

Aus der Frauenklinik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Kommissarischer Direktor: Priv.-Doz. Dr. med. M. Fleisch

Das Vulvakarzinom der vorderen Kommissur
Eine neue Tumorentität ?

Dissertation

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

vorgelegt von
Dimitrios Panayotopoulos

2012

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
gez. Univ.- Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referentin: Prof. Dr. med. Monika Hampf
Korreferent: Prof. Dr. med. Markus Giessing

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Reuschenbach M, Roos J, Panayotopoulos D, Baldus SE, Schnürch HG, Berger A, Petry KU, Duerst M, Seiz M, von Knebel Doeberitz M, Hampl M: Characterization of squamous cell cancers of the vulvar anterior fourchette by Human Papillomavirus, p16^{INK4a}, and p53. Journal of Lower Genital Tract Disease 2013 Jul;17(3):289-297.

Zusammenfassung

Das Vulvakarzinom ist eine seltene Erkrankung (ca. 4% aller gynäkologischen Genitalmalignome), die bisher meist bei älteren Frauen auftrat. Vulväre intraepitheliale Neoplasien (VIN), chronische vulväre Hauterkrankungen wie Lichen sclerosus und HPV-Infektion (am häufigsten HPV-16) sind die wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung eines Vulvakarzinoms.

Das invasive Plattenepithelkarzinom der Vulva kann in zwei Gruppen mit verschiedener Pathogenese eingeteilt werden, die zwei Tumorentitäten bilden: Das mit Lichen sclerosus- und p53-Überexpression-assoziierte Vulvakarzinom der älteren Frauen und das HPV-/VIN-assoziierte Vulvakarzinom der jüngeren Frauen.

Die Inzidenz des Vulvakarzinoms hat in den letzten Jahren zugenommen, insbesondere bei jüngeren Frauen. In der Universitätsfrauenklinik Düsseldorf zeigte sich innerhalb der letzten 30 Jahren eine Verdoppelung der Anzahl der Patientinnen mit Vulvakarzinom, wobei sich eine 4-fache Erhöhung der Anzahl der jungen Patientinnen (+372%) beobachtet wurde. Es zeigte sich sehr häufig eine Tumorlokalisation im Bereich der vorderen Kommissur zwischen Klitoris und Urethra, im Gegensatz zu der bislang typischen Tumorlokalisation an den Labien. Aufgrund dieser klinischen Beobachtungen wurde der Verdacht geäußert, dass diese Vulvakarzinome der vorderen Kommissur einer neuen, 3. Tumorentität des Vulvakarzinoms entsprechen könnten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des klinischen und molekularbiologischen Profils dieser Vulvakarzinome. Im Rahmen einer multizentrischen Studie haben wir die klinischen, histopathologischen und molekulargenetischen Merkmale von 135 Vulvakarzinomen der vorderen Kommissur untersucht. 52 Vulvakarzinome anderer Lokalisationen dienten als Kontrolltumore.

Die erhobenen Daten ermöglichen die Klassifikation der Vulvakarzinome in 3 unterschiedliche Genesen: HPV- und p16^{INK4a}-positive Tumore, p53-überexprimierende Tumore, die HPV-/p16^{INK4a}-negativ sind und eine 3. Gruppe mit unklarer Genese. Es zeigte sich, dass die Tumore der vorderen Kommissur weniger HPV-induziert sind und häufiger p53 überexprimieren und das unabhängig vom Alter der Frauen im Vergleich zur Gruppe der Tumore anderer Lokalisation, wo die HPV induzierten Tumore im Vergleich zu den p53-induzierten Tumoren einen deutlichen Altersunterschied zeigten.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass das Vulvakarzinom nicht mehr als eine Erkrankung der älteren Frauen betrachtet werden darf und dass die Region zwischen Klitoris und Urethra bei Angabe seit längerer Zeit bestehenden, therapieresistenten Beschwerden (Schmerzen, Brennen, Juckreiz, Dysurie) ausführlich untersucht und ggf. biopsiert werden sollte.

Abkürzungsverzeichnis

| | | | |
|---------------|--|----------------------------|---|
| AGO | Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie | LS | Lichen sclerosus |
| AIDS | Acquired Immune Deficiency Syndrome | OC | Orale Kontrazeptiva (Pille) |
| AIN | Anal Intraepithelial Neoplasia | Pap-Abstrich | Abstrich nach Papanicolaou |
| CFSs | Common Fragile Sites (der DNA) | PCR | Polymerase Chain Reaction |
| CIN | Cervical Intraepithelial Neoplasia | pRb | Retinoblastom- Tumorsuppressorprotein |
| DNA | DeoxyriboNucleic Acid | p16^{INK4a} | Inhibitor of kinase 4 |
| EBV | Epstein-Barr Virus | SEER | Surveillance Epidemiology and End Results (of the National Cancer Institute, USA) |
| E6-AP | E6-Associated Protein | STIKO | Ständige Impfkommission |
| FIGO | International Federation of Gynecology and Obstetrics | TNM | TNM-Klassifikation von malignen Tumoren (T=Tumor, N=Lymphknoten, M=Metastasen) |
| HCII | Hybrid Capture II Test | UFK Düsseldorf | Universitätsfrauenklinik Düsseldorf |
| HIV | Human Immunodeficiency Virus | VAIN | Vaginale Intraepitheliale Neoplasie |
| HPV | Human Papilloma Virus | VEGF | Vascular Endothelial Growth Factor |
| HR-HPV | High Risk Human Papilloma Virus | VIN | Vulväre Intraepitheliale Neoplasie |
| HSV | Herpes Simplex Virus | VIN-d | Vulväre Intraepitheliale Neoplasie- differentiated type |
| ICTV | International Committee on the Taxonomy of Viruses | VIN-u | Vulväre Intraepitheliale Neoplasie- usual type |
| ISSVD | Committee of Nomenclature of the International Society for the Study of Vulvar Disease | | |
| kb | kilobase (1000 Basenpaare DNA) | | |
| LR-HPV | Low Risk Human Papilloma Virus | | |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Vulvakarzinom..... | 1 |
| 1.1.1 Epidemiologie des Vulvakarzinoms..... | 1 |
| 1.1.2 Tumorentitäten des Vulvakarzinoms..... | 2 |
| 1.2 Molekulargenetische Grundlagen..... | 2 |
| 1.2.1 Humane Papillomaviren (HPV) – Allgemein..... | 2 |
| 1.2.2 HPV und Mechanismen der Onkogenese..... | 5 |
| 1.2.3 Die Rolle der viralen Onkoproteine..... | 6 |
| 1.2.4 Low-risk HPV vs. high-risk HPV..... | 7 |
| 1.2.5 Die Rolle der viralen Integration..... | 7 |
| 1.2.6 HPV und Angiogenese..... | 8 |
| 1.2.7 Nicht-virale Kofaktoren..... | 8 |
| 1.2.8 HPV Nachweisverfahren..... | 9 |
| 1.2.9 HPV Impfung..... | 9 |
| 1.2.10 p53..... | 10 |
| 1.2.11 p16 ^{INK4a} (inhibitor of kinase 4)..... | 11 |
| 1.3 Klinik..... | 12 |
| 1.3.1 Condylomata acuminata..... | 12 |
| 1.3.2 Vulväre intraepitheliale Neoplasie (VIN)..... | 14 |
| 1.3.3 Lichen sclerosus..... | 17 |
| 1.3.4 Klinisches Erscheinungsbild des Vulvakarzinoms..... | 18 |
| 1.3.5 Stadieneinteilung des Vulvakarzinoms..... | 20 |
| 1.3.6 Therapie des Vulvakarzinoms..... | 21 |
| 1.3.7 Prognose..... | 22 |
| 1.3.8 Aktuelle epidemiologische Aspekte des Vulvakarzinoms..... | 22 |
| 1.3.9 Patientinnen mit Vulvakarzinom der vorderen Kommissur in der UFK Düsseldorf..... | 25 |
| 1.3.10 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit..... | 26 |
| | |
| 2. Materialien und Methoden | 27 |
| 2.1 Patientinnenkollektiv..... | 27 |
| 2.2 DNA-Extraktion vom Tumorgewebe und HPV DNA-Nachweis..... | 27 |
| 2.3 HSV- und EBV-Nachweis..... | 28 |
| 2.4 p16 ^{INK4a} und Ki-67 Expression-Immunhistochemie..... | 28 |
| 2.5 Immunhistochemie für p53-Expression und mikroskopische Evaluation..... | 29 |
| 2.6 Statistik..... | 29 |

| | |
|--|-----------|
| 3. Ergebnisse | 30 |
| 3.1 Vulvakarzinome der vorderen Kommissur..... | 48 |
| 3.2 Vulvakarzinome anderer Lokalisationen (Referenztumore)..... | 50 |
| 3.3 Vergleich der Tumore der vorderen Kommissur mit den Tumoren anderer Lokalisationen..... | 53 |
| 3.3.1 Alter..... | 53 |
| 3.3.2 Tumorstadium..... | 55 |
| 3.3.3 Nodalstatus..... | 56 |
| 3.3.4 HPV..... | 57 |
| 3.3.5 Klinisches Erscheinungsbild..... | 59 |
| 3.3.6 Pilleinnahme..... | 59 |
| 3.3.7 Tumorumgebung..... | 59 |
| 3.3.8 Tumorresektion..... | 60 |
| 3.3.9 Weitere klinische Parameter..... | 60 |
| 3.3.10 p53..... | 61 |
| 3.3.11 p16 ^{INK4a} und Ki-67..... | 61 |
| 3.4 Pap-Abstrich und HPV-Zervixabstrich beim Vulvakarzinom..... | 61 |
| 3.5 Kombinationen von HR-HPV-, p16 ^{INK4a} - und p53-Status..... | 62 |
| 3.5.1 Tumore der vorderen Kommissur..... | 65 |
| 3.5.2 Tumore anderer Lokalisationen..... | 65 |
| 3.5.3 Tumore vorderer Kommissur vs. Tumore anderer Lokalisationen in Bezug auf unterschiedlichen Entstehungsmechanismen..... | 66 |
| | |
| 4. Diskussion | 67 |
| 4.1 Unterschiede zwischen den Tumoren der vorderen Kommissur und den Referenztumoren..... | 68 |
| 4.2 Vergleich HPV-positive vs. HPV-negative Tumore der zwei Lokalisationsgruppen..... | 70 |
| 4.3 HPV-negative Tumore: Tumore vorderer Kommissur vs. Tumore anderer Lokalisationen..... | 71 |
| 4.4 HPV-positive Tumore: Tumore vorderer Kommissur vs. Tumore anderer Lokalisationen..... | 72 |
| 4.5 Molekulargenetik und die 3 identifizierten Entstehungsmechanismen des Vulvakarzinoms..... | 72 |
| | |
| 5. Literaturverzeichnis | 77 |

1. Einleitung

1.1 Vulvakarzinom

1.1.1 Epidemiologie des Vulvakarzinoms

Das Vulvakarzinom ist eine seltene Erkrankung, die meist im höheren Alter auftritt. In den USA macht das Vulvakarzinom ca. 4% der Tumore des weiblichen Genitale aus mit einer Inzidenz von 2,5/100000 pro Jahr (Judson 2006, Sankaranarayanan 2006). In Deutschland zeigt sich eine höhere Inzidenz von 7/100000 pro Jahr (3000 neue Fälle jährlich) (Krebsregister Schleswig-Holstein). Die Inzidenz des Vulvakarzinoms ist in Europa und Nordamerika am höchsten und in Entwicklungsländern am niedrigsten, wobei das letzte auch auf eine mangelhafte Dokumentation in diesen Ländern zurückzuführen wäre (Sankaranarayanan 2006).

In den meisten Fällen (90%) handelt es sich um Plattenepithelkarzinome. Seltener treten Melanome, Basalzellkarzinome, Adenokarzinome, Sarkome und undifferenzierte Karzinome auf. Rauchen, HPV-Infektion, Immunsuppression, vulväre intraepitheliale Neoplasien (VIN) und chronische vulväre Hauterkrankungen wie Lichen sclerosus stellen die wichtigsten Risikofaktoren dar. Bei HIV-positiven Frauen besteht ein 6x höheres relatives Risiko für die Entstehung eines Vulvakarzinoms (Frisch 2000).

HPV-16 ist der am häufigsten isolierte HPV-Typ in vulvären Läsionen. Es folgen HPV-18, 31, 33 und 45 (Van der Avoort 2005, Skapa 2007, Lindell und Näsmann 2010).

Die Inzidenz des Vulvakarzinoms ist in den letzten Jahren gestiegen (Anstieg um 20% zwischen 1973 und 2000) (Judson 2006). In Europa zeigte sich im Zeitraum 1999-2008 ein Inzidenzanstieg von 2,2 auf 6,1/100000 und weltweit von 1,5 auf 4,4/100000 (Krebsregister Schleswig-Holstein). Dieser Inzidenzanstieg ist mit der steigenden Anzahl der HPV-Infektionen korreliert (Judson 2006). In einem Bericht vom amerikanischen Nationalen Krebsregister wurde das Vulvakarzinom als eine der 12 Krebserkrankungen bezeichnet, die zwischen 1992 und 1998 eine steigende Tendenz aufweisen (Howe 2001, SEER-Registries). Im Zeitraum 1973-2004 wurde ein Anstieg der VIN-Läsionen um 3,5% und der invasiven Vulvakarzinome um 1% pro Jahr beobachtet (Bodelon 2009).

Das Plattenepithelkarzinom der Vulva wird im Allgemeinen als eine Erkrankung der älteren Frauen angesehen (mittleres Erkrankungsalter: 65-80J.). Innerhalb der letzten Jahre ist jedoch ein bemerkenswerter Anstieg der Vulvakarzinome bei jungen Frauen aufgefallen (Howe 2001). Dabei handelt es sich meistens um HPV-assoziierte Tumore, die oft von einer VIN umgeben sind (Carter 1993, Messing 1995, Jones 1997, Losch 1999). Berichte über Frauen unter 18J mit Erstdiagnose eines Vulvakarzinoms sind in der

Literatur extrem selten (Roman 1991, Carter 1993, Al-Ghamdi 2002, Hampl 2006). Die jüngste Patientin mit Diagnose eines Vulvakarzinoms ist eine 13jährige Patientin gewesen (Mesroglu 1986).

Der bemerkenswerte Anstieg der Gesamtanzahl der Frauen mit Vulvakarzinom könnte sich durch den Anstieg der VIN-Läsionen bzw. durch die Progression von HPV-induzierten VIN-Läsionen während der letzten Jahre erklären lassen, da die schwergradigen VIN-Läsionen eine Vorstufe des Vulvakarzinoms darstellen (Jones 2005, Judson 2006).

1.1.2 Tumorentitäten des Vulvakarzinoms

Laut verschiedenen epidemiologischen und klinikopathologischen Studien kann das invasive Plattenepithelkarzinom der Vulva in zwei Gruppen mit verschiedener Pathogenese eingeteilt werden, die zwei Tumorentitäten bilden:

1. Vulvakarzinom der älteren Frauen (>50J.). Es handelt sich um differenzierte, verhornde Plattenepithelkarzinome, die nicht über Vorstufen (VIN-Läsionen) entstehen. Risikofaktoren sind nicht neoplastische epitheliale Läsionen wie der Lichen sclerosus (Skapa 2007, van de Nieuwenhof 2009+2010+2011). In einem großen Teil dieser Tumoren werden p53-Mutationen und Überexpression von funktionslosem p53-Protein nachgewiesen (Hoevenaars 2008).
2. Vulvakarzinom der jüngeren Frauen (<50J.). Zu dieser Gruppe gehören nicht verhornde Plattenepithelkarzinome vom basaloiden/bowenoiden Typ oder verrukösen/non-bowenoiden Typ. Diese Karzinome sind HPV-induziert (meistens HPV 16, 18, 31, 33) und entstehen über VIN-Vorstufen. Als Risikofaktoren werden die HPV-Infektion der Zervix, die Immunsuppression, die HIV-Infektion, die positive Kondylomen-Anamnese (als Ausdruck einer HPV-Infektion), der Nikotinabusus und die hohe Anzahl von Sexualpartnern beschrieben. Eine p53-Überexpression kommt bei dieser Gruppe selten vor (Stroup 2008).

1.2 Molekulargenetische Grundlagen

1.2.1 Humane Papillomaviren (HPV) - Allgemein

HPV (human papilloma virus) ist ein ikosaederförmiges, doppelsträngiges DNA-Virus mit einem Durchmesser von ca. 55nm (Howley 1996), das sich im Nukleus der befallenen Zelle repliziert (Abb. 1). Trotz ihrer kleinen Größe, weisen HP-Viren eine sehr komplexe Molekularbiologie auf. Das Genom des Virus besteht aus einer zirkulären,

doppelsträngigen DNA (ca. 8kb) und beinhaltet die fünf „early“ Gene (E1, E2, E5, E6 und E7), deren Proteine für die virale Replikation und für die zelluläre Transformation benötigt werden (Regulatorproteine E1 und E2 ; Onkoproteine E5, E6 und E7), sowie die „late“ Gene L1 und L2, deren Strukturproteine das Viruskapsid bilden (Abb. 2) (Fuchs 1994, De Villiers 2004).

Die Papillomaviren wurden ursprünglich zusammen mit den Polyomaviren in der gleichen Gruppe (Papovaviridae) eingeteilt. Der Grund dafür war das Vorhandensein zyklischer, doppelsträngiger DNA und Ähnlichkeiten des Viruskapsids. Im Verlauf hat sich erwiesen, dass sich die zwei Virusgruppen in der Größe ihres Genoms erheblich unterscheiden, und deren Nukleotid- und Aminosäuresequenzen keine wesentlichen Ähnlichkeiten aufweisen. Die International Committee on the Taxonomy of Viruses (ICTV) hat deswegen die Papillomaviren als eigene Virusfamilie anerkannt (Papillomaviridae) und von der Familie der Polyomaviren (Polyomaviridae) getrennt (De Villiers 2004).

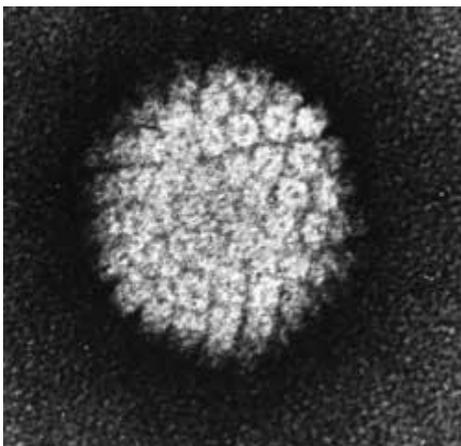


Abb. 1: HPV unter dem Elektronenmikroskop

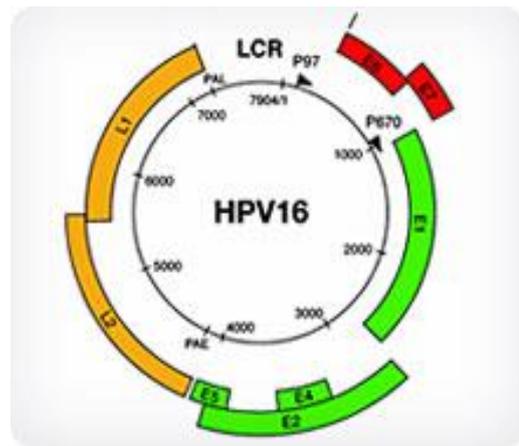


Abb. 2: Das Genom des HP-Virus Typ 16

Die HP-Viren werden durch direkten Kontakt von Mensch zu Mensch übertragen, v.a. durch Geschlechtsverkehr (über 90%) und seltener in Schwimmbädern/Saunen oder über gemeinsam benutzte Handtücher. Die Inzidenz der HPV-Infektion ist weltweit sehr hoch, ca. 70-80% der Frauen machen in ihrem Leben die HPV-Infektion durch. Die HPV-Infektion im Anogenitalbereich ist somit die heutzutage am häufigsten vorkommende sexuell übertragene Erkrankung. Diese Infektionen heilen größtenteils (ca. 70% bei jungen Frauen) innerhalb von 6-18 Monaten aus (Ho 1998). Die Prävalenz der HPV-Infektion zeigt eine Altersabhängigkeit und erreicht ihren Höhepunkt im reproduktiven Alter, mit einem peak in der Altersgruppe von 20-25 Jahren (25%).

Bislang sind mehr als 100 verschiedene Typen von HP-Viren identifiziert worden. HP-Viren sind epitheliotrope Viren und für die Komplettierung ihres Lebenszyklus ist differenziertes Plattenepithel erforderlich. Die Übertragung von HPV erfolgt am wahrscheinlichsten über Kontakt mit abgestoßenen Keratinozyten (sexueller oder indirekter Kontakt). Diese abgestoßene Keratinozyten enthalten Viruspartikel, die auf irgendeine Art (meist über Mikroläsionen der Haut/Schleimhaut) den Wirtsorganismus infizieren. Bis jetzt ist kein spezifischer Rezeptor ermittelt.

HPV können sowohl gutartige Läsionen (z.B. Kondylome), als auch gering-, mittel- oder hochgradige Präneoplasien verursachen, die zu einem invasiven Karzinom führen können. Eine Infektion mit HPV führt oft zu mikroskopischen Läsionen, die mit bloßem Auge kaum erkennbar sind. Die HPV- Infektion wird oft zuerst von einer Latenzphase gefolgt. Zustände wie z.B. Immunsuppression können zu einer Aktivierung der latenten Infektion führen. Ansonsten ist in der Regel die Zeit von der Infektion mit HPV bis zur Entstehung von Genitalwarzen 3 Monate, bis zur Entstehung einer Präneoplasie an der Zervix noch länger.

Zahlreiche klinische und virologische Studien bestätigen die kausale Rolle der HP-Viren bei der Entwicklung der intraepithelialen Neoplasien des unteren Genitaltraktes (CIN, VAIN, VIN, AIN) und Plattenepithelkarzinome der Zervix, Vagina, Vulva und des Anus. Die Gefahr, dass sich eine klinisch relevante intraepitheliale Neoplasie ausbildet, besteht nur bei einer persistierenden HPV-Infektion.

Die Koiliozytose (griechisch: „koilos“=hohl) ist das morphologische Korrelat der HPV-Aktivität. Diese Zellen (Koiliozyten ; Abb. 3) haben einen unregelmäßigen, entrundeten Kern und weisen eine perinukleäre Aufhellung des Zytoplasmas auf.

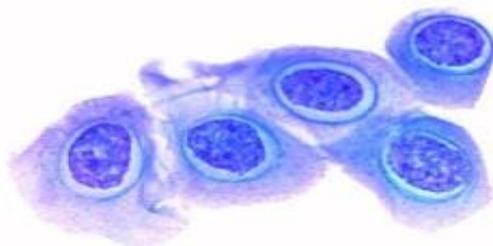


Abb. 3: Koiliozyten

Es gibt ca. 40 HPV-Typen, die eine Infektion des Genitaltraktes verursachen können. Die Infektion der Genitalorgane kann entweder asymptomatisch verlaufen, oder zu Kondylomen, dysplastischen Veränderungen und invasiven Karzinomen führen (zur

Hausen 1999). Die verschiedenen HPV-Typen können in zwei Gruppen unterteilt werden: high-risk (HR-HPV) und low-risk (LR-HPV) (Tabelle 1). Die LR-HPV Typen sind mit benignen Läsionen wie Condylomata acuminata, sowie mit leichtgradigen zervikalen dysplastischen Läsionen assoziiert (Gissmann 1983, Brown 1999). Die HR-HPV Typen können leicht- mittel- und schwergradigen zervikalen Dysplasien bis zum invasiven Zervixkarzinom verursachen (Herrero 1999). Außer dem Zervixkarzinom sind andere HPV-assoziierte Malignome des Genitaltraktes das Vulvakarzinom (Hildesheim 1997), Vaginalkarzinom, Analkarzinom (HPV-positiv in fast allen Fällen) und das Peniskarzinom. 85,3% der VIN-Läsionen und 40,4% der Vulvakarzinome sind HPV positiv. In den HPV-induzierten Tumoren hat der HPV 16 eine Prävalenz von 80-90% (de Vuyst 2009).

| Low risk HPV Typen (LR-HPV) | High risk HPV Typen (HR-HPV) |
|---|--|
| 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 | 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82 |

Tabelle 1: low-risk und high-risk HP-Viren

Ein deutlicher Anstieg der HPV-assoziierten Erkrankungen der Vulva ist in Deutschland und in Europa insgesamt zu verzeichnen. Die erkrankten Frauen sind auch jünger geworden im Vergleich zu vor Jahrzehnten (Krebsregister Schleswig-Holstein, Zeitraum 1999-2008).

Zu den HPV-assoziierten Erkrankungen der Vulva gehören die Kondylome, die VIN (unterteilt in kondylomatös, basaloid und gemischt) und die plattenepithelialen Vulvakarzinome. Die Vulva-Kondylome, die zu 90% auf die LR-HPV-Typen zurückzuführen sind, sind benigne. Die HR-HPV-Typen induzieren die VIN-Läsionen.

HPV 16, 31, 33, 35, 58 und 67 sind die HPV-Typen, die am häufigsten beim Vulvakarzinom nachgewiesen werden. Beim basaloiden und kondylomatösen Typ des Vulvakarzinoms der jungen Frauen, werden hauptsächlich HPV 16, 18, 31 und 33 und seltener 6, 11, 45 isoliert (Venuti 1989, Park 1991, Hording 1993, Milde-Langosch 1995, Trimble 1996, Petry 1996, Junge 1997, Kagie 1997).

1.2.2 HPV und Mechanismen der Onkogenese

Die Mechanismen der HPV-assoziierten Onkogenese wurden erstmals von Harald zur Hausen am Zervixkarzinom beschrieben (zur Hausen 1976, Durst 1983).

Die HPV-Genprodukte tragen zu mehreren Prozessen der Karzinogenese bei (Unempfindlichkeit gegenüber Anti-Wachstum-Signalen, Hemmung der Apoptose, grenzloses Replikationspotenzial, Angiogenese, Gewebsinvasion und Metastase) (Hanahan 2000).

1.2.3 Die Rolle der viralen Onkoproteine

E6 und E7 sind die wichtigsten HPV-Onkoproteine (Munger 1989) und werden in Zervixkarzinomen ständig exprimiert. Die Expression des E6-Proteins führt bei der infizierten Zelle zu einer Unempfindlichkeit gegenüber Anti-Wachstum-Signalen und zum Umgehen der Apoptose. Das E6-Protein verbindet sich mit dem E6-AP (E6-associated protein). Der Proteinkomplex bestehend aus E6 und E6-AP verbindet sich mit dem zellulären Tumorsuppressor p53, was zum Abbau des letzteren führt (Huibregtse 1991, Kuhne 1999).

Das Tumorsuppressorgen p53 aktiviert physiologischerweise die Expression von Genen, deren Bedeutung in der Zellzykluskontrolle und Apoptose liegt (Oren 2003, Slee 2004) und wird bei DNA-Schaden und zellulärem Stress vermehrt nachgewiesen. Im Falle einer sehr ausgedehnten DNA-Schädigung kommt es zu einer vom p53 ausgelösten Aktivierung von proapoptotischen Genen, deren Produkte zur Zellapoptose führen. Der Verlust der p53-Funktion nach der Interaktion mit dem E6 führt in dieser Weise zum Verlust der Zellzyklusregulation und der Apoptosefähigkeit. Außerdem induziert E6 eine Telomeraseaktivität (Veldmann 2003).

Die Expression des E7-Proteins der onkogenen HPV-Typen führt zu Unempfindlichkeit gegenüber Anti-Wachstum-Signalen und zur Persistenz von Keratinozyten (Munger 2001). Dieser Effekt wird durch Wechselwirkungen mit dem Retinoblastom-Tumorsuppressorprotein (pRb) und den Proteinen p107 und p130 vermittelt (Munger 2001). pRb übt seine wachstumshemmende Wirkung aus, indem es einen Komplex mit einer Gruppe von Transkriptionsfaktoren bildet, die insgesamt als E2F bezeichnet werden (Munger 2001). pRb wird in normalen Zellen durch zyklinabhängige Kinasen (cyclin depending kinases-cdk) phosphoryliert, bevor die Zelle in die S-Phase kommt. Der E7-pRb-Komplex zerstört den pRb-E2F-Komplex, sodass die Zelle in die S-Phase kommt (McIntyre 1989, Munger 2001).

Die von den HR-HPV exprimierten Onkoproteine E6 und E7 sind somit in der Lage, eine Deregulation der Zellzykluskontrolle zu bewirken. E6 und E7 sind außerdem in der Lage, den antiviralen und den antionkogenen Effekt der Interferon-vermittelten

Immunreaktion zu unterdrücken. Demgemäß kann eine persistierende HPV-Infektion entstehen, indem das Virus dem Immunsystem entgeht (Tindle 2002).

1.2.4 Low-risk HPV vs. high-risk HPV

HR-HPV E7 binden pRb mit einer viel höheren Affinität als LR-HPV-Proteine (Gage 1990). HR-HPV E6-Proteine führen im Gegensatz zu den LR-HPV E6-Proteine zu einem Abbau von p53 (Thomas 2005). Nur die HR-HPV-E6 Proteine aktivieren die Telomerase (Klingelhutz 1996). Die LR-HPV E6 Proteine führen nicht zu Genominstabilität (Duensing 2000).

1.2.5 Die Rolle der viralen Integration

Die HPV-Infektion ist sehr verbreitet, jedoch führt nur ein kleiner Prozentansatz der Infektionen zu einer Präneoplasie oder einem invasiven Karzinom, und das erst mehrere Monate bis Jahre nach der Erstinfektion.

Am Anfang der HPV-Infektion liegt das HPV-Genom in Form extrachromosomaler Kopien vor. Mit der Zeit kann die virale DNA in die DNA der Wirtszelle integriert werden. Dieses Phänomen korreliert mit dem Übergang einer leichtgradigen in eine schwergradige dysplastische Läsion (Hopmann 2004). Die HPV-Integration ist mit Genominstabilität, Therapieresistenz und schlechter Prognose assoziiert (Lazo 1999, Hopmann 2004). 40-60% der HPV-Integrationen finden innerhalb oder sehr nah zu den sog. CFSs (common fragile sites) der DNA statt. Die CFSs sind häufige Stellen von Translokationen, Deletionen und Genamplifikationen (Thorland 2003, Wentzensen 2004, Yu 2005).

Die HPV-Integration hat Konsequenzen sowohl für das virale, als auch für das Wirtszell-Genom. Die Integration führt zu einer erweiterten Expression der E6- und E7-Gene, die während des Integrationsvorgangs immer erhalten bleiben. Nach der Integration kommt es nämlich zu einem Verlust des E2-Gens, das physiologischerweise für die Transkriptionsregulation der E6- und E7-Gene zuständig ist. Nach der Integration wird dadurch die E2-bedingte down-Regulation der Transkription von E6 und E7 aufgehoben und die zwei Onkoproteine werden überexprimiert (Lazo 1999). Die Integration von HR-HPV-Genom ist mit chromosomaler Instabilität assoziiert. Die Expression von E6 und E7 führt vor allem zu Chromosombrüchen und abnormaler Zentrosomenanzahl. Die Instabilität des Wirtszelle-Genoms ist der erste Schritt des Vorgangs, der zur HPV-assoziierten Malignität führt (Hashida 1991).

1.2.6 HPV und Angiogenese

Das einem Tumor angrenzende Endothel wird zur Neoangiogenese aktiviert, wenn die Menge der vom Tumor produzierten Angiogeneseinduktoren höher als die Menge der Angiogeneseinhibitoren ist (Bouck 1996). Im Fall des Zervixkarzinoms zeigt sich eine progrediente Änderung des Verhältnisses der Angiogeneseinduktoren zu Angiogeneseinhibitoren zugunsten der ersten, während sich die Zervixläsion von einer leichtgradigen Dysplasie zu einem invasiven Zervixkarzinom entwickelt (vascular endothelial growth factor VEGF und Thrombospondin-1) (Guidi 1995, Dobbs 1997, Kodama 2001). Es hat sich gezeigt, dass die Expression der HR-HPV E6 und E7-Genprodukte in der Wirtszelle in der Lage ist, einen angiogenetischen Prozess im Gewebe auszulösen (Toussaint-Smith 2004).

1.2.7 Nicht-virale Kofaktoren

Die meisten Frauen werden nach einer HR-HPV-Infektion keine dysplastische Zervixläsionen entwickeln. Risikofaktoren für die Entwicklung einer Zervixdysplasie nach HPV-Infektion sind:

1. Rauchen. Inhalierete karzinogene Substanzen erreichen über die Blutbahn das Epithel des unteren Genitaltraktes und werden dort angelagert. Zusätzlich bewirkt Rauchen eine Schwächung der humoralen Immunabwehr (Carter 1993, Prokopczyk 1997).
2. Pille. Die Verwendung von OC für über 5 Jahre erhöht das Risiko für die Entwicklung eines Zervixkarzinoms (Franco 2003, Smith 2003, Castle 2004).
3. Multiparität (Schiffman 1995)
4. Ko-Infektion mit Herpes simplex Virus (HSV) (Aurelian 1984).
5. Infektion mit Chlamydia trachomatis in der Anamnese.
6. Immunsuppression. HIV-positive Frauen haben ein ca. 7x bzw. 5x höheres Risiko, eine persistierende HPV-Infektion und eine HPV-assoziierte intraepitheliale Neoplasie zu entwickeln (Williams 1994). Bei diesen Patientinnen kommt häufiger auch eine multizentrische (Vulva, Vagina, Zervix, Anus) Manifestation von HPV-Infektionen vor.

1.2.8 HPV Nachweisverfahren

Die Kenntnis des HPV-Status bei Feststellung von atypischen Zellen im Zervixabstrich und im Rahmen des Zervixkarzinom-Screenings nimmt an Bedeutung zu. Die HPV-Typisierung hat einen großen prognostischen und therapeutischen Wert, da dadurch eine Differenzierung zwischen LR-HPV und HR-HPV ermöglicht wird, sowie die Feststellung des Virustypus. Nach Identifizierung von HR-HPV Typen können die Hochrisikopatientinnen klinisch intensiv beobachtet werden, v.a. wenn sie HPV- 16/18 infiziert sind (s.u.).

Der Hybrid Capture II Test (HCII) ist ein signalamplifizierendes Hybridisierungsassay. Der Test kann die zwei HPV-Gruppen (LR-HPV und HR-HPV) unterscheiden. Die Sonde A identifiziert die LR-HPV Typen 6, 11, 42, 43, 44, und die Sonde B die HR-HPV Typen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 und 68. Die Sensitivität ist mit einer Nachweisgrenze von 1pg DNA (entspricht ca. 5000 Viruskopien) sehr hoch. Der HCII fällt bei 4-5% der Fälle falsch negativ aus. Dieser Test ist weitverbreitet, ermöglicht aber nicht die HPV-Typisierung, sowie die Identifizierung von einigen selten vorkommenden HPV-Typen. Ein spezifischer Virustypisierungstest der Firma Qiagen ist inzwischen auf dem Markt.

Im Gegensatz zum HCII-assay, sind die PCR-basierten Testsysteme in der Lage, spezifische HPV-Typen zu identifizieren. Typ-spezifische, PCR- und DNA-sequencing basierende HPV-Tests sind von verschiedenen Firmen auf dem Markt (Amphicor assay-Roche Diagnostics, INNO-LiPA HPV Genotyping kit-Immunogenetics Inc) (Speich 2004).

1.2.9 HPV Impfung

Für die Herstellung der prophylaktischen Impfstoffe werden virusähnliche Partikel aus dem primären Strukturprotein L1 hergestellt, die in der Lage sind, die Synthese virusspezifischer Antikörper hervorzurufen. Der quadrivalente Impfstoff Gardasil® (gegen HPV 6, 11, 16 und 18) wurde in 2006 und der bivalente Impfstoff Cervarix® (gegen HPV 16 und 18) in 2007 in Europa zugelassen. Beide Impfstoffe schützen gegen die HR-HPV 16 und 18, die in ca. 70% der HR-HPV Infektionen vorkommen und in unserer Studie in 92,5% der HR-HPV positiven Tumore der vorderen Kommissur und 95,7% der HR-HPV positiven Tumore anderer Lokalisationen nachgewiesen wurden. Gardasil® bietet zusätzlich Schutz gegen die LR-HPV 6 und 11, die für die Mehrheit der Genitalwarzen verantwortlich sind. Bei Frauen, die bei Beginn und am Zeitpunkt der 3. Einzelimpfung für HPV 6, 11, 16 und 18 negativ waren, wies die Impfung mit Gardasil® hinsichtlich der

Prävention der mit diesen HPV-Typen assoziierten Vulvaerkrankungen eine Effektivität von 100% in einem Beobachtungszeitraum von 3 Jahren auf. Unter Berücksichtigung der Frauen mit schon vorliegender HPV-Infektion vor der Impfung, kann der o.g. Impfstoff das Auftreten von vulvovaginalen und perianalen HPV-assoziierten Erkrankungen um 34% senken (Garland 2007). Da auch bei den geimpften Frauen das Risiko einer HPV-assoziierten Erkrankung weiterhin besteht (HPV-Infektion durch einen anderen HPV-Typ oder schon existierende HPV-Infektion vor der Impfung), sind auch nach stattgehabter Impfung die vorgesehenen klinischen und Vorsorgeuntersuchungen nach wie vor notwendig. Die genaue Impfschutzdauer ist noch nicht bekannt und die Durchführung einer Auffrischungsimpfung 5 Jahre nach der 3. Einzelimpfung könnte erforderlich sein. In Deutschland wird die HPV-Impfung von der Ständigen Impfkommission (STIKO) am Robert Koch Institut für Mädchen und junge Frauen im Alter von 12 bis 17 Jahren empfohlen.

1.2.10 p53

Das p53-Gen ist das bekannteste und am besten erforschte Tumorsuppressorgen. Das p53-Protein aktiviert weitere Gene mit der Folge, dass der Zellzyklus in der G₁/S-Phase arretiert wird. Das p53-Gen ist somit ein wichtiger Baustein der Tumorsuppression.

Schädigungen der DNA während der G₁-Phase führen zu einem unmittelbaren Stopp des Zellzyklus. Dieser Effekt wird im Wesentlichen durch das p53-Protein vermittelt, welches innerhalb von 30 Minuten nach DNA-Schädigungen in erhöhter Konzentration vorliegt (Kastan 1991). Ein einzelner DNA-Doppelstrangbruch ist schon ausreichend, um diese Reaktion auszulösen.

Aus dem p53-induzierten Anhalten des Zellzyklus in der G₁-Phase ergibt sich für die Zelle ein lebensnotwendiger Vorteil: Durch vorübergehendes Verbleiben in der G₁-Phase bis zur Beseitigung der DNA-Schädigung durch zelluläre DNA-Reparaturmechanismen wird die Replikation von mutierter DNA verhindert, die ansonsten zur irreparablen Festschreibung vererbbarer Mutationen führen würde. Sobald die Reparatur der DNA-Schädigung abgeschlossen ist, fällt der p53-Spiegel auf das Ausgangsniveau zurück und die Zelle tritt wieder in den weiteren Zellzyklus ein (Kastan 1991).

Bei schweren DNA-Schädigungen, für deren Beheben die zellulären DNA-Reparaturmechanismen nicht ausreichend sind, ist das Absterben der Zelle als Schutzmechanismus vorprogrammiert (Apoptose-programmierter Zelltod). Das p53-Protein hat eine zentrale Bedeutung für die Auslösung der Apoptose. Damit ist p53 der

maßgebliche Faktor, der die Entscheidung zwischen vorübergehendem Anhalten des Zellzyklus für lebenserhaltende Maßnahmen der Zelle oder der Einleitung des programmierten Zelltodes trifft.

Durch p53 kommt es infolge eingetretener DNA-Schädigungen zu einem Zellzyklusarrest, worauf sich die Bezeichnung des p53-Proteins als „guardian of the genome“ beruht (Lane 1992). Im Falle einer Beeinträchtigung oder Ausschaltung dieser Funktion, teilen sich Zellen mit nicht reparierten DNA-Schäden ungehindert, replizieren ihr Genom und können somit die Mutation an die Tochterzellen weitergeben.

Der Zellzyklusregulator p53 ist in über 50% aller Karzinome mutiert. p53-Mutationen wurden in 30% der Mammakarzinome und 55% der Ovarialkarzinome nachgewiesen (Bauknecht 1994). Das Zervixkarzinom stellt eine Ausnahme dar. 95% der Zervixkarzinome zeigen keine alterierte Expression des p53-Gens (zur Hausen 2000). Durch die Interaktion des viralen E6-Gens, vermittelt über das E6-assoziierte Protein (E6-AP), kommt es jedoch zu einer funktionellen Ausschaltung des p53-Gens.

Im Falle des Vulvakarzinoms, kann eine Interaktion mit dem HPV E6-Onkoprotein, oder eine p53-Mutation ohne stattgehabte HPV-Infektion zur p53-Deaktivierung führen (Engelmann 2003). Eine p53-Überexpression wird in 50-88% der Vulvakarzinome berichtet (Lee 1994, Pilotti 1995, Kagie 1997, Engelmann 2003). Eine Metaanalyse von 10 Studien zeigt, dass eine p53-Überexpression häufiger bei HPV-negativen als bei HPV-positiven Vulvakarzinomen vorkommt (58% vs. 33%) (Rosenthal 2003). Die p53-Überexpression wird mit dem Schweregrad der intraepithelialen Neoplasie höher, sodass die p53-Überexpression als ein Index der Proliferation abnormaler Zellen dargestellt werden kann. Dementsprechend könnte p53 als Progressionsmarker für intraepitheliale neoplastische Läsionen nützlich sein und als ein Marker verwendet werden, um Patientinnen zu identifizieren, die ein erhöhtes Risiko für die Entstehung eines Vulvakarzinoms auf dem Boden einer VIN haben (Engelmann 2003, Rosenthal 2003).

1.2.11 p16^{INK4a} (inhibitor of kinase 4)

Das p16^{INK4a}-Protein spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation des normalen Zellzyklus. Es ist Teil der Signalkaskade, die nach Abschluss der Zelldifferenzierung weitere Zellteilungen verhindert.

Nach onkogener Transformation von Zervixzellen, hervorgerufen durch HR-HPV, kommt es aufgrund der Deregulation des Zellzyklus zu einer deutlich messbaren Überexpression von p16^{INK4a}.

Im Normalzustand wird der Transkriptionsfaktor E2F durch das Retinoblastomprotein (pRb) gebunden. Das führt zu einer Hemmung der Transkription von Genen, die die Zellproliferation fördern, sowie der Transkription des p16^{INK4a}-Gens. Eine persistierende HR-HPV Infektion kann zu einer Störung des funktionellen Proteinkomplexes pRb-E2F führen. Das virale Onkoprotein E7 ist in der Lage, sich mit dem pRb zu verbinden, was zu einer Freisetzung von E2F führt. Durch den E7-pRb-Komplex wird die Blockade der p16-Gene aufgehoben und es kommt zu einer Überexpression von p16^{INK4a}. Im Falle einer Freisetzung des E2F aus dem E2F-pRb-Komplex, kommt es zur Aufhebung der Blockade der Transkription des p16^{INK4a}-Gens und ein funktionelles p16^{INK4a}-Protein wird in der Zelle gebildet.

Bei einer durch E7 induzierten onkogenen Transformation der Zelle, kommt es unabhängig vom HR-HPV Typ zu einer Überexpression vom p16^{INK4a}-Protein. Der Wirkungsmechanismus des viralen E7-Onkoproteins ist bezüglich der Blockierung von pRb und Überexpression von p16^{INK4a} bei allen HR-HPV gleich. Die Überexpression von p16^{INK4a} ist somit ein Marker für eine onkogene Aktivität aller HR-HPV. Durch den Nachweis von p16^{INK4a} werden diejenigen Fälle entdeckt, bei denen eine virale, HPV-induzierte onkogene Aktivität vorliegt. p16^{INK4a} ist ein molekularbiologischer Indikator für das Zervixkarzinom und seiner Vorstufen (Wang 2004, Dehn 2007, Bergeron 2010, Galgano 2010).

In einer holländischen Studie (Van der Avoort 2005) zeigten 75% der Vulvakarzinome keine, 6% eine leichte und 19% eine starke p16^{INK4a}-Expression. Es wurde keine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem Differenzierungsgrad der Karzinome und der p16^{INK4a}-Expression nachgewiesen.

1.3 Klinik

1.3.1 Condylomata acuminata

Die häufigste, durch HPV induzierte gutartige Erkrankung sind Feigwarzen. Die Prävalenz der Condylomata acuminata (Genitalwarzen) beträgt ca. 10%. Wie die überwiegende Anzahl aller HPV-Infektionen, werden Kondylome fast immer entweder durch Geschlechtsverkehr oder durch Hautkontakt im Bereich der Genitalorgane übertragen. Die Möglichkeit der Übertragung durch Hautkontakt ohne stattgehabte Penetration erklärt auch das Vorkommen von genitalen Kondylomen bei Jungfrauen (Winer 2003). Die Inkubationszeit dauert durchschnittlich 3 Monate (von 3 Wochen bis 18 Monate). Orale und laryngeale Kondylome können sowohl bei Erwachsenen (nach oralem

Verkehr) als auch bei 2-5jährigen Kindern (Übertragung während der Geburt bei ausgeprägtem Kondylomenbefall des mütterlichen Genitaltraktes) vorkommen (Sinclair 2005).

Anogenitale Warzen werden in 90% der Fälle von den LR-HPV 6 und (seltener) 11 verursacht. Im Fall der HPV 6 und 11 findet eine Integration des viralen Genoms in das Genom der Wirtszelle fast nie statt, sodass die Karzinogenese auf dem Boden HPV 6/11-positiven Kondylomen ein sehr seltenes Phänomen ist. Bei Menschen ohne beeinträchtigt Immunsystem haben Genitalwarzen, wenn überhaupt, ein sehr niedriges Entartungsrisiko. Bei immunsupprimierten Menschen zeigt sich ebenfalls kein erhöhtes Risiko für eine maligne Transformation der Genitalwarzen, obwohl in diesem Kollektiv die Entstehung anogenitaler Präkanzerosen und Malignomen mit dem Vorhandensein von Genitalwarzen assoziiert ist (Palefsky 2000, Ferenczy 2003). Diese Patienten (AIDS, Z.n. Organtransplantation, Fanconi-Anämie) haben eine Neigung zu gleichzeitigen LR- und HR-HPV- und oft auch multiplen Infektionen. In diesem Kollektiv können Genitalwarzen (als Folge einer LR-HPV-Infektion) simultan mit invasiven Karzinomen vorkommen, die sich ihrerseits auf dem Boden einer prämaligen (als Folge einer HR-HPV-Infektion entstandenen) epithelialen Läsion entwickelt haben (Spence 2005).

Condylomata acuminata sind exophytische, papilläre, blumenkohlartige Läsionen. Sie kommen hauptsächlich in den nicht-behaarten Hautarealen des äußeren Genitale und seltener auf epithelialen Oberflächen (Introitus vaginae, Analkanal, obere Atemwege) vor (Abb. 4, Abb. 5).



Abb. 4: Condylomata acuminata der Vulva

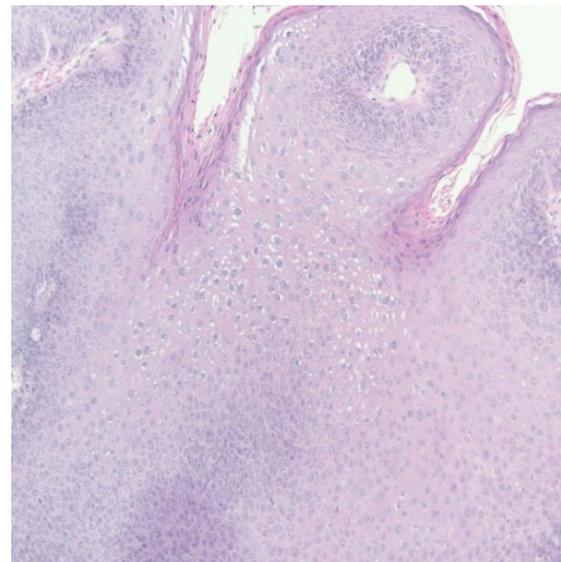


Abb. 5: Histologisches Bild eines Kondyloms mit Koilozyten

Da HPV-Infektionen oft multifokal sind, sind bei ca. 1/3 der Patientinnen mit Genitalwarzen HPV-assoziierte Läsionen im Bereich der Zervix, der Vagina und des meatus urethrae nachweisbar. Bei den zervikalen Läsionen handelt es sich meistens um leichtgradige Dysplasien (CIN 1), während höhergradige Läsionen (CIN 2-3) in ca. 2% der Betroffenen zu finden sind. Dementsprechend ist bei Patientinnen mit Condylomata acuminata die kolposkopische Untersuchung von Vagina und Zervix obligat (Li 2003).

Die prophylaktische Impfung gegen HPV 6/11/16/18 mit Gardasil® hat in der Prävention von HPV 6/11-positiven Genitalwarzen eine 95-99% Erfolgsrate gezeigt (Ferenczy 2007). Die prophylaktische Impfung wirkt über die Produktion von Anti-HPV-Antikörpern. Aktuell wird an der Entwicklung therapeutischer Impfstoffe gearbeitet. Die Induktion der zellulären Immunität inklusiv zytotoxischer Zellen, die für die Zurückbildung der bereits vorhandenen Genitalwarzen erforderlich ist, ist viel schwieriger (Coleman 1994). Die therapeutische Impfung zeigt jedoch in den bisher gelaufenen Studien keine besseren therapeutischen Ergebnisse im Vergleich zu den eingesetzten medikamentösen oder operativen therapeutischen Maßnahmen (Vandepapeliere 2005).

1.3.2 Vulväre intraepitheliale Neoplasie (VIN)

In 1987 wurde von der Committee of Nomenclature of the International Society for the Study of Vulvar Disease (ISSVD) und der Committee on Histological Classification of Vulvar Tumors and Dysmorphies of the International Society of Gynecological Pathologists der Terminus "Vulväre Intraepitheliale Neoplasie – VIN" eingeführt (Colgan 1998). Nach dieser Definition, hat der Begriff der VIN eine Reihe von unübersichtlichen und verwirrenden Termini, wie Leukoplakie, Morbus Bowen, Bowenoide Papulose, Bowenoide Dysplasie, Bowenoide Atypie, Erythroplasie de Queyrat, carcinoma simplex etc. ersetzt.

Bei einer VIN befinden sich die neoplastischen Zellen innerhalb des Plattenepithels. Die Läsion kann sich eventuell spontan zurückbilden, oder persistieren, oder zu einem invasiven Karzinom führen. VIN wurde in drei Grade unterteilt (1-3): VIN 1 (leichte Dysplasie – Läsion im unteren Drittel des Epithels), VIN 2 (mittelschwere Dysplasie – Läsion in der unteren Hälfte des Epithels) und VIN 3 (schwere Dysplasie bis Carcinoma in situ – Läsion in den unteren zwei Dritteln bis zur ganzen Schichtdicke des Epithels) (Report der ISSVD 1990).

Es gibt keine epidemiologischen oder histopathologischen Daten, die den Zusammenhang zwischen VIN 1 und VIN 3 eindeutig machen. Bei VIN 1 handelt es sich um ein flaches Kondylom mit oder ohne Koiliozytose, das frei von nuklearer Aneuploidie

und abnormalen Mitosen ist, die zu den Charakteristika der VIN 2- und VIN 3-Läsionen gehören (Srodon 2006). Diese Befunde sprechen gegen ein Entwicklungspotential einer VIN 1- zu einer VIN 3-Läsion. Es gibt keine Hinweise, dass VIN 1 eine Krebsvorstufe ist (Sideri 2005). VIN 1 kann höchstens als ein Risikoindikator für die Entwicklung einer VIN 2 oder VIN 3 angesehen werden.

In Anlehnung an den neuesten Daten, hat ISSVD die Abschaffung der Einstufung der VIN in den drei o.g. Graden vorgeschlagen, indem VIN 1 gestrichen und VIN 2 und VIN 3 als VIN zusammengefasst wurden. Histologische Veränderungen, die bis jetzt der VIN 1 zugeordnet wurden, werden als flache Condylomata acuminata bezeichnet (Preti 2000, Sideri 2005). Dementsprechend, gibt es nach dem neuesten Stand zwei VIN-Gruppen:

1. VIN-usual type (VIN-u): zu dieser Gruppe gehören die ehemaligen VIN 2- und VIN 3-Läsionen, inklusive der älteren Termini wie Morbus Bowen, Bowenoide Papulose, Dysplasie, Carcinoma in situ. Die Läsionen dieser Gruppe sind mit HR-HPV assoziiert, insbesondere HPV 16 und können histologisch in kondylomatös, basaloid und gemischt (kondylomatös/basaloid) unterteilt werden.
2. VIN-differentiated type (VIN-d): die Läsionen dieser Gruppe sind generell nicht HPV-assoziiert. Eine Veränderung im p53-Gen spielt eine wichtige Rolle in der Entstehung der VIN-d in Abwesenheit einer HR-HPV-Infektion (Kagie 1997, Yang 2000).

Die Klassifikation der VIN erfolgt ausschliesslich nach morphologischen Kriterien und nicht nach HPV-Status oder klinischem Erscheinungsbild (Yang 2000, Sideri 2005, Scurry 2006). Zu den histologischen Merkmalen der VIN gehören: erhöhte Mitoserate, Dyskeratosen, Kernatypie, Kernvergrößerung, basale Hyperplasie, Hyperchromasie, Akanthosen, Hyper- und Parakeratosen und die Erhaltung der Basalmembran (Abb. 7) (Dillner 2010).

VIN-u kommt als uni- oder multifokale Läsion vor. Klinisch zeigt sie sich als Fleck, Erosion, Plaque, oder papilläre Läsion (Abb. 6). VIN-u befindet sich in der Umgebung von ca. 30% der invasiven kondylomatösen oder basaloiden Plattenepithelkarzinome der Vulva. VIN-u ist die Vorstufe des nicht verhornenden basaloiden und kondylomatösen Plattenepithelkarzinoms der Vulva. In ca. 6-7% entwickelt sich auf dem Boden einer VIN-u ein Vulvakarzinom (Herod 1996, Husseinzadeh 1999, Van Seters 2005, Todd 2005), wobei Rauchen und Immunsuppression wichtige Risikofaktoren sind (Herod 1996, Korn 1996, Ferenczy 2003, Goffin 2006). VIN-u erscheint typischerweise bei jüngeren Frauen (Durchschnittsalter 30 Jahre), die meistens über eine höhere Anzahl von Sexualpartnern berichten. VIN-u ist in ca. 50% der Fälle symptomatisch (Juckreiz, Brennen). Die

Diagnose wird histologisch gestellt und aufgrund des möglichen simultanen Vorhandenseins einer Dysplasie der Vagina und/oder des Zervixbereiches (CIN) ist die Durchführung einer Kolposkopie obligat (Van Seters 2005). Auch die Analregion muss inspiziert werden. Das HPV-Impfstoff Gardasil® zeigt in klinischen Studien eine Effektivität in bis zu 100% bei der Prävention der HPV-assoziierten VIN-u bei jungen Frauen von 15-26 Jahren (Villa 2005, Garland 2007, Joura 2007, Dillner 2010).

VIN-d kommt meistens als ein Ulcus, Plaque oder kondylomatöse Läsion in der Umgebung eines Lichen sclerosus bei älteren Frauen (Durchschnittsalter 70 Jahre) vor und ist mit dem verhornenden Plattenepithelkarzinom der Vulva assoziiert (Yang 2000, Hart 2001, Jones 2001), dessen Pathogenese mit chronischen vulvären Dermatosen, chronischen Wundzuständen (Kratzen) und Lichen sclerosus zusammenhängt (Zur Hausen 1982, Hording 1994, Trimble 1996, Scurry 1999). VIN-d ist die Vorstufe des gut differenzierten, verhornenden Plattenepithelkarzinoms der Vulva.

In mehreren Studien wird über die steigende Anzahl von VIN-Läsionen bei jungen Frauen in den letzten Jahren berichtet. Die Zunahmen sind bis zu 4fach (Sturgeon 1992, Iversen 1998, Losch 1999, Joura 2000, Jones 2001, Judson 2006).



Abb. 6: Multifokale VIN

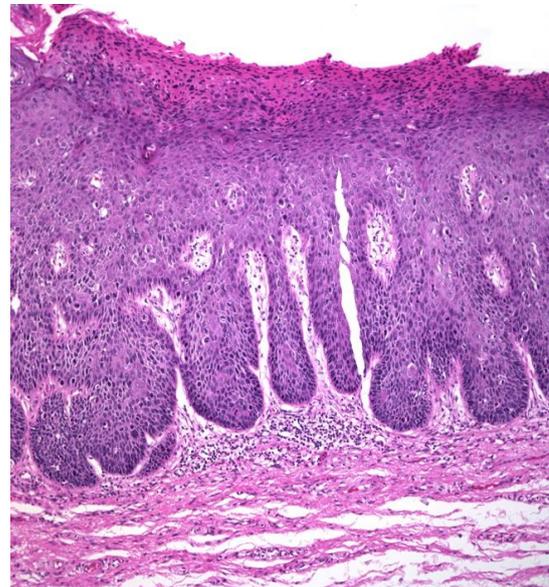


Abb. 7: Histologisches Bild einer VIN-Läsion

1.3.3 Lichen sclerosus

Die meisten Patientinnen mit Lichen sclerosus (LS) befinden sich im 40.-70. Lebensjahr.

Die Ursache des LS ist bisher unbekannt. Verschiedene ätiologische Parameter werden diskutiert und die Pathophysiologie ist multifaktoriell (Meyrick Thomas 1988, Wakelin 1997, Farrell 1999, Powell 1999, Powell 2001).

Das klinische Erscheinungsbild ist vielgestaltig. Die häufigsten klinischen Symptome sind Juckreiz (der sehr ausgeprägt und persistierend sein kann), Schmerzen, Hautirritation, Brennen, Dysurie bis zum Harnverhalt und Dyspareunie. Der persistierende Juckreiz, der das häufigste Symptom des Lichen sclerosus ist, kann durch das ständige Kratzen zu Hautabschürfungen, Fissuren und sekundären Infektionen führen. Der LS kann auch symptomlos sein.

In der klinischen Untersuchung findet sich eine diffuse Leukoplakie im Bereich der Vulva, des Perineums und der perianalen Region und die Haut zeigt einen charakteristischen porzellanweißen Glanz. Seltener kommt es zu einer erythematösen Läsion und Fissuren. Die Progredienz der atrophischen Veränderungen kann bis zur kompletten Zurückbildung der kleinen Labien und der Klitoris führen. Bei fortgeschrittenem Zustand kommt es zu Labiencynechien, Introitusstenose bzw. Introitusverschluss. Ein Befall der Vagina kommt nicht vor. Mit der Zeit kann es zu einer Verdickung des Gewebes kommen (Abb. 8).

Die Diagnose ist klinisch und wird durch Biopsieentnahme und histologische Untersuchung bestätigt. Das histologische Erscheinungsbild zeigt typischerweise eine Atrophie der Epidermis mit Hyperkeratose und hydropischer Degeneration der basalen Schicht. In der Dermis finden sich Ödem, sowie eine Homogenisierung des Kollagens und ein entzündliches Infiltrat aus mononuklearen Zellen (Abb. 9).



Abb. 8: Klinisches Bild eines Lichen sclerosus



Abb. 9: Histologisches Bild eines Lichen sclerosus

Die wichtigsten Differenzialdiagnosen sind Vitiligo, Lichen planus, postmenopausale Atrophie, pemphigus vulgaris, Lichen simplex chronicus und Morbus Paget.

Der Lichen sclerosus kann als chronische entzündliche Dermatose zur Karzinogenese führen und in 4-5% kann sich auf dem Boden eines LS ein Plattenepithelkarzinom der Vulva entwickeln (Scurry 1997). In diesen Fällen wird eine Immundysregulation als Ursache behauptet (Regauer 2002).

Eine lokale Therapie führt zur drastischen Minderung der Beschwerden, eine Heilung ist jedoch trotz mehrerer zur Verfügung stehender Therapiekonzepte nicht zu erwarten. Ein langjähriges follow-up ist erforderlich, da die betroffenen Frauen ein Risiko für die Entwicklung eines Vulvakarzinoms haben.

1.3.4 Klinisches Erscheinungsbild des Vulvakarzinoms

Das Vulvakarzinom zeigt ein langsames Wachstum und aus seinen Vorstufen entwickelt sich ein invasives Karzinom innerhalb einer ca. 8 Jahre-langen Periode (Gotlieb 2003). Ältere Patientinnen kommen häufiger mit fortgeschrittenem klinischem Befund, wobei soziale Hindernisse zu einer Verspätung der Arztvorstellung und der Diagnose führen und diese Tatsache erklären können (Homesley 1995, Canavan 2002, Stehman 2006). Zusätzlich führen ältere Frauen Selbstuntersuchungen der Vulva seltener durch und im Fall eines Lichen sclerosus oder einer chronischen Entzündung sprechen sie den Arzt erst nach durchschnittlich 9 Monaten an (Canavan 2002). Es hat sich auch gezeigt, dass viele Ärzte zu der Verspätung der Diagnosestellung beitragen, indem sie

Medikamente gegen die angegebenen Beschwerden (Juckreiz, Brennen) verschreiben, bevor sie eine Biopsie von dem klinisch suspekten Befund entnehmen bzw. die Patientin in ein Zentrum für gynäkologische Onkologie/Dysplasiezentrum überweisen. Dies führt zu einer Verspätung der Diagnosestellung um ca. 12 Monate (Canavan 2002).

Das durchschnittliche Zeitintervall zwischen Auftreten von Symptomen bis zur Frauenarztvorstellung beträgt ca. 8 Monate.

Die Läsionen können uni- oder bilateral auftreten und können sich als exophytische Tumoren, Ulzerationen oder Flecken manifestieren (Abb. 10). Im Rahmen der Erstvorstellung zeigt sich bei älteren Frauen häufiger ein fortgeschrittener Lokalbefund. Die häufigsten Beschwerden umfassen Juckreiz, Brennen, Dysurie, Blutung oder tastbaren Tumor. Das Plattenepithelkarzinom der Vulva gibt in erster Linie lymphogene Metastasen (inguinale und pelvine Lymphknoten), während die hämatogene Metastasierung ein seltenes Ereignis ist.



Abb. 10: Vulvakarzinom der kleinen Labie (li) auf dem Boden eines Lichen sclerosus

1.3.5 Stadieneinteilung des Vulvakarzinoms

Die Stadieneinteilung des Vulvakarzinoms (TNM und FIGO) wird in den Tabellen 2 und 3 angegeben.

| | |
|-----|---|
| T1 | auf Vulva und Perineum begrenzt |
| T1a | größte Ausdehnung \leq 2cm und Stromainvasion \leq 1mm |
| T1b | größte Ausdehnung $>$ 2cm oder Stromainvasion $>$ 1mm |
| T2 | Infiltration von Vagina (unteres Drittel), Urethra (unteres Drittel), oder Anus |
| T3 | Infiltration der oberen zwei Drittel von Urethra/Vagina, Blasenschleimhaut, Rektumschleimhaut, oder fixiert mit dem Beckenknochen |
| N0 | regionäre (inguinale) Lymphknoten nicht befallen |
| N1a | zwei Lymphknotenmetastasen $<$ 5mm |
| N1b | eine Lymphknotenmetastase beliebiger Größe |
| N2a | drei oder mehr Lymphknotenmetastasen $<$ 5mm |
| N2b | zwei Lymphknotenmetastasen, mindestens eine \geq 5mm |
| N2c | extrakapsuläre Ausbreitung |
| N3 | fixiert/ulzeriert |
| M1 | Fernmetastasen (inkl. pelvine Lymphknoten) |

Tabelle 2: Stadieneinteilung des Vulvakarzinoms TNM (2010)

| | |
|-----------------|--|
| FIGO I | Tumor auf Vulva begrenzt |
| FIGO IA | auf Vulva / Perineum begrenzt, \leq 2cm und Stromainvasion \leq 1mm, negative Lymphknoten |
| FIGO IB | auf Vulva / Perineum begrenzt, $>$ 2cm oder Stromainvasion $>$ 1mm, negative Lymphknoten |
| FIGO II | Infiltration von Vagina (unteres Drittel), Urethra (unteres Drittel), oder Anus |
| FIGO III | regionäre Lymphknotenmetastasen (= inguinale und femorale Lymphknoten) |
| FIGO IIIA | (i) 1 Lymphknotenmetastase \geq 5 mm oder (ii) 1-2 Lymphknotenmetastasen $<$ 5 mm |
| FIGO IIIB | (i) 2 oder mehr Lymphknotenmetastasen \geq 5 mm oder (ii) 3 oder mehr Lymphknotenmetastasen $<$ 5 mm |
| FIGO IIIC | Positive Lymphknoten mit extrakapsulärem Befall |
| FIGO IV | Tumorbefall anderer regionärer Lokalisationen (obere 2/3 Urethra oder Vagina) oder Fernmetastasen |
| FIGO IVA | (i) Befall der oberen Urethra und/oder Mucosa der Vagina, Blase oder Rektum, oder pelvine/ossäre Fixation, oder (ii) fixierte oder ulzerierte inguinofemorale Lymphknoten |
| FIGO IVB | Fernmetastasen (inkl. pelvine Lymphknoten) |

Tabelle 3: Stadieneinteilung des Vulvakarzinoms nach FIGO (Modifikation 2009)

1.3.6 Therapie des Vulvakarzinoms

Die optimale Therapie und die Prognose sind unabhängig vom Tumorstadium bei Diagnose. Die Therapiemöglichkeiten umfassen Operation, Radiotherapie und Chemotherapie.

Die radikale Vulvektomie en bloc mit bilateraler inguinofemorale Lymphonodektomie war bis vor ca. 20 Jahren die operative Standardtherapie. Aufgrund der hohen postoperativen Morbidität (Wundheilungsstörungen, Lymphödem, Lymphozelenbildung, Dyspareunie, femorale Hernie, Genitalprolaps, Stressinkontinenz), wurde die o.g. ausgedehnte Operation durch die triple-incision Technik ersetzt. Diese ist mit einer niedrigeren Komplikationsrate ohne Beeinträchtigung des onkologischen Ergebnisses verbunden (Weikel 2005, Woelber 2011). Die operative Therapie des Vulvakarzinoms kann zur Verschlechterung der Lebensqualität mit psychosexuellen Störungen und Minderung der Kohabitationsfrequenz führen (Green 2000, de Hullu 2002).

In frühen Stadien stellt die radikale lokale Exzision mit einem Sicherheitsabstand von 1cm eine sichere Alternative zur radikalen Vulvektomie dar.

Die systematische inguinofemorale Lymphonodektomie ist bei Tumoren mit Invasionstiefe >1mm indiziert. Sie umfasst die Entfernung der oberflächlichen und tiefen Leistenlymphknoten, wobei die Entfernung von mindestens sechs Lymphknoten in jeder Seite empfohlen wird. Inguinale Lymphknotenmetastasen kommen bei 25-30% der Fälle vor und sind der wichtigste Prognosefaktor beim Vulvakarzinom. Bei Patientinnen mit Tumorgöße <4cm und klinisch unauffälligen Leistenlymphknoten kann in erfahrenen Zentren eine Sentinel-Lymphonodektomie durchgeführt werden. Die Detektionsrate bei der Sentinel-Lymphknotendarstellung beträgt 94%-98%, die falsch negative Rate zwischen 3-7% (Hampl 2008, van der Zee 2008, Lindell und Jonsson 2010). Falls eine Mikrometastase oder isolierte Tumorzellen in den Sentinel-Lymphknoten vorkommen, sollte eine komplette inguinofemorale Lymphonodektomie durchgeführt werden. Im Falle eines mikroinvasiven Karzinoms (≤ 2 cm Größe und ≤ 1 mm Invasionstiefe) ist eine Lymphonodektomie nicht indiziert, da die Rezidivrate sehr gering ist und Lymphknotenmetastasen selten (<1%) vorkommen (AGO-Leitlinie Vulvakarzinom 2009). Bei mehr als 3 positiven Leistenlymphknoten sollten die pelvinen Lymphknoten mitentfernt werden.

Eine adjuvante Radiotherapie der Leisten ist indiziert, wenn nach erfolgter bilateraler Leistenlymphonodektomie mehr als zwei Lymphknoten befallen sind bzw. wenn eine Lymphknotenmetastase mit Kapseldurchbruch vorliegt. Eine weitere Indikation stellt das Vorhandensein einer großen (>1cm) Lymphknotenmetastase dar (AGO-Leitlinie

Vulvakarzinom 2009). Das kleine Becken muss bei positiven pelvinen Lymphknoten mitbestrahlt werden.

Eine kombinierte Radiochemotherapie kann bei einem sehr ausgedehnten Lokalbefund oder bei inoperablen multimorbiden Frauen appliziert werden, oder als neoadjuvante Therapie eingesetzt werden, um eine Tumorzellenreduktion zu erreichen (z.B. bei Analbefall). Die Indikation zu einer neoadjuvanten Radiochemotherapie soll sehr vorsichtig gestellt werden, da sie zu einer hohen Rate an OP-Komplikationen führt. Als Chemotherapieschemata werden Cisplatin/5-Fluoruracil oder Mitomycin C/5-Fluoruracil eingesetzt (Tans 2010).

Die alleinige Chemotherapie ist eine therapeutische Möglichkeit bei Patientinnen mit metastasiertem Vulvakarzinom, für die eine Re-Operation keine Therapieoption mehr darstellt. Zu den eingesetzten Chemotherapieschemata gehören Cisplatin/Vinorelbin oder Bleomycin/Methotrexat/Lomustine (Cormio 2009). Die Ansprechraten sind äußerst gering, deshalb ist die Indikation sehr kritisch zu sehen.

1.3.7 Prognose

Die Prognose ist mit dem inguinalen Lymphknotenstatus am engsten assoziiert, dies ist der wichtigste Prognosefaktor (Lindell und Jonsson 2010, Lindell und Näsmann 2010). Weitere Prognosefaktoren für das Überleben und das Rezidivrisiko sind Tumorzellengröße, Grading, klinisches FIGO-Stadium und Tumorzellenfreiheit der Resektionsränder nach erfolgter Operation. Der HPV-Status des Tumors wird in den letzten Jahren als Prognosefaktor beim Vulvakarzinom angesehen und ist mit einer höheren Überlebensrate assoziiert (Lindell und Näsmann 2010). Der HPV-Status und das Alter bei Erstdiagnose hatten in früheren Arbeiten bisher keine Relevanz für das Rezidivrisiko gezeigt (Messing 1995). 80% der Rezidive (meistens Lokalrezidive) treten während der ersten zwei Jahre auf.

Bei FIGO-Stadium I zeigt sich eine 5J- Überlebensrate von 78,5%, bei Stadium II 63%, bei Stadium III 41% und bei FIGO-Stadium IV von 13% (Beller 2006).

1.3.8 Aktuelle epidemiologische Aspekte des Vulvakarzinoms

In der Universitätsfrauenklinik Düsseldorf zeigte sich innerhalb der letzten 30 Jahren eine Verdoppelung der Anzahl der Patientinnen mit Vulvakarzinom, wobei sich eine 4-fache Erhöhung der Anzahl der jungen Patientinnen (+372%) beobachtet wurde. Der Anstieg der Vulvakarzinome von 1980 bis 2007 lag bei 192%, dies bei gleichzeitiger

Abnahme des Durchschnittsalters der Patientinnen. Das Durchschnittsalter im Zeitraum 1980-1989 lag bei 65,6 Jahren, im Zeitraum 1989-1998 bei 63,9 Jahren, und im Zeitraum 1998-2007 bei 57,0 Jahren (Diagramm 1). D.h., das Durchschnittsalter der Patientinnen sank um ca. 9 Jahre, und die Anzahl der unter 50J-alten Frauen, die an Vulvakarzinomen erkrankten, nahm um 372% zu. Die Anzahl der betroffenen jungen (<50J) Frauen stieg über das o.g. Zeitintervall 4fach an (von 11,3% auf 41,2%). 2/3 der untersuchten Patientinnen mit Vulvaerkrankungen unter 50 Jahren waren HPV positiv (Hampl 2008).

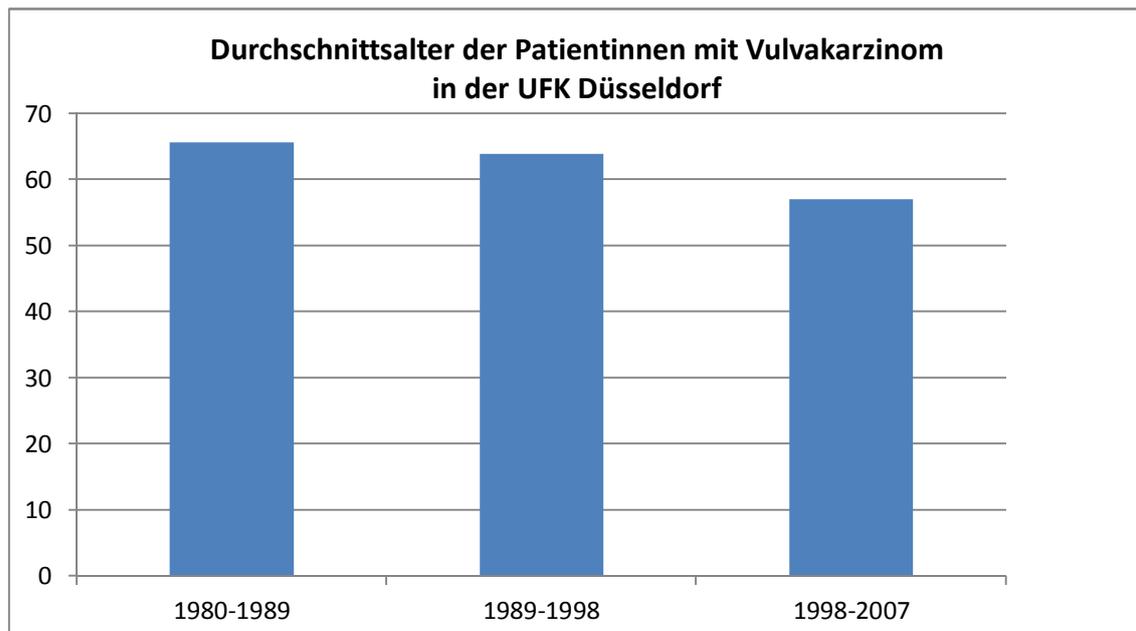


Diagramm 1: Durchschnittsalter der Patientinnen mit Vulvakarzinom in der UFK Düsseldorf im Zeitintervall 1980-2007

Es zeigte sich sehr häufig eine Tumorlokalisation in der vorderen Kommissur zwischen Klitoris und Urethra, im Gegensatz zu der bislang typischen Tumorlokalisation in den Labien (Hampl 2008). Zwischen 1998 und 2007 waren nämlich 38,4% aller erstdiagnostizierter Vulvakarzinome in der Region zwischen Klitoris und Urethra lokalisiert. Die o.g. Lokalisation zeigten zwischen 1980-1989 18,9% und zwischen 1989-1998 20,2% der Tumore (Diagramm 2). Entsprechende Befunde wurden ebenso von mehreren Kollegen in anderen Dysplasiezentren beobachtet (Hampl 2006).

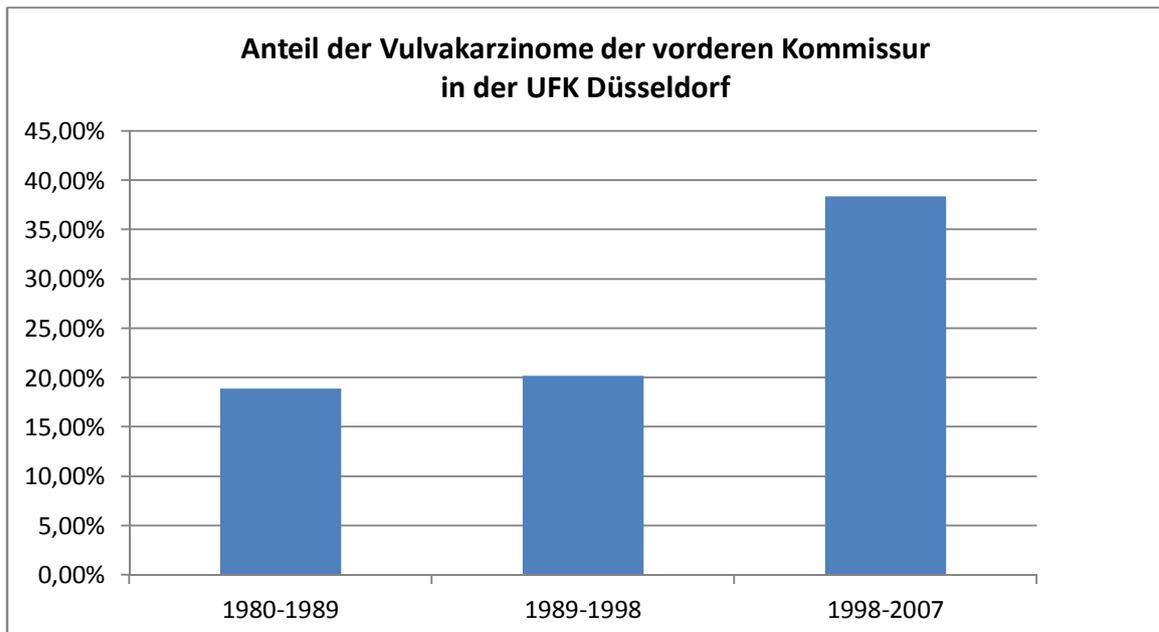


Diagramm 2: Anteil der Vulvakarzinome der vorderen Kommissur in der UFK Düsseldorf im Zeitintervall 1980-2007.

Das Epithel zwischen Klitoris und Urethra ist ein nicht verhornendes Plattenepithel. Im Gegensatz dazu weist die Haut der großen Labien ein verhornendes Plattenepithel auf. Das nicht verhornende Epithel zwischen Klitoris und Urethra ist ungeschützt gegen Infektionen, analog zur Transformationszone der Zervix, und könnte eventuell empfindlicher für kleine Risse und Läsionen sein, die die HPV-Infektion (und ggf. die Tumorgenese im Falle einer Virus-DNA-Integration) erleichtern (zur Hausen 2002). Dementsprechend, könnte sich diese Lokalisationsänderung unter jungen Frauen durch die steigende Anzahl der HR-HPV-Infektionen in dieser Altersgruppe erklären lassen. Eine mögliche Erklärung könnte die frühere Aufnahme des Geschlechtsverkehrs bei jungen Frauen sein, der nach erfolgter HPV-Infektion zu dysplastischen Läsionen und anschliessend zu einem invasiven Karzinom in dieser Stelle führen kann. Bisher gibt es keine Daten bezüglich des Zeitintervalls zwischen dem Zeitpunkt der HPV-Infektion und der Entwicklung von VIN oder einem invasiven Karzinom an der Vulva.

**1.3.9 Patientinnen mit Vulvakarzinom der vorderen Kommissur in der UFK
Düsseldorf**



Abb. 11: 53j. Patientin, pT1b pN0



Abb. 12: 51j. Patientin, pT1b pN0



Abb. 13: 27j. Patientin, pT1b pN1



Abb. 14: 53j. Patientin, pT1b pN0

1.3.10 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Nach diesen klinischen Beobachtungen hat sich der Verdacht entwickelt, dass diese Vulvakarzinome der vorderen Kommissur zwischen Klitoris und Urethra bei jüngeren Frauen einer neuen, 3. Tumorentität des Vulvakarzinoms entsprechen könnten. Die onkogenetischen Entstehungsmechanismen dieser Tumore sind bisher unklar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des klinischen und molekularbiologischen Profils dieser Vulvakarzinome. Im Rahmen einer multizentrischen Studie haben wir die klinischen und molekularpathologischen Merkmale von Vulvakarzinomen mit Lokalisation zwischen Klitoris und Urethra untersucht. Die Tumore wurden auf HPV-DNA und p16^{INK4a}-Expression untersucht, sodass die HPV-induzierte Karzinome identifiziert werden konnten. Um die p53 Mutation-assoziierten Karzinome zu erfassen, wurden die Tumore auf das Vorliegen einer p53-Überexpression geprüft.

In den vergangenen Jahren haben vereinzelte Studien auf eine fragliche Beteiligung des Herpes simplex Virus (HSV) und des Epstein-Barr Virus (EBV) an der Pathogenese des Vulvakarzinoms im Sinne von Kofaktoren hingewiesen (Kaufman 1988, Sherman 1991, Cheung 1993). Da die Vulvakarzinome der vorderen Kommissur oft das klinische Erscheinungsbild einer Herpesvirusinfektion imitieren und der Epstein-Barr Virus mit Onkogenese assoziiert ist, wurden zusätzlich die HSV- und EBV-Prävalenzen mituntersucht.

2. Materialien und Methoden

2.1 Patientinnenkollektiv

Im Rahmen der Studie wurden 135 Tumore von Patientinnen untersucht, die im Zeitintervall 2003-2009 bei Vulvakarzinom der vorderen Kommissur zwischen Klitoris und Urethra in 8 deutschen gynäkologischen Kliniken behandelt wurden (Frauenklinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Frauenklinik des Lukaskrankenhauses Neuss, Klinik für Gynäkologie und gynäkologische Onkologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, Frauenklinik des Universitätsklinikums Kiel, Klinik für Gynäkologie der Charité Berlin, Frauenklinik der Albert-Ludwigs Universität Freiburg, Frauenklinik des Klinikums der Stadt Wolfsburg, Frauenklinik des Klinikums der Stadt Ludwigshafen).

52 Vulvakarzinome anderer Lokalisationen (labia majora, labia minora, Perineum) von der Frauenklinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und der Frauenklinik des Lukaskrankenhauses Neuss dienten als Kontrolltumore.

Die klinischen Daten der Patientinnen und die histopathologischen Merkmale der diagnostizierten Vulvakarzinome wurden von den Krankenakten der beteiligten Kliniken entnommen: Alter bei Erstdiagnose, Parität, Menopausenstatus, Nikotinabusus, Immunsuppression, Pille-/Hormoneinnahme in der Anamnese, CIN/Zervixkarzinom bzw. VIN oder Kondylome in der Anamnese, klinisches Erscheinungsbild des Vulvakarzinoms, histologische Merkmale des Tumors und Tumorstadium, VIN oder Lichen sclerosus in der Umgebung des Tumors, Pap- und HPV-Zervix-Abstrichbefund, führendes Symptom.

Die formalinfixierten Paraffin-eingebetteten Tumorgewebsproben für den HPV-, HSV- und EBV-DNA Nachweis, sowie für den Nachweis der p53-, p16^{INK4a}- und Ki-67-Expression wurden von den jeweiligen pathologischen Instituten zur Verfügung gestellt. Die Untersuchung und Evaluation der 52 Kontrolltumore erfolgte separat.

Ein genehmigter Ethikantrag der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf lag vor (Studennummer 2215, Aug 2003, Amendement von Dez 2006).

2.2 DNA-Extraktion vom Tumorgewebe und HPV DNA-Nachweis

Die DNA-Extraktion erfolgte von formalinfixiertem, Paraffin-eingebettetem Gewebe unter Verwendung des WaxFree kit (TrimGen, Sparks, MA, USA). Ein auf der Luminex-Technik basierender multiplex-Test (Multimetrix, Regensburg, Deutschland) wurde für

den Nachweis und die Typisierung von HPV verwendet. Dieser Test ermöglicht den Nachweis und die Typisierung von 15 verschiedenen HR-HPV Typen (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82), 6 LR-HPV Typen (6, 11, 42, 43, 44, 70), sowie von den Typen 26, 53 und 66. Zur Sicherung der DNA-Integrität wurden in der PCR die Primer für die Amplifikation des HPV L1-Gens und β -Globin verwendet. Bei Proben mit negativer β -Globin Amplifikation wurde die DNA-Extraktion von zusätzlichen Tumorschnitten wiederholt, um die DNA-Menge zu erhöhen.

2.3 HSV- und EBV-Nachweis

Eine real-time PCR wurde für den HSV- und EBV-DNA-Nachweis durchgeführt. Es wurde ein ABI 7900 sequence Detektionssystem unter Verwendung des Taq Man Gen Ex Master Mix Kit (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) mit spezifischen Primern und Proben für die HSV (1/2) UL52 und EBV BNRF1 Genregion eingesetzt. Die verwendeten HSV (1/2) UL52 Primersequenzen waren (forward) 5'-AGG AGC CCG TCC CCT TTC-3' und (reverse) 5'-GCC CCG CGC CTA AAG T-3'. Die eingesetzte HSV UL52 Probe war 5'-VIC- CGG CTC CAC GAG GCC CTG -TAMRA 3'. Die benutzten EBV BNRF1 Primersequenzen waren (forward) 5'-CCA GTG CTG TGA TCG AGC ATC-3' und (reverse) 5'-CTG CTG ACA AAC TGC TGC ATT C-3' und die verwendete Probe war 5'-VIC-TCT GCT GTT GTT TCT GTC TCA CCT ACC GG-TAMRA 3'.

2.4 p16^{INK4a} und Ki-67 Expression-Immunhistochemie

Für die immunhistochemische Doppelfärbung von p16^{INK4a} und Ki-67 wurden 2 μ m Schnitte angefertigt und das CINtec PLUS Kit (mtm Laboratories, Heidelberg, Deutschland) eingesetzt. Die Färbung beruht auf zwei monoklonalen Antikörpern, die gegen humanen p16 (Klon E6H4) und Ki-67 gerichtet sind. Die p16^{INK4a}-Expression wurde durch eine braune 3,3'-Diaminobenzidinreaktion und die Ki-67-Expression durch eine rote FastRed-Reaktion visualisiert.

Die Schnitte wurden entweder ausschließlich nach p16^{INK4a}-Expression, oder ausschließlich nach Ki-67-Expression oder nach Expression beider Proteine untersucht. Die Klassifikation der Schnitte erfolgte wie aufgelistet:

1. Positiv für eine diffuse p16^{INK4a}-Expression im Tumor, wenn die Tumore eine nukleäre und/oder zytoplasmatische, in den basalen und parabasalen Zellen beginnende kontinuierliche diffuse Färbung aufwiesen (als p16+ bezeichnet).

2. Negativ für eine diffuse p16^{INK4a}-Expression im Tumor. Diese Gruppe beinhaltet Fälle mit fokaler oder sporadischer p16^{INK4a}-Expression oder mit kompletter Abwesenheit einer p16^{INK4a}-Expression im Tumor (als p16- bezeichnet). Eine fokale und sporadische Färbung kann erheblich sein, zeigt jedoch niemals ein kontinuierliches Muster mit Beginn in den basalen und parabasalen Zellschichten. Es hat sich erwiesen, dass diese Färbung mit HPV-assoziiierter Transformation nicht in Verbindung steht (Klaes 2001, Reuschenbach 2012).

Das Ausmaß der Ki-67- Expression in den Tumoren wurde in 4 Gruppen eingestuft, beruhend auf der Prozentanzahl der Epithelzellen mit nukleärer Färbung.

1. <10% der Tumorzellen
2. 10- bis 30% der Tumorzellen
3. 30 bis <70% der Tumorzellen
4. ≥70% der Tumorzellen

Tumore, die mindestens eine Zelle mit Expression beider Proteine beinhaltet haben, wurden als positiv für Koexpression von p16^{INK4a} und Ki-67 bezeichnet.

2.5 Immunhistochemie für p53-Expression und mikroskopische Evaluation

Die p53-Färbung wurde mithilfe eines gegen p53 gerichteten monoklonalen Antikörpers durchgeführt (clone DO-7, Dako, Glostrup, Dänemark). Die p53-Expression der untersuchten Läsionen wurde nach der Prozentanzahl der nuklearen Expression zeigenden Tumorzellen in 3 Gruppen klassifiziert:

1. Negativ bis sehr schwach (<10% der Tumorzellen)
2. Mäßig (10-50% der Tumorzellen)
3. Stark (>50% der Tumorzellen)

2.6 Statistik

Das Alter der Patientinnen wurde als quantitative Größe anhand von Mittelwert und Standardabweichung, Minimum und Maximum sowie den Quartilen beschreibend dargestellt und mittels Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung geprüft. Da keine signifikante Abweichung von einer Normalverteilung nachgewiesen werden konnte, wurden die beiden Tumorgruppen mit dem parametrischen t-Test für unabhängige Stichproben hinsichtlich der Altersverteilung verglichen.

Alle weiteren untersuchten Parameter hatten ordinales und nominales Skalenniveau und wurden anhand von absoluten und prozentualen Häufigkeiten deskriptiv dargestellt. Je zwei Größen dieser Skalierung wurden in Kontingenztafeln gegenübergestellt, so dass mit dem Chi²-Test geprüft werden konnte, ob eine Abhängigkeit bestand. Bei zu kleinen erwarteten Häufigkeiten wurde alternativ der Exakte Test nach Fisher eingesetzt. Bei ordinalem Skalenniveau wurden Assoziationen mittels Chi²-Test auf linearen Trend untersucht. Als Effektstärkemaß wurden Odds Ratios mit 95%-Konfidenzintervall berechnet.

Es wurde stets zweiseitig getestet und ein Signifikanzniveau von 5% zugrunde gelegt. Eine Alpha-Adjustierung für multiples Testen fand nicht statt, die Ergebnisse haben dementsprechend explorativen, beschreibenden Charakter. Für die Durchführung der statistischen Berechnungen wurde IBM SPSS Statistics 20 (SPSS Inc. an IBM Company, Chicago, IL) eingesetzt.

Unbekannte klinische oder histopathologische Daten und ungültige HPV-p16^{INK4a}- oder p53-Ergebnisse wegen ungenügenden Gewebematerials wurden als „unbekannt“ registriert und von den Berechnungen ausgeschlossen.

3. Ergebnisse

In der Tabelle 4 werden die Tumormerkmale und die Patientinnendaten angegeben. In den Tabellen 5 und 6 werden die Tumormerkmale der HPV-positiven und HPV-negativen Karzinome der vorderen Kommissur (Tabelle 5) und der anderen Lokalisationen (Referenztumore) (Tabelle 6) dargestellt. Die Tabellen 7 und 8 geben die Tumormerkmale der HPV-positiven (Tabelle 7) und der HPV-negativen (Tabelle 8) Karzinome beider Lokalisationsgruppen an.

Tabelle 4: Patientinnendaten und Tumormerkmale bei der Gesamtheit der untersuchten Tumore.

| | | Vulva Ca Referenz | Vulva Ca vordere Kommissur | p-Wert | Test | Odds-Ratio [95%-KI] |
|---------------------------------|-----------|----------------------|----------------------------------|------------------|--|------------------------|
| Anzahl der Patienten (n) | | 52 | 135 | | | |
| Alter [Jahre] | MW±SD | 63,1±12,9 | 56,8±16,2 | 0,006 | t-Test | |
| | <50 Jahre | 11 (21,2%) | 50 (37,0%) | | | |
| | ≥50 Jahre | 41 (78,8%) | 85 (63,0%) | | | |
| Tumorstadium | T1a | 5 (9,8%) | 35 (26,7%) | <0,001 | Chi ² -Test auf linearen Trend | |
| | T1b | 14 (27,5%) | 54 (41,2%) | | | |
| | T2 | 25 (49,0%) | 39 (29,8%) | | | |
| | T3 | 7 (13,7%) | 3 (2,3%) | | | |
| | unbekannt | 1 | 4 | | | |
| Nodalstatus | N0 | 31 (63,3%) | 71 (73,2%) | 0,087 | Chi ² -Test auf linearen Trend | |
| | N1 | 11 (22,4%) | 20 (20,6%) | | | |
| | N2 | 6 (12,2%) | 6 (6,2%) | | | |
| | N3 | 1 (2,0%) | 0 (0,0%) | | | |
| | unbekannt | 3 | 38 | | | |
| Fernmetastasierung | M0 | 50 (96,2%) | 119 (98,3%) | 0,380 | Chi ² -Test auf linearen Trend | |
| | M1 | 2 (3,8%) | 2 (1,7%) | | | |
| | unbekannt | 0 | 14 | | | |
| G | G1 | 2 (3,9%) | 9 (7,2%) | 0,320 | Chi ² -Test auf linearen Trend | |
| | G2 | 43 (84,3%) | 87 (69,6%) | | | |
| | G3 | 6 (11,8%) | 29 (23,2%) | | | |
| | unbekannt | 1 | 10 | | | |
| R | R0 | 41 (78,8%) | 124 (96,1%) | <0,001 | Chi ² -Test auf linearen Trend | 6,65 [2,18; 20,28] |
| | R1 | 11 (21,2%) | 5 (3,9%) | | | |
| | unbekannt | 0 | 4 | | | |
| V | V0 | 46 (100,0%) | 118 (98,3%) | 0,380 | Chi ² -Test auf linearen Trend | |
| | V1 | 0 (0,0%) | 2 (1,7%) | | | |
| | unbekannt | 6 | 15 | | | |
| L | L0 | 40 (87,0%) | 110 (93,2%) | 0,199 | Chi ² -Test auf linearen Trend | |
| | L1 | 6 (13,0%) | 8 (6,8%) | | | |
| | unbekannt | 6 | 17 | | | |
| VIN in der Anamnese | nein | 44 (84,6%) | 120 (91,6%) | 0,183 | exakter Fisher-Test | |
| | ja | 8 (15,4%) | 11 (8,4%) | | | |
| | unbekannt | 0 | 4 | | | |
| Kondylome in der Anamnese | nein | 51 (98,1%) | 127 (96,9%) | >0,999 | exakter Fisher-Test | |
| | ja | 1 (1,9%) | 4 (3,1%) | | | |
| | unbekannt | 0 | 4 | | | |

| | | Vulva Ca Referenz | Vulva Ca vordere Kommissur | p-Wert | Test | Odds-Ratio [95%-KI] |
|-----------------------------------|---------------------|----------------------|----------------------------------|--------------|---|------------------------|
| Anzahl der Patienten (n) | | 52 | 135 | | | |
| Immunsuppression | nein | 51 (98,1%) | 118 (95,2%) | 0,675 | exakter Fisher-Test | |
| | ja | 1 (1,9%) | 6 (4,8%) | | | |
| | unbekannt | 0 | 11 | | | |
| Nikotinabusus | nein | 37 (75,5%) | 74 (67,9%) | 0,332 | Chi ² -Test | |
| | ja | 12 (24,5%) | 35 (32,1%) | | | |
| | unbekannt | 3 | 26 | | | |
| CIN/Zervix-Ca in der Anamnese | nein | 50 (96,2%) | 128 (97,7%) | 0,624 | exakter Fisher-Test | |
| | ja | 2 (3,8%) | 3 (2,3%) | | | |
| | unbekannt | 0 | 4 | | | |
| Parität (Anzahl Kinder) | 0 | 8 (15,4%) | 21 (16,0%) | | | |
| | 1 | 14 (26,9%) | 31 (23,7%) | | | |
| | 2 | 18 (34,6%) | 48 (36,6%) | | | |
| | 3 | 6 (11,5%) | 20 (15,3%) | | | |
| | 4 | 3 (5,8%) | 5 (3,8%) | | | |
| | 5 | 1 (1,9%) | 1 (0,8%) | | | |
| | 6 | 0 (0,0%) | 2 (1,5%) | | | |
| | 7 | 2 (3,8%) | 3 (2,3%) | | | |
| unbekannt | 0 | 4 | | | | |
| Parität (Anzahl Kinder) | keine | 8 (15,4%) | 21 (16,0%) | 0,974 | Chi ² -Test auf linearen Trend | |
| | 1-2 | 32 (61,5%) | 79 (60,3%) | | | |
| | 3-7 | 12 (23,1%) | 31 (23,7%) | | | |
| | unbekannt | 0 | 4 | | | |
| Pille | nein | 38 (95,0%) | 76 (73,8%) | 0,005 | exakter Fisher-Test | 6,75 [1,52; 29,90] |
| | ja | 2 (5,0%) | 27 (26,2%) | | | |
| | unbekannt | 12 | 32 | | | |
| Hormone | nein | 38 (92,7%) | 94 (89,5%) | 0,758 | exakter Fisher-Test | |
| | ja | 3 (7,3%) | 11 (10,5%) | | | |
| | unbekannt | 11 | 30 | | | |
| HIV | nein | 41 (100,0%) | 74 (100,0%) | | | |
| | unbekannt | 11 | 61 | | | |
| Menopausenstatus | prä- menopausal | 7 (13,7%) | 48 (36,6%) | 0,002 | exakter Fisher-Test | 6,65 [2,18; 20,28] |
| | post- menopausal | 44 (86,3%) | 83 (63,4%) | | | |
| | unbekannt | 1 | 4 | | | |
| gyn. Malignome in der Anamnese | nein | 47 (90,4%) | 123 (94,6%) | 0,328 | exakter Fisher-Test | |
| | ja | 5 (9,6%) | 7 (5,4%) | | | |
| | unbekannt | 0 | 5 | | | |
| Pap-Abstrich | I + II | 40 (97,6%) | 73 (93,6%) | 0,349 | Chi ² -Test auf linearen Trend | |
| | III, IIIId + IVa | 1 (2,4%) | 5 (6,4%) | | | |
| | unbekannt | 11 | 57 | | | |

| | | Vulva Ca Referenz | Vulva Ca vordere Kommissur | p-Wert | Test | Odds-Ratio [95%-KI] |
|---------------------------------|-------------------------------------|----------------------|----------------------------------|--------------|--|------------------------|
| Anzahl der Patienten (n) | | 52 | 135 | | | |
| Erscheinung | Fleck | 5 (9,6%) | 10 (9,3%) | 0,001 | exakter Fisher- Test | |
| | Ulcus | 9 (17,3%) | 49 (45,8%) | | | |
| | Erhabener Tumor | 38 (73,1%) | 48 (44,9%) | | | |
| | unbekannt | 0 | 28 | | | |
| Kardinalsymptom | keine Beschwerden | 2 (4,2%) | 3 (4,4%) | 0,228 | exakter Fisher- Test | |
| | Schmerzen / Brennen / Dysurie | 15 (31,3%) | 32 (47,1%) | | | |
| | Juckreiz | 5 (10,4%) | 8 (11,8%) | | | |
| | Tumor tastbar | 22 (45,8%) | 24 (35,3%) | | | |
| | Blutung | 4 (8,3%) | 1 (1,5%) | | | |
| | unbekannt | 4 | 67 | | | |
| | | | | | | |
| VIN in der Umgebung | nein | 40 (76,9%) | 59 (53,6%) | 0,006 | exakter Fisher- Test | 2,88 [1,37; 6,08] |
| | ja | 12 (23,1%) | 51 (46,4%) | | | |
| | unbekannt | 0 | 25 | | | |
| Lichen in der Umgebung | nein | 42 (80,8%) | 104 (96,3%) | 0,002 | exakter Fisher- Test | 6,19 [1,84; 20,84] |
| | ja | 10 (19,2%) | 4 (3,7%) | | | |
| | unbekannt | 0 | 27 | | | |
| HPV-Abstrich Zervix | negativ | 6 (75,0%) | 25 (54,3%) | 0,932 | Chi ² -Test auf linearen Trend | |
| | positiv, low risk | 0 (0,0%) | 18 (39,1%) | | | |
| | positiv, high risk | 2 (25,0%) | 3 (6,5%) | | | |
| | unbekannt | 44 | 89 | | | |
| HPV DNA im Tumor | negativ | 27 (51,9%) | 76 (58,0%) | 0,454 | Chi ² -Test | |
| | positiv | 25 (48,1%) | 55 (42,0%) | | | |
| | unbekannt | 0 | 4 | | | |
| p53 | schwach (< 10%) | 30 (63,8%) | 60 (47,6%) | 0,111 | Chi ² -Test auf linearen Trend | |
| | mittel(10-50%) | 3 (6,4%) | 17 (13,5%) | | | |
| | stark(>50%) | 14 (29,8%) | 49 (38,9%) | | | |
| | unbekannt | 5 | 9 | | | |
| p16 ^{INK4a} | negativ | 18 (37,5%) | 56 (44,1%) | 0,663 | exakter Fisher- Test | |
| | fokal | 14 (29,2%) | 30 (23,6%) | | | |
| | diffus | 16 (33,3%) | 41 (32,3%) | | | |
| | unbekannt | 4 | 8 | | | |
| Ki-67 | < 10% | 10 (21,3%) | 23 (18,4%) | 0,741 | Chi ² -Test auf linearen Trend | |
| | 10-30% | 10 (21,3%) | 41 (32,8%) | | | |
| | 30-70% | 18 (38,3%) | 37 (29,6%) | | | |
| | > 70% | 9 (19,1%) | 24 (19,2%) | | | |
| | unbekannt | 5 | 10 | | | |

Tabelle 5: Tumore der vorderen Kommissur: HPV-positive vs. HPV-negative Tumore.

| | | HPV negativ | HPV positiv | p-Wert | Test |
|--------------------------|-----------|-------------|-------------|--------------|--|
| Anzahl der Patienten (n) | | 76 | 55 | | |
| Alter [Jahre] | MW±SD | 57,4±15,5 | 56,0±17,2 | 0,626 | t-Test |
| | <50 Jahre | 28 (36,8%) | 21 (38,2%) | | |
| | ≥50 Jahre | 48 (63,2%) | 34 (61,8%) | | |
| Tumorstadium | T1a | 17 (22,4%) | 18 (32,7%) | 0,008 | Chi ² -Test auf linearen Trend |
| | T1b | 27 (35,5%) | 27 (49,1%) | | |
| | T2 | 29 (38,2%) | 10 (18,2%) | | |
| | T3 | 3 (3,9%) | 0 (0,0%) | | |
| | unbekannt | 76 | 55 | | |
| Nodalstatus | N0 | 45 (76,3%) | 26 (68,4%) | 0,385 | Chi ² -Test auf linearen Trend |
| | N1 | 11 (18,6%) | 9 (23,7%) | | |
| | N2 | 3 (5,1%) | 3 (7,9%) | | |
| | N3 | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | | |
| | unbekannt | 17 | 17 | | |
| Fernmetastasierung | M0 | 69 (98,6%) | 50 (98,0%) | 0,821 | Chi ² -Test auf linearen Trend |
| | M1 | 1 (1,4%) | 1 (2,0%) | | |
| | unbekannt | 6 | 4 | | |
| G | G1 | 7 (9,6%) | 2 (3,8%) | 0,913 | Chi ² -Test auf linearen Trend |
| | G2 | 47 (64,4%) | 40 (76,9%) | | |
| | G3 | 19 (26,0%) | 10 (19,2%) | | |
| | unbekannt | 3 | 3 | | |
| R | R0 | 71 (94,7%) | 53 (98,1%) | 0,314 | Chi ² -Test auf linearen Trend |
| | R1 | 4 (5,3%) | 1 (1,9%) | | |
| | unbekannt | 1 | 1 | | |
| V | V0 | 68 (98,6%) | 50 (98,0%) | 0,829 | Chi ² -Test auf linearen Trend |
| | V1 | 1 (1,4%) | 1 (2,0%) | | |
| | unbekannt | 7 | 4 | | |
| L | L0 | 64 (92,8%) | 46 (93,9%) | 0,812 | Chi ² -Test auf linearen Trend |
| | L1 | 5 (7,2%) | 3 (6,1%) | | |
| | unbekannt | 7 | 6 | | |
| VIN in der Anamnese | nein | 69 (90,8%) | 51 (92,7%) | 0,760 | exakter Fisher-Test |
| | ja | 7 (9,2%) | 4 (7,3%) | | |
| | unbekannt | 0 | 0 | | |

| | | HPV negativ | HPV positiv | p-Wert | Test |
|----------------------------------|-----------|-------------|-------------|--------|--|
| Anzahl der Patienten (n) | | 76 | 55 | | |
| Kondylome in der Anamnese | nein | 74 (97,4%) | 53 (96,4%) | >0,999 | exakter Fisher-Test |
| | ja | 2 (2,6%) | 2 (3,6%) | | |
| | unbekannt | 0 | 0 | | |
| Immunsuppression | nein | 70 (95,9%) | 48 (94,1%) | 0,689 | exakter Fisher-Test |
| | ja | 3 (4,1%) | 3 (5,9%) | | |
| | unbekannt | 3 | 4 | | |
| Nikotinabusus | nein | 43 (68,3%) | 31 (67,4%) | 0,924 | Chi ² -Test |
| | ja | 20 (31,7%) | 15 (32,6%) | | |
| | unbekannt | 13 | 9 | | |
| CIN/Zervix-Ca in der Anamnese | nein | 75 (98,7%) | 53 (96,4%) | 0,572 | exakter Fisher-Test |
| | ja | 1 (1,3%) | 2 (3,6%) | | |
| | unbekannt | 0 | 0 | | |
| Parität (Anzahl Kinder) | 0 | 10 (13,2%) | 11 (20,0%) | | |
| | 1 | 18 (23,7%) | 13 (23,6%) | | |
| | 2 | 26 (34,2%) | 22 (40,0%) | | |
| | 3 | 15 (19,7%) | 5 (9,1%) | | |
| | 4 | 2 (2,6%) | 3 (5,5%) | | |
| | 5 | 0 (0,0%) | 1 (1,8%) | | |
| | 6 | 2 (2,6%) | 0 (0,0%) | | |
| | 7 | 3 (3,9%) | 0 (0,0%) | | |
| | unbekannt | 0 | 0 | | |
| Parität (Anzahl Kinder) | keine | 10 (13,2%) | 11 (20,0%) | 0,073 | Chi ² -Test auf linearen Trend |
| | 1-2 | 44 (57,9%) | 35 (63,6%) | | |
| | 3-7 | 22 (28,9%) | 9 (16,4%) | | |
| | unbekannt | 0 | 0 | | |
| Pille | nein | 42 (73,7%) | 34 (73,9%) | 0,979 | Chi ² -Test |
| | ja | 15 (26,3%) | 12 (26,1%) | | |
| | unbekannt | 19 | 9 | | |

| | | HPV negativ | HPV positiv | p-Wert | Test | Odds-Ratio [95%-KI] |
|-----------------------------------|-------------------------------------|-------------|-------------|--------------|------------------------|------------------------|
| Anzahl der Patienten (n) | | 76 | 55 | | | |
| Hormone | nein | 54 (91,5%) | 40 (87,0%) | 0,529 | exakter Fisher-Test | |
| | ja | 5 (8,5%) | 6 (13,0%) | | | |
| | unbekannt | 17 | 9 | | | |
| HIV | nein | 42 (100,0%) | 32 (100,0%) | | | |
| | unbekannt | 34 | 23 | | | |
| Menopausenstatus | prä- menopausal | 28 (36,8%) | 20 (36,4%) | 0,955 | Chi ² -Test | |
| | post- menopausal | 48 (63,2%) | 35 (63,6%) | | | |
| | unbekannt | 0 | 0 | | | |
| gyn. Malignome in der Anamnese | nein | 70 (93,3%) | 53 (96,4%) | 0,449 | Chi ² -Test | |
| | ja | 5 (6,7%) | 2 (3,6%) | | | |
| | unbekannt | 0 | 0 | | | |
| Erscheinung | Fleck | 6 (9,5%) | 4 (9,1%) | 0,271 | exakter Fisher-Test | |
| | Ulcus | 25 (39,7%) | 24 (54,5%) | | | |
| | Erhabener Tumor | 32 (50,8%) | 16 (36,4%) | | | |
| | unbekannt | 13 | 11 | | | |
| Kardinalsymptom | keine Beschwerden | 1 (2,4%) | 2 (7,7%) | 0,408 | exakter Fisher-Test | |
| | Schmerzen / Brennen / Dysurie | 17 (40,5%) | 15 (57,7%) | | | |
| | Juckreiz | 6 (14,3%) | 2 (7,7%) | | | |
| | Tumor tastbar | 17 (40,5%) | 7 (26,9%) | | | |
| | Blutung | 1 (2,4%) | 0 (0,0%) | | | |
| | unbekannt | 34 | 29 | | | |
| VIN in der Umgebung | nein | 41 (64,1%) | 18 (39,1%) | 0,010 | Chi ² -Test | 2,77 [1,27; 6,06] |
| | ja | 23 (35,9%) | 28 (60,9%) | | | |
| | unbekannt | 12 | 9 | | | |
| Lichen in der Umgebung | nein | 58 (93,5%) | 46 (100,0%) | 0,135 | exakter Fisher-Test | |
| | ja | 4 (6,5%) | 0 (0,0%) | | | |
| | unbekannt | 14 | 9 | | | |

| Anzahl der Patienten (n) | | HPV negativ | HPV positiv | p-Wert | Test | Odds-Ratio [95%-KI] |
|--------------------------|--------------------|-------------|-------------|--------------|--|------------------------|
| p53 | schwach (< 10%) | 29 (38,7%) | 31 (60,8%) | 0,008 | Chi ² -Test auf linearen Trend | |
| | mittel (10-50%) | 10 (13,3%) | 7 (13,7%) | | | |
| | stark (>50%) | 36 (48,0%) | 13 (25,5%) | | | |
| | unbekannt | 1 | 4 | | | |
| p16 ^{INK4a} | negativ | 42 (56,0%) | 14 (26,9%) | 0,001 | Chi ² -Test | |
| | fokal | 18 (24,0%) | 12 (23,1%) | | | |
| | diffus | 15 (20,0%) | 26 (50,0%) | | | |
| | unbekannt | 1 | 3 | | | |
| Ki-67 | < 10% | 16 (21,6%) | 7 (13,7%) | 0,814 | Chi ² -Test auf linearen Trend | |
| | 10-30% | 21 (28,4%) | 20 (39,2%) | | | |
| | 30-70% | 20 (27,0%) | 17 (33,3%) | | | |
| | > 70% | 17 (23,0%) | 7 (13,7%) | | | |
| | unbekannt | 2 | 4 | | | |

| Anzahl der Patienten (n) | | negativ | positiv | Gesamt | p-Wert | Test |
|--------------------------|-----------------------|------------|------------|------------|--------|--|
| Pap-Abstrich | I + II | 38 (48,7%) | 35 (44,9%) | 73 (93,6%) | 0,604 | Chi ² -Test auf linearen Trend |
| | III, IIIId + IVa | 2 (2,6%) | 3 (3,8%) | 5 (6,4%) | | |
| | unbekannt | 36 | 17 | 53 | | |
| HPV-Abstrich Zervix | negativ | 17 (37,0%) | 8 (17,4%) | 25 (54,3%) | 0,206 | Chi ² -Test auf linearen Trend |
| | positiv, low risk | 10 (21,7%) | 8 (17,4%) | 18 (39,1%) | | |
| | positiv, high risk | 1 (2,2%) | 2 (4,3%) | 3 (6,5%) | | |
| | unbekannt | 48 | 37 | 85 | | |

Tabelle 6: Tumore anderer Lokalisationen: HPV-positive vs. HPV-negative Tumore.

| | | HPV negativ | HPV positiv | p-Wert | Test |
|--------------------------|-----------|-------------|-------------|--------|--|
| Anzahl der Patienten (n) | | 27 | 25 | | |
| Alter [Jahre] | MW±SD | 66,3±12,5 | 59,6±12,6 | 0,061 | t-Test |
| | <50 Jahre | 28 (36,8%) | 21 (38,2%) | | |
| | ≥50 Jahre | 48 (63,2%) | 34 (61,8%) | | |
| Tumorstadium | T1a | 2 (7,7%) | 3 (12,0%) | | |
| | T1b | 9 (34,6%) | 5 (20,0%) | | Chi ² -Test auf linearen Trend |
| | T2 | 12 (46,2%) | 13 (52,0%) | 0,657 | |
| | T3 | 3 (11,5%) | 4 (16,0%) | | |
| | unbekannt | 1 | 0 | | |
| Nodalstatus | N0 | 15 (57,7%) | 16 (69,6%) | | |
| | N1 | 7 (26,9%) | 4 (17,4%) | | Chi ² -Test auf linearen Trend |
| | N2 | 3 (11,5%) | 3 (13,0%) | 0,426 | |
| | N3 | 1 (3,8%) | 0 (0,0%) | | |
| | unbekannt | 1 | 2 | | |
| Fernmetastasierung | M0 | 25 (92,6%) | 25 (100,0%) | | Chi ² -Test auf linearen Trend |
| | M1 | 2 (7,4%) | 0 (0,0%) | 0,169 | |
| | unbekannt | 0 | 0 | | |
| G | G1 | 1 (3,8%) | 1 (4,0%) | | |
| | G2 | 21 (80,8%) | 22 (88,0%) | | Chi ² -Test auf linearen Trend |
| | G3 | 4 (15,4%) | 2 (8,0%) | 0,492 | |
| | unbekannt | 1 | 0 | | |
| R | R0 | 21 (77,8%) | 20 (80,0%) | | Chi ² -Test auf linearen Trend |
| | R1 | 6 (22,2%) | 5 (20,0%) | 0,846 | |
| | unbekannt | 0 | 0 | | |
| V | V0 | 23 (100,0%) | 23 (100,0%) | | |
| | V1 | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | | |
| | unbekannt | 4 | 2 | | |
| L | L0 | 19 (82,6%) | 21 (91,3%) | | Chi ² -Test auf linearen Trend |
| | L1 | 4 (17,4%) | 2 (8,7%) | 0,386 | |
| | unbekannt | 4 | 2 | | |
| VIN in der Anamnese | nein | 23 (85,2%) | 21 (84,0%) | | |
| | ja | 4 (14,8%) | 4 (16,0%) | >0,999 | exakter Fisher-Test |
| | unbekannt | 0 | 0 | | |

| | | HPV negativ | HPV positiv | p-Wert | Test |
|----------------------------------|-----------|-------------|-------------|--------|--|
| Anzahl der Patienten (n) | | 27 | 25 | | |
| Kondylome in der Anamnese | nein | 27 (100,0%) | 24 (96,0%) | 0,481 | exakter Fisher-Test |
| | ja | 0 (0,0%) | 1 (4,0%) | | |
| | unbekannt | 0 | 0 | | |
| Immunsuppression | nein | 26 (96,3%) | 25 (100,0%) | >0,999 | exakter Fisher-Test |
| | ja | 1 (3,7%) | 0 (0,0%) | | |
| | unbekannt | 0 | 0 | | |
| Nikotinabusus | nein | 22 (84,6%) | 15 (65,2%) | 0,115 | Chi ² -Test |
| | ja | 4 (15,4%) | 8 (34,8%) | | |
| | unbekannt | 1 | 2 | | |
| CIN/Zervix-Ca in der Anamnese | nein | 27 (100,0%) | 23 (92,0%) | 0,226 | exakter Fisher-Test |
| | ja | 0 (0,0%) | 2 (8,0%) | | |
| | unbekannt | 0 | 0 | | |
| Parität (Anzahl Kinder) | 0 | 3 (11,1%) | 5 (20,0%) | | |
| | 1 | 8 (29,6%) | 6 (24,0%) | | |
| | 2 | 9 (33,3%) | 9 (36,0%) | | |
| | 3 | 4 (14,8%) | 2 (8,0%) | | |
| | 4 | 2 (7,4%) | 1 (4,0%) | | |
| | 5 | 0 (0,0%) | 1 (4,0%) | | |
| | 6 | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | | |
| | 7 | 1 (3,7%) | 1 (4,0%) | | |
| | unbekannt | 0 | 0 | | |
| Parität (Anzahl Kinder) | keine | 3 (11,1%) | 5 (20,0%) | 0,455 | Chi ² -Test auf linearen Trend |
| | 1-2 | 17 (63,0%) | 15 (60,0%) | | |
| | 3-7 | 7 (25,9%) | 5 (20,0%) | | |
| | unbekannt | 0 | 0 | | |
| Pille | nein | 21 (95,5%) | 17 (94,4%) | >0,999 | exakter Fisher-Test |
| | ja | 1 (4,5%) | 1 (5,6%) | | |
| | unbekannt | 5 | 7 | | |

| | | HPV negativ | HPV positiv | p-Wert | Test |
|---------------------------------|-------------------------------|-------------|-------------|--------|------------------------|
| Anzahl der Patienten (n) | | 27 | 25 | | |
| Hormone | nein | 20 (90,9%) | 18 (94,7%) | >0,999 | exakter Fisher-Test |
| | ja | 2 (9,1%) | 1 (5,3%) | | |
| | unbekannt | 5 | 6 | | |
| HIV | nein | 20 (100,0%) | 21 (100,0%) | | |
| | unbekannt | 7 | 4 | | |
| Menopausenstatus | prä-menopausal | 3 (11,1%) | 4 (16,7%) | 0,693 | exakter Fisher-Test |
| | post-menopausal | 24 (88,9%) | 20 (83,3%) | | |
| | unbekannt | 0 | 1 | | |
| gyn. Malignome in der Anamnese | nein | 24 (88,9%) | 23 (92,0%) | >0,999 | exakter Fisher-Test |
| | ja | 3 (11,1%) | 2 (8,0%) | | |
| | unbekannt | 0 | 0 | | |
| Erscheinung | Fleck | 3 (11,1%) | 2 (8,0%) | >0,999 | exakter Fisher-Test |
| | Ulcus | 5 (18,5%) | 4 (16,0%) | | |
| | Erhabener Tumor | 19 (70,4%) | 19 (76,0%) | | |
| | unbekannt | 0 | 0 | | |
| Kardinalsymptom | keine Beschwerden | 1 (4,0%) | 1 (4,3%) | 0,924 | exakter Fisher-Test |
| | Schmerzen / Brennen / Dysurie | 7 (28,0%) | 8 (34,8%) | | |
| | Juckreiz | 2 (8,0%) | 3 (13,0%) | | |
| | Tumor tastbar | 13 (52,0%) | 9 (39,1%) | | |
| | Blutung | 2 (8,0%) | 2 (8,7%) | | |
| | unbekannt | 2 | 2 | | |
| | | | | | |
| VIN in der Umgebung | nein | 21 (77,8%) | 19 (76,0%) | 0,879 | Chi ² -Test |
| | ja | 6 (22,2%) | 6 (24,0%) | | |
| | unbekannt | 0 | 0 | | |
| Lichen in der Umgebung | nein | 19 (70,4%) | 23 (92,0%) | 0,078 | exakter Fisher-Test |
| | ja | 8 (29,6%) | 2 (8,0%) | | |
| | unbekannt | 0 | 0 | | |

| | | HPV negativ | HPV positiv | p-Wert | Test |
|--------------------------|-----------------|-------------|-------------|--------|---|
| Anzahl der Patienten (n) | | 27 | 25 | | |
| p53 | schwach (< 10%) | 13 (52,0%) | 17 (77,3%) | 0,078 | Chi ² -Test auf linearen Trend |
| | mittel (10-50%) | 2 (8,0%) | 1 (4,5%) | | |
| | stark (>50%) | 10 (40,0%) | 4 (18,2%) | | |
| | unbekannt | 2 | 3 | | |
| p16 ^{INK4a} | negativ | 13 (50,0%) | 5 (22,7%) | 0,002 | Chi ² -Test |
| | fokal | 10 (38,5%) | 4 (18,2%) | | |
| | diffus | 3 (11,5%) | 13 (59,1%) | | |
| | unbekannt | 1 | 3 | | |
| Ki-67 | < 10% | 7 (28,0%) | 3 (13,6%) | 0,028 | Chi ² -Test auf linearen Trend |
| | 10-30% | 7 (28,0%) | 3 (13,6%) | | |
| | 30-70% | 9 (36,0%) | 9 (40,9%) | | |
| | > 70% | 2 (8,0%) | 7 (31,8%) | | |
| | unbekannt | 2 | 3 | | |

| | | negativ | positiv | Gesamt | p-Wert | Test |
|--------------------------|--------------------|------------|------------|------------|--------|---|
| Anzahl der Patienten (n) | | 27 | 25 | 52 | | |
| Pap-Abstrich | I + II | 20 (48,8%) | 20 (48,8%) | 40 (97,6%) | 0,329 | Chi ² -Test auf linearen Trend |
| | III, IIIId + IVa | 0 (0,0%) | 1 (2,4%) | 1 (2,4%) | | |
| | unbekannt | 7 | 4 | 11 | | |
| HPV-Abstrich Zervix | negativ | 4 (50,0%) | 2 (25,0%) | 6 (75,0%) | 0,127 | Chi ² -Test auf linearen Trend |
| | positiv, low risk | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | | |
| | positiv, high risk | 0 (0,0%) | 2 (25,0%) | 2 (25,0%) | | |
| | unbekannt | 23 | 21 | 44 | | |

Tabelle 7: HPV-positive Tumore: Tumore anderer Lokalisationen vs. Tumore der vord. Kommissur.

| Anzahl der Patienten (n) | | Vulva Ca Referenz | Vulva Ca vordere Kommissur | p-Wert | Test | Odds-Ratio [95%-KI] |
|---------------------------|-----------|-------------------|----------------------------|------------------|---|---------------------|
| | | 25 | 55 | | | |
| Alter [Jahre] | MW±SD | 59,6±12,6 | 56,0±17,2 | 0,347 | t-Test | |
| | <50 Jahre | 6 (24,0%) | 21 (38,2%) | | | |
| | ≥50 Jahre | 19 (76,0%) | 34 (61,8%) | | | |
| Tumorstadium | T1a | 3 (12,0%) | 18 (32,7%) | <0,001 | Chi ² -Test auf linearen Trend | |
| | T1b | 5 (20,0%) | 27 (49,1%) | | | |
| | T2 | 13 (52,0%) | 10 (18,2%) | | | |
| | T3 | 4 (16,0%) | 0 (0,0%) | | | |
| | unbekannt | 0 | 0 | | | |
| Nodalstatus | N0 | 16 (69,6%) | 26 (68,4%) | 0,846 | Chi ² -Test auf linearen Trend | |
| | N1 | 4 (17,4%) | 9 (23,7%) | | | |
| | N2 | 3 (13,0%) | 3 (7,9%) | | | |
| | N3 | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | | | |
| | unbekannt | 2 | 17 | | | |
| Fernmetastasierung | M0 | 25 (100,0%) | 50 (98,0%) | >0,999 | exakter Fisher-Test | |
| | M1 | 0 (0,0%) | 1 (2,0%) | | | |
| | unbekannt | 0 | 4 | | | |
| G | G1 | 1 (4,0%) | 2 (3,8%) | 0,275 | Chi ² -Test auf linearen Trend | |
| | G2 | 22 (88,0%) | 40 (76,9%) | | | |
| | G3 | 2 (8,0%) | 10 (19,2%) | | | |
| | unbekannt | 0 | 3 | | | |
| R | R0 | 20 (80,0%) | 53 (98,1%) | 0,011 | exakter Fisher-Test | 13,3 [1,5; 125,0] |
| | R1 | 5 (20,0%) | 1 (1,9%) | | | |
| | unbekannt | 0 | 1 | | | |
| V | V0 | 23 (100,0%) | 50 (98,0%) | >0,999 | exakter Fisher-Test | |
| | V1 | 0 (0,0%) | 1 (2,0%) | | | |
| | unbekannt | 2 | 4 | | | |
| L | L0 | 21 (91,3%) | 46 (93,9%) | 0,652 | exakter Fisher-Test | |
| | L1 | 2 (8,7%) | 3 (6,1%) | | | |
| | unbekannt | 2 | 6 | | | |
| VIN in der Anamnese | nein | 21 (84,0%) | 51 (92,7%) | 0,249 | exakter Fisher-Test | |
| | ja | 4 (16,0%) | 4 (7,3%) | | | |
| Kondylome in der Anamnese | nein | 24 (96,0%) | 53 (96,4%) | >0,999 | exakter Fisher-Test | |
| | ja | 1 (4,0%) | 2 (3,6%) | | | |
| Immunsuppression | nein | 25 (100,0%) | 48 (94,1%) | 0,547 | exakter Fisher-Test | |
| | ja | 0 (0,0%) | 3 (5,9%) | | | |
| | unbekannt | 0 | 4 | | | |
| Nikotinabusus | nein | 15 (65,2%) | 31 (67,4%) | >0,999 | exakter Fisher-Test | |
| | ja | 8 (34,8%) | 15 (32,6%) | | | |
| | unbekannt | 2 | 9 | | | |

| | | Vulva Ca Referenz | Vulva Ca vordere Kommissur | p-Wert | Test | Odds-Ratio [95%-KI] |
|-----------------------------------|--------------------|----------------------|----------------------------------|--------|--|------------------------|
| Anzahl der Patienten (n) | | 25 | 55 | | | |
| CIN/Zervix-Ca in der Anamnese | nein | 23 (92,0%) | 53 (96,4%) | 0,585 | exakter Fisher-Test | |
| | ja | 2 (8,0%) | 2 (3,6%) | | | |
| Parität (Anzahl Kinder) | 0 | 5 (20,0%) | 11 (20,0%) | - | - | |
| | 1 | 6 (24,0%) | 13 (23,6%) | | | |
| | 2 | 9 (36,0%) | 22 (40,0%) | | | |
| | 3 | 2 (8,0%) | 5 (9,1%) | | | |
| | 4 | 1 (4,0%) | 3 (5,5%) | | | |
| | 5 | 1 (4,0%) | 1 (1,8%) | | | |
| | 7 | 1 (4,0%) | 0 (0,0%) | | | |
| Parität (Anzahl Kinder) | keine | 5 (20,0%) | 11 (20,0%) | 0,800 | Chi ² -Test auf linearen Trend | |
| | 1-2 | 15 (60,0%) | 35 (63,6%) | | | |
| | 3-7 | 5 (20,0%) | 9 (16,4%) | | | |
| Pille | nein | 17 (94,4%) | 34 (73,9%) | 0,089 | exakter Fisher-Test | |
| | ja | 1 (5,6%) | 12 (26,1%) | | | |
| | unbekannt | 7 | 9 | | | |
| Hormone | nein | 18 (94,7%) | 40 (87,0%) | 0,663 | exakter Fisher-Test | |
| | ja | 1 (5,3%) | 6 (13,0%) | | | |
| | unbekannt | 6 | 9 | | | |
| HIV | nein | 21 (100,0%) | 32 (100,0%) | - | exakter Fisher-Test | |
| | ja | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | | | |
| | unbekannt | 4 | 23 | | | |
| Menopausenstatus | prämenop. | 4 (16,7%) | 20 (36,4%) | 0,080 | Chi ² -Test (Pearson) | |
| | postmenop. | 20 (83,3%) | 35 (63,6%) | | | |
| | unbekannt | 1 | 0 | | | |
| Gyn. Malignome in der Anamnese | nein | 23 (92,0%) | 53 (96,4%) | 0,585 | exakter Fisher-Test | |
| | ja | 2 (8,0%) | 2 (3,6%) | | | |
| Pap-Abstrich | I + II | 20 (95,2%) | 35 (92,1%) | >0,999 | exakter Fisher-Test | |
| | III, IId + IVa | 1 (4,8%) | 3 (7,9%) | | | |
| | unbekannt | 4 | 17 | | | |
| HPV-Abstrich Zervix | neg. | 2 (50,0%) | 8 (44,4%) | 0,139 | exakter Fisher-Test | |
| | pos. / low risk | 0 (0,0%) | 8 (44,4%) | | | |
| | pos./high risk | 2 (50,0%) | 2 (11,1%) | | | |
| | unbekannt | 21 | 37 | | | |

| | | Vulva Ca Referenz | Vulva Ca vordere Kommissur | p-Wert | Test | Odds-Ratio [95%-KI] |
|---------------------------------|--------------------------------|----------------------|----------------------------------|--------------|----------------------------|------------------------|
| Anzahl der Patienten (n) | | 25 | 55 | | | |
| Erscheinung | Fleck | 2 (8,0%) | 4 (9,1%) | 0,003 | exakter Fisher- Test | |
| | Ulcus | 4 (16,0%) | 24 (54,5%) | | | |
| | erh. Tumor | 19 (76,0%) | 16 (36,4%) | | | |
| | unbekannt | 0 | 11 | | | |
| Kardinalsymptom | keine Beschw. | 1 (4,3%) | 2 (7,7%) | 0,347 | | |
| | Schmerzen/ Brennen/ Dysurie | 8 (34,8%) | 15 (57,7%) | | | |
| | Juckreiz | 3 (13,0%) | 2 (7,7%) | | | |
| | Tumor tastbar | 9 (39,1%) | 7 (26,9%) | | | |
| | Blutung | 2 (8,7%) | 0 (0,0%) | | | |
| | unbekannt | 2 | 29 | | | |
| VIN in der Umgebung | nein | 19 (76,0%) | 18 (39,1%) | 0,006 | exakter Fisher- Test | 4,9 [1,7; 14,7] |
| | ja | 6 (24,0%) | 28 (60,9%) | | | |
| | unbekannt | 0 | 9 | | | |
| Lichen in der Umgebung | nein | 23 (92,0%) | 46 (100,0%) | 0,121 | exakter Fisher- Test | |
| | ja | 2 (8,0%) | 0 (0,0%) | | | |
| | unbekannt | 0 | 9 | | | |
| p53 | schwach (<10%) | 17 (77,3%) | 31 (60,8%) | 0,435 | exakter Fisher- Test | |
| | mittel (10-50%) | 1 (4,5%) | 7 (13,7%) | | | |
| | stark (>50%) | 4 (18,2%) | 13 (25,5%) | | | |
| | unbekannt | 3 | 4 | | | |
| p16 ^{INK4a} | negativ | 5 (22,7%) | 14 (26,9%) | 0,838 | exakter Fisher- Test | |
| | fokal | 4 (18,2%) | 12 (23,1%) | | | |
| | diffus | 13 (59,1%) | 26 (50,0%) | | | |
| | unbekannt | 3 | 3 | | | |
| Ki-67 | < 10% | 3 (13,6%) | 7 (13,7%) | 0,098 | exakter Fisher- Test | |
| | 10-30% | 3 (13,6%) | 20 (39,2%) | | | |
| | 30-70% | 9 (40,9%) | 17 (33,3%) | | | |
| | >70% | 7 (31,8%) | 7 (13,7%) | | | |
| | unbekannt | 3 | 4 | | | |

Tabelle 8: HPV-negative Tumore: Tumore anderer Lokalisationen vs. Tumore der vord. Kommissur.

| | | Vulva Ca Referenz | Vulva Ca vordere Kommissur | p-Wert | Test | Odds-Ratio [95%-KI] |
|---------------------------------|-----------|----------------------|----------------------------------|--------------|--|------------------------|
| Anzahl der Patienten (n) | | 27 | 76 | | | |
| Alter [Jahre] | MW±SD | 66,3±12,5 | 57,4±15,5 | 0,008 | t-Test | |
| | <50 Jahre | 5 (18,5%) | 28 (36,8%) | | | |
| | ≥50 Jahre | 22 (81,5%) | 48 (63,2%) | | | |
| Tumorstadium | T1a | 2 (7,7%) | 17 (22,4%) | 0,049 | Chi ² -Test auf linearen Trend | |
| | T1b | 9 (34,6%) | 27 (35,5%) | | | |
| | T2 | 12 (46,2%) | 29 (38,2%) | | | |
| | T3 | 3 (11,5%) | 3 (3,9%) | | | |
| | unbekannt | 1 | 0 | | | |
| Nodalstatus | N0 | 15 (57,7%) | 45 (76,3%) | 0,052 | Chi ² -Test auf linearen Trend | |
| | N1 | 7 (26,9%) | 11 (18,6%) | | | |
| | N2 | 3 (11,5%) | 3 (5,1%) | | | |
| | N3 | 1 (3,8%) | 0 (0,0%) | | | |
| | unbekannt | 1 | 17 | | | |
| Fernmetastasierung | M0 | 25 (92,6%) | 69 (98,6%) | 0,186 | exakter Fisher-Test | |
| | M1 | 2 (7,4%) | 1 (1,4%) | | | |
| | unbekannt | 0 | 6 | | | |
| G | G1 | 1 (3,8%) | 7 (9,6%) | 0,692 | Chi ² -Test auf linearen Trend | |
| | G2 | 21 (80,8%) | 47 (64,4%) | | | |
| | G3 | 4 (15,4%) | 19 (26,0%) | | | |
| | unbekannt | 1 | 3 | | | |
| R | R0 | 21 (77,8%) | 71 (94,7%) | 0,020 | exakter Fisher-Test | 5,1 [1,3; 19,6] |
| | R1 | 6 (22,2%) | 4 (5,3%) | | | |
| | unbekannt | 0 | 1 | | | |
| V | V0 | 23 (100,0%) | 68 (98,6%) | >0,999 | exakter Fisher-Test | |
| | V1 | 0 (0,0%) | 1 (1,4%) | | | |
| | unbekannt | 4 | 7 | | | |
| L | L0 | 19 (82,6%) | 64 (92,8%) | 0,220 | exakter Fisher-Test | |
| | L1 | 4 (17,4%) | 5 (7,2%) | | | |
| | unbekannt | 4 | 7 | | | |
| VIN in der Anamnese | nein | 23 (85,2%) | 69 (90,8%) | 0,473 | exakter Fisher-Test | |
| | ja | 4 (14,8%) | 7 (9,2%) | | | |
| Kondylome in der Anamnese | nein | 27 (100,0%) | 74 (97,4%) | >0,999 | exakter Fisher-Test | |
| | ja | 0 (0,0%) | 2 (2,6%) | | | |
| Immunsuppression | nein | 26 (96,3%) | 70 (95,9%) | >0,999 | exakter Fisher-Test | |
| | ja | 1 (3,7%) | 3 (4,1%) | | | |
| | unbekannt | 0 | 3 | | | |
| Nikotinabusus | nein | 22 (84,6%) | 43 (68,3%) | 0,188 | exakter Fisher-Test | |
| | ja | 4 (15,4%) | 20 (31,7%) | | | |
| | unbekannt | 1 | 13 | | | |

| | | Vulva Ca Referenz | Vulva Ca vordere Kommissur | p-Wert | Test | Odds-Ratio [95%-KI] |
|-----------------------------------|--------------------|----------------------|----------------------------------|--------------|--|------------------------|
| Anzahl der Patienten (n) | | 27 | 76 | | | |
| CIN/Zervix-Ca in der Anamnese | nein | 27 (100,0%) | 75 (98,7%) | >0,999 | exakter Fisher-Test | |
| | ja | 0 (0,0%) | 1 (1,3%) | | | |
| Parität (Anzahl Kinder) | 0 | 3 (11,1%) | 10 (13,2%) | - | - | |
| | 1 | 8 (29,6%) | 18 (23,7%) | | | |
| | 2 | 9 (33,3%) | 26 (34,2%) | | | |
| | 3 | 4 (14,8%) | 15 (19,7%) | | | |
| | 4 | 2 (7,4%) | 2 (2,6%) | | | |
| | 6 | 0 (0,0%) | 2 (2,6%) | | | |
| | 7 | 1 (3,7%) | 3 (3,9%) | | | |
| Parität (Anzahl Kinder) | keine | 3 (11,1%) | 10 (13,2%) | 0,914 | Chi ² -Test auf linearen Trend | |
| | 1-2 | 17 (63,0%) | 44 (57,9%) | | | |
| | 3-7 | 7 (25,9%) | 22 (28,9%) | | | |
| Pille | nein | 21 (95,5%) | 42 (73,7%) | 0,033 | exakter Fisher-Test | 7,5 [0,9; 60,7] |
| | ja | 1 (4,5%) | 15 (26,3%) | | | |
| | unbekannt | 5 | 9 | | | |
| Hormone | nein | 20 (90,9%) | 54 (91,5%) | >0,999 | exakter Fisher-Test | |
| | ja | 2 (9,1%) | 5 (8,5%) | | | |
| | unbekannt | 5 | 17 | | | |
| HIV | nein | 20 (100,0%) | 42 (100,0%) | - | | |
| | ja | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | | | |
| | unbekannt | 7 | 34 | | | |
| Menopausenstatus | prämenop. | 3 (11,1%) | 28 (36,8%) | 0,012 | Chi ² -Test (Pearson) | 4,7 [1,3; 16,9] |
| | postmenop. | 24 (88,9%) | 48 (63,2%) | | | |
| Gyn. Malignome in der Anamnese | nein | 24 (88,9%) | 70 (93,3%) | 0,433 | exakter Fisher-Test | |
| | ja | 3 (11,1%) | 5 (6,7%) | | | |
| | unbekannt | 0 | 1 | | | |
| Pap-Abstrich | I + II | 20 (100,0%) | 38 (95,0%) | 0,548 | exakter Fisher-Test | |
| | III, IId + IVa | 0 (0,0%) | 2 (5,0%) | | | |
| | unbekannt | 7 | 36 | | | |
| HPV-Abstrich Zervix | neg. | 4 (100,0%) | 17 (60,7%) | 0,367 | exakter Fisher-Test | |
| | pos. / low risk | 0 (0,0%) | 10 (35,7%) | | | |
| | pos./high risk | 0 (0,0%) | 1 (3,6%) | | | |
| | unbekannt | 23 | 48 | | | |

| | | Vulva Ca Referenz | Vulva Ca vordere Kommissur | p-Wert | Test | Odds-Ratio [95%-KI] |
|---------------------------------|--------------------------------|----------------------|----------------------------------|--------------|----------------------------|------------------------|
| Anzahl der Patienten (n) | | 27 | 76 | | | |
| Erscheinung | Fleck | 3 (11,1%) | 6 (9,5%) | 0,151 | exakter Fisher- Test | |
| | Ulcus | 5 (18,5%) | 25 (39,7%) | | | |
| | erh. Tumor | 19 (70,4%) | 32 (50,8%) | | | |
| | unbekannt | 0 | 13 | | | |
| Kardinalsymptom | keine Beschw. | 1 (4,0%) | 1 (2,4%) | 0,559 | exakter Fisher- Test | |
| | Schmerzen/ Brennen/ Dysurie | 7 (28,0%) | 17 (40,5%) | | | |
| | Juckreiz | 2 (8,0%) | 6 (14,3%) | | | |
| | Tumor tastbar | 13 (52,0%) | 17 (40,5%) | | | |
| | Blutung | 2 (8,0%) | 1 (2,4%) | | | |
| | unbekannt | 2 | 34 | | | |
| VIN in der Umgebung | nein | 21 (77,8%) | 41 (64,1%) | 0,228 | exakter Fisher- Test | |
| | ja | 6 (22,2%) | 23 (35,9%) | | | |
| | unbekannt | 0 | 12 | | | |
| Lichen in der Umgebung | nein | 19 (70,4%) | 58 (93,5%) | 0,006 | exakter Fisher- Test | 6,1 [1,7; 22,7] |
| | ja | 8 (29,6%) | 4 (6,5%) | | | |
| | unbekannt | 0 | 14 | | | |
| p53 | schwach (<10%) | 13 (52,0%) | 29 (38,7%) | 0,548 | exakter Fisher- Test | |
| | mittel (10-50%) | 2 (8,0%) | 10 (13,3%) | | | |
| | stark (>50%) | 10 (40,0%) | 36 (48,0%) | | | |
| | unbekannt | 2 | 1 | | | |
| p16 ^{INK4a} | negativ | 13 (50,0%) | 42 (56,0%) | 0,355 | exakter Fisher- Test | |
| | fokal | 10 (38,5%) | 18 (24,0%) | | | |
| | diffus | 3 (11,5%) | 15 (20,0%) | | | |
| | unbekannt | 1 | 1 | | | |
| Ki-67 | < 10% | 7 (28,0%) | 16 (21,6%) | 0,397 | exakter Fisher- Test | |
| | 10-30% | 7 (28,0%) | 21 (28,4%) | | | |
| | 30-70% | 9 (36,0%) | 20 (27,0%) | | | |
| | >70% | 2 (8,0%) | 17 (23,0%) | | | |
| | unbekannt | 2 | 2 | | | |

3.1 Vulvakarzinome der vorderen Kommissur:

Das Durchschnittsalter der Patientinnen bei Erstdiagnose war 56,8 Jahre. 37,0% der Patientinnen (n=50) waren unter 50 Jahre alt. In den meisten Fällen zeigten sich die Vulvakarzinome der vorderen Kommissur entweder als Ulcera (n=49, entsprechend 45,8%) oder erhabene Tumore (n=48, entsprechend 44,9%) (Tabelle 4 ; Abb. 16). 47,1% der Frauen gaben als Hauptsymptome Schmerzen, Brennen oder Dysurie an, während 35,3% sich wegen eines tastbaren Tumors beim Frauenarzt vorgestellt haben. 46,4% der Tumore waren von einer VIN umgeben. Eine Dermatose im Sinne eines Lichen sclerosus wurde lediglich bei 3,7% der Patientinnen histologisch nachgewiesen. Die Mehrheit der Tumore (41,2%) befand sich im Stadium pT1b und in den meisten Fällen zeigten sich keine Lymphknoten- oder Fernmetastasen (73,2% und 98,3%). 69,6% der Karzinome zeigten einen G2 Differenzierungsgrad und in deren Mehrheit wurde keine Lymph- oder Blutgefäßinvasion nachgewiesen (93,2% und 98,3%). Nikotinabusus wurde von 35 Frauen (32,1%) angegeben und 4,8% der Patientinnen waren immunsupprimiert, davon keine HIV positiv. Bei den meisten Patientinnen wurden keine VIN, Kondylome, CIN/Zervixkarzinom oder andere gynäkologische Malignome anamnestisch erhoben (91,6% ; 96,9% ; 97,7% ; 94,6%). 26,2% der Frauen gaben anamnestisch eine Pille- und 10,5% eine Hormoneinnahme an. 52,4% der Karzinome wiesen eine mäßige bis starke p53- Expression auf. Bei 44,1% der Tumore war der p16^{INK4a}-Nachweis negativ (Tabelle 4).

HR-HPV DNA wurde in 55 Tumoren der vorderen Kommissur (42%) nachgewiesen (Tabelle 4), in 48 davon (86,8%) handelte es sich um den HPV 16. HPV 18 wurde in 3 Tumoren identifiziert. HR-HPV 31, 33, 39, 73 und der LR-HPV 11 wurden in jeweils einem Tumor detektiert (Abb. 15).

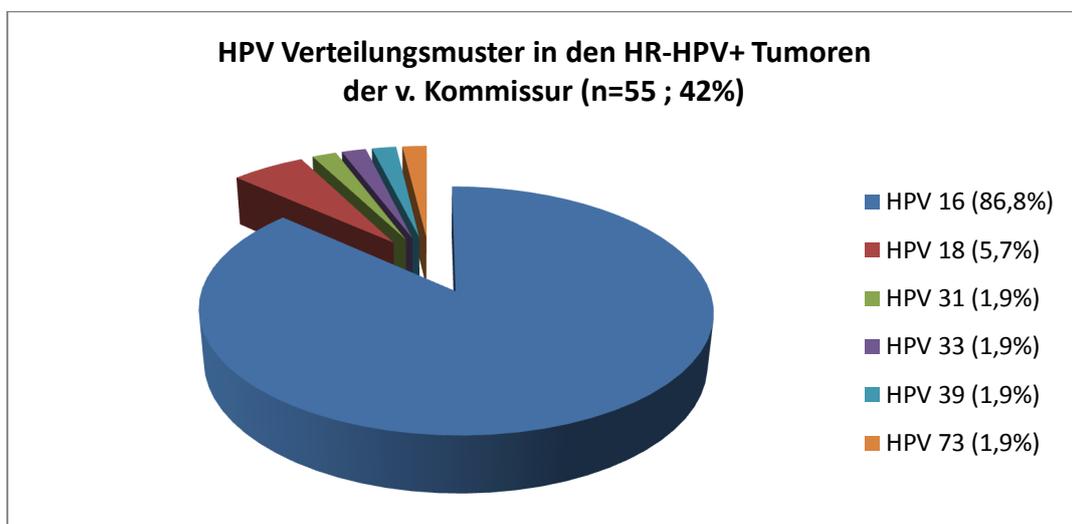


Abb. 15: HPV Typen-Verteilungsmuster in den HR-HPV-positiven Tumoren der vorderen Kommissur

Im Vergleich zu den HR-HPV negativen Tumoren, zeigten sich bei den HR-HPV positiven Tumoren statistisch signifikant häufiger eine umgebende VIN (60,9% vs. 35,9% ; $p=0,010$; Chi²-Test) und ein früheres Tumorstadium ($p=0,008$; Chi²-Test auf linearen Trend) (Tabelle 5). 81,8% der HR-HPV positiven vs. 57,9% der HR-HPV-negativen Karzinome befanden sich im pT1 Stadium. Hinsichtlich des Nodalstatus, der Fernmetastasierung, der Tumordifferenzierung und des L- und V-Status konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den HR-HPV positiven und den HR-HPV negativen Tumoren nachgewiesen werden ($p=0,385$; $p=0,821$; $p=0,913$; $p=0,812$; $p=0,829$; jeweils Chi²-Test auf linearen Trend). Kein HR-HPV positiver Tumor war mit Lichen sclerosus assoziiert, während 6,5% der HR-HPV negativen Tumore von einem LS umgeben waren ($p=0,135$; exakter Fisher-Test) (Tabelle 5).

93,6% der Frauen hatten einen unauffälligen Pap-Abstrich Befund, ohne signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe der HR-HPV positiven Tumore und der Gruppe der HR-HPV negativen Tumore ($p=0,604$; Chi²-Test auf linearen Trend). In der Gruppe der HR-HPV positiven Karzinome fand sich bei 3,8% der Frauen ein auffälliger Pap-Abstrich und nur bei 4,3% ein positiver HR-HPV Abstrichbefund aus der Zervix. Hinsichtlich des Pap- und des HPV-Abstrichbefundes aus der Zervix konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe der HR-HPV positiven und der Gruppe der HR-HPV negativen Tumore nachgewiesen werden ($p=0,604$; $p=0,206$; jeweils Chi²-Test auf linearen Trend), wobei diese Daten auch nur von einem geringen Anteil der Patientinnen vorlagen (Tabelle 5).

Zwischen der Gruppe der HR-HPV positiven und der Gruppe der HR-HPV negativen Vulvakarzinome wurde hinsichtlich der p16^{INK4a}- und der p53-Expression ein statistisch signifikanter Unterschied nachgewiesen ($p=0,001$ und $p=0,008$; Chi²-Test), wobei 50% der HR-HPV positiven Tumore (vs. 20% der HR-HPV negativen) eine diffuse p16^{INK4a}-Expression und 48% der HR-HPV negativen Tumore (vs. 25,5% der HR-HPV positiven) eine starke p53-Expression zeigten (Tabelle 5). HSV DNA und EBV DNA wurden in keinem Tumor nachgewiesen.

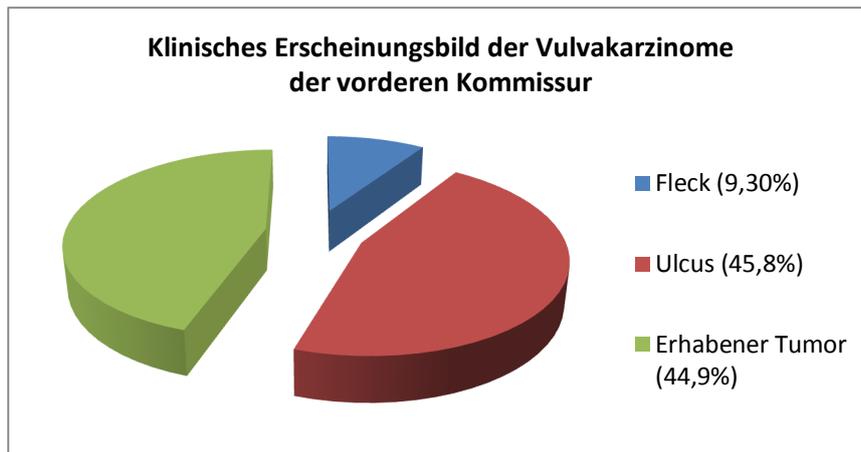


Abb. 16: Klinisches Erscheinungsbild der Vulvakarzinome der vorderen Kommissur

3.2 Vulvakarzinome anderer Lokalisationen (Referenztumore)

In dieser Gruppe betrug das Durchschnittsalter 63,1 Jahre. 11 Frauen (21,2%) waren unter 50 Jahre alt (Tabelle 4). Der größte Anteil der Karzinome (73,1%) hat sich klinisch als erhabener Tumor manifestiert. Ulcera fanden sich bei lediglich 17,3% der Patientinnen (Tabelle 4 ; Abb. 18). Nur ein geringer Prozentsatz (23,1%) der Tumore war von einer VIN und 19,2% von einem Lichen sclerosus umgeben. Bei 49% der Patientinnen befanden sich die Tumore im Stadium pT2 bei Erstdiagnose. Bei 63,3% der Frauen fanden sich keine Lymphknotenmetastasen und bei 96,2% keine Fernmetastasen. 84,3% der Tumore zeigten einen G2 Differenzierungsgrad und eine Lymph- oder Blutgefäßinvasion bestand in der Mehrheit der Karzinome nicht (87% L0- und 100% V0-Status). Anamnestisch gaben 15,4% der Frauen eine VIN, 3,8% eine CIN oder Zervixkarzinom und 1,9% Kondylome an. 24,5% der Patientinnen waren Raucherinnen und 1,9% (n=1) immunsupprimiert (keine HIV Infektion). Pille- bzw. Hormoneinnahme wurde von 5% und 7,3% der Frauen berichtet. 97,6% der Patientinnen hatten unauffällige Pap-Abstriche. Die Mehrheit der Tumore (63,8%) zeigte eine schwache p53-Expression, nur 29,8% zeigten eine starke Expression (Tabelle 4).

In 48,1% der Tumore (n=25) wurde HR-HPV DNA nachgewiesen (Tabelle 4). Das Verteilungsmuster der HPV-Typen war ähnlich mit dem der Gruppe der Karzinome der vorderen Kommissur: In 22 Tumoren (87%) fand sich HPV 16, in 2 Tumoren (8,7%) HPV 18 und in einem Tumor (4,3%) HPV 33. Der LR-HPV 6 wurde in einem Tumor dieser Gruppe identifiziert (Abb. 17).

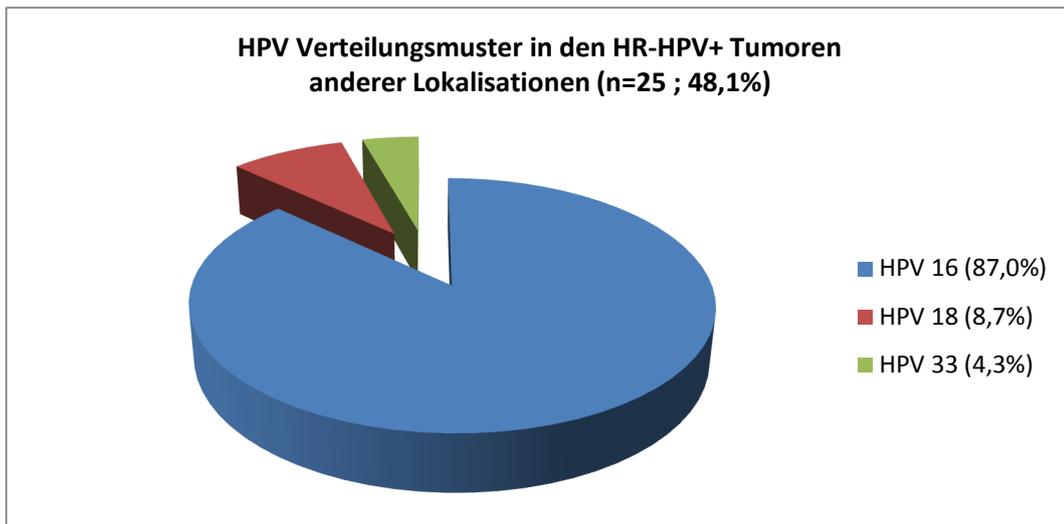


Abb. 17: HPV Typen-Verteilungsmuster in den HR-HPV-positiven Tumoren anderer Lokalisationen

Die Frauen mit HR-HPV positiven Tumoren waren jünger als diejenigen mit HR-HPV negativen Tumoren (Durchschnittsalter 59,6 J vs. 66,3 J ; $p=0,061$; t-Test für unabhängige Stichproben) und in ihrer Anamnese fand sich häufiger Nikotinabusus (34,8% vs. 15,4% ; $p=0,115$; χ^2 -Test) (Tabelle 6). Im Gegensatz dazu, fand sich in der Gruppe der Tumore der vorderen Kommissur kein wesentlicher Unterschied bezüglich des Alters zwischen den Patientinnen mit HPV positiven und negativen Karzinomen.

Hinsichtlich des Tumorstadiums, Nodalstatus, Fernmetastasierung, Differenzierungsgrades, Lymph- und Blutgefäßinvasion wurde kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den HR-HPV positiven und den HR-HPV negativen Tumoren nachgewiesen ($p=0,657$; $p=0,426$; $p=0,169$; $p=0,492$; $p=0,386$; jeweils χ^2 -Test auf linearen Trend) (Tabelle 6). Das gleiche gilt auch für anamnestische Daten wie VIN in der Anamnese ($p>0,999$; exakter Fisher-Test), CIN oder Zervixkarzinom in der Anamnese ($p=0,226$; exakter Fisher-Test), Kondylome ($p=0,481$; exakter Fisher-Test), Pille- bzw. Hormoneinnahme oder gynäkologische Malignome in der Anamnese (jeweils $p>0,999$; exakter Fisher-Test). Das klinische Erscheinungsbild des Tumors und die Beschwerdesymptomatik zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den HR-HPV positiven und den HR-HPV negativen Tumoren ($p>0,999$; $p=0,924$; jeweils exakter Fisher-Test) (Tabelle 6).

Der größte Anteil der HR-HPV positiven und HR-HPV negativen Tumore waren mit Lichen sclerosus (92% und 70,4% ; $p=0,078$; exakter Fisher-Test) und VIN (76% und 77,8% ; $p=0,879$; χ^2 -Test) nicht assoziiert. Ein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,002$; χ^2 -Test) zeigte sich hinsichtlich der p16^{INK4a}-Expression zwischen der Gruppe der HR-HPV positiven und der Gruppe der HR-HPV negativen Tumore, wobei 59,1% der HR-HPV positiven Karzinome eine diffuse p16^{INK4a}-Expression aufwiesen. Im Gegensatz

dazu, trat lediglich bei 18,2% der HR-HPV positiven Tumoren vs. 40% der HR-HPV negativen Karzinome eine starke p53-Expression auf, jedoch ohne signifikanten Unterschied ($p=0,078$; Chi²-Test auf linearen Trend) (Tabelle 6). Analog zu der Gruppe der Vulvakarzinome der vorderen Kommissur, ist der Nachweis von HSV- und EBV-DNA bei allen Tumoren negativ ausgefallen.

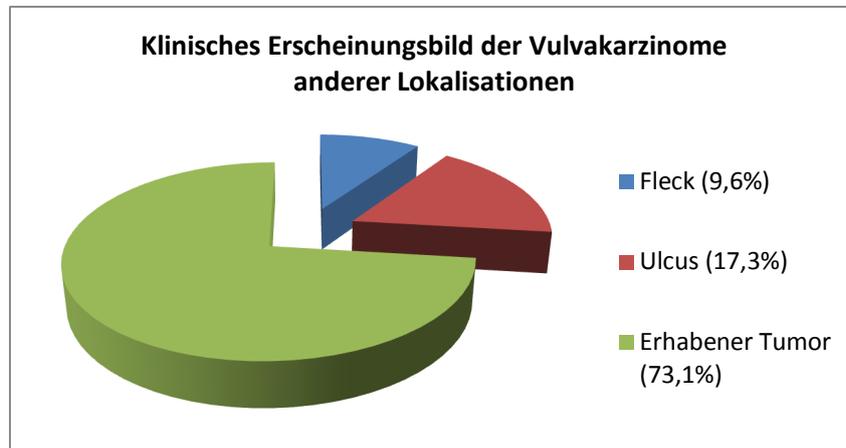


Abb. 18: Klinisches Erscheinungsbild der Vulvakarzinome anderer Lokalisationen

3.3 Vergleich der Tumore der vorderen Kommissur mit den Tumoren anderer Lokalisationen

3.3.1 Alter

| Alter [Jahren] | N | Mittelwert | Standard- abweichung | Min | Max | Perzentile | | |
|-------------------------------|-----|------------|-------------------------|-----|-----|------------|-----------------|-------|
| | | | | | | 25. | 50. (Median) | 75. |
| Vulva Ca anderer Lok. | 52 | 63,08 | 12,89 | 36 | 85 | 52,50 | 64,50 | 73,75 |
| Vulva Ca vordere Kommissur | 135 | 56,77 | 16,18 | 19 | 89 | 45,00 | 56,00 | 69,00 |

Tabelle 9: Alter der Patientinnen mit Vulvakarzinom getrennt nach Tumorlokalisierung.

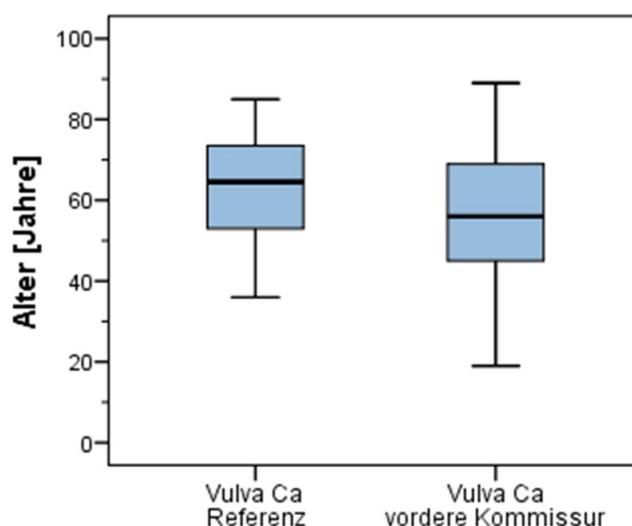


Diagramm 3: Altersvergleich zwischen den Patientinnen mit Tumoren der v. Kommissur und Tumoren anderer Lokalisationen.

Da sowohl in der Gruppe der Vulvakarzinome anderer Lokalisationen als auch in der Gruppe der Vulvakarzinome der vorderen Kommissur keine signifikante Abweichungen von einer Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test, $p=0,184$ bzw. $p=0,199$) nachgewiesen werden konnte, erfolgte der statistische Vergleich der beiden Vulvakarzinom-Gruppen mittels t-Test für unabhängige Stichproben. Es zeigte sich ein signifikanter Altersunterschied (t-Test für unabhängige Stichproben, $p=0,006$), wobei die Patientinnen mit Vulvakarzinom der vorderen Kommissur im Mittel jünger waren als die mit Vulvakarzinom anderer Lokalisationen (63,1J vs. 56,8J) (Tabelle 4 ; Tabelle 9).

Aus dem Diagramm 3 wird ersichtlich, dass das Minimum und die drei Perzentile der Altersverteilung der Patientinnen mit Vulvakarzinom der vorderen Kommissur niedriger waren als die entsprechenden Werte der Patientinnen mit Vulvakarzinom anderer Lokalisationen (Referenzgruppe). Eine Ausnahme stellte nur das Maximum der Altersverteilung dar, das mit 89 Jahren in der Gruppe der vorderen Kommissur leicht

höher war als das Maximum in der Gruppe der anderen Lokalisationen, das bei 85 Jahren lag (Tabelle 9 ; Diagramm 3).

| Alter [Jahre] | N | Mittelwert | Standard- abweichung | Min | Max | Perzentile | | | |
|------------------|----------------------------------|------------|-------------------------|-------|-----|------------|-----------------|-----|----|
| | | | | | | 25. | 50. (Median) | 75. | |
| HPV negativ | Vulva Ca anderer Lok. | 27 | 66,30 | 12,51 | 36 | 85 | 58 | 70 | 75 |
| | Vulva Ca vordere Kommissur | 76 | 57,37 | 15,51 | 19 | 86 | 47 | 58 | 68 |
| HPV positiv | Vulva Ca anderer Lok. | 25 | 59,60 | 12,62 | 36 | 80 | 49 | 61 | 71 |
| | Vulva Ca vordere Kommissur | 55 | 55,96 | 17,20 | 28 | 89 | 43 | 56 | 71 |
| HPV unbekannt | Vulva Ca vordere Kommissur | 3 | 51,00 | 18,08 | 32 | 68 | 32 | 53 | 68 |
| fehlend | Vulva Ca vordere Kommissur | 1 | 73,00 | | 73 | 73 | | | |

Tabelle 10: Alter der Patientinnen mit HPV-negativen und HPV-positiven Tumoren der v. Kommissur und Tumoren anderer Lokalisationen.

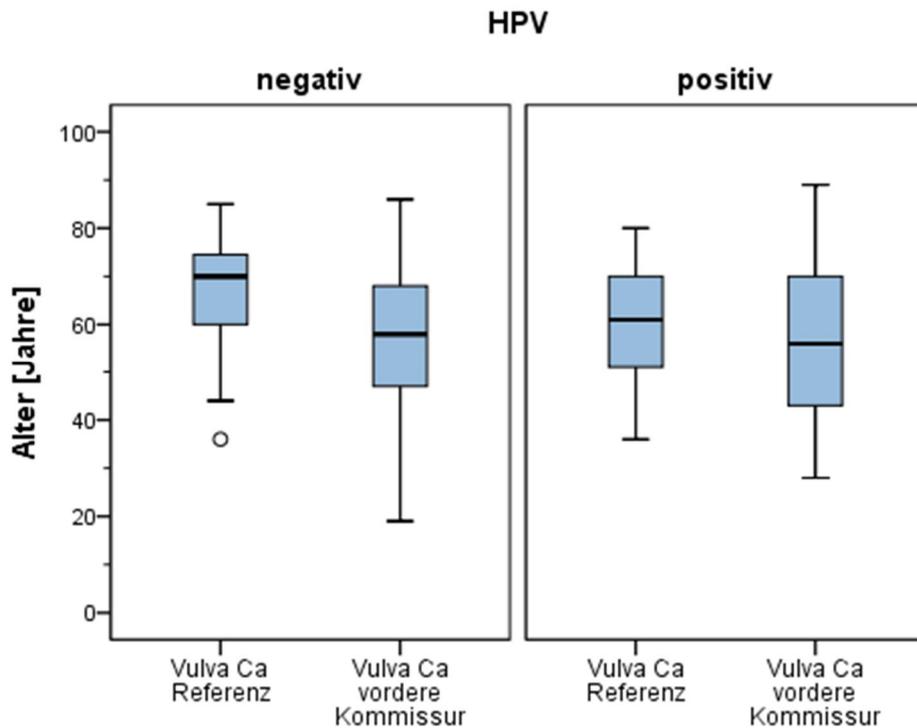


Diagramm 4: Altersvergleich zwischen den Patientinnen mit HPV-negativen und HPV-positiven Tumoren für beide Tumorlokalisationen.

Da für HPV-negativ und HPV-positiv sowohl in der Gruppe der Tumore anderer Lokalisationen als auch in der Gruppe der Vulvakarzinome der vorderen Kommissur keine signifikante Abweichungen von einer Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test,

p=0,200, p=0,141, p=0,200 bzw. p=0,200) nachgewiesen werden konnten, erfolgte der statistische Vergleich der beiden Vulvakarzinom-Gruppen jeweils für beide HPV-Konstellationen mittels t-Test für unabhängige Stichproben. In der HPV-negativ Gruppe zeigte sich ein signifikanter Altersunterschied (t-Test für unabhängige Stichproben, p=0,008), wobei die Patientinnen mit Vulvakarzinom der vorderen Kommissur im Mittel jünger waren als die mit Vulvakarzinom anderer Lokalisationen (57,4J vs. 66,3J) (Tabelle 8 ; Tabelle 10 ; Diagramm 4). In der HPV-positiven Gruppe ließ sich kein signifikanter Altersunterschied nachweisen (t-Test für unabhängige Stichproben, p=0,347) (Tabelle 7 ; Tabelle 10 ; Diagramm 4).

Aus dem Diagramm 4 wird ersichtlich, dass in der HPV-negativen Gruppe das Minimum und die drei Perzentile der Altersverteilung der Patientinnen mit Vulvakarzinom der vorderen Kommissur niedriger waren als die entsprechenden Werte der Patientinnen mit Vulvakarzinom anderer Lokalisationen. Eine Ausnahme stellt nur das Maximum der Altersverteilung dar, das mit 86 Jahren in der Vulvakarzinom vordere Kommissur-Gruppe dem Maximum der Vulvakarzinom anderer Lokalisationen-Gruppe fast entsprach, das bei 85 Jahren lag. In der HPV-positiv Gruppe waren das Minimum und das 25. und 50. Perzentil der Altersverteilung der Patientinnen der Vulvakarzinom der vorderen Kommissur-Gruppe leicht niedriger als die entsprechenden Werte der Vulvakarzinom anderer Lokalisationen-Gruppe. Dagegen lag das 75. Perzentil in beiden Gruppen bei 71 Jahren, während das Maximum der Vulvakarzinom vordere Kommissur-Gruppe mit 89 Jahren deutlich über dem Maximum der Vulvakarzinom anderer Lokalisationen-Gruppe lag, das bei 80 Jahren war (Tabelle 10 ; Diagramm 4).

3.3.2 Tumorstadium

Es wurde ein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich des Tumorstadiums zwischen den beiden Gruppen nachgewiesen ($p < 0,001$; Chi²-Test auf linearen Trend), wobei die Karzinome der vorderen Kommissur in einem früheren T-Stadium diagnostiziert wurden. 67,9% der Tumore der vorderen Kommissur vs. 37,3% der Tumore anderer Lokalisationen befanden sich im pT1 Stadium. Ein pT2 Stadium wurde bei 29,8% der Tumore der vorderen Kommissur und bei 49% der Tumore anderer Lokalisationen beobachtet (Tabelle 4).

3.3.3 Nodalstatus

| Tumorstadium | | Vulva Ca Referenz | Vulva Ca vordere Kommissur | p-Wert | Test |
|--------------|--------------------------|----------------------|----------------------------------|--------|---|
| T1b | Anzahl der Patienten (n) | 14 | 57 | | |
| | Nodalstatus | | | | |
| | N0 | 12 (85,7%) | 44 (81,5%) | | |
| | N1 | 2 (14,3%) | 9 (16,7%) | | |
| | N2 | 0 (0,0%) | 1 (1,9%) | 0,639 | Chi ² -Test auf linearen Trend |
| | N3 | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | | |
| | unbekannt | 0 | 3 | | |
| T2 | Anzahl der Patienten (n) | 25 | 40 | | |
| | Nodalstatus | | | | |
| | N0 | 13 (52,0%) | 22 (59,5%) | | |
| | N1 | 8 (32,0%) | 10 (27,0%) | | |
| | N2 | 4 (16,0%) | 5 (13,5%) | 0,602 | Chi ² -Test auf linearen Trend |
| | N3 | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | | |
| | unbekannt | 0 | 3 | | |
| T3 | Anzahl der Patienten (n) | 7 | 3 | | |
| | Nodalstatus | | | | |
| | N0 | 3 (42,9%) | 2 (66,7%) | | |
| | N1 | 1 (14,3%) | 1 (33,3%) | | |
| | N2 | 2 (28,6%) | 0 (0,0%) | 0,286 | Chi ² -Test auf linearen Trend |
| | N3 | 1 (14,3%) | 0 (0,0%) | | |
| | unbekannt | 0 | 0 | | |
| Gesamt | Anzahl der Patienten (n) | 51 | 135 | | |
| | Nodalstatus | | | | |
| | N0 | 30 (62,5%) | 74 (74,0%) | | |
| | N1 | 11 (22,9%) | 20 (20,0%) | | |
| | N2 | 6 (12,5%) | 6 (6,0%) | 0,058 | Chi ² -Test auf linearen Trend |
| | N3 | 1 (2,1%) | 0 (0,0%) | | |
| | unbekannt | 3 | 35 | | |

Tabelle 11: Vergleich des Nodalstatus im jeweiligen Tumorstadium zwischen den Lokalisationsgruppen.

Hinsichtlich des Nodalstatus für das jeweilige Tumorstadium wurde kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Tumoren der vorderen Kommissur und den Referenztumoren nachgewiesen (für pT1b: $p=0,639$; für pT2: $p=0,602$; für pT3: $p=0,286$; für alle T-Stadien: $p=0,058$; jeweils Chi²-Test auf linearen Trend) (Tabelle 11).

Dementsprechend, ist die Tendenz für Lymphknotenmetastasierung bei den Karzinomen der vorderen Kommissur nicht signifikant höher oder niedriger als bei den Karzinomen anderer Lokalisationen.

Weder in der Gruppe der Karzinome der vorderen Kommissur noch in der Gruppe der Referenztumore noch in der Gesamtheit der untersuchten Tumore konnte ein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich des Nodalstatus zwischen den HPV-positiven und den

HPV-negativen Tumoren nachgewiesen werden. (Für Tumore der vorderen Kommissur: $p=0,385$; für Referenztumore: $p=0,426$; für die Gesamtheit der Tumore: $p=0,847$; jeweils χ^2 -Test auf linearen Trend) (Tabelle 5 ; Tabelle 6 ; Tabelle 12).

| | | HPV negativ | HPV positiv | p-Wert | Test |
|--------------------------|-----------|-------------|-------------|--------|---|
| Anzahl der Patienten (n) | | 85 | 61 | | |
| Nodalstatus | N0 | 60 (70,6%) | 42 (68,9%) | 0,847 | Chi ² -Test auf linearen Trend |
| | N1 | 18 (21,2%) | 13 (21,3%) | | |
| | N2 | 6 (7,1%) | 6 (9,8%) | | |
| | N3 | 1 (1,2%) | 0 (0,0%) | | |
| | unbekannt | 0 | 0 | | |

Tabelle 12: Nodalstatus aller untersuchten Tumore, getrennt nach HPV-Status.

Dementsprechend ist die Tendenz zur Lymphknotenmetastasierung in beiden Gruppen und in der Gesamtheit bei den HPV-positiven Tumoren nicht signifikant höher oder niedriger als bei den HPV-negativen Tumoren.

3.3.4 HPV

HR-HPV DNA wurde in 42% der Tumore der vorderen Kommissur und 48,1% der Tumore anderer Lokalisationen nachgewiesen, ohne dass ein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich des HPV-Status zwischen den beiden Gruppen ermittelt werden konnte ($p=0,454$; χ^2 -Test) (Tabelle 4). Diese Zahlen stimmen mit den bisher publizierten Daten (de Vuyst 2009) überein. Das Verteilungsmuster der HPV-Typen war in den beiden Gruppen ähnlich und entspricht den bisher veröffentlichten Beobachtungen (Hampel 2006). Der HPV 16 war in beiden Gruppen der am häufigsten nachgewiesene Typ (86,8% und 87%), gefolgt vom HPV 18 (5,7% und 8,7%) (Abb. 15 ; Abb. 17).

HPV-negative Tumore

In der Gruppe der HPV-negativen Karzinome waren die Patientinnen mit Tumoren der vorderen Kommissur statistisch signifikant jünger als die Frauen mit Tumoren anderer Lokalisationen (mittleres Alter 57,4J vs. 66,3J ; $p=0,008$; t-Test) (Tabelle 8). Auf diesem Altersunterschied beruht auch die nachgewiesene statistisch signifikant häufigere Pilleneinnahme in der Gruppe der Tumore der vorderen Kommissur (26,3% vs. 4,5% ; $p=0,033$; exakter Fisher-Test). Ein Lichen sclerosus in der Tumorumgebung wurde statistisch signifikant häufiger bei den Referenztumoren nachgewiesen (29,6% vs. 6,5% ; $p=0,006$; exakter Fisher-Test) (Tabelle 8). Diese Beobachtungen spiegeln den Entstehungsmechanismus des nicht HPV-induzierten, Lichen-assoziierten Vulvakarzinoms der älteren Frauen wider.

Die Tumore der vorderen Kommissur wurden statistisch signifikant häufiger in einem früheren Tumorstadium diagnostiziert im Vergleich zu den Referenztumoren (22,4% vs. 7,7% im Stadium pT1a ; $p=0,049$; χ^2 -Test auf linearen Trend), was auch die statistisch signifikant häufigere R0-Resektion bei dieser Lokalisationsgruppe erklären kann (94,7% vs. 77,8% ; $p=0,020$; exakter Fisher-Test) (Tabelle 8).

Bezüglich der restlichen untersuchten klinischen und molekulargenetischen Parameter wurde kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Karzinomen der vorderen Kommissur und den Referenztumoren festgestellt (Nodalstatus: $p=0,052$; Fernmetastasierung: $p=0,186$; Differenzierungsgrad: $p=0,692$; Lymphgefäßinvasion: $p=0,220$; Blutgefäßinvasion: $p>0,999$; VIN in der Anamnese: $p=0,473$; Kondylome in der Anamnese: $p>0,999$; Immunsuppression: $p>0,999$; Nikotinabusus: $p=0,188$; CIN/Zervixkarzinom in der Anamnese: $p>0,999$; Parität: $p=0,914$; Hormoneinnahme: $p>0,999$; gynäkologische Malignome in der Anamnese: $p=0,433$; Pap-Abstrich: $p=0,548$; Erscheinung: $p=0,151$; Kardinalsymptom: $p=0,559$; HPV-Abstrich Zervix: $p=0,367$; VIN in der Tumorumgebung: $p=0,228$; p53-Überexpression: $p=0,548$; p16^{INK4a}-Expression: $p=0,355$; Ki-67: $p=0,397$) (Tabelle 8).

HPV-positive Tumore

In dieser Gruppe zeigte sich im Gegensatz zu den HPV-negativen Tumoren kein statistisch signifikanter Altersunterschied zwischen den beiden Lokalisationsgruppen (mittleres Alter bei den Tumoren der vorderen Kommissur 56,0J vs. 59,6J bei den Referenztumoren ; $p=0,347$; t-Test) (Tabelle 7).

Ähnlich wie bei den HPV-negativen Karzinomen, wurden die HPV-positiven Tumore der vorderen Kommissur statistisch signifikant häufiger in einem früheren Tumorstadium diagnostiziert im Vergleich zu den HPV-positiven Referenztumoren (81,8% vs. 32,0% im Stadium pT1, sowie 32,7% vs. 12,0% im Stadium pT1a ; $p<0,001$; χ^2 -Test auf linearen Trend), wodurch signifikant häufiger eine R0-Resektion erreicht wurde (98,1% vs. 80,0% ; $p=0,011$; exakter Fisher-Test). Die HPV-positiven Tumore der vorderen Kommissur haben sich im Vergleich zu den Referenztumoren signifikant häufiger als Ulcus (54,5% vs. 16,0%) und signifikant seltener als erhabene Tumore (36,4% vs. 76,0%) klinisch manifestiert ($p=0,003$; exakter Fisher-Test). Ein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Kardinalsymptoms bestand allerdings zwischen den beiden Lokalisationsgruppen nicht ($p=0,347$). Eine VIN fand sich in der Tumorumgebung der Karzinome der vorderen Kommissur signifikant häufiger im Vergleich zu der Umgebung der Referenztumore (60,9% vs. 24,0% ; $p=0,006$; exakter Fisher-Test) (Tabelle 7).

Hinsichtlich der restlichen untersuchten klinischen und molekulargenetischen Parameter ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Lokalisationsgruppen (Nodalstatus: $p=0,846$; Fernmetastasierung: $p>0,999$; Differenzierungsgrad: $p=0,275$; Lymphgefäßinvasion: $p=0,652$; Blutgefäßinvasion: $p>0,999$; VIN in der Anamnese: $p=0,249$; Kondylome in der Anamnese: $p>0,999$; Immunsuppression: $p=0,547$; Nikotinabusus: $p>0,999$; CIN/Zervixkarzinom in der Anamnese: $p=0,585$; Parität: $p=0,800$; Pilleneinnahme: $p=0,089$; Hormoneinnahme: $p=0,663$; gynäkologische Malignome in der Anamnese: $p=0,585$; Pap-Abstrich: $p>0,999$; HPV-Abstrich Zervix: $p=0,139$; Lichen sclerosus in der Tumorumgebung: $p=0,121$; p53-Überexpression: $p=0,435$; p16^{INK4a}-Expression: $p=0,838$; Ki-67: $p=0,098$) (Tabelle 7).

3.3.5 Klinisches Erscheinungsbild

Ein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,001$; exakter Fisher-Test) wurde bezüglich des klinischen Erscheinungsbildes zwischen den beiden Gruppen festgestellt. 45,8% der Tumore der vorderen Kommissur vs. 17,3% der Tumore anderer Lokalisationen kommen als Ulcus und 44,9% vs. 73,1% als erhabener Tumor vor (Tabelle 4 ; Abb. 16 ; Abb. 18). Hinsichtlich des führenden Symptoms war ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen nicht nachweisbar ($p=0,228$; exakter Fisher-Test). Die meisten Frauen beider Gruppen haben sich entweder wegen Schmerzen, Brennen und/oder Dysurie, oder wegen eines tastbaren Tumors beim Arzt vorgestellt.

3.3.6 Pilleinnahme

Hinsichtlich der Verhütung mit der Pille hat sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ergeben ($p=0,005$; exakter Fisher-Test). 26,2% der Frauen mit Karzinomen der vorderen Kommissur vs. 5% der Frauen mit Tumoren anderer Lokalisationen haben die Pille als Verhütungsmethode eingesetzt (Tabelle 4). Das beruht auf dem Altersunterschied der zwei Gruppen.

3.3.7 Tumorumgebung

Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen hinsichtlich des Nachweises von VIN und Lichen sclerosus in der Tumorumgebung wurde demonstriert ($p=0,006$ und $p=0,002$; jeweils exakter Fisher-Test) (Tabelle 4).

46,4% der Tumore der vorderen Kommissur vs. 23,1% der Karzinome anderer Lokalisationen waren von einer VIN-Läsion umgeben. Andererseits zeigten nur 3,7% der Karzinome der vorderen Kommissur vs. 19,2% der Referenztumore einen Lichen sclerosus in ihrer Umgebung. Innerhalb der Gruppe der Karzinome der vorderen Kommissur war der Unterschied hinsichtlich der umgebenden VIN zwischen den HPV-

positiven und den HPV-negativen Tumoren (60,9% vs. 35,9%) statistisch signifikant ($p=0,010$; Chi²-Test) (Tabelle 5 ; Diagramm 5). Diese Beobachtungen unterstützen die Einteilung des Vulvakarzinoms in zwei Gruppen je nach Entstehungsmechanismus, nämlich die HPV-assoziierten Tumore der jüngeren und die Lichen-assoziierten Karzinome der älteren Frauen.

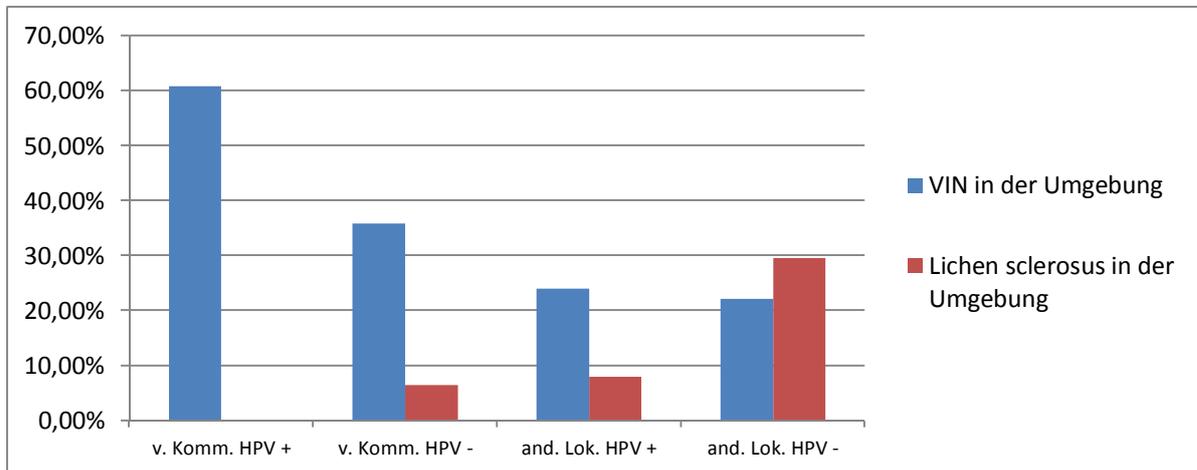


Diagramm 5: VIN und Lichen sclerosus in der Umgebung der untersuchten Vulvakarzinome

3.3.8 Tumorresektion

Bezüglich des Tumorresektionsstatus R (R1-Resektion bei 3,9% der Tumore der vorderen Kommissur vs. 21,2% bei den Referenztumoren) ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p<0,001$; Chi²-Test auf linearen Trend), was offensichtlich auf den niedrigeren Tumorstadium der Tumore der vorderen Kommissur zurückzuführen ist (Tabelle 4). Die Chance auf eine R0-Resektion war bei den Karzinomen der vorderen Kommissur sechs-mal höher als bei den Tumoren der Referenzgruppe.

3.3.9 Weitere klinische Parameter

Hinsichtlich der restlichen untersuchten klinischen Parameter (Nodalstatus: $p=0,087$; Fernmetastasierung: $p=0,380$; Differenzierungsgrad: $p=0,320$; Lymphgefäßinvasion: $p=0,199$; Blutgefäßinvasion: $p=0,380$; VIN in der Anamnese: $p=0,183$; CIN/Zervixkarzinom in der Anamnese: $p=0,624$; gynäkologische Malignome in der Anamnese: $p=0,328$; Kondylome: $p>0,999$; Immunsuppression: $p=0,675$; Nikotinabusus: $p=0,332$; Parität: $p=0,974$; Hormoneinnahme: $p=0,758$; Pap-Abstrich-Befund: $p=0,349$; HPV-Zervixabstrich-Befund: $p=0,932$) konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen nachgewiesen werden. Das gleiche gilt auch für die untersuchten molekulargenetischen Parameter (p53-Überexpression: $p=0,111$; p16^{INK4a}-Expression: $p=0,663$; Ki-67: $p=0,741$) (Tabelle 4).

3.3.10 p53

In beiden Tumorlokalisationsgruppen wiesen die HR-HPV negativen Tumore häufiger eine starke p53-Überexpression als die HR-HPV positiven (vordere Kommissur: 48,0% vs. 25,5% ; p=0,008 ; Referenztumore: 40% vs. 18,2% ; p=0,078 ; jeweils Chi²-Test auf linearen Trend) (Tabelle 5 ; Tabelle 6).

3.3.11 p16^{INK4a} und Ki-67

In beiden Tumorlokalisationsgruppen trat bei den HR-HPV positiven Tumoren statistisch signifikant eine diffuse p16^{INK4a}-Überexpression auf, im Vergleich zu den HR-HPV negativen Karzinomen (vordere Kommissur: p=0,001 ; Referenztumore: p=0,002 ; jeweils Chi²-Test) (Tabelle 5 ; Tabelle 6).

3.4 Pap-Abstrich und HPV-Zervixabstrich beim Vulvakarzinom

| | | Vulva-Ca HPV negativ | Vulva-Ca HPV positiv | Gesamt | p-Wert | Test |
|--------------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------|--------|--|
| Anzahl der Patienten (n) | | 103 | 80 | 183 | | |
| Pap-Abstrich | I + II | 58 (56,3%) | 55 (68,7%) | 113 (95,0%) | 0,392 | Chi ² -Test auf linearen Trend |
| | III, IIIId + IVa | 2 (1,9%) | 4 (5,0%) | 6 (5,0%) | | |
| | unbekannt | 43 | 21 | 64 | | |
| HPV-Abstrich Zervix | negativ | 21 (38,9%) | 10 (12,5%) | 31 (57,4%) | 0,056 | Chi ² -Test auf linearen Trend |
| | positiv, low risk | 10 (18,5%) | 8 (14,8%) | 18 (33,3%) | | |
| | positiv, high risk | 1 (1,9%) | 4 (7,4%) | 5 (9,3%) | | |
| | unbekannt | 71 | 58 | 129 | | |

Tabelle 13: Pap- und HPV-Zervix Abstrichbefunde bei den HPV-positiven und HPV-negativen untersuchten Vulvakarzinomen.

Nur bei 5% der Frauen lag ein pathologischer Pap-Abstrich Befund vor. Ein für HR-HPV positiver HPV-Abstrich aus der Zervix trat bei 7,4% der Patientinnen mit HR-HPV positiven- Karzinomen und bei 1,9% der Patientinnen mit HR-HPV-negativen Karzinomen auf. In allen untersuchten Tumoren (vordere Kommissur und andere Lokalisationen) konnte keine Abhängigkeit zwischen dem HPV-Status des Tumors und dem Pap- oder dem HPV-Zervix-Abstrichbefund nachgewiesen werden (p=0,392 ; p=0,056 ; jeweils Chi²-Test auf linearen Trend) (Tabelle 13).

3.5 Kombinationen von HR-HPV-, p16^{INK4a}- und p53- Status

Der Nachweis einer HR-HPV Infektion in einem Tumor reicht allein nicht aus, um daranzuschliessen, dass es sich um eine HR-HPV induzierte Onkogenese handelt. Ein positiver HPV-DNA Nachweis im Gewebe kann auch nur eine vorübergehende HPV-Infektion oder eine Kontamination der Haut mit HPV darstellen.

Die Überexpression von p16^{INK4a} hängt mit der durch persistierende HR-HPV Infektion verursachten onkogenen Transformation direkt zusammen. Der Nachweis einer Überexpression von p16^{INK4a} deutet auf eine durch die HR-HPV-Onkoproteine verursachte Inaktivierung der Zellzyklussteuerung hin, die zur Onkogenese beiträgt. Die am besten geeignete Methode, HR-HPV induzierte Karzinome zu identifizieren, ist der synchrone Nachweis von HR-HPV DNA und p16^{INK4a} (von Knebel Doeberitz 2002, Wentzensen 2007). Zellen, die das E7 HPV-Onkoprotein exprimieren, weisen eine erhebliche p16^{INK4a}-Überexpression auf.

Es wurden drei Kombinationen von HR-HPV-, p16^{INK4a}- und p53- Status festgelegt, um die Vulvatumore nach ihren onkogenetischen Mechanismen einzuteilen (Tabelle 14):

1. Tumore entstanden durch eine persistierende HR-HPV Infektion und Transformation (HR-HPV positiv, p16^{INK4a} positiv und p53 unmaßgeblich). HR-HPV positive und p16^{INK4a} positive Tumore fanden sich zu 21,4% in der vorderen Kommissur und zu 27,7% in anderen Lokalisationen. Diese Karzinome hatten die kleinste Größe zwischen den Tumoren der 3 aufgelisteten Gruppen.
2. Tumore bei denen eine p53-Inaktivierung ursächlich zu sein scheint (starke p53-Expression, HR-HPV und p16^{INK4a} unmaßgeblich – Ausnahme: HR-HPV und p16^{INK4a} positive Tumore, die in der ersten Gruppe eingeteilt werden). p53-Mutationen traten etwas häufiger bei den Tumoren der vorderen Kommissur auf (33,6% vs. 29,8% ; p=0,365).
3. Tumore unklarer Genese, die weder HPV-induziert zu sein scheinen, noch eine p53-Überexpression aufweisen (in der Mehrheit HR-HPV-, p16^{INK4a}- und p53 negativ). Diese Tumore haben die Mehrheit der untersuchten Tumore repräsentiert (40,3% in der vorderen Kommissur und 42,6% in den anderen Lokalisationen) und haben sich klinisch häufig als Flecken manifestiert.

| | HPV-induzierte Tumore | Tumore mit p53-Überexpression | Tumore unklarer Genese |
|----------------------------|------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|
| HR-HPV | positiv | positiv/negativ | positiv/negativ |
| p16^{INK4a} | positiv | negativ | negativ |
| p53-Überexpression | schwach/negativ | positiv | schwach/negativ |

Tabelle 14: Kombinationen der molekulargenetischen Merkmale nach onkogenetischem Mechanismus

Tabelle 15 und Abb. 19 geben die Einteilung der Tumore der vorderen Kommissur nach Entstehungsmechanismus an.

| | HPV-induzierte Tumore | Unklarer Genese | Tumore mit p53-Überexpression |
|--------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------------|
| Tumore der vorderen Kommissur | | | |
| Insgesamt | 21,4% (27/126) | 40,3% (54/126) | 33,6% (45/126) |
| Durchschnittsalter | 55,6 J | 55 (p=0,891) | 60,1 (p=0,259) |
| Nikotinabusus | 31,80% | 26,7% (p=0,660) | 35,1% (p=0,795) |
| Immunsuppression | 0,00% | 8,0% (p=0,146) | 4,5% (p=0,279) |
| Fleck | 7,70% | 15,8% (p=0,613) | 5,0% (p=0,834) |
| Ulcus | 46,20% | 44,70% | 42,50% |
| Erhabener Tumor | 46,20% | 39,50% | 52,50% |
| VIN | 66,70% | 39,1% (p=0,029) | 40,5% (p=0,046) |
| pT1a | 33,30% | 22,2% (p=0,666) | 26,7% (p=0,531) |
| pT1b | 40,70% | 46,30% | 33,30% |
| pT2 | 25,90% | 29,60% | 35,60% |
| pT3 | 0,00% | 1,90% | 4,40% |
| pN0 | 72,20% | 76,2% (p=0,352) | 69,7% (p=0,913) |
| pN1 | 16,70% | 21,40% | 21,20% |
| pN2 | 11,10% | 2,40% | 9,10% |
| M0 | 100% | 98,0% (p=0,472) | 97,7% (p=0,442) |
| M1 | 0,00% | 2,00% | 2,30% |
| G1 | 4,00% | 11,5% (p=0,557) | 4,7% (p=0,979) |
| G2 | 72% | 65,40% | 69,80% |
| G3 | 24% | 23,10% | 25,60% |
| Hohe Ki-67 Expression | 3,80% | 30,2% (p=0,061) | 13,3% (p=0,234) |
| Niedrige Ki-67 Expression | 15,40% | 13,20% | 28,90% |

Tabelle 15: Einteilung der Tumore der vorderen Kommissur nach Entstehungsmechanismus.

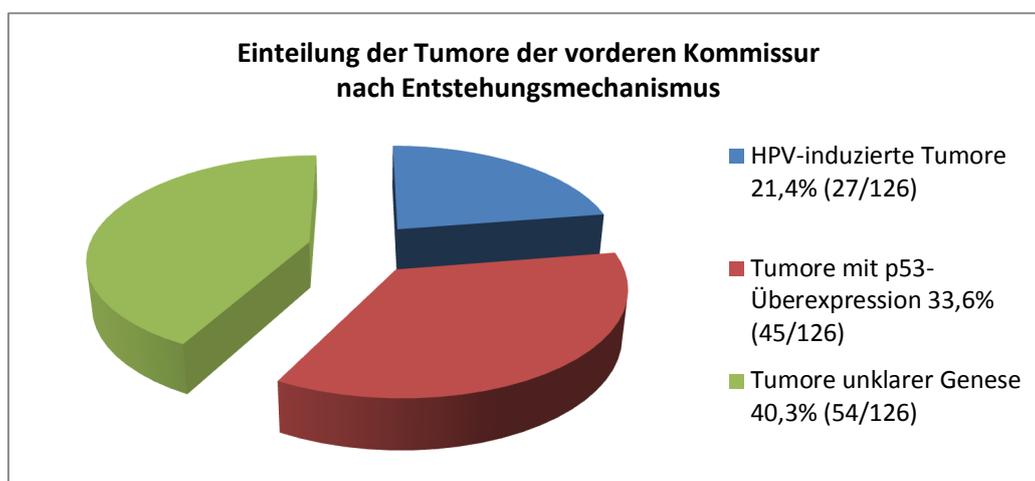


Abb. 19: Einteilung der Tumore der vorderen Kommissur nach Entstehungsmechanismus.

Tabelle 16 und Abb. 20 geben die Einteilung der Tumore der anderen Lokalisationen nach Entstehungsmechanismus an.

| | HPV-induzierte Tumore | Unklarer Genese | Tumore mit p53-Überexpression |
|--------------------------------------|-----------------------|----------------------|-------------------------------|
| Tumore anderer Lokalisationen | | | |
| Insgesamt | 27,7% (13/47) | 42,6% (20/47) | 29,8% (14/47) |
| Durchschnittsalter | 54,9 | 63,2 (p=0,061) | 69,4 (p=0,006) |
| Nikotinabusus | 53,80% | 25% (p=0,092) | 0,0% (p=0,004) |
| Immunsuppression | 0,00% | 0,00% | 7,1% (p=0,326) |
| Fleck | 15,40% | 10,0% (p=0,893) | 7,1% (p=0,780) |
| Ulcus | 15,40% | 15,00% | 14,30% |
| Erhabener Tumor | 69,20% | 75,00% | 78,60% |
| VIN | 30,80% | 30,0% (p=0,963) | 14,3% (p=0,303) |
| pT1a | 15,40% | 15,8% (p=0,991) | 28,6% (p=0,051) |
| pT1b | 23,10% | 21,10% | 28,60% |
| pT2 | 61,50% | 63,20% | 35,70% |
| pT3 | 0,00% | 0,00% | 7,10% |
| pN0 | 72,70% | 63,2% (p=0,378) | 57,1% (p=0,444) |
| pN1 | 27,30% | 21,10% | 28,6% |
| pN2 | 0,00% | 15,80% | 14,30% |
| M0 | 100% | 95,0% (p=0,413) | 92,9% (p=0,326) |
| M1 | 0,00% | 5,00% | 7,10% |
| G1 | 7,70% | 5,3% (p=0,208) | 0% (p=0,367) |
| G2 | 92,30% | 73,70% | 92,80% |
| G3 | 0,00% | 21,10% | 7,10% |
| Hohe Ki-67 Expression | 0,00% | 35,0% (p=0,059) | 21,4% (p=0,011) |
| Niedrige Ki-67 Expression | 46,20% | 15,00% | 0,00% |

Tabelle 16: Einteilung der Tumore der anderen Lokalisationen nach Entstehungsmechanismus.

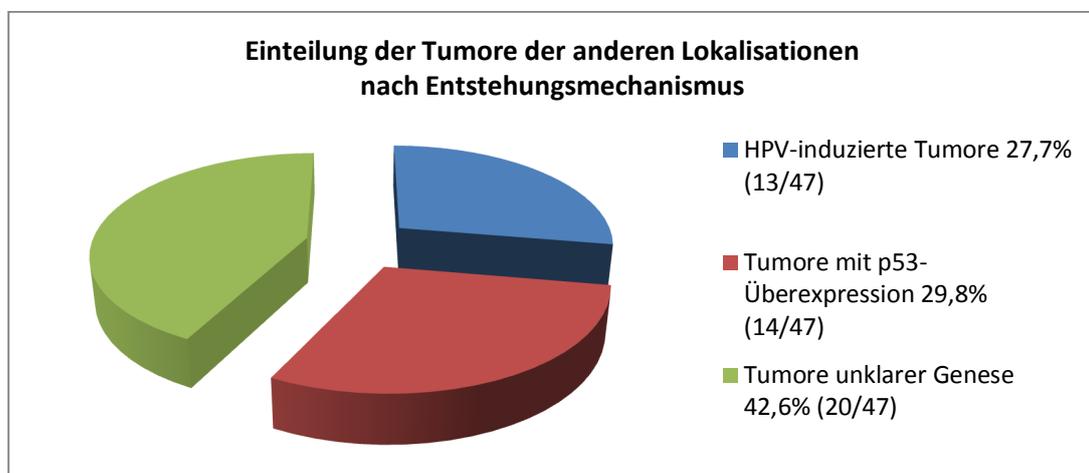


Abb. 20: Einteilung der Tumore der anderen Lokalisationen nach Entstehungsmechanismus.

Sowohl in der Gruppe der vorderen Kommissur, als auch in der Referenztumoregruppe war der Großteil der Tumore unklarer Genese (40,3% und 42,6%). Bezüglich des Tumorentstehungsmechanismus, war das Verteilungsmuster in beiden Lokalisationsgruppen ähnlich. Tumore der vorderen Kommissur: HPV-Transformation: 21,4% ; p53-Überexpression: 33,6% ; unklare Genese: 40,3%. Tumore anderer Lokalisationen: HPV-Transformation: 27,7% ; p53-Überexpression: 29,8% ; unklare Genese: 42,6% (Abb. 19 und Abb. 20).

Ein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Tumorentstehungsmechanismus bestand zwischen der Gruppe der Tumore der vorderen Kommissur und der Gruppe der Tumore anderer Lokalisationen nicht. Es zeigte sich aber ein Trend, dass Tumore der vorderen Kommissur seltener HPV-induziert zu sein scheinen, dafür das Tumorsuppressorgen p53 häufiger ausgeschaltet zu sein scheint.

3.5.1 Tumore der vorderen Kommissur

Die Tumore der vorderen Kommissur mit HPV-Transformation zeigten signifikant häufiger eine VIN in ihrer Umgebung im Vergleich zu den Tumoren mit p53-Überexpression und Tumoren unklarer Genese der gleichen Lokalisation ($p=0,046$; $p=0,029$) (Tabelle 15). Die Tumore unklarer Genese wiesen im Vergleich zu den Tumoren mit HPV-Transformation und den Tumoren mit p53-Mutation eine niedrigere Proliferationsrate auf (ausgedrückt durch die Ki-67-Expression ; $p=0,061$; $p=0,234$) (Tabelle 15).

Bei den Frauen mit Vulvakarzinomen der vorderen Kommissur fanden sich ein ähnliches Durchschnittsalter (etwas höheres Alter, aber statistisch nicht signifikant bei den p53-überexprimierenden Tumoren) und eine vergleichbare Häufigkeit von Nikotinabusus in allen 3 Gruppen.

Bei den Patientinnen mit Karzinomen mit HPV-Transformation fand sich weder eine Immunsuppression noch eine Fernmetastasierung (Tabelle 15).

3.5.2 Tumore anderer Lokalisationen

Die Frauen mit Tumoren mit HPV-Transformation in anderen Lokalisationen waren jünger als diejenigen mit Tumoren unklarer Genese ($p=0,061$) und p53-Überexpression ($p=0,006$) (Tabelle 16). Diese Patientinnen gaben häufiger eine Nikotinabususanamnese (53,8%) im Vergleich zu der Gruppe der Tumore mit p53-Überexpression (0% ; $p=0,004$) und der Tumore unklarer Genese (25% ; $p=0,092$) an.

Die Tumore anderer Lokalisationen mit p53-Überexpression befanden sich in höheren T-Tumorstadien und zeigten häufiger befallene Leistenlymphknoten. Diese Tumore, sowie die Tumore unklarer Genese wiesen ein höheres Grading und eine niedrigere Proliferationsrate (angegeben durch Ki-67 Expression) im Vergleich zu den Tumoren mit HPV Transformation ($p=0,011$ und $p=0,059$) (Tabelle 16).

Analog zu der Gruppe der Tumore der vorderen Kommissur, kam bei keiner Patientin mit HPV-Transformation-induziertem Tumor eine Immunsuppression oder Fernmetastasierung vor (Tabelle 16).

3.5.3 Tumore vorderer Kommissur vs. Tumore anderer Lokalisationen in Bezug auf unterschiedlichen Entstehungsmechanismen

Vergleicht man die Ergebnisse der Tabelle 15 (Tumore der vorderen Kommissur) mit den Ergebnissen der Tabelle 16 (Tumore anderer Lokalisationen), so fällt folgendes auf:

1. Alter: Das Durchschnittsalter der Patientinnen mit Tumoren der vorderen Kommissur ist bei den 3 Tumorentitäten ähnlich (bei den Tumoren mit p53-Überexpression eher höher, jedoch statistisch nicht signifikant, $p=0,259$) (Tabelle 15). In der Gruppe der Referenztumoren sind die Frauen mit HPV-induzierten Tumoren deutlich jünger (54,9J vs. 63,2J und 69,4J ; $p=0,061$; $p=0,006$) (Tabelle 16).
2. Nikotinabusus: 53,8% der Frauen mit HPV-induzierten Karzinomen anderer Lokalisationen waren Raucherinnen, während keine Patientin mit p53-überexprimierendem Tumor dieser Lokalisationsgruppe einen Nikotinabusus angegeben hat ($p=0,004$) (Tabelle 16). Im Gegensatz dazu, ergaben sich bei den 3 Entitäten der Tumoren der vorderen Kommissur keine signifikante Unterschiede bezüglich des Nikotinabusus (31,8% vs. 26,7% und 35,1%) (Tabelle 15).
3. Erscheinung: In der Gruppe der Referenztumore zeigte sich deutlich häufiger das klinische Erscheinungsbild eines erhabenen Tumors im Vergleich zu den Tumoren der vorderen Kommissur bei allen 3 Entitäten (69,2%, 75,0% und 78,6% vs. 46,2%, 39,5% und 52,5%) (Tabellen 15 und 16), während die Karzinome aller 3 Entitäten der vorderen Kommissur deutlich häufiger als Ulcus erschienen (46,2%, 44,7% und 42,5% vs. 15,4%, 15,0% und 14,3%).
4. Tumorstadium: Bei beiden Lokalisationsgruppen befanden sich die p53-überexprimierenden Karzinome häufiger in einem höheren Tumorstadium und die HPV-induzierten Tumore häufiger in einem früheren Tumorstadium.

5. Nodalstatus: Bei den HPV-induzierten Referenztumoren fand sich häufiger eine Lymphknotenmetastasierung (pN1) im Vergleich zu den HPV-induzierten Tumoren der vorderen Kommissur (27,3% vs. 16,7%) (Tabelle 15 ; Tabelle 16).
6. Grading: Die HPV-induzierten und die p53-überexprimierenden Tumore der vorderen Kommissur wiesen deutlich häufiger einen G3-Status im Vergleich zu den Referenztumoren dieser 2 Entitäten auf (24,0% und 25,6% vs. 0,0% und 7,1%) (Tabelle 15 ; Tabelle 16).
7. Ki-67 Expression: Bei beiden Lokalisationsgruppen zeigten die Tumore unklarer Genese häufiger eine hohe Ki-67 Expression (vord. Kommissur 30,2% ; Referenztumore 35,0%) (Tabelle 15 ; Tabelle 16).

4. Diskussion

Das Vulvakarzinom ist ein seltener gynäkologischer Tumor (ca. 4% aller gynäkologischen Genitalmalignome) und tritt meistens bei älteren Frauen auf. Nach dem heutigen Kenntnisstand gibt es zwei Tumorentitäten des Vulvakarzinoms: Das Vulvakarzinom der älteren Frauen, das mit Lichen sclerosus und p53-Überexpression assoziiert ist, und das Vulvakarzinom der jüngeren Frauen, das nach HPV-Infektion über VIN-Läsion entsteht und selten mit p53-Überexpression in Verbindung steht. Der Anteil der HPV-positiven Vulvakarzinome variiert von 9% bis 70% in verschiedenen Studien (Brandenberger 1992, Iwasawa 1997, Lerma 1999, Pinto 2004, Knopp 2006, Skapa 2007, Madsen 2008, Sutton 2008, Hampl 2008).

Im Gegensatz zum HPV-positiven Vulvakarzinom, ist der Kenntnisstand bez. des onkogenetischen Mechanismus des HPV-negativen Vulvakarzinoms deutlich niedriger. Es wurde vermutet, dass eine virale Komponente im Sinne eines bisher unbekanntes HPV-Typs oder eines Polyomavirus eine Rolle spielen könnte (zur Hausen 2009). Das HPV-negative Vulvakarzinom ist mit VIN-d und Lichen sclerosus assoziiert. Die Mehrheit der VIN-d Läsionen sind molekulargenetisch mit p53-Mutationen oder DNA-Deletionen verbunden, wobei eine Ähnlichkeit zu den p53-Mutationen beim Vulvakarzinom nachgewiesen worden ist (Pinto 2010).

In den letzten Jahren hat sich ein Abfall des Durchschnittsalters der Patientinnen mit Vulvakarzinom gezeigt und die Tumorlokalisierung in der vorderen Kommissur zwischen Klitoris und Urethra kommt immer häufiger vor (Hampl 2008). Diese Beobachtungen in der Frauenklinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf führten zur Initiierung der

vorliegenden Studie mit der Fragestellung, ob diese Karzinome der vorderen Kommissur einer neuen, 3. Tumorentität des Vulvakarzinoms entsprechen.

Im Rahmen dieser multizentrischen Studie wurden die klinischen, histopathologischen und molekulargenetischen Merkmale der Vulvakarzinome der vorderen Kommissur untersucht und mit den entsprechenden Merkmalen von Vulvatumoren anderer Lokalisationen verglichen. 135 Tumore der vorderen Kommissur und 52 Tumore anderer Lokalisationen (Referenztumore) wurden analysiert. Die untersuchten klinischen Parameter umfassten Alter bei Erstdiagnose, klinisches Erscheinungsbild und Beschwerdesymptomatik, Nikotinabusus, Immunsuppression, VIN in der Anamnese, CIN/Zervixkarzinom oder andere gynäkologische Malignome in der Anamnese, Parität, Kondylome in der Anamnese, Pille- oder Hormoneinnahme, VIN oder Lichen sclerosus in der Tumorumgebung, Pap- und HPV-Zervix-Abstrichbefunde, TNM-Stadium und Grading. Eine HPV-Typisierung, sowie eine Untersuchung nach Herpes simplex Virus und Epstein-Barr Virus wurden durchgeführt. Die beiden letzten Viren wurden in den vergangenen Jahren als fragliche Kofaktoren bei der Entstehung des Vulvakarzinoms diskutiert. Die Expression der Zellzyklusregulatoren p53 und p16^{INK4a}, sowie des Proliferationsmarkers Ki-67 wurden ebenfalls untersucht.

4.1 Unterschiede zwischen den Tumoren der vorderen Kommissur und den Referenztumoren

Es hat sich ein signifikanter Altersunterschied zwischen der Gruppe der Karzinome der vorderen Kommissur und der Gruppe der Karzinome anderer Lokalisationen ergeben, wobei die Patientinnen der ersten Gruppe im Mittel jünger waren (Durchschnittsalter 56,8J vs. 63,1J ; $p=0,006$; Tabelle 4). Ein signifikanter Altersunterschied zeigte sich auch zwischen den HR-HPV-negativen Karzinomen (66,3J vs. 57,4J ; $p=0,008$; Tabelle 8), jedoch nicht zwischen den HR-HPV-positiven Karzinomen (59,6J vs. 56,0J ; $p=0,347$; Tabelle 7) der beiden Lokalisationsgruppen. D.h. die Patientinnen mit Tumoren der vorderen Kommissur sind jünger, unabhängig vom HPV-Status des Tumors. Ein wesentlicher Altersunterschied zwischen HR-HPV positiven und HR-HPV negativen Karzinomen zeigte sich bei den Referenztumoren, jedoch nicht bei den Tumoren der vorderen Kommissur. Die Ursache für den Altersunterschied zwischen den beiden Tumorguppen ist bislang unklar.

Die Tumore der vorderen Kommissur zeigten häufiger ($p<0,001$) ein früheres Tumorstadium (67,9% vs. 37,3% im Stadium pT1) (Tabelle 4) ohne signifikanten Unterschied ($p=0,058$) bezüglich der Lymphknotenmetastasierungstendenz im jeweiligen Tumorstadium im Vergleich zu den Referenztumoren (Tabelle 11).

42% der Tumore der vorderen Kommissur und 48,1% der Tumore anderer Lokalisationen waren HR-HPV positiv, wobei das HPV-Verteilungsmuster bei beiden Lokalisationsgruppen ähnlich war und der HPV 16 der am häufigsten identifizierte HPV-Typ gewesen ist (86,8% und 87%). Die nachgewiesenen HPV-Typen in unserer Studie entsprechen den bisherigen Beobachtungen (HPV 16, 33 und 45 in 93,4% der HPV-positiven Vulvakarzinome - Skapa 2007 ; HPV 16 in 85% der HPV-positiven Vulvakarzinome, sonst HPV 45 und 33 – Kagie 1997 ; HPV 16 in 71% der HPV-positiven Vulvakarzinome, sonst HPV 18 – Trimble 1996). Ein HR-HPV positiver HPV-Abstrich der Zervix kann nach unseren Ergebnissen nicht als Risikofaktor für die Entstehung eines HR-HPV positiven Vulvakarzinoms gewertet werden.

Die Mehrheit der Tumore der vorderen Kommissur zeigen sich klinisch als Ulcus, während der Hauptanteil der Karzinome anderer Lokalisationen als erhabener Tumor vorkommt (Abb. 16 ; Abb. 18). 46,4% der Tumore der vorderen Kommissur waren von einer VIN, dagegen 19,2% der Referenztumore von einem Lichen sclerosus umgeben. Dies beruht darauf, dass innerhalb der Gruppe der Karzinome der vorderen Kommissur bei den HR-HPV positiven Tumoren signifikant häufiger eine VIN in der Umgebung histologisch diagnostiziert wurde im Vergleich zu den HR-HPV negativen Karzinomen. Eine Assoziation zu einem Lichen sclerosus ließ sich in dieser Gruppe nicht nachweisen.

Lediglich 4,8% (n=6) der Patientinnen mit Vulvakarzinom der vorderen Kommissur (vs. 1,9% ; n=1 der Patientinnen der Referenzgruppe, statistisch nicht signifikanter Unterschied ; p=0,675) waren immunsupprimiert. Keine Patientin war HIV positiv.

Bezüglich der untersuchten klinischen Parameter Nodalstatus, Fernmetastasierung, Kardinalsymptom, Differenzierungsgrad, Lymphgefäßinvasion, Blutgefäßinvasion, VIN in der Anamnese, CIN/Zervixkarzinom oder andere gynäkologische Malignome in der Anamnese, Kondylome, Immunsuppression, Nikotinabusus, Parität, Hormoneinnahme, Pap-Abstrich-Befund und HPV-Zervix-Abstrichbefund konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Lokalisationsgruppen nachgewiesen werden. Das gleiche gilt auch für die untersuchten molekulargenetischen Parameter (p53-Überexpression, p16^{INK4a}-Expression, Ki-67), wobei sich jedoch ein Trend zur häufigeren p53-Überexpression bei den Tumoren der vorderen Kommissur zeigte (Tabelle 4). Die HR-HPV positiven Karzinome der vorderen Kommissur zeigten signifikant häufiger eine diffuse p16^{INK4a}-Expression und signifikant seltener eine p53-Überexpression als die HR-HPV negativen Tumore dieser Gruppe (Tabelle 5).

Herpes simplex Virus und Epstein-Barr Virus wurden in keinem der untersuchten Vulvakarzinome nachgewiesen. Nach unseren Befunden gibt es somit keinen Anhalt für eine Beteiligung dieser beiden Viren an der Pathogenese des Vulvakarzinoms.

4.2 Vergleich HPV-positive vs. HPV-negative Tumore der zwei Lokalisationsgruppen

Es zeigte sich ein signifikanter Altersunterschied zwischen den HR-HPV-negativen Karzinomen (66,3J vs. 57,4J ; $p=0,008$) (Tabelle 8), jedoch nicht zwischen den HR-HPV-positiven Karzinomen (59,6J vs. 56,0J ; $p=0,347$) (Tabelle 7) der zwei Lokalisationsgruppen.

Die HR-HPV positiven Tumore zeigten keine signifikant unterschiedliche Lymphknotenmetastasierungstendenz als die HR-HPV negativen Tumore, sowohl innerhalb jeder einzelner Lokalisationsgruppe (Tabelle 5 ; Tabelle 6), als auch in der Gesamtheit der untersuchten Tumore (Tabelle 12), sodass nach unseren Daten die HR-HPV-Positivität oder Negativität keinen Risikofaktor für Lymphknotenmetastasen beim Vulvakarzinom darstellt. Die HPV-positiven Vulvakarzinome scheinen erfahrungsgemäß weniger aggressiv zu sein. Lindell et al. konnten eine statistisch signifikant höhere Überlebensrate bei Frauen mit HPV-positiven Vulvakarzinomen im Vergleich zu Patientinnen mit HPV-negativen Tumoren nachweisen, jedoch ohne signifikanten Unterschied hinsichtlich des Leistenlymphknotenbefalls zwischen den beiden Gruppen (Lindell und Näsmann 2010). Weitere Arbeitsgruppen berichten über ähnliche Befunde bezüglich der Überlebensrate (Monk 1995, Knopp 2006, Sutton 2008), während andere Studienergebnisse diese Behauptung nicht unterstützen (Pinto 1999, Pinto 2004). In unserer Studie konnten wir die These bezüglich der niedrigeren Aggressivität der HPV-positiven Vulvakarzinome für die Tumore der vorderen Kommissur unterstützen ($p=0,008$), jedoch nicht für die Tumore anderer Lokalisationen ($p=0,657$), da die Tumore der vorderen Kommissur in einem niedrigeren Tumorstadium diagnostiziert wurden (Tabelle 5 ; Tabelle 6).

Im Gegensatz dazu zeigten die HR-HPV positiven Tumore der Referenzgruppe eine statistisch signifikant stärkere Ki-67 Expression im Vergleich zu den HR-HPV negativen Tumoren dieser Gruppe ($p=0,028$) (Tabelle 6). Dieser Trend zeigt sich bei den Tumoren der vorderen Kommissur nicht ($p=0,814$) (Tabelle 5).

In beiden Lokalisationsgruppen wurde kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Tumordifferenzierungsgrades, der Lymphknoten- und Fernmetastasierungstendenz und der Neigung zur Lymph- bzw. Blutgefäßinvasion zwischen den HPV-positiven und HPV-negativen Tumoren nachgewiesen.

Innerhalb der Gruppe der Karzinome der vorderen Kommissur wurde bei den HR-HPV positiven Tumoren signifikant häufiger eine VIN in der Umgebung histologisch diagnostiziert im Vergleich zu den HR-HPV negativen Karzinomen. Hinweis auf einen Lichen sclerosus zeigte sich in dieser Gruppe nicht.

Die HR-HPV positiven Karzinome der anderen Lokalisationen wiesen auch eine signifikant häufigere p16^{INK4a}-Expression und eine nicht signifikant seltenere p53-Überexpression im Vergleich zu den HR-HPV negativen Tumoren dieser Gruppe auf (Tabelle 6). Diese Befunde stimmen somit mit der Theorie der zwei Vulvakarzinomentstehungsmechanismen überein, nämlich des HPV/p16^{INK4a}- und VIN-assoziierten, sowie des HPV-unabhängigen/p53- und Lichen-assoziierten Entstehungsmechanismus. Zu der ersten Entität des Vulvakarzinoms (Vulvakarzinom der jüngeren Frauen) gehören HPV-induzierte, über VIN-Vorstufen entstehende Karzinome, die selten eine p53-Überexpression zeigen. Histologisch sind diese Tumore nicht verhornende Plattenepithelkarzinome vom basaloiden oder verrukösen Typ. Beim Vulvakarzinom der älteren Frauen handelt es sich um Tumore, die sich nicht über VIN-Vorstufen entwickeln. Diese Tumore sind häufig mit einer p53-Überexpression und/oder einem Lichen sclerosus assoziiert und sind differenzierte verhornende Plattenepithelkarzinome.

4.3 HPV-negative Tumore: Tumore vorderer Kommissur vs. Tumore anderer Lokalisationen

In der Gruppe der HPV-negativen Karzinome waren die Patientinnen mit Tumoren der vorderen Kommissur statistisch signifikant jünger als die Frauen mit Tumoren anderer Lokalisationen (Durchschnittsalter 57,4J vs. 66,3J ; p=0,008). Ein Lichen sclerosus wurde statistisch signifikant häufiger in der Tumorumgebung der Referenztumoren histologisch nachgewiesen (29,6% vs. 6,5% ; p=0,006), nicht aber bei den Tumoren der vorderen Kommissur. Diese Beobachtungen spiegeln den Entstehungsmechanismus des nicht HPV-induzierten, Lichen-assoziierten Vulvakarzinoms der älteren Frauen wider (Tabelle 8). Dieser Mechanismus scheint für die Tumore anderer Lokalisationen zuzutreffen, während die Tumore der vorderen Kommissur diesem Paradigma nicht folgen. Der Grund dafür ist unklar.

Die Karzinome der vorderen Kommissur wurden statistisch signifikant häufiger in einem früheren Tumorstadium diagnostiziert im Vergleich zu den Referenztumoren (22,4% vs. 7,7% im Stadium pT1a, p=0,049). Hinsichtlich der restlichen untersuchten klinischen und molekulargenetischen Parameter (Nodalstatus, Fernmetastasierung, Differenzierungsgrad, Lymphgefäßinvasion, Blutgefäßinvasion, VIN in der Anamnese,

Kondylome in der Anamnese, Immunsuppression, Nikotinabusus, CIN/Zervixkarzinom in der Anamnese, Parität, Hormoneinnahme, gynäkologische Malignome in der Anamnese, Pap-Abstrich, Erscheinung, Kardinalsymptom, HPV-Zervix-Abstrich, VIN in der Tumorumgebung, p53-Überexpression, p16^{INK4a}-Expression, Ki-67) wurde kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Karzinomen der vorderen Kommissur und den Referenztumoren festgestellt (Tabelle 8).

4.4 HPV-positive Tumore: Tumore vorderer Kommissur vs. Tumore anderer Lokalisationen

In dieser Gruppe zeigte sich im Gegensatz zu den HPV-negativen Tumoren kein statistisch signifikanter Altersunterschied zwischen den beiden Lokalisationsgruppen (mittleres Alter bei den Tumoren der vorderen Kommissur 56,0J vs. 59,6J bei den Referenztumoren ; p=0,347).

Ähnlich wie bei den HPV-negativen Karzinomen, wurden die HPV-positiven Tumore der vorderen Kommissur statistisch signifikant häufiger in einem früheren Tumorstadium diagnostiziert im Vergleich zu den HPV-positiven Referenztumoren (81,8% vs. 32,0% im Stadium pT1, sowie 32,7% vs. 12,0% im Stadium pT1a ; p<0,001). Die HPV-positiven Tumore der vorderen Kommissur zeigten im Vergleich zu den Referenztumoren signifikant häufiger das klinische Erscheinungsbild eines Ulcus (54,5% vs. 16,0%) und signifikant seltener eines erhabenen Tumors (36,4% vs. 76,0%) (p=0,003), jedoch ohne einen signifikanten Unterschied hinsichtlich des Kardinalsymptoms. Eine VIN fand sich in der Tumorumgebung der Karzinome der vorderen Kommissur signifikant häufiger im Vergleich zu der Umgebung der Referenztumore (60,9% vs. 24,0% ; p=0,006) (Tabelle 7).

Bezüglich der restlichen untersuchten klinischen und molekulargenetischen Parameter ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Lokalisationsgruppen (Nodalstatus, Fernmetastasierung, Differenzierungsgrad, Lymphgefäßinvasion, Blutgefäßinvasion, VIN in der Anamnese, Kondylome in der Anamnese, Immunsuppression, Nikotinabusus, CIN/Zervixkarzinom in der Anamnese, Parität, Pilleeinnahme, Hormoneinnahme, gynäkologische Malignome in der Anamnese, Pap-Abstrich, HPV-Zervix-Abstrich, Lichen sclerosus in der Tumorumgebung, p53-Überexpression, p16^{INK4a}-Expression, Ki-67) (Tabelle 7).

4.5 Molekulargenetik und die 3 identifizierten Entstehungsmechanismen des Vulvakarzinoms

Nach dem Modell der Mehrschrittsonkogenese, muss eine Reihe von biochemischen und zellregulatorischen Kontrollmechanismen überwunden werden, um eine maligne

Entartung eines Zellklons hervorzurufen. Im Rahmen der Tumorprogression werden Tumorzellen plötzlich unabhängig von physiologischen wachstumsstimulierenden Signalen bzw. insensitiv gegenüber wachstumshemmenden oder apoptotischen Signalen. Die Abschaffung der Zellzykluskontrolle wird zumeist durch aktivierende Mutationen von Onkogenen oder durch die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen erreicht. Das p53 Tumorsuppressorgen spielt durch seine Funktion im Rahmen der Zellzyklusregulation und der Apoptose eine zentrale Rolle in der Entstehung einer großen Anzahl von soliden Tumoren. Seine Deaktivierung ist ein wichtiger Schritt in Richtung der Onkogenese. Bei Schädigung der zellulären DNA induziert p53 entweder Reparaturenzyme oder den programmierten Zelltod. Die p53-abhängige Zellzyklusregulation bewirkt eine Zyklusarretierung vor der S-Phase bei reparablen DNA-Schäden, um die nur während dieser Zyklusphase durchführbaren Reparaturvorgänge zu ermöglichen (Kastan 1991, Lane 1992).

Der Untersuchung der Expression des zyklinabhängige-Kinase-Inhibitors p16^{INK4a} kommt eine besondere Bedeutung zu. Die Expression von p16^{INK4a} wird durch das HR-HPV E7-Gen induziert und ihr Nachweis (diffuse Expression) bei HR-HPV positiven Tumoren weist auf eine virale Transformation der befallenen Zellen hin. Der HR-HPV DNA Nachweis allein reicht nämlich nicht aus, um eine viral bedingte Zellzyklusdysregulation und onkogene Wirkung zu beweisen (Wang 2004, Dehn 2007, Bergeron 2010, Galgano 2010).

In unserer Studie wurden die Karzinome nach der Kombination ihres HR-HPV-, p53- und p16^{INK4a}-Status in 3 Gruppen eingeteilt, ihrem Entstehungsmechanismus entsprechend:

1. HPV-induzierte Tumore (nach HR-HPV Infektion und Transformation - HR-HPV positiv und p16^{INK4a} positiv - entstandene Tumore)
2. Tumore mit p53-Überexpression (nach p53-Mutation entstandene Tumore - p53-Überexpression, HR-HPV positiv und p16^{INK4a} negativ oder HR-HPV negativ und p16^{INK4a} positiv/negativ)
3. Tumore unklarer Genese, die weder nach einer HR-HPV Infektion noch nach erfolgter p53-Mutation entstanden sind (in der Mehrheit HR-HPV-, p16^{INK4a}- und p53 negativ)

Der Tumorentstehungsmechanismus nach erfolgter HR-HPV Infektion (Kombination von HR-HPV-DNA-Nachweis und diffuser p16^{INK4a}-Expression) zeigte sich in einem kleineren Anteil der Tumore der vorderen Kommissur im Vergleich zu den Tumoren

anderer Lokalisationen (21,4% vs. 27,7%). Die diffuse p16^{INK4a}-Expression bei HR-HPV Positivität war in engem Zusammenhang mit der Abwesenheit einer p53-Überexpression. Ein kleiner Anteil der HR-HPV- und p16^{INK4a}-positiven Tumore zeigten jedoch eine starke p53-Überexpression (3,2% der Tumore der vorderen Kommissur), was auf das zusätzliche Auftreten von p53-Mutationen in einer HR-HPV-infizierten Zelle zurückgeführt werden kann.

Die Tumore mit p53-Überexpression waren in ihrer Mehrheit HR-HPV negativ und p16^{INK4a} negativ, sodass bei diesen Karzinomen eine HR-HPV induzierte Onkogenese ausgeschlossen werden konnte. Im Kollektiv der Frauen mit Tumoren der vorderen Kommissur zeigte sich ein ähnliches Durchschnittsalter zwischen den Patientinnen mit HR-HPV-induzierten Tumoren (HR-HPV positiv und p16^{INK4a} positiv) und den Patientinnen mit p53-überexprimierenden Tumoren (55,6J und 60,1J) (Tabelle 15). Im Gegensatz dazu, zeigte sich im Kollektiv der Tumoren anderer Lokalisationen ein ausgeprägter Durchschnittsaltersunterschied zwischen diesen beiden Gruppen (54,9J bei den HR-HPV induzierten und 69,4J bei den p53-überexprimierenden Tumoren) (Tabelle 16). In Zusammenschau mit der häufigen Anwesenheit eines umgebenden Lichen sclerosus bei diesen Tumoren, zeigt sich in unserer Studie das bekannte Gesamtbild der p53-induzierten, Lichen-assoziierten und HPV-unabhängigen Vulvakarzinomentstehung bei älteren Frauen, v.a. bei den Frauen mit Tumoren anderer Lokalisationen, während diese Genese bei den Frauen mit Tumoren der vorderen Kommissur p53-induziert auch bei jüngeren Frauen zu finden war.

Diese Studie zeigt, dass sowohl das Vulvakarzinom der vorderen Kommissur als auch der anderen Lokalisationen über drei verschiedene Onkogenese-Mechanismen entstehen kann: HR-HPV induziert, nach p53-Mutation oder über einen anderen Weg, der bisher unbekannt ist. Die meisten untersuchten Vulvakarzinome gehörten zu der Gruppe der Tumoren unklarer Genese (HR-HPV-, p16^{INK4a}- und p53-negativ). 40,3% der Tumoren der vorderen Kommissur und 42,6% der Tumoren anderer Lokalisationen wurden dieser Gruppe zugeteilt (Abb. 19 ; Abb. 20).

Das Durchschnittsalter der Frauen mit Karzinomen der vorderen Kommissur war jünger bei den p53-überexprimierenden Tumoren und den Tumoren unklarer Genese im Vergleich zu den Frauen mit Tumoren anderer Lokalisationen (Diagramm 6).

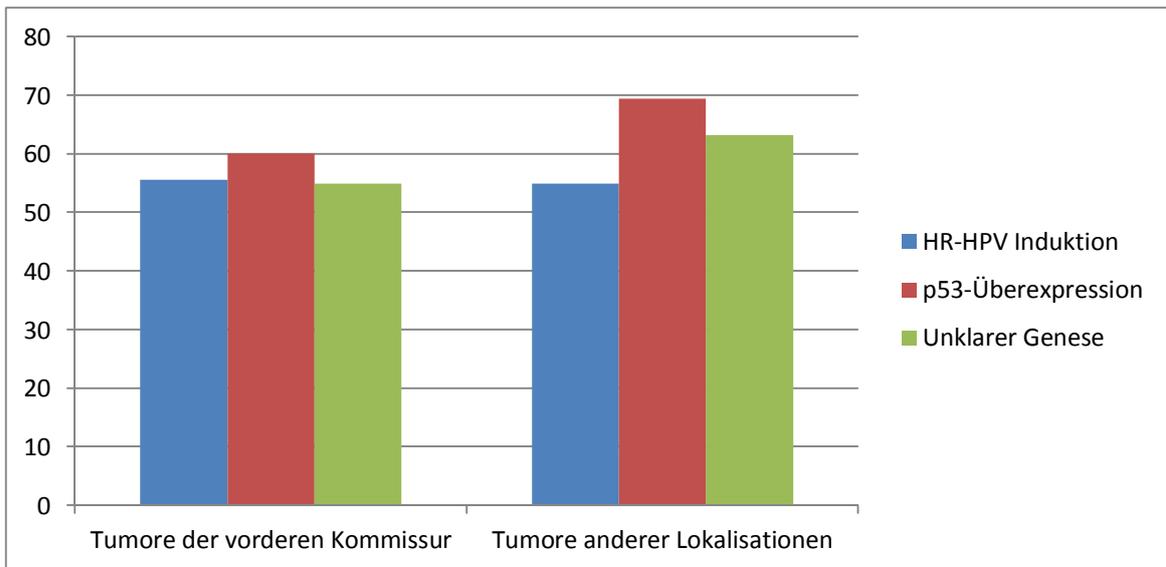


Diagramm 6: Durchschnittsalter der Frauen mit Vulvakarzinom für jeden Entstehungsmechanismus.

Im Gegensatz zu den Tumoren der vorderen Kommissur, zeigte sich bei den Referenztumoren ein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich des Nikotinabusus zwischen den verschiedenen Tumorentitäten (53,8% der Patientinnen mit HPV-induzierten Tumoren vs. 0% der Patientinnen mit p53-überexprimierenden Karzinomen) (Tabelle 15 ; Tabelle 16). Die Mehrheit der Tumore der vorderen Kommissur zeigt das klinische Bild eines Ulcus, während sich die Mehrheit der Karzinome anderer Lokalisationen als erhabener Tumor manifestiert. Dies gilt für alle 3 Entitäten der beiden Lokalisationsgruppen mit Ausnahme der p53-überexprimierenden Tumore der vorderen Kommissur (Tabelle 15 ; Tabelle 16). Bei den Karzinomen der vorderen Kommissur wurden die HPV-induzierten Tumore in einem früheren Tumorstadium und die p53-überexprimierenden Tumore in einem höheren Tumorstadium diagnostiziert. Bei den p53-überexprimierenden Referenztumoren lag häufiger eine Lymphknotenmetastasierung vor (pN1 28,6% vs. 21,2% bei den Tumoren der vorderen Kommissur) (Tabelle 15 ; Tabelle 16). Ein G3-Differenzierungsgrad fand sich deutlich häufiger bei den HPV-induzierten und den p53-überexprimierenden Karzinomen der vorderen Kommissur im Vergleich zu diesen 2 Entitäten der Referenztumore (24,0% und 25,6% vs. 0,0% und 7,1%), während bei beiden Lokalisationsgruppen eine hohe Ki-67 Expression häufiger bei den Tumoren unklarer Genese vorlag (Tabelle 15 ; Tabelle 16).

Die vorliegenden Daten (jüngeres Alter, früheres Tumorstadium, häufiger Ulcuserscheinung, häufiger VIN und seltener Lichen sclerosus in der Umgebung) rechtfertigen keine Klassifikation der Karzinome der vorderen Kommissur zwischen Klitoris und Urethra bei jüngeren Frauen als eine neue, 3. Tumorentität des Vulvakarzinoms. Der klinische Aspekt dieser Tumore besitzt aber weiterhin eine

bedeutende Wichtigkeit. Ärzte, insbesondere Gynäkologen und Dermatologen sollen darauf aufmerksam gemacht werden, dass auch bei jüngeren Frauen mit Beschwerden an der Vulva oder Miktionsbeschwerden ein Vulvakarzinom die Ursache der Beschwerden sein kann. Die traditionelle Einstellung, das Vulvakarzinom sei eine Erkrankung der älteren Frauen, ist nicht mehr haltbar. Die gesamte Vulva und insbesondere der Bereich der vorderen Kommissur müssen im Rahmen einer gynäkologischen Untersuchung bei entsprechenden Beschwerden immer ausführlich untersucht werden. Vulvabeschwerden wie Juckreiz oder Brennen sollten nicht routinemäßig auf Pilzinfektionen oder unklare Dermatosen zurückgeführt werden und bei unklarer Diagnose ist eine Überweisung in ein Zentrum für gynäkologische Onkologie/Dysplasiezentrum dringend zu empfehlen. Die Stelle zwischen Klitoris und Urethra sollte bei Angabe von insbesondere seit längerer Zeit bestehenden, therapieresistenten Beschwerden (Schmerzen, Brennen, Juckreiz, Dysurie) ausführlich untersucht werden. Beim Auftreten von Läsionen wie kleines Ulcus oder erhabener Tumor, sollte die Indikation zur Vulvoskopie und Biopsieentnahme von jeder suspekter Läsion großzügig und zeitnah gestellt werden.

5. Literaturverzeichnis

AGO-Leitlinie Vulvakarzinom: Interdisziplinäre S2k-Leitlinie für die Diagnostik und Therapie des Vulvakarzinoms und seiner Vorstufen. Herausgegeben von der Kommission Vulva Vagina der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie (AGO) e.V. in der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG) e.V. sowie in der Deutschen Krebsgesellschaft e.V. W. Zuckschwerdt Verlag, **2009**.

Al-Ghamdi A, Freedmann D, Miller D, Poh C, Rosin M, Zhang L, Gilks CB. Vulvar squamous cell carcinoma in young women: a clinicopathologic study of 21 cases. *Gynecol Oncol* **2002**;84:94-101.

Aurelian L. Herpes simplex virus type 2 and cervical cancer. *Clin Dermatol* **1984**;2:90-99.

Bauknecht T, Kiechle-Schwarz M, Brandstetter T. Onkogene, Wachstumsfaktoren und Suppressorgene beim Ovarialkarzinom und ihre prognostische Bedeutung. Review. *Klein Lab* **1994**;40:1215-1226.

Beller U, Quinn MA, Benedet JL, Creasmann WT, Ngan HYS, Maisonneuve P, Pecorelli S, Odicino F, Heintz ATM. Carcinoma of the vulva. *Int J Gynecol Obstet* **2006**;95:7-27.

Bergeron C. Conjunctive p16^{INK4a} testing significantly increases accuracy in diagnosing high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Clin Pathol* **2010**;133:395-406.

Bodelon C, Madeleine MM, Voigt LF, Weiss NS. Is the incidence of invasive vulvar cancer increasing in the United States? *Cancer Causes Control* **2009**;20:1779-1782.

Bouck N, Stellmach V, Hsu SC. How tumors become angiogenic. *Adv Cancer Res* **1996**;69:135-174.

Brandenberger AW, Rudlinger R, Hanggi W, Bersinger NA, Dreher E. Detection of human papillomavirus in vulvar carcinoma. A study by in situ hybridization. *Arch Gynecol Obstet* **1992**;252:31-35.

Brown DR, Schroeder JM, Bryan JT, Stoler MH, Fife KH. Detection of multiple human papillomavirus types in condylomata acuminata lesions from otherwise healthy and immunosuppressed patients. *J Clin Microbiol* **1999**;37:3316-3322.

Canavan TP, Cohen D: Vulvar cancer. *Am Fam Physician* **2002**;66:1269-1274,1276.

Carter J, Carlson J, Fowler J, Hartenbach E, Adcock L, Carson L, Twiggs LB. Invasive vulvar tumors in young women-a disease of the immunosuppressed? *Gynecol Oncol* **1993**;51:307-310.

Castle PE. Beyond human papillomavirus: the cervix, exogenous secondary factors, and the development of cervical precancer and cancer. *J Low Genit Tract Dis* **2004**;8:224-230.

Cheung AN, Khoo US, Kwong KY, Srivastava G, Collins RJ. Epstein-Barr virus in carcinoma of the vulva. *J Clin Pathol* **1993**;46:849-851.

Coleman N, Birley HD, Renton AM, Hanna NF, Ryait BK, Byrne M, Taylor-Robinson D, Stanley MA. Immunologic events in regressing genital warts. *Am J Clin Pathol* **1994**;102:768-774.

Colgan TJ. Vulvar Intraepithelial Neoplasia: a synopsis of recent developments. *J Lower Genital Tract Dis* **1998**;2:31-36.

Cormio G, Loizzi V, Gissi F, Serrati G, Panzarino M, Carriero C, Selvagi L. Cisplatin and Vinorelbine chemotherapy in recurrent vulvar carcinoma. *Oncology* **2009**;77:281-284.

Dehn D, Torkko KC, Shroyer KR. Human papillomavirus testing and molecular markers of cervical dysplasia and carcinoma. *Cancer* **2007**;111:1-14.

De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of Papillomaviruses. *Virology* **2004**;324:17-27.

Dillner J, Kjaer SK, Wheeler CM, Sigurdsson K, Iversen OE, Hernandez-Avila M, Perez G, Brown DR, Koutsky LA, Tay EH, Garcia P, Ault KA, Garland SM, Leodolter S, Olsson SE, Tang GW, Ferris DG, Paavonen J, Lehtinen M, Steben M, Bosch FX, Joura EA, Majewski S, Muñoz N, Myers ER, Villa LL, Taddeo FJ, Roberts C, Tadesse A, Bryan JT, Maansson R, Lu S, Vuocolo S, Hesley TM, Barr E, Haupt R. Four year efficacy of prophylactic human papillomavirus quadrivalent vaccine against low grade cervical, vulvar, and vaginal intraepithelial neoplasia and anogenital warts: randomised controlled trial. *BMJ* **2010**;340:c3493.

Dobbs SP, Hewett PW, Johnson IR, Carmichael J, Murray JC. Angiogenesis is associated with vascular endothelial growth factor expression in cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer* **1997**;76:1410-1415.

Duensing S, Lee LY, Duensing A, Basile J, Pibooniyom S, Gonzalez S, Crum CP, Munger K. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc Natl Acad Sci* **2000**;97:10002-10007.

Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci USA* **1983**;80:3812-3815.

Engelman DES, Andrade LALA, Vassallo J. Human papillomavirus infection and p53 protein expression in vulvar intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma. *Bras J Med Biol Res* **2003**;36:1159-1165.

Farrell AM, Millard PR, Schomberg KH, Wojnarowska F. An infective aetiology for vulvar lichen sclerosus re-addressed. *Clin Exp Dermatol* **1999**;24:479-483.

Ferenczy A, Coutlee F, Franco EL, Hankins C. Human papillomavirus and HIV coinfection and the risk of neoplasias of the low genital tract: a review of recent developments. *CMAJ* **2003**;169:431-434.

Ferenczy A, Franco EL. Prophylactic human papillomavirus vaccines: potential for sea change. *Expert Rev Vaccines* **2007**;6:511-525.

Franco EL, Schlecht NF, Saslow D. The epidemiology of cervical cancer. *Cancer J* **2003**;9:348-359.

Frisch M, Biggar RJ, Goedert JJ. Human papillomavirus-associated cancers in patients with human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. *J Natl Cancer Inst* **2000**;92:1500-1510.

Fuchs PG, Pfister H. Transcription of papillomavirus genomes. *Intervirology* **1994**;37:159-167.

Gage JR, Myers C, Wettstein FO. The E7 proteins of the non-oncogenic human papillomavirus type 6b (HPV-6b) and of the oncogenic HPV-16 differ in retinoblastoma protein binding and other properties. *J Virol* **1990**;64:723-730.

Galgano MT, Castle PE, Atkins KA, Brix WK, Nassau SR, Stoler MH. Using biomarkers as objective standards in the diagnosis of cervical biopsies. *Am J Surg Pathol* **2010**;34:1077-1087.

Garland SM, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Harper DM, Leodolter S, Tang GWK, Ferris DG, Steben M, Bryan J, Taddeo FJ, Railkar R, Esser MT, Sings HL, Nelson M, Boslego J, Sattler C, Barr E, Koutsky LA. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases. *NEJM* **2007**;356:1928-1943.

Gissmann L, Wolnik L, Ikenberg H, Koldowski U, Schnuerch HG, zur Hausen H. Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. *Proc Natl Acad Sci* **1983**;80:560-563.

Goffin F, Mayrand MH, Gauthier P, Alobaid A, Lussier C, Provencher D, Drouin P, Franco EL, Coutlée F. High-risk human papillomavirus infection of the genital tract of women with a previous history of recurrent high-grade vulvar intraepithelial neoplasia. *J Med Virol* **2006**;78:814-819.

Gotlieb WH: The assessment and surgical management of early stage vulvar cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **2003**;17:557-569.

Green MS, Naumann RW, Elliot M: Sexual dysfunction following vulvectomy. *Gynecol Oncol* **2000**;77:73-77.

Guidi AJ, Abu-Jawdeh G, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Dvorak HF, Brown LF. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* **1995**;87:1237-1245.

HAMPL M, Deckers-Figiel S, Hampl J, Rein D, Bender HG. New aspects of vulvar cancer: Changes in localisation and age of onset. *Gynecol Oncol* **2008**;109:340-345.

HAMPL M, Ramp U, Bender HG, Kueppers V. A case of a pT3, HPV 52-positive vulvar carcinoma in an 18-year-old woman. *Gynecol Oncol* **2006**;101:530-533.

HAMPL M, Sarajuuri H, Wentzensen N, Bender HG, Kueppers V. Effect of human papillomavirus vaccines on vulvar, vaginal, and anal intraepithelial lesions and vulvar cancer. *Obstet Gynecol* **2006**;108:1361-1368.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* **2000**;100:57-70.

Hart WR. Vulvar intraepithelial neoplasia: Historical aspects and current status. *Int J Gynecol Pathol* **2001**;20:16-30.

Hashida T, Yasumoto S. Induction of chromosome abnormalities in mouse and human epidermal keratinocytes by the human papillomavirus type 16 E7 oncogene. *J Gen Virol* **1991**;72:1569-1577.

Herod JJ, Shafi MI, Rollason TP, Jordan JA, Luesley DM. Vulvar intraepithelial neoplasia: long term follow up of treated and untreated women. *Br J Obstet Gynecol* **1996**;103:446-452.

Herrero R, Munoz N. Human papillomavirus and cancer. *Cancer Surv* **1999**;33:75-98.

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. *Obstet Gynecol* **1997**;90:748-754.

Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *NEJM* **1998**;338:423-428.

Hoevenaars BM, de Wilde PC, Massuger LF, Melchers WJ, de Hullu JA, Bulten J. A panel of p16^{INK4a}, MIB1 and p53 proteins can distinguish between the two pathways leading to vulvar squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* **2008**;123:2767-2773.

Homesley HD: Management of vulvar cancer. *Cancer* **1995**;76:2159-2170.

Hopman AH, Smedts F, Dignef W, Ummelen M, Sonke G, Mravunac M, Vooijs GP, Speel EJ, Ramaekers FC. Transition of high-grade cervical intraepithelial neoplasia to microinvasive carcinoma is characterized by integration of HPV 16/18 and numerical chromosomal abnormalities. *J Pathol* **2004**;202:23-33.

Hording U, Junge J, Daugaard S, Lundvall F, Poulsen H, Bock JE. Vulvar squamous cell carcinoma and papillomaviruses: indications for two different etiologies. *Gynecol Oncol* **1994**;52:241-246.

Hording U, Kringsholm B, Andreasson B, Visfeldt J, Daugaard S, Bock JE. Human papillomavirus in vulvar squamous-cell carcinoma and in normal vulvar tissues: a search for a possible impact of HPV on vulvar cancer prognosis. *Int J Cancer* **1993**;55:394-396.

Howe HL, Wingo PA, Thun MJ, Ries LA, Rosenberg HM, Feigal EG, Edwards BK. Annual report to the nation on the status of cancer (1973 through 1998), featuring cancers with recent increasing trends. *J Natl Cancer Inst* **2001**;93:824-842.

Howley P. Papillomaviridae: the viruses and their replication. In Fields B, Knipe D, Howley P (eds). *Fields Virology*. 3rd ed, 2nd Vol. Philadelphia: Lippincott-Raven, **1996**, pp 2045-2109.

Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J* **1991**;10:4129-4135.

Hullu de JA, Hollema H, Lolkema S, Boezen M, Bonstra H, Burger MP: Vulvar carcinoma: the price of less radical surgery. *Cancer* **2002**;95:2331-2338.

Husseinzadeh N, Recinto C. Frequency of invasive cancer in surgically excised vulvar lesions with intraepithelial neoplasia (VIN 3). *Gynecol Oncol* **1999**;73:119-120.

Iversen T, Tretli S. Intraepithelial and invasive squamous cell neoplasia of the vulva: trends in incidence, recurrence, and survival rate in Norway. *Obstet Gynecol* **1998**;91:969-972.

Iwasawa A, Nieminen P, Lehtinen M, Paavonen J. Human papillomavirus in squamous cell carcinoma of the vulva by polymerase chain reaction. *Obstet Gynecol* **1997**;89:81-84.

Jones RW. Vulvar intraepithelial neoplasia: Current perspectives. *Eur J Gynaecol Oncol* **2001**;22:393-402.

Jones RW, Baranyai J, Stables S. Trends in squamous cell carcinoma of the vulva: the influence of vulvar intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol* **1997**;90:448-452.

Jones RW, Rowan DM, Stewart AW. Vulvar intraepithelial neoplasia: aspects of the natural history and outcome in 405 women. *Obstet Gynecol* **2005**;106:1319-1326.

Joura EA, Leodolter S, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Koutsky LA, Garland SM, Harper DM, Tang GW, Ferris DG, Steben M, Jones RW, Bryan J, Taddeo FJ, Bautista OM, Esser MT, Sings HL, Nelson M, Boslego JW, Sattler C, Barr E, Paavonen J. Efficacy of a quadrivalent prophylactic human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like-particle vaccine against high-grade vulval and vaginal lesions: a combined analysis of three randomised clinical trials. *Lancet* **2007** 19;369(9574):1693-1702.

Joura EA, Losch A, Haider-Angeler MG, Breiteneker G, Leodolter S. Trends in vulvar neoplasia. Increasing incidence of vulvar intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma of the vulva in young women. *J Reprod Med* **2000**;45:613-615.

Judson PL, Habermann EB, Baxter NN, Durham SB, Virnig BA. Trends in the incidence of invasive and in situ vulvar carcinoma. *Obstet Gynecol* **2006**;107:1018-1022.

Junge J, Poulsen H, Horn T, Hording U, Lundvall F. Prognosis of vulvar dysplasia and carcinoma in situ with special reference to histology and types of human papillomavirus (HPV). *APMIS* **1997**;105:963-971.

Kagie MJ, Kenter GG, Tollenaar RA, Hermans J, Trimbos JB, Fleuren GJ. p53 protein overexpression is common and independent of human papillomavirus infection in squamous cell carcinoma of the vulva. *Cancer* **1997**;80:1228-1233.

Kagie MJ, Kenter GG, Zomerdijk-Nooijen Y, Hermans J, Schuurin E, Timmers PJ, Trimbos JB, Fleuren GJ. Human papillomavirus infection in squamous cell carcinoma of the vulva, in various synchronous epithelial changes and in normal vulvar skin. *Gynecol Oncol* **1997**;67:178-183.

Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* **1991**;51:6304-6311.

Kaufman RH, Bornstein J, Adam E, Burek J, Tessin B, Adler-Storthz K. Human papillomavirus and herpes simplex virus in vulvar squamous cell carcinoma in situ. *Am J Obstet Gynecol* **1988**;158:862-871.

Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, Dallenbach-Hellweg G, Schmidt D, von Knebel DM. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* **2001**;92:276-284.

Klingelhutz AJ, Foster SA, McDougall JK. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* **1996**;380:79-82.

Knopp S, Nesland JM, Tropé C, Holm R. p14ARF, a prognostic predictor in HPV-negative vulvar carcinoma. *Am J Clin Pathol* **2006**;126:266-276.

Kodama J, Hashimoto I, Seki N, Hongo A, Yoshinouchi M, Okuda H, Kudo T. Thrombospondin-1 and -2 messenger RNA expression in invasive cervical cancer: correlation with angiogenesis and prognosis. *Clin Cancer Res* **2001**;7:2826-2831.

Korn AP, Abercrombie PD, Foster A. Vulvar intraepithelial neoplasia in women infected with human immunodeficiency virus-1. *Gynecol Oncol* **1996**;61:384-386.

Krebsregister Schleswig-Holstein, Institut für Krebs epidemiologie e.V., Inzidenz und Mortalität (**1999-2008**), Schmidt-Römhild Verlag Lübeck.

Kuhne C, Banks L. Cellular targets of the papillomavirus E6 proteins. *Papilloma Rep* **1999**;10:139-145.

Lane D. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* **1992**;358:15-16.

Lazo PA. The molecular genetics of cervical carcinoma. *Br J Cancer* **1999**;80:2008-2018.

Lee YY, Wilczynski SP, Chumakov A, Chih D, Koffler UP. Carcinoma of the vulva: HPV and p53 mutations. *Oncogene* **1994**;9:1655-1659.

Leima E, Matias-Guiu X, Lee SJ, Prat J. Squamous cell carcinoma of the vulva: study of ploidy, HPV, p53 and pRb. *Int J Gynecol Pathol* **1999**;18:191-197.

Li J, Rousseau MC, Franco EL, Ferenczy A. Is colposcopy warranted in women with external anogenital warts? *J Lower Genital Tract Dis* **2003**;7:22-28.

Lindell G, Jonsson C, Ehrsson RJ, Jacobsson H, Gemzell-Danielsson K, Nordström KB, Larson B. Evaluation of preoperative lymphoscintigraphy and sentinel node procedure in vulvar cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **2010**;152:91-95.

Lindell G, Näsmann A, Jonsson C, Ehrsson RJ, Jacobsson H, Gemzell-Danielsson K, Dalianis T, Nordström KB, Larson B. Presence of human papillomavirus (HPV) in vulvar squamous cell carcinoma (VSSC) and sentinel node. *Gynecol Oncol* **2010**;117:312-316.

Losch A, Joura EA. Vulvar neoplasia in young women. *Gynecol Oncol* **1999**;75:519.

Madsen B, Jensen H, van den Brule A, Wohlfahrt J, Frisch M. Risk factors for invasive squamous cell carcinoma of the vulva and vagina – population based case control study in Denmark. *Int J Cancer* **2008**;122:2827-2834.

McIntyre MC, Ruesch MN, Laimins LA. Human papillomavirus E7 oncoproteins bind a single form of cyclin E in a complex with cdk2 and p107. *Virology* **1996**;215:73-82.

Mesroglu M, Lelle RJ. Carcinoma of the vulva in a 13year old girl. *Geburtshilfe Frauenheilkd* **1986**;46:754-756.

Messing MJ, Gallup DG. Carcinoma of the vulva in young women. *Obstet Gynecol* **1995**;86:51-54.

Meyrick Thomas RH, Ridley CM, McGibbon DH, Black MM. Lichen sclerosus et atrophicus and autoimmunity-a study of 350 women. *Br J Dermatol* **1988**;118:41-46.

Milde-Langosch K, Albrecht K, Joram S, Schlechte H, Giessing M, Loning T. Presence and persistence of HPV infection and p53 mutation in cancer of the cervix uteri and the vulva. *Int J Cancer* **1995**;63:639-645.

Monk BJ, Burger RA, Fritz L, Parham G, Vasilev SA, Wilczynski SP. Prognostic significance of human papillomavirus DNA in vulvar carcinoma. *Obstet Gynecol* **1995**;85:709-715.

Munger K, Basile J, Duensing S, Eichten A, Gonzalez S, Zacny V. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* **2001**;20:7888-7898.

Munger 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. *J Virol* **1989**;63:4417-4421.

Oren M. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ* **2003**;10:431-442.

Palefsky JM. Anal squamous intraepithelial lesions in human immunodeficiency virus-positive men and women. *Semin Oncol* **2000**;27:471-479.

Park JS, Rader JS, Wu TC, Laimins LA, Currie JL, Kurman RJ, Shah KV. HPV-16 viral transcripts in vulvar neoplasia: preliminary studies. *Gynecol Oncol* **1991**;42:250-255.

Petry KU, Kochel H, Bode U, Schedel I, Niesert S, Glaubitz M, Maschek H, Kuhnle H. Human papillomavirus is associated with the frequent detection of warty and basaloid high-grade neoplasia of the vulva and cervical neoplasia among immunocompromised women. *Gynecol Oncol* **1996**;60:30-34.

Pilotti S, D Amato L, Della Torre G, Donghi R, Langoni A, Giarola M, Sampietro G, De Palo G, Pierotti MA, Rilke F. Papillomavirus, p53 alteration, and primary carcinoma of the vulva. *Diagnostic Molecular Pathology* **1995**;4:239-248.

Pinto AP, Miron A, Yassin Y, Monte N, Woo TY, Mehra KK, Medeiros F, Crum CP. Differentiated vulvar intraepithelial neoplasia contains p53 mutations and is genetically linked to vulvar squamous cell carcinoma. *Mod Pathol* **2010**;23:404-412.

Pinto AP, Schlecht NF, Pintos J, Kaiano J, Franco EL, Crum CP, Villa LL. Prognostic significance of lymph node variables and human papillomavirus DNA in invasive vulvar carcinoma. *Gynecol Oncol* **2004**;92:856-865.

Pinto AP, Signorello LB, Crum CP, Harlow BL, Abrao F, Villa LL. Squamous cell carcinoma of the vulva in Brasil: prognostic importance of host and viral variables. *Gynecol Oncol* **1999**;74:61-67.

Powell J, Wojnarowska F. Lichen sclerosus. *Lancet* **1999**;353:1777-1783.

Powell J, Wojnarowska F. Childhood vulvar lichen sclerosus: an increasingly common problem. *J Am Acad Dermatol* **2001**;44:803-806.

Preti M, Mezzetti M, Robertson C, Sideri M. Inter-observer variation in histopathological diagnosis and grading of vulvar intraepithelial neoplasia: Results of a European collaborative study. *Br J Obstet Gynaecol* **2000**;107:594-599.

Prokopczyk B, Cox JE, Hoffmann D, Waggoner SE. Identification of tobacco-specific carcinogen in the cervical mucus of smokers and nonsmokers. *J Natl Cancer Inst* **1997**;89:868-873.

Regauer S, Reich O, Beham-Schmid C. Monoclonal gamma T-cell receptor rearrangement in vulvar lichen sclerosus and squamous cell carcinomas. *Am J Pathol* **2002**;160:1035-1045.

Report of the Committee on Terminology of the International Society for the Study of Vulvar Disease. New Nomenclature for vulvar disease. *J Reprod Med* **1990**;35:483-484.

Reuschenbach M, Seiz M, Doeberitz CV, Vinokurova S, Duwe A, Ridder R, Sartor H, Kommos F, Schmidt D, Doeberitz MV. Evaluation of cervical cone biopsies for coexpression of p16(INK4a) and Ki-67 in epithelial cells. *Int J Cancer* **2012**;130:388-394.

Roman LD, Mitchell MF, Burke TW, Silva EG. Unsuspected invasive squamous carcinoma of the vulva in young women. *Gynecol Oncol* **1991**;41:182-185.

Rosenthal AN, Hopster D, Ryan A, Jacobs IJ. Immunohistochemical analysis of p53 in vulval intraepithelial neoplasia and vulval squamous cell carcinoma. *Br J of Cancer* **2003**;88:251-256.

Sankaranarayanan R, Ferlay J. Worldwide burden of gynaecological cancer: the size of the problem. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **2006**;20:207-225.

Schiffman M, Brinton L. The epidemiology of cervical carcinogenesis. *Cancer* **1995**;76:1888-1901.

Scurry J. Does lichen sclerosus play a central role in the pathogenesis of human papillomavirus negative vulvar squamous cell carcinoma? The itch-scratch-lichen sclerosus hypothesis. *Int J Gynecol Cancer* **1999**;9:87-99.

Scurry J, Champion M, Scurry B, Kim SN, Hacker N. Pathologic audit of 164 consecutive cases of vulvar intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Pathol* **2006**;25:176-181.

Scurry JP, Vanin K. Vulvar squamous cell carcinoma and lichen sclerosus. *Aus J Dermatol* **1997**;38:20-25.

SEER-Registries ; The Surveillance, Epidemiology, and End Results Program of the National Cancer Institute, USA. Diagramme und Tabellen:
<http://seer.cancer.gov/faststats/selections.php?#Output>
http://seer.cancer.gov/csr/1975_2010/browse_csr.php?section=1&page=sect_01_table.08.html (Datum des Zugriffs 24.04.2012).

Sherman KJ, Daling JR, Chu J, Weiss NS, Ashley RL, Corey L. Genital warts, other sexually transmitted diseases, and vulvar cancer. *Epidemiology* **1991**;2:257-262.

Sideri M, Jones RW, Wilkinson EJ. Squamous vulvar intraepithelial neoplasia: 2004 modified terminology, ISSVD Vulvar Oncology Subcommittee. *J Reprod Med* **2005**;50:807-810.

Sinclair KA, Woods CR, Kirse DJ, Sinal SH. Anogenital and respiratory tract human papillomavirus infections among children: age, gender and potential transmission through sexual abuse. *Pediatrics* **2005**;116:815-825.

Skapa P, Zamecnik J, Hamsikova E, Salakova M, Smahelova J, Jandova K, Robova H, Rob L, Tachezy R. Human papillomavirus (HPV) profiles of vulvar lesions: possible implications for the classification of vulvar squamous cell carcinoma precursors and for the efficacy of prophylactic HPV vaccination. *Am J Surg Pathol* **2007**;31:1834-1843.

Slee EA, O'Connor DJ, Lu X. To die or not to die: how does p53 decide? *Oncogene* **2004**;23:2809-2818.

Smith J, Green J, Berrington de Gonzalez A. Cervical cancer and the use of hormonal contraceptives: a systematic review. *Lancet* **2003**;361:1159-1167.

Speich N, Schmitt C, Bollmann R, Bollmann M. Human papillomavirus (HPV) study of 2916 cytological samples by PCR and DNA sequencing: genotype spectrum of patients from the west German area. *J of Med Microbiol* **2004**;53:125-128.

Spence AR, Franco EL, Ferenczy A. The role of human papillomavirus in cancer: evidence to date. *Am J Cancer* **2005**;4:49-64.

Srodon M, Stoler MH, Baber GB, Kurman RJ. The distribution of low and high-risk HPV types in vulvar and vaginal intraepithelial neoplasia (VIN and VaIN). *Am J Surg Pathol* **2006**;30:1513-1518.

Stehman FB, Look KY: Carcinoma of the vulva. *Obstet Gynecol* **2006**;107:719-733.

Stroup AM, Harlan LC, Trimble EL. Demographic, clinical, and treatment trends among women diagnosed with vulvar cancer in the United States. *Gynecol Oncol* **2008**;108:577-583.

Sturgeon SR, Brinton LA, Devesa SS, Kurman RJ. In situ and invasive vulvar cancer incidence trends (1973 to 1987). *Am J Obstet Gynecol* **1992**;166:1482-1485.

Sutton BC, Allen RA, Moore WE, Dunn ST. Distribution of human papillomavirus genotypes in invasive squamous carcinoma of the vulva. *Mod Pathol* **2008**;21:345-354.

Tans L, Ansink AC, van Rooij PH, Kleijnen C, Mens JW. The role of chemo-radiotherapy in the management of locally advanced carcinoma of the vulva: single institutional experience and review of literature. *Am J Clin Oncol* **2010**;34:22-26.

Thomas MC, Chiang CM. E6 oncoprotein represses p53-dependent gene activation via inhibition of protein acetylation independently of inducing p53 degradation. *Mol Cell* **2005**;17:251-264.

Thorland EC, Myers SL, Gostout BS, Smith DI. Common fragile sites are preferential targets for HPV 16 integration in cervical tumors. *Oncogene* **2003**;22:1225-1237.

Tindle RW. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nat Rev Cancer* **2002**;2:59-65.

Todd RW, Luesley DM. Medical management of vulvar intraepithelial neoplasia. *J Lower Genital Tract Dis* **2005**;9:206-212.

Toussaint-Smith E, Donner DB, Roman A. Expression of human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins in primary foreskin keratinocytes is sufficient to alter the expression of angiogenic factors. *Oncogene* **2004**;23:2988-2995.

Trimble CL, Hildesheim A, Brinton LA, Shah KV, Kurman RJ. Heterogeneous etiology of squamous carcinoma of the vulva. *Obstet Gynecol* **1996**;87:59-64.

Van de Nieuwenhof HP, Bulten J, Hollema H, Dommerholt RG, Massuger L, van der Zee AGJ, de Hullu JA, van Kempen L. Differentiated vulvar intraepithelial neoplasia is often found in lesions, previously diagnosed as lichen sclerosus, which have progressed to vulvar squamous cell carcinoma. *Mod Pathol* **2011**;24:297-305.

Van de Nieuwenhof HP, van Kempen LC, de Hullu JA, Bekkers RL, Bulten J, Melchers WJG, Massuger LFAG. The aetiological role of HPV in vulvar squamous cell carcinoma fine tuned. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2009**;18:2061-2067.

Van de Nieuwenhof HP, van Kempen L, Massuger L, de Hullu JA. Differentiated-type vulvar intraepithelial neoplasia has a high risk association with vulvar squamous cell carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* **2010**;20:194.

Vandepapeliere P, Barasso R, Meijer CJ, Walboomers JM, Wettendorff M, Stanberry LR, Lacey CJ. Randomized controlled trial of an adjuvanted human papillomavirus (HPV) type 6 L2E7 vaccine: infection of external anogenital warts with multiple HPV types and failure of therapeutic vaccination. *J Infect Dis* **2005**;192:2099-2107.

Van der Avoort IAM, Shirango H, Hoevenaars BM, Grefte JMM, de Hullu JA, de Wilde PCM, Bulten J, Melchers WJG, Massuger LFAG. Vulvar squamous cell carcinoma is a multifactorial disease following two separate and independent pathways. *Int J Gynecol Pathol* **2005**;25:22-29.

Van der Zee AG, Oonk MH, De Hullu JA, Ansink AC, Vergote I, Verheijen RH, Maggioni A, Gaarenstroom KN, Baldwin PJ, Van Dorst EB, Van der Velden J, Hermans RH, van der Putten H, Drouin P, Schneider A, Sluiter WJ. Sentinel node dissection is safe in the treatment of early-stage vulvar cancer. *J Clin Oncol* **2008**;26:884-889.

Van Seters M, van Beurden M, Craen AJ. Is the assumed natural history of vulvar intraepithelial neoplasia III based on enough evidence? A systematic review of 3322 published patients. *Gynecol Oncol* **2005**;97:645-651.

Veldmann T, Liu X, Yuan H, Schlegel R. Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. *Proc Natl Acad Sci* **2003**;100:8211-8216.

Venuti A, Marcante ML. Presence of human papillomavirus type 18 DNA in vulvar carcinomas and its integration into the cell genome. *J Gen Virol* **1989**;70:1587-1592.

Villa LL, Costa RLR, Petta CA, Andrade RP, Ault KA, Giuliano AR. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicentre phase II efficacy trial. *Lancet Oncol* **2005**;6:271-278.

Von Knebel Doeberitz M. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur J Cancer* **2002**;38:2229-2242.

Vuyst de H, Clifford GM, Nascimento MC, Madeleine MM, Franceschi S. Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus. A metaanalysis. *Int J Cancer* **2009**;124:1626-1636.

Wakelin SH, Marren P. Lichen sclerosus in women. *Clin Dermatol* **1997**;15:155-169.

Wang S, Trunk M, Schiffman M, Herrero R, Sherman ME, Burk RD, Hildesheim A, Bratti M, Wright T, Rodriguez AC, Chen S, Reichert A, von Knebel Doeberitz C, Ridder R, von Knebel Doeberitz M. Validation of p16^{INK4a} as a marker of oncogenic human papillomavirus infection in cervical biopsies from a population-based cohort in Costa Rica. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2004**;13:1355-1360.

- Weikel W, Hofmann M, Steiner E, Knapstein PG, Koelbl H: Reconstructive Surgery following resection of primary vulvar cancers. *Gynecol Oncol* **2005**;99:92-100.
- Wentzensen N, Vinokurova 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. *Cancer Res* **2004**;64:3878-3884.
- Wentzensen N, von Knebel Doeberitz M. Biomarkers in cervical cancer screening. *Dis Markers* **2007**;23:315-330.
- Williams AB, Darragh TM, Vranizan K, Ochia C, Moss AR, Palefsky JM. Anal and cervical human papillomavirus infection and risk of anal and cervical epithelial abnormalities in human immunodeficiency virus-infected women. *Obstet Gynecol* **1994**;83:205-211.
- Winer RL, Lee SK, Hughes JP, Adam DE, Kiwiat NB, Koutsky LA. Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol* **2003**;157:218-226.
- Woelber L, Kock L, Giesecking F, Petersen C, Trillsch F, Choschzick M, Jaenicke F, Mahner S. Clinical management of primary vulvar cancer. *Eur J Cancer* **2011**;47:2315-2321.
- Yang B, Hart WR: Vulvar intraepithelial neoplasia of the simplex (differentiated) type: A clinicopathologic study including analysis of HPV and p53 expression. *Am J Surg Pathol* **2000**;24:429-441.
- Yu T, Ferber MJ, Cheung TH, Chung TK, Wong YF, Smith DI. The role of viral integration in the development of cervical cancer. *Cancer Genet Cytogenet* **2005**;158:27-34.
- Zur Hausen H. Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res* **1976**;26:794.
- Zur Hausen H. Human genital cancer: synergism between two virus infections or synergism between a virus infection and initiating events. *Lancet* **1982**;2:1370-1372.
- Zur Hausen H. Papillomaviruses in human cancers. *Eur J Cancer* **1999**;111:581-587.
- Zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* **2000**;92:690-698.
- Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* **2002**;2:342-350.

Zur Hausen H. The search for infectious causes of human cancers: where and why.
Virology **2009**;392:1-10.

Danksagung

Ich möchte diese Gelegenheit nutzen, um meinen tiefen Dank zum Ausdruck zu bringen.

Mein ganz besonderer Dank geht an meine Betreuerin, Frau Prof. Dr. Monika Hampl, die mir mit ihrem Fachwissen durchgehend zur Seite stand.

Ihre hervorragende Betreuung, sowie ihre wertvolle Ratschläge und ständige Diskussionsbereitschaft sorgten für das Gelingen dieser Arbeit.

Ebenso danke ich an dieser Stelle meiner Familie für die geduldige, vertrauensvolle und stets motivierende Unterstützung.

Eidesstattliche Versicherung

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

19.11.2012, Dimitrios Panayotopoulos