

Aus dem Institut für
Gynäkologische Tumorummunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Von Morphologie zu Molekularbiologie:
Charakterisierung HPV-induzierter zervikaler Läsionen auf der
Basis einer quantitativen, mRNA-basierten Messung zellulärer
und viraler Biomarker**

–

Ein diagnostischer Paradigmenwechsel?

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Nora Franziska Nevermann

aus Hamburg

Datum der Promotion: 23. Juni 2019

Inhaltsverzeichnis

Abstract (deutsch)	4
Abstract (englisch)	6
1 Einleitung	7
1.1 Vorgeschichte	7
1.2 Das Humane Papillomvirus	8
1.2.1 Struktur, Genom und Klassifikation	8
1.2.2 Der virale Lebenszyklus	9
1.2.3 Onkogenetische Mechanismen	10
1.3 Aufbau des zervikalen Epithels	13
1.4 Epidemiologie der HPV-Infektion und des Zervixkarzinoms	14
1.5 Strategien der Prävention	16
1.5.1 Primärprävention: Impfung	16
1.5.2 Sekundärprävention: Algorithmus der Vorsorge	17
1.5.3 HPV-Tests	20
1.5.4 HPV-Test vs. Zytologie als primäres Screening	22
1.6 Das Projekt im Kontext der Einleitung	24
2 Zielsetzung und Projektdesign	26
2.1 Zielsetzung	26
2.2 Projektdesign	27
2.2.1 Biomarker der HPV-Infektion und Zervixkarzinom-Entwicklung	27
3 Materialien und Methoden	36
3.1 Ethikvotum	36
3.2 Das Probenkollektiv	36
3.2.1 Asservierung der Proben	37
3.3 QuantiGene 2.0 Plex Assay	37
3.3.1 Prinzip des QuantiGene 2.0 Assays	38
3.3.2 Materialien	39
3.3.3 Durchführung	41
3.3.4 Berechnung der relativierten Werte (rel. MFI)	44
3.3.5 Definition der HPV-Positivität	45
3.3.6 Technische Aspekte	45
3.4 Referenzmethode der Genotypisierung: BSGP5+/6+ - Multiplexed Genotyping	48
3.4.1 Materialien	49
3.4.2 Durchführung und Auswertung	50
3.5 Zellkultur	51
3.6 Statistische Auswertung	51
3.6.1 Verteilung	51
3.6.2 Rangkorrelationen	51
3.6.3 ROC-Analyse	52
3.6.4 Logistische Regression	52
3.6.5 Berechnung der Risikoscores	55
4 Ergebnisse	56
4.1 Quantitative HPV-Genotypisierung im Vergleich	56
4.1.1 Quantitative E7-Messung: Bestimmung des führenden HPV-Typ	57
4.2 Evaluation der zellulären Biomarker	58
4.2.1 Korrelation der Biomarkerexpression zum Schweregrad der Dysplasie	58

4.2.2 Korrelation der Biomarker untereinander.....	59
4.2.3 Charakterisierung von Dysplasiegraden durch Biomarker-Trennwerte: ROC-Analysen	61
4.2.4 Berechnung eines mathematischen Modells auf Basis der Biomarker: Logistische Regression und Risikoscore	72
4.2.5 Übersicht: Formeln der Risikoscores	82
4.2.6 Anwendung des Risikoscores	83
4.3 Splice Sites.....	86
4.3 Test of Cure?.....	89
5 Diskussion	92
5.1 Proof of principle und HPV-Genotypisierung.....	92
5.2 E7: wichtiges Onkogen und Target der Genotypisierung	93
5.3 Charakterisierung zervikaler Läsionen durch Biomarker	94
5.3.1 Die Schwelle \leq CIN2/CIN3+: Charakterisierung hochgradiger Dysplasien	95
5.3.2 Den Goldstandard in Frage stellen: ein Dilemma	97
5.3.3 Evaluation des Risikoscores \leq CIN2/CIN3+: Test of Cure?	98
5.3.4 Differenzierung von CIN1 und CIN2 über Biomarker.....	100
5.3.5 Auswertung der Schwelle \leq CIN3/Karzinom	101
5.4 Abschluss und Perspektive	103
Literaturverzeichnis	105
Abbildungsverzeichnis	112
Tabellenverzeichnis	114
Eidesstattliche Erklärung	117
Lebenslauf	118
Danksagung	118

Abstract (deutsch)

Einleitung: Das Dysplasierisiko einer zervikalen Infektion mit dem Humanen Papillomvirus (HPV) abzuschätzen, ist mit aktuellen Screening-Methoden nur eingeschränkt möglich. Das onkogene Potential dieser Infektionen bedingt hauptsächlich die Entstehung zervikaler Karzinome. Während 38% der Frauen im Alter von 20-25 Jahren eine HPV-Infektion aufweisen, entwickelt sich nur bei einem kleinen Prozentsatz der Frauen eine Dysplasie. Ein idealer HPV-basierter Screening-Algorithmus müsste die Aussagekraft besitzen, transiente HPV-Infektionen von solchen mit hohem Dysplasierisiko zu differenzieren. Dieses Projekt untersucht, ob zervikale HPV-Infektionen verschiedener Dysplasiestadien molekularbiologisch anhand zellulärer Biomarkerexpression charakterisiert werden können. Zudem wird eine neuartige Methode der E7-Onkogen-basierten HPV-Genotypisierung evaluiert.

Methoden: Für 218 zervikale Abstriche verschiedener Dysplasiegrade wurde eine quantitative mRNA-Messung (QuantiGene® 2.0 Assay) für ein Panel 23 zellulärer Biomarker, sowie für das Onkogen E7 von 18 high-risk HPV-Typen durchgeführt. Durch die Techniken der „Branched DNA“-Amplifikation und „Multi-analyte Profiling Beads“ ermöglicht der Assay eine quantitative Messung, deren Sensitivität auf Amplifikation des Signals beruht. Die Auswertung erfolgte durch einen Luminex-Readout. Die Expressionsstärke der Biomarker wurde auf einen Marker der Zellularität (Expressionsstärke des Housekeeping-Gens beta-Aktin, ACTB) relativiert. Referenzmethode für die Evaluierung der Genotypisierung war die BSGP 5+/6+-MultiPlex Genotypisierung (MPG). Die Korrelation der zellulären Biomarker mit den pathologisch und klinisch bestimmten Dysplasiegraden wurde errechnet. Auf Basis der signifikant korrelierenden Marker wurden über die statistischen Instrumente der ROC-Analysen und der logistischen Regression Kombinationsmodelle an Trennwerten der Expressionshöhe für die wichtigen Stadien (Infektion, prämaligne Dysplasie, invasives Karzinom) errechnet.

Ergebnisse: Im Vergleich der E7-mRNA-basierten HPV-Genotypisierung mit PCR-basiertem MPG zeigten **55,9%** der Proben ein exakt gleiches Ergebnis. **82,8%** zeigten ein mindestens teilweise gleiches Ergebnis (bei multiplen HPV-Infektionen mindestens ein identischer HPV-Typ). In **88,9%** der Fälle war der führende HPV-Typ (stärkste E7-Onkogenexpression) auch in der Referenzmethode positiv. Die Expression der Onkogene E6 und E7, sowie von acht Biomarkern (p16, STMN, p63, ALDH1A1, KRT17, MCM2, Ki67, BIRC5) korrelierte signifikant mit dem Dysplasiegrad. Über ein Berechnungsmodell, welches die Marker E7, ALDH1A1 und MCM2 einschließt, wurde für die Schwelle \leq CIN2/CIN3+ eine **AUC von 0,903** und eine

Sensitivität von 86,9%, Spezifität von 81,4% für die richtige Zuordnung der Gruppen errechnet. Für die Schwelle \leq CIN3/Karzinom wurde über die Marker E7, HPV16E6, STMN1 und KRT17 eine **AUC von 0,913** gefunden (**Sensitivität: 85,2%, Spezifität: 77,2%**).

Interpretation: Als Pilotprojekt zeigt diese Studie, dass zervikale Dysplasien über Biomarker als biologische Entitäten und rein molekulare Methoden charakterisiert werden können. Als nächster Schritt sollte mit einer höheren Fallzahl und prospektiven Design die Reproduzierbarkeit der Daten und somit die Aussagekraft der Marker bestätigt werden.

Abstract (englisch)

Background: Currently, no screening tool allows a precise estimate of the risk of progression towards dysplasia in cervical infections with the Human Papilloma Virus (HPV). HPV-infections are the main cause of cervical cancer. While 38% of women age 20-25 screen positive for HPV-infections, only a small percentage of these infections will develop towards dysplasia. Ideally, an HPV-based screening algorithm should differentiate transient HPV-infections from transforming ones. This project examines whether different stages of dysplasia induced by HPV infections can be characterized by means of biological markers. Secondly, this study evaluates of a new E7-based method of HPV-genotyping.

Methods: Quantitative mRNA-testing (QuantiGene® 2.0 Assay) was performed for a panel of 23 cellular biomarkers and the oncogene E7 of 18 high-risk HPV-types for 218 cervical smears. Using branched-DNA-amplification and multi-analyte profiling beads, the targets were analyzed quantitatively with its sensitivity based on signal amplification. The results were recorded by a Luminex-readout and expression levels of each marker were relativized by the expression levels of Actin-b as a marker of cellularity. BSGP5+/6+-multiplex genotyping (MPG) was used as reference method for the evaluation of the new genotyping method. The correlation of biomarker expression with degree of dysplasia was calculated. Mathematical models based on expression-level cut-offs of the correlating biomarkers were established by the statistical methods of ROC-analysis and logistic regressions for relevant pathological thresholds.

Results: E7-mRNA-based HPV-genotyping showed identical results compared to the PCR-based MPG in 55,9% of the samples. 82,8% showed partially identical results (in multiple infection at least one matching HPV-type). In 88,9% of cases, the leading HPV-type in QuantiGene (strongest expression of E7) was also detected via MPG. The expression of the oncogenes E6 and E7, as well as of eight biomarkers were seen to significantly correlate with stages of dysplasia. By means of mathematical models based on expression levels of E7, ALDH1A1 and MCM2, the sample were correctly attributed over the threshold \leq CIN2/CIN3+ with an AUC of 0,903, a sensitivity of 86,9% and a specificity of 81,4%. The threshold of \leq CIN3/carcinoma was defined by expression levels of E7, STMN1 and KRT17 with an AUC of 0,913 (sensitivity: 85,2%, specificity: 77,2%).

Interpretation: As a pilot project this study shows that stages of cervical dysplasia can be defined as biological entities via molecular biomarkers. In a next step, reproducibility of the data and the significance of the biomarkers should be confirmed with a higher number of cases and a prospective design.

Einleitung

1.1 Vorgeschichte

Ada Lovelace (1815 - 1852), britische Mathematikerin und erste weibliche Pionierin in der Programmierung von (mechanischen) Computern, stellte sich 1851 wegen rezidivierenden vaginalen Blutungen, starker Schmerzen und vermindertem Allgemeinzustand bei ihrem Hausarzt vor. Vorangegangene Therapien (Silbernitrat, Blutegel, Weinkonsum und Abstinenz von geistig-intellektueller Arbeit, die „augenscheinlich die weibliche Gesundheit ruinierte“) hatten keine Besserung gebracht und so führte der Arzt eine nur in schweren Fällen angewandte „innere Untersuchung“ durch und beschrieb eine „ausgeweitete, tiefsitzende“ – also vaginal erreichbare - Läsion als Quelle der Blutungen und Schmerzen.¹ Er stufte diese als benigne ein und hielt an dem Behandlungsplan fest. Lovelaces Zustand verschlechterte sich jedoch progressiv und sie starb ein qualvolles Jahr später. 1851 war die Entität des Zervixkarzinoms noch nicht definiert. Der diagnostische Algorithmus beschränkte sich auf eine primitive Form der **makroskopischen Begutachtung** und die Therapie war kaum spezifisch.

1928 veröffentlichte der griechische Arzt George Papanicolaou eine Studie, in der er vaginale/zervikale Abstriche im Mikroskop begutachtet hatte und die Zellmorphologie der Abstriche gesunder Frauen mit denen von Frauen mit unterschiedlichen vaginalen Erkrankungen verglich. Er beschrieb ein abnormales Wachstumsverhalten und Zellkernveränderungen als Charakteristika einer malignen Veränderung der Zervix: *„The changes of the cells are mainly an abnormal growth and the development of the nucleus of the cell. The nucleus becomes very large, out of proportion to the cell, and becomes very dark and dense, and often it shows fragmentation. It breaks up in pieces“*.²

Dieser Wechsel auf die **mikroskopische Ebene** der Pathologie war ein Meilenstein für das Verständnis und die Diagnostik von zervikalen Dysplasien. Seit 1971 ist der Abstrich nach Papanicolaou (Pap-Abstrich) Basis der zervikalen Vorsorgeuntersuchungen. Papanicolaou endete seine Veröffentlichung von 1928 mit der Perspektive: *“We have a better understanding of the situation in a cancer case, and we may have some help in analyzing the cancer problem in the future. I think this work will be carried a little further“*.²

„Ein wenig weitergetragen“ wurde das Verständnis des Zervixkarzinoms 1987 durch eine Veröffentlichung von Harald zur Hausen, die das Humane Papillomvirus (HPV) ursächlich mit der Entstehung einer zervikalen Dysplasie in Verbindung brachte.³ Zusammen mit seinen

Mitarbeitern Prof. L. Gissmann, M. Dürst und H. Ikenberg identifizierte er die Subtypen 16 und 18 in Zervixkarzinomen und führte hiermit die **Molekularbiologie** als neue Dimension in das Verständnis der Pathologie ein. Heute ist es allgemein bekannt, dass eine Infektion mit einem high risk HPV-Typen der Hauptrisikofaktor für die Entstehung eines Zervixkarzinoms ist. Während der Großteil der häufigen Infektionen transient sind und von einer ausreichenden Immunantwort eliminiert werden, entwickeln sich wenige Infektionen zu einem Karzinom.⁴

1.2 Das Humane Papillomvirus

1.2.1 Struktur, Genom und Klassifikation

Das HPV ist ein ikosaedrisches, unbehülltes Virion mit einem doppelsträngigen, zirkulären DNA-Genom von ca. 8 Kbp Größe. Die kodierenden Sequenzen des Genoms (open reading frames, ORF) sind unterteilt in die „early-Gene“ (E1, 2, 4-7) und „late-Gene“ (L1, 2). Die early-Gene werden zu Beginn des viralen Lebenszyklus exprimiert und sind auch in infizierten Zellen vorhanden, die eine nicht-produktive Infektion ausweisen. Ihre Proteine ermöglichen den Beginn der viralen DNA-Replikation (E1 und E2), kontrollieren diese (E2) und ermöglichen den viralen Lebenszyklus in dem infizierten Plattenepithel (E5, E6, E7).⁴ E6, E7 und E5 sind die essentiellen Faktoren, die eine maligne Progression ermöglichen. Diese Vorgänge werden im Folgenden besprochen. L1 und L2 kodieren die Kapsomer-Proteine der Kapsidhülle. Ihre Expression findet sich ausschließlich in produktiven Infektionen und findet statt in den differenzierten Zellen der stratifizierenden Epithelien.⁵

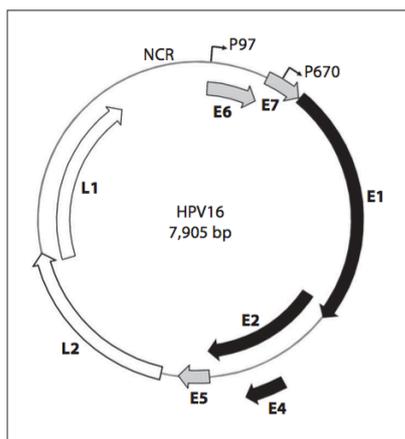


Abbildung 1: Schema der Organisation des HPV16-Genomes. *Quelle: modifiziert nach Pfister, 2012⁴*

Anhand der Ähnlichkeit des ORFs der L1-Sequenz werden die HPVs in 5 Genera (α , β , γ , μ , ν) unterteilt. HPV-Typen, die benigne Hautwarzen hervorrufen, sind in allen Genera zu finden. Die high risk- und low risk-Typen, die Karzinome bzw. genitale Kondylome verursachen gehören alle

dem Genus α an.⁶ Dieses legt nahe, dass die onkogenetischen Eigenschaften nur zu einem einzigen Zeitpunkt entstanden sind.

1.2.2 Der virale Lebenszyklus

Der Lebenszyklus des HPV weist einige außergewöhnliche Aspekte auf. Das Verständnis seines Ablaufs ist von großer Wichtigkeit, da es die Quelle und Erklärung der onkogenetischen Eigenschaften des Virus beinhaltet.

Die Zielzellen des HPVs sind die Basalzellen eines Plattenepithels, also die einzigen proliferierenden Zellen des Gewebes. Über Mikroläsionen der Haut oder Mukosa findet das HPV Zugang zu der Basalmembran des Gewebes, bindet hier über das L1-Protein an Heparansulfat-Proteoglykane und gelangt so in die Basalzellen, die in das Wundbett migrieren.⁷ Die Mikroläsion bildet also nicht nur den räumlichen Zugang, sondern liefert auch proliferierende Keratinozyten. Nach den Schritten des Eindringens und Uncoatings verbleibt das Virusgenom als Episom im Zellkern.

Doeberitz und Vinokurova teilen in ihrem Review von 2012 den Ablauf einer HPV-Infektion in drei verschiedene Phasen ein: Latenz, Permissivität und Transformation.⁴ Nach der Penetration der Basalzellen befindet sich das Virus in einer **Phase der Latenz**. Einige Infektionen schaffen hieraus den Übergang in eine **permissive Phase**, die durch eine beginnende Expression der Gene E6 und E7 gekennzeichnet ist. In diesem Stadium wird die Expression von E6/E7 durch das im E2-Gen kodierte Protein kontrolliert und limitiert. Infektionen, bei denen dieses Expressionsmuster nicht initiiert wird, enden als „abortive“ Infektionen. Es ist anzunehmen, dass ein Großteil der Infektionen diesem Verlauf folgt und als transiente Infektionen keinerlei Risiko für eine maligne Entwicklung darstellt.⁸

Während der permissiven Phase folgt die virale Vermehrung dem Differenzierungsprozess der infizierten Basalzellen. Während die meisten Virusarten eine Zielzelle infizieren und sich in dieser replizieren, findet beim HPV die Produktion neuer Virione erst nach mitotischer Teilung der Zellen statt. Physiologischerweise steigen die Epithelzellen im Prozess ihrer Differenzierung in die höheren Zellschichten des Epithels auf und verlassen als differenzierte Zellen die S-Phase des Zellzyklus.⁹ Suprabasale Zellen, die mit HPV infiziert sind, verbleiben während ihrer Differenzierung aktiv im Replikationszyklus und erhalten sich somit das enzymale Milieu der S-Phase. Das HPV-Genom kodiert keine Enzyme, die für die Virusreplikation notwendig sind. Somit ist das Virus abhängig von der enzymalen Ausstattung der Wirtszelle und die Arretierung in der

S-Phase ist Voraussetzung der viralen Genomreplikation. In HPV-infizierten Zellen bewirkt eine Hochregulation der viralen Gene E5-7, dass die Wirtszellen die S-Phase nicht verlassen. Die Wirkmechanismen dieses Prozesses sind im folgenden Abschnitt genauer beschrieben.

In den oberen Schichten des Epithels verändert sich das Expressionsmuster des Virus und die Kapsidgene L1 und L2 werden exprimiert als Vorbereitung für die Reifung und den Zusammenbau der Viruspartikel an der Oberfläche des Gewebes.

Von dieser permissiven Phase ausgehend kann die Infektion transformierende Eigenschaften annehmen. Die **Phase der Transformation** ist dadurch gekennzeichnet, dass in den Basalzellen die Limitierung der Onkogen-Expression durch E2 durchbrochen wird und eine Überexpression von E6 und E7 stattfindet. Hiermit beginnt die Pathogenese der malignen Entartung des Epithels.

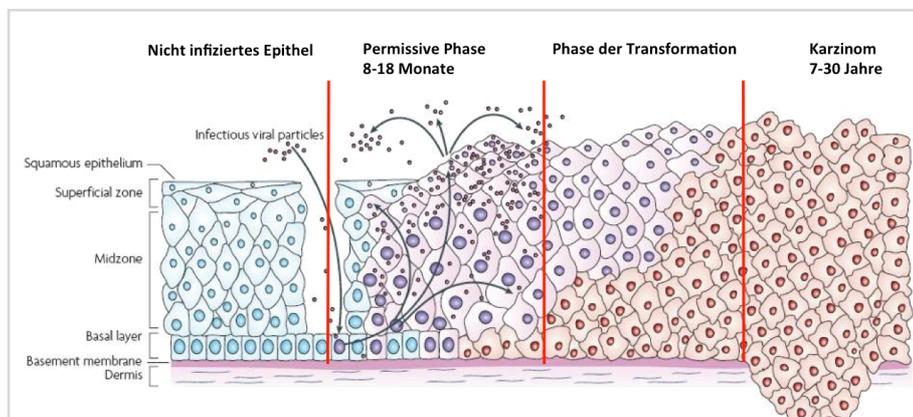


Abbildung 2: Stadien der HPV-Infektion. Physiologisches Epithel (blau, infizierte Zellen der permissiven Phase (violett), transformierte Zellen assoziiert mit aufgehobener Onkogenkontrolle durch E2 und Überexpression von E6/7 (rot). *Quelle: modifiziert nach Nature Reviews Cancer: Vol.7: 11-22 (Januar 2007)¹⁰*

1.2.3 Onkogenetische Mechanismen

In HPV-infizierten Zellen wird die Fähigkeit zur Proliferation, also die enzymatische Ausstattung der DNA-Replikation, von dem Differenzierungsgrad der Epithelzellen abgekoppelt. Die wichtigsten viralen Faktoren, die diese Arretierung der S-Phase ermöglichen sind in den Genen E6 und E7 kodiert. Im Folgenden sollen die Funktionsweisen dieser beiden Proteine genauer beschrieben werden.

1.2.3.1 E7

E7 weist als Protein keinerlei intrinsische Aktivität als Enzym oder Transkriptionsfaktor auf, sondern wirkt über die Bindung von zellulären Faktoren. Am besten charakterisiert ist seine Interaktion mit der Familie der Retinoblastom-Proteine (Rb). Diese Proteine sind als Tumorsuppressoren Teil des zellulären Kontrollsystems, das die proliferative S-Phase des Zellzyklus reguliert. Sie kontrollieren den Übergang der G1-Phase in die S-Phase.¹¹ Durch

Bindung an Transkriptionsfaktoren der Familie E2F verhindert Rb die Expression ihrer Zielgene, die den Übergang in die S-Phase ausmachen. E7 induziert den Abbau von Rb über das Ubiquitin-Proteasomen-System und disinhibiert somit die Expression der E2F-responsiven Gene (z.B. Cyclin A und E). Die DNA-Synthese der S-Phase wird hiermit ermöglicht. Eine weitere bekannte Interaktion ist die Bindung der Histondeacetylase durch E7. Diesen Eingriff in die episomale Regulierung der Zellen dient ebenfalls dem Zweck, den Status der S-Phase auch in suprabasalen Zellen zu erhalten und somit die Produktion der Virione zu ermöglichen.¹²⁻¹⁴ Auch die Disinhibition der CDK2 über Modifikation der CDK2-Inhibitionen p21 und p27 scheint ein Weg zu sein der E7-vermittelten Stabilisierung der S-Phase.¹⁵

Für alle HPV-Typen sind die Wirkmechanismen von E7 identisch. Das E7 der high risk HPVs bindet Rb-Proteine allerdings mit einer höheren Affinität.^{16,17}

1.2.3.2 E6

Auf den E7-vermittelten Eingriff in den Rb-E2F-Komplex reagiert die Zelle mit einer Hochregulation des Tumorsuppressors p53.¹⁸ Als Ultima Ratio leitet p53 den Übergang in einen programmierten Zelltod ein. Die Funktion des zweiten wichtigen HPV-Onkogens ist es, diesen Sicherheitsmechanismus auszuschalten. Kodiert ist er in dem E6-Gen. Durch die Bindung von E6 wird p53 in einem trimerischen Komplex mit dem E6-assoziierten Protein für den Abbau über das Ubiquitin-Proteasomen-System markiert.¹⁹ Außerdem verhindert E6 sterisch die DNA-Bindung von p53.²⁰ Das E6 von low risk-HPV bindet ebenfalls p53, führt allerdings nicht zu dessen Degradation.

Diese Blockierung der p53-vermittelten Apoptose ist der zweite essentielle Faktor für den Erhalt einer proliferativen Kapazität in differenzierten suprabasalen HPV-infizierten Zellen. Gleichzeitig behindert dies die Mechanismen der Zell-DNA-Reparatur und der Elimination genetisch geschädigter, transformierter Zellen. Eine weitere karzinogene Eigenschaft des E6-Proteins liegt in der Aktivierung der Telomerase-reversen-Transkriptase (TERT), wodurch die physiologische Limitierung der proliferativen Kapazität einer Zelle aufgehoben wird.²¹

Der Erhalt des S-Phase-Milieus in differenzierten Zellen, das Ausschalten von Apoptose und Reparaturmechanismen und eine immortalisierende Wirkung sind die zentralen Aspekte der synergistischen Aktivität von E6 und E7. Dies sind auch die Voraussetzungen der die maligne Transformation einer Zelle.

Neben den soeben beschriebenen wichtigsten onkogenen Aspekten sind weitere Mechanismen zu beobachten. Infizierte Zellen weisen in der Transformationsphase multipolare Mitosen mit einer abnormalen Anzahl an Centromeren auf.²² Es wurde gezeigt, dass E6 und E7 eine direkt schädigende Wirkung auf DNA haben.²³ Ebenso fördern sie die Integration von Fremd-DNA und es entsteht eine Resistenz gegen wachstumshemmende Zytokine und antivirale Interferone.²⁴

1.2.3.3 Weitere Onkogene

Das Protein des early-Genes **E5** unterstützt die transformierende Aktivität von E6 und E7 und fördert Hyperproliferation von infizierten Zellen.²⁵ Zielmolekül ist der epitheliale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR). Es konnte gezeigt werden, dass seine Halbwertszeit in Anwesenheit von E5 verlängert ist und dass unter E5 wirkungsverstärkende Veränderungen in den untergeordneten Signalkaskaden des Rezeptors austreten.²⁶ Immunevasion, also inhibierende Interaktion mit Vermittlern des Immunsystems (Downregulation der Major Histokompatibilitätskomplexe (MHC), Interaktion mit der Zyklooxygenase (COX)-2 und Inhibierung der Natural Killer-Zellen), ist ein weiterer Aspekt der E5-vermittelten Onkogenität.²⁷ Die genauen Wirkmechanismen des Onkoproteins E5 sind bisher nur unvollständig verstanden.

E2 fungiert als Replikationsfaktor, reguliert die Expression der early-Gene und verhindert eine Überexpression von E6 und E7, um eine effiziente Vermehrung und Freisetzung von Viruspartikeln zu gewährleisten. 50% der HPV16 positiven Karzinome weisen eine virale DNA auf, die in das Genom der Wirtszelle integriert ist. Die Integration der Virus-DNA beschädigt häufig das E2-Gen und führt somit zu einer unkontrollierten Expression von E6 und E7.²⁸

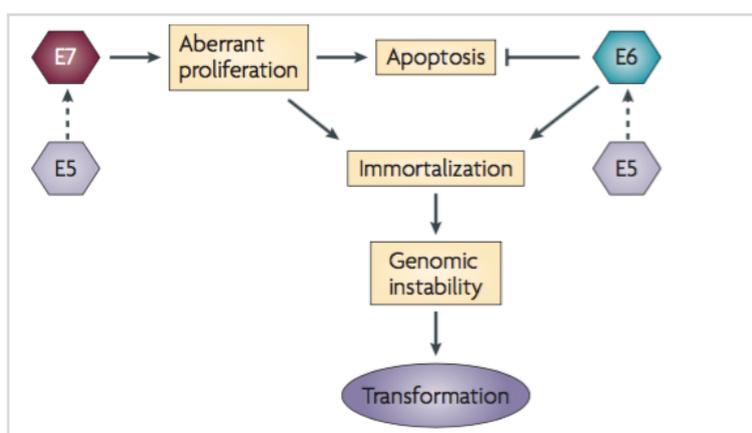


Abbildung 3: Schema der synergistischen Wirkung der Onkogene E5, E6 und E7. *Quelle: modifiziert nach Nature Review Cancer, Vol. 10 S.554, August 2010*²⁹

Eine high risk-HPV-Infektion führt nur in wenigen Fällen zu der Entstehung eines Zervixkarzinoms. Dies zeigt, dass nur wenige Infektionen in eine transformierende Phase übergehen und dieser Schritt mithin als aberrante Entwicklung einer Infektion anzusehen ist.

Ist dieser Fall eingetreten, dann bilden die Onkogene des HPV eine Situation der Vulnerabilität gegen äußere Stressoren. DNA-Schäden akkumulieren mit der Zeit, und die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung eines Karzinoms ist erhöht sich drastisch. Zudem wird eine adäquate Immunantwort durch Interaktion der Onkogene (v.a. E5) inhibiert. Die lange Latenz zwischen HPV-Infektion und Auftreten des Karzinoms ist Ausdruck dieser Mechanismen.

1.3 Aufbau des zervikalen Epithels

Obwohl im Rahmen der sexuellen Transmission ebenso Vulva, Vagina, Penis, Anus und die Schleimhaut des Mund-Rachen-Raums dem HPV exponiert werden, sind die Inzidenzen der HPV-induzierten Karzinomen außerhalb der Zervix im Vergleich zum Zervixkarzinom erstaunlich niedrig. Der Aufbau des zervikalen Epithels liefert Gründe für diese topographische Häufung.

Auf der Portio vaginalis uteri befindet sich der Übergang des endozervikalen Zylinderepithels in das Plattenepithel der Portio und Vagina. Diese Grenze wird als Junktion oder Transformationszone (T-Zone) bezeichnet, wobei sich um diese Grenze herum eine Übergangszone festmachen lässt. Diese Übergangszone ist der Ort, an dem der Großteil der Dysplasien entstehen.³⁰ Eine vaginale pH-Erniedrigung während der Pubertät induziert eine metaplastische Umwandlung des distalen Zylinderepithels in Plattenepithel. Hierdurch kommt es zu einer Verschiebung der T-Zone von einer einsehbaren Position auf der Portio in die innere Zervix.

2012 konnten M. Herfs und C.P. Crum in einer histologischen Analyse der T-Zone eine kleine Population kubischer Epithelzellen identifizieren.³¹ Diese Zellen weisen ein spezifisches Expressionsmuster auf, das eine klare Unterscheidung zu sowohl dem Zylinder- als auch dem Plattenepithel möglich macht. Diese Zellen weisen im Gegensatz zu Zylinder- und auch Plattenepithelzellen eine hohe Suszeptibilität für Transdifferenzierung und somit für das Entstehen einer Morphologie von high grade Läsion (HSIL). 5 Transkripte und exprimierte Proteine spezifische für diese Zellen konnten identifiziert werden: Keratin 7 (KRT7), Anterior Gradient 2 (AGR2), Cluster Differentiation 63 (CD63), Matrixmetalloproteinase 7 (MMP7), Guanin-Deaminase (GDA).

Es konnte gezeigt werden, dass zervikale Karzinomzellen und Zellen von high grade Läsionen ebenfalls das Expressionsprofil dieser kubischen Zellpopulation der T-Zone aufweisen.³¹ Die Beobachtung legt nahe, dass diese Zellpopulation der Ausgangspunkt der zervikalen Dysplasie

sein könnte. Hierin könnte der Grund liegen für die weitgehende topographische Beschränkung der HPV-induzierten Karzinome auf die Zervix.

1.4 Epidemiologie der HPV-Infektion und des Zervixkarzinoms

Genitale Infektionen mit dem Humanen Papillomvirus stellen einen häufigen Befund bei sexuell aktiven Frauen dar und sind als zwangsläufige Konsequenz sexueller Aktivität anzusehen. Eine Kohortenstudie in Bogotá konnte ermitteln, dass das kumulative Risiko, sich innerhalb von 5 Jahren neu mit einem HPV-Typ zu infizieren vor allem für junge (Alter: 15-19 Jahre), sexuell aktive Frauen mit 43% sehr hoch ist, aber auch für Frauen, die älter als 45 Jahre sind, bei 13% liegt.³²

Aus den mehr als 150 identifizierten Genotypen des Humanen Papillomvirus werden aktuell 18 Typen mit der Entstehung von Präkanzerosen und Karzinomen assoziiert und daher als high risk-HPV (HR-HPV) -Typen klassifiziert.³³ 19 Typen gelten als Verursacher von anogenitalen Kondylomen und werden daher als Gruppe der low risk-HPV (LR-HPV)-Typen zusammengefasst. HPV16 und 18 stellen die wichtigsten Vertreter der Gruppe der high risk-Typen dar und machen zusammen die Ursache von 80% aller Zervixkarzinome aus. 54,1% der hochgradigen Dysplasien und 26,9% der niedriggradigen Dysplasien sind positiv für mindestens einen dieser Typen. Aber auch bei 3,8% der europäischen Frauen mit normaler Zytologie lässt sich einer dieser Typen nachweisen.³⁴ Unabhängig vom HPV-Typ weisen 15-22% der jungen Frauen unter 30 Jahre eine HPV-Infektion auf (s. Abbildung 4).

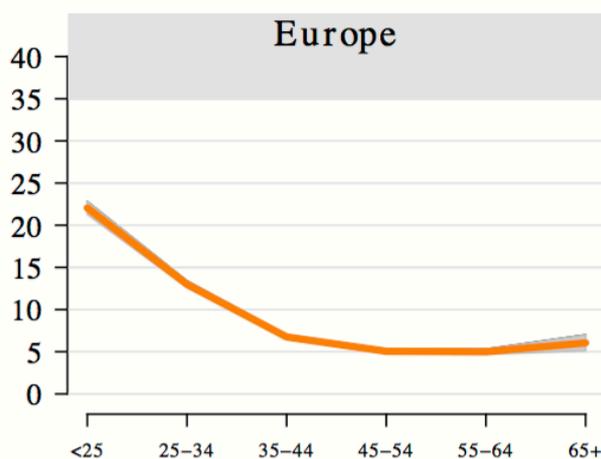


Abbildung 4: Altersabhängige Prävalenz des HPV in Europa (95%KI) bei Frauen mit unauffälliger Zytologie. Quelle: *Human Papillomavirus and Related Diseases in Europe. ICO Information Centre on HPV and Cancer; Summary Report 2015*³⁵

Durch alle Stadien einer HPV-induzierten Läsion hindurch bleibt HPV16 der häufigste HPV-Typ; seine Häufigkeit relativ zu den anderen HR-HPV-Typen steigt mit zunehmendem Grad an Dysplasie (s. Abbildung 5).

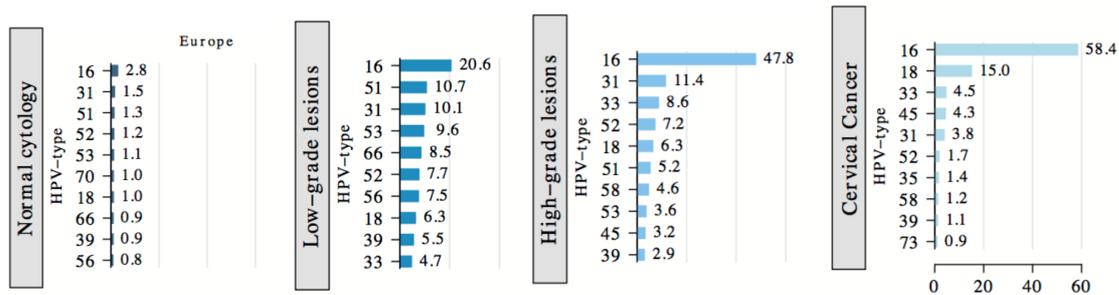


Abbildung 5: Übersicht der 10 häufigsten high risk HPV-Typen bei verschiedenen Stadien der Dysplasie (Europa). Modifiziert nach: *Human Papillomavirus and Related Diseases in Europe. ICO Information Centre on HPV and Cancer; Summary Report 2015*³⁵

Ein Einblick in die epidemiologischen Zahlen der HPV Infektion und des Zervixkarzinoms unterstreicht die Wichtigkeit eines suffizienten Screening-Programms. 2012 erkrankten weltweit ca. 527.000 Frauen am Zervixkarzinom, davon ca. 58.000 in Europa. Weltweit starben im gleichen Jahr 265.000 Frauen an dieser Diagnose.³⁶ Hiermit steht diese Pathologie an 4. Stelle der Krebsbezogenen Todesfälle weltweit, für europäische Frauen an 6. Stelle und an zweiter Stelle für junge europäische Frauen (Alter 15-44 Jahren). Laut Zahlen des Krebsregisters des Robert-Koch-Instituts erkrankten 2012 in Deutschland ca. 4.500 Frauen an einem Zervixkarzinom, 1600 Frauen starben an dieser Erkrankung. Für das invasive Karzinom beträgt das mittlere Erkrankungsalter 53 Jahre, für in-situ-Karzinome 34 Jahre. Die Pathologie betrifft also Frauen in jungen Lebensjahren.

Seit der Einführung eines gesetzlichen Früherkennungsprogramms (Krebsvorsorge) 1971 und der konsequenten chirurgischen Entfernung hochgradiger Dysplasien konnte die Inzidenz der Zervixkarzinome drastisch gesenkt werden. Die Rate an Neuerkrankungen ist jedoch seit den 1990er Jahren wenig gesunken (s. Abbildung 6).

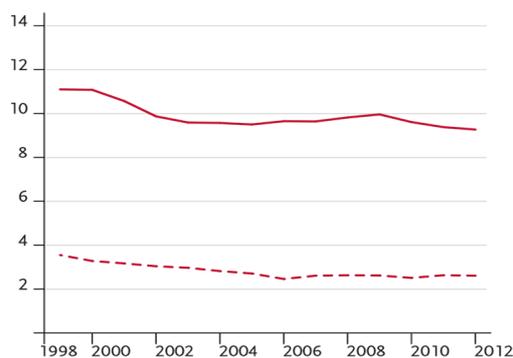


Abbildung 6: Altersstandardisierte Erkrankungsrate (durchgezogene rote Linie) und Sterberaten (gestrichelte rote Linie) des Zervixkarzinoms (ICD-10 C53), Deutschland 1999-2012, je 100.000 Frauen (Europastandard); *Quelle: Website: Zentrum für Krebsregisterdaten, Robert-Koch-Institut*³⁷

1.5 Strategien der Prävention

1.5.1 Primärprävention: Impfung

2006 wurde der erste Impfstoff der Firma Sanofi Pasteur & MSD gegen das HPV zugelassen. Als Antigen zur Immunisierung wird das Kapsidprotein des late-Genes L1 verwendet. Da sich HPV nur in vivo und nicht in vitro vermehrt, wird das Protein über rekombinante gentechnische Verfahren in Hefekulturen hergestellt. Die L1-Kapsomere formen spontan ein Virus-ähnliches Partikel mit einem leeren Kapsid ohne virale DNA. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die derzeit zugelassenen Impfstoffe.

Tabelle 1: Übersicht über verfügbare Impfstoffe gegen das HPV

	Gardasil®	Cervarix®	Gardasil®9
Hersteller, Zulassung	Sanofi Pasteur&MSD, 2006	GlaxoSmithKline, 2007	MSD, 2015
HPV-Typen	Low risk: 6, 11 High risk: 16, 18	High risk: 16, 18	Low risk: 6, 11 High risk: 16, 18, 31, 33, 45, 52 und 58
StiKo-Empfehlung	Ja	Ja	Ja
Impfschema	i.m.-Injektion in Monaten 0, 2 und 6	i.m.-Injektion in Monaten 0, 1 und 6	i.m.-Injektion in Monaten 0, 2 (und 6), 9-14 Jahre: 2 Dosen, ab 15 Jahre: 3 Dosen

Die Studie „Papilloma Trial against Cancer in Young Adults“ (PATRICIA) konnte eine Schutzwirkung des bivalenten Impfstoffes Cervarix® von 100% gegen die HPV-Impfstofftypen zeigen.³⁸ In Anbetracht der Prävalenz der eingeschlossenen HPV-Typen wurde eine Wirksamkeit des Impfstoffes von 52% für CIN2 und 71% für CIN3 errechnet. Laut der PATRICIA-Studie waren allerdings 93% der Frauen ohne vorherigen HPV-Exposition gegen CIN3 geschützt. Diese um 20% erweiterte Wirksamkeit lässt sich durch eine immunogene Kreuzreaktion zwischen den verschiedenen HPV-Typen erklären.

Mit Gardasil®9 wurde der klassische Gardasil-Impfstoff um die HPV-Typen 31, 33, 45, 52 und 58 erweitert, um so eine Gesamteffektivität von 89% im Verhindern von zervikalen Dysplasien zu erreichen.

Trotz guter Wirksamkeit und bestätigter Sicherheit lag die Impfquote der 14-17-jährigen Mädchen in Deutschland 2014 gerade einmal bei 40%.³⁹ Dieses Ergebnis legt nahe, dass Vorsorgeprogrammen der Sekundärprävention weiterhin eine wichtige Rolle zukommen wird.

1.5.2 Sekundärprävention: Algorithmus der Vorsorge

1971 wurde in Deutschland das erste gesetzliche Früherkennungsprogramm für das Zervixkarzinom eingeführt. Aktuell hat jede Frau ab dem 20. Lebensjahr Anrecht auf Erstattung einer Untersuchung pro Jahr. Die zytologische Beurteilung eines Pap-Abstriches, die makroskopischen Aspekte der Kolposkopie und histologische Auswertung von Biopsiematerial stellen hierbei die drei Säulen der Vorsorge dar. Die S3-Leitlinie der Prävention des Zervixkarzinoms (Februar 2016) hat zum ersten Mal die Anwendung von HPV-Tests als weitere Säule der Diagnostik einführen.

1.5.2.1 Zytologie: der Pap-Test

Für die zytologische Methode des Pap-Tests wird mit einem Abstrichinstrument (z.B. Tupfer oder Bürste) repräsentatives Zellmaterial sowohl vom endozervikalen als auch vom ektozervikalen Bereich des Gebärmutterhalses gewonnen. Dieses Material wird auf einen Glasobjektträger ausgestrichen, fixiert und unter einem Lichtmikroskop begutachtet. Die entnommene Probe kann hierbei Basalzellen, Parabasalzellen, Intermediär- und Superfizialzellen enthalten, sowie Zellen des Zylinderepithels und der vaginalen Flora.

Das mikroskopische Korrelat einer HPV-Infektion im Stadium einer CIN1 sind dyskaryotische Zellen mit zytoplasmatischer Aufhellung, die als Koilozyten bezeichnet werden (s. Abbildung 7). Das Vorliegen von Zellen mit stark zum Kern verschobener Kern-Zytoplasma-Relation und in HE-Färbung hyperchrom erscheinenden Kernen ist Merkmal einer CIN1.

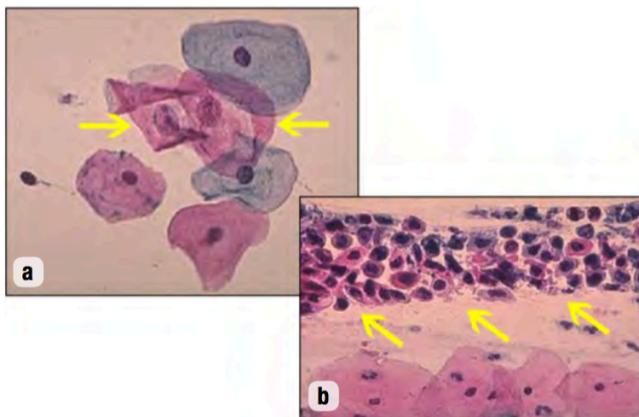


Abbildung 7: Zervikaler Abstrich in HE-Färbung mit Koilozyten (gelbe Pfeile in a) und dyskaryotischen Zellen entsprechend einer CIN3 (gelbe Pfeile in b). *Quelle: Schneider, A: Primäre, sekundäre und tertiäre Prävention des Zervixkarzinoms, Endopress 2015* ⁴⁰

Als **Klassifikationssystem** der Zytologie wird in Deutschland vor allem die 3.Auflage der Münchener Nomenklatur von 2014 verwendet. Als zweites System ist die US-amerikanische Bethesda-Klassifikation in Gebrauch. Tabelle 2 zeigt eine Gegenüberstellung der beiden Systeme.

Aufgrund großer Subjektivität der Auswertung und Schwierigkeiten bei der Gewinnung von repräsentativem Material weißt der Pap-Test bei guter Spezifität eine Sensitivität von 50% für die Erkennung einer hochgradigen CIN-Läsion auf.⁴⁰

Als neuere Entwicklung kann der Pap-Abstrich auch in Form einer **Dünnschichtzytologie** durchgeführt werden. Hierfür werden die entnommenen Zellen in ein Flüssigmedium gegeben und als Monolayer auf einen Projektträger aufgetragen. Die Überlagerung der relevanten Zellen durch vaginalen Mukus oder Blut kann hierdurch vermindert werden. Das Problem der adäquaten Probenentnahme bleibt allerdings bestehen. In vergleichenden Studien hat die Dünnschichtzytologie keine signifikant besseren Ergebnisse für Sensitivität und Spezifität gezeigt als konventionelle Zytologie.⁴¹

Tabelle 2: Klassifikationssystem der Ergebnisse der Pap-Tests gemäß der 3.Auflage der Münchener Nomenklatur. Quelle: Dtsch Arztebl 2014⁴²

Münchener Nomenklatur III	
Gruppe	Definition
0	Unzureichendes Material
I	Unauffällige und unverdächtige Befunde
II-a	Unauffällige Befunde bei auffälliger Anamnese
II	Befunde mit eingeschränkt protektivem Wert
II-p	Plattenepithelzellen mit geringergradigen Kernveränderungen als bei CIN, auch mit koilozytärem Zytoplasma/Parakeratose
II-g	Zervikale Drüsenzellen mit Anomalien, die über das Spektrum reaktiver Veränderungen hinausreichen
II-e	Endometriumzellen bei über 40-Jährigen in der zweiten Zyklushälfte
III	Unklare bzw. zweifelhafte Befunde
III-p	CIN 2/3/ Plattenepithelkarzinom nicht auszuschließen
III-g	Ausgeprägte Atypien des Drüsenepithels, Adenocarcinoma in situ/invasives Adenokarzinom nicht auszuschließen
III-e	Abnorme endometriale Zellen (insbesondere postmenopausal)
III-x	Zweifelhafte Drüsenzellen ungewissen Ursprungs
IIID	Dysplasiebefunde mit größerer Regressionsneigung
IIID1	Zellbild einer leichten Dysplasie analog CIN 1
IIID2	Zellbild einer mäßigen Dysplasie analog CIN 2
IV	Unmittelbare Vorstadien des Zervixkarzinoms
IVa-p	Zellbild einer schweren Dysplasie/eines Carcinoma in situ analog zu CIN 3
IVa-g	Zellbild eines Adenocarcinoma in situ
IVb-p	Zellbild einer CIN 3, Invasion nicht auszuschließen
IVb-g	Zellbild eines Adenocarcinoma in situ, Invasion nicht auszuschließen
V	Malignome
V-p	Plattenepithelkarzinom
V-g	Endozervikales Adenokarzinom
V-e	Endometriales Adenokarzinom
V-x	Andere Malignome, auch unklaren Ursprungs

1.5.2.2 Kolposkopie

Bei dieser Methode kann mit einem Kolposkop die Zervix in sechs- bis zehnfacher Vergrößerung makroskopisch untersucht werden. Applikation von 3-5%iger Essigsäure ermöglicht die Abgrenzung von normalem ausgereiftem Platten- oder Zylinderepithel zu dysplastischem Gewebe. Aufgrund ihrer niedrigen Spezifität wird die Kolposkopie nicht für das primäre Screening, sondern als Triage-Methode eingesetzt für Frauen mit abnormalen Befunden im Pap-Abstrich oder positivem high risk-HPV-Testergebnis. Ziel ist die makroskopische Untersuchung der T-Zone auf Merkmale einer normalen T-Zone bzw. pathognomonischen Zeichen einer Dysplasie. Tabelle 3 gibt einen Überblick über diese Merkmale.

Tabelle 3: Übersicht über die diagnostischen Kriterien der Transformationszone in der Kolposkopie

Transformationszone (TZ)	Merkmale
Normale TZ	Zylinderepithel unverhorntes Plattenepithel Retentionszysten (Ovula Nabothi) Offene Drüsenausführungsgänge
Atypische TZ	Leukoplakie Essigweißes Epithel Mosaikfärbung nach Essiggabe Atypische Gefäße
Schwergradig veränderte TZ	Erhabene Drüsenausgänge Ridge-Zeichen Inner border-Zeichen Rag-Zeichen

1.5.2.3 Histologie

Da die Methode der Kolposkopie in der Erkennung der oben ausgeführten Merkmale eine weitreichende Erfahrung des Untersuchenden voraussetzt, sollte ein Kolposkopie-Befund durch eine histologische Untersuchung bestätigt werden. Bei dieser Methode wird eine Gewebeprobe, die durch eine gezielte Biopsie im Rahmen einer Kolposkopie gewonnen werden kann, von einem Pathologen bewertet. Zellveränderungen, atypische Mitosen, eine veränderte Kern-Plasma-Relation sind wichtige Aspekte, die hierbei untersucht werden. Die Intaktheit der Basalmembran grenzt eine CIN von einem invasiven Karzinom ab. Die verschiedenen Stadien der CIN werden anhand des Verhältnisses von veränderten zu normalen Zellen in der Dicke des Epithels unterschieden. Wenn die Ausbreitung der atypischen, proliferierenden Zellen 1/3 der Epitheldicke nicht überschreiten, spricht man von CIN1. Ab 2/3 der Dicke spricht man von CIN2 und eine CIN3 zeigt atypische Zellkerne und Mitosen über die gesamte Dicke des Epithels.

Der Gebrauch von Biomarkern als immunohistochemische Färbungen spielt in der histologischen Diagnostik zunehmend eine Rolle. p16INK4a (Marker einer transformierenden Infektion mit HPV), Ki67 (Marker der Zellproliferation) und Stathmin1 (Onkoprotein 18; steigert Zellproliferation und ist mit höhergradigen Läsionen assoziiert) sind hierbei die wichtigsten verwendeten Marker. Die Verwendung von Tumormarkern soll im Weiteren eine wichtige Rolle spielen und wird daher unten ausführlich behandelt.

1.5.3 HPV-Tests

Die Einführung von HPV-Tests in die Präventionsstrategie beinhaltet den Übergang zu einer grundlegend neuen Ebene der Diagnostik. HPV-Tests ermöglichen Aussagen über das Virus als direkte Ursache der Pathologie. Der folgende Abschnitt soll einen Überblick über die Prinzipien des primären Screenings mit HPV-Tests geben.

Im deutschen Gesundheitssystem werden HPV-Tests zur primären Vorsorge derzeit noch als individuelle Gesundheitsleistung angesehen. Die Einführung eines primären Screenings auf der Basis von HPV-Tests wird intensiv diskutiert. Die Kosten für einen Test werden in Deutschland bei zwei Indikationen von den Krankenkassen übernommen: 1. zur Abklärung eines abnormalen zytologischen Ergebnisses oder einer auffälligen Kolposkopie; 2. als „Test of Cure“ nach Therapie durch Konisation. In den USA gelten für die Zulassung eines molekulargenetischen Tests strenge Auflagen durch die Food and Drug Administration (FDA), während in Europa die niedrigere Schwelle des European Conformity-Zeichens für In Vitro Diagnostik (CE-IVD) erreicht werden muss. Laut einer Studie von Poljak et al. existierten zu Beginn des Jahres 2016 193 kommerziell erhältliche HPV-Tests mit einer sehr starken Dynamik der Produktentwicklung innerhalb der Firmen und einer weiterhin als steigend geschätzten Tendenz der Test-Anzahl.⁴³ Ein Blick auf das wirtschaftliche Potential der HPV-Tests erklärt dies: Für 2013 wurde der weltweite Markt der Zervixkarzinom-Vorsorge auf einen Wert von 6,9 Milliarden USD geschätzt. Aktuelle Analysen berechnen eine jährliche Wachstumsrate dieses Marktes auf 20%, oder sogar 70% (www.transparencymarketresearch.com⁴³). Poljak schreibt in seinem Artikel: „*Unfortunately, today’s HPV test global market is one of the most confusing and least regulated, and with most divergent diagnostic products on the market, sometimes colloquially described as the “Wild West”*“.

Die Unterschiede zwischen den verschiedenen zur Auswahl stehenden HPV-Tests können in folgende Merkmale des Methodendesigns zusammengefasst werden:

- **Art der Genotypisierung:** In manchen Testdesigns detektiert eine Sonde mehrere HPV-Typen gleichzeitig. Somit können beispielsweise alle high-risk HPV-Typen oder Gruppen hiervon zu einem Signal zusammengefasst werden. Dies erleichtert die Auswertung, liefert allerdings keine präzise Typisierung.
- **Detektiertes Molekül:** sowohl DNA, als auch mRNA oder Proteine des Virus können als Zielstruktur verwendet werden. Für den DNA-Nachweis wird häufig das Late-1-Gen verwendet, da dieses Kapsid-Gen die größte Heterogenität zwischen den Virustypen aufweist. Die Messung der mRNA-Expression liefert neben dem Virusnachweis einen Hinweis auf den Aktivitätszustand der Infektion.
- **Target-Amplifikation oder Signal-Amplifikation:** Bei der Target-Amplifikation wird über das PCR-Verfahren die Targetstruktur vervielfältigt. Dies ermöglicht eine sehr hohe Sensitivität, lässt allerdings keine Aussage über die ursprünglich vorhandene Menge des Targets zu. Bei der Signal-Amplifikation wird das Target über eine Sonde gebunden und das Signal der Sonde über Bindung weiterer Strukturen verstärkt. Hierbei wird die ursprüngliche Targetquantität erhalten und somit eine Abschätzung der Viruslast oder Virusproduktivität ermöglicht.

Tabelle 4 zeigt die wichtigsten Merkmale einer Auswahl gängiger HPV-Assays.

Tabelle 4: Übersicht über eine Auswahl an häufig verwendeten HPV-Tests

Test-Systeme		Typisierend; Spektrum	Target	Hersteller	FDA-/CE- Zulassung	
DNA- basiert	Sonden- basiert	Hybrid Capture II	nein; 13 hr	Gesamtes Genom	Qiagen	Ja / Ja
		Cervista HPV	nein; 14 hr	L1	Hologic	Ja / Ja
	PCR- basiert	GP5+/6+ EIA/Luminex	ja; 18 hr, 7 lr	L1	Diamex	Nein / Ja
		Abbott RT hrHPV	Nur 16, 18 14 hr	L1	Abbott	Ja / Ja
		Cobas 4800	nur 16, 18 14 hr	L1	Roche	Ja / Ja
mRNA		APTIMA HPV	nein 14 hr	E6/E7	Hologic	Ja / Ja
		HPV-Proofer	ja; 7 hr	E6/E7	PreTect	Nein / Ja
Protein		Arbor Vita	(Ja) 16, 18	E6	Arbor Vita	Nein / Ja

Arbyn, Poljak et al. untersuchten in einem Review 2015, welche HPV-Tests geeignet sind, als Methode des primären Screenings eingesetzt zu werden.⁴⁴ In ihrer Beurteilung richteten sie sich nach den „Meijer-Kriterien“, die 2009 als Richtlinien zur Validierung eines HPV-Tests von einem internationalen Team aufgestellt wurden.⁴⁵ Die Meijer-Kriterien beruhen auf der Bewertung von Reproduzierbarkeit, Sensitivität und Spezifität im Vergleich mit dem Hybrid Capture-2-Test oder dem GP5+/6+ PCR–Enzyme Immunoassay (EIA). Die beiden Referenztests wurden durch große randomisierte Fall-Kontroll- und Kohortenstudien über eine Dauer von 8 Jahren validiert. Vier Tests (Cobas 4800, Abbott RealTime hrHPV, PapilloCheck, BD Onclarity) konnten somit vollständig validiert werden. Cervista HPV HR Test und GP5+/6+ PCR-Luminex konnten partiell validiert werden, wobei GP5+/6+ PCR-Luminex dem Referenztest GP5+/6+ PCR-EIA in Sensitivität und Spezifität gleicht und nur die Reproduzierbarkeit formell nicht nachgewiesen ist.⁴⁴

1.5.4 HPV-Test vs. Zytologie als primäres Screening

Über den Vergleich von Sensitivität und Spezifität (PPV, NPV) kann die Aussagekraft von Zytologie nach Pap- und HPV-Tests als Methoden der Früherkennung verglichen werden.⁴⁶ Für die Sensitivität, die in der Zytologie das große Handicap darstellt, zeigen HPV-Tests konsistent sehr gute Werte (s. Tabelle 5). Dieser Vorteil geht auf Kosten der Spezifität. Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben verursacht nur ein kleiner Prozentsatz der HPV-Infektionen eine Transformation, während der Großteil als transiente Infektionen kein Risiko für eine Dysplasie darstellt. Diese Gegebenheit erklärt, wieso die Spezifität der HPV-Tests unzureichend ist und diese Tests nur unzureichend eine Aussage über das Vorliegen einer Dysplasie liefern können (positiver prädiktiver Wert für CIN2+, s. Tabelle 5).

Tabelle 5: Vergleich zwischen HPV-Test (Hybrid Capture II) und Zytologie. *Quelle: Cuzick J et al. 2006*⁴⁶

	Sensitivität % CIN2+	Spezifität % <CIN2	Positiver Prädiktiver Wert % CIN2+
HPV-Test	96,1	90,7	15,5
Zytologie	53,0	96,3	20,3

Tabelle 6 zeigt eine genauere Analyse der Sensitivität für den Vergleich HPV-Test vs. Zytologie mit einer Aufschlüsselung nach verschiedenen Studien, dem Alter der Patientinnen und der Definition der Sensitivität (CIN2+/CIN3+). Auffällig ist, dass die Sensitivität der Zytologie innerhalb der Studien und innerhalb der Altersgruppen jung (<35 Jahre) und älter (>50 Jahre) starke Schwankungen aufweist. Das Alter zeigt hingegen keinen Einfluss auf die Sensitivität der HPV-Tests.

Tabelle 6: Vergleich verschiedener Studien: Sensitivität CIN3+/CIN2+ zwischen HPV-Tests und Zytologie, aufgeteilt nach Altersgruppen der Patientinnen. Quelle: Cuzick J et al.; 2006⁴⁶

Studie, Test	Merkmal	HPV-Test (%)			Zytologie (%)		
		Insgesamt	<35 Jahre	>50 Jahre	Insgesamt	<35 Jahre	>50 Jahre
Jena (D), GP5+/6+	Sensitivität CIN3+	93,8	92,5	100	22,5	15,1	100
	Sensitivität CIN2+	94,7	93,6	100	18,6	11,5	100
Hannover (D), HC-II	Sensitivität CIN3+	96,6	100	100	35,7	20,7	58,8
	Sensitivität CIN2+	97,5	100	100	34,3	13,2	68,2
Frankreich, HC-II	Sensitivität CIN3+	98,7	100	100	64,8	58,6	80,6
	Sensitivität CIN2+	98,1	99,2	100	62,0	57,5	81,3
Kanada, HC-II	Sensitivität CIN3+	87,7	100	--	60,8	66,4	--
	Sensitivität CIN2+	85,0	100	--	61,0	55,3	--

Die vergleichenden Ergebnisse zu Sensitivität und Spezifität konnten durch die Untersuchung von positivem und negativem Vorhersagewert ergänzt und bestätigt werden.

Dillner et al. haben die Inzidenz von CIN3+ 72 Monate nach einer Screeninguntersuchung in Abhängigkeit von der Art des Screenings untersucht.⁴⁷ Sie konnten zeigen, dass ein positives Zytologie-Ergebnis ein höheres Risiko für das Auftreten einer CIN3+-Läsion bedeutet, als ein positiver HPV-Test. Dieses Ergebnis war durch die relativ hohe Spezifität der Zytologie zu erwarten.

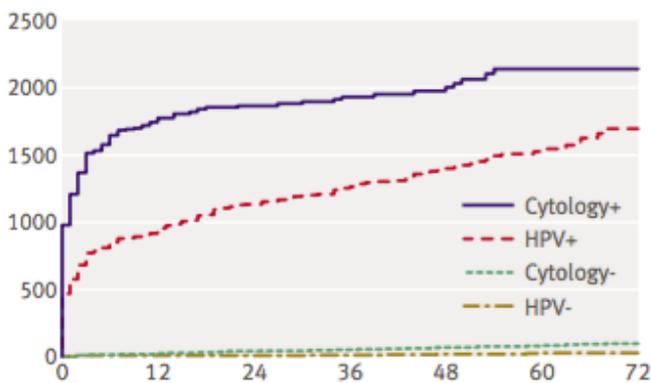


Abbildung 8: Kaplan-Meier-Kurve der kumulativen Inzidenz von CIN3+ pro 10.000 Frauen in Abhängigkeit von der Testart des Screenings zum Zeitpunkt 0 (in Monaten). Quelle: Dillner et al. 2008⁴⁷

Sie zeigten ebenfalls, dass ein positiver HPV-Test bei gleichzeitig unauffälliger Zytologie ein höheres CIN3+-Risiko bedeutet als eine auffällige Zytologie bei negativem HPV-Test (s. Abb. 9).

Dies lässt sich durch die hohe Sensitivität des HPV-Tests erklären. Die Kombination aus positivem HVP-Test und auffälliger Zytologie, also zusätzlich einer Aussage zu morphologischen Veränderungen durch die Infektion, zeigt den höchsten positiven prädiktiven Wert und erhöht auch die alleinige Aussage des HPV-Tests (HPV-Test positiv: Inzidenz CIN3+ = ca. 17% nach 72 Monaten, HPV-Test positiv und Zytologie auffällig: Inzidenz CIN3+ = ca. 35%).

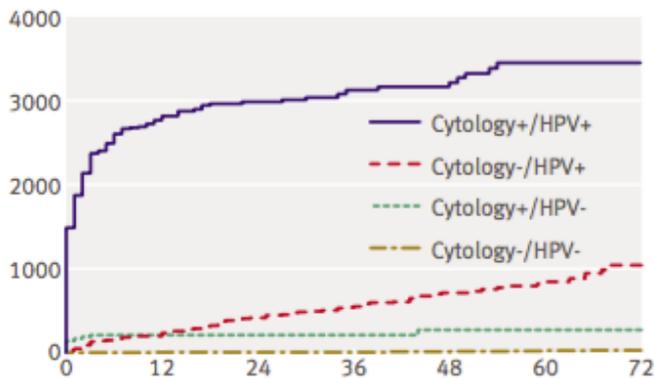


Abbildung 9: Kaplan-Meier-Kurve der kumulativen Inzidenz von CIN3+ pro 10.000 Frauen in Abhängigkeit von der Kombination der Ergebnisse von Zytologie und HPV-Test zum Zeitpunkt 0 (in Monaten). *Quelle: Dillner et al. 2008*⁴⁷

Im Vergleich zu einer rein zytologischen Diagnostik kann durch eine DNA-HPV-Testung vor allem eine höhere Sensitivität und ein höherer negativer prädiktiver Wert für die Diagnostik hoher Dysplasiegrade erreicht werden.⁴⁸

1.6 Das Projekt im Kontext der Einleitung

Der aktuell angewendete Algorithmus der Sekundärprävention beruht auf der morphologischen Beurteilung der Zell- und Gewebeveränderungen, die durch eine HPV-Infektion hervorgerufen werden. Es wird also nicht direkt die HPV-Infektion charakterisiert, die sich auf subzellulärem Niveau abspielt. Stattdessen werden zelluläre Veränderungen als Surrogatmarker der Infektion beobachtet.

Die Erkenntnisse der letzten Jahrzehnte, dass eine Infektion mit HPV die Ursache und notwendige Voraussetzung für die Entstehung eines Zervixkarzinoms ist, hat die Sicht auf diese Pathologie grundlegend verändert. Es scheint hierdurch erklärbar, dass der Pap-Test als indirekte, morphologische Diagnostik unzureichende Ergebnisse der Sensitivität liefert. Die aktuell vorhandenen HPV-Tests stellen zum ersten Mal das Virus selbst in den Fokus der Diagnostik.

Andererseits erklärt die Epidemiologie der HPV-Infektionen, warum es als Screening nicht ausreichend ist, die reine Präsenz des Virus nachzuweisen: Die häufige Infektion ist ein Risikofaktor und keine obligate „Vorstufe“ der Entartung.

Abbildung 10 visualisiert das Verhältnis von Sensitivität und Spezifität verschiedener HPV-Tests. Ein optimaler Test wäre gleichzeitig hoch spezifisch und hoch sensitiv. Er wäre somit in der linken oberen Ecke des Bildes angeordnet. Die eingezeichnete Linie markiert die klinisch akzeptable Sensitivitätsgrenze von 95%. Die linke, also gut spezifische, angestrebte Hälfte dieses Feldes ist leer: Bei guter Sensitivität erreicht kein HPV-Test eine gute Spezifität.

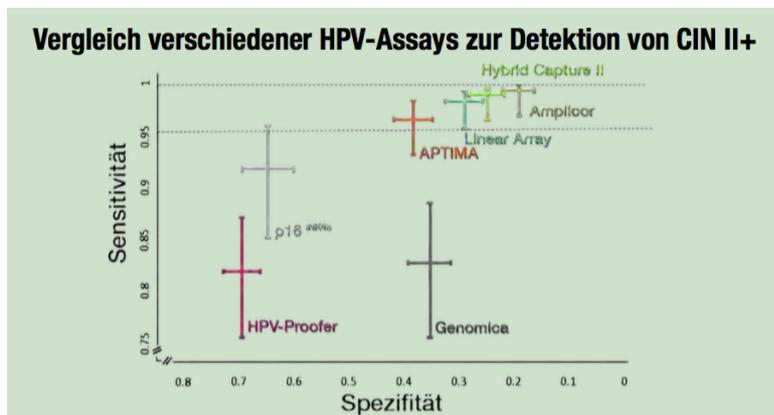


Abbildung 10: Vergleich der Sensitivität und Spezifität verschiedener HPV-Assays. *Quelle: Szarewski, 2008*⁴⁹

Ein grundlegend wichtiger Aspekt der HPV-Biologie wird bisher durch keinen der existierenden HPV-Tests wiedergegeben: Wie oben beschrieben können bei einer HPV-Infektion verschiedene Phasen unterschieden werden, die mit dem Dysplasierisiko in Zusammenhang stehen. Das Verständnis, dass eine HPV-Infektion entweder produktiv verlaufen kann oder als „fehlgelaufene“ Infektion transformierende Eigenschaften annehmen kann, ist hierbei zentral. Es bietet einen Ansatz, die Infektionen und zelluläre Progression auf molekularbiologischem Niveau zu charakterisieren und somit die transformierenden Infektionen selektionieren zu können.

Erste Schritte in diese Richtung sind bereits unternommen worden: Um die Sensitivität der Zytologie zu erhöhen, werden die Abstriche mit immunhistochemischen Färbungen ergänzt: zwei Marker, p16 und Ki-67 (im Folgenden näher beschrieben), wurden als Dual Staining-Methode eingeführt. Studien haben für diese p16/Ki-67-Zytologie als primäres Screening eine Sensitivität für CIN2+ von 86,7% ermittelt.⁵⁰ Verglichen mit der Sensitivität des Pap-Tests für CIN2+ (53%, s.o.) stellt dies eine relevante Verbesserung dar. Die klinisch akzeptable Schwelle von 95% wird aber nicht erreicht.

Zielsetzung und Projektdesign

2.1 Zielsetzung

Die rasante Entwicklung des Marktes für HPV-Tests der letzten Jahre markiert eine Umstrukturierung in der Vorsorge gegenüber dem Zervixkarzinom. Nicht mehr steht nur die zelluläre Morphologie im Zentrum der Diagnostik, sondern die Präsenz des Virus selbst wird berücksichtigt. Während die histologischen und zytologischen Korrelate als Folgeerscheinung der Infektion betrachtet werden können, rückt mit dem HPV-Test die Betrachtung des Verursachers des Karzinoms in das Zentrum der Vorsorge. Dieser Schritt mag naheliegend und logisch erscheinen, kann aber in seiner Bedeutung als Paradigmenwechsel bezeichnet werden.

Keiner der weit über 100 verfügbaren HPV-Test ist jedoch in der Lage, die Biologie einer HPV-Infektion in Hinblick auf ihr Entartungsrisiko zu charakterisieren. Vertritt man den Ansatz, dass der Screening-Algorithmus tatsächlich auf der Diagnostik der Ursache, also des HP-Virus, beruhen sollte, so wäre dies der nächste logische und notwendige Schritt: Die Epidemiologie des HPV zeigt deutlich, dass ein Test, der nur das Vorhandensein des Virus nachweist, maximal ein Zusatz der Diagnostik sein kann. Die Infektion mit HPV ist häufig und in den allermeisten Fällen passager und ungefährlich.

Die im Folgenden beschriebene Analyse fragt danach, inwieweit es möglich ist, eine zervikale Infektion mit HPV auf molekularbiologischer Ebene zu charakterisieren. Ziel ist es, eine ungefährliche, produktive HPV-Infektion von einer transformativen Infektion zu unterscheiden. Hierfür soll nicht nur die Präsenz des Virus nachgewiesen werden, sondern vor allem die onkogene Aktivität der Infektion (gemessen an dem Expressionslevel von E7) typspezifisch bestimmt werden. Entsprechend der Biologie der Infektion kann erwartet werden, dass die Expression von E7 mit zunehmendem Dysplasiegrad ansteigt.⁵¹ Dieses soll überprüft werden.

Des Weiteren wird die mRNA-Expression von 23 zellulären Markern daraufhin untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen Expressionsstärke der einzelnen Marker und steigendem Dysplasiegrad besteht. Dies stellt zunächst eine wissenschaftliche Fragestellung dar und soll dann gegebenenfalls auf seine klinische Anwendbarkeit untersucht werden: Es soll untersucht werden, ob es möglich ist, über das Expressionsprofil zellulärer Marker die Stadien einer HPV-Infektion zu charakterisieren und somit eine prognostische Aussage über das Transformationsrisiko einer Infektion zu treffen.

2.2 Projektdesign

Diese Zielsetzung teilt die zu untersuchenden Hypothesen in zwei Bereiche auf:

1. **HPV-Genotypisierung:** Testung auf 18 high-risk HPV-Typen: 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82
2. **Charakterisierung von HPV-Infektionen:** Testung auf 23 zelluläre/virale Marker

Zwei Prinzipien, auf denen die Methodik des Assays beruht, erlauben eine Annäherung an die Fragestellung:

1. Die gemessene Struktur ist die **mRNA** der Targets.
2. Die Analyse beruht auf einer **quantitativen** Messung der Targets.

Im Folgenden sollen die viralen und zellulären Marker näher beschrieben werden, anhand derer die HPV-Infektionen typisiert und die Infektionen auf molekularbiologischer Ebene charakterisiert werden sollen. In dem Teil „Methoden und Materialien“ soll anschließend der durchgeführte Assay erläutert werden.

2.2.1 Biomarker der HPV-Infektion und Zervixkarzinom-Entwicklung

2.2.1.1 HPV-Typisierung: E7

Während eine DNA-Messung das Vorliegen einer Infektion bestimmen kann und im Fall einer quantitativen Analyse auch die Viruslast misst, erhält man über die Messung der mRNA-Expression eine Aussage über das Aktivitätsprofil der Genexpression des Virus bzw. der Wirtszelle. Zielstruktur der HPV-Typisierung dieser Methodik ist das Onkoprotein E7 (Biologie des Markers s. S. 7 f.).

2.2.1.2 Splicing-Muster

Schmitt et al. haben in einer Publikation von 2010 beschrieben, dass über unterschiedliche posttranskriptionale Modifikation der HPV16-mRNA verschiedene Splicing-Muster entstehen und identifiziert werden können, die eine Aussage über den Status der Infektion zulassen (s. Abbildung 11).⁵²

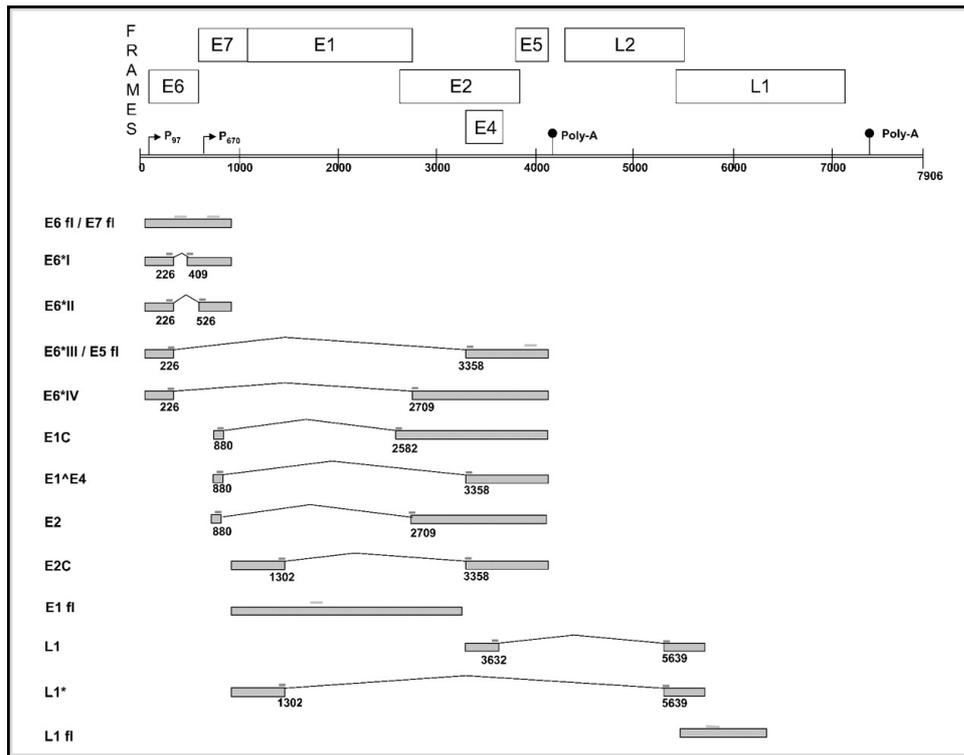


Abbildung 11: Genomstruktur des HPV16 und Transkripte; Promotoren (P) und ORF (Kästen) sind schematische gezeigt. Quelle: Schmitt et al. 2010⁵²

Vor allem die Transkripte $E1^E4$, $E1C$ und $E6^*I$ des HPV16 sind hierbei von Bedeutung und wurden daher in den Assay integriert.

Schmitt et al. konnten zeigen, dass in HSIL und Karzinomen die Expression des Transkripts $E1C$ (880[^]2582) stark erhöht ist. Dieses Transkript beinhaltet den COOH-Terminus von $E1$ ($E1C$), wobei es den Beginn des $E2$ -ORF einschließt. Hierdurch wird die Translation von $E2$ nach abgeschlossener $E1C$ -Translation unmöglich gemacht. Die Splice-Variante $E1C$ könnte somit die Expression von $E2$ unterdrücken. $E2$ kontrolliert die Expression der Onkogene $E6/7$ und seine Ausschaltung und die konsekutive Überexpression von $E6/7$ stellen einen wichtigen Meilenstein in der Transformation einer Zelle durch einer HPV-Infektion dar.

Im Gegensatz dazu ist die Expression von $E1^E4$ (880[^]3358) in HSIL und Karzinomen im Vergleich zu gesundem Epithel herunterreguliert. Dieses Transkript kodiert Proteine, die notwendig sind für die Kapsidbildung und Freisetzung von Virionen. Dieses Genprodukt ist somit wichtig für HPV-Infektionen im produktiven Stadium.

Der Quotient von $E1C/E1^E4$ ermöglicht eine Diskriminierung zwischen leicht- und hochgradigen zervikalen Läsionen für Infektionen mit HPV16.⁵² In der Studie von Schmitt et al. wurden 92%

der NIL/M wurden korrekt als nicht transformierende Infektion eingeordnet und, ebenso wurden 100% der Karzinome und 67% der HSIL als solche erkannt.

E6*1 beinhaltet das Transkript des kompletten Onkoproteins E6 und zeigte eine signifikante Hochregulation in HSIL und Karzinomen.

Die Analyse der Splicing-Muster des HPV16, dem häufigsten Verursacher von Dysplasien und Zervixkarzinomen, gibt also eine Aussage darüber, ob die Infektion eher einen Status der Produktivität, assoziiert mit einem geringen Dysplasierisiko, oder Zeichen der Transformation aufweist.

2.2.1.3 Housekeeping Gene: ACTB, HPRT

Die hier beschriebene Analyse basiert auf der Annahme, dass die Quantität der Expression der viralen und zellulären Marker in dem Großteil der Zellen einer gegebenen Läsion konstant ist. Wenn man dann den absolut gemessenen Wert eines Markers auf die Zellzahl des Abstriches relativiert, erhält man eine stichhaltige Aussage über die relative Expression dieses Markers der Läsion.

Als Maß der Zellularität wurden zwei Marker in den Assay aufgenommen: Aktin- β (ACTB), ein Bestandteil des Zytoskeletts, und Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT1), ein Enzym des Purin-Stoffwechsels. β -Aktine sind als nicht-muskuläre Aktine Bestandteil des Zytoskeletts und erfüllen eine Reihe an Funktionen (Zellteilung, Migration, Zellwachstum, mRNA-Transport etc.). Aufgrund seiner ubiquitären Expression ist ACTB eine häufig genutzte Kontrolle für das Vorhandensein von Zellen in einer Messung.^{53 54}

2.2.1.4 p16INK4a (CDKN2A)

p16^{INK4a} spielt eine wichtige Rolle in der physiologischen Regulierung des Zellzyklus (G1-S-Übergang). Als Inhibitor von Cyclin-abhängigen Kinasen blockiert es die Phosphorylierung verschiedener Cycline und wirkt der Phosphorylierung und damit Inaktivierung von Tumorsuppressoren wie pRB entgegen.⁵⁵ Die Aufgabe des p16 besteht darin, die Zelle nach entstandenem Zellschaden an einer weiteren Proliferation zu hindern. Diese Blockierung des Zellzyklus stellt den ersten Schritt einer Enddifferenzierung der Zelle und Eintritt in die replikative Seneszenz dar.⁵⁶ Effektormolekül ist vor allem CDK4, welches durch Phosphorylierung das pRB inaktiviert (Disinhibierung von pRB durch p16). Viele Tumore, z.B. das Mamma- oder Kolonkarzinom, weisen durch Deletion, Mutation oder epigenetisches Silencing eine Ausschaltung von p16 auf. Auch im HPV-induzierten Zervixkarzinom ist die Wirkkette von p16

gestört, jedoch nicht direkt auf der Ebene von p16, sondern über die Inhibierung von pRB. Die Hochregulation von p16 als Gegenreaktion auf den Eingriff in den Zellzyklus kann also ihre Wirkung nicht mehr ausüben.

Eine Überexpression von p16 markiert somit eine high-risk HPV-Infektion, die eine übermäßige E7-Expression aufweist und somit in die transformierende Phase übergegangen ist.⁵⁷ Auch in alternden Zellen findet physiologisch eine Überexpression von p16 statt und führt zu Zellzyklusarrest und irreversibler Chromatin-Kondensation.⁵⁸ Das Expressionslevel ist somit altersabhängig.

2.2.1.5 Stathmin-1

Stathmin-1 (STMN), auch Onkoprotein 18 genannt, ist ein ubiquitär exprimiertes Protein, das als Mikrotubuli-Destabilisator eine wichtige Rolle während der Mitose sowie für Zellmotilität und –migration spielt. Belletti et al. konnten zeigen, dass eine Unterdrückung von STMN zu einem reduzierten Zellwachstum führt, da die Zellen in der G2-Phase des Zellzyklus arretiert werden und eine erhöhte Apoptoserate aufweisen.⁵⁹ Physiologisch wird die proliferative Wirkung von STMN durch den CDK-Inhibitor p27 kontrolliert. In Abwesenheit von p27 verbleibt STMN aktiv und erhöht durch Destabilisierung des Zytoskeletts die Motilität der Zelle. Die Wirkung von p27 wird durch das HPV-Onkoprotein E7 modifiziert.⁶⁰

Eine Überexpression von STMN mRNA und Protein in invasiven Zervixkarzinomen konnte in einer Studie gezeigt werden.⁶¹ Ebenso wurde anhand von immunhistochemischen Färbungen gezeigt, dass der Anteil der STMN-positiven Histologien mit zunehmendem Dysplasiegrad ansteigt.⁶² Tabelle 7 zeigt diese Ergebnisse mit einem Vergleich zwischen p16 und STMN.

Tabelle 7: Vergleich der Positivität für die Marker Stathmin-1 und p16 in immunhistochemischen Färbungen. *Quelle: modifiziert nach Howitt et al., 2013*⁶²

Marker	SIL insg.	CIN1	CIN2	CIN3	Adeno- Karzinom in situ	Invas. Squamous Cell Ca	AdenoCa
Stathmin-1	29%	9%	45%	93%	100%	100%	100%
p16	80%	71%	100%	94%	n.d.	n.d.	n.d.

Diese Ergebnisse zeigen, dass p16 mit 80% im Vergleich zu STMN (29%) unabhängig von Dysplasiegrad eine höhere Sensitivität für das Vorliegen einer Squamous Intraepithelial Lesion (SIL) aufweist. STMN zeigt allerdings eine höhere Spezifität für das Vorliegen einer high-SIL (HSIL). Die beiden Marker ergänzen sich somit in ihrer Aussage.

2.2.1.6 Ki-67

Ki-67 wird als Marker der Zellproliferation eingesetzt. Benannt nach dem Ort seiner Entdeckung (Kiel), wurde es als ein Protein identifiziert, das nur in proliferierenden Zellen exprimiert wird. Es ist nachweisbar in der G1-, der S-, und der G2-Phase und während der Mitose und nicht exprimiert in der G0-Phase des Zellzyklus aller menschlicher Zellarten. Somit kann es als Marker der Wachstumsfraktion einer Zellpopulation angesehen werden.⁶³ Die zelluläre Funktion von Ki-67 bleibt allerdings ungeklärt. Es scheint naheliegend, dass seine Aufgabe in enger Verbindung mit der Zellproliferation steht. Ein genauer Mechanismus konnte aber bisher nicht identifiziert werden.⁶⁴

Tabelle 8 zeigt, dass der Anteil der stark Ki-67 positiven zytologischen Abstriche (70-100% der Zellen Ki-67 positiv) mit der Höhe des Dysplasiegrades zunimmt. Niedriggradige Dysplasien (CIN1) zeigen hingegen zu 71,4% ein geringes Maß an Ki-67-positive Zellen.

Tabelle 8: Häufigkeit der Ki-67-Proteinexpression in zervikalen Läsionen; aufgeteilt in schwach positiv (0-30% der Zellen) und stark positiv (70-100%). *Quelle: modifiziert nach Reuschenbach et al. 2012*⁶⁵

	CIN1	CIN2	CIN3 / CIS	Invasives Karzinom
Ki-67: 0-30% pos.	71,4%	56,5%	14,8%	15,4%
Ki-67: 70-100% pos.	4,8%	26,1%	63,0%	45,7%

2.2.1.7 MCM2

Die Proteine der Minichromosome-Maintenance (MCM)-Familie sind wichtige Regulatoren der DNA-Replikation von Eukaryoten. MCM-Proteine bilden einen präreplikativen Komplex, markieren durch Bindung den zu replizierenden DNA-Abschnitt und ermöglichen die Anlagerung des Origin-Erkennungskomplexes (Origin Recognition Complex, ORC). Nach ihrer Dissoziation werden die MCM-Proteine abgebaut. Hierdurch wird sichergestellt, dass ihr Signal zur Replikation nur einmal pro Zellzyklus gegeben werden kann.⁶⁶ Während das Expressionslevel des ORC im Verlauf des Zellzyklus konstant bleibt, ist die Expression von MCM auf die Phase der Replikation beschränkt.⁶⁷ Somit können die MCM-Moleküle als spezifische **Marker der Proliferation** angesehen werden.

Während in gesunden Epithelien die Expression von MCM2 auf das basale, proliferative Kompartiment begrenzt ist, findet sich in dysplastischen Epithelien eine diffuse Expression, die bis in die oberflächlichen Abschnitte hineinreicht. Während in LSIL-Läsionen 40% der Zellen der oberflächlichen Epithelabschnitte MCM2 exprimieren, sind in HSILs 80% der oberflächlichen Zellen MCM2-positiv, befinden sich also in einem proliferativen Zustand.⁶⁸ In der hier zitierten Publikation versuchen A. Freeman et al. bereits 1999, sich über die Evaluation von zellulären

Markern einer funktionellen Definition von Dysplasie anzunähern, um die morphologischen Kriterien zu verlassen.

2.2.1.8 KRT17

Zytokeratine sind als gewebespezifische Intermediärfilamente ein Bestandteil des Zytoskeletts. Keratin-17 (KRT17) ist exprimiert in Stammzellen des embryonalen Ektoderms, in Hautanhangsgebilden (Haare und Nägel) und der endozervikalen Schleimhaut. Während es in physiologischem, differenziertem Epithel nicht exprimiert ist, konnte seine Expression in Karzinomen (Ovar, Magen, Mamma) nachgewiesen werden.⁶⁹⁻⁷¹

Escobar-Hoyos et al. charakterisierten KRT17 als zelluläres Onkoprotein, das unabhängig von den HPV-Onkogenen den Beginn der zellulären Transformation zu einem Zervixkarzinom vermittelt.⁷² Dieser Mechanismus funktioniert über eine Deregulation des Tumorsuppressors p27. Lokalisiert im Nukleus wirkt p27 als CDK-Inhibitor und verhindert den Übergang der G0/G1-Phase in die S-Phase. Mitogene Stimuli ermöglichen den Übergang in die S-Phase durch einen Export von p27 aus dem Zellkern heraus in das Zytoplasma, wo es über das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut wird.⁷³ KRT17 vermittelt den nukleären Export und den darauf folgenden Abbau von p27 und ermöglicht somit einen proliferativen Status der Zelle und somit Tumorwachstum.

KRT17 zeigt eine Sensitivität von 94% (95% CI: 73–94%) und eine Spezifität von 86% (95% CI: 73–94%) für die Unterscheidung von CIN2+ zu normalem Gewebe/CIN1.⁷⁴ Die Expression ist hierbei unabhängig vom Alter der Patientinnen und zeigt keine Beeinflussung durch bakterielle/Pilz-vermittelte Zervizitiden.

Escobar-Hoyos et al. konnten zeigen, dass der Status der KRT17 –Expression mit der Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten mit einem Zervixkarzinom korreliert. Sowohl für Karzinome mit niedrigem (1-2) als auch mit hohem (3-4) Staging erweist sich eine Überexpression von KRT17 als negativer prädiktiver Wert. Hierbei ist eine hohe KRT17-Expression ein noch präziserer Prädiktor für Mortalität als das Tumor-Staging (KRT17: HR=5,7, p=0,0002; Staging: HR=3,2, p=0,0035).⁷²

2.2.1.9 Marker der zervikalen Junktionszone

Herfs et al. identifizierten 2012 innerhalb der zervikalen Junktionszone zwischen ektozervikalem Plattenepithel und endozervikalem Zylinderepithel (oben bereits genauer beschrieben) eine kleine Population kubischer, einschichtiger Epithelzellen, die sich durch ein spezifisches Expressionsprofil von fünf Markern von dem umliegenden Epithel abgrenzt (s. Tabelle 9).³¹

Tabelle 9: Marker des spezifischen Expressionsprofils der zervikalen Junctionszellen

Markername	Abkürzung	Zelluläre Funktion
Keratin 7	KRT7	Intermediärfilamente, Bestandteil des Zytoskeletts
Anterior Gradient 2	AGR2	Unbekannt; in Tumorzellen korreliert ein hohes AGR2-Level mit p53-Downregulation und Transformation ⁷⁵
Cluster Differentiation 63	CD63	Transmembranprotein; reguliert transmembranalen Proteintransport; Rolle in Signalkaskade von VEGF-Rezeptoren ⁷⁶
Matrix Metalloproteinase 7	MMP7	Abbau von extrazellulärer Matrix
Guanin-Deaminase	GDA	Enzym des Abbauweges von Purinbasen zu Harnsäure

Auch embryonale Zellen der Zervix weisen dieses Expressionsmuster auf, was einen embryonalen Ursprung der Zellen nahelegt. Es konnte gezeigt werden, dass alle hochgradigen zervikalen Läsionen (CIN2+) und Zervixkarzinome das Expressionsmuster dieser Junctionspopulation aufweisen. Für niedriggradige CINs (CIN1) trifft dies nur in wenigen Fällen zu (n = 8/42).³¹ Die histologisch definierte Gruppe der CIN1 kann über dieses Expressionsprofil in zwei Gruppen unterteilt werden: Marker-positiv/-negativ. Es erscheint naheliegend, dass eine zervikale Läsion, die dieses Profil nicht aufweist, aus einer Region der Transformationszone außerhalb der Junctionszone stammt. Dies würde mit einem verminderten/keinem Risiko für eine Progredienz zu einem Karzinom einhergehen.

Die beschriebene Population könnte das Ausgangsgewebe des Zervixkarzinoms darstellen. Hiermit ließe sich auch die hohe Suszeptibilität der Zervix im Vergleich zu penilen, analen und oralen Epithelien für HPV-induzierte Karzinome erklären.

2.2.1.10 Stammzellmarker: *SOX2*, *Oct4*, *Nanog*; *ALDH1A1*

SOX2 ist Mitglied der SOX (SRY-related high mobility group box)-Familie, einer Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die eine essentielle Rolle in der Biologie von Stammzellen (Regulation der Organogenese, Zelldifferenzierung, Erhaltung der Pluripotenz) spielen.⁷⁷ Eine hohe SOX2-Expression konnte in vivo während der Embryogenese und in vitro in embryonalen Stammzellen nachgewiesen werden. Für mehrere solide Neoplasien konnten hohe Expressionslevel von SOX2 und eine Korrelation zwischen Expressionsstärke und histopathologischem Grading gezeigt werden.⁷⁸

Auch für das Zervixkarzinom konnte in einem immunhistochemischen Assay ein Zusammenhang zwischen Dysplasiegrad und SOX2-Expression nachgewiesen werden. Während 25% der gesunden Zervixbiopsien SOX2 exprimierten, waren 83% der CIN3 und 77% der Karzinome Sox2-positiv. Die Tumorzelllinien SiHa und C33A zeigten eine klare Sox2-Expression, HeLa und CaSKi hingegen nicht.⁷⁹

Zwei weitere Transkriptionsfaktoren wurden identifiziert, die synergistisch die Pluripotenz von Stammzellen erhalten: **Oct-4** (POU5F1) aus der Familie der POU-Transkriptionsfaktoren, und das Homöoboxprotein **Nanog**.

Die Aldehyddehydroxygenase (**ALDH**)-Familie fungieren als wichtige zelluläre Entgifter. Aldehyde sind stark elektrophile Moleküle, die sowohl die Funktion von Enzymen als auch die Struktur von DNA schädigen können. Der Abbau von Aldehyden ist daher essentiell für das Überleben einer jeden Zelle und vor allem für Zellen mit langer Lebensdauer wie Stammzellen. Die Unterform **ALDH1A1** partizipiert in dem Stoffwechsel von Retinsäure (Vitamin A), der ebenfalls eine wichtige Rolle in der Gewebedifferenzierung und Embryogenese spielt.⁸⁰ Die Messung der ALDH-Aktivität kann daher als Mittel dienen, Zellen mit Stammzeleigenschaften zu isolieren.⁸¹

Inwieweit die pluripotenten Eigenschaften von Stammzellen eine Rolle in der Entstehung des Zervixkarzinoms spielen, ist nicht geklärt. In dieser Studie soll untersucht werden, ob die Expressionshöhe der vier Stammzellmarker mit verschiedenen Dysplasiestadien in der Zervix korreliert.

2.2.1.11 Survivin / BIRC5

Das Protein Survivin, Mitglied der Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP)-Familie, spielt eine komplexe Rolle in den Bereichen von Zellteilung und Apoptose und erscheint daher prädisponiert, in die Onkogenese involviert zu sein. Die IAP-Proteine weisen eine Baculovirus IAP-repeat (BIR)-Domäne auf (BIRC5 ist die alternative Bezeichnung von Survivin), die notwendig ist für die Inhibition der Apoptose. Survivin ist mit mehreren Schritten der Mitose funktionell verknüpft: Aufspaltung der Chromosomen, Zytokinese, Formation des Chromosomal Passenger Complex (CPC), ein Komplex der wichtig ist für die korrekte polare Aufspaltung der homologen Chromatide. Neben dieser mitogenen Aktivität scheint Survivin auch Apoptose-hemmend zu wirken: Survivin hemmt den programmierten Zelltod sowohl über den intrinsischen, Caspase-9-vermittelten Weg, als auch über eine Aktivierung von NFκB.⁸²

Für einige Tumorentitäten konnte eine Überexpression von Survivin sowie eine Korrelation zwischen Expressionshöhe und Überleben gezeigt werden.⁸³ Auch für das Zervixkarzinom konnte ein Zusammenhang zwischen Grad der Dysplasie und Survivin-Expression gezeigt werden. 5% der Proben von gesundem Zervixgewebe zeigten in immunhistochemischer Färbung eine Expression von Survivin, während für 16% der CIN1, 50% CIN2, 86% der CIN3 und 80% der Karzinome Survivin-positiv waren.⁸⁴

In Zervixkarzinomen korrelierte die Expression von Survivin mit der Expression von p16 (Tabelle 10), wobei sich ein hoher Wert für die Rangkorrelation nach Spearman von $r=0,854$ ergab.⁸⁴

Tabelle 10: Korrelation der Positivität von Survivin und p16 in immunhistochemischen Färbungen von Zervixkarzinomen. *Quelle: Liu et al. 2015*⁸⁴

Survivin	p16			
	-	+	++	+++
-	4	3	3	0
+	0	0	6	3
++	0	0	12	0
+++	0	3	0	16

Definition der p16/Survivin-Positivität in der immunhistochemischen Färbung: negativ (-) =<5% angefärbte Zellen, schwach positiv (+) = 5-24%, mäßig stark positiv (++) = 25-50%, stark positiv (+++) = >50%

2.2.1.12 p63

Das Tumor Protein TP63 (p63) gehört zu der p53-Familie der Transkriptionsfaktoren. Als epithelialer Stammzellmarker spielt p63 in der embryonalen Entwicklung von Geweben eine koordinierende Rolle zwischen epithelialelem und mesenchymalem Gewebe. Ob dieser Faktor eine Rolle in der Hyperproliferation epithelialer Wirtszellen des HPV spielt, soll in diesem Projekt untersucht werden.

Materialien und Methoden

3.1 Ethikvotum

Die Verwendung des Restmaterials von zervikalen Abstrichen, die für einen diagnostischen HPV-Test entnommen wurden, für einen wissenschaftlichen Zweck erhielt ein positives Votum der Ethikkommission (Nummer des Votums: EA1/168/13).

3.2 Das Probenkollektiv

Im Rahmen dieses Projektes wurden 481 Proben aus verschiedenen Sammlungen asserviert, aufbereitet und mit QuantiGene® 2.0 Plex Assay gemessen. Von den 481 Proben konnten 216 in die Analyse der Marker eingeschlossen werden. Gründe für den Ausschluss waren: inkomplette Daten der Histologie, Zustand nach Therapie einer zervikalen Läsion, positives Ergebnis in der HPV-Testung der gesunden Kontrollgruppe, nicht verwendbare Ergebnisse der Luminex-Messung (s. Tabelle 11). Ein Teil der hier nicht eingeschlossenen Proben wird in später beschriebenen Analysen verwendet (s. S. 54 ff.).

Tabelle 11: Übersicht über gemessene und in die Analyse eingeschlossene Proben.
V1/2/3=1./2./3. Zeitpunkt der Kontrolle im Rahmen der EcoRocs-Studie

Quelle	Gemessenen Proben	Verwendet für Analyse	Ausschlussgründe	
			unbrauchbare Messung (N)	Anderes
EcoRocs	128 (V1:70, V2:47, V3:11)	61	5	Nur V1 wurden verwendet, Ausschluss wenn HPV negativ (N=4)
Pipavir	120 (mit Histologie: 58)	30	8	Nicht vorhandene Histo (N=62), unschlüssige Zuordnung (N=20)
Dr. Mechsner	67	39	7	Ausschluss wenn HPV positiv (N=21)
Ethopia	62	23	7	Ausschluss wenn HPV negativ (N=32)
Charité	6	6		
MVZ im Fürstenberg-Karree	98	57	17	Z.n. Therapie einer zervikalen Läsion (N=24)
Insgesamt	481	216	44	163

Die eingeschlossenen Proben wurden entsprechend der klinischen Diagnostik in Gruppen eingeteilt, denen jeweils ein klinischer Score zugeteilt wurde (s. Tabelle 12). Dieser klinische Score basiert auf dem von Agorastos et al. entwickelten Score des ASSIST-Studie⁸⁵, beinhaltet aber eine Erweiterung um zwei Untergruppen.

Tabelle 12: Übersicht über die Einteilung in klinische Gruppen

Gruppe	Charakterisierung	Fallzahl
0	HPV negativ, zytologisch unauffällig	63
1	HPV positiv, zytologisch unauffällig	18
2	Zytologisch auffällig oder CIN1	10
3	CIN2	23
4	CIN3	75
5	Karzinom	27
Gesamtzahl		216

3.2.1 Asservierung der Proben

Grundlage für die Asservierung der Proben waren zervikale Abstriche, die mit einer oberflächlichen und einer endozervikalen Bürste entnommen und in 20 ml ThinPrep® PreservCyt®-Medium (Hologic, Inc.; USA) konserviert wurden. Von diesem Medium wurden 2 ml in ein 2,2 ml Eppendorf Tube abgefüllt und bei +4°C und 10000 rpm für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig entfernt und das Zellpellet in 100 µl verdünnter Lysis Mixture gelöst (1:3 Verdünnung des Lysis Mixture aus dem QuantiGene® Assay Kit mit nukleasefreiem Wasser; der Lysis Mix wurde 30min bei 36°C vorinkubiert). Die so asservierten Proben wurden bis zur Messung bei -80°C aufbewahrt.

3.3 QuantiGene® 2.0 Plex Assay

Der durchgeführte Assay weist ein Charakteristikum auf, das die Beantwortung der in diesem Projekt gestellten Fragen ermöglicht: Er beruht auf dem Prinzip der Signalamplifikation. Um ein messbares Signal zu erzeugen, benötigt er keine Amplifikation des Zielmoleküls selbst. Das Zielmolekül, dessen Quantität möglichst präzise gemessen werden soll, wird zunächst von einem Träger (magnetische Mikrospären, „Capture Beads“) gebunden. Als nächstes lagern sich weitere anfärbare Moleküle in Verzweigungen an das Zielmolekül, sodass ein Signal entsteht, das stark genug ist, um gemessen zu werden. Das kombinierte Signal aller Beads ist demnach proportional zu der Molekülanzahl des Targets und wird in Mean Fluorescence Intensity (MFI) gemessen.

Diese Methode bietet die fast einzigartige Möglichkeit, die Präsenz von Produkten der HPV-Genexpression (hier: RNA-Moleküle) nicht nur nachzuweisen, sondern auch präzise zu quantifizieren. Der Assay funktioniert als Multiplex, sodass in einer einzigen Messung bis zu 82 verschiedene Zielmoleküle quantitativ gemessen werden können. Im Folgenden soll diese Methode genauer beschrieben werden.

3.3.1 Prinzip des QuantiGene® 2.0 Assays

Die Kombination aus zwei Techniken ermöglicht diesen Assay: Die „Branched DNA“-Signalamplifikation (bDNA) auf dem Träger der „Multi-analyte Profiling Beads“ (xMAP).

Die spezifischen mRNA-Moleküle, die in diesem Projekt die nachzuweisenden Zielmoleküle sind, werden jeweils von drei verschiedenen Sonden gebunden (s. Abbildung 12):

1. **Capture Extender (CE):** sind an die Mikrokugeln (Beads) gekoppelt und binden das mRNA Molekül
2. **Label Extender (LE):** Binden an die Ziel-RNA und stellen die Basis dar für die sich verzweigende Signalamplifikation
3. **Blocking Probes (BL):** binden die noch freien RNA-Abschnitte und verhindern zum einen, dass ein Molekül mehrfach gemessen wird, und zum anderen, dass Kreuzreaktionen auftreten.

Die Enden der Label Extender werden nun von bDNA-Molekülen gebunden, welche die Basis für den verzweigten (branched) „Baum“ der Signalamplifikation darstellen. Jede Amplifikations-Einheit enthält mehrere Bindungsstellen für biotinylierte Sonden, die fluoreszierendes Streptavidin-konjugiertes R-Phycoerythrin (SAPE) binden. Das so entstehende fluoreszierende Signal eines jeden individuellen Capture Beads wird über ein Luminex Durchflusszytometer ausgewertet. Entscheidend ist die Verwendung von bis zu 82 verschiedenen Bead-Typen, die sich über verschiedene intrinsische Fluoreszenzfarben im Rot- und Infrarotbereich unterscheiden. Über die Capture Extender binden diese spezifisch ein RNA-Molekül. Diese Vielfalt an Beads ermöglicht den Multiplex, also das Differenzieren verschiedener Moleküle in einem Assay. Bis zu 82 verschiedene Targets können gleichzeitig analysiert werden. Die Signalstärke des SAPE für jedes Capture Bead wird gemessen und als Mean Fluorescence Intensity (MFI), also als für einen spezifischen Bead-Typus gemittelte Fluoreszenzstärke, berechnet. Die MFI ist als Wert proportional zu der Anzahl an Ziel-RNA-Molekülen, die in der Probe enthalten sind.

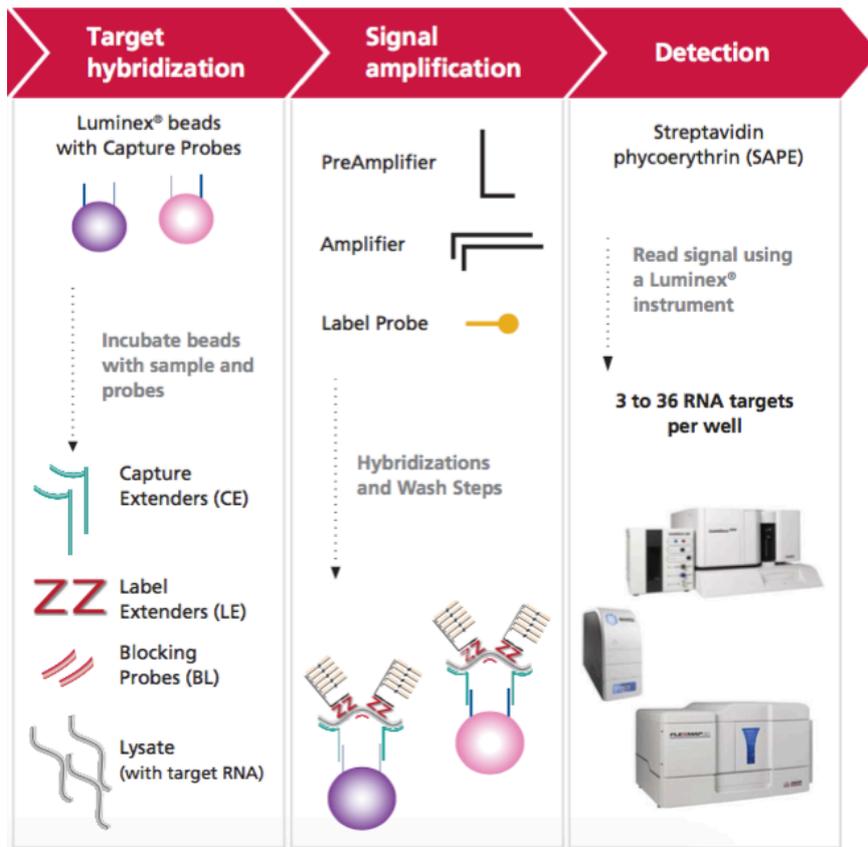


Abbildung 12: Funktionsprinzip des QuantiGene® 2.0 Plex Assays. Quelle: QuantiGene® 2.0 User Manual, S. 2, Bioscience

3.3.2 Materialien

Die folgenden Tabellen enthalten Angaben zu Produkt und Hersteller der verwendeten Reagenzien (Tabelle 13 und 14) und Geräte/Materialien (Tabelle 15).

Tabelle 13: Auflistung der Reagenzien des QuantiGene® 2.0 Plex Assays

Reagenzien	Hersteller
Lysis Mixture	Affymetrix (Santa Clara, USA)
Blocking Reagent	Affymetrix (Santa Clara, USA)
Proteinase K	Affymetrix (Santa Clara, USA)
Probe Set	Affymetrix (Santa Clara, USA)
Capture Beads	Affymetrix (Santa Clara, USA)
Amplifier Diluent	Affymetrix (Santa Clara, USA)
Labelprobe Diluent	Affymetrix (Santa Clara, USA)
SAPE Diluent	Affymetrix (Santa Clara, USA)
Wash Buffer Component 1	Affymetrix (Santa Clara, USA)
Wash Buffer Component 2	Affymetrix (Santa Clara, USA)
Pre-Amplifier 2.0	Affymetrix (Santa Clara, USA)
Amplifier 2.0	Affymetrix (Santa Clara, USA)
Labelprobe	Affymetrix (Santa Clara, USA)
Streptavidin-conjugated R-Phycoerythrin	Affymetrix (Santa Clara, USA)

Tabelle 14: Auflistung der Reagenzien für das Luminex Durchflusszytometer

Reagenzien	Hersteller
Nuclease freies Wasser	Fresenius Kabi (Louviers, Frankreich)
Sheeth-Fluid	BioRad
Perchlorat („Bleach“)	DanKlorix Clogate/Palmolive
Isopropanol	Roth

Tabelle 15: Auflistung der verwendeten Geräte und Materialien

Gerätetyp	Name	Firma
Vortex	Digital Vortex Genie 2	Scientific Industries (Bohemia, USA)
Wasserbad	TW 8	Julabo (Seelbach, Deutschland)
Thermometer	QuantiGene® Incubator	Affymetrix (Santa Clara, USA)
Temperatur Validation	Temperature Validation Kit	Affymetrix (Santa Clara, USA)
Handheld Magnetic Plate Washer	Bio – Plex	BioRad (Hercules, USA)
Zentrifugen	Heraeus Multifuge 1 S-R, Rotornr.: 75002005	Thermo (Waltham, USA)
Mini-Zentifuge	MiniSpin	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
2 Platten-Zentrifuge	PlateFuge	Benchmark Scientific (Edison, USA)
Pipetten	Research plus, 0,5 -10 µl; 10µl; 10-100 µl; 100-1000 µl,	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Mehrkanal-Pipette	8-Kanal-Pipette Eppendorf Research plus	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipettenspitzen	mit/ohne Filter	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
Thermoschüttler (2 ml und 1,5 ml Eppendorfgefäße)	PHMP	Grant-Bio, Shepreth, UK
96-Well-Platten	Flachboden: PS, Chimney well, µClear, Schwarz	Greiner Bio-One International AG (Kremsmünster, Österreich)
	Rundboden: unbehandelt, nicht steril	VWR International (Radnor, USA)
Versiegelungsfolien für 96-Well-Platten	Rotilabo - Abdeckfolien für PCR - Platten	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
	Polyolefin - Abdeckfolien für Microtiterplatten	HJ - Bioanalytik GmbH (Erkelenz, Deutschland)
Luminex Reading – System	BioPlex 200 System	BioRad (Hercules, USA)
“Falcon”-Röhrchen	PS Falcon steril 15 ml	BD (Franklin Lakes, USA)
	1,5 ml Safe Lock Tubes	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
	2,0 ml Safe Lock Tubes	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Kühlschrank/ Tiefkühler	4°C	Liebherr
	-20°C	Bosch
	-80°C	Bosch
Werkbank	HeraSafe KS 12	Thermo (Waltham, USA)

3.3.3 Durchführung

Die Durchführung des QuantiGene® 2.0 Plex Assay ist in zwei Tage gegliedert. Am ersten Tag werden die asservierten Proben mit dem „Working Bead Mix“ versehen, einem Mix, der neben den Capture Beads auch die drei Arten benötigter Sonden (Capture Extender, Label Extender, Blocking Probes, Details s.o.) enthält. Die Hybridisierung erfolgt dann über 22h. Am zweiten Tag wird in 5 Schritten die Signalamplifikation aufgebaut. Die Messung der Proben erfolgt dann anschließend mit einem Luminex®-Readout.

Tag 1

- 1) Die zu messenden **Zellysate** auf Raumtemperatur bringen, **Lysis Mixture** für ca. 30 min im Wärmebad (37°C) erwärmen. **Probe Set, Blocking Reagent und Proteinase K** auftauen.
- 2) Thermoshaker auf 54°C vorwärmen.
- 3) Pro Well **20 µl des Zellysates** auf eine durchsichtige Rundbodenplatte pipettieren.
- 4) Als **Negativkontrolle** je **20 µl verdünnte Lysis Mixture** (1/3 Lysis Mix, 2/3 RNase-freies Wasser) in 3 Wells geben.
- 5) **Working Bead Mix** nach folgender Tabelle ansetzen (Überstand: ca. 20%):

Tabelle 16: Ansatz des Working Bead Mix

Reihenfolge	Reagenz	pro 1 well (µl)	Lagerung
1	Nukleasefreies Wasser	1,3	Raumtemp.
2	Lysis Mixture	1,65	Raumtemp.
3	Blocking Reagent	0,5	-20°C
4	Proteinkinase K	0,05	-20°C
5	Probe Set	1,25	-20°C
6	Capture Beads (gut vortexen!)	0,25	4°C

- 6) In jedes Well **5 µl Working Bead Mix** hinzugeben, so dass in **jedem Well ein Gesamtvolumen von 25 µl** vorhanden ist.
- 7) Platte mit einer Folie für PCR-Platten (dicht!) versiegeln.
- 8) Platte in den Thermoshaker stellen und bei **54° C und 600 rpm (18-)22 Stunden** inkubieren.

Tag 2

Alle Mengenangaben beziehen sich auf die Arbeit mit einer **gesamten 96 Well-Platte** und enthalten bereits den nötigen Überstand für die Arbeit mit einem Reservoir und einer Multikanalpipette.

Tabelle 17: Benötigte Reagenzien für den zweiten Abschnitt des QuantiGene® Plex Assays

Reagenzien	Lagerung
Amplifier-, Preamplifier-, Labelprobemix und SAPE Diluent	4°C
Wash Buffer Component 1 und 2, nukleasefreies Wasser	RaumT
SAPE	4° C

- 1) **Preamplifier und Amplifiermix** im Wärmebad erwärmen (37°C, 30 min.)
- 2) **Waschpuffer** gemäß Tabelle 18 vorbereiten.

Tabelle 18: Herstellung des Waschpuffers

Reagenzien	Quantität
Wash Buffer Component 1	0,3 ml
Washbuffer Component 2	5 ml
RNAse-freies Wasser	94,5 ml

- 3) Platte aus dem Thermoshaker nehmen und 1 min bei 240xg und Raumtemperatur zentrifugieren. **Thermoshaker auf 50°C einstellen.**
- 4) Jede Probe ca. 5 mal auf- und abpipettieren und dann von der "Hybridization Plate" (Rundboden) auf die "**Magnetic Separation Plate**" (**Flachboden, schwarz**) übertragen. Schaumbildung möglichst vermeiden, Multikanalpipette benutzen.
- 5) **Platte waschen:**
 - a. Platte auf den **Handheld Magnetic Plate Washer** setzen und mit den vorhandenen Klemmen befestigen, sodass die Platte fest auf dem Magneten liegt.
 - b. **1 min. warten** (die magnetischen Beads sammeln sich auf dem Boden), dann die Lösung aus der Platte über einem Waschbecken zügig auskippen und leicht auf Papiertüchern ausklopfen.
 - c. **50 µl Waschpuffer** in jedes Well geben, Platte vom Magneten nehmen
 - d. Ca. **10 sek auf Thermoschüttler** schütteln und den Waschvorgang noch zweimal wiederholen.

6) **Pre-Amplifier-Hybridisierung:**

- a. **50 µl** von dem **Pre-Amplifier Mix** in jedes Well geben.
- b. Platte mit der **Aluminiumfolie** für PCR-Platten versiegeln, von der Magnetplatte lösen und für **1 h bei 50°C** im Thermoshaker hybridisieren. In den ersten **2 min bei 800 rpm**, um die Beads zu resuspendieren. Die folgenden **58 min bei 600 rpm**.

7) **Platte waschen** (siehe Schritt 5 a-d)

8) **Amplifier-Hybridisierung:**

- a. **50 µl** des **Amplifier Mix** in jedes Well geben.
- b. Platte mit der Aluminiumfolie für PCR-Platten versiegeln und für **1 h bei 50°C** im Thermoshaker hybridisieren. In den ersten **2 min bei 800 rpm**, um die Beads zu resuspendieren. Die folgenden **58 min bei 600 rpm**.

9) **Platte waschen** (siehe Schritt 5 a-d)

10) **Labelprobe-Hybridisierung**

- a. **50 µl** des **Labelprobe Mix** in jedes Well geben.
- b. Platte mit der Aluminiumfolie für PCR-Platten versiegeln und für **1 h bei 50°C** im Thermoshaker hybridisieren. In den ersten **2 min bei 800 rpm**, um die Beads zu resuspendieren. Die folgenden **58 min bei 600 rpm**.

11) **Platte waschen** (siehe Schritt 5 a-d)

12) **SAPE Working Mix vorbereiten:**

SAPE kurz vor dem Gebrauch aus dem Kühlschrank nehmen (**lichtempfindlich!**). 10 sek. bei ca. Stärke 7 vortexen, dann **18 µl SAPE** in **6 ml SAPE Diluent** verdünnen. 10 sek. vortexen und **bis zum Gebrauch vor Licht schützen**. Nach Entfernen der Platte aus dem **Thermoshaker** auf Raumtemperatur kühlen lassen.

13) **SAPE binden:**

- a. **50 µl** von dem in Schritt 12 vorbereiteten **SAPE Working Mix** in jedes Well geben.
- b. Platte mit der Aluminiumfolie für PCR-Platten versiegeln und für **30 min bei Raumtemperatur** im Thermoshaker inkubieren (2 min bei 800 rpm, dann 28 min bei 600 rpm)

14) **Luminex für die Messung vorbereiten**

- a. Zuerst Luminex einschalten, dann den PC starten und BioPlex-Software starten.
- b. Selbstreinigung „**Wash between plates**“ durchführen und den **Laser erwärmen**
- c. Messprotokoll öffnen, zu messende Analyten auswählen und Platte entsprechend der Proben formatieren.

- d. Unter (*Advanced Settings* ->) *Run Protocol* das zu messende **Gate auf 5 000-25 000** einstellen.
- 15) Platte ein letztes Mal waschen (siehe Schritt 5 a-d), jedoch diesmal **mit SAPE Washbuffer statt des normalen Waschpuffers**.
- 16) Nach dem letzten Waschen **90 µl SAPE Washbuffer** in jedes Well geben.
- 17) Durch Pipettieren die Beads gründlich mit dem Washbuffer in Lösung bringen, um Aggregate zu vermeiden. Anschließend die Platte messen.
- 18) Nach der Messung: Selbstreinigung „**Shut-down**“ durchführen und manuell die Nadel reinigen.

3.3.4 Berechnung der relativierten Werte (rel. MFI)

Die Expressionsstärke der gemessenen Zielmoleküle wird als Mean Fluorescence Intensity (MFI) gemessen. Jede Messung enthält auf der 96-Well-Platte drei Zell- und RNA-freie Negativkontrollen zur Messung des Signalhintergrunds der Capture Beads. Hierfür wird statt der lysierten Probe 25 µl Lysis Mixture (QuantiGene® 2.0 Assay Kit) gemessen. Für jedes gemessene Zielmolekül wird dann der Mittelwert der drei Negativkontrollen von den rohen MFI-Werten abgezogen.

Zwei Housekeeper-Moleküle, Aktin-β und Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1) sind als Targets in den Assay integriert. ACTB wird für die Berechnung der in der Auswertung verwendeten relativen MFI-Werte (rel. MFI) verwendet. Nach Abzug der Negativkontrollen wird jeder Wert durch den Aktin β-Wert der entsprechenden Probe geteilt und das Ergebnis für bessere Handhabbarkeit mit 100 multipliziert. Diese Berechnungen lassen sich in folgender Formel zusammenfassen:

$$\text{relativierte MFI (rel. MFI)} = \frac{\text{gemessener Wert (MFI)} - \text{Mittelwert der 3 Neg.kontrollen (MFI)}}{\text{ACTB (MFI)} - \text{Mittelwert der 3 Neg.kontrollen (MFI)}} * 100$$

Die Verrechnung der Expressionsstärke von zellulären Markern und HPV-mRNA auf die Expressionsstärke des Housekeepers stellt einen wichtigen Schritt der hier durchgeführten Analyse dar. Sie ermöglicht annäherungsweise eine Relativierung der gemessenen mRNA-Expressionsstärke auf die Zellzahl in der klinischen Probe.

Proben, die ein Signal für Aktin-β von > 70 MFI aufwiesen, wurden als auswertbar definiert. Diese Grenze definiert das Mindestmaß an Zellularität, das für eine aussagekräftige Messung der zellulären Biomarker notwendig ist. Die Festlegung der Grenze beruht auf einer empirischen

Entscheidung. Es wurde beobachtet, dass unter einem Aktin- β -Wert von > 70 MFI gehäuft massenhaft HPV-Typen in einer Probe als positiv gemessen wurden, die in der Referenzmethode nicht zu finden waren. Oberhalb der Grenze zeigten sich stabil adäquate Ergebnisse der HPV-Typisierung und plausible Werte der Biomarker.

3.3.5 Definition der HPV-Positivität

Wie oben beschrieben beinhaltet jede Messung 3 Negativkontrollen. Die technische Grenze der HPV-Positivität (technischer Limit of Detection, LOD) wurde folgendermaßen aus den Negativkontrollen berechnet:

$$LOD = \text{Mittelwert der 3 Negativkontrollen} + 3 \times \text{Standartabweichung}$$

3.3.6 Technische Aspekte

Wie oben beschrieben besteht der Quantigene-Assay aus zwei Schritten: Einer Phase der Hybridisierung (Materialien: Beadmix) und einer Phase der Signalamplifikation und Färbung (Materialien: Färbekit). Um eine maximale Anzahl an Proben mit einem QuantiGene® 2.0 Assay Kit zu messen, wurde in einer schrittweisen Reduktion evaluiert, welche Quantität der Reagenzien noch verlässliche Ergebnisse bringt („Scale-down“-Versuch).

3.3.6.1 „Scale-down“-Versuch

Zielwert für die Verwendung des Beadmix war es, pro Well und Zielmolekül mindestens 15 Capture Beads (CB), im Schnitt über 25 CB zu messen. Tabelle 19 zeigt, dass ab einer Verwendung von 25% der vorgegebenen Quantitäten CB-Zahlen von < 25 erreicht werden und bei 12,5% der vorgegebenen Quantitäten auch die Grenze von 15 Beads unterschritten wird.

Tabelle 19: Konzentrationen der Capture Beads (CB) über verschiedene Titrationsschritte

Konzentration der CB im Working Bead Mix	< 25 Beads pro Well	< 15 Beads pro Well
50% ($\cong 0,5 \mu\text{l/well}$)	0/70 = 0%	0/70 = 0%
25% ($\cong 0,25 \mu\text{l/well}$)	12/70 = 17%	0/70 = 0%
12,5% ($\cong 0,125 \mu\text{l/well}$)	70/70 = 100%	56/70 = 80%

In Anbetracht des großen finanziellen Vorteils wurde für die Messungen die Menge von 25% der vorgesehenen Menge des Beadmix verwendet. Hierdurch reduziert sich der Messpreis für eine Probe von ca. 40€ auf ca. 10€.

Für die verwendeten Mengen an Färbekit wurde gezeigt, dass eine Reduzierung der Reagenzien zu schwächeren MFI-Signalen und damit zu einer Senkung der Sensitivität führt. Ab einer Reduzierung auf 25% wurde innerhalb der getesteten Proben (N=6) ein HPV-Wert, der in der Referenz als grenzwertig positiv gemessen worden war, als negativ gemessen. Da dieser Verlust an Sensitivität der Aussagekraft des Assays schadet, wurde für den Schritt der Signalamplifikation und Färbung die Menge von 50% der vorhergesehenen Reagenzien nicht unterschritten.

3.3.6.2 Vergleich verschiedener Capture Bead-Chargen

Zwei verschiedene Chargen an Capture Beads wurden für die vergleichenden Messungen verwendet (s. Tabelle 20).

Tabelle 20: Auflistung der verwendeten Chargen an Capture Beads

Panel	Katalognr.	Charge (Lot)	Plex	Verwendung
12769	312769-137	1481511	37 Plex	1. Platte
12769	312769-137	1481511	37 Plex	2. Platte
QP9000	QP9000	2931507	3 Plex	3 Plex
11001	311001-430	2441508	30 Plex	Housekeeper
12926	312926-146	0891608	46 Plex	Ab 3. Platte

In den Messungen mit der Charge 0891608 zeigte sich, dass die Werte für das Housekeeping-Gen Aktin- β im Vergleich zu den Messungen mit der Charge 1481511 im Durchschnitt deutlich erhöht waren (um ca. 200%). Da alle gemessenen Werte auf ACTB relativiert werden, musste diese Auffälligkeit ausgeglichen werden, um eine Vergleichbarkeit zwischen Ergebnissen, die mit unterschiedlichen Chargen gemessen wurden, sicherzustellen. In einer Kontrollmessung wurden somit 8 Proben mit jeweils beiden Chargen gemessen. Über den Mittelwert der Differenz konnte der **Faktor 2,88** bestimmt werden, um die Ergebnisse beider Chargen anzugleichen. Um diesem Problem in Zukunft besser zu begegnen, sollte eine Positivkontrolle mitgemessen werden, die einen konstanten Vergleich der Messergebnisse ermöglicht.

3.3.6.3 Evaluation der Housekeeper

Wie bereits beschrieben ergänzt die Relativierung der gemessenen MFI-Werte auf die MFI-Werte des Housekeepers Aktin- β die Aussage der Messung um einen wichtigen Teil. Die Wahl von Aktin- β als geeignetes Housekeeping-Gen beruht in ersten Linie auf Empfehlungen vorhandener Publikationen.⁸⁶ Da die absoluten Zahlen zu Zellularität der verwendeten Proben nicht zur Verfügung standen, blieb nur eine eingeschränkte Möglichkeit der Evaluation des Housekeepers innerhalb dieses Projekts.

Eine mögliche Fehlerquelle wäre eine Veränderung der Expression von Aktin- β (ACTB) bei zunehmender Progression der Erkrankung im Rahmen einer HPV-Infektion. Um diesen potentiellen Fehler auszuschließen, wurde das Verhältnis der Expression von ACTB zu HPRT über den steigenden Grad der klinischen Läsionen untersucht. Abbildung 13 zeigt, dass die Expression von ACTB und HPRT zu einem gewissen Maß korreliert und sich die Fälle unabhängig von dem Krankheitsstadium um eine Trendlinie herum darstellen lassen (Regressionskoeffizient (R^2) = 0,33). Sechs Fälle, die am stärksten von der Trendlinie abweichen (rot umkreist), lassen sich vier verschiedenen Krankheitsstadien zuordnen. Schließt man diese Fälle von der Auswertung aus, ergibt sich ein wesentlich höherer Regressionskoeffizient von 0,805. Dass sich die sechs Fälle vier verschiedenen Krankheitsstadien der zervikalen Dysplasie zuordnen lassen, unterstützt die Annahme, dass die Expression der Housekeeping Gene nicht in Abhängigkeit der Krankheitsstadien dysreguliert wird.

Es zeigt sich außerdem, dass innerhalb der Krankheitsstadien die absolute Expressionsmenge von ACTB und HPRT stark variiert. Dies unterstreicht die Wichtigkeit, die absolut gemessenen MFI-Werte auf die Expressionsstärke der Housekeeper zu relativieren.

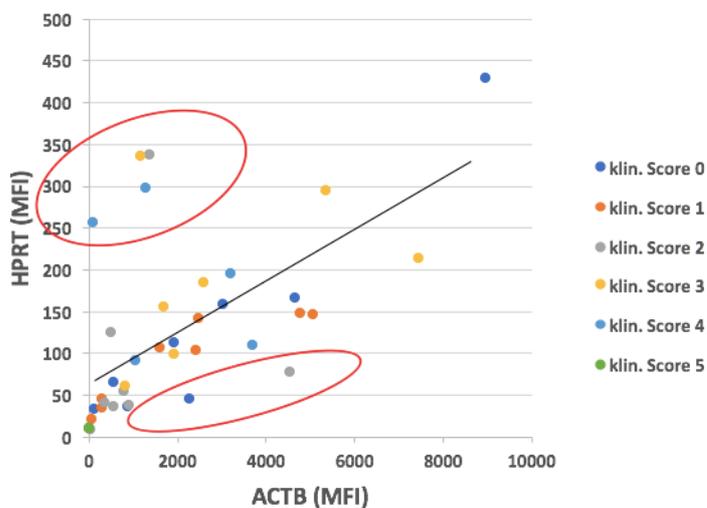


Abbildung 13: Korrelation der Expression von ACTB und HPRT über verschiedene Stadien der zervikalen Dysplasie, lineare Trendlinie eingezeichnet (schwarz); stark abweichende Fälle rot umkreist

In einem weiteren Schritt der technischen Evaluierung wurden über eine titrierte Messung von konzentrierter ACTB-mRNA untersucht, ob ab einer bestimmten Konzentration an zu messender mRNA die Messung per Capture Beads einen Punkt der Sättigung erreicht. Tabelle 21 zeigt, dass für die höchste Titrationsstufe ein Wert von 15545 MFI für ACTB gemessen wurde. Entsprechend der 1:10 Verdünnung wäre der Wert dieser höchsten Titrationsstufe bei dem 10fachen der nachfolgenden Titration, somit bei ca. 30000 MFI, zu erwarten gewesen. Dass der gemessene Wert

bei nur ca. 50% des erwarteten Wertes liegt, legt nahe, dass in dem Bereich um 15500 eine Sättigung erreicht wird.

Die Messerergebnisse der klinischen Proben liegen für ACTB im Bereich von ca. 100 – 5000 MFI. Dieser Bereich ist weit von dem maximal gemessenen Wert entfernt. Die ACTB-Messungen sind somit nicht der Gefahr ausgesetzt, durch Sättigung verzerrt zu werden.

Tabelle 21: Titration von Housekeeping-mRNA für ACTB und HPRT (in MFI gemessen); Titration in 1:10 Verdünnung von konzentrierter mRNA.

Titration	ACTB	HPRT1	Titration	ACTB	HPRT1
1.1	15545,25	1436,75	2.1	17458,25	2340,75
1.2	3515,25	120,25	2.2	5209,25	219,75
1.3	372,75	14,75	2.3	1013,25	37,75
1.4	31,25	2,75	2.4	140,25	9,75
1.5	3,25	2,75	2.5	4,25	-0,25

3.3.6.4 Auffälligkeiten der Proben

Ein großer Vorteil des Quantigene-Assays ist, dass die Probenaufbereitung auf wenige, simple Schritte reduziert ist (Abzentrifugieren des Thinpreps, Lyse). Dies hat aber zur Folge, dass Auffälligkeiten der Abstriche wie sehr hohe Viskosität, Beimengung von Blut und Schleim oder Differenz der Zellularität direkt auf die Messung Einfluss nehmen können. Als „unauffällige Probe“ gelten Proben mit niedriger Viskosität (leicht pipettierbar) und ohne Beimengung von Blut oder Schleim. Tabelle 22 zeigt, dass jedoch nur eine sehr hohe Viskosität, die schon das Pipettieren behindert, Ursache für ein nicht verwendbares Messergebnis (Beadzahl < 25) sein kann.

Tabelle 22: Auffälligkeiten der Abstriche im Zusammenhang mit der gemessenen Anzahl an Capture Beads

Auffälligkeit	Anzahl an Capture Beads pro Well (Standardabweichung); N=50
Unauffällig	59 (12)
Hohe Viskosität	11 (15)
Großes Pellet	40 (13)
Blut	43 (9)

3.4 Referenzmethode der Genotypisierung: BSGP5+/6+ - Multiplexed Genotyping

Als Referenzmethode für die Evaluierung der E7-mRNA-basierten HPV-Detektion wurde eine Methode mit höchst möglicher Sensitivität gewählt. Bei der Broad Spectrum General Primer 5+/6+-Multiplex HPV-Genotypisierung (BSGP 5+/6+-MPG) handelt es sich um eine PCR-basierte HPV-Detektion, bei der General Primer (GP) 5+/6+ verwendet werden. Als Targetstruktur

dienten Sequenzen des L1-Gens. Sowohl stark konservierte Sequenzen als auch angrenzende, sehr variable Sequenzen sind hierbei eingeschlossen, wodurch die Differenzierung verschiedener HPV-Typen ermöglicht wird.⁸⁷ Die amplifizierten Moleküle werden anschließend an magnetische Beads gebunden, dieser Komplex wird dann über Genotyp-spezifische Sonden ergänzt, mit SAPE angefärbt und schließlich von einem Laser-basierten Read-Out analysiert (Luminex Read out, Detail s.o.). Das Signal der L1-Moleküle wird in der Einheit Mean Fluorescence Intensity (MFI) gemessen.

Der Schritt der PCR-basierten Targetamplifikation ermöglicht eine hohe Sensitivität. Die Detektionsgrenze ist abhängig vom HPV-Typ und liegt bei 10 – 1000 Kopien des Zielmoleküls.⁸⁷

3.4.1 Materialien

Tabelle 23 zeigt die Materialien und Reagenzien, die für die BSGP 5+/6+-Genotypisierung verwendet wurden.

Tabelle 23: Materialien der GP 5+/6+ - PCR

Material / Reagenz	Hersteller
HS GP 5+/6+ Primer	TIB Molbiol (Luckenwalde, Deutschland)
Eppendorf-Taq Polymerase	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
MyTaq HS Mix	Bioline (London, UK)
PCR-Thermocycler EP Gradient	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Aerosol-resistente Filtertips	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
0,2 ml PCR-Gefäße	AB Gene, Thermo (Waltham, USA)
Extra Pipettierhilfen für Mastermix	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipetten 10µl; 100µl; 200µl; 1000µl	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
1,5 ml Tubes	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
RNA/ DNA freies Wasser	Fresenius Kabi (Louviers, Frankreich)
PCR-Werkbank	Thermo (Waltham, USA)
Handschuhe	diverse
Einmal-Laborkittel, gelb	diverse

Die Materialien des MPG und des Luminex-Readouts entsprechen den Listen des Plex Assays (s. Tabellen 13-14 S. 36).

3.4.2 Durchführung und Auswertung

Da diese Methodik bereits umfassend publiziert und gut zugänglich ist, soll im Folgenden nur das Wichtigste beschrieben werden.

Basis der HPV-Typisierung sind intra- und extrazervikal abgenommene und in Thinprep® konservierte Abstriche. Über einen Maxwell® 16-System wird die DNA isoliert (verwendeter Kit: LEV Blood/DNA Kit, AS1290). Mit der isolierten DNA wird dann eine PCR auf der Basis von HS GP 5+/6+ (Bioline) durchgeführt. Tabelle 24 zeigt die hierfür verwendeten Primer und ihre Konzentrationen im Mastermix.

Tabelle 24: Auflistung der verwendeten Primer für die HS GP-PCR (Bioline). *Quelle: Schmitt et al., 2008*⁸⁸

Primer	Konzentration (pmol/RX)
GP5+	0,214
BSGP5 2	0,086
BSGP5 3	0,086
BSGP5 4	0,086
BSGP5 5	0,086
BSGP5 6	0,086
BSGP5 7	0,860
BSGP5 9	0,086
BSGP5 17	0,086
BSGP6 - a	0,257
BSGP6 - b	0,171
BSGP6 - c	0,171
MS3 (BGf3)	0,075
MS10 (BioBG-b3)	0,075

Die somit amplifizierten Sequenzen werden dann an Sonden-gekoppelte Luminex beads hybridisiert und über ein Luminex-Readout gemessen⁸⁸. Eine Probe wurde als auswertbar angesehen, wenn die Gesamtanzahl der gemessenen Beads <1000 war und die Anzahl an Beads pro Bead-Art über 30 lag.

Die **HPV-Positivität** wurde in Relation zu dem Hintergrundsignal der Negativkontrollen definiert: Ein Wert, der über dem Zweifachen des Hintergrundsignals lag, wurde als grenzwertig positiv angesehen. Ab einem Wert über dem Dreifachen des Hintergrundsignals galt die Probe als HPV Genotyp-positiv.

3.5 Zellkultur

Um einen ersten Eindruck über die Messbarkeit der gewählten Marker in pathologisch veränderten Zellen der Zervixschleimhaut zu bekommen, wurden in einer „Pilot-Messung“ Zelllinien aus Zervixkarzinomen verwendet.

4 Zelllinien von Zervixkarzinomen (HeLa: HPV18+, ATCC® CCL-2™; CaSki: HPV16+, ATCC® CRL-1550™; SiHa: HPV16+, ATCC® HTB-35™; C33A: HPV-, ATCC® HTB-31™) wurden entsprechend dem Protokoll der American Type Culture Collection (ATCC) in Zellkultur gewachsen. Die Zelllinien wurden bei 37°C, 5% CO₂ in befeuchteter Luft kultiviert. Regelmäßige Kontrollen auf Verunreinigung mit Mykoplasmen wurden durchgeführt und waren stets negativ. Als Lagerungsmedium wurden NaCl und PreserveCyte verwendet. Über eine HPV DNA-Genotypisierung wurde die Stabilität der Humanen Papillomaviren in den Lagerungsmedien überprüft. Die Zelllinien wurden in einer Konzentration von 10⁶ Zellen/ml in Thinprep® Medium suspendiert und bis zu den Messungen bei -20°C aufbewahrt.

3.6 Statistische Auswertung

Um den Zusammenhang zwischen Expression der zellulären und viralen Marker (gemessen in MFI, s.o.) und dem Krankheitsgrad der zervikalen Läsion zu untersuchen, wurden verschiedene statistische Methoden verwendet.

3.6.1 Verteilung

Der Anstieg der Marker über die verschiedenen klinischen Stadien konnte nicht durch eine Normalverteilung beschrieben werden. Der Median der Werte eines Markers stieg zwar im Verlauf der klinischen Grade an, die Mittelwerte zeigten aber so hohe Standardabweichungen, dass diese Art der Beschreibung für die gemessenen Daten keine Aussage hat. Tabelle 25 zeigt dies exemplarisch für den Marker Stathmin-1 (STMN1).

Tabelle 25: Vergleich der relativierten MFI-Werte des Markers Stathmin-1 für zwei klinische Gruppen

	Stathmin-1 (rel.MFI)	
	HPV negative Proben (n=63)	Karzinome (n=27)
Mittelwert	30,8	342,7
Standardabweichung	35,6	591,8
Median	18,7	179,5

3.6.2 Rangkorrelationen

Um die Stärke des Zusammenhangs zwischen klinischen Stadien (Ordinalskala) und Markerexpression (Verhältnisskala) zu untersuchen, wurde eine Rangkorrelation nach Kendall T

durchgeführt. Für diese Untersuchung müssen die benachbarten Merkmalsausprägungen nicht äquidistant sein, da nur der Unterschied der Ränge verwendet wird (nicht ihre Differenz). Ebenso ist eine Normalverteilung nicht Voraussetzung.

Für die Korrelation der Marker untereinander wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman berechnet, da diese Methode auch bei nichtlinearen Zusammenhängen angewendet werden kann und robust gegen Ausreißer ist.

3.6.3 ROC-Analyse

Eine zentrale Hypothese dieses Projektes besteht darin, dass es möglich ist, anhand der gemessenen Marker den Progressionsgrad einer zervikalen Läsion auf molekularbiologischer Ebene zu charakterisieren. Hierfür werden Schwellenwerte benötigt, welche die verschiedenen Stadien einer HPV-Infektion abgrenzen. Grundlage hierfür sind die physikalischen Ergebnisse der durchgeführten Messungen. Die „Receiver Operating Characteristics“ (ROC)-Analyse ermöglicht die Berechnung einer Trenngröße, die die Messergebnisse (MFI, stetiges Merkmal) zu einer binären Testentscheidung reduziert. Es können also jeweils nur zwei Krankheitsgruppen miteinander verglichen werden.

Hierfür wird jeder gemessene Wert als potentieller Schwellenwert angesehen und jedem Wert wird seine Sensitivität und Spezifität zugeordnet. Der Anteil der falsch positiven (= 1-Spezifität) wird nun gegen den Anteil der richtig positiven (=Sensitivität) aufgetragen und ergibt die ROC-Kurve. Generell gilt: je höher die Sensitivität, desto niedriger die Spezifität. Für die Marker bedeutet das: Je niedriger der Trennwert gesetzt wird, umso mehr „Kranke“ werden eingeschlossen (hohe Sensitivität), aber umso mehr Gesunde werden fälschlicherweise als krank eingestuft (niedrige Spezifität). Die Gesamtgenauigkeit eines Markers für die Zuordnung von Proben in die klinischen Gruppen lässt sich über die Area under the Curve (AUC) quantifizieren ($AUC > 0,5$: Test ist besser als zufällige Zuordnung, $AUC = 1$: falsche Befunde sind ausgeschlossen). Im Rahmen dieser generellen Aussagefähigkeit eines Markers muss dann eine günstige Kombination an Sensitivität/Spezifität gewählt werden.

3.6.4 Logistische Regression

Der nächste Schritt ist das Anwenden einer logistischen Regression. Über die ROC-Analysen werden nun eine Auswahl an maximal günstigen, potentiellen Trennwerten für jeden Marker und jede Schwelle berechnet. Die logistische Regression bewertet nun die Kombination verschiedener Marker für eine Schwelle. Sie ermöglicht die Berechnung der Eintrittswahrscheinlichkeit eines

Zustandes (abhängige Variable, dichotom; hier: Schwelle im klinischen Score, z.B. 0,1,2,3 = 0 gegen 4,5 = 1) in Abhängigkeit von anderen Variablen (unabhängige Variablen, metrisch; hier: mögliche Trennwerte der Marker).

Um die Aussagen, die eine logistische Regression liefert, genauer zu erläutern, soll im Folgenden beispielhaft anhand der Schwelle 0123_45 die wichtigsten Teile der Regression aufgeführt werden. Abb. 14 zeigt die verwendete Syntax (Programmversion: IBM® SPSS® Statistics 25.0)

```

310
311
312 TEMPORARY.
313
314 RECODE StärksterHPV (LOWEST thru 0.5=0) (0.501 thru 4.5=1) (4.501 thru HIGHEST=2) INTO StärksterHPVg3 .
315 RECODE StärksterHPV (LOWEST thru 0.5=0) (0.501 thru HIGHEST=1) INTO StärksterHPVg2 .
316 RECODE HPV16E756 (LOWEST thru 0.85=0) (0.8501 thru HIGHEST=1) INTO HPV16E7g2.
317 RECODE MCM251 (LOWEST thru 40.5=0) (40.501 thru HIGHEST=1) INTO MCM2g2.
318 RECODE MKi6774 (LOWEST thru 11=0) (11.01 thru HIGHEST=1) INTO MKi67g2.
319 RECODE STMN157 (LOWEST thru 90.5=0) (90.5001 thru HIGHEST=1) INTO STMN1g2.
320 RECODE HPV16E6i39 (LOWEST thru 0.40=0) (0.4001 thru HIGHEST=1) INTO HPV16E6lg2.
321 COMPUTE StärksterHPVlog=LN(StärksterHPV + 1) .
322 COMPUTE STMN157log=LN(STMN157 + 1) .
323
324 VARIABLE LABELS
325 StärksterHPVg3 'StärksterHPV'
326 HPV16E7g2 'HPV16E7'
327 MCM2g2 'MCM2'
328 STMN1g2 'STMN'
329 MKi67g2 'Ki67' .
330
331 FORMATS
332 StärksterHPVg3 HPV16E7g2 MCM2g2 MKi67g2 (F1).
333
334 LOGISTIC REGRESSION VARIABLES Score
335 /METHOD=BSTEP StärksterHPVg3 HPV16E7g2 MCM2g2 MKi67g2
336 /CONTRAST (StärksterHPVg3)=Indicator(1) /CONTRAST (HPV16E7g2)=Indicator(1)
337 /CONTRAST (MKi67g2)=Indicator(1) /CONTRAST (MCM2g2)=Indicator(1)
338 /CONTRAST (STMN1g2)=Indicator(1) /CONTRAST (HPV16E6lg2)=Indicator(1)
339 /PRINT=CI(95)
340 /CRITERIA=PIN(.05) POUT(.10) ITERATE(20) CUT(.5).
341
342

```

Abbildung 14: Syntax der logistischen Regression für die Schwelle 0123_45, SPSS (Version IBM® SPSS® Statistics 25.0)

Die Klassifizierungstabelle (s. Tabelle 26) schlüsselt für die einzelnen Schritte der Regression auf, wie hoch der Prozentsatz richtig zugeordneter Proben ist. Hierbei wurde eine forward-step Regression verwendet. Es ist zu erkennen, dass sich der Prozentsatz der richtig bzw. falsch zugeordneten Proben ab Schritt 2 im Verlauf bis zu Schritt 4 bei Hinzunahme weiterer Marker nicht mehr verbessert. Trotzdem steigern diese Schritte die Gesamtaussagekraft des Modells, indem z.B. eine richtig zugeordnete Probe noch sicherer in ihre Kategorie eingeordnet wird. Über die Markerkombination des letzten Schrittes der Regression (Schritt 4) werden also 93,1% der Proben mit dem klinischen Score 0-3 (<CIN3) und 73,8% der Proben 4-5 (CIN3, Karzinome) richtig zugeordnet.

Tabelle 26: "Klassifizierungstabelle", ein Teilergebnis der logistischen Regression für die Schwelle 0123_45

	Beobachtet		Vorhergesagt		
			Score		Prozentsatz der Richtigen
			0	1	
Schritt 1	Score	0	96	6	94,1
		1	32	52	61,9
	Gesamtprozentsatz				79,6
Schritt 2	Score	0	95	7	93,1
		1	22	62	73,8
	Gesamtprozentsatz				84,4
Schritt 3	Score	0	95	7	93,1
		1	22	62	73,8
	Gesamtprozentsatz				84,4
Schritt 4	Score	0	95	7	93,1
		1	22	62	73,8
	Gesamtprozentsatz				84,4

Die folgenden Tabellen charakterisieren die Aussagefähigkeit der durchlaufenen Schritte. Das in Tabelle 27 gezeigte Teilergebnis schlüsselt auf, welche Markerkombination für welchen Schritt verwendet wurde. Außerdem liefert es für jeden verwendeten Trennwert den „Regressionskoeffizienten B“, der wichtig ist für die Berechnung der Odd's Ratio (hier der mathematischen Herleitung entsprechend als $\text{Exp}(B)$ bezeichnet) und auch in die Berechnung des finalen Risikoscores einfließt (s.u.).

Tabelle 27: Teilergebnis der logistischen Regression für die Schwelle 0123_45

		Regressionskoeffizient B	Standardfehler	Sig.	Exp(B)	95% Konfidenzintervall für EXP(B)	
						Unterer Wert	Oberer Wert
Schritt 1	HPV16E7(1)	3,258	,477	,000	26,000	10,207	66,226
	Konstante	-1,099	,204	,000	,333		
Schritt 2	HPV16E7(1)	3,186	,501	,000	24,189	9,064	64,552
	MCM2(1)	3,851	1,065	,000	47,062	5,837	379,439
	Konstante	-1,467	,236	,000	,231		
Schritt 3	StärksterHPVg2(1)	1,560	,484	,001	4,759	1,842	12,296
	HPV16E7(1)	2,473	,534	,000	11,859	4,163	33,788
	MCM2(1)	3,557	1,088	,001	35,067	4,155	295,996
	Konstante	-2,249	,388	,000	,105		
Schritt 4	StärksterHPVg2(1)	1,676	,500	,001	5,342	2,006	14,228
	HPV16E7(1)	2,491	,554	,000	12,078	4,078	35,765
	ALDH1A1(1)	1,212	,465	,009	3,362	1,351	8,364
	MCM2(1)	3,396	1,155	,003	29,841	3,101	287,128
	Konstante	-3,052	,529	,000	,047		

Die logistische Regression ermöglicht also, begründet Marker zu selektieren, deren Kombination eine Mehraussage im Vergleich zu der Aussage der einzelnen Marker bietet. Auch die einzelnen Trennwerte eines Markers können so selektiert werden.

3.6.5 Berechnung der Risikoscores

Als dritter Schritt der statistischen Auswertung wird diejenige Kombination an Trennwerten, die über die logistische Regression als Kombination mit der höchst möglichen Aussagekraft bestimmt wurde, zu einem **Risikoscore** zusammengefasst. Dieser Risikoscore berechnet für die final ausgewählten Trennwerte, ob der Wert überschritten wurden (1 Punkt) oder nicht (0 Punkte), und gewichtet diese Punkte dann je nach der Gesamtaussagekraft des Markers durch Multiplikation mit dem Regressionskoeffizienten B (s. Tabelle 27). Abbildung 15 zeigt den verwendeten Algorithmus. Über den nächsten Schritt (s. Abb. 15, Zeile 354 der Syntax) wird nun ein Score zwischen 0 und 100 berechnet, der das Risiko widerspiegelt zur Kategorie „krank“ zu gehören.

Die Syntax-Zeilen 356-360 in Abbildung 15 zeigen den letzten Schritt der Berechnung: Durch eine ROC-Analyse kann nun der **Trennwert des Risikoscores** berechnet werden, der diejenige Schwelle markiert, welche die höchste Trennschärfe zwischen gesund bzw. krank liefert.

```

343 TEMPORARY.
344
345 TEMPORARY.
346 RECODE StärksterHPV (LOWEST thru 0.5=0) (0.501 thru 4.5=1) (4.501 thru HIGHEST=0) INTO StärksterHPVmid .
347 RECODE StärksterHPV (LOWEST thru 0.5=0) (0.501 thru 4.5=0) (4.501 thru HIGHEST=1) INTO StärksterHPVhigh .
348 RECODE HPV16E756 (LOWEST thru 0.85=0) (0.8501 thru HIGHEST=1) INTO HPV16E7g2.
349 RECODE MCM251 (LOWEST thru 40.5=0) (40.501 thru HIGHEST=1) INTO MCM2g2.
350 RECODE MKi6774 (LOWEST thru 11=0) (11.01 thru HIGHEST=1) INTO MKi67g2.
351
352 COMPUTE RiskHPV3=-2.352 + (1.166*(StärksterHPVmid)) + (1.962*(StärksterHPVhigh)) + (2.416*(HPV16E7g2))
353 + (2.333*(MCM2g2)) + (2.618*(MKi67g2)).
354 COMPUTE Riskscore3=(EXP(RiskHPV3)) / (1 + (EXP(RiskHPV3))) * 100 .
355
356 ROC Riskscore3 BY Score (1)
357 /PLOT=CURVE(REFERENCE)
358 /PRINT=SE COORDINATES
359 /CRITERIA=CUTOFF(INCLUDE) TESTPOS(LARGE) DISTRIBUTION(FREE) CI(95)
360 /MISSING=EXCLUDE.
361
362
363

```

Abbildung 15: Syntax für die Berechnung des Risikoscores für die Schwelle 0123_45, SPSS (Version: IBM® SPSS® Statistics 25.0)

Ergebnisse

Der soeben beschriebene Assay stellt ein neues Testformat dar zur Diagnose und Charakterisierung von HPV-Infektionen. Als nächster Schritt in der Entwicklung dieses Tests wurde anhand klinischer Proben die Aussagekraft des Assays untersucht. Die Hypothesen und nunmehr die Ergebnisse dieses Projektes lassen sich in zwei Teilbereiche untergliedern:

1. **Genotypisierung:** Die quantitative Messung der mRNA des Onkogens E7 ermöglicht eine Genotypisierung der 18 high risk-HPV-Typen, die als Targets eingeschlossen wurden (HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82). Diese neuartige Methode der HPV-Diagnostik wurde anhand einer Referenzmethode evaluiert.
2. **Analyse durch zelluläre Biomarker:** Ein Panel von 23 zellulären Markern wurde ausgewählt, die – nach dem aktuellen Stand der molekularbiologischen Forschung um die Pathogenese des HPV-Virus – am ehesten eine Aussage über den Charakter und den Transformationsgrad einer HPV-Infektion liefern können. Auf der Basis ihrer quantitativen Messung soll nun evaluiert werden, ob über eine Kombination dieser Marker der klinisch diagnostizierte Grad einer HPV-induzierten Läsion verlässlich vorhergesagt werden kann.

4.1 Quantitative HPV-Genotypisierung im Vergleich

Der QuantiGene® 2.0 Plex Assay ermöglicht eine quantitative, RNA-basierte HPV-Genotypisierung mit dem Onkogen E7 als Targetmolekül. Für die Auswertung der Ergebnisse der Genotypisierung dient die BSGP 5+/6+-MPG (MPG) als Referenzmethode mit hoher Sensitivität (Details s.o.).

238 Proben standen für die Auswertung der parallelen Messung mit MPG und QuantiGene® 2.0 zur Verfügung. 147 Proben waren positiv für mindestens einen high-risk (hr) HPV-Typ in der GP5+/6+ -PCR und 128 Proben zeigten eine Positivität für mindestens einen hr HPV-Typ in der QuantiGene-Typisierung. 11 Proben waren im Test mit QuantiGene HPV-positiv und in der PCR negativ, 17 Proben zeigten mindestens einen HPV-Typ in der PCR-Methode, waren jedoch negativ in der QuantiGene-Typisierung.

Ausgehend von den Ergebnissen der GP5+/6+ PCR ergab die QG-Typisierung für 133 Proben (**55,9%**) ein exakt entsprechendes Ergebnis (Gruppen 0+1+2 ohne 1b und 2b, s. Tabelle 28). Für 197 Proben (**82,8%**) zeigte sie ein teilweise gleiches Ergebnis, wobei hier im Fall einer Infektion

mit multiplen HPV-Typen mindestens ein identischer HPV-Typ in der QG-Methoden erkannt wurde (Gr. 0,1, 2, 2.1 s. Tabelle 28).

Tabelle 28: Die QuantiGene®-HPV-Genotypisierung im Vergleich zur Referenzmethode GP5+/6+ - MPG

Ergebnis GP5+/6+ - MPG	Ergebnis Quantigene Assay-Typisierung, gruppiert		Anzahl	Bemerkung
HPV negativ	0	identisch	80	
	0.1	Abweichend (HPV-positiv)	11	
Infektion mit max. 1 HPV-Typ („single infection“)	1	identisch	59	Von den 58 zeigten 9 in GQ eine multiple Infektion (1b)
	1.1	Abweichende Typen	8	
Multiple Infektion	2	identisch	4	Von den 4 zeigte 1 in QG zusätzliche Positivität (2b)
	2.1	teilweise identisch	54	
	2.2	abweichend	5	
Positiv für mind. 1 HPV-Typ	3	HPV-negativ	17	

4.1.1 Quantitative E7-Messung: Bestimmung des führenden HPV-Typ

Wie im oberen Abschnitt beschrieben, bietet die QG-Genotypisierung die Möglichkeit einer quantitativen Messung des Zielmoleküls und ermöglicht somit die Aussage, welcher HPV-Typ in einer Infektion mit mehreren Typen am stärksten das Onkogen E7 exprimiert (s. S. 34 ff.). Eine entsprechende Klassifizierung der HPV-Typen in einer multiplen Infektion ist durch die Methode der GP5+/6+ PCR nicht möglich. Ausgehend von der Annahme, dass das Expressionslevel der Onkogene mit dem Transformationsrisiko einer Infektion in Zusammenhang steht (s. S. 7 f.), kann der HPV-Typ mit der höchsten Expression an E7 als führender HPV-Typ charakterisiert werden. Ihm kommt in der Pathogenese eine führende Rolle zu.

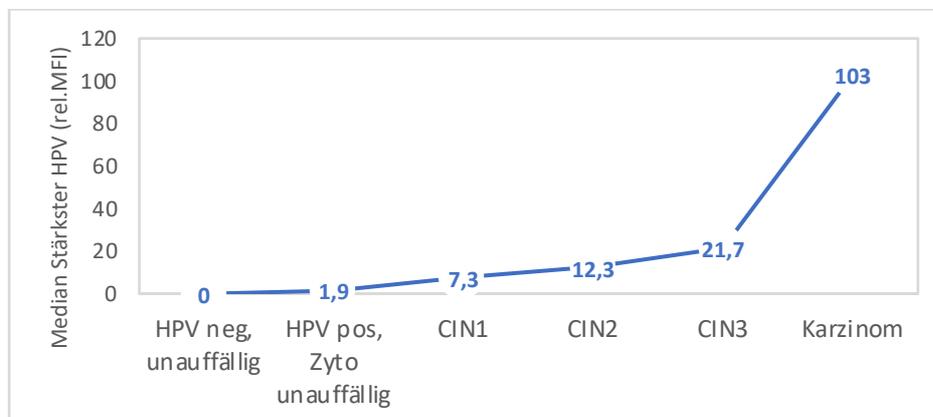


Abbildung 16: Mediane der Messergebnisse des Stärksten HPV (E7-Expression des führenden HPV-Typs) über die klinischen Gruppen

Abbildung 16 zeigt, dass der Median des Stärksten HPV über die klinischen Gruppen hinweg ansteigt. Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme, dass das Expressionslevel des Onkogens E7 mit dem Transformationsrisiko einer Infektion korreliert.

Während im Vergleich der beiden Typisierungen 3 von 63 multiplen Infektionen (4,8%) ein exakt identisches Ergebnis zeigten, wurden in 56 der 63 Fälle (**88,9%**) der führende HPV-Typ auch in der PCR erkannt.

4.2 Evaluation der zellulären Biomarker

4.2.1 Korrelation der Biomarkerexpression zum Schweregrad der Dysplasie

In einem ersten Schritt der Auswertung soll bestimmt werden, inwieweit die Expressionsstärke der zellulären Marker mit dem klinischen Score korreliert. Die Rangkorrelation nach Kendall-Tau ergab, dass 8 zelluläre Marker, die Expressionsstärke von E6 und auch Expressionsstärke des „Stärksten HPV“ (also des HPV-Typ, der für eine Probe die höchste Expression für E7 aufwies) signifikant mit dem klinischen Score korrelieren (s. Markierung Tabelle 29).

Tabelle 29: Rangkorrelation nach Kendall T für den klinischen Score und die 19 Biomarker.

** : Signifikanzlevel $p < 0,01$

* : Signifikanzlevel $p < 0,05$

Marker	Klinischer Score		
	Korrelationskoeffizient	Sig. (2-seitig)	Anzahl
Stärkster HPV	0,593**	<0,001	216
HPV16-E6I	0,435**	<0,001	216
p16	0,223**	<0,001	216
STMN	0,293**	<0,001	216
p63	0,175**	0,001	186
ALDH1A1	0,159**	0,004	186
ALDH1L1	-0,023	0,655	216
CD63	0,015	0,774	216
AGR2	-0,110*	0,029	216
SOX2	0,130*	0,010	216
NANOG	-0,053	0,291	216
MMP7	-0,109*	0,031	216
KRT7	0,084	0,096	216
KRT17	0,227**	<0,001	216
MCM2	0,266**	<0,001	216
POU5FI	0,024	0,629	216
Ki-67	0,219**	<0,001	216
GDA	0,061	0,226	216
BIRC	0,233**	<0,001	216

4.2.2 Korrelation der Biomarker untereinander

Für die Analyse der Korrelation der Marker untereinander wurde eine Rangkorrelation nach Spearman durchgeführt (s. Tabelle 30). Es ist erkennbar, dass wieder die Expression der Onkogene sowie die 8 zellulären Marker, die schon in der Berechnung nach Kendall T korrelierten, mit dem klinischen Score korrelieren. Teilweise zeigen die Marker eine stärkere Korrelation untereinander als mit dem klinischen Score. Es muss bedacht werden, dass einige Marker, beispielsweise p16 und das Onkogen E7, in ihrer biologischen Funktion verknüpft sind und daher zwangsläufig korrelieren.

Ergebnisse

Tabelle 30: Korrelation nach Spearman; gelbe Markierung: Marker, welche signifikant mit dem klinischen Score korrelieren. Sig. = Signifikanz, Korr.koef. = Korrelationskoeffizient *Signifikanzniveau <0,05 **Signifikanzniveau <0,01

		p16	STMN1	p63	ALDH1A1	ALDH1L1	CD63	AGR2	SOX2	NANOG	MMP7	KRT7	KRT17	MCM2	POU5F1	MKI67	GDA	BIRC5	Score		
Spearman	p16	Korr.koef.	1,000	,588**	,558**	,294**	,601**	,374**	,071	,308**	,089	,199**	,672**	,496**	,548**	,142*	,457**	,211**	,366**	,272**	
		Sig.		,000	,000	,000	,000	,000	,310	,000	,200	,004	,000	,000	,000	,040	,000	,002	,000	,000	
		N	208	208	177	177	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208
Rho	STMN1	Korr.koef.	,588**	1,000	,551**	,690**	,708**	,558**	,182**	,198**	,373**	,557**	,787**	,426**	,915**	,619**	,847**	,607**	,646**	,347**	
		Sig.	,000		,000	,000	,000	,000	,009	,004	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	
		N	208	208	177	177	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208
p63	p63	Korr.koef.	,558**	,551**	1,000	,437**	,520**	,360**	,184*	,386**	,238**	,267**	,523**	,406**	,612**	,306**	,537**	,281**	,580**	,203**	
		Sig.	,000	,000		,000	,000	,000	,014	,000	,001	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,007	
		N	177	177	177	177	177	177	177	177	177	177	177	177	177	177	177	177	177	177	177
ALDH1A1	ALDH1A1	Korr.koef.	,294**	,690**	,437**	1,000	,684**	,658**	,105	,212**	,287**	,635**	,614**	,236**	,658**	,609**	,638**	,632**	,473**	,171*	
		Sig.	,000	,000	,000		,000	,000	,163	,005	,000	,000	,002	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,023	
		N	177	177	177	177	177	177	177	177	177	177	177	177	177	177	177	177	177	177	177
ALDH1L1	ALDH1L1	Korr.koef.	,601**	,708**	,520**	,684**	1,000	,730**	,183**	,190**	,315**	,635**	,843**	,336**	,691**	,559**	,577**	,621**	,394**	,015	
		Sig.	,000	,000	,000	,000		,000	,008	,006	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,826	
		N	208	208	177	177	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208
CD63	CD63	Korr.koef.	,374**	,558**	,360**	,658**	,730**	1,000	-,013	,095	,206**	,516**	,579**	,125	,594**	,472**	,545**	,512**	,256**	-,040	
		Sig.	,000	,000	,000	,000	,000		,857	,174	,003	,000	,000	,072	,000	,000	,000	,000	,000	,565	
		N	208	208	177	177	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208
AGR2	AGR2	Korr.koef.	,071	,182**	,184*	,105	,183**	-,013	1,000	,034	,441**	,164*	,216**	,462**	,213**	,396**	,165*	,118	,360**	-,115	
		Sig.	,310	,009	,014	,163	,008	,857		,631	,000	,018	,002	,000	,002	,000	,017	,090	,000	,099	
		N	208	208	177	177	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208
SOX2	SOX2	Korr.koef.	,308**	,198**	,386**	,212**	,190**	,095	1,000	,034	,139*	,076	,232**	,102	,187**	,055	,136*	-,067	,410**	,140*	
		Sig.	,000	,004	,000	,005	,006	,174	,631		,045	,273	,001	,144	,007	,429	,049	,337	,000	,043	
		N	208	208	177	177	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208
NANOG	NANOG	Korr.koef.	,089	,373**	,238**	,287**	,315**	,206**	,441**	1,000	,139*	,409**	,385**	,221**	,454**	,639**	,313**	,368**	,543**	-,024	
		Sig.	,200	,000	,001	,000	,000	,003	,000	,045		,000	,000	,001	,000	,000	,000	,000	,000	,733	
		N	208	208	177	177	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208
MMP7	MMP7	Korr.koef.	,199**	,557**	,267**	,635**	,635**	,516**	,164*	,076	1,000	,624**	,163*	,498**	,653**	,463**	,734**	,299**	-,100		
		Sig.	,004	,000	,000	,000	,000	,018	,273	,000		,000	,019	,000	,000	,000	,000	,000	,151		
		N	208	208	177	177	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	
KRT7	KRT7	Korr.koef.	,672**	,787**	,523**	,614**	,843**	,579**	,216**	,232**	,385**	1,000	,624**	1,000	,524**	,737**	,572**	,599**	,642**	,503**	,136
		Sig.	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,002	,001	,000	,000		,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,050
		N	208	208	177	177	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208
KRT17	KRT17	Korr.koef.	,496**	,426**	,406**	,236**	,336**	,125	,462**	,102	,221**	,163*	1,000	,419**	,257**	,290**	,304**	,402**	,247**		
		Sig.	,000	,000	,000	,002	,000	,072	,000	,144	,001	,019	,000		,000	,000	,000	,000	,000		
		N	208	208	177	177	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	
MCM2	MCM2	Korr.koef.	,548**	,915**	,612**	,658**	,691**	,594**	,213**	,187**	,454**	,498**	,737**	1,000	,622**	,837**	,563**	,681**	,326**		
		Sig.	,000	,000	,000	,000	,000	,002	,007	,000	,000	,000	,000	,000		,000	,000	,000	,000		
		N	208	208	177	177	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	
POU5F1	POU5F1	Korr.koef.	,142*	,619**	,306**	,609**	,559**	,472**	,396**	,055	,639**	,653**	,572**	,257**	1,000	,539**	,671**	,544**	,074		
		Sig.	,040	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,429	,000	,000	,000	,000		,000	,000	,000	,285		
		N	208	208	177	177	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	
MKI67	MKI67	Korr.koef.	,457**	,847**	,537**	,638**	,577**	,545**	,165*	,136*	,313**	,463**	,599**	,290**	,837**	1,000	,548**	,622**	,259**		
		Sig.	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,017	,049	,000	,000	,000	,000	,000		,000	,000	,000		
		N	208	208	177	177	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	
GDA	GDA	Korr.koef.	,211**	,607**	,281**	,632**	,621**	,512**	,118	-,067	,368**	,734**	,642**	,304**	,563**	,671**	1,000	,336**	,068		
		Sig.	,002	,000	,000	,000	,000	,000	,090	,337	,000	,000	,000	,000	,000	,000		,000	,329		
		N	208	208	177	177	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	
BIRC5	BIRC5	Korr.koef.	,366**	,646**	,580**	,473**	,394**	,256**	,360**	,410**	,543**	,299**	,503**	,402**	,681**	,544**	1,000	,336**	,347**		
		Sig.	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000		,000	,000		
		N	208	208	177	177	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	
Score	Score	Korr.koef.	,272**	,347**	,203**	,171*	,015	-,040	-,115	,140*	-,024	-,100	,136	,247**	,326**	,074	,259**	,068	,347**	1,000	
		Sig.	,000	,000	,007	,023	,826	,565	,099	,043	,733	,151	,050	,000	,000	,285	,000	,329	,000		
		N	208	208	177	177	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208	208

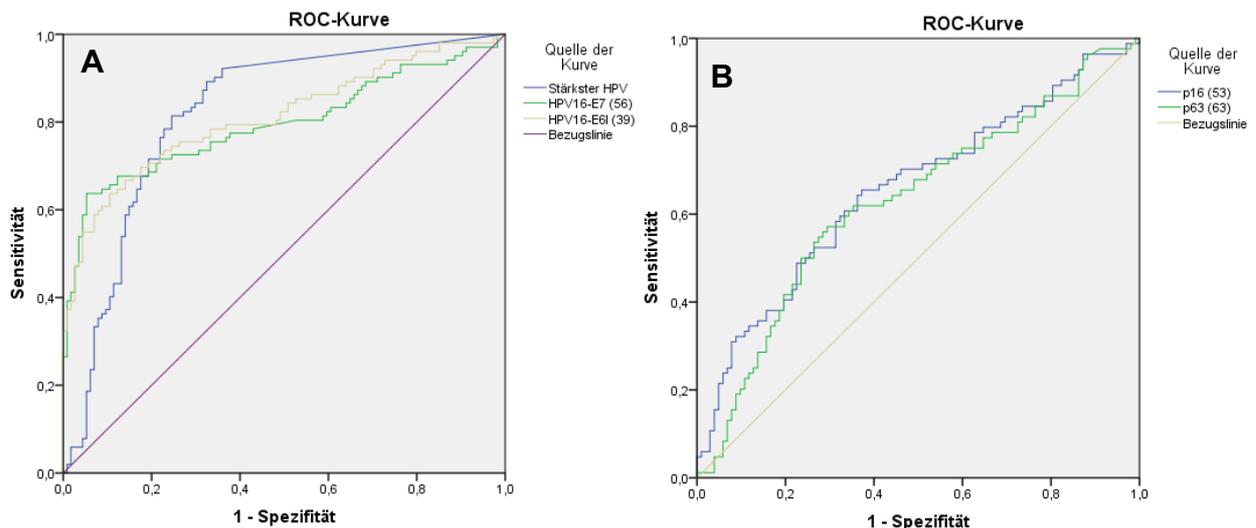
4.2.3 Charakterisierung von Dysplasiegraden durch Biomarker-Trennwerte: ROC-Analysen

Für die weitere Evaluation der Marker wurden drei Schwellen der klinischen Stadien untersucht:

1. Die Trennung die Schwelle von Läsionen kleiner CIN2 gegen CIN2 und höher ($<CIN2/CIN2+$);
 2. Die Trennung zwischen Läsionen, die maximal den Dysplasiegrad CIN2 aufweisen gegen Läsion mit CIN3 oder der Diagnose eines Karzinoms ($<CIN3/CIN3+$);
 3. die Trennung der Karzinome von anderen Dysplasiestufen ($<Ca/Ca$);
- In der Diagnostik der HPV-induzierten zervikalen Läsionen können die zweite und dritte Schwelle als die klinisch wichtigsten benannt werden. Das Übertreten dieser Schwellen indiziert eine jeweils höhere Stufe der therapeutischen Invasivität. Auch prognostisch sind sie von hoher Bedeutung. Aus diesem Grund liegt der Schwerpunkt der weiteren Auswertung auf diesen beiden Schwellen ($<CIN3/CIN3+$ und $<Ca/Ca$).

ROC-Analysen ermöglichen zum einen eine Abschätzung der Gesamtaussagekraft eines Markers für eine Schwelle (s. S. 49), zum anderen können Trennwerte bestimmt werden, die das günstigste Verhältnis von Sensitivität und Spezifität für die Definition einer Schwelle aufweisen. Die folgenden Abbildungen zeigen die ROC-Kurven der einzelnen Marker (gruppiert), sowie eine Zusammenstellung der „Area under the Curve“ (AUC) -Werte.

4.2.3.1 Trennwerte für die Schwelle: 0123_45 ($\leq CIN2/CIN3+$)



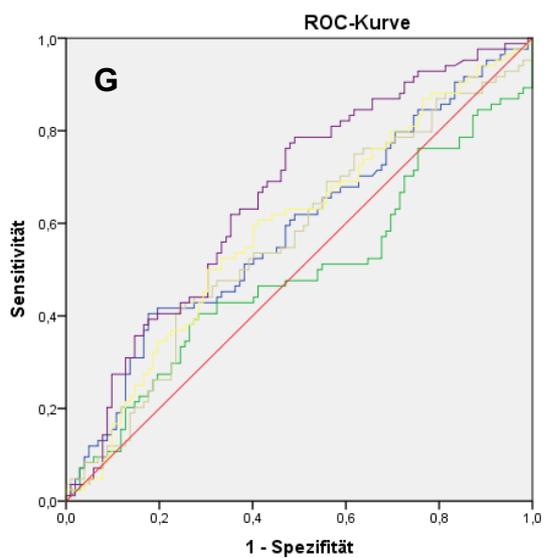
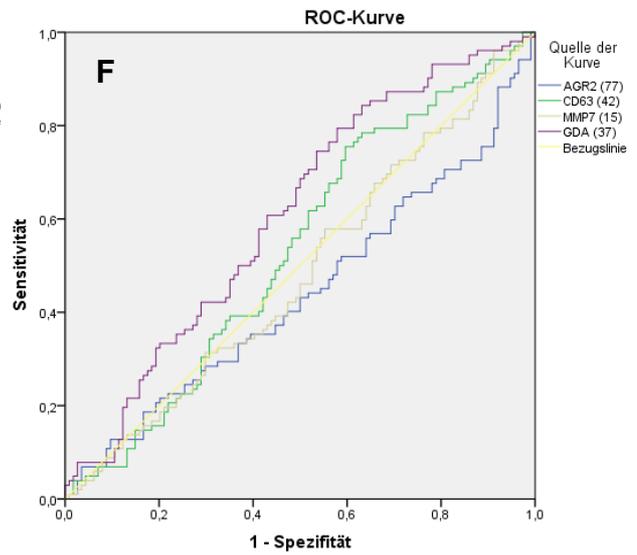
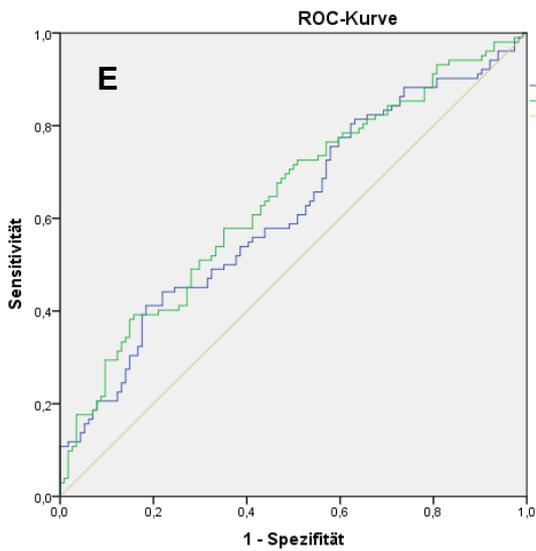
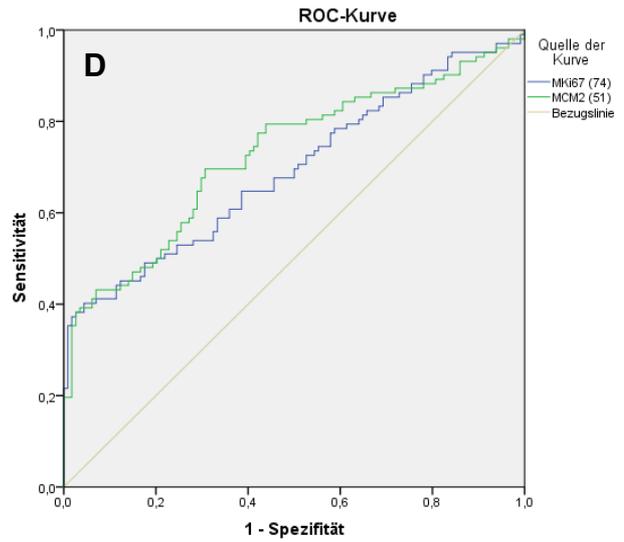
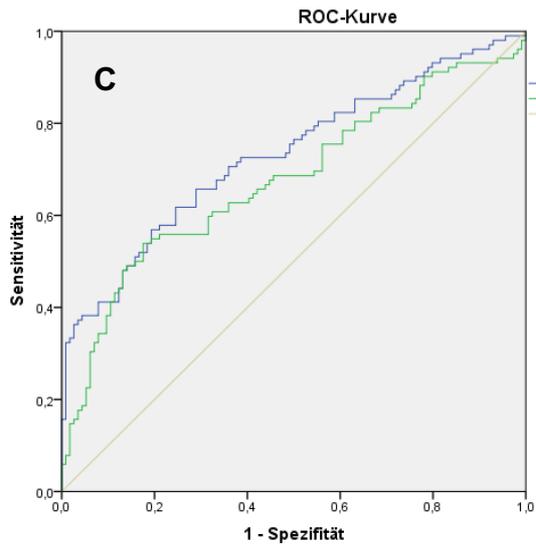


Abbildung 17: ROC-Analysen der zellulären und viralen Marker (gruppiert) für die Schwelle 0123_45.

A: HPV Onkogene (HPV16 E6, E7, StärksterHPV)

B: p16, p53

C: Progressionsmarker: STMN, Survivin

D: Proliferationsmarker: Ki67, MCM2

E: Keratine: 7, 17

F: SCJ-Marker: ARG, CD63, MMP7, GDA

G: Tumormarker: SOX2, Oct4, NANOG, ALDH

Folgende AUCs konnten für die einzelnen Marker berechnet werden (Schwelle 0123_45):

Tabelle 31: Übersicht der Area under the Curve (AUCs) der ROC-Analysen für die Schwelle 0123_45; sortiert nach Größe, absteigend

Marker	AUC	Standardfehler	Asymptotische Signifikanz	CI 95% Unten	CI 95% Oben
Stärkster HPV	0,819	0,030	0,000	0,761	0,878
HPV16 E6	0,811	0,030	0,000	0,752	0,871
HPV16 E7	0,795	0,032	0,000	0,731	0,858
STMN	0,731	0,035	0,000	0,663	0,799
MCM2	0,727	0,035	0,000	0,658	0,796
Ki-67	0,692	0,036	0,000	0,621	0,764
BIRC5	0,677	0,037	0,000	0,604	0,75
ALDH1A1	0,660	0,040	0,000	0,582	0,739
p16	0,647	0,038	0,000	0,574	0,721
KRT17	0,643	0,038	0,000	0,569	0,716
p63	0,628	0,042	0,003	0,547	0,71
KRT7	0,615	0,038	0,003	0,540	0,69
GDA	0,609	0,038	0,006	0,534	0,684
POU5FI	0,578	0,039	0,047	0,502	0,655
SOX	0,560	0,039	0,128	0,483	0,637
ALDH1L1	0,556	0,039	0,159	0,479	0,633
CD63	0,534	0,039	0,389	0,457	0,611
NANOG	0,506	0,040	0,875	0,427	0,585
MMP7	0,484	0,039	0,679	0,406	0,561
AGR	0,440	0,040	0,125	0,362	0,517

Es zeigt sich, dass einige Marker in ihrer quantitativen Bestimmung sehr hohe AUC-Werte liefern und somit potentiell in der Lage sind, eine Aussage über den Dysplasiegrad einer zervikalen Läsion zu treffen. Die drei Messwerte der HPV-Onkogene (HPV16 E6, HPV16 E7, E7 der führenden HPV-Infektion (=stärkster HPV)) weisen gegenüber allen zellulären Markern die höchsten AUC-Werte auf und liefern somit den höchsten Aussagewert für die Differenzierung von zervikalen Läsionen <CIN3 und CIN3+. Das zelluläre Onkoprotein STMN und der Proliferationsmarker MCM2 können in der Reihe der zellulären Marker mit der größten Genauigkeit die Schwelle <CIN3/CIN3 + beschreiben. MMP7 und ARG weisen Werte von < 0,5 auf und haben somit keine Aussagekraft bzw. korrelieren leicht antiproportional mit dem klinischen Score.

In einem nächsten Schritt konnte über die Auswertung der ROC-Analysen eine Auswahl potentieller Trennwerte bestimmt werden. Hierfür wurden diejenigen MFI-Werte der einzelnen Marker ausgewählt, die als Trennwerte mit einer günstigen Kombination an Sensitivität/Spezifität die Schwelle 0123_45 definieren. Aufgrund mangelnder Aussagekraft wurden MMP7 und ARG aus dieser Analyse ausgeschlossen.

Über folgende Richtlinien wurden die Trennwerte ausgewählt: Zunächst wurde derjenige bestimmt und ausgewählt, der die höchste Summe von Sensitivität + Spezifität aufwies („gesamt-bester“ Trennwert). Im nächsten Schritt wurde überprüft, inwieweit der Marker mit seiner spezifischen ROC-Kurve geeignet ist, eine besonders hohe Sensitivität bzw. Spezifität für die Schwelle 0123_45 zu erreichen. Somit wurden weitere Trennwerte ausgemacht, welche die Aussage des „gesamt-besten“ Trennwertes ergänzen können (s. Tabelle 32).

Tabelle 32: Auswahl an aussagekräftigen Trennwerten für die Schwelle 0123_45;

Sens. = Sensitivität

Spez. = Spezifität

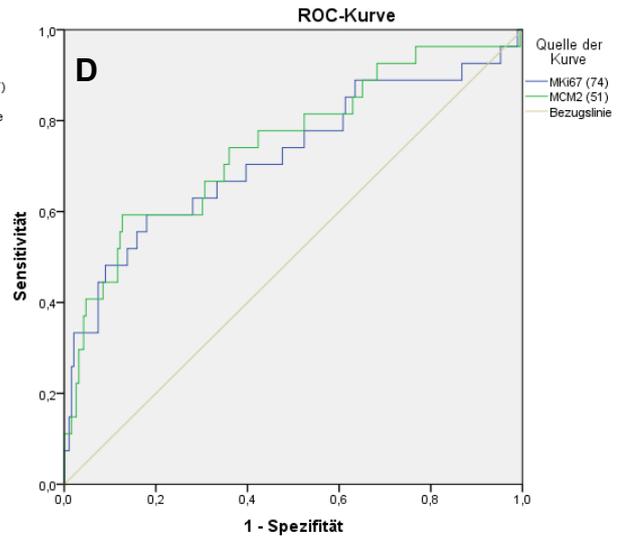
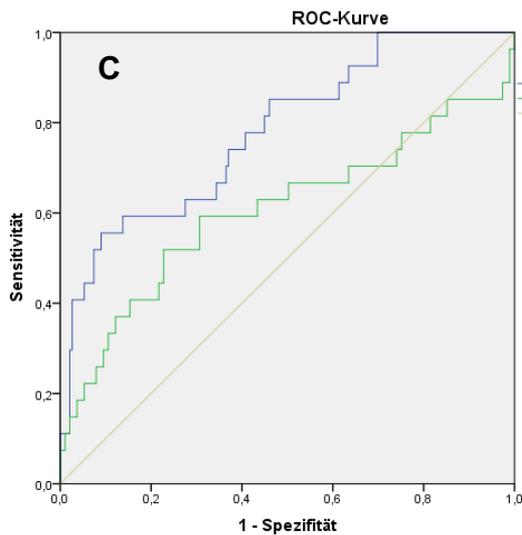
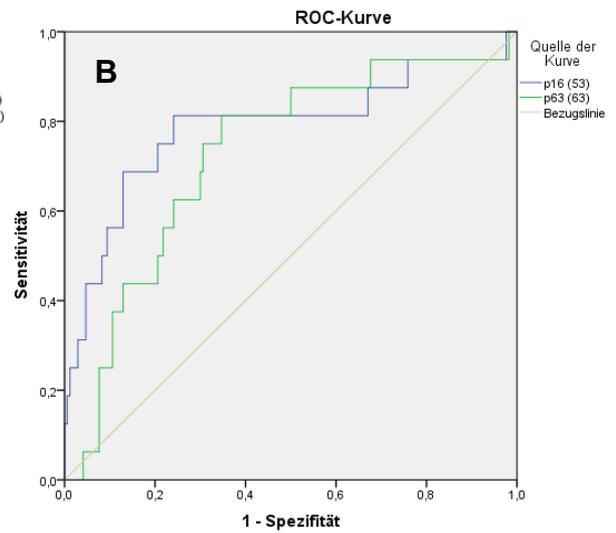
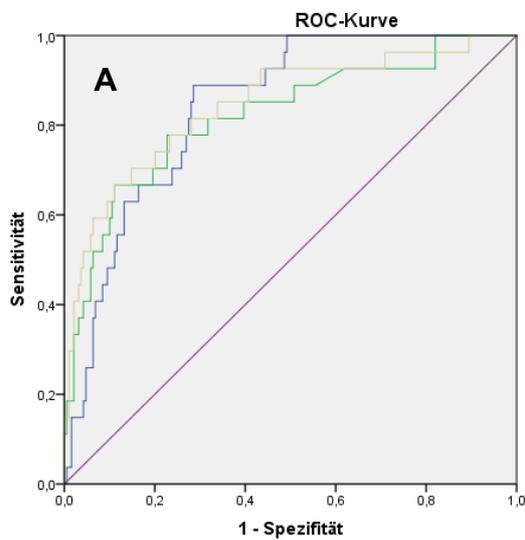
Summe = Summe aus Sens. + Spez.

Marker	Trennwert (rel.MFI)	Sens.	Spez.	Summe	Marker	Trennwert (rel.MFI)	Sens.	Spez.	Summe
Stärkster HPV	0,49	0,902	0,658	1,56	ALDH1 A1	0,55	0,869	0,343	1,212
	4,52	0,814	0,754	1,568		1,31	0,786	0,510	1,296
	11,11	0,716	0,807	1,523		11,62	0,274	0,902	1,176
	22,76	0,588	0,860	1,448	ALDH1 L1	9,41	0,598	0,561	1,159
	66,91	0,353	0,921	1,274	CD63	60,01	0,755	0,404	1,159
HPV16 E7	0,00	0,784	0,57	1,354	SOX	1,93	0,402	0,781	1,183
	0,84	0,637	0,947	1,584		2,76	0,314	0,825	1,139
	7,31	0,471	0,974	1,445	NANOG	3,15	0,422	0,728	1,150
HPV16 E6	0,01	0,804	0,509	1,313	KRT7	55,05	0,882	0,263	1,145
	0,40	0,637	0,895	1,532		85,11	0,814	0,368	1,182
	0,58	0,588	0,930	1,518		318,68	0,412	0,816	1,228
	25,44	0,324	1	1,324		582,99	0,206	0,921	1,127
p16	9,85	0,804	0,342	1,146	KRT17	135,74	0,814	0,342	1,156
	19,72	0,667	0,588	1,255		427,90	0,392	0,842	1,234
	30,83	0,539	0,702	1,241		542,30	0,284	0,904	1,188
	52,00	0,363	0,851	1,214	POU5FI	3,47	0,755	0,377	1,132
STMN	10,31	0,853	0,351	1,204		11,64	0,480	0,684	1,164
	16,66	0,765	0,500	1,265	GDA	1,31	0,873	0,307	1,180
	24,85	0,706	0,640	1,346		1,88	0,843	0,368	1,21
	49,72	0,569	0,807	1,376	BIRC5	0,28	0,833	0,316	1,149
	62,41	0,490	0,860	1,35		0,43	0,755	0,439	1,194
	90,58	0,373	0,965	1,338		1,51	0,539	0,825	1,364
	125,56	0,324	0,991	1,315		2,55	0,412	0,895	1,307
p63	1,22	0,738	0,422	1,16		3,00	0,343	0,921	1,264

(p63)	3,59	0,571	0,706	1,277
	8,17	0,417	0,804	1,221
Ki-67	1,16	0,784	0,412	1,196
	2,39	0,647	0,614	1,261
	7,58	0,402	0,956	1,358
	11,02	0,353	0,991	1,344
MCM2	4,47	0,853	0,368	1,221
	10,88	0,696	0,693	1,389
	21,77	0,471	0,851	1,322

4.2.3.2 Trennwerte für die Schwelle: 01234_5 (\leq CIN3/Karzinom)

Nach dem selbigen Verfahren wurde auch die zweite klinisch wichtige Schwelle analysiert, die Karzinome von nicht-Karzinomen trennt.



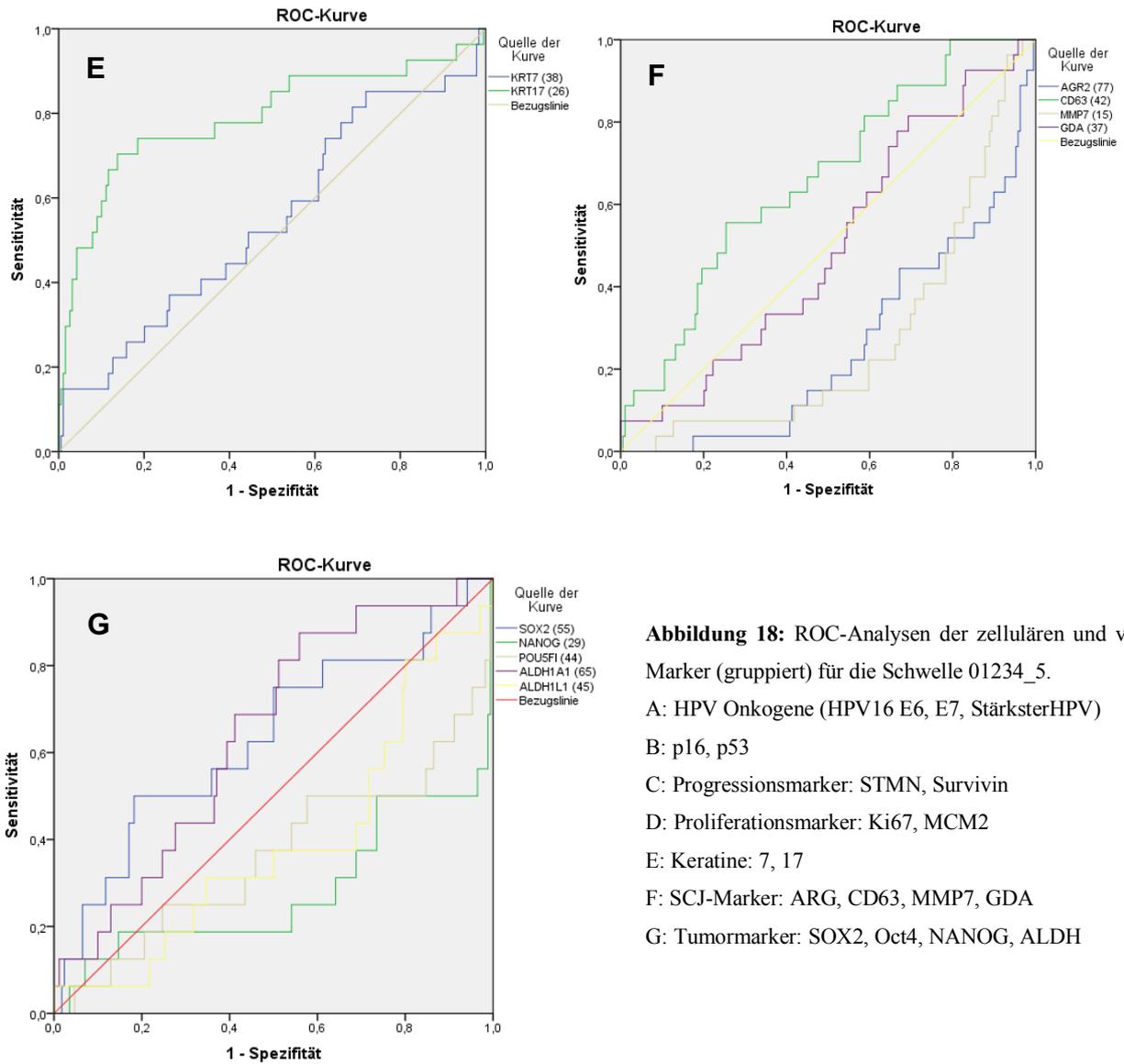


Abbildung 18: ROC-Analysen der zellulären und viralen Marker (gruppiert) für die Schwelle 01234_5.

- A: HPV Onkogene (HPV16 E6, E7, StärksterHPV)
- B: p16, p53
- C: Progressionsmarker: STMN, Survivin
- D: Proliferationsmarker: Ki67, MCM2
- E: Keratine: 7, 17
- F: SCJ-Marker: ARG, CD63, MMP7, GDA
- G: Tumormarker: SOX2, Oct4, NANOG, ALDH

Für die einzelnen Marker konnte folgende AUC berechnet werden (Schwelle 01234_5):

Tabelle 33: „Areas under the Curve“ (AUCs) der einzelnen Marker für die Schwelle 01234_5. Sortiert nach Größe, absteigend

Marker	AUC	Standardfehler	Asymptotische Signifikanz	CI 95% Unten	CI 95% Oben
HPV16 E6	0,845	0,045	0,000	0,757	0,933
StärksterHPV	0,840	0,033	0,000	0,776	0,904
HPV16 E7	0,820	0,048	0,000	0,727	0,914
KRT17	0,790	0,058	0,000	0,676	0,903
STMN	0,780	0,049	0,000	0,685	0,876
p16	0,751	0,057	0,000	0,64	0,863
MCM2	0,747	0,056	0,000	0,638	0,857
p63	0,726	0,066	0,003	0,597	0,854
Ki-67	0,719	0,062	0,000	0,599	0,84
CD63	0,662	0,053	0,007	0,558	0,766
ALDH1A1	0,644	0,065	0,056	0,518	0,771
BIRC5	0,606	0,071	0,076	0,467	0,744
SOX2	0,575	0,065	0,210	0,446	0,703
KRT7	0,548	0,063	0,425	0,425	0,67
GDA	0,499	0,056	0,986	0,389	0,608
POU5FI	0,397	0,061	0,084	0,277	0,517
NANOG	0,391	0,069	0,066	0,255	0,526
ALDH1L1	0,384	0,057	0,051	0,272	0,495
MMP7	0,272	0,048	0,000	0,178	0,365
AGR	0,255	0,047	0,000	0,162	0,347

Tabelle 33 zeigt, dass auch für diese Schwelle eine Beschreibung durch Messung der Markerexpression möglich ist und dass auch hier die Expressionsstärke der HPV-Onkogene den höchsten Aussagewert liefern. Sechs der zellulären Marker (GDA, POU5FI, NANOG, ALDH1L1, MMP7 und ARG) weisen einen AUC-Werte von $<0,5$ auf und korrelieren somit nicht bzw. leicht antiproportional mit dem klinischen Score.

Wie oben beschrieben wurden nun die Trennwerte bestimmt, die mit einer günstigen Kombination an Sensitivität und Spezifität die Schwelle $<$ Karzinom/Karzinom definieren können.

Tabelle 34: Auswahl an aussagekräftigen Trennwerten für die Schwelle 01234_5:

Sens. = Sensitivität

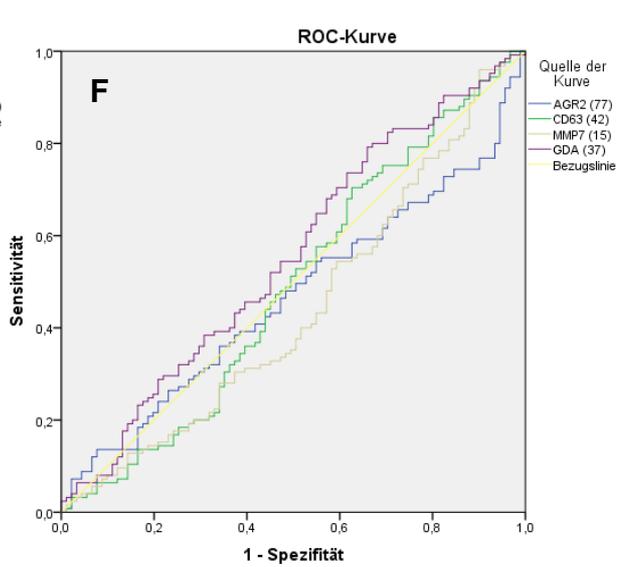
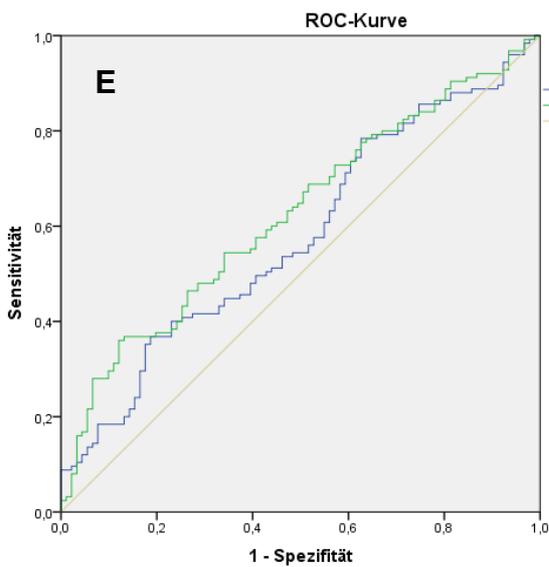
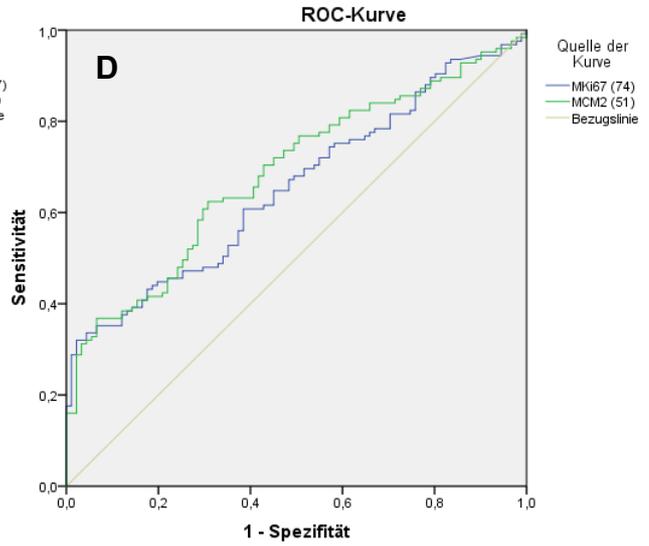
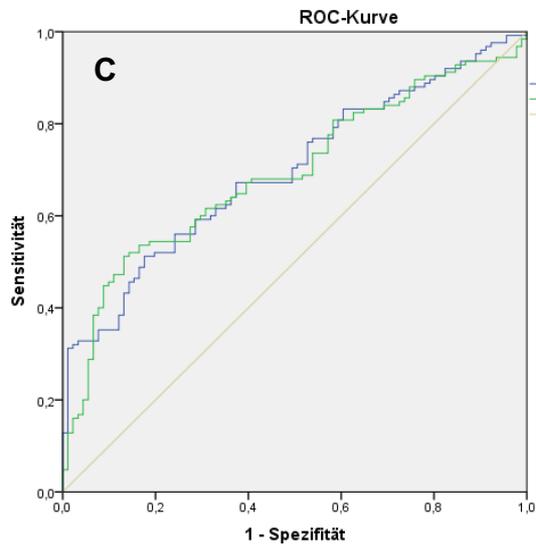
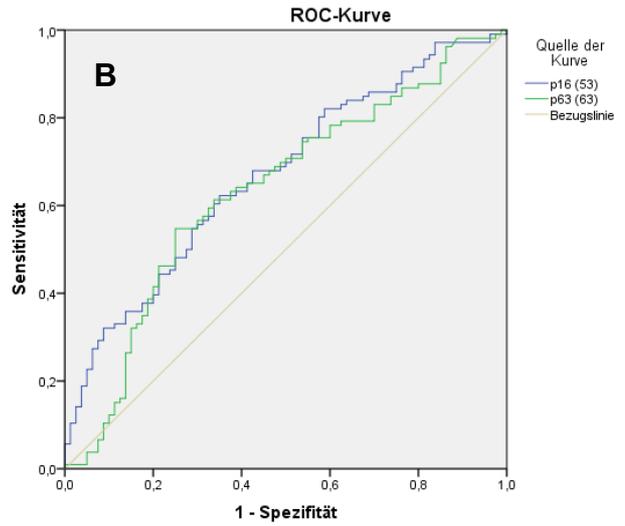
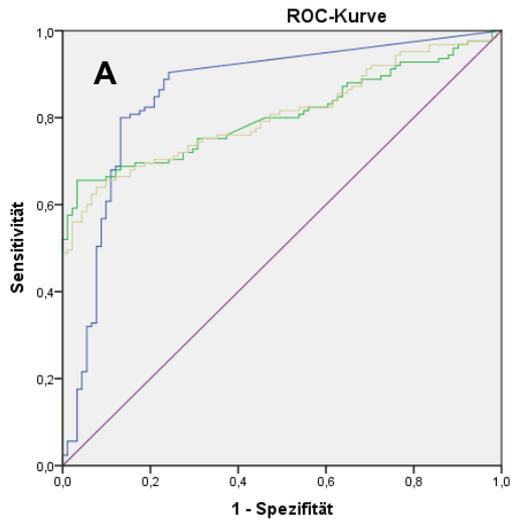
Spez. = Spezifität

Summe = Summe aus Sens. + Spez.

Marker	Trennwert (rel. MFI)	Sens.	Spez.	Summe	Marker	Trennwert (rel. MFI)	Sens.	Spez.	Summe
Stärkster HPV	1,87	1	0,508	1,508	ALDH1 A1	0,75	0,938	0,312	1,25
	22,05	0,889	0,714	1,603		1,70	0,875	0,441	1,316
	72,32	0,63	0,868	1,498		3,17	0,688	0,588	1,276
HPV16 E7	1,75	0,778	0,772	1,55	SOX	2,76	0,444	0,788	1,232
	24,14	0,667	0,889	1,556		5,33	0,222	0,921	1,143
	45,17	0,519	0,937	1,456	KRT7	1365,93	0,148	0,989	1,137
HPV16 E6	0,11	0,926	0,566	1,492	KRT17	204,49	0,889	0,46	1,349
	13,16	0,667	0,889	1,556		505,65	0,704	0,862	1,566
	116,44	0,37	0,979	1,349		886,34	0,481	0,952	1,433
p16	42,06	0,741	0,735	1,476	CD63	56,35	0,889	0,333	1,222
	65,08	0,593	0,836	1,429		121,47	0,556	0,746	1,302
	98,13	0,37	0,942	1,312	BIRC5	1,55	0,593	0,693	1,286
STMN	10,66	1	0,302	1,302		2,34	0,519	0,772	1,291
	14,77	0,926	0,365	1,291	p63	0,92	0,938	0,318	1,256
	25,79	0,852	0,54	1,392		4,51	0,813	0,653	1,466
	126,74	0,556	0,91	1,466		18,46	0,438	0,871	1,309
	218,26	0,407	0,974	1,381					
Ki-67	1,24	0,889	0,365	1,254					
	7,00	0,593	0,82	1,413					
	15,66	0,444	0,926	1,37					
	31,61	0,333	0,979	1,312					
MCM2	8,66	0,815	0,476	1,291					
	11,67	0,778	0,577	1,355					
	39,07	0,593	0,873	1,466					
	75,60	0,407	0,952	1,359					

4.2.3.3 Trennwerte für die Schwelle: 012_345 (\leq CIN2/CIN2+)

Auch für diese dritte relevante Schwelle wurden ROC-Kurven, AUC und dann die Schwellenwerte bestimmt.



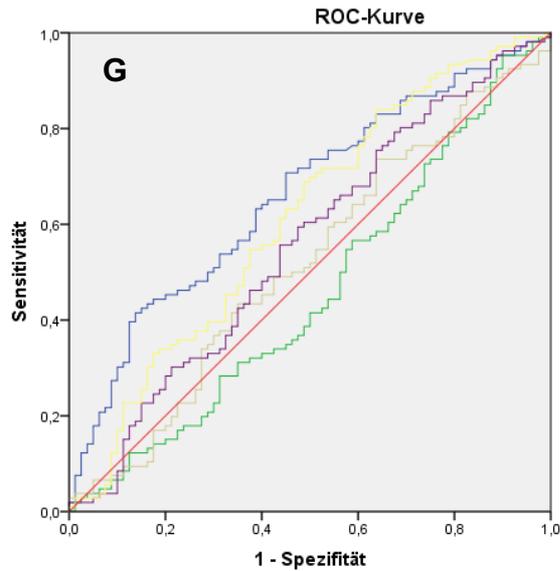


Abbildung 19: ROC-Analysen der zellulären und viralen

Marker (gruppiert) für die Schwelle 012_345.

A: HPV Onkogene (HPV16 E6, E7, StärksterHPV)

B: p16, p53

C: Progressionsmarker: STMN, Survivin

D: Proliferationsmarker: Ki67, MCM2

E: Keratine: 7, 17

F: SCJ-Marker: ARG, CD63, MMP7, GDA

G: Tumormarker: SOX2, Oct4, NANOG, ALDH

Tabelle 35: Areas under the Curve (AUCs) der einzelnen Marker für die Schwelle 012_345. Sortiert nach Größe, absteigend

Marker	AUC	Standardfehler	Asymptotische Signifikanz	CI 95% Unten	CI 95% Oben
Stärkster HPV	0,859	0,028	0,000	0,804	0,915
HPV16-E7	0,806	0,030	0,000	0,748	0,864
HPV16-E6	0,806	0,029	0,000	0,748	0,863
STMN1	0,697	0,035	0,000	0,628	0,766
BIRC5	0,692	0,036	0,000	0,622	0,762
MCM2	0,685	0,036	0,000	0,615	0,755
Ki-67	0,654	0,037	0,000	0,582	0,726
p16	0,650	0,037	0,000	0,577	0,724
p63	0,635	0,042	0,002	0,553	0,716
KRT17	0,625	0,038	0,002	0,551	0,699
SOX2	0,619	0,038	0,003	0,544	0,694
ALDH1A1	0,611	0,042	0,009	0,529	0,694
KRT7	0,578	0,039	0,049	0,502	0,655
GDA	0,553	0,040	0,185	0,474	0,631
POU5FI	0,540	0,040	0,317	0,461	0,619
ALDH1L1	0,520	0,041	0,618	0,440	0,600
NAGOG	0,495	0,039	0,903	0,418	0,572
CD63	0,489	0,041	0,775	0,409	0,569
AGR2	0,465	0,039	0,375	0,388	0,541
MMP7	0,441	0,040	0,137	0,362	0,519

Tabelle 36: Auswahl an aussagekräftigen Trennwerten für die Schwelle 012_345.

Sens = Sensitivität, Spez. = Spezifität, Summe = Summe aus Sens. + Spez.

Marker	Trennwert (MFI)	Sens.	Spez.	Summe	Marker	Trennwert (MFI)	Sens.	Spez.	Summe	
Stärkster HPV	0,010	0,904	0,758	1,662	SOX	0,350	0,712	0,484	1,196	
	4,230	0,800	0,868	1,668			1,710	0,424	0,791	1,215
	11,11	0,680	0,890	1,570	MCM2	6,420	0,768	0,495	1,263	
	27,52	0,504	0,923	1,427			10,88	0,624	0,692	1,316
						28,37	0,368	0,934	1,302	
HPV16 E7	0,050	0,752	0,692	1,444		38,00	0,304	0,967	1,271	
	0,100	0,696	0,802	1,498	Ki-67	1,220	0,744	0,429	1,173	
	0,370	0,656	0,967	1,623			2,310	0,608	0,615	1,223
	1,420	0,520	1	1,520			4,210	0,432	0,824	1,256
						8,300	0,320	0,978	1,298	
HPV16 E6	0,010	0,776	0,560	1,336	BIRC5	0,350	0,800	0,418	1,218	
	0,130	0,696	0,802	1,498			0,790	0,672	0,604	1,276
	0,270	0,640	0,923	1,563			1,460	0,512	0,868	1,380
	1,030	0,488	1	1,488						
p16	9,320	0,832	0,374	1,206						
	19,33	0,648	0,593	1,241						
STMN1	22,98	0,672	0,626	1,298						
	49,72	0,512	0,824	1,336						
	108,21	0,312	0,989	1,301						
p63	1,140	0,755	0,450	1,205						
	3,590	0,547	0,750	1,297						
	6,670	0,415	0,800	1,215						
ALDH1A1	0,550	0,840	0,362	1,202						
	1,490	0,689	0,512	1,201						
KRT17	253,93	0,544	0,659	1,203						
	432,84	0,360	0,879	1,239						
	542,30	0,272	0,934	1,206						

Auch für diese dritte Schwelle zeigt die Expression der Onkogene die höchste Aussagekraft im Vergleich aller Marker und auch absolut gute Werte. Ihre AUCs liegen für diese Schwelle über den Werten der beiden anderen Schwellen und ermöglichen eine Annäherung an die Differenzierung <CIN2/CIN2+. Die zellulären Marker auf der anderen Seite weisen alle eine AUC von < 0,7 auf und nur für STMN1 und MCM2 lassen sich potentielle Trennwerte bestimmen, die in der Summe von Sensitivität und Spezifität 1,3 überschreiten. Ein Großteil der ausgewählten Trennwerte, die relativ gesehen die beste Aussagekraft aufweisen, weist nur sehr niedrige Werte

für Sensitivität und Spezifität auf. 14 der 26 ermittelten Trennwerte der zellulären Marker haben in der Summe von Sensitivität + Spezifität einen Wert von $< 1,25$ (s. rote Markierungen in Tabelle 36) und besitzen damit eine nur geringe Trennschärfe.

4.2.4 Berechnung eines mathematischen Modells auf Basis der Biomarker: Logistische Regression und Risikoscore

Die logistische Regression dient dazu, eine Kombination an Markern zu errechnen, die sich in ihre Aussage ergänzen, und somit diejenigen Marker aus der Rechnung herauszunehmen, die keine zusätzliche Aussagekraft besitzen. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Regressionsberechnungen für die drei genannten Schwellen aufgeführt.

4.2.4.1 Charakterisierung der Schwelle $\leq \text{CIN2/CIN3+}$ mittels Markerkombinationen

Für die Schwelle $< \text{CIN3/CIN3+}$ erreicht die Kombination der vier folgenden Marker die höchste Aussage: **Stärkster HPV, HPV16 E7, MCM2 und ALDH1A1**.

Tabelle 37: Kodierung kategorialer Variablen, logistische Regression der Schwelle 0123_45

Marker	Trennwert (rel. MFI)	Häufigkeit	Parameterkodierung in log. Regression
Stärkster HPV (g2)	$< 0,5$	156	0
	$> 0,5$	30	1
HPV16 E7	$< 0,85$	128	0
	$> 0,85$	58	1
MCM2	$< 40,5$	70	0
	$> 40,5$	116	1
ALDH1A1	$< 1,31$	75	0
	$> 1,31$	111	1

Über diese Kombination konnten 93,1% der Proben $< \text{CIN3}$ (unterhalb der Schwelle) und 73,8% der Proben CIN3+ richtig zugeordnet werden. Insgesamt wurden 84,4% der Proben richtig zugeordnet. Da die wichtigsten Zwischenergebnisse der logistischen Regression dieser Schwelle bereits gezeigt wurden (s. S. 50 ff.), werden hier nur die Endergebnisse aufgeführt.

30 der 216 Proben wurden von der Berechnung ausgeschlossen (s. Tabelle 38), da für sie kein Wert für den Marker ALDH1A1 vorliegt. Dieser Marker gehört mit zwei anderen zu einem Panel, das als 3Plex erst später dem Assay hinzugefügt wurde.

Tabelle 38: SPSS-Ausgabe der Zusammenfassung der Fallverarbeitung, logistische Regression der Schwelle 0123_45

Ungewichtete Fälle ^a		N	Prozent
Ausgewählte Fälle	Einbezogen in Analyse	186	86,1
	Fehlende Fälle	30	13,9
	Gesamt	216	100,0
Nicht ausgewählte Fälle		0	,0
Gesamt		216	100,0

Auf der Basis dieser Regression wurde ein Risikoscore berechnet, der nun die Aussagen der einzelnen Marker im Hinblick auf die Schwelle 0123_45 zu einer Aussage kombiniert (Details zur Methodik s. S. 53). Tabelle 39 zeigt die wichtigsten Rechengrößen (roter Kasten), die in die Berechnung eingeflossen sind.

Tabelle 39: SPSS-Ausgabe der Schritte und einbezogenen Variablen der Regression der Schwelle 0123_45

		Regressionskoeffizient B	Standardfehler	Sig.	Exp(B)	95% Konfidenzintervall für EXP(B)	
						Unterer Wert	Oberer Wert
Schritt 1	HPV16E7(1)	3,258	,477	,000	26,000	10,207	66,226
	Konstante	-1,099	,204	,000	,333		
Schritt 2	HPV16E7(1)	3,186	,501	,000	24,189	9,064	64,552
	MCM2(1)	3,851	1,065	,000	47,062	5,837	379,439
	Konstante	-1,467	,236	,000	,231		
Schritt 3	StärksterHPVg2(1)	1,560	,484	,001	4,759	1,842	12,296
	HPV16E7(1)	2,473	,534	,000	11,859	4,163	33,788
	MCM2(1)	3,557	1,088	,001	35,067	4,155	295,996
	Konstante	-2,249	,388	,000	,105		
Schritt 4	StärksterHPVg2(1)	1,676	,500	,001	5,342	2,006	14,228
	HPV16E7(1)	2,491	,554	,000	12,078	4,078	35,765
	ALDH1A1(1)	1,212	,465	,009	3,362	1,351	8,364
	MCM2(1)	3,396	1,155	,003	29,841	3,101	287,128
	Konstante	-3,052	,529	,000	,047		

Die Bestimmung der mathematisch günstigsten Marker-Trennwerte ergibt eine Kombination aus zwei Werten der Messung des viralen Onkogens E7 und zwei zellulären Markern. Die verwendeten Trennwerte des Onkogens E7 (HPV16 E7 und E7 des StärksterHPV) sind niedrig gewählt und liegen nah an der Grenze der HPV-Positivität. Da hochgradige Läsionen und Karzinome fast ausnahmslos HPV-positiv sind, wird hierüber eine hohe Sensitivität ermöglicht. Eine ausreichende Spezifität wird über den hoch gewählten Trennwert des Proliferationsmarkers MCM2 (40,5 rel. MFI) gewährleistet und zusätzlich über die Hinzunahme eines Stammzellmarkers (ALDH1A1) als Zeichen des Anteils von Tumorstammzellen.

Die Aussagekraft des Scores lässt sich durch eine ROC-Analyse quantifizieren (s. Abbildung 20). Die AUC für diese Markerkombination ergab einen Wert von **0,903**.

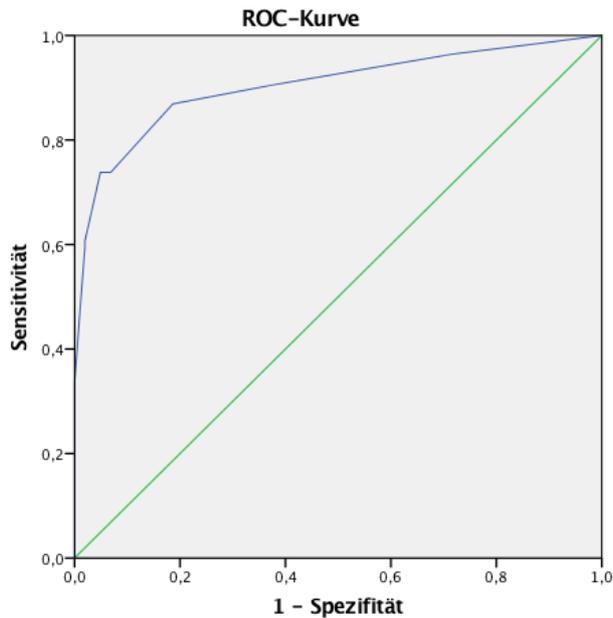


Abbildung 20: ROC-Kurve für die Schwelle <CIN3/CIN3+ für die bestmögliche Kombination an Marker-Trennwerten. Verwendete Marker: StärksterHPV, E7 von HPV16, ALDH1A1, MCM2

Innerhalb dieses Scores, der die Aussagen der besten Trennwerte aller Marker zu einer Aussage vereint, muss nun ein Trennwert ermittelt werden, der die günstigste Kombination an Sensitivität und Spezifität ausweist. Tabelle 40 zeigt die Koordinaten der ROC-Kurve und damit die möglichen Trennwerte dieses Risikoscores. Da eine hohe Sensitivität erreicht werden soll (bei akzeptabler Spezifität), wurde folgender Punkt als Günstigster gewählt:

Trennwert: 33,04
Sensitivität: 86,9%
Spezifität: 81,4%.

Tabelle 40: Koordinaten der ROC-Kurve für 0123_45: potentielle Trennwerte des Risikoscores 2

Trennwert	Sensitivität	Spezifität	Summe Sens.+ Spez.
3,51	1	0	1
100,67	0	1	1
99,29	0,214	1	1,214
97,56	0,226	1	1,226
9,11	0,964	0,284	1,248
93,66	0,333	1	1,333
16,94	0,905	0,627	1,532
86,84	0,595	0,98	1,575
78,94	0,607	0,98	1,587
52,21	0,738	0,931	1,669
62,12	0,738	0,941	1,679
33,04	0,869	0,814	1,683
70,51	0,738	0,951	1,689

Misst man also für eine Patientin die vier Marker „Stärkster HPV“, „HPV16 E7“, „MCM2“ und „ALDH1A1“, wendet dann die ermittelten Trennwerte an (s. Tabelle 40) und gibt schließlich das Resultat in die Gleichung des Risikoscores ein (Gewichtung über Verrechnung mit dem Regressionskoeffizienten B, s. Formel S. 53) so erhält man den Wert des Risikoscores. Liegt dieser über dem Trennwert von 33,04, so kann mit einer hohen Wahrscheinlichkeit (Sensitivität: 86,9%, Spezifität: 81,4%) davon ausgegangen werden, dass eine hochgradige Dysplasie (CIN3) oder ein Karzinom vorliegt (CIN3+).

4.2.4.2 Charakterisierung der Schwelle \leq CIN3/Karzinom mittels Markerkombinationen

Auch für diese Schwelle wurde eine logistische Regression auf der Basis von 216 Proben durchgeführt. Keiner der ausgewählten Marker wurde im Nachhinein dem Assay hinzugefügt, weshalb alle Proben in die Berechnung eingeschlossen werden konnten.

Tabelle 41: Zusammenfassung der Fallverarbeitung (SPSS-Ausgabe), logistische Regression der Schwelle 01234_5

Ungewichtete Fälle		N	Prozent
Ausgewählte Fälle	Einbezogen in Analyse	216	100,0
	Fehlende Fälle	0	,0
	Gesamt	216	100,0
Nicht ausgewählte Fälle		0	,0
Gesamt		216	100,0

Die Kombination der folgenden vier Marker konnte mit der besten Genauigkeit die Schwelle definieren:

Tabelle 42: Schwellenwerte der Schwelle 01234_5

Marker	Schwellenwert (rel. MFI)
Stärkster HPV	22,0
HPV16E6	0,12
STMN1	218,3
KRT17	505,7; 900,0

Über diese Kombination können 97,4% der nicht-Karzinom-Proben und 59,3% der Karzinome richtig zugeteilt werden (s. Schritt 4 der Klassifizierungstabelle, Tabelle 43).

Tabelle 43: SPSS-Ausgabe der Klassifizierungstabelle der einzelnen Schritte der Regression, Schwelle 1234_5.

	Beobachtet	Vorhergesagt		
		Score ,0	1,0	Prozentsatz der Richtigen
Schritt 1	Score ,0	180	9	95,2
	1,0	14	13	48,1
	Gesamtprozentsatz			89,4
Schritt 2	Score ,0	184	5	97,4
	1,0	14	13	48,1
	Gesamtprozentsatz			91,2
Schritt 3	Score ,0	185	4	97,9
	1,0	14	13	48,1
	Gesamtprozentsatz			91,7
Schritt 4	Score ,0	184	5	97,4
	1,0	11	16	59,3
	Gesamtprozentsatz			92,6

Tabelle 44 zeigt die einzelnen Schritte der logistischen Regression, sowie Odd's Ratio und Regressionskoeffizient, die relevant sind für die Berechnung des Risikoscores, der jeweiligen Marker für die Beschreibung der Schwelle 01234_5.

Tabelle 44: SPSS-Ausgabe der Schritte und Variablen der logistischen Regression; Schwelle 01234_5

	Regressionskoeffizient B	Standardfehler	Sig.	Exp(B)	95% Konfidenzintervall für EXP(B)		
					Unterer Wert	Oberer Wert	
Schritt 1	KRT17g3		,000				
	KRT17g3(1)	1,973	,597	,001	7,191	2,231	23,180
	KRT17g3(2)	3,382	,565	,000	29,431	9,725	89,061
	Konstante	-3,014	,362	,000	,049		
Schritt 2	StärksterHPVg2(1)	2,362	,666	,000	10,613	2,875	39,177
	KRT17g3			,000			
	KRT17g3(1)	1,421	,639	,026	4,140	1,183	14,485
	KRT17g3(2)	2,635	,609	,000	13,943	4,223	46,039
	Konstante	-4,223	,625	,000	,015		
Schritt 3	StärksterHPVg2(1)	1,962	,688	,004	7,110	1,846	27,393
	KRT17g3			,001			
	KRT17g3(1)	1,311	,666	,049	3,711	1,006	13,684
	KRT17g3(2)	2,333	,631	,000	10,314	2,992	35,549
	HPV16E6lg2(1)	1,812	,803	,024	6,122	1,270	29,525
	Konstante	-5,205	,870	,000	,005		
Schritt 4	StärksterHPVg2(1)	1,692	,711	,017	5,429	1,348	21,864
	KRT17g3			,006			
	KRT17g3(1)	1,109	,700	,113	3,032	,768	11,962
	KRT17g3(2)	2,080	,662	,002	8,008	2,189	29,297
	STMN1g2(1)	1,369	,713	,055	3,933	,973	15,893
	HPV16E6lg2(1)	1,634	,808	,043	5,126	1,052	24,983
	Konstante	-5,002	,850	,000	,007		

Wie oben beschrieben wird nun aus diesen Trennwerten, die über die Regression ermittelt worden

sind, der Risikoscore berechnet und dieser anschließend über eine ROC-Analyse charakterisiert. Die AUC der ROC-Analyse für diese Schwelle liegt bei 0,913 (s. Abbildung 21). Damit zeigt sich, dass auch für diese Schwelle eine Beschreibung durch die zellulären Marker mit guter Präzision möglich ist.

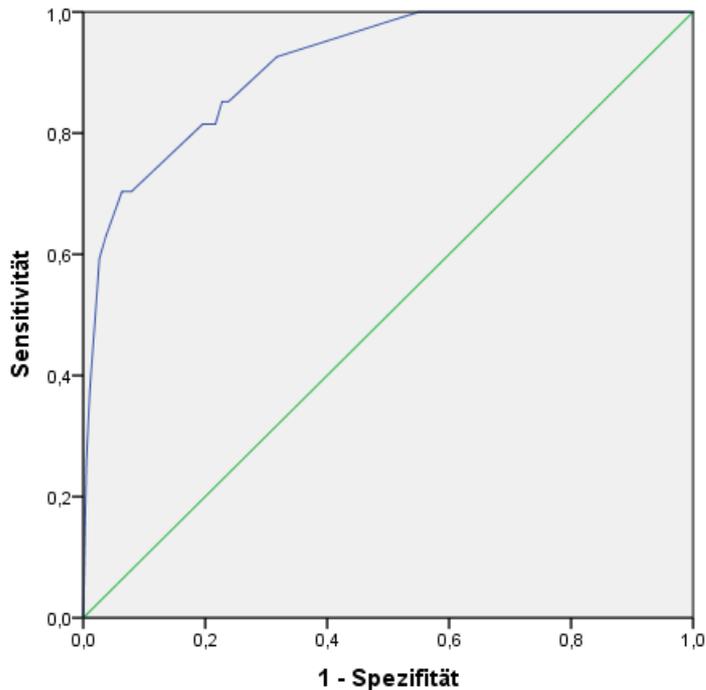


Abbildung 21: ROC-Kurve für die Schwelle 01234_5 für die bestmögliche Kombination an Marker-Trennwerten. Verwendete Marker: StärksterHPV, E6, KRT17 und STMN1. AUC: 0,913

Die Koordinaten der ROC-Kurve stellen die potentiellen Trennwerte des Risikoscores dar (s. Tabelle 45). Aus ihnen kann nun derjenige Punkt mit der besten Kombination an Sensitivität und Spezifität ausgesucht werden.

Tabelle 45: Koordinaten der ROC-Kurve der Schwelle 01234_5

Trennwert	Sensitivität	Spezifität	Summe Sens. + Spez.
-0,33	1,000	0,000	1,000
86,48	0,000	1,000	1,000
77,26	0,259	0,995	1,254
64,50	0,370	0,989	1,359
1,33	1,000	0,418	1,418
2,66	1,000	0,450	1,450
51,17	0,593	0,974	1,567
39,29	0,630	0,963	1,593
9,71	0,815	0,783	1,598
3,43	0,926	0,683	1,609
4,32	0,852	0,762	1,614
11,26	0,815	0,799	1,614
14,16	0,815	0,804	1,619
7,28	0,852	0,772	1,624
18,69	0,704	0,921	1,625
22,12	0,704	0,931	1,635
29,41	0,704	0,937	1,641

Um eine möglichst hohe Sensitivität zu gewähren, wurde folgender Punkt ausgesucht:

Trennwert: 7,28
Sensitivität: 85,2%
Spezifität: 77,2%

Über die quantitative Analyse der Marker „StärksterHPV“, „E6“, „KRT17“ und „STMN1“ kann somit ein Risikoscore berechnet werden, der die Aussagen der einzelnen Marker kombiniert und somit die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen eines Karzinoms einschätzen kann. Liegt dieser Score über dem Trennwert von 7,28, so liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit (Sensitivität 85,2%, Spezifität 77,2%) ein Karzinom vor.

4.2.4.3 Charakterisierung der Schwelle \leq CIN1/CIN2+ mittels Markerkombinationen

Für diese dritte Schwelle wurde folgende Kombination aus drei Markern ermittelt (Auswertung von 216 Proben, s. Tabelle 46):

Tabelle 46: Schwellenwerte der Schwelle 012_345

Marker	Schwellenwert
Stärkster HPV	0,01 ; 11,11
HPV16E7	0,37
BIRC5	1,46

Tabelle 47: Fallverarbeitung für die Schwelle 012_345 (SPSS-Ausgabe)

Ungewichtete Fälle		N	Prozent
Ausgewählte Fälle	Einbezogen in Analyse	216	100,0
	Fehlende Fälle	0	,0
	Gesamt	216	100,0
Nicht ausgewählte Fälle		0	,0
Gesamt		216	100,0

Hiermit konnten 85,7% der Proben $<$ CIN2, 86,4% der Proben CIN2+ (86,1% der Proben insgesamt) richtig zugeordnet werden (Tabelle 48, Schritt 4).

Tabelle 48: SPSS-Ausgabe der Klassifizierungstabelle der einzelnen Schritte der Regression, Schwelle 012_345.

	Beobachtet	Vorhergesagt		Prozentsatz der Richtigen
		Score012 ,00	1,00	
Schritt 1	Score012 ,00	88	3	96,7
	1,00	44	81	64,8
	Gesamtprozentsatz			78,2
Schritt 2	Score012 ,00	78	13	85,7
	1,00	18	107	85,6
	Gesamtprozentsatz			85,6
Schritt 3	Score012 ,00	78	13	85,7
	1,00	18	107	85,6
	Gesamtprozentsatz			85,6
Schritt 4	Score012 ,00	78	13	85,7
	1,00	17	108	86,4
	Gesamtprozentsatz			86,1

Die durch die Regression selektierten Schwellenwerte zeigen eine auffällige Kombination: drei der vier Trennwerte basieren auf der Messung des viralen Onkogens E7. Wie sich schon in den ROC-Kurven dieser Schwelle und auch in der Vorauswahl der günstigsten Trennwerte gezeigt hat, können die zellulären Marker nur äußerst unpräzise diese Schwelle definieren. Die viralen Onkogene hingegen zeigen auch hier einen guten Aussagewert. Die Regression basiert daher

nachvollziehbar auf dem Onkogen E7. Die gewählte Trennwert von 0,01 rel. MFI für „Stärkster HPV“ ist so niedrig, dass er praktisch die Grenze zur HPV-Positivität darstellt. Hierrüber kann eine hohe Sensitivität erreicht werden, da klinische Fälle oberhalb der Schwelle 012_345, also Läsionen, die eine höhergradige Läsion oder sogar ein Karzinom aufweisen, fast ausnahmslos HPV-positiv sind. Über den zweiten E7-basierten Trennwert von 11,11 rel.MFI und über die Hinzunahme des Tumormarkers BIRC5/Survivin kann die Spezifität erhöht werden.

Dem Schema der Analyse entsprechend wurde auf Basis der Regression der Risikoscore berechnet. Tabelle 49 zeigt die verwendeten Werte von Gleichungskonstante und Regressionskoeffizienten.

Tabelle 49: SPSS-Ausgabe der Schritte und Variablen der logistischen Regression; Schwelle 012_345

		Regressionskoeffizient β	Standardfehler	Sig.	Exp(B)	95% Konfidenzintervall für EXP(B)	
						Unterer Wert	Oberer Wert
Schritt 1	HPV16E7g2(1)	3,989	,616	,000	54,000	16,138	180,697
	Konstante	-,693	,185	,000	,500		
Schritt 2	HPV16E7g2(1)	3,706	,644	,000	40,673	11,510	143,723
	StärksterHPVhigh(1)	2,530	,442	,000	12,551	5,273	29,873
	Konstante	-1,502	,261	,000	,223		
Schritt 3	HPV16E7g2(1)	3,081	,660	,000	21,782	5,974	79,427
	StärksterHPVmid(1)	1,581	,548	,004	4,861	1,662	14,218
	StärksterHPVhigh(1)	3,032	,492	,000	20,745	7,916	54,368
	Konstante	-1,948	,334	,000	,143		
Schritt 4	BIRC5g2(1)	1,382	,525	,009	3,984	1,423	11,158
	HPV16E7g2(1)	2,952	,671	,000	19,141	5,136	71,335
	StärksterHPVmid(1)	1,840	,573	,001	6,296	2,049	19,350
	StärksterHPVhigh(1)	2,858	,506	,000	17,428	6,460	47,018
	Konstante	-2,281	,381	,000	,102		

Der Risikoscore der Schwelle 012_345 ergab eine **AUC von 0,927**. Die folgenden Abbildungen zeigen die ROC-Kurve und ihre Koordinaten, die potentielle Trennwerte für den Risikoscore darstellen.

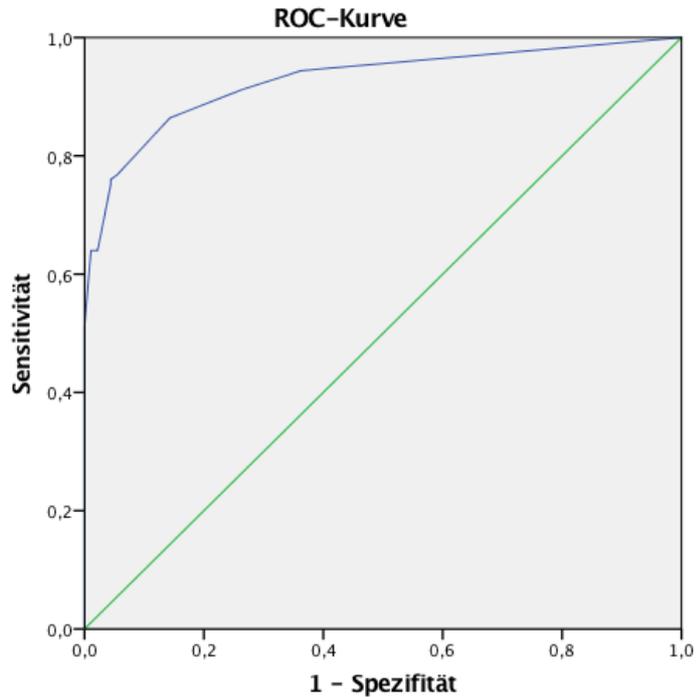


Abbildung 22: ROC-Kurve für die Schwelle 012_345 für die bestmögliche Kombination an Marker-Trennwerten. Verwendete Marker: StärksterHPV low (0,01 rel. MFI), StärksterHPV mid (11,11 rel. MFI), HPV16E7, BIRC5. AUC: 0,927

Tabelle 50: Koordinaten der ROC-Kurve der Schwelle 012_345

Trennwert	Sensitivität	Spezifität	Summe Sens. + Spez.
8,27	1,000	0,000	1,000
100,27	0,000	1,000	1,000
98,64	0,320	1,000	1,320
97,58	0,360	1,000	1,360
94,82	0,512	1,000	1,512
19,10	0,944	0,637	1,581
88,13	0,640	0,978	1,618
90,56	0,640	0,989	1,629
34,04	0,912	0,736	1,648
79,79	0,752	0,956	1,708
65,11	0,768	0,945	1,713
69,05	0,760	0,956	1,716
51,59	0,864	0,857	1,721

Um wieder eine ausreichend hohe Sensitivität zu erreichen, kann folgender Trennwert als der günstigste gesehen werden: **Trennwert: 51,6**

Sensitivität: 86,4%

Spezifität: 85,7%

4.2.5 Übersicht: Formeln der Risikoscores

1. Schwelle \leq CIN2/CIN3+ (0123_45):

- **benötigte Marker (Trennwert):**
 - StärksterHPV (0,5 rel.MFI)
 - HPV16E7 (0,85 rel.MFI)
 - ALDH1A1 (1,31 rel. MFI)
 - MCM2 (40,5 rel. MFI)
- **Formel:**

$$\mathbf{Risiko} = -3,052 + (1,67 * \mathit{StärksterHPV}) + (2,49 * \mathit{HPV16E7}) + (1,21 * \mathit{ALDH1A1}) \\ + (3,40 * \mathit{MCM2})$$

$$\mathbf{Risikoscore} = \frac{e^{\mathit{Risiko}}}{(1+e^{\mathit{Risiko}})} * 100$$

- Trennwert des Risikoscores: **33,04** (Sensitivität: 86,9%, Spezifität: 81,4%)

2. Schwelle \leq CIN3/Karzinom (01234_5):

- **benötigte Marker (Trennwert):**
 - StärksterHPV (22,0 rel. MFI)
 - HPV16E6 (0,12 rel.MFI)
 - STMN1 (218,3 rel.MFI)
 - KRT17 mid (505,7 rel.MFI)
 - KRT17 high (900 rel.MFI)
- **Formel:**

$$\mathbf{Risiko} = -5,002 + (1,69 * \mathit{StärksterHPV}) + (1,63 * \mathit{HPV16E6}) + (1,37 * \mathit{STMN1}) \\ + (1,11 * \mathit{KRT17}^{mid}) + (2,08 * \mathit{KRT17}^{high})$$

$$\mathbf{Risikoscore} = \frac{e^{\mathit{Risiko}}}{(1+e^{\mathit{Risiko}})} * 100$$

- Trennwert des Risikoscores: **7,28** (Sensitivität: 85,2%, Spezifität: 77,2%)

3. Schwelle \leq CIN1/CIN2+ (012_345):

- **benötigte Marker (Trennwert):**
 - StärksterHPV low (0,01 rel. MFI)
 - StärksterHPV mid (11,11 rel. MFI)
 - HPV16E7 (0,37 rel.MFI)
 - BIRC5 (1,46 rel.MFI)
- **Formel:**

$$\text{Risiko} = -2,281 + (2,86 * \text{StärksterHPV}^{\text{low}}) + (1,84 * \text{StärksterHPV}^{\text{mid}}) \\ + (2,95 * \text{HPV16E7}) + (1,38 * \text{BIRC5})$$

$$\text{Risikoscore} = \frac{e^{\text{Risiko}}}{(1+e^{\text{Risiko}})} * 100$$

- Trennwert des Risikoscores: **51,6** (Sensitivität: 86,4%, Spezifität: 85,7%)

4.2.6 Anwendung des Risikoscores

4.2.6.1 Charakterisierung der Tumorzelllinie CaSki durch den Risikoscore \leq CIN3/Karzinom

Um an einem Beispiel die Anwendung des Risikoscores zu veranschaulichen, soll im Folgenden die Zelllinie CaSki anhand der errechneten Marker-Kombination für die Schwelle 01234_5 (Differenzierung der Karzinome von nicht-Karzinomen) charakterisiert werden. Bei der Zelllinie handelt es sich um eine HPV16 positive Linie eines Zervixkarzinoms. Tabelle 51 zeigt die benötigten Werte und ihre Ergebnisse in der QuantiGene®-Messung der Tumorzelllinie.

Tabelle 51: Benötigte Trennwerte des Risikoscores 01234_5 und Messergebnisse für die Zelllinie CaSki

Marker	Trennwert (rel. MFI)	Gemessener Wert für CaSki (rel. MFI)	Positiv = 1 Negativ = 0
StärksterHPV	22	598	1
HPV16 E6	0,12	815	1
STMN1	218	776	1
KRT17 mid	505	1159	1
KRT17 high	900		1

Auf der Basis der oben aufgeführten Formel für die Schwelle 01234_5 (s. S. 79) ergibt sich aus den Messergebnissen folgende Gleichungen:

$$\text{Risiko} = -5,002 + (1,69 * \text{StärksterHPV}) + (1,63 * \text{HPV16E6}) + (1,37 * \text{STMN}) + \\ (1,1 * \text{KRT17}^{\text{mid}}) + (2,1 * \text{KRT17}^{\text{high}}) = 2,89$$

$$\text{Risikoscore} = \frac{e^{2,89}}{(1+e^{2,89})} * 100 = 94,73$$

Mit einem Wert von 94,73 liegt der Risikoscore über dem Trennwert von 7,28. Die Berechnung ergibt also, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit von einem Karzinom ausgegangen werden kann, und liegt somit richtig.

4.2.6.2 Graphische Darstellung der Anwendung der Risikoscores auf klinische Proben

Um eine Probe über die Risikoscores zu charakterisieren, können die Scores aller drei Trennschwellen auf die Probe angewandt werden. Als Beispiel sollte eine Probe mit der histologischen Diagnose einer CIN3 oberhalb des Risikoscore-Trennwertes der Schwellen \leq CIN1/CIN2+ und \leq CIN2/CIN3+, aber unterhalb des Trennwertes der Schwelle \leq CIN3/Karzinom liegen. Um diese Anwendung zu demonstrieren, wurden die drei Risikoscores auf vier zufällig ausgewählte Proben aus verschiedenen klinischen Stadien (zytologisch unauffällig und HPV-negativ, CIN2, CIN3, Karzinom) angewandt. Die Ergebnisse der Risikoscores wurden in Prozent der jeweiligen Trennwerte berechnet. Beispielsweise wurde für die klinisch unauffällige Probe ein Risikoscore von 9,3 für die Schwelle \leq CIN1/CIN2+ errechnet, der somit bei 18% des Trennwertes der Schwelle liegt.

Tabelle 52: Anwendung der Risikoscores auf Proben verschiedener Krankheitsstadien. Werte angegeben in Prozent des Risikoscore-Trennwertes

	Trennwert Risikoscore (rel.MFI)	Zytol. unauffällig, HPV neg		CIN2		CIN3		Karzinom		
		gemessen (rel.MFI)	Bewertung	gemessen (rel.MFI)	Bewertung	gemessen (rel.MFI)	Bewertung	gemessen (rel.MFI)	Bewertung	
012_345	St.HPV low	0,01	0,00	0	10,6	1	67,2	1	729,8	1
	St.HPV mid	11,11	0,00	0	10,6	0	67,2	1	729,8	1
	HPV16E7	0,37	0,00	0	0,00	0	67,2	1	729,8	1
	BIRC5	1,46	0,00	0	0,00	0	2,84	1	4,3	1
	Vorergebnis Risikoscore			-2,281		0,579		6,749		6,749
	Risikoscore	51,6		9,27		64,08		99,88		99,88
	% vom Trennwert			18%		124%		193%		193%
0123_45	StärksterHPV	0,5	0,00	0	10,9	1	67,2	1	729,8	1
	HPV16E7	0,85	0,00	0	0,00	0	67,2	1	729,8	1
	ALDH1A1	1,31	6,13	1	0,99	0	3,24	1	0,00	1
	MCM2	40,5	6,90	0	20,1	0	41,1	1	278,3	1
	Vorergebnis Risikoscore			-1,842		-1,382		5,718		5,718
	Risikoscore	33,04		13,68		20,07		99,67		99,67
	% vom Trennwert			41%		61%		301%		301%
01234_5	StärksterHPV	22	0,00	0	10,9	0	67,2	1	729,8	1
	HPV16E6	0,12	0,10	0	0,00	0	46,7	1	726,0	1
	STMN	218,3	17,3	0	30,2	0	114,8	0	528,8	1
	KRT17 mid	505,7	393	0	70,3	0	218,04	0	1971,0	1
	KRT17 high	900	393	0	70,3	0	218,04	0	1971,0	1
	Vorergebnis Risikoscore			-5,002		-5,002		-1,682		2,878
	Risikoscore	7,28		0,67		0,67		15,68		94,67
% vom Trennwert			9%		9%		215%		1300%	

Die graphische Darstellung dieser Anwendung ist in Abbildung 23 dargestellt.

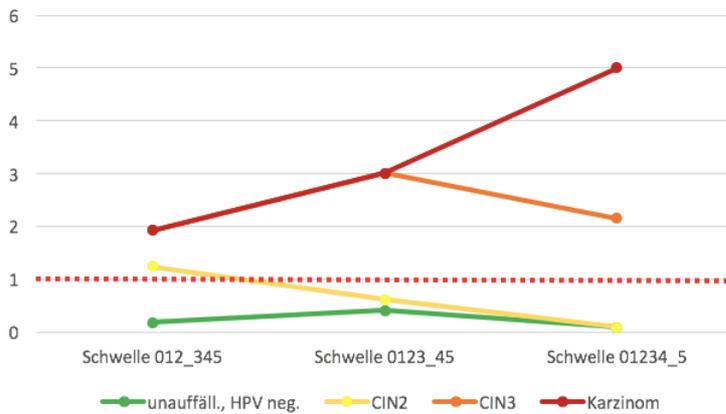


Abbildung 23: Graphische Darstellung der Anwendung der Risikoscores; Werte sind relativiert auf die Trennwerte der Risikoscores; Ebene der Trennwerte (=1) als gestrichelte Linie hervorgehoben

Reduziert man die Ergebnisse der Risikoscores auf 1 (=Ergebnis liegt oberhalb des Trennwertes) und 0 (=Ergebnis liegt unterhalb des Trennwertes), ergibt sich folgende graphische Darstellung (s. Abbildung 24). Es fällt auf, dass die Probe mit der histologischen Diagnose einer CIN3 über die Risikoscores als Karzinom eingestuft wurde.

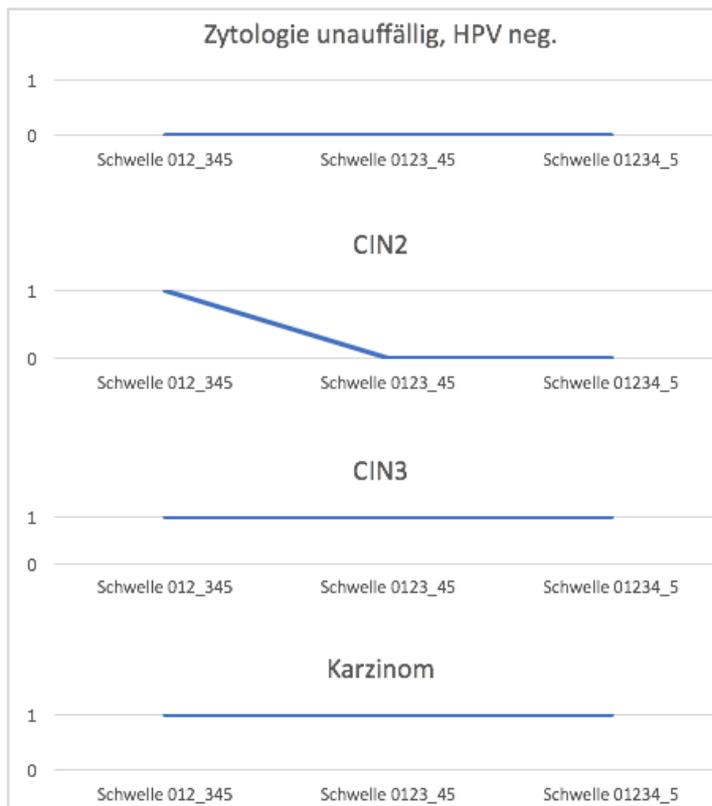


Abbildung 24: Darstellung der Anwendung der Risikoscores; Werte sind berechnet als 1 = Ergebnis liegt oberhalb des Trennwertes, 0 = Ergebnis liegt unterhalb des Trennwertes

4.3 Splice Sites

Eine Sondergruppe innerhalb der gemessenen Marker sind diejenigen drei, deren Sonden Splice-Produkte von viralen Onkogenen binden (E1C, E1_4, E6I*). Der „Proof of Principle“, also der Nachweis der Funktionsfähigkeit der Sonden, sowie der Ausschluss einer Kreuzreaktivität mit anderen HPV-Typen ist Teil der Fragestellung dieses Projektes. Für die Evaluierung der Kreuzreaktivität wurde ein Kollektiv von 104 Proben, welche negativ für HPV16, aber positiv für andere HPV-Typen sind, verwendet. Bei keiner der HPV16-negativen Probe wurden positive Werte für die Splice-Produkte gemessen. Es lag somit **keine Kreuzreaktivität** der Splice-Produkte von E1, E4 und E6 zu den entsprechenden Splice-Produkten anderer HPV-Typen vor.

Für den „Proof of Principle“ wurde folgende Untergruppe an Proben analysiert: Einschlusskriterium: HPV-Typ16 positiv oder insgesamt HPV negativ (Vergleichsgruppe), vollständige Daten für die 3 Splice-Marker (d.h. Ausschluss der Probe ohne Daten des nachträglich eingefügten 3-Plex). Diese Subgruppe bestand aus 110 Proben, Tabelle 53 zeigt ihre Verteilung auf die klinischen Gruppen. Jede Probe, die im QuantiGene Assay positiv für das HPV-Onkogen E7 war, zeigte auch eine Positivität für mindestens einen der drei Splice-Marker.

Tabelle 53: Anzahl der HPV16 positiven Proben pro klinische Gruppe

Klinische Gruppe	0: HPV16 negativ	1: HPV negativ, Zytologie auffällig	2: CIN1	3: CIN2	4: CIN3	5: Karzinom
Anzahl	54	--	--	6	37	13

Da das Splice-Produkt E6I* das komplette E6-Genprodukt enthält, konnte die Korrelation zwischen der Expression der Onkogene E6 und E7 untersucht werden. Mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2=0,76$ zeigt sich eine deutliche Korrelation ihrer Expression (s. Abb.25).

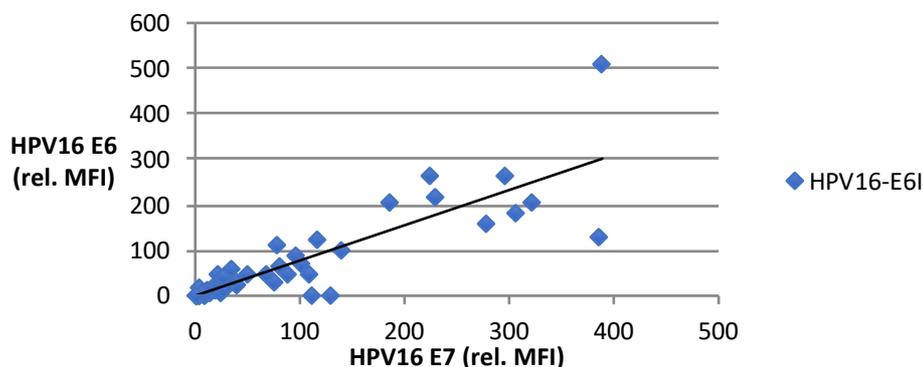


Abbildung 25: Korrelation der Detektion der mRNA für die HPV16-Onkoproteine E6*I und E7

Für die Expression der Splice Produkte E1C und E1_4 haben Schmitt et al. gezeigt, dass ihre Expression nicht linear korreliert, sondern assoziiert ist mit dem Schweregrad der Dysplasie ⁵².

Während E1_4 in niedriggradigen Läsionen dominiert, weißt E1C in hochgradigen Läsionen eine relativ zu E1_4 hohe Expression auf (Details s.S.20). Abbildung 26 zeigt, dass auch in der Auswertung des Quantigene Assays das Verhältnis der beiden Splice Produkte nicht linear korreliert ($R^2 = 0,008$), sondern entlang der beiden Achsen zwei Linie, also zwei Proportionalitäten zeigt.

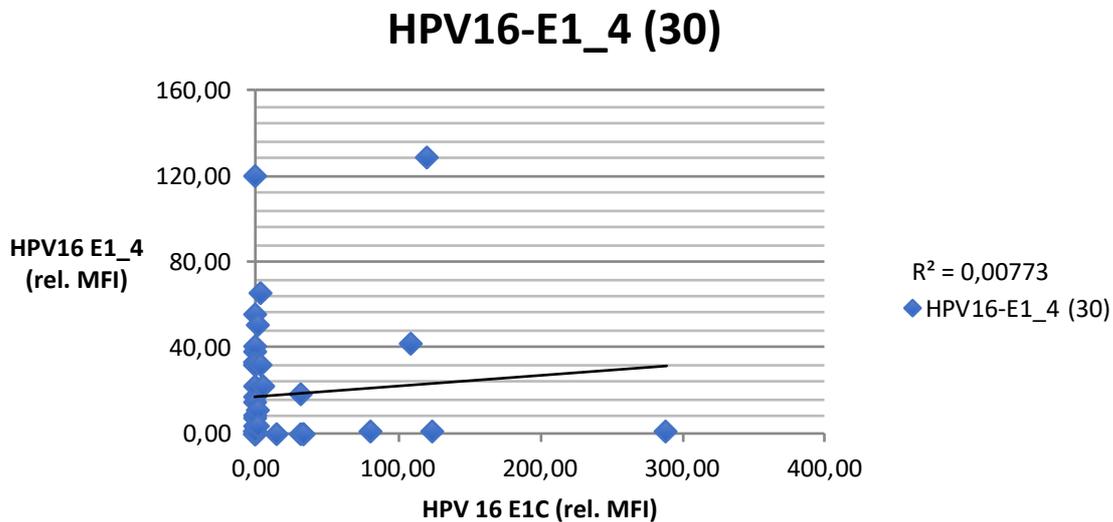


Abbildung 26: Korrelation der Expression der HPV16 Splice-Produkte E1C und E1_4

Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, inwieweit die quantitative Messung der Splice Produkte mit dem klinischen Score der Proben korreliert. Aufgrund einer unzureichenden Größe des Probenkollektivs konnte diese Frage nicht ausreichend beantwortet werden.

Als „Pilot-Analyse“ wurde eine ROC-Kurve berechnet, um die Aussagekraft der Marker zu quantifizieren. Abbildung 27 zeigt die ROC-Kurven der drei Splice Produkte und des Onkogens E7.

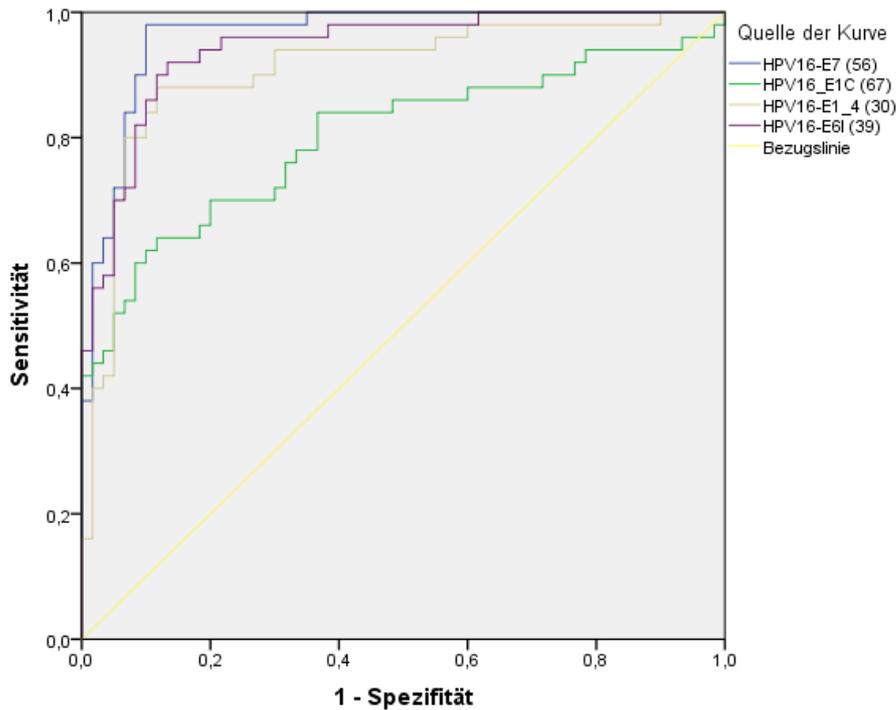


Abbildung 27: ROC-Kurven der der Splice-Marker und des Markers HPV16 E7 für die Schwelle 0123_45

Tabelle 54: „Area under the Curve“ (AUC) der drei Splice-Marker und HPV16 E7 für die Schwelle 0123_45

Variable(n) für Testergebnis	Fläche	Standardfehler r^a	Asymptotische Signifikanz ^b	Asymptotisches 95% Konfidenzintervall	
				Untergrenze	Obergrenze
HPV16-E7 (56)	,963	,016	,000	,931	,995
HPV16_E1C (67)	,801	,045	,000	,713	,889
HPV16-E1_4 (30)	,908	,031	,000	,848	,968
HPV16-E6I (39)	,943	,021	,000	,901	,984

a. Unter der nichtparametrischen Annahme

b. Nullhypothese: Wahrheitsfläche = 0.5

Formell ergeben sich aussagekräftige Kurven mit hohen AUCs (s. Abbildung 27 und Tabelle 54). Betrachtet man allerdings die Aufteilung der Proben auf die klinischen Gruppen, also das Fehlen von Proben der Gruppen 1 und 2, so repräsentiert die Schwelle 0123_45 in diesem Fall eine Gegenüberstellung einer akzeptablen Gruppe_45 gegen ein Kollektiv aus 6 Proben der Gruppe_3 plus ausreichend vieler Negativkontrollen (Gruppe 0). Die Analyse vergleicht somit vor allem nicht-pathologische Proben mit Proben hoher Dysplasie. Dass diese Differenzierung gesund vs. sehr krank gut möglich ist, kann als erstes gutes Zeichen gewertet werden, beinhaltet allerdings keine absolut hochwertige Aussage.

Betrachtet man die aussagekräftigsten Koordinaten der Kurven, wird dies noch einmal deutlich: Die potentiell besten Trennwerte repräsentieren sehr niedrige MFI-Werte, die an der Grenze der HPV-Positivität liegen (s. Tabelle 55). Das heißt, dass die Aussagekraft der Marker in Bezug auf

diese Schwelle 0123_45 (<CIN3/CIN3+) fast ausschließlich auf Unterscheidung HPV16 positiv vs. negativ beruht und nicht auf der Differenzierung der Dysplasiegrade. Da die Gruppen 2 und 3 in diesem Kollektiv nur sehr kleine Fallzahlen aufweisen und die Gruppe 0 per Definition HPV-negativ ist, erhält man alleine über die Aussage HPV 16 positiv/negativ eine sehr gute Einschätzung der Proben, die sich allerdings nicht auf ein ausgeglichenes Kollektiv übertragen lässt. Diese Auswertung kann daher nur die technische Funktion bestätigen, nicht jedoch die klinische Aussagekraft einschätzen.

Tabelle 55: aussagekräftigste potentielle Trennwerte der Splice Marker und E7 für die Schwelle 0123_45

Marker	Trennwert (rel. MFI)	Sensitivität	Spezifität
HPV16 E7	0,52	98,0%	90,0%
	1,42	90,0%	91,7%
HPV16 E6I	0,18	96,0%	78,3%
	0,37	92,0%	86,7%
	0,58	84,0%	90,0%
HPV16 E1_4	0,03	88,0%	88,3%
	0,06	94,0%	70,0%
	0,66	80,0%	93,3%
HPV16 E1C	0,001	84,0%	63,3%
	0,05	70,0%	80,0%
	0,12	64,0%	88,3%

Diese Untersuchung muss also mit einem besser geeigneteren, umfangreicheren Probenkollektiv wiederholt werden. Ebenfalls wäre es wünschenswert, entsprechende Sonden für alle relevanten HPV-Typen zur Verfügung zu haben.

4.3 Test of Cure?

Die insgesamt 481 asservierten Samples enthalten eine Untergruppe an Proben, die gesondert analysiert wurde: Es handelt sich um Proben von Patientinnen mit der histologischen Diagnose einer CIN3, die daraufhin therapiert wurden. Die Proben wurden vor der Therapie (V1), drei Monate (V2) und 6 Monate (V3) nach der Therapie entnommen. Insgesamt standen 55 V1, 38 V2 und 9 V3 (insgesamt 102 Proben) zur Verfügung.

Auf dieses Kollektiv wurde nun der Risikoscore der Schwelle 0123_45 angewendet mit der Frage, inwieweit die Proben vor der Therapie (CIN3, V1) über die Marker als CIN3+ eingeschätzt werden und inwieweit die Proben nach der Therapie (V2,3) als nicht pathologisch eingeschätzt werden.

Tabelle 56: Anwendung des Risikoscores 0123_45 auf ein Probenkollektiv mit Diagnose einer CIN3 vor und nach Therapie durch Konisation. V1= vor Therapie, V2 = 3 Monate nach Therapie, V3 = 6 Monate nach Therapie

	Marker positiv (CIN3+)	Marker negativ (<CIN3)	Summe
V1 (CIN3)	46 (84%)	9 (16%)	55 (100%)
V2,3 (nach Therapie)	17 (36%)	30 (64%)	47 (100%)

84% der V1-Proben wurden auch über die Marker als CIN3 eingestuft und 64% der V2+3 wurden über die Marker als <CIN3 eingeordnet.

Innerhalb der falsch positiven Proben (V2,3, die laut Marker als CIN3+ eingeordnet wurden) sind 8 der 17 HPV-positiv in der Referenzmethode BSGP5+/6+ - MPG und 16 der 17 sind HPV-positiv im QG Assay. Der Vergleich mit der Gruppe der als richtig negativ eingeordneten Proben (V2,3, laut Marker <CIN3) ergibt, dass hier 7 der 30 Marker in der PCR-basierten Referenzmethode HPV-positiv sind und 8 der 30 im QG Assay.

Des Weiteren fällt auf, dass keiner der 17 falsch positiven Fälle den Grenzwert des Markers MCM2 von 40,5 rel. MFI überschreitet. Dies bedeutet, dass alle 17 Fälle über die Trennwerte für HPV E7 und ALDH1A1 den Grenzwert des Risikoscores von 33 überschreiten und somit in die falsch-positive Kategorie eingeteilt werden (s. Tabelle 56). Innerhalb des mathematischen Modells wird vor allem über den hohen Trennwert von MCM2 eine gute Spezifität erreicht.

Tabelle 57: Übersicht über die Kategorie "falsch positiv": Ausschnitt der Messergebnisse (rel.MFI) und errechneter Risikoscore.

*: In Klammern die Zuordnung anhand der Trennwerte der Marker: 1 = Trennwert überschritten, 0 = unter Trennwert

Probe	BSGP-PCR	QG-Typ.	Stärkster HPV rel.MFI*	HPV16 E7 rel.MFI*	ALDH1A1 rel. MFI*	MCM2 rel. MFI*	Risk-score
07-010 (V2)	56	18, 31, 56	20,78 (1)	0,47 (0)	5,09 (1)	4,19 (0)	45,91
07-016 (V2)	NN	16, 18	1,61 (1)	1,61 (1)	0,92 (0)	1,58 (0)	75,31
01-002 (V2)	16	16	2,82 (1)	2,82 (1)	2,41 (1)	8,15 (0)	91,11
01-006 (V2)	52	16, 33	1,48 (1)	1,48 (1)	1,38 (1)	3,96 (0)	91,11
01-008 (V2)	51	51	2,55 (1)	0,01 (0)	2,12 (1)	3,47 (0)	45,91
01-009 (V2)	16	16	13,48 (1)	13,48 (1)	3,08 (1)	13,12 (0)	91,11
01-021 (V2)	16,35,82	68, 82	1,36 (1)	0,05 (0)	2,84 (1)	6,75 (0)	45,91
01-022 (V2)	NN	18	2,08 (1)	0 (0)	4,32 (1)	22,49 (0)	45,91
01-024 (V2)	NN	18	0,69 (1)	0,02 (0)	2,55 (1)	2,06 (0)	45,91
01-025 (V2)	NN	16, 18	0,89 (1)	0,53 (0)	1,78 (1)	6,51 (0)	45,91
01-029 (V2)	NN	59, 66	1,17 (1)	0,32 (0)	19,64 (1)	20,33 (0)	45,91
01-031 (V2)	16, 45	45, 58	23,58 (1)	0,32 (0)	1,82 (1)	7,82 (0)	45,91
01-032 (V2)	NN	16	1,04 (1)	1,04 (1)	14,41 (1)	11,11 (0)	91,11
01-042 (V2)	NN	45	2,66 (1)	0,24 (0)	7,96 (1)	6,90 (0)	45,91
01-045 (V2)	NN	NN	0 (0)	1,12 (1)	18,34 (1)	29,42 (0)	65,72
01-003 (V3)	16	31	0,54 (1)	0,02 (0)	25,61 (1)	17,08 (0)	45,91
01-007 (V3)	59	56, 59	0,64 (1)	0 (0)	19,25 (1)	18,09 (0)	45,91

Innerhalb der Gruppe V1 wurden 9 der 55 Proben über die Analyse der Marker als <CIN3 eingestuft (falsch negativ). 4 der 9 Proben wurden über die Referenzmethode BSGP5+/6+ - MPG und 5 der 9 über den QG-Assay als HPV-negativ eingestuft. Keiner der 9 Proben erreicht den MCM2- Trennwert von 44,5 rel. MFI und auch der HPV16 E7 Trennwert der Schwelle 0123_45 wird nicht überschritten (Tabelle 57). Die Proben sind somit für maximal einen Wert des Risikoscores positiv (Stärkster HPV oder ALDH1A1) und werden als <CIN3 eingestuft.

Tabelle 58: Übersicht über die Kategorie "falsch negativ" (Proben der Gruppe V1, die über die Marker-Analyse als <CIN3 eingestuft werden): Ausschnitt der Messergebnisse (rel. MFI) und errechneter Risikoscore.

*: In Klammern die Zuordnung anhand der Trennwerte der Marker: 1 = Trennwert überschritten, 0 = unter Trennwert

** Trennwert des Risikoscore für 0123_45: 33

Probe	BSGP-PCR	QG-Typ.	Stärkster HPV rel.MFI*	HPV16E7 rel.MFI*	ALDHA1 rel. MFI*	MCM2 rel. MFI*	Risk-score **
07-012 (V1)	NN	NN	0 (0)	0 (0)	7,33 (1)	9,81 (0)	13,71
01-008 (V1)	51, 82	51	0 (0)	0 (0)	13,91 (1)	13,86 (0)	13,71
01-025 (V1)	NN	NN	0 (0)	0 (0)	0,01 (0)	1,25 (0)	4,51
01-030 (V1)	16	NN	0 (0)	0 (0)	0,86 (0)	1,62 (0)	4,51
01-031 (V1)	NN	NN	0 (0)	0 (0)	1,19 (0)	5,56 (0)	4,51
01-048 (V1)	16	NN	0 (0)	0 (0)	14,4 (1)	24,04 (0)	13,71
01-051 (V1)	NN	NN	0 (0)	0 (0)	4,80 (1)	12,99 (0)	13,71
07-005 (V1)	16	31	58,4 (1)	0 (0)	0,24 (0)	1,37 (0)	20,17
01-066 (V1)	16	16	0,53 (1)	0,53 (0)	0,95 (0)	1,63 (0)	20,17

Diskussion

Schon der Titel der Arbeit wirft die Frage nach einem „Paradigmenwechsel“ auf. Dies erscheint vielleicht provokativ, doch bearbeitet dieses Projekt eine Fragestellung, die nicht nur in diesem Rahmen, sondern auch auf der Ebene der internationalen Forschung heftig diskutiert wird und vielleicht tatsächlich die Überschrift „Paradigmenwechsel“ benötigt.

Folgende Fragestellungen sind die Basis des Projektes: Ist es möglich, über die Expressionsmessung von Biomarkern die verschiedenen Stadien zervikaler Dysplasien als molekularbiologische Entitäten zu charakterisieren? Ist es möglich, hierüber eine neue Messmethode zu etablieren, welche das onkogene Risiko einer zervikalen HPV-Infektion aussagekräftig abschätzt? Das klinische Ziel dieser Arbeit wäre es, den Screening-Algorithmus für zervikale Dysplasien auf die Abschätzung der Dysplasieursachen zu fußen und das Screening somit in den aktuellen Wissensstand zu integrieren und sinnvoll zu verbessern.

5.1 Proof of Principle und HPV-Genotypisierung

Die Ergebnisse dieses Projekts zeigen, dass es technisch möglich ist, auf der Basis von konservierten, lysierten, aber sonst unbehandelten Abstrichen, mRNA-Targets als Analyten zu verwenden und sie quantitativ zu messen. Der QuantiGene® 2.0 Assay bietet die Möglichkeit, mit relativ wenig Aufwand die enorme Informationsmenge einer quantitativen Messung von bis zu 82 Markern für 96 Proben zu erhalten. Diese Herangehensweise an eine molekularbiologische Charakterisierung kann so leicht durch keine andere Methodik erreicht werden und ermöglicht einen neuen Einblick in die Biologie der zervikalen Dysplasien. Durch Reduzierung der Reagenzien können die Kosten auf ein tragbares Niveau gesenkt werden.

Die mRNA-basierte QuantiGene-Typisierung wurde im Vergleich zu dem Goldstandard der PCR-basierten Typisierung mit MPG Luminex Read-out auf der Basis von L1-DNA-Sequenzen evaluiert. Zwei Aspekte, durch die sich die beiden Methoden grundlegend unterscheiden, müssen in der Evaluation bedacht werden:

1. Das Target: Während der Luminex mRNA-Moleküle misst, basiert der BSGP-Multiplex auf DNA-Targets. Hierdurch wird jeweils ein anderes Präsenzprofil des Virus gemessen: Während virale DNA auch als Kontamination vorhanden sein kann (z.B. Deposit von postkoitalem Material), setzt das Vorhandensein von mRNA eine aktive Infektion voraus. DNA ist resistenter gegenüber Umweltfaktoren als RNA, wodurch DNA ein länger messbares, sensibleres Target

darstellt. Für den QuantiGene® 2.0 Assay wurde die mRNA des Onkogens E7 als Target gewählt. E7 kann aufgrund von Unterschieden in den Nukleinsäuresequenzen typspezifisch gemessen werden und somit das Target für die HPV-Genotypisierung liefern.

2. Das Messprinzip: Der BSGP-Multiplex beruht auf einer PCR und somit auf einer Target-Amplifikation. Die zu messenden Moleküle werden amplifiziert, um eine maximale Sensitivität der Methode zu erreichen. Der QuantiGene® 2.0 Assay verstärkt das Signal der gebundenen Einzelmoleküle (Signalamplifikation) und ist somit zwangsläufig weniger sensibel.

Diese unterschiedlichen Qualitäten können in Abhängigkeit von ihrem praktischen Einsatz sowohl Vorteil als auch Nachteil sein: Dieses Projekt zielt auf eine Risikostratifikation der klinischen Diagnostik. Im Geschlechtsverkehr abgelagerte Virus-Partikel oder passagäre Infektionen des Virus haben keinerlei pathologische Bedeutung und ihr Nachweis führt zu einer unnötigen nachfolgenden Diagnostik. Eine maximale Sensitivität ist somit nicht angestrebt. Eine perfekte Konkordanz der beiden Methoden ist sowohl aufgrund der methodischen Unterschiede, als auch gemäß vorhandener Literatur nicht wahrscheinlich. In einem systematischen Review errechneten Thurah et al., dass im Vergleich zweier Messmethoden 31-52% der HPV-Typisierungsergebnisse nicht übereinstimmend sind.⁸⁹ In dem Vergleichen bezieht sich diese Publikation auf die wichtigsten der etablierten Typisierungsmethoden (HC2 im Vergleich zu APTIMA, Cobas, Abbott RealTime, Cervista, GP5+/6+, CLART, BD HPV Test, Amplicor und Linear Array).

Für **55,9%** der Proben ergaben die beiden Methoden ein exakt gleiches Ergebnis (d.h. exakt gleiches Ergebnis auch für multiple Infektionen). Bei **82,8%** zeigte sich ein mindestens teilweise gleiches Ergebnis (übereinstimmende Einzelinfektionen; bei multiplen Infektionen wurde mindestens ein HPV-Typ von beiden Methoden gefunden).

Dieses Ergebnis zeigt, dass der QuantiGene 2.0 Assay trotz mRNA-Target und fehlender Target-Amplifikation eine gute Sensitivität zeigt gemessen an der sehr hohen Sensitivität des Vergleichstests. Dass ein Teil der HPV-Infektionen (hier 17,2%), die über eine sehr sensitive DNA-basierte Methodik gefunden werden, keine (messbare) Quantität an E7-mRNA produzieren, ist plausibel.

5.2 E7: wichtiges Onkogen und Target der Genotypisierung

Das Prinzip des QuantiGene-Assays der quantitativen Messung ermöglicht eine neuartige Auswertung der Typisierung: Im Fall von multiplen Infektionen können die einzelnen HPV-Typen anhand ihrer E7-Last verglichen und abgestuft werden. E7 ist ein zentraler Faktor der onkogenen

„Fehlentwicklung“ einer HPV-Infektion. Die Arbeiten von v. Knebel Doeberitz und Vinokurova legen nahe, dass eine Überexpression von E7 (und E6) den Wendepunkt in der Biologie einer HPV-Infektion darstellen und hiermit der Übergang in eine transformierende Infektion stattfindet.⁸ Einige verfügbare HPV-Tests verwenden bereits dieses Molekül als Target (z.B. Aptima® HPV-Test, Firma: Hologic). Auch hier liegt die eigentliche Neuerung in der quantitativen Messung durch den QuantiGene Assay.

Auf der Basis dieser Überlegungen wurde der Marker „**Stärkster HPV**“ berechnet, der jeweils den Messwert für den HPV-Typen mit dem höchsten Signal für E7 darstellt. Dieser könnte als der Dysplasie-verursachende HPV-Typ betrachtet werden. Ziel hierbei ist es, die pathologisch relevanten HPV-Infektionen von passagären Infektionen und Virus-Deposits abzugrenzen. **88,9%** des Stärksten HPV wurden auch in der PCR-Methodik gefunden. Die Berechnung des Stärksten HPV erzielt somit eine höhere Konkordanz mit der Vergleichs-Typisierung, als die generelle mRNA-Typisierung über QuantiGene.

Da es zu erwarten ist, dass eine HPV-Infektion, die eine Dysplasie hervorruft, auch hohe Quantitäten an DNA aufweist und somit verlässlich über eine PCR-basierte Methode gemessen werden kann, bestärkt dieses Ergebnis die Idee, dass die starke Expression von E7 mit dem Risiko einer Dysplasie korreliert.

Die Berechnungen des Risikoscores zeigen weiterhin, dass die E7-basierten Marker (Stärkster HPV und HPV16E7) für alle drei Dysplasie-Schwellen bei Weitem die höchste Aussagekraft besitzen und somit für jede Schwelle Teil der Formel des Risikoscores sind. Dies bestätigt die pathologische Wichtigkeit dieses Moleküls und unterstützt somit die These von v. Knebel Doeberitz und Vinokurova.

5.3 Charakterisierung zervikaler Läsionen durch Biomarker

Der Einsatz von Biomarkern ist keine grundlegend neue Idee, sondern wird bereits als Zusatz für die Methoden der Histologie und Zytologie eingesetzt. Die grundlegende Neuerung liegt in der Möglichkeit der *quantitativen* Messung. In histologischen und zytologischen Färbungen ist eine Quantifizierung aufgrund von hoher Subjektivität nur sehr eingeschränkt möglich.

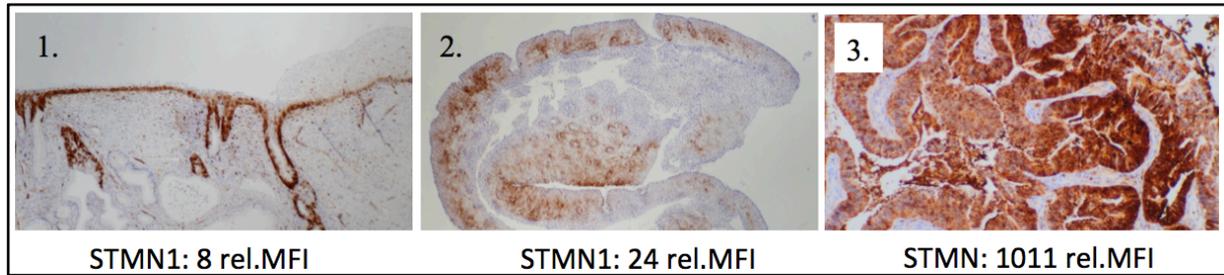


Abbildung 28: Histologische Schnitte der Zervix mit Stathmin-Färbung im Vergleich zu den Messergebnissen für Stathmin1 (QuantiGene® 2.0 Assay) derselben Läsion. Quelle der histologischen Schnitte und Fotos: Prof. A. Schneider, MVZ im Fürstenberg Karee Berlin.

Abbildung 28 zeigt verschiedene histologische Schnitte mit einer Färbung für Stathmin 1 (STMN1). In dem 1. Schnitt sind nur die basalen Zellen angefärbt (dargestellt ist die Junktionszone der Zervix). Dies entspricht dem Bild der physiologischen STMN1-Expression und ist als STMN1-negativ zu bewerten. Die Bilder 2 und 3 sind als STMN1 positiv zu bewerten, da mindestens in Abschnitten mehr als 2/3 des Epithels angefärbt sind. Es scheint offensichtlich, dass trotz der Positivität die Bilder 2 und 3 nicht im gleichen Maß angefärbt sind. In Bild 3 zeigt sich eine tiefere Färbung. Dieser Unterschied ist aber im Rahmen der Histologie nicht objektiv messbar. Vergleicht man hierzu die Ergebnisse des QuantiGene® 2.0 Assays (Schnitt 1, 8 rel. MFI), so lässt sich der Unterschied der STMN-Expression der Schnitte 2 und 3 klar darstellen: 24 rel. MFI (2) und 1011 rel. MFI (3). Dieser Mehrgehalt an Information ist die Basis dieses Projektes und wurde auf alle gewählten Marker angewendet.

5.3.1 Die Schwelle \leq CIN2/CIN3+: Charakterisierung hochgradiger Dysplasien

Die Differenzierung hochgradiger Dysplasien (CIN3, Karzinome) von Vorstadien markiert die pathologische Schwelle mit der größten Wichtigkeit für Therapieentscheidung und Prognose. Betrachtet man die ROC-Kurven der einzelnen Marker für die Schwelle 0123_45, so liefern einige Marker schon einzeln betrachtet eine hohe Aussagekraft (v.a. StärksterHPV, HPV16 E7, STMN, MCM2). Vergleicht man diese Kurven und AUCs mit der ROC-Kurve des errechneten Scores (Kombination der Marker), so sieht man, dass die Aussagekraft der gewählten Markerkombination die Aussage der besten Einzelmarker übertrifft (s. Abbildung 29).

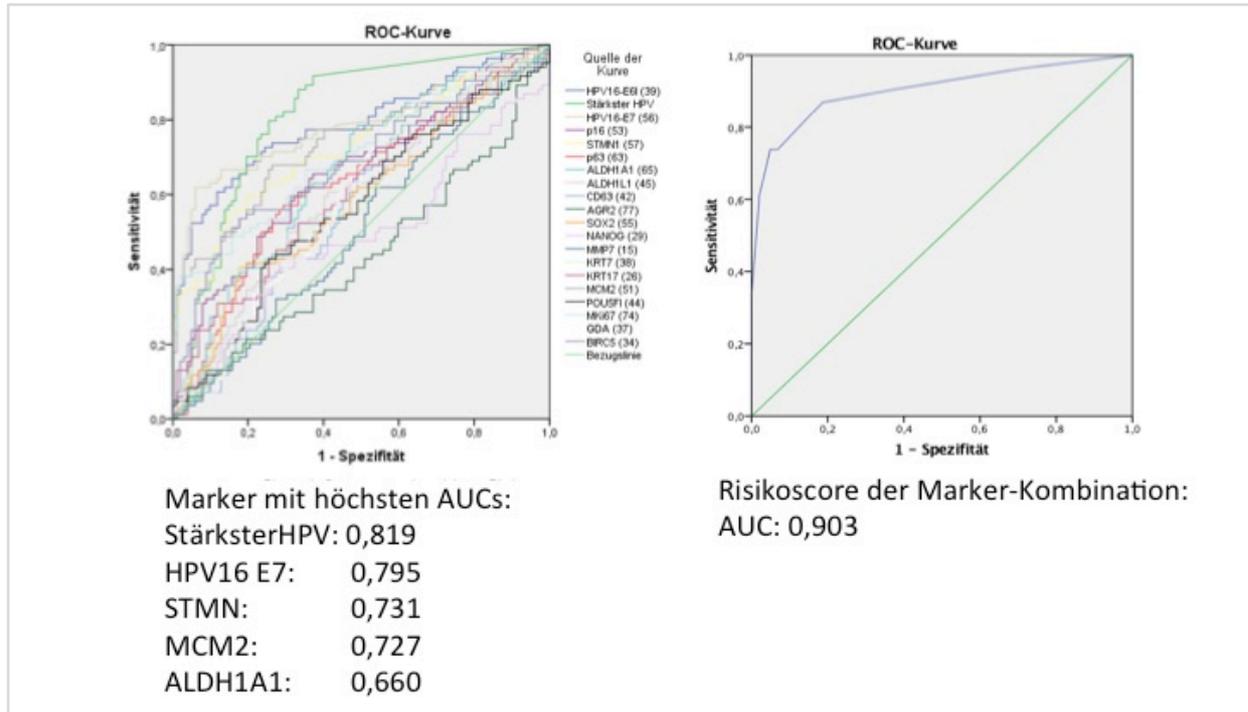


Abbildung 29: ROC-Kurven/AUCs der einzelnen Marker im Vergleich zu der ROC-Kurve/AUC des Risikoscores; Schwelle 0123_45

Während der StärksteHPV als insgesamt bester Marker eine AUC von 0,819 erreicht, liegt die AUC des Risikoscores bei 0,903. Dieses Ergebnis bestätigt die Idee des Multiplex Assays: Die Marker ergänzen sich gegenseitig und erreichen in ihrer Kombination hohe Werte für ihre Aussagekraft in Bezug auf die Schwelle 0123_45.

Für die Schwelle 0123_45 hat die Analyse über logistische Regression und ROC-Analysen ergeben, dass 84% der Proben (93,1% der Proben <CIN3 und 73,8% der Proben CIN3/Karzinom) korrekt zugeordnet werden konnten (AUC des Risikoscores: 0,903). Für diese Diskriminierung wurde eine Kombination von vier Markern gewählt, die biologisch plausibel erscheint: Über die Detektion des HPV als Ursache der Dysplasie werden alle potentiellen Läsionen erfasst und somit eine gute Sensitivität erreicht. Über die Hinzunahme der Markers MCM2, der in der Analyse der einzelnen Marker die höchste Aussagekraft für die Differenzierung <CIN3/CIN3+ zeigte, erhält man eine Auskunft über die Art der Infektion: MCM2-Moleküle markieren DNA-Abschnitte, die repliziert werden sollen, und werden physiologisch nur sehr limitiert in der Phase der Replikation exprimiert und sofort abgebaut. Eine Überexpression von MCM2, bzw. der fehlende Abbau signalisiert einen Zustand der pathologischen Proliferation. Als zweiter zellulärer Marker für diese Schwelle wurde der Stammzellmarker ALDH1A1 in die Formel aufgenommen. Dieses Molekül, das als „Entgifter“ fungiert, ist vor allem für Stammzellen mit immortalem Phänotyp (Zielzellen der HPV-Infektion) wichtig und kann als Marker der Dedifferenzierung angesehen werden. Die

Kombination an Markern wurde zunächst ausschließlich durch mathematische Argumente errechnet. Es zeigt sich, dass diese Auswahl auch biologisch sinnvoll ist.

Auf der Basis dieser Berechnungen konnten 84% der Proben korrekt zugeordnet werden. Dies ist zunächst als Erfolg zu werten für diese grundlegend neue Methodik der molekularbiologischen Diagnostik. Mit einer Sensitivität von 86,9% und einer Spezifität von 81,4% ist allerdings die von Szarewski et al. visualisierte ideale „linke obere Ecke“ im Diagramm von Sensitivität und Spezifität nicht erreicht (s. Abbildung 30).⁴⁹

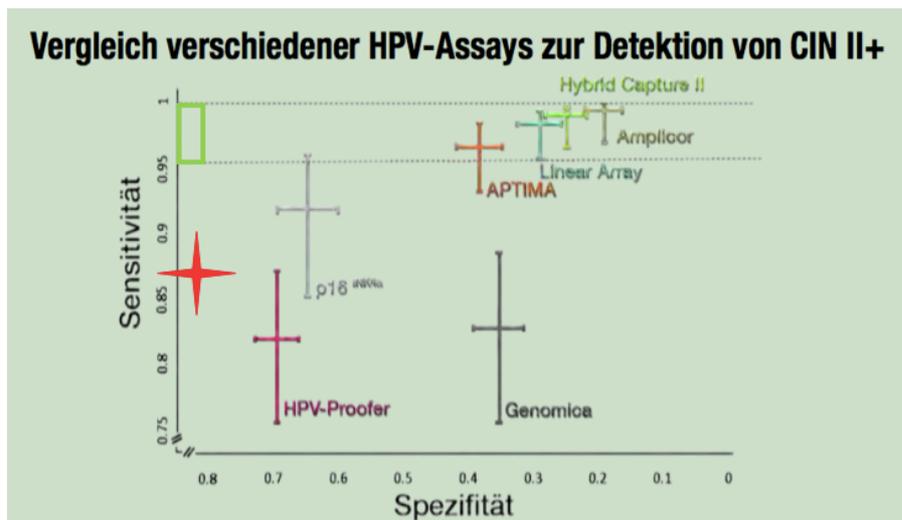


Abbildung 30: Vergleich verschiedener HPV-Test anhand von Sensitivität/Spezifität. Roter Stern: Visualisierung des Ergebnisses des Quantigene® 2.0 Assays (Schwelle 0123_45). Grüner Kasten: ideale Platzierung eines Screening-Tests. *Quelle: modifiziert nach: Szarewski A, et al.*⁴⁹

Verschiedene Ursachen können hierfür in Erwägung gezogen werden. Ein naheliegender Grund wäre, dass auch die beste Kombination an Markern nur unzureichend die Stadien der Dysplasie abbilden kann. Entweder reichen die Marker, die über die Auswertung der vorhandenen Literatur ausgewählt wurden, nicht aus, um die Biologie der Dysplasie zu beschreiben, oder aber die Dysplasie-Stadien laufen nicht über einheitliche biologische Profile und Zustände ab und können daher nicht molekularbiologisch charakterisiert werden.

5.3.2 Den Goldstandard in Frage stellen: ein Dilemma

Bei der Analyse handelt es sich um den Vergleich einer neuen potentiellen Methodik der Diagnostik (aus dem Bereich der Molekularbiologie) mit dem sogenannten „Goldstandard“ der Diagnostik, einem System, das auf der Betrachtung der Morphologie beruht. Dieser Goldstandard ist die beste existierende Annäherung an die Charakterisierung einer zervikalen Läsion und daher Grundlage des Vergleichs.

Ausgangspunkt des Projektes ist allerdings eine begründete Kritik an diesem System der morphologischen Charakterisierung. Hierin liegt ein Dilemma, da dieses kritisch zu reflektierende System dennoch als Goldstandard der Arbeit eingesetzt werden muss. Schon 1982 thematisierten Buckley et al. in einer Publikation die Schwierigkeit, die Bedeutung einer Dysplasie einzuschätzen und nannten es die „*vagueness as to what is meant by dysplasia*“⁹⁰. Es sei zwar möglich, eine Dysplasie über zytologische Kriterien zu definieren, ihre Bedeutung sei allerdings schwer vorherzusagen. Buckley schrieb 1982: „*Dysplasia has, in fact, never been defined as a pathological process and it is not clear whether those who wish to retain this term consider, that a cell in dysplastic cervical epithelium is an abnormal non-neoplastic cell, a cell which has undergone malignant change or one which, in some ill undefined manner, occupies a hypothetical middle ground between neoplastic and non-neoplastic cells*“⁹⁰.

Buckley bezweifelt hiermit, dass ein morphologisch definierter Zustand von Zellen oder Gewebe eine in sich geschlossene biologische Entität darstellt. Es wäre ebenso denkbar, dass verschiedene Prozesse der Zervix (physiologische Auseinandersetzung mit der vaginalen Flora oder auch Fremdmaterial (Sperma), pathologische Auseinandersetzung mit pathogenen Keimen ohne Risiko einer Dysplasie, HPV-induzierte Transformation) sich morphologisch gleichförmig darstellen, in ihrer pathologischen Bedeutung aber stark abweichen. Die Rolle der morphologischen Betrachtung beschreibt er sehr kritisch: „*It is thus clear that dysplasia is an ill-understood and imprecisely defined abnormality, that grading of dysplasia is a highly subjective and arbitrary exercise (...)*“⁹⁰.

5.3.3 Evaluation des Risikoscores \leq CIN2/CIN3+: Test of Cure?

Im Rahmen eines „Test of Cure“ wurde der Risikoscore der Schwelle 0123_45 wurde auf ein Kollektiv von Proben angewendet, die bei histologisch diagnostizierter CIN3 vor Therapie (V1) und nach Therapie (V2,3) entnommen wurden. Über den Score (bestehend aus den Markern StärksterHPV, HPV16E7, ALDH1A1, MCM2) wurden diese Proben nun nach richtig/falsch positiv und richtig/falsch negativ geordnet. 17 Proben wurden als falsch positiv eingeordnet (V2/3, die laut Risikoscore als CIN3+ eingeordnet werden). Die Rate der richtig negativen ist somit zu niedrig. Keiner dieser 17 Proben hat den Trennwerte für MCM2 überschritten, die Einordnung als CIN3+ basierte also auf der Positivität der anderen drei Marker (StärksterHPV, HPV16E7, ALDH1A1).

Dies ist bemerkenswert, da der Trennwert für MCM2 in dieser Schwelle hoch gewählt ist (Trennwert = 40,5 rel.MFI) und somit über diesen Marker die Spezifität gewährleistet wird. Die

Tatsache, dass alle Proben der Gruppe „falsch positiv“ ohne diesen Marker, der die Spezifität sichert, als positiv eingestuft wurden, wirft die Frage auf, ob dies nicht einen Schwachpunkt des Risikoscores aufdeckt. Dass die Spezifität des mathematischen Modells über einen einzigen Marker gesichert wird, ist vielleicht nicht ausreichend.

Ein anderer Schwachpunkt, der zu einer Fehleinschätzung führen kann, ist die Festlegung der Trennwerte für den Risikoscore (Trennwert der Marker-Kombination). Für die Schwelle 0123_45 wurde der Trennwert aufgrund einer günstigen Kombination an Sensitivität und Spezifität auf 33 gelegt. Für eine korrekte Festlegung dieses Trennwertes ist folgende Voraussetzung wichtig: ein zuverlässiger, präziser Goldstandard. In diesem Projekt ist dies der klinische Score, der sich aus den Ergebnissen der Histologie (Einzelhistologie) ergibt. Eine Studie zu der Reproduzierbarkeit von histologischen und zytologischen Diagnosen für zervikale Läsionen (Schiffman, Stoler et al., 2001) hat gezeigt, dass nur 204 von 433 (47%) der Läsionen, die in einer ersten Diagnostik als HSIL klassifiziert worden waren, auch von einem zweiten Untersucher als HSIL eingeordnet wurden.⁹¹

Schmitt et al. publizierten 2010 eine Studie, in der sie versuchten, zervikale Läsionen über eine Marker-Kombination aus 4 Splice-Produkten zu charakterisieren⁵². Ausgangspunkt ihrer Studie war die Zielvorstellung, neue Methoden des Screenings zu finden, angesichts der schlechten Spezifität und auch Sensitivität der Zytologie und Histologie. Ihre Methode beruhte auf qRT-PCR als einem quantitativen Target-amplifizierenden Assay. Während sie 100% der Karzinome über ihre Marker-Kombination korrekt einordnen konnten, wurden nur 67% der HSIL-Fälle korrekt identifiziert.

Falls der Goldstandard – wie in der Literatur durchaus angedeutet – Läsionen falsch einschätzt und somit der Risikoscore CIN3-Läsionen finden soll, die keine CIN3-Läsionen sind, wird der Score falsch „kalibriert“. Durch die falsch deklarierten CIN3 errechnet sich eine falsch niedrige Sensitivität des Scores. Da auf jeden Fall eine hohe Sensitivität von Nöten ist, wird also ein Trennwert gewählt mit hoher Sensitivität, welches auf Kosten der Spezifität geht. Durch diese Verzerrung könnte der Trennwert von 33 fälschlicherweise als der beste errechnet worden sein.

Dieses Projekt ist weder in der Lage zu beweisen, dass die Morphologie 30% bis sogar 50% der CIN3 unsicher zuordnet, noch kann es die Aussage treffen, dass Dysplasien als biologische Entität charakterisiert werden können. Dieses Projekt kann nur mit den vorhandenen Messdaten arbeiten und weitere Argumente liefern. Der aktuelle Wissensstand lässt es wahrscheinlich aussehen, dass

hochgradige Dysplasien als biologische Entität charakterisieren werden können und eher die Morphologie verschiedene transformierende und nicht-transformierende Zustände fälschlich als Entität zusammenfügt. Schmitt et al. berechnen, dass 67% der HSIL durch erneute histologische Begutachtung bestätigt werden können.⁵² Stoler et al. zeigten eine Reproduzierbarkeit in der histologischen Diagnostik von HSIL von 47%.⁹¹ Geht man davon aus, dass eher 60-70% der CIN3 gefunden werden sollten (und ca. 30% von der Morphologie falsch zugeordnet wurden), ist das Ergebnis dieser Arbeit von 84% richtig positiven CIN3 zu hoch. Eine zu hohe Rate an richtig positiven und eine zu niedrige Rate an richtig negativen Proben (s.o.) sprechen für eine schlechte Kalibrierung aufgrund eines unpräzisen Goldstandards. Die CIN3-Schwelle des Risikoscores wäre somit zu niedrig gesetzt.

2008 veröffentlichten McCredie et al. eine retrospektiv durchgeführte Studie über die Progressionswahrscheinlichkeit der histologischen Diagnose einer CIN3.⁹² Für eine Untergruppe an Patientinnen, an denen nach der histologischen Diagnose einer CIN3 nur eine minimale Manipulation in Form von maximal einer Stanzbiopsie durchgeführt wurde, ergab sich eine kumulative Inzidenz an Zervixkarzinomen von 31,1% 30 Jahre nach der Diagnose einer CIN3. Eine weitere Untergruppe von Patientinnen, bei welchen über 24 Monaten eine persistierende Pathologie nachgewiesen wurde, zeigte 30 Jahre nach Diagnose eine kumulative Karzinominzidenz von 50,3%. Die Daten dieser Studie stellen die einzige vorhandene empirischen Abschätzung der Prognose einer CIN3 dar. Die von McCredie et al. veröffentlichten Ergebnisse können als weiteren Hinweis gedeutet werden, dass es sich bei der histologischen Klassifizierung einer CIN3 nicht um die Charakterisierung einer homogenen biologischen Entität handelt, sondern um eine wenig spezifische morphologische Einteilung, die sowohl bei transformierenden als auch bei nicht-transformierenden HPV-Infektionen oder anderen Reizzuständen vorliegen kann. Bei einer Karzinominzidenz von 30% nach wenig Manipulation und 30 Jahre nach Diagnose muss kritisch die Frage gestellt werden, ob diese morphologische Charakterisierung eine ausreichende Aussagekraft und Spezifität besitzt, um die Indikation für eine invasive Therapie zu rechtfertigen.

5.3.4 Differenzierung von CIN1 und CIN2 über Biomarker

Als weiteres Teilergebnis dieser Arbeit ist die Auswertungen zu der Schwelle \leq CIN1/CIN2+ (012_345) im Kontext der aktuellen Forschung interessant. Die Ergebnisse für diese Schwelle zeigen, dass die quantitative Messung der HPV-Onkogene eine brauchbare Aussagekraft liefert (AUC des Stärkster HPV = 0,86, AUC von HPV16E7 = 0,8). Auffallend ist jedoch, dass alle zellulären Marker für diese Schwelle nur eine äußerst niedrige Aussagekraft besitzen (bester zellulärer Marker: STMN: AUC = 0,697).

Zwei mögliche Erklärungsansätze für diese Ergebnisse können formuliert werden: 1. Die verwendeten Marker sind ungünstig gewählt, um die Biologie dieser Dysplasiestufen zu beschreiben. 2. Gerade bei den niedrigen Dysplasiestufen (CIN1,2) fasst die morphologische Definition verschiedene Entitäten zusammen, die sich auf biologischer Ebene nicht ähneln.

Es muss hierbei kritisch bedacht werden, dass die Fallzahlen dieser Arbeit niedrig sind, gerade für die Gruppen CIN1 und CIN2. Ergebnisse können somit eher als Hinweis im Rahmen einer Pilotstudie angesehen werden.

Der errechnete Risikoscore, also die kombinierten Marker-Trennwerte, ergibt ein erstaunlich gutes Ergebnis (AUC=0,927), das sogar die Aussagekraft der Schwelle 0123_45 übertrifft. Es fällt allerdings auf, dass dieser Risikoscore aus 4 Trennwerte errechnet wurde, von denen drei auf den Markern der viralen Onkogene beruhen. Der Trennwert des zellulären Markers BIRC trägt mit seiner Odd's Ratio von 3,9 nur marginal zu der Gesamtaussage des Scores bei (vgl. Odd's Ratios der anderen 3 Trennwerte: 17,4; 19,1; 6,3, s. Tabelle 49 S.82; bei SPSS gemäß der mathematischen Herleitung als „Exp(B)“ ausgegeben). In der Formel des Risikoscores erhalten vor allem zwei Trennwerte der Onkogene über ihren Koeffizienten eine große Bedeutung. Beide sind sehr niedrig gewählte HPV-Trennwerte, die quasi die Grenze der HPV-Positivität definieren: Stärkster HPV low (0,01 rel. MFI), HPV16E7 (0,37 rel.MFI). Der gewählte zelluläre Marker ist ein Tumor-Stammzellmarker, der in der Frage nach niedriggradigen Dysplasien biologisch nicht sinnvoll erscheint. Dieser Score ist also eher ein Modell, das auf mathematischen Argumenten eine „Pseudoschwelle“ kreiert und biologisch unsinnig erscheint. Die Abgrenzung \leq CIN1/CIN2+ beruht hier auf der Abgrenzung HPV negativ/positiv und nicht auf der Abgrenzung biologischer Profile.

Es ist zu klären, in wie weit die Struktur des hier verwendeten Datensatz zu diesen Ergebnissen beiträgt. Die Gruppe \leq CIN1 besteht aus wenigen CIN1 und vielen Proben der Gruppe 0 (HPV negativ). Die Gruppe CIN2+ beinhaltet wenige CIN2 und viele CIN3, die in aller Regel HPV positiv sind. Es ist zu prüfen, ob sich diese Ergebnisse auf einen ausgewogenen Datensatz übertragen lassen.

5.3.5 Auswertung der Schwelle \leq CIN3/Karzinom

Für die Schwelle \leq CIN3/Karzinom wurde ein Risikoscore errechnet, der auf Trennwerten der Marker Stärkster HPV, HPV16E6, STMN und KRT17 beruht. Biologisch betrachtet erscheint dieses Modell sinnvoll. Die Trennwerte der beiden zellulären Marker sind hoch gesetzt (STMN:

218 rel.MFI, KRT17: 506 rel.MFI und 900 rel.MFI), wodurch eine gute Spezifität erreicht werden kann. Die Sensitivität stützt sich auf die Trennwerte der viralen Marker, vor allem auf den Trennwert des HPV16 Onkogens E6, der mit 0,12 rel.MFI fast an der Positivitätsgrenze liegt. Der E7-Trennwert des führenden HPV-Typs (Stärkster HPV) liegt mit 20 rel.MFI ungefähr bei dem Median der Werte der CIN3-Gruppe (s. Abbildung 16 S. 55) und ist somit auch niedrig gewählt. Mit einer AUC von 0,913 ist die Gesamtaussagekraft dieses Markermodells hoch. Das Probenkollektiv beinhaltet nur 27 Proben von Karzinomen. In einem nächsten Schritt sollte die Charakterisierung dieser Schwelle mit einem umfangreicheren und numerisch ausgeglichenen Datensatz bestätigt werden.

In dem Abschnitt 4.2.6 Anwendung der Risikoscores (s. S. 80) werden die Scores der drei berechneten Schwellen auf zufällig ausgewählte Proben verschiedener Krankheitsstadien angewendet. Es fällt auf, dass die Probe mit der histologischen Diagnose einer CIN3 über den Risikoscore fälschlich als Karzinom klassifiziert wurde. Betrachtet man die einzelnen Komponenten des Risikoscores für diese Probe, so ist zu bemerken, dass alleine die viralen Marker (Stärkster HPV und HPV16 E7) über den Trennwerten des Scores liegen, während die zellulären Marker unterhalb der Trennwerte liegen. Da die Trennwerte der viralen Marker relativ niedrig gewählt sind und die Spezifität vor allem über die zellulären Marker gewährleistet wird, legt das Ergebnis nahe, dass diese Probe „durch eine Lücke der Spezifität“ falsch zugeordnet wurde. Dass eine Probe alleine aufgrund von auffälligen viralen Markern als positiv angesehen wird, liegt an der sehr hohen Aussagekraft der viralen Marker. Mit einem Wert von 67 rel.MFI für das Onkogen E7 des führenden HPV (in diesem Fall HPV16) liegt diese Probe näher an dem entsprechenden Median der Karzinomgruppe (103 rel.MFI, s. Abbildung 16 S. 55) als an dem Median der CIN3-Gruppe (21,7 rel.MFI).

Der Goldstandard der Histologie hat diese Probe als CIN3 klassifiziert. Die molekularbiologische Charakterisierung des QuantiGene zeigt eine Onkogen-Expression, die in einem kritischen Bereich liegt. Da es sich bei der molekularen Charakterisierung um eine neuartige Methode der Diagnostik handelt, die in diesem Projekt erstmals evaluiert wird, bedarf es weiterer Forschung um die objektive Aussagekraft der Marker im Vergleich zu der Aussagekraft des aktuellen Goldstandards der Histologie abzuschätzen. Die aktuelle Einteilung der zervikalen Karzinom-Vorstufen beruht auf den Einteilungsmöglichkeiten der morphologischen Betrachtung der Gewebeproben. Ob diese Einteilung, CIN1-3, auch als Ergebnis-Klassen der molekularen Charakterisierung sinnvoll ist, bleibt zu evaluieren. Die oben genannte Probe, die histologisch als

CIN3 klassifiziert wurde, würde molekularbiologisch am ehesten als „Hochrisiko-CIN3“ zu bezeichnen sein.

5.4 Abschluss und Perspektive

Die geleistete Arbeit dieses Projektes bestand aus klar definierten und chronologisch durchführbaren Schritten:

1. Sammeln, Ordnen, Aufbereiten von Proben
2. Vortestungen zur technischen Evaluierung der Methodik
3. Messung der Proben und Vorbereitung der Ergebnisse (Berechnung der rel.MFI)
4. mathematische Auswertung der Daten

Mehrere Meilensteine der Forschung haben die Prävention des Zervixkarzinoms von einer unspezifischen Ebene der Makroskopie zu einer spezifischen Ebene der Mikroskopie (G. Papanicolaou) und dann zu der kausalen Ebene der Molekularbiologie (H. zur Hausen) weiterentwickelt. Seit diesem letzten Schritt hat sich der Wissensstand um die Biologie der Dysplasie und des viralen Lebenszyklus drastisch verbessert. Dieses neue Wissen wurde zunächst als Zusatz der Diagnostik in den bestehenden Algorithmus integriert (z.B. immunhistochemische und zytologische Färbungen für die Marker p16 und Ki67, E7-basierte HPV-Tests). Durch das aktuelle angewandte Screening-Modell konnte die Mortalität des Zervixkarzinoms deutlich gesenkt werden. Seit den 1990er Jahren ist die Rate an Neuerkrankungen jedoch wenig gesunken (s. Abbildung 6 S. 13). Dass die neueste Ebene der Wissenschaft, in der das Virus mit seiner Biologie als Ursache der Pathologien im Zentrum steht, nun von der Peripherie in das Zentrum der Diagnostik rückt, scheint ein logischer Schritt. Genau in diesen Prozess ordnet sich die vorliegende Arbeit mit ihrem wissenschaftlichen Hintergrund ein.

Ein Studienaufbau mit 216 final auswertbaren Proben wird der Dimension der Fragestellung nicht gerecht. Daher ist diese Arbeit als Pilotstudie im Rahmen der aktuellen Forschung anzusehen. Die Arbeit liefert ein hochinteressantes Ergebnis: einen Risikoscore für die relevanteste Schwelle (0123_45), der mit einer AUC von 0,903 eine deutliche Aussagekraft liefert und deren mathematisches Modell auch biologisch sinnvoll erscheint.

Das Projekt wirft mehr Fragen auf, als es derzeit beantworten kann. Seine Ergebnisse sind so vielversprechend, dass es die Motivation rechtfertigt, sich diesem Forschungsthema nun mit einem Projekt in größerem Maßstab zu widmen. Die wichtigste Frage, die sich im Laufe der Arbeit gestellt hat, zeigt sich in Form eines Dilemmas: Die begründete Kritik an einem gültigen

Algorithmus der Diagnostik (morphologisch: Zytologie und Histologie) ist Ausgangspunkt des Projekts. Dennoch muss eben dieser Algorithmus als Goldstandard und Kalibrierung der Auswertung fungieren. Um diesen Konflikt lösen zu können, bedarf es einer Studie mit prospektivem Design.

Der Schritt, HPV als Ursache zervikaler Pathologien in den Mittelpunkt der Diagnostik zu stellen, erscheint theoretisch sinnvoll und naheliegend. Es würde sich hieraus folgender zweistufiger Algorithmus der Diagnostik ergeben: In einem ersten Schritt wird ein HPV-Test durchgeführt, um somit die Patientinnen, bei denen der Dysplasie-Risikofaktor einer HPV-Infektion vorliegt, herauszufiltern. Bei positivem Ergebnis folgt dann als zweiter Schritt eine Messung der Biomarkerexpression, um die Art der HPV-Infektion, bzw. das Risiko einer Dysplasie einzuschätzen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit, ein Projekt von kleinem Rahmen, liefern empirische Indizien, dass sich diese eingeschlagene Richtung der Forschung, lohnt. In einem nächsten Schritt sollte die Fragestellung nach der biologischen Entität einer hochgradigen Dysplasie in einem größeren Rahmen und somit in einem prospektiven Studiendesign bearbeitet werden.

Literaturverzeichnis

- 1 Lowy, I. *A Woman's Disease - The history of cervical cancer*. 1-5 (Oxford University Press, 2011).
- 2 Classes in oncology: George Nicholas Papanicolaou's new cancer diagnosis presented at the Third Race Betterment Conference, Battle Creek, Michigan, January 2-6, 1928, and published in the Proceedings of the Conference. *CA Cancer J Clin* **23**, 174-179 (1973).
- 3 zur Hausen, H. Papillomaviruses in human cancer. *Cancer* **59**, 1692-1696 (1987).
- 4 Pfister, H. *Prophylaxis and Early Detection of HPV-Related Neoplasia*. (Karger, 2012).
- 5 Buck, C. B. Arrangement of L2 within the papillomavirus capsid. *J Virol* **82**, 5190-5197 (2008).
- 6 Narechania, A., Chen, Z., DeSalle, R. & Burk, R. D. Phylogenetic incongruence among oncogenic genital alpha human papillomaviruses. *J Virol* **79**, 15503-15510, doi:10.1128/JVI.79.24.15503-15510.2005 (2005).
- 7 Kines, R. C., Thompson, C. D., Lowy, D. R., Schiller, J. T. & Day, P. M. The initial steps leading to papillomavirus infection occur on the basement membrane prior to cell surface binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 20458-20463, doi:10.1073/pnas.0908502106 (2009).
- 8 Doeberitz, M. & Vinokurova, S. Host factors in HPV-related carcinogenesis: cellular mechanisms controlling HPV infections. *Arch Med Res* **40**, 435-442, doi:10.1016/j.arcmed.2009.06.002 (2009).
- 9 Howley, P. M. *Fields Virology*. 2299-2354 (Wolters Kluwer, 2007).
- 10 Woodman, C. B., Collins, S. I. & Young, L. S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* **7**, 11-22, doi:10.1038/nrc2050 (2007).
- 11 Dyson, N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* **12**, 2245-2262 (1998).
- 12 Hwang, S. G., Lee, D., Kim, J., Seo, T. & Choe, J. Human papillomavirus type 16 E7 binds to E2F1 and activates E2F1-driven transcription in a retinoblastoma protein-independent manner. *J Biol Chem* **277**, 2923-2930, doi:10.1074/jbc.M109113200 (2002).
- 13 Longworth, M. S. & Laimins, L. A. The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc finger-like motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol* **78**, 3533-3541 (2004).
- 14 Brehm, A., Nielsen, S. J., Miska, E. A., McCance, D. J., Reid, J. L., Bannister, A. J. & Kouzarides, T. The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *EMBO J* **18**, 2449-2458, doi:10.1093/emboj/18.9.2449 (1999).
- 15 Jones, D. L. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogation p21-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev*, 2101-2111 (1997).
- 16 Gage, J. R., Meyers, C. & Wettstein, F. O. The E7 proteins of the nononcogenic human papillomavirus type 6b (HPV-6b) and of the oncogenic HPV-16 differ in retinoblastoma protein binding and other properties. *J Virol* **64**, 723-730 (1990).
- 17 Munger, K., Werness, B. A., Dyson, N., Phelps, W. C., Harlow, E. & Howley, P. M. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J* **8**, 4099-4105 (1989).

- 18 Demers, G. W., Halbert, C. L. & Galloway, D. A. Elevated wild-type p53 protein levels in human epithelial cell lines immortalized by the human papillomavirus type 16 E7 gene. *Virology* **198**, 169-174, doi:10.1006/viro.1994.1019 (1994).
- 19 Huibregtse, J. M., Scheffner, M. & Howley, P. M. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J* **10**, 4129-4135 (1991).
- 20 Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J. & Howley, P. M. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63**, 1129-1136 (1990).
- 21 Howie, H. L., Katzenellenbogen, R. A. & Galloway, D. A. Papillomavirus E6 proteins. *Virology* **384**, 324-334, doi:10.1016/j.virol.2008.11.017 (2009).
- 22 Duensing, S. e. a. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc. Natl Acad Sci USA* (2000).
- 23 Duensing, S. & Munger, K. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability. *Cancer Res* **62**, 7075-7082 (2002).
- 24 Kesis, T. D., Connolly, D. C., Hedrick, L. & Cho, K. R. Expression of HPV16 E6 or E7 increases integration of foreign DNA. *Oncogene* **13**, 427-431 (1996).
- 25 Bouvard, V., Matlashewski, G., Gu, Z. M., Storey, A. & Banks, L. The human papillomavirus type 16 E5 gene cooperates with the E7 gene to stimulate proliferation of primary cells and increases viral gene expression. *Virology* **203**, 73-80, doi:10.1006/viro.1994.1456 (1994).
- 26 Straight, S. W., Herman, B. & McCance, D. J. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes. *J Virol* **69**, 3185-3192 (1995).
- 27 de Freitas, A. C., de Oliveira, T. H. A., Barros, M. R., Jr. & Venuti, A. hrHPV E5 oncoprotein: immune evasion and related immunotherapies. *J Exp Clin Cancer Res* **36**, 71, doi:10.1186/s13046-017-0541-1 (2017).
- 28 Schwarz, E., Freese, U. K., Gissmann, L., Mayer, W., Roggenbuck, B., Stremlau, A. & zur Hausen, H. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* **314**, 111-114 (1985).
- 29 Moody, C. A. & Laimins, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer* **10**, 550-560, doi:10.1038/nrc2886 (2010).
- 30 Crum, C. P., Ikenberg, H., Richart, R. M. & Gissman, L. Human papillomavirus type 16 and early cervical neoplasia. *N Engl J Med* **310**, 880-883, doi:10.1056/NEJM198404053101403 (1984).
- 31 Herfs, M., Yamamoto, Y., Laury, A., Wang, X., Nucci, M. R., McLaughlin-Drubin, M. E., Munger, K., Feldman, S., McKeon, F. D., Xian, W. & Crum, C. P. A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 10516-10521, doi:10.1073/pnas.1202684109 (2012).
- 32 Bosch, F. X., Burchell, A. N., Schiffman, M., Giuliano, A. R., de Sanjose, S., Bruni, L., Tortolero-Luna, G., Kjaer, S. K. & Munoz, N. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine* **26 Suppl 10**, K1-16, doi:10.1016/j.vaccine.2008.05.064 (2008).
- 33 Munoz, N., Bosch, F. X., de Sanjose, S., Herrero, R., Castellsague, X., Shah, K. V., Snijders, P. J., Meijer, C. J. & International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study, G. Epidemiologic classification of human papillomavirus

- types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* **348**, 518-527, doi:10.1056/NEJMoa021641 (2003).
- 34 L. Bruni, L. B.-R., G. Albero, M. Aldea, B. Serrano, S. Valencia, M. Brotons, M. Mena, R. Cosano, J. Muñoz, F.X. Bosch, S. de Sanjosé, X.Castellsagué. Human Papillomavirus and Related Diseases in Europe. (ICO Information Centre on HPV and Cancer, 2015).
- 35 Cancer, I. I. C. o. H. a. in *Summary Report* (2015).
- 36 L. Bruni, L. B.-R., G. Albero, M. Aldea, B. Serrano, S. Valencia, M. Brotons, M. Mena, R. Cosano, J. Muñoz, F. X. Bosch, S. de Sanjosé, X. Castellsagué. Human Papillomavirus and Related Diseases in the World. Summary Report 2015. (ICO Information Centre on HPV and Cancer, 2015).
- 37 Internetauftritt des Zentrum für Krebsregisterdaten, Robert Koch Institut, Abschnitt: Gebärmutterhalskrebs (Zervixkarzinom)ICD-10 C53 <http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Gebaermutterhalskrebs/gebaermutterhalskrebs_node.html;jsessionid=FF2699D8B8CB05D32CCF577FE6458AE1.2_cid372>. Seite besucht am 24.5.2017
- 38 Kaufmann, A. M. & Nitschmann, S. [Vaccine against human papillomavirus : PATRICIA Study (PApilloma TRIal against Cancer In young Adults)]. *Internist (Berl)* **51**, 410, 412-413, doi:10.1007/s00108-009-2575-8 (2010).
- 39 Poethko-Muller, C., Buttman-Schweiger, N. & Ki, G. G. S. S. G. [HPV vaccination coverage in German girls: results of the KiGGS study: first follow-up (KiGGS Wave 1)]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* **57**, 869-877, doi:10.1007/s00103-014-1987-3 (2014).
- 40 Schneider, A. *Primäre, sekundäre und tertiäre Prävention des Zervixkarzinoms*. (Endopress, 2015).
- 41 Whitlock, E. P., Vesco, K. K., Eder, M., Lin, J. S., Senger, C. A. & Burda, B. U. Liquid-based cytology and human papillomavirus testing to screen for cervical cancer: a systematic review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* **155**, 687-697, W214-685, doi:10.7326/0003-4819-155-10-201111150-00376 (2011).
- 42 Griesser, H. Gynäkologische Dysplasien. *Deutsches Ärzteblatt* **111(15): A-640** (2014).
- 43 Poljak, M., Kocjan, B. J., Ostrbenk, A. & Seme, K. Commercially available molecular tests for human papillomaviruses (HPV): 2015 update. *J Clin Virol* **76 Suppl 1**, S3-S13, doi:10.1016/j.jcv.2015.10.023 (2016).
- 44 Arbyn, M., Snijders, P. J., Meijer, C. J., Berkhof, J., Cuschieri, K., Kocjan, B. J. & Poljak, M. Which high-risk HPV assays fulfil criteria for use in primary cervical cancer screening? *Clin Microbiol Infect* **21**, 817-826, doi:10.1016/j.cmi.2015.04.015 (2015).
- 45 Meijer, C. J., Berkhof, J., Castle, P. E., Hesselink, A. T., Franco, E. L., Ronco, G., Arbyn, M., Bosch, F. X., Cuzick, J., Dillner, J., Heideman, D. A. & Snijders, P. J. Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. *Int J Cancer* **124**, 516-520, doi:10.1002/ijc.24010 (2009).
- 46 Cuzick, J., Clavel, C., Petry, K. U., Meijer, C. J., Hoyer, H., Ratnam, S., Szarewski, A., Birembaut, P., Kulasingam, S., Sasieni, P. & Iftner, T. Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer* **119**, 1095-1101, doi:10.1002/ijc.21955 (2006).
- 47 Dillner, J., Rebolj, M., Birembaut, P., Petry, K. U., Szarewski, A., Munk, C., de Sanjose, S., Naucler, P., Lloveras, B., Kjaer, S., Cuzick, J., van Ballegooijen, M., Clavel, C., Iftner, T. & Joint European Cohort, S. Long term predictive values of cytology and human

- papillomavirus testing in cervical cancer screening: joint European cohort study. *BMJ* **337**, a1754, doi:10.1136/bmj.a1754 (2008).
- 48 Wentzensen, N., Fetterman, B., Castle, P. E., Schiffman, M., Wood, S. N., Stiemerling, E., Tokugawa, D., Bodelon, C., Poitras, N., Lorey, T. & Kinney, W. p16/Ki-67 Dual Stain Cytology for Detection of Cervical Precancer in HPV-Positive Women. *J Natl Cancer Inst* **107**, djv257, doi:10.1093/jnci/djv257 (2015).
- 49 Szarewski, A., Ambroisine, L., Cadman, L., Austin, J., Ho, L., Terry, G., Liddle, S., Dina, R., McCarthy, J., Buckley, H., Bergeron, C., Soutter, P., Lyons, D. & Cuzick, J. Comparison of predictors for high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women with abnormal smears. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **17**, 3033-3042, doi:10.1158/1055-9965.EPI-08-0508 (2008).
- 50 Ikenberg, H., Bergeron, C., Schmidt, D., Griesser, H., Alameda, F., Angeloni, C., Bogers, J., Dachez, R., Denton, K., Hariri, J., Keller, T., von Knebel Doeberitz, M., Neumann, H. H., Puig-Tintore, L. M., Sideri, M., Rehm, S., Ridder, R. & Group, P. S. Screening for cervical cancer precursors with p16/Ki-67 dual-stained cytology: results of the PALMS study. *J Natl Cancer Inst* **105**, 1550-1557, doi:10.1093/jnci/djt235 (2013).
- 51 Bergeron, C., Ronco, G., Reuschenbach, M., Wentzensen, N., Arbyn, M., Stoler, M. & von Knebel Doeberitz, M. The clinical impact of using p16(INK4a) immunochemistry in cervical histopathology and cytology: an update of recent developments. *Int J Cancer* **136**, 2741-2751, doi:10.1002/ijc.28900 (2015).
- 52 Schmitt, M., Dalstein, V., Waterboer, T., Clavel, C., Gissmann, L. & Pawlita, M. Diagnosing cervical cancer and high-grade precursors by HPV16 transcription patterns. *Cancer Res* **70**, 249-256, doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2514 (2010).
- 53 Lupberger, J., Kreuzer, K. A., Baskaynak, G., Peters, U. R., le Coutre, P. & Schmidt, C. A. Quantitative analysis of beta-actin, beta-2-microglobulin and porphobilinogen deaminase mRNA and their comparison as control transcripts for RT-PCR. *Mol Cell Probes* **16**, 25-30, doi:10.1006/mcpr.2001.0392 (2002).
- 54 Sharan, R. N., Vaiphei, S. T., Nongrum, S., Keppen, J. & Ksoo, M. Consensus reference gene(s) for gene expression studies in human cancers: end of the tunnel visible? *Cell Oncol (Dordr)* **38**, 419-431, doi:10.1007/s13402-015-0244-6 (2015).
- 55 Drayton, S., Brookes, S., Rowe, J. & Peters, G. The significance of p16INK4a in cell defenses against transformation. *Cell Cycle* **3**, 611-615 (2004).
- 56 D'Arcangelo, D., Tinaburri, L. & Dellambra, E. The Role of p16INK4a Pathway in Human Epidermal Stem Cell Self-Renewal, Aging and Cancer. *Int J Mol Sci* **18**, doi:10.3390/ijms18071591 (2017).
- 57 von Knebel Doeberitz, M., Reuschenbach, M., Schmidt, D. & Bergeron, C. Biomarkers for cervical cancer screening: the role of p16(INK4a) to highlight transforming HPV infections. *Expert Rev Proteomics* **9**, 149-163, doi:10.1586/ep12.13 (2012).
- 58 Rayess, H., Wang, M. B. & Srivatsan, E. S. Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *Int J Cancer* **130**, 1715-1725, doi:10.1002/ijc.27316 (2012).
- 59 Belletti, B. & Baldassarre, G. Stathmin: a protein with many tasks. New biomarker and potential target in cancer. *Expert Opin Ther Targets* **15**, 1249-1266, doi:10.1517/14728222.2011.620951 (2011).
- 60 Zerfass-Thome, K., Zwerschke, W., Mannhardt, B., Tindle, R., Botz, J. W. & Jansen-Durr, P. Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene* **13**, 2323-2330 (1996).
- 61 Xi, W., Rui, W., Fang, L., Ke, D., Ping, G. & Hui-Zhong, Z. Expression of stathmin/op18 as a significant prognostic factor for cervical carcinoma patients. *J Cancer Res Clin Oncol* **135**, 837-846, doi:10.1007/s00432-008-0520-1 (2009).

- 62 Howitt, B. E., Nucci, M. R., Drapkin, R., Crum, C. P. & Hirsch, M. S. Stathmin-1 expression as a complement to p16 helps identify high-grade cervical intraepithelial neoplasia with increased specificity. *Am J Surg Pathol* **37**, 89-97, doi:10.1097/PAS.0b013e3182753f5a (2013).
- 63 Scholzen, T. & Gerdes, J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* **182**, 311-322, doi:10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9 (2000).
- 64 Gerdes, J., Schwab, U., Lemke, H. & Stein, H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* **31**, 13-20 (1983).
- 65 Reuschenbach, M., Seiz, M., von Knebel Doeberitz, C., Vinokurova, S., Duwe, A., Ridder, R., Sartor, H., Kommos, F., Schmidt, D. & von Knebel Doeberitz, M. Evaluation of cervical cone biopsies for coexpression of p16INK4a and Ki-67 in epithelial cells. *Int J Cancer* **130**, 388-394, doi:10.1002/ijc.26017 (2012).
- 66 Romanowski, P. & Madine, M. A. Mechanisms restricting DNA replication to once per cell cycle: the role of Cdc6p and ORC. *Trends Cell Biol* **7**, 9-10, doi:10.1016/S0962-8924(97)30077-4 (1997).
- 67 Williams, G. H., Romanowski, P., Morris, L., Madine, M., Mills, A. D., Stoeber, K., Marr, J., Laskey, R. A. & Coleman, N. Improved cervical smear assessment using antibodies against proteins that regulate DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14932-14937 (1998).
- 68 Freeman, A., Morris, L. S., Mills, A. D., Stoeber, K., Laskey, R. A., Williams, G. H. & Coleman, N. Minichromosome maintenance proteins as biological markers of dysplasia and malignancy. *Clin Cancer Res* **5**, 2121-2132 (1999).
- 69 Wang, Y. F., Lang, H. Y., Yuan, J., Wang, J., Wang, R., Zhang, X. H., Zhang, J., Zhao, T., Li, Y. R., Liu, J. Y., Zeng, L. H. & Guo, G. Z. Overexpression of keratin 17 is associated with poor prognosis in epithelial ovarian cancer. *Tumour Biol* **34**, 1685-1689, doi:10.1007/s13277-013-0703-5 (2013).
- 70 Ide, M., Kato, T., Ogata, K., Mochiki, E., Kuwano, H. & Oyama, T. Keratin 17 expression correlates with tumor progression and poor prognosis in gastric adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* **19**, 3506-3514, doi:10.1245/s10434-012-2437-9 (2012).
- 71 van de Rijn, M., Perou, C. M., Tibshirani, R., Haas, P., Kallioniemi, O., Kononen, J., Torhorst, J., Sauter, G., Zuber, M., Kochli, O. R., Mross, F., Dieterich, H., Seitz, R., Ross, D., Botstein, D. & Brown, P. Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. *Am J Pathol* **161**, 1991-1996, doi:10.1016/S0002-9440(10)64476-8 (2002).
- 72 Escobar-Hoyos, L. F., Shah, R., Roa-Pena, L., Vanner, E. A., Najafian, N., Banach, A., Nielsen, E., Al-Khalil, R., Akalin, A., Talmage, D. & Shroyer, K. R. Keratin-17 Promotes p27KIP1 Nuclear Export and Degradation and Offers Potential Prognostic Utility. *Cancer Res* **75**, 3650-3662, doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-0293 (2015).
- 73 Kamura, T., Hara, T., Matsumoto, M., Ishida, N., Okumura, F., Hatakeyama, S., Yoshida, M., Nakayama, K. & Nakayama, K. I. Cytoplasmic ubiquitin ligase KPC regulates proteolysis of p27(Kip1) at G1 phase. *Nat Cell Biol* **6**, 1229-1235, doi:10.1038/ncb1194 (2004).
- 74 Escobar-Hoyos, L. F., Yang, J., Zhu, J., Cavallo, J. A., Zhai, H., Burke, S., Koller, A., Chen, E. I. & Shroyer, K. R. Keratin 17 in premalignant and malignant squamous lesions of the cervix: proteomic discovery and immunohistochemical validation as a diagnostic and prognostic biomarker. *Mod Pathol* **27**, 621-630, doi:10.1038/modpathol.2013.166 (2014).

- 75 Norris, A. M., Gore, A., Balboni, A., Young, A., Longnecker, D. S. & Korc, M. AGR2 is a SMAD4-suppressible gene that modulates MUC1 levels and promotes the initiation and progression of pancreatic intraepithelial neoplasia. *Oncogene* **32**, 3867-3876, doi:10.1038/onc.2012.394 (2013).
- 76 Tugues, S., Honjo, S., Konig, C., Padhan, N., Kroon, J., Gualandi, L., Li, X., Barkefors, I., Thijssen, V. L., Griffioen, A. W. & Claesson-Welsh, L. Tetraspanin CD63 promotes vascular endothelial growth factor receptor 2-beta1 integrin complex formation, thereby regulating activation and downstream signaling in endothelial cells in vitro and in vivo. *J Biol Chem* **288**, 19060-19071, doi:10.1074/jbc.M113.468199 (2013).
- 77 Sinclair, A. H., Berta, P., Palmer, M. S., Hawkins, J. R., Griffiths, B. L., Smith, M. J., Foster, J. W., Frischauf, A. M., Lovell-Badge, R. & Goodfellow, P. N. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* **346**, 240-244, doi:10.1038/346240a0 (1990).
- 78 Chen, Y., Shi, L., Zhang, L., Li, R., Liang, J., Yu, W., Sun, L., Yang, X., Wang, Y., Zhang, Y. & Shang, Y. The molecular mechanism governing the oncogenic potential of SOX2 in breast cancer. *J Biol Chem* **283**, 17969-17978, doi:10.1074/jbc.M802917200 (2008).
- 79 Ji, J. & Zheng, P. S. Expression of Sox2 in human cervical carcinogenesis. *Hum Pathol* **41**, 1438-1447, doi:10.1016/j.humpath.2009.11.021 (2010).
- 80 Alison, M. R., Guppy, N. J., Lim, S. M. & Nicholson, L. J. Finding cancer stem cells: are aldehyde dehydrogenases fit for purpose? *J Pathol* **222**, 335-344, doi:10.1002/path.2772 (2010).
- 81 Dolle, L., Boulter, L., Leclercq, I. A. & van Grunsven, L. A. Next generation of ALDH substrates and their potential to study maturational lineage biology in stem and progenitor cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **308**, G573-578, doi:10.1152/ajpgi.00420.2014 (2015).
- 82 Athanasoula, K., Gogas, H., Polonifi, K., Vaiopoulos, A. G., Polyzos, A. & Mantzourani, M. Survivin beyond physiology: orchestration of multistep carcinogenesis and therapeutic potentials. *Cancer Lett* **347**, 175-182, doi:10.1016/j.canlet.2014.02.014 (2014).
- 83 Nigam, J., Chandra, A., Kazmi, H. R., Parmar, D., Singh, D. & Gupta, V. Prognostic significance of survivin in resected gallbladder cancer. *J Surg Res* **194**, 57-62, doi:10.1016/j.jss.2014.07.054 (2015).
- 84 Liu, H. Q., Wang, Y. H., Wang, L. L. & Hao, M. P16INK4A and survivin: Diagnostic and prognostic markers in cervical intraepithelial neoplasia and cervical squamous cell carcinoma. *Exp Mol Pathol* **99**, 44-49, doi:10.1016/j.yexmp.2015.04.004 (2015).
- 85 Agorastos, T., Koutkias, V., Falelakis, M., Lekka, I., Mikos, T., Delopoulos, A., Mitkas, P. A., Tantsis, A., Weyers, S., Coorevits, P., Kaufmann, A. M., Kurzeja, R. & Maglaveras, N. Semantic integration of cervical cancer data repositories to facilitate multicenter association studies: the ASSIST approach. *Cancer Inform* **8**, 31-44 (2009).
- 86 Steinau, M., Rajeevan, M. S. & Unger, E. R. DNA and RNA references for qRT-PCR assays in exfoliated cervical cells. *J Mol Diagn* **8**, 113-118, doi:10.2353/jmoldx.2006.050088 (2006).
- 87 van den Brule, A. J., Pol, R., Fransen-Daalmeijer, N., Schouls, L. M., Meijer, C. J. & Snijders, P. J. GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. *J Clin Microbiol* **40**, 779-787 (2002).
- 88 Schmitt, M., Dondog, B., Waterboer, T. & Pawlita, M. Homogeneous amplification of genital human alpha papillomaviruses by PCR using novel broad-spectrum GP5+

-
- and GP6+ primers. *J Clin Microbiol* **46**, 1050-1059, doi:10.1128/JCM.02227-07 (2008).
- 89 de Thurah, L., Bonde, J., Lam, J. U. H. & Rebolj, M. Concordant testing results between various human papillomavirus assays in primary cervical cancer screening: systematic review. *Clin Microbiol Infect*, doi:10.1016/j.cmi.2017.05.020 (2017).
- 90 Buckley, C. H., Butler, E. B. & Fox, H. Cervical intraepithelial neoplasia. *J Clin Pathol* **35**, 1-13 (1982).
- 91 Stoler, M. H., Schiffman, M. & Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance-Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study, G. Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study. *JAMA* **285**, 1500-1505 (2001).
- 92 McCredie, M. R., Sharples, K. J., Paul, C., Baranyai, J., Medley, G., Jones, R. W. & Skegg, D. C. Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: a retrospective cohort study. *Lancet Oncol* **9**, 425-434, doi:10.1016/S1470-2045(08)70103-7 (2008).

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema der Organisation des HPV16-Genomes. <i>Quelle: modifiziert nach Pfister, 2012⁴</i>	8
Abbildung 2: Stadien der HPV-Infektion. Physiologisches Epithel (blau, infizierte Zellen der permissiven Phase (violett), transformierte Zellen assoziiert mit aufgehobener Onkogenkontrolle durch E2 und Überexpression von E6/7 (rot). <i>Quelle: modifiziert nach Nature Reviews Cancer: Vol.7: 11-22 (Januar 2007)¹⁰</i>	10
Abbildung 3: Schema der synergistischen Wirkung der Onkogene E5, E6 und E7. <i>Quelle: modifiziert nach Nature Review Cancer, Vol. 10 S.554, August 2010²⁹</i> ...	12
Abbildung 4: Altersabhängige Prävalenz des HPV in Europa (95%KI) bei Frauen mit unauffälliger Zytologie. <i>Quelle: Human Papillomavirus and Related Diseases in Europe. ICO Information Centre on HPV and Cancer; Summary Report 2015³⁵</i> ..	14
Abbildung 5: Übersicht der 10 häufigsten high risk HPV-Tyen bei verschiedenen Stadien der Dysplasie (Europa). Modifiziert nach: <i>Human Papillomavirus and Related Diseases in Europe. ICO Information Centre on HPV and Cancer; Summary Report 2015³⁵</i>	15
Abbildung 6: Altersstandardisierte Erkrankungsrate (durchgezogene rote Linie) und Sterberaten (gestrichelte rote Linie) des Zervixkarzinoms (ICD-10 C53), Deutschland 1999-2012, je 100.000 Frauen (Europastandard); <i>Quelle: Website: Zentrum für Krebsregisterdaten, Robert-Koch-Institut³⁷</i>	15
Abbildung 7: Zervikaler Abstrich in HE-Färbung mit Koilozyten (gelbe Pfeile in a) und dyskaryotischen Zellen entsprechend einer CIN3 (gelbe Pfeile in b). <i>Quelle: Schneider, A: Primäre, sekundäre und tertiäre Prävention des Zervixkarzinoms, Endopress 2015⁴⁰</i>	17
Abbildung 8: Kaplan-Meier-Kurve der kumulativen Inzidenz von CIN3+ pro 10.000 Frauen in Abhängigkeit von der Testart des Screenings zum Zeitpunkt 0 (in Monaten). <i>Quelle: Dillner et al. 2008⁴⁷</i>	23
Abbildung 9: Kaplan-Meier-Kurve der kumulativen Inzidenz von CIN3+ pro 10.000 Frauen in Abhängigkeit von der Kombination der Ergebnisse von Zytologie und HPV-Test zum Zeitpunkt 0 (in Monaten). <i>Quelle: Dillner et al. 2008⁴⁷</i>	24
Abbildung 10: Vergleich der Sensitivität und Spezifität verschiedener HPV-Assays. <i>Quelle: Szarewski, 2008⁴⁹</i>	25
Abbildung 11: Genomstruktur des HPV16 und Transkripte; Promotoren (P) und ORF (Kästen) sind schematische gezeigt. <i>Quelle: Schmitt et al. 2010⁵²</i>	28
Abbildung 12: Funktionsprinzip des QuantiGene® 2.0 Plex Assays. <i>Quelle: QuantiGene® 2.0 User Manual, S.2, Bioscience</i>	39
Abbildung 13: Korrelation der Expression von ACTB und HPRT über verschiedene Stadien der zervikalen Dysplasie, lineare Trendlinie eingezeichnet (schwarz); stark abweichende Fälle rot umkreist	47
Abbildung 14: Syntax der logistischen Regression für die Schwelle 0123_45, SPSS (Version IBM® SPSS® Statistics 25.0)	53
Abbildung 15: Syntax für die Berechnung des Risikoscores für die Schwelle 0123_45, SPSS (Version: IBM® SPSS® Statistics 25.0)	55
Abbildung 16: Mediane der Messergebnisse des Stärksten HPV (E7-Expression des führenden HPV-Typs) über die klinischen Gruppen	57
Abbildung 17: ROC-Analysen der zellulären und viralen Marker (gruppiert) für die Schwelle 0123_45	62

Abbildung 18: ROC-Analysen der zellulären und viralen Marker (gruppiert) für die Schwelle 01234_5.....	66
Abbildung 19: ROC-Analysen der zellulären und viralen	70
Abbildung 20: ROC-Kurve für die Schwelle <CIN3/CIN3+ für die bestmögliche Kombination an Marker-Trennwerten. Verwendete Marker: StärksterHPV, E7 von HPV16, ALDH1A1, MCM2	74
Abbildung 21: ROC-Kurve für die Schwelle 01234_5 für die bestmögliche Kombination an Marker-Trennwerten. Verwendete Marker: StärksterHPV, E6, KRT17 und STMN1. AUC: 0,913	77
Abbildung 22: ROC-Kurve für die Schwelle 012_345 für die bestmögliche Kombination an Marker-Trennwerten. Verwendete Marker: StärksterHPV low (0,01 rel. MFI), StärksterHPV mid (11,11 rel. MFI), HPV16E7, BIRC5. AUC: 0,927	81
Abbildung 23: Graphische Darstellung der Anwendung der Risikoscores; Werte sind relativiert auf die Trennwerte der Risikoscores; Ebene der Trennwerte (=1) als rot gestrichelte Linie hervorgehoben	85
Abbildung 24: Darstellung der Anwendung der Risikoscores; Werte sind berechnet als 1 = Ergebnis liegt oberhalb des Trennwertes, 0 = Ergebnis liegt unterhalb des Trennwertes.....	85
Abbildung 25: Korrelation der Detektion der mRNA für die HPV16-Onkoproteine E6*1 und E7	86
Abbildung 26: Korrelation der Expression der HPV16 Splice-Produkte E1C und E1_4	87
Abbildung 27: ROC-Kurven der der Splice-Marker und des Markers HPV16 E7 für die Schwelle 0123_45	88
Abbildung 28: Histologische Schnitte der Zervix mit Stathmin-Färbung im Vergleich zu den Messergebnissen für Stathmin1 (QuantiGene® 2.0 Assay) derselben Läsion. Quelle der histologischen Schnitte und Fotos: Prof. A. Schneider, MVZ im Fürstenberg Karee Berlin.....	95
Abbildung 29: ROC-Kurven/AUCs der einzelnen Marker im Vergleich zu der ROC-Kurve/AUC des Risikoscores; Schwelle 0123_45.....	96
Abbildung 30: Vergleich verschiedener HPV-Test anhand von Sensitivität/Spezifität. Roter Stern: Visualisierung des Ergebnisses des Quantigene ® 2.0 Assays (Schwelle 0123_45). Grüner Kasten: ideale Platzierung eines Screening-Tests. Quelle: modifiziert nach: Szarewski A, et al. ⁴⁹	97

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über verfügbare Impfstoffe gegen das HPV	16
Tabelle 2: Klassifikationssystem der Ergebnisse der Pap-Tests gemäß der 3.Auflage der Münchener Nomenklatur. Quelle: Dtsch Arztebl 2014 ⁴²	18
Tabelle 3: Übersicht über die diagnostischen Kriterien der Transformationszone in der Kolposkopie	19
Tabelle 4: Übersicht über eine Auswahl an häufig verwendeten HPV-Tests.....	21
Tabelle 5: Vergleich zwischen HPV-Test (Hybrid Capture II) und Zytologie. Quelle: Cuzick J et al. 2006 ⁴⁶	22
Tabelle 6: Vergleich verschiedener Studien: Sensitivität CIN3+/CIN2+ zwischen HPV-Tests und Zytologie, aufgeteilt nach Altersgruppen der Patientinnen. Quelle: Cuzick J et al.; 2006 ⁴⁶	23
Tabelle 7: Vergleich der Positivität für die Marker Stathmin-1 und p16 in immunhistochemischen Färbungen. Quelle: modifiziert nach Howitt et al., 2013 ..	30
Tabelle 8: Häufigkeit der Ki-67-Proteinexpression in zervikalen Läsionen; aufgeteilt in schwach positiv (0-30% der Zellen) und stark positiv (70-100%). Quelle: modifiziert nach Reuschenbach et al. 2012 ⁶⁵	31
Tabelle 9: Marker des spezifischen Expressionsprofils der zervikalen Junktionszellen	33
Tabelle 10: Korrelation der Positivität von Survivin und p16 in immunhistochemischen Färbungen von Zervixkarzinomen. Quelle: Liu et al. 2015 ⁸⁴	35
Tabelle 11: Übersicht über gemessene und in die Analyse eingeschlossene Proben.	36
Tabelle 12: Übersicht über die Einteilung in klinische Gruppen	37
Tabelle 13: Auflistung der Reagenzien des QuantiGene ® 2.0 Plex Assays	39
Tabelle 14: Auflistung der Reagenzien für das Luminex Durchflusszytometer.....	40
Tabelle 15: Auflistung der verwendeten Geräte und Materialien.....	40
Tabelle 16: Ansatz des Working Bead Mix.....	41
Tabelle 17: Benötigte Reagenzien für den zweiten Abschnitt des QuantiGene ® Plex Assays	42
Tabelle 18: Herstellung des Waschpuffers.....	42
Tabelle 19: Konzentrationen der Capture Beads (CB) über verschiedene Titrationsschritte	45
Tabelle 20: Auflistung der verwendeten Chargen an Capture Beads.....	46
Tabelle 21: Titration von Housekeeping-mRNA für ACTB und HPRT (in MFI gemessen); Titration in 1:10 Verdünnung von konzentrierter mRNA.....	48
Tabelle 22: Auffälligkeiten der Abstriche im Zusammenhang mit der gemessenen Anzahl an Capture Beads.....	48
Tabelle 23: Materialien der GP 5+/6+ - PCR.....	49
Tabelle 24: Auflistung der verwendeten Primer für die HS GP-PCR (Bioline). Quelle: Schmitt et al., 2008 ⁸⁸	50
Tabelle 25: Vergleich der relativierten MFI-Werte des Markers Stathmin-1 für zwei klinische Gruppen	51
Tabelle 26: "Klassifizierungstabelle", ein Teilergebnis der logistischen Regression für die Schwelle 0123_45.....	54
Tabelle 27: Teilergebnis der logistischen Regression für die Schwelle 0123_45.....	54
Tabelle 28: Die QuantiGene®-HPV-Genotypisierung im Vergleich zur Referenzmethode GP5+/6+ - MPG.....	57
Tabelle 29: Rangkorrelation nach Kendall T für den klinischen Score und die 19 Biomarker.	58

Tabelle 30: Korrelation nach Spearman; gelbe Markierung: Marker, welche signifikant mit dem klinischen Score korrelieren. Sig. = Signifikanz, Korr.koef. = Korrelationskoeffizient *Signifikanzniveau <0,05 **Signifikanzniveau <0,01.....	60
Tabelle 31: Übersicht der Area under the Curve (AUCs) der ROC-Analysen für die Schwelle 0123_45; sortiert nach Größe, absteigend	63
Tabelle 32: Auswahl an aussagekräftigen Trennwerten für die Schwelle 0123_45;.....	64
Tabelle 33: „Areas under the Curve“ (AUCs) der einzelnen Marker für die Schwelle 01234_5. Sortiert nach Größe, absteigend	67
Tabelle 34: Auswahl an aussagekräftigen Trennwerten für die Schwelle 01234_5:.....	68
Tabelle 35: Areas under the Curve (AUCs) der einzelnen Marker für die Schwelle 012_345. Sortiert nach Größe, absteigend	70
Tabelle 36: Auswahl an aussagekräftigen Trennwerten für die Schwelle 012_345.....	71
Tabelle 37: Kodierung kategorialer Variablen, logistische Regression der Schwelle 0123_45.....	72
Tabelle 38: SPSS-Ausgabe der Zusammenfassung der Fallverarbeitung, logistische Regression der Schwelle 0123_45	73
Tabelle 39: SPSS-Ausgabe der Schritte und einbezogenen Variablen der Regression der Schwelle 0123_45	73
Tabelle 40: Koordinaten der ROC-Kurve für 0123_45: potentielle Trennwerte des Risikoscores 2	74
Tabelle 41: Zusammenfassung der Fallverarbeitung (SPSS-Ausgabe), logistische Regression der Schwelle 01234_5	75
Tabelle 42: Schwellenwerte der Schwelle 01234_5	75
Tabelle 43: SPSS-Ausgabe der Klassifizierungstabelle der einzelnen Schritte der Regression, Schwelle 1234_5.	76
Tabelle 44: SPSS-Ausgabe der Schritte und Variablen der logistischen Regression; Schwelle 01234_5	76
Tabelle 45: Koordinaten der ROC-Kurve der Schwelle 01234_5	78
Tabelle 46: Schwellenwerte der Schwelle 012_345	79
Tabelle 47: Fallverarbeitung für die Schwelle 012_345 (SPSS-Ausgabe).....	79
Tabelle 48: SPSS-Ausgabe der Klassifizierungstabelle der einzelnen Schritte der Regression, Schwelle 012_345.	79
Tabelle 49: SPSS-Ausgabe der Schritte und Variablen der logistischen Regression; Schwelle 012_345	80
Tabelle 50: Koordinaten der ROC-Kurve der Schwelle 012_345	81
Tabelle 51: Benötigte Trennwerte des Risikoscores 01234_5 und Messergebnisse für die Zelllinie CaSki	83
Tabelle 52: Anwendung der Risikoscores auf Proben verschiedener Krankheitsstadien. Werte angegeben in Prozent des Risikoscore-Trennwerts	84
Tabelle 53: Anzahl der HPV16 positiven Proben pro klinische Gruppe.....	86
Tabelle 54: „Area under the Curve“ (AUC) der drei Splice-Marker und HPV16 E7 für die Schwelle 0123_45	88
Tabelle 55: aussagekräftigste potentielle Trennwerte der Splice Marker und E7 für die Schwelle 0123_45	89
Tabelle 56: Anwendung des Risikoscores 0123_45 auf ein Probenkollektiv mit Diagnose einer CIN3 vor und nach Therapie durch Konisation. V1= vor Therapie, V2 = 3 Monate nach Therapie, V3 = 6 Monate nach Therapie	90
Tabelle 57: Übersicht über die Kategorie "falsch positiv": Ausschnitt der Messergebnisse (rel.MFI) und errechneter Risikoscore.....	91

Tabelle 58: Übersicht über die Kategorie "falsch negativ" (Proben der Gruppe V1, die über die Marker-Analyse als <CIN3 eingestuft werden): Ausschnitt der Messergebnisse (rel. MFI) und errechneter Risikoscore..... 91

Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Nora Franziska Nevermann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Von Morphologie zu Molekularbiologie: Charakterisierung HPV-induzierter zervikaler Läsionen auf der Basis einer quantitativen, mRNA-basierten Messung zellulärer und viraler Biomarker – Ein diagnostischer Paradigmenwechsel?“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

Von ganzem Herzen danke ich dem Betreuer dieser Promotion, PD Dr. Andreas Kaufmann, für seine Arbeit als Doktorvater. Dieses Projekt stellt für mich den Einstieg in wissenschaftliche Arbeit dar. Es ist wohl selten, eine fachlich so hoch qualifizierte, motivierende und zugleich wertschätzende und stets freundliche Betreuung zu erhalten. Ich wünsche mir, dass mich die wissenschaftliche Arbeit mit dieser Basis nun meinen ganzen professionellen Weg über begleitet.

Ein großer Dank geht an Dana Schiller, die mir stets mit ihrer ganzen Kompetenz und Herzlichkeit zur Hilfe stand. Ich danke von ganzem Herzen Amrei Krings dafür, dass sie mir eine Ansprechpartnerin für jede Frage und vor allem ein Vorbild war für den Einstieg in wissenschaftliche Praxis.

Ich danke Herrn Professor Achim Schneider und dem ganzen Team des MVZs im Fürstenberg Karree für die freundliche und konstruktive Zusammenarbeit. Für die statistischen Erklärungen und die Beratung danke ich Herrn Dr. Rolf Richter.

Ich danke der Friedrich-Ebert-Stiftung für die studienbegleitende Finanzierung und insbesondere für die Finanzierung der Konferenzen, an denen ich im Rahmen dieses Projektes teilnehmen durfte.

Ich danke meinen Eltern und meinen Freunden für ihre unterstützende Hilfe als anregende Diskussionspartner, Korrekturleser und liebende Begleiter.