

Karin Milde-Langosch¹ · Sabine Riethdorf¹ · Tjoung-Won Park²

¹ Institut für Pathologie, Abt. Gynäkopathologie, Universitätskrankenhaus Eppendorf, Hamburg

² Universitäts-Frauenklinik, Universitätskrankenhaus Eppendorf, Hamburg

Natürlicher Verlauf der HPV-Infektion

Nutzen der HPV-Analytik in der Zervixdiagnostik

Zusammenfassung

Zervixkarzinome und ihre Vorstufen, die Zervixdysplasien (CIN1-CIN3), sind mit genitalen Papillomavirus (HPV)-Infektionen assoziiert. Epidemiologische und In-vitro-Untersuchungen haben gezeigt, daß einige dieser HPV-Typen, die High risk-Typen 16, 18, 31 u.a., Proteine (E6, E7) kodieren, welche die Stabilität des Zellzyklus und des Genoms beeinflussen. Die Progression von der leichten über die schwere Dysplasie zum Karzinom ist mit einer zunehmenden Expression dieser viralen Onkogene verbunden. Welche zusätzlichen Faktoren außer der persistierenden High-risk-HPV-Infektion dazu beitragen, daß einige der Dysplasien zu invasiven Tumoren fortschreiten, ist noch nicht vollständig geklärt. Neue Ergebnisse deuten u.a. auf genetische Prädisposition (p53-Polymorphismus), zelluläre Immunreaktionen und auf die Wirkung von Zytokinen hin. Für den Nachweis der Papillomavirus-Infektion in Zervixabstrichen und -biopsien stehen heute mit der PCR und dem Hybrid Capture-Assay hochempfindliche und zuverlässige Detektionssysteme zur Verfügung. Bei histologisch nachgewiesener schwerer Dysplasie oder invasivem Karzinom hat ihre Anwendung zur Zeit keine Relevanz. Der HPV-Nachweis kann jedoch vor allem bei unklarem zytologischem Befund (ASCUS) oder leichten Dysplasien wichtige diagnostische und prognostische Hinweise liefern.

Schlüsselwörter

Papillomaviren · Zervixkarzinom · Zervixdysplasie · HPV-Diagnostik

Plattenepithelkarzinome der Zervix gehören mit jährlich etwa 450000 Neuerkrankungen weltweit zu den häufigsten malignen Tumoren der Frau. Nachdem bereits im letzten Jahrhundert postuliert wurde, daß sexuell übertragbare Agentien eine Rolle bei der Entstehung dieser Karzinome spielen, ist heute allgemein akzeptiert, daß Infektionen durch humane Papillomaviren (HPV) in fast 100% der Fälle an der Karzinogenese beteiligt sind. Diese gemeinsame Ätiologie sowie die Entwicklung der invasiven Tumoren aus definierten Vorstufen tragen dazu bei, daß Zervixkarzinome ein interessantes Modellsystem der Krebsentstehung darstellen. So sind folgende Aussagen heute allgemein akzeptiert:

1. Zervikale Plattenepithelkarzinome entstehen aus klinisch gut erfaßbaren Vorläuferläsionen, den zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN 1–3).¹

¹ Abkürzungen: ASCUS, atypical squamous cells of undetermined significance; AGUS, atypical glandular cells of undetermined significance; AP-1, activating protein 1; CHO, chinese hamster ovary; CIN, cervical intraepithelial neoplasia; CIS, carcinoma in situ; DNA, deoxyribonucleic acid; DNS; EGF, epithelial growth factor; HSIL, high-grade squamous intraepithelial lesion; ISH, In-situ-Hybridisierung; LSIL, low-grade squamous intraepithelial lesion; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1; MHC, major histocompatibility complex; PCR, polymerase chain reaction; Rb, retinoblastoma protein; RNA, ribonucleic acid; RNS; TEF-1, transcriptional enhancer factor 1; TGF, transforming growth factor; TNF, tumor necrosis factor; URR, upstream regulatory region; YY1, ying and yang protein

2. Die große Mehrzahl dieser Zervixdysplasien ist ätiologisch mit einer Papillomavirus (HPV)-Infektion verknüpft, wobei die HPV-Nachweisrate von ca. 65% in CIN1 auf über 90% in CIN3 ansteigt. In Karzinomen liegt sie bei Verwendung der klassischen Southern-Blot-Technik bei ca. 90% [16], mit der hochempfindlichen PCR bei fast 100% [3].

3. Persistierende Infektionen mit bestimmten *high risk*-Papillomavirus-typen (meist HPV 16, aber auch HPV 18, 31 u.a.) sind mit einem erhöhten Progressionsrisiko verbunden [16].

4. Die Progression von der leichten zur schweren Zervixdysplasie sowie zum invasiven Karzinom geht mit einer zunehmenden Expression viraler Onkogene einher, welche direkt in die Regulation des Zellzyklus und die Stabilität des Genoms eingreifen [30].

Trotz dieser Gemeinsamkeiten bleibt vieles in der Entstehung dieser Tumoren ungeklärt. So sucht man noch nach eindeutigen Kriterien für die Prognose der verschiedenen Dysplasiegrade, wobei man neben zytologischen Untersuchungen zunehmend molekularbiologische Verfahren einbezieht (HPV-Typisierung, HPV-Integration, Klonalitätsanalysen u.a.). Im folgenden möchten wir die Rolle der Papillomaviren bei der zervikalen Karzinogenese näher erläutern sowie auf die Methodik und

Dr. K. Milde-Langosch
Institut für Pathologie,
Universitätskrankenhaus Eppendorf,
Martinistraße 52, D-20246 Hamburg

K. Milde-Langosch · S. Riethdorf · T.-W. Park

Natural course of human papillomavirus (HPV) infection. Effectiveness of HPV analysis in cervical swabs

Summary

Cervical carcinomas and their precursors (cervical dysplasia, CIN1–3) are associated with human papillomavirus (HPV) infections. Epidemiological and in vitro-studies have shown that some of the genital HPV types, the *high risk*-types 16, 18, 31 etc., code for proteins (E6/E7) which strongly influence the cell cycle and genome stability. Progression from weak to severe dysplasia and to invasive cancer is associated with increasing expression of these viral oncogenes. Which additional cofactors contribute to progression of some dysplasias to carcinomas is still a matter of investigation. Recent results point to genetic predisposition (p53 polymorphism), cellular immune reaction, and cytokine expression. For HPV detection in cervical swabs and biopsies two highly sensitive and reliable systems (PCR, Hybrid Capture system) are available. Although classical histological methods are sufficient for the diagnosis of high-grade lesions and invasive cancer, HPV testing might give valuable diagnostic and prognostic clues especially in cases of unclear cytology (ASCUS) or weak dysplasia.

Key words

Papillomaviruses · Cervical cancer · Cervical dysplasia · HPV detection

Originalien

den Nutzen von HPV-Untersuchungen in der Zervixdiagnostik eingehen.

Epidemiologie

Epidemiologische Studien, bei denen hochsensitive, gut reproduzierbare HPV-Detektionsmethoden angewandt wurden, ergaben, daß die große Mehrheit der Zervixdysplasien und -karzinome mit spezifischen HPV-Typen assoziiert ist und HPV-DNA-Positivität mit einem signifikant erhöhten Risiko einer begleitenden Zervixdysplasie bzw. eines invasiven Zervixkarzinoms verbunden ist. Sonstige mögliche Risikofaktoren wie Rauchen, hormonelle Kontrazeption oder andere genitale Infektionen weisen in einer multivariaten Analyse unter Einbeziehung des HPV-Status keine Signifikanz auf [26]. In einer der größten Multicenterstudien wurde eine HPV-Typisierung an über 1000 invasiven Zervixkarzinomen aus unterschiedlichen geographischen Lokalisationen durchgeführt. Etwa 80% aller untersuchten Zervixkarzinome wiesen die HPV-Typen 16, 18, 45 und 31 sowie noch 15 weitere Typen auf. Unabhängig von der geographischen Lokalisation fanden sich in ca. zwei Dritteln der untersuchten Karzinome HPV 16 oder 18 [3]. Allerdings ist die HPV-Infektionsrate auch ohne das Vorliegen einer Zervixläsion hoch: Sie liegt in Zervixabstrichen junger Patientinnen im Alter von 20–25 Jahren bei ca. 20–40% und nimmt mit zunehmendem Alter dann deutlich ab.

Von den über 80 heute bekannten HPV-Typen kommen 23 im Genitalbereich vor. Die unterschiedliche Häufigkeit verschiedener HPV-Typen in genitalen Läsionen führte zur Unterscheidung von Low risk-HPV-Typen (HPV 6, 11, 42, 43, 44), welche in Condylomata acuminata und leichten dysplastischen Veränderungen, jedoch nicht bzw. extrem selten (verruköse Karzinome) in Karzinomen vorkommen, und „High-risk-Typen“ (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45,

51, 52, 56, 58, 59 u.a.), die in Zervixdysplasien und in Karzinomen vorkommen. Eine Unterteilung der letzten Gruppe nach ihrem onkogenen Potential in High-risk- und Intermediate risk-HPV-Typen [16] hat sich in der Praxis nicht bewährt. HPV 16 ist in allen Studien der eindeutig häufigste HPV-Typ in schweren Dysplasien und Plattenepithelkarzinomen, während in Adenokarzinomen der Zervix etwa gleich häufig HPV 16 und 18 vorliegen [21]. Eine enge Korrelation zwischen assoziiertem HPV-Typ und dem natürlichen Verlauf der Zervixdysplasie wird in verschiedenen größeren klinisch-prospektiven Studien beschrieben, unter anderem in unserem eigenen Kollektiv von 150 CIN1/Low-grade SIL mit klinisch dokumentierten Verlauf und einem Beobachtungszeitraum zwischen 3 Monaten und 5 Jahren (Abb. 1). Danach weisen progrediente Fälle signifikant häufiger HPV16-Infektionen auf als Läsionen, die im Beobachtungszeitraum eine Regression zeigen.

Molekularbiologie

Papillomaviren haben eine doppelsträngige, zirkuläre DNA mit einer Länge von ca. 8000 Basenpaaren (Abb. 2). Das virale Genom wird im wesentlichen in 3 Abschnitte eingeteilt: Die URR („upstream regulatory region“) umfaßt rund 400 Basenpaare. Sie kodiert nicht für ein Protein, besteht jedoch aus einer Reihe von Bindungsstellen für Transkriptions-Aktivatoren und -Suppressoren. Die URR ist für die Virusexpression von Bedeutung, da sie die Transkription viraler Gene reguliert und somit die Produktion viraler Proteine kontrolliert. Die „early region“ kodiert die viralen Onkoproteine E1, E2, E4, E5, E6 und E7. Die Onkoproteine E6 und E7 spielen bei der viralen Replikation und der neoplastischen Transformation der Wirtszelle eine wichtige Rolle (s. unten). Das E1-Protein bestimmter HPV-Typen besitzt ATPase- und Helicase-Ei-



Abb. 1 ▲ Natürlicher Verlauf von leichten Dysplasien (CIN1/LSIL). Beobachtungszeitraum 2 Monate–5 Jahre

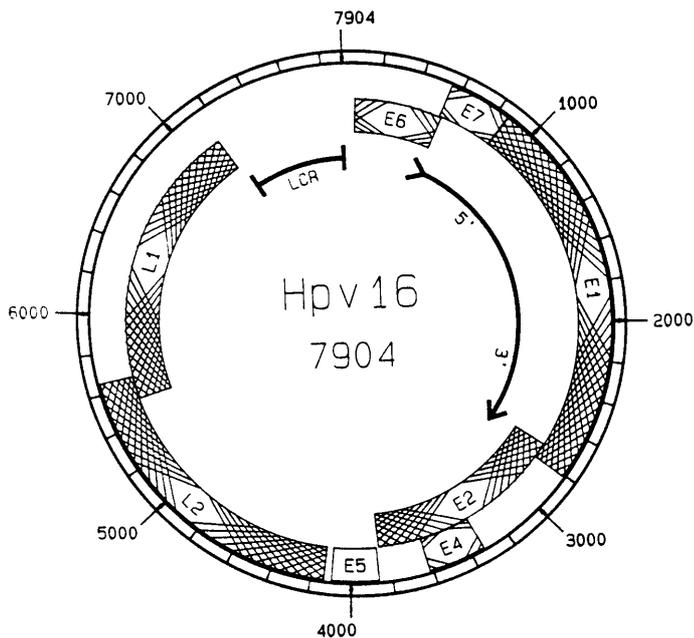


Abb.2 ▲ Organisation des zirkulären HPV16-Genoms. Angabe der Nukleotidnummern und der Positionen der regulatorischen Region (long control region, LCR) und der offenen Leseraster (ORFs) E1–E7, L1 und L2. Der gezeigte generelle Aufbau gilt mit Abweichungen für alle humanen Papillomaviren

genschaften. E2 bindet an die HPV-URR und wirkt als Aktivator und Suppressor der viralen Transkription. Die Assoziation des Protein E4 mit dem Zytoskelett induziert vermutlich den Kollaps des zytoplasmatischen Zytokeratin-Netzwerkes. Dies führt zu den charakteristischen zytopathischen Effekten in HPV-infizierten Zellen und ist bei der Freisetzung von Virionen aus den Zellen von Bedeutung. Das E5-Protein erhöht die EGF-vermittelte Signalübertragung in der Zelle (Reviews: [22, 30]). Die Gene der „late region“ L1 und L2 werden erst zu einem späten Zeitpunkt transkribiert und kodieren die viralen Kapsidproteine.

Der Nachweis von E6/E7-mRNA-Transkripten in Zervixkarzinomen und Zervixkarzinom-Zelllinien weist darauf hin, daß die E6/E7-Genexpression bei der neoplastischen Transformation eine wichtige Rolle spielt. In-vitro-Versuche belegen, daß die viralen Onkoproteine E6 und E7 hoch onkogener HPV-Typen zur Immortalisierung humaner Keratinozyten und sogar zusammen mit aktiviertem K-ras-Onkogen zur neoplastischen Transformation führen können. Solche HPV 16-immortalisierten humanen Keratinozyten ähneln in organotypischen (Raft)-Zellkultursystemen nach vielen Zellpassagen mor-

phologisch zunehmend schweren Zervixdysplasien [2]. Diese Beobachtungen stimmen mit epidemiologischen Studien überein, welche eine sehr lange Latenzzeit zwischen initialer HPV-Infektion und Tumorprogression dokumentiert haben. In situ-Hybridisierungsversuche haben ergeben, daß die E6/E7-Genexpression mit zunehmendem Dysplasiegrad (CIN1–CIN3) deutlich ansteigt [9].

Das E6-Onkoprotein greift direkt in die Zellzyklusregulation der Wirtszelle ein, indem es mit p53 in Wechselwirkung trifft. P53 wirkt als Tumorsuppressor und kann sowohl Apoptose als auch Zellzyklusarrest in der späten G1-Phase induzieren, welches der Behebung von DNA Schäden dient. Nach Komplexbildung von E6 und p53 erfolgt über die Ubiquitin-abhängige Proteolyse die selektive Degradation von p53 [22]. Die E6-Onkoproteine der High-risk-HPV-Typen haben im Vergleich zu denen der Low-risk-HPV-Typen eine höhere Affinität zu p53 und/oder beschleunigen die Degradation. Der Verlust von p53 in E6-exprimierenden Zellen kann zu einer unkontrollierten Zellzyklusprogression und Akkumulation genetischer Mutationen führen und somit zur neoplastischen Zelltransformation beitragen. Anders als in vielen hu-

manen Tumoren, bei denen häufig p53-Mutationen vorkommen, stellen diese in Zervixkarzinomen ein eher seltenes Ereignis dar; stattdessen wird dieser wichtige Tumorsuppressor durch virale Proteine ausgeschaltet.

In menschlichen Populationen weist das p53-Gen einen Polymorphismus im Codon 72 auf. Dieser führt dazu, daß das Protein an der entsprechenden Position entweder die Aminosäure Arginin oder Prolin enthält. Neueste Ergebnisse [27] weisen darauf hin, daß die Arginin-Form für die E6-abhängige Degradation anfälliger ist als die Prolin-Form. Tatsächlich war die Arginin-Form bei Patientinnen mit Zervixkarzinom deutlich häufiger als in der Kontrollgruppe nachweisbar. Weitere Untersuchungen werden zeigen, ob der p53-Polymorphismus tatsächlich zu einer unterschiedlichen Anfälligkeit verschiedener Bevölkerungsgruppen gegenüber Zervixkarzinomen führt.

Das E7-Onkoprotein kann mit dem Tumorsuppressor Rb (Retinoblastoma-Protein) und seinen verwandten Proteinen p107 und p130 Komplexe bilden [22, 30]. Diese Proteine spielen in normalen, nicht HPV-infizierten Zellen eine zentrale Rolle im Zellzyklus, indem sie die Bildung verschiedener, an der DNA-Replikation in der S-Phase beteiligter Proteine kontrollieren. Durch Bindung des HPV 16 E7-Onkoproteins an Rb, sowie an p107 und p130 wird dieser Kontrollmechanismus gestört und es kommt zur unkontrollierten Transkription von Zellzyklus-abhängigen Genen. Die Bindungsaffinität von E7 und Rb scheint mit dem vorliegenden HPV-Typ zu variieren. So weist HPV 6 E7 eine geringere Affinität zu Rb auf als HPV 16 und 18 E7. HPV6-Mutationen, bei denen eine bestimmte Aminosäure durch eine für HPV 16/18 E7 typische Aminosäure substituiert ist, weisen eine signifikant höhere Affinität zu Rb und in In-vitro-Transformationsassays eine transformierende Wirkung auf [10].

Zusätzlich zu den geschilderten Aktivitäten greifen E6 und E7 in den Zellzyklus ein, indem sie in die Bildung der Kinasekomplexe, welche das Fortschreiten im Zellzyklus regulieren, eingreifen. Die Aktivität des Promoters, welcher die Expression von E6 und E7 reguliert, wird durch ein komplexes Zusammenspiel von viruspezifischen Proteinen (E2), ubiquitären zellulären

Transkriptionsfaktoren (YY1, AP-1, SP1 u.a.) und Keratinozyten-spezifischen Faktoren (TEF-1, TIF u.a.; [28]) gesteuert, welche an spezifische Akzeptorsequenzen innerhalb der URR binden. Veränderungen dieser Regulationsmechanismen, z.B. durch HPV-Integration (s. unten), Deletion von URR-Regionen [19] u.a. können zu einer unkontrollierten Onkogen-Expression und damit zum Progreß führen.

HPV-Integration: In gutartigen Läsionen der Zervix liegt HPV-DNA meistens in zirkulärer, extrachromosomaler, episomaler Form vor. Dagegen ist sie in den meisten Zervixkarzinomen (ca. 70%) in das Wirtsgenom integriert [7]. In einigen Fällen werden in Zervixkarzinomen sowohl episomale als auch integrierte HPV DNA nachgewiesen. Die Integration findet immer in der Region der E1/E2-Leseraster statt und ist oft mit einem Funktionsverlust dieser Proteine verbunden. Es gilt als sicher, daß die Integration viraler DNA in das Wirtsgenom über die unkontrollierte Aktivierung zellulärer Gene und teilweise Deregulation viraler Onkogene zur komplexen zellulären Regulationsstörung und möglicherweise auch zur neoplastischen Transformation führen kann. In diesem Zusammenhang kommt es auch zur zunehmenden genetischen Instabilität.

Die Angaben zur Häufigkeit integrierter HPV-DNA in präinvasiven Zervixläsionen schwanken zwischen 5 und 50% [7]. Dabei kann es sich um potentiell progrediente Risikoläsionen handeln. Derzeit wird in Deutschland im Rahmen einer Multicenter Studie mit Hilfe eines PCR gestützten Verfahrens die Häufigkeit und klinische Bedeutung von integrierter HPV DNA in Zervixdysplasien untersucht.

Jüngste Untersuchungen zur *Telomeraseaktivierung* weisen darauf hin, daß Zellimmortalisierung eine wesentliche Voraussetzung für die maligne Zelltransformation darstellt. Die Verkürzung der Chromosomen während jeder Zellteilung durch unvollständige Replikation von repetitiven DNA-Sequenzen, den Telomeren, stellt ein wesentliches Merkmal der zellulären Seneszenz dar. Das Enzym Telomerase restauriert die Telomere und trägt so zur Immortalisierung der Zellen bei. So konnte in HPV 16 E6-transfizierten menschlichen Keratinozyten eine hundertfache Zunahme

der Telomeraseaktivität und Zellimmortalisierung induziert werden [15]. Auch in Zervixkarzinomen und bereits in präneoplastischen Läsionen wurde Telomeraseaktivierung in enger Assoziation mit viraler Onkogenexpression nachgewiesen. Inwiefern Telomeraseaktivität und virale Onkogenexpression als Prognosefaktoren für Tumorprogression gewertet werden können, ist Gegenstand aktueller klinisch-wissenschaftlicher Forschung.

Ein möglicher zusätzlicher Prognoseparameter für leichte zervikale Dysplasien könnte die *Klonalität* der Läsion sein. So konnte durch molekularbiologische Methoden nachgewiesen werden, daß CIN2 und CIN3-Läsionen mit High-risk-Typen assoziiert und stets monoklonalen Ursprungs waren. Low-grade-Läsionen (CIN1) waren dagegen in ca. 30% der Fälle polyklonal, und dies korrelierte mit einer Infektion durch Low-risk-HPV-Typen [23].

Externe Faktoren

Auch extrazelluläre Regulationsmechanismen kontrollieren die Viruspersistenz, die Expression der viralen Onkogene und deren Auswirkungen auf die Epithelzellen und ihre Umgebung. Man weiß heute, daß die zellvermittelte Immunantwort eine entscheidende Rolle für die Wachstumslimitation bzw. Regression HPV-assoziiierter Zervixläsionen spielt. Hierauf läßt auch die Häufigkeit und hohe Progressionsrate dieser Läsionen in immunsupprimierten Transplantations- und AIDS-Patientinnen schließen [1].

HPV-infizierte Zervixläsionen sind von *T-Lymphozyten*, hauptsächlich CD8-positiven, infiltriert, die wahrscheinlich nur wenig aktiviert sind. Für die Untersuchung der Lymphozyteninfiltration von präneoplastischen Läsionen der Cervix uteri bietet die organotypische Kultivierung HPV-transformierter Keratinozyten ein gutes Modell. Daran konnte gezeigt werden, daß die geringe cytotoxische Aktivität der T-Lymphozyten durch Faktoren erhöht werden kann, die eine Verbindung zwischen den T-Lymphozyten und den Keratinozyten herstellen, z.B. Phytohaemagglutinin A [13]. Diese Ergebnisse belegen, daß T-Zellen u.U. in der Lage sind, HPV-infizierte Keratinozyten zu beseitigen. Neueste Ergebnisse lassen eine Bedeutung der T-Zell-vermittelten

Immunantwort gegen onkogene Papillomaviren für die Prävention der zervikalen Kanzerogenese vermuten.

MHC-Moleküle der Klassen I und II sind in die Antigenpräsentation der T-Lymphozyten einbezogen. Veränderungen in der Expression dieser Moleküle könnten die Eliminierung virusinfizierter Zellen beeinflussen. So scheint die Expression der MHC-Klasse-I-Moleküle in prämaligen und malignen zervikalen Läsionen verringert zu sein [6]. Die Assoziation bestimmter MHC-Allele mit der Inzidenz dieser Läsion ist noch nicht eindeutig belegt. Jüngste Ergebnisse an HPV-infizierten Frauen [11] zeigen jedoch, daß ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von CIN II-III bei Patientinnen mit einem bestimmten HLA-Haplotyp besteht.

Durch immunkompetente Zellen, die in betroffene Gewebe infiltrieren, gebildete *Cytokine* scheinen eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle der Auswirkungen einer HPV-Infektion zu spielen. Therapeutische Bedeutung erlangten z.B. Interferone, vor allem Interferon alpha, durch ihre regressiv wirkende Wirkung auf HPV-induzierte Läsionen.

Aktiviert Makrophagen sind ebenfalls Kandidaten für eine lokale zelluläre Kontrolle. Sie entfalten ihre Wirkung nicht nur direkt durch ihre zytotoxischen Eigenschaften gegenüber virusinfizierten oder entarteten Zellen, sondern auch indirekt über die Freisetzung von Cytokinen, wie z.B. TNF α und TGF- β . Tumor-assoziierte Makrophagen sind in der Lage, verschiedene Mediatoren, die in die Regulation des Tumorwachstums, die Angiogenese, Fibrin deposition, Invasion und Metastasierung, sowie die lokale und systemische Immunsuppression eingreifen, zu sekretieren.

Chemokine bilden eine Gruppe von sekundären proinflammatorischen Mediatoren, die für die Rekrutierung verschiedener Leukozytenpopulationen verantwortlich sind und durch primäre Mediatoren wie IL-1 oder TNF- α induziert werden. Das Chemokin MCP-1 („monocyte chemoattractant protein“) ist chemoattraktiv für Monozyten, inaktiv dagegen gegenüber Neutrophilen und Lymphozyten. Eine Anregung der MCP-1-Produktion durch β -Intergrine, TNF- α u.a. Cytokine könnte daher von therapeutischem Interesse sein. Tatsächlich sind kultivierte Tumorzellen (CHO- oder HeLa-Zellen), die gen-

technisch so verändert wurden, daß sie MCP-1 produzieren, nach Transplantation in Nacktmäuse nicht mehr zur Tumorbildung fähig. Von Rösl et al. [25] wurde aufgrund experimenteller Befunde ein negativer Zusammenhang von HPV-Onkogen- und MCP-1-Expression postuliert. So war in zervikalen HPV-E6/E7-exprimierenden Karzinomzelllinien, welche in Nacktmäusen Tumoren bilden, keine MCP-1-Transkription nachweisbar. Fusioniert man dagegen diese Zellen mit Fibroblastenzellen, kommt es wieder zur TNF α -induzierbaren MCP-1-Bildung, nach Heterotransplantation in Nacktmäuse zur starken Makrophageninfiltration und nicht mehr zur Tumorentstehung. Inwieweit die negative Korrelation zwischen MCP-1- und HPV-Onkogenexpression auch an Biopsiematerial von Zervixläsionen nachzuweisen ist, ist Gegenstand unserer Untersuchungen. Die Ergebnisse zeigen, daß in schweren Dysplasien mit HPV-Onkogenexpression die MCP-1-Expression unterdrückt ist, wogegen in Tumoren diese Beziehung gestört sein kann [24].

Darüberhinaus konnte in allen Plattenepithelkarzinomen eine MCP-1-Expression in den Stromazellen, die dem Tumor benachbart waren, nachgewiesen werden.

Natürlicher Verlauf

Zwischen den einzelnen Phasen der Tumorentstehung können Jahre, z.T. sogar Jahrzehnte liegen. So liegt das mittlere Lebensalter von Patientinnen mit Dysplasien, Carcinomata in situ und invasiven Zervixkarzinomen bei 34, 42 bzw. 48 Jahren. Nach unseren eigenen Untersuchungen sowie nach aktuellem Wissensstand stellt sich der Verlauf der HPV-Infektion folgendermaßen dar (Abb. 3). Dabei liegt die mittelschwere Dysplasie (CIN2) in ihren Eigenschaften zwischen CIN1 und CIN3.

1. *Latente Infektion:* Die Infektion nach sexueller Übertragung findet zunächst im Bereich der basalen Epithelzellen statt, wobei kleine Schleimhautverletzungen und die Transformationszone besonders anfällig sind. Eine Virusvermehrung findet zunächst nur in Verbindung mit der Replikation der Wirts-DNA statt und führt zu keinen morphologischen Veränderungen. Der Nachweis ist nur über hochsensitive

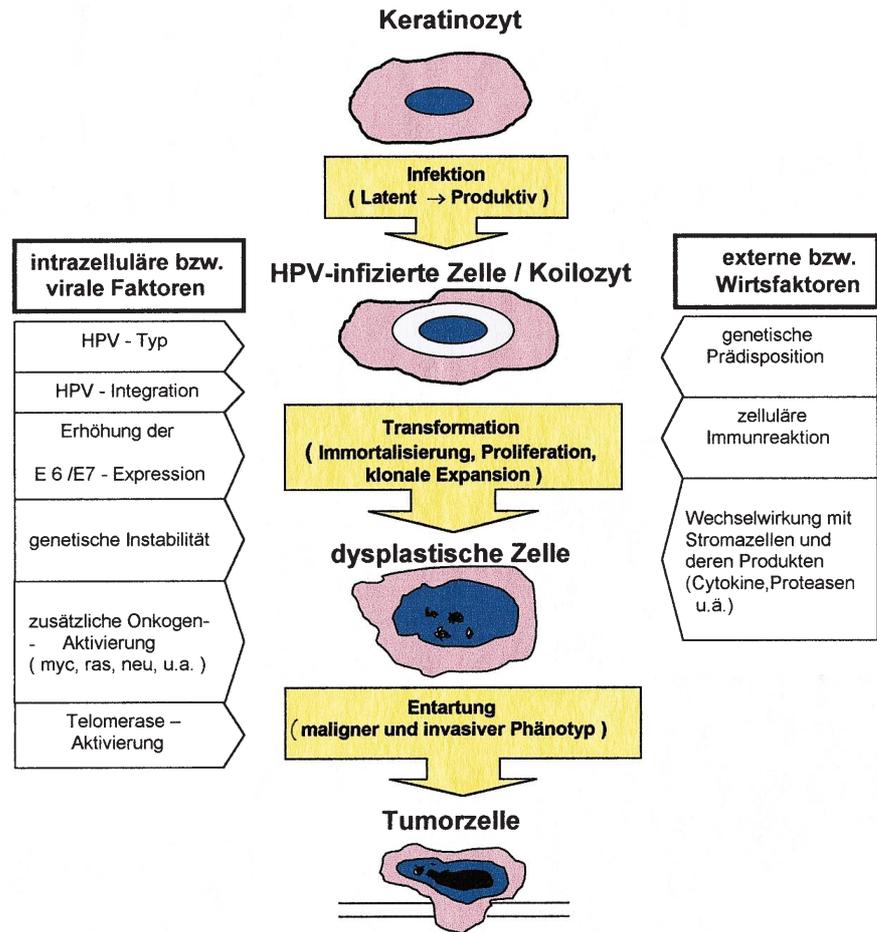


Abb. 3 ▲ Ätiologie des Zervixkarzinoms: virale und zelluläre Faktoren

molekularbiologische Techniken möglich. Während die Mehrzahl dieser Infektionen transient ist, besteht für Fälle mit persistierender HPV-Positivität in Abhängigkeit von HPV-Typ, Virusmenge und Zeit ein stark erhöhtes Risiko, an einer Dysplasie zu erkranken.

2. *Leichte Dysplasie (CIN1/LSIL):* Unabhängig von der Wirtsreplikation findet in den höheren Epithelschichten mit zunehmender Differenzierung eine erhöhte Virusreplikation statt, die zu typischen morphologischen Veränderungen (Koilozytosen u.a.) führt. Der Nachweis der HPV-Infektion ist durch molekularbiologische Techniken und z.T. aufgrund der zytopathischen Effekte möglich. Die Zahl der assoziierten HPV-Typen (Low-risk und High-risk) ist hoch, Doppelinfektionen sind häufig (ca. 30%; Tabelle 1). Oft sind diese Läsionen polyklonal. Die Virus-DNA liegt stets episomal vor, und die Expression der viralen Onkogene E6/E7 ist sehr schwach.

Eine spontane Regression dieser Läsionen ist häufig (Abb. 1), insbeson-

dere bei Low-risk-HPV-Infektionen. In prospektiven Untersuchungen bildeten sich nach einem Beobachtungszeitraum von 3–4 Jahren 62% der leichten Dysplasien zurück, nur in 16% der Fälle kam es zum Progreß. Inwieweit außer dem HPV-Typ andere Risikofaktoren wie Rauchen, hormonelle Kontrazeption, Immunstatus und Begleitinfektionen die Progressionsrate beeinflussen, ist bis heute umstritten [26].

3. *Schwere Dysplasie (CIN3/HSIL) und Carcinoma in situ (CIS):* Diese Läsionen sind überwiegend mit bestimmten High-risk-HPV-Typen (HPV 16, 18, 31, 33, 45) assoziiert, welche episomal und z.T. auch ins Wirtsgenom integriert vorliegen. Die schwere Dysplasie ist stets monoklonal und enthält häufig Telomeraseaktivität. Durch in-situ-Hybridisierung ist eine deutliche E6/E7-Expression nachweisbar, dagegen ist die MCP1-Expression unterdrückt. In vielen Fällen ist Aneuploidie nachweisbar.

Eine spontane Regression wird in diesem Stadium nur selten beobachtet.

Tabelle 1
HPV-Nachweis und Typisierung durch PCR in 424 Zervixabstrichen mit der zytologischen Diagnose Pap 3D

	n=	
HPV negativ	124	
HPV pos. (consensus pr.)	300	
HPV 16	92	
HPV 18	17	
HPV 16 or 18 ^a	104 (34,4%)	
HPV 31	40	
HPV 33	42	
HPV 35	33	
HPV 31, 33, or 35 ^a	100 (33,3%)	
HPV 45	4	
HPV 51	11	
HPV 52	7	
HPV 45, 51, or 52 ^a	20 (6,7%)	
HPV 6/11	30	
HPV 6/11 alone	14 (4,7%)	

^a Unter Berücksichtigung von Doppelinfektionen

In einer Verlaufsstudie [20] mit Beobachtungszeiten von 5 bis 28 Jahren wurde in drei Vierteln der Fälle Persistenz, in einem Viertel Progression zum invasiven Karzinom beobachtet. Daher ist die schwere Dysplasie in jedem Fall behandlungsbedürftig.

4. **Invasives Karzinom:** Die Virus-DNA liegt in ca. 2/3 der Fälle integriert vor, eine Spontanregression ist in diesen Fällen nicht möglich. In den übrigen Fällen sind häufig Deletionen der URR nachweisbar, was ebenfalls eine Deregulation der Virusexpression bewirkt [19]. Die hohe Expression der viralen Onkogene E6 und E7 führt zum zunehmenden Versagen intrazellulärer Regulationsmechanismen. Durch das Ausschalten von p53, Rb und anderen Zellzyklus-Inhibitoren und die dadurch erhöhte Proliferationsrate kommt es zur Akkumulation zusätzlicher genetischer Veränderungen, z.B. Aneuploidie, Onkogen-Aktivierungen, Allelverluste, und zur weiteren Progression.

Methoden der HPV-Analytik

Ein für die Diagnostik brauchbares HPV-Nachweissystem sollte a) ausrei-

chend empfindlich sein, b) hochspezifisch sein, d.h. keine falsch-positiven Ergebnisse liefern, c) möglichst alle genitalen HPV-Typen erfassen und d) Aussagen über den HPV-Typ oder zumindest die Risikogruppen erlauben. Zur Zeit werden diese Erwartungen nur von molekularbiologischen Verfahren erfüllt, die auf dem Nachweis der Virus-DNA basieren. Diese Techniken sind an zytologischen (Zervixabstriche) und histologischem Ausgangsmaterial (Frisch- und Paraffinmaterial) durchführbar. Insgesamt eignen sich Zervixabstriche sehr gut zur HPV-Diagnostik. Voraussetzung ist allerdings, daß der Abstrich sorgfältig abgenommen wurde und ausreichend Zellen enthält. Für Transport und Lagerung sollten Abstriche und kleine Biopsien sofort nach Entnahme in Röhrchen des „Specimen collection kit“ (Digene/Abbot) überführt werden, um einen Abbau von Nukleinsäuren zu verhindern.

Von den im Folgenden aufgeführten HPV-Nachweismethoden sind z.Z. nur das Hybrid-Capture-System und die PCR für routinediagnostische Zwecke geeignet und in einem Arbeitstag durchführbar. Selbstverständlich erlauben diese Methoden nur den Nachweis des Virusgenoms, geben jedoch keinen Aufschluß über HPV-Integration oder die Stärke der E6/E7-Expression, welche im natürlichen Verlauf eine Rolle spielen (s. oben).

Immunhistochemie und Serologie

Erste HPV-Antikörper waren stets gegen intakte Viruskapside, d.h. gegen die „späten“ Proteine L1 und L2 gerichtet. Für alle nichtproduktiven Virusinfektionen, z.B. die meisten Zervixdysplasien und -karzinome, waren sie daher nicht geeignet. Mittlerweile wurden zahlreiche Antikörper gegen „frühe“ HPV-Proteine, darunter die viralen Onkoproteine E6 und E7, entwickelt und auf den Markt gebracht (Fa. St. Cruz, Dianova u.a.), allerdings nur für die genitalen HPV-Typen 16 und 18. Im Vergleich zu molekularbiologischen Techniken ist die Immunhistochemie jedoch wenig sensitiv.

Serologische Untersuchungen wurden im Rahmen von epidemiologischen Studien im großen Stil durchgeführt, jedoch ist die humorale Immunantwort verglichen mit anderen Virus-

infektionen bei HPV-Infektionen nur schwach ausgeprägt. So wiesen in der Studie von Dillner et al. [8] nur 37% der Karzinompatienten, jedoch auch 19% der Kontrollgruppe Antikörper gegen HPV 16, 18 oder 33 auf. Für diagnostische Zwecke ist die HPV-Serologie daher zum jetzigen Zeitpunkt nicht geeignet.

Southern-Blot- und Dot-Blot-Hybridisierungen

Radioaktive Southern-Blot-Hybridisierungen galten lange als „Goldstandard“ für Sensitivität und Spezifität von HPV-Bestimmungen. Sie erfordern jedoch zunächst die zeitraubende Isolierung von DNA aus Gewebs- oder Zellmaterial. Diese wird beim Southern Blot-Verfahren durch Restriktionsenzyme in kleinere Fragmente zerschnitten, die im Agarosegel aufgetrennt und dann auf eine Membran übertragen („geblottet“) werden. Bei der Dot-Blot-Methode wird die DNA direkt auf die Membran aufgebracht. Die Hybridisierung erfolgt mit HPV-spezifischen Sonden, d.h. radioaktiv oder nichtradioaktiv markierten DNA- oder RNA-Abschnitten. Die Bindung dieser Sonde an die Membran, auch nach intensivem Waschen, weist auf das Vorhandensein von HPV-DNA in der Patientenprobe hin, wobei das Bandenmuster bei der Southern-Blot-Hybridisierung zusätzliche Informationen über den HPV-Typ gibt. Während die aufwendigen Southern-Blot-Untersuchungen nur für Forschungszwecke Anwendung finden, wurde die Dot-Blot-Technik auch für kommerzielle Kits benutzt. Durch die große Menge zellulärer DNA in den Proben ist es hier aber oft nicht möglich, schwache Signale von falsch-positiven Ergebnissen zu unterscheiden.

In-situ-Hybridisierungen

Als einzige Nachweismethode erlaubt die In-situ-Hybridisierung (ISH) am Paraffinschnitt oder am Ausstrich die Zuordnung des positiven Signals zu einzelnen Zellen bzw. Gewebsarealen (Abb. 4). Für diagnostische Zwecke sind zahlreiche nicht-radioaktive HPV-ISH-Kits auf dem Markt, die meist mit biotinylierten HPV-Sondencocktails arbeiten (z.B. Fa. Dako, Paesel & Lorei, Kretech). Die Methode umfaßt das Auftragen der

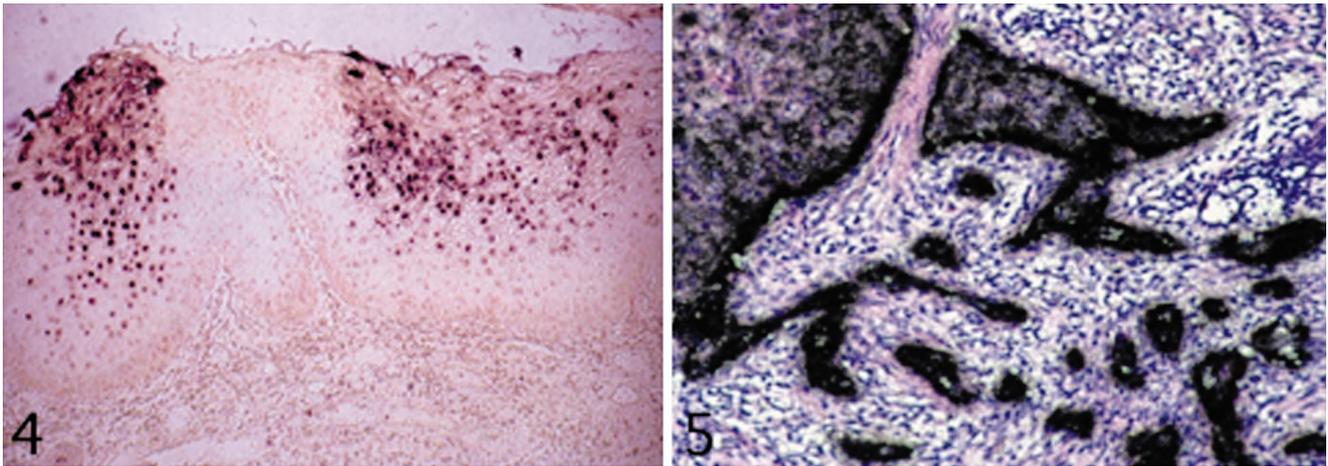


Abb.4 ▲ HPV16-DNA in einer leichten Zervixdysplasie. DNA-in-situ-Hybridisierung mit einer biotinylierten DNA-Sonde und Detektion über ein Streptavidin-Alkalische Phosphatase-System

Abb.5 ▲ Starke E6/E7-Expression in einem zervikalen Plattenepithelkarzinom. In-situ-Hybridisierung mit einer ^{35}S -markierten Antisense-RNA-Sonde

Sonde, die thermische Denaturierung von Sonde und zellulärer DNA, die Hybridisierung (Anlagerung) bei einer definierten Temperatur, Waschvorgänge und den immunhistochemischen Nachweis der gebundenen Sonde; dabei bleibt nicht immer die Morphologie des Präparats erhalten. Die Empfindlichkeit hängt von der Länge und Markierungsdichte der Sonde, vor allem aber von dem verwendeten Detektionssystem ab (Fluoreszenz-, Peroxidase- und Alkalische Phosphatase-Systeme; Tyramid-Signalverstärkung), die Spezifität wird durch die Hybridisierungs- und Waschbedingungen (Temperatur, Pufferzusammensetzung) bestimmt. Beide sind für Läsionen mit niedrigen Kopienzahlen pro Zelle oft nicht ausreichend. Um nicht für jeden zu testenden HPV-Typ ein Präparat (Paraffinschnitt, Ausstrich) zu benötigen, arbeiten kommerzielle ISH-Systeme mit SONDENGEMISCHEN, z.B. für HPV 16/18, HPV 6/11 u.ä. Eine sichere Typisierung ist hierbei oft nicht möglich. Die Kosten des HPV-Nachweises mit solchen Kits liegen bei ca. 32 DM bis 70 DM pro Probe.

Die Hybridisierung mit RNA-Sonden und der anschließende RNase-Abbau nichtgebundener Sonde kann zu einer deutlichen Erhöhung der Spezifität führen. Eine zusätzliche Steigerung der Empfindlichkeit ist durch die Verwendung radioaktiver, ^{35}S -markierter Antisense-RNA-Sonden möglich, welche jedoch nicht kommerziell erhältlich sind und einen hohen technischen und zeit-

lichen Aufwand (Expositionszeiten von bis zu einigen Wochen) erfordern. Heute werden In-situ-Hybridisierungen vor allem zu wissenschaftlichen Zwecken durchgeführt. Dabei dienen sie der Lokalisation der Virus-DNA und vor allem der Analyse der viralen Genexpression (Abb. 5). Für routinediagnostische HPV-Bestimmungen ist diese Methode durch ihren Zeit- und Materialaufwand nicht einsetzbar.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Einführung der PCR in die Virusdiagnostik führte zu einem deutlichen Sprung in der Sensitivität und Spezifität der HPV-Diagnostik. Dadurch, daß definierte DNA-Abschnitte, welche von zwei komplementären Oligonukleotiden (Primern) begrenzt werden, spezifisch bis zu 100000fach vervielfältigt werden, kommt es zu einer extremen Sensitivität, d.h. im optimalen Fall kann eine einzige Virus-DNA-Kopie in der Probe nachgewiesen werden. Die tatsächliche Empfindlichkeit hängt jedoch stark von den gewählten Primern und den PCR-Bedingungen ab.

Die amplifizierten Virus-DNA-Fragmente können nach Gelelektrophorese im Agarosegel leicht sichtbar gemacht werden. Für besondere Erfordernisse kann man die PCR zusätzlich koppeln mit:

a) Transfer der Banden auf Nylonmembranen und Hybridisierung mit spe-

zifischen Sonden (höhere Empfindlichkeit und Spezifität);

b) quantitativer Nachweis der PCR-Produkte durch ELISA;

c) Spaltung der PCR-Produkte durch Restriktionsenzyme und Auftrennung im Polyacrylamidgel mit nachfolgender Detektion der Spaltprodukte, z.B. durch Silberfärbung (exakte Typisierung).

Je nach dem gewählten Primerpaar kann der HPV-Nachweis streng typenspezifisch sein oder den Nachweis fast aller genitalen HPV-Typen erlauben: Sogenannte „consensus primers“ oder „general primers“ binden an Teile der L1/L2-Region im Virusgenom, welche bei allen genitalen HPV-Typen starke Homologien aufweisen. Die meistverwendeten dieser gruppenspezifischen Primer sind die Paare MY09/MY11 [18] und GP5+/GP6+ [14], welche für das Screening von HPV-Infektionen breite Verwendung finden. Bei positivem HPV-Befund kann dann eine Typisierung durch Hybridisierung mit typenspezifischen Sonden oder durch weitere, typenspezifische PCR-Reaktionen erfolgen.

Die extrem hohe Empfindlichkeit der PCR ist jedoch auch für die Schwächen der Methode verantwortlich: Zum einen ist die PCR hochanfällig gegen Kontaminationen, die nur durch verschiedene Vorsichtsmaßnahmen und bei einiger Erfahrung vermieden werden können; zum anderen erfaßt sie auch sehr geringfügige, transiente und latente HPV-Infektionen ohne klinische Bedeutung. Bei der „consensus primer“-PCR ist die Empfindlichkeit gegenüber der Verwendung von typenspezifischen Primern jedoch verringert und daher für die Praxis gut geeignet.

Auf Grund der vielen Fehler- und Kontaminationsmöglichkeiten bedarf es zur Durchführung der PCR unbedingt eines molekularbiologischen Speziallabors mit entsprechend erfahrenerm Personal. Die Kosten für die reine HPV-Bestimmung mit Gelelektrophorese belaufen sich auf ca. 12 DM Materialkosten (general primer-PCR und Kontrollreaktion, z.B. für β -Globin) bei einmaligen Gerätekosten von ca. 20000,- DM. Jedoch kann sich für eine exakte Bestimmung des HPV-Typs je nach den notwendigen Zusatzversuchen der Kosten- und Zeitaufwand vielfältigen.

Hybrid Capture Assay (Flüssig-Hybridisierung)

Dieses für die Diagnostik am Zervixabstrich entwickelte System (Fa. Digene/Abbot) ist eine Weiterentwicklung der ersten, klassischen Hybridisierungsverfahren. Es enthält RNA-Sondengemische für Low-risk- und High/intermediate risk-HPV-Typen und erlaubt so eine sehr spezifische Unterscheidung zwischen diesen Risikogruppen, jedoch keine weitere Typenbestimmung. Diese RNA-Sonden hybridisieren in Lösung mit der denaturierten Proben-DNA; danach wird das Gemisch in „Capture“-Röhrchen überführt, die mit hochspezifischen Antikörpern gegen RNA-DNA-Doppelstränge beschichtet sind, so daß die entstandenen Hybride hier eingefangen werden. Nach Entfernen nicht-gebundener Bestandteile erfolgt die Detektion mit weiteren, Alkalische-Phosphatase-gekoppelten Antikörpern und einem Substrat, welches bei seiner Umsetzung Lichtblitze freisetzt. Diese Chemilumineszenz wird dann im Luminometer quantitativ gemessen.

Das klassische Hybrid Capture-System erfaßt 14, das Nachfolgesystem (HCII), welches statt Röhrchen Mikrotiterplatten verwendet, 18 genitale HPV-Typen. Die Empfindlichkeit des HPV-Nachweises durch das Röhrchen-System liegt bei Abstrichen mit der Diagnose LSIL/HSIL bzw. Pap 3D/Pap 4 nur geringfügig unter der der PCR, und auch die Klassifizierung in Low- bzw. High-risk-HPV-Typen entspricht der durch PCR erzielten Typisierung ([4]; eigene Ergebnisse Tabelle 2). Bei zytologisch normalen Abstrichen liegen die HPV-Nachweisraten mit der PCR dage-

gen ca. doppelt so hoch [4]. Dies spiegelt die geringen Kopienzahlen bei solchen asymptomatischen, meist transienten HPV-Infektionen wider. Beim HCII-Nachfolgesystem mit erhöhter Nachweisempfindlichkeit liegen die Werte jedoch auch hier nahe denen der PCR.

Dem Nachteil der hohen Materialkosten (ca. 37 DM/Probe) und Anfangsinvestitionen (Geräte für ca. 45000,- DM) stehen beim Hybrid Capture-System die sichere und schnelle Identifizierung der Risikogruppe (High/Low-risk-HPV) und die einfache Handhabung des Systems auch für molekularbiologisch wenig erfahrenes Personal gegenüber.

Nutzen der HPV-Bestimmung

Daß es einen Zusammenhang zwischen Papillomavirus-Infektionen und der Entstehung von Zervixkarzinomen gibt, ist im Laufe der letzten Jahre ins medizinische Allgemeinwissen übergegangen. Viele Gynäkologen erwarten daher heute vom Pathologen bei Ein-sendung einer Zervixbiopsie auch Zusatzuntersuchungen zum HPV-Status. Bei eindeutigem histologischen Befund einer schweren Dysplasie, Carcinoma in situ oder eines invasiven Karzinoms bietet die HPV-Bestimmung und Typisierung jedoch keine Vorteile, hier ist die klassische HE-Diagnostik zur Zeit ausreichend. Innerhalb der Zervixdiagnostik könnte eine HPV-Analytik durch PCR oder Hybrid Capture dagegen heute in folgenden Anwendungsbe-reichen sinnvoll sein:

a) *Routinescreening von Zervixabstrichen:* Verschiedene Studien haben gezeigt, daß die Zahl falsch-negativer

Ergebnisse in der Routinezytologie durch den Einsatz der HPV-Diagnostik deutlich reduziert werden könnte [29]. Gegen eine routinemäßige Anwendung der HPV-Diagnostik in der Krebsvorsorge sprechen jedoch der Kostenaufwand und die hohe HPV-Nachweisrate in zytologisch normalen Abstrichen, insbesondere bei jungen Patientinnen. Aus diesen Gründen wird bei ausreichender Qualitätssicherung von der Mehrzahl der Experten die „Triple“-Diagnostik aus Kolposkopie, Zytologie und Histologie als ausreichend für die Früherkennung betrachtet.

b) *Kontrollbedürftiger Abstrichbefund:* Bei rezidivierenden Pap 3D-Befunden bzw. unklarer Zytologie (ASCUS) kann die HPV-Diagnostik wichtige diagnostische und prognostische Hinweise geben. Bis heute existieren erhebliche Unsicherheiten bei zytologischen Normabweichungen am unteren Ende der „PAP-Skala“: Dies spiegelt sich in den verschiedenen Begriffen wieder (Pap3, suspekter Zervixausstrich, „Borderline“-Zytologie, „ASCUS“, „AGUS“ etc.). Ca. 30% solcher Abstriche sind HPV-positiv [5]. In der Nachsorge wurde gezeigt, daß 20–60% dieser Frauen eine Dysplasie entwickeln. Solche Fälle sollten daher unbedingt kolposkopisch und histologisch abgeklärt werden, wobei die HPV-Analytik ein wichtiges zusätzliches Kriterium darstellt (Abb. 6).

c) *Pap 3D-Befund:* auch bei der Diagnose Pap 3D (Low-grade-SIL; s. Riethdorf et al., in diesem Heft) ist eine HPV-Analytik empfehlenswert. Schon lange ist bekannt, daß nicht jede „Koi-lozytose“ HPV-positiv ist, immerhin 1/4 der Zellausstriche mit „Koi-lozytosen“ sind HPV-negativ. Diese Fehlinterpretation

Tabelle 2

HPV-Typisierung durch PCR und Hybrid-Capture-Analyse. Vergleichsstudie an 300 HPV-positiven Zervixabstrichen mit der zytologischen Diagnose Pap 3D

HPV-Typ (PCR)	n=	Hybrid-Capture-Resultat			
		high risk	high+low risk	low risk	negativ
HPV 16/18/31/33/31/33/35/45/51/52	224	171	42	0	11
HPV 6/11	14	1	1	10	2
HPV X ^a	62	28	5	5	24

^a Positiv mit „consensus primers“ [35], jedoch negativ in der PCR mit typenspezifischen Primern für HPV 6/11, 16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52

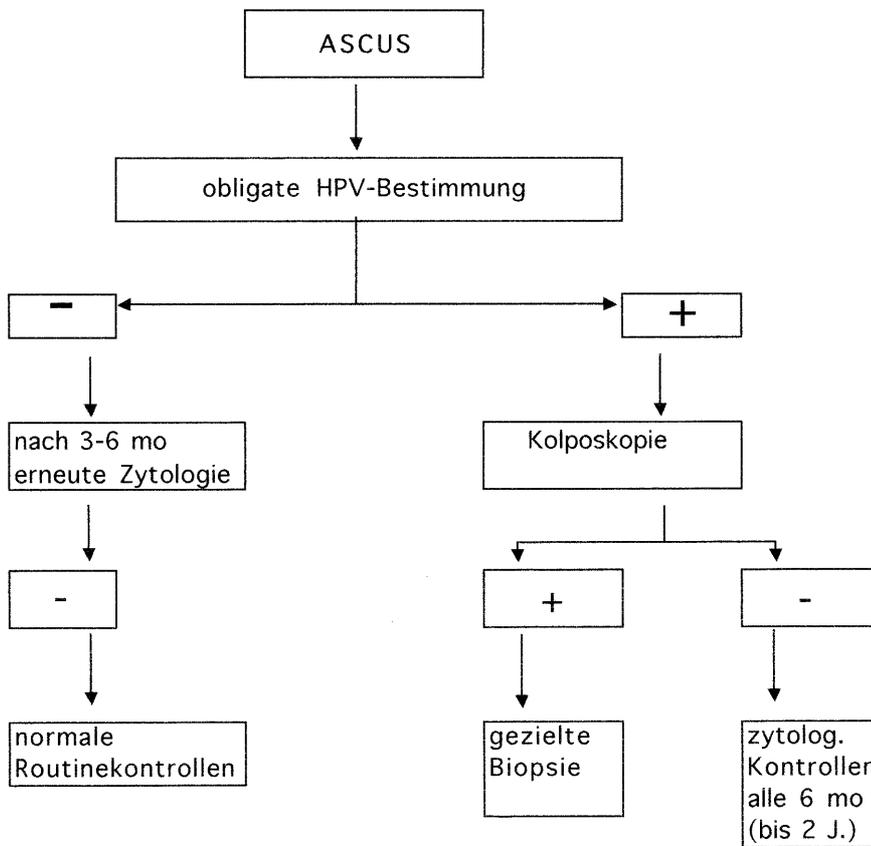


Abb. 6 ▲ Rolle der HPV-Diagnostik im Management von Patientinnen mit „Borderline“-Zytologie („atypical squamous cells of undetermined significance“, ASCUS)

tationen entstehen v.a. aufgrund entzündlicher Prozesse („Pseudokoilozytosen“). Um Fehldiagnosen und Überbehandlung zu vermeiden, aber auch in Hinsicht auf prospektive Aussagen, ist es notwendig, die HPV-Infektion zuverlässig festzustellen. Zusätzlich sind ca. 40% der Abstriche mit der Diagnose Pap3D HPV-negativ oder mit Low-risk-HPV-Typen assoziiert ([16]; eigene Untersuchungen) und haben daher gegenüber High-risk-Infektionen ein minimales Entartungsrisiko (Abb. 1).

d) *Okkultes Primärtumor*: Da die HPV-Infektion im Verlauf der Tumorausbreitung und -metastasierung persistent ist, kann der HPV-Nachweis in bestimmten Fällen auch die Zuordnung von Metastasen unklarer Genese unterstützen. Eine Bestimmung des HPV-Typs bei invasiven Karzinomen hat jedoch keinen sicheren prognostischen Wert.

e) *Therapiekontrolle*: Nach lokaler ablativer Therapie (Laser-, Loop-Behandlungen) bzw. während und nach einer systematischen Behandlung (z.B. mit Interferon α) stellt die HPV-Analytik einen wichtigen Parameter in Fol-

low-up-Untersuchungen dar. Bei bekanntem HPV-Status vor Therapiebeginn können negative Befunde auf eine komplette Remission, positive auf ein Rezidiv hindeuten. Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, daß die HPV-Befunde dem klinischen Bild entsprechen ([12]; eigene Beobachtungen).

Bei sorgfältiger Abwägung von Kosten und Nutzen kann heute also folgende Empfehlung ausgesprochen werden:

morphologischer Befund	HPV-Bestimmung sinnvoll?
normal	nein
ASCUS	ja
LSIL	ja
HSIL	nein
Karzinom	nein (Ausnahmen: s. oben)

Ausblick

Die Erkenntnis, daß HPV-Infektionen die zentrale Rolle bei der Entstehung von Zervixkarzinomen spielen, führte

zu intensiven Anstrengungen in der Entwicklung von Impfstoffen gegen HPV. Sowohl prophylaktische als auch therapeutische Vakzinierungen (Schutz vor Metastasierung oder Rezidiven) sind z.Z. in der Entwicklung oder Erprobung und zeigen in Tiermodellen z.T. bereits erfreuliche Ergebnisse [17]. Erschwerend ist hierbei, daß der Schutz jeweils nur einen HPV-Typ betrifft. Trotzdem ist die Entwicklung eines Impfstoffes gegen eine der häufigsten Krebserkrankungen der Frau ein höchst vielversprechender Ansatz, insbesondere für die Anwendung in Ländern ohne ein funktionierendes Vorsorgesystem.

Fazit für die Praxis

Epidemiologische und molekularbiologische Untersuchungen haben unser Wissen über die Entstehung von Zervixkarzinomen und ihren Vorstufen deutlich erweitert. Sicher ist heute, daß fast 100% dieser Tumoren mit bestimmten, onkogenen Papillomavirus-Typen assoziiert sind und daß virale Onkoproteine für die Transformation zum malignen Phänotyp verantwortlich sind. Obwohl für die Diagnostik von invasiven Zervixkarzinomen und schweren Dysplasien auch heute noch die klassische Histologie und Zytologie mit herkömmlichen Färbungen ausreicht, liefert bei Patientinnen mit unklarem zytologischem Befund (ASCUS) oder mit Zeichen einer leichten Dysplasie (LSIL) eine HPV-Bestimmung mit den heute verfügbaren, hochempfindlichen Methoden (PCR, Hybrid Capture) wichtige ergänzende Informationen für Diagnose und Therapieplanung.

Wir danken J. Koppelmeier für die Anfertigung der Abb. 3.

Literatur

1. Benton C, Shahidullah H, Hunter JAA (1992) **Human papillomavirus in the immunosuppressed**. Papillomavirus Rep 3:23–26
2. Blanton RA, Perez-Reyez N, Merrick DT, McDougall JK (1991) **Epithelial cells immortalized by human papillomaviruses have premalignant characteristics in organotypic culture**. Am J Pathol 138:673–685
3. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV (1995) **Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective**. J Natl Cancer Inst 87:796–802

4. Cope JU, Hildesheim A, Schiffman MH, Manos MM, Lörincz AT, Burk RD, Glass AG, Greer C, Buckland J, Helgesen K, Scott DR, Sherman ME, Kurman RJ, Liaw-K-L (1997) **Comparison of the Hybrid Capture tube test and PCR for detection of human papillomavirus DNA in cervical specimens.** *J Clin Microbiol* 35:2262–2265
5. Cox JT, Lörincz AT, Schiffman MH (1995) **HPV testing by hybrid capture is useful in triaging women with a cytologic diagnosis of ASQUS.** *Am J Obstet Gynecol* 1172:946
6. Cromme FJ, Meijer CJLM, Snijders PJF, Uytendaele A, Kenemans P, Helmerhorst T, Stern PL, Van den Brule AJC, Walboomers JMM (1993) **Analysis of MHC class I and II expression in relation to presence of HPV genotypes in premalignant and malignant cervical lesions.** *Br J Cancer* 67:1372–1380
7. Cullen AP, Reid R, Campion M, Lorincz AT (1991) **Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasia.** *J Virol* 65:606–612
8. Dillner J, Lehtinen M, Björge T, Luostarinen T, Youngman L, Jellum E, Koskela P, Gislefoss RE, Hallmans G, Paavonen J, Sapp M, Schiller JT, Hakulinen T, Thoresen S, Hakama M (1997) **Prospective seroepidemiologic study of human papillomavirus infection as a risk factor for invasive cervical cancer.** *J Natl Cancer Inst* 89:1293–1299
9. Dürst M, Gritz D, Schneider A, zur Hausen H (1992) **Human papillomavirus type 16 (HPV 16) gene expression and DNA replication in cervical neoplasia: analysis by in situ hybridization.** *Virology* 189:132–140
10. Heck D, Yee CL, Howley PM, Munger K (1992) **Efficiency of binding the retinoblastoma protein correlates with the transforming capacity of the E7 oncoproteins of the human papillomaviruses.** *Proc Natl Acad Sci USA* 89:4442–4446
11. Helland A, Olsen AO, Gjoen K, Akselsen HE, Sauer T, Magnus P, Borresen-Dale AL, Ronningen KS (1998) **An increased risk of cervical intra-epithelial neoplasia grade II–III among human papillomavirus positive patients with the HLA-DQA1*0102–DQB1*0602 haplotype: a population-based case-control study of Norwegian women.** *Int J Cancer* 76:19–24
12. Ho GYF, Burk RD, Klein S, Kadish AS, Chang CJ, Palan P, Basu J, Tachezy R, Lewis R, Romney S (1995) **Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia.** *J Natl Cancer Inst* 87:1365–1371
13. Jacobs N, Moutschen MP, Franzen-Detrooz E, Boniver V, Boniver J, Delvenne P (1998) **Organotypic culture of HPV-transformed keratinocytes: a model for testing lymphocytic infiltration of (pre)neoplastic lesions of the uterine cervix.** *Virchows Arch* 432:323–330
14. Jacobs MV, de Roda Husman AM, van den Brule AJC, Snijders PJF, Meijer CJLM, Walboomers JMM (1995) **Group-specific differentiation between high- and low-risk human papillomavirus genotypes by general primer-mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes.** *J Clin Microbiol* 33:901–905
15. Klingelutz AJ, Foster SA, McDougall JK (1996) **Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16.** *Nature* 380:79–81
16. Lörincz AT, Reid R, Jenson AB, Greenburg MD, Lancaster W, Kurman RJ (1992) **Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types.** *Obstet Gynecol* 79:328–337
17. Lowy DR, Schiller JT (1998) **Papillomaviruses and cervical cancer: pathogenesis and vaccine development.** *Monogr Natl Cancer Inst* 23:27–30
18. Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM (1989) **Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses.** *Cancer Cells* 7:209–213
19. May M, Dong X-P, Beyer-Finkler E, Stubenrauch F, Fuchs PG, Pfister H (1994) **The E6/E7 promoter of extrachromosomal HPV16 DNA in cervical cancers escapes from cellular repression by mutation of target sequences for YY1.** *EMBO J* 13:1460–1466
20. McIndoe WA, McLean MR, Jones RW, Mullins PR (1984) **The invasive potential of carcinoma in situ of the cervix.** *Obstet Gynecol* 64:451–458
21. Milde-Langosch K, Schreiber C, Becker G, Löning T, Stegner H-E (1993) **Human papillomavirus detection in cervical adenocarcinomas by polymerase chain reaction.** *Human Pathol* 24:590–594
22. Park T-W, Fujiwara H, Wright TC (1995) **Molecular biology of cervical cancer and its precursors.** *Cancer* 76:1902–1913
23. Park T-W, Richart RM, Sun X-W, Wright TC (1996) **Correlation between HPV type and clonal status of cervical squamous intraepithelial lesions (SIL).** *J Natl Cancer Inst* 88:355–358
24. Riethdorf L, Riethdorf S, Gützloff K, Prall F, Löning T (1996) **Differential expression of the monocyte chemoattractant protein-1 gene in human papillomavirus 16-infected squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the Cervix uteri.** *Am J Pathol* 149:1469–1475
25. Rösl F, Lengert M, Albrecht J, Kleine K, Zawatzky R, Schraven B, zur Hausen H (1994) **Differential regulation of the JE gene encoding the monocyte chemoattractant protein (MCP-1) in cervical carcinoma cell lines and derived hybrids.** *J Virol* 68:2142–2150
26. Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, Glass AG, Cadell DM, Rush BB, Scott DR, Sherman ME, Kurman RJ, Wacholder S, Stanton CK, Manos MM (1993) **Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia.** *J Natl Cancer Inst* 85:958–964
27. Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, Breuer J, Leigh IM, Matlashewski G, Banks L (1998) **Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer.** *Nature* 393:229–234
28. Turek LP (1994) **The structure, function and regulation of papillomaviral genes in infection and cervical cancer.** *Adv Viral Res* 44:305–356
29. Walboomers JMM, de Roda Husman A-M, Snijders PJF, Stel HV, Risse EKJ, Helmerhorst TJM, Voorhorst FJ, Meijer CJLM (1995) **Human papillomavirus in false negative archival cervical smears: implications for screening for cervical cancer.** *J Clin Pathol* 48:728–732
30. Zur Hausen H (1994) **Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific human papillomavirus types.** In: *Current topics in microbiology and immunology* 186:131–156