

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und
Ohrenheilkunde

der Universität zu Köln

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. h.c. K.-B.
Hüttenbrink

Nachweis onkogener humaner Papillomaviren im
Oropharynx und an der Cervix uteri

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Iris Inge Engbert
aus Frechen

promoviert am

16. Januar 2013

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. h.c. Th. Krieg

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. med. S. F. Preuss
2. Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Dr. h.c. H. Pfister

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten.

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/ eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Köln, den 24.07.2012

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Frau Monika Junk (MTA im Institut für Virologie der Universitätsklinik Köln) von mir selbst durchgeführt worden.

Die unter 3.8 beschriebene Klonierung wurde von Herrn Dr. rer. nat. C. Hübbers im Jean-Uhrmacher-Institut für klinische HNO Forschung der Universität zu Köln durchgeführt.

Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Privatdozent Dr. med. S. Preuss danke ich für die Übernahme der Betreuung meiner Arbeit nach dem Klinikwechsel von Herrn Professor Dr. med. J.P. Klußmann, welcher die Arbeit initiierte und anfänglich betreute. Ich danke Herrn Privatdozent Dr. med. S. Preuss für seine kontinuierliche und freundschaftliche Betreuung.

Herrn Dr. med. M. Valter danke ich für seine Hilfe und Betreuung bei den gynäkologischen Aspekten der vorliegenden Arbeit.

Herrn Dr. rer. nat. Dipl. chem. Sönke Weißenborn danke ich für seine Unterstützung und Beratung bei der Versuchsplanung.

Für die wertvolle Unterstützung danke ich der Medizinisch-Technischen-Assistentin Frau Monika Junk, insbesondere für die ausführliche Einarbeitung in die virologischen Nachweismethoden.

Herrn Dr. rer. nat. C. Hübbers danke ich für die Durchführung der Klonierung im Jean-Uhrmacher-Institut.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	7
1.1 Kopf-Hals-Karzinome.....	7
1.2 Tonsillenkarcinom.....	9
1.3 Zervixkarzinom.....	10
1.4 Humane Papillomaviren.....	12
1.5 Interaktion viraler Onkogene mit dem Zellzyklus der Wirtszelle.....	18
1.6 HPV-assoziierte Kopf-Hals-Tumoren.....	21
1.7 Nachweis von Papillomavirus-Infektionen.....	26
1.8 Zielsetzung.....	30
2. Material.....	31
2.1 Laborgeräte.....	31
2.2 Laborbedarf.....	31
2.3 Chemikalien.....	32
2.4 Enzyme.....	33
2.5 Nukleotide.....	33
2.6 DNA Längenmarker.....	33
2.7 DNA Präparationskit.....	33
2.8 Puffer und Lösungen.....	33
2.9 Oligonukleotide.....	34
2.9.1 PCR-Primer für qualitativen HPV-Nachweis (General Primer).....	34
2.9.2 HPV-Hybridisierungssonden.....	35
2.10 Material Klonierung.....	36
2.11 Patienten und Probanden.....	37
2.12 Fragebögen.....	37
2.13 Software.....	38
3. Methoden.....	39
3.1 Methoden zur Probengewinnung	39
3.1.1 Tonsillenabstriche.....	39
3.1.2 Mundspülungen.....	39
3.1.3 Abstriche von der Cervix uteri.....	40
3.1.4 Zervix-Zytologien	40
3.1.5 Probentransport und Aufbewahrung.....	40
3.2 Methoden zur Aufreinigung der DNA.....	41
3.2.1. DNA-Extraktion aus Patientenmaterialien.....	41
3.3 Die Polymerasekettenreaktion (PCR).....	42
3.3.1 Nested-PCR (A5/A10-A6/A8) zum Nachweis von HPV-DNA genitaler HPV-Typen	42
3.3.2 Ermittlung der PCR Sensitivität.....	44
3.4 PCR zum Nachweis des β -Globin Gens nach Smoller (1997).....	45
3.5 Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationen.....	46
3.6 Agarose-Gelelektrophorese.....	47
3.7 HPV-EIA zur HPV-Typisierung.....	49
3.8 Klonierung von DNA-Material	51
3.8.1. Ligation.....	51
3.8.2. Transformation.....	52
3.8.3 Blau-Weiß-Test zur optischen Selektion von E.colis mit klonierten DNA Fragmenten.....	52
3.9 Statistische Analyse	53

4. Auswertung.....	54
4.1. Prävalenz von HPV-Infektionen genital und oral.....	54
4.2. Verteilung der Prävalenz von low-risk/high-risk HPV Infektionen genital und oral.....	55
4.3 Prävalenz verschiedener high-risk HPV-Typen bei genitaler HPV Infektion.....	57
4.4 Prävalenz einzelner HPV-Typen bei oraler HPV-Infektion.....	58
4.5 Koinzidenz genitaler und oraler HPV-Infektionen.....	59
4.6 Risikofaktorenanalyse für eine genitale HPV-Infektion.....	60
4.7 Risikofaktorenanalyse für eine orale HPV-Infektion.....	62
4.8 Analyse der Probandenpaare.....	65
5. Diskussion.....	66
6. Zusammenfassung.....	73
7. Literaturverzeichnis.....	74
8. Lebenslauf.....	81

1. Einleitung

1.1 Kopf-Hals-Karzinome

Mit ungefähr 500.000 Neuerkrankungen pro Jahr, dies entspricht 5% aller Krebserkrankungen, stellen Tumoren der Kopf-Hals-Region weltweit ein wichtiges Gesundheitsproblem dar. [49] Histologisch handelt es sich dabei fast ausschließlich um Plattenepithelkarzinome der Schleimhaut des oberen Aerodigestivtraktes. [10] Die geschätzte Zahl der Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland liegt mit 7.600 bei Männern mehr als doppelt so hoch wie bei Frauen (2.800). Kopf-Hals-Karzinome stehen hinsichtlich der Erkrankungshäufigkeit bei Männern mit 3,3% an siebter Stelle der Krebserkrankungen insgesamt. Bei Frauen liegen sie zurzeit mit 1,4% an 15. Stelle [1]. In der deutschen Todesursachenstatistik von 1995 standen die bösartigen Neuerkrankungen von Mundhöhle, Rachen und Kehlkopf mit 5264 Todesfällen an sechster Stelle aller durch maligne Tumoren verursachten Todesfälle. [4] Das mittlere Erkrankungsalter liegt mit 61 Jahren bei den Männern und 63 Jahren bei den Frauen im Vergleich zu anderen Krebslokalisationen relativ niedrig. Die Tonsillenregion ist nach dem Larynx der zweithäufigste Manifestationsort eines Kopf-Hals-Karzinoms. [19] Die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) für Kopf-Hals-Karzinome ist abhängig von der Tumorlokalisation und liegt zwischen 22% für das Hypopharynxkarzinom und 63% für das Karzinom des Larynx. [3] Dieser Unterschied in der Überlebenszeit entsteht vor allem durch die häufig erst spät auftretende Symptomatik insbesondere bei Pharynxkarzinomen. Insgesamt weisen 2/3 der Patienten bei Erstdiagnose einen lokal bereits fortgeschrittenen Tumor auf. [72] Bei mehr als der Hälfte der Patienten liegen bei Diagnosestellung bereits lokoregionäre Lymphknoten-Metastasen vor, die die 5-JÜR weiter reduzieren. [57] Das Therapieschema eines Kopf-Hals-Karzinoms wird in Abhängigkeit von Tumorlokalisation, Ausdehnung und histologischem Typ erstellt. Klassischerweise besteht die Therapie aus einer chirurgischen Entfernung des Primärtumors, bei der eine R0-Resektion angestrebt wird, einer Exstirpation der lokoregionären Lymphknoten, sowie ggf. einer postoperativen Bestrahlung, welche heutzutage oft mit einer Chemotherapie kombiniert wird.

Bei inoperablen Karzinomen stehen die primäre Strahlentherapie und/oder chemotherapeutische Ansätze im Vordergrund. [4] Studienergebnisse aus den letzten Jahren haben allerdings die Frage aufgeworfen, ob die primär chirurgische Therapie noch zeitgemäß ist. Organerhaltende Therapieregime mittels kombinierter Radiochemotherapie haben in einigen Studien ihre Wirksamkeit bewiesen. Bestimmte Primärtumoren sprechen allerdings schlecht auf eine Radiochemotherapie an. Ebenso zeigte sich, dass diese organerhaltenden, aggressiven Protokolle mitunter tödliche Toxizitäten aufweisen. Die therapiebedingte Mortalität dieser Protokolle reicht von 2-5%. Im Bereich der Mundhöhle erreicht die primäre Radiochemotherapie eine geringere Überlebenswahrscheinlichkeit und verursacht eine erhöhte Inzidenz von gravierenden Nebenwirkungen wie Osteoradionekrosen im Vergleich zu primär chirurgischen Verfahren. Daher ist insbesondere für diese Tumorlokalisation weiterhin die primäre chirurgische Therapie als Goldstandard anzusehen. Eine Übersichtsarbeit von 2010 konnte für keine Tumorlokalisation einen Überlebensvorteil durch die primäre Radiochemotherapie zeigen. Die zurzeit in Studien eingesetzten Chemotherapie-Protokolle und aggressiven Radiochemotherapien konnten ihre Wirksamkeit zwar beweisen, sie sollten aber aufgrund des Nebenwirkungsprofils nur ausgewählten Patienten angeboten und in spezialisierten Zentren durchgeführt werden. [53]

Als Hauptrisikofaktoren für die Entstehung eines Kopf-Hals-Karzinoms wird der chronische Konsum von Tabak und Alkohol angesehen. Raucher erkranken sechsmal häufiger an einem Karzinom in dieser Region als Nichtraucher. [70] Ein kombinierter Konsum von Tabak und Alkohol führt zu einer Multiplikation des Risikos. [40] Des Weiteren werden Faktoren wie eine unzureichende Mundhygiene, Mangelernährung sowie die berufliche Exposition gegenüber Schadstoffen (Asbest, chrom- und nickelhaltige Farben und Lacke, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe), UV- und radioaktive Strahlung für die Kanzerogenese verantwortlich gemacht. [39] Für einige Tumorlokalisationen wird eine virale Induktion des Tumors angenommen, auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

1.2 Tonsillenkarzinom

Das Karzinom der Tonsillenregion hat mit 0,3-1% einen geringen Anteil an den menschlichen Malignomen [70]. Unter den Kopf-Hals-Karzinomen steht es bei der Häufigkeitsverteilung nach dem Larynxkarzinom an zweiter Stelle [19]. Aufgrund der geringen Symptomatik in frühen Tumorstadien werden Tonsillenkarzinome häufig erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert, in dem bereits lokoregionäre Lymphknotenmetastasen vorliegen. Wie bei den übrigen Kopf-Hals-Tumoren handelt es sich in 90% bis 95% der Fälle um ein Plattenepithelkarzinom. Die Risikofaktoren für die Entstehung eines Tonsillenkarzinoms entsprechen denen für die Entstehung anderer Karzinome des oberen Aerodigestivtraktes. Für diese Region wird ebenfalls der Konsum von Tabak und Alkohol als Hauptrisikofaktor angesehen. Es gibt jedoch eine Gruppe von Patienten, bei denen diese Risikofaktoren nicht vorliegen. Seit langem wird vermutet, dass virale Infektionen diesen Teil der Kopf-Hals-Karzinome verursachen.

1.3 Zervixkarzinom

Weltweit ist das Karzinom des Gebärmutterhalses nach dem Mammakarzinom das zweithäufigste Karzinom der Frau. 1990 wurden global 47.100 Neuerkrankungen und 215.000 Todesfälle verzeichnet. Etwa 80% der Zervixkarzinome treten in Entwicklungsländern ohne Screeningprogramme auf. [11]

In Deutschland erkranken derzeit 6.200 Frauen jährlich an einem Karzinom der Cervix uteri. Damit steht dieses Karzinom in Deutschland mit einem Anteil von 3% an 11. Stelle der Krebserkrankungen bei Frauen. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt mit 51 Jahren ca. 18 Jahre unter dem durchschnittlichen Erkrankungsalter für Krebs insgesamt. [1] Eine frühe Aufnahme des Geschlechtsverkehrs, häufig wechselnde Sexualpartner, Rauchen und ein schlechter Ernährungszustand gelten als Risikofaktoren. Ungefähr 90% der Karzinome sind Plattenepithelkarzinome, seltener sind Adenokarzinome und adenosquamöse Karzinome. [28] Die meisten Karzinome entstehen in der Transformationszone der Zervix. Hier befindet sich der Übergang zwischen dem Zylinderepithel des Zervikalkanals und dem mehrschichtigen nicht verhornenden Plattenepithel der Portio vaginalis cervicis (Portio). Die Entstehung des Karzinoms erfolgt über Vorstufen, dysplastische Veränderungen des Epithels. Diese entstehen, wenn das nicht verhornende Plattenepithel der Portio entdifferenziert und seine geordnete Schichtung verloren geht. Diese Dysplasien werden in drei Schweregrade unterteilt und als zervikale intraepitheliale Neoplasien (CIN I-III) bezeichnet. CIN I und II (leichte bzw. mäßige Dysplasie) sind in 70% der Fälle spontan rückbildungsfähig. [28] Unter CIN III werden die schwere Dysplasie und das Carcinoma in situ subsumiert. Aufgrund der hohen Progressionsrate wird eine CIN III Läsion als obligate Präkanzerose bezeichnet. [11] Die Stadieneinteilung des Zervixkarzinoms erfolgt anhand der TNM-Klassifikation, beziehungsweise anhand der FIGO-Klassifikation (Fédération internationale de gynécologie et d'obstétrique). Die ätiologische Rolle von HPV bei der Entstehung des Zervixkarzinoms ist in vielen Studien untersucht worden und mittlerweile anerkannt. Eine Infektion mit einem der 13 onkogenen HPV-Typen (HPV-Typ 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, und 68) gilt als Hauptursache für die Entwicklung eines invasiven Karzinoms der Zervix uteri und seiner direkten

Vorstufen. [7] HPV-DNA ist in annähernd 100% der Zervixkarzinome nachweisbar. [73] HPV 16 und 18 haben sich dabei als die am häufigsten nachweisbaren Typen erwiesen. Der größte Anteil der HPV-Infektionen ist transient, verursacht nur geringe zytologische Veränderungen und verliert in einem Zeitraum von 1-2 Jahren seine Nachweisbarkeit. Einige Infektionen persistieren jedoch länger als 2 Jahre und schreiten, falls sie unbehandelt bleiben, in ihrer Entwicklung zu einer CIN III oder einem invasiven Karzinom weiter fort. Als Kofaktoren, die diese Progression beeinflussen, werden vor allem das Rauchen aber auch Multiparität und die Einnahme oraler Kontrazeptiva angesehen. [7] Seitdem in den 1970er Jahren der zytologische Abstrich als gesetzliche Krebsfrüherkennungsmaßnahme eingeführt wurde, ist eine Abnahme der Zervixkarzinom-Inzidenz und der Sterblichkeit zu beobachten, da nun bereits Vorstufen des Karzinoms erkannt und behandelt werden können. [1]

1.4 Humane Papillomaviren

Humane Papillomaviren (HPV) sind weltweit verbreitet und zählten bis 1999 noch gemeinsam mit den Polyomaviren zu der Gruppe der Papovaviridae. Seit 1999 werden die Papillomaviren als eine eigene Familie klassifiziert, die der Papillomaviridae. Heute sind hunderte von Papillomaviren bekannt, von denen etwa 100 human pathogen sind. Eine Infektion mit HPV verursacht benigne Veränderungen der Haut (Warzen) und der Schleimhäute (Condylome). Die klinischen Krankheitsbilder, die durch die Infektion verursacht werden können, sind häufig charakteristisch für den infizierenden HPV-Typ (Tabelle 1). Einige Typen werden mit der Entstehung maligner Epithelveränderungen, insbesondere mit dem Zervixkarzinom, anderen Anogenitalkarzinomen und einigen Kopf-Hals-Karzinomen in Verbindung gebracht. Warzen und ihre Infektiosität waren bereits zu Zeiten der Griechen und Römer bekannt. Jedoch konnte ihr viraler Übertragungsweg erst Anfang des 20. Jahrhunderts belegt werden. Damals wurde entdeckt, dass man mit zellfreiem Material aus Läsionen in der Lage war, die Erkrankung zu übertragen. [24] Papillomaviren umfassen eine Gruppe von kleinen (52-55nm), unbehüllten Viren. Sie besitzen eine zirkuläre Doppelstrang DNA mit einer Länge von 8.000 Basenpaaren (bp). Sie infizieren Plattenepithelien, wobei sie in einer großen Zahl von Wirbeltieren eine Vielzahl von proliferierenden Erkrankungen (Papillome) verursachen. Da Papillomaviren speziesspezifisch sind, war es nicht möglich, die humanen Papillomaviren in Tierversuchen zu erforschen.

Tabelle 1: HPV-assoziierte Epithelläsionen

klinisches Bild	Besonderheiten	HPV-Typen
plantare Warzen	einzelne Warzen, bevorzugt an Fußsohle; gutartig	1, 4
gewöhnliche Warzen	gehäufte Warzenbildung, meist an Händen; gutartig	1, 2, 4, 26, 28, 29, 41, 48, 60, 63, 65
flache Warzen	gehäufte Warzenbildung, an Armen, Beinen, im Gesicht; gutartig	3, 10, 27
Metzgerwarzen	Gewöhnliche Warzen an Händen von Metzgern etc.; gutartig	7
juvenile Larynxpapillome	meist bei Kindern, starkes Wachstum; gutartig	6, 11
fokale, epitheliale Hyperplasie	Läsionen im Mundbereich; gutartig	13, 32
Condylomata acuminata	exophytische Läsionen der Haut und Schleimhaut; meist gutartig, gehen in seltenen Fällen in maligne Formen über	6, 11, 40, 42-44
flache Condylome, cervicale intraepitheliale Neoplasien (CIN I, CIN II)	meist gutartig, können in maligne Formen übergehen	6, 11, 16, 18, 30, 31, 33-35, 39, 40, 42-45, 51, 52, 56-59, 61, 64, 66-68
Zervixkarzinom, cervicale intraepitheliale Neoplasien (CIN III)	Präkanzerose, invasiver Tumor;	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 62, 66
Epidermodysplasia verruciformis	gehäufte Warzenbildung; bösartig	5, 8, 14, 17, 20, 47
bowenoide Papulose	pigmentierte Hautläsionen; bösartig	16, 18

Die DNA-Sequenzierung der Papillomaviren hat zu einer phylogenetischen Einteilung geführt. Sie werden anhand ihres L1-Gens, welches das Hauptstrukturprotein kodiert, in 12 Genera, die jeweils mit einem griechischen Buchstaben (Alpha bis Pi) bezeichnet werden, eingeteilt. (Abbildung 2) Innerhalb eines Genus stimmt die DNA des L1-Gens, der darin enthaltenen Typen, in über 60% überein. [24] Humane Papillomaviren sind in 5 der 12 Genera enthalten (Alpha, Beta, Gamma, Mu, Nu), die übrigen Gruppen enthalten tierische Papillomaviren. HPV werden nach der Region, die sie befallen, in Haut- und Schleimhauttypen unterteilt. Zusätzlich werden sie anhand ihrer onkogenen Potenz in Niedrig-Risiko- (engl. low-risk = LR-HPV) und Hoch-Risiko-Typen (engl. high-risk = HR-HPV) unterteilt. Die am weitesten verbreiteten high-risk-Typen sind HPV 16 und 18, ihre Rolle bei der Entstehung des Zervixkarzinoms wurde vielfach untersucht und durch zahlreiche epidemiologische und molekularbiologische Studien untermauert. [52] [81] Hauptverantwortlich für die onkogene Potenz der high-risk HPV-Typen sind die

viralen Proteine E6 und E7, für die in vitro zelltransformierende Aktivität nachgewiesen werden konnte. Die häufigsten Vertreter der low-risk Typen, HPV 6 und 11, finden sich in gutartigen Läsionen wie der juvenilen Larynxpapillomatose und im Genitalbereich bei Condyloma accuminatum. Das Genom der Papillomaviren enthält 10 offene Leserahmen (Open reading frames, ORFs), die Genen entsprechen und sich als Charakteristikum der Papillomaviren alle auf einem Strang der DNA befinden. Sie werden abhängig von ihrer Lokalisation im Genom als frühe (Early Genes = E1 bis E7), welche regulatorische Gene kodieren, und späte Gene (Late Genes = L1, L2) klassifiziert. (Genom-Organisation siehe Abbildung 1). Die späten Gene kodieren die für das Kapsid bildenden Strukturproteine. Die Funktion der Proteine E1 und E2 besteht in der Regulation der viralen Replikation und Transkription. E5, E6, und E7 modifizieren die Wirtszelle hinsichtlich ihrer Zellproliferation und -differenzierung. Bei den high-risk HPV Typen verursachen diese Proteine die Immortalisierung und Transformation und werden demzufolge als Onkoproteine bezeichnet. Das „späte Gen“ L1 mit einem Molekulargewicht von ungefähr 55kd macht 80 Prozent des Proteinanteils des Virions aus. L2 hat ein Molekulargewicht von ungefähr 70 kd. (Übersicht Gen-Genprodukt siehe Tabelle 2). Zusätzlich findet man im Papillomavirus Genom eine nicht kodierende Region, die häufig auch als „upper regulatory region“ (URR) oder „long control region“ (LCR) bezeichnet wird. Sie enthält regulatorische Bereiche für die virale Genexpression und Replikation. Die Transkription der Papillomavirus-DNA erfolgt polycictronisch, eine mRNA kodiert also mehrere Gene. Durch alternative Spleißvorgänge sind diese mRNAs sehr variabel und können so unterschiedliche Anteile der jeweiligen Gene enthalten.

Eine Infektion mit HPV findet durch direkten Kontakt mit einer Virus tragenden Person, oder indirekt z.B. durch Inokulation Virus tragender Hornschuppen statt. Da Papillomaviren einen spezifischen Tropismus für Epithelien besitzen, erfolgt eine Infektion nur an Plattenepithelien der Haut und Schleimhäute. Die Basalzelle als alleinige zur Zellteilung fähige Zelle des Epithels ist als Einzige einer Infektion zugänglich. Das Virus erreicht sie über Mikrotraumen der Haut und Schleimhäute. Die Synthese von Viruspartikeln ist eng an den Differenzierungsgrad des Epithels gekoppelt. Genprodukte der „frühen Gene“

lassen sich in den Basal- und Parabasallzellen nachweisen, wohingegen die Expression „später Gene“, die Synthese von Strukturproteinen und reifen Virionen erst in terminal differenzierten Plattenepithelzellen auftritt. [24] Nach einer Inkubationszeit von mehreren Wochen bis hin zu mehreren Jahren können Humane Papillomaviren hier benigne und maligne Veränderungen hervorrufen. (siehe Tabelle 1)

Abbildung 1: Genom-Organisation von HPV16 (7,906 bp); NCR = Nichtkodierende Region (Synonym URR= upstream regulatory region).

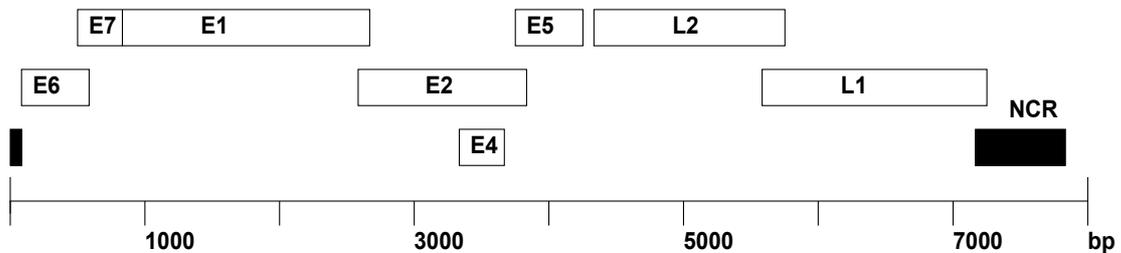
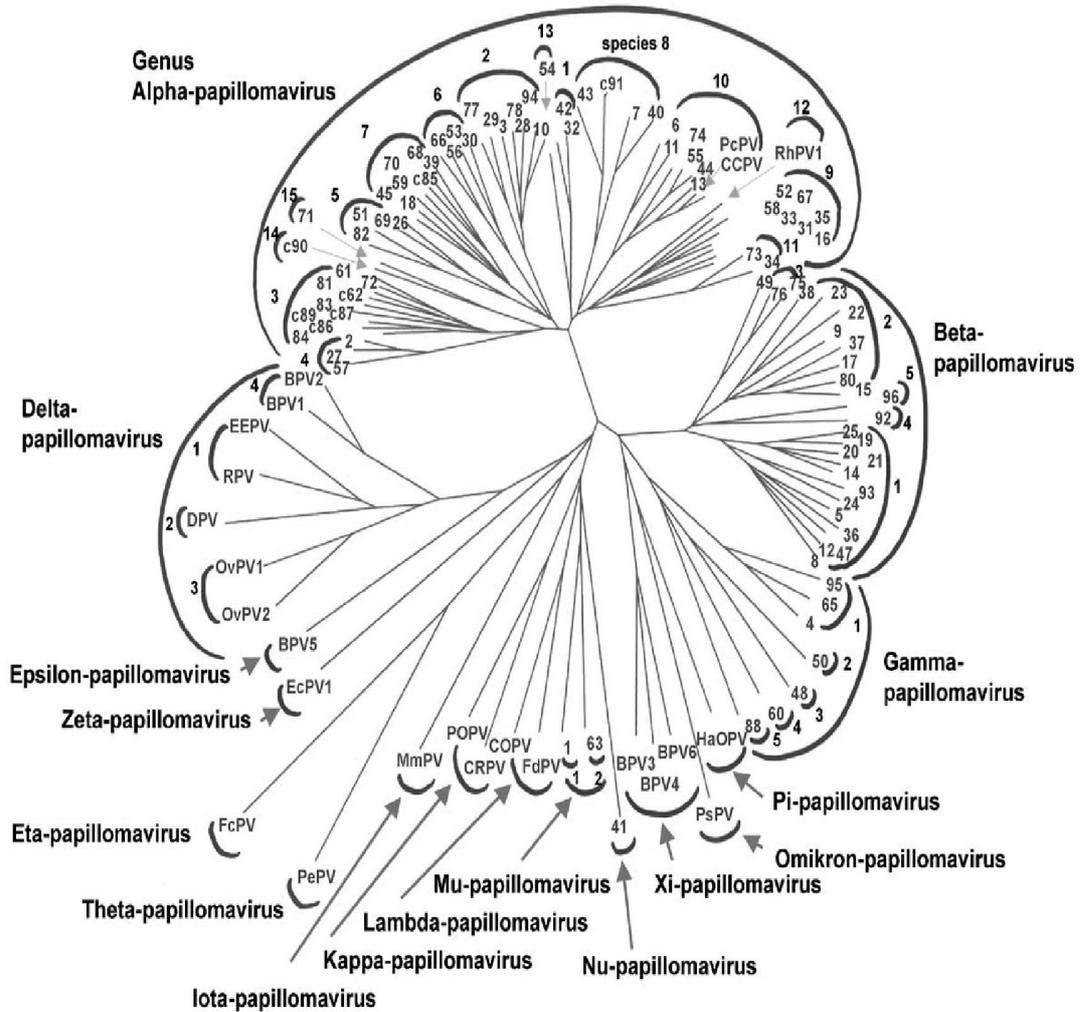


Tabelle 2: HPV Gen-Produkte

Gen-Produkt	Funktion
L1	Hauptkapsid-Protein, 55 kD, macht 80% der gesamten HPV-Proteine aus
L2	Nebenkapsid-Protein, 70 kD
E1	Virale DNA-Replikation
E2	Virale DNA-Replikation und Regulation der Transkription
E4	Zytokeratin Durchbrechung (Virusfreisetzung)
E5	Onkoprotein, Mitose-stimulierend
E6	Onkoprotein, unter anderem Inaktivierung des Tumor-Suppressor-Proteins p53
E7	Onkoprotein, unter anderem Inaktivierung des Tumor-Suppressor-Proteins pRB

Abbildung 2: Phylogenetischer Baum von 106 Papillomviren nach de Villiers et al. / Virology 324, 2004, 17-27



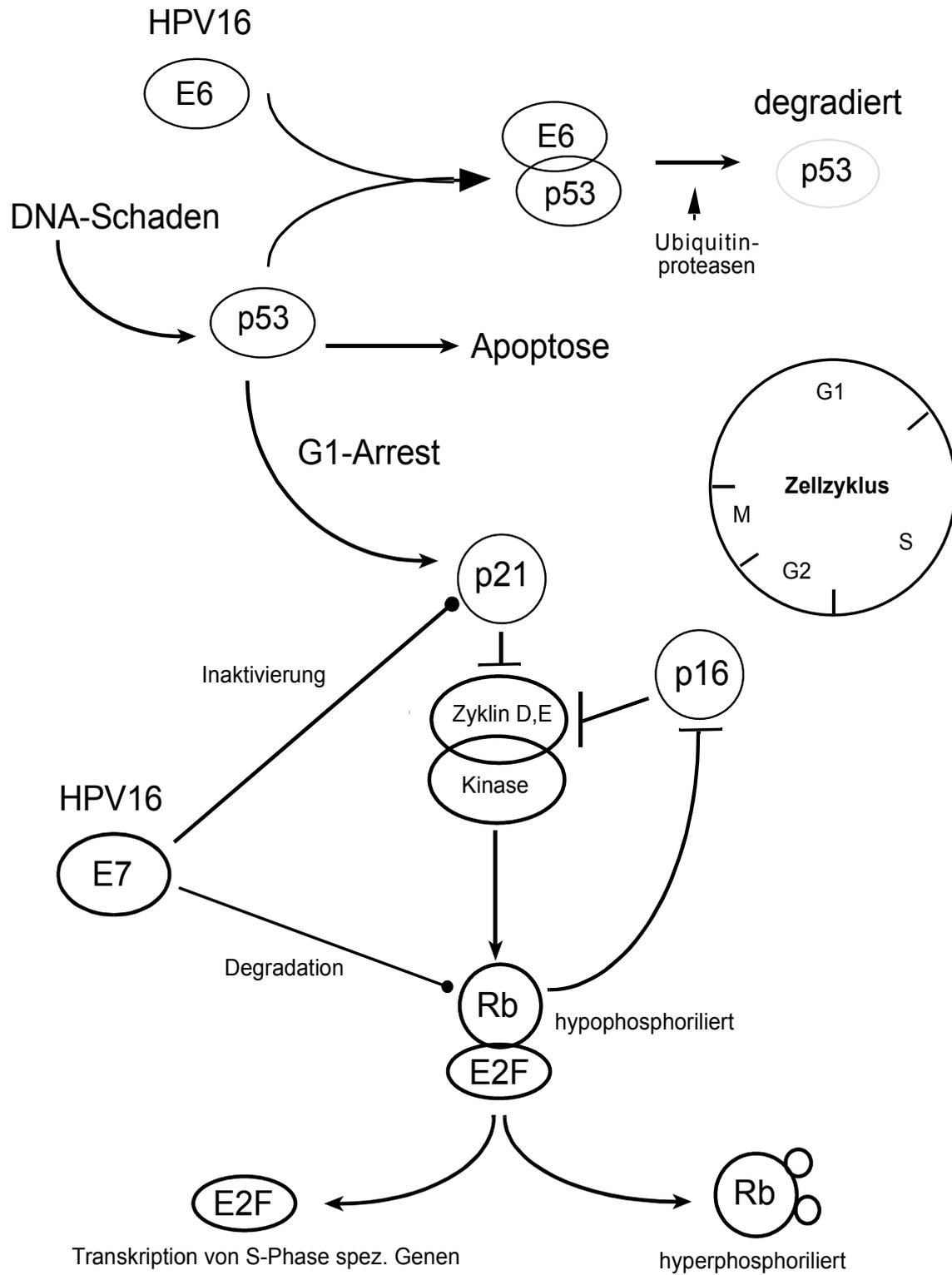
1.5 Interaktion viraler Onkogene mit dem Zellzyklus der Wirtszelle

Für die transformierende Wirkung der high-risk HPV-Typen, die für diese in vitro nachgewiesen werden konnte, sind hauptsächlich deren Proteine E6 und E7 verantwortlich. Sie beeinflussen den Zellzyklus über Wechselwirkungen mit dessen Hauptregulatoren, den Tumorsuppressorproteinen p53 und dem Retinoblastomprotein (pRb) (Abbildung 3). Im Falle einer DNA-Schädigung, z.B. durch chemische Agenzien oder ionisierende Strahlung, reichert sich p53 in der Zelle an. Hierdurch wird der Zellzyklus in seinem Übergang von der G1 in die S-Phase gestoppt und es entsteht die Gelegenheit, die entstandenen Schäden zu reparieren. Alternativ kann p53 auch bei irreparabler Schädigung des Genoms die Apoptose einleiten. Den G1-Arrest erreicht p53 durch seine Wirkung als Transkriptionsfaktor für die Synthese von p21, welches ein Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinase ist. Diese bewirkt die Phosphorylierung des pRb. In seiner hypophosphorylierten Form bindet pRb den Wachstumsfaktor E2F, welcher an der Initiierung des Übergangs des Zellzyklus von der G1 in die S-Phase beteiligt ist. Nach der Beseitigung der DNA-Schäden durch das zelleigene Reparatursystem wird Rb in der späten G1-Phase phosphoryliert, wodurch es den Wachstumsfaktor wieder frei gibt. Das E6 Protein der HR-HPV bildet einen Komplex mit p53 und ist dadurch in der Lage, dessen Abbau zu fördern oder durch seine Bindung an seiner Aktivität als Transkriptionsfaktor für p21 zu hindern. Durch Störung des p53 Schutzmechanismus unterbleibt die Reparatur der DNA-Schäden, wodurch sich DNA-Mutationen anreichern können und die genetische Instabilität der Zelle ansteigt. [41] Zusätzlich aktiviert E6 p53-unabhängig die zelluläre Telomerase und kann so zur Immortalisierung der befallenen Zelle führen.

Das Enzym Telomerase stabilisiert die Enden von Chromosomen (Telomere). Diese unterliegen während der DNA-Replikation normalerweise einer Verkürzung. In Abhängigkeit des Alters einer Zelle ist eine Verkürzung der Telomere zu beobachten. Da ein Zusammenhang zwischen der Telomerlänge und der Fähigkeit zur Zellteilung besteht, kommt den Telomeren die Funktion einer mitotischen Uhr zu. In eukaryontischen Zellen wirkt das Enzym

Telomerase dieser Telomer-Verkürzung mit dem Anhängen repetitiver Sequenzen entgegen. [31] E7 fördert den Übergang in die S-Phase zum einen durch die Inaktivierung von p21, wodurch über die ausbleibende CDK-Inhibition vermehrt Wachstumsfaktoren (E2F) freigesetzt werden, zum anderen bindet E7 direkt pRb und inaktiviert es so. P16 ist ein Protein, das ebenfalls über die Inhibition der Cyclin-abhängigen Kinasen und der dadurch ausbleibenden Phosphorylierung des pRb antiproliferativ wirkt. P16 unterliegt einem negativen Feedback-Mechanismus durch pRb. Bei einer Inaktivierung von pRb durch E7 kommt es zu einer Anreicherung von p16 in der Zelle, die immunhistochemisch nachgewiesen werden kann. [30] [56] Die Virus-DNA kann in den infizierten Zellen episomal oder in die humane DNA integriert vorliegen. Da beobachtet wurde, dass die virale DNA in benignen genitalen HPV-assoziierten Läsionen in der Regel episomal und in malignen Läsionen wie dem Zervixkarzinom eher in das Genom integriert vorliegt, wird der Integration des viralen Genoms in die Wirts-DNA ein wichtiger Schritt bei der Kanzerogenese zugeschrieben. Es wurde gezeigt, dass mit der Zunahme des Dysplasiegrades auch eine Zunahme des Anteils an in das Genom integrierter DNA verbunden ist. [8] Einige Studien wiesen allerdings nach, dass in 15-30% der Zervixkarzinome HPV-16 nur episomal vorliegt. [27] Die Integration der viralen DNA kann zu einer überschießenden Expression von E6 und E7 führen. Ihre Replikation wird durch einen Promoter, der sich im LCR-Abschnitt befindet und selbst wiederum durch das E2 Protein kontrolliert wird, reguliert. Bei der Integration kommt es oft zu einem Bruch des E2 Leserahmens, während der LCR-Abschnitt erhalten bleibt. Außerdem kann es durch die Integration zur Stabilisierung der E6 und E7 mRNA-Sequenzen kommen. [25]

Abbildung 3: Interaktionen von HPV16-Onkoproteinen E6 und E7 mit zwei Hauptregulatoren des Zellzyklus: Retinoblastomprotein (Rb) und p53-Protein (p53)



1.6 HPV-assoziierte Kopf-Hals-Tumoren

Der übermäßige Konsum von Tabak und Alkohol wird als klassischer Risikofaktor für die Entstehung von Kopf-Hals-Karzinomen angesehen. [72] Betrachtet man das betroffene Patientenkollektiv, fällt jedoch eine Gruppe von Patienten auf, bei denen keine Alkohol oder Raucher-Anamnese vorliegt. [75] 1983 wurde das erste Mal eine Verbindung zwischen Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich und HPV vermutet, da HPV-typische morphologische Veränderungen (Koilozyten) in diesen Tumoren nachgewiesen werden konnten. [68] Die Beteiligung von HPV bei der Entstehung von Karzinomen der Anogenitalregion ist weitgehend aufgeklärt und anerkannt. [52] In fast 100% der Zervixkarzinome lässt sich HPV-DNA nachweisen, so dass eine Infektion mit HPV generell ein hohes Risiko für die Entstehung eines Karzinoms darzustellen scheint. [52] Die Mitwirkung von HPV bei der Entstehung benigner Läsionen im Kopf-Hals-Bereich konnte bereits geklärt werden. Bei der juvenilen Larynxpapillomatose finden sich überwiegend die HPV-Typen 6 und 11, die zu den low-risk-Typen gerechnet werden. Weitere Assoziationen bestehen zu invertierten Papillomen der Nasenhöhle [20] und benignen Epithelhyperplasien in der Mundhöhle. [65] Es konnte gezeigt werden, dass eine HPV-Infektion das Risiko für ein Kopf-Hals-Karzinom, unabhängig von Tabak und Alkohol, erhöht. [9] Die epidemiologischen Daten über die Rolle von HPV in Kopf-Hals-Karzinomen waren zunächst unbeständig und reichten von 0-100%. [62, 65] Es fällt jedoch schwer, die Daten mehrerer Studien miteinander in Korrelation zu setzen, da ihre Entstehung zum Teil auf verschiedenen Studien-Modellen beruht. Die verwendeten Nachweismethoden, darunter Immunhistologie [69], In-situ-Hybridisierung [6, 69] und Polymerase-Ketten-Reaktion [12, 63, 65] unterscheiden sich deutlich in ihrer Sensitivität und Spezifität. Die untersuchten Patientenkollektive fielen außerdem zum Teil sehr klein aus. Weiterhin variierten sowohl die Biopsiematerialien als auch die Anteile bestimmter Tumorlokalisationen an der Grundgesamtheit. Eine große Metaanalyse von 2005 fasste Daten aus 60 Studien, deren Untersuchungen auf PCR-Methoden beruhten, zusammen. [35]

Insgesamt konnte in annähernd 26% von 5046 Fällen von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region HPV-DNA nachgewiesen werden. Deutlich wurde hierbei ein Unterschied in der Verbreitung von HPV-DNA in Abhängigkeit von der Lokalisation der Tumore. Am häufigsten fand sich eine Assoziation mit HPV bei Karzinomen des Oropharynx (35,6% von 969 Fällen), zu denen auch das Tonsillenkarzinom zählt. Bei den Larynxkarzinomen, zu denen in dieser Metaanalyse die Hypopharynxkarzinome gerechnet wurden, fand sich in 24% HPV-DNA und bei den Karzinomen der Mundhöhle konnte in 23,5% der Fälle HPV-DNA mit Hilfe der PCR detektiert werden. In annähernd 87% der Fälle der HPV-positiven Oropharynxkarzinome lässt sich HPV 16 nachweisen. Nur knapp 2,8% der Oropharynxkarzinome waren HPV18 positiv. Einige andere Studien ergaben ebenfalls einen signifikant höheren Anteil an HPV-assoziierten Karzinomen im Bereich des Oropharynx im Vergleich zu anderen Tumorlokalisationen. [2, 17, 50, 58, 62] Die hohe Prävalenz von HR-HPV scheint sich besonders in Karzinomen der Tonsillenregion abzuzeichnen. Klusmann et al. konnten 2001 in 26% von 98 Kopf-Hals-Karzinomen HPV-DNA nachweisen. Auch hier waren mit 45% die Oropharynxkarzinome am häufigsten betroffen und insbesondere die von der Tonsillenregion ausgehenden Tumoren (58%). In 93% der HPV-positiven Fälle konnte DNA von HPV16 nachgewiesen werden. HPV-DNA konnte nicht in Tonsillen der Kontrollgruppe, in der die Tonsillektomie nicht aufgrund einer malignen Erkrankung erfolgte, nachgewiesen werden. [34] Diese Verteilung stimmt mit den Ergebnissen früherer Studien überein. [6, 17, 50, 62, 80] Auch der große Anteil der durch HPV16 bedingten Tumoren konnte in anderen Studien verifiziert werden. [48, 59, 66] 2004 wurde eine Übersichtsarbeit über HPV-DNA assoziierte Tonsillenkarzinome (n=432) veröffentlicht. [56] HPV-DNA konnte in 51% (221/432) dieser Karzinome nachgewiesen werden. Der HPV high-risk-Typ 16 konnte in 84% der Fälle detektiert werden. Zusätzlich waren in fast 4,5% aller Fälle Doppelinfektionen mit HPV16/18 beziehungsweise HPV 16/33 beobachtbar. Eine Einzelinfektion mit HPV33 konnte in 4,6% der Fälle nachgewiesen werden. Die Detektionsrate für HPV-DNA in Tonsillenkarzinomen ist allem Anschein nach doppelt so hoch (51%) wie die in der aktuellen Literatur angegebene Rate für alle Karzinome des oberen Aerodigestivtraktes zusammen. [12] Weitere epidemiologische Daten bekräftigen den Verdacht

einer ätiologischen Rolle von HPV insbesondere beim Tonsillenkarzinom. Eine Studie ermittelte für Patienten mit einem HPV-assoziierten Anogenitalkarzinom ein 4,3fach erhöhtes Risiko für die Erkrankung an einem Plattenepithelkarzinom der Tonsillenregion. [13] Das relative Risiko war für das Tonsillenkarzinom signifikant höher als für alle anderen oralen Plattenepithelkarzinome. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Ehemänner von Patientinnen mit Zervixkarzinom ein erhöhtes Risiko für die Erkrankung an einem Tonsillenkarzinom besitzen. [21] Auch was die Risikofaktoren für die Entstehung eines Karzinoms betrifft, scheint es Gemeinsamkeiten zwischen Zervix- und Tonsillenkarzinom zu geben. Schwartz et al. [58] konnten zeigen, dass Risikofaktoren für das Zervixkarzinom, junges Alter bei erstem Geschlechtsverkehr, große Anzahl von Sexualpartnern und genitale Warzen in der Anamnese ebenso für die Entwicklung eines Kopf-Hals-Karzinoms gelten. Diese Ergebnisse führten zu der Vorstellung, dass einige Karzinome des oberen Aerodigestivtraktes sexuell übertragen werden. [14, 18] Die sexuelle Übertragung von HPV wurde in einer Studie von Hernandez untersucht. [22] Hier wurden 25 heterosexuelle, monogame Paare über einen Zeitraum von 7,5 Monaten wiederholt einem HPV-Screening an unterschiedlichen anatomischen Stellen unterzogen. Innerhalb des Untersuchungszeitraums konnten 53 Übertragungen unter 16 Paaren nachgewiesen werden. Hierbei lag die Rate an Übertragungen vom Penis zur Zervix mit 4,9/100 Personen-Monate etwas niedriger als die Übertragungsrate von der Zervix zum Penis (17,4/100 Personen-Monate). Zusätzlich konnten Übertragungen von den Händen zu den Genitalien, als auch Selbstinfektionen (vornehmlich bei männlichen Probanden) nachgewiesen werden. Paare, bei denen eine HPV Übertragung stattfand, waren im Vergleich sexuell aktiver und verwendeten seltener Kondome. Im Rahmen dieser Studie wurden mittels Cytobrush Abstriche von den Wangeninnenseiten und der Zunge durchgeführt, um den oralen HPV Status zu ermitteln. Es wurde keine orale HPV Infektion detektiert. Eine weitere Studie untersuchte die Konkordanz von HPV Infektionen bei heterosexuellen Paaren. [76] Von den 25 eingeschlossenen Paaren waren 21 Paare oral HPV- negativ. Lediglich in einem Fall konnte bei beiden Partnern oral HPV 16 nachgewiesen werden. Bei diesem Paar gelang an keiner anderen der untersuchten anatomischen Stellen ein Nachweis von HPV 16.

Ein oraler HPV-Nachweis gelang in dieser Studie nur bei Paaren, bei denen bei beiden Partnern eine HPV-Infektion in der Anogenitalregion vorlag. Dies erwies sich jedoch nicht als statistisch signifikant. Das Risiko für die Entstehung eines Kopf-Hals-Karzinoms nimmt mit steigender Anzahl vaginaler oder oraler Sexualpartner und Seropositivität für HPV16-Antikörper zu. In einer Studie von Smith et al. hatten die Patienten mit HPV-positiven Karzinomen eine höhere Anzahl von Sexualpartnern angegeben. Außerdem schienen die angegebenen Sexualgewohnheiten einen Einfluss auf das Karzinom-Risiko zu haben. So war das Risiko für Patienten, die oral-genitalen Kontakt angaben, erhöht. [60]

Der alleinige Nachweis von HPV-DNA in den Tumoren beweist zwar keinen kausalen Zusammenhang mit der Tumorentstehung. Molekularbiologische Studien haben allerdings den Verdacht unterstützt, dass die Untergruppe der HPV-assoziierten Kopf-Hals-Karzinome eine direkte, kausale Folge einer HPV-Infektion sein könnte. Van Houten et al. [71] konnten in 9 von 20 HPV-positiven Kopf-Hals-Karzinomen Transkriptionsprodukte des viralen Onkoproteins E6 (die die virale Aktivität anzeigen) nachweisen. Diese 9 Tumoren waren zusätzlich frei von p53 Mutationen. Und nur in den Lymphknotenmetastasen der HPV-E6-mRNA-positiven Tumoren konnte ebenfalls HPV-DNA und E6-Transkripte detektiert werden. Eine weitere Studie untersuchte 28 Kopf-Hals-Karzinome, in denen HPV-DNA nachgewiesen worden war. In 12 Karzinomen konnte die Expression von E6/E7 nachgewiesen werden. In den Fällen mit E6/E7 Expression war p53 als Wild-Typ vorhanden, wohingegen in den übrigen Fällen eine p53-Mutation nachweisbar war. [79] Der Expressionsnachweis der viralen Produkte spricht für eine virale Aktivität im Rahmen der HPV-Infektion. Eine Studie von Mork et al. konnte zeigen, dass Patienten, die seropositiv für HPV16-Antikörper waren, ein 2,1fach erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Kopf-Hals-Karzinoms und ein 10,2fach erhöhtes Risiko für ein Tonsillenkarcinom aufwiesen. [45] Bei Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen sind häufiger Antikörper gegen HPV16 nachweisbar als in entsprechenden Kontrollgruppen. Die Expression von Zellzyklusproteinen scheint in HPV-assoziierten Läsionen verändert zu sein. Andl et al. [2] stellten in HPV positiven Tonsillenkarcinomen, analog zu der Interaktion von E7 mit pRb, eine verminderte Expression von pRb fest. Bei einer Inaktivierung von pRb durch E7 kommt es zu einer Überexpression von p16. Klusmann et al. konnten eine

signifikante Korrelation zwischen der p16 Überexpression und dem HPV-Status nachweisen. [32] Molekularbiologisch zeichnen sich die HPV-assoziierten Kopf-Hals-Karzinome zusammenfassend durch das Vorhandensein von HPV-DNA, die Expression von HPV E6/E7, das Vorhandensein von p53 als Wildtyp, eine verminderte Expression von CyclinD und pRb und eine Überexpression von p16 aus [16]. Histomorphologisch sind HPV-positive Tonsillenkarcinome durch eine basaloide Erscheinung mit geringer Keratinbildung charakterisiert. [80] Einige Studien konnten eine günstigere Prognose hinsichtlich der Überlebenszeit für HPV-positive Kopf-Hals-Karzinome zeigen. [2, 17, 43] Eine Ursache hierfür könnte eine günstigere Sensitivität für Strahlentherapie und Chemotherapie darstellen. [38] Dies passt zu den Ergebnissen von van Houten et al. [71], die eine inverse Korrelation von HPV Status und p53-Mutationen feststellen konnten. Tumoren mit intaktem p53 sind generell sensibler für eine strahleninduzierte Apoptose. [51] Aktuelle Studien sprechen nun aufgrund der oben dargestellten Besonderheiten der HPV-assoziierten Kopf-Hals-Karzinome von zwei unterschiedlichen Tumorentitäten in Kopf-Hals-Karzinomen, den HPV-assoziierten Karzinomen und den HPV-negativen Karzinomen. [16, 33] Diese beiden Entitäten unterscheiden sich in ihren Risikofaktoren, ihrer Prognose und in epidemiologischen, klinischen und molekularbiologischen Aspekten grundlegend voneinander.

1.7 Nachweis von Papillomavirus-Infektionen

HPV-Infektionen können unterteilt werden in HPV assoziierte Neoplasien, klinische, subklinische und latente Infektionen. Kutane oder sich im äußeren Genitalbereich befindende Neoplasien und klinische Infektionen können häufig schon aufgrund ihres charakteristischen Aussehens diagnostiziert werden. Die Bestätigung der Diagnose erfolgt in diesen Fällen histologisch. Subklinische Infektionen, insbesondere an der häufig betroffenen Cervix uteri sind mit bloßem Auge nicht sichtbar und rufen häufig keine Symptome hervor, sie können kolposkopisch, zytologisch oder über den Erregernachweis diagnostiziert werden. Die latenten Infektionen sind dadurch gekennzeichnet, dass sie zu keinerlei morphologischen Veränderungen führen, sie stellen jedoch ein hohes Risiko für die Entwicklung einer Dysplasie dar. Sie sind in diesem Fall nur über den Virusnachweis diagnostizierbar.

Generell gibt es folgende Möglichkeiten für den Nachweis einer HPV-Infektion:

1. Morphologische Methoden (Kolposkopie, Zytologie, Histologie)
2. Nachweis von HPV-DNA (PCR, Hybrid capture)
3. Immunzytochemische Methoden
4. Elektronenmikroskopische Methoden
5. Serologische Methoden

In der Praxis finden die unter 1 und 2 genannten Methoden heute die häufigste Anwendung.

Morphologischer Nachweis von HPV-Infektionen

Der morphologische Nachweis von HPV-Infektionen erfolgt indirekt, da nicht das Virus selbst, sondern die von ihm hervorgerufenen Veränderungen des Epithels Gegenstand der Untersuchung sind. Bei der Kolposkopie wird die Cervix uteri mit dem Kolposkop betrachtet. Läsionen können durch das Auftragen von 3-5% Essigsäure und Iod sichtbar gemacht werden. Als typisches Bild stellt sich eine Infektion mit HPV als Leukoplakie, Mosaik oder Punktierung dar. Bei der Zytologie werden einzelne durch einen Abstrich gewonnene Zellen und im Falle einer histologischen Untersuchung Zellen im Zellverband nach den HPV-typischen Zellveränderungen untersucht. Die für eine HPV-Infektion typischste Zellveränderung ist die Koilozytose. Die betroffenen Zellen sind durch eine perinukleäre Aufhellung und eine erhöhte Dichte des umgebenden Plasmasaums ausgezeichnet. Die Beurteilung einer Zervix-Zytologie erfolgt nach den Kriterien von Papanicolaou (Pap I-V, siehe Tabelle). Histologische Befunde von der Zervix werden nach dem Konzept der „zervikalen intraepithelialen Neoplasien“ (CIN I-III, geringgradige, mäßiggradige, hochgradige Dysplasie/Carcinoma in situ) eingeteilt. Diese morphologischen Untersuchungen sind in der Praxis weit verbreitet, weisen jedoch den Nachteil auf, dass nach positiver Diagnose keine Unterscheidung zwischen high-risk und low-risk Typen möglich ist, so dass Folgeuntersuchungen notwendig sind.

Des Weiteren weisen die Ergebnisse einen Mangel an Sensitivität und Spezifität auf, da das hauptauschlaggebende Kriterium für eine zytologische und histologische HPV-Diagnostik, die Koilozyten, sowohl durch andere Faktoren hervorgerufen werden können als auch bei einer vorhandenen HPV-Infektion fehlen können. Trotz dieser Nachteile hat die Einführung der Krebsvorsorgeuntersuchung durch eine jährliche Zervixzytologie zu einer Abnahme der Inzidenz von Zervixkarzinomen geführt [1].

Tabelle 3: Einteilung zytologischer Befunde nach Papanicolaou (PAP-Einteilung)

negativ	I	normales Zellbild
	II	entzündliche, regenerative, metaplastische oder degenerative Veränderungen, Hyper- und Parakeratosezellen
zweifelhaft	III	schwere entzündliche oder degenerative Veränderungen und/oder schlecht erhaltenes Zellmaterial, Dysplasie, Carcinoma in situ oder invasives Karzinom nicht auszuschließen; abnorme Drüsen und Stromazellen des Endometriums nach der Menopause
	IIID	Zellen einer Dysplasie leichten bis mäßigen Grades
positiv	IVa	Zellen einer schweren Dysplasie oder eines Carcinoma in situ
	IVb	Zellen einer schweren Dysplasie oder eines Carcinoma in situ, invasives Karzinom nicht sicher auszuschließen
	V	Zellen eines invasiven Zervixkarzinoms oder anderer maligner Tumoren

Nachweis genomischer HPV-DNA

Methoden für den Nachweis genomischer HPV-DNA können grundsätzlich in zwei Gruppen eingeteilt werden. In der Gruppe der Hybridisierungstests, zu denen der Southern blot (Sb), die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) die In-situ-Hybridisierung (ISH) und kommerziell erhältliche Tests für die direkte Hybridisierung (Hybrid Capture® Test) zählen, erfolgt der Nachweis ohne vorherige Amplifikation der Ausgangs-DNA. Bei der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) hingegen wird die DNA vor dem Nachweis amplifiziert. Dies hat den Vorteil, dass schon geringe Mengen an Ausgangs-DNA (Target-DNA) für eine Untersuchung ausreichen. [77]

Bei der Durchführung einer PCR zum Nachweis von HPV-DNA gibt es generell zwei Möglichkeiten. Durch die Verwendung HPV-Typen spezifischer Primer, werden nur DNA-Fragmente amplifiziert, die den gesuchten spezifischen HPV-Typen enthalten. Es ist auch möglich, mehrere Typen-spezifische Primer innerhalb eines PCR-Ansatzes zu verwenden. Mit der anderen Form der PCR besteht die Möglichkeit, mithilfe einer einzigen PCR eine Probe als HPV-positiv beziehungsweise HPV-negativ zu klassifizieren. Hierfür werden so genannte „General Primer“ verwendet, die ein breites Spektrum an HPV-Typen amplifizieren. Da sich die einzelnen HPV-Typen jedoch immer in einzelnen Nukleotiden unterscheiden, wird die PCR in diesem Fall unter weniger stringenten Bedingungen durchgeführt, so dass einzelne Basenfehlpaarungen akzeptiert werden (z.B. Annealingtemperatur 40°C bei der GP5+/6+ - PCR). Alternativ wird eine Mischung so genannter „degenerierter Primer“ verwendet, das bedeutet, die Oligonukleotide weisen einzelne Nukleotid-Unterschiede auf, damit auch bei Nicht-Übereinstimmung einzelner Nukleotide eine Amplifikation gewährleistet ist. Generell setzen Primer bei der HPV-PCR in der E1- oder L1-Region der HPV-DNA an, da diese unter den einzelnen HPV-Typen am meisten konserviert sind. Unter den vorhandenen Methoden zum Nachweis von HPV-DNA besitzt die PCR die höchste Sensitivität. Es können bereits 1-10 vorhandene HPV-Genom-Kopien mit ihrer Hilfe nachgewiesen werden. Ihre Verwendung ist außerdem an nicht aufgearbeiteten Zellsuspensionen wie Zervix-Abstrichen durchführbar. Der größte Nachteil der PCR ist ihre Anfälligkeit für Kontaminationen, durch Plasmide und andere PCR-Produkte können falsch-positive Ergebnisse entstehen. Verfahren zum Nachweis und zur optischen Darstellung der amplifizierten PCR Produkte stellen die Agarosegelelektrophorese, mit anschließender direkter Färbung der Gele mit Ethidiumbromid, oder Hybridisierungsverfahren mit Hilfe von z.B. biotin-, fluoreszein-, digoxigenin- oder radioaktiv-markierten Sonden dar. Alternativen stellen bei der Breitspektrum-PCR die Typisierung mit Hilfe der Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Analyse (RFLP) oder Sequenzanalyse dar.

1.8 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Prävalenz einer oralen HPV-Infektion in Abhängigkeit vom Vorhandensein einer genitalen HPV-Infektion bei weiblichen Probandinnen im Alter zwischen 18 und 99 Jahren. Des Weiteren wurden Risikofaktoren sowohl für eine genitale als auch für eine orale HPV-Infektion bei oben genannten Probandinnen untersucht. Zusätzlich wurden HPV-Untersuchungen bei Paaren durchgeführt. Hier sollte unter anderem untersucht werden, ob eine genitale HPV-Infektion der Partnerin ein erhöhtes Risiko für eine orale HPV-Infektion des männlichen Partners darstellt.

2.Material

2.1 Laborgeräte

Vortex-Mischer:

Reax 2000
Schwabach
VF-2

Heidolph Instruments GmbH,

Janke&Kunkel, Staufen

Thermomixer 5436

Eppendorf, Hamburg

Biofuge Pico

Heraeus, Hanau

Thermocycler T3

Biometra, Göttingen

Elektrophoresekammer Sub Cell GT
München

Bio-Rad Laboratories GmbH,

Spannungsgerät:

Electrophoresis Powersupply

Biotec-Fischer, Germany

PHERO-stab. 300

Herolab GmbH, Wiesloch

Herolab E.A.S.Y 429K Kamera

Herolab GmbH, Wiesloch

Herolab E.A.S.Y RH3 Transluminator

Memmert, Schwabach

Brutschrank Typ B26

Heraeus, Hanau

Wärmeschrank Kelvitron T

Tecan, Crailsheim

Tecan M8/2R Columbus Plus

Microplate Strip Washer

Tecan, Crailsheim

Spectra Photometer

Eppendorf, Hamburg

Eppendorf Pipette „Reference“

Eppendorf, Hamburg

Multipette Plus

Scaltec, Göttingen

Waage SBA52

2.2 Laborbedarf

Cytobrush® Plus GT

Medscand Medical, Sweden

Holzmundspatel

Roeser Medical, Mülheim

Objektträger, 76x26mm

Menzel-Gläser, Braunschweig

Einmalskalpelle

Feather, Japan

PCR Soft Tubes, 0,2ml Art.Nr. 71108

Biozym Scientific GmbH,

Oldendorf

Strepta Well High Bind (11989685001)

Roche, Mannheim

Biosphere® Filter Tips type Eppendorf/Gilson 0,5µl-10µl 10µl-100µl 100µl-1000µl	Sarstedt, Nümbrecht
Einmalhandschuhe Nitril 3000 Peha-soft	Meditrade, Kiefersfelde Hartmann, Heidenheim

2.3 Chemikalien

Ampuwa	Fresenius, Bad Homburg
NaCl 0,9%	Braun, Melsungen
Merckofix® Fixationsspray	Merck, Darmstadt
Merthiolat (Thimerosal)	Sigma, Deisenhofen
Hypochlorid 0,5%	Virologie, Köln
Incidin 0,5%	Virologie, Köln
Agarose Electrophoresis Grade	Invitrogen, Karlsruhe
Ethidiumbromid 10mg/ml	Sigma, Deisenhofen
Ethanol abs. pa.	J.T.Baker, Griesheim
PBS	Fa. Gibco BRL, Karlsruhe
NaOH-Pellets Nr. 1.06498.1000	Merck, Darmstadt
Tween-20	Merck, Darmstadt
Tris-Base	Merck, Darmstadt
Eisessig	Merck, Darmstadt
EDTA 0,5M, pH 8,0	Fa. Gibco BRL, Karlsruhe
Bromphenol-Blau	Sigma, Deisenhofen
Xylene-Cyanol	Sigma, Deisenhofen
Saccharose	Sigma, Deisenhofen
Tris-HCL 1M, pH 8,0	Fa. Gibco BRL, Karlsruhe
Na-Citrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
SIGMAFAST™ N-1891	Sigma, Deisenhofen
p-Nitrophenyl phosphate Tablets	
Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments	Roche, Mannheim

2.4 Enzyme

Proteinase K	Quiagen, Hilden
Taq DNA Polymerase # EP0072	Fermentas, St. Leon-Rot

2.5 Nukleotide

NTP Set # R0481	Fermentas, St. Leon-Rot
-----------------	-------------------------

2.6 DNA Längenmarker

Gene Ruler™ 0,5µg/µl 100bp	Fermentas, St. Leon-Rot
----------------------------	-------------------------

2.7 DNA Präparationskit

QIAamp DNA Mini Kit	Quiagen, Hilden
---------------------	-----------------

2.8 Puffer und Lösungen

HPV-Transportmedium	4ml PBS/Merthiolat 0,05%
Elektrophorese-Laufpuffer, 50xTAE:	242g Tris-Base 57,1ml Eisessig 100ml 0,5 mM EDTA, pH 8,0 Aqua dest. Ad 1L
Gel Loading Puffer 6x:	0,25% Bromphenol-Blau 0,25% Xylene-Cyanol 40% Saccharose
Ethidiumbromid-Bad	1ml Stammlösung (10mg/ml) + 1L Aqua dest.
TE-Puffer	0,5ml Tris-HCL 1M, pH 8,0 0,1ml EDTA 0,5M, pH 8,0 49,4ml Ampuwa
SSC1x (0,15M NaCl, 0,015M Na-Citrat)	8,77g NaCl 4.41g Na-Citrat-Dihydrat Aqua dest. ad 1000ml
SSCx20	175,4g NaCl 88,2g Na-Citrat-Dihydrat 800ml Aqua dest., mit NaOH 10M auf pH 7,0 einstellen

2.9 Oligonukleotide

2.9.1 PCR-Primer für qualitativen HPV-Nachweis (General Primer)

Tabelle 4: Primer aus bereits etablierten PCR-Protokollen für den qualitativen Nachweis von HPV- und β -Globin

Name	Sequenz	Länge	Zitat
β -glob.1 PC04	5'-CAA-CTT-CAT-CCA-CGT-TCA-CC-3'	20nt	[50]
β -glob.2 GH20	5'-GAA-GAG-CCA-AGG-ACA-GGT-AC-3'	20nt	[50]
A5-fw	5'-TAT-TYT-SCT-WCT-CCY-AGT-GG-3'	20nt	[78]
A6-fw	5'-GCM-CAG-GGM-CAY-AYY-AAT-GG-3'	20nt	[78]
A8-bw- Bio	5'-Biotin-CAA-ART-TCC-ART-CYT-CCA-A-3'	19nt	[78]
A10-bw	5'-CKT-CCC-AAR-GGA-WAY-TGR-TC-3'	20nt	[78]

A/C=M, A/G=R, A/T=W, C/G=S, C/T=Y, G/T=K

PCR-Kontrollen

HPV-PCR Positivkontrolle:

Die Positivkontrollen für die HPV-PCR entstammen aus einem Pool von bekannt positivem aufgearbeitetem Patientenmaterial, welches mindestens einen HR- und einen LR-HPV-Typen enthält. Die Konzentration entspricht dem Dreifachen der in der Validierung ermittelten Nachweisgrenze.

β -Globin Positivkontrolle:

1ng humane Plazenta DNA

Sigma, Deisenhofen

Negativkontrollen:

Ampuwa

Fresenius, Bad Homburg

2.9.2 HPV-Hybridisierungssonden

Alle 5'-dd-UTP-Digoxigenin-markiert

Eurogentec, Belgien

Tabelle 5: High-Risk-Sonden

HPV-Typ	Sequenz (5→3)
16	GTC-ATT-ATG-TGC-TGC-CAT-ATC-TAC-TTC-AGA
18	TGC-TTC-TAC-ACA-GTC-TCC-TGT-ACC-TGG-GCA
31	TGT-TTG-TGC-TGC-AAT-TGC-AAA-CAG-TGA-TAC
33	TTT-ATG-CAC-ACA-AGT-AAC-TAG-TGA-CAG-TAC
35	GTC-TGT-GTG-TTC-TGC-TGT-GTC-TTC-TAG-TGA
39	TCT-ACC-TCT-ATA-GAG-TCT-TCC-ATA-CCT-TCT
45mod	ACA-CAA-AAT-CCT-GTG-CCA-AGT-ACA-T
51	AGC-ACT-GCC-ACT-GCT-GCG-GTT-TCC-CCA-ACA
52	TGC-TGA-GGT-TAA-AAA-GGA-AAG-CAC-ATA-TAA
56	GTA-CTG-CTA-CAG-AAC-AGT-TAA-GTA-AAT-ATG
58	ATT-ATG-CAC-TGA-AGT-AAC-TAA-GGA-AGG-TAC
59	TCT-ACT-ACT-GCT-TCT-ATT-CCT-AAT-GTA-TAC
66	TAT-TAA-TGC-AGC-TAA-AAG-CAC-ATT-AAC-TAA
68	TCT-ACT-ACT-ACT-GAA-TCA-GCT-GTA-CCA-AAT

Tabelle 6: Low-Risk-Sonden

HPV-Typ	Sequenz 5→3
6	ATC-CGT-AAC-TAC-ATC-TTC-CAC-ATA-CAC-CAA
11	ATC-TGT-GTC-TAA-ATC-TGC-TAC-ATA-CAC-TAA
40	GCT-GCC-ACA-CAG-TCC-CCC-ACA-CCA-ACC-CCA
42	CTG-CAA-CAT-CTG-GTG-ATA-CAT-ATA-CAG-CTG
43	TCT-ACT-GAC-CCTACT-GTG-CCC-AGT-ACA-TAT
44	GCC-ACT-ACA-CAG-TCC-CCT-CCG-TCTACA-TAT

Die verwendeten Hybridisierungssonden wurden vor der Herstellung der Sondenmixe in TE-Puffer aufgenommen, so dass sie als 100µM vorlagen.

High-Risk Sondenmix aus 14 High-Risk Sonden:

10µl je High-Risk Sonde 1µM (= 140µl) + 860µl SSC1x/0,5%Tween 20

Low-Risk Sondenmix aus 6 Low-Risk Sonden:

10µl je Low-Risk Sonde 1µM (= 60µl) + 940 µl SSC1x/0,5%Tween 20

Einzelsonden (für die HPV-Typisierung):

10µl Sonde 1µM + 990 µl SSC1x/0,5%Tween 20

2.10 Material Klonierung

pGEM-T Easy Vector (3015bp)
T4-DNA-Ligase
kompetente E.colis

Roche, Mannheim
Roche, Mannheim
zur Verfügung gestellt von Fr.
Prof Noegel, BC I, Uniklinik
Köln

SOC-Medium

Hefeextrakt 0,5%
Trypton 2%
NaCl 10mM
KCl 2,5mM
MgCl 10mM
Magnesiumsulfat 10mM
Glucose 20mM

LB-Medium

Hefeextrakt 5g/l
Trypton 10 g/l
NaCl 5g/l
Roche, Mannheim

X-Gal
(5-Bromo-4-chloro3-indolyl-β-D-Galaktosid)
IPTG
(Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)

Roche, Mannheim

2.11 Patienten und Probanden

Im Rahmen dieser Arbeit konnten im Zeitraum zwischen August 2005 und November 2006 in der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Uniklinik Köln Proben von 140 Patientinnen und Patienten gesammelt werden.

Bei den Probandinnen handelte es sich um Patientinnen der Poliklinik der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Uniklinik Köln im Alter zwischen 18 und 99 Jahren, die die Sprechstunde aus unterschiedlichen Gründen aufsuchten. Ein Teil der Probandinnen waren Patientinnen der Dysplasiesprechstunde. Bei diesen Probandinnen konnte aufgrund eines vorrausgegangenen auffälligen Zervixabstriches von einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für ein HPV-positives Abstrichergebnis ausgegangen werden. Durch die Einschleusung der Probandinnen aus der Dysplasiesprechstunde wurde sichergestellt, dass gleich große Gruppen von genital HPV-positiven und HPV-negativen Probandinnen untersucht wurden.

Bei den Probandinnen erfolgten Abstriche der Tonsillen, die Durchführung einer Mundspülung, ein Abstrich von der Zervix uteri sowie eine Zervixzytologie. Alle Zervixabstriche wurden von Dr. med. Markus Valter (Klinik und Poliklinik für Gynäkologie und Geburtshilfe der Uniklinik Köln) standardisiert durchgeführt. Wenn möglich erfolgten bei den Partnern der Probandinnen ebenfalls Abstriche der Tonsillen sowie eine Mundspülung. Alle Probanden/innen waren vorher aufgeklärt worden und hatten schriftlich der Probenentnahme zugestimmt.

2.12 Fragebögen

Die Probanden/innen beantworteten zusätzlich standardisierte Fragebögen. Ein Fragebogen beinhaltete 58 Fragen zu Lebensgewohnheiten wie Tabak- und Alkoholkonsum, Sexualgewohnheiten, Vorerkrankungen und Fragen zur Ermittlung des Bildungsniveaus. Die Fragebögen wurden anonymisiert.

2.13 Software

Easy Image Plus

SPSS 17.0

Chromas 2.33

Herold, Wiesel

IBM

3.Methoden

Sofern nicht anders angegeben, wurden die Standardmethoden der Molekularbiologie angewendet, wie von Sambrook et al. [55] angegeben. Methoden, die auf kommerziellen Kits beruhen, wurden, sofern nicht anders vermerkt, nach Herstellerprotokoll durchgeführt.

3.1 Methoden zur Probengewinnung

3.1.1 Tonsillenabstriche

Zellmaterial von den Rachenmandeln wurde mit Hilfe eines Cytobrush® Plus GT gewonnen. Hierfür wurde die Zunge des Probanden mit Hilfe eines Mundspatels beiseite gedrängt und mit dem Cytobrush 5- bis 10-mal, mit mittlerem Druck über die Tonsillen vor- und zurückgestrichen. Es wurde hierbei jeweils ein separater Abstrich für die linke und rechte Tonsille jedes Probanden angefertigt. Für den Transport wurden die Bürstchen in ein HPV-Transportröhrchen, gefüllt mit 4ml PBS-Puffer/0,05% Merthiolat, überführt.

3.1.2 Mundspülungen

Für die Herstellung der Mundspülungen spülten die Patienten die Mundhöhle für circa 15 Sekunden kräftig mit 5ml NaCl. Um ein Bakterienwachstum in der Probe zu verringern, wurde die Mundspülung anschließend in ein Transportgefäß mit 0,5µl Merthiolat überführt.

3.1.3 Abstriche von der Cervix uteri

Die Zervixabstriche wurden nach Standard entnommen. Hierfür wurden mit einem Cytobrush sowohl Zellen von der Portio als auch aus der Endozervix gewonnen. Die Bürstchen wurden in ein Transportröhrchen mit 4ml PBS-Puffer/0,05% Merthiolat überführt.

3.1.4 Zervix-Zytologien

Für die Herstellung der Zervix-Zytologien, wurde das für den Zervixabstrich verwendete Cytobrush vor der Überführung in das Transportmedium auf einem Objektträger abgestrichen. Das Zellmaterial auf dem Objektträger wurde mit Merckofix® Fixationsspray fixiert. Sowohl die Färbung der Zytologien nach Papanicolaou als auch die Begutachtung und Bewertung erfolgten nach Standard am Institut für Pathologie der Universität zu Köln.

3.1.5 Probentransport und Aufbewahrung

Die Proben wurden in das Virologische Institut der Universität zu Köln transportiert und bei 4°C bis zur DNA-Extraktion aufbewahrt.

3.2 Methoden zur Aufreinigung der DNA

3.2.1. DNA-Extraktion aus Patientenmaterialien

Die DNA Extraktion erfolgte mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kits. Als Anhaltspunkt wurde das Spin-Protokoll für Mundschleimhaut-Abstriche verwendet und etwas modifiziert, um die DNA Ausbeute aus den Proben zu erhöhen.

Im Einzelnen wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

- Vortexen der Proben, (Tonsillenabstriche und Zervixabstriche inklusive Cytobrush, anschließend verwerfen der Bürstchen)
- Überführen der Proben in 1,5ml Reaktionsgefäße,
- 1min Zentrifugieren bei 13.000rpm, Überstand abpipettieren
- Herstellung der Verdaulösung: 200µl AL-Puffer, vortexen, hinzugeben von 20µl Proteinase K, vortexen,
- 10min inkubieren bei 56°C im Heizblock
- Kurz anzentrifugieren aufgrund der Kondenswasserentwicklung, beenden des Verdaus mit 200µl Ethanol (100%), vortexen
- Proben auf Spin-Säulen füllen,
- 1min zentrifugieren bei 13.000rpm
- Säule in neues Collecting-Tube überführen, zugeben von 500µl Waschpuffer 1, 1min zentrifugieren bei 13.000rpm
- Säule in neues Collecting-Tube überführen, zugeben von 500µl Waschpuffer 2, 1min zentrifugieren bei 13.000rpm
- Säule in neues Collecting-Tube überführen, bei Tonsillen- und Zervixabstrichen zufügen von 200µl Elutionspuffer (AE-Puffer), bei den Mundspülungen zufügen von 100µl AE-Puffer, 5min inkubieren, abschließend 1min bei 13.000rpm zentrifugieren
- Säulen verwerfen und Eluat in 1,5ml Reaktionsgefäße überführen

Die extrahierte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -7°C gelagert.

3.3 Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) lassen sich Nukleinsäuresequenzen definierter Länge und Basenfolgen aus einem Gemisch von DNA-Molekülen in vitro selektiv vervielfältigen. [46] Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR für qualitative Analysen eingesetzt. Sofern nicht anders angegeben, wurde die PCR gemäß den Literaturangaben durchgeführt. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden umfangreiche Vorkehrungen gemäß Kwok et al. getroffen. [36]

3.3.1 Nested-PCR (A5/A10-A6/A8) zum Nachweis von HPV-DNA genitaler HPV-Typen

Dieses PCR-System wurde zum Screening von HPV Sequenzen in den Probanden-Materialien verwendet. Es ist ein sehr sensitives Assay und weist über 90% aller HPV-Typen und alle relevanten mukotropen HPV-Typen nach [78]. Bei der nested-PCR werden zwei PCRs hintereinander durchgeführt, wobei mit zwei ineinander geschachtelten Primerpaaren gearbeitet wird. Im ersten Schritt erfolgt eine externe PCR. Im zweiten Schritt, der internen PCR, werden die Amplifikate des ersten Reaktionsansatzes, der externen PCR, als Template verwendet.

Die inneren Primer hybridisieren im zweiten Schritt innerhalb der Sequenz, die von den externen Primern flankiert wird. Diese Verknüpfung zweier PCRs ermöglicht nicht nur den Nachweis geringerer Mengen an Ausgangs-DNA als in einfachen PCRs und somit eine höhere Sensitivität, sondern zusätzlich erreicht man mit Hilfe dieser nested-PCR ebenfalls eine höhere Spezifität gegenüber den einzelnen PCRs.

Dies ist dadurch begründet, dass in der zweiten PCR alle falschen, unspezifischen Kopien nicht weiter repliziert werden. Die unspezifischen Amplikons der ersten PCR bieten den inneren Primern nicht ausreichende komplementäre Sequenzen zur Hybridisierung und stehen somit in den folgenden Zyklen nicht mehr als Matrize zur Verfügung [47].

Die PCR wurde gemäß der Literatur [78] durchgeführt. Um homogene Reaktionsansätze zu gewährleisten wurden alle Komponenten für den Reaktionsansatz im PCR-Raum 1 zu einem so genannten Mastermix zusammenpipettiert und sorgfältig vermischt. Im Anschluss erfolgte die Aufteilung auf die einzelnen PCR Reaktionsgefäße. Diese wurden daraufhin aus dem PCR Bereich 1 in den Probenaufbereitungsraum transportiert, wo das zu untersuchende, aufgearbeitete Probenmaterial zu den Reaktionsansätzen hinzugefügt wurde.

Der Ansatz für die externe PCR (A5/A10) hatte ein Reaktionsvolumen von 50µl und setzte sich wie folgt zusammen:

5µl aufgearbeitete DNA
 5µl PCR Puffer (10x)
 1µl dNTP-Mix (10mM)
 0,5µl Primer A5 (100µM)
 0,5µl Primer A10 (100µM)
 0,5µl DNA-Taq-Polymerase (5U/µl)
 37,5µl Ampuwa

Die Endkonzentration der Primer betrug 1µM, die der dNTPs 200µM. Die Reaktionszyklen wurden wie folgt durchgeführt:

Tabelle 7: Reaktionszyklen der externen PCR

Zyklen	Denaturierung (95°C)	Annealing	Synthese (72°C)
1x	3 min		
5x	45 sec	45 sec (50°C)	90 sec
30x	45 sec	45 sec (56°C)	90 sec

Das Produkt der externen PCR mit den Primern A5/A10 besitzt eine Länge von 526bp.

1µl des PCR-Produktes aus der externen PCR wurde zur weiteren Amplifikation wie folgt in der internen PCR (A6/A8) eingesetzt:

1µl externes PCR-Produkt
5µl PCR Puffer (10x)
1µl dNTP-Mix (10mM)
0,5µl Primer A5 (100µM)
0,5µl Primer A10 (100µM)
0,5µl DNA-Taq-Polymerase (5U/µl)
41,5µl Ampuwa

Der interne Backwardprimer war für die spätere Hybridisierung 5´Biotin-markiert. Die Reaktionszyklen der internen PCR (A6/A8) wurden wie folgt durchgeführt:

Tabelle 8: Reaktionszyklen der internen PCR

Zyklen	Denaturierung (95°C)	Annealing (56°C)	Synthese (72°C)
1x	3 min		
35x	45 sec	45 sec	90 sec

Das Produkt nach der internen PCR mit den Primern A6/A8 ist 271bp groß.

3.3.2 Ermittlung der PCR Sensitivität

Zur Ermittlung der Sensitivität der Untersuchungsmethode wurde eine nested-PCR mit einer Verdünnungsreihe mit bekannter Anzahl von HPV-16-Kopien durchgeführt (1,10, 10², 10³,10⁴ Kopien). In der Agarose-Gelelektrophorese war eine Bande ab 10 Kopien erkennbar, was für eine hohe Sensitivität der Untersuchungsmethode spricht.

3.4 PCR zum Nachweis des β -Globin Gens nach Smoller (1997)

Um nachzuweisen, dass die sich in der Agarose-Gelelektrophorese als HPV-negativ erwiesenen Proben ausreichend zelluläre DNA enthielten und keine PCR hemmenden Substanzen beinhalten, wurden Sequenzen aus dem β -Globin-Gen amplifiziert. Proben, in denen sich kein β -Globin-Gen nachweisen lässt, wurden nicht in die statistische Auswertung mit einbezogen. Für Proben, in denen sich kein HPV nachweisen ließ, in denen sich aber nachweislich das β -Globin-Gen befand, galt, dass sie ausreichend DNA-Material für eine Analyse enthielten.

Die Reaktionsansätze für die β -Globin-PCR mit einem Gesamtvolumen von 50 μ l setzten sich wie folgt zusammen:

10 μ l DNA

5 μ l PCR Puffer (10x)

1 μ l dNTP-Mix (10mM)

0,5 μ l Primer PCO4 (100 μ M)

0,5 μ l Primer GH20 (100 μ M)

0,2 μ l DNA-Taq-Polymerase (5U/ μ l)

32,8 μ l Ampuwa

Tabelle 9: Reaktionszyklen β -Globin PCR

Zyklen	Denaturierung (94°C)	Annealing (55°C)	Synthese (72°C)
1x	3 min		
35x	1 min	2 min	3 min
1x			10 min

Das PCR-Produkt der β -Globin PCR besitzt eine Länge von 268bp.

3.5 Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationen

Die Polymerase-Kettenreaktion ist durch ihre extrem hohe Sensitivität besonders empfindlich gegenüber Kontaminationen. Es besteht die Gefahr falsch positiver Ergebnisse durch ein so genanntes „PCR carry over“, welches die Verschleppung von PCR-Produkten aus vorher durchgeführten Versuchen bezeichnet. Um dieses Verschleppen von PCR-Produkten aus positivem Probenmaterial und Positivkontrollen (z.B. HPV-Plasmide) zu verhindern, wurden verschiedene Sicherheitsvorkehrungen getroffen. Besonders hervorzuheben ist die Notwendigkeit einer strikten räumlichen und apparativen Trennung der einzelnen Arbeitsschritte.

PCR-Bereich 1: Ansetzen des PCR Mastermix

PCR-Bereich 2: Extraktion der DNA aus Probandenmaterial, Umsetzen der extrahierten DNA auf die PCR-Reaktionsgefäße, Aufbewahrung und Pipettieren von Positivkontrollen,

PCR-Bereich 3: Durchführung der PCR-Reaktion und Detektion der Amplimere durch Agarose-Gelelektrophorese,

Ein „carry over“ durch Laborkleidung konnte vermieden werden, da für jeden Arbeitsbereich eigene Laborkittel verwendet wurden. Kontaminationen über die Hände wurden durch das regelmäßige Wechseln der Einmalhandschuhe verhindert. Weiterhin wurden prinzipiell gestopfte Pipettenspitzen und Einwegmaterialien verwendet.

3.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde sowohl zum Nachweis des internen PCR-Produktes als auch zum Nachweis des β -Globin Gens verwendet. Für die Herstellung des 2%igen Agarose-Gels wurden 5g Agarose in 250ml 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht, bis die Flüssigkeit völlig klar war. Nach leichtem Abkühlen wurde das Gel in die Gelkammer gegossen wo es erstarrte. 10 μ l des Amplifikationsproduktes wurden mit 2 μ l Gel-Loading-Puffer vermischt und 10 μ l des Gemischs pro Geltasche aufgetragen. Zwischen den Kontrollen und den Patientenproben wurden 5 μ l des 100bp Längenmarkers aufgetragen. Die Laufzeit des Gels betrug bei 150 Volt circa 30 Minuten. Hiernach wurde das Gel für 15 Minuten in ein Ethidiumbromid-Bad eingelegt und im Anschluss unter UV-Licht zur Dokumentation photographiert. Die Proben werden als positiv gewertet, wenn eine eindeutige Bande in Höhe der Positivkontrolle (268bp Betaglobingen/Abbildung 4, 271bp HPV/Abbildung 5) erkennbar ist.

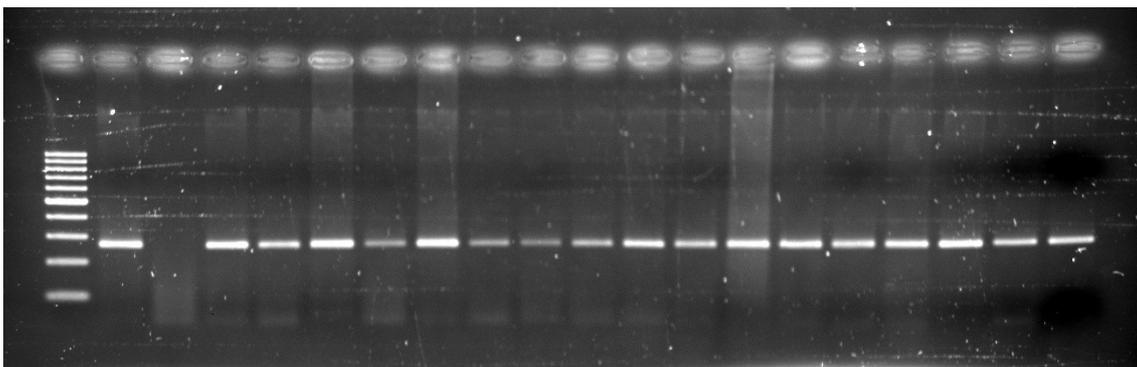


Abbildung 4: Gelelektrophorese nach β -Globin-PCR

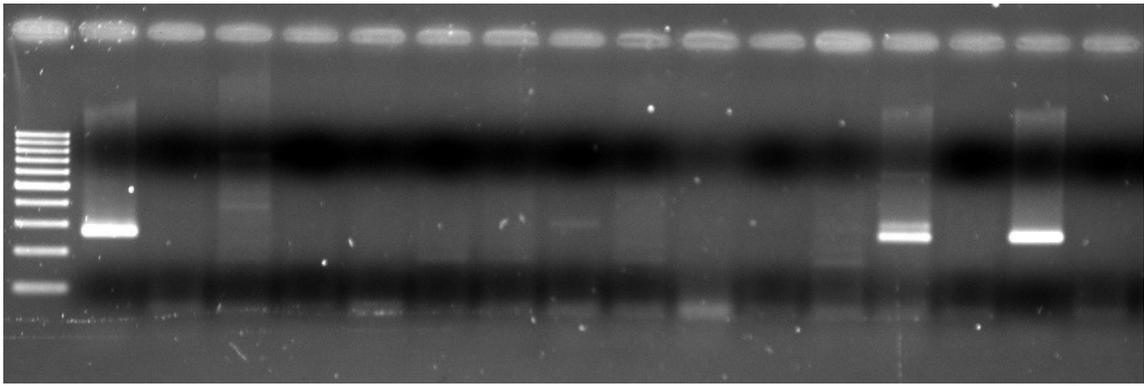


Abbildung 5: Gelelektrophorese nach HPV nested PCR

3.7 HPV-EIA zur HPV-Typisierung

Um festzustellen, welche HPV-Typen bei positivem Nachweis von HPV-DNA vorliegen, wurde ein HPV-EIA (Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest) durchgeführt. Hierfür wurden die aus der nested-PCR hervorgegangenen internen PCR-Produkte verwendet, deren Backwardprimer 5' Biotin-markiert war. Bei positiven Gelelektrophorese-Resultaten erfolgte zuerst eine Differenzierung in High Risk (HR) und Low Risk (LR) HPV-Typen mittels Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten Oligonukleotid-Sonden-Gemischen (14 HR bzw. 6 LR Typen). Im weiteren erfolgte eine genauere Aufschlüsselung mittels Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten Oligonukleotid-Sonden für spezifische HPV-Typen (bei HR-HPV positiven: HPV 16,18,31,33,35; bei LR-HPV positiven: HPV 6,11). Das Biotin-markierte interne PCR-Produkt wird an eine Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte (MTP) gebunden, alkalisch denaturiert, mit Digoxigenin-markierten Oligonukleotid-Sonden hybridisiert, mit einem gegen Digoxigenin gerichteten und mit Alkalischer Phosphatase (AP) konjugierten Antikörper inkubiert. Die Detektion der Hybridisierung erfolgt durch Umsetzung von p-Nitrophenylphosphat durch die AP und photometrische Detektion des Farbumschlages. [64]

Es wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

Capturing der biotinylierten PCR-Produkte

- 50µl SCC 1x/0,5%Tween und 5µl des internen PCR Produktes pro Well der Streptavidin-beschichteten MTP
- Inkubation bei 37°C für 1 Stunde

DNA-Denaturierung

- 3-maliges Waschen mit SCC Puffer
- Zufügen von 100µl NaOH 0,2M pro Well
- 10-minütiges Inkubieren bei Raumtemperatur

Sonden Hybridisierung

- 3-maliges Waschen mit SCC Puffer
- Zugeben von 50µl der Hybridisierungssonden
- Inkubation bei 55°C für eine Stunde

Nachweisreaktion

- 3-maliges Waschen mit SCC Puffer
- Auftragen von 50µl pro Well des verdünnten Anti-Digoxigenin-Ak (10ml SCC Puffer: 1µl Ak= 1:10.000))
- Inkubation bei 37°C für 1 Stunde
- 5 x Waschen mit SCC Puffer
- Zugeben von 100µl pNPP-Substrat, (1mg pNPP/ml 0,2M Tris-HCL)
- Inkubation über Nacht bei 37°C
- Messen der optischen Dichte mit dem Photometer bei 405nm (Referenzfilter 620nm)

Cut-Off-Berechnung:

Cut-Off = 3x mittlere optische Dichte(OD)_{405/620nm} der Reagenzien-Negativkontrollen

Probandenproben:

Positives Testergebnis (Nachweis von HPV in der Probe): OD_{405/620} ≥ Cut-Off

Negatives Testergebnis (fehlender HPV Nachweis): OD_{405/620} < Cut-Off

3.8 Klonierung von DNA-Material

Bei einigen Proben kam es bei der Untersuchung mit Hilfe der nested PCR, anschließender Gelelektrophorese und HPV-EIA zu widersprüchlichen Ergebnissen. Beispielsweise zeigten Proben in der PCR ein positives HPV-Ergebnis, es konnte jedoch kein spezifischer HPV-Typ mit Hilfe der spezifischen Sonden im EIA detektiert werden. Zum einen könnte es sich in diesen Fällen um seltenere HPV-Typen handeln, die sich nicht im Sortiment der Sonden spezifischer HPV-high-risk-Typen befanden, zum anderen könnte in diesen Fällen eine Mischinfektion vorliegen. Aus diesem Grund entschlossen wir uns in diesen Fällen zur Anwendung des Klonierungsverfahrens. Die Durchführung der Klonierung erfolgte im Jean Uhrmacher-Institut für klinische HNO Forschung der Universität zu Köln durch Herrn Dr. rer. nat. C.Hübbers.

Als Klonierung bezeichnet man die Vermehrung eines bestimmten DNA-Fragments in einer Wirtszelle. Die DNA muss hierfür zunächst in einen Vektor (z. B. ein Plasmid) integriert werden. Als Wirtszellen wurden kompetente E.colis verwendet.

3.8.1.Ligation

Bei der Ligation erfolgt die Verbindung des DNA Fragmentes (Insert) mit dem pGEMTEasy Vektor durch die T4-Ligase.

10µl Gesamtansatz

- 1µl Vektor (100ng)
- 2-3µl Insert (PCR-Produkt, 200-300ng)
- 2µl 5 x Puffer
- 1µl T4-Ligase

→ Inkubation über Nacht bei 8°C

3.8.2. Transformation

- 200µl E.coli Auftauen auf Eis und Mischen mit
- 1µl des Ligationsproduktes, 15 minütige Inkubation auf Eis
- 45s bei 42°C ins Wasserbad
- 5min auf Eis
- 60min in SOC Medium
- Ausstreichen auf Agarose-Platte mit Indikator und Ampicillin zusätzlich
- 100 µl LB-Medium, 30µl 2x X-Gal, 10µl IPTG

Es wurden jeweils pro Platte 10 weiße Kolonien gepickt und in LB Medium überführt. Anschließend erfolgte eine DNA-Aufarbeitung (s.u.3.2.1) und eine DNA-Sequenzierung im ZMMK (Zentrum für Molekulare Medizin der Universität zu Köln). Die Analyse der Sequenzierungsergebnisse erfolgte mit Chromas 2.33

3.8.3 Blau-Weiß-Test zur optischen Selektion von E.colis mit klonierten DNA Fragmenten

Zur optischen Selektion der E.coli Stämme auf den Agaroseplatten, welche den gewünschten DNA-Klon enthielten, wurde der so genannte Blau-Weiß-Test verwendet. Er beruht auf der Unterbrechung des β -Galaktosidase (*lacZ*) Gens. Das *lacZ*-Gen ist als Markergen im Vektor enthalten und umrahmt die Insertionstelle für das DNA-Fragment. Bei korrekter Insertion kann das *lacZ* Gen nicht mehr exprimiert werden und somit keine funktionelle β -Galaktosidase gebildet werden. Die Aktivität der β -Galaktosidase kann direkt auf den LB-Platten durch das Substrat X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktosid) nachgewiesen werden, denn dieses Enzym spaltet den farblosen Indikator unter Freisetzung eines blauen Farbstoffes. Bakterien, die ein Plasmid ohne kloniertes DNA Fragment aufgenommen haben, bilden daher auf X-Gal Platten blaue Kolonien. Bei erfolgter Insertion kann X-Gal nicht umgesetzt werden und die Kolonien bleiben weiß.

3.9 Statistische Analyse

Alle statistischen Analysen (deskriptive Statistik, T-Test bei unabhängigen Stichproben, Chi²-Test) wurden mit der Software SPSS 17.0 berechnet. Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ gewählt.

4. Auswertung

4.1. Prävalenz von HPV-Infektionen genital und oral

Zur Analyse standen zunächst die Zervixabstriche von 129 Probandinnen mit einem Altersdurchschnitt von 35 Jahren zur Verfügung. 45,7% der Zervixabstriche zeigten ein HPV positives Ergebnis. Die Probandinnen dieser Gruppe waren im Durchschnitt 32 Jahre alt. Die Rate an oraler HPV Infektionen im vorhandenen Patientinnenkollektiv war deutlich geringer. Hier zeigte sich in 7 Fällen (5,4%) eine HPV Infektion. Der Altersdurchschnitt in diesem Kollektiv betrug 34 Jahre.

Abbildung 6: Prävalenz von HPV Infektionen an der Zervix

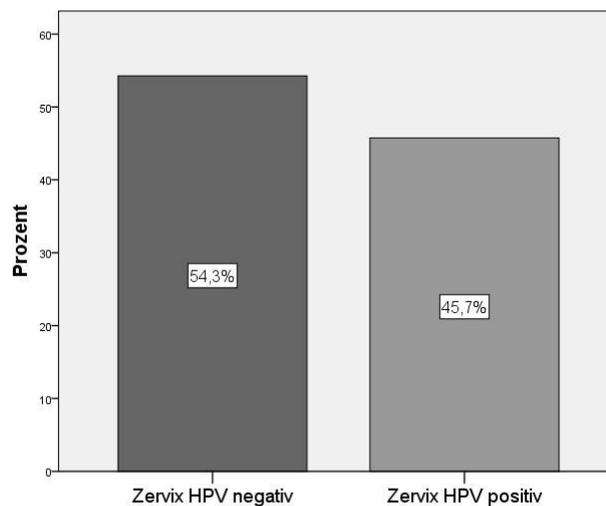
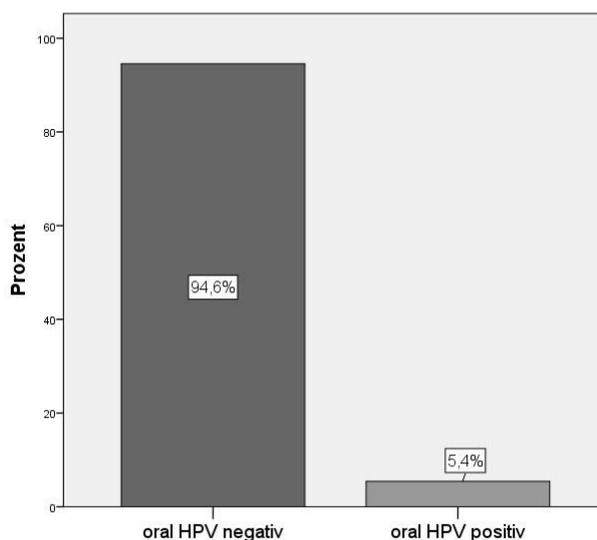


Abbildung 7: Prävalenz von HPV Infektionen im Oropharynx



4.2. Verteilung der Prävalenz von low-risk/high-risk HPV Infektionen genital und oral

In den HPV-positiven Zervixabstrichen konnte in 67,8 % der Fälle ein high-risk HPV-Typ nachgewiesen werden. In 8,5 % konnte in weiteren Versuchen ein HPV-Typ der low-risk Reihe detektiert werden. In 5,1% der Fälle lagen sowohl high-risk als auch low-risk Typen im Untersuchungsmaterial vor. Im Oropharynx fiel die Verteilung der HPV-Subgruppen ausgeglichener aus. Hier überwogen mit 57,1% die low-risk HPV-Typen. Ein Teil der Proben erbrachte nach der HPV-nested-PCR und der Gelelektrophorese ein HPV-positives Ergebnis, in der weiteren Untersuchung mittels HPV-Sonden im EIA konnten diese Proben allerdings keiner HPV-Subgruppe (low/high-risk) zugeteilt werden. Mit den im EIA angewendeten Sonden wurden nur die häufigsten HPV-Typen detektiert. Da in den genannten Proben seltenere Typen vorlagen, welche für unsere Studie nicht relevant erschienen, wurden diese Proben nicht weiter analysiert.

Abbildung 8: Verteilung der HPV Subgruppen an der Zervix

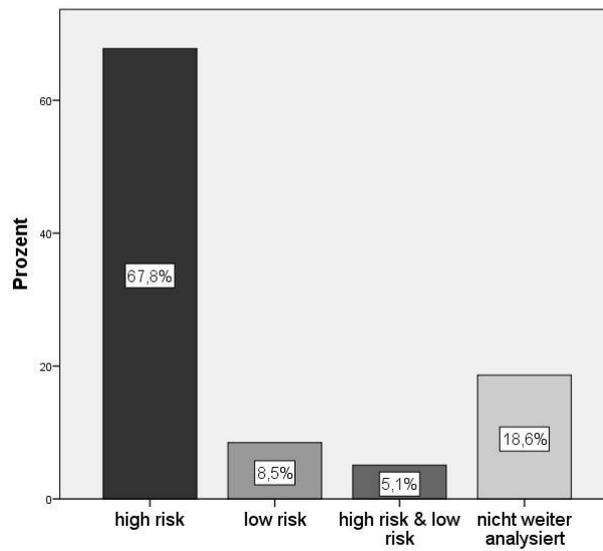
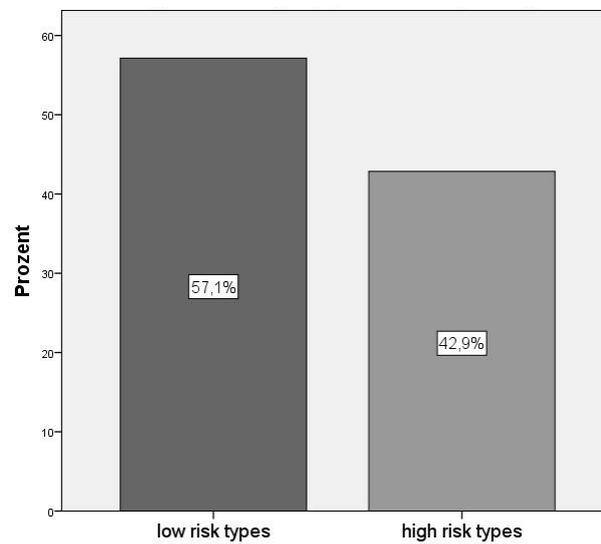


Abbildung 9: Verteilung der HPV Subgruppen im Oropharynx



4.3 Prävalenz verschiedener high-risk HPV-Typen bei genitaler HPV Infektion

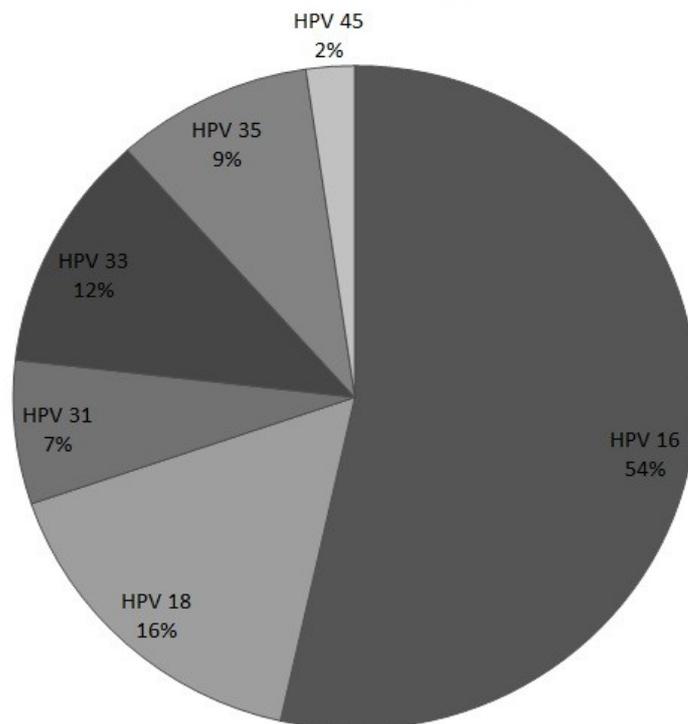
Lag an der Zervix eine Besiedlung mit HPV-Typen der high-risk Subgruppe vor, so war dies in der Mehrzahl der Fälle HPV 16 zu zuschreiben (53,5%). Am zweithäufigsten lag eine Besiedlung mit HPV 18 (16,3%), gefolgt von HPV 33 (11,6%), HPV 35 (9,3%), HPV 31 (7%) und 45 (2,3%) vor. In 7 Fällen (30,4%) gab es eine Mischinfektion mit HPV 16 und 18. In vier weiteren Fällen fanden sich unterschiedliche Mischinfektionen der HPV Typen 31, 33 und 35.

Im Falle einer genitalen HPV low-risk Infektion war in 25% der Fälle HPV 54 nachweisbar.

Tabelle 10: Häufigkeitsverteilung der HPV Typen bei genitaler HPV Infektion

Anzahl	HPV- low-risk Typen	HPV- high-risk Typen
2	54	-
14	-	16
6	-	16;18
1	-	16;18;31;33;35
1	-	31;35
1	-	33;35
1	-	31;33;35
1	-	45

Abbildung 10: Verteilung der HPV high-risk Typen an der Zervix



4.4 Prävalenz einzelner HPV-Typen bei oraler HPV-Infektion

In 5,4% des oralen Probengutes konnte eine HPV-DNA-Infektion nachgewiesen werden. Im Einzelnen entspricht dies zwei HPV-positiven Tonsillen-Abstrichen, sowie 5 positiven Mundspülungen unterschiedlicher Probanden. Es gab keinen Fall, in dem sowohl eine Mundspülung als auch ein Tonsillenabstrich ein positives Ergebnis erbrachte. In den Tonsillen Abstrichen wurde einmal der low-risk HPV-Typ 54 und einmal der high-risk HPV-Typ 52 nachgewiesen.

In den Mundspülungen wurden jeweils einmal die HPV-Typen 18, 54, 56 und zweimal der HPV-Typ 84 nachgewiesen.

Tabelle 11: Häufigkeitsverteilung der HPV-Typen bei oraler HPV-Infektion

HPV-Typ	Tonsillenabstrich (Anzahl = 2)	Mundspülung (Anzahl = 5)
Low-risk	54	54, 2x84
High-risk	52	18, 56

4.5 Koinzidenz genitaler und oraler HPV-Infektionen

Bei 5,2% der Probanden mit genitaler HPV Infektionen bestand auch eine orale HPV-Infektion. Es waren jedoch auch 5,7% der genital HPV-negativen Frauen, oral HPV-positiv. Bei einer genitalen HPV-high-risk-Infektion lag in 2,4% der Fälle ebenfalls eine orale Infektion mit einem high-risk-Typen vor. In keinem der Fälle wurden eine genitale high-risk-Infektion und eine orale low-risk-Infektion nachgewiesen. Bei Vorliegen einer genitalen low-risk-Infektion (n=8) lagen in jeweils 12,5% der Fälle gleichzeitig eine orale low-risk- bzw. high-risk-HPV-Infektion vor. Im Falle der low-risk Infektion handelte es sich um den exakt gleichen HPV-Typen. In diesem Fall konnte sowohl im Zervixabstrich als auch im Tonsillenabstrich der low-risk-HPV-Typ 54 nachgewiesen werden.

4.6 Risikofaktorenanalyse für eine genitale HPV-Infektion

Probandinnen mit einem HPV-positiven Ergebnis im Zervixabstrich unterschieden sich zunächst gegenüber der Gruppe ohne genitale Infektion durch ein signifikant jüngeres Alter ($p=0,025$). Frauen mit positivem Abstrich waren mit 32 Jahren im Durchschnitt 5 Jahre jünger als die Vergleichsgruppe.

Ein anderer Faktor ist die Anzahl der Sexualpartner. Hier gaben die genital HPV positiven Probandinnen mit 8 Partnern im Vergleich zu 4, ebenfalls eine signifikant ($p=0,001$) höhere Anzahl an Sexualpartnern an. Das Alter bei Aufnahme des ersten Geschlechtsverkehrs scheint im untersuchten Patientenkollektiv keine Rolle für das Risiko einer HPV-Infektion zu spielen. In den Lebensgewohnheiten der genital HPV-positiven bzw. negativen Probandinnen zeigten sich aber deutliche Unterschiede. HPV-positive Probandinnen waren signifikant häufiger Raucherinnen ($p < 0,001$) und gaben auch häufiger regelmäßigen Alkoholkonsum an. Der regelmäßige Alkoholkonsum als Risikofaktor ist jedoch bei einem p-Wert von 0,196 nicht als signifikant zu werten.

Vergleicht man nun die Probandinnen, bei denen eine genitale HPV-high-risk-Infektion vorliegt, mit den Probandinnen mit einem positiven Zervixabstrich für low-risk HPV-Typen hinsichtlich der oben genannten Kriterien, so lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen finden.

Tabelle 12: Risikofaktoren für eine genitale HPV-Infektion

	Zervixabstrich HPV-negativ	Zervixabstrich HPV-positiv	p-Wert
Alter der Probandin	37,5	32,6	0,025
Alter bei erstem GV	17,7	17,2	0,454
Anzahl der Sexualpartner	4,55	8,71	0,001
Ausbildungsdauer (J)	14,83	14,69	0,871
Raucher, aktuell	13,4	47,4	<0,001
Raucher, jemals	47,4	75,4	0,001
Alkohol regelmäßig, aktuell	31,3	40,4	0,196
Alkohol regelmäßig, jemals	37,3	47,4	0,172
Oralverkehr	62,7	56,4	0,309
jemals Warzen oder Condylome insgesamt	53,3	36,8	0,054
Warzen, Gesicht	3,3	0	0,261
Handwarzen	18,3	10,5	0,175
Fußwarzen	33,3	28,1	0,339
Condylome, genital	8,3	3,5	0,241
Z.n. auffälligem PAP- Abstrich	16,1	47,4	0,001
Z.n. Zervixdysplasie	3,3	16,4	0,025
regelmäßige Verwendung von Kondomen	20	23,6	0,397
Z.n. Konisation	8,8	3,6	0,155

Tabelle 13: Risikofaktoren für eine genitale HPV-high-risk / low-risk-Infektion

	Zervixabstrich HPV high-risk-positiv	Zervixabstrich HPV low-risk-positiv	p-Wert
Alter der Probandin	31,2	32,4	0,790
Alter bei erstem GV	16,7	16,0	0,482
Anzahl der Sexualpartner	8,8	8,0	0,815
Ausbildungsdauer (J)	14,5	12,6	0,257
Raucher, aktuell	52,2	40,0	0,478
Raucher, jemals	77,5	100,0	0,309
Alkohol regelmäßig, aktuell	47,5	60,0	0,478
Alkohol regelmäßig, jemals	52,5	60,0	0,565
Oralverkehr	52,6	60,0	0,569

4.7 Risikofaktorenanalyse für eine orale HPV-Infektion

Aus den gewonnenen Daten lässt sich kein Risikoprofil für eine orale HPV-Infektion ermitteln. Die Probandinnen mit einer HPV-positiven Mundspülung beziehungsweise einem positiven Tonsillenabstrich unterscheiden sich von denen mit negativen Testergebnissen weder in Alter noch in Sexualgewohnheiten, wie Alter bei erstem Geschlechtsverkehr oder Anzahl der Sexualpartner. Oral HPV-positive Probandinnen gaben mit 80% etwas häufiger an, Oralverkehr zu haben. Dies erwies sich mit einem p-Wert von 0,338 jedoch nicht als signifikant. Außerdem gaben nur knapp 29% der HPV positiven Probandinnen an, jemals in ihrem Leben über mindestens ein Jahr mehr als 10 Zigaretten geraucht zu haben. In der HPV negativen Gruppe waren dies 62% (p=0,090). Aktuell rauchten in beiden Gruppen circa 30%.

Tabelle 14: Risikofaktoren für eine orale HPV Infektion

	Oral HPV negativ	Oral HPV positiv	p-Wert
Alter der Probandin	35,3	34,3	0,827
Alter bei erstem GV	17,5	16,4	0,493
Anzahl der Sexualpartner	6,4	5,6	0,786
Ausbildungsdauer (J)	14,8	15,4	0,768
Raucher, aktuell	30,5	28,6	0,640
Raucher, jemals	61,9	28,6	0,090
Alkohol regelmäßig, aktuell	35,6	42,9	0,492
Alkohol regelmäßig, jemals	42,4	42,9	0,636
Oralverkehr	59,5	80,0	0,338
jemals Warzen oder Condylome insgesamt	45,1	60,0	0,420
Warzen im Kopfbereich	1,8	0	0,917
Handwarzen	14,2	20,0	0,547
Fußwarzen	31,9	20,0	0,498
Condylome, genital	4,4	40,0	0,028
Z.n. auffälligem PAP-Abstrich	30,1	50,0	0,557
Z.n. Zervixdysplasie	9,1	33,3	0,147
regelmäßige Verwendung von Kondomen	21,7	16,7	0,618
Z.n. Konisation	5,9	14,3	0,553

Bei der Risikofaktorenanalyse zwischen der oral high-risk positiven Gruppe und der oral low-risk positiven Gruppe zeigen sich weder ein statistisch signifikanter Unterschied in Alter oder Sexualgewohnheiten noch in Lebensgewohnheiten wie dem Konsum von Nikotin und Alkohol.

Tabelle 15: Risikofaktoren für eine orale HPV high-risk-/ low-risk-Infektion

	Oral HPV high-risk positiv	Oral HPV low-risk positiv	p-Wert
Alter der Probandin	29,3	38,0	0,316
Alter bei erstem GV	15,5	17,0	0,509
Anzahl der Sexualpartner	5,0	6,0	0,495
Ausbildungsdauer (J)	11,0	18,3	0,146
Raucher, aktuell	33,0	25,0	0,714
Raucher, jemals	33,0	25,0	0,714
Alkohol regelmäßig, aktuell	33,3	50,5	0,629
Alkohol regelmäßig, jemals	33,3	50,5	0,629
Oralverkehr	100	66,7	0,600

4.8 Analyse der Probandenpaare

Zur Verfügung standen uns die Abstriche von 15 Paaren. Nahezu 33% der Zervixabstriche waren HPV positiv. Davon waren 80% high-risk HPV positiv. In einem Fall lag eine Einfachinfektion mit HPV 16 vor, in den übrigen lagen Mischinfektionen der Zervix vor; in einem Fall mit HPV 16/18, in einem weiteren Fall mit HPV 16/18/31/33/35. Es lag außerdem eine Mischinfektion mit low-risk und high-risk Typen vor, die nicht weiter analysiert wurde. Bei den insgesamt 30 Probanden/innen war in keinem Fall eine orale HPV-Infektion nachweisbar.

Tabelle 15: Risikofaktorenanalyse der Probandenpaare

	Frauen	Männer	p-Wert
Alter	33,1	34,1	0,782
Alter bei erstem GV	19,1	17,7	0,647
Anzahl der Sexualpartner	5,2	10,1	0,287
Ausbildungsdauer (J)	14,2	15,9	0,315
Raucher, aktuell	21,4	28,6	0,500
Raucher, jemals	42,9	50,0	0,500
Alkohol regelmäßig, aktuell	42,9	50,0	0,500
Alkohol regelmäßig, jemals	42,9	57,1	0,353
Oralverkehr	81,8	81,8	0,707

5. Diskussion

Im Jahre 1983 wurde zum ersten Mal eine Verbindung zwischen Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich und HPV vermutet, da erstmalig HPV-typische morphologische Veränderungen (Koilozyten) in diesen Tumoren nachgewiesen werden konnten. [68] Die Angaben über die Häufigkeit von HPV in Kopf-Hals-Karzinomen schwanken stark [62, 65]. Im Jahre 1998 konnte in einer Metaanalyse gezeigt werden [42], dass in 34,5% der Kopf-Hals-Karzinome unterschiedlicher Lokalisationen HPV nachgewiesen werden konnte. Klusmann et al. konnten bestätigen, dass nahezu 1/5 der auftretenden Kopf-Hals-Karzinome onkogene HPV enthalten. Es zeigte sich ebenfalls, dass der Anteil der HPV-positiven Karzinome abhängig von der Tumorlokalisierung ist. Ungefähr 92% der von Klusmann et al. nachgewiesenen HPV-positiven Kopf-Hals-Karzinome befanden sich im Oropharynx. Ein besonders hoher Anteil HPV-positiver Karzinome konnte in mehreren Studien für das Tonsillenkarzinom gezeigt werden. Der Anteil der high-risk HPV-positiven Tonsillenkarzinome schwankt zwischen 34% [58] und 64% [80]. Fasst man mehrere Studien zusammen, in denen Tonsillenkarzinome innerhalb der Oropharynxkarzinome abgegrenzt wurden, findet sich in 53% der Fälle HPV DNA. [62, 74]

Als Ursache für die besondere Anfälligkeit der Tonsillenregion gegenüber einer HPV-Infektion wird die besondere Beschaffenheit der Tonsillenkrypten angesehen. In der Kryptentiefe befindet sich nicht - wie in der sonstigen Oropharynx- und Mundschleimhaut - mehrschichtiges Plattenepithel, sondern teilweise nur eine einschichtige epitheliale Auskleidung entsprechend der Basalzellschicht. Hier zeigt sich zusätzlich eine geringere Differenzierung des Epithels [44]. Da der HPV-Replikationszyklus streng von der Zelldifferenzierung abhängt und HPV primär nur die Basalzellschicht infizieren kann, scheint eine höhere Permissivität des Kryptenepithels für HPV plausibel [33]. Dies würde möglicherweise der Transformationszone entsprechen, von der die Zervixkarzinome in der Regel entstehen sollen [25]. Zusätzlich wäre in der Tiefe der Tonsillenkrypten eine geringere Virusclearance denkbar. Für das Zervixkarzinom und seine Vorstufen ist eine Beteiligung von HPV schon lange

bekannt. HPV-DNA ist in fast 100% der Zervixkarzinome nachweisbar [73]. Über die Übertragungswege des Virus ist bisher wenig bekannt. Für das Zervixkarzinom wird eine Übertragung von HPV durch Geschlechtsverkehr angenommen. Unklar ist jedoch, wie es zu einer oralen HPV Infektion kommt. In der vorliegenden Studie untersuchten wir die Möglichkeit einer genital-oralen Übertragung von HPV durch sexuellen Kontakt. Zusätzlich sollten mittels eines Fragebogens Risikofaktoren für eine genitale beziehungsweise orale HPV Infektion ermittelt werden. Es wurde untersucht, ob eine genitale HPV-Infektion einen Risikofaktor für eine orale HPV-Infektion der Probandin selbst oder des aktuellen Sexualpartners darstellt. Zum Nachweis einer oralen HPV-Infektion wurde in der vorliegenden Studie mit einem Cytobrush Abstrich-Material von den Tonsillen gewonnen. Zusätzlich führten die Probanden/innen eine Mundspülung durch. In einer Studie aus dem Jahre 2002 wurde die Ausbeute von DNA-Material für anschließende PCRs zwischen Cytobrush-Abstrichen von der Wangeninnenseite mit Mundspülungen verglichen [29]. Es zeigten sich etwas größere DNA-Mengen bei den Mundspülungen. Ebenso waren hier längere DNA-Fragmente nachzuweisen. Es gab jedoch keinen statistisch signifikanten Unterschied bezüglich der DNA-Ausbeute. Beide Methoden erzielten ein für die folgenden PCR-Untersuchungen ausreichendes Material. Eine weitere Studie aus den USA bestätigte diese Ergebnisse. Auch hier konnte sowohl für Abstriche der Wangenschleimhaut als auch für Mundspülungen eine für PCR-Untersuchungen ausreichende DNA-Qualität gezeigt werden [15]. Die Qualität des Probengutes, beziehungsweise die ausreichende DNA-Menge, wurde in der vorliegenden Studie mittels Amplifikation des Beta-Globin-Gens bestätigt. Es gab keine Probe, die aufgrund unzureichender DNA-Menge, beziehungsweise eines nicht amplifizierten Beta-Globin-Gens, aus der Studie ausgeschlossen werden musste.

In der vorliegenden Studie wurde bei 45,7% der Probandinnen eine genitale HPV-Infektion nachgewiesen. Da die Patientinnen zum Teil aus einem Risikokollektiv stammten (Patientinnen der Dysplasiesprechstunde der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Uniklinik Köln) ist das Vorkommen von 45,7% genital HPV-positiven Probandinnen nicht mit einem Normalkollektiv gleichzusetzen. Bei Kontrollen der Zervix sind bei gesunden Patientinnen ohne Dysplasien oder Karzinome in bis zu 20% high-risk-HPV

nachweisbar. [5] Die meisten dieser Infektionen sind passager und gehen nicht in eine persistierende Infektion über. Eine orale HPV-Infektion ließ sich in dieser Studie trotz hoher Rate an genital HPV-positiven Probandinnen deutlich seltener, nämlich nur in 5,4% der Fälle (7/129) nachweisen. Beide Gruppen, sowohl die genital HPV-positiven Probandinnen als auch die oral HPV-positiven, zeigten ein vergleichbares Durchschnittsalter (genital positiv 35 Jahre vs. oral positiv 34 Jahre). Unsere Beobachtungen bestätigen die Ergebnisse einer im Jahre 2001 veröffentlichten Studie mit 268 Teilnehmern. In dieser Studie konnte bei 6,0% der Teilnehmer HPV-DNA in der Mundhöhle nachgewiesen werden [67]. Smith et al. konnten bei einer genitalen Infektionsrate von 29% ebenfalls eine deutlich geringere Nachweisbarkeit einer oralen HPV Infektion mit 2,4% zeigen [61]. Insgesamt scheint die Inzidenz der Infektion des Oropharynx mit onkogenen HPV deutlich niedriger zu sein als die im Anogenitaltrakt. Die orale HPV-Infektion war nicht, wie eventuell zu erwarten gewesen wäre, häufiger bei genital positiven Probandinnen nachweisbar. In der Gruppe der genital HPV-positiven Probandinnen war nur in 5,2% auch ein oraler HPV-Nachweis möglich. Bei Probandinnen, die genital keinen Nachweis von HPV zeigten, war der HPV-Nachweis oral in 5,7% positiv. Nur in 2,4% der Fälle lag sowohl genital als auch oral eine high-risk HPV-Infektion vor. Interessanterweise gelang nur in einem einzigen Fall sowohl genital als auch oral der Nachweis des identischen HPV Typs. In diesem Fall handelte es sich bei der oralen Probe um einen Tonsillenabstrich. Oral und genital konnte bei dieser Probandin der low-risk HPV Typ 54 nachgewiesen werden. Auch Smith et al. konnten in ihrer Studie keinen signifikanten Zusammenhang zwischen genitaler und oraler HPV-Infektion nachweisen [61]. Nur in 1% der Fälle war eine simultane Infektion von Zervix und Mundhöhle nachweisbar. In keinem der Fälle war in beiden Schleimhautregionen der gleiche HPV-Typ nachweisbar gewesen. Ein möglicher Erklärungsansatz für dieses Phänomen wären voneinander unabhängige, unterschiedliche Clearing-Möglichkeiten für die virale Infektion in den verschiedenen Schleimhautregionen. Genital konnten wir mit 67,8% deutlich häufiger high-risk als low-risk HPV-Typen nachweisen. Am häufigsten war dies HPV 16 (54%), gefolgt von HPV 18 (16%). Dies entspricht dem Bild der Zervixkarzinom verursachenden HPV-Typen. HPV 16 gilt als häufigster Zervixkarzinom verursachender HPV-Typ. Ca. 10-15% der Zervixkarzinome

werden durch HPV 18 hervorgerufen [5]. Oral überwog der Nachweis von low-risk HPV-Typen (54%). Dies steht im Widerspruch dazu, dass beim Oropharynxkarzinom ähnlich wie bei den Zervixkarzinomen HPV 16 der am häufigsten nachgewiesene Typ ist [17, 34, 54]. Seltener wurden HPV 18 und 33 nachgewiesen. In anderen Studien wurden in 56,2% der oral HPV-positiven Fälle high-risk HPV-Typen gefunden [67]. Bei fast einem Drittel (30,4%) der genital HPV-positiven Probandinnen war in unserer Studie an der Zervix eine Mischinfektion mehrerer HPV-Typen nachweisbar. Am häufigsten zeigte sich eine Mischinfektion mit HPV 16 und 18. Im Gegensatz hierzu lag bei den oralen HPV Infektionen jeweils nur ein singulärer HPV-Typ vor. Im Einzelnen gelang in den Mundspülungen 5-mal der HPV-Nachweis. In den Tonsillenabstrichen jedoch nur 2-mal. Allerdings war bei keiner Probandin sowohl der Tonsillenabstrich als auch die Mundspülung positiv für HPV. Vergleichbare Ergebnisse erzielte eine Studie, bei der 3 verschiedene Methoden zum oralen HPV-Nachweis getestet wurden. [37] Verglichen wurden Mundspülungen, Mukosa-Abstriche von 3 verschiedenen Regionen und Schleimhautbiopsien. In dieser Studie erbrachte die Mundspülung die meisten positiven Ergebnisse. Die wenigsten HPV-Nachweise erfolgten durch Biopsien. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied in der HPV-Detektionsrate zwischen Mundspülungen und Schleimhautabstrichen. Jede der beiden Methoden erfasste einzelne Infektionen, welche durch die andere Methode nicht erfasst wurden. Innerhalb der drei untersuchten Schleimhautregionen gab es keinen signifikanten Unterschied in der Häufigkeit einer HPV-Infektion. In 25% der Fälle konnte eine HPV-Infektion nur in einer der drei Schleimhautregionen nachgewiesen werden. Lediglich in 4% erbrachten alle drei Regionen ein HPV-positives Ergebnis. Wie bereits in anderen Studien gezeigt werden konnte, so konnten auch wir bestätigen, dass eine steigende Anzahl der Sexualpartner das Risiko einer genitalen HPV-Infektion signifikant erhöht. Ebenso scheint der Konsum von Tabak und Alkohol dieses Risiko zu steigern. Probandinnen mit einer genitalen HPV-Infektion waren im Durchschnitt 5 Jahre jünger als die Probandinnen mit einem HPV-negativen Zervixabstrich. Bekanntermaßen sind viele Krebserkrankungen mit einem bestimmten Sozialstatus assoziiert. Dies liegt zum einen an den jeweiligen, dem Sozialstatus entsprechenden Lebensgewohnheiten sowie an unterschiedlichen Zugangsmöglichkeiten zum

Gesundheitssystem. Für die Zervixkarzinom-Vorsorge hat sich gezeigt, dass sie insbesondere von jüngeren Frauen mit höherem Sozialstatus in Anspruch genommen wird [26]. Dies kann durch Früherkennung von Karzinomvorstufen zu einer Abnahme der Zervixkarzinom-Inzidenz in dieser Bevölkerungsgruppe führen. Wir konnten allerdings keinen Unterschied für das Risiko einer HPV-Infektion in Abhängigkeit vom Bildungsniveau belegen. Als möglicher Übertragungsweg einer genitalen HPV-Infektion in die Mundhöhle wurde die Ausübung von Oralverkehr vermutet. Oral HPV-positive Probandinnen gaben im Fragebogen etwas häufiger die Ausübung von Oralverkehr an. Dies erwies sich jedoch nicht als statistisch signifikant ($p=0,338$). Entgegen den Erwartungen gaben oral HPV negative Probandinnen mit 62% deutlich häufiger an (29% bei oral HPV positiven Probandinnen), regelmäßig zu rauchen. Somit scheint eine Vorschädigung des Gewebes durch regelmäßigen Nikotinabusus keinen Risikofaktor für eine orale HPV-Infektion darzustellen.

Um die Möglichkeit einer sexuellen Übertragung von humanen Papillomaviren weiter abzuklären, wurden Paare hinsichtlich des Vorhandenseins einer HPV-Infektion und etwaiger Risikofaktoren untersucht und befragt. In der Paaranalyse waren 33,3% der Zervixabstriche der weiblichen Probandinnen HPV-positiv. Hiervon waren 80% sogar HPV high-risk positiv. Trotzdem gelang uns bei den 15 zur Verfügung stehenden Paaren in keinem der Fälle der Nachweis einer oralen HPV-Infektion. Es wurden allerdings für diese Studie keine genitalen Proben der männlichen Partner gewonnen. Es ist daher nicht ausgeschlossen, dass Männer genital infiziert waren und dass dies das Reservoir für die virale Infektion der Partnerin war. Smith et al. [61] haben bei 4 von 68 (5,9%) aktuellen männlichen Partnern eine HPV-Infektion oral nachgewiesen. Von diesen 5,9% hatte keiner der Männer eine Partnerin mit einer aktuellen genitalen oder oralen HPV-Infektion. Hippelainen et al. fanden, dass genitale HPV-Infektionen, welche bei Paaren nachgewiesen werden konnten, nur in 5,6% der Fälle von denselben HPV-Typen ausgingen [23]. Diese Studie schlug einen vorausgegangenen sexuellen Kontakt als Ursache der aktuell nachgewiesenen Infektion vor. Eine andere Hypothese ist, dass die Infektion bei einem der Partner durch immunologische Vorgänge beseitigt worden ist. Sowohl die vorliegende Untersuchung als auch die Ergebnisse

einiger früher durchgeführter Studien legen einen fehlenden kausalen Zusammenhang zwischen genitaler und oraler HPV-Infektion nahe. Das fehlende simultane Auftreten von HPV-Positivität und gleichen HPV-Typen zwischen Zervix und Mundhöhle lässt eine genital-orale Selbstinfektion unwahrscheinlich erscheinen. Auch in anderen Studien schien die Infektionsquelle nicht der oral/genitale Kontakt zum aktuellen männlichen Partner zu sein, da keine Konkordanz zwischen den Partnern nachzuweisen war. Die Ergebnisse lassen eher andere Übertragungswege wahrscheinlich erscheinen, beziehungsweise eine unterschiedliche Anfälligkeit für eine HPV-Infektion oral oder genital. Es ist unklar, ob die orale Schleimhaut Eigenschaften besitzt, die sie vor einer persistierenden viralen Infektion schützen. Es hat sich gezeigt, dass Speichel durch gewisse antimikrobielle Bestandteile wie Lysozym, Lactoferrin, IgA und Zytokine eine protektive Wirkung gegenüber Infektionen hat. Ob diese Faktoren vor einer persistierenden HPV-Infektion schützen, ist unklar. Zusätzlich könnte der höhere Grad an Verhornung, welcher die Mundschleimhaut charakterisiert, zur höheren Unempfindlichkeit gegenüber der Virusinvasion beitragen. Der fehlende Zusammenhang zwischen genitalen HPV-Typen und oraler HPV-Infektion bei Frauen und ihren aktuellen Partnern macht deutlich, dass viele Faktoren, die den Übertragungsweg und die Infektiösität von HPV beeinflussen, noch ungeklärt sind. Resümierend sind die Ergebnisse der vorliegenden Studie insbesondere aufgrund der geringen Fallzahl jedoch vorsichtig zu interpretieren. Daher sind weitergehende Untersuchungen sinnvoll, um detailliertere Erkenntnisse zu den Übertragungswegen einer HPV-Infektion zu erhalten. Aufgrund der deutlich niedrigeren Inzidenz einer oralen HPV-Infektion im Vergleich zu einer genitalen HPV-Infektion ist für eine Zunahme der Aussagekraft ein größeres Probandenkollektiv von Nöten. Insbesondere sollte bei der geringen Inzidenz einer oralen HPV-Infektion eine größere Anzahl von Paaranalysen durchgeführt werden. Die zusätzliche Untersuchung genitaler Proben der männlichen Probanden ist zu empfehlen. Um Auskunft über den Verlauf einer HPV-Infektion zu erlangen, wären Kontrolluntersuchungen des HPV-Status sinnvoll. Sie könnten gegebenenfalls Aufschluss über die Möglichkeiten der Virusclearance geben. Des Weiteren bleibt zu klären, aus welchem Grund bei drei vorhandenen oralen Proben (je 2 Tonsillenabstrichen und einer Mundspülung)

jeweils nur eine der Proben ein HPV positives Ergebnis erbrachte, obwohl nachgewiesenermaßen alle Proben eine zur Analyse ausreichende DNA Menge enthielten. Eine Ursache für den fehlenden Nachweis tonsillärer HPV-Infektionen, könnte sein, dass sich die Viren tief in den Tonsillenkrypten befinden und durch den Cytobrush-Abstrich nicht erreicht werden. Da dieser teilweise von den Probanden/innen als sehr unangenehm empfunden wird, kann es sein, dass lediglich DNA-Material von der Tonsillenoberfläche gewonnen und somit eine vorhandene Infektion nicht erfasst wurde.

6. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Zusammenhang zwischen genitaler und oraler HPV-Infektion zu untersuchen. Es sollte untersucht werden, ob eine vorhandene genitale HPV-Infektion einen Risikofaktor für eine orale HPV-Infektion darstellt. Zusätzlich sollten Risikofaktoren für eine genitale beziehungsweise eine orale HPV-Infektion ermittelt werden. Hierfür wurden über einen Zeitraum von 16 Monaten Proben von insgesamt 140 Probanden/innen gesammelt. Das Probenmaterial umfasste jeweils zwei Tonsillenabstriche, eine Mundspülung, sowie bei den Probandinnen zusätzlich einen Zervixabstrich. Aus dem Probenmaterial erfolgte eine DNA-Extraktion mit Hilfe eines standardisierten Kits (Quiagen), eine nested-PCR zur Vervielfachung der DNA-Menge sowie eine Detektion der HPV Typen mittels EIA (Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest). Einige Proben, die mit der EIA-Methode nicht zufriedenstellend untersucht werden konnten, wurden einem Klonierungsverfahren unterzogen. Während bei 45,7% der Probandinnen (n=129) eine genitale HPV-Infektion nachgewiesen werden konnte, zeigte sich lediglich in 5,4% der Fälle eine orale HPV-Infektion. Orale HPV-Infektionen waren bei genital HPV-positiven Probandinnen nicht signifikant häufiger nachweisbar als bei genital HPV-negativen Probandinnen. In den Fällen mit simultaner HPV-Infektion war in einem Fall, sowohl genital als auch oral derselbe HPV-Typ (low-risk HPV Typ 54) nachweisbar. Obwohl bei den untersuchten 15 Paaren 5 (33.3%) Probandinnen genital HPV-positiv waren, war in keinem Fall eine orale HPV-Infektion nachweisbar. Es bleibt weiterhin unklar, auf welchem Wege es zu einer oralen-HPV Infektion kommt und ob Sexualpraktiken, wie z.B. das Ausüben von Oralverkehr, hierbei eine Rolle spielen. In der vorliegenden Studie konnten wir für Probandinnen mit einer bestehenden genitalen HPV-Infektion kein erhöhtes Risiko für das simultane Auftreten einer oralen HPV-Infektion nachweisen. Ebenso konnte nicht bestätigt werden, dass für den Sexualpartner einer genital HPV-positiven Probandin ein erhöhtes Risiko für eine orale HPV-Infektion besteht. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass andere bisher nicht bekannte Faktoren die Virusübertragung beeinflussen.

7. Literaturverzeichnis

1. Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland in Zusammenarbeit mit dem Robert-Koch Institut (Hrsg.): Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends. 6. überarbeitete Auflage. 2011.
2. Andl T, Kahn T, Pfuhl A, Nicola T, Erber R, Conradt C, Klein W, Helbig M, Dietz A, Weidauer H, Bosch FX. Etiological involvement of oncogenic human papillomavirus in tonsillar squamous cell carcinomas lacking retinoblastoma cell cycle control. *Cancer Res* 1998;58(1):5-13.
3. Berrino F, Gatta G. Variation in survival of patients with head and neck cancer in Europe by the site of origin of the tumours. *Eur J Cancer* 1998;34(14):2154-2161.
4. Bootz F. [Oncology of the head and neck area]. *Laryngorhinootologie* 2000;79(6):350-365.
5. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002;55(4):244-265.
6. Brandsma JL, Abramson AL. Association of papillomavirus with cancers of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1989;115(5):621-625.
7. Castle PE, Wacholder S, Lorincz AT, Scott DR, Sherman ME, Glass AG, Rush BB, Schussler JE, Schiffman M. A prospective study of high-grade cervical neoplasia risk among human papillomavirus-infected women. *J Natl Cancer Inst* 2002;94(18):1406-1414.
8. Cullen AP, Reid R, Champion M, Lorincz AT. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J Virol* 1991;65(2):606-612.
9. D'Souza G. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. 2007.
10. DeVita V, Hellmann S, Rosenberg S. *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 2011.
11. Fischer U, Raptis G, Gessner W, Roschlau U, Dressel K, Bilek K, Horn LC. [Epidemiology and pathogenesis of cervical cancer]. *Zentralbl Gynakol* 2001;123(4):198-205.

12. Franceschi S, Munoz N, Bosch XF, Snijders PJ, Walboomers JM. Human papillomavirus and cancers of the upper aerodigestive tract: a review of epidemiological and experimental evidence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996;5(7):567-575.
13. Frisch M, Biggar RJ. Aetiological parallel between tonsillar and anogenital squamous-cell carcinomas. *Lancet* 1999;354(9188):1442-1443.
14. Frisch M, Hjalgrim H, Jaeger AB, Biggar RJ. Changing patterns of tonsillar squamous cell carcinoma in the United States. *Cancer Causes Control* 2000;11(6):489-495.
15. Garcia-Closas M, Egan KM, Abruzzo J, Newcomb PA, Titus-Ernstoff L, Franklin T, Bender PK, Beck JC, Le ML, Lum A, Alavanja M, Hayes RB, Rutter J, Buetow K, Brinton LA, Rothman N. Collection of genomic DNA from adults in epidemiological studies by buccal cytobrush and mouthwash. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10(6):687-696.
16. Gillison ML. Human papillomavirus-associated head and neck cancer is a distinct epidemiologic, clinical, and molecular entity. *Semin Oncol* 2004;31(6):744-754.
17. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zahurak ML, Daniel RW, Viglione M, Symer DE, Shah KV, Sidransky D. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(9):709-720.
18. Gillison ML, Koch WM, Shah KV. Human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma: are some head and neck cancers a sexually transmitted disease? *Curr Opin Oncol* 1999;11(3):191-199.
19. Guay ME, Lavertu P. Tonsillar carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1995;252(5):259-264.
20. Harris MO, Beck JC, Lancaster W, Gregoire L, Carey TE, Bradford CR. The HPV 6 E6/E7 transforming genes are expressed in inverted papilloma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1998;118(3 Pt 1):312-318.
21. Hemminki K, Dong C, Frisch M. Tonsillar and other upper aerodigestive tract cancers among cervical cancer patients and their husbands. *Eur J Cancer Prev* 2000;9(6):433-437.
22. Hernandez BY, Wilkens LR, Zhu X, Thompson P, McDuffie K, Shvetsov YB, Kamemoto LE, Killeen J, Ning L, Goodman MT. Transmission of human papillomavirus in heterosexual couples. *Emerg Infect Dis* 2008;14(6):888-894.

23. Hippelainen MI, Yliskoski M, Syrjanen S, Saastamoinen J, Hippelainen M, Saarikoski S, Syrjanen K. Low concordance of genital human papillomavirus (HPV) lesions and viral types in HPV-infected women and their male sexual partners. *Sex Transm Dis* 1994;21(2):76-82.
24. Howley PM, Knipe DM, Griffin DE. *Fields Virology*. 5, 2299-2340. 2006.
25. Jastreboff AM, Cymet T. Role of the human papilloma virus in the development of cervical intraepithelial neoplasia and malignancy. *Postgrad Med J* 2002;78(918):225-228.
26. Kahl H, Holling H, Kamtsiuris P. [Utilization of health screening studies and measures for health promotion]. *Gesundheitswesen* 1999;61 Spec No:S163-S168.
27. Kalantari M, Blennow E, Hagmar B, Johansson B. Physical state of HPV16 and chromosomal mapping of the integrated form in cervical carcinomas. *Diagn Mol Pathol* 2001;10(1):46-54.
28. Kiechle M, Paepke S. *Gynäkologie und Geburtshilfe*. 511-518. 2007. Elsevier, Urban&Fischer.
29. King IB, Satia-Abouta J, Thornquist MD, Bigler J, Patterson RE, Kristal AR, Shattuck AL, Potter JD, White E. Buccal cell DNA yield, quality, and collection costs: comparison of methods for large-scale studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11(10 Pt 1):1130-1133.
30. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, Dallenbach-Hellweg G, Schmidt D, von Knebel DM. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 2001;92(2):276-284.
31. Klingelhutz AJ, Foster SA, McDougall JK. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* 1996;380(6569):79-82.
32. Klussmann JP, Gultekin E, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Dienes HP, Eckel HE, Pfister HJ, Fuchs PG. Expression of p16 protein identifies a distinct entity of tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus. *Am J Pathol* 2003;162(3):747-753.
33. Klussmann JP, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Eckel HE, Pfister HJ, Fuchs PG. Human papillomavirus-positive tonsillar carcinomas: a different tumor entity? *Med Microbiol Immunol* 2003;192(3):129-132.
34. Klussmann JP, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Kolligs J, Jungehuelsing M, Eckel HE, Dienes HP, Pfister HJ, Fuchs PG. Prevalence, distribution, and viral load of human papillomavirus 16 DNA in tonsillar carcinomas. *Cancer* 2001;92(11):2875-2884.

35. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14(2):467-475.
36. Kwok S, Sninsky JJ, White TJ, Gelfand DH. *PCR-Protocols - A Guide to Methods and Applications*. Academic Press 1990;142-145.
37. Lawton G, Thomas S, Schonrock J, Monsour F, Frazer I. Human papillomaviruses in normal oral mucosa: a comparison of methods for sample collection. *J Oral Pathol Med* 1992;21(6):265-269.
38. Lindel K, Beer KT, Laissue J, Greiner RH, Aebersold DM. Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx: a radiosensitive subgroup of head and neck carcinoma. *Cancer* 2001;92(4):805-813.
39. Maier H, Fischer G, Sennewald E, Heller WD. [Occupational risk factors for pharyngeal cancer. Results of the Heidelberg Pharyngeal Cancer Study]. *HNO* 1994;42(9):530-540.
40. Maier H, Sennewald E, Heller GF, Weidauer H. Chronic alcohol consumption--the key risk factor for pharyngeal cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1994;110(2):168-173.
41. Mantovani F, Banks L. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* 2001;20(54):7874-7887.
42. McKaig RG, Baric RS, Olshan AF. Human papillomavirus and head and neck cancer: epidemiology and molecular biology. *Head Neck* 1998;20(3):250-265.
43. Mellin H, Friesland S, Lewensohn R, Dalianis T, Munck-Wikland E. Human papillomavirus (HPV) DNA in tonsillar cancer: clinical correlates, risk of relapse, and survival. *Int J Cancer* 2000;89(3):300-304.
44. Mischke D, Genka T, Wille G, Lobeck H, Wild AG. Keratins as molecular markers of epithelial differentiation: differential expression in crypt epithelium of human palatine tonsils. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1991;100(5 Pt 1):372-377.
45. Mork J, Lie AK, Glattre E, Hallmans G, Jellum E, Koskela P, Moller B, Pukkala E, Schiller JT, Youngman L, Lehtinen M, Dillner J. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2001;344(15):1125-1131.
46. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 1990;262(4):56-5.
47. Newton C, Graham A. *PCR*. 19-65. 1994. Spektrum Akademischer Verlag.

48. Niedobitek G, Pitteroff S, Herbst H, Shepherd P, Finn T, Anagnostopoulos I, Stein H. Detection of human papillomavirus type 16 DNA in carcinomas of the palatine tonsil. *J Clin Pathol* 1990;43(11):918-921.
49. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999;80(6):827-841.
50. Paz IB, Cook N, Odom-Maryon T, Xie Y, Wilczynski SP. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. An association of HPV 16 with squamous cell carcinoma of Waldeyer's tonsillar ring. *Cancer* 1997;79(3):595-604.
51. Peltenburg LT. Radiosensitivity of tumor cells. Oncogenes and apoptosis. *Q J Nucl Med* 2000;44(4):355-364.
52. Pfister H. The role of human papillomavirus in anogenital cancer. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1996;23(3):579-595.
53. Preuss SF. [A review of indications for primary surgical care of patients with advanced head and neck cancer]. *Laryngorhinootologie* 2010;89(7):435-444.
54. Ritchie JM, Smith EM, Summersgill KF, Hoffman HT, Wang D, Klussmann JP, Turek LP, Haugen TH. Human papillomavirus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx. *Int J Cancer* 2003;104(3):336-344.
55. Sambrook JRD. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3. 1989. CSHL Press.
56. Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol* 1998;153(6):1741-1748.
57. Schuller DE, McGuirt WF, McCabe BF, Young D. The prognostic significance of metastatic cervical lymph nodes. *Laryngoscope* 1980;90(4):557-570.
58. Schwartz SM, Daling JR, Doody DR, Wipf GC, Carter JJ, Madeleine MM, Mao EJ, Fitzgibbons ED, Huang S, Beckmann AM, McDougall JK, Galloway DA. Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst* 1998;90(21):1626-1636.
59. Schwartz SR, Yueh B, McDougall JK, Daling JR, Schwartz SM. Human papillomavirus infection and survival in oral squamous cell cancer: a population-based study. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2001;125(1):1-9.

60. Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Klussmann JP, Lee JH, Wang D, Haugen TH, Turek LP. Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int J Cancer* 2004;108(5):766-772.
61. Smith EM, Ritchie JM, Yankowitz J, Wang D, Turek LP, Haugen TH. HPV prevalence and concordance in the cervix and oral cavity of pregnant women. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2004;12(2):45-56.
62. Snijders PJ, Cromme FV, van den Brule AJ, Schrijnemakers HF, Snow GB, Meijer CJ, Walboomers JM. Prevalence and expression of human papillomavirus in tonsillar carcinomas, indicating a possible viral etiology. *Int J Cancer* 1992;51(6):845-850.
63. Snijders PJ, Scholes AG, Hart CA, Jones AS, Vaughan ED, Woolgar JA, Meijer CJ, Walboomers JM, Field JK. Prevalence of mucosotropic human papillomaviruses in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *Int J Cancer* 1996;66(4):464-469.
64. Snijders PJ, van den Brule AJ, Jacobs MV, Pol RP, Meijer CJ. HPV DNA detection and typing in cervical scrapes. *Methods Mol Med* 2005;119:101-114.
65. Steinberg BM, DiLorenzo TP. A possible role for human papillomaviruses in head and neck cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*. [15], 91-112. 1996.
66. Strome SE, Savva A, Brissett AE, Gostout BS, Lewis J, Clayton AC, McGovern R, Weaver AL, Persing D, Kasperbauer JL. Squamous cell carcinoma of the tonsils: a molecular analysis of HPV associations. *Clin Cancer Res* 2002;8(4):1093-1100.
67. Summersgill KF, Smith EM, Levy BT, Allen JM, Haugen TH, Turek LP. Human papillomavirus in the oral cavities of children and adolescents. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;91(1):62-69.
68. Syrjanen K, Syrjanen S, Lamberg M, Pyrhonen S, Nuutinen J. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg* 1983;12(6):418-424.
69. Tsuchiya H, Tomita Y, Shirasawa H, Tanzawa H, Sato K, Simizu B. Detection of human papillomavirus in head and neck tumors with DNA hybridization and immunohistochemical analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991;71(6):721-725.
70. Tylor M, Olofsson J. Prognostic factors in oral cavity carcinomas. *Acta Otolaryngol Suppl* 1992;492:75-78.

71. van Houten VM, Snijders PJ, van den Brekel MW, Kummer JA, Meijer CJ, van LB, Denkers F, Smeele LE, Snow GB, Brakenhoff RH. Biological evidence that human papillomaviruses are etiologically involved in a subgroup of head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2001;93(2):232-235.
72. Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Hong WK. Head and neck cancer. *N Engl J Med* 1993;328(3):184-194.
73. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189(1):12-19.
74. Weber A, Tannapfel A. [Prognostic factors in head-neck carcinomas]. *HNO* 2002;50(1):35-42.
75. Wey PD, Lotz MJ, Tiedman LJ. Oral cancer in women nonusers of tobacco and alcohol. *Cancer* 1987;60(7):1644-1650.
76. Widdice LE, Breland DJ, Jonte J, Farhat S, Ma Y, Leonard AC, Moscicki AB. Human papillomavirus concordance in heterosexual couples. *J Adolesc Health* 2010;47(2):151-159.
77. Wieland U, Pfister H. Molecular diagnosis of persistent human papilloma virus infections. *Intervirolgy* 1996;39(3):145-157.
78. Wieland U, Ritzkowsky A, Stoltidis M, Weissenborn S, Stark S, Ploner M, Majewski S, Jablonska S, Pfister HJ, Fuchs PG. Communication: papillomavirus DNA in basal cell carcinomas of immunocompetent patients: an accidental association? *J Invest Dermatol* 2000;115(1):124-128.
79. Wiest T, Schwarz E, Enders C, Flechtenmacher C, Bosch FX. Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control. *Oncogene* 2002;21(10):1510-1517.
80. Wilczynski SP, Lin BT, Xie Y, Paz IB. Detection of human papillomavirus DNA and oncoprotein overexpression are associated with distinct morphological patterns of tonsillar squamous cell carcinoma. *Am J Pathol* 1998;152(1):145-156.
81. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002;2(5):342-350.

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.