

Aus der Frauenklinik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Janni

Klinische und molekulare Charakterisierung von Neoplasien
des unteren Genitaltraktes

Dissertation

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

vorgelegt von

Elisabeth Roeling

2012

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

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

Referentin: apl. Prof. Dr. Monika Hampf
Korreferent: PD Dr. Guido Kobbe

ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund: Im Bereich des unteren Genitaltrakts ist die Transformation von Epithelzellen zu invasiven Läsionen, im Gegensatz zur Krebsentstehung im Zervikalbereich, bisher nur unzureichend verstanden. Es bestehen HPV-assoziierte, als auch HPV-unabhängige Mechanismen. Viele Patientinnen leiden an multizentrischen Läsionen und Rezidive sind häufig. Eine steigende Inzidenz von Läsionen des unteren Genitaltrakts ist in den letzten Jahrzehnten insbesondere bei jüngeren Frauen beobachtet worden.

Zielsetzung: Es erfolgte die Analyse solitärer und multizentrischer Läsionen des unteren Genitaltrakts bezüglich klinischer Charakteristika sowie molekularer Marker, mit besonderem Augenmerk auf Eigenschaften und mögliche Ursachen metachroner und multizentrischer Befunde.

Material und Methoden: 126 Patientinnen zweier großer kolposkopischer Einrichtungen mit Pathologien im Bereich des unteren Genitaltrakts wurden eingeschlossen. 196 Gewebeproben, davon 131 vulväre, 15 vaginale, 23 anale und 24 zervikale Läsionen, wurden hinsichtlich Histologie, HPV-Status und immunhistochemischer p16-Färbung als Marker einer HPV-Infektion untersucht.

Ergebnisse: Es wurden im untersuchten Gesamtkollektiv zwei Patientinnengruppen identifiziert: Kollektiv I = Frauen mit solitären Läsionen des unteren Genitaltrakts (44 Patientinnen) und Kollektiv II = Frauen mit multizentrischen und/oder metachronen Läsionen (82 Patientinnen mit 148 Läsionen). Das mittlere Alter der Frauen mit solitären Läsionen betrug 50,8 Jahre, das der Frauen mit multizentrischen bzw. metachronen Befunden 40,8 Jahre. 59,5 % (25 von 42) der Gewebeproben des ersten Kollektivs waren HPV positiv, demgegenüber 92,8 % (129 von 139) der Proben im zweiten Kollektiv, davon 114 Proben (82 %) high risk-positiv. Der Anteil der p16-positiven Proben unterschied sich nicht wesentlich zwischen den Kollektiven. Es bestand jedoch eine enge Korrelation zwischen p16- und HPV-Status (positiver prädiktiver Wert 96,7 %).

Fazit: Es konnte gezeigt werden, dass zwei Patientinnengruppen mit Läsionen des unteren Genitaltrakts existieren, von denen eine ein höheres Risiko für rezidivierende HPV-induzierte Läsionen aufweist. Gleichzeitig wurde das Potential von p16INK4a als ergänzendes Werkzeug zur Diagnostik HPV-assoziiertes intraepithelialer wie invasiver Läsionen im Bereich der Vulva unterstrichen.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

5-FU	5-Fluorouracil	ISSVD	International Society for the Study of Vulvar Disease
Aqua bidest	Bidestilliertes Wasser		
bp	Basenpaar(e)		
Bak	Bak-Protein, Teil der Bcl-Protein-Familie	HCl	Salzsäure
Bcl	Regulatorproteine für die Apoptose (Bcl = b- cell-lymphoma)	HE	Hämatoxylin Eosin
		HIV	Human immunodeficiency virus
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	HMB 45	Monoklonaler Maus- Antikörper HMB 45
Ca in situ	Carcinoma in situ	HPV	Humanes Papillomavirus
CDK	Cyclin dependent kinase	hr	High risk
CDKN2A	<i>CDK</i> inhibitor 2A	HSV-2	Herpes-simplex-Virus Typ 2
(C, V, A) Cond.ac.	Zervikales, vulvares, anales Condyloma acuminatum	KCl	Kaliumchlorid
(C, Va, V, A) IN 1-3	Zervikale, vaginale, vulväre, anale intraepitheliale Neoplasie Grad 1-3	KH₂PO₄	Kalium- dihydrogenphosphat
(C, V) SCC	Cervical, vulvar squamous cell carcinoma	Ki-67	Ki-67 Protein, Proliferationsmarker
		L-Gene	“Late“-Gene im HPV- Replikationszyklus
DAB	Diaminobenzidine	lr	Low risk
DNA	Deoxyribonucleic acid	M	Molar
E-Gene	“Early“-Gene im HPV- Replikationszyklus	MCM5	Minichromosome maintenance protein 5
E2F	E2-Promotor Binding Factor	mRNA	Messenger <i>RNA</i>
		na	Not available
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique	NaCl	Natriumchlorid
G0-Phase	Ruhephase (Zellzyklus, G = gap)	Na₂HPO₄	Dinatrium- hydrogenphosphat
G1-Phase	1. Interphase-Stadium (Zellzyklus, G = gap)	neg	Negativ
		p16^{INK4a}	P16 ^{INK4a} -Protein, <i>CDK</i> - Inhibitor (INK4a = inhibitor of kinase 4)
		p53	Tumorsuppressor- protein p53

PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction
pos	Positiv
Poly-A-Sequenz	Abschnitt der <i>mRNA</i> aus Polyadenylsäure
Rb	Retinoblastomgen
RNA	Ribonucleic acid
RT-PCR	Reverse transcription <i>PCR</i>
S100	S100-Protein, Gruppe von kalzium-bindenden Proteinen
S-Phase	2. Interphase-Stadium (Zellzyklus, Synthesephase)
UFK	Universitätsfrauenklinik
UV-Licht	Ultraviolettes Licht

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Nichtinvasive Läsionen der Vulva	1
1.1.1	Vulväre intraepitheliale Neoplasie: VIN	1
1.1.1 a)	Klassische VIN 3, HPV-induziert	3
1.1.1 b)	Differenzierte VIN (Simplextyp), HPV-unabhängig	4
1.1.1 c)	VIN: Diagnose, Therapie und Prävention	5
1.1.2	Weitere Erkrankungen der Vulva, Differentialdiagnosen	6
1.2	Maligne Tumoren der Vulva	7
1.2.1	Plattenepithelkarzinome	7
1.2.1 a)	Keratinisierendes Plattenepithelkarzinom/ invasives Plattenepithelkarzinom not otherwise specified (=NOS)	8
1.2.1 b)	HPV-positive Plattenepithelkarzinome	9
1.2.2	Andere Tumoren der Vulva	10
1.2.3	Therapie der Vulvakarzinome	10
1.3	Humane Papillomaviren (HPV)	11
1.3.1	HPV-Klassifikation	11
1.3.2	HPV-Struktur und Genom-Organisation	11
1.3.3	HPV-induzierte Erkrankungen	12
1.3.4	HPV-Pathogenese	13
1.4	p16^{INK4a}	15
1.4.1	Bedeutung im Zellzyklus	15
1.4.2	p16 ^{INK4a} als Biomarker	15
1.5	Ziele dieser Arbeit	17
2	MATERIAL UND METHODEN	18
2.1	Material	18
2.1.1	Reagenzien und Chemikalien	18
2.1.2	Geräte	18
2.1.3	Puffer und Lösungen	19
2.1.4	Kommerzielle Reagenzien	19
2.1.5	Zelllinien	20

2.2 Methoden	20
2.2.1 Patientinnen/Gewebeproben	20
2.2.2 HPV-Typisierung	21
2.2.3 Herstellung der Gewebe-Schnitte	21
2.2.4 HE-Färbung	21
2.2.5 p16-Immunhistochemie	22
2.2.6 Mikroskopische Bewertung	24
2.2.7 Statistische Auswertung	25
3 ERGEBNISSE	26
3.1 Beschreibung der Läsionen	26
3.1.1 Das Gesamtkollektiv	26
3.1.2 Die Einzelkollektive	32
3.1.3 Multizentrität und Metachronizität	33
3.2 Klinische Parameter	37
3.2.1 Alter	37
3.2.2 Zigarettenkonsum	39
3.2.3 Einnahme von Hormonpräparaten	40
3.2.4 Parität	42
3.3 Biomarker	43
3.3.1 <u>HPV-Status</u>	43
3.3.1 a) HPV-Status unabhängig von Grad und Lokalisation der Läsionen	43
3.3.1 b) HPV-Status abhängig von der Befund-Lokalisation	45
3.3.1 c) HPV-Status abhängig von dem Läsionsgrad	50
3.3.1 d) HPV-Status versus Alter	50
3.3.1 e) HPV-Status versus Zigarettenkonsum	51
3.3.2 <u>p16-Status</u>	51
3.3.2 a) p16-Status abhängig von dem Läsionsgrad	52
3.3.2 b) p16-Status abhängig von der Befund-Lokalisation	55
3.3.2 c) p16- versus HPV-Status	57
3.3.2 d) Interindividuelle Übereinstimmung p16-Beurteilung	60
4 DISKUSSION	62
4.1 Übersicht	62
4.2 Metachronizität und Multizentrität	62
4.3 Die Einzelkollektive	63

4.4 Biomarker I, HPV-Status	66
4.4.1 Bedeutung im Bereich des unteren weiblichen Genitaltrakts	66
4.4.2 HPV-Subtypisierung	68
4.4.3 Zusammenhang HPV-induzierter Läsionen mit klinischen Parametern	69
4.5 Biomarker II, p16^{INK4a}-Immunhistochemie	71
4.5.1 Studienlage	71
4.5.2 p16-Immunhistochemie in der vorliegenden Arbeit	72
4.5.3 Interobservervarianz	73
5 SCHLUSSFOLGERUNGEN	74
6 LITERATURVERZEICHNIS	75

1 EINLEITUNG

1.1 Läsionen der Vulva

1.1.1 Vulväre intraepitheliale Neoplasie: VIN

Die VIN ist eine häufige Präkanzerose des Vulvakarzinoms [1, 2]. Neueste Daten zeigen, dass in den letzten 30 Jahren die Inzidenz der VIN um 400 % zugenommen hat [3, 4]. Sie liegt heute bei ca. 7/100.000 Frauen. Gleichzeitig ist das Durchschnittsalter der Frauen mit einer VIN gesunken [1, 5, 6]. Als Grund für diese Entwicklung wird eine steigende Infektionsrate mit Humanen Papillomaviren (HPV), eine der Hauptursachen der VIN bei jüngeren Patientinnen, sowie eine verbesserte Diagnosestellung angegeben [1]. Die HPV-induzierte VIN tritt heute meist vor dem 50. Lebensjahr auf [5-7].

1986 wurde von der „International Society for the Study of Vulvar Disease“ (ISSVD) eine Klassifikation der VIN festgelegt. Demzufolge werden leichte, mäßige und schwere Dysplasien (VIN 1-3) unterschieden. Die Einteilung erfolgt nach dem Ausmaß, in dem das normale Plattenepithel durch dysplastische Zellen ersetzt ist. Beschränken sich Letztere auf das untere Epitheldrittel, spricht man von einer VIN 1, ist auch das mittlere Drittel betroffen handelt es sich um eine VIN 2 (Abb. 1.1-3) Häufig zeigen sich diese beiden Stadien im Randbereich einer VIN 3, sind aber auch isoliert anzutreffen [1].

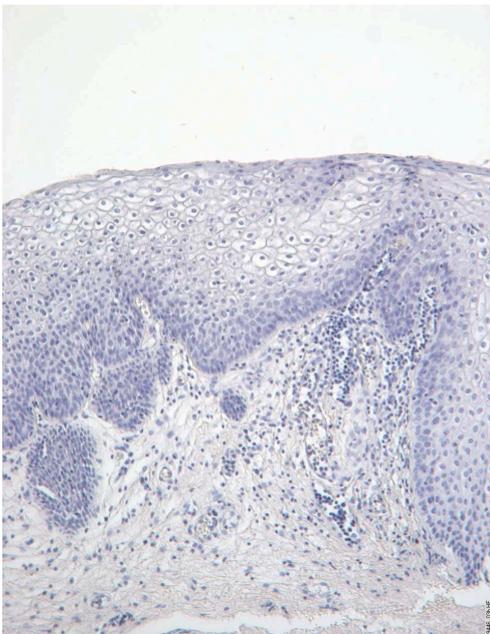


Abb. 1.1: **VIN 1 histologisch**; VIN 1 = vulväre intraepitheliale Neoplasie Grad 1

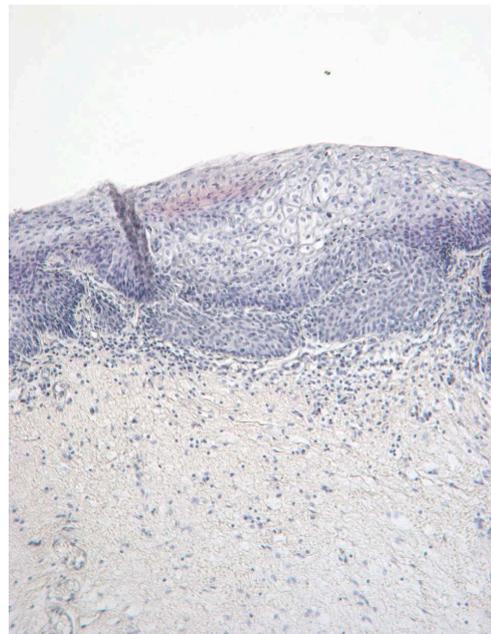


Abb. 1.2: **VIN 2 histologisch**; VIN 2 = vulväre intraepitheliale Neoplasie Grad 2



Abb. 1.3: **VIN 2 makroskopisch**; VIN 2 = vulväre intraepitheliale Neoplasie Grad 2

In der Bezeichnung VIN 3 (Abb. 1.4-6), die eine Ausdehnung der Läsion über die gesamten Epithelschichten beinhaltet, sind die alten Termini „Ca in situ“, „Morbus Bowen“, „bowenoide Papulose“ sowie die „Erythroplasie Queyrat“ subsumiert. Weitere Bestandteile der Klassifikation der ISSVD sind die intraepitheliale Form des Morbus Paget an der Vulva, die sonst eher an der Mamma anzutreffen ist, und das Melanoma in situ. Die Kategorie VIN 3 weist darüber hinaus eine weitere Differenzierung in die klassische und differenzierte Form auf, die mit der Assoziation der jeweiligen Läsion zu Humanen Papillomaviren zusammenhängt.

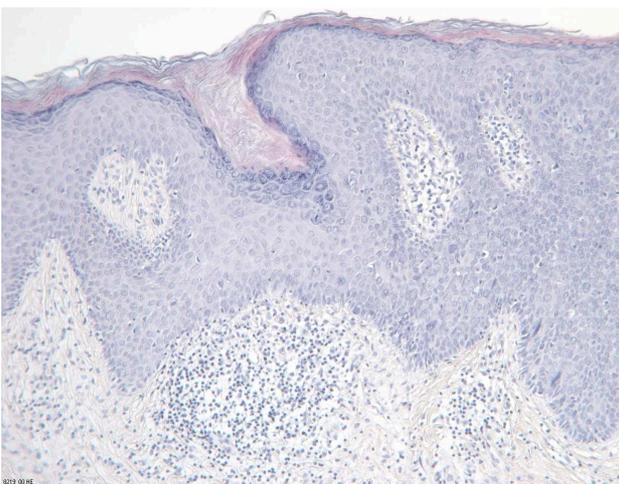


Abb. 1.4: **VIN 3 histologisch**; VIN 3 = vulväre intraepitheliale Neoplasie Grad 3



Abb. 1.5: **VIN3 makroskopisch**; VIN 3 = vulväre intraepitheliale Neoplasie Grad 3



Abb. 1.6: **VIN3 makroskopisch**; VIN 3 = vulväre intraepitheliale Neoplasie Grad 3

2004 erfolgte eine Modifikation der dargestellten Klassifikation der ISSVD von 1986: Der Terminus VIN soll sich demzufolge nur noch auf die ehemaligen Entitäten VIN 2 und 3, also die hochgradigen intraepithelialen Läsionen beziehen, wohingegen die Bezeichnung VIN 1 aufgegeben wird, da sie klinisch ohne Krankheitswert ist [8]. In der WHO-Klassifikation der Zervix-assoziierten Tumorstufen wird dagegen der Begriff der zervikalen intraepithelialen Neoplasie Grad 1 (CIN 1) beibehalten und bezeichnet die akute produktive HPV-Infektion, welche mit Koilozyten, Akanthose, Para- und Hyperkeratose einhergeht und sowohl von high und low risk-HPV-Typen (s.u.) verursacht werden kann [9, 10].

1.1.1 a) Klassische VIN 3, HPV-induziert

Bei der klassischen VIN werden zwei Subtypen abgegrenzt, der basaloide und der kondylomatöse Typ. Beide sind gewöhnlich mit einer HPV-Infektion verbunden [7]. Kennzeichnend für den basaloiden Typ ist u.a. ein verbreitertes Epithel mit relativ glatter Oberfläche. Hingegen besitzt der kondylomatöse Typ eine unregelmäßige, papillomatöse Oberfläche mit ausgeprägter Hyper- und Parakeratose, bei gleichsam verdicktem Epithel. Gemeinsam ist beiden Subtypen die atypische Ausreifung des Epithels. Neben den Reinformen finden sich Überlappungen und Mischtypen [1, 7, 11, 12].

Ein Großteil der VIN 3-Fälle ist HPV-induziert, wobei hauptsächlich der HPV-Typ 16 aus den Läsionen isoliert werden kann [7, 13-15]. Die betroffenen Patientinnen sind im Vergleich zu denjenigen mit einer HPV-negativen Läsion im Durchschnitt jünger [6, 16-18].

HPV-assoziierte Läsionen des unteren Genitaltraktes treten häufig multifokal oder multizentrisch auf. Dabei können mehrere Stellen der Vulva oder der Analregion (= multifokal), aber auch das Vaginal- und Zervikalepithel betroffen sein (= multizentrisch). Das

Spektrum der beobachteten simultanen Läsionen reicht vom benignen Condyloma acuminatum über intraepitheliale Neoplasien bis hin zum invasiven Karzinom. Dies macht eine eingehende Untersuchung des gesamten unteren Genitaltrakts einschließlich der Zervix und der Analregion erforderlich, um synchron vorliegende Dysplasien oder invasive Prozesse nicht zu übersehen. Weiterhin ist die regelmäßige Nachsorge der Frauen unabdingbar, um metachrone Läsionen bzw. Rezidive - ein häufiges Ereignis bei der HPV induzierten VIN - frühzeitig zu erkennen [6, 7, 14, 16, 19].

Einen wichtigen Risikofaktor in der Pathogenese der klassischen VIN stellt der Nikotinabusus dar [7, 12, 20], aber auch häufig wechselnde Geschlechtspartner, HIV oder eine Immunsuppression anderer Genese bedeuten ein erhöhtes Risiko [21, 22].

Der Anteil der HPV 16-positiven Läsionen ist größer bei höhergradigen VIN-Läsionen [23], vergleichbar zur Verteilung in CIN-Läsionen.

1.1.1 b) Differenzierte VIN (Simplextyp), HPV-unabhängig

Der differenzierte Typ der VIN ist üblicherweise nicht mit einer HPV-Infektion verbunden [17, 23, 24]. Diese Form der VIN entsteht häufig auf dem Boden anderer Epitheldefekte der Vulva wie Lichen sclerosus et atrophicus und Plattenepithelhyperplasien. Auch fällt bei einem Teil der Läsionen die immunhistochemische Färbung für Protein p53 (Tumorsuppressorprotein) positiv aus, entsprechende Färbungen der klassischen VIN-Fälle erbrachten dagegen ein negatives Ergebnis [6, 12, 18, 24]. Im Unterschied zur klassischen Variante der VIN 3 sind die Epithelzellen hochgradig differenziert, ausgeprägte Atypien bleiben auf die basalen Zellschichten beschränkt („basale Atypie“). Daher besteht leicht die Möglichkeit, eine derartige Läsion zu übersehen oder irrtümlicherweise eine Plattenepithelhyperplasie zu diagnostizieren. P53 stellt möglicherweise einen geeigneten Biomarker zur besseren Differenzierung dar [1, 12, 18, 19]. Ein Problem in der Diagnostik von differenzierten VIN-Läsionen stellt die Abgrenzung zum invasiven Plattenepithelkarzinom dar, vor allem im Frühstadium, da sich die Zellmuster stark ähneln [1, 12, 17, 24].

Der Anteil der HPV-negativen, differenzierten VIN 3 an der Gesamtzahl der VIN 3-Fälle ist gering [7, 12, 13], wohingegen man sie häufig im Zusammenhang mit invasiven Karzinomen finden kann. Der Simplextyp gilt daher auch als der wahrscheinliche Vorläufer von HPV-negativen invasiven Plattenepithelkarzinomen der Vulva [12, 23, 24]. Das Durchschnittsalter der Patientinnen mit der HPV-negativen Form der VIN ist deutlich höher als bei der klassischen VIN [6, 17, 18, 24, 25].

1.1.1 c) VIN: Diagnose, Therapie und Prävention

Klinisches Symptom der VIN ist in vielen Fällen Pruritus, des Weiteren werden tastbare Erhabenheiten, weißliche Epithelveränderungen und Schmerzen angegeben. Ein Teil der Patientinnen präsentiert sich jedoch auch ohne klinische Symptome, die Diagnose stellt einen Zufallsbefund dar [6, 26].

Nach der reinen Inspektion ist die Kolposkopie bzw. Vulvoskopie eine geeignete Methode pathologische Veränderungen der Vulva zu erkennen. Als weitere Hilfsmittel werden im Rahmen dieser Untersuchung die Applikation von 3%iger Essigsäure und die Toluidinblauprobe eingesetzt [27-30]. Es folgt bei entsprechendem Verdacht eine Biopsie mit anschließender histologischer Aufarbeitung. Da HPV-positive intraepitheliale Neoplasien der Vulva einen großen Anteil ausmachen und gleichzeitig der direkte Virusnachweis relativ viel Aufwand erfordert, ist ein Ziel dieser Arbeit, die Bedeutung des CDK (cyclin dependent kinase) -Inhibitors p16^{INK4a} (s.u.) für die Diagnostik HPV-assoziiertes Läsionen zu untersuchen.

Nach Diagnosestellung einer VIN gibt es mehrere Therapieansätze mit unterschiedlicher Effektivität: Neben der chirurgischen Exzision und (Skinning-) Vulvektomie, stellen die CO₂-Laservaporisation und -exzision etablierte Verfahren dar. Auch Kombinationen aus chirurgischer und Laser-Therapie werden durchgeführt. Neuere Therapieansätze repräsentieren lokale Behandlungen mit Immunmodulatoren.

Eine große Studie von Jones et al. ergab eine hohe Rezidivrate nach chirurgischer Exzision und/oder CO₂-Laservaporisation von ungefähr 50 %. Darüber hinaus zeigte diese Studie ein hohes Risiko der Entwicklung eines invasiven Vulvakarzinoms für unbehandelte Frauen über 30 Jahre [5]. Ähnliches wurde schon in früheren Untersuchungen von Jones beobachtet [26]. Auch in anderen Studien waren die Rezidivraten zum Teil hoch [6, 31, 32], auf der anderen Seite konnten Penna et al. für die Laserexzision und -vaporisation relativ gute Ergebnisse aufzeigen [33]. Niedrige Rezidivraten fanden sich nach (Skinning) Vulvektomie [32] sowie nach einer Kombination aus chirurgischer partieller Vulvektomie und anschließender Laserablation [34]. Die Bedeutung einer HPV-Infektion für die Prognose wird unterschiedlich bewertet [19, 31, 32], wahrscheinlich ist die Progressionsrate HPV-induzierter Läsionen geringer.

Ein neuerer Therapieansatz ist die lokale Behandlung mit Imiquimod (Aldara®), einem Immunmodulator in Salbenform. Imiquimod aktiviert den Toll-like-Rezeptor 7 (TLR-7) und führt zu einer lokalen Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen. Die Erfolge der bislang durchgeführten klinischen Studien sind uneinheitlich [35-37]. Ein deutlicher Vorteil der Imiquimodbehandlung liegt in der Möglichkeit, die Integrität der Vulva zu erhalten.

Seit kurzem gibt es die Möglichkeit der Primärprävention HPV induzierter Erkrankungen: Die prophylaktische Impfung gegen HPV hat eine ausgezeichnete Effektivität. Seit Oktober 2006

befindet sich der HPV-Impfstoff Gardasil® (Entwicklung: Merck & Co.; europäischer Vertrieb: Sanofi Pasteur MSD) auf dem europäischen Markt, der für Frauen zwischen 9 und 26 Jahren, sowie für männliche Jugendliche zwischen 9 und 15 Jahren zugelassen ist. Der Impfstoff enthält Hüllprotein der HPV-Typen 6, 11, 16 und 18. Während die Typen 6 und 11 für ungefähr 90% der Kondylome des Genitalbereiches verantwortlich sind [38], verursachen Letztere circa 70 bzw. 40 % der VINs respektive der Vulvakarzinome [15].

Der Zulassung von Gardasil® folgte im März 2007 die Empfehlung zur generellen Impfung gegen humane Papillomaviren für Mädchen zwischen 12 und 17 Jahren durch die Ständige Impfkommission [39]. In Phase-3-Studien zur Effektivität quadrivalenter Impfstoffe gegen die HPV-Typen 6, 11, 16 und 18 konnte eine signifikante Reduktion HPV-assoziiertes Läsionen bei jungen Frauen, die im Vorfeld der Impfung negativ für die entsprechenden Virustypen waren, gezeigt werden [8, 40-42].

Im September 2007 wurde ein zweiter HPV-Impfstoff, Cervarix® (GlaxoSmithKline), für Mädchen und Frauen zwischen 10 und 25 Jahren zugelassen. Dieser richtet sich gegen die HPV-Typen 16 und 18. Die Effektivität der Impfung war vergleichbar mit derjenigen von Gardasil® [43-46].

Die HPV-Impfung scheint keine relevanten Nebenwirkungen zu haben [47].

1.1.2 Weitere Erkrankungen der Vulva, Differentialdiagnosen

Wichtige Differentialdiagnosen der VIN sind der intraepitheliale Morbus Paget, das oberflächlich ausgebreitete Melanoma in situ, Condylomata acuminata, der Lichen sclerosus et atrophicus, die einfache Hyperkeratose oder die Leukoplakie [1, 12].

Der Morbus Paget präsentiert sich primär als intraepitheliale Neoplasie mit dem Potential der Progression in ein Paget-Karzinom und weist die typischen großen, hellen Paget-Zellen auf. [1]. Das Melanoma in situ der Vulva lässt sich durch immunhistochemische Färbungen für S100 und HMB 45 abgrenzen [1, 48].

Im Gegensatz zu diesen beiden Differentialdiagnosen sind Condylomata acuminata der Vulva, Vagina und Zervix mit einer Inzidenz von ca. 1% der weiblichen Bevölkerung eine häufige Erkrankung und gutartig [22]. Sie werden meist durch die low risk-HPV-Typen 6 und 11 hervorgerufen und stehen laut einer chinesischen Untersuchung an erster oder zweiter Stelle der sexuell übertragenen Krankheiten [49]. Morphologisch sind sie durch ein exophytisches Wachstum mit papillomatösen und verrukösen Formen gekennzeichnet. Ein wichtiges histologisches Merkmal der Kondylome sind die durch die HPV-Infektion hervorgerufenen Koilozyten. Nukleäre Atypien liegen generell nicht vor. Eine Ausnahme hiervon bildet das atypische Kondylom, das in der Regel durch high risk-HPV-Typen hervorgerufen wird [1, 50].

Eine relativ seltene, chronisch-progrediente Erkrankung, die bevorzugt Frauen der weißen ethnischen Gruppe betrifft, wird durch den Lichen sclerosus et atrophicus repräsentiert. Er führt zu einem atrophischen Schwund der Schamlippen mit starkem Juckreiz (Craurosis vulvae). Dies entspricht histopathologisch einer Atrophie der Epidermis mit reaktiver Hyperkeratose sowie einem lymphozytären Infiltrat der Dermis mit frühzeitiger Zerstörung vor allem der elastischen Fasern [51]. Das Krankheitsbild repräsentiert eine wichtige Differentialdiagnose zur VIN. Eine Abgrenzungsmöglichkeit, zumindest zur klassischen VIN, stellen HPV-Nachweis und p16-Immunhistochemie dar.

1.2 Maligne Tumoren der Vulva

1.2.1 Plattenepithelkarzinome

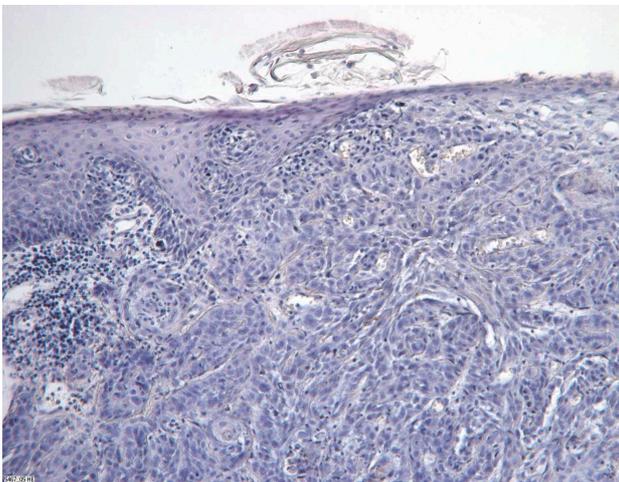


Abb. 1.7: **VSCC histologisch**; VSCC = vulvar squamous cell carcinoma

Die Inzidenz des invasiven Plattenepithelkarzinoms (Abb. 1.7) liegt bei 1–2/100.000 Frauen/Jahr, womit es ungefähr 3,5-8 % der malignen Tumoren des weiblichen Genitaltrakts und 95% der Malignome der Vulva ausmacht. Die Inzidenz steigt mit zunehmendem Alter, der Altersgipfel liegt bei 60-80 Jahren [1, 52]. Weltweit ist die Inzidenzrate in den letzten Jahren relativ stabil geblieben [1, 53] bzw. hat nur wenig zugenommen (20 %) [3]. Der Anteil der jungen Frauen mit Plattenepithelkarzinomen der Vulva ist demgegenüber deutlich gestiegen [54, 55]. Bezogen auf Deutschland ergaben neuere Erhebungen eine Zunahme der Inzidenz des Vulvakarzinoms in den letzten Jahren [56, 57].

Die Stadieneinteilung des Vulvakarzinoms erfolgt zum einen nach der TNM-Klassifikation (T = Tumor; N = Nodi/regionäre Lymphknoten; M = Fernmetastasen) der Union Internationale Contre le Cancer (www.uicc.org), zum anderen nach den FIGO-Stadien der Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (www.figo.org).

Es wird heute angenommen, dass sich die invasiven Neoplasien der Vulva, ähnlich wie die intraepithelialen Neoplasien, grob in zwei verschiedene Formen einteilen lassen. Unterscheidungskriterium neben der Morphologie ist auch hier die Assoziation zu einer high risk-HPV-Infektion [11, 23, 58]. Die Datenlage bezüglich der Prognose ist uneinheitlich: während in der Studie von Monk et al. Frauen mit HPV-negativen Karzinomen schlechtere Überlebenszeiten aufwiesen [59], wurde in der Studie von Pinto et al. keine Beeinflussung der Überlebenszeit der Patienten durch den HPV-Status festgestellt [60]. Das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen war dagegen bei mehreren Studien mit einer ungünstigeren Prognose verbunden [27, 52, 59-61]. Ein weiterer Prognosefaktor ist der Sicherheitsabstand. Ein Abstand von ≥ 8 mm erscheint bedeutsam für eine höhere loko-regionäre Kontrolle [61]. Insgesamt betrachtet liegt die 5-Jahresüberlebensrate (5-JÜR) aller Vulvakarzinome bei 30-50 %. Die stadienabhängige 5-JÜR beträgt bei FIGO I 90 %, bei FIGO II 60 % und bei FIGO III 50 %. Von den Patientinnen mit einem FIGO IV-Tumor leben nach 5 Jahren noch 20 % [52].

Als allgemeine Risikofaktoren für die Entwicklung eines Vulvakarzinoms wurden bisher eine hohe Anzahl an Geschlechtspartnern (damit zusammenhängend ein frühzeitiger erster Geschlechtsverkehr sowie ein niedriger sozioökonomischer Status), anamnestische Kondylome, Tabakkonsum und HSV-2-Infektionen genannt [62, 63]. Bei Brinton et al. wurde jedoch keine Adjustierung bezüglich des HPV-Status durchgeführt. Dagegen untersuchten Madelaine et al. den Zusammenhang von Tabakkonsum respektive HSV-2-Infektionen und der Entwicklung von invasiven Vulva-Läsionen gesondert für HPV-negative und HPV-positive Fälle. Für beide Parameter ergab sich ein ursächlicher Zusammenhang zur Karzinomentwicklung unabhängig vom HPV-Status. Es ist nicht auszuschließen, dass die restlichen der oben angeführten Faktoren eher das Risiko für den Erwerb einer HPV-Infektion beschreiben.

1.2.1 a) Keratinisierendes Plattenepithelkarzinom/Invasives Plattenepithelkarzinom not otherwise specified (=NOS)

Das keratinisierende Plattenepithelkarzinom der Vulva geht nur in wenigen Fällen mit einer HPV-Infektion einher [11, 58, 59]. Es ähnelt darin, ebenso wie in der Morphologie, dem differenzierten Typ der VIN, der als eine direkte Vorstufe des invasiven Karzinoms angesehen wird [12, 24, 64].

Makroskopisch zeigen „gewöhnliche“ Plattenepithelkarzinome entweder ein endophytisch-ulzerierendes oder ein exophytisches Wachstum [1]. Mikroskopisch weisen die Zellen einen hohen Differenzierungsgrad auf. In der Studie von Lee et al. fanden sich im Gegensatz zu HPV-positiven Plattenepithelkarzinomen Punktmutationen im p53-Gen [65]. In einer späteren Studie belegten Santos et al. wiederum eine hohe p53-Expression für einen Großteil der

keratinisierenden Plattenepithelkarzinome [18]. Eine Variante der exophytischen Form bildet das verruköse Karzinom (Riesenkondylom Buschke-Löwenstein) [1, 2]. Diese Form ist zwar nicht high risk-HPV-positiv, doch besteht eine Assoziation zu den low risk-HPV-Typen 6 und 11 [66]. Als weitere Varianten des keratinisierenden Plattenepithelkarzinoms sind das meist nicht verhornende riesenzellige (anaplastische) Plattenepithelkarzinom, das spindelzellige und das akantholytische Plattenepithelkarzinom zu nennen [1].

Das HPV-negative Vulvakarzinom tritt üblicherweise unifokal auf und auch metachrone Läsionen werden selten beobachtet [59, 67, 68]. Benachbarte Epithelveränderungen stellen die Plattenepithelhyperplasie, der Lichen sclerosus sowie die differenzierte VIN dar [11, 24, 67, 69].

Die betroffenen Frauen sind in der Regel weit fortgeschrittenen Lebensalters, das heißt 70 Jahre und älter [11, 59, 69-71]. Es kommen jedoch durchaus Fälle von jungen Patientinnen mit hochdifferenzierten Plattenepithelkarzinomen vor [55]. In dieser Altersstufe besitzen Letztere jedoch keine herausragende Bedeutung [16, 54, 55]. Der Anteil der HPV-negativen Karzinome an der Gesamtheit der Tumore variiert in den verschiedenen Studien von 40 %-100 %, wobei vor allem jüngere Studien darauf hinweisen, dass er unter 50 % liegt [11, 13, 15, 23, 59, 65, 67, 70-72].

1.2.1 b) HPV-positive Plattenepithelkarzinome

Wie auch bei der klassischen VIN stellt HPV 16 den dominanten Virustyp in diesen Läsionen dar. Des Weiteren werden Infektionen mit den HPV-Typen 18, 33 und 45 beobachtet [11, 13, 15, 59, 67, 70, 72].

Ebenso wie die HPV-assoziierten intraepithelialen Neoplasien lassen sich die HPV-positiven Vulvakarzinome in basaloide und kondylomatöse Formen einteilen. Ihnen benachbart liegt häufig eine klassische VIN [11, 54, 67, 69, 70]. Auch können wie bei der klassischen VIN syn- und metachrone intraepitheliale und invasive Läsionen an anderen Stellen des Anogenitaltrakts auftreten [16, 59, 67, 68].

Als Differentialdiagnosen des basaloiden Karzinoms kommen das ebenfalls zu den Plattenepithelkarzinomen zählende Basalzellkarzinom der Vulva (s.u.), das Merkel-Zell-Karzinom mit einem viel diffuseren Wachstumsmuster sowie sekundäre kleinzellige Tumoren in Frage [1]. Kondylomatöse Plattenepithelkarzinome wachsen exophytisch und müssen von dem verrukösen Karzinom (s.o.) abgegrenzt werden.

Patientinnen mit HPV-assoziierten Karzinomen sind in der Regel jünger als 60 Jahre [11, 55, 59, 67, 69-71] und ähnlich wie bei der klassischen VIN zählen Rauchen [59, 63, 73] und Immunsuppression [22] zu den Risikofaktoren. Studienergebnisse in Bezug auf den Anteil, den HPV-assoziierte Tumoren an den Plattenepithelkarzinomen der Vulva ausmachen, sind uneinheitlich (s.o.).

1.2.2 Andere Tumore der Vulva

Andere Malignome sind eher selten an der Vulva anzutreffen. Sie beinhalten unter anderem das Maligne Melanom, den Morbus Paget der Vulva, das Basalzellkarzinom/Basaliom und Karzinome der Bartholinschen-Drüse. Die ersten beiden sind oben bereits als Differentialdiagnosen zur VIN beschrieben.

Das Basalzellkarzinom der Vulva macht ungefähr 5 % der Vulvakarzinome aus und betrifft vor allem Patientinnen im höheren Lebensalter [27]. Während in einigen Studien eine Assoziation mit HP-Viren unabhängig von der Lokalisation nicht nachgewiesen werden konnte [74, 75], fanden Shamanin et al. bereits 1996 verschiedene HPV-Typen in Basalzellkarzinomen sowohl immunsupprimierter als auch immunkompetenter Patienten [76]. Karzinome der Bartholinschen Drüse sind Adenokarzinome und gehören ebenfalls zu den seltenen Vulvamalignomen [1, 27].

1.2.3 Therapie der Vulvakarzinome

Kriterien, die das therapeutische Vorgehen beeinflussen, sind auf der einen Seite die Ausdehnung des Tumors sowie der Lymphknotenbefall, welcher schon bei geringer Infiltrationstiefe vorliegen kann, auf der anderen Seite das Alter, die Operationsfähigkeit und die Wünsche der Patientin.

Lediglich bei FIGO Ia (Tumortiefe < 1 mm) ist die lokale Exzision im Gesunden mit einem Sicherheitsabstand von 1-2 cm ausreichend, da in diesem Stadium das Risiko der Lymphknotenmetastasierung fast 0 % beträgt. Liegen in der Umgebung des Tumors zeitgleich eine VIN oder andere Dermatosen vor, wird bei älteren Patientinnen eine einfache Vulvektomie, bei jüngeren eine Kombination aus lokaler Exzision weit im Gesunden und einer konservierenden Behandlung der umgebenden Hautbezirke z.B. mittels CO₂-Laser bevorzugt. Bei FIGO Ib erfolgt zusätzlich zur lokalen Exzision die ipsi- oder bilaterale inguinofemorale Lymphknotenresektion. Höhere Stadien erfordern eine radikale Vulvektomie (Resektion der großen und kleinen Schamlippen sowie beidseitige Entfernung der inguinalen und femoralen Lymphknoten). Im Falle positiver inguinaler Lymphknoten muss auch die Entfernung der pelvinen Lymphknoten oder eine Bestrahlung des kleinen Beckens erfolgen. Je nach Ausdehnung des Tumors werden die unteren Anteile der Vagina oder ein Stück der Urethra reseziert.

Eine postoperative Radiatio wird, neben der Indikation im Falle positiver inguinaler Lymphknoten, bei nicht radikal resezierbaren Tumoren, z.B. FIGO IVA, oder palliativ eingesetzt, gegebenenfalls in Kombination mit einer Chemotherapie (Cisplatin/5-FU). Eine alleinige Chemotherapie zeigt nur geringe Ansprechraten von wiederum nur kurzer Dauer und wird selten eingesetzt [27, 52].

Ein neueres Verfahren zur präoperativen Diagnostik besteht in der Sentinel-Lymphknoten-Entfernung, welche z.B. bei Patientinnen mit Mammakarzinom oder beim Malignen Melanom bereits klinisch angewandt wird. In Bezug auf das Vulvakarzinom lieferte diese Methode ebenfalls in einigen Studien zuverlässige Informationen über das Vorliegen oder Nicht-Vorliegen einer Metastasierung in die inguinalen Lymphknoten [77-79]. Der Einsatz beim Vulvakarzinom sollte jedoch bis zum Vorliegen größerer Zahlen nur unter Studienbedingungen erfolgen, da übersehene metastatisch befallene Lymphknoten in der Leiste für die Frauen immer ein Todesurteil bedeuten und auch „Pitfalls“ der Methode beschrieben sind [78, 80].

1.3 Humane Papillomaviren (HPV)

1.3.1 HPV-Klassifikation

Die humanen Papillomaviren gehören zur Familie der Papillomaviridae [63]. Diese beinhaltet neben den humanpathogenen eine große Zahl an tierpathogenen Papillomaviren wie z.B. das CRPV (cottontail rabbit papillomavirus), das BPV (bovine papillomavirus) oder das COPV (canine oral papillomavirus) [81]. Die humanpathogenen Arten verursachen eine Vielzahl von Haut- und Schleimhauttumoren, wobei sich weit über 100 HPV-Genotypen unterscheiden lassen, die in vielen Fällen bestimmten Krankheitsbildern zugeordnet werden können (s.u.) [82-84].

Ein neuer Genotyp ist durch ein Genom definiert, welches in mehr als 10 % von der Abfolge der Nukleotidsequenz im L1-Gen eines jeden bis dahin isolierten Genotyps abweicht. Um eine Übersicht über die Fülle der verschiedenen Genotypen zu bekommen, nutzt man den Tropismus der HPV-Typen für bestimmte epitheliale Gewebe, um sie weiter einzuteilen. Dem entsprechend grenzt man die Gruppe der (muko-) kutanen HPV-Typen (z.B. HPV 1-2, 10, 26-29, 37, 38, 46, 47, 49, 50, 57) von der anogenitalen Gruppe (z.B. HPV 6, 11, 16, 18, verschiedene der 30er, 40er, 50er, 60er, 70er) ab. Zur Gruppe der gynäkologisch wichtigen HPV-Viren zählen inzwischen über 40 Typen [84, 85].

1.3.2 HPV-Struktur und Genom-Organisation

In ihrer Struktur ähneln die Papillomaviren den Polyomaviren: Sie enthalten zirkuläre doppelsträngige DNA, besitzen ein ikosaedrisches Kapsid, sind 45-55 nm groß und nackt [83]. Ihr Genom ist jedoch größer als das der Polymaviren und setzt sich im Falle der kutanen Virustypen aus ungefähr 7600 Basenpaaren (bp), im Falle der genitalen Virustypen aus ungefähr 7900 bp zusammen [85].

Nach ihrer Funktion im viralen Replikationszyklus werden die HPV-Gene in early and late unterteilt [85]. Während L1 und L2 für Proteine kodieren, die zum Aufbau des Kapsids und damit der Virusstruktur vonnöten sind, übernehmen die Genprodukte der E-Gene vor allem regulatorische Funktionen in Bezug auf den Erhalt des Genoms, die DNA-Replikation und die Aktivierung des Lysezyklus' [81].

Der restliche, ca. 10% umfassende Bereich des Genoms wird durch die lange Kontrollregion („long control region“, „LCR“) eingenommen. Diese kodiert nicht für Proteine, sondern enthält den Replikationsursprung, Promoter, Transkriptions-Enhancer sowie Poly-A-Sequenzen. Sie trägt damit wesentlich zur Regulation der viralen Genexpression bei [81, 85].

1.3.3 HPV-induzierte Erkrankungen

Entsprechend der Assoziation mit malignen Läsionen werden die HPV-Subtypen als „low risk“ oder „high risk“ bezeichnet [81, 86]. Eine neuere Definition erfolgte 2005 sowie 2009 durch die International Agency for Research on Cancer (IARC). Diese klassifiziert die HPV-Typen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 und 59 als karzinogen, außerdem HPV 68 als wahrscheinlich karzinogen für den Menschen. Eine weitere Gruppe bilden die HPV-Typen 5, 6, 8, 11 und 66 als möglicherweise karzinogen, wobei HPV 66 zwischen 2005 und 2009 als wahrscheinlich karzinogen eingestuft war [87, 88].

Die plantaren, die vulgären und die planen, juvenilen Warzen werden überwiegend durch die low risk-Typen 1, 2, 3, 4 und 10 verursacht [82]. Die seltene Epidermodysplasia verruciformis, die beetartig verschiedene Warzenformen zeigt, ist dagegen vor allem mit den HPV-Typen 5 und 8 assoziiert. Sie kann in 30-60 % der Fälle in ein Plattenepithelkarzinom übergehen, bevorzugte Lokalisation bildet die sonnenexponierte Haut. Dem entsprechend nimmt UV-Licht in der Pathogenese einen wichtigen Stellenwert ein [81, 89, 90].

Die low risk-Typen HPV 6 und 11 sind zum einen im Kopf-/Halsbereich für die Larynxpapillome, zum anderen für die Condylomata acuminata der Anogenitalregion (s.o.) verantwortlich. Ebenso wie die Epidermodysplasia verruciformis weisen Larynxpapillome ein Entartungsrisiko auf [82, 83]. Auch hier tragen externe Faktoren, nämlich die Exposition gegenüber chemischen Substanzen, zur Karzinomentstehung bei [81].

Wissenschaftlich anerkannt und in vielen Studien untersucht ist die ursächliche Rolle der high risk-HPV-Typen 16 und 18 in der Pathogenese des Zervixkarzinoms. Gleiches gilt für HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 und 66 [66, 84, 86, 91-93], jedoch in geringerem Maße. HP-Viren besitzen damit eine große Bedeutung als Kanzerogene, da das Zervixkarzinom den zweithäufigsten Tumor der Frau weltweit darstellt [87], mit geschätzten 493.000 Neuerkrankungen und 274.000 Todesfällen im Jahr 2002. Die Haupttumorlast liegt in den Entwicklungsländern [94]. Als Ko- bzw. Risikofaktoren für die Entwicklung eines Zervixkarzinoms bei HPV-infizierten Frauen wurden Tabakkonsum, ein junges Alter bei

erstem Geschlechtsverkehr, eine hohe Anzahl von Geschlechtspartnern sowie eine hohe Parität beschrieben [95-99]. Die meisten genannten Faktoren sind direkt mit HPV-Infektionen assoziiert und stellen wahrscheinlich keine unabhängigen Risikofaktoren dar (s.o.).

Die Rolle der humanen Papillomaviren in der Pathogenese des Vulvakarzinoms ist bereits beschrieben worden (s.o.). Darüber hinaus lassen sich laut Studien bei einem Großteil der Plattenepithelkarzinome der Anal- bzw. Perianalregion HP-Viren nachweisen, auch hier ist ein kausaler Zusammenhang zwischen HPV-Infektion und Kanzerogenese wahrscheinlich [81, 100-102]. Zur Entstehung des Plattenepithelkarzinoms der Vagina gibt es nur wenige Studien, doch entdeckten z.B. Daling et al. bei 60 % der von ihnen untersuchten Patientinnen mit einem invasiven Vaginakarzinom in den Gewebeproben HPV-DNA [103]. Auch in Gewebeproben von Peniskarzinomen findet man HP-Viren (Typ 16 und 18) [104].

Im Kopf-Hals-Bereich konnte eine Assoziation zu HPV, insbesondere zum HPV-Typ 16, für einen Teil der Tonsillenkarzinome nachgewiesen werden [105-108]. Dabei zeigte sich, dass man im Kopf-Hals-Bereich verschiedene Entitäten der Plattenepithelkarzinome differenzieren kann, was Analysen von Wiest et al. bestätigten [109]. Bei bis zu 20% der Kopf-Hals-Tumoren wird inzwischen eine HPV-Ätiologie angenommen [108].

1.3.4 HPV-Pathogenese

In Bezug auf ihren Lebenszyklus nehmen humane Papillomaviren eine Sonderstellung unter den Viren ein: Grundvoraussetzung einer Infektion ist die Zugangsmöglichkeit zu Haut- oder Schleimhautzellen, die die Fähigkeit zur Proliferation beibehalten haben, also Zellen der Basalschicht. Ein solcher Zugang ergibt sich z.B. im Falle von Mikroläsionen der Haut und Schleimhaut. Hat eine Infektion stattgefunden, wird die virale Genexpression in den Basalzellen größtenteils unterdrückt. Lediglich die sogenannten „frühen“ (early) Virusgene werden in begrenztem Ausmaß exprimiert, was eine gesteigerte Proliferation der infizierten Zellen nach sich zieht. Nach dem Eintritt infizierter Zellen in die Suprabasalschicht beginnt die Expression der „späten“ Virusgene mit Synthese der Strukturproteine. Der Zyklus schließt sich, indem in den oberflächlichen Epidermisschichten vollständige Viruspartikel gebildet und aus der Zelle geschleust werden [84, 86].

Während in gutartigen Läsionen sowie in niedriggradigen Dysplasien HP-Viren in episomaler Form vorliegen, sind die viralen Genome oder Genomfragmente in einigen fortgeschrittenen Dysplasien und in einem Teil der HPV-induzierten Karzinome in das Wirtszellgenom integriert [84, 110-112]. Die Integrationsorte selber sind über das ganze Genom verteilt [84, 113, 114]. Es scheint Prädilektionsstellen für eine Integration zu geben, sogenannte fragile Stellen im Genom, die auf Grund ihrer Neigung zu Chromosomenbrüchen eine Integration fremder DNA erleichtern [114].

Die Transformation von Epithelzellen durch karzinogene HPV-Typen wird primär durch die Onkoproteine E6 und E7 verursacht, vermutlich spielt auch E5 eine Rolle bei der Transformation [86].

E5 besitzt Bedeutung in der Proliferationsphase der Viren, in dem es in bereits differenzierten Zellen die Fähigkeit zur erneuten DNA-Synthese unterstützt [115, 116]. Die Studie von Genther et al. zeigte jedoch auch, dass die Rolle des E5-Proteins eher untergeordnet ist [116]. Hinsichtlich der späteren Prozesse der HPV-induzierten Karzinogenese ist es nicht erforderlich, was durch die Tatsache untermauert wird, dass die E5 Gensequenz zum Teil bei der Integration des Virusgenoms zerstört wird [117].

E6 und E7 sind in der Lage, unabhängig voneinander strukturelle und numerische chromosomale Instabilität zu verursachen [118]. Die Fähigkeit der DNA humaner Papillomaviren zur Transformation humaner Keratinozyten in unsterbliche Zellen, die der terminalen Differenzierung nicht mehr zugänglich sind, wird sowohl durch die Blockierung von E6 als auch von E7 aufgehoben [119]. Die 2003 von Yamamoto et al. an embryonalen Fibroblasten durchgeführte Studie bestätigte ebenfalls, dass die E6- und E7-Gene unabhängig voneinander Unsterblichkeit induzieren können [120].

Ein wichtiger Effekt des E6-Gens beruht auf seiner Interaktion mit dem Tumorsuppressorgen p53, welches Zellen mit geschädigter DNA der Apoptose zuführt. Werness und Scheffner zeigten bereits 1990, dass E6-Proteine der HPV-Typen 16 und 18 in der Lage sind, p53 zu binden und damit seine Degradation durch das Ubiquitin-abhängige Proteasen-System zu fördern [121-123]. Ein weiteres Zielprotein, dessen Abbau durch das Onkoprotein E6 gefördert wird, stellt Bak dar, ein pro-apoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie [90, 123, 124]. Aus diesen Interaktionen mit p53 und Bak resultiert eine Unempfindlichkeit gegenüber Apoptose auslösenden Prozessen und eine zunehmende chromosomale Instabilität. Zusätzlich erreicht das E6-Onkoprotein einen wachstumsstimulierenden Effekt durch eine Aktivierung der Telomerase [120, 123, 125].

Stellt p53 den Hauptangriffsort für E6 dar, ist dies das Retinoblastomgen (Rb) für E7. Das Rb-Protein besitzt ebenfalls die Funktion eines Tumorsuppressors, indem es im hypophosphoryliertem Zustand den Transkriptionsfaktor E2F bindet und somit den Zellzyklus in der G1-Phase arretiert. Durch zyklinabhängige Kinasen (CDK) kommt es zur Hyperphosphorylierung des Rb-Proteins, woraufhin E2F freigesetzt wird und Zielgene aktiviert, die den Zellzyklus vorantreiben [126]. Durch die Interaktion des E7-Onkoprotein mit dem Rb-Genprodukt kommt es, neben einer erhöhten Degradation des Rb-Proteins [127], CDK-unabhängig zu einer Dissoziation des Rb-Protein/E2F-Komplexes und somit zur Progression des Zellzyklus [128]. Aus der Inaktivierung des Rb-Proteins resultiert eine Steigerung der Expression des CDK-Inhibitors p16^{INK4a} [129]. Schon 1998 zeigte sich dieser Effekt in einer Studie von Sano et al. ausschließlich bei high und intermediate risk-HPV-assoziierten Läsionen [130]. Zusätzlich zu seinen Effekten auf das Rb-Protein stimuliert E7

die Expression von Cyclin A und Cyclin E, welche für die Aktivierung der CDKs verantwortlich sind [131]. Des Weiteren führt E7 schon in einem frühen Stadium der viralen Infektion, noch vor Auftreten ausgeprägter Kernabnormalitäten, zu einer gestörten Synthese des Zentrosomenapparates, was wiederum die Destabilisierung des Genoms fördert [132]. Trotz der Fähigkeit der E6- und E7-Genprodukte, auch unabhängig voneinander Zellen zu transformieren, wird dieser Effekt bei Vorhandensein beider Onkoproteine deutlich erhöht. Dies erklärt sich unter anderem durch folgenden Synergismus: Für sich genommen führen die Wirkungen von E7 zu p53- und Bak-induzierter Apoptose. Durch die Degradation von p53 und Bak infolge der Interaktion mit E6 wird eine solche Apoptose jedoch verhindert [86, 133].

1.4 p16^{INK4a}

1.4.1 Bedeutung im Zellzyklus

p16^{INK4a} ist das Produkt des Tumorsuppressorgens CDKN2A und inhibiert CDK 4 und 6 [134], welche zur Hyperphosphorylierung des Rb-Proteins führen (s.o.). Es trägt somit im Rahmen des Signalwegs CDK-Rb-E2F zur Regulation des Zellzyklus bei, indem es den Übertritt in die S-Phase verhindert. Dabei unterliegt es einerseits einer negativen Rückkopplung durch das Rb-Protein, andererseits induzieren hohe Konzentrationen von E2F die Expression des CDK-Inhibitors [129, 135, 136]. Beauséjour et al. konnten zudem in ihrer Studie zeigen, dass p16 neben p53 entscheidend zur Induktion des irreversiblen Zellarrest beiträgt [137].

Bei einer großen Anzahl verschiedener Tumoren findet sich eine Inaktivierung der p16-Funktion durch (Punkt-) Mutationen, Deletion des Gens, Verlust des chromosomalen Locus (loss of heterozygosity, LOH) oder durch methylierungsabhängige Hemmung der Promotoraktivität [138]. Im Unterschied dazu wurde bei high risk-HPV-assoziierten zervikalen und genitalen Läsionen eine drastische Überexpression von p16^{INK4a} festgestellt [130, 139, 140].

1.4.2 p16^{INK4a} als Biomarker

Bereits 1997 zeigten Kim et al., dass im Falle des Zervixkarzinoms, im Gegensatz zu anderen Tumorentitäten, keine Deletion oder Punktmutation im p16-Gen vorliegt [141]. Ein Jahr später stellten Sano et al. einen Zusammenhang zwischen high risk-HPV-induzierten Läsionen im Zervikalbereich und der Überexpression des p16-Proteins fest. Sie betrachteten die p16-Immunhistochemie schlussfolgernd als mögliche Entscheidungshilfe zur Differenzierung zwischen high/intermediate und low risk-HPV-Infektionen [130]. An dieses

Ergebnis anschließend beschäftigten sich im Verlauf mehrere Studien mit der Bedeutung des p16-Genprodukts als Biomarker in der Diagnostik HPV-assoziiertes Zervixläsionen und stellten zum Teil Vergleiche mit anderen Biomarkern wie z.B. Ki-67 oder MCM5 an [139, 140, 142-150]. Dabei erwies sich die p16-Immunhistochemie in der Untersuchung zervikaler Biopsien allgemein als nützlicher Biomarker, der eine hohe Sensitivität für high risk-HPV-transformierte Läsionen besitzt und die Interobservervarianz in der Beurteilung histologischer Gewebeschnitte reduziert.

Ähnliche Ergebnisse erzielten Studien, die die Wertigkeit der immunzytochemischen p16^{INK4a}-Färbung von dysplastischen Zellen in zytologischen Abstrichpräparaten untersuchten [151, 152]. 2003 wendeten Negri et al. sowohl immunhistochemische als auch immunzytochemische Methoden zur Diagnostik des Adenokarzinoms der Zervix und seiner Vorstufen an. Hier konnte ebenfalls ein diagnostischer Nutzen für p16 belegt werden [153].

Mittlerweile hatten mehrere Untersuchungen eine Assoziation der high risk-HPV-Typen zu anderen Karzinomen wie dem Plattenepithelkarzinom der Analregion [100, 102] oder dem Tonsillenkarzinom [107] nachgewiesen. Als Konsequenz wurde auch bei diesen Entitäten die p16-Immunhistochemie durchgeführt, welche in Übereinstimmung mit den oben genannten Studien eine hohe Korrelation zwischen p16-Überexpression und einer high risk-HPV-Infektion ergab [101, 105, 106].

Im Fall des Vulvakarzinoms war die Bedeutung des p16-Proteins auf Grund der uneinheitlichen Pathogenese bis vor wenigen Jahren fraglich. 1997 fanden Chan et al. bei der Untersuchung von vulvären Läsionen eine Abnahme der p16-Expression von ursprünglich 86% bei benignen Läsionen auf 37 % bei invasiven Plattenepithelkarzinomen [154]. Mittels einer Methylierungs-spezifischen PCR wiesen dann Lerma et al. 2002 eine Hypermethylierung des p16^{INK4a}-Promotors in 68 % der in ihrer Studie untersuchten Vulvakarzinome, 69,2 % der VIN- und 42,8 % der Lichen sclerosus-Fälle nach [25]. In der 2007 veröffentlichten Studie von Tringler wurden ausschließlich invasive Vulvaläsionen auf ihren p16-Status hin untersucht. 43 % der Proben waren positiv. Gleichzeitig ergaben sich Hinweise für p16 als prognostisch bedeutsamer Biomarker im Sinne eines günstigeren Krankheitsverlaufs [155].

Zu berücksichtigen ist, dass in keiner der genannten Studien der HPV-Status untersucht wurde. Erst im September 2004 wurde durch Riethdorf et al. eine Studie veröffentlicht, welche sowohl die p16-Expression als auch das Vorliegen einer HPV-Infektion überprüfte [71]. Dabei zeigte sich eine ähnliche Konstellation wie im Bereich der Zervix, dass nämlich eine intensive und diffuse p16-Expression das Vorliegen eines HPV-assoziierten neoplastischen Prozesses anzeigte. Auch die kurz zuvor erschienene Arbeit von Santos et al. bestätigte die p16-Immunhistochemie als geeignetes Werkzeug zur Unterscheidung zwischen HPV-assoziierten und HPV-unabhängigen Vulvakarzinomen und VINs [18]. Im Unterschied zu Riethdorf führte Santos zu diesem Zeitpunkt keine HPV-Testung durch,

sondern unterteilte die Läsionen nach der Morphologie in einen basaloiden oder warzigen, das heißt also HPV-assoziierten Typ und in einen verhornenden, differenzierten und damit HPV-unabhängigen Typ. 2006 veröffentlichte Santos jedoch eine weitere Studie, in welcher er die Unzulänglichkeit der morphologischen Kriterien für die HPV-Status-Beurteilung aufzeigte. Diesmal wurde eine parallele HPV-Testung durchgeführt und er konnte erneut die p16-Überexpression als zuverlässigen Marker HPV-positiver Karzinome der Vulva darstellen. Intraepitheliale Neoplasien wurden isoliert nicht untersucht, lediglich in einigen Fällen als Begleitbefund der invasiven Läsionen [156]. 2005 und 2006 stellten weitere Arbeitsgruppen den Zusammenhang zwischen einer p16-Überexpression und high risk-HPV-infizierten Läsionen fest [23, 157]. Die Aussagekraft dieser Studien ist jedoch insofern begrenzt, dass Rufforny et al. nur vier Vulvakarzinome in die Studie miteinbezogen und die von Van der Avoort et al. untersuchten Vulvakarzinome sämtlich HPV negativ waren.

1.5 Ziele dieser Arbeit

Während für Zervixläsionen und Karzinome inzwischen ein weit akzeptiertes Progressionsmodell existiert, ausgehend von der HPV-Infektion zur Transformation von Epithelzellen, über Krebsvorstufen bis zum invasiven Karzinom, ist die Situation im Bereich der Vulva und Vagina komplexer. In beiden Bereichen gibt es sowohl HPV-assoziierte, als auch HPV-unabhängige Transformationsmechanismen. Viele Patientinnen mit Vulva- oder Vaginalläsionen leiden unter multifokalen oder sogar multizentrischen Läsionen die häufig rezidivieren. Viele dieser Läsionen sind HPV-assoziiert, aber die Mechanismen der Ausbreitung und Persistenz dieser Krebsvorstufen sind nicht gut verstanden. Persistierende Läsionen des unteren Genitaltraktes sind schwer zu beherrschen, beunruhigen Patientinnen und behandelnde Ärzte und verursachen erhebliche Kosten. Ziel dieser Arbeit ist es, Läsionen des unteren Genitaltraktes klinisch und molekular zu charakterisieren, mit besonderem Augenmerk auf Eigenschaften und mögliche Ursachen multifokaler und multizentrischer Befunde.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien und Chemikalien

Aquatex	BDH
Antibiotikallösung: Penicillin, Streptomycin (Zielkonzentration 1 %)	Gibco BRL
Eosin, 0,5 %	Merck
Ethanol p.a. (absolut, 98 %, 70 %)	Merck
Eukitt	O. Kindler GmbH & CO
Fixationsspray Merckofix	Merck
Formalinlösung 5 %, gepuffert, pH 6,9	Merck
Fötale Kälberserum (Zielkonzentration 10 %)	Gibco BRL
Paraffin	SÜSSE GMBH
Mayers Hämalaun Lösung	Merck
Mayer's Hematoxylin	DakoCytomation (Code-Nr. S3309)
Salzsäure (HCl)	Roth
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Gibco BRL
Xylol	Merck

2.1.2 Geräte

Brutschrank	Heraeus
Deckgläser (in verschiedenen Längen)	Menzel
Färbebox	Steinbrenner
Färbegefäße	Roth
Färbegestell	Roth
Fettstift	DakoCytomation
21 Glasküvetten mit Deckel	Roth
Kimwipes (grün)	Kimberly Clark
Lichtmikroskop (LEITZ DMRD)	Leica
Objekträger (konventionell präpariert)	Thermo
Objekträger (LBC, ThinPrep™)	Cytic Germany, Pohlheim (Cytoc = Hologic)

Objekträgerhalterung	Roth
Pinsel	Nova Synthetics
Pinzette	Dumont&Fils
Präpariernadel	Roth
Rotationsmikrotom (C-Messer) (RM2035)	Leica
Strecktisch	Leica
Wasserbad	JULABO UC

2.1.3 Puffer und Lösungen

FCS (fötales Kälberserum):

Wird vor Verwendung 45 min. bei 56 °C inaktiviert.

5 M HCl:

285 ml 32 % HCl
ad 500 ml Aqua bidest

0,25 % HCl-Alkohol:

1,7 ml HCl 37 %
ad 250 ml Ethanol 99 %

PBS:

für 1 l:		Endkonzentration:
8 g	NaCl	0,8 % (w/v)
0,2 g	KCl	0,02 % (w/v)
1,44 g	Na ₂ HPO ₄	0,144 % (w/v)
0,24 g	KH ₂ PO ₄	0,024 % (w/v)
ad 800 ml	Aqua bidest	

pH 7,4 mit 5 M HCl einstellen; ad 1 l Volumen mit Aqua bidest; autoklavieren

2.1.4 Kommerzielle Reagenzien

CINtec™ p16^{INK4a} Histology/Cytology Kit for Manual Staining, DakoCytomation Denmark A/S

Peroxydase-Blocking Reagent, Mouse-Anti-Human-p16^{INK4a} (Klonbezeichnung E6H4, MTM Laboratories AG, Heidelberg), Visualization Reagent, Negative Control Reagent, Liquid DAB+Substrate, Chromogen System, Target Retrieval Solution (x10), Wash Buffer (x10)

Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM, Gibco BRL

2.1.5 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	HPV-Subtyp
HeLa	Adenokarzinom der Zervix	18

2.2 Methoden

2.2.1 Patientinnen/Gewebeproben

Die in die Untersuchungen eingeschlossenen Gewebeproben wurden von Patientinnen asserviert, die in der Dysplasiesprechstunde der Frauenklinik der Universität Düsseldorf (UFK) untersucht bzw. operiert wurden. Der Untersuchungszeitraum erstreckte sich über die Jahre 1997-2005. Ein Teil der Gewebeproben wurde von auswärtigen Instituten angefordert, wenn die Frauen zu einem früheren Zeitpunkt andernorts operiert worden waren und später zur Behandlung eines Rezidivs oder einer unabhängig vom ersten Befund aufgetretenen Läsion an der UFK Düsseldorf vorstellig wurden. Vor der Probenentnahme wurde von den Patientinnen ein mündliches oder schriftliches Einverständnis eingeholt. Die Untersuchungen waren von der zuständigen Ethikkommission genehmigt worden.

Insgesamt wurden 196 Läsionen von 126 Patientinnen in die Untersuchungen eingeschlossen. Klinische und epidemiologische Parameter, die neben HPV-Status und p16-Expression in der Analyse verwendet wurden, umfassten Alter, Immunstatus, Rauchen, Geburtenanzahl, Einnahme von Kontrazeptiva bzw. Hormonen und die Frage nach vorausgegangenem dysplastischen Veränderungen des Genitaltrakts inklusive Rezidiven.

Ein zentrales Ziel dieser Studie war es darüber hinaus, den Einfluss verschiedener Parameter wie HPV-Status, Alter etc. auf die Multizentrität und Metachronizität der anogenitalen Läsionen zu untersuchen. Eine Läsion wurde als multizentrisch eingestuft, wenn mehrere Läsionen in verschiedenen Lokalisationen (z.B. Zervix, Vagina, Vulva) vorhanden waren. Multifokalität lag vor, wenn mehrere, deutlich voneinander abgegrenzte Läsionen in einem Bereich vorlagen. Dabei wurden synchrone Läsionen in Vulva- und Perianalbereich aufgrund der engen räumlichen Beziehung als multifokal bezeichnet. Die Bedingungen für eine metachrone Läsion waren dann erfüllt, wenn eine neue Läsion in einem zeitlichen Abstand von mindestens 2 Monaten und ohne Zusammenhang zu den vorhergegangenen Läsionen aufgetreten war. Nachresektionen waren entsprechend von dieser Kategorie ausgenommen.

Die Parameter Multizentrität und Metachronizität wurden als Kriterien zur Einteilung der Patientinnen in zwei Kollektive herangezogen: Erfüllte der Befund einer Patientin keines der beiden Kriterien, so erfolgte die Zuteilung zum Kollektiv I. War mindestens einer der beiden Parameter zutreffend, wurde die entsprechende Patientin dem Kollektiv II zugeordnet. Multifokalität spielte in der Zuordnung keine Rolle, 19 Patientinnen des ersten Kollektivs hatten daher einen multifokalen Befund.

Sämtliche Patientinnen- und Läsionsbezogene Informationen wurden den entsprechenden Patienten-Akten des Universitätsklinikums entnommen.

2.2.2 HPV-Typisierung

Die HPV-Typisierung wurde im Rahmen einer Doktorarbeit von Frau Hedy Sawajuri durchgeführt und freundlicherweise dieser Arbeit zur Verfügung gestellt.

Sie erfolgte nach dem Verfahren nach Bollman et al. [158]. Für die HPV-DNA-Amplifikation wurden demnach die Konsensusprimer GP5+/GP6+ und MY09/MY11 verwendet. Als Positiv-Kontrolle diente die PCR-Amplifikation des menschlichen β -Globin-Gens. Die Sequenzierung der PCR-Produkte wurde nach entsprechender Aufreinigung mit Hilfe des BigDye Terminator sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) durchgeführt und im Anschluss erfolgte ein Abgleich der Ergebnisse mittels des BLAST Programms (Blast, Pittsboro, NC) mit der GenBank Datenbank.

2.2.3 Herstellung der Gewebe-Schnitte

Alle Gewebeproben wurden in 5%igem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Von den Paraffinblöcken wurden mit dem Rotationsmikrotom 5 μ m dicke Schnitte für die HE-Färbung und 2 μ m dicke Schnitte für die p16-Färbung hergestellt. Unmittelbar nach dem Schneiden wurden die Paraffinschnitte ins Wasserbad bei 38 °C überführt und auf beschichtete Objektträger aufgezogen. Die Lagerung erfolgte über Nacht bei 37 °C im Trockenschrank, anschließend bei Raumtemperatur.

2.2.4 HE-Färbung

Die 5 μ m-Schnitte wurden durch 3 maliges Baden in Xylol über jeweils 5 min entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (2x 100 %, 1x 96 %, 1x 70 %, ebenfalls jeweils 5 min) rehydriert. Nach 5 min Färben in Mayers Hämalaun Lösung wurden die Proben mehrmals mit Leitungswasser gespült und 5-8mal in 0,25%igen HCl-Alkohol eingetaucht. Anschließend folgte das Wässern über 3 min mit Leitungswasser und als nächster Schritt das Färben mit 0,5%igem Eosin über 1 min. Für die abschließende Rehydrierung wurden die

Proben jeweils 2 min in der aufsteigenden Alkoholreihe sowie 2x 2 min in Xylol gebadet. Das Eindecken erfolgte mit Eukitt®.

2.2.5 p16-Immunhistochemie

Die p16-Färbung der 2 µm-Schnitte wurde mit dem CINtec™ p16^{INK4a} Histology/Cytology Kit for Manual Staining durchgeführt. Als Positiv-Kontrolle diente bei jeder Färberunde die HPV-Typ 18-positive Tumorzelllinie HeLa, welche einem zervikalen Adenokarzinom entstammt. HPV 18 liegt hier in integrierter Form vor und p16^{INK4a} wird stark überexprimiert.

Die Färbung der Gewebeproben und der Positiv-Kontrolle erfolgte parallel, jedoch in getrennten Küvetten, um eine Kontamination der Gewebeproben zu vermeiden. Als inhärente Negativ-Kontrolle wurde den Läsionen benachbartes, ungefärbtes Normalgewebe genutzt.

Von größter Wichtigkeit für ein Gelingen der Färbung war es, dass die Proben während der gesamten Färbeprozedur nicht austrockneten.

Entparaffinierung und Rehydrierung

Die HeLa-Zelllinie wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium unter Zusatz von fötalem Kälberserum (Zielkonzentration: 10 %) und Antibiotikallösung mit Penicillin und Streptomycin (Zielkonzentration 1 %) unter Standardbedingungen kultiviert.

Für die immunhistochemische Färbung wurden die Zellen nach dem ThinPrep™-Verfahren der Firma Cytoc (Cytoc Germany, Pohlheim) auf Objektträger aufgebracht und mit Merckofix® Fixationsspray bei einer Einwirkzeit von 10 min fixiert. Zur Rehydrierung folgten 10 min in 50%igem Ethanol und weitere 10 min in Aqua bidest.

Zeitgleich wurden die histologischen Schnitte entparaffiniert, rehydriert und mit Aqua bidest gespült, in gleicher Weise wie bei der HE-Färbung beschrieben.

Epitopendemaskierung

Zur Freilegung der Epitope wurde die mit Aqua bidest 1:10 verdünnte Target Retrieval Solution (x10) in schwarzen, verschlossenen Färbeküvetten im Wasserbad auf 95-99 °C erwärmt. Die Inkubation der Objektträger und der HeLa-Kontrolle in der erwärmten Lösung erfolgte über 10 min im Wasserbad bei 95-99 °C, anschließend 20 min bei Raumtemperatur. Zum Abschluss wurden die Objektträger 5 min in Waschpuffer gespült.

Peroxidase-Blockierungsreagenz

Unter Verwendung geeigneter schwarzer Färbeboxen (bei den jeweiligen Färbeschritten mit einem Deckel verschlossen) wurde nun das Peroxidase-Blocking-Reagent zu den Proben

gegeben (200 µl/Schnitt), um die endogene Peroxidaseaktivität auszuschalten. Nach 5 min Einwirkzeit wurde ein Pufferbad (5 min) angeschlossen.

Primärer Antikörper

Als primärer Antikörper diente Mouse Anti-Human p16INK4a, ein monoklonaler Mausantikörper. Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 0,14 µl Mouse Anti-Human p16INK4a pro ml Antikörper-Diluent angewendet. Die Probeninkubation (200 µl/Probe) wurde über 30 min durchgeführt, gefolgt von einem 5 minütigen Waschvorgang im frischen Pufferbad.

Visualisierungsreagenz

Das Visualization Reagent des Kits besteht sowohl aus sekundären Ziegen-Anti-Maus-Immunglobulinmolekülen als auch aus Meerrettichperoxidase-molekülen, die an ein gemeinsames Dextranpolymer-Rückgrat gekoppelt sind. Es wurde über 30 min zu den Objektträgern hinzugegeben (200 µl/Probe). Es folgte ein dreimaliges frisches Pufferbad für jeweils 5 min.

Substrat-Chromogenlösung

Bei diesem Schritt, der die enzymatische Umwandlung des Chromogens in das sichtbare Reaktionsprodukt am Ort des gesuchten Antigens nach sich zieht, bestand die Applikationsmenge ebenfalls in 200 µl/Probe. Nach 5 min wurde die Chromogenlösung abgeklopft und weitere 200 µl/Probe aufgetragen, ohne zwischengeschalteten Waschvorgang. Die Einwirkzeit betrug erneut 5 min, danach wurde 5 min in Aqua bidest gespült.

Herstellung von 1 ml Substrat-Chromogenlösung:

1 ml Liquid DAB+Substrate + 1 Tropfen Chromogen System, sorgfältig mischen.

Gegenfärbung mit Hämatoxylin

Die Gegenfärbung erfolgte für 3-4 min in DakoCytomation Mayer's Hematoxylin simultan mit der HeLa-positiv-Kontrolle. Nachfolgend wurde mit Leitungswasser gewässert.

Eingedeckt wurde mit Aquatex®.

2.2.6 Mikroskopische Bewertung

Die mikroskopische Bewertung der p16-gefärbten Gewebeproben erfolgte durch zwei unabhängige Personen (Pathologe, Doktorandin). Neben der Bewertung der p16-gefärbten Schnitte wurde zum Vergleich parallel der jeweilige HE-Schnitt mikroskopisch begutachtet.

Das Bewertungsschema umfasste die folgenden Kriterien:

Färbung: ja/nein

Färbungs-Typ: diffus/fokal

Färbungs-Intensität: Grad 1-3

Färbungs-Ausdehnung (vertikal): Grad 1-3

Größe der Läsion: Normalgewebe vorhanden/nicht vorhanden, Anteil der Läsion am Gesamtgewebe

Verhornung: ja/nein

Papillen: ja/nein

Stroma: vorhanden/nicht vorhanden

Besonderheiten: z.B. schlechter Zustand des Gewebes etc.

Als diffus wurde eine Färbung eingestuft, wenn sie von der Basalzellschicht ausging und durchgängig mehrere zusammenhängende Zellen erfasste (Abb. 2.1). Eine fokale Färbung bestand demgegenüber aus vereinzelt angefärbten Zellen, die selten in der Basalzellschicht lokalisiert waren (Abb. 2.2).

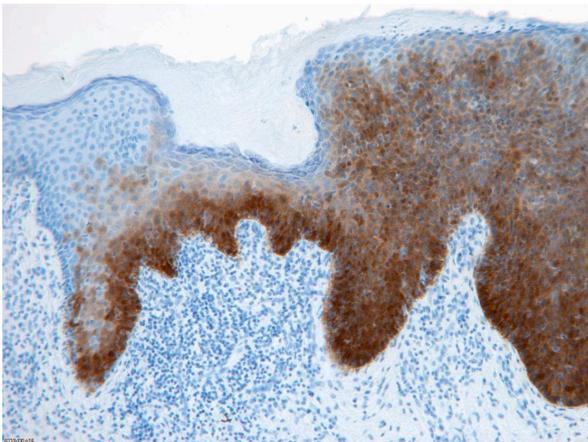


Abb. 2.1: **VIN 3, diffus p16-positiv**; VIN 3 = vulväre intraepitheliale Neoplasie Grad 3

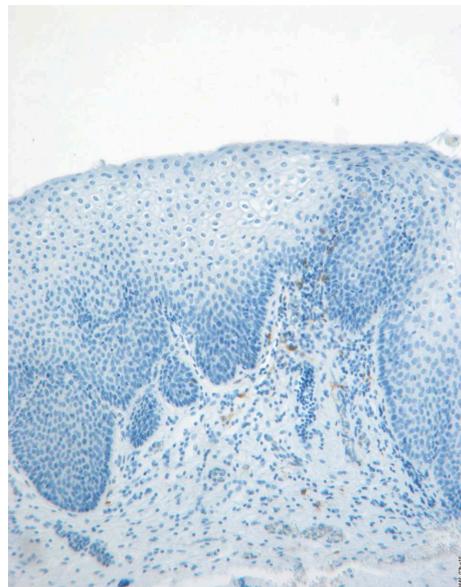


Abb 2.2: **VIN 1, fokal p16-positiv**; VIN 1 = vulväre intraepitheliale Neoplasie Grad 1

Diese fokale Ausprägung wurde in der endgültigen statistischen Auswertung zusammen mit einer vollständig fehlenden Färbung als p16-negativ gewertet. Eine Unterscheidung von zytoplasmatischer versus nukleärer Anfärbung, wie sie bei Riethdorf et al. vorgenommen wurde [36], fand nicht statt, da mehrere Studien, unter anderem Klaes et al., die untergeordnete Rolle dieser Differenzierung aufgezeigt hatten [95, 121-123].

Eine Ausdehnung des Grades 1 beschrieb eine Färbung, die weniger als das untere Drittel des Epithels (vertikal) betraf. Unter Grad 2 fiel eine Färbung, die über das untere Drittel, jedoch nicht über das ganze Epithel hinweg reichte. Grad 3 wurde gewertet, wenn von der Basalzellschicht bis zu den obersten Superfizialschichten das Epithel durchgehend gefärbt war.

2.2.7 Statistische Auswertung

Es erfolgte ein systematischer Vergleich der beiden Einzelkollektive hinsichtlich ausgesuchter Merkmale. Zur Beurteilung des Altersdurchschnitts wurde der t-Test angewandt. Für die restlichen Parameter wurden entweder der Chi-Quadrat- oder der Fisher's Exact Test zu Grunde gelegt, je nach Probenzahl. Ein p-Wert $< 0,05$ galt als signifikant.

Die Übereinstimmungsqualität bezüglich der Beurteilung der immunhistochemisch gefärbten Gewebeproben wurde anhand des Kappa-Koeffizienten (Cohen's Kappa) bestimmt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Beschreibung der Läsionen

3.1.1 Das Gesamtkollektiv

Insgesamt wurden 196 Gewebeproben von 126 Patientinnen aus dem Bereich des weiblichen Genitaltrakts untersucht. Noch im Verlauf dieser Studie erfolgte 2004 die Modifikation der VIN-Klassifikation der ISSVD, welche den Begriff der VIN 1 auf Grund fehlenden klinischen Krankheitswertes aufgab. In unserer Studie haben wir dennoch zunächst den Terminus VIN 1 beibehalten.

Tab. 3.1 zeigt zunächst eine Übersicht von allen untersuchten Läsionen.

Tabelle 3.1: **Übersicht: Läsionen Gesamtkollektiv**

Patientin	Alter (Jahre)	Histologie	HPV	Typ	p16 ^{INK4a}
case 1	41	VCond.ac.	pos	66	neg
case 2	62	VSCC	neg	neg	neg
case 3	47	VSCC	pos	18	neg
case 4	52	VSCC	pos	16	pos
case 5	77	VSCC	neg	neg	neg
case 6	80	VIN 3	pos	16	pos
case 7	37	AIN 2	pos	16	pos
case 8	60	VSCC	neg	neg	pos
case 9	55	VIN 3	neg	neg	pos
case 10	32	VIN 3	pos	16	pos
case 11	46	VIN 2	pos	16	pos
case 12	63	VSCC	neg	neg	pos
case 13	65	VAIN 2	neg	neg	neg
case 14	39	ACond.ac.	na	na	na
case 15	65	VSCC	neg	neg	na
case 16	53	VSCC	na	na	pos
case 17	45	VSCC	pos	16	pos
case 18	51	VIN 2	pos	16	pos
		AIN 2	pos	16	pos
case 19	77	VSCC	neg	neg	na
case 20	26	VIN 3	pos	16	pos

case 21	52	VIN 3	pos	33	pos
case 22	73	VSCC	neg	neg	neg
case 23	54	VSCC	pos	16	pos
		VIN 3	pos	16	pos
case 24	32	VIN 2	pos	16	pos
case 25	56	VSCC	neg	neg	neg
case 26	43	VSCC	neg	neg	neg
case 27	57	VIN 3	na	na	pos
case 28	45	VSCC	pos	16	pos
		VIN 3	na	na	pos
case 29	65	VIN 3	neg	neg	na
case 30	33	VSCC	na	na	pos
case 31	40	VSCC	neg	neg	pos
case 32	48	VIN 3	pos	16	pos
		AIN 3	pos	16+33	pos
case 33	49	VIN 3	pos	16	pos
case 34	72	VSCC	neg	neg	na
case 35	54	VSCC	neg	neg	neg
case 36	67	VSCC	neg	neg	na
case 37	40	VSCC	pos	16	neg
case 38	62	VSCC	pos	16	na
case 39	18	VSCC	pos	52	neg
case 40	30	VSCC	pos	42	pos
case 41	48	VSCC	neg	neg	neg
case 42	37	VSCC	pos	16	pos
case 43	57	VSCC	pos	16	pos
case 44	32	VSCC	na	na	na
case 45	47	AIN 3	pos	16	pos
case 46	34	CIN 3	pos	16+33	pos
		VAIN 3	pos	16	pos
		VIN 3	pos	16+33	pos
		AIN 2	pos	16+unbekannt	pos
case 47	18	VCond.ac.	na	na	na
case 48	36	CIN 2	pos	16+31	pos
		VIN 2	pos	16	pos
case 49	38	VAIN 1	pos	16	neg
		VIN 3	pos	16	pos
		VIN 3	pos	16	pos

		VIN 3	pos	16	na
		VSCC	pos	16	pos
case 50	35	VIN 3	pos	33	pos
	40	VIN 3	pos	33	pos
case 51	27	CIN 3	pos	16	pos
		VIN 3	pos	16	pos
case 52	55	VIN 3	pos	16+42	pos
case 53	48	VIN 3	pos	33	pos
		AIN 3	pos	33	pos
case 54	64	VAIN 3	pos	16	pos
		VAIN 3	pos	16	na
		VIN 3	pos	16	pos
case 55	39	VIN 3	pos	16	pos
		AIN 3	pos	16	pos
	41	VAIN 2	pos	16	neg
		VIN 3	pos	16	neg
		AIN 3	pos	16	neg
case 56	25	ACond.ac.	pos	16+18+51+53+59	neg
case 57	32	CIN 3	pos	33	pos
		VIN 1	pos	33	pos
case 58	65	VIN 2	pos	16	pos
case 59	39	CIN 3	pos	33	pos
		VIN 3	pos	33	pos
case 60	42	VIN 2	pos	33	pos
case 61	67	VIN 3	pos	16	pos
case 62	35	CIN 3	pos	16	na
		VIN 3	pos	16	pos
case 63	45	VIN 3	pos	16	pos
case 64	52	VIN 3	pos	16	pos
case 65	41	VIN 3	pos	16	pos
case 66	41	VIN 3	pos	16	pos
		AIN 3	pos	16	neg
case 67	77	VIN 3	pos	18	na
case 68	43	CIN 3	pos	31	pos
		VIN 3	pos	16+31	pos
case 69	18	AIN 3	pos	16	pos
case 70	34	CIN 1	neg	neg	neg
		VIN 3	pos	16	pos

case 71	28	CIN 3	pos	33	pos
		VIN 3	pos	16	pos
case 72	47	VIN 3	pos	16	pos
case 73	38	CIN 3	pos	66	neg
		VIN 2	pos	16	pos
case 74	50	CIN 3	pos	59	pos
	52	VAIN 2	pos	56	pos
		VIN 3	pos	6	neg
case 75	36	VIN 2	neg	neg	neg
case 76	41	CIN 3	pos	35	na
		VIN 3	pos	16	na
case 77	46	AIN 1	pos	16	na
	51	VIN 3	na	na	na
case 78	36	VIN 3	pos	16	pos
case 79	28	VAIN 2	pos	33	pos
		VIN 3	pos	33	pos
		AIN 3	pos	33	pos
	29	CIN 2	pos	33	neg
		VAIN 2	pos	33	neg
case 80	66	VIN 3	pos	33	pos
case 81	48	VIN 2	pos	16	pos
case 82	47	VIN 3	pos	16	pos
case 83	21	CIN 2	pos	51	pos
		VIN 2	pos	unbekannt	na
case 84	38	VIN 2	pos	16	pos
		AIN 3	pos	16	pos
case 85	43	VIN 3	na	na	neg
case 86	43	VIN 3	pos	16	pos
	43	VIN 2	na	na	pos
		VIN 3	pos	16	pos
		AIN 3	pos	6	neg
case 87	37	VIN 3	pos	16	pos
		AIN 3	pos	16	pos
		Damm	na	na	pos
case 88	42	CIN 3	pos	16	pos
		VIN 2	pos	16	pos
case 89	22	CIN 3	pos	16	pos
		VIN 2	neg	neg	na

case 90	30	CSCC	pos	16	pos
	35	VAIN 2	pos	16+42	neg
		VIN 2	pos	16+42	neg
case 91	37	VIN 2	pos	18	pos
case 92	63	VIN 3	pos	16	pos
case 93	21	VIN 2	pos	16	pos
case 94	50	VIN 3	pos	16	pos
case 95	43	VIN 3	pos	16	na
case 96	26	VIN 3	pos	16	pos
case 97	44	VSCC	pos	16	pos
		AIN 3	pos	16	pos
case 98	29	VIN 3	pos	16	pos
case 99	42	VIN 3	pos	16	pos
case 100	51	VIN 2	neg	neg	neg
case 101	41	CIN 2	pos	18	neg
	41	VIN 3	pos	16+unbekannt	neg
		VIN 3	pos	61	neg
case 102	63	AIN 3	pos	16	pos
case 103	39	VIN 3	pos	16	pos
case 104	23	CIN 3	pos	58	pos
		VIN 1	neg	neg	neg
case 105	67	VAIN 3	pos	16	pos
case 106	53	VIN 3	pos	16	pos
case 107	40	VIN 3	pos	16	pos
case 108	19	VIN 2	pos	16	neg
case 109	36	VIN 3	pos	16	pos
case 110	33	VIN 2	neg	neg	neg
case 111	51	VIN 3	pos	33	pos
case 112	33	VIN 2	pos	16	pos
case 113	25	VSCC	pos	16+11	neg
case 114	32	CIN 2	pos	58	pos
		VIN 2	pos	42	neg
case 115	54	VSCC	pos	16	pos
		VIN 3	pos	16	pos
case 116	49	CIN 2	neg	neg	neg
		VAIN 2	neg	neg	neg
		VIN 3	neg	neg	neg
case 117	30	Damm	pos	16+11	pos

	31	VAIN 2	pos	16+unbekannt	pos
		VIN 3	pos	16	pos
		AIN 3	pos	16	pos
case 118	26	VIN 3	na	na	na
case 119	53	Zervix	pos	67	pos
		VIN 1	pos	67	pos
		AIN 3	pos	67	pos
	54	CCond.ac.	pos	67+72+unbekannt	pos
		VIN 2	pos	67+72+unbekannt	pos
		AIN 2	pos	67+72+unbekannt	pos
case 120	37	VAIN 1	pos	42	neg
		VIN 3	pos	16+58	pos
case 121	73	VIN 3	pos	16	pos
case 122	16	CIN 2	pos	6+11	neg
		VIN 2	neg	neg	neg
case 123	61	VIN 3	pos	16	pos
		AIN 3	pos	16	pos
case 124	38	CIN 2	pos	66	pos
		VAIN 2	pos	66	pos
case 125	30	VIN 2	pos	16	neg
case 126	34	VSCC	pos	16+33	pos
		VIN 3	pos	na	pos
		VIN 3	pos	na	pos

(C, V, A) Cond.ac. = zervikales, vulvares, anales Condyloma acuminatum, (C, Va, V, A) IN 1-3 = zervikale, vaginale, vulväre, anale intraepitheliale Neoplasie Grad 1-3, (C, V) SCC = cervical, vulvar squamous cell carcinoma; HPV = Humanes Papillomavirus; na = not available, pos = positiv, neg = negativ

Gewebeproben der Vulva stellten mit 131 Fällen die größte Gruppe dar. Die vulväre intraepitheliale Neoplasie Grad 3 war in dieser Studie der häufigste Befund (68 Proben), gefolgt von den invasiven Läsionen der Vulva (33 Proben). Von den restlichen Proben entstammten 24 der Zervix, 23 der Analregion sowie 15 der Vagina.

Eine entsprechende Zusammenfassung zeigt Tab. 3.2.

Tabelle 3.2 : **Läsionsgrade Gesamtkollektiv**

	Benigne Formen		Präkanzerosen			Maligne Formen	Summe n/ %
	Cond.ac.	(C, Va, V, A) IN 1	(C, Va, V, A) IN 2	(C, Va, V, A) IN 3	(C, V) SCC		
Zervix	1	1	8	13	1	24/ 12,4	
Vagina	-	2	9	4	-	15/ 7,8	
Vulva	2	3	25	68	33	131/ 67,9	
Anus	2	1	4	16	-	23/ 11,9	

Cond.ac. = Condyloma acuminatum; (C, Va, V, A) IN 1-3 = zervikale, vaginale, vulväre, anale intraepitheliale Neoplasie Grad 1-3, (C, V) SCC = cervical, vulvar squamous cell carcinoma

3.1.2 Die Einzelkollektive

Die Patientinnen wurden nach den Parametern Multizentrität und Metachronizität in zwei Kollektive eingeteilt. Das erste Kollektiv setzte sich aus Patientinnen zusammen, welche solitäre oder allenfalls multifokale Läsionen an einem Organ aufwiesen. Es durften keine weiteren Läsionen in Folge oder in der Vorgeschichte aufgetreten sein. Zu Kollektiv II wurden demgegenüber Patientinnen gezählt, die multizentrische und/oder metachrone Befunde aufwiesen. Es ergab sich folgende Verteilung der Patientinnen:

Kollektiv I → 44 Patientinnen (48 Läsionen untersucht)

Kollektiv II → 82 Patientinnen (148 Läsionen untersucht)

Die Verteilung der Gewebeproben in den Einzelkollektiven ist in Tab. 3.3 aufgeführt.

Tabelle 3.3: Läsionsgrade Kollektiv I und II

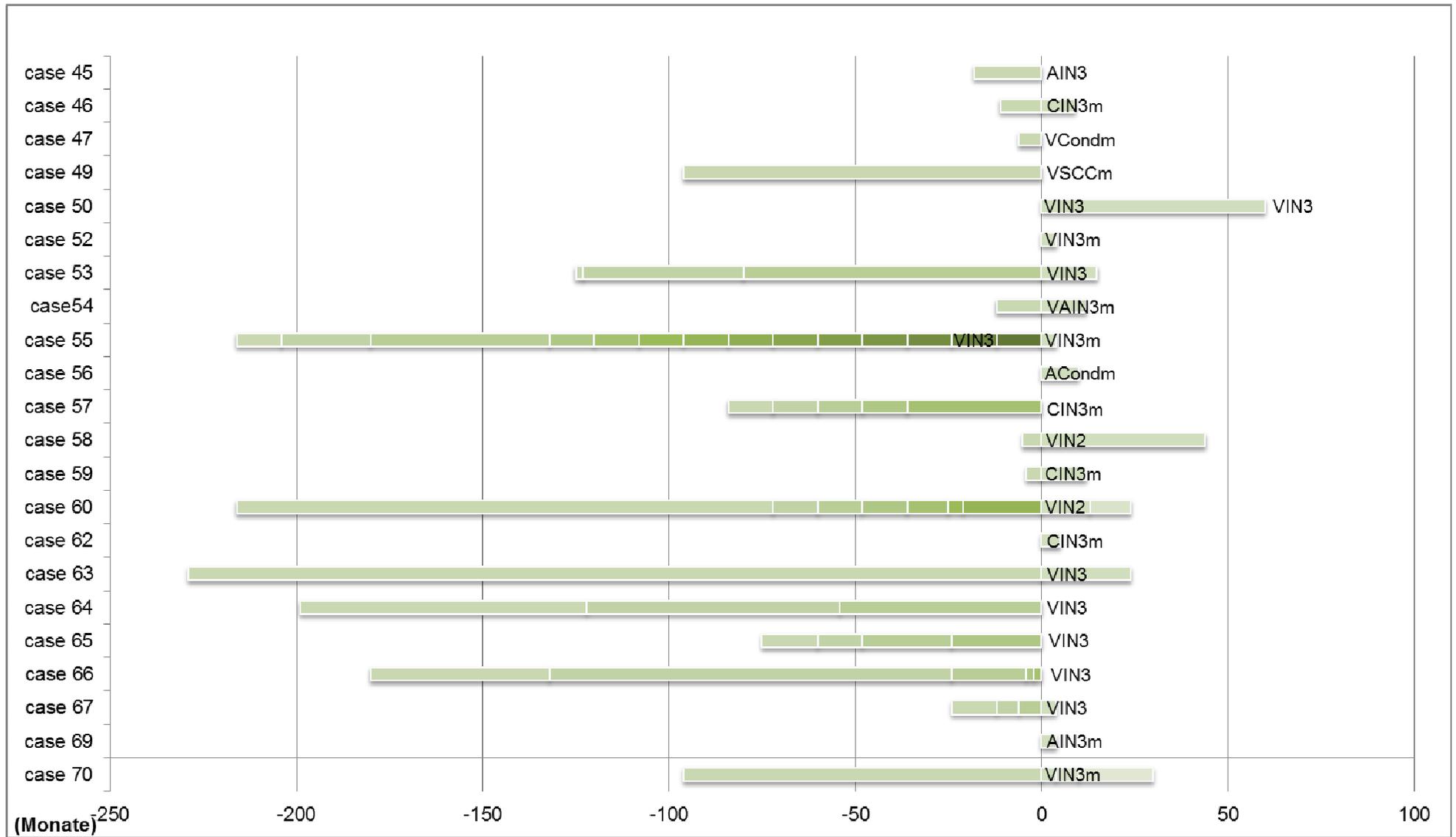
	Benigne Formen		Präkanzerosen			Maligne Formen	Summe n/ %
	Cond.ac.	(C, Va, V, A) IN 1	(C, Va, V, A) IN 2	(C, Va, V, A) IN 3	(C, V) SCC		
K I, n=48							
Zervix	-	-	-	-	-	-	-
Vagina	-	-	1	-	-	-	1/ 2,1
Vulva	1	-	3	11	28		43/ 89,6
Anus	1	-	2	1	-		4/ 8,3
K II, n=148							
Zervix	1	1	8	13	1		24/ 16,5
Vagina	-	2	8	4	-		14/ 9,7
Vulva	1	3	22	57	5		88/ 60,7
Anus	1	1	2	15	-		19/ 13,1

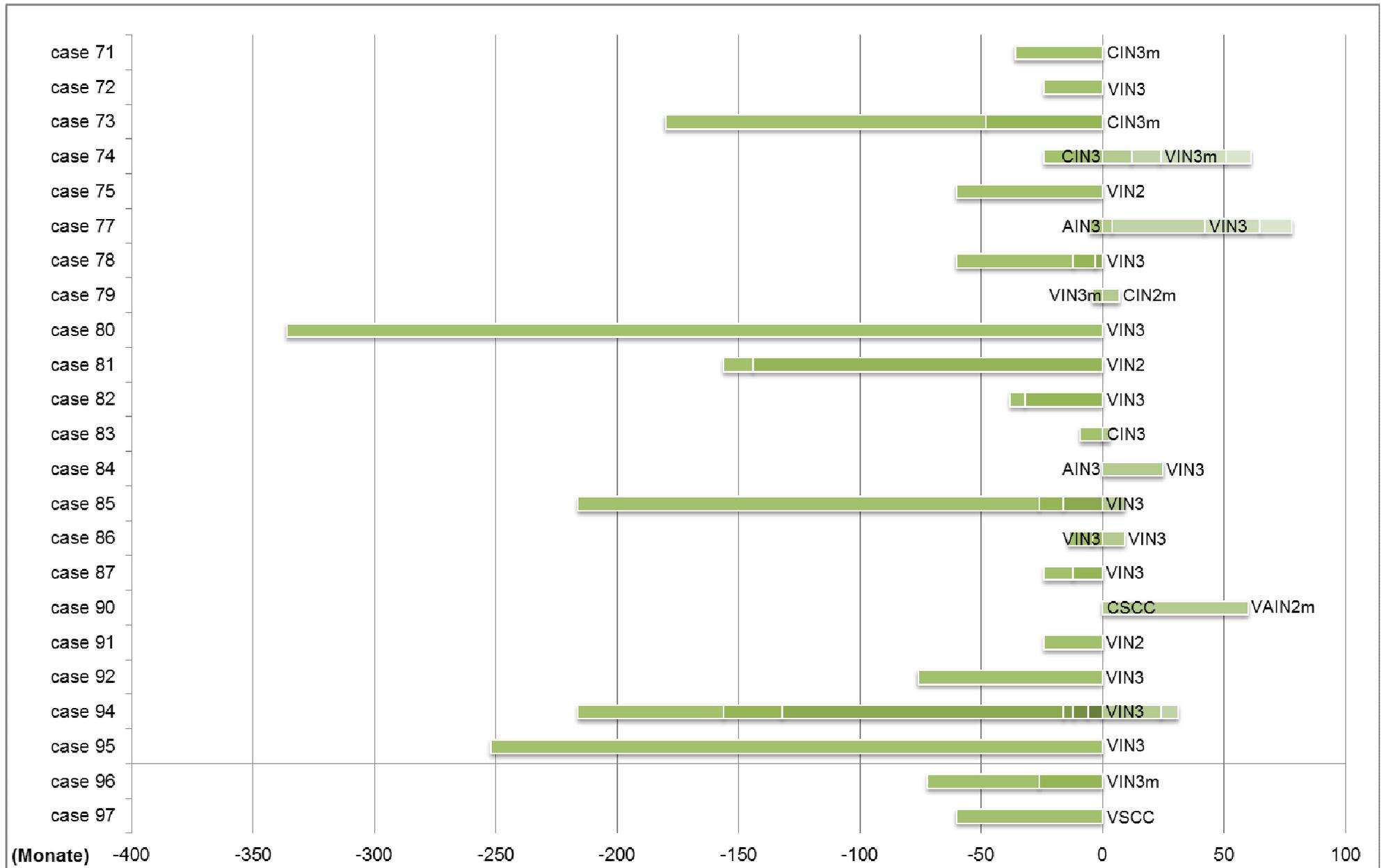
Cond.ac. = Condyloma accuminatum; (C, Va, V, A) IN 1-3 = zervikale, vaginale, vulväre und anale intraepitheliale Neoplasie Grad 1-3, (C, V) SCC = cervical, vulvar squamous cell carcinoma

3.1.3 Multizentrität und Metachronizität

Wie bereits erwähnt lag ein besonderes Augenmerk dieser Studie auf der Multizentrität und Metachronizität der Befunde. Es fanden sich 35 Patientinnen, bei denen im Zeitraum der Studie mehr als eine Läsion der HPV-Testung zugeführt werden konnte und mindestens zwei Läsionen HPV-positiv waren. Es fiel auf, dass es zwei verschiedene Gruppen von Patienten zu geben schien. Bei der einen Gruppe war in allen Läsionen einer Patientin zumindest einen HPV-Typ konstant (27 Patientinnen, 77,1 %). Die andere Gruppe setzte sich aus Patientinnen zusammen, deren Läsionen jeweils von unterschiedlichen HPV-Typen infiziert waren (8 Patientinnen, 22,9 %).

Bei vielen Patientinnen des zweiten Kollektivs, welche metachrone Läsionen aufwiesen, konnte jedoch nur eine Läsion untersucht werden, da die restlichen metachronen Befunde lediglich den entsprechenden Patientenakten entnommen worden waren. Abb. 3.1. zeigt sämtliche Patientinnen mit metachronen Läsionen sowie deren zeitlichen Verlauf. Die Beschriftungen entsprechen denjenigen Läsionen, von denen Gewebeproben zur Verfügung standen. Der längste untersuchte Zeitraum, in welchem bei einer Patientin Läsionen auftraten, umfasste 336 Monate.





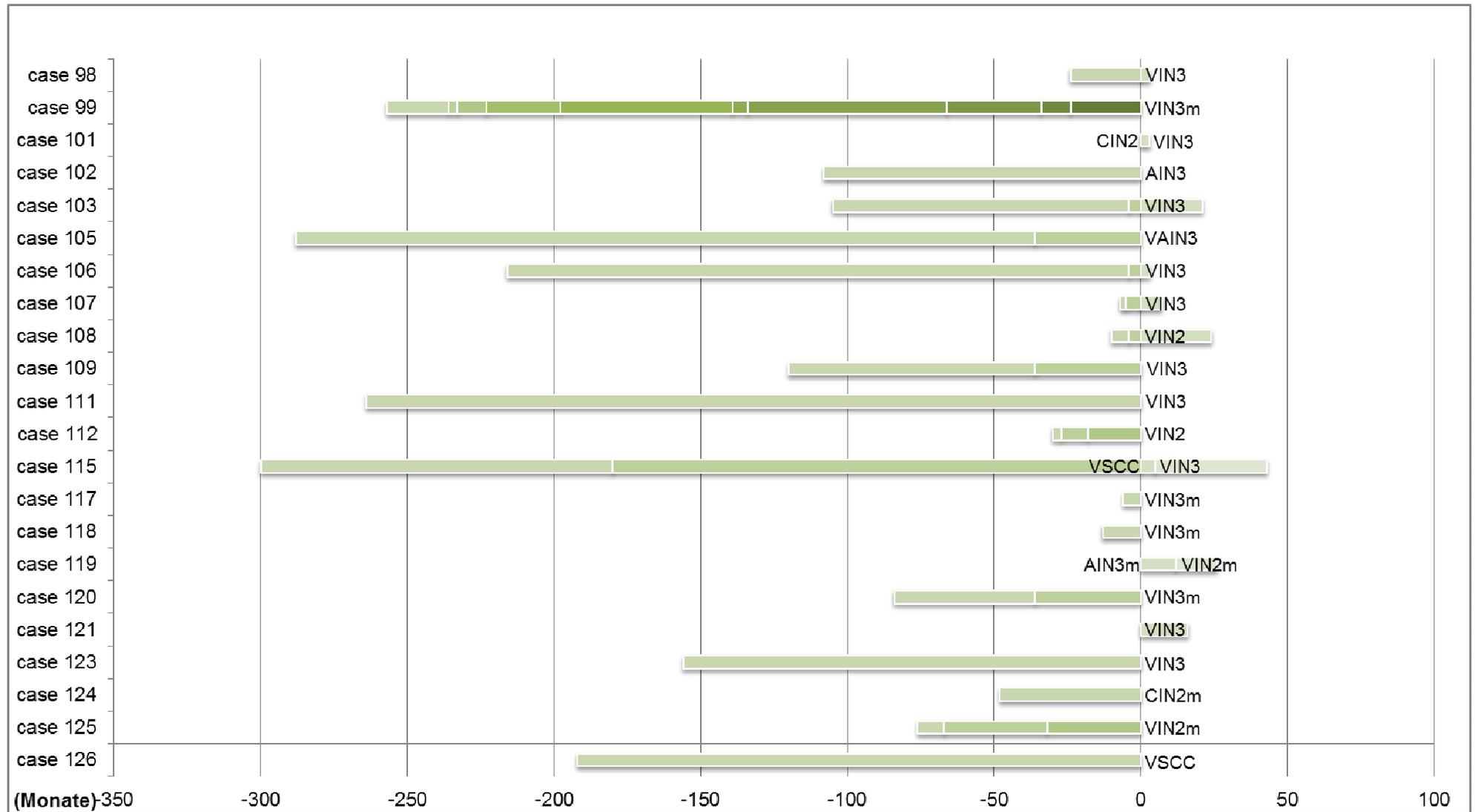


Abb. 3.1: **Metachrone Läsionen**; Beschriftung: aktuell untersuchte Läsionen; Cond. = Condyloma acuminatum; IN 1-3 = intraepitheliale Neoplasie Grad 1-3; SCC = squamous cell carcinoma; C, Va, V, A = zervikal, vaginal, vulvär, anal; m = multizentrische Befunde; Balkenstriche: metachrone Befunde; t 0: Indexläsion

Die Verteilung der Indexläsionen der multizentrischen Fälle auf die verschiedenen Bereiche des weiblichen unteren Genitaltrakts ist in Abb. 3.2 dargestellt. Der Anteil der Befunde, der nicht der Vulva entstammte, war im Vergleich zum Gesamtkollektiv (Abb. 3.3) deutlich höher.

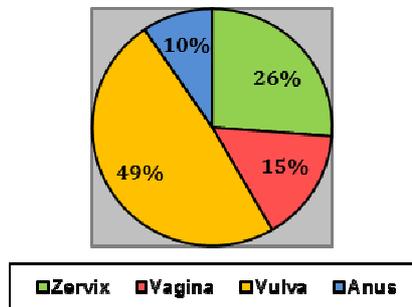


Abb. 3.2: Verteilung Indexläsionen, multizentrische Fälle

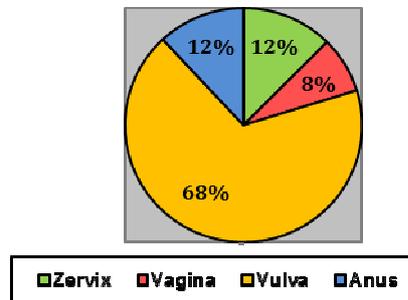


Abb. 3.3: Verteilung Indexläsionen, Gesamtkollektiv

3.2 Klinische Parameter

3.2.1 Alter

Im Gesamtkollektiv betrug das mittlere Alter der 126 Patientinnen 44,3 Jahre (Range 16-80). Zwischen den beiden Einzelkollektiven fand sich ein signifikanter Altersunterschied von fast 10 Jahren ($p = 0,0001$): Das mittlere Alter betrug im Kollektiv I 50,8 Jahre, im Kollektiv II dagegen nur 40,8 Jahre. Eine Übersicht zeigt Tab. 3.4.

Tabelle 3.4: Altersverteilung Gesamtkollektiv und Einzelkollektive

	Patientinnen (n)	Mittelwert (Jahre)	Median (Jahre)	Range (Jahre)
Gesamtkollektiv	126	44,3	42,5	16-80
Kollektiv I	44	50,8	51,5	18-80
Kollektiv II	82	40,8	39	16-77

Bei der Betrachtung des Alters in Abhängigkeit von der Lokalisation der Läsionen zeigte sich, dass die Patientinnen mit zervikalen Läsionen fast 10 Jahre jünger waren als Patientinnen mit Läsionen in unteren Bereichen des Genitaltrakts. Bezog man den Läsionsgrad mit ein, war eine eindeutige Korrelation zwischen mittlerem Patientenalter und Schweregrad der Läsion im Bereich der Vagina sowie Vulva zu sehen.

Tab. 3.5 zeigt die Altersverteilung in den verschiedenen Lokalisationen, sowie für den Vaginal- und den Vulvabereich gesondert nach Läsionsgrad.

Tabelle 3.5: Altersverteilung in Abhängigkeit von der Befund-Lokalisation (sowie von dem Läsionsgrad für Vagina und Vulva), Gesamtkollektiv

	Patientinnen (n)	Mittelwert (Jahre)	Median (Jahre)	Range (Jahre)
Zervix	24	34,8	34,5	16-54
Vagina	13	44,5	38	28-67
VAIN 1	2	37,5	37,5	37-38
VAIN 2	8	42,4	39,5	28-65
VAIN 3	3	55	64	34-67
Vulva	117	44,4	43	16-80
Cond.ac.	2	29,5	29,5	18-41
VIN 1	3	36	32	23-53
VIN 2	25	36,8	36	16-65
VIN 3	61	45,5	43	26-80
SCC	33	50,2	52	18-77
Anus	21	41,5	41	18-63

Cond.ac. = Condyloma acuminatum, VIN 1-3 = vulväre intraepitheliale Neoplasie Grad 1-3, SCC = squamous cell carcinoma, VAIN 1-3 = vaginale intraepitheliale Neoplasie Grad 1-3

Wurde das Verhältnis von Patientinnenalter und Läsionsgrad unabhängig von der Lokalisation untersucht, ergab sich im Gesamtkollektiv sowie im ersten Kollektiv ebenfalls eine Korrelation (Tab. 3.6). So lag im Gesamtkollektiv das Durchschnittsalter der Patientinnen mit reinen Kondylomata bei 35,4 Jahren. Patientinnen mit invasiven Befunden waren dagegen durchschnittlich 49,6 Jahre alt.

Im zweiten Kollektiv waren die fünf Patientinnen mit invasiven Läsionen auffallend jung (durchschnittlich 37,5 Jahre). Bei den nicht-invasiven Läsionen war jedoch ein Anstieg des Alters mit dem Grad der Läsion zu erkennen.

Tabelle 3.6: Altersverteilung in Abhängigkeit von dem Läsionsgrad, Gesamtkollektiv

	Patientinnen (n)	Mittelwert (Jahre)	Median (Jahre)	Range (Jahre)
<u>Gesamtkollektiv</u>				
Cond.ac.	5	35,4	39	18-54
(C, Va, V, A) IN 1	7	37,6	37	23-53
(C, Va, V, A) IN 2	35	38,2	37	16-65
(C, Va, V, A) IN 3	73	44,6	43	18-80
SCC	34	49,6	50	18-77
<u>Kollektiv I</u>				
Cond.ac.	2	40	40	39-41
(C, Va, V, A) IN 1	0	-	-	-
(C, Va, V, A) IN 2	5	46,2	46	32-65
(C, Va, V, A) IN 3	11	51,2	52	26-80
SCC	28	52,2	53,5	18-77
<u>Kollektiv II</u>				
Cond.ac.	3	32,3	25	18-54
(C, Va, V, A) IN 1	7	37,6	37	23-53
(C, Va, V, A) IN 2	30	36,9	36,5	16-65
(C, Va, V, A) IN 3	62	43,5	41,5	18-77
SCC	6	37,5	36	25-54

Cond.ac. = Condyloma acuminatum; (C, Va, V, A) IN 1-3 = zervikale, vaginale, vulväre, anale intraepitheliale Neoplasie Grad 1-3, SCC = squamous cell carcinoma

3.2.2 Zigarettenkonsum

Für 111 der 126 Patientinnen lagen Informationen über das Rauchverhalten vor (Tab. 3.7). Eine Patientin wurde als Raucherin gewertet, wenn sie einen aktuellen Zigarettenkonsum angab oder mindestens 10 Jahre lang geraucht hatte, unabhängig davon, wie lange dieser Konsum zurücklag. Es zeigte sich, dass 72,1 % rauchten, bzw. langjährig geraucht hatten. Im ersten Kollektiv war dieser Anteil geringer, er lag bei 61 %. In Kollektiv II rauchten dagegen 55 von 70 Patientinnen (78,6 %). Dieser Unterschied war signifikant ($p = 0,046$). Stratifizierte man den Zigarettenkonsum nach Altersgruppen in Quintilen, fand sich ein recht hoher Anteil an Raucherinnen (79 %, 82,9 % und 86,7 %) in den ersten drei Altersgruppen bis zu den 60-jährigen. Ab einem Lebensalter von 61 Jahren sank die Anzahl der Konsumierenden deutlich und rasch bis auf 0.

Die Tab. 3.7 zeigt die Stratifizierung nach Altersgruppen zusätzlich auch für die Einzelkollektive. Mit Ausnahme der Altersstufe 76-90 Jahre fanden sich in jeder Altersgruppe

des zweiten Kollektivs anteilig mehr Raucherinnen als in der entsprechenden Gruppe des ersten Kollektivs.

Tabelle 3.7: **Zigarettenkonsum in Gesamtkollektiv und Einzelkollektiven**

	Patientinnen (n)	Raucherinnen (n)	Raucherinnen (%)
<u>Gesamtkollektiv</u>	111	80	72,1
Altersgruppe (Jahre)			
16-30	19	15	79
31-45	41	34	82,9
46-60	30	26	86,7
61-75	17	5	29,4
76-90	4	0	0
<u>Kollektiv I</u>	41	25	61
Altersgruppe (Jahre)			
16-30	3	2	66,7
31-45	11	8	72,7
46-60	15	13	86,7
61-75	9	2	22,2
76-90	3	0	0
<u>Kollektiv II</u>	70	55	78,6
Altersgruppe (Jahre)			
16-30	16	13	81,3
31-45	30	26	86,7
46-60	15	13	86,7
61-75	8	3	37,5
76-90	1	0	0

3.2.3 Einnahme von Hormonpräparaten (Pille, HRT = hormon replacement therapy)

Für 114 Patientinnen konnte in Erfahrung gebracht werden, ob sie orale Kontrazeptiva oder Hormonersatzpräparate einnahmen (Tab. 3.8). Der Anteil der Frauen, die Hormone einnahmen, war im zweiten Kollektiv höher, der Unterschied jedoch nicht signifikant ($p = 0,13$).

Stratifizierte man nach 15-Jahres-Altersgruppen, zeigte sich, dass dieser Unterschied in den drei jüngeren Altersstufen am deutlichsten war (33,3 %, 16,7 % und 26,7 %

Hormoneinnahme im ersten Kollektiv vs. 52,9 %, 34,4 % und 40 % im zweiten Kollektiv). Er erreichte aber auch hier keine Signifikanz (16-30 Jahre: $p = 0,50$; 31-45 Jahre: $p = 0,22$; 46-60 Jahre: $p = 0,35$). Bei den 61-75-jährigen kehrte sich das Verhältnis um (33,3 % Kollektiv I vs. 14,3 % Kollektiv II).

Tabelle 3.8: **Hormonstatus in Gesamtkollektiv und Einzelkollektiven**

	Patientinnen (n)	Hormon-Einnahme (n)	Hormon-Einnahme (%)
<u>Gesamtkollektiv</u>	114	37	32,5
Altersgruppe (Jahre)			
16-30	20	10	50
31-45	44	13	30
46-60	30	10	33,3
61-75	16	4	25
76-90	4	0	0
<u>Kollektiv I</u>	42	10	23,8
Altersgruppe (Jahre)			
16-30	3	1	33,3
31-45	12	2	16,7
46-60	15	4	26,7
61-75	9	3	33,3
76-90	3	0	0
<u>Kollektiv II</u>	72	27	37,5
Altersgruppe (Jahre)			
16-30	17	9	52,9
31-45	32	11	34,4
46-60	15	6	40
61-75	7	1	14,3
76-90	1	0	0

3.2.4 Parität

Bei 117 Patientinnen war der Paritätsstatus bekannt (Tab. 3.9). Nach 15-Jahres-Altersgruppen stratifiziert ergab sich, wie erwartet, eine Abnahme des Anteils der Nullipara mit zunehmendem Alter. Eine Ausnahme bildete die Gruppe der 76-90-jährigen mit 50 %

Nullipara (zwei von vier Patientinnen).

Auf Grund niedriger Patientinnenzahlen war der Vergleich der Kollektive innerhalb der Altersgruppen 16-30 Jahre und 76-90 Jahre eingeschränkt aussagekräftig. Betrachtete man den Paritätsstatus ohne Berücksichtigung des Alters, fanden sich im zweiten Kollektiv 15,3 % mehr Nullipara (nicht signifikant: $p = 0,10$). Ein ähnlicher Unterschied zeigte sich bei den 31-45-jährigen mit 27,3 % Nullipara im ersten Kollektiv (3 von 11 Frauen) und 43,8 % im zweiten Kollektiv (14 von 32 Frauen). Auch hier lag keine Signifikanz ($p = 0,58$) vor.

Tabelle 3.9: **Paritätsstatus in Gesamtkollektiv und Einzelkollektiven**

	Patientinnen (n)	Nullipara (n)	Nullipara (%)
<u>Gesamtkollektiv</u>	117	43	36,8
Altersgruppe (Jahre)			
16-30	21	17	81
31-45	44	17	38,6
46-60	31	5	16,1
61-75	17	2	11,8
76-90	4	2	50
<u>Kollektiv I</u>	41	11	26,8
Altersgruppe (Jahre)			
16-30	3	3	100
31-45	11	3	27,3
46-60	15	2	13,3
61-75	9	1	11,1
76-90	3	2	66,7
<u>Kollektiv II</u>	76	32	42,1
Altersgruppe (Jahre)			
16-30	18	14	77,8
31-45	32	14	43,8
46-60	16	3	18,8
61-75	8	1	12,5
76-90	1	0	0

3.3 Biomarker

3.3.1 HPV-Status

Für 181 Gewebeproben konnte der HPV-Status ermittelt werden, bei vier Proben des ersten Kollektivs und elf Proben des zweiten Kollektivs war der HPV-Status unbekannt.

3.3.1 a) HPV-Status unabhängig von Grad und Lokalisation der Läsionen

Im Gesamtkollektiv waren 27 Proben HPV-negativ (14,9 %) und 154 Proben HPV-positiv (85,1 %). In 137 der positiven Fälle wurden high risk-Typen gefunden, in 17 Fällen low risk-Typen.

Untersuchte man gesondert die Kollektive I und II, zeigten sich in Hinblick auf den HPV-Status deutliche Unterschiede: Während in Kollektiv I 25 von 42 Gewebeproben HPV-positiv waren (59,5 %), wurden in Kollektiv II 129 von 139 Proben HPV-positiv getestet (92,8 %), davon 114 (82 %) high risk-positiv.

Betrachtete man nicht isoliert die einzelnen Läsionen, sondern den HPV-Status der Patientinnen, so konnte für 118 Patientinnen der HPV-Status ermittelt werden. 82,2 % hatten zumindest eine HPV-positive Läsion. Im ersten Kollektiv betrug dieser Anteil 56,4 %, in Kollektiv II war er mit 94,9 % signifikant größer ($p < 0,0001$, Abb. 3.4).

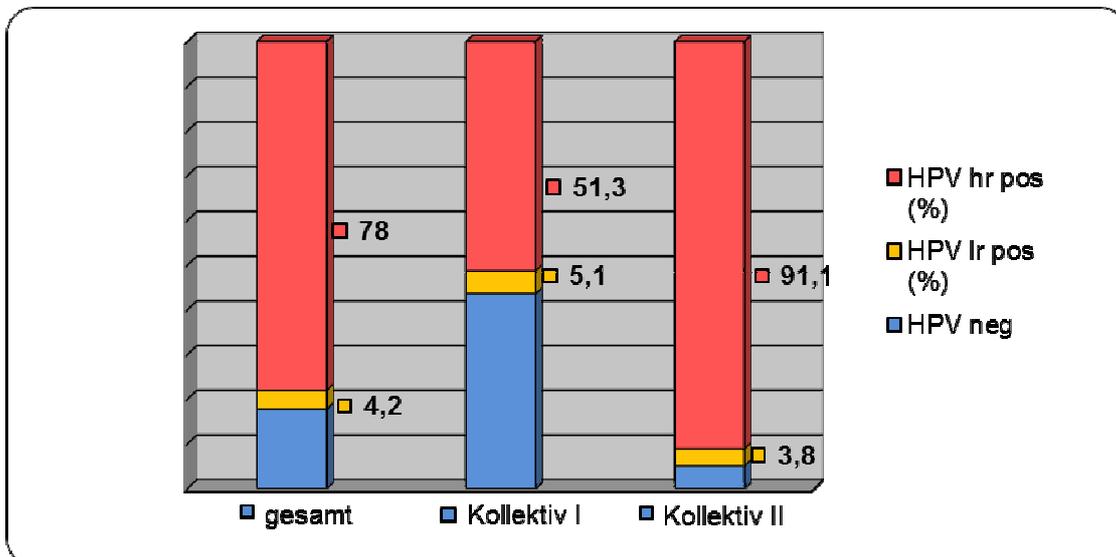


Abb. 3.4: HPV-Status, Gesamtkollektiv und Einzelkollektive

HPV = Humanes Papillomavirus, lr/hr = low/high risk, pos = positiv, neg = negativ

Insgesamt dominierte der high risk-HPV-Typ 16, der in 106 Läsionen (68,8 %) nachgewiesen werden konnte. An zweiter Stelle stand der HPV-Typ 33 (22 Läsionen, 14,3 %).

Mischinfektionen lagen in 20 der 154 HPV-positiven Gewebeproben vor (13,0 %), 16mal eine Kombination mit HPV 16.

Im ersten Kollektiv dominierte ebenfalls deutlich der HPV-Typ 16. Nur in einem Fall lag eine Mischinfektion, 16+33, vor (4 %), die restlichen Mischinfektionen fielen ins zweite Kollektiv (14,7 %). In Tab. 3.10 sind sämtliche gefundenen HPV-Typen mit den entsprechenden Häufigkeiten dargestellt.

Tabelle 3.10: **HPV-Subtypen, Gesamtkollektiv** (158 Proben HPV-positiv), **Kollektiv I** (25 Proben HPV-positiv), **Kollektiv II** (129 Proben HPV-positiv)

HPV Subtypen	Infektionen gesamt (%)	Einzelinfektionen (%)	Infektionen gesamt (%)	Einzelinfektionen (%)	Infektionen gesamt (%)	Einzelinfektionen (%)
	<u>Gesamtkollektiv</u>		<u>Kollektiv I</u>		<u>Kollektiv II</u>	
High risk						
16	68,8	59,1	80	76	67,4	55,8
33	14,3	11,7	8	4	15,5	13,2
18	3,3	2,6	4	4	3,1	2,3
58	1,9	1,3			2,3	1,6
31	1,9	0,6			2,3	0,8
51	1,3	0,6			1,6	0,8
59	1,3	0,6			1,6	0,8
35	0,6	0,6			0,8	0,8
52	0,6	0,6	4	4		
56	0,6	0,6			0,8	0,8
Low risk						
67	3,9	1,9			4,7	2,3
42	3,9	1,9	4	4	3,9	1,6
66	2,6	1,3	4	4	2,3	2,3
6	1,9	1,3			2,3	1,6
11	1,9	-			2,3	-
72	1,9	-			2,3	-
61	0,6	0,6			0,8	0,8
53	0,6	-			0,8	-

HPV = Humanes Papillomavirus

Tab. 3.11 zeigt gesondert die Zusammensetzung der Mischinfektionen. Die Konstellation HPV 16+33 wurde am häufigsten nachgewiesen.

Tabelle 3.11: HPV-Koinfektionen, Gesamtkollektiv

HPV Subtypen	Anteil (%)
16+33	2,6
16+unbekannt	1,9
16+42	1,9
67+72+unbekannt	1,9
16+11	1,3
16+31	1,3
6+11	0,6
16+58	0,6
16+18+51+53+59	0,6

HPV = Humanes Papillomavirus

3.3.1 b) HPV-Status abhängig von der Befund-Lokalisation

Tab. 3.12 gibt einen Überblick über den HPV-Status der Läsionen des Gesamtkollektivs in Abhängigkeit von der Befundlokalisierung. Für die verschiedenen Bereiche des weiblichen Genitaltrakts ergaben sich folgende Ergebnisse:

Vulva:

118 der aus dem Vulvabereich stammenden Proben konnten auf ihren HPV-Status hin untersucht werden. Es ergab sich für 80,5 % der Proben ein positives Ergebnis. Auffallend war, dass der Anteil der HPV-positiven Fälle bei den invasiven Läsionen nur 53,3 % betrug, derjenige der VIN III dagegen 95,1 %. Die Verteilung der HPV-Typen zeigte eine deutliche Dominanz von HPV 16 (77,9 %). Auch hier folgte HPV 33 an zweiter Stelle (12,6 %).

Zervix:

Für die zervikalen Proben konnte ausnahmslos der HPV-Status ermittelt werden. 91,7 % waren HPV-positiv. HPV 16 wurde am häufigsten nachgewiesen (31,8 %), jedoch nahmen andere high risk-HPV-Typen, inklusive HPV 33, ein deutlich größeres Gewicht ein als im Bereich der Vulva.

Anus:

Das Vorliegen einer HPV-Infektion konnte bei 22 der 23 analen Fälle überprüft werden. Die Testergebnisse waren zu 100 % HPV-positiv. HPV 16 wurde in einem ähnlich hohen Anteil nachgewiesen wie in den Vulva-Läsionen (77,3 %).

Vagina:

Bei den vaginalen Läsionen konnte der HPV-Status für alle 15 Proben erhoben werden, dabei wurden 86,7 % HPV-positiv getestet. Der Anteil der HPV 16-positiven Läsionen betrug 61,5 %. Er lag damit leicht unter demjenigen der Läsionen aus der Vulva oder der Analregion.

Tabelle 3.12: HPV-Status in den verschiedenen Lokalisationen, Gesamtkollektiv

	Proben (n)	HPV + (n/% ¹)	hr (n/% ²)	16 (n/% ²)	33 (n/% ²)	18 (n/% ²)	else hr (n/% ²)	lr (n/% ²)
<u>Vulva</u>								
Cond.ac.	1	1/100	-	-	-	-	-	1/100
VIN 1	3	2/66,7	1/50	-	1/50	-	-	1/50
VIN 2	23	18/78,3	16/88,9	14/77,8	1/5,6	1/5,6	-	2/11,1
VIN 3	61	58/95,1	56/96,6	47/81,0	9/15,5	1/1,7	2/3,4	2/3,4
SCC	30	16/53,3	15/93,8	13/81,3	1/6,3	1/6,3	1/6,3	1/6,3
Summe	118	95/80,5	88/92,6	74/77,9	12/12,6	3/3,2	3/3,2	7/7,4
<u>Zervix</u>								
Cond.ac.	1	1/100	-	-	-	-	-	1/100
CIN 1	1	-	-	-	-	-	-	-
CIN 2	8	7/87,5	5/71,4	1/14,3	1/14,3	1/14,3	3/42,9	2/28,6
CIN 3	13	13/100	12/92,3	5/38,5	4/30,8	-	4/30,8	1/7,7
SCC	1	1/100	1/100	1/100	-	-	-	-
Summe	24	22/91,7	18/81,8	7/31,8	5/22,7	1/4,6	7/31,8	4/18,2
<u>Anus</u>								
Cond.ac.	1	1/100	1/100	1/100	-	1/100	1/100	-
AIN 1	1	1/100	1/100	1/100	-	-	-	-
AIN 2	4	4/100	3/75	3/75	-	-	-	1/25
AIN 3	16	16/100	14/93,8	12/75	3/18,8	-	-	2/12,5
SCC	-	-	-	-	-	-	-	-
Summe	22	22/100	19/86,4	17/77,3	3/13,6	1/4,5	1/4,5	3/13,6
<u>Vagina</u>								
Cond.ac.	-	-	-	-	-	-	-	-
VAIN 1	2	2/100	1/50	1/50	-	-	-	1/50
VAIN 2	9	7/77,8	6/85,7	3/42,9	2/28,6	-	1/14,3	1/14,3
VAIN 3	4	4/100	4/100	4/100	-	-	-	-
SCC	-	-	-	-	-	-	-	-
Summe	15	13/86,7	11/84,6	8/61,5	2/15,4	-	1/7,7	2/15,4

%¹: bezieht sich auf die Gesamtzahl der Läsionen, %²: bezieht sich auf die HPV-positiven Läsionen

HPV+ = Humanes Papillomavirus-positiv; hr/lr = high/low risk; Cond.ac. = Condyloma acuminatum, (C, Va, V, A) IN 1-3 = zervikale, vaginale, vulväre, anale intraepitheliale Neoplasie Grad 1-3, SCC = squamous cell carcinoma

In Tab. 3.13 und 3.14 wird der HPV-Status in Abhängigkeit von der Befundlokalisierung gesondert für Kollektiv I und II dargestellt. Für die einzelnen Bereiche zeigte sich Folgendes:

Vulva:

In Kollektiv I wurden lediglich 57,9 % der Vulva-Läsionen HPV-positiv getestet. Koinfektionen lagen nicht vor. Die Rate der HPV-positiven VIN 3-Fälle war wie im Gesamtkollektiv deutlich höher als diejenige der invasiven Läsionen. Im Vergleich dazu waren die Proben des zweiten Kollektivs zu 91,3 % HPV-positiv und der Anteil der positiven Befunde nahm in Korrelation zum Läsionsgrad zu.

Zervix:

Das erste Kollektiv beinhaltete keine zervikalen Läsionen. Gesamtkollektiv und Kollektiv II entsprachen sich somit.

Anus:

In Kollektiv I befanden sich lediglich drei anale Läsionen mit bekanntem HPV-Status, alle high risk-HPV-positiv (16 und 16+33). Auffällig im zweiten Kollektiv war die Koinfektion des Kondylombefundes. Es fanden sich hier folgende HPV-Typen: 16, 18, 51, 53 und 59.

Vagina:

Der einzige vaginale Befund im ersten Kollektiv, eine VAIN 2, war HPV-negativ. Die restlichen vaginalen Proben befanden sich im Kollektiv II, 13 (92,9 %) waren HPV-positiv.

Tabelle 3.13: HPV-Status in den verschiedenen Lokalisationen, Kollektiv I

	Proben (n)	HPV + (n/% ¹)	hr (n/% ²)	16 (n/% ²)	33 (n/% ²)	18 (n/% ²)	else hr (n/% ²)	lr (n/% ²)
<u>Vulva</u>								
Cond.ac.	1	1/100	-	-	-	-	-	1/100
VIN 1	-	-	-	-	-	-	-	-
VIN 2	3	3/100	3/100	3/100	-	-	-	-
VIN 3	9	7/77,8	7/100	6/85,7	1/14,3	-	-	-
SCC	25	11/44	10/90,9	8/72,7	-	1/9,1	1/9,1	1/9,1
Summe	38	22/57,9	20/90,9	17/77,3	1/4,5	1/4,5	1/4,5	2/9,1
<u>Zervix</u>								
-								
<u>Anus</u>								
Cond.ac.	-	-	-	-	-	-	-	-
AIN 1	-	-	-	-	-	-	-	-
AIN 2	2	2/100	2/100	2/100	-	-	-	-
AIN 3	1	1/100	1/100	1/100	1/100	-	-	-
SCC	-	-	-	-	-	-	-	-
Summe	3	3/100	3/100	3/100	1/33,3	-	-	-
<u>Vagina</u>								
Cond.ac.	-	-	-	-	-	-	-	-
VAIN 1	-	-	-	-	-	-	-	-
VAIN 2	1	-	-	-	-	-	-	-
VAIN 3	-	-	-	-	-	-	-	-
SCC	-	-	-	-	-	-	-	-
Summe	1	-	-	-	-	-	-	-

%¹: bezieht sich auf die Gesamtzahl der Läsionen, %²: bezieht sich auf die HPV-positiven Läsionen

HPV+ = Humanes Papillomavirus-positiv; hr/lr = high/low risk; Cond.ac. = Condyloma acuminatum, (C, Va, V, A) IN 1-3 = zervikale, vaginale, vulväre, anale intraepitheliale Neoplasie Grad 1-3, SCC = squamous cell carcinoma

Tabelle 3.14: HPV-Status in den verschiedenen Lokalisationen, Kollektiv II

	Proben (n)	HPV + (n/% ¹)	hr (n/% ²)	16 (n/% ²)	33 (n/% ²)	18 (n/% ²)	else hr (n/% ²)	lr (n/% ²)
<u>Vulva</u>								
Cond.ac.	-	-	-	-	-	-	-	-
VIN 1	3	2/66,7	1/50	-	1/50	-	-	1/50
VIN 2	20	15/75	13/86,7	11/73,3	1/6,7	1/6,7	-	2/13,3
VIN 3	52	51/98,1	49/96,1	41/80,4	8/15,7	1/2,0	2/3,9	2/3,9
SCC	5	5/100	5/100	5/100	1/20	-	-	-
Summe	80	73/91,3	68/93,2	57/78,1	11/15,1	2/2,7	2/2,7	5/6,9
<u>Zervix</u>								
Cond.ac.	1	1/100	-	-	-	-	-	1/100
CIN 1	1	-	-	-	-	-	-	-
CIN 2	8	7/87,5	5/71,4	1/14,3	1/14,3	1/14,3	3/42,9	2/28,6
CIN 3	13	13/100	12/92,3	5/38,5	4/30,8	-	4/30,8	1/7,7
SCC	1	1/100	1/100	1/100	-	-	-	-
Summe	24	22/91,7	18/81,8	7/31,8	5/22,7	1/4,6	7/31,8	4/18,2
<u>Anus</u>								
Cond.ac.	1	1/100	1/100	1/100	-	1/100	1/100	-
AIN 1	1	1/100	1/100	1/100	-	-	-	-
AIN 2	2	2/100	1/50	1/50	-	-	-	1/50
AIN 3	15	15/100	13/86,7	11/73,3	2/13,3	-	-	2/13,3
SCC	-	-	-	-	-	-	-	-
Summe	19	19/100	16/84,2	14/73,7	2/10,5	1/5,3	1/5,3	3/15,8
<u>Vagina</u>								
Cond.ac.	-	-	-	-	-	-	-	-
VAIN 1	2	2/100	1/50	1/50	-	-	-	1/50
VAIN 2	8	7/87,5	6/85,7	3/42,9	2/28,6	-	1/14,3	1/14,3
VAIN 3	4	4/100	4/100	4/100	-	-	-	-
SCC	-	-	-	-	-	-	-	-
Summe	14	13/92,9	11/84,6	8/61,5	2/15,4	-	1/7,7	2/15,4

%¹: bezieht sich auf die Gesamtzahl der Läsionen, %²: bezieht sich auf die HPV-positiven Läsionen

HPV+ = Humanes Papillomavirus-positiv; hr/lr = high/low risk; Cond.ac. = Condyloma acuminatum, (C, Va, V, A) IN 1-3 = zervikale, vaginale, vulväre, anale intraepitheliale Neoplasie Grad 1-3, SCC = squamous cell carcinoma

3.3.1 c) HPV-Status abhängig von dem Läsionsgrad

Im Bereich der intraepithelialen Läsionen war ein Zusammenhang des HPV-Status mit dem Läsionsgrad gut sichtbar (Tab. 3.15): Der Anteil der HPV high risk-positiven Befunde stieg von 33,3 % bei den Kondylomen auf 91,5 % bei den drittgradigen Läsionen an. Diese Korrelation war signifikant ($p < 0,0001$). Wie zu erwarten war der Prozentsatz der HPV-positiven invasiven Läsionen niedriger als derjenige der intraepithelialen Läsionen dritten Grades. Dennoch sind 54,8 % der Karzinome HPV-positiv, 51,6 % high risk positiv.

Tabelle 3.15: **HPV-Status in Abhängigkeit von dem Läsionsgrad, Gesamtkollektiv**

	Proben (n)	HPV+ (n)	HPV+ (%)	hrHPV+ (n)	hrHPV+ (%)
Cond.ac.	3	3	100	1	33,3
(C, Va, V, A) IN 1	7	5	71,4	3	42,9
(C, Va, V, A) IN 2	44	36	81,8	30	68,2
(C, Va, V, Pa) IN 3	94	91	96,8	86	91,5
SCC	31	17	54,8	16	51,6
Summe	179	152	84,9	136	76

HPV+ = Humanes Papillomavirus positiv, hr = high risk; Cond.ac. = Condyloma acuminatum, (C, Va, V, A) IN 1-3 = zervikale, vaginale, vulväre, anale intraepitheliale Neoplasie Grad 1-3, SCC = squamous cell carcinoma

3.3.1 d) HPV-Status versus Alter

Bei 118 Patientinnen konnte wenigstens in einem Befund der HPV-Status ermittelt werden (Tab. 3.16). Dabei ergab sich ein signifikanter Altersunterschied zwischen Patientinnen mit rein HPV-negativen Läsionen und solchen mit HPV-positiven Befunden. Die Erstgenannten waren im Schnitt 57,7 Jahre alt (jüngste Patientin 33 Jahre), während das mittlere Alter der Letzteren 42,0 Jahre, also ungefähr 15 Jahre weniger, betrug (jüngste Patientin 16 Jahre), $p < 0,0001$.

Um diesen Befund genauer zu untersuchen, wurden die Patientinnen in 15-Jahres-Altersgruppen stratifiziert. Wiederum zeigte sich ein Zusammenhang zwischen HPV-Status und Alter: Der Anteil der Patientinnen, bei denen mindestens eine HPV-positive Läsion vorgelegen hatte, stand signifikant in negativer Korrelation zum sukzessiv ansteigenden Alter. In der Gruppe der 16-30-jährigen hatten alle Frauen mindestens eine HPV-infizierte Läsion. Mit steigendem Alter sank dieser Anteil bis auf 50 % bei den 76-90-jährigen ($p = 0,0007$).

Tabelle 3.16: HPV-Status in Abhängigkeit von dem Alter, Gesamtkollektiv und stratifiziert nach 15-Jahres-Altersgruppen

<u>Gesamtkollektiv</u>	Patientinnen (n)	Mittelwert (Jahre)	Median (Jahre)	Range (Jahre)
HPV pos*	97 (82,2 %)	42,0	41	16-80
HPV neg**	21 (17,8 %)	57,7	60	33-77

<u>Altersgruppen</u>	Patientinnen (n)	HPV pos* (n)	HPV pos* (%)
16-30	20	20	100
31-45	46	42	91,3
46-60	30	23	76,7
61-75	18	10	55,6
76-90	4	2	50

HPV pos/neg = Humanes Papillomavirus-positiv/-negativ; * = Patientin mit mindestens einer HPV-positiven Läsion, ** = Patientin hat ausschließlich HPV-negative Läsionen

3.3.1 e) HPV-Status versus Zigarettenkonsum

Es ließ sich für 103 Patientinnen folgender, signifikanter Zusammenhang zwischen HPV-Status und Zigarettenkonsum feststellen (Tab. 3.17): 81,7 % der Patientinnen mit HPV-positiven Läsionen rauchten, während nur 28,6 % der Patientinnen mit HPV-negativen Befunden Zigaretten konsumierten ($p < 0,0001$).

Tabelle 3.17: Zigarettenkonsum in Abhängigkeit von dem HPV-Status, Gesamtkollektiv

	Pat. (n)	Raucherinnen (n)	Raucherinnen (%)
HPV +	82	67	81,7
HPV -	21	6	28,6
Summe	103	73	70,9

HPV = Humanes Papillomavirus; Pat. = Patientinnen

3.3.2 p16-Status

Die p16^{INK4a}-Immunhistochemie wurde bei 177 der 196 Gewebeproben durchgeführt. Sie ergab 129 p16-positive Befunde. In Kollektiv I lag die Rate an p16-positiven Läsionen mit 70 % (28 von 40 Proben) ähnlich hoch wie diejenige in Kollektiv II mit 73,7 % (101 von 137 Proben).

3.3.2 a) p16-Status abhängig von dem Läsionsgrad

Die invasiven Läsionen ausgenommen korrelierte der p16-Status im Gesamtkollektiv mit dem Grad der Läsion ($p < 0,0001$). So waren alle drei Kondylome p16-negativ (Abb. 3.5). Der Anteil der p16-positiven Proben stieg bei den intraepithelialen Läsionen von 33,3 % bei den erstgradigen, über 59,1 % bei den zweitgradigen, auf 87,1 % bei den drittgradigen Läsionen an (Abb. 3.6-3.9). Die Karzinome waren zu 59,3 % (16 von 27) p16-positiv (Abb. 3.10, 3.11). 3 der 177 p16-getesteten Proben konnten wegen unklarer Diagnosestellung nicht miteinbezogen werden.

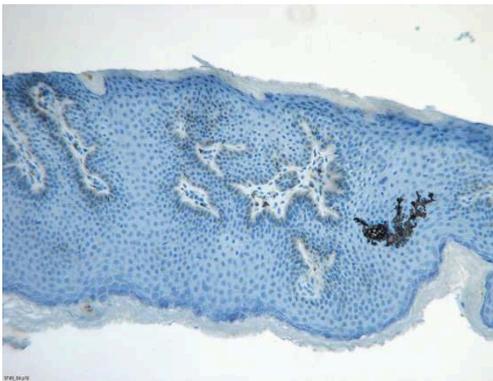


Abb. 3.5 a): **ACond.ac., p16-negativ**

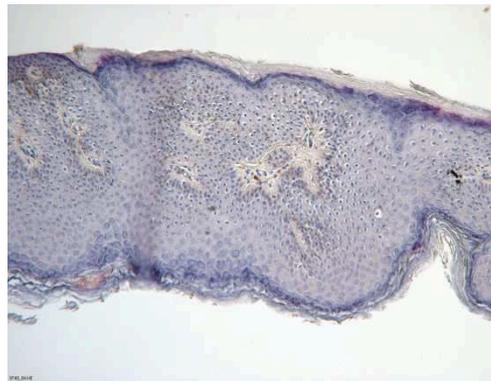


Abb. 3.5 b): **ACond.ac., HE-Schnitt**

ACond.ac. = anales Condyloma acuminatum, HE = Hämatoxylin Eosin



Abb. 3.6 a): **CIN 1, p16-neg**

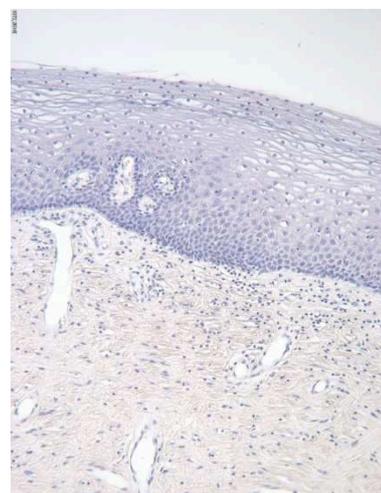


Abb. 3.6 b): **CIN 1, HE-Schnitt**

CIN = zervikale intraepitheliale Neoplasie Grad 1, HE = Hämatoxylin Eosin

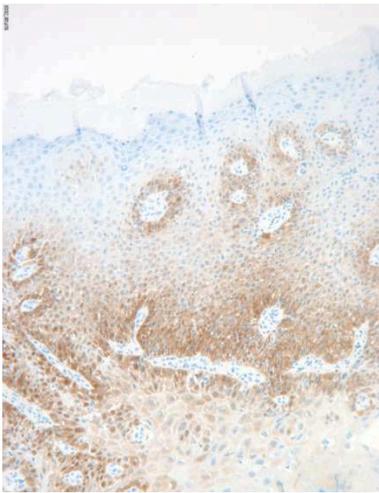


Abb. 3.7 a): **VIN 2, p16-positiv**

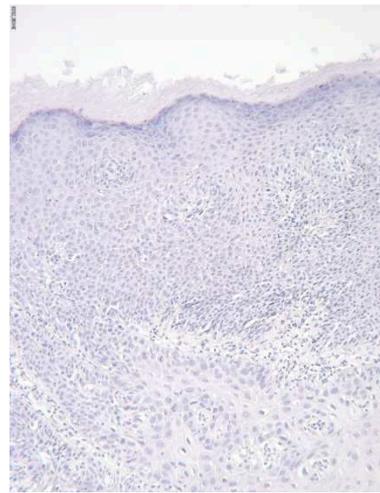


Abb. 3.7 b): **VIN 2, HE-Schnitt**

VIN 2 = vulväre intraepitheliale Neoplasie Grad 2, HE = Hämatoxylin Eosin

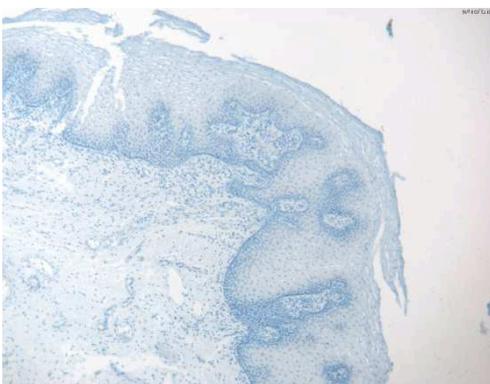


Abb. 3.8 a): **VAIN 2, p16-negativ**

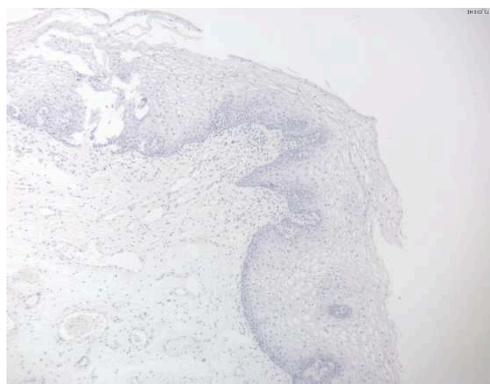


Abb. 3.8 b): **VAIN 2, HE-Schnitt**

VAIN 2 = vaginale intraepitheliale Neoplasie Grad 2, HE-Schnitt = Hämatoxylin Eosin

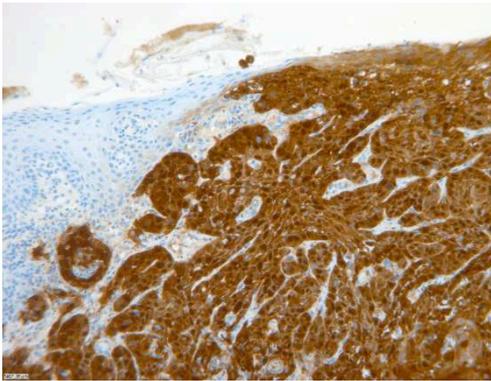
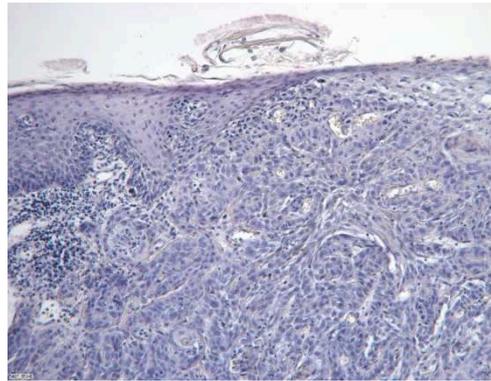


Abb. 3.9 a): **VIN 3, p16-positiv**

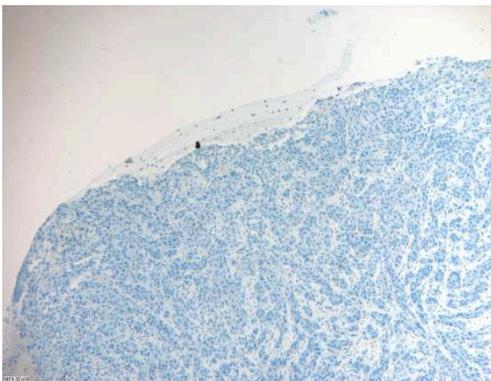
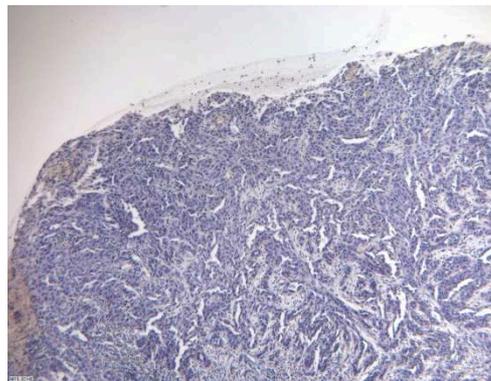


Abb. 3.9 b): **VIN 3, HE-Schnitt**

VIN 3 = vulväre intraepitheliale Neoplasie Grad 3, HE = Hämatoxylin Eosin

Abb. 3.10 a): **VSCC, p16-positiv**Abb. 3.10 b): **VSCC, HE-Schnitt**

VSCC = vulvar squamous cell carcinoma, HE = Hämatoxylin Eosin

Abb. 3.11 a): **VSCC, p16-negativ**Abb. 3.11 b): **VSCC, HE-Schnitt**

VSCC = vulvar squamous cell carcinoma, HE = Hämatoxylin Eosin

Auch in den Einzelkollektiven fand sich eine Korrelation des p16-Status mit dem Läsionsgrad bis hin zu den drittgradigen Läsionen ($p = 0,04$ Kollektiv I, $p < 0,0001$ Kollektiv II). Tab. 3.18 zeigt die entsprechenden Befunde des ersten Kollektivs. Der Anteil der p16-positiven Karzinome entspricht mit 54,4 % ungefähr dem des Gesamtkollektivs.

Tabelle 3.18: **p16-Status in Abhängigkeit von dem Grad der Läsion, Kollektiv I**

	Läsionen (n)	p16-positiv (n)	p16-positiv (%)
Cond.ac.	1	0	0
(C, Va, V, A) IN 1	0	-	-
(C, Va, V, A) IN 2	6	5	83,3
(C, Va, V, A) IN 3	11	11	100
SCC	22	12	54,5
Summe	40	28	70

Cond.ac. = Condyloma acuminatum, (C, Va, V, A) IN 1-3 = zervikale, vaginale, vulväre, anale intraepitheliale Neoplasie Grad 1-3, SCC = squamous cell carcinoma

Im Unterschied dazu sind in Kollektiv II fünf von sechs Karzinomen p16-positiv. Somit konnte

eine Korrelation zwischen p16-Status und Läsionsgrad bin hin zu den invasiven Läsionen nachgewiesen werden ($p = 0,001$, Tab. 3.19).

Tabelle 3.19: **p16-Status in Abhängigkeit von dem Grad der Läsion, Kollektiv II**

	Läsionen (n)	p16-positiv (n)	p16-positiv (%)
Cond.ac.	2	0	0
(C, Va, V, A) IN 1	6	2	33,3
(C, Va, V, A) IN 2	38	21	55,3
(C, Va, V, A) IN 3	82	70	85,4
SCC	6	5	83,3
Summe	134	98	73,1

Cond.ac. = Condyloma acuminatum, (C, Va, V, A) IN 1-3 = zervikale, vaginale, vulväre, anale intraepitheliale Neoplasie Grad 1-3, SCC = squamous cell carcinoma

3.3.2 b) p16-Status abhängig von der Befund-Lokalisation

Betrachtete man den p16-Status in den verschiedenen Bereichen zeigte sich folgendes Bild:

Vulva:

115 der 131 Vulva-Befunde konnten getestet werden (Tab. 3.20). Der Anteil der p16-positiven Proben betrug 74,8 %. Das Kondylom war p16-negativ. Bei den VIN 3 fanden sich mit 88,7 % die meisten p16-positiven Fälle (55 der 62 Proben). Von den 26 Karzinomen waren 15 p16-positiv (57,7 %).

Tabelle 3.20: **p16-Status Vulva, Gesamtkollektiv**

	Läsionen (n)	p16-positiv (n)	p16-positiv (%)
Cond.ac.	1	0	0
VIN 1	3	2	66,7
VIN 2	23	14	60,9
VIN 3	62	55	88,7
SCC	26	15	57,7
Summe	115	86	74,8

Cond.ac. = Condyloma acuminatum, VIN 1-3 = vulväre intraepitheliale Neoplasie Grad 1-3, SCC = squamous cell carcinoma

Zervix:

An der Zervix konnten 22 der 24 Proben getestet werden (Tab. 3.21). 15 dieser Fälle waren p16-positiv (68,2 %). Das Kondylom und die CIN 1 waren negativ, während die Hälfte der CIN 2 und 90,9 % der CIN 3 positiv getestet wurden (4 von 8 bzw. 10 von 11 Proben). Das

Karzinom war ebenfalls p16-positiv.

Tabelle 3.21: **p16-Status Zervix, Gesamtkollektiv**

	Läsionen (n)	p16-positiv (n)	p16-positiv (%)
Cond.ac.	1	0	0
CIN 1	1	0	0
CIN 2	8	4	50
CIN 3	11	10	90,9
SCC	1	1	100
Summe	22	15	68,2

Cond.ac. = Condyloma acuminatum, CIN 1-3 = zervikale intraepitheliale Neoplasie Grad 1-3, SCC = squamous cell carcinoma

Anus:

Von den 23 analen Befunden, standen 21 für die p16-Immunhistochemie zur Verfügung (Tab. 3.22). Der Anteil der p16-positiven Fälle war hier mit 18 von 21 Proben am größten (85,7 %). Wie bei Vulva und Zervix wurde das Kondylom p16-negativ getestet, ebenso zwei der 16 AIN 3.

Tabelle 3.22: **p16-Status Anus, Gesamtkollektiv**

	Läsionen (n)	p16-positiv (n)	p16-positiv (%)
Cond.ac.	1	0	0
AIN 1	0	-	-
AIN 2	4	4	100
AIN 3	16	14	87,5
SCC	0	-	-
Summe	21	18	85,7

Cond.ac. = Condyloma acuminatum, AIN 1-3 = anale intraepitheliale Neoplasie Grad 1-3, SCC = squamous cell carcinoma

Vagina:

Alle 15 vaginalen Läsionen wurden auf ihren p16-Status hin untersucht, wobei sich sieben Proben p16-positiv zeigten (46,7 %). Dies lag deutlich unter der Rate der positiven Läsionen in den anderen Bereichen. Es war jedoch ein Anstieg der p16-positiven Fälle mit dem Grad der Läsion zu sehen: Die beiden VAIN 1 waren p16-negativ, 44,4 % der VAIN 2 und 75 % der VAIN 3 waren p16-positiv (Tab. 3.23).

Tabelle 3.23: p16-Status Vagina, Gesamtkollektiv

	Läsionen (n)	p16-positiv (n)	p16-positiv (%)
Cond.ac.	0	-	-
VAIN 1	2	0	0
VAIN 2	9	4	44,4
VAIN 3	4	3	75
SCC	0	-	-
Summe	15	7	46,7

Cond.ac. = Condyloma acuminatum, VAIN I-III = vaginale intraepitheliale Neoplasie Grad 1-3, SCC = squamous cell carcinoma

3.3.2 c) p16- versus HPV-Status

In 168 Fällen konnten sowohl der HPV- als auch der p16-Status bestimmt werden. Beide Parameter korrelierten eng miteinander ($p < 0,0001$ für HPV vs. p16, als auch high risk-HPV versus p16). Die p16-Immunhistochemie als ein Test zur high risk-HPV-Detektion besaß folgende Testvariablen: Eine Sensitivität von 84,6 % und einen positiven prädiktiven Vorhersagewert (PPV) von 90,9 %, eine Spezifität von 71,1 % sowie einen negativen prädiktiven Vorhersagewert von 57,5 %. Überprüfte man lediglich die Eignung zur HPV-Detektion ohne die Klassifizierung in high und low risk, sank die Sensitivität auf 79,6 %. Deutlicher war der Abfall des negativen prädiktiven Wertes auf 36,2 %. Demgegenüber stiegen Spezifität und positiver prädiktiver Wert auf 81 % bzw. 96,7 %. Tab. 3.24 zeigt den p16-Status in Abhängigkeit von der HPV-Testung.

Tabelle 3.24: p16-Status in Abhängigkeit des HPV-Status, Gesamtkollektiv

	Summe (n)	p16 pos (n/%)	p16 neg (n/%)
HPV pos	147	117/79,6	30/20,4
HPV neg	21	4/19,1	17/81,0
Summe	168	121/72,0	47/28,0
HPV hr	130	110/84,6	20/15,4
∑ HPV lr;neg	38	11/29	27/71,1

HPV pos/neg = Humanes Papillomavirus-positiv/-negativ; hr/lr = high/low risk;

p16 pos/neg = p16-positiv/-negativ

Die Konstellation „HPV-negativ, p16-positiv“ kam nur in vier Fällen vor (3 VSCC, 1 VIN 3), welche allesamt im ersten Kollektiv zu finden waren. Der umgekehrte Fall „HPV-positiv, p16-

negativ“ wurde bei 30 Gewebeproben festgestellt. In zehn dieser Proben wurden lediglich low risk-Typen gefunden. Bei zehn weiteren Befunden handelte es sich um niedrige Läsionsgrade (bis maximal zweiten Grades).

Bei der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen HPV- und p16-Status stratifiziert nach Läsionsgrad erhielt man die in Tab. 3.25 gezeigten Werte. Für 21 HPV-negative Proben lag gleichzeitig der p16-Status vor. Dieser fiel nur in 19,1 % positiv aus. Die Kondylome waren vollständig p16-negativ. Die 145 HPV-positiven Fälle, bei denen man den p16-Status bestimmt hatte, waren hingegen zu 79,3 % p16-positiv. Die höchste Übereinstimmung zwischen HPV high risk- und p16-Status ergab sich für die drittgradigen intraepithelialen Läsionen: 92,6 % der high risk-positiven Fällen wurden hier ebenfalls p16-positiv getestet ($p = 0,0002$). Erneut lag auch eine Korrelation zwischen p16-Positivität und Schwere des Läsionsgrades vor, welche nicht auf die invasiven Läsionen zutraf. Es wurde jedoch auch in den high risk-Karzinomen in 80 % der Fälle eine p16-Überexpression nachgewiesen.

Tabelle 3.25: p16-Status in Abhängigkeit des HPV-Status, stratifiziert nach Läsionsgrad

	HPV-Status	Proben (n)	p16 pos (n/%)	p16 neg (n/%)
<u>Cond.ac.</u>	pos	3	0/0	3/100
	neg	-	-	-
	hr pos	1	0/0	1/100
	∑ lr;neg	2	0/0	2/100
	∑ pos;neg	3	0/0	3/100
<u>(C, Va, V, A) IN 1</u>	pos	4	2/50	2/50
	neg	2	0/0	2/100
	hr pos	2	1/50	1/50
	∑ lr;neg	4	1/25	3/75
	∑ pos;neg	6	2/33,3	4/66,7
<u>(C, Va, V, A) IN 2</u>	pos	36	25/69,4	11/30,6
	neg	7	0/0	7/100
	hr pos	30	22/73,3	8/26,7
	∑ lr;neg	13	3/23,1	10/76,9
	∑ pos;neg	43	25/58,1	18/41,9
<u>(C, Va, V, A) IN 3</u>	pos	86	76/88,4	10/11,6
	neg	2	1/50	1/50
	hr pos	81	75/92,6	6/7,4
	∑ lr;neg	7	2/28,6	5/71,4
	∑ pos;neg	88	77/87,5	11/12,5
<u>SCC</u>	pos	16	12/75	4/25
	neg	10	3/30	7/70
	hr pos	15	12/80	3/20
	∑ lr;neg	11	3/27,3	8/72,7
	∑ pos;neg	26	15/57,7	11/42,3
<u>Summe</u>	pos	145	115/79,3	30/20,7
	neg	21	4/19,1	17/81,0

HPV = Humanes Papillomavirus; hr/lr = hig/low risk; Cond.ac. = Condyloma acuminatum, (C, Va, V, A) IN 1-3 = zervikale, vaginale, vulväre, anale intraepitheliale Neoplasie Grad 1-3, SCC = squamous cell carcinoma; pos = positiv, neg = negativ

3.3.2 d) Interindividuelle Übereinstimmung p16-Beurteilung

158 der 177 auf ihren p16-Status hin untersuchten Proben wurden sowohl von einem Pathologen als auch der Doktorandin beurteilt, die restlichen Schnitte nur von einem

Pathologen. Im Falle einer inkongruenten Bewertung wurde das Urteil des Pathologen als gültig übernommen.

Insgesamt betrug die Übereinstimmungsrate 93,0 %, der kappa-Wert lag bei 0,805 (Standarderror 0,056). P16-positive respektive -negative Proben isoliert betrachtet ergaben sich für die interindividuelle Kongruenz folgende Werte: 98,3%ige Übereinstimmung bei den positiven im Gegensatz zu 77,5 % bei den negativen Fällen.

In Kollektiv I waren die Beurteilungen mit 97,3 % (36 von 37 Fällen kongruent) überwiegend identisch. Im zweiten Kollektiv lag die Übereinstimmungsrate mit 91,7 % (111 von 121 Fällen übereinstimmend) leicht unter der des Gesamtkollektivs. Im zweiten Kollektiv ist darüber hinaus der Unterschied zwischen p16-positiven und -negativen Proben am stärksten: 97,8 % Kongruenz im Falle der p16-positiven Läsionen, lediglich 72,4 % bei den p16-negativen.

Tab. 3.26 zeigt die interindividuelle Übereinstimmung absolut sowie anteilmäßig für das Gesamtkollektiv sowie die Einzelkollektive.

Tabelle 3.26: **Qualitative Beurteilung p16-Färbung, interindividuelle Übereinstimmung (1)**

	Proben (n)	Übereinstimmung (n)	Übereinstimmung (%)
<u>Gesamtkollektiv</u>			
p16 pos/neg	158	147	93,0
p16 pos	118	116	98,3
p16 neg	40	31	77,5
<u>Kollektiv I</u>			
p16 pos/neg	37	36	97,3
p16 pos	26	26	100
p16 neg	11	10	90,9
<u>Kollektiv II</u>			
p16 pos/neg	121	111	91,7
p16 pos	92	90	97,8
p16 neg	29	21	72,4

p16 pos/neg = p16-positiv/-negativ

Tab. 3.27 bildet die Urteile der beiden Untersucher in Form einer Kontingenztafel ab. „Untersucher 1“ ist gleichbedeutend mit dem Pathologen, dessen Urteil bei mangelnder Übereinstimmung als gültig gewertet wurde. Die höhere Rate an Inkongruenz bei den fokal gefärbten bzw. p16-negativen Befunden wird deutlich.

Tabelle 3.27: **Qualitative Beurteilung p16-Färbung, interindividuelle Übereinstimmung (2)**

		Untersucher 2			
		<u>Gesamtkollektiv</u>			
Beurteilung		negativ	fokal	diffus	Summe
negativ		22	3	3	28
fokal		-	6	6	12
diffus		-	2	116	118
Summe		22	11	125	158
		<u>Kollektiv I</u>			
Untersucher 1	Beurteilung	negativ	fokal	diffus	Summe
	negativ	7	3	1	11
	fokal	-	-	-	-
	diffus	-	-	26	26
	Summe	7	3	27	37
		<u>Kollektiv II</u>			
Beurteilung		negativ	fokal	diffus	Summe
negativ		15	-	2	17
fokal		-	6	6	12
diffus		-	2	90	92
Summe		15	8	98	121

rot: inkongruente Urteile; eine fokale Färbung wurde als p16-negativ gewertet

4 DISKUSSION

4.1 Übersicht

Läsionen im Bereich der Vulva, präkanzerös wie auch invasiv, sind verglichen mit denjenigen der Zervix selten [94]. Insbesondere die Inzidenz der präkanzerösen Läsionen hat aber in den letzten Jahren deutlich zugenommen. Die Inzidenz der Vulvakarzinome ist demgegenüber zwar stabil geblieben, der Anteil der jüngeren Frauen ist jedoch ebenfalls gestiegen [3, 4].

Hinsichtlich ihrer Erscheinungsform liefern Läsionen der Vulva ein heterogenes Bild. Sowohl bei den intraepithelialen als auch bei den invasiven Läsionen existieren zwei verschiedene Entitäten. Auf der einen Seite findet sich die differenzierte VIN, zusammen mit dem keratinisierenden Plattenepithelkarzinom. Sie sind typischerweise HPV-negativ [11, 17, 23, 24, 58, 59] und das Patientinnenkollektiv besitzt ein eher fortgeschrittenes Lebensalter [6, 11, 17, 18, 24, 25, 59, 69-71]. Auf der anderen Seite stehen die kondylomatösen und basaloiden Läsionen, invasiv wie intraepithelial, die im Allgemeinen eine HPV-Assoziation aufweisen [7, 11, 13-15, 59, 67, 70, 72]. Betroffene Patientinnen sind im Vergleich durchschnittlich jünger [6, 16-18] und es finden sich häufig multizentrische Befunde sowie ein metachrones Krankheitsgeschehen [6, 7, 14, 16, 19, 59, 67, 68]. In vielen Studien wurde darüber hinaus die Bedeutung des Zigarettenkonsums als Risikofaktor für die Entstehung HPV-positiver Läsionen beschrieben [7, 12, 20, 59, 73].

4.2 Metachronizität und Multizentrität

Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Erscheinungsformen der Vulvaläsionen wurde für diese Arbeit beschlossen, die Patientinnen in zwei Kollektive einzuteilen. Die beiden zentralen Kriterien, auf deren Basis die Zuordnung erfolgte, waren die Parameter Metachronizität und Multizentrität. Bereits 2007 hatten sich Hampl et al. eingehender mit diesen beiden Parametern beschäftigt [159]. Mit Hilfe der gewonnenen Erkenntnisse entwickelten die Autoren drei Modelle, welche die unterschiedlichen Entstehungswege multizentrischer bzw. metachroner Läsionen des weiblichen unteren Genitaltrakts anhand klinischer und molekularer Charakteristika beschreiben:

- 1) Nach Art eines Feldeffekts kommt es infolge der Infektion mit einem karzinogenen HPV-Virus zur Induktion von unabhängigen Zellklonen. Typisch sind synchrone, multizentrische Läsionen, die den gleichen HPV-Typ aufweisen. Der Grad der Onkogenexpression variiert je nach Grad der Läsion.
- 2) Es liegt eine gesteigerte Anfälligkeit gegenüber einer HPV-Infektion sowie der

entsprechenden Zelltransformation vor. Es kommt zu rezidivierenden Infektionen mit diversen HPV-Typen, einschließlich der sonst eher selten gefundenen, und zu einer regelmäßig deregulierten Onkogenexpression.

3) Die existenten Läsionen sind klonal verwandt, d.h. gehen von einem gemeinsamen Zellklon aus. Es finden sich in der Vergangenheit aufgetretene Zervixläsionen als Ursprung des transformierenden Zellklons, weitere metachrone Läsionen, sowie eine in jedem Fall deregulierte Onkogenexpression.

Ziel dieser Arbeit war es, die verschiedenen Modelle an einem größeren Kollektiv zu bestätigen und genauer zu charakterisieren. Das erste der zu diesem Zweck gebildeten Kollektive setzte sich aus Patientinnen zusammen, welche lediglich solitäre, allenfalls multifokale Läsionen aufwiesen. Es durften keine weiteren Läsionen in Folge oder in der Vorgeschichte aufgetreten sein. Zu Kollektiv II wurden demgegenüber nur Patientinnen gezählt, die entweder multizentrische Befunde aufwiesen oder zu einem früheren oder späteren Zeitpunkt weitere Läsionen entwickelt hatten, respektive entwickelten. Neben der Bestimmung von HPV- und p16-Status der Läsionen erfolgte zusätzlich eine Recherche klinischer Parameter mittels der zugehörigen Patientenakten.

Durch das zweite Kollektiv, dem die Eigenschaften Multizentrität und Metachronizität als Zugehörigkeitskriterien zu Grunde gelegt waren, ließen sich schließlich die drei genannten Krankheitsmodelle abbilden (Tab. 3.1, Abb. 3.1): So war case 49 ein typisches Beispiel für den ersten Entstehungsmechanismus. Der hochpotente high risk-Typ 16 konnte hier synchron in allen Läsionen gefunden werden. Das zweite Modell ließ sich gut anhand der Befunde von case 74 nachvollziehen. Die Patientin wies dementsprechend rezidivierende Läsionen mit unterschiedlichen, eher untypischen HPV-Typen auf. Für case 55 könnte schließlich der dritte Entstehungsweg als Ursache zu Grunde gelegt werden, da die Patientin wiederholt in verschiedenen Bereichen des Genitaltrakts Läsionen mit identischem HPV-Status entwickelte.

4.3 Die Einzelkollektive

Die anhand der Parameter Multizentrität und Metachronizität gebildeten Patientinnenkollektive wurden in Folge auf ihre Unterschiede hinsichtlich klinischer Parameter wie Alter, Nikotinkonsum, Parität und Hormoneinnahme untersucht. Des Weiteren wurden die Kollektive in Bezug auf den HPV- bzw. p16-Status der jeweiligen Läsionen verglichen. Das erste Kollektiv war mit 44 Patientinnen kleiner als das zweite (82 Patientinnen). Geht man davon aus, dass die Kollektive zwei eigenständige Patientinnengruppen repräsentieren, stellt sich die Frage, ob sich diese Verteilung auch entsprechend auf die Allgemeinbevölkerung übertragen lässt (s.u.). Der Anteil der Frauen mit metachronen bzw. multizentrischen Befunden müsste demgemäß ungefähr doppelt so hoch

liegen wie derjenige der Frauen mit solitären oder allenfalls multifokalen Läsionen.

Zählte man in den vorliegenden Kollektiven die zugehörigen Läsionen war der Unterschied mit 48 gegenüber 148 Gewebeproben erwartungsgemäß allein durch die Kollektivkriterien noch größer. Zu erwähnen ist, dass bei vielen Patientinnen weitere metachrone oder simultane, multifokale oder multizentrische Befunde per Aktenlage beschrieben waren. In Abb. 3.1 sind diese zusätzlichen Befunde erfasst, eine Untersuchung des HPV- oder p16-Status konnte jedoch nicht erfolgen.

Durch die Kollektivbildung änderte sich zunächst die Gewichtung, mit der die verschiedenen Bereiche des weiblichen unteren Genitaltrakts vertreten waren (Tab. 3.2, 3.3). Im ersten Kollektiv waren Befunde der Zervix nicht vertreten. Die deutliche Mehrheit der Läsionen entstammte der Vulva (89,6 %), der Rest verteilte sich auf Vagina und Perianus. Im zweiten Kollektiv ließen sich dementsprechend alle Zervikalläsionen finden. Sie gehörten somit ausnahmslos entweder einem multizentrischen oder metachronen Krankheitsgeschehen an. Zusammen mit den Proben aus Vaginal- und Analbereich bildeten sie mehr als ein Drittel der Befunde des zweiten Kollektivs.

Ein Aspekt, der nur das zweite Kollektiv betraf, war die Verteilung der Indexläsionen der multizentrischen Fälle auf die verschiedenen Bereiche des unteren weiblichen Genitaltrakts (Abb. 3.2). Hier machten die Vulvabefunde nur noch knapp die Hälfte der Fälle aus. Ein bedeutender Anteil der Indexläsionen war der Zervix entnommen worden.

Beim Vergleich der klinischen Charakteristika der Kollektive fiel ein Punkt besonders ins Gewicht, die Differenz im Patientinnenalter: Die Frauen des zweiten Kollektivs waren durchschnittlich 10 Jahre jünger als diejenigen des ersten (Tab. 3.4). Als möglicher Störfaktor ist an dieser Stelle die Gewichtung der verschiedenen Läsionsgrade in den beiden Kollektiven aufzuführen. So lag der Anteil der Vulvakarzinome im ersten Kollektiv mit 58,3 % unverhältnismäßig hoch. Er betrug im zweiten Kollektiv lediglich 4,1 %, stattdessen waren die drittgradigen intraepithelialen Läsionen vorherrschend. Sie machten 55,4 % der Gewebeproben aus. Es erfolgte daher zusätzlich eine Stratifikation des Durchschnittsalters der Patientinnen nach Läsionsgrad. Der Altersunterschied zwischen den beiden Kollektiven bestätigte sich erneut. Minimal, d.h. 7,7 Jahre, war er bei den Frauen mit Kondylomen. Die größte Altersdifferenz zeigte sich bei Patientinnen mit invasiven Läsionen und betrug 14,7 Jahre (Tab. 3.6). Eine mögliche Erklärung hierfür bietet der Umstand, dass multizentrische Läsionen häufig nach Zervixläsionen entstehen [159-161]. Frauen, bei denen bereits eine intraepitheliale Neoplasie diagnostiziert wurde, werden in der Regel einem intensiverem Vorsorgeprogramm zugeführt. Invasive Läsionen fallen dabei früher auf.

Wie bereits beschrieben, nehmen generell die intraepithelialen Läsionen, sowie bei den invasiven Befunden der Anteil der jüngeren Patientinnen zu. Da sich also im zweiten Kollektiv, welches fast die doppelte Patientinnenzahl fasst, jüngere Patientinnen mit überwiegend präinvasiven Läsionen befinden, ist dies ein Hinweis dafür, dass die Verteilung

der Patientinnen in den Kollektiven derjenigen der tatsächlichen Patientengruppen entspricht.

Eine geringe Abweichung konnte in Bezug auf den Zigarettenkonsum festgestellt werden. In beiden Kollektiven rauchten über die Hälfte der Frauen bzw. hatten langjährig geraucht. Im zweiten Kollektiv lag der Anteil jedoch mit 78,6 % um 17,6 % höher (Tab. 3.7).

Bezüglich der Parameter Hormoneinnahme und Paritätstatus konnten ebenfalls keine gravierenden Unterschiede zwischen den Patientinnen der Einzelkollektive gefunden werden (Tab. 3.8, 3.9). Im zweiten Kollektiv erschien zunächst die Zahl der Nullipara größer, beschränkte man die Untersuchung jedoch auf die > 50 Jährigen lag sie sogar unter der Zahl der Nullipara im ersten Kollektiv.

Lieferten die klinischen Parameter, mit Ausnahme des Patientinnenalters, keine entscheidenden Erkenntnisse im Vergleich der beiden Einzelkollektive, zeigten sich bei der Prüfung des HPV-Status deutlichere Abweichungen. Während im ersten Kollektiv nur knapp die Hälfte der Frauen high risk-positive Läsionen aufwies, waren im zweiten 93,7 % durch ein high risk-HP-Virus infiziert (Abb. 3.3). Es wurden in der ersten Gruppe hierbei insgesamt sechs unterschiedliche HPV-Typen gefunden, davon 4 high risk-HP-Viren: 16 (80%), 18, 33, 52. Es handelte sich nur in einem Fall um eine Mischinfektion (HPV 16 und 33). In der zweiten Gruppe kamen 17 unterschiedliche Typen vor, darunter 10 high risk-HP-Viren: 16 (67,4 %), 18, 31, 33, 35, 51, 52, 56, 58, 59 (Tab. 3.10). In 18 Fällen lag eine Mischinfektion vor. Sehr deutlich zeigte sich die unterschiedliche HPV-Assoziation bei den invasiven Läsionen. Alle fünf Karzinome des zweiten Kollektivs waren HPV-positiv. Im ersten Kollektiv wurden lediglich 11 der 25 Karzinome positiv getestet (44 %; Tab. 3.13, 3.14).

Die Untersuchung des p16-Status der Läsionen erbrachte weniger deutliche Unterschiede zwischen den Kollektiven. 66,7 % der Patientinnen im ersten Kollektiv verglichen mit 85,5 % derjenigen des zweiten Kollektivs hatten mindestens einen p16-positiven Befund. Auffallend war, dass auch der Anteil p16-positiver invasiver Befunde im zweiten Kollektiv wesentlich höher lag, wobei man jedoch die erheblich geringere Fallzahl berücksichtigen musste (Tab. 3.18, 3.19). Insgesamt war der Vergleich der Einzelkollektive hinsichtlich des p16-Status von untergeordneter Bedeutung. Von größerem Interesse war vielmehr das Verhältnis zwischen p16- und HPV-Status der entsprechenden Gewebeproben (s.u.).

4.4 Biomarker I, HPV-Status

4.4.1 Bedeutung im Bereich des unteren weiblichen Genitaltrakts

Der Anteil der HPV-assoziierten Läsionen variiert deutlich in den verschiedenen Bereichen des unteren weiblichen Genitaltrakts. Während gemäß zahlreicher Studien nahezu 100 % der zervikalen Läsionen von HP-Viren infiziert sind und ein kausaler Zusammenhang

hergestellt werden konnte [66, 84, 86, 91-93, 158, 162, 163], sind Pathogenese und klinische Präsentation der vulvären Läsionen heterogen (s.o.). So wird beispielsweise der Anteil der HPV-positiven Vulvakarzinome in der bisherigen Literatur mit 0 bis 60 % sehr unterschiedlich beziffert [11, 13, 15, 23, 59, 65, 67, 70-72]. In der Studie von Van der Avoort, in welcher keine HP-Virus-infizierte Läsion festgestellt werden konnte, lag das durchschnittliche Patientenalter bei 71 Jahren. Den Gegenpol bildet die Arbeit von Hampl et al.. Bei einem Durchschnittsalter von 55 Jahren konnten in 60 % der Fälle HP-Viren nachgewiesen werden. In den Arbeiten von Hording, Riethdorf, Kagie, Monk und Toki wurden die Vulvakarzinome den bereits im Vorhinein beschriebenen morphologischen Unterformen, keratinisierende Karzinome auf der einen sowie basaloiden und kondylomatöse Karzinome auf der anderen Seite, zugeteilt. Während die keratinisierenden Karzinome einen sehr geringen Anteil an HPV-positiven Läsionen aufwiesen (min. 4 % bis max. 39 %), wurden bei den basaloiden respektive kondylomatösen Formen deutlich mehr HPV-Infektionen gefunden (min. 24 % bis max. 95 %). Das Alter der Patientinnen mit keratinisierenden Läsionen betrug jeweils über 70 Jahre, das der Patientinnen mit basaloiden oder warzigen Läsionen lag jeweils unter 60 Jahren. Aus den beschriebenen Punkten lassen sich verschiedene Schlussfolgerungen ableiten. Zum einen wäre es denkbar, dass die Patientenkollektive der Studien von Van der Avoort und Hampl jeweils eines der Einzelkollektive der vorliegenden Arbeit repräsentieren. So könnten bei Van der Avoort vor allem Patientinnen mit den Kriterien des ersten Kollektivs vertreten sein. Entsprechend würden die Patientinnen der Studie von Hampl et al. eher die Kriterien des zweiten Kollektivs erfüllen. Bezüglich der Studien, welche die Karzinome in verschiedene Entitäten eingeteilt haben, ließe sich die These aufstellen, dass jeweils eine Entität für eines der Einzelkollektive steht. Die keratinisierenden Karzinome wären demgemäß im ersten Kollektiv abgebildet, in Kollektiv II würden sich dagegen die basaloiden und kondylomatösen Karzinome finden.

Dessen ungeachtet liegt der Anteil der HPV-positiven Vulvakarzinome deutlich unterhalb der Rate der HPV-positiven Zervixkarzinome. In unserer Studie waren die invasiven Läsionen zu 53,3 % mit HP-Viren infiziert (Tab. 3.12). Der Anteil HPV-positiver Proben variierte jedoch auffallend in den gebildeten Einzelkollektiven (44 % respektive 100 %, s.o.). Des Weiteren bedeutend war die im Vergleich mit den Karzinomen hohe HPV-Assoziation der drittgradigen intraepithelialen Läsionen der Vulva: 95,1 % der VIN3-Fälle waren Virus-positiv (Tab. 3.12). Auch dieser Umstand entsprach den bisherigen Studienergebnissen.

Die genannten Erkenntnisse bestätigen, dass im Bereich der Vulva, entgegengesetzt zur Zervix, die HPV-Infektion nur einen von vielen möglichen Wegen in der Karzinomentstehung darstellt. Die HPV-negative VIN verkörpert einen dieser Wege. Sie ist häufig benachbart zu invasiven Läsionen zu finden [7, 12, 13, 23, 24] und hat ein größeres malignes Potential [12, 164, 165]. Eine Vorstufensequenz wie bei der klassischen VIN ist nicht bekannt [8]. Auch wird sie im Verhältnis seltener diagnostiziert. Hart nennt in seinem Review einen Anteil von

2-10 % der VIN-Fälle. Als mögliche Gründe führt er zum einen die Fehlinterpretation des jeweiligen Befundes als Plattenzellhyperplasie oder chronische Vulvitis an. Weiterhin senke eine sehr schnelle Progression zur Invasivität mit entsprechend kurzem intraepithelialen Intervall die Diagnoserate [12]. Wie bereits beschrieben führt bei der typischerweise HPV-positiven metachronen VIN die vorausgegangene Zervixläsion zu einem verstärkten Vorsorgeprogramm. Dies ist bei der differenzierten VIN nicht der Fall, sie wird entsprechend später und seltener diagnostiziert. Dessen ungeachtet fanden Eva et al. in ihrer letzten Studie einen relativ hohen Prozentsatz an differenzierten VIN: 29 % der untersuchten intraepithelialen Vulvaläsionen war vom Simplex-Typ [165]. Neben der klassischen VIN, dem Lichen sclerosus und der Plattenepithelhyperplasie stellte die differenzierte VIN jedoch auch hier die kleinste Gruppe dar. Eine Differenzierung zur klassischen VIN scheint über die p16-Immunhistochemie möglich zu sein [166].

Aus dem Bereich des Anus sowie der Vagina standen in der vorliegenden Arbeit lediglich kondylomatöse und intraepitheliale Läsionen zur Verfügung. In den analen Gewebeproben wurden ohne Ausnahme HP-Viren gefunden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Lu et al. [101]. Dort waren insgesamt 29 Plattenepithelkarzinome aus dem Bereich des Anorekts untersucht worden. Auch andere Studien, welche Läsionen dieser Region auf ihren HPV-Status hin getestet haben, fanden hohe Infektionsraten [100, 102]. Schon zur Hausen verglich daher die Rolle der HP-Viren im Anal- und Perianalbereich mit derjenigen der Zervikalregion [81]. Da beide Gebiete eine Transformationszone mit dem Übergang von Zylinder- in Plattenepithel aufweisen, liegt ein Zusammenhang in Form einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber HP-Viren nahe.

Die vaginalen Befunde dieser Arbeit waren ebenfalls zum Großteil, d.h. in 86,7 % der Fälle, HPV-positiv (Tab. 3.12). Für diesen Bereich des weiblichen Genitaltrakts gibt es nur wenige Studien [103, 167]. Im Falle der invasiven Läsionen lag die Rate der HPV-positiven Läsionen bei beiden Arbeiten relativ niedrig (55,6 % bei Ikenberg, 60 % in der Studie von Daling). Daling et al. untersuchten jedoch auch Patientinnen mit einem Carcinoma in situ der Vagina. 80 % dieser Befunde waren HPV-positiv, ein Anteil, der mit den Ergebnissen unserer Arbeit vergleichbar ist. HP-Viren scheinen demnach in der Pathogenese von Läsionen der Vagina eine intermediäre Bedeutung einzunehmen, welche zwischen derjenigen für Vulva- und Zervixläsionen liegt.

Es ist weiterhin zu bedenken, dass die hohe Anzahl HPV-positiver Befunde im Anal- und Vaginalbereich in der vorliegenden Arbeit durch die Tatsache bedingt sein könnte, dass von den 37 analen und vaginalen Läsionen, die auf ihren HPV-Status untersucht werden konnten, 33 entweder multizentrisch waren oder metachrone Läsionen bestanden. Drei der vier restlichen Befunde waren darüber hinaus multifokal. Während die vaginalen Befunde zum Großteil Indexläsionen von multizentrischen Fällen darstellten (13 von 15 Läsionen), traf das bei den Analbefunden nur in acht von 23 Fällen zu. 12 anale Läsionen waren dafür Teil

eines metachronen Krankheitsgeschehens. Es sind demnach weitere Studien erforderlich, um die Rolle von HP-Viren in der Pathogenese von Vaginal- und Anal- bzw. Perianalkarzinomen genauer zu definieren.

4.4.2 HPV-Subtypisierung

In Läsionen des Zervikalbereichs können neben HPV 16, der in ungefähr 50-55 % aller HPV-positiven Fälle gefunden wird, zu einem beträchtlichen Ausmaß auch andere Subtypen nachgewiesen werden [92, 162].

Im Gegensatz dazu spielen andere Typen neben HPV 16 im Bereich der Vulva sowie der Analregion nur eine geringe Rolle [11, 13, 15, 67, 70, 72]. Vor allem an der Vulva bedarf es anscheinend einer Infektion durch einen HPV-Typen mit besonders hoher onkogener Potenz, damit es zu einer Transformation der Epithelzellen kommen kann.

Die beschriebene Verteilung der Subtypen in den verschiedenen Bereichen des weiblichen unteren Genitaltrakts zeigte sich auch in der vorliegenden Arbeit. Die zervikalen HPV-positiven Befunde waren lediglich zu 31,8 % von HPV 16 infiziert. In 22,7 % der Fälle ließ sich HPV 33 nachweisen, in den restlichen Gewebeproben unbekanntere HPV-Typen. An der Vulva und im analen Bereich lag eine Infektion mit HPV 16 dagegen bei 77,9 % bzw. 77,3 % der HPV-positiven Läsionen vor. Entsprechend selten wurden andere HPV-Subtypen gefunden (Tab. 3.12). Die in diesem Punkt für die Läsionen der Vagina gefundenen Werte (61,5 % der HPV-positiven Fälle enthielten HPV 16 DNA) lagen wiederum zwischen denjenigen von Zervix und Vulva.

Teilte man die in dieser Arbeit detektierten HPV-Subtypen entsprechend der Arbeit von Castle et al. in bestimmte phylogenetische Gruppen ein [168], fand man als mit Abstand größte Gruppe in allen Bereichen des unteren Genitaltrakts die HP-Viren der Spezies $\alpha 9/\alpha 11$. Zu ihnen zählten folgende HPV-Typen: 16, 31, 33, 52, 58, 67. Den zweithöchsten Anteil hatten HP-Viren der Spezies $\alpha 1/\alpha 8/\alpha 10$, welche mit den Typen 6, 11 und 42 als nicht-karzinogen eingestuft werden. Es folgten in absteigender Größe die Gruppen $\alpha 7$ (HPV 18,59), $\alpha 6$ (HPV 53, 56, 66), $\alpha 3/15$ (HPV 61, 72) und $\alpha 5$ (HPV 51). In den Proben aus Zervix und Vagina waren die Viren der Gruppe $\alpha 9/\alpha 11$ mit 72% respektive 71,4 % verhältnismäßig geringer vertreten als an Vulva (90,5 %) und Anus (95,5 %). Der Anteil der Infektionen mit nicht-karzinogenen Viren war in etwa gleich hoch wie bei Castle. Ein Unterschied bestand in der Tatsache, dass im Gegensatz zu Castle in keiner einzigen der von uns untersuchten vaginalen Läsionen HPV-Typen der Gruppe $\alpha 3/\alpha 15$ entdeckt werden konnten. Man muss hierbei jedoch die geringe Anzahl vaginaler Proben berücksichtigen, welche in der Arbeit von Castle eine weitaus bedeutendere Rolle spielten.

4.4.3 Zusammenhang HPV-induzierter Läsionen mit klinischen Parametern

Es wurde bereits mehrfach beschrieben, dass Frauen mit HPV-positiven Befunden ein durchschnittlich jüngeres Lebensalter aufweisen als Frauen, in deren Läsionen sich keine HP-Viren nachweisen lassen [6, 16-18]. Dies bestätigte sich in der vorliegenden Arbeit zum einen indirekt bei der Untersuchung der Einzelkollektive (s.o.). Aber auch im direkten Vergleich des Durchschnittsalters der entsprechenden Patientinnen fand sich ein Altersunterschied von mehr als 15 Jahren. Der Anteil der HPV-positiven Befunde sank demgemäß mit zunehmendem Patientenalter (Tab. 3.16). Im Hinblick auf die kürzlich eingeführten HPV-Impfungen wird durch diese Beobachtungen erneut die Wichtigkeit der frühzeitigen Durchführung einer solchen Impfung unterstrichen.

Ebenfalls von Bedeutung für den präventiven Bereich ist die Rolle des Zigarettenkonsums als Risikofaktor für HPV-assoziierte Läsionen (s.o.), welche sich in unseren Untersuchungsergebnissen erneut bestätigte (Tab. 3.17). Theoretisch könnte die hohe Zahl der Raucherinnen unter den Frauen mit HPV-positiven Läsionen auch auf das jüngere Alter in dieser Gruppe zurückgeführt werden. Wir untersuchten daher zusätzlich den Zusammenhang zwischen Alter und Zigarettenkonsum der Frauen. Insgesamt war der Anteil der Raucherinnen im untersuchten Patientinnenkollektiv mit 72,1 % (80 von 111 Frauen) relativ hoch und lag über dem deutschen Durchschnitt von 51,3 % [169]. Ähnlich den Berichten des Robert Koch-Institutes rauchten jenseits des 60. Lebensjahres nur noch wenige Frauen, jedoch war der Anteil der Raucherinnen zuvor gleich bleibend hoch (Tab. 3.7). Das Alter hatte somit keinen wesentlichen Einfluss auf den festgestellten Zusammenhang zwischen Zigarettenkonsum und HPV-Status. Neben der frühzeitigen Applikation der HPV-Impfung ist es demnach von zentraler Bedeutung, jungen Frauen den Zigarettenkonsum als zusätzlichen Risikofaktor für die Entstehung HPV-assoziiierter Läsionen bewusst zu machen.

Zwei weitere Parameter - die Einnahme von Hormonpräparaten (Hormonersatztherapie, Antibaby-Pille) und der Parität-Status - wurden in der vorliegenden Arbeit auf ihre Eigenschaft als potentielle Risikofaktoren für HPV-assoziierte Krankheitsbilder im Bereich des unteren weiblichen Genitaltrakts hin untersucht. Beschränkt auf Neoplasien der Vulva gibt es bisher nur wenige Studien, die sich mit diesen Punkten beschäftigt haben. Zwei schon etwas länger zurückliegende Arbeiten von Brinton und Sherman ergaben 1990 bzw. 1994 keinen Zusammenhang zwischen reproduktiven Faktoren und Karzinomen der Vulva [62, 170].

Für den Bereich der Zervix gibt es dagegen viele Arbeiten, die die Bedeutung von Parität und oralen Kontrazeptiva genauer untersucht haben. Die International Agency for Research on Cancer führte in ihrem Bericht von 2005 eine hohe Parität (> 3 Geburten) explizit als Kofaktor in der Entstehung HPV-assoziiierter Neoplasien auf. Die meisten hierzu erschienenen

Studien stimmten mit dieser Aussage überein [95, 96, 98, 171]. Schiffman et al. konnten unabhängig von dem HPV-Status einen Zusammenhang zwischen hoher Parität und präinvasiven zervikalen Befunden feststellen [172]. Es gab jedoch auch Studien, in denen der Zusammenhang weniger deutlich ausfiel [97, 173]. Bauer et al. fanden sogar Hinweise auf ein erhöhtes HPV-Infektions-Risiko für Nullipara. Wichtig ist, dass den Endpunkt dieser Studie, im Unterschied zu den anderen Arbeiten, nicht die Entwicklung einer intraepithelialen oder invasiven Neoplasie, sondern lediglich die HPV-Infektion darstellte [99].

Bezüglich der Bedeutung oraler Kontrazeptiva bei der Tumorentstehung im Zervikalbereich sind die Studienergebnisse weitaus uneinheitlicher. Bereits 2001 berichteten La Vecchia et al. über ein erhöhtes Risiko der Entwicklung eines Zervixkarzinoms bei HPV-positiven Frauen, welche orale Kontrazeptiva einnahmen [174]. Entsprechend fanden Moreno et al. 2002 ein deutlich erhöhtes Zervixkarzinomrisiko bei Patientinnen, die länger als fünf Jahre orale Kontrazeptiva eingenommen hatten [175]. Die übrigen, zum größten Teil im Vorhinein aufgeführten Studien konnten dagegen keinen oder nur einen sehr geringen Zusammenhang feststellen [97, 171-173, 176]. Daling et al. beschrieben lediglich eine gewisse Bedeutung der Einnahme oraler Kontrazeptiva in der Entwicklung invasiver Tumoren im Zervikalbereich, wenn der Konsum zu einem kritischen Zeitpunkt (< oder = 17 Jahre) begonnen hatte [177].

In der vorliegenden Arbeit fand, was Hormoneinnahme und Parität betrifft, kein Vergleich mit einer Kontrollgruppe, d.h. Frauen ohne Neoplasien im Bereich des unteren weiblichen Genitaltrakts, statt. Es konnte daher auf die Bedeutung von Parität und Einnahme oraler Kontrazeptiva (respektive hormoneller Ersatzpräparate) bei der Tumorentstehung in diesem Bereich nicht eingegangen werden. Es wurde allein der Zusammenhang zu HPV-Infektionen untersucht. Es konnte jedoch keine nennenswerte Assoziation festgestellt werden.

4.5 Biomarker II, p16^{INK4a}-Immunhistochemie

4.5.1 Studienlage

Zentrales Ziel dieser Studie war die Untersuchung des Kinase-Inhibitors p16^{INK4a} hinsichtlich seiner Eignung als Marker für HPV-positive Läsionen des weiblichen unteren Genitaltrakts. Für den Zervikalbereich ist der Nachweis einer solchen Eignung bereits mehrfach erbracht worden [139, 140, 143, 146, 147, 150]. Darüber hinaus sind Studien erschienen, welche, zum Teil zusätzlich zur HPV-Testung, den p16-Status isoliert in den jeweiligen zervikalen Befunden untersuchten [142, 144, 148, 149]. Erneut erwies sich die p16-Färbung als hilfreiches Werkzeug in der Diagnostik präneoplastischer wie auch invasiver Läsionen. Die Studien von Agoff und Murphy bestätigten zusätzlich die positive Korrelation zwischen p16- und HPV-Status. Besonders Volgareva et al. betonten aber, dass durchaus p16-negative hochgradige Läsionen vorkommen und man sich nicht allein auf die p16-Testung als Marker

invasiver Läsionen verlassen dürfe. In ihrer, wie auch in der Arbeit von Klaes, war jedoch auf die HPV-Testung und entsprechende Korrelation verzichtet worden. Die p16-negativen Befunde könnten somit durchaus HPV-negativen Proben entsprochen haben.

Die p16-Expression und die Korrelation mit dem HPV-Status wurden für Läsionen der Vulva ebenfalls in einigen Studien untersucht, deren Anzahl jedoch weit unter derjenigen der Studien den Zervikalkbereich betreffend liegt [8, 23, 71, 157]. Auf Grund des gewichtigen Anteils HPV-negativer Läsionen der Vulva war es darüber hinaus von Interesse zu untersuchen, inwieweit der p16-Status ungeachtet des HPV-Status mit dem Schweregrad vulvärer Befunde korreliert. Die meisten Studien zur p16-Immunhistochemie im Vulva-Bereich haben sich auch mit diesem Punkt beschäftigt. Van der Avoort et al. zeigten einen mit dem Läsionsgrad ansteigenden Prozentsatz p16-positiver Befunde bis hin zu den drittgradigen VIN. Der Anteil positiver invasiver Läsionen war gering. Bei Rufforny et al. erstreckte sich die positive Korrelation auch auf die Vulvakarzinome, deren Anzahl jedoch mit vier Fällen sehr beschränkt war. Im Unterschied zu den beiden anderen Studien differenzierten Riethdorf und Santos die invasiven Läsionen nach morphologischen Kriterien in keratinisierende, basaloide sowie warzige Formen. Sie fanden bei den keratinisierende Karzinomen selten bzw. in keinem Fall eine p16-Überexpression. Demgegenüber wurden die anderen beiden Entitäten durchweg p16-positiv getestet. Neben den invasiven Läsionen untersuchten Santos et al. drittgradige intraepitheliale Befunde (100 % diffus p16-positiv) und benigne Läsionen (keine diffuse Färbung). Riethdorf schloss zusätzlich Fälle erst- und zweitgradiger VIN mit ein, welche jeweils nur ein heterogenes Färbemuster zeigten. Eine weitere von Santos durchgeführte Arbeit beschränkte die Untersuchungen auf invasive Karzinome sowie die Gegenüberstellung von HPV- und p16-Status [156].

Alle Studien konnten schließlich einen Zusammenhang zwischen p16-Expression und HPV-Status aufzeigen. So wiesen Riethdorf et al in 90 % der Fälle mit diffuser p16-Färbung HPV-16 nach, was einer deutlich signifikanten Korrelation entsprach ($p < 0,001$) [71]. Bei Rufforny wurde eine HPV-Infektion in den diffus p16-positiven Befunden etwas seltener, d.h. in 23 von 28 Proben gefunden (82,1 %) [157]. Es ist dabei zu berücksichtigen, dass in beiden Studien außer HPV 16 kein anderer HPV-Typ bestimmt wurde, der Anteil p16-positiver Befunde mit zu Grunde liegender HPV-Infektion somit eher noch unterschätzt wurde. Die Methoden, mittels derer HP-Viren detektiert wurden, waren unterschiedlich. Riethdorf testete das Vorliegen von HPV 16 E6/E7-Transkripten durch RNA/RNA-in-situ-Hybridisierung, während bei Rufforny HPV 16 mit Hilfe einer RT-PCR nachgewiesen wurde.

Umgekehrt betrachtet, also auf die Frage, wie gut HPV-positive Befunde durch eine p16- positive Färbung auffielen, lieferten die Studien folgende Ergebnisse: Bei Riethdorf waren 94,5 % der Läsionen, in denen HPV 16 E6/E7 mRNA nachgewiesen wurde, auch diffus p16- positiv. Drei dieser insgesamt 55 Läsionen blieben p16-negativ bzw. zeigten eine lediglich heterogene Anfärbung. In der Arbeit von Rufforny zeigten 95,8 % der HPV-positiven Proben

eine diffuse p16-Überexpression. Eine HPV-infizierte Probe wies keine p16-Färbung auf. Als mögliche Erklärung postulierten die Autoren die, von Tam et al. 1994 beschriebene, je nach Zellzyklusphase unterschiedliche p16-Konzentration. Letztere sinkt demgemäß in der G0- sowie frühen G1-Phase auf einen Tiefpunkt und erreicht einen Gipfel in der S-Phase [135]. Alle genannten Studien wurden durch verschiedenen Faktoren (geringe Fallzahlen bzw. niedriger Anteil invasiver Läsionen, eingeschränkte HPV-Typen-Auswahl) in ihrer Aussagekraft begrenzt, so dass die vorliegende Arbeit vor allem die zusätzliche Bestätigung, aber auch Ausweitung der bisher gefundenen Erkenntnisse zum Ziel hatte.

4.5.2 p16-Immunhistochemie in der vorliegenden Arbeit

177 Gewebeproben konnten mittels p16-Immunhistochemie getestet werden, die Ergebnisse stützen diejenigen der bisherigen Studien. Ähnlich wie bei Van der Avoort stieg der Anteil p16-positiver Proben in Korrelation mit dem Läsionsgrad an und war bei den invasiven Befunden rückläufig, jedoch in geringerem Ausmaß. Im zweiten Kollektiv waren die p16-positiven Karzinome anteilig sogar nahezu auf gleicher Höhe mit den drittgradigen intraepithelialen Läsionen (Tab. 3.18, 3.19).

Ein Vergleich zwischen p16- und HPV-Status war in 168 Gewebeproben durchgeführt worden. Es ergab sich folgende Korrelation (Tab. 3.24): Von 130 high risk-HPV-positiven Proben zeigten 110 eine diffuse p16-Färbung (84,6 %). Demgegenüber war bei 29 % der HPV-negativen bzw. low risk-HPV-infizierten Läsionen eine p16-Überexpression nachweisbar.

Trotz eines positiven high risk-HPV-Nachweises wurde in 24 Proben keine entsprechende, diffuse p16-Färbung gefunden. Für diese divergenten Befunde hinsichtlich des p16- und HPV-Status gibt es verschiedene Erklärungen. Eine Infektion mit einem low risk-HPV-Virus geht erwartungsgemäß in den meisten Fällen mit einem negativen p16-Status einher, da das E7-Protein der low risk-HPV-Viren eine geringere Affinität zum Rb-Protein hat [178, 179]. Demgemäß kommt es nicht zur Inaktivierung des Rb-Proteins und die Überexpression von p16 bleibt aus. Darüber hinaus spielt bei high risk-HPV-infizierten Läsionen auch der Läsionsgrad eine bedeutende Rolle. So stieg in der vorliegenden Arbeit die Korrelation zwischen den beiden Parametern bis zu den drittgradigen Befunden kontinuierlich an. Im Bereich der invasiven Läsionen war sie jedoch wieder niedriger. Drei der 15 high risk-HPV-positiven Karzinome waren p16-negativ (20 %; Tab. 3.25). Eine mögliche Deutung wäre, dass die normalen Rückkopplungen und Regulationsmechanismen des Zellzyklus in einem Teil der invasiven Läsionen nicht mehr funktionieren und es in Folge nicht mehr zu einer Überexpression von p16 kommen kann. Ein weiteres Erklärungsmodell stellt die HPV-Infektion als unbeteiligten Nebenbefund dar. In diesem Fall spielen die HPV-Viren keine kausale Rolle, es handelt sich um eine Bystander-Infektion, bei der es zu keiner E6/E7-

Onkogenexpression kommt. Diese Konstellation ist bereits für Kopf- und Halskarzinome beschrieben worden [108, 109]. Im Gegenzug fanden Wiest et al. p53-Mutationen. Eine Differenzierung zu HPV-induzierten Karzinomen erfolgte über die p16-Immunhistochemie, durch welche eine Überexpression der HPV-Onkogene detektiert wurde.

Eine zentrale Bedeutung bei der Entstehung differenter Ergebnisse in der p16- und HPV-Testung hatte in dieser Arbeit die Qualität des Probenmaterials. Bei fast der Hälfte der entsprechenden Gewebeproben war auf dem p16-Schnitt nur oder zum größten Teil Normalgewebe vorhanden. Andere Befunde waren horizontal angeschnitten, das Oberflächenepithel fehlte oder der Schnitt war in der Struktur an sich zerstört. Die genannten Punkte wurden überwiegend darauf zurückgeführt, dass die verwendeten Paraffinblöcke bereits mehrfach verwendet worden waren. Das zur Verfügung stehende Gewebe hatte demnach teilweise einen sehr geringen Umfang. Es ist zu vermuten, dass sich die Korrelation zwischen HPV- und p16-Status noch steigern ließe, wenn man nach der Gewinnung des Materials direkt die p16-Schnitte herstellen könnte.

4.5.3 Interobservervarianz

Einige der Studien, die sich mit der p16^{INK4a}-Expression in zervikalen Läsionen beschäftigt haben, stellten auch Untersuchungen hinsichtlich der Interobservervarianz an [142, 148]. Agoff et al. zeigten eine hohe interindividuelle Reproduzierbarkeit der Beurteilung von Gewebeproben hinsichtlich des p16-Status auf. Demgegenüber stellten Klaes et al. zusätzlich einen Rückgang der Interobservervarianz in der Schweregradeinteilung intraepithelialer Läsionen durch die Anwendung dieses Biomarkers fest.

Für den Bereich der Vulva gibt es bezüglich der Interobservervarianz noch keine wegweisenden Untersuchungen. In der vorliegenden Arbeit wurde zwar kein Vergleich der Beurteilungsvarianz HE-gefärbter versus p16^{INK4a}-gefärbter Proben angestellt. Die Untersuchung der interindividuellen Reproduzierbarkeit der Beurteilung des p16-Status ergab jedoch eine sehr gute Übereinstimmungsrate von 93,0 % für alle immunhistochemisch gefärbten Schnitte. Sie war bei den p16-positiven Fällen wesentlich höher als bei den negativen Proben (98,3 % versus 77,5 %, Tab. 3.26, 3.27).

5 SCHLUSSFOLGERUNGEN

Die Läsionen des Vulvabereiches bieten sowohl morphologisch als auch in ihrem Entstehungsmechanismus ein heterogenes Bild. In der vorliegenden Arbeit konnte anhand zweier Kollektive gezeigt werden, dass sich diesen verschiedenen Entitäten der Vulvaläsionen Patientengruppen mit bestimmten Eigenschaften zuordnen lassen. Auf der einen Seite stehen Patientinnen mit multizentrischen oder metachronen Befunden, welche durchschnittlich 10 Jahre jünger als die Frauen des Vergleichskollektivs sind und deren Läsionen eine deutliche Assoziation mit einer großen Anzahl verschiedener high risk-HPV-Typen aufweisen. Der Anteil dieser Patientinnengruppe am Gesamtkollektiv der Frauen mit Läsionen des unteren weiblichen Genitaltrakts ist mittlerweile sehr hoch und insbesondere in dieser Population scheint eine wichtige Ansatzstelle für präventive Maßnahmen gegeben zu sein. Auf der anderen Seite finden sich Patientinnen mit solitären, allenfalls multifokalen Befunden, welche nur in einem geringen Ausmaß HPV-infiziert sind. Diese Frauen haben ein höheres Durchschnittsalter und sind zahlenmäßig geringer vertreten als die Patientinnen mit multizentrischen bzw. metachronen Befunden, wobei ein potentieller Screeningbias (intensivere Vorsorgeprogramme bei metachronen Befunden) nicht zu vernachlässigen ist. Die bei ihnen nachgewiesenen HP-Viren sind typischerweise hochpotent.

Darüber hinaus unterstreicht die vorliegende Arbeit erneut das Potential von p16^{INK4a} als Biomarker für HPV-assoziierte intraepitheliale wie invasive Läsionen im Bereich der Vulva. In der alltäglichen Praxis könnte die p16-Immunhistochemie damit ein ergänzendes Werkzeug in der Diagnostik entsprechender Befunde darstellen. Auf Grund der recht einfachen Durchführung der Färbung und der geringen Interobservervarianz könnte sie flächendeckend eingesetzt werden, ohne dass man auf speziell darauf ausgerichtete Labore angewiesen wäre. Zusätzlich ergaben sich Hinweise, dass p16^{INK4a} auch bei Läsionen der Vaginal- und Analregion einen entscheidenden Beitrag zur Diagnosestellung leisten könnte. Insgesamt sind jedoch weiterhin größer angelegte Untersuchungen erforderlich, um den Nutzen von p16^{INK4a} als Biomarker für den Bereich der Vulva und des übrigen unteren Genitaltrakts hinlänglich beurteilen zu können.

Letzendlich bleiben die multizentrischen Läsionen des unteren Genitaltrakts eine Herausforderung für den betreuenden Arzt. Auf Grund hoher Rezidivraten sind sie nur schwer zu beherrschen, gleichzeitig ist das Progressionspotential schwer vorherzusagen. Unklar bleibt weiterhin, inwieweit ein tatsächlicher Anstieg der intraepithelialen Läsionen zu verzeichnen ist oder sich lediglich intensiviertere Vorsorgeprogramme auf die Diagnoserate auswirken.

6 Literaturverzeichnis

- [1] ANDERS S, Riethdorf L, Löning T: Neoplasien und Präneoplasien der Vulva und Vagina: Epidemiologie und Histologie. *In: gyn* (2006) S. 16-28
- [2] BÖCKER W, Denk H, Heitz PhU: *Pathologie*. München: 3. Aufl. Urban & Fischer, 2004, S. 942-3
- [3] JUDSON PL, Habermann EB, Baxter NN, Durham SB, Virnig BA: Trends in the incidence of invasive and in situ vulvar carcinoma. *In: Obstet Gynecol* 107 (2006) Nr. 5, S. 1018-22
- [4] AKERMAN G, Dussour C, Haddad B, Paniel BJ, Rouzier R: Epidemiology of vulvar intra-epithelial neoplasias. *In: Gynecol Obstet Fertil* 35 (2007) Nr. 12, S. 1251-6
- [5] JONES RW, Rowan DM, Stewart AW: Vulvar intraepithelial neoplasia: aspects of the natural history and outcome in 405 women. *In: Obstet Gynecol* 106 (2005) Nr. 6, S. 1319-26
- [6] McNALLY OM, Mulvany NJ, Pagano R, Quinn MA, Rome RM: VIN 3: a clinicopathologic review. *In: Int J Gynecol Cancer* 12 (2002) Nr. 5, S. 490-5
- [7] VAN BEURDEN M, ten Kate FJ, Smits HL, Berkhout RJ, de Craen AJ et al.: Multifocal vulvar intraepithelial neoplasia grade III and multicentric lower genital tract neoplasia is associated with transcriptionally active human papillomavirus. *In: Cancer* 75 (1995) Nr. 12, S. 2879-84
- [8] SIDERI M, Jones RW, Wilkinson EJ, Preti M, Heller DS et al.: Squamous intraepithelial neoplasia: 2004 modified terminology, ISSVD Vulvar Oncology Subcommittee. *In: J Reprod Med* 50 (2005) Nr. 11, S. 807-10
- [9] TRUNK MJ, Wentzensen N, von Knebel Doeberitz M: Molekulare Pathogenese des Zervixkarzinoms und seiner Vorstufen. *In: Der Pathologe* 26 (2005) Nr. 4, S. 283-290
- [10] TAVASSOLI FA, Devilee P: Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs. *World Health Organization (Hrsg.): Classification of tumours* Lyon : IARC Press, 2003
- [11] TOKI T, Kurman RJ, Park JS, Kessis T, Daniel RW et al.: Probable nonpapillomavirus etiology of squamous cell carcinoma of the vulva in older women: a clinicopathologic study using in situ hybridization and polymerase chain reaction. *In: Int J Gynecol Pathol* 10 (1991) Nr. 2, S. 107-25
- [12] HART WR: Vulvar intraepithelial neoplasia: historical aspects and current status. *In: Int J Gynecol Pathol* 20 (2001) Nr. 1, S. 16-30
- [13] UEDA Y, Enomoto T, Miyatake T, Shroyer KR, Yoshizaki T, Kanao H et al.: Analysis of clonality and HPV infection in benign, hyperplastic, premalignant, and malignant lesions of the vulvar mucosa. *In: Am J Clin Pathol* 122 (2004) Nr. 2, S. 266-74
- [14] BECKMANN AM, Acker R, Christiansen AE, Sherman KJ: Human papillomavirus infection in women with multicentric squamous cell neoplasia. *In: Am J Obstet Gynecol* 165 (1991) Nr. 5 Pt 1, S. 1431-7
- [15] 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. *In: Obstet Gynecol* 108 (2006) Nr. 6, S. 1361-8
- [16] ADAMEK K, Szczudrawa A, Basta A: Coexistence of VIN and vulvar invasive cancer with intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma of the cervix and/or vagina, and HPV infection of the low female genital tract. *In: Ginekol Pol* 74 (2003) Nr. 9, S. 657-61
- [17] HAEFNER HK, Tate JE, McLachlin CM, Crum CP: Vulvar intraepithelial neoplasia: age, morphological phenotype, papillomavirus DNA, and coexisting invasive carcinoma. *In: Hum Pathol* 26

(1995) Nr. 2, S. 147-54

[18] SANTOS M, Montagut C, Mellado B, García A, Ramón y Cajal S et al.: Immunohistochemical staining for p16 and p53 in premalignant and malignant epithelial lesions of the vulva. *In: Int J Gynecol Pathol* 23 (2004) Nr. 3, S. 206-14

[19] DERUELLE P, Deruelle-Khazaal R, Collinet P, Lucot JP, Thomas P et al.: Clinical study and prognosis of 56 cases of vulvar intraepithelial neoplasia. *In: Gynecol Obstet Fertil* 33 (2005) Nr. 10, S. 755-61

[20] VAN BEURDEN M, ten Kate FW, Tjong-A-Hung SP, de Craen AJ, van der Vange N et al.: Human papillomavirus DNA in multicentric vulvar intraepithelial neoplasia. *In: Int J Gynecol Pathol* 17 (1998) Nr. 1, S. 12-6

[21] PETRY KU, Köchel H, Bode U, Schedel I, Niesert S, Glaubitz M et al.: Human papillomavirus is associated with the frequent detection of warty and basaloid high-grade neoplasia of the vulva and cervical neoplasia among immunocompromised women. *In: Gynecol Oncol* 60 (1996) Nr. 1, S. 30-4

[22] CONLEY LJ, Ellerbrock TV, Bush TJ, Chiasson MA, Sawo D et al.: HIV-1 infection and risk of vulvovaginal and perianal condylomata acuminata and intraepithelial neoplasia: a prospective cohort study. *In: Lancet* 359 (2002) Nr. 9301, S. 108-13

[23] VAN DER AVOORT IA, Shirango H, Hoevenaars BM, Grefte JM, de Hullu JA et al.: Vulvar squamous cell carcinoma is a multifactorial disease following two separate and independent pathways. *In: Int J Gynecol Pathol* 25 (2006) Nr. 1, S. 22-9

[24] YANG B, Hart WR: Vulvar intraepithelial study including analysis of HPV and p53. *In: Am J Surg Pathol* 24 (2000) Nr. 3, S. 429-41

[25] LERMA E, Esteller M, Herman JG, Prat J: Alterations of the p16/Rb/cyclin-D1 pathway in vulvar carcinoma, vulvar intraepithelial neoplasia, and lichen sclerosus. *In: Hum Pathol* 33 (2002) Nr. 11, S. 1120-5

[26] JONES RW, Rowan DM: Vulvar intraepithelial neoplasia III: a clinical study of the outcome in 113 cases with relation to the later development of invasive vulvar carcinoma. *In: Obstet Gynecol* 84 (1994) Nr. 5, S. 741-5

[27] SCHNÜRCH HG: Vulvakarzinom – Diagnostik und Therapie. *In: Der Urologe* 43 (2004) Nr. 7, S. 849-860

[28] STEFANAKI IM, Tosca AD, Themelis GC, Vazgiouraki EM, Dokianakis DN et al.: In vivo detection of human papilloma virus-induced lesions of anogenital area after application of acetic acid: a novel and accurate approach to a trivial method. *In: J Photochem Photobiol B* 65 (2001) Nr. 2-3, S. 115-21

[29] COLLINS CG, Hansen LH, Theriot E: A clinical stain for use in selecting biopsy sites in patients with vulvar disease. *In: Obstet Gynecol* 28 (1966) Nr. 2, S. 158-63

[30] JOURA EA, Zeisler H, Lösch A, Sator MO, Müllauer-Ertl S: Differentiating vulvar intraepithelial neoplasia from nonneoplastic epithelial disorders. The toluidine blue test. *In: J Reprod Med* 43 (1998) Nr. 8, S. 671-4

[31] CHULVIS DO VAL IC, Almeida Filho GL, Valiante PM, Gondim C, Takiya CM et al.: Vulvar intraepithelial neoplasia p53 expression, p53 gene mutation and HPV in recurrent/progressive cases. *In: J Reprod Med* 49 (2004) Nr. 11, S. 868-74

[32] HILLEMANN P, Wang X, Staehle S, Michels W, Dannecker C: Evaluation of different treatment modalities for vulvar intraepithelial neoplasia (VIN): CO(2) laser vaporization, photodynamic therapy,

- excision and vulvectomy. *In: Gynecol Oncol* 100 (2006) Nr. 2, S. 271-5
- [33] PENNA C, Fallani MG, Fambrini M, Zipoli E, Marchionni M: CO2 laser surgery for vulvar intraepithelial neoplasia. Excisional, destructive and combined techniques. *In: J Reprod Med* 47 (2002) Nr. 11, S. 913-8
- [34] BROWN JV 3RD, Goldstein BH, Rettenmaier MA, Aylward MM, Graham CL et al.: Laser ablation of surgical margins after excisional partial vulvectomy for VIN: Effect on recurrence. *In: J Reprod Med* 50 (2005) Nr. 5, S. 345-50
- [35] TODD RW, Etherington IJ, Luesley DM: The effects of 5% imiquimod cream on high-grade vulval intraepithelial neoplasia. *In: Gynecol Oncol* 85 (2002) Nr. 1, S. 67-70
- [36] VAN POELGEEST MI, van Seters M, van Beurden M, Kwappenberg KM, Heijmans-Antonissen C et al.: Detection of human papillomavirus (HPV) 16-specific CD4+ T-cell immunity in patients with persistent HPV16-induced vulvar intraepithelial neoplasia in relation to clinical impact of imiquimod treatment. *In: Clin Cancer Res* 11 (2005) Nr. 14, S. 5273-80
- [37] VAN SETERS M, Fons G, van Beurden M: Imiquimod in the treatment of multifocal vulvar intraepithelial neoplasia 2/3. Results of a pilot study. *In: J Reprod Med* 47 (2002) Nr. 9, S. 701-5
- [38] SUN AH, Xu Y, Feng Y, Yan J: Study on the frequency of human papillomavirus type 6 and type 11 infection and L1 gene expression of the virus in biopsy samples of pointed condyloma patients. *In: Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 27 (2006) Nr. 2, S. 150-3
- [39] Robert Koch-Institut: Impfung gegen humane Papillomaviren (HPV) für Mädchen von 12 bis 17 Jahren - Empfehlung und Begründung. *In: Epidemiologisches Bulletin* (2007) Nr. 12, S. 97-103
- [40] GARLAND SM, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Harper DM, Leodolter S et al.: Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases. *In: N Engl J Med* 356 (2007) Nr. 19, S. 1928-43
- [41] FUTURE II Study Group: Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent high-grade cervical lesions. *In: N Engl J Med* 356 (2007) Nr. 19, S. 1915-27
- [42] JOURA EA, Leodolter S, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G et al.: 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. *In: Lancet* 369 (2007) Nr. 9574, S. 1693-702
- [43] PAAVONEN J, Jenkins D, Bosch FX, Naud P, Salmerón J et al.: 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. *In: Lancet* 369 (2007) Nr. 9580, S. 2161-70
- [44] AULT KA: Human papillomavirus vaccines and the potential for cross-protection between related HPV types. *In: Gynecol Oncol* 107 (2007) Nr. 2 Suppl 1, S. 31-3
- [45] HARPER DM, Franco EL, Wheeler C, Ferris DG, Jenkins D et al.: 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. *In: Lancet* 364 (2004) Nr. 9447, S. 1757-65
- [46] HARPER DM, Franco EL, Wheeler CM, Moscicki AB, Romanowski B et al.: Sustained efficacy up to 4,5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: following-up from a randomised control trial. *In: Lancet* 367 (2006) Nr. 9518, S. 1247-55
- [47] SLADE BA, Leidel L, Vellozzi C, Woo EJ, Hua W et al.: Postlicensure safety surveillance for

- quadrivalent human papillomavirus recombinant vaccine. *In: JAMA* 302 (2009) Nr. 7, S. 750-7
- [48] BÖCKER W, Denk H, Heitz PhU: *Pathologie*. München: 3. Aufl. Urban & Fischer, 2004, S 1021-4
- [49] WANG J, Liu Y, Jin H, Wang B, Wang H: Clinical and experimental studies on condyloma acuminata. *In: Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 22 (2000) Nr. 5, S. 487-90
- [50] BÖCKER W, Denk H, Heitz PhU: *Pathologie*. München: 3. Aufl. Urban & Fischer, 2004, S. 931-2
- [51] MOLL I, Augustin M, Jung EG: *Dermatologie*. Stuttgart: 6., komplett überarb. und erw. Aufl. Thieme, 2005, S. 417-8
- [52] HAAG P, Hanhart N, Müller M: *Gynäkologie und Urologie für Studium und Praxis*. Breisach am Rhein: 3. Aufl. Medizinische Verlags- u. Informationsdienste, 2006, S. 39-42
- [53] HEMMINKI K, Li X, Vaittinen P: Time trends in the incidence of cervical and other genital squamous cell carcinomas and adenocarcinomas in Sweden, 1958-1996. *In: Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 101 (2002) Nr. 1, S. 64-9
- [54] JONES RW, Baranyai J, Stables S: Trends in squamous cell carcinoma of the vulva: the influence of vulvar intraepithelial neoplasia. *In: Obstet Gynecol* 90 (1997) Nr. 3, S. 448-52
- [55] AL-GHAMDI A, Freedman D, Miller D, Poh C, Rosin M et al.: Vulvar squamous cell carcinoma in young women: a clinicopathologic study of 21 cases. *In: Gynecol Oncol* 84 (2002) Nr. 1, S. 94-101
- [56] DITTMER C, Katalinic A, Mundhenke C, Thill M, Fischer D: Epidemiology of vulvar and vaginal cancer in Germany. *In: Arch Gynecol Obstet* 284 (2011) Nr. 1, S. 169-74
- [57] KATALINIC A, Gerdemann U: Aktuelle Zahlen zum Vulvakarzinom (Stand März 2011). *In: Institut für Krebs Epidemiologie e.V.* (2011) S. 1-4
- [58] SUN Y, Hildesheim A, Brinton LA, Nasca PC, Trimble CL et al.: Human papillomavirus-specific serologic response in vulvar neoplasia. *In: Gynecol Oncol* 63 (1996) Nr. 2, S. 200-3
- [59] MONK BJ, Burger RA, Lin F, Parham G, Vasilev SA et al.: Prognostic significance of human papillomavirus DNA in vulvar carcinoma. *In: Obstet Gynecol* 85 (1995) Nr. 5 Pt 1, S. 709-15
- [60] PINTO AP, Schlecht NF, Pintos J, Kaiano J, Franco EL et al.: Prognostic significance of lymph node variables and human papillomavirus DNA in invasive vulvar carcinoma. *In: Gynecol Oncol* 92 (2004) Nr. 3, S. 856-65
- [61] CHAN JK, Sugiyama V, Pham H, Gu M, Rutgers J et al.: Margin distance and other clinicopathologic prognostic factors in vulvar carcinoma: a multivariate analysis. *In: Gynecol Oncol* 104 (2007) Nr. 3, S. 636-41
- [62] BRINTON LA, Nasca PC, Mallin K, Baptiste MS, Wilbanks GD et al.: Case-control study of cancer of the vulva. *In: Obstet Gynecol* 75 (1990) Nr. 5, S. 859-66
- [63] MADELEINE MM, Daling JR, Carter JJ, Wipf GC, Schwartz SM et al.: Cofactors with human papillomavirus in a population-based study of vulvar cancer. *In: J Natl Cancer Inst* 89 (1997) Nr. 20, S. 1516-23
- [64] RUHUL QUDDUS M, Xu C, Steinhoff MM, Zhang C, Lawrence WD et al.: Simplex (differentiated) type VIN: absence of p16INK4 supports its weak association with HPV and its probable precursor role in non-HPV related vulvar squamous cancers. *In: Histopathology* 46 (2005) Nr. 6, S. 718-20
- [65] LEE YY, Wilczynski SP, Chumakov A, Chih D, Koeffler HP: Carcinoma of the vulva: HPV and p53 mutations. *In: Oncogene* 9 (1994) Nr. 6, S. 1655-9
- [66] IARC: Human Papillomaviruses. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. Lyon : IARC Press, 2006, Volume 90

- [67] HØRDING U, Junge J, Daugaard S, Lundvall F, Poulsen H et al.: Vulvar squamous cell carcinoma and papillomaviruses: indications for two different etiologies. *In: Gynecol Oncol* 52 (1994) Nr. 2, S. 241-6
- [68] HØRDING U, Daugaard S, Junge J, Lundvall F: Human papillomaviruses and multifocal genital neoplasia. *In: Int J Gynecol Pathol* 15 (1996) Nr. 3, S. 230-4
- [69] KURMAN RJ, Toki T, Schiffman MH: Basaloid and warty carcinomas of the vulva. Distinctive types of squamous cell carcinoma frequently associated with human papillomaviruses. *In: Am J Surg Pathol* 17 (1993) Nr. 2, S. 133-45
- [70] KAGIE MJ, Kenter GG, Zomerdiik-Nooijen Y, Hermans J, Schuurin E et al.: Human papillomavirus infection in squamous cell carcinoma of the vulva, in various synchronous epithelial changes and in normal vulvar skin. *In: Gynecol Oncol* 67 (1997) Nr. 2, S. 178-83
- [71] RIETHDORF S, Neffen EF, Cviko A, Löning T, Crum CP et al.: p16INK4A expression as biomarker for HPV 16-related vulvar neoplasias. *In: Hum Pathol* 35 (2004) Nr. 12, S. 1477-83
- [72] GASCO M, Sullivan A, Repellin C, Brooks L, Farrell PJ et al.: Coincident inactivation of 14-3-3sigma and p16INK4a is an early event in vulval squamous neoplasia. *In: Oncogene* 21 (2002) Nr. 12, S. 1876-81
- [73] HILDESHEIM A, Han CL, Brinton LA, Kurman RJ, Schiller JT: Human papillomavirus type 16 and risk of preinvasive and invasive vulvar cancer: results from a seroepidemiological case-control study. *In: Obstet Gynecol* 90 (1997) Nr. 5, S. 748-54
- [74] KARAGAS MR, Nelson HH, Sehr P, Waterboer T, Stukel TA et al.: Human papillomavirus infection and incidence of squamous cell and basal cell carcinomas of the skin. *In: J Natl Cancer Inst* 98 (2006) Nr. 6, S. 389-95
- [75] GIBSON GE, Ahmed I: Perianal and genital basal cell carcinoma: A clinicopathologic review of 51 cases. *In: J Am Acad Dermatol* 45 (2001) Nr. 1, S. 68-71
- [76] SHAMANIN V, zur Hausen H, Lavergne D, Proby CM, Leigh IM et al.: Human papillomavirus infections in nonmelanoma skin cancers from renal transplant recipients and nonimmunosuppressed patients. *In: J Natl Cancer Inst* 88 (1996) Nr. 12, S. 802-11
- [77] MOORE RG, DePasquale SE, Steinhoff MM, Gajewski W, Steller M et al.: Sentinel node identification and the ability to detect metastatic tumor to inguinal lymph nodes in squamous cell cancer of the vulva. *In: Gynecol Oncol* 89 (2003) Nr. 3, S. 475-9
- [78] MERISIO C, Berretta R, Gualdi M, Pultrone DC, Anfuso S et al.: Radioguided sentinel lymph node detection in vulvar cancer. *In: Int J Gynecol Cancer* 15 (2005) Nr. 3, S. 493-7
- [79] TERADA KY, Shimizu DM, Jiang CS, Wong JH: Outcomes for patients with T1 squamous cell cancer of the vulva undergoing sentinel node biopsy. *In: Gynecol Oncol* 102 (2006) Nr. 2, S. 200-3
- [80] DE HULLU JA, Oonk MH, Ansink AC, Hollema H, Jager PL et al.: Pitfalls in the sentinel lymph node procedure in vulvar cancer. *In: Gynecol Oncol* 94 (2004) Nr. 1, S. 10-5
- [81] ZUR HAUSEN H: Papillomavirus infections - a major cause of human cancers. *In: Biochim Biophys Acta* 1288 (1996) Nr. 2, S. F55-78
- [82] CLASSEN M, Diehl V, Kochsiek K, Berdel WE: *Innere Medizin*. München [u.a.]: 5., völlig überarb. Aufl. Urban und Fischer, 2004, S. 904-6
- [83] HOF H, Dörries R: *Medizinische Mikrobiologie*. Stuttgart: 3., komplett überarb. und erw. Aufl. Thieme, 2005, S. 244-6. - 3131253134

- [84] GARLAND SM: Human papillomavirus update with a particular focus on cervical disease. *In: Pathology* 34 (2002) Nr. 3, S. 213-24
- [85] O'CONNOR M, Apt D, Bernhard HU: DNA Tumor Viruses: Papilloma. *In: Encyclopedia of Cancer* 1 (1997) S. 520-31
- [86] ZUR HAUSEN H: Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *In: Nat Rev Cancer* 2 (2002) Nr. 5, S. 342-50
- [87] COGLIANO V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B et al.: Carcinogenicity of human papillomaviruses. *In: Lancet Oncol* 6 (2005) Nr. 4, S. 204
- [88] CASTLE PE: The evolving definition of carcinogenic human papillomavirus. *In: Infect Agent Cancer* 4 (2009) S. 7
- [89] AKGÜL B, Lemme W, García-Escudero R, Storey A, Pfister HJ: UV-B irradiation stimulates the promoter activity of the high-risk, cutaneous human papillomavirus 5 and 8 in primary keratinocytes. *In: Arch Virol* 150 (2005) Nr. 1, S. 145-51
- [90] JACKSON S, Harwood C, Thomas M, Banks L, Storey A: Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins. *In: Genes Dev* 14 (2000) Nr. 23, S. 3065-73
- [91] BOSCH FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV: The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *In: J Clin Pathol* 55 (2002) Nr. 4, S. 244-65
- [92] HERNÁDI Z, Gazdag L, Szoke K, Sápó T, Krasznai ZT et al.: Duration of HPV-associated risk for high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *In: Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 125 (2006) Nr. 1, S. 114-9
- [93] DÜRST M, Backsch C, Kaufmann AM, Schneider A: Ätiologie und Pathogenese des Zervixkarzinoms. *In: Der Gynäkologe* 36 (2003) Nr. 4, S. 282-8
- [94] PARKIN DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P: Global cancer statistics, 2002. *In: CA Cancer J Clin* 55 (2005) Nr. 2, S. 74-108
- [95] MUÑOZ N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R et al. International Agency for Research on Cancer. Multicentric Cervical Cancer Study Group.: Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *In: Lancet* 359 (2002) Nr. 9312, S. 1093-101
- [96] HILDESHEIM A, Herrero R, Castle PE, Wacholder S, Bratti MC et al.: HPV co-factors related to the development of cervical cancer: results from a population-based study in Costa Rica. *In: Br J Cancer* 84 (2001) Nr. 9, S. 1219-26
- [97] DEACON JM, Evans CD, Yule R, Desai M, Binns W, et al.: Sexual behaviour and smoking as determinants of cervical HPV infection and of CIN3 among those infected: a case-control study nested within the Manchester cohort. *In: Br J Cancer* 83 (2000) Nr. 11, S. 1565-72
- [98] FERRERA A, Velema JP, Figueroa M, Bulnes R, Toro LA et al.: Co-factors related to the causal relationship between human papillomavirus and invasive cervical cancer in Honduras. *In: Int J Epidemiol* 29 (2000) Nr. 5, S. 817-25
- [99] BAUER HM, Hildesheim A, Schiffman MH, Glass AG, Rush BB et al.: Determinants of genital human papillomavirus infection in low-risk women in Portland, Oregon. *In: Sex Transm Dis* 20 (1993) Nr. 5, S. 274-8
- [100] FRISCH M: On the etiology of anal squamous carcinoma. *In: Dan Med Bull* 49 (2002) Nr. 3, S. 194-209
- [101] LU DW, El-Mofty SK, Wang HL: Expression of p16, Rb, and p53 proteins in squamous cell

- carcinomas of the anorectal region harboring human papillomavirus DNA. *In: Mod Pathol* 16 (2003) Nr. 7, S. 692-9
- [102] ZAKI SR, Judd R, Coffield LM, Greer P, Rolston F et al.: Human papillomavirus infection and anal carcinoma. Retrospective analysis by in situ hybridization and the polymerase chain reaction. *In: Am J Pathol* 140 (1992) Nr. 6, S. 1345-55
- [103] DALING JR, Madeleine MM, Schwartz SM, Shera KA, Carter JJ et al.: A population-based study of squamous cell vaginal cancer: HPV and cofactors. *In: Gynecol Oncol* 84 (2002) Nr. 2, S. 263-70
- [104] BÖCKER W, Denk H, Heitz PhU: *Pathologie*. München: 3. Aufl. Urban & Fischer, 2004, S. 899
- [105] KLUSSMANN JP, Gültekin E, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V et al.: Expression of p16 protein identifies a distinct entity of tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus. *In: Am J Pathol* 162 (2003) Nr. 3, S. 747-53
- [106] WITTEKINDT C, Gültekin E, Weissenborn SJ, Dienes HP, Pfister HJ et al.: Expression of p16 protein is associated with human papillomavirus status in tonsillar carcinomas and has implications on survival. *In: Adv Otorhinolaryngol* 62 (2005) S. 72-80
- [107] STROME SE, Savva A, Brissett AE, Gostout BS, Lewis J et al.: Squamous cell carcinoma of the tonsils: a molecular analysis of HPV associations. *In: Clin Cancer Res* 8 (2002) Nr. 4, S. 1093-100
- [108] WENTZENSEN N, von Knebel Doeberitz M: Virale Kanzerogenese von Kopf-Hals-Tumoren. *In: Der Pathologe* 25 (2004) Nr. 1, S. 21-30
- [109] WIEST T, Schwarz E, Enders C, Flechtenmacher C, Bosch FX: Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control. *In: Oncogene* 21 (2002) Nr. 10, S. 1510-7
- [110] KLAES R, Woerner SM, Ridder R, Wentzensen N, Duerst M et al.: Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *In: Cancer Res* 59 (1999) Nr. 24, S. 6132-6
- [111] DANIEL B, Mukherjee G, Seshadri L, Vallikad E, Krishna S: Changes in the physical state and expression of human papillomavirus type 16 in the progression of cervical intraepithelial neoplasia lesions analysed by PCR. *In: J Gen Virol* 76 (1995) Pt 10, S. 2589-93
- [112] PIRAMI L, Giachè V, Becciolini A: Analysis of HPV16, 18, 31, and 35 DNA in pre-invasive and invasive lesions of the uterine cervix. *In: J Clin Pathol* 50 (1997) Nr. 7, S. 600-4
- [113] KLIMOV E, Vinokourova S, Mojsjak E, Rakhmanaliev E, Kobseva V et al.: Human papilloma viruses and cervical tumours: mapping of integration sites and analysis of adjacent cellular sequences. *In: BMC Cancer* 2 (2002) S. 24
- [114] WENTZENSEN N, Vinokourova S, von Knebel Doeberitz M: Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *In: Cancer Res* 64 (2004) Nr. 11, S. 3878-84
- [115] FEHRMANN F, Klumpp DJ, Laimins LA: Human papillomavirus type 31 E5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation. *In: J Virol* 77 (2003) Nr. 5, S. 2819-31
- [116] GENTHER SM, Sterling S, Duensing S, Münger K, Sattler C et al.: Quantitative role of the human papillomavirus type 16 E5 gene during the productive stage of the viral life cycle. *In: J Virol* 77 (2003) Nr. 5, S. 2832-42
- [117] CORDEN SA, Sant-Cassia LJ, Easton AJ, Morris AG: The integration of HPV-18 DNA in cervical

- carcinoma. *In: Mol Pathol* 52 (1999) Nr. 5, S. 275-82
- [118] DUENSING S, Münger K: The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability. *In: Cancer Res* 62 (2002) Nr. 23, S. 7075-82
- [119] MÜNGER K, Phelps WC, Bubb V, Howley PM, Schlegel R: The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *In: J Virol* 63 (1989) Nr. 10, S. 4417-21
- [120] YAMAMOTO A, Kumakura S, Uchida M, Barrett JC, Tsutsui T: immortalization of normal human embryonic fibroblasts by introduction of either the human papillomavirus type 16 E6 or E7 gene alone. *In: Int J Cancer* 106 (2003) Nr. 3, S. 301-9
- [121] WERNES BA, Levine AJ, Howley PM: Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *In: Science* 248 (1990) Nr. 4951, S. 76-9
- [122] SCHEFFNER M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM: The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *In: Cell* 63 (1990) Nr. 6, S. 1129-36
- [123] BÖCKER W, Denk H, Heitz PhU: *Pathologie*. München: 3. Aufl. Urban & Fischer, 2004, S. 181
- [124] THOMASS M, Banks L: Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. *In: J Gen Virol* 80 (1999) Pt 6, S. 1513-7
- [125] VELDMAN T, Horikawa I, Barrett JC, Schlegel R: Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *In: J Virol* 75 (2001) Nr. 9, S. 4467-72
- [126] BÖCKER W, Denk H, Heitz PhU: *Pathologie*. München: 3. Aufl. Urban & Fischer, 2004, S. 189-90
- [127] BOYER SN, Wazer DE, Band V: E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *In: Cancer Res* 56 (1996) Nr. 20, S. 4620-4
- [128] PAGANO M, Dürst M, Joswig S, Draetta G, Jansen-Dürr P: Binding of the human E2F transcription factor to the retinoblastoma protein but not to cyclin A is abolished in HPV-16-immortalized cells. *In: Oncogene* 7 (1992) Nr. 9, S. 1681-6
- [129] KHLEIF SN, DeGregori J, Yee CL, Otterson GA, Kaye FJ et al.: Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. *In: Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996) Nr. 9, S. 4350-4
- [130] SANO T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T: Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *In: Am J Pathol* 153 (1998) Nr. 6, S. 1741-8
- [131] ZERFASS K, Schulze A, Spitkovsky D, Friedman V, Henglein B et al.: Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. *In: J Virol* 69 (1995) Nr. 10, S. 6389-99
- [132] DUENSING S, Duensing A, Crum CP, Münger K: Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein-induced abnormal centrosome synthesis is an early event in the evolving malignant phenotype. *In: Cancer Res* 61 (2001) Nr. 6, S. 2356-60
- [133] STÖPPLER H, Stöppler MC, Johnson E, Simbulan-Rosenthal CM, Smulson ME et al.: The E7 protein of human papillomavirus type 16 sensitizes primary human keratinocytes to apoptosis. *In: Oncogene* 17 (1998) Nr. 10, S. 1207-14

- [134] SERRANO M, Hannon GJ, Beach D: A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *In: Nature* 366 (1993) Nr. 6456, S. 704-7
- [135] TAM SW, Shay JW, Pagano M: Differential expression and cell cycle regulation of the cyclin-dependent kinase 4 inhibitor p16Ink4. *In: Cancer Res* 54 (1994) Nr. 22, S. 5816-20
- [136] LI Y, Nichols MA, Shay JW, Xiong Y: Transcriptional repression of the D-type cyclin-dependent kinase inhibitor p16 by the retinoblastoma susceptibility gene product pRb. *In: Cancer Res* 54 (1994) Nr. 23, S. 6078-82
- [137] BEAUSÉJOUR CM, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe SW et al.: Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *In: EMBO J* 22 (2003) Nr. 16, S. 4212-22
- [138] ROCCO JW, Sidransky D: p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *In: Exp Cell Res* 264 (2001) Nr. 1, S. 42-55
- [139] KLAES R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W et al.: Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *In: Int J Cancer* 92 (2001) Nr. 2, S. 276-84
- [140] SANO T, Masuda N, Oyama T, Nakajima T: Overexpression of p16 and p14ARF is associated with human papillomavirus infection in cervical squamous cell carcinoma and Overexpression of p16 and p14ARF is associated with human papillomavirus infection in cervical squamous cell carcinoma and dysplasi. *In: Pathol Int* 52 (2002) Nr. 5-6, S. 375-83
- [141] KIM JW, Namkoong SE, Ryu SW, Kim HS, Shin JW et al.: Absence of p15INK4B and p16INK4A gene alterations in primary cervical carcinoma tissues and cell lines with human papillomavirus infection. *In: Gynecol Oncol* 70 (1998) Nr. 1, S. 75-9
- [142] KLAES R, Benner A, Friedrich T, Ridder R, Herrington S et al.: p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *In: Am J Surg Pathol* 26 (2002) Nr. 11, S. 1389-99
- [143] WANG SS, Trunk M, Schiffman M, Herrero R, Sherman ME et al.: Validation of p16INK4a as a marker of oncogenic human papillomavirus infection in cervical biopsies from a population-based cohort in Costa Rica. *In: Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13 (2004) Nr. 8, S. 1355-60
- [144] VOLGAREVA G, Zavalishina L, Andreeva Y, Frank G, Krutikova E et al.: Protein p16 as a marker of dysplastic and neoplastic alterations in cervical epithelial cells. *In: BMC Cancer* 4 (2004) S. 58
- [145] DRAY M, Russell P, Dalrymple C, Wallman N, Angus G et al.: p16(INK4a) as a complementary marker of high-grade intraepithelial lesions of the uterine cervix. I: Experience with squamous lesions in 189 consecutive cervical biopsies. *In: Pathology* 37 (2005) Nr. 2, S. 112-24
- [146] HU L, Guo M, He Z, Thornton J, McDaniel LS et al.: Human papillomavirus genotyping and p16INK4a expression in cervical intraepithelial neoplasia of adolescents. *In: Mod Pathol* 18 (2005) Nr. 2, S. 267-73
- [147] KEATING JT, Cviko A, Riethdorf S, Riethdorf L, Quade BJ et al.: Ki-67, cyclin E, and p16INK4 are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. *In: Am J Surg Pathol* 25 (2001) Nr. 7, S. 884-91
- [148] AGOFF SN, Lin P, Morihara J, Mao C, Kiviat NB et al.: p16(INK4a) expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types. *In: Mod Pathol* 16 (2003) Nr. 7, S. 665-73
- [149] MURPHY N, Ring M, Heffron CC, King B, Killalea AG et al.: p16INK4A, CDC6, and MCM5:

- predictive biomarkers in cervical preinvasive neoplasia and cervical cancer. *In: J Clin Pathol* 58 (2005) Nr. 5, S. 525-34
- [150] KONG CS, Balzer BL, Troxell ML, Patterson BK, Longacre TA: p16INK4A immunohistochemistry is superior to hpv in situ hybridization for the detection of high-risk hpv in atypical squamous metaplasia. *In: Am J Surg Pathol* 31 (2007) Nr. 1, S. 33-43
- [151] WENTZENSEN N, Bergeron C, Cas F, Eschenbach D, Vinokurova S et al.: Evaluation of a nuclear score for p16INK4a-stained cervical squamous cells in liquid-based cytology samples. *In: Cancer* 105 (2005) Nr. 6, S. 461-7
- [152] NEGRI G, Moretto G, Menia E, Vittadello F, Kasal A et al.: Immunocytochemistry of p16INK4a in liquid-based cervicovaginal specimens with modified Papanicolaou counterstaining. *In: J Clin Pathol* 59 (2006) Nr. 8, S. 827-30
- [153] NEGRI G, Egarter-Vigl E, Kasal A, Romano F, Haitel A et al.: p16INK4a is a useful marker for the diagnosis of adenocarcinoma of the cervix uteri and its precursors: an immunohistochemical study with immunocytochemical correlations. *In: Am J Surg Pathol* 27 (2003) Nr. 2, S. 187-93
- [154] CHAN MK, Cheung TH, Chung TK, Bao SY, Zhao CL et al.: Expression of p16INK4 and retinoblastoma protein Rb in vulvar lesions of Chinese women. *In: Gynecol Oncol* 68 (1998) Nr. 2, S. 156-61
- [155] TRINGLER B, Grimm C, Dudek G, Zeillinger R, Tempfer C et al.: p16INK4a expression in invasive vulvar squamous cell carcinoma. *In: Appl Immunohistochem Mol Morphol* 15 (2007) Nr. 3, S. 279-83
- [156] SANTOS M, Landolfi S, Olivella A, Lloveras B, Klaustermeier J et al.: p16 overexpression identifies hpv-positive vulvar squamous cell carcinomas. *In: Am J Surg Pathol* 30 (2006) Nr. 11, S. 1347-56
- [157] RUFFORNY I, Wilkinson EJ, Liu C, Zhu H, Buteral M et al.: Human papillomavirus infection and p16(INK4a) protein expression in vulvar intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma. *In: J Low Genit Tract Dis* 9 (2005) Nr. 2, S. 108-13
- [158] BOLLMANN R, Méhes G, Torka R, Speich N, Schmitt C et al.: Human papillomavirus typing and DNA ploidy determination of squamous intraepithelial lesions in liquid-based cytologic samples. *In: Cancer* 99 (2003) Nr. 1, S. 57-62
- [159] HAMPL M, Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel-Doeberitz M, Poremba C et al.: Comprehensive analysis of 130 multicentric intraepithelial female lower genital tract lesions by HPV typing and p16 expression profile. *In: J Cancer Res Clin Oncol* 133 (2007) S. 235-45
- [160] VINOKUROVA S, Wentzensen N, Eienkel J, Klaes R, Ziegert C et al.: Clonal history of papillomavirus-induced dysplasia in the female lower genital tract. *In: J Natl Cancer Inst* 97 (2005) Nr. 24, S. 1816-21
- [161] DODGE JA, Eltabbakh GH, Mount SL, Walker RP, Morgan A.: Clinical features and risk of recurrence among patients with vaginal intraepithelial neoplasia. *In: Gynecol Oncol* 83 (2001) Nr. 2, S. 363-9
- [162] BOSCH FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjose S et al.: Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *In: Vaccine* 26 (2008) Nr. 10, S. K1-16
- [163] WALBOOMERS JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA: Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *In: J Pathol* 189 (1999) Nr. 1, S. 12-9

- [164] EVA LJ, Ganesan R, Chan KK, Honest H, Malik S et al.: Vulval squamous cell carcinoma occurring on a background of differentiated vulval intraepithelial neoplasia is more likely to recur: a review of 154 cases. *In: J Reprod Med* 53 (2008) Nr. 6, S. 397-401
- [165] EVA LJ, Ganesan R, Chan KK, Honest H, Luesley DM: Differentiated-type vulval intraepithelial neoplasia has a high-risk association with vulval squamous cell carcinoma. *In: Int J Gynecol Cancer* 19 (2009) Nr. 4, S. 741-4
- [166] MULVANY NJ, Allen DG: Differentiated intraepithelial neoplasia of the vulva. *In: Int J Gynecol Pathol* 27 (2008) Nr. 1, S. 125-35
- [167] IKENBERG H, Runge M, Göppinger A, Pfeleiderer A: Human papillomavirus DNA in invasive carcinoma of the vagina. *In: Obstet Gynecol* 76 (1990) Nr. 3 Pt 1, S. 432-8
- [168] CASTLE PE, Rodriguez AC, Porras C, Herrero R, Schiffmann M et al.: A Comparison of Cervical and Vaginal Human Papillomavirus. *In: Sexually Transmitted Diseases* 34 (2007) Nr. 11, S. 849-855
- [169] LANGE C, Ziese T; *Robert Koch-Institut: Gesundheit in Deutschland. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Berlin, 2006, S. 107-9*
- [170] SHERMAN KJ, Daling JR, McKnight B, Chu J: Hormonal factors in vulvar cancer. A case-control study. *In: J Reprod Med* 39 (1994) Nr. 11, S. 857-61
- [171] THOMAS DB, Ray RM, Koetsawang A, Kiviat N, Kuypers J et al.: Human papillomaviruses and cervical cancer in Bangkok. I. Risk factors for invasive cervical carcinomas with human papillomavirus types 16 and 18 DNA. *In: Am J Epidemiol* 153 (2001) Nr. 8, S. 723-31
- [172] SCHIFFMAN MH, Bauer HM, Hoover RN, Glass AG, Cadell DM et al.: Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *In: J Natl Cancer Inst* 85 (1993) Nr. 12, S. 958-64
- [173] KJAER SK: Risk factors for cervical neoplasia in Denmark. *In: APMIS Suppl* 80 (1998) S. 1-41
- [174] LA VECCHIA C, Altieri A, Franceschi S, Tavani A: Oral contraceptives and cancer: an update. *In: Drug Saf* 24 (2001) Nr. 10, S. 741-54
- [175] MORENO V, Bosch FX, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV et al.: Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *In: Lancet* 359 (2002) Nr. 9312, S. 1085-92
- [176] SHAPIRO S, Rosenberg L, Hoffman M, Kelly JP, Cooper DD et al.: Risk of invasive cancer of the cervix in relation to the use of injectable progestogen contraceptives and combined estrogen/progestogen oral contraceptives (South Africa). *In: Cancer Causes Control* 14 (2003) Nr. 5, S. 485-95
- [177] DALING JR, Madeleine MM, McKnight B, Carter JJ, Wipf GC et al.: The relationship of human papillomavirus-related cervical tumors to cigarette smoking, oral contraceptive use, and prior herpes simplex virus type 2 infection. *In: Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 5 (1996) Nr. 7, S. 541-8
- [178] HECK DV, Yee CL, Howley PM, Münger K: Efficiency of binding the retinoblastoma protein correlates with the transforming capacity of the E7 oncoproteins of the human papillomaviruses. *In: Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1992) Nr. 10, S. 4442-6
- [179] MÜNGER K, Scheffner M, Huibregtse JM, Howley PM: Interactions of HPV E6 and E7 oncoproteins with tumour suppressor gene products. *In: Cancer Surv* 12 (1992) S. 197-217

DANKSAGUNG

Die Dissertation wurde an der Frauenklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf durchgeführt.

Hiermit möchte ich allen danken, die am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren.

Mein ganz besonderer Dank geht an meinen Betreuer, PD Dr. med. Nicolas Wentzensen, der mir trotz erheblicher räumlicher Distanzen (Heidelberg/USA) stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat. Ebenfalls danken möchte ich den Mitarbeitern des pathologischen Institutes des Universitätsklinikums Heidelberg, namentlich Nina Nelius und Dr. Miriam Reuschenbach.

Ein weiterer Dank gilt meiner Doktormutter, Prof. Dr. med. Monika Hampl, insbesondere für die Bereitstellung des Themas und das Korrekturlesen der vorgelegten Manuskripte.

Herausheben möchte ich an dieser Stelle den Dank an meine Eltern und Geschwister, die mir bis zuletzt den nötigen Rückhalt gegeben haben, um diese Doktorarbeit fertigzustellen.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

25.06.2012, Elisabeth Roeling