

Aus der Frauenklinik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Tanja Fehm

Die Rolle von ECM-1 in Präneoplasien der vorderen Kommissur

Dissertation

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

vorgelegt von
Franziska Teresa Stevens
2015

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

gez.:

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

Erstgutachterin: Prof. Dr. med. Monika Hampf

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Markus Giessing

ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund: Die Inzidenz von präinvasiven Läsionen der Vulva (VIN 2-3, vulväre intraepitheliale Neoplasie) und des Vulvakarzinoms im Bereich der vorderen Kommissur hat in den letzten Jahren deutlich zugenommen. Es konnten vor allem kleine erosive Läsionen zwischen Klitoris und Urethra vorgefunden werden, die entweder noch einer VIN 3 entsprechen, mikroinvasiv auftreten oder bereits invasive Karzinome sind. Die Genese dieser Läsionen ist ungeklärt und soll Gegenstand unserer Untersuchung sein.

Zielsetzung: Die Läsionen gleichen klinisch oft einer lichenoiden Veränderung und eher seltener einer HPV-induzierten Läsion. Eine Infektion mit dem humanen Papillomvirus kann bei diesen Läsionen eine Rolle spielen. Jedoch zeigen Daten aus der UFK Düsseldorf von invasiven Tumoren aus dieser Region, dass eine HPV-Infektion nur bei ca. 30 % der betroffenen Frauen vorliegt.

Aus den bisherigen Ergebnissen leiten wir die Theorie ab, dass histologische oder immunhistochemische Zeichen eines Lichen sclerosus in der Umgebung dieser Veränderungen nachweisbar sein könnten.

Material und Methoden: Wir analysierten 35 Gewebeproben von schweren vulvären intraepithelialen Neoplasien (VIN 3) der vorderen Kommissur im Hinblick auf die Expression von HPV-DNA mittels HPV-Array Kit der Firma Chipron® und im Hinblick auf die p53- und ECM-1-Expression mittels Immunhistochemie. ECM-1 ist ein extrazelluläres Matrixprotein, welches bei Patienten mit LS im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe erhöht ist (Gambichler et al., 2012).

Ergebnisse: Das mittlere Alter der Patientinnen war 54 Jahre. Die VIN 3-Läsionen der vorderen Kommissur waren in 49 % HPV-positiv (17/35), zeigten in 35% eine Überexpression von p53 (15/35) und waren in 71% ECM-1-positiv (25/35). Frauen über 50 Jahre (n=24) waren zu 63 % HPV-negativ, zeigten eine p53-Überexpression (14/24) und waren häufiger ECM-1-positiv (19/24). Histologisch zeigte keine der Läsionen einen Lichen sclerosus.

Fazit: Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit suggerieren, dass HPV in der Pathogenese der VIN 3 der vorderen Kommissur im Gegensatz zu VIN 3-Läsionen anderer Lokalisationen nicht der entscheidende Faktor zu sein scheint. Die hohe Expressionsrate des ECM-1 in zwei Dritteln der Läsionen unterstützt den klinischen Aspekt einer zugrunde liegenden lichenoiden Erkrankung, obwohl histologisch kein LS diagnostiziert wurde.

II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Ab	Antibody		(Zellzyklus, G=gap)
Abb	Abbildung	G2-Phase	Letztes Interphase-
A. d	Destilliertes Wasser		Stadium
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol		vor Mitose (Zellzyklus,
AIN	Anale intraepitheliale		G=gap)
	Neoplasie	HCL	Salzsäure
bp	Basenpaare	HE	Hämatoxylin Eosin
CIN	Cervikale intraepitheliale	HIV	Human
	Neoplasie		immunodeficiency
CIS	Carcinoma in situ		Virus
CO₂	Kohlenstoffdioxid	H₂O₂	Wasserstoffperoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid	HPV	Humanes Papillomavirus
dH₂O	Destilliertes Wasser	hr-HPV	High-risk HPV
dNTPs	Desoxyribonukleosid-	IFN-γ	Interferon γ
	triphosphate	IgG	Immunglobulin G
d-VIN	Differenzierte vulväre	ISSVD	International Society for
	intraepitheliale Neoplasie		the Study of Vulva
ECM-1	Extrazelluläres		Disease
	Matrixprotein 1	K+	Positivkontrolle
E-Gene	<i>Early</i> -Gene im	kDa	Kilodalton
	HPV-Replikationszyklus	L-Gene	<i>Late</i> -Gene im HPV-
ELISA	Enzyme Linked		Replikationszyklus
	Immunsorbent Assay	LS	Lichen sclerosus
G1-Phase	1. Interphase-Stadium		

III. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

LSAB	Labelled Streptavidin Biotin	UKD	Universitätsklinikum Düsseldorf
M	Molar	u-VIN	undifferenzierte vulväre intraepitheliale Neoplasie
mAb	Mouse Antibody	UV-Lampe	Ultraviolette Lampe
MgCl₂	Magnesiumchlorid	UV-Licht	Ultraviolettes Licht
µl	Mikroliter	VIN	Vulväre Intraepitheliale Neoplasie
ml	Milliliter	WHO	World Health Organisation
mM	Millimolar		
NaOH	Natriumhydroxid		
nm	Nanometer		
p53	Tumorsuppressorgen		
PCR	Polymerase chain reaction		
PE	Probeexzision		
rpm	rounds per minute		
SKT	Schnellkochtopf		
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer		
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer		
TBS-Puffer	Tris-gepufferte Saline		
TNF-α	Tumornekrosefaktor α		
Tris	Tris(hydroxymethyl)- aminomethan		
UFK	Universitätsfrauenklinik		

IV. INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 HPV	1
1.2 Nicht invasive Läsionen der Vulva	5
1.3 Klassische VIN (undifferenzierte VIN, u-VIN)	7
1.4 Differenzierte VIN (d-VIN)	11
1.5 Lichen Sclerosus	14
1.6 p53	17
1.7 Extrazelluläres Matrixprotein-1 (ECM-1)	19
1.8 Ziele der Arbeit	21
2. MATERIAL UND METHODEN	24
2.1 Untersuchungsmaterialien/Untersuchungsgegenstände	24
2.2 DNA-Isolierung	25
2.3 Polymerase Chain Reaction zum Nachweis von HPV-DNA im Gewebe	27
2.4 Gelelektrophorese	29
2.5 HPV-Type 3.5 LCD-Array-Kit	30
2.6 Immunhistochemie für ECM-1 und p53	34
2.7 Mikroskopische Auswertung der p53 und ECM-1-Immunhistochemie	37
2.8 Statistik	37
3. ERGEBNISSE	38
3.1 Allgemeine Beschreibung des Patientenkollektivs	38
3.2 Klinische Parameter	39
3.2.1 ALTER	39
3.2.2 BESCHWERDEN	40
3.2.3 MENOPAUSE	41
3.3 Biomarker	41
3.3.1 HPV-DNA NACHWEIS IN DER VIN 3-LÄSION	41
3.3.2 HPV-TYPEN-BESTIMMUNG	42
3.3.3 P53-EXPRESSION IM GEWEBE	44
3.3.4 ECM-1 EXPRESSION IM GEWEBE	44

V. INHALTSVERZEICHNIS

3.4	Spezifische Befunde	47
3.4.1	HPV, p53 UND ECM-1 IN ABHÄNGIGKEIT DES ALTERS DER FRAUEN	47
3.4.2	HPV UND ECM-1 IN ABHÄNGIGKEIT DES ALTERS	53
3.4.3	GIBT ES EINEN ZUSAMMENHANG ZWISCHEN DEM AUSMAß DER ECM-1- EXPRESSION UND DEM AUFTRETEN VON BESCHWERDEN?	55
3.4.4	UNTERSCHIEDEN SICH DIE ECM-1 BEFUNDE IN VIN 3-LÄSIONEN DER VORDEREN KOMMISSUR VON DEN ECM-1 BEFUNDEN EINER GESUNDEN KONTROLLPOPULATION?	56
4.	DISKUSSION	58
4.1	Übersicht	58
4.2	Klinische Parameter	60
4.3	HPV-Status bei VIN 3-Läsionen der vorderen Kommissur	62
4.4	Molekularpathologische Marker in VIN 3-Läsionen der vorderen Kommissur	63
5.	SCHLUSSFOLGERUNGEN	68
6.	LITERATURVERZEICHNIS	70
7.	ANHANG	84
7.1	Abbildungen	84
7.2	Tabellen	85

1. Einleitung

1.1 HPV

STRUKTUR UND TAXONOMIE

HP-Viren (human papillom virus) gehören zu der Familie der Papillomviridae und sind kleine unbehüllte DNA-Viren, die weltweit vorkommen. Humane Papillomviren sind streng wirtsspezifisch, d. h. sie infizieren ausschließlich menschliche Epithelien (Howley & Lowy, 2001). Sie besitzen ein ikosaedrisches Kapsid und einen Durchmesser von 55 nm. Bislang wurden ca. 100 verschiedene Typen beschrieben, die anhand ihres Tropismus für bestimmte Gewebe in die (muko-)kutane und anogenitale Gruppe eingeteilt werden. Zu den gynäkologisch relevanten HPV-Typen zählen mittlerweile über 40 Typen. Allen gemeinsam ist eine ringförmig geschlossene doppelsträngige DNA mit ca. 8000 Basenpaaren (De Villiers et al., 2004; Garland, 2002). Das Genom ist in eine *early* und eine *late* Kontrollgruppe organisiert. Die Produkte der 5 Gene der *early* Gruppe (E1, E2, E5, E6 und E7) sind für die Virusreplikation und für die transformierenden Eigenschaften der Viren verantwortlich (Regulatorproteine: E1 und E2, Onkoproteine: E5, E6 und E7). Die beiden Gene L1 und L2 stammen von der *late* Kontrollgruppe und kodieren für das Viruskapsidprotein (Münger & Howley, 2002). Die Klassifikation der Viren erfolgt heutzutage durch den Vergleich der DNA-Sequenz des L1-Gens, welches bei den Papillomviren am stärksten konserviert ist (De Villiers, 2001). Es existieren 5 Stämme (A-E) an Papillomviren, die durch phylogenetische Untersuchungen des L1-Gens entstanden sind.

Während tierische Papillomviren in allen Untergruppen vertreten sind, findet man humane Papillomviren ausschließlich in den Gruppen A, B und E (De Villiers, 2001).

Die Gruppe A (A1-A15) beinhaltet neben den bei Condylomata acuminata gefundenen HPV-Typen 6 und 11 auch die genital- und schleimhautassoziierten HP-Viren 16 und 18 (Hengge, 2004). Zusätzlich zur phylogenetischen Differenzierung werden die Subtypen der in der Genitalregion vorkommenden HPV-Typen in Hoch- und Niedrigrisikotypen unterteilt. Die Hochrisikotypen können leicht- mittel- und schwergradige Dysplasien sowie z. B ein invasives Zervixkarzinom verursachen. Die Niedrigrisikotypen werden in den benignen Condylomata acuminata und in leichtgradigen zervikalen Dysplasien gefunden (Muñoz et al., 2003). Neben dem Zervixkarzinom sind auch andere Malignome wie das Vulvakarzinom, Vaginalkarzinom, Analkarzinom und Peniskarzinom HPV-assoziiert (De Vuyst et al., 2009). Der Anteil an HPV-induzierten Karzinomen des Oropharyngealtraktes variiert weltweit. Während in den USA die Prävalenz zwischen 40 und 80% liegt, sind in Deutschland ca. 30 bis 50% HPV-positiv (Klussmann et al., 2003, 2004, 2009).

Tabelle 1: Hauptvertreter der Hoch- und Niedrigrisikotypen von HPV

Hochrisikotypen:	Niedrigrisikotypen:	Potenzielle Hochrisikotypen:
16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81	26, 53, 66

HPV-PATHOGENESE

Papillomviren infizieren ausschließlich mehrschichtige Plattenepithelien der Haut und Schleimhaut und eine Infektion findet nur dann statt, wenn die Zellen noch proliferationsfähig sind. Jedoch findet die vollständige Virusreifung und die dazu gehörigen Schritte wie die Replikation und Genexpression nur in differenzierten, nicht mehr teilungsfähigen Keratinozyten statt (Howley & Lowy, 2001). Die Eintrittspforte für die Viren stellen wahrscheinlich kleine Mikroläsionen der Haut und Schleimhaut dar. Nach der initialen Infektion des Gewebes wird in den Basalzellen die virale Genexpression weitgehend unterdrückt. Lediglich die *early* Gene E5, E6 und E7 werden exprimiert, sodass zu diesem Zeitpunkt eine geringe Kopienanzahl der viralen DNA vorliegt. Es kommt zu einer lateralen Ausbreitung der mit HPV-infizierten Basalzellen. In den Schichten der Suprabasalzellen kommt es zur Expression der *late* Gene (Zur Hausen, 2002). Im Stratum spinosum findet schließlich der Zusammenbau der Viren statt, bevor die reifen Viren mit abgestoßenen Zellen freigesetzt werden (Hengge, 2004). Der Virus hat auch außerhalb der Wirtszelle eine hohe Überlebensrate und bleibt lange infektiös. Außerdem ist der Virus für das Immunsystem des Wirtes sehr schwer zugänglich, da die gesamte Infektion auf das Epithel beschränkt bleibt. Diese Tatsache ist ausschlaggebend für eine chronische Infektion mit dem HP-Virus (Howley & Lowy, 2001; Zur Hausen, 2002).

HPV-INDUZIERTE ERKRANKUNGEN

Die genitale Infektion mit HPV ist eine weit verbreitete sexuell übertragbare Erkrankung mit einer von Land zu Land schwankenden Prävalenz von 20-46% (Burk et al., 1996; Fairley et al., 1994). Zumeist erfolgt die Übertragung sexuell (ca. 90%), seltener auf nicht sexuellem Wege, z. B. in Schwimmbädern oder Saunen. Wahrscheinlich werden bei den verschiedenen Infektionswegen die Viruspartikel über abgeschilferte Keratinozyten übertragen, die Viruspartikel enthalten (Ho et al., 1998). HP-Viren können sowohl gutartige Läsionen, wie die Kondylome, als auch Dysplasien unterschiedlichen Schweregrades bis hin zum invasiven Karzinom verursachen. Oft sind die durch HPV verursachten Läsionen der Haut und Schleimhaut nur sehr klein und subtil, sodass sie mit dem bloßen Auge schwer zu erkennen sind und damit nicht selten übersehen werden (Zur Hausen, 1999). Der Zeitpunkt einer Infektion mit HPV bis hin zur Entwicklung von Kondylomen, einer Dysplasie oder einer invasiven Läsion ist sehr unterschiedlich. Kondylome entwickeln sich dabei schneller (ca. 3 Monate) als eine Präneoplasie der Cervix, der Vulva oder des Anus. Eine nur vorübergehende HPV-Infektion reicht nicht aus für die Entstehung entarteter Zellen. Voraussetzung hierfür ist eine persistierende Infektion mit den HP-Viren (Zur Hausen, 1999). Außer der zervikalen Manifestation der HPV-Infektion spielen die humanen Papillomviren auch bei intraepithelialen und invasiven Läsionen der Vagina, des Anus und der Vulva eine wichtige Rolle. De Sanjosé et al. zeigten in einer aktuellen großen Studie, dass 88,7% aller VIN Fälle (klassisch und differenziert) HPV-positiv waren und die invasiven vulvären Karzinome mit 25,1 % deutlich seltener mit HPV assoziiert waren.

Des Weiteren wurde in dieser Studie bestätigt, dass die differenzierte VIN eine unterschiedliche Genese zur klassischen VIN aufweist. Während die klassische VIN

meist HPV-induziert ist, spielen diese bei der differenzierten VIN eine geringere Rolle (De Sanjosé et al. 2013). Eine ausführliche Beschreibung des Zusammenhangs der VIN und den HP-Viren folgt im Abschnitt 1.2.

Zu den HPV-assoziierten Erkrankungen der Vulva gehören die Kondylome, die VIN und die plattenepithelialen Vulvakarzinome. Die Kondylome werden durch Niedrigrisikotypen der HPV verursacht und sind benigne. Hochrisikotypen induzieren die VIN Läsionen. Das Vulvakarzinom wird häufig durch HPV 16, 31, 33, 35, 58, und 67 hervorgerufen, wobei das Karzinom vom basaloiden und kondylomatösen Typ vornehmlich durch HPV 16, 18, 31 und 33 verursacht wird (Kagie et al., 1997; Petri et al., 1996).

Neben Erkrankungen der anogenitalen Region spielt HPV auch bei nicht genitalen Warzenformen (z. B. Verrucae planes juveniles) und bei Tumoren im Kopf-Hals-Bereich eine Rolle (Hengge, 2004). Bei bis zu 20 % der Kopf-Hals-Tumoren wird eine HPV-Ätiologie vermutet (Klussmann et al., 2003; Wentzensen & von Knebel Doeberitz, 2004).

1.2 NICHT INVASIVE LÄSIONEN DER VULVA

Die vulväre intraepitheliale Neoplasie ist eine potentielle Präkanzerose des Vulvakarzinoms (Anders et al., 2006). Die Inzidenzrate nimmt stetig zu und seit den letzten 30 Jahren ist sie um 400% gestiegen (Akerman et al., 2007; Judson et al., 2006).

Aktuell liegt die Inzidenzrate bei 7/100.000 Frauen und einer steigenden Anzahl von Betroffenen unter 40 Jahren (Anders et al., 2006; Jones et al., 2005; McNally et al., 2002).

Diese Tatsache wird einerseits durch eine steigende Zahl an HPV-Infektionen, andererseits durch eine verbesserte Diagnosestellung erklärt (Anders et al., 2006). Die Einteilung der VIN orientiert sich an der Anzahl dysplastischer Zellen im normalen Plattenepithel. Dabei werden leichte, mittelgradige und schwere Dysplasien unterschieden (VIN 1-3) (Anders et al., 2006; Hart, 2001). Die „International Society for the Study of Vulvovaginal Disease“ (ISSVD) unterscheidet bei der VIN 3 zwischen zwei unterschiedlichen Formen als Präkanzerosen für das Vulvakarzinom (Hillard et al., 1979). Die differenzierte vulväre interepitheliale Neoplasie (VIN) stellt die präkanzeröse Form des verhornenden Plattenepithelkarzinoms dar und betrifft meist ältere Frauen. Man findet sie v.a. bei Frauen mit einem Lichen sclerosus oder Lichen ruber in der genitalen Haut (van der Avoort et al., 2006). Es besteht keine Verbindung zur *high-risk* HPV-Infektion. Die differenzierte VIN ist nicht vollständig erfasst, hat eine relativ kurze präinvasive Phase bevor sie in ein invasives Stadium übergeht und stellt eine sowohl klinisch als auch histologisch schwierig zu diagnostizierende Läsion dar (Fox & Wells, 2003; Sideri et al., 1999). Die zweite Form der Präkanzerose, vor allem der nicht verhornenden Plattenepithelkarzinome, ist die undifferenzierte VIN (klassische VIN). Diese hauptsächlich jüngere Frauen betreffende Läsion ist assoziiert mit einer HPV-Infektion (Monk et al., 1995; van der Avoort et al., 2006). Es kommen häufig multifokale Läsionen im Rahmen einer chronisch persistierenden *high-risk* HPV-Infektion vor, die den gesamten äußeren Genitalbereich der Frau betreffen.

22% der Frauen mit undifferenzierter VIN haben gleichzeitig eine CIN (cervicale intraepitheliale Neoplasie) (Lara-Torre & Perlman, 2004) und nahezu 71% der Frauen mit undifferenzierter VIN haben eine vorangegangene, eine begleitende oder sich

anschließende VAIN (vaginale intraepitheliale Neoplasie), CIN, AIN (anale intraepitheliale Neoplasie) oder ein cervikales, vaginales oder anales Karzinom (Goffin et al., 2006; Hampl et al., 2006; van Beurden et al., 1995).

1.3 KLASSISCHE VIN (UNDIFFERENZIERTE VIN, U-VIN)

Seit der Erstbeschreibung 1912 durch John T. Bowen gab es verschiedene Einteilungen der VIN. Die Begriffe wie „Erythroplasia Queyrat`s“, „bowenoides Carcinoma in situ“ und das „Carcinoma simplex“ wurden von der Einteilung in eine leichte, mäßige und schwere Dysplasie (VIN 1-3) abgelöst (Preti et al., 2005). Die ISSVD legte 2003 eine neue aktuell gültige Klassifizierung der VIN fest. Dabei kommt die VIN 1 nicht mehr als Präkanzerose vor und die VIN 2/ VIN 3 wurden zur schweren Dysplasie VIN 3 vereinigt (Sideri et al., 2005). Zudem wurde die Differenzierung der Kategorie VIN 3 in eine klassische und eine differenzierte VIN eingeführt (Scurry & Wilkinson, 2006; Sideri et al., 2005). Die klassische VIN wird in einen basaloiden und einen kondylomatösen Typ unterteilt. Diese beiden Subtypen können jeweils alleine vorkommen oder als Mischtyp (Scurry & Wilkinson, 2006). Beide Typen sind gewöhnlich mit einer HPV-Infektion, hervorgerufen vor allem durch *high-risk* Typ 16, 31 und 33 assoziiert (van Beurden et al., 1995). Typisch für den basaloiden Typ ist ein verbreitertes Epithel mit eher glatter Oberfläche. Beim kondylomatösen Typ ist das Epithel ebenfalls verdickt, die Oberfläche aber eher papillomatös mit ausgeprägter Hyperkeratose (Hart, 2001; Toki et al., 1991).

Im klinischen Alltag wird jedoch nicht zwischen diesen beiden Subtypen der klassischen VIN unterschieden (Van de Nieuwenhof et al., 2008).

Während die Inzidenz der klassischen VIN weltweit steigt (400%ige Zunahme in 30 Jahren) und bei 5-7/100.000/Jahr liegt (Joura, 2002), ist bei der Inzidenz aller Vulvakarzinome nur eine Zunahme von 20% zu verzeichnen (Joura et al., 2000; Sturgeon et al., 1992). Bei jungen Frauen ist die Inzidenz der Vulvakarzinome stark gestiegen, was durch das jüngere Alter beim ersten Geschlechtsverkehr und die steigende Zahl an HPV-Infektionen erklärt wird (Al-Ghamdi et al., 2002; Joura et al., 2000; Judson et al., 2006; Losch & Joura, 1999). Der größte Teil der VIN 3-Läsionen ist HPV-assoziiert, wobei hauptsächlich der HPV-Typ 16, daneben die Typen 31 und 33, isoliert werden (HAMPL et al., 2006; Ueda et al., 2004; van Beurden et al., 1995). Zur Hausen verifizierte 1977 seine These, dass nicht der Herpes-Simplex Virus für die Pathogenese der cervikalen Neoplasien entscheidend ist, sondern das humane Papillomvirus (Zur Hausen, 1977). 1982 wurde erstmalig der HPV auch in der VIN beschrieben (Zachow et al., 1982). Das Durchschnittsalter der Frauen mit einer klassischen VIN ist deutlich jünger, im Gegensatz zu dem der differenzierten VIN (Haefner et al., 1995; McNally et al., 2002; Santos et al., 2004). Das Immunsystem scheint bei der Entstehung einer klassischen VIN eine besondere Rolle zu spielen, da Frauen mit dem Risikofaktor Rauchen (Hart, 2001; van Beurden et al., 1995), einer HIV-Infektion oder unter einer immunsuppressiven Therapie häufiger von der klassischen VIN betroffen sind (Conley et al., 2002; Petry et al., 1996). Die Prävalenz der klassischen VIN bei HIV-Erkrankten variiert von 0,5-37% (Kuhn et al., 1999). HPV-assoziierte Läsionen treten häufig multifokal oder multizentrisch auf (Deruelle et al., 2005; McNally et al., 2002).

Da die multizentrische HPV-positive VIN häufig mit einer CIN korreliert, ist eine eingehende Untersuchung des gesamten unteren Genitaltraktes erforderlich (Hart, 2001).

Histopathologisch ist die klassische VIN einfach zu erkennen. Typischerweise ist die Epidermis verdickt und die Oberfläche zeigt das Bild einer Para- oder Hyperkeratose oder auch beides nebeneinander. Das charakteristische mikroskopische Bild zeigt eine veränderte Architektur der Zellschichten mit unorganisierten Keratinozyten, ein hohes Kern-Zytoplasma-Verhältnis, Hyperchromasie des Kerns und eine hohe Zellteilungsaktivität (Hart, 2001). Sogenannte Koilozyten, pathologisch veränderte Plattenepithelzellen, kommen zahlreich vor. Sie sind morphologisch durch ein um den Zellkern gelegenes, scharf begrenztes optisch leeres Feld, einer Schrumpfung des Zellkerns und durch ein verdichtetes Chromatin gekennzeichnet (Hart, 2001).

Das klinische Erscheinungsbild der klassischen VIN erstreckt sich von einer grauweißen Plaque, einer erythematösen Plaque bis zu einer pigmentierten Läsion. Prädilektionsstellen sind neben den großen auch die kleinen Labien und die hintere Kommissur (McNally et al., 2002).

Das meist genannte Symptom von betroffenen Frauen ist der Juckreiz (60%). Daneben kommen Schmerzen, Dysurie und offene Stellen an der Vulva vor. Ein Großteil der Patientinnen ist jedoch vollkommen beschwerdefrei (McNally et al., 2002). Eine geeignete Methode zur Erkennung pathologischer Läsionen der Vulva ist neben der Inspektion auch die Vulvoskopie. Dabei werden zusätzlich der Essigsäuretest und der Toluidinblautest angewendet (Collins et al., 1966; Schnürch, 2004; Stefanaki et al., 2001).

Bei auffälligem Befund erfolgt eine Probeexzision, die histologisch untersucht wird. Nach Diagnosestellung ergeben sich je nach individuellem Ausmaß der Läsion verschiedene Therapiemöglichkeiten. Die Therapie der Wahl stellt die Chirurgie dar. Dabei kommen Verfahren wie die chirurgische Exzision und die (*Skinning*-)Vulvektomie zum Einsatz. Daneben sind die CO₂-Laservaporisation und –exzision und die elektrochirurgische Exzision etablierte Verfahren (Joura, 2002). Der Vorteil der Laserchirurgie liegt in der geringen thermischen Belastung der vulvären Haut und der erhaltenen Integrität des Organs (Preti et al., 2005; Sideri et al., 1999). Nachteil dieser Verfahren ist, dass sie die Haut im Aufbau derartig zerstören, sodass entfernte Gewebeproben nicht histologisch untersucht werden können und so eventuell ein invasives Karzinom der Diagnostik entgehen kann (Preti et al., 2005). Als neuere Behandlungsmöglichkeit gilt die Anwendung von Imiquimod (Aldara®). Dieser Immunmodulator ist der Behandlung von Genitalwarzen im Hinblick auf Rezidive der chirurgischen Therapie überlegen. Er aktiviert proinflammatorische Zytokine wie TNF α und IFN γ und steigert so die Immunantwort im betroffenen Gewebe (Stanley, 2002). Als präventives Verfahren gegen die Entwicklung von HPV-induzierten intraepithelialen Neoplasien und Karzinomen wurde 2006 der Impfstoff Gardasil® (Entwicklung: Merck & Co.; europäischer Vertrieb: Sanofi Pasteur MSD) eingeführt. Dieser schützt vor den HPV-Infektionen mit den Typen 6,11,16 und 18. Kurze Zeit später erschien Cervarix® (GlaxoSmithKline) auf dem Markt, welches nur vor HPV 16 und 18 schützt (Dunne & Park, 2013).

Der tetravalente Impfstoff Gardasil schützt neben den cervikalen Läsionen fast zu 100% auch vor HPV-induzierten vulvären, analen und vaginalen Präneoplasien und Neoplasien, wenn er bei HPV-negativen Frauen eingesetzt wird (Joura et al., 2007).

Bei dem bivalenten Impfstoff Cervarix® wurde in den Impfstoffstudien nur die Verhinderung von cervikalen Entartungen als Endpunkt untersucht, wobei sich eine ca. 98%ige Wirksamkeit bei HPV-negativen Frauen zeigte (Darus & Mueller, 2013; Harper & Vierthaler, 2011).

1.4 DIFFERENZIERTE VIN (D-VIN)

Die differenzierte VIN, auch „Simplex-Typ“ genannt, kommt in 2-10% der Fälle vor. Erstmals wurde sie im Jahre 1961 von Abell und Gosling als eine hoch differenzierte Form des Carcinoma in situ (CIS) beschrieben. 1977 wurde der Begriff „differenziert“ in die Klassifikation der VIN eingeführt, um die hoch differenzierte Morphologie der dysplastischen Zellen hervorzuheben (Hart, 2001). Heute wird in der Klassifikation der ISSVD nicht mehr von „VIN III, severe Dysplasie, differentiated type“ gesprochen, sondern von „VIN, differentiated type“ (Wilkinson et al., 1986). Die WHO hingegen beschreibt in ihrer Nomenklatur das „carcinoma in situ (simplex type) (VIN III)“ (Scully et al., 1994).

Am Gesamtpool der VIN Läsionen stellt die differenzierte VIN einen geringeren Anteil (2-10 %) als die undifferenzierte Form dar (Hart, 2001; van Beurden et al., 1995). Die differenzierte VIN ist assoziiert mit der chronisch inflammatorischen Dermatose Lichen sclerosus (LS) und kommt meist bei postmenopausalen Frauen (Durchschnittsalter 67 Jahre) vor (Hart, 2001).

Die nicht HPV-induzierte Läsion tritt entweder als alleiniges Krankheitsbild der Vulva auf oder sie kommt in umgebenden Arealen eines vulvären Plattenepithelkarzinoms der Vulva vor.

Frauen mit differenzierter VIN, weisen in ihrer Krankengeschichte nicht selten ein Plattenepithelkarzinom der Vulva und/oder einen LS auf (Lieggl & Regauer, 2006; Scurry et al., 2006). Zudem ist die differenzierte VIN meist unizentrisch und hat ein hohes Malignitätsrisiko (Yang & Hart, 2000). Im Gegensatz zur klassischen VIN ist die Pathogenese der differenzierten VIN unabhängig von dem humanen Papillomvirus und entsteht häufig auf dem Boden anderer vulvärer Plattenepithelläsionen wie dem LS oder der Plattenepithelhyperplasie (McNally et al., 2002; Preti et al., 2005). Eine weitere Abgrenzung zur klassischen VIN stellt die zum Teil positive immunhistochemische Färbung mit p53 dar (Hart, 2001; McNally et al., 2002; Yang & Hart, 2000).

Histologisch ist die differenzierte VIN eine nicht leicht zu diagnostizierende Läsion, weil die Epithelzellen hoch differenziert bleiben und die atypischen Zellen nur in basalen und parabasalen Schichten vorkommen. Auch die für eine Malignität sprechenden nukleären Pleomorphismen kommen bei der differenzierten VIN eher nicht vor (Hart, 2001). Typischerweise ist die Epidermis verdickt und weist eine stark verhornte Oberfläche auf (Hart, 2001). Die basalen Zellen zeigen ein eosinophiles Zytoplasma, unregelmäßig verteiltes Chromatin und prominente Nukleolen. Zudem findet man bei der differenzierten VIN erweiterte Reteleisten (Preti et al., 2005; Wilkinson, 2002; Yang & Hart, 2000). Kennzeichnend für die differenzierte VIN sind die abnormalen Keratinozyten.

Diese dysplastischen Zellen mit einem stark eosinophilen Zytoplasma (bedingt durch hohen Keratinanteil) findet man direkt über der Basalzellschicht (Hart, 2001; Scurry et al., 2006; Wilkinson, 2002).

Wie oben bereits beschrieben, kommt die differenzierte VIN häufig im Zusammenhang mit einem LS oder einem vulvären Plattenepithelkarzinom vor. Es kommen jedoch auch Fälle vor, bei denen die differenzierte VIN isoliert auftritt (Roma & Hart, 2007). Klinisch imponiert die differenzierte VIN als weißliche Plaque, als eine Ulcus ähnliche oder als rötlich-erythematöse Läsion (Yang & Hart, 2000).

Nicht selten berichten die Patientinnen von einer langen Phase von unspezifischem Pruritus, Brennen und Schmerzen im Bereich der Vulva. Ein nicht unerheblicher Teil der Patientinnen gibt allerdings keinerlei Symptome und Beschwerden an (Jones et al., 2005; McNally et al., 2002). Da die differenzierte VIN eine unifokale Läsion darstellt, die bevorzugt an der unbehaarten Haut der kleinen Labien vorkommt, ist die chirurgische Therapie im Sinne einer radikalen Exzision vorrangig. Eine medikamentöse Therapie kommt bei häufig auftretenden Rezidiven nicht in Frage (Preti et al., 2005). Die genaue Pathogenese der differenzierten VIN und deren Zusammenhang mit der Entstehung eines Vulvakarzinoms ist unbekannt. Jedoch wird die hohe Proliferationsrate der differenzierten VIN und die im Gegensatz zur undifferenzierten VIN raschere Progression in ein invasives Plattenepithelkarzinom in der Literatur beschrieben (Mulvany & Allen, 2008; Roma & Hart, 2007; Yang & Hart, 2000). Dieses maligne Potenzial der differenzierten VIN rechtfertigt die Biopsie eines jeden suspekten Areals (van der Avoort et al., 2006).

1.5 LICHEN SCLEROSUS

Lichen sclerosus (LS) ist eine chronisch inflammatorische Dermatose mit Prädilektionsstellen des anogenitalen Traktes, welche die Lebensqualität der Patienten erheblich beeinträchtigt (Hengge, 2012). Der ursprüngliche Name Lichen sclerosus et atrophicus wurde 1976 geändert, da E. G. Friedrich darauf hinwies, dass nicht alle LS histopathologisch atroph seien. Daraufhin wurde der Name Lichen sclerosus offiziell durch die ISSVD bestimmt (Val & Almeida, 2005).

Die geschätzte Inzidenz liegt bei 14/100.000/Jahr (Powell & Wojnarowska, 1999). LS kommt mit einem Verhältnis von 5:1 häufiger bei Frauen bzw. Mädchen vor als bei Männern und Jungen. Hauptsächlich sind postmenopausale Frauen, präpubertäre Mädchen und Kinder unter 10 Jahren betroffen (Powell & Wojnarowska, 1999, 2001). Etwa 15-20% der Betroffenen sind Kinder (Powell & Wojnarowska, 2002). Die Pathogenese ist nicht eindeutig geklärt. Die Vermutung, dass die Genese infektiösen oder genetischen Ursprungs sei, konnte nicht bestätigt werden (Meyrick et al., 1988). Vielmehr ließ sich eine gestörte Fibroblastenaktivität mit gesteigerter Kollagenproduktion nachweisen (Carli et al., 1997; Scrimin et al., 2000). Oyama et al. entdeckten in einer Studie von 2003 gegen das extrazelluläre Matrixprotein-1 (ECM-1) gerichtete monoklonale Autoantikörper. Dabei untersuchten sie Serumautoantikörperprofile von 86 Patienten mit Lichen sclerosus und einer Kontrollgruppe von 85 gesunden Patienten. In 67% der Fälle wurden spezifische, aber niedrig-titrige Autoantikörper gegen ECM-1 gefunden (Oyama et al., 2003).

Das histopathologische Bild zeigt klassischerweise eine dünne Epidermis mit einem breiten Band aus Kollagenfasern an der Dermis-Epidermis-Grenze und darunter liegendem Lymphozyteninfiltrat (Goldstein et al., 2005; Neill et al., 2010; Val & Almeida, 2005). Zudem findet man in den basalen Zellschichten degenerative Veränderungen in Form von Vakuolen (Val & Almeida, 2005).

Klinisch manifestiert sich der LS sowohl extragenital und mukosal, aber vor allem auch anogenital. Die Läsionen sind weiße Plaques und Papeln, oft umgeben von erythematösen Arealen, Ekchymosen, Hyperkeratosen, Fissuren, Teleangiektasien, Hyperpigmentierung und Ulcera.

Das Ausmaß der Läsionen ist sehr variabel und reicht von extremer Ausprägung der Beschwerden bis zu asymptomatischen Manifestationen. In fortgeschrittenen Stadien ist es nicht selten, dass die normale Architektur der genitalen Zone zerstört wird. Folgen sind die Atrophie der Labia minora, die Synechie der Kommissuren und die Introitusstenosierung (Goldstein et al., 2005).

Beschwerden äußern Patienten im Sinne von unerträglichem Juckreiz, Schmerzen aufgrund wunder offener Stellen und Kohabitationsbeschwerden (Marini et al., 2005). Bei Männern ist vor allem die Glans betroffen und bei extragenitaler Manifestation die Oberschenkelinnenseite, der Nacken, die Schultern und die Handgelenke (Val & Almeida, 2005). Nach klinischem Verdacht wird die Diagnose durch eine Biopsie gesichert. Zudem sollten im Hinblick auf autoimmune Begleiterkrankungen (Goolamali et al. 1974) antinukleäre Antikörper sowie Schilddrüsenautoantikörper untersucht werden (Marini et al., 2005). Neuerdings steht ein diagnostischer ELISA zur Verfügung mit dem man die Autoantikörper detektieren kann.

In einer Studie von Oyama et al. wies dieser Test eine Sensitivität von 80% und eine Spezifität von 93,7% auf (Oyama et al., 2004). Differentialdiagnosen stellen der Lichen planus, die Vitiligo, die Psoriasis und die vulväre intraepitheliale Neoplasie dar. Der größte Unterschied zwischen diesen Entitäten (ausgenommen Lichen planus) liegt darin, dass die Differentialdiagnosen in der Regel keine strukturellen Veränderungen der Vulva aufweisen (Val & Almeida, 2005). Zur Therapie des LS stehen verschiedene Möglichkeiten mit teils unzulänglicher klinischer Sicherheit zur Verfügung. Der Anspruch an eine Therapie ist das Lindern der Symptome, die Verhinderung der atrophischen Veränderungen und bestenfalls die Prävention einer malignen Entartung (Funaro, 2004).

Britischen Leitlinien zufolge ist die Behandlung des anogenitalen Lichen sclerosus mit potenten topischen Kortikosteroiden von zunächst drei Monaten Mittel der Wahl (Neill et al., 2010). Es gibt keine kontrolliert randomisierte Studie, jedoch zeigten mehrere kleine Studien gute klinische Ergebnisse in der Anwendung der Kortikosteroide (Cooper et al., 2004; Smith & Haefner, 2004). Eine andere Therapie, mittlerweile durch eine Phase-II-Studie geprüft, ist die topische Anwendung des Calcineurinantagonisten Tacrolimus (Protopic ®) (Marini et al., 2005). Dieser wird der neuen Klasse der Immunmodulatoren zugeordnet und in Salbenform auf die betroffenen Stellen aufgebracht (Meykadeh & Hengge, 2003). Tacrolimus hemmt in der Epidermis Calcineurin, wodurch eine Entzündung blockiert wird und die Synthese der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-2 und Interferon- γ induziert wird (Meykadeh & Hengge, 2003). Die Therapie mit Tacrolimus führt nicht nur zur Linderung der Beschwerden, sondern auch zur Abheilung der Primärerkrankung (Marini et al., 2005).

Andere therapeutische Möglichkeiten wie die Anwendung topischer Testosteron- oder Östrogensalben, von Cyclosporin, Calcitriol, Penicillinamin und Retinoiden zeigten keine positiven Ergebnisse (Marini et al., 2005).

Es gibt unterschiedliche Gründe dafür, die Gefahr einer möglichen maligne Entartung des Lichen sclerosus nicht außer Acht zu lassen. Einerseits leiden Patientinnen mit einem vulvären Plattenepithelkarzinom sehr häufig an einem LS (in ca. 60%) (Leibowitch et al., 1990), einer Plattenepithelhyperplasie oder an einer differenzierten VIN in angrenzenden Geweben zur Primärläsion (Kagie et al., 1997).

Andererseits kommt es bei Patienten mit einem LS in 4-6% der Fälle zur malignen Entartung (Meyrick et al., 1996). Bei Patienten mit extragenitaler Manifestation eines Lichen sclerosus besteht hingegen kein Entartungsrisiko (Val & Almeida, 2005).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Pathogenese der Entartung des LS unklar ist. Zwar ist die differenzierte VIN eine Präkanzerose für das vulväre Plattenepithelkarzinom (Van der Avoort et al., 2006), jedoch bleibt die genaue pathogenetische Entwicklung des LS zur differenzierten VIN und der Entstehung eines vulvären Plattenepithelkarzinoms Gegenstand der gegenwärtigen Forschung.

1.6 p53

Das humane Protein p53 liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 und wurde 1979 von Albert B. De Leo, David P. Lane und Arnold Levine unabhängig voneinander entdeckt (Zakut-Houri et al., 1983). p53 spielt eine bedeutende Rolle bei der Regulation des Zellzyklus. Es fungiert in den meisten Zellen als Tumorsuppressor, welcher die Zellaktivität einiger Gene bremst.

Die Aktivierung erfolgt durch Stressoren, wie DNA-Schädigungen im Rahmen von UV-Strahlung, radioaktiven Substanzen oder Zytostatika (Knippschild et al., 1996). Als Transkriptionsfaktor ist p53 an der Inhibierung verschiedener Zyklinkinasen beteiligt, um Zeit für entsprechende Reparaturmechanismen zu gewinnen, worunter es schließlich zum Zellzyklusarrest kommt. Ist eine Reparatur nicht möglich, triggert p53 die Zellapoptose, den sogenannten „programmierten Zelltod“ (Clarke et al., 1993). Aufgrund dieser Eigenschaft wird p53 in der Literatur als „Wächter des Genoms“ bezeichnet.

Zellen, in denen das p53-Protein mutiert vorliegt und somit nicht funktionstüchtig ist, weisen eine erhöhte genetische Instabilität auf.

Diese Instabilität führt vermehrt zu Mutationen und Aberrationen von Chromosomen und somit zu einer schnelleren Entstehung maligner Zellklone (Lane, 1992).

Die besondere medizinische Bedeutung liegt in der Tatsache begründet, dass eine p53-Überexpression in 50% aller Tumoren nachgewiesen werden kann und sie damit zu den häufigsten molekularen Veränderungen humaner Karzinome gezählt wird (Lane & Benchimol, 1990).

Mutationen des p53-Proteins können durch verschiedene Methoden nachgewiesen werden. Eine gute, wenig zeitintensive Möglichkeit für den Nachweis bieten immunhistochemische Färbungen, welche auch in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kamen (Baas et al., 1994). Charakteristisch für eine sogenannte „*Missense*-Mutation“ des p53-Proteins ist die positive Zellkernfärbung und die gleichzeitig ausbleibende Färbung des Stromas bei der Mehrzahl der Zellen eines Gewebes (Harris & Hollstein, 1993).

Während p53 Mutationen in gynäkologischen Karzinomen, u.a. in Mammakarzinomen oder Ovarialkarzinomen vorkommen, lässt sich bei 95% aller Zervixkarzinome eine solche Mutation nicht nachweisen (Zur Hausen, 2000).

Bei vulvären Läsionen wird in der Literatur eine p53-Überexpression von 50-88% beschrieben (Engelman, 2003; Kagie et al., 1997). Rosenthal et al. zeigten in ihrer Studie, dass bei HPV-negativen Vulvakarzinomen häufiger eine p53-Überexpression vorkommt als bei HPV-positiven Vulvakarzinomen (58% vs. 33%) (Rosenthal et al., 2003). Zudem korreliert das Ausmaß der p53-Überexpression mit dem Schweregrad der vulvären intraepithelialen Neoplasie, wodurch eine Aussage über eine eventuelle Tumorprogression der VIN möglich wird (Engelman et al., 2003; Rosenthal et al., 2003). Trotz der Vielzahl humaner Karzinome, die eine p53-Überexpression aufweisen, ist p53 als molekularer Marker für eine schlechte Prognose aufgrund der so heterogen ausfallenden Ergebnisse unterschiedlicher Studien bis heute zurückhaltend zu betrachten.

1.7 EXTRAZELLULÄRES MATRIXPROTEIN-1 (ECM-1)

Das extrazelluläre Matrixprotein-1 Gen liegt auf Chromosom 1q21 und codiert ein ca. 85-kDa großes Glycoprotein (Smits et al., 1997), das erstmalig in einer osteogenetischen Mäusezelllinie identifiziert wurde (Mathieu et al., 1994). Das entsprechende humane Homolog des ECM-1 Gens wurde 1997 isoliert (Johnson et al., 1997; Smits et al., 1997). ECM-1 reguliert die enchondrale Ossifikation, stimuliert Endothelzellen und induziert die Angiogenese (Chan, 2004). Es existieren drei verschiedene Subtypen, das ECM-1a, b und c (Mongiat et al., 2003; Smits et al., 1997).

Der Subtyp ECM-1a kommt in verschiedensten Geweben vor (Leber, Dünndarm, Lunge, Ovar, Prostata, Hoden, quergestreifte Muskulatur, Pankreas und Niere) und wird vor allem in der Plazenta und im Herzen exprimiert. ECM-1b dagegen kommt nur in den Tonsillen und Keratinozyten vor (Smits et al., 1997). Die Variante ECM-1c ist bis heute ausschließlich in der Haut identifiziert worden (Mongiat et al., 2003). ECM-1 scheint neben seinen Funktionen als Ossifikations- und Angiogenesestimulator (Deckers et al., 2001; Han et al., 2001) ebenfalls eine Rolle bei der terminalen Differenzierung von Keratinozyten in der Dermis und Epidermis zu spielen (Smits et al., 2000). Bis heute ist die genaue Funktion des ECM-1 nicht detailliert bekannt (Fujimoto et al., 2005). Gegenstand neuerer Studien ist der Zusammenhang von ECM-1 und zwei Erkrankungen: der Lipidproteinose und dem Lichen sclerosus (Chan, 2004).

Da letztere Krankheit Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist, soll in Folgendem kurz der Zusammenhang zwischen ECM-1 und Lichen sclerosus erläutert werden. Lichen sclerosus ist assoziiert mit Autoimmunkrankheiten wie Vitiligo, Schilddrüsenerkrankungen und perniziöser Anämie (Val & Almeida, 2005). Wie bereits oben beschrieben, scheint ein Teil der Pathogenese des Lichen sclerosus in der humoralen Autoimmunität begründet zu sein. Oyama et al. wiesen in ihrer Studie Autoantikörper in 74% (Kontrollgruppe 7%) der Sera von LS-Patienten gegen das ECM-1 nach (Oyama et al., 2003). Diese Autoantikörper machen das ECM-1 funktionsuntüchtig und scheinen somit teilweise für die histologischen Veränderungen des LS verantwortlich zu sein. Diese Veränderungen stellen die Keratinozytendegeneration, die Hyalinisierung der Dermis und die Dysintegrität der Basalmembran dar (Chan, 2004).

Gambichler et al. zeigten in ihrer Studie eine im Vergleich zu gesunden Kontrollpatientinnen erhöhte Expressionsrate von ECM-1 im Gewebe von Frauen mit LS (Gambichler et al., 2012). Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass Autoantikörper gegen ECM-1 und daraus kompensatorisch erhöhte Proteinexpression im erkrankten Gewebe ein Hinweis sein könnte, dass Patientinnen mit einer VIN 3-Läsion an einer lichenoiden Grunderkrankung leiden, obwohl sie diese histologisch meist (noch) nicht aufweisen.

1.8 ZIELE DER ARBEIT

Die Inzidenz der präinvasiven und invasiven Läsionen der vorderen Kommissur zwischen Klitoris und Urethra stieg im letzten Jahrzehnt deutschlandweit stark an.

Während für die cervikalen Läsionen ein weit akzeptiertes Progressionsmodell besteht, welches von der HPV-induzierten Zelltransformation ausgeht, ist die Pathogenese der Läsionen der Vulva unklar und wohl multifaktoriell.

Die Läsionen gleichen klinisch eher selten einer HPV-induzierten Läsion, sondern eher einer lichenoiden Veränderung, da es sich häufig um nicht erhabene rötliche Läsionen oder kleine Ulcera handelt (Abb.1-6).



Abb. 1: VIN 3 vordere Kommissur, 53-j. Patientin



Abb. 2: VIN 3 vordere Kommissur, 53-j. Patientin



Abb. 3: VIN 3 vordere Kommissur, 68-j. Patientin



Abb. 4: VIN 3 vordere Kommissur, 57-j. Patientin



Abb. 5: VIN 3 vordere Kommissur, 62-j. Patientin



Abb. 6: VIN 3 vordere Kommissur, 52-j. Patientin

Eine Infektion mit dem humanen Papillomvirus (HPV) kann bei diesen Veränderungen eine Rolle spielen, aber jüngste Daten von Läsionen der vorderen Kommissur zeigen, dass diese Infektion bei nur ca. 40% der betroffenen Frauen vorliegt (Reuschenbach et al., 2013). Die Pathogenese der restlichen 60% ist unklar. Jedoch konnte in der Studie von Reuschenbach et al. gezeigt werden, dass das Zellzyklusprotein p53 in einem Großteil der Karzinome der vorderen Kommissur der VIN3-Läsionen überexprimiert wird (39,7%) und deshalb eine fraglich lichenoiden Genese der Tumore eine Rolle spielt (Reuschenbach et al., 2013).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, der Hypothese nachzugehen, dass bei Frauen mit präinvasiven Läsionen der vorderen Kommissur, ausgehend vom klinischen Erscheinungsbild, eine lichenoiden Pathogenese eine Rolle spielt, obwohl histopathologisch kein Lichen sclerosus nachweisbar ist. Dafür wurde ein Lichenspezifisches Markerprotein, das ECM-1, gewählt und die Expression dieses Markers im Gewebe von Frauen mit einer VIN 3 untersucht.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 UNTERSUCHUNGSMATERIALIEN/UNTERSUCHUNGSGEGENSTÄNDE

Die vorliegende Studie wurde von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zugelassen (Studiennummer: 3966). Es wurden 35 Gewebeproben von hochgradigen vulvären intraepithelialen Neoplasien der vorderen Kommissur untersucht. Klinisch wiesen alle untersuchten Patientinnen eine eher lichenoid erscheinende Läsion der vorderen Kommissur auf. Die Läsionen wurden im Zeitraum von 2006-2012 in der Dysplasiesprechstunde der Universitätsfrauenklinik Düsseldorf diagnostiziert und behandelt und das resezierte Gewebe in der Pathologie der Universitätsklinik Düsseldorf untersucht. Die folgenden histologischen und molekularpathologischen Untersuchungen wurden anonymisiert durchgeführt. Die Diagnose und Klassifizierung hochgradige vulväre intraepitheliale Neoplasie stellten erfahrene Pathologen der Heinrich-Heine-Universität gemäß der aktuellen Leitlinien. Die entsprechenden Proben wurden von der Pathologie der Uniklinik Düsseldorf zur weiteren Untersuchung zur Verfügung gestellt. Die Einverständniserklärung der Frauen lag vor. Die klinischen Parameter die bei den Patientinnen untersucht wurden umfassten Alter, Beschwerden und Menopause.

Schwerpunkt der Studie war die Untersuchung der Gewebeproben hinsichtlich folgender Marker:

- Nachweis von HPV-DNA: im Falle eines positiven Ergebnisses wurde die Typisierung der Viren vorgenommen
- Immunhistochemie für p53
- Immunhistochemie für ECM-1

2.2 DNA-ISOLIERUNG

Die DNA-Isolierung der in Paraffin eingebetteten Proben wurde mit dem EZ1®DNA Tissue Set (Quiagen®, Hilden, Deutschland) durchgeführt.

ZUSCHNITT DER PARAFFINBLÖCKE

Für die Analyse der Gewebeproben wurden Serienschnitte (Schnittdicke=5 µm) mit Hilfe eines Mikrotoms (Thermo Scientific Schlittenmikrotom HM430) angefertigt.

ENTPARAFFINIERUNG

Die paraffinierten Gewebeproben wurden mit 1 ml Xylol gemischt und dann bei 37°C und 600 rpm aufgemischt. Nach 10 Minuten in dem Heizschüttler wurde die Probe kurz gevortext und im Anschluss daran bei Höchstgeschwindigkeit (9000 rpm) und Raumtemperatur zentrifugiert. Diese Schritte wurden zweimal wiederholt. Um verbliebene Xylolreste zu entfernen wurde 2x5 Minuten 1 ml 100%iger Ethanol zu dem Gewebsgemisch gegeben. Es folgte die Zentrifugation des Gemisches bei Höchstgeschwindigkeit und Raumtemperatur, anschließend das Abpipettieren des Überstandes. Damit das Ethanol restlos verdampfen konnte, wurde das Eppendorf-*Tube* geöffnet. Schließlich erfolgte die Inkubation der Probe bei 56°C und 600 rpm über Nacht im Heizschüttler.

DNA-EXTRAKTION

Die Extraktion der DNA wurde mit Hilfe des EZ1-Biorobot® durchgeführt. Dieses Gerät arbeitet auf der Basis der Silicea-basierten DNA-Aufreinigung mit den Eigenschaften magnetischer Partikel. DNA-Moleküle werden in einem Schritt isoliert, indem sie sich in Anwesenheit bestimmter Salze an die Oberfläche der Silicea-Moleküle binden.

Die gebundenen Partikel werden mit Hilfe magnetischer Kräfte von den übrigen Lysaten getrennt und durch einen Puffer eluiert. Die Abb. 7 zeigt das Prinzip des EZ-1-Biorobot®.

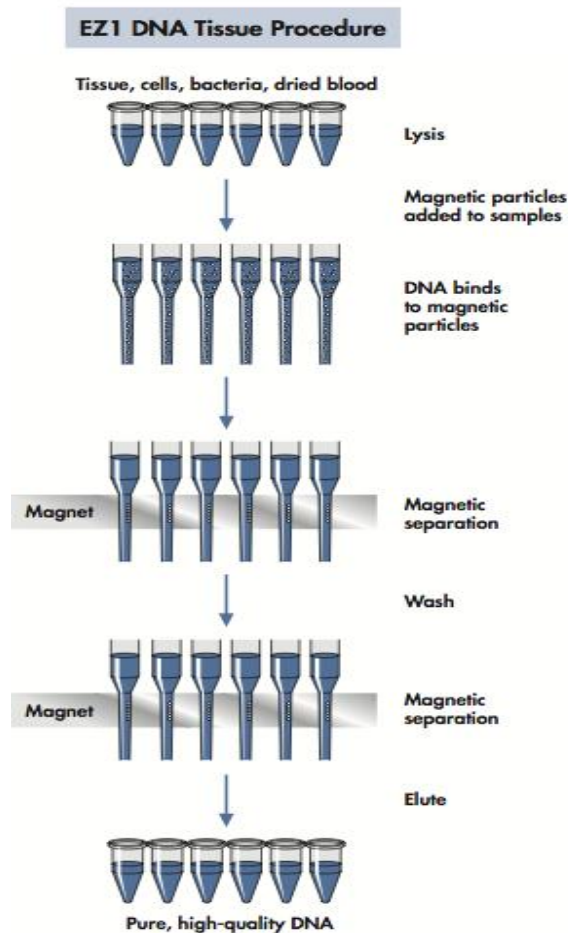


Abb. 7: Verfahrensprinzip des EZ-Biorobots®. Aus EZ1 DNA Tissue Handbook, Qiagen,

08/2011

Die durchgeführten Einzelschritte sind dem Geräteprotokoll (EZ1®DNA Tissue Handbook 08/2011, Qiagen®, Hilden, Deutschland) zu entnehmen.

DNA-KONZENTRATIONSBESTIMMUNG

Die Konzentration der DNA wurde mit einem Photometer (Eppendorf BioPhotometer 6131 02494) bestimmt. Die Extinktion der DNA-Lösung wurde hierbei mit einer Wellenlänge von 260nm gemessen. Dazu wurde die DNA-Lösung mit einem TE-Puffer in einem Verhältnis von 2:100 verdünnt. Als Referenzwert galt der Leerwert von destilliertem Wasser.

2.3 POLYMERASE CHAIN REACTION ZUM NACHWEIS VON HPV-DNA IM GEWEBE

METHODE

Die Polymerase Kettenreaktion ist eine Methode zur enzymatischen Vervielfältigung von DNA und wurde 1983 von K.B. Mullis erstmalig beschrieben. Der gängigste PCR-Ablauf besteht aus 25-40 Zyklen, die in einem *Thermocycler* ablaufen. Die ersten 25-30 Zyklen verlaufen exponentiell, während die Zyklen im Verlauf der Reaktion linear ablaufen. Jeder einzelne Zyklus besteht aus drei Schritten: Denaturierung, Anlagerung, Elongation. Die Denaturierung beinhaltet die Trennung der Wasserstoffbrücken zwischen den beiden DNA-Strängen durch Erhitzen der DNA auf 94-96°C. Im zweiten Schritt folgt die Abkühlung auf 50-86°C, sodass sich der Primer an die spezifische Nukleotidsequenz der zu vervielfältigenden DNA-Sequenz in 5' - 3' - Richtung anlagern kann. Der letzte Schritt besteht schließlich in der Neusynthese des Tochterstranges, beginnend am 3'- 5'- Ende des angelagerten Primers bei einer Temperatur von 86-72°C. Auf diese Weise sind zwei neue DNA-Stränge entstanden, die im nächsten Zyklus als Matrize dienen.

DURCHFÜHRUNG

Da das β -Globin-Gen in jeder menschlichen Zelle vorhanden ist, wurde es verwendet, um die Intaktheit der DNA zu kontrollieren. Als Positivkontrolle diente eine hausinterne (Institut für Pathologie der HHU) Kontrolle: „K+ LS 10 mg/ μ l“. Als Negativkontrolle wurde destilliertes Wasser verwendet.

Die HPV-PCR wurde mit dem HPV Type 3.5 LCD-Array Kit durchgeführt (CHIPRON®, Berlin, Deutschland). Es wurden zwei Primer Mixe verwendet:

- 1) My11/09 (Standardprimer zum Nachweis von HPV-DBA)
- 2) `125´ (Primer mit unveröffentlichter Sequenz der Firma CHIPRON®). Um alle HPV-Typen, die auf dem HPV-Chip repräsentiert sind zu detektieren, wurden beide Primer-Mixe in unabhängigen Durchläufen verwendet. Als Positivkontrolle galt auch hier eine hausinterne (Institut für Pathologie) Kontrolle: „K+HPV 326-09“, Typ 31 positiv. Als Negativkontrolle wurde ebenfalls A. d. verwendet. Die Tabelle 2 zeigt die Sequenzen sowie die Größe der zu erwartenden PCR-Produkte und die Tabelle 3 die entsprechende Fragmentgröße der verwendeten Primer:

Tabelle 2: **Sequenzen der verwendeten Primer:**

HPV:	
`125´:	Die Primersequenz ist durch die Firma CHIPRON® nicht veröffentlicht
MY11(forward):	5`- GCMCAGGGWCATAAYAATGG -3´
MY09(reverse):	5`- CGTCCMARRGGAWACTGATC-3´
β-Globin:	
Sense:	5`-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3´
Antisense:	5`-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3´

Tabelle 3: **Fragmentgröße der Primer**

MY11/09:	~ 450 bp
`125´:	~125-155 bp

Ein 23 µl-Reaktionsansatz für die HPV-PCR hatte folgende Zusammensetzung:

Tabelle 4: Reaktionsansatz HPV-PCR

MIX MY 11/09	MIX `125`	
17,7 µl	16,7µl	dH ₂ O
2,5 µl	2,5 µl	10xHotStart Puffer (15mM MgCl ₂ im Puffer)
1,0 µl	1,0 µl	dNTPs
1,0 µl	2,0 µl	Primer MIX MY11/09 oder `125`
0,3 µl	0,3 µl	Hot Start Taq
0,5 µl	0,5 µl	MgCl ₂ (Endkonzentration MgCl ₂ 20mM)

Die PCRs erfolgten mit folgender Programmeinstellung im Biometra® *Thermo-Cycler*:

Tabelle 5: PCR-Zyklen

Zeit:	Temperatur:
3 min	96°C
1 min	94°C
1:30 min	45°C
1:30 min	72°C
3 min	72°C

Wiederholung der Schritte 2-4 für
insgesamt 42 Zyklen

2.4 GELELEKTROPHORESE

Mit Hilfe der Gelelektrophorese wurden die PCR-amplifizierten DNA-Produkte ihrer Größe nach aufgetrennt. 1,6 g Agarose wurden mit 80 ml TBE-Puffer gemischt und 3 Minuten in der Mikrowelle erhitzt um die Agarose vollständig in Lösung zu bringen. Anschließend wurde die Lösung durch Schwenken des Gefäßes unter kaltem Wasser abgekühlt. Damit die DNA-Produkte visualisiert werden konnten, wurden dem noch flüssigen Gel 3 µl Ethidiumbromid zugefügt. Das Gemisch wurde schließlich in einen Gelträger gegossen.

Nach vollständiger Polymerisation wurde die Gelplatte in eine Elektrophoresekammer gefüllt und mit 1xTBE-Puffer aufgefüllt, sodass das Gel vollständig bedeckt war. In die äußerste Tasche wurden 5 µl *GeneRuler*™ 50bp DNA *Ladder* zur Quantifizierung der Fragmentlängen pipettiert. Die weiteren Geltaschen wurden mit jeweils 2 µl Ladepuffer und 5 µl Probe bzw. Positiv- und Negativkontrolle gefüllt. Für die Dauer von 30 Minuten wurde eine Spannung von 80 Volt angelegt bis die Ethidiumbromidbande des Ladepuffers im unteren Kammerbereich sichtbar wurde. Im Anschluss daran, wurde das Gel unter einer UV-Lampe (Bio-Doc Analyze®, Biometra) fotografiert.

2.5 HPV-TYPE 3.5 LCD-ARRAY-KIT

Alle HPV positiven DNA-Proben wurden einer HPV-Typisierung unterzogen. Dazu wurde der HPV-CHIP der Firma CHIPRON®, Berlin eingesetzt. Er ermöglicht die Identifizierung von 32 HP-Virus Typen. Die folgenden Durchführungsschritte sind dem Data-Sheet HPV 3.5 V-II-09 der Firma CHIPRON® im Detail zu entnehmen.

METHODE

Die PCR-Fragmente werden mit einem Hybridisierungs-Puffer gemischt und hybridisieren folglich auf dem individuellen Feld auf einem Chip. Während der Hybridisierung binden die PCR-Fragmente an die spezifischen Proben, die sich auf den Feldern des Chips immobilisiert befinden. In einem kurzen Waschvorgang wird jedes einzelne Feld mit einer von der Firma CHIPRON® produzierten Lösung (Enzym-Konjugat) behandelt, wodurch die Hybridisierungsprodukte gebunden werden. In einem zweiten Waschschrift können die Positionen, an denen PCR-Fragmente und *label solution* gebunden haben, sichtbar gemacht werden.

Dies geschieht durch das sogenannte *blue stain*, welches ein Präzipitat aus Substrat und Enzym darstellt. Die Ergebnisse werden schließlich mit einem Scanner und entsprechender Software der Firma CHIPRON® ausgewertet. Die Abb.8 zeigt den schematischen Aufbau eines LCD-Chips. Die Zahlen entsprechen den jeweiligen HPV-Typen.

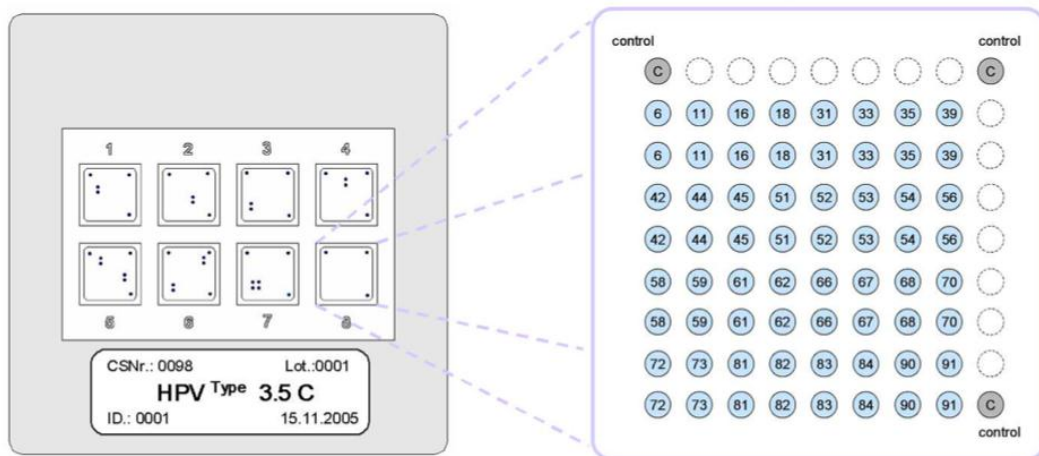


Abb. 8: Schematischer Aufbau eines LCD-Chips. Aus Data Sheet HPV 3.5 V-II-09, CHIPRON®

DURCHFÜHRUNG

Die Abb.9 zeigt eine Übersicht der einzelnen Arbeitsschritte. Eine detaillierte Arbeitsanweisung ist dem Data Sheet HPV 3.5 V-II-09 zu entnehmen.

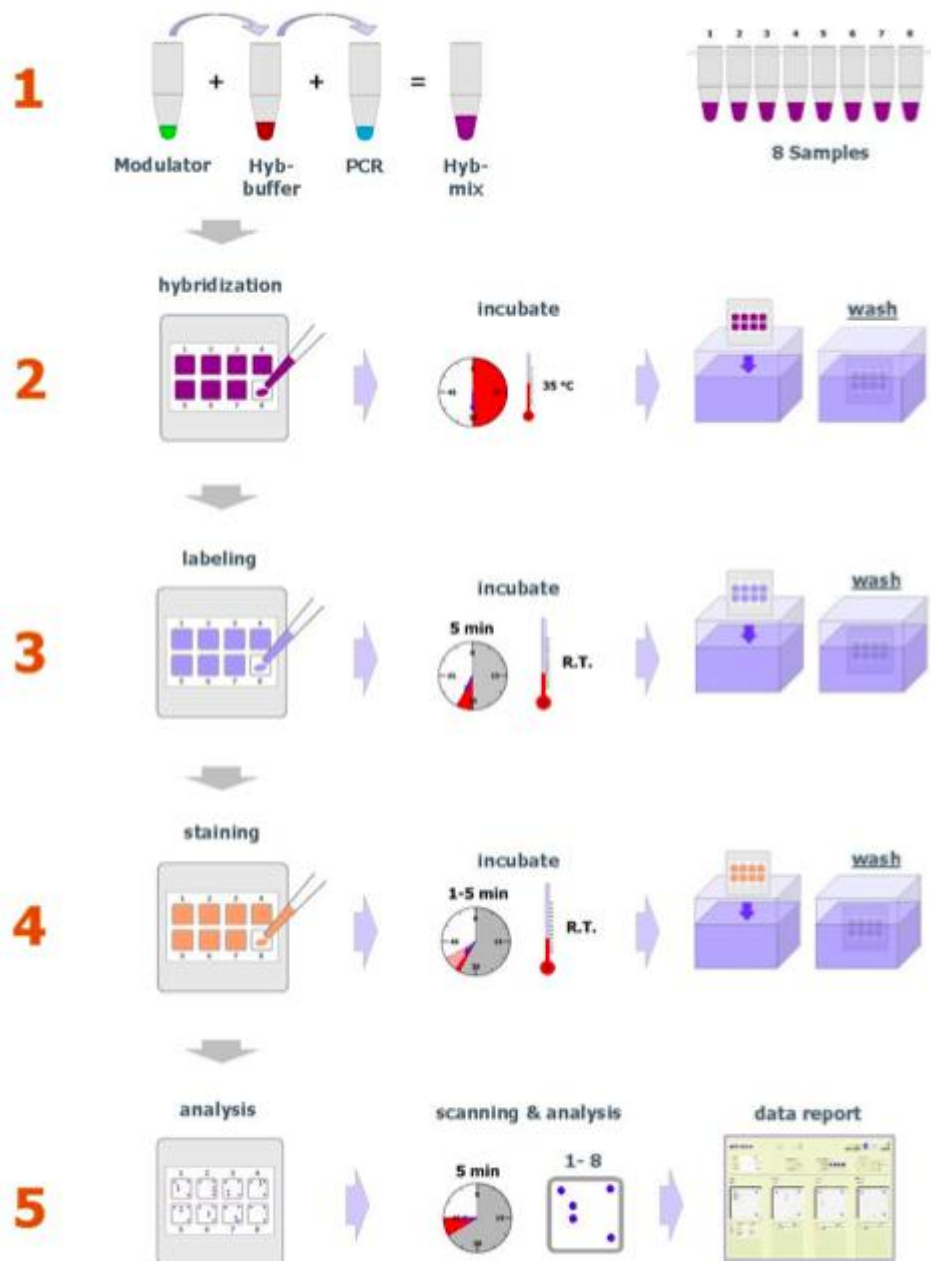


Abb. 9: Arbeitsschritte für die Hybridisierung, Waschung und Färbe-Schritte LCD-Chip. Aus Data Sheet HPV 3.5 V-II-09, CHIPRON®

AUSWERTUNG

Die Datenanalyse der CHiPs erfolgte mit der Software „Slide Reader“ der Firma CHiPRON® (Berlin, Deutschland). Eine beispielhafte Auswertung eines LCD-Chips zeigt die Abb.10. Dargestellt ist im Feld 2 der Nachweis des HPV-Typ 56.

The screenshot shows the SlideReader software interface for an HPV chip analysis. The header includes 'LCD-ARRAY REPORT', 'HPV-Type 3.5 C', 'SUMMARY', and '2012-0025'. The main area displays four fields (Field 1 to Field 4) with their respective results. Field 2 shows a positive result for HPV Type 56. The right side of the interface contains a 'Sample Information' table with five rows for each field, labeled 'Name 1' through 'Name 5'.

Field	Name 1	Name 2	Name 3	Name 4	Name 5
Field 1: 47b					
Field 2: 48					
Field 3: 49					
Field 4: 50					

Abb. 10: Datenanalyse eines HPV-Chip mit der Software "Slide Reader",
Ergebnis Feld 2: HPV 56

2.6 IMMUNHISTOCHEMIE FÜR ECM-1 UND P53

METHODE

Die Immunhistochemie wurde mit einem p53- und ECM-1-Antikörper für alle Proben durchgeführt. Als Primärantikörper für das p53-Antigen diente der „Anti-p53 (Ab-06) (Pantropic) Mouse mAb (DO-1) Cat.No OP43“ der Firma Calbiochem® (Darmstadt, Deutschland) und gegen das ECM-1-Antigen wurde der „ABIN600190“ der Firma antikörper-online® (Aachen, Deutschland) verwendet. Die indirekte Nachweismethode der Bindungsreaktion von Substrat und primärem Antikörper erfolgte mit dem DCS DetectionLine® Nachweissystem der Firma DCS®, Hamburg. Dieses System beruht auf der LSAB (Labelled Streptavidin Biotin)-Methode. Das Nachweissystem besteht aus einem polyvalenten biotinylierten Sekundär-Antikörper (Ziegen-Immunglobulin) und einem Konjugat aus Streptavidin mit Meeretich-Peroxidase (HRP). Die Antigenspezifität richtet sich gegen das Maus-, Ratten-, Kaninchen- und Meerschweinchen- IgG und präadsorbiert das humane IgG.

DURCHFÜHRUNG

Es wurden 2-4 µm dicke Paraffinschnitte auf silanisierte Objektträger (Firma Engelbrecht) aufgezogen und im Brutschrank bei ca. 100°C 15-30 Minuten getrocknet und anschließend wurde mit der Immunhistochemie fortgeföhren. Um die Proben zu entparaffinieren wurden sie 15 Min. in Xylol eingetaucht, durch eine absteigende Alkoholreihe gezogen und schließlich gründlich in Leitungswasser gespült.

Die Tabelle 6 beinhaltet die Einzelschritte der immunhistochemischen Föhbung.

Tabelle 6: Immunhistochemie: LSAB-Methode, Arbeitsschritte

10 Min. 3 % H₂O₂ (Merck 8597)

Mit Leitungswasser spülen

15 Min. Avidin (3 Hühnereiweiß ad 500 ml a.d.)

Mit Leitungswasser spülen

15 Min. Biotin (0,08 g d-Biotin in 410 ml TBS-Puffer) (Sigma 4501)

Mit Leitungswasser spülen

Mit Triton-a.d. spülen (0,04 %iges Triton X-100) (Merck 8603)

Über Nacht bei 4°C Inkubation mit Primärantikörper

Mit Triton-a.d. spülen

15 Min. Inkubation mit polyvalentem, biotinylierten

Sekundärantikörper

Mit Triton-a.d. spülen

15 Min. Inkubation Streptavidin-Meeretich-Peroxidase-Konjugat

Mit Triton-a.d. spülen

10 Min. Inkubation mit Diaminobenzidin (braun) oder 20 Min. AEC

(rot)

Mit Triton-a.d. spülen

Mit Leitungswasser spülen

7 Min. mit Hämalaun gegenfärben

Leitungswasser spülen: kalt, warm, kalt; AEC aus Wasser

eindecken

Aufsteigende Alkoholreihe, Xylol, eindecken

VORBEHANDLUNG IM SCHNELLKOCHTOPF

Zur Freilegung der Epitope erfolgte die Vorbehandlung der Proben bei einem pH-Wert von 9 im Schnellkochtopf (SKT). Dazu wurde der SKT bis zur Markierung 1/3 mit Citratpuffer gefüllt. Ein Plastikgefäß der Firma Roche® wurde mit pH-9 Puffer aufgefüllt und in den Citratpuffer gestellt. Nachdem beides zusammen auf eine Heizplatte gestellt und 15 Minuten auf Stufe 3 erhitzt wurde, wurden die Schnitte in den entsprechend aufgeheizten Puffer gegeben, der SKT mit Deckel geschlossen und das Gemisch für weitere 15 Minuten erhitzt. Sobald der 2. Ring der Druckanzeige (nach ca. 5 Min.) erschien, wurde die Heizplatte auf Stufe 1 zurückgestellt. Nach den abgelaufenen 15 Min. wurde der SKT von der Heizplatte heruntergenommen, der Topf 5 Min. abgekühlt und anschließend manuell der Druck abgelassen. Zum Schluss wurde der Deckel entfernt, das Plastikgefäß entnommen, der SKT unter Leitungswasser geflutet und die Schnitte aus dem Puffer zügig in kaltes Wasser gesetzt.

Tabelle 7 stellt die Anleitung der Pufferherstellung dar.

Tabelle 7: Anleitung zur Herstellung der Puffer

Citratpuffer pH 6 (10mM):	TRIS-Puffer pH 7,6 (0,05 M):
21 g Citronensäure (Merck 8382)	6,1 g Tris (Merck 8382)
25 ml NaOH (2mol) (Fluka 38212)	In 50 ml A. d lösen
Ad 10 Liter A. d.	41 ml 1M HCL
	Ad 1000 ml A. d.

2.7 MIKROSKOPISCHE AUSWERTUNG DER P53 UND ECM-1- IMMUNHISTOCHEMIE

Die mikroskopische Auswertung der p53- und ECM-1-Expression erfolgte durch drei voneinander unabhängige Personen, Herrn Prof. Dr. med. S.E Baldus (Pathologie UKD), Herrn Prof. Dr. med. U.R Hengge (Dermatologiezentrum, Düsseldorf) und der Doktorandin (UFK Düsseldorf). Zusätzlich zur immunhistochemischen Auswertung erfolgte die Begutachtung der HE-Schnitte in Hinsicht auf histologische Zeichen für den Lichen sclerosus durch Herrn Prof. Dr. med. Hengge. Die Auswertung erfolgte semiquantitativ und die p53-Expression und ECM-1-Expression wurde über die Anzahl der Zellen mit nukleärer Expression des Antigens (Angabe in Prozent) in drei Gruppen eingeteilt, wobei eine Färbung von $\geq 50\%$ der Zellen als positiv galt und alle Werte, die darunter lagen, negativ gewertet wurden:

1. Negativ bis sehr schwache Expression ($< 10\%$ positiv gefärbte Zellen)
2. Mäßige Expression (10-50% positiv gefärbte Zellen)
3. Starke Expression ($> 50\%$ der positiv gefärbte Zellen)

2.8 STATISTIK

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit der Hilfe der Statistikberatung 0.5® (Düsseldorf, Deutschland). Neben der rein deskriptiven Auswertung der Ergebnisse wurden interferenzstatistische Verfahren wie der t-Test und die Pearson-Korrelation angewandt. Es wurde stets zweiseitig getestet und ein Signifikanzniveau von 5% zugrunde gelegt.

Die Analyse der Daten wurde mittels IBM SPSS Statistics, Version 20.0

(IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.) durchgeführt.

3. ERGEBNISSE

3.1 ALLGEMEINE BESCHREIBUNG DES PATIENTENKOLLEKTIVS

Von den in der Universitätsfrauenklinik Düsseldorf (Direktorin: Universitätsprofessorin Dr. med. T. Fehm) operierten Patientinnen mit VIN 3 der Jahre 2006-2012 konnten im Zentrum für Pathologie der Universität Düsseldorf (Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. H. E. Gabbert) die Paraffinblöcke sowie die HE-Schnitte von 35 Patientinnen gewonnen werden. Bei den Läsionen der Patientinnen handelte es sich um Präneoplasien in Form von vulvären intraepithelialen Neoplasien dritten Grades (VIN 3), invasive Läsionen waren ausgeschlossen. Die entsprechenden Läsionen befanden sich zwischen der Klitoris und der Urethra, der sogenannten vorderen Kommissur. Therapie der Wahl war bei allen Patientinnen die Exzision/Laserexzision oder die PE gefolgt von einer CO₂-Laservaporisation.

3.2 KLINISCHE PARAMETER

3.2.1 ALTER

Im Gesamtkollektiv betrug das mittlere Alter der Patientinnen 54,66 Jahre. Die Abb.11 zeigt die Altersverteilung in Form eines Histogramms.

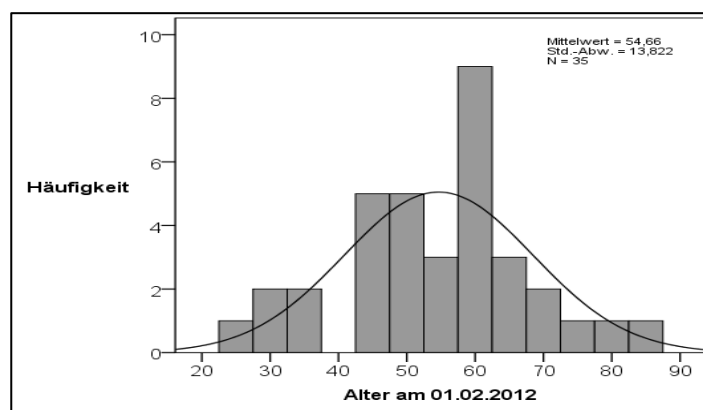


Abb. 11: Altersverteilung des Gesamtkollektivs

Da bei jungen Frauen mit VIN 3 die HPV-induzierte Genese, bei älteren die lichen-induzierte Genese überwiegt, wurden zwei Kollektive unterschieden:

a. <50 Jahre und b. >50 Jahre. 11 von 35 Patientinnen (31 %) waren zum Zeitpunkt der Untersuchung unter 50 Jahre alt, während 24 von 35 Frauen (69 %) über 50 Jahre alt waren (Abb.12).

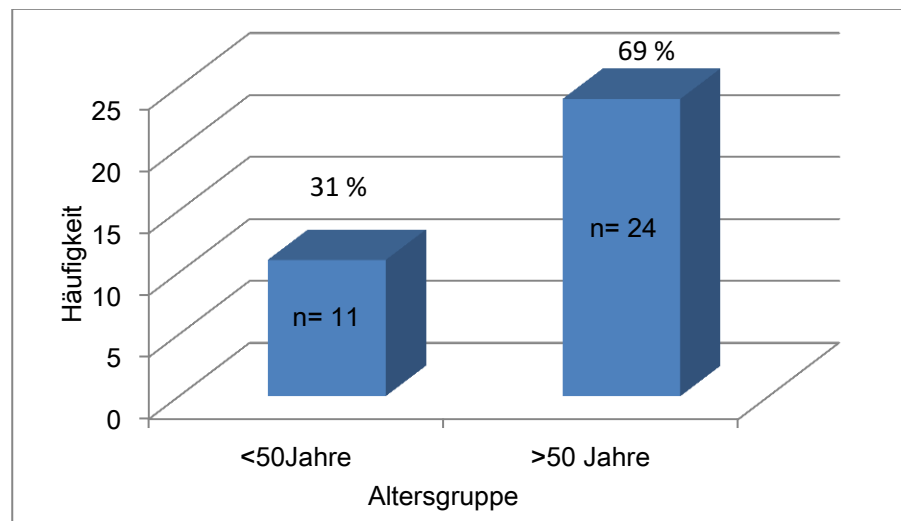


Abb. 12: Absolute und relative Häufigkeiten der Altersgruppe < vs. > 50 Jahre, Gesamtkollektiv

3.2.2 BESCHWERDEN

Aus den Anamnesedaten konnte für jede Patientin ein Beschwerdebild, definiert als Brennen und/oder Juckreiz in der Genitalregion, erhoben werden (Abb.13). 16 von 35 Patientinnen (46 %) gaben Beschwerden an, während 19 Frauen (54 %) die Frage nach Beschwerden verneinte.

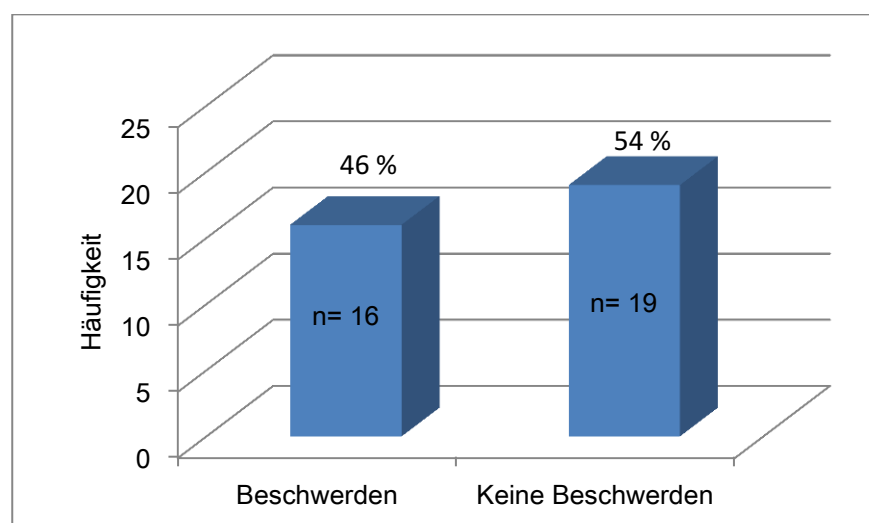


Abb. 13: Absolute und relative Häufigkeiten von Beschwerden (Brennen und Juckreiz) vs. keine Beschwerden, Gesamtkollektiv

3.2.3 MENOPAUSE

Bei allen Patientinnen war der Menopausenstatus bekannt. Es zeigte sich eine leichte Tendenz in Richtung Frauen während der Menopause im Vergleich zu Frauen, die noch nicht in der Menopause waren (Abb.14). 20 von 35 (57 %) Patientinnen befanden sich in der Menopause, während 15 Frauen (43 %) noch regelmäßig menstruierten.

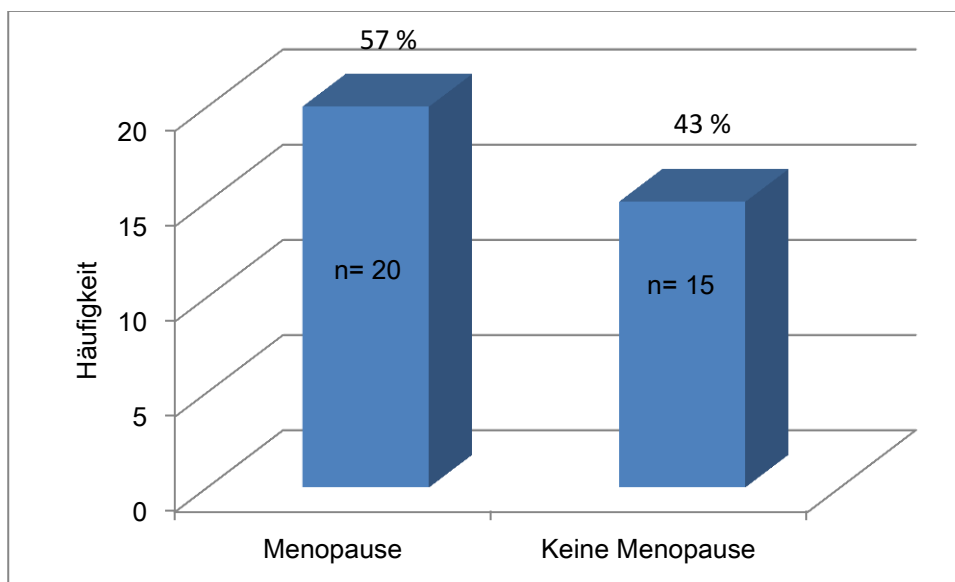


Abb. 14: **Absolute und relative Häufigkeiten Menopause vs. keine Menopause**, Gesamtkollektiv

3.3 BIOMARKER

3.3.1 HPV-DNA NACHWEIS IN DER VIN 3-LÄSION

Es konnte für alle Patientinnen der HPV-Status im Gewebe ermittelt werden. Die molekularbiologischen Methoden lieferten Ergebnisse, die qualitativ hochwertig und reproduzierbar waren.

Die Negativkontrollen (A. d.) waren durchweg negativ und die Positivkontrolle (hausinterne Probe der Pathologie des UKD: K+ 326-09, Typ 31 positiv) durchweg positiv. 17 von 35 Patientinnen (49%) waren positiv für HPV-DNA, während in 18 Läsionen (51%) keine HPV-DNA nachgewiesen wurde (Abb.15).

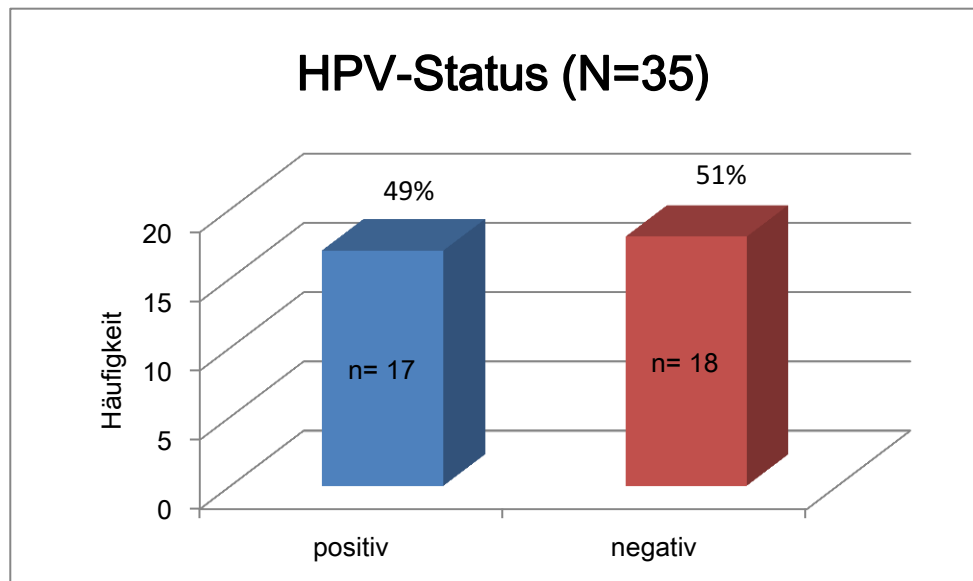


Abb. 15: HPV-DNA Nachweis in VIN 3-Läsionen der vorderen Kommissur

3.3.2 HPV-TYPEN-BESTIMMUNG

In allen HPV-positiv getesteten VIN3-Läsionen (n=17) wurde der zugrunde liegende HPV-Typ bestimmt (Abb.16). Es wurden neun unterschiedliche HPV-Typen identifiziert, wovon 5 Proben zur Sequenzierung weggeschickt wurden (Biomedizinisches Forschungszentrum der Universität Düsseldorf).

In 14 Fällen wurde ein *high-risk* Typ nachgewiesen (16, 31 und 56). In drei Fällen konnte ein *low-risk* Typ (6, 11 und 73) nachgewiesen werden. Seltenerer Typen mit unbekanntem Risiko (107, FOSMID clone ABC12-46660900G8 from chromosome 4, *Homo sapiens chromosome 8 clone RP 11-7F18) ließen sich in 4 Fällen nachweisen.

Der *hr*-HPV-Typ 31 war am häufigsten vertreten (n=10), gefolgt vom *hr*-HPV-Typ 16 (n=5). Die restlichen HPV-Typen verteilten sich regelmäßig auf den Rest der HPV-positiv getesteten Frauen.

In 6 Fällen wurde eine Mehrfachinfektion durch verschiedene HPV-Typen identifiziert, wobei bei diesen immer die *hr*-HPV-Typen 16 und 31 vertreten waren.

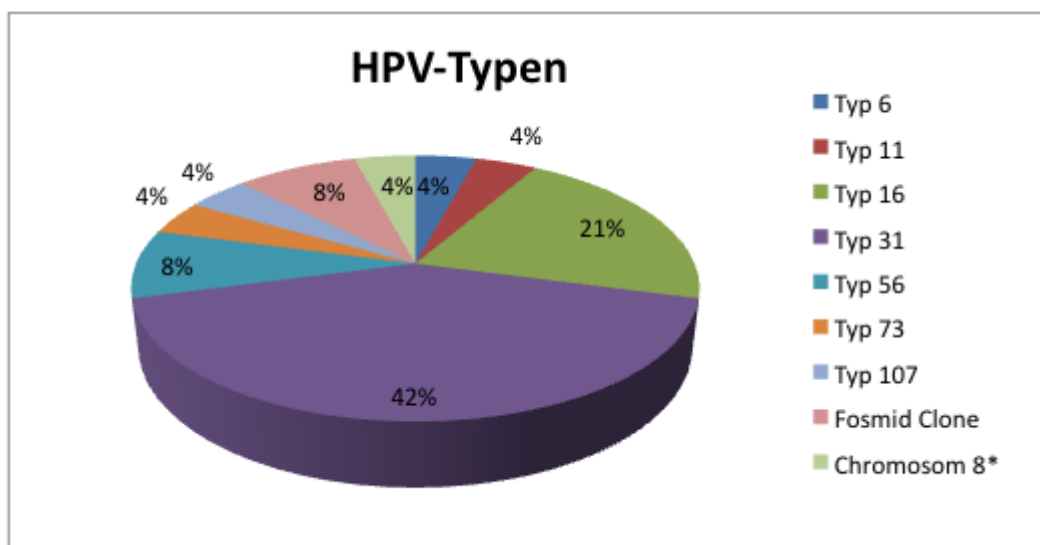


Abb. 16: HPV-Typen in n=17 untersuchten VIN 3-Läsionen

Tabelle 8: HPV-Mischinfektionen

HPV-Kombinationen	Häufigkeit	Prozent
16+56	1	5,9
16+107	1	5,9
31+56	1	5,9
31+6	1	5,9
31+Chromosom 8*	1	5,9
16+31+73	1	5,9

3.3.3 p53-EXPRESSION IM GEWEBE

Der p53-Status wurde mittels p53 Immunhistochemie in allen VIN3-Läsionen (N=35) bestimmt. Als positiver p53-Status galt eine Zellfärbung von $\geq 50\%$ aller Zellen bei einer starken Färbeintensität. Es zeigte sich ein positives Ergebnis bei 15 von 35 Frauen (43%). Negativ fiel die Immunhistochemie bei 20 Läsionen (57%) aus (Abb.17).

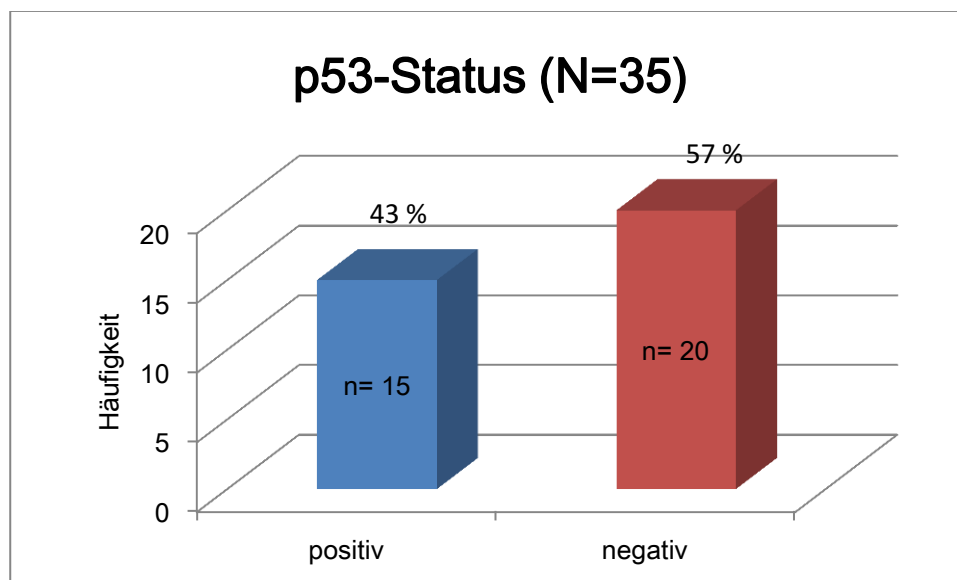


Abb. 17: Absolute und relative Häufigkeiten des p53-Status aller VIN 3-Läsionen

3.3.4 ECM-1 EXPRESSION IM GEWEBE

Alle Gewebeproben (N=35) wurden mit einem gegen das extrazelluläre Matrixprotein-1 gerichteten monoklonalen Antikörper immunhistochemisch gefärbt, welches beim Lichen sclerosus überexprimiert wird (Gambichler et al., 2012). Die Färbung wurde quantitativ ausgewertet.

25 VIN3-Läsionen (71%) des Gesamtkollektivs (N=35) zeigten eine Überexpression (\geq 50% ECM-1-positiv gefärbte Zellen) und galten somit als ECM-1-positiv. 10 Läsionen (29 % des Gesamtkollektivs) wurden negativ bewertet (Abb. 20). Ein positives Färbeergebnis zeigen Abb.18 und 19.

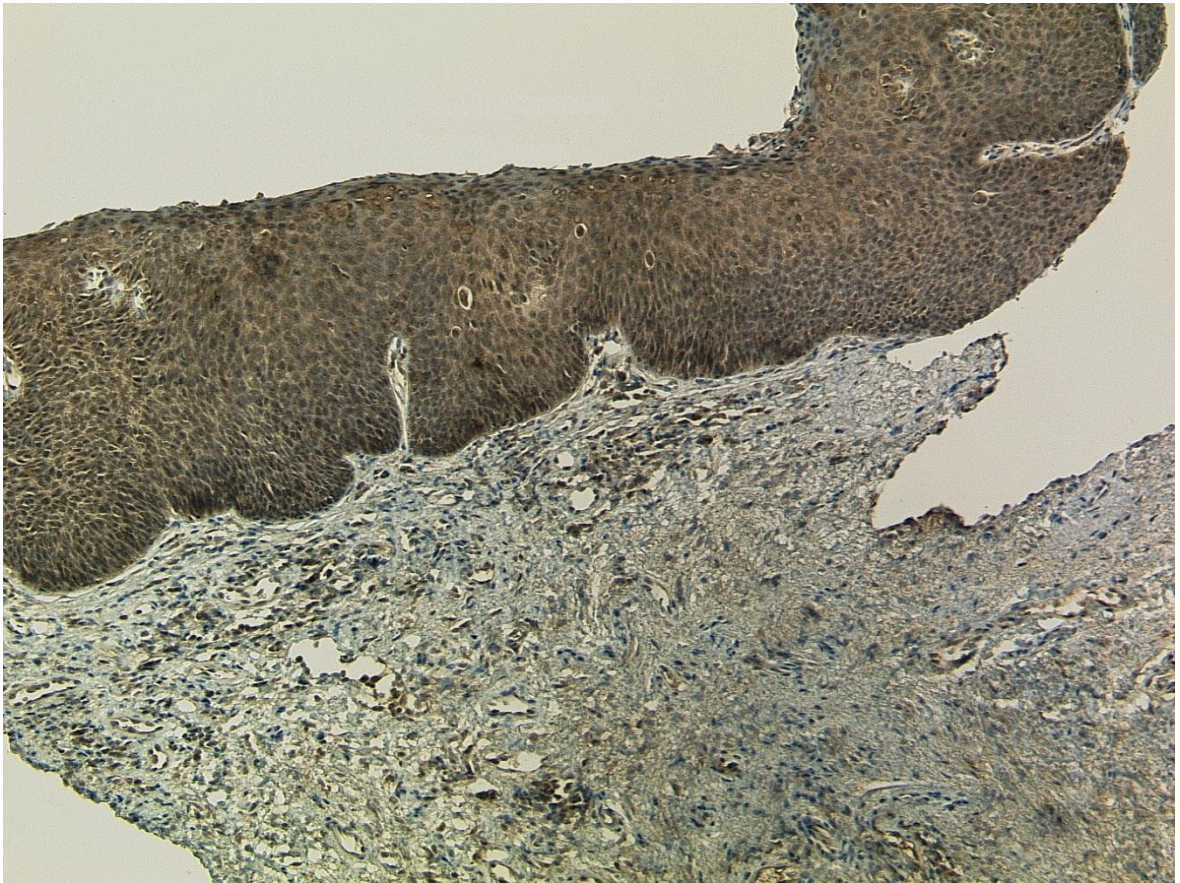


Abb. 18: VIN 3 vordere Kommissur, ECM-1-positiv, 10xVergrößerung

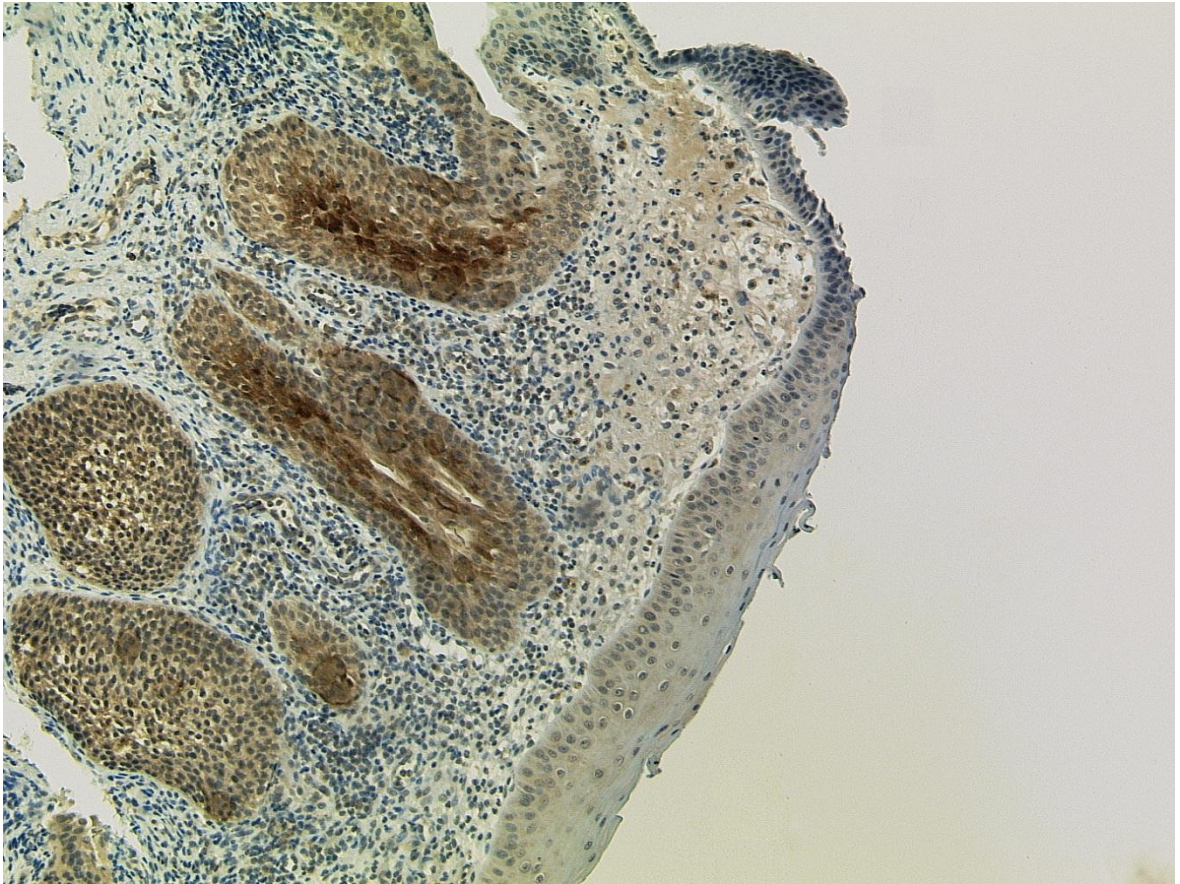


Abb. 19: VIN 3 vordere Kommissur, ECM-1-positiv, 10x Vergrößerung

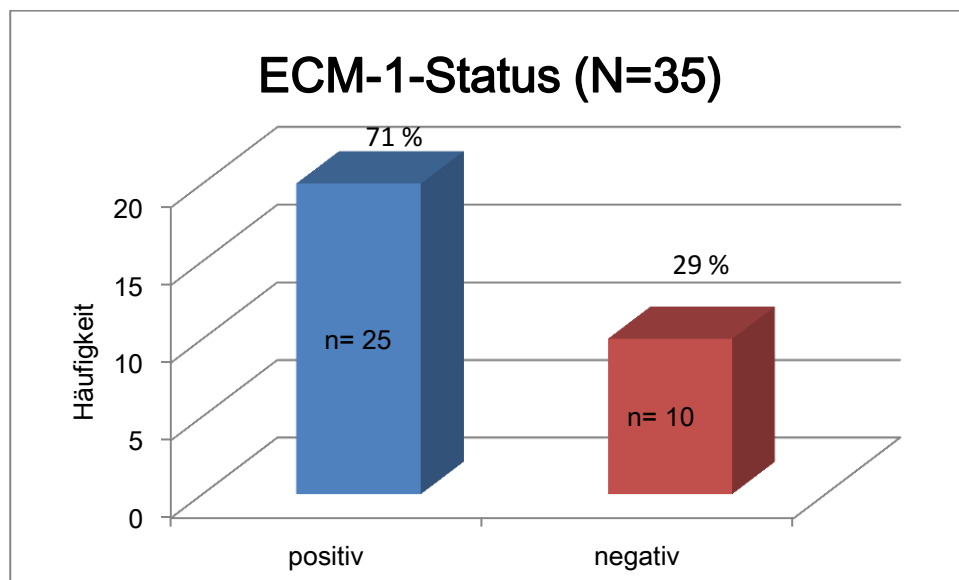


Abb. 20: Absolute und relative Häufigkeiten des ECM-1-Status aller VIN 3-Läsionen

3.4 SPEZIFISCHE BEFUNDE

In folgendem wurden die erhobenen Einzelergebnisse auf verschiedene Zusammenhänge hin ausgewertet:

- 1) Biomarker in Abhängigkeit des Alters der Frauen
- 2) Biomarkerkombination HPV und ECM-1 in Abhängigkeit des Alters der Frauen
- 3) Beschwerdeauftritt in Abhängigkeit des Alters der Frauen
- 4) Vergleich der ECM-1-Expression in VIN3-Läsionen und in gesundem Gewebe

Dabei wird eine nachgewiesene HPV-Infektion als HPV-induziert gewertet und eine Überexpression von p53 und ECM-1 als Zeichen für eine lichenoiden Genese angesehen.

3.4.1 HPV, P53 UND ECM-1 IN ABHÄNGIGKEIT DES ALTERS DER FRAUEN

HPV UND ALTER

Die Einzelergebnisse der Biomarker wurden in Abhängigkeit der Altersgruppen unter und über 50 Jahre ausgewertet. In der Altersklasse <50-Jahre wurden 8 von 11 Frauen positiv für HPV getestet (73%) und 3 von 11 Frauen HPV-negativ getestet (27%) (Abb.21 und 22).

Hingegen wiesen in der Gruppe der Frauen >50 Jahre nur 9 von 24 Frauen einen positiven HPV-Status auf (38%), während 15 Patientinnen HPV-negativ getestet wurden (63%) (Abb. 21 und 23).

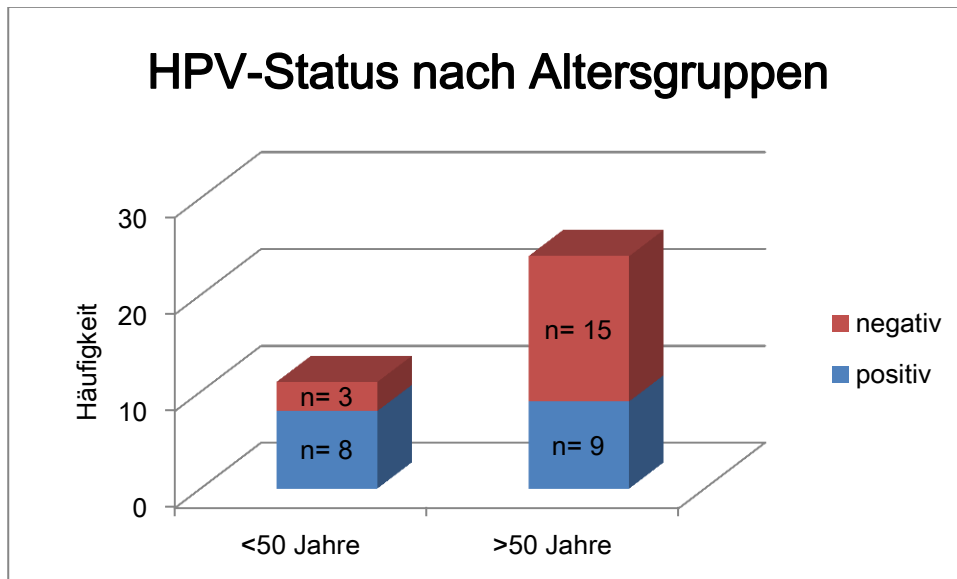


Abb. 21: HPV-Status in Abhängigkeit des Alters der VIN 3 Patientinnen

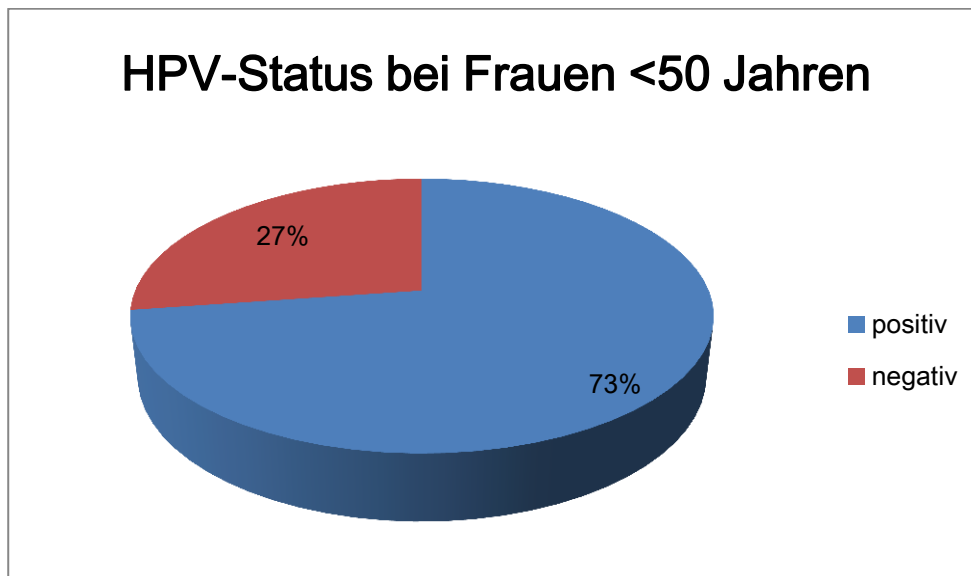


Abb. 22: Relative Häufigkeit des HPV-Status bei Frauen <50 Jahren

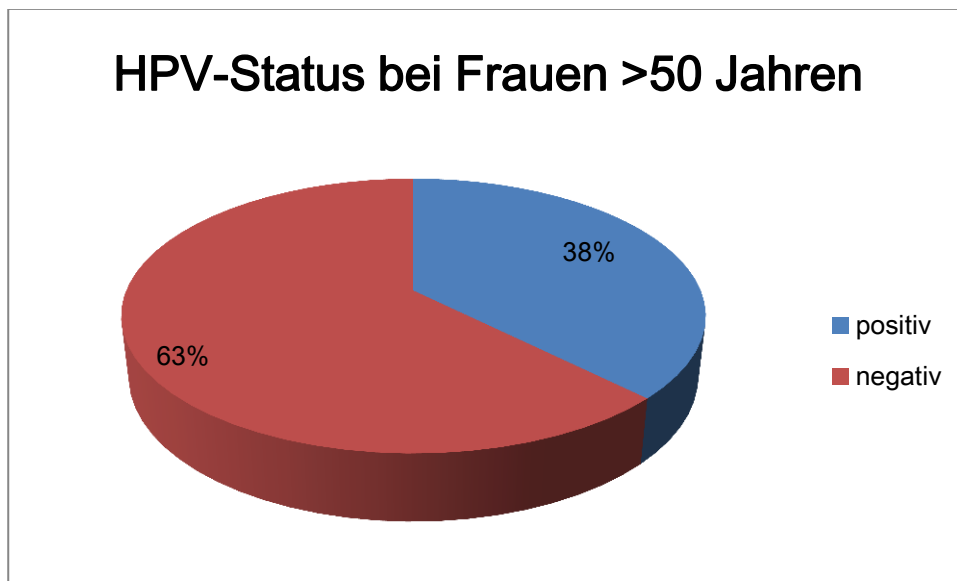


Abb. 23: Relative Häufigkeit des HPV-Status bei Frauen >50 Jahren

P53 UND ALTER

Die p53-Expression wurde ebenfalls für die beiden Altersklassen unter und über 50 Jahre gesondert untersucht. Die Gruppe der <50-jährigen Frauen (n=11) umfasst eine Patientin (9%) mit positivem p53-Status ($\geq 50\%$ gefärbte Zellen bei starker Färbintensität) und 10 Frauen (91%), die p53-negativ getestet wurden (Abb. 24 und 25). Im Einzelkollektiv der >50-jährigen Frauen wiesen 14 von 24 Frauen (58%) einen positiven p53-Status auf, während 10 Frauen p53-negativ waren (42%) (Abb. 24 und 26).

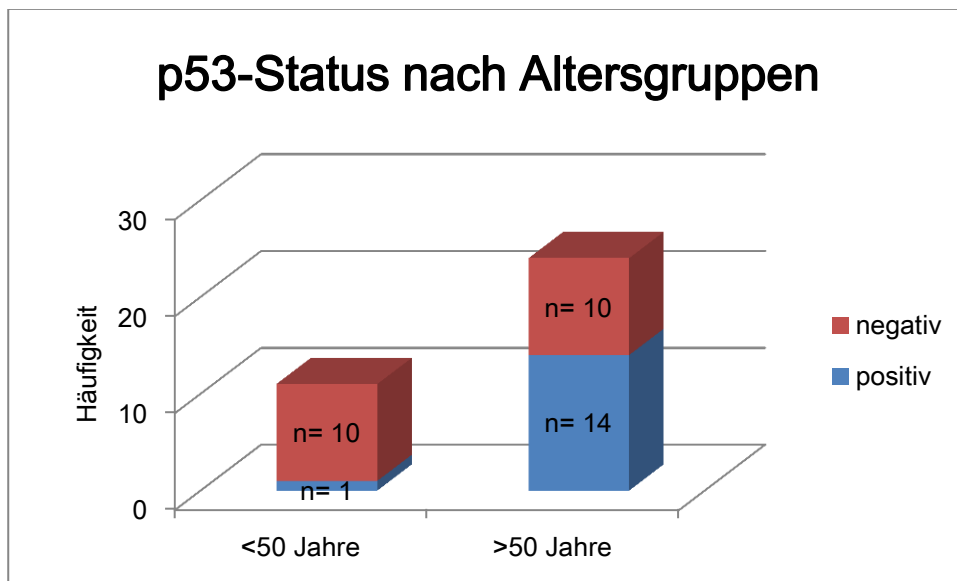


Abb. 24: p53-Status in Abhängigkeit des Alters der VIN 3 Patientinnen

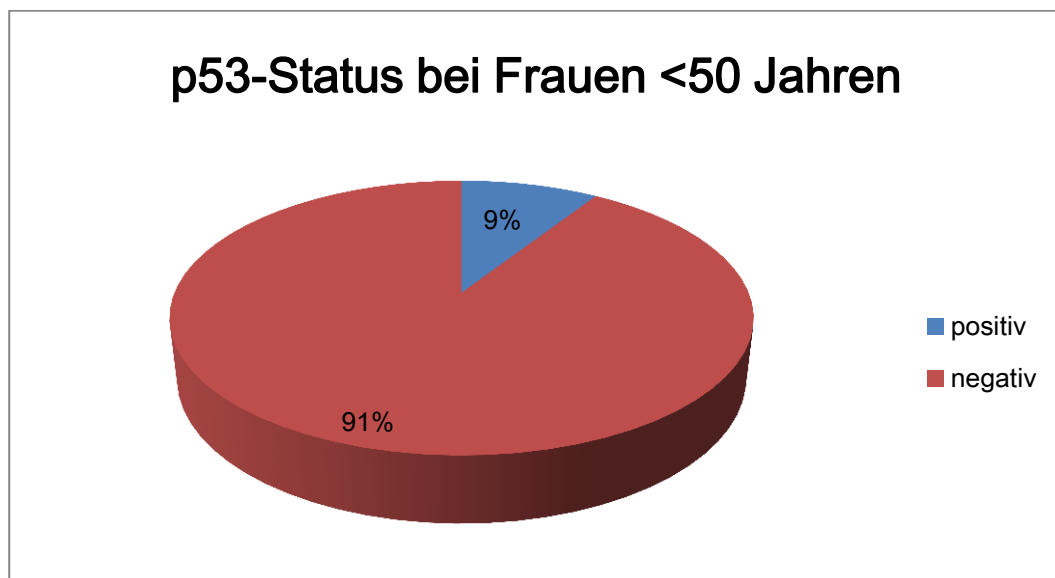


Abb. 25: Relative Häufigkeit des p53-Status bei Frauen <50 Jahre

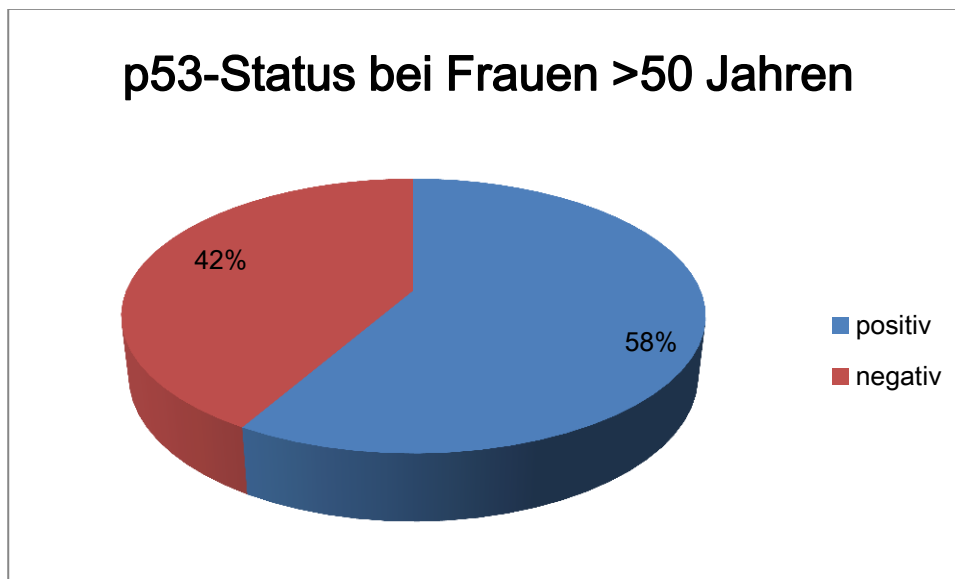


Abb. 26: Relative Häufigkeit des p53-Status bei Frauen >50 Jahre

ECM-1 UND ALTER

Die Ergebnisse der ECM-1 Überexpression im Gesamtkollektiv wurden genau wie die HPV und p53 Ergebnisse in Abhängigkeit vom Alter der Frauen zum Zeitpunkt der Untersuchung ausgewertet. In der Altersklasse der <50 Jahre alten Frauen gab es 6 von 11 Frauen (45%), die ECM-1-positiv getestet wurden ($\geq 50\%$ gefärbte Zellen bei starker Färbeintensität) und 5 von 11 Frauen (55%) zeigten keine ECM-1-Überexpression (Abb.27 und 28).

Die Altersgruppe >50 Jahre beinhaltete 19 von 24 Frauen mit positivem ECM-1-Status (79%) und fünf Frauen (21%) in dieser Gruppe waren ECM-1-negativ (Abb.27 und 29).

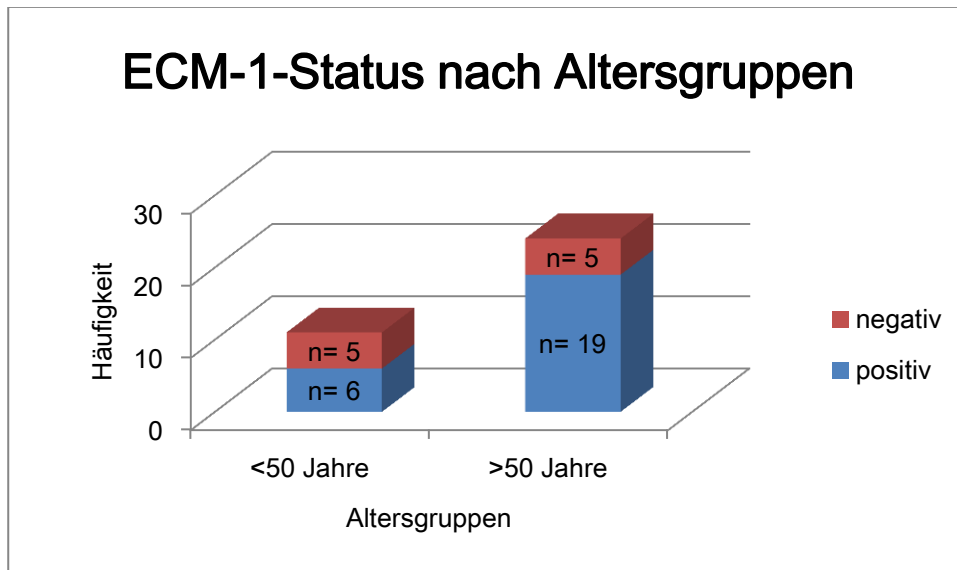


Abb. 27: ECM-1 Status in Abhängigkeit des Alters der VIN 3 Patientinnen

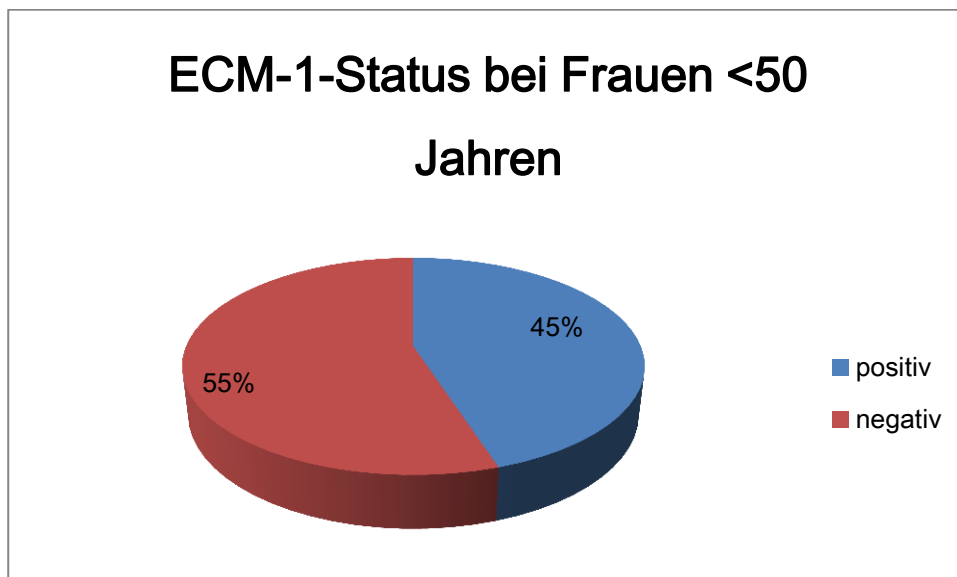


Abb. 28: Relative Häufigkeit des ECM-1 Status bei Frauen < 50 Jahre

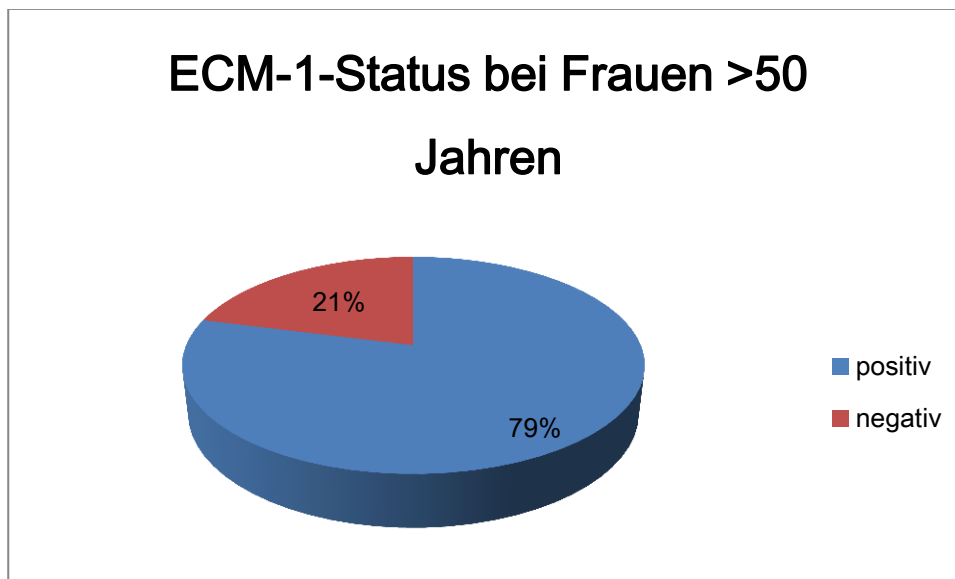


Abb. 29: Relative Häufigkeit des ECM-1 Status bei Frauen >50 Jahre

3.4.2 HPV UND ECM-1 IN ABHÄNGIGKEIT DES ALTERS

Aufgrund der angenommenen unterschiedlichen Pathogenesen der HPV-induzierten Läsionen und der Läsionen mit lichenoider Genese und ECM-1-Überexpression wurden die beiden Biomarker gemeinsam im Verhältnis zum Alter untersucht, um mögliche Gemeinsamkeiten bzw. Differenzen aufzuzeigen.

Die Altersklasse <50 Jahre (n=11) setzt sich zusammen aus 3 HPV-negativ und 8 HPV-positiv getesteten Frauen. 2 der 3 HPV-negativen Frauen zeigten gleichzeitig einen ECM-1-positiven Status; eine HPV-negative Patientin war gleichzeitig ECM-1-negativ (Abb.30). Die 8 HPV-positiven Frauen <50 Jahren wurden jeweils zur Hälfte (n=4) ECM-1-positiv und ECM-1-negativ getestet (Abb.30).

Die Altersklasse >50 Jahre umfasste insgesamt 24 Patientinnen, 15 waren HPV-negativ und 9 Patientinnen waren HPV-positiv.

4 Frauen waren HPV-negativ und gleichzeitig ECM-1-negativ. 11 von 15 HPV-negativ getesteten Frauen zeigten parallel eine ECM-1-Überexpression, d. h. sie galten als ECM-1-positiv.

Die Gruppe der >50 Jährigen (n=24) beinhaltete 9 HPV-positiv getestete Frauen, wovon eine Patientin gleichzeitig einen ECM-1-negativen Status aufwies und 8 Patientinnen eine Läsion mit ECM-1-Überexpression zeigten (Abb.30).

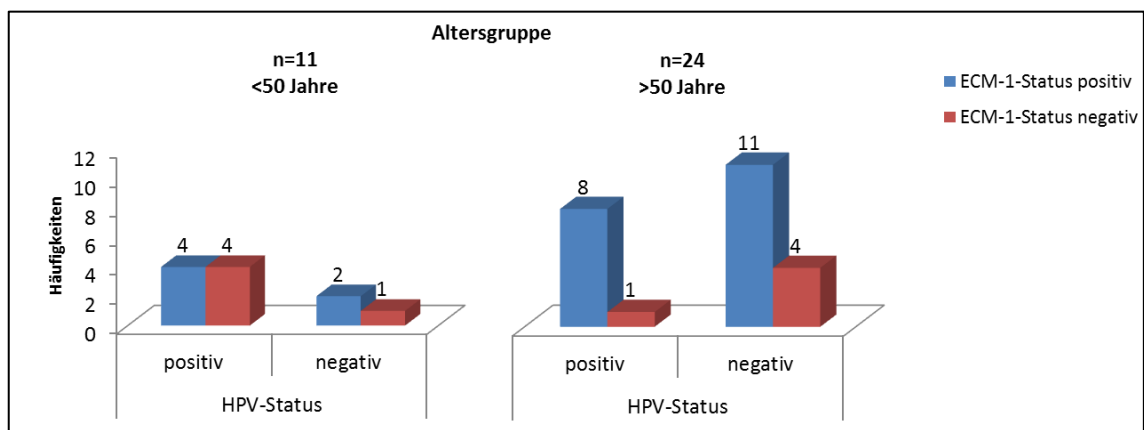


Abb. 30: HPV- und ECM-1- Status in den Gruppen < und > 50 Jahre

3.4.3 GIBT ES EINEN ZUSAMMENHANG ZWISCHEN DEM AUSMAß DER ECM-1- EXPRESSION UND DEM AUFTRETEN VON BESCHWERDEN?

Um die ECM-1-Expression bei Frauen mit Beschwerden und Frauen ohne Beschwerden miteinander vergleichen zu können, wurden in beiden Gruppen der Mittelwert des prozentualen Anteils ECM-1 gefärbter Zellen bestimmt. Der Mittelwert betrug bei Frauen mit Beschwerden in der Anamnese 70%, während in der Gruppe ohne angegebene Beschwerden im Mittel 52% der Zellen ECM-1-positiv angefärbt wurden (Abb.31).

Zur Prüfung des statistischen Signifikanzniveaus wurde ein t-Test bei unabhängigen Stichproben durchgeführt. Dieser ergab einen p-Wert von 0,078 (Tab.9). Somit war der Unterschied der Mittelwerte der gefärbten ECM-1 Zellen beider Gruppen statistisch nicht signifikant.

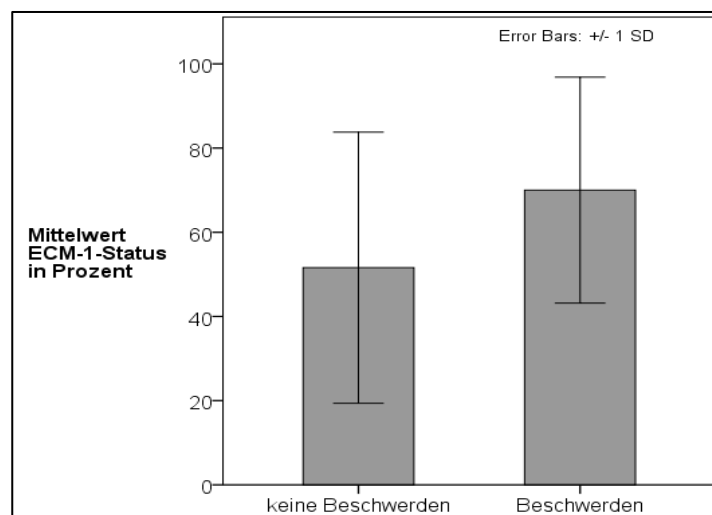


Abb. 31: Mittelwerte des prozentualen Anteils ECM-1 gefärbter Zellen

Tabelle 9: t-Test bei unabhängigen Stichproben

T-Test für die Mittelwertgleichheit			
	T	df	Sig. (2-seitig)
ECM1 (in%)	-1,817	33	0,078

3.3.4 UNTERSCHIEDEN SICH DIE ECM-1 BEFUNDE IN VIN 3-LÄSIONEN DER VORDEREN KOMMISSUR VON DEN ECM-1 BEFUNDEN EINER GESUNDEN KONTROLLPOPULATION?

Um eine Aussage darüber treffen zu können, in wie weit sich der Anteil der ECM-1 gefärbten Zellen in der Gruppe der Frauen mit VIN3-Läsionen von dem Anteil der ECM-1 gefärbten Zellen in einer gesunden Kontrollpopulation unterscheidet, wurden die Mittelwerte dieser beiden Gruppen miteinander verglichen. Die Werte für den prozentual gefärbten Anteil der ECM-1-positiven Zellen am Gesamtzellsatz wurden mittels Immunhistochemie und anschließender mikroskopischer Auswertung bestimmt. In der Gruppe der Frauen mit VIN 3 der vorderen Kommissur (N=35) betrug der errechnete Mittelwert der mit ECM-1 gefärbten Zellen 60 (M=60, SD=30,87) (Tab.10). Da wir aus ethischen Gründen darauf verzichtet haben, Gewebeproben aus der Genitalregion gesunder Frauen zu entnehmen, wurden uns freundlicherweise die Daten einer gesunden Kontrollpopulation (N=10) von Gambichler et al. zur Verfügung gestellt. In dieser gesunden Kontrollpopulation ergab der Mittelwert des prozentualen Anteils der mit ECM-1 gefärbten Zellen 1,4 (M=1,4, SD= 1,5) (Tab.11). Zur Prüfung des statistischen Signifikanzniveaus wurde ein t-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt, welcher einen p-Wert von 0,000 ergab. Die Analyse zeigte, dass der

prozentuale Anteil gefärbter Zellen bei Patientinnen mit VIN 3 der vorderen Kommissur signifikant höher ausfiel als in einer gesunden Kontrollpopulation ($p < 0,001$) (Tab. 11).

Tabelle 10: Mittelwerte des prozentualen Anteils ECM-1 gefärbter Zellen in VIN 3 Läsionen der

vorderen Kommissur			
	N	Mittelwert	Standardab- weichung
ECM-1- Färbeanteil (in %)	35	60	30,87

Tabelle 11: Vergleich der Mittelwerte der ECM-1 Färbeanteile Stevens-Gambichler, t-Test

	Stevens	Gambichler et al. (2012)	t-Test	
N	35	10	df	39,24
ECM-1 Prozentwert	Mean	60	t	24,56
	SD	30,87	p	0
	S.E.	5,22		0,47

4. DISKUSSION

4.1 ÜBERSICHT

Die Inzidenz der präneoplastischen Läsionen der Vulva ist steigend (Akerman et al., 2007; Judson et al., 2006). Nach heutigem Kenntnisstand existieren zwei unterschiedliche Präkanzerosen für das Vulvakarzinom mit jeweils unterschiedlicher pathologischer Genese. Auf der einen Seite gibt es die klassische VIN, die vor allem jüngere Patientinnen betrifft und zu 90% auf dem Boden einer Infektion mit dem humanen Papillomvirus entsteht (Toki et al., 1991; Ueda et al., 2004; van Beurden et al., 1995). Demgegenüber steht die differenzierte VIN, die meist bei älteren Frauen in Abwesenheit des HP-Virus auftritt und mit einem Lichen sclerosus assoziiert ist (Haefner et al., 1995; Toki et al., 1991; Yang & Hart, 2000). Die Heterogenität der verschiedenen vulvären Läsionen spiegelt sich auch in der unterschiedlichen Assoziation mit dem HP-Virus wieder. Während die Läsionen der kleinen oder großen Labien von 9%-70% bezüglich der HPV-Assoziation variiert (De Sanjosé et al., 2013; De Vuyst et al., 2009; Hampl et al., 2008; Iwasawa et al., 1997; Knopp et al., 2006; Lerma et al., 1999; A. Pinto et al., 2004; Skapaet al., 2007; Sutto et al., 2008), spielt dieser an der vorderen Kommissur eine deutlich geringere Rolle (42%) (Reuschenbach et al., 2013). Die Lokalisation der vorderen Kommissur zwischen Urethra und Klitoris ist eine immer häufiger in der UFK Düsseldorf gesehene Prädilektionsstelle der präinvasiven und invasiven vulvären Läsionen (Hampl et al., 2008). Bislang gibt es jedoch keinerlei Literatur zu präinvasiven Läsionen der Vulva an der vorderen Kommissur.

Die vorhandenen Arbeiten umfassen die vulvären intraepithelialen Neoplasien 1-3 im gesamten Bereich der Vulva, nicht explizit die Läsionen der vorderen Kommissur. Als einzige Studie zu Vulvakarzinomen der vorderen Kommissur ist die multizentrische, jüngst veröffentlichte Studie von Reuschenbach et al. zu nennen. Diese untersuchten 135 Vulvakarzinome der vorderen Kommissur und 52 Tumoren anderer Lokalisationen, die als Referenztumoren galten. Neben der Untersuchung klinischer Parameter, wie Alter der Frauen, Nikotinabusus und Parität, führten sie immunhistochemische Färbungen für die Proliferationsmarker p53 und p16^{INK4a} durch. Des Weiteren untersuchten sie die Tumoren auf das Vorhandensein von HPV-, EBV- und Herpes-Viren-DNA. Nach Auswertung aller Daten kamen sie zu dem Ergebnis, dass sowohl das Vulvakarzinom als auch die Referenztumoren durch drei verschiedene pathogenetische Mechanismen entstehen: HPV-induziert, nach p53-Mutation oder durch einen bislang unbekanntem Mechanismus. Die Mehrzahl der untersuchten Tumoren der Studie fiel in die Gruppe unklarer Mechanismus (42,6%) (Reuschenbach et al., 2013).

In der vorliegenden Arbeit wurde diese bislang ungeklärte Entität der VIN3-Läsionen der vorderen Kommissur hinsichtlich Alter der Patientinnen, Beschwerden, Menopause, HPV, p53 und ECM-1 weiterführend untersucht und besonderes Augenmerk auf den Zusammenhang zwischen den Läsionen und der ECM-1-Expression gelegt.

Das klinische Bild der untersuchten Läsionen gleicht einer lichenoiden Veränderung. Aufgrund dieser Beobachtung wurde ein Marker-Protein gewählt, dessen Expression bei Patienten mit Lichen sclerosus erhöht ist.

Immunhistochemische Färbungen mit dem Marker ECM-1 zeigten in einer aktuellen Studie von Gambichler et al. bei Patienten mit Lichen sclerosus eine hochsignifikant höhere Expression von ECM-1 im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (Gambichler et al., 2012).

Die VIN3-Läsionen der 35 Patientinnen wurden ebenfalls mit dem ECM-1 Protein gefärbt, um eine mögliche pathogenetische Beziehung der VIN3-Läsionen der vorderen Kommissur und einem Lichen sclerosus zu verifizieren.

4.2 KLINISCHE PARAMETER

ALTER, BESCHWERDEN UND MENOPAUSE

Das mittlere Alter der Patientinnen betrug 54 Jahre. Damit liegt es ca. 10 Jahre unter dem mittleren Alter der differenzierten VIN (Yang & Hart, 2000). Die Mehrheit (ca. 70%) der Patientinnen unserer Studie war über 50 Jahre und 30% der Frauen waren unter 50 Jahre. Aufgrund der Tendenz zum eher älteren Jahrgang würden die Läsionen der Patientinnen in die Gruppe der differenzierten VIN passen. Während die klassische VIN eher multifokal vorkommt und jüngere Frauen betrifft, ist die differenzierte VIN eine eher bei älteren und postmenopausalen Frauen auftretende, meist unifokale Veränderung (Fox & Wells, 2003; Monk et al., 1995; Sideri et al., 2005; van der Avoort et al., 2006). Hinsichtlich des Auftretens von Pruritus und Brennen ließ sich bei den Frauen fast kein Unterschied (45,7% Beschwerden versus 54,3% keine Beschwerden) feststellen, den man als klinischen Parameter für das Auftreten der VIN 3 der vorderen Kommissur verwenden könnte.

Auch McNally et al. wiesen in ihrem *Review* auf einen Großteil der Patientinnen ohne vorangegangene Beschwerden hin (McNally et al., 2002). Umso ersichtlicher wird es, dass eine fehlende Symptomatik eine gründliche Inspektion der Vulva nicht weniger wichtig werden lässt. Der Studie von Reuschenbach et al. ist zu entnehmen, dass zwischen den Patientinnen mit einem Vulvakarzinom der vorderen Kommissur und denen mit Karzinomen anderer Lokalisationen ein signifikanter Altersunterschied besteht (57,4 Jahre vs. 66,3 Jahre) (Reuschenbach et al., 2013). Dieses eher jüngere Alter der Frauen mit Läsionen an der vorderen Kommissur deckt sich mit dem mittleren Alter der Patientinnen unserer Untersuchung (54,66 Jahre). Die VIN und das Vulvakarzinom sind also längst nicht mehr als eine Erkrankung der älteren Frauen zu sehen, sondern sie betreffen immer mehr auch jüngere Frauen.

Des Weiteren wurde aus den anamnestischen Daten der Frauen die Information über die Menopause entnommen. Daraus ergab sich, dass 20 Frauen zum Zeitpunkt der Untersuchung postmenopausal waren und 15 Frauen prämenopausal. Dieser geringe Unterschied lässt eine strenge Einteilung in die allgemeine VIN-Klassifizierung (prämenopausal-klassische VIN, postmenopausal-differenzierte VIN) nicht zu. Zwar könnte man die Läsionen eher den postmenopausalen Frauen zuordnen und damit der differenzierten VIN (Hart, 2001; Preti et al., 2005; Roma & Hart, 2007; Scurry et al., 2006), jedoch war die Gruppe der prämenopausalen Frauen zu groß, um aufgrund dieser Tatsache die Läsionen einer geläufigen Klassifizierung zuzuordnen.

4.3 HPV-STATUS BEI VIN 3-LÄSIONEN DER VORDEREN KOMMISSUR

Die VIN 3 der vorderen Kommissur scheint aufgrund der Ergebnisse (49% versus 51%) nicht ausschließlich durch eine HPV-Infektion bedingt zu sein. Eine solche Infektion kann bei diesen Läsionen vorkommen (49% HPV positive Frauen), spielt aber nicht die entscheidende Rolle in der Pathogenese, im Gegensatz zu VIN3-Läsionen anderer Lokalisationen. Deutlich höhere HPV-Positivraten (71-100%) bei hochgradigen VIN-Läsionen gemischter Lokalisationen beschreiben van der Avoort et al. und Srodon et al. (Srodon et al. 2006; van der Avoort et al., 2006). Die erst kürzlich veröffentlichte multizentrische Studie von Reuschenbach et al. unterstützt die These, dass HPV bei Läsionen der vorderen Kommissur seltener nachgewiesen wird (42%) als in Läsionen anderer Lokalisationen (48%) (Reuschenbach et al., 2013) und somit in der Tumorgenese dieser Läsionen eine eher untergeordnete Rolle spielt.

In der hier präsentierten Arbeit war neben HPV-Typ 16 (5/17) HPV 31 (10/17) der am häufigsten isolierte Typ. Dieser kam in anderen publizierten Studien bei der VIN 3 nicht vor. Stattdessen dominierte hier der Typ 16 mit 80% und 90% (de Sanjosé et al., 2013; Hillemanns & Wang, 2006; Srodon et al., 2006; van der Avoort et al., 2006). Die *low-risk* Typen 6,11 und 56 wurden jeweils einmal diagnostiziert. In 4 Fällen wurde auch ein seltener Typ mit unbekanntem Risiko gefunden. Dies widerspricht den meisten Studien, da dort bei einer VIN 3 fast ausschließlich *high-risk* Typen gefunden wurden (Hillemanns & Wang, 2006; Srodon et al., 2006; van der Avoort et al., 2006). Es ist zu beachten, dass einige Studien schon Jahre zurückliegen und damit einhergehende Differenzen der Sensitivität des HPV-Nachweises möglich sind.

Mischinfektionen mit zwei oder mehreren HPV-Typen konnten in 6 Fällen verzeichnet werden. Das waren prozentual mehr Fälle als in der weltweiten Studie von de Sanjosé et al. (35% versus 17%), wobei hier sicherlich der große Unterschied der Probenanzahl zu erwähnen ist (35 versus 587).

4.4 MOLEKULARPATHOLOGISCHE MARKER IN VIN 3-LÄSIONEN DER VORDEREN KOMMISSUR

Die p53 Inaktivierung durch virale Onkoproteine oder Mutationen ist ein wichtiger molekularpathologischer Mechanismus in der Karzinogenese und wurde auch in vulvären Karzinomen gezeigt. Das p53 Protein detektiert DNA-Schäden und führt zum Zellarrest in der G1-oder G2-Phase des Zellzyklus, um DNA-Reparaturmechanismen zu aktivieren. Der Ausfall des p53 Tumorsuppressorgens spielt eine große Rolle in der Onkogenese von soliden Tumoren (Gusterson et al., 1991; Kastan et al., 1991; Lane, 1991). Um eine mögliche p53-Überexpression in den VIN3-Läsionen der vorderen Kommissur zu untersuchen, wurden die Proben immunhistochemisch gefärbt und semiquantitativ ausgewertet. Die aktuelle Studienlage berichtet über gegensätzliche Ergebnisse bei ihren p53-Färbungen der vulvären Präneoplasien und invasiven Läsionen (Pinto et al., 2010). In der vorliegenden Studie konnte keine signifikante Mehrheit der Läsionen mit erhöhter p53-Expression festgestellt werden (60% p53-negativ versus 40% p53-positiv). Dieses Ergebnis stimmt mit Rosenthal et al. überein, die in ihrer Studie ebenfalls in hochgradigen vulvären Läsionen keine erhöhten p53-Werte erhielten (Rosenthal et al., 2003).

Liegl und Regauer untersuchten in ihrer Arbeit VIN Läsionen und das Risiko, bei gleichzeitig bestehendem Lichen sclerosus, ein invasives Karzinom zu entwickeln. Aufgrund ihrer Ergebnisse beschreiben sie eine Überexpression von p53 als Zeichen ischämischen Stresses, anstatt diese als Progressionsmarker für ein invasives Geschehen anzusehen (Liegl & Regauer, 2006). Demgegenüber stehen andere Studien, die erhöhte p53-Expressionswerte (75-81%) in vulvären Läsionen zeigten (Hantschmann et al., 2005; Santos et al., 2004), wobei ausschließlich differenzierte VIN Läsionen diese Veränderungen aufzeigten. Zudem scheinen HPV-negative Vulvakarzinome der vorderen Kommissur eher eine p53-Überexpression aufzuweisen. Diese Tatsache verdeutlicht, dass Karzinome auf unterschiedliche Weisen entstehen, HPV-induziert oder auf dem Boden einer p53-Mutation (Reuschenbach et al., 2013).

Bei der Interpretation dieser Schwankungsbreite müssen unterschiedlich eingeteilte *Scores* bei der Einteilung der Färbeergebnisse und die unterschiedlichen Lokalisationen der Läsionen beachtet werden (vordere Kommissur versus andere vulväre Lokalisation).

Lichen sclerosus ist eine chronisch inflammatorische Dermatose, die sich klinisch oft als weiße, atrophische und sklerotische Plaque manifestiert und bevorzugt im Genitalbereich vorkommt. Obwohl die genaue Ätiologie unbekannt ist, wird eine autoimmune Komponente in der Pathogenese vermutet, was gut mit der Assoziation zu anderen Autoimmunerkrankungen wie Vitiligo, perniziöse Anämie und Schilddrüsenerkrankungen vereinbar ist (Hengge, 2012; Powell & Wojnarowska, 1999; Smith & Haefner, 2004; Tasker & Wojnarowska, 2003; Val & Almeida, 2005).

Oyama et al. detektierten 2003 in ihrer Studie bei 67 % der LS-Patienten (n=86) im Serum spezifische IgG-Autoantikörper, die gegen das ECM-1 Protein gerichtet sind. Zudem zeigten 64 von 86 Lichen sclerosus Patienten in dieser Studie eine positive Immunaktivität gegen ein rekombinates ECM-1-Protein, während in der Kontrollgruppe diese Aktivität nur in 7% der Fälle auftrat (Oyama et al., 2003). Kurze Zeit später entwickelten Oyama et al. einen ELISA, der spezifisch (Spezifität=93,7%) Autoantikörper gegen das ECM-1 Protein bei Lichen sclerosus Patienten detektiert und hoch sensitiv (Sensitivität= 80%) ist. Hohe Anti-ECM-1-Titer korrelierten zudem mit länger bestehenden Läsionen (Oyama et al., 2004). Histopathologisch zeigt sich beim LS eine Degeneration von basalen Keratinozyten mit darunterliegender homogenisierter Zone aus sauren Mucopolysacchariden (Val & Almeida, 2005), die auf eine gestörte Zusammensetzung der extrazellulären Matrix hindeutet. Gamblicher et al. haben in ihrer Studie 2012 die Expressionsraten der extrazellulären Matrixproteine, darunter auch das ECM-1, von LS-Patienten mit einer gesunden Kontrollgruppe verglichen (Gambichler et al., 2012). Der Mittelwert der immunhistologisch gefärbten Zellen lag im Vergleich zur Kontrollgruppe bei Lichen sclerosus Patienten signifikant höher (18,3 versus 1,4). Das Ergebnis stimmt mit den Ergebnissen unserer Studie überein, welche einen Mittelwert von 60 ergab. Die Ergebnisse der Studie von Gambichler et al. haben uns veranlasst, den Marker ECM-1 in Läsionen der vorderen Kommissur zu untersuchen, da das Genitale der Frauen klinisch eher atroph erscheint und die Läsionen oft ein eher lichenartiges Bild aufweisen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit einer deutlichen Überexpression von ECM-1 in 71,4% der untersuchten Läsionen unterstützen unsere Arbeitshypothese und Annahme, dass bei Frauen mit VIN 3 der vorderen Kommissur ein subklinischer LS zugrunde liegen könnte und die Pathogenese dieser ulcerierten Läsionen häufiger durch ein Zusammenspiel von p53-Überexpression, lichenoider Genese und ECM-1-Überexpression bedingt ist, als das sie der HPV-induzierten Genese mit klinisch kondylomatösen Läsionen folgt.

Da unsere Studie retrospektiv durchgeführt wurde und es aus ethischen Gründen im Verlauf der vorliegenden Arbeit nicht möglich war, Biopsien gesunder vulvärer Haut der Patientinnen zu gewinnen, wurden für die Berechnung eines Signifikanzniveaus der Mittelwert 10 gesunder Frauen von Gambichler et al. verwendet. Dabei wurde mittels t-Tests für unabhängige Stichproben gezeigt, dass der prozentuale Anteil gefärbter Zellen bei VIN3-Läsionen der vorderen Kommissur der vorliegenden Untersuchung signifikant höher ausfiel als bei gesunden Kontrollpatientinnen ($p < 0,000$). Zusätzlich zu dieser Analyse wurde in der vorliegenden Arbeit der ECM-1-Status der Patientinnen bestimmt, indem die einzelnen Färbeergebnisse mit dem Antikörper gegen ECM-1 semiquantitativ ausgewertet wurden und anschließend in die beiden Gruppen ECM-1 positiv und ECM-1 negativ eingeteilt wurden. Als positives Ergebnis galt eine Anzahl gefärbter Zellen über 50% und Proben, die weniger als 50% gefärbte ECM-1 Zellen aufwiesen, wurden als negativ bewertet. 71,4 % der Frauen wiesen einen positiven ECM-1-Status auf, während 28,6% der Frauen negativ getestet wurden.

Die Unterteilung des Gesamtkollektivs in <50 Jahre und >50 Jahre zeigte, dass Frauen über 50 Jahre öfter einen positiven ECM-1-Status aufweisen als jüngere Frauen (79,2% versus 54,5%). Jedoch ist im Vergleich der Mittelwerte gefärbter ECM-1-Zellen der beiden Einzelkollektive kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen ($p=0,127$). Um die Frage zu beantworten, inwiefern eine HPV-Infektion mit der ECM-1-Expression und dem Alter der Frauen zusammenhängt, wurden die beiden Einzelkollektive „HPV- und ECM-1-Status in den Gruppen < und > 50 Jahre“ verglichen. Es lässt sich keine Aussage darüber treffen, ob eine HPV-Infektion mit einer ECM-1-Überexpression positiv oder negativ korreliert. Diese Feststellung unterstreicht die Erkenntnis, dass die VIN und auch das invasive Karzinom der vorderen Kommissur nicht den bislang bekannten Pathogenesen zu folgen scheint und HPV bei diesen Läsionen eine untergeordnete Rolle spielt.

Das Einzelkollektiv der Frauen mit Beschwerden zeigt ebenfalls keinen signifikant höheren Mittelwert gefärbter ECM-1-Zellen als bei den Frauen ohne Beschwerden ($p=0,078$). Da aktuell nur die Studie von Gambichler et al. einen direkten Vergleich zu der hier repräsentierten Studie zulässt, wäre eine Verallgemeinerung der Ergebnisse bzgl. ECM-1 und VIN 3 der vorderen Kommissur sicherlich zu weit gegriffen. Jedoch bleibt festzuhalten, dass die VIN 3 der vorderen Kommissur eine Besonderheit unter den vulvären Läsionen darstellt und eine ECM-1-Überexpression in diesen Läsionen als völlig neuer Bestandteil ihrer bislang unklarer Entstehung gesehen werden kann. Es müssen diesbezüglich weiterführende Untersuchungen in größeren Kollektiven folgen, um ECM-1 als lichenoiden Marker in VIN3-Läsionen der vorderen Kommissur zu evaluieren.

5. SCHLUSSFOLGERUNGEN

Das Vulvakarzinom und dessen präinvasive Vorstufen (VIN 1-3) stellen nach dem Zervixkarzinom die zweithäufigste anogenitale Tumorart der Frau dar. Die vulväre intraepitheliale Neoplasie schweren Grades (VIN 3), die Gegenstand dieser Arbeit war, wird anhand unterschiedlicher Pathogenesen in zwei Typen unterteilt. Die klassische VIN, die HPV-induziert ist und eher jüngere Frauen betrifft und die differenzierte VIN, welche häufig im Rahmen einer lichenoiden Erkrankung, HPV-unabhängig ist und ältere Frauen betrifft.

Während bis vor einiger Zeit die kleinen und großen Labien der Frau die Prädilektionsstellen der VIN darstellten, zeichnet sich heute ein enormer Zuwachs der vulvären Läsionen zwischen Klitoris und Urethra, der sogenannten vorderen Kommissur, ab. In der Universitätsfrauenklinik Düsseldorf wird die Lokalisation der vorderen Kommissur in allen Altersgruppen beobachtet. Die Läsionen sind entweder rötliche Plaques, kleine erosive Stellen oder Ulcera und oft nicht größer als 2 - 3mm. Ziel dieser Arbeit war es, neben dem klinischen Aspekt, histopathologische und molekularpathologische Zeichen für eine zugrunde liegende lichenoiden Genese nachzuweisen und damit die Pathogenese der VIN an der vorderen Kommissur als einen neuen, bisher unbekanntem Tumor-*Pathway* zu charakterisieren.

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden die klinischen, histopathologischen und molekularpathologischen Parameter von 35 Gewebeproben schwerer vulvärer intraepithelialer Neoplasien analysiert. Das mittlere Alter der Patientinnen war 54 Jahre.

Die VIN3-Läsionen der vorderen Kommissur waren in 46% HPV-positiv (17/35), zeigten in 35% eine Überexpression von p53 (15/35) und waren in 71% ECM-1-positiv (25/35). Frauen über 50 Jahre (n=24) waren im Verhältnis von 10:1 HPV negativ, zeigten eine p53 Überexpression und waren häufiger ECM-1-positiv (19/24). Die Mikroskopie der HE-Schnitte zeigte keinen histologisch nachweisbaren Lichen sclerosus. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, dass eine HPV-Infektion bei der VIN 3 der vorderen Kommissur nicht der entscheidende Faktor für die Onkogenese der Läsionen zu sein scheint. Vielmehr unterstützt die Großzahl der ECM-1-positiven Patientinnen (n=25) die Vermutung, dass die VIN der vorderen Kommissur oft auf dem Boden einer lichenoiden Grunderkrankung entsteht. Abschließend bleibt zu sagen, dass wir eine stetig wachsende Zahl dieser Neoplasien und Präneoplasien im klinischen Alltag beobachten und diese die Durchführung umfangreicherer und weiterführender Studien mit besonderem Augenmerk auf das ECM-1 Protein als lichenoiden Marker rechtfertigen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Akerman, G., Dussour, C., Haddad, B., Paniel, B.-J., & Rouzier, R. (2007). Epidemiology of vulva intra-epithelial neoplasias. *Gynecol Obstet Fertil*, *35*(12), 1251–1256.
- Al-Ghamdi, A., Freedman, D., Miller, D., Poh, C., Rosin, M., Zhang, L., & Gilks, C. B. (2002). Vulvar squamous cell carcinoma in young women: a clinicopathologic study of 21 cases. *Gynecol Oncol*, *84*(1), 94–101.
- Anders, S., Riehtorf, L., & Löning, T. (2006). Neoplasien und Präneoplasien der Vulva und Vagina: Epidemiologie und Histologie. *Gyn*, 16–28.
- Baas, I. O., Mulder, J. W., Offerhaus, G. J., Vogelstein, B., & Hamilton, S. R. (1994). An evaluation of six antibodies for immunohistochemistry of mutant p53 gene product in archival colorectal neoplasms. *J Pathol*, *172*(1), 5–12.
- Burk, R., Ho, G., Beardsley, L., Lempa, M., Peters, M., & Bierman, R. (1996). Sexual behavior and partner characteristics are the predominant risk factors for genital human papillomavirus infection in young women. Sexual behavior and partner characteristics are the predominant risk factors for genital human papillomavirus infection. *J Infect Dis*, *174*(4), 679–689.
- Carli, P., Moretti, S., Spallanzani, A., Berti, E., & Cattaneo, A. (1997). Fibrogenic cytokines in vulvar lichen sclerosus. An immunohistochemical study. *J Reprod Med*, *42*(3), 161–165.
- Chan, I. (2004). The role of extracellular matrix protein 1 in human skin. *Clinical and Experimental Dermatology*, *29*(1), 52–56.
- Clarke, A. R., Purdie, C. A., Harrison, D. J., Morris, R. G., Bird, C. C., Hooper, M. L., & Wyllie, A. H. (1993). Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature*, *362*(6423), 849–852.
- Collins, C., Hansen, L., & Theriot, E. (1966). A clinical stain for use in selecting biopsy sites in patients with vulvar diseases. *Obstet Gynecol*, *28*(2), 158–163.

- Conley, L. J., Ellerbrock, T. V., Bush, T. J., Chiasson, M. A., Sawo, D., & Wright, T. C. (2002). HIV-1 infection and risk of vulvovaginal and perianal condylomata acuminata and intraepithelial neoplasia: a prospective cohort study. *Lancet*, *359*(9301), 108–113.
- Cooper, S. M., Gao, X. H., Powell, J. J., & Wojnarowska, F. (2004). Does treatment of vulvar lichen sclerosus influence its prognosis? *Arch Dermatol*, *140*(6), 702–706.
- Darus, C. J., & Mueller, J. J. (2013). Development and impact of human papillomavirus vaccines. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, *56*(1), 10–16.
- De Sanjosé, S., Alemany, L., Ordi, J., Tous, S., Alejo, M., Bigby, S. M., Bosch, F. X. (2013). Worldwide human papillomavirus genotype attribution in over 2000 cases of intraepithelial and invasive lesions of the vulva. *Eur J Cancer*, *49*(16), 3450–3461.
- De Villiers, E.-M. (2001). Taxonomic classification of papillomviruses. *Papillomvirus Report*, *12*, 57–63.
- De Villiers, E.-M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H.-U., & zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*, *324*(1), 17–27.
- De Vuyst, H., Clifford, G. M., Nascimento, M. C., Madeleine, M. M., & Franceschi, S. (2009). Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: a meta-analysis. *Int J Cancer*, *124*(7), 1626–1636.
- Deckers, M. M., Smits, P., Karperien, M., Ni, J., Tylzanowski, P., Feng, P., Parmelee, D., Zhang, J., Bouffard, E., Gentz, R., Löwik, C. W., & Merregaert, J. (2001). Recombinant human extracellular matrix protein 1 inhibits alkaline phosphatase activity and mineralization of mouse embryonic metatarsals in vitro. *Bone*, *28*(1), 14–20.
- Deruelle, P., Deruelle-Khazaal, R., Collinet, P., Lucot, J.-P., Thomas, P., & Leroy, J.-L. (2005). Clinical study and prognosis of 56 cases of vulvar intraepithelial neoplasia. *Gynecol Obstet Fertil*, *33*(10), 755–761.

- Dunne, E., & Park, I. (2013). HPV and HPV-Associated Diseases. *Infect Dis Clin North Am*, 27(4), 765–778.
- Engelman, D. E., Andrade, L. A., & Vassallo, J. (2003). Human papillomavirus infection and p53 protein expression in vulvar intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma. *Braz J Med Biol Res*, 36(9), 1159–1165.
- Fairley, C. K., Chen, S., Ugoni, A., Tabrizi, S.N., Forbes, A., & Garland, S. M. (1994). Human papillomavirus infection and its relationship to recent and distant sexual partners. *Obstet Gynecol*, 84(5), 755–759.
- Fox, H., & Wells, M. (2003). Recent advances in the pathology of the vulva. *Histopathology*, 42(3), 209–216.
- Fujimoto, N., Terlizzi, J., Brittingham, R., Fertala, A., McGrath, J. A., & Uitto, J. (2005). Extracellular matrix protein 1 interacts with the domain III of fibulin-1C and 1D variants through its central tandem repeat 2. *Biochem Biophys Res Commun*, 333(4), 1327–1333.
- Funaro, D. (2004). Lichen sclerosus: a review and practical approach. *Dermatol Ther*, 17(1), 28–37.
- Gambichler, T., Skrygan, M., Czempiel, V., Tigges, C., Kobus, S., Meier, J. J., Köhler, C. U., Scola, N., Stücker, M., Altmeyer, P., & Kreuter, A. (2012). Differential expression of connective tissue growth factor and extracellular matrix proteins in lichen sclerosus. *J Eur Acad of Dermatol Venereol*, 26(2), 207–212.
- Garland, S. M. (2002). Human papillomavirus update with a particular focus on cervical disease. *Pathology*, 34(3), 213–24.
- Goffin, F., Mayrand, M., Gauthier, P., Alobaid, A., Lussier, C., Provencher, D., Drouin, D., Franco, E. L., & Coutlée, F. (2006). High-risk human papillomavirus infection of the genital tract of women with a previous history or current high-grade vulvar intraepithelial neoplasia. *J Med Virol*, 78(6), 814–819.
- Goldstein, A., Marinoff, S., Christopher, K., & Srodon, M. (2005). Prevalence of vulvar lichen sclerosus in a general gynecology practice. *J Reprod Med*, 50(7), 477–480.

- Goolamali, S. K., Barnes, E. W., Irvine, W. J., & Shuster, S. (1974). Organ-specific antibodies in patients with lichen sclerosis. *Br Med J*, 4(5936), 78–79.
- Gusterson, B., Anbazhagan, R., Warren, W., Midgely, C, Lane, D., O'Hare, M., Stamps, A., Carter, R., & Jayatilake, H. (1991). Expression of p53 in premalignant and malignant squamous epithelium. *Oncogene*, 6(10), 1785–1789.
- Haefner, H., Tate, J., McLachlin, C., & Crum, C. (1995). Vulvar intraepithelial neoplasia: Age, Morphological Phenotype, Papillomavirus DNA, and Coexisting Invasive Carcinoma. *Human Pathology*, 26(2), 147–154.
- Hampl, M., Deckers-Figiel, S., Hampl, J. A, Rein, D., & Bender, H. G. (2008). New aspects of vulvar cancer: changes in localization and age of onset. *Gynecol Oncol*, 109(3), 340–345.
- Hampl, M., Sarajuuri, H., Wentzensen, N., Bender, H., & Kueppers, V. (2006). Effect of human papillomavirus vaccines on vulvar, vaginal, and anal intraepithelial lesions and vulvar cancer. *Obstet Gynecol*, 108(6), 1361–1368.
- Han, Z., Ni, J., Smits, P., Underhill, C. B., Xie, B., Chen, Y., Liu, N., Tylzanowski, P., Parmelee, D., Feng, P., Ding, I., Gao, F., Gentz, R., Hylebroeck, D., Merregaert, J., & Zhang, L. (2001). Extracellular matrix protein 1 (ECM1) has angiogenic properties and is expressed by breast tumor cells. *FASEB J*, 15(6), 988–994.
- Hantschmann, P., Sterzer, S., Jeschke, U., & Friese, K. (2005). P53 expression in vulvar carcinoma, vulvar intraepithelial neoplasia, squamous cell hyperplasia and lichen sclerosis. *Anticancer Res*, 25(3A), 1739–1745.
- Harper, D. M., & Vierthaler, S. L. (2011). Next Generation Cancer Protection: The Bivalent HPV Vaccine for Females. *ISRN Obstet Gynecol*, 457204.
- Harris, C. C., & Hollstein, M. (1993). Clinical Implications of the p53 Tumor-Suppressor Gene. *N Engl J Med*, 329(18), 1318–1327.
- Hart, W. R. (2001). Vulvar intraepithelial neoplasia: Historical aspects and current status. *Int J Gynecol Pathol*, 20(1), 16–30.

- Hengge, U. R. (2004). Papillomviruserkrankungen. *Der Hautarzt*, 55(9), 841–854.
- Hengge, U. R. (2012). Lichen sclerosus. In Goldsmith L., Katz, S., Gilchrest, B., Paller, A., Leffel, D., & Wolff, K. (Hrsg.), *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*, 8. Aufl. The McGraw-Hill Companies, New York (u.a.), Section 9, Chapter 65.
- Hillard, G., Massey, F., & O'Tool, R. (1979). Vulval neoplasia in the young. *Int J Gynecol Obstet*, 135(2), 185–188.
- Hillemanns, P., & Wang, X. (2006). Integration of HPV-16 and HPV-18 DNA in vulvar intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol*, 100(2), 276–282.
- Ho, G. Y., Bierman, R., Beardsley, L., Chang, C. J., & Burk, R. D. (1998). Natural History Of Cervicovaginal Papillomavirus Infection In Young Women. *N Engl J Med*, 338(7), 423–428.
- Howley, P., & Lowy, D. (2001). Papillomvirusus and their replication. In Knipe, D., & Howley, P. (Hrsg.), *Fields virology*, 4. Aufl. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2197-2229.
- Iwasawa, A., Nieminen, P., Lehtinen, M., & Paavonen, J. (1997). Human papillomavirus in squamous cell carcinoma of the vulva by polymerase chain reaction. *Obstet Gynecol*, 89(1), 81–84.
- Johnson, M. R., Wilkin, D. J., Vos, H. L., Ortiz de Luna, R. I., Dehejia, a M., Polymeropoulos, M. H., & Francomano, C. A. (1997). Characterization of the human extracellular matrix protein 1 gene on chromosome 1q21. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 16(5), 289–92.
- Jones, R., Rowan, D., & Stewart, A. (2005). Vulvar intraepithelial neoplasia; aspects of the natural history and outcome in 405 women. *Obstet Gynecol*, 106(12), 1251–1256.
- Joura, E. A., Losch, A., Haider-Angeler, M., Breitenecker, G., & Leodolter, S. (2000). Trends in vulvar neoplasia. Increasing incidence of vulvar intrapithelial and squamous cell carcinoma in young women. *J Reprod Med*, 45(8), 613–615.

- Joura, E. A. (2002). Epidemiology, diagnosis and treatment of vulvar intraepithelial neoplasia. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 14(1), 39–42.
- Joura, E. A., Leodolter, S., Hernandez-avila, M., Wheeler, C. M., Perez, G., Koutsky, L. A., Garland, S. M., Harper, D. M., Tang, G. W., Ferris, D. G., Steben, M., Jones, R. W., Bryan, J., Taddeo, F. J., Bautista, O. M., Esser, M. T., Sings, H. L., Nelson, M., Boslego, J. W., Sattler, C., Barr, E., & Paavonen, J. (2007). 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*, 369(9574), 1693–1702.
- Judson, P. L., Habermann, E. B., Baxter, N. N., Durham, S. B., & Virning, B. A. (2006). Trends in the incidence of invasive and in situ vulvar carcinoma. *Obstet Gynecol*, 107(5), 1018–1022.
- Kagie, M. J., Kenter, G. G., Hermans, J., Trimbos, J. B., & Fleuren, G. J. (1997). The relevance of various vulvar epithelial changes in the early detection of squamous cell carcinoma of the vulva. *Int J Gynecol Cancer*, 7(1), 50–57.
- Kastan, M. B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., & Craig, R. W. (1991). Participation of p53 Protein in the Cellular Response to DNA Damage. *Cancer Res*, 51(23), 6304–6311.
- Klussmann, J. P., Gültekin, E., Weissenborn, S. J., Wieland, U., Dries, V., Dienes, H. P., Eckel, H. E., Pfister, H. J., & Fuchs, P. G. (2003). Expression of p16 protein identifies a distinct entity of tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus. *Am J Pathol*, 162(3), 747–753.
- Klussmann, J. P., Dinh, S., Guntinas-Lichius, O., Wittekindt, C., Weissenborn, S., Wieland, U., Dienes, H. P., Hoffmann, T., Smith, E., Turek, L., Speel, E. J., & Pfister, H. J. (2004). HPV-associated tonsillar cancer. An update. *HNO*, 52(3), 208–218.

- Klussmann, J. P., Mooren, J. J., Lehnen, M., Claessen, S. M. H., Stenner, M., Huebbers, C. U., Weissenborn, S. J., Wedemeyer, I., Straetmans, J. M., Manni, J. J., Hopmann, A. H., & Speel, E. J. (2009). Genetic signatures of HPV-related and unrelated oropharyngeal carcinoma and their prognostic implications. *Clin Cancer Res*, *15*(5), 1779–86. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1463
- Knippschild, U., Milene, D., Campbell, L., & Meek, D. (1996). p53 N-terminus-targeted protein kinase activity is stimulated in response to wild type p53 and DNA damage. *Oncogene*, *13*(7), 1387–1393.
- Knopp, S., Nesland, J. M., Tropé, C., & Holm, R. (2006). p14^{ARF}, a Prognostic Predictor in HPV-Negative Vulvar Carcinoma. *American Journal of Clinical Pathology*, *126*(2), 266–276.
- Kuhn, L., Sun, X., & Wright T. C. Jr. (1999). Human Immunodeficiency virus infection and female lower genital tract malignancy. *Curr Opin Obstet Gynecol*, *11*(1), 35–39.
- Lane, D. P., & Benchimol, S. (1990). P53: Oncogene or Anti-Oncogene? *Genes & Development*, *4*(1), 1–8.
- Lane, D. P. (1991). A death in the life of p53. *Cancer*, *362*(6423), 786–787.
- Lane, D. P. (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, *358*(6381), 15–16.
- Lara-Torre, E., & Perlman, S. E. (2004). Vulvar intraepithelial neoplasia in adolescents with abnormal Pap smear results: a series report. *J Pediatr Adolesc Gynecol*, *17*(1), 45–48. doi:10.1016/j.jpag.2003.11.001
- Leibowitch, M., Neill, S., Pelisse, M., & Al, E. (1990). The epithelial changes associated with squamous cell carcinoma of the vulva: a review of the clinical, histological and viral findings in 78 women. *Br J Obstet Gynaecol.*, *97*(12), 1135–1139.
- Lerma, E., Matias-Guiu, X., Lee, S., & Prat, J. (1999). Squamous cell carcinoma of the vulva: study of ploidy, HPV, p53 and pRb. *J Gynecol Pathol*, *18*(3), 191-197.

- Liegl, B., & Regauer, S. (2006). p53 immunostaining in lichen sclerosus is related to ischaemic stress and is not a marker of differentiated vulvar intraepithelial neoplasia (d-VIN). *Histopathology*, 48(3), 268–274.
- Losch, A., & Joura, E. (1999). Vulvar neoplasia in young women. *Gynecol Oncol*, 75(3), 519.
- Marini, A., Blecken, S., Ruzicka, T., & Hengge, U. R. (2005). Lichen sclerosus. *Der Hautarzt*, 56(6), 550–555.
- Mathieu, E., Meheus, L., Raymackers, J., & Merregaert, D. J. (1994). Characterization of the osteogenic stromal cell line MN7: Identification of secreted MN7 proteins using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, western blotting, and microsequencing. *J Bone Miner Res*, 9(6), 903–913.
- McNally, O., Mulvany, N., Pagano, R., Quinn, M., & Rome, R. (2002). VIN 3: a clinicopathologic review. *Int J Gynecol Cancer*, 12(5), 490–495.
- Meykadeh, N., & Hengge, U. R. (2003). Topische Immunmodulation in der Dermatologie. *Der Hautarzt*, 54(7), 641–662.
- Meyrick, T. R., Ridley, C., McGibbon, D., & Black, M. (1988). Lichen sclerosus et atrophicus and autoimmunity--a study of 350 women. *Br J Dermatol*, 118(1), 41–46.
- Meyrick, T., Ridley, C., McGibbon, D., & Al., E. (1996). Anogenital lichen sclerosus in women. *JR Soc Med.*, 89(12), 694–698.
- Mongiati, M., Fu, J., Oldershaw, R., Greenhalgh, R., Gown, A. M., & Iozzo, R. V. (2003). Perlecan protein core interacts with extracellular matrix protein 1 (ECM1), a glycoprotein involved in bone formation and angiogenesis. *J Biol Chem*, 278(19), 17491–17499.
- Monk, B., Burger, R., Lin, F., Parham, G., Vasilev, S., & Wilczynski, S. (1995). Prognostic significance of human papillomavirus DNA in vulvar carcinoma. *Obstet Gynecol*, 85(5), 709–715.

- Mulvany, N., & Allen, D. (2008). Differentiated intraepithelial neoplasia of the vulva. *Int J Gynecol Pathol*, 27(1), 125–135.
- Münger, K., & Howley, P. M. (2002). Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res*, 89(2), 213-228.
- Muñoz, N., Bosch, F. X., de Sanjosé, S., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, K. V., Snijders, P. J., & Meijer, C. J. (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, 348(6), 518-527.
- Neill, S. M., Lewis, F. M., Tatnall, F. M., & Cox, N. H. (2010). British Association of Dermatologists' guidelines for the management of lichen sclerosis. *Br J Dermatol*, 163(4), 672–682.
- Oyama, N., Chan, I., Neill, S. M., Hamada, T., South, A. P., Wessagowit, V., Wojnarowska, F., D'Cruz, D., Hughes, G. J., Black, M. M., & McGrath, J. A. (2003). Mechanisms of disease Autoantibodies to extracellular matrix protein 1 in lichen sclerosis. *Lancet*, 362(9378), 118–123.
- Oyama, N., Chan, I., Neill, S. M., South, A. P., Wojnarowska, F., Kawakami, Y., D'Cruz, D., Mepani, K., Hughes, G. J., Bhogal, B. S., Kaneko, F., & McGrath, J. A. (2004). Development of antigen-specific ELISA for circulating autoantibodies to extracellular matrix protein 1 in lichen sclerosis. *J Clin Invest*, 113(11), 1550-1559.
- Petry, K. U., Köchel, H., Bode, U., Schedel, I., Niesert, S., Glaubitz, M., Maschek, H. J., & Kühnle, H. (1996). 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*, 60(1), 30–34.
- Pinto, A. P., Schlecht, N., Pintos, J., Kaiano, J., Franco, E., Crum, C., & Villa, L. L. (2004). Prognostic significance of lymph node variables and human papillomavirus DNA in invasive vulvar carcinoma. *Gynecol Oncol*, 92(3), 856–865.
- Pinto, A. P., Miron, A., Yassin, Y., Monte, N., Woo, T. Y. C., Mehra, K. K., Medeiros, F., & Crum, C. P. (2010). Differentiated vulvar intraepithelial neoplasia contains Tp53

- mutations and is genetically linked to vulvar squamous cell carcinoma. *Mod Pathol*, 23(3), 404–412.
- Powell, J. J., & Wojnarowska, F. (1999). Lichen sclerosus. *Lancet*, 353(9166), 1777–1783.
- Powell, J. J., & Wojnarowska, F. (2001). Childhood vulvar lichen sclerosus: an increasingly common problem. *J Am Acad Dermatol*, 44(5), 803–806.
- Powell, J. J., & Wojnarowska, F. (2002). Childhood vulvar lichen sclerosus. The course after puberty. *J Reprod Med*, 47(9), 706–709.
- Preti, M., van Seters, M., Sideri, M., & van Beurden, M. (2005). Squamous vulvar intraepithelial neoplasia. *Clin Obstet Gynecol*, 48(4), 845–861.
- Reuschenbach, M., Roos, J., Panayotopoulos, D, Baldus, S. E., Schnürch, H. G., Berger, A., Petry, K., Dürst, M., Seiz, M., von Knebel Doeberitz, M., & Hampl, M. (2013). Characterization of squamous cell cancers of the vulvar anterior fourchette by human papillomavirus, p16INK4a, and p53. *J Low Genit Tract Dis*, 17(3), 289–297.
- Roma, A., & Hart, W. R. (2007). Progression of simplex (differentiated) vulvar intraepithelial neoplasia to invasive squamous cell carcinoma: a prospective case study confirming its precursor role in the pathogenesis of vulvar cancer. *Int J Gynecol Pathol*, 26(3), 248–253
- Rosenthal, A. N., Hopster, D., Ryan, A., & Jacobs, I. J. (2003). Immunohistochemical analysis of p53 in vulval intraepithelial neoplasia and vulval squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer*, 88(2), 251–256.
- Santos, M., Montagut, C., Mellado, B., García, Á., Cajal, S. R. Y., Cardesa, A., Puig-Tintoré, L. M., & Ordi, J. (2004). Immunohistochemical Staining for p16 and p53 in Premalignant and Malignant Epithelial Lesions of the Vulva. *Int J Gynecol Pathol*, 23(3), 206–214.

- Schnürch, H. G. (2004). Vulvar carcinoma. Diagnosis and therapy. *Der Urologe. Ausg. A*, 43(7), 849–859.
- Scrimin, F., Rustja, S., Radillo, O., Volpe, C., Abrami, R., & Guaschino, S. (2000). Vulvar lichen sclerosus: an immunologic study. *Obstet Gynecol*, 95(1), 147–150.
- Scully, R. E., Bonfiglio, T. A., Kurman, R. J., Silverberg, S. G., & Wilkinson E. J. (1994). Histologic Typing of Female Genital Tract Tumours. In: Scully, R. E., Poulson H. E., Sobin, L. H. (Hrsg.), *World Health Organization International Histological Classification of Tumours*, 2.Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg, 65-66.
- Scurry, J., Champion, M., Scurry, B., Kim, S., & Hacker, N. (2006). Pathologic audit of 164 consecutive cases of vulvar intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Pathol*, 25(2), 176–81.
- Scurry, J., & Wilkinson, E. (2006). Review of terminology of precursors of vulvar squamous cell carcinoma. *J Low Genit Tract Dis*, 10(3), 161–169.
- Sideri, M., Spinaci, L., Spolti, N., & Schettino, F. (1999). Evaluation of CO₂ laser excision or vaporization for the treatment of vulvar intraepithelial neoplasia. *Gynecologic Oncology*, 75(2), 277–281.
- Sideri, M., Jones, R., Wilkinson, E. J., Heller, D. S., Scurry, J., Haefner, H., & Neill, S. (2005). Squamous vulvar intraepithelial neoplasia: 2004 modified terminology, ISSVD Vulvar Oncology Subcommittee. *J Reprod Med*, 50(11), 807–810.
- Skapa, P., Zamecnik, J., & Hamsikova, E., Salakova, M., Smahelova, J., Jandova, K., Robova, H., Rob, L., & Tachezy, R. (2007). 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*, 31(12), 1834-1843.
- Smith, Y., & Haefner, H. (2004). Vulvar lichen sclerosus: Pathophysiology and treatment. *Am J Clin Dermatol*, 53(2), 105–125.
- Smits, P., Ni, J., Feng, P., Wauters, J., Van Hul, W., Boutaibi, M. E., Dillon, P. J., & Merregaert, J. (1997). The human extracellular matrix gene 1 (ECM1): genomic

- structure, cDNA cloning, expression pattern, and chromosomal localization. *Genomics*, *45*(3), 487–495.
- Smits, P., Poumay, Y., Karperien, M., Tylzanowski, P., Wauters, J., Huylebroeck, D., Ponc, M., & Merregaert, J. (2000). Differentiation-Dependent Alternative Splicing and Expression of the Extracellular Matrix Protein 1 Gene in Human Keratinocytes. *J Invest Dermatol*, *114*(4), 718–724.
- Srodon, M., Stoler, M., Baber, G., & Kurman, R. (2006). The distribution of low and high-risk HPV types in vulvar and vaginal intraepithelial neoplasia (VIN and VaIN). *Am J Surg Pathol*, *30*(12), 1513–1518.
- Stanley, M. A. (2002). Imiquimod and the imidazoquinolones: mechanism of action and therapeutic potential. *Clin Exp Dermatol*, *27*(7), 571–577.
- Stefanaki, I. M., Tosca, A. D., Themelis, G. C., Vazgiouraki, E. M., Dokianakis, D. N., Panayiotidis, J. G., Spandidos, D. A., & Balas, C. J. (2001). In vivo detection of human papilloma virus-induced lesions of anogenital area after application of acetic acid: a novel and accurate approach to a trivial method. *J Photochem Photobiol B*, *65*(2-3), 115–121.
- Sturgeon, S., Brinton, L., Devesa, S., & Kurman, R. (1992). In situ and invasive vulvar cancer incidence trends (1973 to 1987). *Am J Obstet Gynecol*, *166*(5), 1482–1485.
- Sutton, B. C., Allen, R. a, Moore, W. E., & Dunn, S. T. (2008). Distribution of human papillomavirus genotypes in invasive squamous carcinoma of the vulva. *Mod Pathol*, *21*(3), 345–54.
- Tasker, G. L., & Wojnarowska, F. (2003). Lichen sclerosus. *Clin Exp Dermatol*, *28*(2), 128–133.
- Toki, T., Kurman, R. J., Park, J. S., Kesis, T., Daniel, R. W., & Shah, K. V. (1991). Probable nonpapillomavirus etiology of squamous cell carcinoma of the vulva in older women: a clinicopathologic study using in situ hybridization and polymerase chain reaction. *Int J Gynecol Pathol*, *10*(2), 107–125.

- Ueda, Y., Enomoto, T., Miyatake, T., Shroyer, K. R., Yoshizaki, T., Kanao, H., Ueno, Y., Sun, H., Nakashima, R., Yashino, K., Kimura, T., Haba, T., Wakasa, K., & Murata, Y. (2004). Analysis of Clonality and HPV Infection in Benign, Hyperplastic, Premalignant, and Malignant Lesions of the Vulvar Mucosa. *Am J Clin Pathol*, 122(2), 266–274.
- Val, I., & Almeida, G. (2005). An overview of lichen sclerosus. *Clin Obstet Gynecol*, 48(4), 808–817.
- Van Beurden, M., ten Kate, F. J., Smits, H. L., Berkhout, R. J., de Craen, a J., van der Vange, N., Lammes, F. B., & ter Schegget, J. (1995). Multifocal vulvar intraepithelial neoplasia grade III and multicentric lower genital tract neoplasia is associated with transcriptionally active human papillomavirus. *Cancer*, 75(12), 2879–2884.
- Van de Nieuwenhof, H. P., van der Avoort, I., & de Hullu, J. A. (2008). Review of squamous premalignant vulvar lesions. *Crit Rev Oncol Hematol*, 68(2), 131–156.
- Van der Avoort, I., Shirango, H., & Hoevenaars, B., Grefte, J. M., de Hullu, J. A., de Wilde, P. C., Bulten, J., Melchers, W. J., & Massuger, L. F. (2006). Vulvar squamous cell carcinoma is a multifactorial disease following two separate and independent pathways. *Int J Gynecol Pathol*, 25(1), 22–29.
- Wentzensen, N., & von Knebel Doeberitz, M. (2004). Virale Kanzerogenese von Kopf-Hals-Tumoren. *Der Pathologe*, 25(1), 21–30.
- Wilkinson, E. (2002). Premalignant and malignant tumors of the vulva. In: Kurman, R. J., Ellenson, L. H., Ronnett, B. M. (Hrsg.), *Blauenstein's pathplogy of the female genital tract*. 6. Aufl. Springer, New York, 56-70.
- Wilkinson, E., Kneale, B., & Lynch, P. (1986). Report of the ISSVD terminology committee. *J Reprod Med*, 31, 973–974.
- Yang, B., & Hart, W. R. (2000). Vulvar intraepithelial neoplasia of the simplex (differentiated) type: a clinicopathologic study including analysis of HPV and p53 expression. *Am J Surg Pathol*, 24(3), 429–441.

- Zachow, K., Ostrow, R., Bender, M., Watts, S., Okagaki, T., Pass, F., & Faras, A. J. (1982). Detection of human papillomavirus DNA in anogenital neoplasias. *Nature*, *300*(5894), 771–773.
- Zakut-Houri, R., Oren, M., Bienz, B., Lavie, V., Hazum, S., & Givol, D. (1983). A single gene and a pseudogene for the cellular tumour antigen p53. *Nature*, *306*(5943), 594–597.
- Zur Hausen, H. (1977). Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol*, *78*, 1–30.
- Zur Hausen, H. (1999). Papillomaviruses in human cancers. *Eur J Cancer*, *111*, 581–587.
- Zur Hausen, H. (2000). Papillomaviruses Causing Cancer : Evasion From Host-Cell Control in Early Events in Carcinogenesis, *J Natl Cancer Inst*, *92*(9), 690–698.
- Zur Hausen, H. (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*, *2*(5), 342–350.

7. ANHANG

7.1 ABBILDUNGEN

Abb. 1: VIN 3 vordere Kommissur, 53-j. Patientin	22
Abb. 2: VIN 3 vordere Kommissur, 53-j. Patientin	22
Abb. 3: VIN 3 vordere Kommissur, 68-j. Patientin	22
Abb. 4: VIN 3 vordere Kommissur, 57-j. Patientin	22
Abb. 5: VIN 3 vordere Kommissur, 62-j. Patientin	22
Abb. 6: VIN 3 vordere Kommissur, 52-j. Patientin	22
Abb. 7: Verfahrensprinzip des EZ-Biorobots®. Aus EZ1 DNA Tissue Handbook, Quiagen, 08/2011	26
Abb. 8: Schematischer Aufbau eines LCD-Chips. Aus Data Sheet HPV 3.5 V-II-09, CHIPRON®	31
Abb. 9: Arbeitsschritte für die Hybridisierung, Waschung und Färbe-Schritte LCD-Chip. Aus Data Sheet HPV 3.5 V-II-09, CHIPRON®	32
Abb. 10: Datenanalyse eines HPV-Chip mit der Software "Slide Reader",	33
Abb. 11: Altersverteilung des Gesamtkollektivs	39
Abb. 12: Absolute und relative Häufigkeiten der Altersgruppe < vs. > 50 Jahre, Gesamtkollektiv	40
Abb. 13: Absolute und relative Häufigkeiten von Beschwerden (Brennen und Juckreiz) vs. keine Beschwerden, Gesamtkollektiv	40
Abb. 14: Absolute und relative Häufigkeiten Menopause vs. keine Menopause, Gesamtkollektiv	41
Abb. 15: HPV-DNA Nachweis in VIN 3-Läsionen der vorderen Kommissur	42

Abb. 16: HPV-Typen in n=17 untersuchten VIN 3-Läsionen	43
Abb. 17: Absolute und relative Häufigkeiten des p53-Status aller VIN 3-Läsionen	44
Abb. 18: VIN 3 vordere Kommissur, ECM-1-positiv, 10xVergrößerung	45
Abb. 19: VIN 3 vordere Kommissur, ECM-1-positiv, 10xVergrößerung	46
Abb. 20: Absolute und relative Häufigkeiten des ECM-1-Status aller VIN 3-Läsionen	46
Abb. 21: HPV-Status in Abhängigkeit des Alters der VIN 3 Patientinnen	48
Abb. 22: Relative Häufigkeit des HPV-Status bei Frauen <50 Jahren	48
Abb. 23: Relative Häufigkeit des HPV-Status bei Frauen >50 Jahren	49
Abb. 24: p53-Status in Abhängigkeit des Alters der VIN 3 Patientinnen	50
Abb. 25: Relative Häufigkeit des p53-Status bei Frauen <50 Jahre	50
Abb. 26: Relative Häufigkeit des p53-Status bei Frauen >50 Jahre	51
Abb. 27: ECM-1 Status in Abhängigkeit des Alters der VIN 3 Patientinnen	52
Abb. 28: Relative Häufigkeit des ECM-1 Status bei Frauen < 50 Jahre	52
Abb. 29: Relative Häufigkeit des ECM-1 Status bei Frauen >50 Jahre	53
Abb. 30: HPV- und ECM-1- Status in den Gruppen < und > 50 Jahre	54
Abb. 31: Mittelwerte des prozentualen Anteils ECM-1 gefärbter Zellen	55

7.2 TABELLEN

Tabelle 1: Hauptvertreter der Hoch- und Niedrigrisikotypen von HPV	2
Tabelle 2: Sequenzen der verwendeten Primer:	28
Tabelle 3: Fragmentgröße der Primer	28
Tabelle 4: Reaktionsansatz HPV-PCR	29
Tabelle 5: PCR-Zyklen	29

Tabelle 6: Immunhistochemie: LSAB-Methode, Arbeitsschritte	35
Tabelle 7: Anleitung zur Herstellung der Puffer	36
Tabelle 8: HPV-Mischinfektionen	43
Tabelle 9: t-Test bei unabhängigen Stichproben	56
Tabelle 10: Mittelwerte des prozentualen Anteils ECM-1 gefärbter Zellen in VIN 3 Läsionen der vorderen Kommissur	57
Tabelle 11: Vergleich der Mittelwerte der ECM-1 Färbeanteile Stevens-Gambichler, t- Test	57

DANKSAGUNG

Ich möchte an dieser Stelle die Gelegenheit nutzen, um mich bei allen Personen zu bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Ganz besonders gilt dieser Dank meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. Monika Hampl, die mir stets mit ihrem Fachwissen zur Seite stand.

Zuletzt möchte ich mich herzlichst bei meiner Familie und meinem Freund bedanken, die mir immer wieder Rückhalt und Motivation gegeben haben, diese Arbeit fertigzustellen.

EIDESSTÄTLICHE VERSICHERUNG

Eidesstattliche Versicherung

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

Düsseldorf, den