

Aus der Klinik für Gynäkologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**mRNA-basierte Quantifizierung von Biomarkern zur Diagnostik von
zervikalen intraepithelialen Neoplasien und von Zervixkarzinomen:
Validierung des QuantiGene® 2.0 Plex Assays**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Mirka Basten
aus Kiel

Datum der Promotion: 23.06.2019

„Wenn wir wüssten, was wir tun,
würde man es nicht Forschung nennen.“

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
Formelverzeichnis	VIII
Zusammenfassung	1
Abstract	2
1 Einleitung	3
1.1 Humanes Papillomvirus (HPV)	4
1.2 Entstehung des Zervixkarzinoms und seiner Vorstufen	6
1.2.1 Rolle der persistierenden Infektion mit humanen Papillomviren.....	6
1.2.2 Karzinogenese	7
1.3 Prävention des Zervixkarzinoms	9
1.3.1 Primärprävention: Impfung	9
1.3.2 Sekundärprävention: Screening.....	9
1.4 Biomarker des Zervixkarzinoms und seiner Vorstufen	14
1.4.1 Virale Onkoproteine und Splicemarker.....	14
1.4.2 Marker der „squamocolumnar junction zone“	15
1.4.3 Proliferationsmarker.....	15
1.4.4 Tumorsuppressoren	15
1.4.5 Zelluläre Onkoproteine und Stammzellmarker	16
1.4.6 Marker der Zellularität	17
2 Fragestellung	18
3 Material und Methoden	20
3.1 Studienpopulation	20
3.1.1 Rekrutierung	20
3.1.2 Klinische Daten	21
3.1.3 Proben.....	22
3.2 QuantiGene® 2.0 Plex Assay	23
3.2.1 Durchführung	24

3.2.2	Reagenzien, Materialien und Geräte	28
3.3	Statistische Analyse	30
4	Ergebnisse	35
4.1	Beschreibung der Studienpopulation	35
4.2	HPV-Diagnostik mittels QuantiGene®	40
4.2.1	Definition der Cutoff-Werte	40
4.2.2	Übereinstimmung mit Multiplex Genotyping und BD Onclarity™	41
4.2.3	Klinische Aussagekraft der HPV-Diagnostik	42
4.3	Dysplasiediagnostik mittels QuantiGene®	44
4.3.1	Korrelation der Biomarkerexpression mit den Krankheitsstadien	46
4.3.2	Modellentwicklung der Risikoscores für die Krankheitsstadien.....	46
4.3.3	Confounder der Biomarkerexpression	57
4.3.4	Prognostische Aussagekraft	62
4.4	Methoden zur Diagnose von Zervixdysplasien im Vergleich	64
5	Diskussion	66
5.1	Hypothesenbezogene Ergebnisdiskussion	66
5.2	Interpretation	70
5.2.1	Vergleich mit den Ergebnissen der Pilotstudie und weiterer Studien	70
5.2.2	Vergleich des QuantiGenes® mit anderen Methoden	74
5.2.3	Biomarker im Pathogenese-konzept des Zervixkarzinoms und seiner Vorstufen....	75
5.3	Limitationen.....	77
5.4	Schlussfolgerung und Ausblick	79
	Literaturverzeichnis.....	80
	Eidesstattliche Versicherung.....	93
	Lebenslauf.....	94
	Danksagung.....	95

Abkürzungsverzeichnis

AGC	Atypical glandular cells
AGR2	Anterior Gradient 2
AIS	Adenocarcinoma in situ
ALDH	Aldehyd-Dehydrogenase
ARG2	Arginase 2
ASC-H	Atypical squamous cells of undetermined significance cannot exclude HSIL
ASC-US	Atypical squamous cells of undetermined significance
AUC	Area under the curve
BD	BD Onclarity™
bDNA	Branched DNA
CD63	Cluster Differentiation 63
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
CI	Konfidenzintervall
CIN	Zervikale intraepitheliale Neoplasie
CIN2+ bzw. CIN3+	CIN2–3 oder Zervixkarzinom bzw. CIN3 oder Zervixkarzinom
CxCa	Zervixkarzinom
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E2BS	E2 binding site
E6AP	E6-assoziiertes Protein
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
GDA	Guanin-Desaminase
GP	General primer
HPV	Humanes Papillomvirus
hrHPV	High-risk Humanes Papillomvirus
HSIL	High-grade squamous intraepithelial lesion
IHC	Immunhistochemie
IZC	Immunzytochemie
KRT	Keratin
LCR	Long control region
ln	Natürlicher Logarithmus
lrHPV	Low-risk Humanes Papillomvirus
LSIL	Low-grade squamous intraepithelial lesion
MCM2	Minichromosome Maintenance Protein 2
MFI	Mean fluorescence intensity
MHC	Major Histocompatibility Complex
MMP7	Matrix-Metalloprotease 7
MPG	Multiplex Genotyping
mRNA	Messenger RNA
MVZ	Medizinisches Versorgungszentrum

n	Anzahl
N/A	Nicht verfügbar
NILM	Negative for intraepithelial lesion or malignancy
NOS	Not otherwise specified
OR	Odds Ratio
PCR	Polymerasekettenreaktion
PIPAVIR	Persistent infections with human papillomaviruses (Studie)
QG	QuantiGene [®] 2.0 Plex Assay
qRT-PCR	Quantitative real-time PCR
Rb	Retinoblastom-Protein
rMFI	relative MFI
RNA	Ribonukleinsäure
ROC	Receiver Operating Characteristic
rpm	Revolutions per minute
SAPE	Streptavidin-conjugated Phycoerythrin
Sens.	Sensitivität
Spez.	Spezifität
SCJ	Squamocolumnar junction
TERT	Telomerase Reverse Transkriptase
Topo2 α	Topoisomerase 2 α
V. a.	Verdacht auf
VALGENT	Validation of HPV Genotyping Tests (Studie)
VLP	Virus-like particle

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Geschätzte altersstandardisierte Mortalität des Zervixkarzinoms (pro 100.000 Frauen pro Jahr) im internationalen Vergleich.	3
Abbildung 2: Morphologie des humanen Papillomvirus (HPV). A) Elektronenmikroskopisch aufgenommene Papillomviren. B) Schematisch dargestelltes Episom von HPV 16 mit den <i>early</i> - (E1, E2, E4–7) und den <i>late</i> -Genen (L1, L2) und der <i>long control region</i> (LCR).....	4
Abbildung 3: Phasen der HPV-Infektion an der Transformationszone der Zervix.	6
Abbildung 4: HPV-Infektion mit ihren möglichen Folgen.....	7
Abbildung 5: Die wesentlichen Schritte der Entstehung des Zervixkarzinoms ausgehend von den HPV-Onkoproteinen E6 und E7.	8
Abbildung 6: Flowchart zur Rekrutierung der Studienteilnehmerinnen.....	21
Abbildung 7: Ablauf des QuantiGene® 2.0 Plex Assays.	27
Abbildung 8: Vierfeldertafel zur Berechnung von Sensitivität und Spezifität.	32
Abbildung 9: Mediane der Biomarkerexpression in verschiedenen Stadien der zervikalen intraepithelialen Neoplasie (CIN) und in Zervixkarzinomen bei A) hrHPV-positiven Frauen (n = 954) und bei B) HPV-16-positiven Frauen (n = 328).....	45
Abbildung 10: ROC-Kurven der Biomarker mit den höchsten AUC (<i>areas under the curve</i>) für die Krankheitsschwelle CIN2+ (n = 1135).	48
Abbildung 11: ROC-Kurve des Risikoscores für das Vorliegen einer CIN2+ nach Formel 2 (n = 1135).	50
Abbildung 12: ROC-Kurven der Biomarker mit den höchsten AUC (<i>areas under the curve</i>) für die Krankheitsschwelle CIN3+ (n = 1135).	51
Abbildung 13: ROC-Kurve des Risikoscores für das Vorliegen einer CIN3+ nach Formel 3 (n = 1135).	53
Abbildung 14: ROC-Kurven der Biomarker mit den höchsten AUC (<i>areas under the curve</i>) für die Krankheitsschwelle zum Zervixkarzinom (n = 1135).	55
Abbildung 15: ROC-Kurve des Risikoscores für das Vorliegen eines Zervixkarzinoms nach Formel 4 (n = 1135).	57
Abbildung 16: Boxplot der relativen <i>mean fluorescence intensity</i> (rMFI) von MMP7 bei Frauen, die im Follow-Up einen regredienten, einen persistenten oder einen progredienten Befund der zervikalen Dysplasie aufwiesen (n = 24).	63
Abbildung 17: Darstellung der Sensitivität und Spezifität verschiedener diagnostischer Methoden zur Detektion von A) CIN2+ und B) CIN3+.	65
Abbildung 18: Biomarkerexpression in der Pathogenese zervikaler Dysplasien und des Zervixkarzinoms.....	76

 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: HPV-Prävalenz in verschiedenen Karzinomen.	4
Tabelle 2: Definition zytologischer Befunde nach Münchener Nomenklatur III und Bethesda-System.	11
Tabelle 3: Eigenschaften einer Auswahl von nach Meijer-Kriterien oder VALGENT-Studienprotokoll validierten hrHPV-Tests.	12
Tabelle 4: Zusammensetzung der Diluted Working Lysis Mixture.	22
Tabelle 5: Targets des hier durchgeführten QuantiGene® 2.0 Plex Assays.	23
Tabelle 6: Zusammensetzung des Working Bead Mix.	24
Tabelle 7: Zusammensetzung des Waschpuffers.	24
Tabelle 8: Zusammensetzung des SAPE Working Mix.	26
Tabelle 9: Reagenzien in der Reihenfolge ihrer Verwendung.	28
Tabelle 10: Verwendete Verbrauchsmaterialien.	28
Tabelle 11: Verwendete Geräte.	29
Tabelle 12: Einteilung der klinischen Gruppen für die Auswertung der Dysplasiediagnostik. ...	30
Tabelle 13: Beschreibung der Studienpopulation eingeteilt nach histologischen Gruppen und insgesamt.	38
Tabelle 14: Klinische Cutoffs des QuantiGenes® für HPV-Positivität mit Sensitivität, Spezifität und Youden-Index im Vergleich zu den Ergebnissen des Multiplex Genotypings (n = 1403).	40
Tabelle 15: Konkordanz und Cohens Kappa (κ) der HPV-Diagnostik mittels QuantiGene® (QG), Multiplex Genotyping (MPG) und BD Onclarity™ (BD).	42
Tabelle 16: Sensitivität und Spezifität des QuantiGenes® (QG) mit verschiedenen Cutoffs, des Multiplex Genotypings (MPG) und des BD Onclarity™ (BD) für die Diagnose von CIN2+ und CIN3+.	43
Tabelle 17: Häufigkeiten der klinischen Gruppen in der untersuchten Studienpopulation.	44
Tabelle 18: Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman (r_s) für den Zusammenhang zwischen der Biomarkerexpression und den Krankheitsstadien (n = 1135).	46
Tabelle 19: AUC (<i>areas under the curve</i>) der ROC-Kurven aller Biomarker für die Krankheitsschwelle CIN2+ (n = 1135).	47
Tabelle 20: Cutoffs aus der ROC-Analyse mit zugehöriger Sensitivität und Spezifität und Ergebnis der logistischen Regression für die Krankheitsschwelle CIN2+ (n = 1135).	49
Tabelle 21: Ergebnis der ROC-Analyse des Risikoscores für das Vorliegen einer CIN2+ nach Formel 2 (n = 1135).	50
Tabelle 22: AUC (<i>areas under the curve</i>) der ROC-Kurven aller Biomarker für die Krankheitsschwelle CIN3+ (n = 1135).	51
Tabelle 23: Cutoffs aus der ROC-Analyse mit zugehöriger Sensitivität und Spezifität und Ergebnis der logistischen Regression für die Krankheitsschwelle CIN3+ (n = 1135).	52
Tabelle 24: Ergebnis der ROC-Analyse des Risikoscores für das Vorliegen einer CIN3+ nach Formel 3 (n = 1135).	53
Tabelle 25: AUC (<i>areas under the curve</i>) der ROC-Kurven aller Biomarker für die Krankheitsschwelle zum Zervixkarzinom (n = 1135).	54

Tabelle 26: Cutoffs aus der ROC-Analyse mit zugehöriger Sensitivität und Spezifität und Ergebnis der logistischen Regression für die Krankheitsschwelle zum Zervixkarzinom (n = 1135)..... 56

Tabelle 27: Ergebnis der ROC-Analyse des Risikoscores für das Vorliegen eines Zervixkarzinoms nach Formel 4 (n = 1135)..... 57

Tabelle 28: Korrelationskoeffizienten der bivariaten Korrelation nach Spearman (r_s) und der partiellen Korrelation (r_p) der Biomarker mit den Krankheitsstadien..... 59

Tabelle 29: Cutoffs aus der ROC-Analyse mit zugehöriger Sensitivität und Spezifität und Ergebnis der logistischen Regression für die Krankheitsschwelle CIN2+ unter Berücksichtigung der Confounder (n = 1135)..... 60

Tabelle 30: Cutoffs aus der ROC-Analyse mit zugehöriger Sensitivität und Spezifität und Ergebnis der logistischen Regression für die Krankheitsschwelle CIN3+ unter Berücksichtigung der Confounder (n = 1135)..... 61

Tabelle 31: Cutoffs aus der ROC-Analyse mit zugehöriger Sensitivität und Spezifität und Ergebnis der logistischen Regression für die Krankheitsschwelle zum Zervixkarzinom unter Berücksichtigung der Confounder (n = 1135)..... 62

Tabelle 32: Sensitivität und Spezifität verschiedener diagnostischer Methoden zur Detektion von CIN2+ und CIN3+..... 64

Formelverzeichnis

Formel 1: Grundmodell der Regressionsfunktion der multivariaten binären logistischen Regression zur Berechnung der Wahrscheinlichkeit für das Eintreten der abhängigen Variable y in Abhängigkeit von den unabhängigen Variable x_1 bis x_n	34
Formel 2: Risikoscore für das Vorliegen einer CIN2+.....	49
Formel 3: Risikoscore für das Vorliegen einer CIN3+.....	53
Formel 4: Risikoscore für das Vorliegen eines Zervixkarzinoms (CxCa).....	56

Zusammenfassung

Hintergrund: Das Zervixkarzinom stellt eine durch Humane Papillomviren (HPV) induzierte Neoplasie dar, die aus Präkanzerosen, den zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN), hervorgeht. Herkömmliche Screening-Methoden basieren auf wenig spezifischer HPV-Testung oder subjektiver und wenig sensitiver Zytologie.

Ziel: Das Ziel dieser Studie ist die Validierung des neuen, mRNA-basierten und quantitativen QuantiGene® 2.0 Plex Assays (QG) zur Diagnostik und zum Screening des Zervixkarzinoms und seiner Vorstufen.

Methoden: Die zervikalen Abstriche der flüssigkeitsbasierten Zytologie von 1438 Patientinnen einer Dysplasiesprechstunde wurden mittels QG analysiert. Dabei wurde die mRNA-Expression von 18 high-risk HPV-Typen und 23 Biomarkern quantifiziert. Auf Basis dieser Ergebnisse und der von Vergleichstests (Multiplex Genotyping, BD Onclarity™, Histologie) wurden mittels ROC-Analysen Cutoffs für die HPV-Diagnostik und mittels multivariater logistischer Regression Risikoscores für verschiedene Krankheitsschwellen (CIN2+, CIN3+, Zervixkarzinom) ermittelt.

Ergebnisse: Die HPV-Diagnostik mittels QG erreichte 77 % Konkordanz ($\kappa = 0,49$) mit Multiplex Genotyping und 80 % Konkordanz ($\kappa = 0,57$) mit BD Onclarity™. Sie erzielte 84 % bzw. 87 % Sensitivität und 53 % bzw. 40 % Spezifität für die Diagnose von CIN2+ bzw. CIN3+. Der Risikoscore für CIN2+ beinhaltete das E7 des führenden HPV, HPV 16 E6*I und E1^E4, p16 und Stathmin und erreichte 73 % Sensitivität und 78 % Spezifität. Der Risikoscore von CIN3+ (E7 des führenden HPV, HPV 16 E6*I und E1^E4, p16, MCM2) erzielte 82 % Sensitivität und 63 % Spezifität. Der Risikoscore für das Zervixkarzinom (E7 des führenden HPV, MCM2, BIRC5, ALDH1A1, TERT) erreichte 90 % Sensitivität und 80 % Spezifität.

Diskussion: Die Sensitivität der HPV-Diagnostik mittels QG für CIN ist bei vergleichbarer Spezifität 7–10 % geringer als die der Vergleichstests. Die Risikoscores erreichen eine höhere Sensitivität bei niedrigerer Spezifität als die Zytologie und eine höhere Spezifität bei niedrigerer Sensitivität als die HPV-Testung.

Schlussfolgerung: Der QG ist ein objektiver, quantitativer und mRNA-basierter Test, der HPV- und Dysplasiediagnostik und somit Screening und Triagierung von HPV-positiven Patientinnen kombiniert. Dadurch besitzt er das Potenzial, das Zervixkarzinom-Screening zuverlässiger, ökonomischer und effizienter zu gestalten.

Abstract

Background: Cervical cancer is a neoplasia induced by human papillomavirus (HPV) that develops from precancerous lesions called cervical intraepithelial neoplasia (CIN). Conventional screening methods are based on poorly specific HPV testing or on subjective and poorly sensitive cytology.

Objective: The aim of this study is the validation of the new, mRNA-based and quantitative QuantiGene[®] 2.0 Plex Assay (QG) for the diagnosis and screening of cervical cancer and its precursors.

Methods: The cervical smears of liquid-based cytology of 1438 patients from a specialized dysplasia clinic were analyzed by use of QG. The mRNA expression of 18 high-risk HPV types and 23 biomarkers was quantified. On the basis of these results and those of comparison tests (multiplex genotyping, BD Onclarity[™], histology) cutoffs for the HPV diagnosis were defined by ROC-analysis and riskscores for different thresholds of disease (CIN2+, CIN3+, cervical cancer) were identified by multivariate logistic regression.

Results: The HPV diagnosis by use of QG reached 77 % concordance ($\kappa = 0.49$) with multiplex genotyping and 80 % concordance ($\kappa = 0.57$) with BD Onclarity[™]. It attained 84 % and 87 % sensitivity and 53 % and 40 % specificity for the diagnosis of CIN2+ and CIN3+ respectively. The riskscore for CIN2+ included E7 of the strongest HPV, HPV 16 E6*I and E1[^]E4, p16 and stathmin and achieved 73 % sensitivity and 78 % specificity. The riskscore for CIN3+ (E7 of the strongest HPV, HPV 16 E6*I and E1[^]E4, p16, MCM2) reached 82 % sensitivity and 63 % specificity. The riskscore for cervical cancer (E7 of the strongest HPV, MCM2, BIRC5, ALDH1A1, TERT) achieved 90 % sensitivity and 80 % specificity.

Discussion: The HPV diagnosis by use of QG is comparably specific for CIN but 7–10 % less sensitive than the comparison tests. The riskscores reach a higher sensitivity and lower specificity than cytology and a higher specificity and lower sensitivity than HPV testing.

Conclusion: QG is an objective, quantitative and mRNA-based test that combines the diagnosis of HPV infections with that of cervical dysplasia and therefore combines screening and triage of HPV positive patients. As a consequence the QG has the potential to make cervical cancer screening more reliable, economic and efficient.

1 Einleitung

Die ersten Erkenntnisse zur Entstehung des Zervixkarzinoms lieferte im Jahr 1842 der italienische Chirurg und Epidemiologe Domenico Antonio Rigoni-Stern, als er entdeckte, dass zölibatär lebende Nonnen nur äußerst selten von der Erkrankung betroffen waren. In den 1980er Jahren wurde durch die Arbeiten von Harald zur Hausen endgültig bestätigt, dass das Zervixkarzinom durch die sexuell übertragbare Infektion mit humanen Papillomviren hervorgerufen wird. Dieses Wissen um den Zusammenhang zwischen Infektion und Karzinominduktion revolutionierte die Krebsforschung, sodass Harald zur Hausen hierfür im Jahr 2009 den Nobelpreis für Medizin verliehen bekam.¹

Die durch intensive Forschung erlangten Erkenntnisse und hierauf basierenden Präventionsprogramme bewirkten in den USA eine Abnahme der Mortalität des Zervixkarzinoms von 13,1/100.000 Frauen im Jahr 1950 auf 2,4/100.000 Frauen im Jahr 2007.²

Aktuell erkranken weltweit jedes Jahr schätzungsweise 530.000 Frauen an einem Zervixkarzinom, die Hälfte verstirbt daran. Dabei betreffen 85 % der Morbidität und Mortalität Frauen in Entwicklungsländern (**Abbildung 1**). Dort stellt das Zervixkarzinom das zweithäufigste (alterstandardisierte Inzidenz von 16/100.000 Frauen pro Jahr) und in Industrieländern das sechsthäufigste (10/100.000 Frauen pro Jahr) Karzinom der Frau dar.³

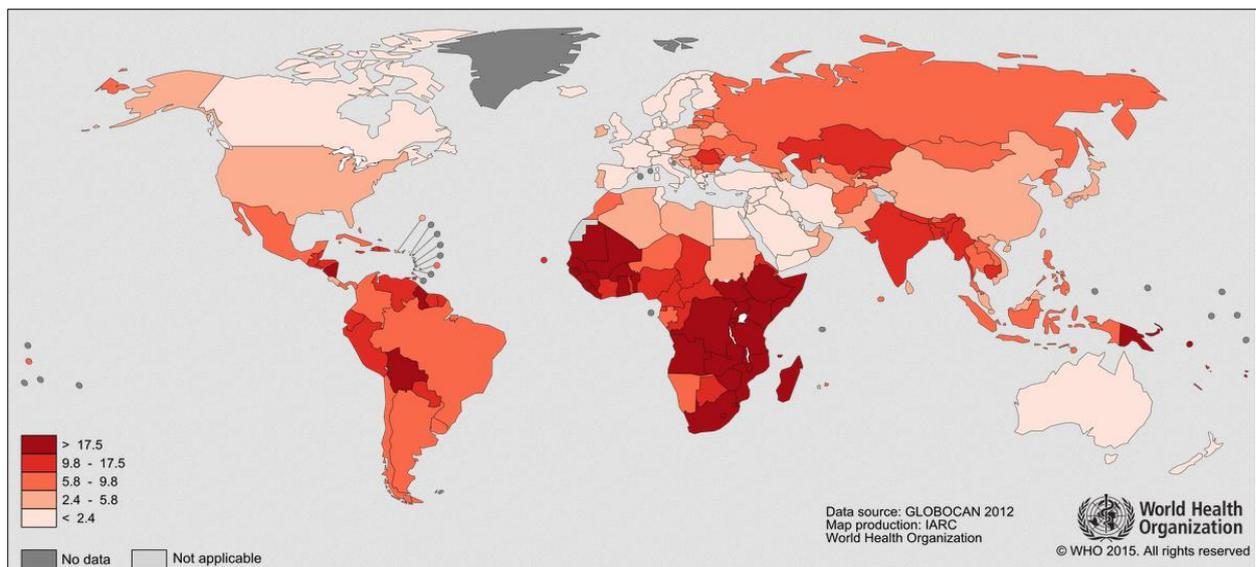


Abbildung 1: Geschätzte alterstandardisierte Mortalität des Zervixkarzinoms (pro 100.000 Frauen pro Jahr) im internationalen Vergleich. [Quelle: International Agency for Research on Cancer, 2012⁴]

1.1 Humanes Papillomvirus (HPV)

Das humane Papillomvirus (HPV) ist ein epitheliotropes, unbehülltes DNA-Virus aus der Familie der Papillomaviridae (**Abbildung 2A**).⁵ Ein Virion hat eine Größe von ungefähr 55 nm und besitzt eine zirkuläre Doppelstrang-DNA (Episom) aus ca. 8000 Basenpaaren. Das Episom enthält acht *open reading frames* (E1, E2, E4–7, L1, L2) und eine *long control region* (LCR) zur Steuerung der Transkription und Replikation (**Abbildung 2B**).⁶

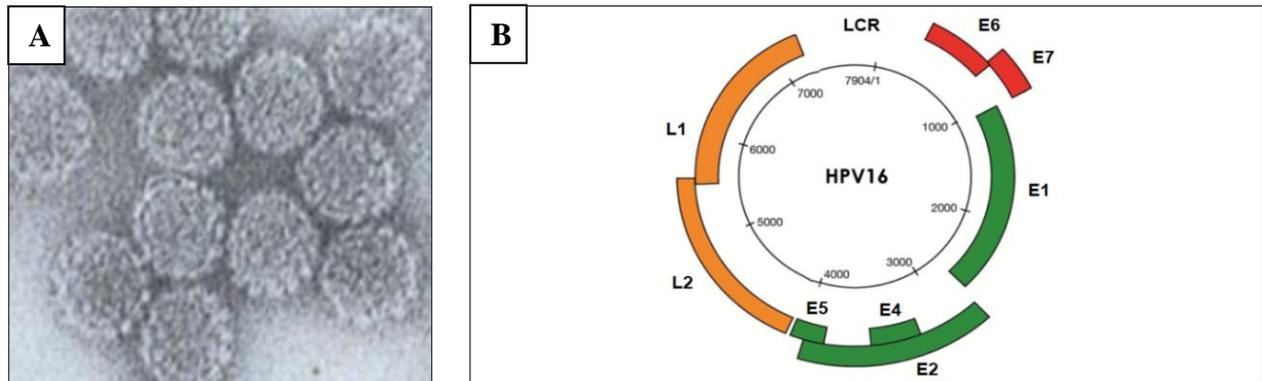


Abbildung 2: Morphologie des humanen Papillomvirus (HPV). **A)** Elektronenmikroskopisch aufgenommene Papillomviren. **B)** Schematisch dargestelltes Episom von HPV 16 mit den *early*- (E1, E2, E4–7) und den *late*-Genen (L1, L2) und der *long control region* (LCR). [Modifiziert nach Doorbar et al., 2015⁶]

Während viele HPV-Genotypen den Menschen als Kommensale besiedeln, rufen andere benigne und maligne Neoplasien hervor.^{5,7} Das hierfür besonders relevante Genus der Alpha-Papillomviren unterteilt sich in *low-risk* (lr) HPV (z. B. HPV 6 und 11) und *high-risk* (hr) HPV (z. B. HPV 16 und 18). Während lrHPV Genitalwarzen (*Condylomata acuminata*) auslösen, wurden hrHPV in Zusammenhang mit der Entstehung diverser anogenitaler und oropharyngealer Karzinome gebracht (**Tabelle 1**).⁶ In Zervixkarzinomen identifizierten Clifford et al. achtzehn verschiedene hrHPV-Genotypen, davon in 70 % der Fälle HPV 16 und 18 (erstes häufiger in Plattenepithel-, letzteres häufiger in Adenokarzinomen). Die Typen 45, 31, 33, 58 und 52 wurden in absteigender Häufigkeit in weiteren 20 % der Zervixkarzinome detektiert.⁸

Tabelle 1: HPV-Prävalenz in verschiedenen Karzinomen.

Karzinom	HPV-Prävalenz (%)	Studie
Zervixkarzinom	99,7	Walboomers et al., 1999 ⁹
	87,3 (Plattenepithelkarzinom)	Clifford et al., 2003 ⁸
	76,4 (Adenokarzinom)	Clifford et al., 2003 ⁸
Analkarzinom	88,3	Alemany et al., 2015 ¹⁰
Vaginalkarzinom	74,0	Alemany et al., 2014 ¹¹
Vulvakarzinom	39,7	Faber et al., 2017 ¹²
Peniskarzinom	33,1	Alemany et al., 2016 ¹³
Oropharynxkarzinom	24,9	Castellsagué et al., 2016 ¹⁴

Der virale Lebenszyklus

Bei einer Infektion mit HPV gelangt das Virus durch ein epitheliales Mikrotrauma zur Basalmembran, wo es über das Kapsid-Protein L1 an Heparansulfat-Proteoglykane bindet.^{15,16} Die hierdurch hervorgerufene Konformationsänderung des Kapsids ermöglicht die Furin-vermittelte Spaltung des L2-Proteins und so die Bindung an Rezeptoren basaler Keratinozyten, die im Rahmen der Wundheilung in die Läsion einwandern.¹⁷ Es folgt die Clathrin- oder Caveolae-vermittelte Endozytose des Virus und, ebenfalls L2-abhängig, die intrazelluläre Freisetzung des Episoms und der Transport zum Nukleus.¹⁸⁻²⁰ Die HPV-Infektion kann dann für lange Zeit latent persistieren oder in eine produktive oder transformierende Infektion übergehen (**Abbildung 3**).²¹

In der Latenzphase der Infektion etabliert das Virus in den basalen Keratinozyten eine niedrige Anzahl Genomkopien, indem es die zelluläre Replikation zur Amplifikation der Episome und die zelluläre Mitose zur Vermehrung der infizierten Basalzellen nutzt.^{22,23} Die Initiation der viralen Replikation erfolgt durch die Proteine E1, eine DNA-Helicase, und E2 als Transaktivator.^{24,25} E2 dient während der Mitose der infizierten Keratinozyten außerdem der Aufteilung der Episome auf die Tochterzellen und reguliert die Expression der potenziellen Onkogene E6 und E7.^{26,27}

Während die Keratinozyten physiologischerweise im Verlauf der Differenzierung und Migration an die Epitheloberfläche den Zellzyklus verlassen, hält das Virus in der produktiven Phase der Infektion durch die Expression von E6 und E7 die replikationsaktive S-Phase auch während der Differenzierung aufrecht.²⁸ Zusätzlich inhibiert E5 die Apoptose und fördert die Immunevasion, indem es den Transport von MHC-I an die Zelloberfläche und somit die Antigenpräsentation und T-Zell-Aktivierung stört.^{29,30} E4, das vorwiegend in seiner Splicevariante E1[^]E4 vorkommt, unterstützt die Virusamplifikation und -freisetzung in der späten produktiven Phase des viralen Lebenszyklus (siehe Kapitel 1.4.1).³¹⁻³³ Die Expression der späten Virusproteine L1 und L2 wird durch E2 hochreguliert.³⁴ Die produktive Phase des viralen Lebenszyklus wird mit der Desquamation des infizierten Keratinozyten abgeschlossen. Unter den hierbei herrschenden oxidativen Bedingungen setzen sich die L1-Proteine zu Kapsiden zusammen und bilden so neue Virionen, die freigesetzt werden.³⁵

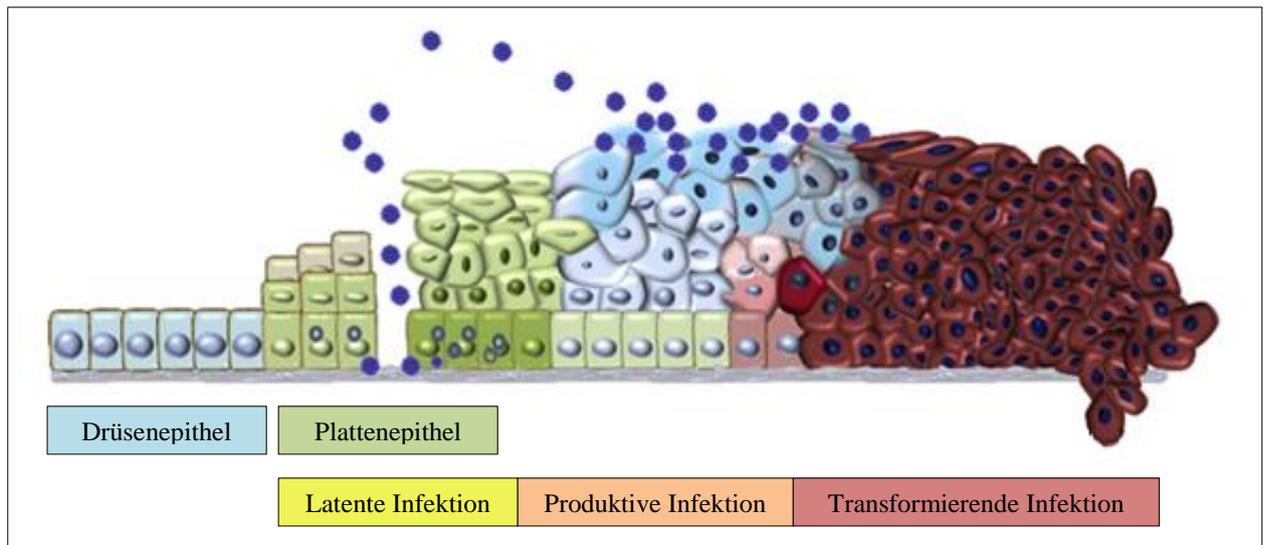


Abbildung 3: Phasen der HPV-Infektion an der Transformationszone der Zervix. [Modifiziert nach von Knebel Doeberitz et al., 2009²¹]

1.2 Entstehung des Zervixkarzinoms und seiner Vorstufen

1.2.1 Rolle der persistierenden Infektion mit humanen Papillomviren

Vorübergehende und klinisch inapparente Infektionen mit HPV treten bei jungen Frauen (< 30 Jahre) mit einer kumulativen Inzidenz von 43 % in 3 Jahren sehr häufig auf und heilen meist innerhalb weniger Monate aus (*clearance*).^{36,37} Die persistierende Infektion mit HPV hingegen stellt den schwerwiegendsten Risikofaktor für zervikale intraepitheliale Neoplasien (CIN), den Präkanzerosen des Zervixkarzinoms, dar. Dabei persistieren Infektionen mit den Typen 16, 31 und 33 am längsten (im Median länger als 12 Monate).³⁷ Die Wahrscheinlichkeit, in den nächsten 12 Jahren an einer CIN3+ (CIN3 oder Zervixkarzinom) zu erkranken, liegt bei positivem Befund für HPV 16 bei 25 % und für HPV 31 und 33 bei jeweils 15 %.³⁸ Bereits innerhalb von 3 Jahren führt eine Infektion mit HPV 16 oder 18 in 20 % der Fälle zu einer CIN2 und in 7 % der Fälle sogar zu einer CIN3.³⁹

Da die HPV-Prävalenz in Zervixkarzinomen bei fast 100 % liegt, jedoch nur ein Bruchteil aller HPV-Infektionen zu Dysplasien führt, lässt sich schlussfolgern, dass die HPV-Infektion zwar eine notwendige aber keine hinreichende Voraussetzung für die Karzinogenese darstellt (**Abbildung 4**).^{9,38}

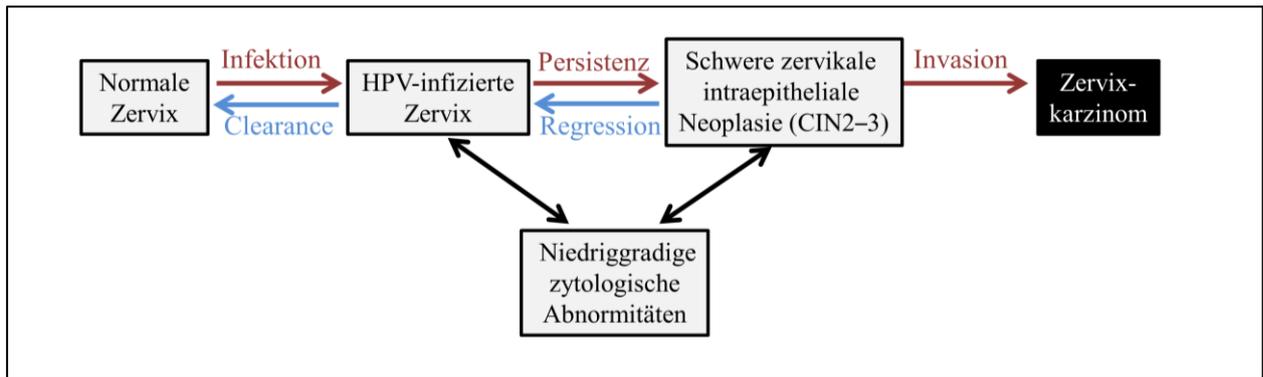


Abbildung 4: HPV-Infektion mit ihren möglichen Folgen. [Modifiziert nach Moscicki et al., 2006⁴⁰]

1.2.2 Karzinogenese

Im Folgenden sind die wichtigsten Schritte der Entstehung des Zervixkarzinoms beschrieben, die fundamental von den viralen Proteinen E6 und E7 beeinflusst werden (**Abbildung 5**). Diese dienen dem Virus zu seiner Replikation und greifen hierfür auf vielfältige Weise in die Zellzyklus- und Apoptoseregulation der Keratinozyten ein. Da hierdurch eine maligne Transformation ausgelöst werden kann, werden E6 und E7 auch als Onkoproteine bezeichnet.⁴¹

E7 überführt den Zellzyklus in die replikationsaktive S-Phase, indem es den hierfür benötigten Transkriptionsfaktor E2F direkt und indirekt aktiviert.⁴² E2F liegt im inaktiven Stadium gebunden an das Retinoblastom-Protein (Rb) vor. Durch die Bindung von E7 an Rb wird E2F freigesetzt und so in sein aktives Stadium überführt.^{43,44} Außerdem interagiert E7 mit dem Tumorsuppressor p21, der dadurch nicht mehr seine inhibitorische Wirkung auf die Cyclin-abhängige Kinase 2 (CDK2), ein weiteres wichtiges Enzym für den Übergang in die S-Phase, ausüben kann.⁴⁵ Die physiologische Reaktion der Zelle auf einen derartigen Kontrollverlust über die Zellzyklusregulation besteht in der p53-vermittelten Apoptose.⁴⁶ Diese wird jedoch durch E6 verhindert, indem p53 über eine Aktivierung der Ubiquitin-Ligase E6AP (E6-assoziiertes Protein) für die Degradation durch das Ubiquitin-Proteasom-System markiert wird.⁴⁷ Durch E6AP-vermittelte Ubiquitinierung werden außerdem Transkriptionsrepressoren der Telomerase Reverse Transkriptase (TERT) degradiert.⁴⁸ Diese Disinhibition der katalytisch aktiven Untereinheit verstärkt die Aktivität der Telomerase, führt durch Telomerverlängerung zur Umgehung der zellulären Seneszenz und stellt einen weiteren Schritt der malignen Transformation dar.⁴⁹

Durch abnormale Centrosombildung im Sinne einer Erhöhung der Centriolenanzahl bedingt E7 multipolare Mitosen und folglich das Entstehen aneuploider Tochterzellen.^{50,51} Das Vorliegen

der viralen Onkoproteine ist zwar allein nicht ausreichend für die Karzinogenese, bewirkt jedoch eine grundlegende numerische und strukturelle Genominstabilität und ermöglicht so die schrittweise Akkumulation weiterer Mutationen (z. B. im wirtseigenen Protoonkogen Ras).^{52,53}

Die Genominstabilität begünstigt außerdem die Integration der viralen Episome in das Wirtsgenom.⁵¹ Dies führt über eine erhöhte Stabilität der mRNA zur vermehrten Expression von E6 und E7 und verschafft betroffenen Zellen einen Wachstumsvorteil.^{54,55} Häufig wird zusätzlich der *open reading frame* von E2 unterbrochen, was durch den Verlust der regulatorischen Eigenschaften von E2 (z. B. Repression des E6/E7-Promoters) entscheidend zur Immortalisierung der Zellen beiträgt.⁵⁶ Zwar kann episomal vorliegendes E2 die Transkription von E6 und E7 zunächst noch inhibieren, jedoch gehen die Episome über die Zeit verloren und Keratinozyten mit integriertem HPV-Genom werden selektiert.^{57,58} Die Genomintegration in der Nähe wirtseigener Protoonkogene (z. B. Myc) kann zu deren verstärkter Expression führen (insertionale Mutagenese).⁵⁹ Bei Patientinnen mit Zervixkarzinom liegen, im Gegensatz zu Patientinnen mit niedriggradigen zervikalen Dysplasien, integrierte Virusgenome in der Mehrheit der Fälle (62 %) vor.⁶⁰

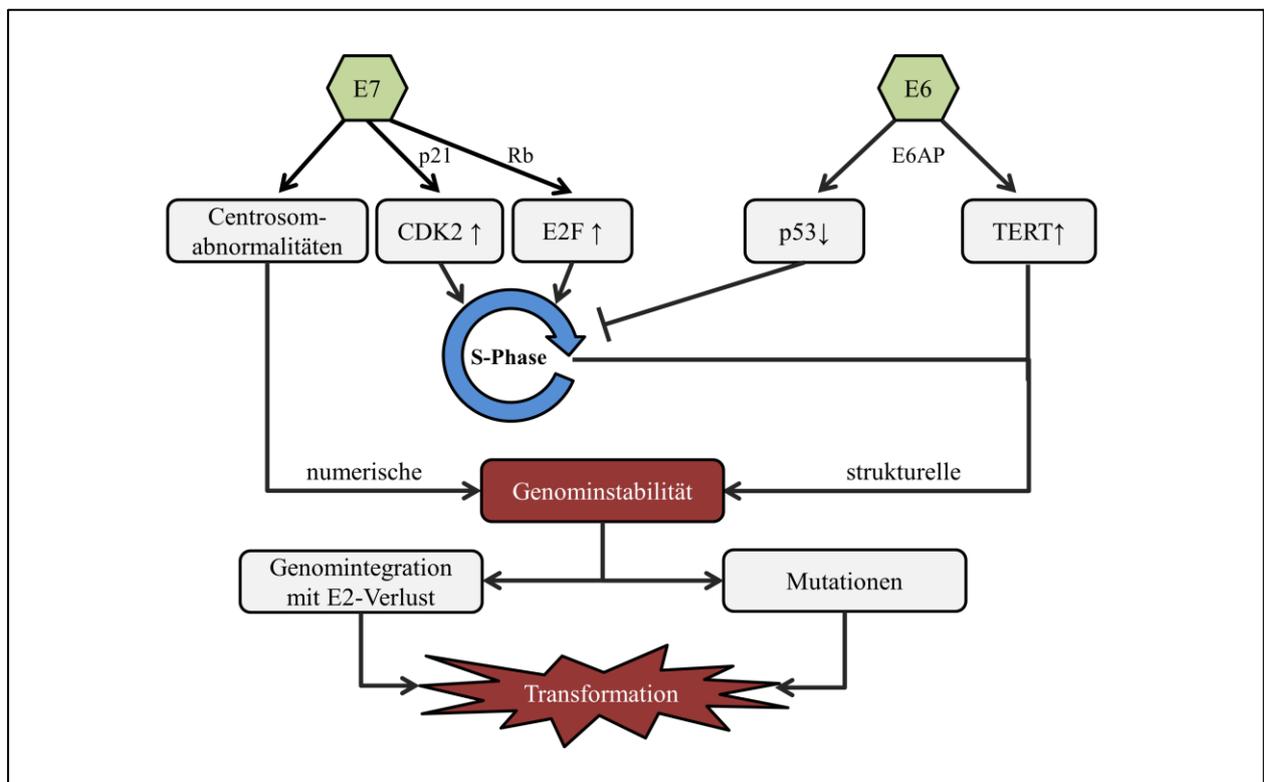


Abbildung 5: Die wesentlichen Schritte der Entstehung des Zervixkarzinoms ausgehend von den HPV-Onkoproteinen E6 und E7. (*Rb* = Retinoblastom-Protein; *E6AP* = E6-assoziiertes Protein; *CDK* = Cyclin-abhängige-Kinase; *TERT* = Telomerase Reverse Transkriptase)

1.3 Prävention des Zervixkarzinoms

Die schrittweise Entstehung des Zervixkarzinoms mit der ursächlichen HPV-Infektion und den CIN als Präkanzerosen bietet eine breite Angriffsfläche für Präventionsmaßnahmen.

1.3.1 Primärprävention: Impfung

Die immunogene Wirkung der bisher zugelassenen HPV-Impfstoffe basiert auf rekombinant hergestellten L1-VLP (*virus-like particles*).⁶¹ Die HPV-Impfstoffe Gardasil® (quadrivalent: HPV 6, 11, 16, 18) und Cervarix® (bivalent: HPV 16, 18) besitzen seit 2006 bzw. 2007 ihre Zulassung für den deutschen Markt. Seit 2015 ist der Impfstoff Gardasil® 9 (nonavalent: HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58) zugelassen. Die ständige Impfkommission empfiehlt aktuell die zweimalige Impfung von Mädchen im Alter zwischen 9 und 14 Jahren und die dreimalige Impfung von Mädchen im Alter zwischen 15 und 17 Jahren.⁶² Im Jahr 2010, drei Jahre nach Einführung der Impfung, hatten sich ca. 60 % der 18–20-jährigen Frauen in Deutschland mindestens einmal, knapp 50 % der damaligen Empfehlung entsprechend dreimal impfen lassen.⁶³

Delere et al. wiesen nach, dass die Prävalenz von HPV 16 und 18 in geimpften Kohorten deutlich geringer als in ungeimpften Kohorten (14 % vs. 22 %) ausfiel. Bei Frauen, die die erste Impfdosis vor der Kohabitarche erhielten, lag die Prävalenz sogar nur bei knapp 10 %.⁶⁴ Mindestens eine Dosis des bivalenten Impfstoffs wies im 3-Jahres-Follow-Up bei zum Zeitpunkt der Impfung HPV-negativen Frauen 98 % bzw. 100 % Wirksamkeit gegen HPV-16/18-bedingte CIN2+ (CIN2–3 oder Zervixkarzinom) bzw. CIN3+ auf. Auch Kreuzimmunität für weitere HPV-Typen wurde beschrieben.⁶⁵ Bogaards et al. kalkulierten, dass durch die Impfung von 50 % der weiblichen Bevölkerung, die Inzidenz des Zervixkarzinoms langfristig insgesamt um knapp 50 % und bei nicht geimpften Frauen aufgrund der Herdenimmunität um ca. 25 % fallen wird.⁶⁶

1.3.2 Sekundärprävention: Screening

Im Gegensatz zu anderen Screening-Programmen (z. B. Brust- oder Hautkrebs), bewirkt das Zervixkarzinom-Screening nicht primär die Früherkennung der Erkrankung, sondern durch Diagnose und Therapie von Präkanzerosen (CIN und Adenocarcinoma in situ) ihre Vorbeugung. Das in seiner aktuellen Form seit 1971 bestehende gesetzliche Screening-Programm in Deutschland beinhaltet für alle Frauen ab einem Alter von 20 Jahren einen jährlichen

zytologischen Abstrich. Bei Auffälligkeiten erfolgt die weitere diagnostische Abklärung (HPV-Testung, Kolposkopie mit Biopsie) und gegebenenfalls Therapie (Konisation).⁶⁷

Zytologie

Der zytologische Pap-Abstrich (benannt nach dem Erfinder George Nicolas Papanicolaou) wird vor der mikroskopischen Betrachtung entweder konventionell direkt auf einem Objektträger ausgestrichen oder zuvor in einem Fixationsmedium (z. B. ThinPrep® PreservCyt-Medium) ausgewaschen. Letzteres Verfahren, die flüssigkeitsbasierte Zytologie, erreicht eine höhere Sensitivität für CIN2–3.⁶⁸ Je nach Studie erzielt der Pap-Abstrich bei hoher Spezifität (86–100 %) eine verhältnismäßig niedrige Sensitivität (30–87 %) für zervikale Dysplasien.⁶⁹ Eine Ergänzung durch die Immunzytochemie in Form einer Kombinationsfärbung von p16 und Ki67 erzielt bei gleicher Spezifität eine weitere Erhöhung der Sensitivität für CIN2+ (87 % vs. 69 %).⁷⁰ Die Zytologie weist außerdem nur eine moderate ($\kappa = 0,46$) Interrater-Reliabilität (Reproduzierbarkeit der Diagnose durch unterschiedliche Zytologen) auf.⁷¹

Die Beurteilung des zytologischen Befundes erfolgt entweder anhand der Münchener Nomenklatur III oder des Bethesda-Systems (**Tabelle 2**).

Tabelle 2: Definition zytologischer Befunde nach Münchener Nomenklatur III und Bethesda-System. [Modifiziert nach der Arbeitsgemeinschaft Zervixpathologie und Kolposkopie e.V., 2013⁷²]

Münchener Nomenklatur III	Definition	Bethesda –System
0	Unzureichendes Material	Unsatisfactory for evaluation
I	Unauffällige und unverdächtige Befunde	NILM
II-a	Unauffällige Befunde bei auffälliger Anamnese	NILM
II	Befunde mit eingeschränkt protektivem Wert	
II-p	Plattenepithelzellen mit geringergradigen Kernveränderungen als bei CIN1 auch mit koilozytärem Zytoplasma/Parakeratose	ASC-US
II-g	Zervikale Drüsenzellen mit Anomalien, die über das Spektrum reaktiver Veränderungen hinausreichen	AGC endocervical NOS
II-e	Endometriumzellen bei Frauen > 40. Lebensjahr in der zweiten Zyklushälfte	Endometrial cells
III	Unklare bzw. zweifelhafte Befunde	
III-p	CIN2/CIN3/Plattenepithelkarzinom nicht auszuschließen	ASC-H
III-g	Ausgeprägte Atypien des Drüsenepithels, Adenocarcinoma in situ/invasives Adenokarzinom nicht auszuschließen	AGC endocervical favor neoplastic
III-e	Abnorme endometriale Zellen (insbesondere postmenopausal)	AGC endometrial
III-x	Zweifelhafte Drüsenzellen ungewissen Ursprungs	AGC
IIID	Dysplasiebefunde mit größerer Regressionsneigung	
IIID1	Zellbild einer leichten Dysplasie analog CIN1	LSIL
IIID2	Zellbild einer mäßigen Dysplasie analog CIN2	HSIL
IV	Unmittelbare Vorstadien des Zervixkarzinoms	
IVa-p	Zellbild einer schweren Dysplasie/eines Carcinoma in situ analog CIN3	HSIL
IVa-g	Zellbild eines Adenocarcinoma in situ	AIS
IVb-p	Zellbild einer CIN3, Invasion nicht auszuschließen	HSIL with features suspicious for invasion
IVb-g	Zellbild eines Adenocarcinoma in situ, Invasion nicht auszuschließen	AIS with features suspicious for invasion
V	Malignome	
V-p	Plattenepithelkarzinom	Squamous cell carcinoma
V-g	Endozervikales Adenokarzinom	Endocervical adenocarcinoma
V-e	Endometriales Adenokarzinom	Endometrial adenocarcinoma
V-x	Andere Malignome, auch unklaren Ursprungs	Other malignant neoplasms

NILM = negative for intraepithelial lesion or malignancy; CIN = zervikale intraepitheliale Neoplasie; ASC-US = atypical squamous cells of undetermined significance; AGC = atypical glandular cells; NOS = not otherwise specified; ASC-H = atypical squamous cells of undetermined significance cannot exclude HSIL; LSIL = low-grade squamous intraepithelial lesion; HSIL = high-grade squamous intraepithelial lesion; AIS = Adenocarcinoma in situ

HPV-Testung

Im Vergleich zur Zytologie erreicht die Testung auf hrHPV-Infektionen für die Diagnose von CIN2+ in einer Screening-Population bei deutlich höherer Sensitivität (96 % vs. 53 %) eine geringere Spezifität (91 % vs. 96 %). Dabei stellte sich die Spezifität höher dar, je älter die Frauen waren.⁷³ Besonders bei Frauen > 30 Jahre ist nach einem negativen HPV-Test die kumulative Inzidenz von CIN3+ in den Folgejahren geringer als bei unauffälliger Zytologie. Diese Ergebnisse suggerieren eine mögliche Überlegenheit im Screening.⁷⁴

Die bedeutende Aussagekraft der HPV-Testung für die Diagnostik zervikaler Dysplasien hat eine Vielzahl (aktuell ca. 200) kommerzieller HPV-Tests hervorgebracht.⁷⁵ Zur Beurteilung der Güte dieser Vielzahl von Tests wurden von Meijer et al. Kriterien für Sensitivität und Spezifität bei der Diagnose hochgradiger zervikaler Dysplasien im Vergleich zu zwei etablierten Tests (Hybrid Capture 2, GP5+/6+ Enzymimmunoassay) sowie für die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen in unterschiedlichen Laboren festgelegt.⁷⁶ In der VALGENT-Studie (*VALidation of HPV GENotyping Tests*) werden verschiedene genotypisierende hrHPV-Tests nach einem standardisierten Studienprotokoll auf ihre diagnostische Qualität überprüft.⁷⁷ In **Tabelle 3** wird eine Auswahl der validierten hrHPV-Tests dargestellt. Der BD OnclarityTM (BD) und das Multiplex Genotyping (MPG) wurden in dieser Arbeit als Vergleichstests verwendet.

Tabelle 3: Eigenschaften einer Auswahl von nach Meijer-Kriterien oder VALGENT-Studienprotokoll validierten hrHPV-Tests. [Modifiziert nach Arbyn et al. 2015⁷⁸]

hrHPV-Test	Target	Amplifikationstyp	Genotypisierung (Typen)	Studie
Vergleichstests				
Hybrid Capture 2	Virales Genom (DNA)	Signalamplifikation	Nein (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68)	
GP5+/6+ Enzymimmunoassay	L1-DNA	Targetamplifikation	Nein (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)	
Validiert nach Meijer-Kriterien				
Aptima®	E6/E7-RNA	Targetamplifikation	Nein (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68)	Heideman et al. 2013 ⁷⁹
BD Onclarity TM	E6/E7-DNA	Targetamplifikation	Ja (16, 18, 31, 45, 51, 52, 33/58, 56/59/66, 35/39/68)	Ejegod et al. 2014 ⁸⁰
Validiert nach VALGENT-Protokoll				
GP5+/6+ Luminex (Multiplex Genotyping)	L1-DNA	Targetamplifikation	Ja (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82)	Geraets et al. 2014 ⁸¹

hrHPV = high-risk Humanes Papillomvirus; GP = general primer; DNA = Desoxyribonukleinsäure; RNA = Ribonukleinsäure

Kolposkopie und Histologie

Zur Abklärung auffälliger zytologischer Befunde wird die Kolposkopie mit Entnahme einer Biopsie empfohlen.⁸² Kolposkopisch können leichte (*minor changes*, z. B. semitransparentes essigweißes Epithel und zartes Mosaik), schwere (*major changes*, z. B. intensiv essigweißes Epithel und grobes Mosaik) und karzinomverdächtige Veränderungen (z. B. atypische Gefäße und Erosionen) entdeckt werden.⁸³ Die Kolposkopie erfasst CIN2+ mit einer Sensitivität von 87 % bei geringer Spezifität von 45 %.⁸⁴

Die histopathologische Beurteilung des Biopsats stellt den diagnostischen Goldstandard für Präkanzerosen und Karzinome der Zervix dar. Die CIN sind Präkanzerosen des Plattenepithelkarzinoms und werden anhand histologischer Kriterien (z. B. Koilozytose, Hyperplasie basaler und parabasaler Zellen, Hyper- und Dyskeratose, Zellkernanomalien und abnormale Mitosen) in Schweregrade (1–3) unterteilt. Das Adenocarcinoma in situ stellt die Vorstufe des Adenokarzinoms dar.⁸⁵ Durch immunhistologische Färbung der Biomarker p16, Ki67 und Stathmin kann die Aussage der histologischen Diagnose weiter präzisiert werden, wobei sich Stathmin als besonders spezifisch für hochgradige Dysplasien erwiesen hat (94 % für CIN2/3 vs. 44 % Spezifität von p16 für CIN2/3).⁸⁶

Konisation

Bei histologisch nachgewiesener CIN3, in manchen Fällen auch schon bei CIN2, wird die Entfernung der Präkanzerose (Konisation) meist mittels Schlingenexzision empfohlen.⁸⁷ Aus ethischen Gründen ist der Nachweis des Karzinomrisikos hochgradiger zervikaler Dysplasien durch Studien nicht zu erbringen. Es existiert jedoch eine retrospektive Datenanalyse, in der ungefähr 50 % der Patientinnen mit CIN3 ein Zervixkarzinom entwickelten und die so eine wichtige Grundlage für die aktuellen Handlungsempfehlungen bietet.⁸⁸ Im Gegensatz hierzu scheinen CIN2 besonders bei jungen Frauen (< 25 Jahre) meist spontan zu regredieren (ca. 60 % in 2 Jahren).⁸⁹

Bei zuvor konisierten Patientinnen konnte ein vermehrtes Auftreten von Schwangerschaftskomplikationen (Zervixinsuffizienz, vorzeitiger Blasensprung mit Amnioninfektionssyndrom, Frühgeburtlichkeit) und damit einhergehenden Folgen für das Neugeborene (niedriges Geburtsgewicht, häufigere Intensivpflichtigkeit, erhöhte perinatale Mortalität) beobachtet werden.⁹⁰

1.4 Biomarker des Zervixkarzinoms und seiner Vorstufen

Die molekulare Beurteilung von zervikalen Präkanzerosen und Karzinomen durch die diagnostische Nutzung von Biomarkern birgt viele potenzielle Vorteile gegenüber der rein makro- (Kolposkopie) und mikroskopischen (Zytologie, Histologie) Beurteilung: Sie ermöglicht sensitivere, spezifischere und besser reproduzierbare Aussagen über das Krankheitsstadium. Auffällige Screening-Ergebnisse können gezielter und sicherer triagiert werden. Möglicherweise können sogar Progressionsrisiken kalkuliert werden. Auf diese Weise werden kostspielige, wiederholte Diagnostik und gesundheitsschädliche Überbehandlung reduziert.⁹¹ Im Folgenden werden die eingeschlossenen Biomarker dieser Arbeit (**Tabelle 5**) vorgestellt.

1.4.1 Virale Onkoproteine und Splicemarker

Das virale Protein **E7** wird aufgrund seiner Fähigkeit, den Zellzyklus zu deregulieren und so die maligne Transformation zu begünstigen, als Onkoprotein bezeichnet (siehe Kapitel 1.2.2).⁴¹ Da sich in der PIPAVIR-Studie zeigte, dass der Nachweis von E7-Protein (mittels ELISA) bei der Triagierung HPV-positiver Frauen eine höhere Sensitivität für CIN2+ erreicht als die Zytologie, wurde in dieser Arbeit das E7 des am stärksten exprimierten HPV-Typen als Biomarker (führender HPV) eingeführt.⁹² Baron et al. fanden eine signifikante Korrelation zwischen dem positivem Nachweis von E6/E7-mRNA, der Schwere der zervikalen Dysplasie und der Viruslast.⁹³ Die Studienlage dazu, ob die Viruslast wiederum Aussage über die Schwere, Dauer oder das Progressionsrisiko einer zervikalen Läsion gibt, ist widersprüchlich.⁹⁴ Schmitt et al. schlussfolgerten jedoch, dass die Viruslast bei Frauen mit CIN im Vergleich zu gesunden Frauen deutlich erhöht ist.⁹⁵

Die Mehrheit der Zervixkarzinome wird durch HPV 16 ausgelöst, sodass die Analyse seiner Genexpression molekulare Hinweise auf den Zustand der Infektion liefern kann.⁸ Schmitt et al. stellten dabei zwischen den Dysplasiestadien deutliche Unterschiede im Virustranskriptom fest, die durch alternatives Splicing der mRNA entstehen. Während das Spliceprodukt **E1[^]E4** in Zervixkarzinomen vermindert vorlag, stiegen **E6*[^]I** und **E1C** mit zunehmender Dysplasieschwere deutlich an.⁹⁶ E1[^]E4 nimmt wichtige Funktionen in der Genomamplifikation und Virussyntese der produktiven Infektion wahr.³³ Da die mRNA von E6*[^]I zur Synthese von E7 translatiert wird und E1C über noch nicht eindeutig geklärte Mechanismen (als Transaktivator der LCR oder durch E2-Suppression) ebenfalls die Onkogenexpression fördert, deuten diese beiden Splicemarker hingegen auf transformierende Infektionen hin.^{97,98}

1.4.2 Marker der „squamocolumnar junction zone“

Herfs et al. identifizierten im Bereich der Transformationszone, also dem Übergang des ektozervikalen Plattenepithels in das endozervikale Drüsenepithel, eine kleine Zellpopulation, die *squamocolumnar junction cells* (SCJ-Zellen), mit charakteristischer Biomarkerexpression (Keratin 7/**KRT7**, Anterior Gradient 2/**AGR2**, Cluster Differentiation 63/**CD63**, Matrix-Metalloprotease 7/**MMP7**, Guanin-Desaminase/**GDA**). Da in besagter Studie alle CIN2+ diese Biomarker exprimierten, propagierten die Autoren, dass die SCJ-Zellen den Ursprung aller Zervixkarzinome darstellen.⁹⁹ Durch einen Fehler bei der Sondenauswahl wurde Arginase 2 (ARG2) statt AGR2 in den Assay aufgenommen.

1.4.3 Proliferationsmarker

Stathmin (Onkoprotein 18) beeinflusst als Mikrotubuli-Destabilisator die Dynamik des Zytoskeletts und reguliert so die Proliferation der Keratinozyten.¹⁰⁰ In der Immunhistochemie wurde die besonders hohe Spezifität (94 %) für CIN2+ beschrieben.⁸⁶

Ki67, das an der Synthese ribosomaler RNA beteiligt ist, wird fast ausschließlich in proliferierenden Zellen exprimiert und deshalb zur Diagnostik und Prognoseabschätzung diverser Karzinome (z. B. Prostata, Mamma) genutzt.^{101,102} Auch in der Immunzyto- und Immunhistochemie der Zervix wird Ki67, meist in Kombination mit p16, bereits als Proliferationsmarker verwendet.^{70,86}

Das Minichromosome Maintenance Protein 2 (**MCM2**) ist an der Initiation der DNA-Replikation beteiligt.¹⁰³ Die Topoisomerase 2 α (**Topo2 α**) wird aufgrund ihrer Fähigkeit, die DNA-Topologie zu verändern, zur zellulären Transkription, Replikation und Mitose benötigt.¹⁰⁴ Der kombinierte immunzytochemische Nachweis von MCM2 und Topo2 α existiert bereits als kommerzieller Test (BD ProExTM C) und erzielt für CIN2/3 eine Sensitivität von 92 % bei einer Spezifität von 80 %.¹⁰⁵

1.4.4 Tumorsuppressoren

Tumorsuppressoren sind zelluläre Proteine, die der Zellzyklusregulation und Apoptoseinduktion dienen, sodass der Verlust ihrer Funktion zur Karzinogenese führen kann. Einer der bekannten Tumorsuppressoren ist **p53**, der „Wächter des Genoms“.¹⁰⁶ Er fungiert als Transkriptionsfaktor für Zellzyklusinhibitoren (z. B. p21) und proapoptische Proteine und wird

durch das virale Onkoprotein E6 degradiert (siehe Kapitel 1.2.2).^{46,47} Dass die p53-Expression eine Aussage über die Schwere oder das Progressionsrisiko einer zervikalen Dysplasie erlaubt, konnte immunhistochemisch bisher jedoch nicht nachgewiesen werden.^{107,108}

Der Tumorsuppressor **p16** inhibiert zwei CDK, die in ihrem aktiven Zustand durch Phosphorylierung von Rb die Abspaltung des Transkriptionsfaktors E2F bewirken. p16 supprimiert folglich indirekt den E2F-abhängigen Übergang in die S-Phase des Zellzyklus. Da bei einer HPV-Infektion die Spaltung des Rb-E2F-Komplexes jedoch nicht durch die CDK, sondern durch das virale Onkogen E7 erfolgt, erzielt die reflektorische p16-Überexpression im Sinne eines negativen Feedbacks nicht ihren üblichen Effekt.^{91,109} In der Immunzyto- und Immunhistochemie wird p16 bereits wegen seiner hohen diagnostischen Güte (96 % Sensitivität und 44 % Spezifität für CIN2/3 in der Immunhistochemie) zur Identifikation hrHPV-induzierter zervikaler Dysplasien genutzt.^{70,86} In einer Studie von Del Pino et al. progredierte 18 % der immunhistochemisch p16-positiven und keine der p16-negativen CIN1. Dieses Ergebnis weist auf eine potenzielle prognostische Aussagekraft der p16-Expression in zervikalen Dysplasien hin.¹¹⁰

1.4.5 Zelluläre Onkoproteine und Stammzellmarker

Onkoproteine sind Moleküle, deren Überexpression die Entartung und Immortalisierung von Zellen bewirkt und die so entscheidend zur Entstehung von Karzinomen beitragen.¹⁰⁶ Das Onkoprotein **BIRC5** (Survivin) ist ein Apoptose-Inhibitor, der normalerweise durch p53 supprimiert wird. Bei der HPV-vermittelten Karzinogenese bedingt das virale Onkoprotein E6 die p53-Degradation und so die Überexpression von BIRC5.^{111,112} Die immunhistochemische BIRC5-Expression korreliert in verschiedenen Studien mit der Schwere der zervikalen Läsion.^{112,113}

Die aktuelle Forschung geht davon aus, dass viele Malignome, unter anderem auch das Zervixkarzinom, von Krebsstammzellen ausgehen.¹¹⁴ Diese sind über ihre Fähigkeit definiert, autonom maligne Tumore zu initiieren, und teilen die Eigenschaften (v. a. Selbsterneuerung) und Biomarkerexpression normaler Stammzellen.¹⁰⁶ Martens et al. identifizierten den embryonalen Transkriptionsfaktor **p63** und den embryonalen Stammzellmarker Keratin 17 (**KRT17**) als charakteristische Marker zervikaler Stammzellen, in der Annahme, dass diese die Zielzellen der HPV-Infektion und somit der Karzinogenese darstellen.¹¹⁵ Wegen der Fähigkeit, diverse Zellzyklusregulatoren (Cycline und CDK) zu regulieren, wird p63 außerdem für die virale

Genomamplifikation in den sich differenzierenden Keratinozyten benötigt.¹¹⁶ Die Expression von KRT17 ist mit schlechter Prognose von Patientinnen mit Zervixkarzinom assoziiert.¹¹⁷

Rao et al. identifizierten die Aldehyd-Dehydrogenase-1 (**ALDH1**), die durch Aldehyd-Oxidation zur Zellentgiftung beiträgt, als Marker zervikaler Krebsstammzellen und beobachteten außerdem eine positive Korrelation ALDH1-Expression mit erhöhter Zellproliferation.¹¹⁸ Für ALDH1-Positivität von Zervixkarzinomen konnte weiterhin eine Assoziation mit schlechter Prognose der Erkrankung gezeigt werden.¹¹⁹ In die hier vorliegende Arbeit wurden die Subtypen ALDH1A1 und ALDH1L1 einbezogen.

Zur Aufrechterhaltung der Pluripotenz in embryonalen Stammzellen tragen entscheidend die Transkriptionsfaktoren **SOX2**, **NANOG** und **POU5F1** (OCT4) bei.¹²⁰ Auch in hochgradigen zervikalen Dysplasien und Zervixkarzinomen konnte im Vergleich zu dysplasiefreier Zervix eine vermehrte Expression dieser Marker detektiert werden, was die Verstärkung der Zellproliferation und die Inhibition der Apoptose zur Folge hat.¹²¹⁻¹²³

Das virale Onkoprotein E6 induziert über die vermehrte Transkription von **TERT** einen weiteren klassischen Stammzellmarker, die Telomerase, die über die Telomereelongation zur Immortalisierung von Zellen beiträgt.^{48,120} Barbosa et al. zeigten mittels quantitativer real-time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) die Zunahme der Telomeraseaktivität mit der Schwere der zervikalen Dysplasie.¹¹³

1.4.6 Marker der Zellularität

Die Quantifizierung der mRNA-Expression erfordert eine Normalisierung der Biomarker auf die Zellzahl in der Probe. Hierzu werden Haushaltsgene (*housekeeping genes*) verwendet, deren Expression unabhängig vom Krankheitsstadium und anderen äußeren Gegebenheiten stabil bleibt. Für zervikale Epithelzellen konnten Steinau et al. in der qRT-PCR stabile Level für **Actin-β** in gesunden und dysplastischen Zellen nachweisen.¹²⁴

2 Fragestellung

Grundlagen

Im September 2016 beschloss der Gemeinsame Bundesausschuss in Deutschland, das seit 1971 bestehende opportunistische Screening-Programm für Gebärmutterhalskrebs in ein organisiertes Screening-Programm zu überführen. Alle Frauen zwischen 20 und 60 Jahren sollen hierfür alle fünf Jahre von ihren Krankenkassen schriftlich über das Screening informiert werden. Während die unter 35-jährigen Frauen hierbei weiterhin Anspruch auf einen jährlichen zytologischen Abstrich haben, sollen die über 35-jährigen Frauen alle drei Jahre ein Kombinationsscreening aus HPV-Test und zytologischem Abstrich erhalten.^{125,126}

Im Wolfsburg-Modell präsentierten Luyten et al. im Jahr 2009 einen risikoadaptierten Screening-Ansatz für Frauen über 30 Jahre. Da durch einen primären Pap-Abstrich nur ungefähr 10 % der CIN3+ korrekt diagnostiziert wurden, beinhaltete der neue Ansatz initial die nicht-genotypisierende HPV-Diagnostik und im Anschluss die Zytologie zur Triagierung der HPV-positiven Frauen. Auch bei der Triagierung erreichte die Zytologie nur eine Sensitivität von ca. 73 %, weshalb die Autoren der Studie die HPV-Genotypisierung oder Verwendung von Biomarkern als alternative Triage-Methoden vorschlugen.¹²⁷

Im Zuge der aktuellen Umstrukturierungen wird in dieser Arbeit der QuantiGene® 2.0 Plex Assay (QG) validiert. Dieser ermöglicht die mRNA-basierte Quantifizierung von Biomarkern zur HPV-Diagnostik (inklusive Genotypisierung) und zur Dysplasiediagnostik. In einem einzigen Test kombiniert der QG dadurch potenziell das Screening mit der Triagierung auffälliger Befunde. Dabei ist er technisch, personell und finanziell weniger aufwendig und möglicherweise aussagekräftiger als die bestehenden Methoden.

Die Etablierung der Labor- und Messmethodik wurde in den aktuellen Forschungsarbeiten von P. Hannemann und L. Rotenberg durchgeführt. Eine explorativ durchgeführte Pilotstudie (n = 238 für die HPV-Diagnostik, n = 216 für die Auswertung der Biomarker) zur klinischen Anwendung wurde bereits in der aktuellen Arbeit von N. Nevermann realisiert und hat erste Hinweise ergeben, dass die Methode zur Diagnostik von zervikalen Dysplasien geeignet ist. Die Ergebnisse der Pilotstudie sollen in der vorliegenden Arbeit in einem größeren und prospektiv gesammelten Studienkollektiv validiert und ergänzt werden.

Hypothesen

Hauptypothesen:

- Mit dem QG kann eine zufriedenstellende hrHPV-Diagnostik im Vergleich mit BD und MPG erreicht werden.
- Mit dem QG können Veränderungen in der Biomarkerexpression gemessen werden, die charakteristisch für das Dysplasiestadium der Patientin sind und so zur Diagnose führen.

Nebenhypothesen:

- Außer der Biomarkerexpression existieren weitere Faktoren (Alter, hrHPV-Typ), die das Krankheitsstadium als Confounder beeinflussen und somit zur Diagnostik genutzt werden können.
- Das Ergebnis des QG gibt nicht nur Auskunft über das Krankheitsstadium, sondern kann auch eine Vorhersage über das Progressions- bzw. Regressionsrisiko der Läsion treffen.

3 Material und Methoden

3.1 Studienpopulation

3.1.1 Rekrutierung

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen der MolTriage-Studie (*Molecular Triage*), einer Substudie der PIPAVIR-Studie (*Persistent Infections with human PApillomaVIRuses*), angefertigt und beruht somit auf dem Ethikvotum EA1/168/13 vom 04.01.2013. Es handelt sich um eine Kooperation des Labors für gynäkologische Tumorummunologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin mit der Abteilung für molekulare Diagnostik onkogener Infektionen des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) in Heidelberg sowie dem Medizinischen Versorgungszentrum (MVZ) im Fürstenberg-Karree in Berlin.

Über den Zeitraum von einem Jahr (01.10.2015 bis 30.09.2016) wurde allen Patientinnen der Dysplasiesprechstunde des MVZ im Fürstenberg-Karree die Studienteilnahme angeboten. Für die Patientinnen fielen hierbei keine zusätzlichen Untersuchungen an, da lediglich vorhandene klinische Daten aus der Akte erfasst und das Restmaterial der zytologischen Untersuchung verwendet wurde. Alle Studienteilnehmerinnen gaben nach Aufklärung im Rahmen der Sprechstunde ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme.

Die prospektive Probensammlung wurde mit Zervixkarzinomproben aus der diagnostischen Laborroutine, dem DKFZ und der Asklepios Klinik Harburg in Hamburg angereichert.

Ein- und Ausschlusskriterien

Voraussetzung für den Einschluss in die Studie waren das Vorhandensein von Restmaterial der zytologischen Untersuchung und die informierte schriftliche Einwilligung der Patientin.

Patientinnen wurden von der Studienteilnahme ausgeschlossen, wenn...

- die Probenzuordnung nicht eindeutig war,
- es sich bei der Probe nicht um einen zervikalen Abstrich handelte,
- die Patientin an einem anogenitalen Karzinom nicht-zervikalen Ursprungs (Vulva, Vagina, Anus) litt,

- sich die Probe durch zu niedriges Actin- β -Signal (< 100 MFI) oder zu wenige Capture Beads (< 20) in der Messung als mangelhaft herausstellte.

Unter Berücksichtigung der Ein- und Ausschlusskriterien wurden 1438 Patientinnen in die Studie eingeschlossen. Insgesamt lagen 1585 Proben vor, von denen 147 Follow-Up-Proben waren. Eine Übersicht zur Rekrutierung der Studienteilnehmerinnen gibt **Abbildung 6**.

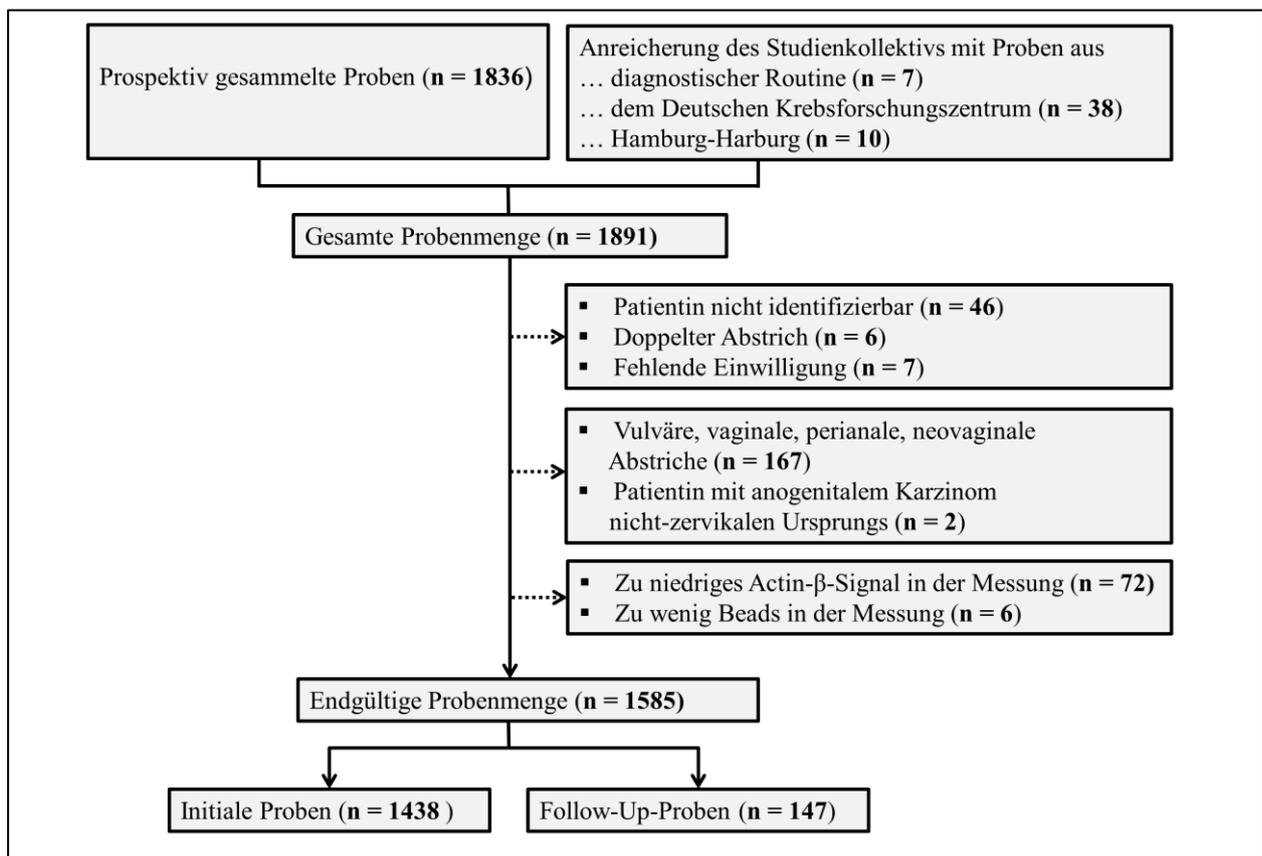


Abbildung 6: Flowchart zur Rekrutierung der Studienteilnehmerinnen.

3.1.2 Klinische Daten

Folgende klinische Daten wurden der Patientinnenakte des MVZ in codierter Form entnommen: zytologische Diagnose (Pap-Abstrich mit flüssigkeitsbasierter Zytologie), das Ergebnis der Immunzytochemie (p16/Ki67 *dual stain*), die histologische Diagnose, das Ergebnis der Immunhistochemie (p16, Ki67 und Stathmin), das Ergebnis des BD HPV-Tests, die kolposkopischen Untersuchungsergebnisse und die histologische Diagnose im Konus.

Des Weiteren wurden die Ergebnisse der HPV-Testung mittels MPG von den Kollegen des DKFZ zur Verfügung gestellt.

3.1.3 Proben

Für die diagnostisch durchgeführte Dünnschichtzytologie wurde mittels einer Plastikbürste (Cervex-Brush®, *Rovers Medical Devices, Oss, Niederlande*) der äußere Gebärmuttermund der Patientin abgestrichen und die Bürste anschließend im Sinne einer flüssigkeitsbasierten Zytologie in methanolhaltigem ThinPrep® PreservCyt-Medium (*Hologic Inc., Marlborough, USA*) ausgewaschen. Das Restmaterial der Untersuchung wurde als Probe für diese Studie verwendet.

Die Proben wurden im MVZ durchgehend bei 4 °C gelagert und einmal monatlich an die Labore der Charité und des DKFZ verschickt, wo sie durch Vergabe einer Barcode-Nummer pseudonymisiert wurden.

Herstellung und Lagerung der Zelllysate

Nach 5-sekündigem Schütteln auf dem Vortexmischer wurden 2 ml der Probe in ein Eppendorf-Tube gegeben und für 10 min bei 12.000 rpm zentrifugiert, sodass sich am Boden ein Zellpellet bildete. Das Medium (ThinPrep® PreservCyt) wurde abpipettiert und durch 100 µl Diluted Working Lysis Mixture (**Tabelle 4**) ersetzt.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Diluted Working Lysis Mixture.

Reagenz	Teile
Lysis Mixture (im Wasserbad auf 37 °C erwärmt)	1
Proteinase K (50 µg/µL)	0,01
Ribonuklease-freies Wasser	2

Durch 5-sekündiges Schütteln auf dem Vortexmischer wurde das Zellpellet in der Diluted Working Lysis Mixture gelöst und die Probe zur Lyse für 30 min bei 50 °C und 450 rpm im Thermoschüttler inkubiert. Die fertigen Zelllysate wurden bis zur Messung bei -80 °C gelagert.

Einen Überblick über alle Reagenzien, Geräte und Verbrauchsmaterialien geben **Tabelle 9**, **Tabelle 10** und **Tabelle 11**.

3.2 QuantiGene® 2.0 Plex Assay

Der QuantiGene® 2.0 Plex Assay (*Affymetrix Inc., Santa Clara, USA*) ist ein Bead-basierter Multiplex-Assay, der die Quantifizierung von bis zu 80 verschiedenen RNA-Molekülen pro Probe direkt aus dem Zelllysate ermöglicht. Bei Durchführung auf einer 96-Well-Platte können dabei bis zu 96 Proben (abzüglich Kontrollen) gleichzeitig analysiert werden.

Das Prinzip des QG beruht auf der xMap® Technologie: Farbkodierte magnetische Capture Beads sind mit den spezifischen RNA-Sonden gekoppelt. Die Messung gliedert sich in zwei Tage. An Tag 1 wird die RNA im Zelllysate spezifisch an die Capture Beads gebunden (Hybridisierung). An Tag 2 erfolgt im Gegensatz zu anderen geläufigen Methoden (z. B. qRT-PCR) keine Amplifikation der Targets, sondern eine Signalamplifikation mittels *branched DNA* (bDNA). Am Ende dieser Signalamplifikation steht die Markierung mit einem Label-Reagenz, in diesem Fall Streptavidin-conjugated Phycoerythrin (SAPE).¹²⁸ Die Auslesung erfolgt durch den Luminex®-Reader, der auf Durchflusszytometrie und einem dualen Lasersystem basiert. Alle Beads werden einzeln ausgerichtet und ausgelesen. Dabei differenziert der rote Laser die farbkodierten Beads, der grüne Laser quantifiziert die Intensität des SAPE-Signals.¹²⁹ Diese Signalintensität, die direkt proportional zu der Menge der gebundenen mRNA ist, wird in *mean fluorescence intensity* (MFI) angegeben.¹²⁸

In der vorliegenden Arbeit wurde die mRNA der in **Tabelle 5** gelisteten Targets quantifiziert.

Tabelle 5: Targets des hier durchgeführten QuantiGene® 2.0 Plex Assays.

Biologische Parameter	Target
lrHPV E7	HPV 6
hrHPV E7	HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82
Splicemarker	HPV 16 E1 [^] E4, E6 [*] I, E1C
Tumorsuppressoren	p16, p53
Proliferationsmarker	Stathmin, Ki67, MCM2, Topo2 α
Marker der „squamous junction zone“	KRT7, ARG2 (fälschlicherweise statt AGR2), CD63, MMP7, GDA
Stammzellmarker	p63, KRT17, ALDH1A1, ALDH1L1, SOX2, NANOG, POU5F1 (OCT4), TERT
Zelluläre Onkoproteine	BIRC5 (Survivin)
Marker der Zellularität	Actin- β

lrHPV = low-risk Humanes Papillomvirus; hrHPV = high-risk Humanes Papillomvirus

3.2.1 Durchführung

Die Durchführung des QG gliederte sich in zwei Arbeitstage.

Tag 1: Hybridisierung der mRNA aus dem Zelllysate mit den Bead-gekoppelten Sonden

Die Zelllysate und die benötigten Reagenzien (**Tabelle 6**) wurden aufgetaut und die Lysis Mixture für 30 min bei 37 °C im Wasserbad erwärmt. In jedes Well einer 96-Well-Rundbodenplatte (*hybridization plate*) wurden 20 µl des Zelllysates pipettiert. Als Negativkontrollen wurden je 20 µl der Diluted Working Lysis Mixture (Tabelle 4) in die letzten drei Wells gegeben. Der Working Bead Mix wurde entsprechend Tabelle 6 angesetzt. Da die Capture Beads aufgrund ihrer magnetischen Eigenschaft miteinander aggregieren, wurden sie vor Benutzung 30 s lang auf dem Vortexmischer geschüttelt.

Tabelle 6: Zusammensetzung des Working Bead Mix.

Reihenfolge	Reagenz	Pro Well
1	Ribonuklease-freies Wasser	1,30 µl
2	Lysis Mixture	1,65 µl
3	Blocking Reagent	0,50 µl
4	Proteinase K (50 µg/µL)	0,05 µl
5	Probe Set	1,25 µl
6	Capture Beads	0,25 µl

Um den Working Bead Mix zu homogenisieren, wurde er für mindestens 15 s auf dem Vortexmischer geschüttelt. Anschließend wurden jedem Well 5 µl des Working Bead Mix hinzugefügt. Die Platte wurde mit einer Folie für PCR-Platten versiegelt und lichtgeschützt im Thermoschüttler für 22 Stunden bei 54 °C und 600 rpm inkubiert.

Tag 2: Signalamplifikation und Messung

Am 2. Tag wurden zunächst Preamplifier und Amplifier für 30 min bei 37 °C im Wasserbad erwärmt und der Waschpuffer entsprechend **Tabelle 7** angesetzt.

Tabelle 7: Zusammensetzung des Waschpuffers.

Reagenz	Pro 96-Well-Platte
Wash Buffer Component 1	0,3 ml
Wash Buffer Component 2	5,0 ml
Ribonuklease-freies Wasser	94,5 ml

Anschließend wurde die Platte dem Thermoschüttler entnommen und 1 min bei 240 x g und Raumtemperatur zentrifugiert, um Kondenstropfen von der Folie zu lösen. Zur Resuspension der Capture Beads, die sich auf dem Boden der Platte abgesetzt haben, wurde jedes Well fünf Mal auf- und abpipettiert. Die Proben enthielten zu diesem Zeitpunkt die mit den Capture Beads hybridisierte mRNA und wurden dann von der Rundbodenplatte auf eine Flachbodenplatte übertragen. Die Flachbodenplatte in Kombination mit einem Magneten diente während der folgenden Waschvorgänge dazu, die magnetischen Capture Beads am Boden der Platte zu fixieren, sodass diese nicht ausgewaschen wurden.

Während der folgenden Signalamplifikation wurden abwechselnd Waschvorgänge und Hybridisierungen mit diversen Reagenzien (Pre-Amplifier, Amplifier, Label Probe, SAPE Working Mix) durchgeführt.

Im Waschvorgang wurde die Platte für eine 1 min auf dem Handheld Magnetic Plate Washer befestigt, sodass sich die Capture Beads auf dem Plattenboden sammeln. Dann wurde die Platte (mit dem befestigten Magneten) zügig ausgekippt und leicht auf Papiertüchern abgeklopft. Es wurden 100 µl Waschpuffer (Tabelle 7) in jedes Well gegeben. Im Anschluss wurde die Platte vom Handheld Magnetic Plate Washer genommen, zur Resuspension der Capture Beads 10 s auf dem Thermoschüttler geschüttelt, für 1 min auf dem Handheld Magnetic Plate Washer befestigt und ausgekippt. Dieser Ablauf wurde pro Waschvorgang insgesamt drei Mal wiederholt.

Es folgte zuerst die Hybridisierung mit dem Pre-Amplifier, indem 50 µl von diesem in jedes Well gegeben wurden. Die Platte wurde mit der Aluminiumfolie für PCR-Platten versiegelt und für 1 h bei 50 °C und 600 rpm im Thermoschüttler inkubiert. Für die ersten 2 min wurde die Drehzahl auf 800 rpm erhöht, um die Beads zu resuspendieren.

Nach der Inkubation wurde die Platte erneut gewaschen. Dann folgte die Hybridisierung mit 50 µl/Well des Amplifiers und eine weitere einstündige Inkubation. Die Platte wurde erneut gewaschen. Zu jedem Well wurden 50 µl Label Probe gegeben und die Platte wiederum inkubiert.

In den letzten Minuten der Inkubation mit der Label Probe, wurde der SAPE Working Mix gemäß **Tabelle 8** angesetzt.

Tabelle 8: Zusammensetzung des SAPE (Streptavidin-conjugated Phycoerythrin) Working Mix.

Reagenz	Pro 96-Well-Platte
SAPE Diluent	6 ml
SAPE	18 μ l

Der fertige SAPE Working Mix wurde 15 s auf dem Vortexmischer homogenisiert. Nach der Inkubation wurde die Platte gewaschen. Dann wurden jedem Well 50 μ l des SAPE Working Mix hinzugefügt. Es folgte die letzte Inkubation für nur 30 min bei Raumtemperatur. Die Drehzahl lag während der ersten 2 min bei 800 rpm und nachfolgend bei 600 rpm.

Währenddessen wurde der Luminex®-Reader für die Messung vorbereitet: Mit dem „Wash between plates“-Programm wurde er mit Chlor und Isopropanol gereinigt, der Laser wurde erwärmt und das Messprotokoll vorbereitet. Außerdem wurde Sheath Fluid als Trägermedium für die Messung aufgefüllt.

Nach Ablauf der Inkubation wurde die Platte mit SAPE Wash Buffer gewaschen. In den Wells befanden sich zu diesem Zeitpunkt die Capture Beads mit der gekoppelten RNA. Über die Label Extender hat sich während der Hybridisierungen des zweiten Tages ein „Signalamplifikations-Bäumchen“ auf den RNA-Molekülen aufgebaut, das mit SAPE gefärbt wurde.¹²⁸ Die Capture Beads mit den „Signalamplifikations-Bäumchen“ wurden in 90 μ l SAPE Wash Buffer als Messmedium resuspendiert. Durch fünfmaliges Auf- und Abpipettieren wurde einer hohen Beadaggregation, die die Messqualität beeinträchtigt, entgegengewirkt. Abschließend wurde die Platte im Luminex® gemäß den Angaben des Herstellers gemessen.

Einen Überblick über die Durchführung des QG gibt **Abbildung 7**.

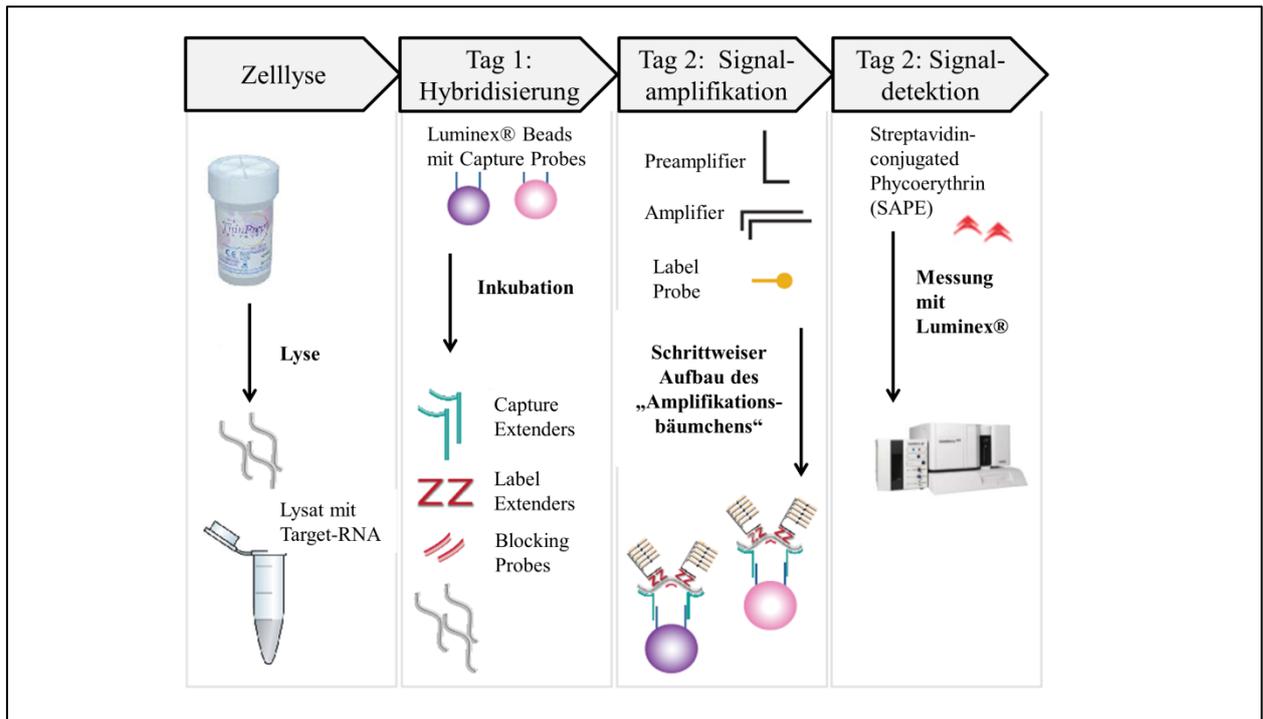


Abbildung 7: Ablauf des QuantiGene® 2.0 Plex Assays. [Modifiziert nach User Manual des Herstellers, 2014¹²⁸]

Die Messungen wurden nach Angaben des Herstellers (*Affymetrix Inc., Santa Clara, USA*) mit folgenden Anpassungen durchgeführt:

- Probenmenge und Working Bead Mix wurden zum Zweck der Kosteneffizienz auf ein Viertel der vorgegebenen Mengen reduziert.
- Aus Gründen der Kosteneffizienz wurde außerdem die verwendete Menge an Preamplicifier, Amplifier, Label Probe und SAPE halbiert.
- In der Annahme, dass sich die Beads besser vom Plattenboden lösen und so ein effizienteres Waschen möglich wird, wurde während der Waschvorgänge die Platte von dem Magneten heruntergenommen. Durch gründlicheres Waschen wurden Störsignale in der Messung vermindert und die Messqualität erhöht.
- Das Messvolumen wurde von 130 µl auf 90 µl reduziert, um die Messung zu beschleunigen.

P. Hannemann, L. Rotenberg und N. Nevermann zeigten in ihren Forschungsarbeiten keine Veränderung der Messqualität durch die vorgenommenen Anpassungen.

3.2.2 Reagenzien, Materialien und Geräte

Die **Tabelle 9**, **Tabelle 10** und **Tabelle 11** geben einen Überblick über die verwendeten Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte.

Tabelle 9: Reagenzien in der Reihenfolge ihrer Verwendung.

Reagenzien	Hersteller
Lysis Mixture	Affymetrix Inc. (Santa Clara, USA)
Proteinase K (50 µg/µL)	Affymetrix Inc.
Ribonuklease-freies Wasser Ampuwa® Spüllösung	Fresenius Kabi GmbH (Bad Homburg, Deutschland)
Blocking Reagent	Affymetrix Inc.
Probe Set	Affymetrix Inc.
Capture Beads	Affymetrix Inc.
Wash Buffer Component 1	Affymetrix Inc.
Wash Buffer Component 2	Affymetrix Inc.
Pre-Amplifier	Affymetrix Inc.
Amplifier	Affymetrix Inc.
Label Probe	Affymetrix Inc.
SAPE Diluent	Affymetrix Inc.
Streptavidin-conjugated R-Phycoerythrin (SAPE)	Affymetrix Inc.
SAPE Wash Buffer	Affymetrix Inc.
Sheath Fluid	Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, USA)
Chlor	Colgate-Palmolive (New York, USA)
Isopropanol	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)

Tabelle 10: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterialien	Name	Hersteller
Tubes	2 ml	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
	Falcon® 15 ml aus Polystyren	Corning Inc. (Corning, USA)
	Falcon® 50 ml aus Polypropylen	Corning Inc.
Serologische Pipetten	Falcon® 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml	Corning Inc.
Pipettenspitzen	Biosphere® Filter Tips 0,5–20 µl, 2–100 µl, 100–1000 µl	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
96-Well-Platten	Hybridization Plate (QuantiGene® 2.0 Plex Assay Kit)	Affymetrix Inc.
Versiegelungsfolien für 96-Well-Platten:	Microplate, 96 Well, PS, Flachboden (Chimney-Well), µClear®, Schwarz	Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster, Österreich)
	Pressure Seals (QuantiGene® 2.0 Plex Assay Kit)	Affymetrix Inc.
	Rotilabo® - Abdeckfolien für PCR-Folien, Aluminium	Carl Roth GmbH + Co. KG

Tabelle 11: Verwendete Geräte.

Geräte	Name	Hersteller
Werkbank	HeraSafe™ KS 12	ThermoFisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Vortexmischer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc. (Bohemia, USA)
Pipettierhelfer	Powerpette plus	Carl Roth GmbH + Co. KG
Mikropipetten	Research 0,5 –10 µl; 10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl	Eppendorf
Mehrkanal-Mikropipetten	Research 0,5 –10 µl, 30 –300 µl	Eppendorf
Mini-Zentrifuge	MiniSpin	Eppendorf
Wasserbad	TW 8	Julabo GmbH (Seelbach, Deutschland)
Thermoschüttler für 96-Well-Platte	PHMP	Grant Instruments Ltd. (Shepreth, UK)
Thermoschüttler 2-ml-Tubes	Thermomixer comfort	Eppendorf
Platten-Zentrifuge	PlateFuge	Benchmark Scientific Inc. (Edison, USA)
Magnetplatte	Handheld Magnetic Washer	Bio-Rad Laboratories Inc.
Luminex®-Reader	Bio-Plex® 200 System	Bio-Rad Laboratories Inc.
Kühl- und Eisschränke	4 °C	Liebherr (Bulle, Schweiz)
	-20 °C	Robert Bosch GmbH (Gerlingen, Deutschland)
	-80 °C	Robert Bosch GmbH

3.3 Statistische Analyse

Die statistischen Analysen dieser Arbeit wurden mit den Programmen SPSS Statistics Version 23 für Windows (*IBM, Armonk, USA*) und Excel 2010 (*Microsoft Corporation, Redmond, USA*) durchgeführt. Alle statistisch signifikanten Ergebnisse sind mit Sternchen gekennzeichnet. Die Anzahl der Sternchen ist von der Höhe des Signifikanzniveaus abhängig: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$.

Für die Auswertung der HPV-Diagnostik wurden die gemessenen Rohdaten (in MFI) verwendet, da hierbei eine qualitative Aussage (HPV positiv oder negativ) getroffen wurde. Für die quantitative Auswertung der Biomarkerexpression wurden die Rohdaten wie folgt bearbeitet:

1. Abzug des Hintergrundes (Mittelwert der drei Negativkontrollen)
2. Normierung auf Actin- β
3. Multiplikation mit 100 zur einfacheren Handhabung der Daten

Mit Durchführung der Schritte 1–3 wurde die Einheit von MFI zu rMFI (relative MFI) verändert.

4. rMFI-Werte < 0 wurden auf 0 gesetzt, da eine negative Expression biologisch nicht sinnvoll ist.

Weiterhin wurden für die Auswertung der Dysplasiediagnostik mittels des QG alle Studienteilnehmerinnen in klinische Gruppen entsprechend **Tabelle 12** eingeteilt. Als „HPV negativ“ galten dabei alle Proben, die sowohl im BD als auch im QG ein negatives Ergebnis aufwiesen. Entsprechend wurde ein positives Ergebnis bei mindestens einem der beiden Tests als „HPV positiv“ gewertet. Die histologische Diagnose ergab sich aus dem Biopsat oder Konisat. Lag nur eines dieser Ergebnisse vor oder kamen beide Untersuchungen zu dem gleichen Ergebnis, wurde dieses als histologische Diagnose gewertet. Bei abweichenden Diagnosen im Biopsat und Konisat wurde das höhergradige Ergebnis als histologische Diagnose angenommen. Außerdem wurde der Biomarker „führender HPV“ eingeführt, der bei HPV-Positivität und multipler Infektion dem E7 des am stärksten exprimierten HPV-Typen und bei HPV-Negativität 0 entspricht.

Tabelle 12: Einteilung der klinischen Gruppen für die Auswertung der Dysplasiediagnostik.

Klinische Gruppe	Beschreibung
0	HPV negativ und histologisch unauffällig
1	HPV positiv und histologisch unauffällig
2	HPV positiv und CIN1
3	HPV positiv und CIN2
4	HPV positiv und CIN3
5	HPV positiv und Zervixkarzinom

CIN = zervikale intraepitheliale Neoplasie

Teststatistik

Mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests wurde die Altersverteilung der Studienpopulation auf das Bestehen einer Normalverteilung überprüft. Die Nullhypothese, dass die Verteilung einer Normalverteilung entspricht, wurde bei einem p-Wert $< 0,05$ verworfen und die Alternativhypothese, dass keine Normalverteilung vorliegt, stattdessen angenommen.

Um zu überprüfen, ob die Altersverteilung in den verschiedenen klinischen Stadien gleich ist, wurde der Kruskal-Wallis-Test angewandt. Dieses nicht-parametrische Testverfahren überprüft, ob mehrere unabhängige Stichproben der gleichen Grundgesamtheit entstammen. Bei einem p-Wert $> 0,05$ wurde von einer gleichen Grundgesamtheit der Stichproben ausgegangen.

Receiver-Operating-Characteristic-Analyse

Bei einem quantitativen Test kann theoretisch jeder gemessene Wert als Cutoff für die Diagnose eines dichotomen Zustandes (gesund vs. krank) genutzt werden. Bildet man für jeden dieser Cutoffs die Sensitivität auf der y-Achse und die Falsch-Positiv-Rate ($1 - \text{Spezifität}$) auf der x-Achse eines Koordinatensystems ab, erhält man die Receiver-Operating-Characteristic- oder Grenzwertoptimierungskurve (ROC-Kurve). Die *area under the curve* (AUC) gibt dabei Rückschluss auf die Eignung des Tests zur Unterscheidung zwischen „krank“ und „gesund“. Je näher die AUC an 1 bzw. 0 liegt, desto höher sind die Werte für Sensitivität und Spezifität. Eine AUC von 0,5 beschreibt das schlechteste zu erwartende Ergebnis und suggeriert, dass die Unterscheidung der Zustände mit dem untersuchten Test einem Zufallsereignis gleicht. Der Messwert mit dem höchsten Youden-Index ($J = \text{Sensitivität} + \text{Spezifität} - 1$) stellt den rechnerisch bestmöglichen Cutoff dar.

Konkordanz und Cohens Kappa

Um die Eignung des QG zur HPV-Diagnostik zu beurteilen, wurde er dem Vergleich mit zwei anderen genotypisierenden HPV-Tests (MPG und BD) unterzogen. Diese Analyse wurde methodisch an die VALGENT-Studie angelehnt, die bereits verschiedene genotypisierende HPV-Tests miteinander verglichen und validiert hat.⁷⁷ Es wurde die Konkordanz, also der Anteil an gleichsinnigen Aussagen, und Cohens Kappa (κ) als Maß der Übereinstimmung erhoben. Werden viele negative Proben in eine Analyse einbezogen, führt dies zu einer hohen Zahl zufälliger Übereinstimmungen und somit zu einem positiven Einfluss auf die Konkordanz. Kappa wird von diesen zufälligen Übereinstimmungen nicht beeinflusst und besitzt deshalb eine höhere Aussagekraft. Die Beurteilung der Kappa-Werte erfolgte nach der Einteilung von Landis

und Koch: schlechte ($\kappa < 0$), geringe ($\kappa = 0-0,2$), ausreichende ($\kappa = 0,21-0,4$), mittelmäßige ($\kappa = 0,41-0,6$), beachtliche ($\kappa = 0,61-0,8$) und fast vollkommene Übereinstimmung ($\kappa = 0,81-1,0$).¹³⁰

Bewertung diagnostischer Tests: Sensitivität und Spezifität

Um die Aussagekraft des QG und anderer diagnostischer Tests zu beurteilen, wurden die Sensitivität und Spezifität für die Diagnose des Zervixkarzinoms und seiner Vorstufen erfasst. Dies geschah mittels einer Vierfeldertafel, in der das histologische Ergebnis als Goldstandard und das Ergebnis des Vergleichstest dargestellt wurden (**Abbildung 8**). Es gelten folgende Definitionen:

- Sensitivität = richtig positiv / (richtig positiv + falsch negativ)
- Spezifität = richtig negativ / (richtig negativ + falsch positiv)

		Goldstandard	
		Krank	Gesund
Vergleichstest	Test positiv	richtig positiv	falsch positiv
	Test negativ	falsch negativ	richtig negativ

Abbildung 8: Vierfeldertafel zur Berechnung von Sensitivität und Spezifität.

Korrelationen

Um das Vorliegen eines Zusammenhangs zwischen der klinischen Gruppe und der Höhe der Biomarkerexpression zu überprüfen, wurden Korrelationsanalysen durchgeführt. Da die Daten nicht normalverteilt sind, eignet sich hierfür der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman (r_s). Durch den Vergleich von Rängen anstatt des Vergleichs der Rohdaten können auch nicht-lineare Zusammenhänge aufgedeckt werden. Je näher r_s an ± 1 liegt, desto stärker ist die positive/negative Korrelation. Ein r_s von 0 wird als fehlende Korrelation gedeutet. Da keine Unterscheidung zwischen abhängiger und unabhängiger Variable erfolgt, werden Ursache und Wirkung nicht differenziert.

Bei der partiellen Korrelation (r_p) wurde eine Drittvariable (Alter, hrHPV-Typ) berücksichtigt, die theoretisch die beiden Variablen der Korrelation (Biomarker, klinische Gruppe) gleichermaßen beeinflusst und somit als Confounder ursächlich für eine Scheinkorrelation sein könnte. Indem die Drittvariable bei der partiellen Korrelation stabil gehalten wird, kann ihr Einfluss aus der Korrelation der anderen beiden Variablen herausgerechnet werden.

Binär logistische Regression

Während die Korrelationsanalyse nur Rückschlüsse über einen bestehenden Zusammenhang zulässt, untersucht die Regressionsanalyse die Art und Stärke dieses Zusammenhangs. In dieser Arbeit liegen die unabhängigen Variablen metrisch (Biomarker) und die abhängige Variable ordinal (klinische Gruppe) skaliert vor. Zur Durchführung der binären logistischen Regression wurde die abhängige Variable dichotomisiert, indem verschiedene Krankheitsschwellen eingeführt wurden. CIN2+ wurde als negativ (0) definiert, wenn Frauen einen unauffälligen Befund oder CIN1 in der Histologie hatten. CIN2+ wurde als positiv (1) definiert, wenn den Frauen histologisch entweder eine CIN2, CIN3 oder ein Zervixkarzinom diagnostiziert wurde. Entsprechend fand die Dichotomisierung für die Schwellen CIN3+ und das Zervixkarzinom statt. Die metrische Biomarkerexpression wurde ebenfalls anhand des am besten geeigneten Cutoffs (nach Youden-Index) der ROC-Analyse dichotomisiert, sodass der Biomarker anschließend als positiv (1) gewertet wurde, wenn er oberhalb des entsprechenden Cutoffs lag oder als negativ (0), wenn er unterhalb des Cutoffs lag.

In der univariaten logistischen Regression wurde zunächst der Zusammenhang zwischen jedem einzelnen Biomarker als unabhängige Variablen und den dichotomen Krankheitsschwellen als abhängigen Variablen überprüft.

Durch die multivariate Analyse wurden die Biomarker ausgewählt, die in ihrer Kombination die beste Vorhersagekraft besitzen. Das Ergebnis der multivariaten binären logistischen Regression liefert dabei eine Konstante a und den Regressionskoeffizienten b , die zur Aufstellung der Regressionsfunktion (**Formel 1**) dienen. Diese gibt Auskunft über die Wahrscheinlichkeit des Eintretens der abhängigen Variable y (in diesem Fall Krankheit) in Abhängigkeit von den unabhängigen Variablen x_1 bis x_n (in diesem Fall verschiedene Biomarker).

Die Odds Ratio (OR) ergibt sich aus dem Regressionskoeffizienten b ($OR = e^b$). Sie gibt Auskunft darüber, wie sich mit einer Veränderung der unabhängigen Variable die Wahrscheinlichkeit für das Eintreten der abhängigen Variable verhält. Eine $OR > 1$ deutete also darauf hin, dass eine Biomarkerexpression über dem jeweiligen Cutoff das Risiko für das Vorliegen der Krankheit (CIN2+, CIN3+, Zervixkarzinom) erhöht. Eine $OR < 1$ wies darauf hin, dass eine Biomarkerexpression über dem jeweiligen Cutoff das Risiko für das Vorliegen der Krankheit vermindert.

Formel 1: Grundmodell der Regressionsfunktion der multivariaten binären logistischen Regression zur Berechnung der Wahrscheinlichkeit für das Eintreten der abhängigen Variable y in Abhängigkeit von den unabhängigen Variable x_1 bis x_n .

$$p(y) = \frac{1}{1 + e^{-(a + b_1 \cdot x_1 + b_2 \cdot x_2 + \dots + b_n \cdot x_n)}}$$

a = Konstante der multivariaten Regression

b = Regressionskoeffizient B der jeweiligen Variable x

x = Ausprägung der unabhängigen Variable

4 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit ist es, den QG als diagnostische Methode für zervikale Dysplasien und Zervixkarzinome zu validieren. Im Ergebnisteil wird zunächst die Studienpopulation beschrieben (4.1). Anschließend werden die Ergebnisse des QG zur HPV-Diagnostik (4.2) und zur Dysplasiediagnostik (4.3) dargestellt. Für Letzteres werden die Unterschiede der Biomarkerexpression in verschiedenen Krankheitsstadien und die darauf aufbauende Modellierung von Risikoscores aufgezeigt. Zuletzt wird die diagnostische Güte des QG mit derer anderer Methoden verglichen (4.4).

4.1 Beschreibung der Studienpopulation

Insgesamt wurden 1438 Patientinnen in die Studie eingeschlossen. Bei 1214 Frauen (84,4 %) wurde nach zervikaler Biopsie eine histologische Diagnose gestellt, anhand derer sie für die Beschreibung der Studienpopulation gruppiert sind: 378 Patientinnen (31,1 %) ohne Dysplasie, 206 (17,0 %) mit CIN1, 323 (26,6 %) mit CIN2, 281 (23,1 %) mit CIN3 und 26 (2,1 %) mit Zervixkarzinom. Den Überblick über die Charakteristika der Studienpopulation gibt **Tabelle 13**.

Alter

Im Histogramm und im Kolmogorov-Smirnov-Test mit Signifikanzkorrektur nach Lilliefors zeigte sich, dass hinsichtlich des Alters keine Normalverteilung vorliegt ($p < 0,001$). Das Alter aller Studienteilnehmerinnen lag im Median bei 35,8 Jahren, wobei die jüngste und die älteste Patientin 18,9 bzw. 86,7 Jahre alt waren. Die Nullhypothese, dass alle histologischen Gruppen bezüglich des Alters gleichverteilt waren, wurde anhand des Kruskal-Wallis-Tests verworfen ($p < 0,001$). Die Frauen mit Zervixkarzinom waren im Median am ältesten (44 Jahre), wohingegen solche mit CIN2 am jüngsten waren (32,1 Jahre).

Zytologie und Immunzytochemie

Es wurde bei 1305 Studienteilnehmerinnen (90,8 %) eine Zytologie und bei 1007 (70,0 %) zusätzlich eine Immunzytochemie der Biomarker p16 und Ki67 als Kombinationsfärbung durchgeführt. Im Allgemeinen zeigte sich: je höhergradig die histologische Diagnose ausfiel, desto mehr Frauen zeigten auch einen zytologisch auffälligen Befund. Trotzdem zeigten fast alle Gruppen auch voneinander abweichende Aussagen von Histologie und Zytologie. Zum Beispiel

wiesen 8,1 % der Frauen mit dysplasiefreier Histologie einen hochgradigen zytologischen Befund (Pap IIID2–IV) auf. Umgekehrt wurden die Befunde von 7,6 % der Frauen mit CIN3 als zytologisch unauffällig (Pap I–II) eingestuft.

Der Anteil der positiven Befunde in der Immunzytochemie stieg kontinuierlich mit der Schwere der histologischen Diagnose an. So konnte eine immunzytochemische Anfärbung von p16 und Ki67 bei 15,5 % der Frauen mit dysplasiefreier Histologie, 25,8 % der Frauen mit CIN1, 72,4 % der Frauen mit CIN2, 92,1 % der Frauen mit CIN3 und 100 % der Frauen mit Karzinom detektiert werden.

Immunhistochemie

In der Immunhistochemie wurden drei verschiedene Biomarker (p16, Ki67 und Stathmin) angefärbt. Der Anteil der positiven Befunde stieg für alle Biomarker mit der Schwere der histologischen Diagnose an. Eine Positivrate über 90 % erzielte Ki67 bereits bei allen Frauen mit CIN1, p16 bei allen Frauen mit CIN2 und Stathmin erst bei allen Frauen mit CIN3.

Kolposkopie

Bei 1157 Studienteilnehmerinnen (80,5 %) wurde eine Kolposkopie durchgeführt. Während bei den gesunden Frauen und den Frauen mit CIN1 in der Kolposkopie in der Mehrheit der Fälle der Befund „*minor changes*“ erhoben wurde (51,8 % bzw. 72,5 %), wurde bei dem Großteil der Frauen mit CIN2 und CIN3 der Befund „*major changes*“ erhoben (67,2 % bzw. 89,1 %). Es wurden drei Patientinnen mit Zervixkarzinom eingeschlossen, bei denen auch der Kolposkopiebefund vorlag. Bei zwei von ihnen wurde bereits bei der kolposkopischen Untersuchung ein karzinomverdächtiger Befund erhoben.

HPV-Testung mittels BD Onclarity™

Eine HPV-Testung mittels BD Onclarity™ wurde bei 1324 Studienteilnehmerinnen (92,1 %) durchgeführt. Diese ergab bei 61,9 % aller Studienteilnehmerinnen eine Infektion mit mindestens einem hrHPV-Typ. Die Prävalenz der HPV-Infektion stieg mit der Schwere der histologischen Diagnose an und lag in der Gruppe der Frauen mit CIN2 und 3 bei > 90 %. Der am häufigsten vorkommende Typ war HPV 16, der bei 25,8 % aller getesteten Frauen vorlag. Die Prävalenz der Infektion mit HPV 16 nahm, wie die HPV-Prävalenz insgesamt, mit zunehmender Schwere der histologischen Diagnose zu. Bei den gesunden Frauen lag sie bei 8,9 %, bei den Frauen mit CIN1 bei 12,0 %, bei den Frauen mit CIN2 hingegen schon bei 35,2 % und bei den Frauen mit

CIN3 bei 61,9 %. Ähnlich verhielt es sich mit der Prävalenz von HPV 18. Bei HPV 31, 45, 51, 52 und den Gruppen 33/58, 56/59/66 und 35/39/68 lag die höchste Prävalenz hingegen bei den Frauen mit CIN2. Aufgrund der niedrigen Fallzahl der mittels BD HPV-getesteten Karzinome (n = 4) konnten hier keine verwertbaren Aussagen zur HPV-Prävalenz in Zervixkarzinomen gemacht werden.

Therapie

Nach Einschluss in die Studie unterzogen sich insgesamt 504 Studienteilnehmerinnen (35,6 %) einer Konisation. Von den histologisch dysplasiefreien Frauen wurden 7,7 %, von den Frauen mit CIN1 17,0 %, von denen mit CIN2 54,2 % und von denen mit CIN3 84,7 % konisiert. Ungefähr 15 % der Patientinnen mit CIN3 erhielten während des Studienzeitraums keine Therapie im MVZ im Fürstenberg-Karree. Wie viele dieser Patientinnen sich woanders haben therapieren lassen, konnte nicht evaluiert werden.

Im Anschluss konnte der histologische Befund des Konus mit der im Vorhinein gestellten histologischen Diagnose anhand des Biopsats verglichen werden. Bei Frauen mit CIN3 im Biopsat konnte diese Diagnose in 89,2 % der Fälle im Konus bestätigt werden. Es wurden jedoch auch 13 Karzinome (5,6 %) im Konus diagnostiziert, die zuvor im Biopsat als CIN3 unterschätzt worden sind. Bei einer Frau (0,6 %) mit CIN2 im Biopsat wurde im Konus ein Karzinom diagnostiziert. Bei den Frauen mit unauffälliger Biopsie bzw. CIN1, die aufgrund der gesamten Befundkonstellation trotzdem eine Konisation erhielten, wurden in 50,0 % bzw. 45,2 % der Fälle höhergradige Dysplasien (CIN2 bzw. 3) im Konus diagnostiziert.

Tabelle 13: Beschreibung der Studienpopulation eingeteilt nach histologischen Gruppen und insgesamt.

	Dysplasiefrei	CIN1	CIN2	CIN3	CxCa	Keine Histologie	Gesamt
n (%)	378 (31,1)	206 (17,0)	323 (26,6)	281 (23,1)	26 (2,1)	224 (-)	1438 (100)
Alter (Jahre)	38,7 [19,5–86,7]	36,1 [19,8–73,7]	32,1 [18,7–76,8]	33,2 [21,7–67,1]	44,0 ¹⁾ [32,9–70,5] ¹⁾	45,7 [19,7–86,2]	35,8 ²⁾ [18,9–86,7] ²⁾
Zytologie³⁾							
I, II-a	245 (68,8)	81 (42,9)	33 (11,3)	9 (3,6)	0 (0)	159 (74,3)	527 (40,4)
II-p, II-g	32 (9,0)	29 (15,3)	33 (11,3)	10 (4,0)	0 (0)	11 (5,1)	115 (8,8)
III-p, III-g	7 (2,0)	6 (3,2)	25 (8,5)	32 (12,8)	0 (0)	3 (1,4)	73 (5,6)
IIID1	43 (12,1)	42 (22,2)	52 (17,7)	6 (2,4)	0 (0)	15 (7,0)	158 (12,1)
IIID2, IV	29 (8,1)	31 (16,4)	150 (51,2)	191 (76,4)	3 (100)	26 (12,1)	430 (33,0)
V-p, V-g	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (0,8)	0 (0)	0 (0)	2 (0,2)
N/A	22 (-)	17 (-)	30 (-)	31 (-)	23 (-)	10 (-)	133 (-)
IZC							
p16/Ki67 +	44 (15,5)	40 (25,8)	181 (72,4)	199 (92,1)	2 (100)	32 (32,0)	498 (49,5)
p16/Ki67 –	240 (84,5)	115 (74,2)	69 (27,6)	17 (7,9)	0 (0)	68 (68,0)	509 (50,5)
p16/Ki67 N/A	94 (-)	51 (-)	73 (-)	65 (-)	24 (-)	124 (-)	431 (-)
IHC							
p16 +	14 (4,4)	101 (51,0)	310 (97,8)	266 (98,9)	3 (100)	0 (0)	694 (62,8)
p16 –	304 (95,6)	97 (49,0)	7 (2,2)	3 (1,1)	0 (0)	0 (0)	411 (37,2)
p16 N/A	60 (-)	8 (-)	6 (-)	12 (-)	23 (-)	224 (-)	333 (-)
Ki67 +	62 (20,0)	188 (94,9)	316 (99,7)	268 (100)	3 (100)	0 (0)	837 (76,4)
Ki67 –	248 (80,0)	10 (5,1)	1 (0,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	259 (23,6)
Ki67 N/A	68 (-)	8 (-)	6 (-)	13 (-)	23 (-)	224 (-)	342 (-)
Stathmin +	13 (6,1)	70 (36,1)	216 (71,8)	259 (97,4)	3 (100)	0 (0)	561 (57,4)
Stathmin –	201 (93,9)	124 (63,9)	85 (28,2)	7 (2,6)	0 (0)	0 (0)	417 (42,6)
Stathmin N/A	164 (-)	12 (-)	22 (-)	15 (-)	23 (-)	224 (-)	460 (-)
Kolposkopie⁴⁾							
Normal	99 (32,7)	14 (7,4)	10 (3,2)	4 (1,5)	0 (0)	28 (33,3)	155 (13,4)
Minor changes	157 (51,8)	137 (72,5)	92 (29,6)	22 (8,2)	0 (0)	26 (31,0)	434 (37,5)
Major changes	47 (15,5)	38 (20,1)	209 (67,2)	238 (89,1)	1 (33,3)	30 (35,7)	563 (48,7)
V. a. CxCa	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (1,1)	2 (66,7)	0 (0)	5 (0,4)
N/A	75 (-)	17 (-)	12 (-)	14 (-)	23 (-)	140 (-)	281 (-)

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung Tabelle 13: Beschreibung der Studienpopulation eingeteilt nach histologischen Gruppen und insgesamt.

	Dysplasiefrei	CIN1	CIN2	CIN3	CxCa	Keine Histologie	Gesamt
BD Onclarity™							
hrHPV +⁵⁾	115 (31,2)	112 (58,6)	277 (94,5)	254 (97,7)	3 (75,0)	59 (28,5)	820 (61,9)
16 +	33 (8,9)	23 (12,0)	103 (35,2)	161 (61,9)	1 (25,0)	20 (9,7)	341 (25,8)
18 +	11 (3,0)	7 (3,7)	22 (7,5)	22 (8,5)	2 (50,0)	6 (2,9)	70 (5,3)
31 +	9 (2,4)	21 (11,0)	64 (21,8)	41 (15,8)	0 (0)	8 (3,9)	143 (10,8)
45 +	7 (1,9)	9 (4,7)	14 (4,8)	9 (3,5)	0 (0)	2 (1,0)	41 (3,1)
51 +	14 (3,8)	13 (6,8)	31 (10,6)	17 (6,5)	0 (0)	3 (1,4)	78 (5,9)
52 +	13 (3,5)	16 (8,4)	32 (10,9)	24 (9,2)	1 (25,0)	7 (3,4)	93 (7,0)
33/58 +	14 (3,8)	13 (6,8)	44 (15,0)	38 (14,6)	0 (0)	11 (5,3)	120 (9,1)
56/59/66 +	40 (10,8)	35 (18,3)	45 (15,4)	21 (8,1)	1 (25,0)	12 (5,8)	154 (11,6)
35/39/68 +	22 (6,0)	23 (12,0)	39 (13,3)	23 (8,8)	0 (0)	8 (3,9)	115 (8,7)
hrHPV –	254 (68,8)	79 (41,4)	16 (5,5)	6 (2,3)	1 (25,0) ⁶⁾	148 (71,5)	504 (38,1)
N/A	9 (-)	15 (-)	30 (-)	21 (-)	22 (-)	17(-)	114 (-)
Therapie							
Ja	29 (7,7)	35 (17,0)	175 (54,2)	238 (84,7)	1 (25,0)	24 (10,7)	504 (35,6)
Nein	349 (92,3)	171 (83,0)	148 (45,8)	43 (15,3)	3 (75,0)	200 (89,3)	912 (64,4)
N/A	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	22 (-)	0 (-)	22 (-)
Konus							
Dysplasiefrei	8 (30,8)	3 (9,7)	1 (0,6)	1 (0,4)	0 (0)	2 (11,8)	15 (3,2)
CIN1	5 (19,2)	14 (45,2)	9 (5,5)	2 (0,9)	0 (0)	3 (17,6)	33 (7,0)
CIN2	8 (30,8)	10 (32,3)	97 (59,1)	9 (3,9)	0 (0)	4 (23,5)	128 (27,2)
CIN3	5 (19,2)	4 (12,9)	56 (34,1)	206 (89,2)	0 (0)	7 (41,2)	278 (59,0)
CxCa	0 (0)	0 (0)	1 (0,6)	13 (5,6)	2 (100)	1 (5,9)	17 (3,6)

Angaben in Median und [Range] bzw. in Anzahl n und (gültige %)

¹⁾ n = 14 und ²⁾ n = 1426; ³⁾ nach Münchener Nomenklatur III; ⁴⁾ nach Kolposkopischer Nomenklatur Rio 2011; ⁵⁾ multiple Infektionen möglich;

⁶⁾ im Multiplex Genotyping und QuantiGene® HPV 73+

CIN = zervikale intraepitheliale Neoplasie; CxCa = Zervixkarzinom; N/A = nicht verfügbar; IZC = Immunzytochemie;

IHC = Immunhistochemie; V. a. = Verdacht auf; hrHPV = high-risk Humanes Papillomvirus

4.2 HPV-Diagnostik mittels QuantiGene®

4.2.1 Definition der Cutoff-Werte

Da es sich beim QG um einen quantitativen Test handelt, mussten für die Auswertung der HPV-Diagnostik zunächst die Cutoff-Werte für HPV-Positivität definiert werden. Hierzu wurden ROC-Analysen durchgeführt, bei denen das MPG-Ergebnis als Goldstandard zugrunde gelegt wurde. Da jede Probe für jeden HPV-Typen das dichotome Merkmal positiv bzw. negativ im MPG besitzt, kann jedem QG-Messwert eine Sensitivität und Spezifität zugeordnet werden. Als Cutoff wurde der Messwert mit dem höchsten Youden-Index festgelegt.

Auf diese Weise erreichte der QG bei allen HPV-Typen außer HPV 68 eine Spezifität von über 90 %. Die Sensitivität des QG lag für HPV 6 und 66 bei unter 40 %, für HPV 51, 52 und 53 bei unter 60 %. Für allen anderen Typen lag sie deutlich über 60 %. **Tabelle 14** zeigt alle HPV-Typen mit ihren Cutoffs und der jeweiligen Sensitivität und Spezifität.

Tabelle 14: Klinische Cutoffs des QuantiGenes® für HPV-Positivität mit Sensitivität, Spezifität und Youden-Index im Vergleich zu den Ergebnissen des Multiplex Genotypings (n = 1403).

HPV-Typ	n ¹⁾	Klinischer Cutoff (MFI)	Sensitivität (%)	Spezifität (%)	Youden-Index
6	26	35,25	38,5	99,6	0,381
16	448	32,25	65,8	97,1	0,629
18	75	54,75	78,7	95,3	0,740
26	1	59,50	100,0	99,9	0,999
31	120	31,75	81,7	95,0	0,767
33	61	28,25	65,6	91,0	0,566
35	25	33,75	84,0	99,6	0,836
39	56	28,75	66,1	95,2	0,613
45	41	64,75	61,0	93,2	0,542
51	86	38,75	54,7	99,3	0,540
52	107	27,75	59,8	96,8	0,566
53	62	26,75	59,7	93,0	0,527
56	78	29,25	60,3	98,7	0,577
58	45	25,25	84,4	97,1	0,815
59	51	26,75	64,7	92,1	0,568
66	60	40,75	33,3	96,5	0,298
68	24	23,75	79,2	78,7	0,579
73	30	55,50	80,0	99,6	0,796
82	24	31,25	66,7	99,0	0,657

MFI = mean fluorescence intensity

¹⁾ bezogen auf das Ergebnis des Multiplex Genotypings; multiple Infektionen möglich

4.2.2 Übereinstimmung mit Multiplex Genotyping und BD Onclarity™

Um die Güte des QG für die HPV-Diagnostik zu beurteilen, wurden die Konkordanz und Cohens Kappa (κ) als Maß der Übereinstimmung mit MPG und BD betrachtet. Die Bewertung von Kappa erfolgte durch die Einteilung nach Landis und Koch.¹³⁰

Bei dem Vergleich dieser beiden etablierten HPV-Tests miteinander, zeigte sich sowohl für die Gesamtdiagnose der 14 wichtigsten hrHPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68), als auch für alle einzelnen bzw. gruppierten Typen eine beachtliche bis fast vollkommene Übereinstimmung ($\kappa = 0,8-0,9$).

Bei der Gesamtdiagnose der 14 hrHPV erreichte der QG eine mittelmäßige Übereinstimmung mit BD ($\kappa = 0,57$) und MPG ($\kappa = 0,49$). Auch bei der Diagnostik der einzelnen HPV-Typen 16, 18, 31 und 45 stimmte der QG mit BD besser überein als mit MPG. Im Vergleich mit MPG zeigte sich eine fast vollkommene Übereinstimmung ($\kappa > 0,8$) für HPV 35 und 73, eine beachtliche Übereinstimmung ($\kappa > 0,6$) für HPV 16, 31, 51, 56 und 58 und eine mittelmäßige Übereinstimmung ($\kappa > 0,4$) für HPV 6, 18, 26, 39, 52 und 82. Für HPV 33, 45, 53, 59, 66 und 68 wies der QG nur eine geringe bis ausreichende Übereinstimmung ($\kappa = 0,1-0,3$) mit MPG auf. Die Zusammenfassung dieser Ergebnisse befindet sich in **Tabelle 15**.

Tabelle 15: Konkordanz und Cohens Kappa (κ) der HPV-Diagnostik mittels QuantiGene® (QG), Multiplex Genotyping (MPG) und BD Onclarity™ (BD).

n	QG vs. MPG		QG vs. BD		MPG vs. BD	
	Konkordanz	κ	Konkordanz	κ	Konkordanz	κ
	1403		1313		1313	
HPV-Typ	Konkordanz	κ	Konkordanz	κ	Konkordanz	κ
14 hrHPV¹⁾	76,8	0,491 ^{***}	79,7	0,568 ^{***}	92,5	0,837 ^{***}
6	98,4	0,469 ^{***}	-	-	-	-
16	87,1	0,679 ^{***}	91,7	0,774 ^{***}	94,3	0,860 ^{***}
18	94,5	0,560 ^{***}	94,4	0,564 ^{***}	99,4	0,940 ^{***}
26	99,9	0,499 ^{***}	-	-	-	-
31	93,9	0,622 ^{***}	93,0	0,648 ^{***}	97,0	0,824 ^{***}
33	89,9	0,317 ^{***}	-	-	-	-
35	99,4	0,820 ^{***}	-	-	-	-
39	94,1	0,443 ^{***}	-	-	-	-
45	92,3	0,286 ^{***}	92,3	0,308 ^{***}	99,3	0,883 ^{***}
51	96,6	0,645 ^{***}	96,3	0,607 ^{***}	97,9	0,804 ^{***}
52	94,0	0,571 ^{***}	94,2	0,569 ^{***}	99,2	0,937 ^{***}
53	91,5	0,344 ^{***}	-	-	-	-
56	96,6	0,644 ^{***}	-	-	-	-
58	96,7	0,602 ^{***}	-	-	-	-
59	91,1	0,309 ^{***}	-	-	-	-
66	93,8	0,283 ^{***}	-	-	-	-
68	78,7	0,084 ^{***}	-	-	-	-
73	99,2	0,810 ^{***}	-	-	-	-
82	98,4	0,585 ^{***}	-	-	-	-
P1 (33/58)	-	-	87,7	0,405 ^{***}	97,9	0,858 ^{***}
P2 (56/59/66)	-	-	87,1	0,451 ^{***}	96,9	0,856 ^{***}
P3 (35/39/68)	-	-	78,0	0,254 ^{***}	96,9	0,789 ^{***}

hrHPV = high-risk Humanes Papillomvirus

Darstellung in Anlehnung an die VALGENT-Studie⁷⁷; Einteilung der Kappa-Werte nach Landis und Koch¹³⁰: rosa: $\kappa = 0-0,2$; orange: $\kappa = 0,21-0,4$; gelb: $\kappa = 0,41-0,6$; hellgrün: $\kappa = 0,61-0,8$; dunkelgrün: $\kappa = 0,81-1,0$

¹⁾enthält die 14 wichtigsten hrHPV: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68

*** $p \leq 0,001$

4.2.3 Klinische Aussagekraft der HPV-Diagnostik

Die Diagnostik von HPV-Infektionen soll in erster Linie Hinweise auf das Vorliegen von zervikalen Dysplasien geben. Deshalb soll ein effektiver HPV-Test nicht zwangsläufig jede Infektion erkennen, sondern vor allem möglichst sensitiv und spezifisch klinisch relevante Infektionen diagnostizieren. Testpositivität bedeutet im Folgenden in Anlehnung an das VALGENT-Studiendesign, dass mindestens einer der 14 riskantesten hrHPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) positiv getestet wurde.⁷⁷

Sowohl MPG als auch BD erkannten zervikale Dysplasien (CIN2+ und CIN3+) mit höherer Sensitivität als der QG (beide ca. 94 % vs. 84,1 % für CIN2+ und ca. 94 % versus 86,6 % für CIN3+). Die höchste Spezifität zeigte BD mit 59,2 % für CIN2+ und 40,7 % für CIN3+. Der QG

erreichte eine vergleichbare Spezifität von 52,8 % für CIN2+ und 40,4 % für CIN3+. Insgesamt fiel die Spezifität für zervikale Dysplasien bei den drei untersuchten HPV-Tests sehr gering aus.

Der QG ist ein quantitativer HPV-Test, der im Gegensatz zu MPG und BD nicht das Vorliegen von viraler DNA misst, sondern die E7-Expression auf mRNA-Basis bestimmt. Da die E7-Expression mit der Viruslast und der Dysplasieschwere korreliert, wurde durch Erhöhung der Cutoffs eine höhere Spezifität erzielt.^{92,93} Eine Erhöhung des Cutoffs um 1 MFI führte dabei bereits zu einem Anstieg der Spezifität auf 56,7 % für CIN2+ und 43,4 % für CIN3+, allerdings auch zu einem Abfall der Sensitivität. Eine Erhöhung aller Cutoffs um 10 MFI führte zu 75,4 % Spezifität und 70,1 % Sensitivität für CIN2+ und zu 55,4 % Spezifität und 80,3 % Sensitivität für CIN3+. So konnte durch die Quantifizierung der HPV-Testung eine spezifischere Aussage über das Krankheitsstadium getroffen werden. Die Sensitivität und Spezifität der verschiedenen HPV-Tests für CIN2+ und CIN3+ sind zusammenfassend in **Tabelle 16** dargestellt.

Tabelle 16: Sensitivität und Spezifität des QuantiGenes[®] (QG) mit verschiedenen Cutoffs, des Multiplex Genotypings (MPG) und des BD Onclarity[™] (BD) für die Diagnose von CIN2+ und CIN3+.

HPV-Test	n	CIN2+		CIN3+	
		Sensitivität (%)	Spezifität (%)	Sensitivität (%)	Spezifität (%)
QG (Cutoffs + 0)	1199	84,1	52,8	86,6	40,4
QG (Cutoffs + 1)	1199	82,9	56,7	85,6	43,4
QG (Cutoffs + 10)	1199	70,1	75,4	80,3	55,4
MPG	1199	93,7	51,9	94,0	35,7
BD	1126	94,0	59,2	93,5	40,7

4.3 Dysplasiediagnostik mittels QuantiGene®

Der folgende Teil der Arbeit befasst sich mit den Unterschieden der Biomarkerexpression in den verschiedenen Stadien der zervikalen Dysplasie. **Abbildung 9**, in der exemplarisch die Expression einiger Biomarker in den verschiedenen Krankheitsstadien dargestellt ist, weist bereits darauf hin, dass ein Teil der Biomarker (z. B. führender HPV, p16) kontinuierlich über den Krankheitsverlauf und ein anderer Teil (z. B. Stathmin, BIRC5) erst ab einem bestimmten Krankheitsstadium sprunghaft ansteigt. Deshalb wurden zwei Modelle untersucht: das kontinuierliche Modell mittels Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman (4.3.1) und das stufenartige Modell mittels ROC-Analysen und binärer logistischer Regression, in dem die Krankheitsstadien zu Krankheitsschwellen (CIN2+, CIN3+, Zervixkarzinom) dichotomisiert wurden. Aus den Ergebnissen der multivariaten logistischen Regressionen ergaben sich Risikoscores für die Krankheitsschwellen (4.3.2). Außerdem wurde der Einfluss möglicher Confounder auf den Zusammenhang zwischen Biomarkerexpression und Krankheitsstadium (4.3.3) und eine mögliche prognostische Aussagekraft der Biomarker untersucht (4.3.4).

Für die Analyse der Dysplasiediagnostik mittels QG wurden nur die 1135 Studienteilnehmerinnen berücksichtigt, die sich einer klinischen Gruppe zuordnen ließen (**Tabelle 17**).

Tabelle 17: Häufigkeiten der klinischen Gruppen in der untersuchten Studienpopulation.

Klinische Gruppe	Beschreibung	n (%)
0	HPV negativ und histologisch unauffällig	181 (15,9)
1	HPV positiv und histologisch unauffällig	177 (15,6)
2	HPV positiv und CIN1	133 (11,7)
3	HPV positiv und CIN2	274 (24,1)
4	HPV positiv und CIN3	330 (29,1)
5	HPV positiv und Zervixkarzinom	40 (3,5)
Gesamt		1135 (100)

CIN = zervikale intraepitheliale Neoplasie

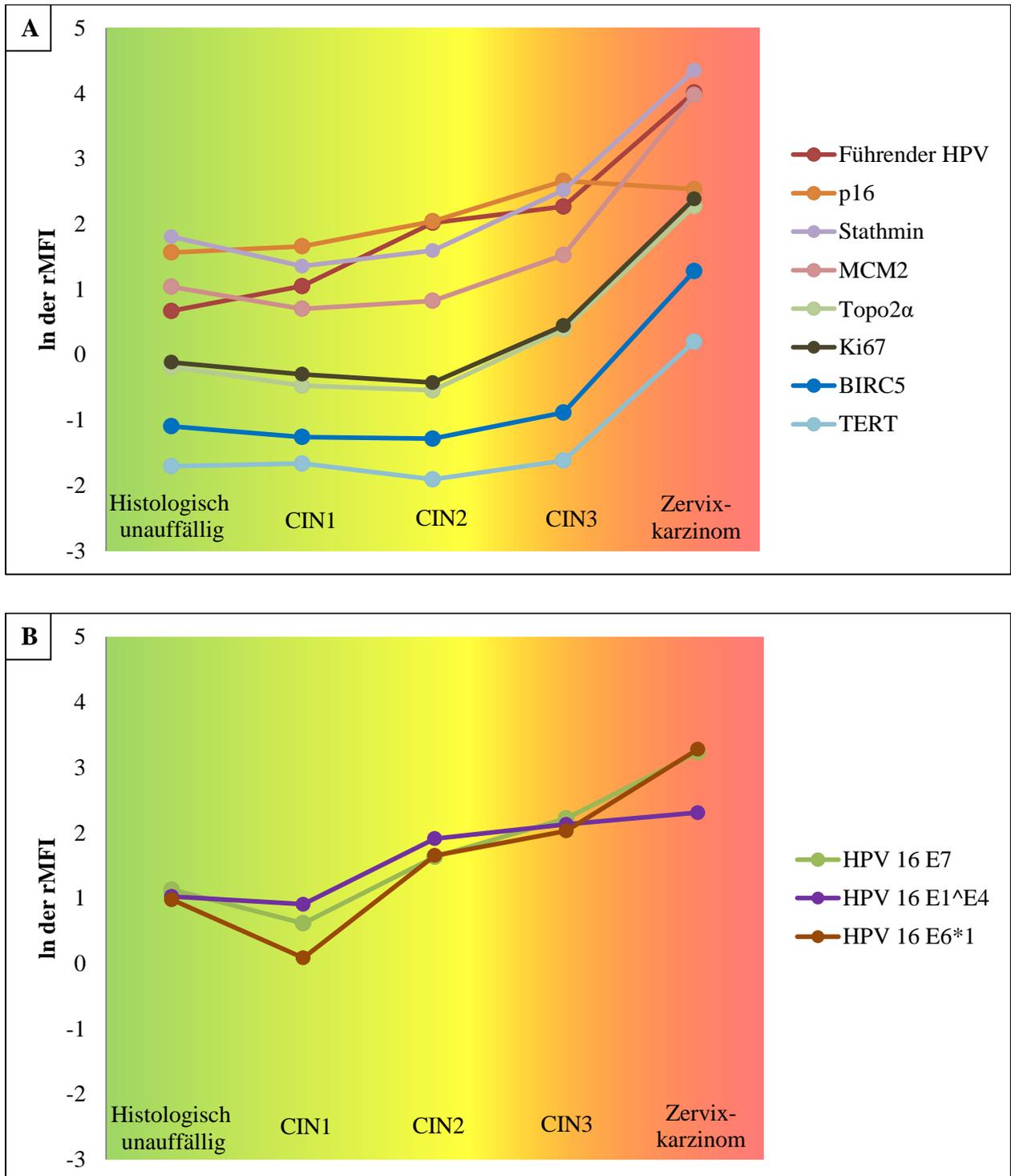


Abbildung 9: Mediane der Biomarkerexpression in verschiedenen Stadien der zervikalen intraepithelialen Neoplasie (CIN) und in Zervixkarzinomen bei **A)** hrHPV-positiven Frauen (n = 954) und bei **B)** HPV-16-positiven Frauen (n = 328). Zur besseren Darstellung sind die natürlichen Logarithmen (ln) der relativen *mean fluorescence intensity* (rMFI) abgebildet.

4.3.1 Korrelation der Biomarkerexpression mit den Krankheitsstadien

Mit Hilfe des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman (r_s) wurde der Datensatz auf das Bestehen eines kontinuierlichen Zusammenhangs zwischen der Expressionsstärke der Biomarker und den Krankheitsstadien überprüft. Dabei zeigte sich die stärkste Korrelation für den führenden HPV-Typ ($r_s = 0,54$). Die folgenden Biomarker wiesen in abnehmender Korrelationsstärke eine signifikante positive Korrelation mit $r_s \geq 0,3$ auf: p16, HPV 16 E7, E6*I und E1^E4, MCM2, Stathmin, Ki67 und Topo2 α . MMP7 korrelierte als einziger Marker negativ mit dem Krankheitsstadium. In **Tabelle 18** befinden sich alle Ergebnisse dieser Analyse.

Tabelle 18: Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman (r_s) für den Zusammenhang zwischen der Biomarkerexpression und den Krankheitsstadien (n = 1135).

Biomarker	r_s
Führender HPV	0,543***
p16	0,449***
HPV 16 E7	0,391***
HPV 16 E6*I	0,385***
HPV 16 E1^E4	0,378***
MCM2	0,305***
Stathmin	0,305***
Ki67	0,298***
Topo2 α	0,292***
KRT7	0,233***
KRT17	0,229***
BIRC5	0,228***
p63	0,214***
MMP7	-0,162***
SOX2	0,161***
ALDH1L1	0,147***
HPV 16 E1C	0,127***
TERT	0,117***
ALDH1A1	0,070*
p53	0,067*
GDA	0,066*
CD63	-0,026
POU5FI	0,020
ARG2	-0,001
NANOG	< 0,001

*** $p \leq 0,001$; * $p \leq 0,05$

4.3.2 Modellentwicklung der Risikoscores für die Krankheitsstadien

Für alle definierten Krankheitsschwellen (CIN2+, CIN3+, Zervixkarzinom) wurden zunächst ROC-Analysen durchgeführt und die metrischen Biomarker anhand des besten Cutoffs nach Youden-Index dichotomisiert. Eine reduzierte Auswahl der Biomarker, solche mit signifikanter AUC der ROC-Kurve, wurde in die univariate logistische Regression eingeschlossen. Da das

Regressionsmodell der multivariaten Analyse durch zu viele unabhängige Variablen instabil wird, gingen in die multivariate logistische Regression nur die Biomarker mit der höchsten OR (in der univariaten Analyse) ein. Aus den Ergebnissen der multivariaten Analyse wurde der Risikoscore für die jeweilige Krankheitsschwelle entwickelt.

Krankheitsschwelle CIN2+

Gemessen an den AUC der ROC-Kurven eigneten sich folgende Biomarker am besten zur Differenzierung zwischen gesunden Frauen bzw. Frauen mit CIN1 und Frauen mit CIN2–3 bzw. Zervixkarzinom (CIN2+): führender HPV, p16, HPV 16 E7 und die HPV-16-Splicemarker E6*I und E1^E4 (AUC = 0,7–0,8). Die ROC-Kurven dieser fünf Biomarker sind in **Abbildung 10** dargestellt. Insgesamt erreichten 17 der 25 Biomarker signifikante AUC für die Krankheitsschwelle CIN2+ (**Tabelle 19**).

Tabelle 19: AUC (*areas under the curve*) der ROC-Kurven aller Biomarker für die Krankheitsschwelle CIN2+ (n = 1135).

Biomarker	AUC	95 % CI
Führender HPV	0,767***	0,739–0,795
p16	0,733***	0,704–0,762
HPV 16 E7	0,689***	0,658–0,719
HPV 16 E6*I	0,677***	0,646–0,708
HPV 16 E1^E4	0,675***	0,645–0,706
Stathmin	0,631***	0,599–0,663
MCM2	0,630***	0,598–0,662
KRT17	0,618***	0,585–0,650
Ki67	0,614***	0,582–0,647
Topo2 α	0,613***	0,581–0,646
KRT7	0,612***	0,579–0,645
p63	0,587***	0,553–0,620
BIRC5	0,581***	0,548–0,614
ALDH1L1	0,568***	0,534–0,602
SOX2	0,559***	0,525–0,592
HPV 16 E1C	0,547**	0,513–0,580
MMP7	0,394***	0,361–0,427
TERT	0,525	0,492–0,559
GDA	0,512	0,478–0,547
p53	0,507	0,473–0,540
ALDH1A1	0,502	0,468–0,535
POU5FI	0,490	0,456–0,524
ARG2	0,486	0,452–0,520
CD63	0,472	0,438–0,506
NANOG	0,467	0,433–0,500

CI = Konfidenzintervall

*** $p \leq 0,001$; ** $p \leq 0,01$

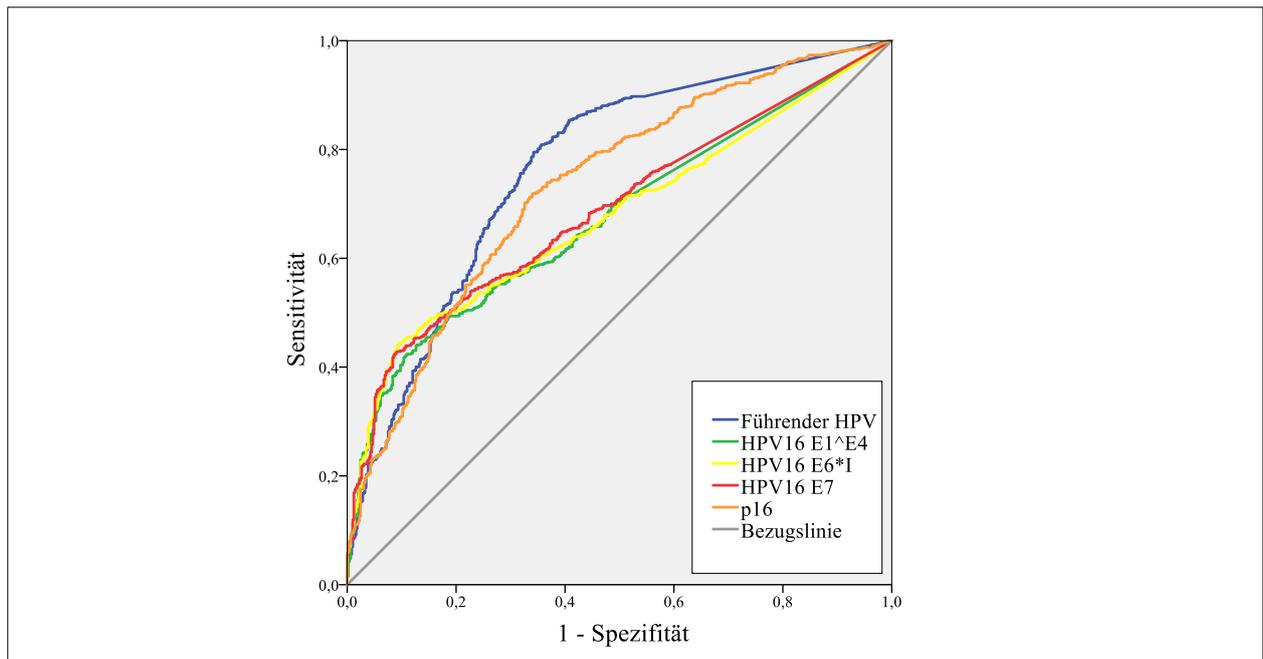


Abbildung 10: ROC-Kurven der Biomarker mit den höchsten AUC (*areas under the curve*) für die Krankheitsschwelle CIN2+ (n = 1135).

In der univariaten logistischen Regression ergaben der führende HPV und die HPV-16-Onkogene E7 und E6*I die höchste OR für die Diagnose von CIN2+. Wird für nur einen dieser Marker ein Wert höher als der jeweilige Cutoff gemessen, so erhöht sich die Wahrscheinlichkeit für eine CIN2+ um das 7–8-fache. In der multivariaten logistischen Regression wurden nur Biomarker mit einer univariaten OR > 3 berücksichtigt. Die Kombination aus dem führenden HPV (OR = 3,9), p16 (OR = 2,5), HPV 16 E6*I (OR = 2,1), HPV 16 E1^E4 (OR = 1,8) und Stathmin (OR = 1,5) ergab den besten Vorhersagewert. Die durch ROC-Analyse ermittelten Cutoffs sowie die zugehörigen Werte für Sensitivität und Spezifität und die durch die logistische Regression ermittelten OR sind in **Tabelle 20** zusammengefasst.

Tabelle 20: Cutoffs aus der ROC-Analyse mit zugehöriger Sensitivität und Spezifität und Ergebnis der logistischen Regression für die Krankheitsschwelle CIN2+ (n = 1135). Die Biomarker, die in die multivariate Analyse eingeschlossen wurden, sind fett gedruckt.

Biomarker	Cutoff (rMFI)	Sens. (%)	Spez. (%)	Univariat		Multivariat	
				OR	95 % CI	OR	95 % CI
Führender HPV	1,34	80,9	64,4	7,649^{***}	5,841–10,016	3,913^{***}	2,903–5,275
HPV 16 E7	1,42	42,7	91,0	7,571 ^{***}	5,352–10,710	—	—
HPV 16 E6*I	1,17	44,4	90,4	7,547^{***}	5,380–10,587	2,050^{**}	1,198–3,505
HPV 16 E1^E4	1,00	41,8	89,6	6,189^{***}	4,451–8,604	1,845[*]	1,092–3,116
p16	6,47	71,9	66,0	4,963^{***}	3,851–6,396	2,530^{***}	1,893–3,382
Stathmin	17,33	33,4	87,2	3,405^{***}	2,494–4,647	1,511[*]	1,039–2,198
MCM2	5,60	38,8	83,9	3,288 ^{***}	2,464–4,386	—	—
Topo2a	2,10	36,5	84,9	3,195^{***}	2,379–4,290	—	—
Ki67	2,03	37,3	82,1	2,721 ^{***}	2,055–3,602	—	—
KRT17	66,02	63,4	57,2	2,313 ^{***}	1,820–2,941	—	—
KRT7	102,07	39,6	76,4	2,119 ^{***}	1,632–2,752	—	—
p63	1,11	64,0	50,7	1,827 ^{***}	1,439–2,321	—	—
BIRC5	0,33	54,3	58,5	1,675 ^{***}	1,321–2,123	—	—
ALDH1L1	2,73	62,3	50,1	1,657 ^{***}	1,306–2,102	—	—
SOX2	0,15	53,9	58,7	1,640 ^{***}	1,294–2,079	—	—
HPV 16 E1C	0,17	41,9	67,2	1,451 [*]	1,135–1,855	—	—
MMP7	698,69	1,1	99,4	1,788	0,460–6,948	—	—

Sens. = Sensitivität; Spez. = Spezifität; rMFI = relative mean fluorescence intensity; CI = Konfidenzintervall

*** $p \leq 0,001$; ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$

Durch das Einsetzen der Konstante der multivariaten Regression und der Regressionskoeffizienten der jeweiligen Variablen in das Grundmodell der Regressionsfunktion (Formel 1) ergab sich der Risikoscore für das Vorliegen einer CIN2+ (**Formel 2**).

Formel 2: Risikoscore für das Vorliegen einer CIN2+.

$$p(\text{CIN2}+) = \frac{1}{1 + e^{-(1,430 + 1,364 \cdot x_1 + 0,718 \cdot x_2 + 0,612 \cdot x_3 + 0,928 \cdot x_4 + 0,413 \cdot x_5)}}$$

$x_1 = 0$ bzw. 1 , wenn führender HPV < bzw. > $1,34$ rMFI
 $x_2 = 0$ bzw. 1 , wenn HPV 16 E6*I < bzw. > $1,17$ rMFI
 $x_3 = 0$ bzw. 1 , wenn HPV 16 E1^E4 < bzw. > $1,00$ rMFI
 $x_4 = 0$ bzw. 1 , wenn p16 < bzw. > $6,47$ rMFI
 $x_5 = 0$ bzw. 1 , wenn Stathmin < bzw. > $17,33$ rMFI

Der Risikoscore für das Vorliegen einer CIN2+ wurde in einer ROC-Analyse erneut auf seine diagnostische Güte überprüft und ergab eine AUC von 0,81, die deutlich über den AUC der einzelnen Biomarker lag. **Tabelle 21** zeigt den idealen Cutoff (0,51) mit entsprechender Sensitivität (73,4 %) und Spezifität (78,0 %). Die ROC-Kurve ist in **Abbildung 11** dargestellt.

Tabelle 21: Ergebnis der ROC-Analyse des Risikoscores für das Vorliegen einer CIN2+ nach Formel 2 (n = 1135).

AUC	95 % CI	Cutoff für p (CIN2+)	Sensitivität (%)	Spezifität (%)
0,813 ^{***}	0,788–0,838	0,51	73,4	78,0

AUC = area under the curve; CI = Konfidenzintervall

^{***} $p \leq 0,001$

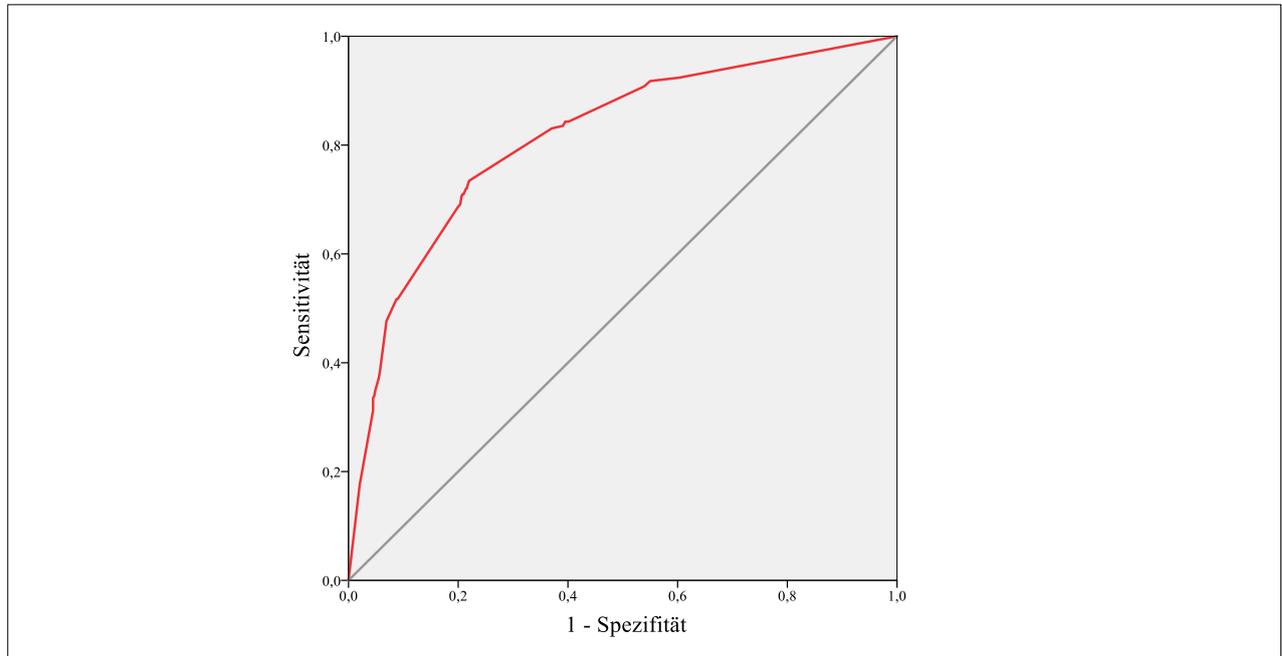


Abbildung 11: ROC-Kurve des Risikoscores für das Vorliegen einer CIN2+ nach Formel 2 (n = 1135).

Krankheitsschwelle CIN3+

Gemessen an den AUC der ROC-Analyse gehörte der HPV-16-Splicemarker E1[^]E4 bei der Krankheitsschwelle CIN3+, im Gegensatz zu der Schwelle CIN2+, nicht mehr zu den fünf aussagekräftigsten Biomarkern und wurde durch Stathmin ersetzt. Als stärkster Biomarker zur Differenzierung zwischen gesunden Frauen bzw. Frauen mit CIN1–2 und Frauen mit CIN3 bzw. Zervixkarzinom (CIN3+) erwies sich p16. Sowohl HPV 16 E6*1 und E7 als auch der führende HPV zeigten weiterhin eine hohe Aussagekraft. Die ROC-Kurven der fünf aussagekräftigsten Biomarker sind in **Abbildung 12** dargestellt. Insgesamt waren die AUC fast aller Biomarker signifikant und erreichten im Schnitt höhere Werte als bei der Krankheitsschwelle CIN2+ (**Tabelle 22**).

Tabelle 22: AUC (*areas under the curve*) der ROC-Kurven aller Biomarker für die Krankheitsschwelle CIN3+ (n = 1135).

Biomarker	AUC	95 % CI
p16	0,747 ^{***}	0,716–0,778
HPV 16 E6*I	0,715 ^{***}	0,680–0,749
HPV 16 E7	0,712 ^{***}	0,678–0,747
Stathmin	0,708 ^{***}	0,676–0,741
Führender HPV	0,707 ^{***}	0,677–0,738
HPV 16 E1^E4	0,704 ^{***}	0,670–0,738
Ki67	0,698 ^{***}	0,665–0,732
Topo2α	0,695 ^{***}	0,662–0,728
MCM2	0,693 ^{***}	0,659–0,727
KRT7	0,649 ^{***}	0,615–0,683
p63	0,646 ^{***}	0,611–0,681
BIRC5	0,631 ^{***}	0,596–0,666
KRT17	0,624 ^{***}	0,590–0,659
ALDH1L1	0,595 ^{***}	0,560–0,630
p53	0,579 ^{***}	0,542–0,615
SOX2	0,576 ^{***}	0,540–0,612
ALDH1A1	0,563 ^{***}	0,526–0,600
TERT	0,563 ^{***}	0,527–0,600
HPV 16 E1C	0,559 ^{***}	0,524–0,595
GDA	0,554 ^{**}	0,518–0,589
MMP7	0,423 ^{***}	0,387–0,459
POU5FI	0,521	0,485–0,557
CD63	0,515	0,480–0,550
ARG2	0,489	0,453–0,524
NANOG	0,485	0,448–0,521

CI = Konfidenzintervall

*** $p \leq 0,001$; ** $p \leq 0,01$

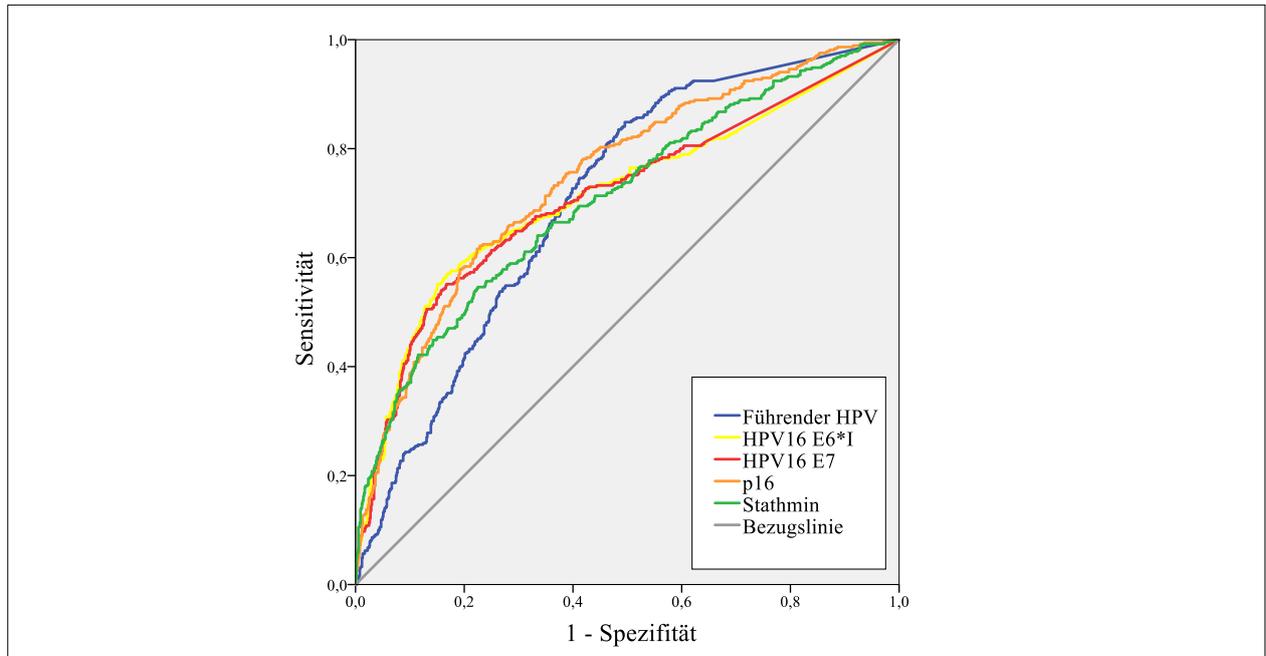


Abbildung 12: ROC-Kurven der Biomarker mit den höchsten AUC (*areas under the curve*) für die Krankheitsschwelle CIN3+ (n = 1135).

In der univariaten logistischen Regression ergaben HPV 16 E6*I und E1^E4 bei Werten über dem jeweiligen Cutoff die höchste OR (6,9 bzw. 6,1) für die Diagnose von CIN3+. In der multivariaten Regression, in die alle Biomarker mit einer univariaten OR > 3 eingeschlossen wurden, wies die Kombination von p16 (OR = 3,0), dem führenden HPV, HPV 16 E1^E4, E6*I (OR = 2,0–2,2) und MCM2 (OR = 1,8) den besten Vorhersagewert für CIN3+ auf. Die durch ROC-Analyse ermittelten Cutoffs sowie die zugehörigen Werte für Sensitivität und Spezifität und die durch die logistische Regression ermittelten OR sind in **Tabelle 23** zusammengefasst.

Tabelle 23: Cutoffs aus der ROC-Analyse mit zugehöriger Sensitivität und Spezifität und Ergebnis der logistischen Regression für die Krankheitsschwelle CIN3+ (n = 1135). Die Biomarker, die in die multivariate Analyse eingeschlossen wurden, sind fett gedruckt.

Biomarker	Cutoff (rMFI)	Sens. (%)	Spez. (%)	Univariat		Multivariat	
				OR	95 % CI	OR	95 % CI
HPV 16 E6*I	1,34	55,1	85,0	6,946^{***}	5,223–9,238	2,008^{**}	1,221–3,303
HPV 16 E1^E4	1,05	53,2	84,3	6,121^{**}	4,615–8,117	2,087^{**}	1,288–3,383
HPV 16 E7	1,09	55,1	83,3	6,116^{**}	4,625–8,086	—	—
Führender HPV	1,40	84,9	50,5	5,711^{**}	4,156–7,846	2,213^{***}	1,538–3,185
p16	11,10	62,2	77,1	5,539^{***}	4,231–7,252	2,996^{***}	2,199–4,082
Stathmin	12,21	54,6	77,5	4,145^{***}	3,178–5,408	—	—
MCM2	5,19	51,9	79,2	4,111^{***}	3,143–5,377	1,790^{***}	1,298–2,469
Topo2α	1,87	50,0	80,0	4,000^{***}	3,053–5,240	—	—
Ki67	0,94	70,5	59,9	3,545^{***}	2,718–4,625	—	—
p63	1,73	61,4	62,2	2,585 ^{***}	2,003–3,336	—	—
KRT7	73,70	61,4	61,2	2,501 ^{***}	1,939–3,227	—	—
KRT17	66,68	67,6	52,7	2,319 ^{***}	1,789–3,008	—	—
BIRC5	0,29	66,2	53,6	2,228 ^{***}	1,721–2,884	—	—
ALDH1A1	2,35	35,4	78,2	1,963 ^{**}	1,493–2,580	—	—
SOX2	0,39	47,6	68,8	1,975 ^{***}	1,531–2,549	—	—
p53	9,93	41,4	73,6	1,952 ^{***}	1,502–2,536	—	—
ALDH1L1	2,90	65,7	50,2	1,906 ^{***}	1,474–2,464	—	—
TERT	0,40	38,1	73,9	1,711 ^{***}	1,313–2,231	—	—
GDA	2,46	55,7	56,9	1,647 ^{***}	1,283–2,115	—	—
HPV 16 E1C	0,15	47,3	63,7	1,546 ^{**}	1,202–1,988	—	—
MMP7	698,69	1,6	99,5	3,136	0,880–11,181	—	—

Sens. = Sensitivität; *Spez.* = Spezifität; *rMFI* = relative mean fluorescence intensity; *CI* = Konfidenzintervall

^{***} $p \leq 0,001$; ^{**} $p \leq 0,01$

Zur Berechnung des Risikos für das Vorliegen einer CIN3+ ergab sich aus der multivariaten logistischen Regression **Formel 3**.

Formel 3: Risikoscore für das Vorliegen einer CIN3+.

$$p(\text{CIN3}+) = \frac{1}{1 + e^{-(2,396 + 0,697 \cdot x_1 + 0,736 \cdot x_2 + 0,794 \cdot x_3 + 1,097 \cdot x_4 + 0,582 \cdot x_5)}}$$

$x_1 = 0$ bzw. 1 , wenn HPV 16 E6*I < bzw. > 1,34 rMFI
 $x_2 = 0$ bzw. 1 , wenn HPV 16 E1^E4 < bzw. > 1,05 rMFI
 $x_3 = 0$ bzw. 1 , wenn führender HPV < bzw. > 1,40 rMFI
 $x_4 = 0$ bzw. 1 , wenn p16 < bzw. > 11,10 rMFI
 $x_5 = 0$ bzw. 1 , wenn MCM2 < bzw. > 5,19 rMFI

Der Risikoscore für das Vorliegen einer CIN3+ ergab in der ROC-Analyse eine AUC von 0,81. Die ROC-Kurve und die ermittelten Cutoffs mit ihrer Sensitivität und Spezifität sind in **Abbildung 13** und **Tabelle 24** dargestellt. Der Cutoff 0,27 ist zwar nach Youden-Index am besten geeignet, besitzt jedoch eine mittelmäßige Spezifität (73,3 %) und Sensitivität (77,6 %). Da aber bei diesem hohen Krankheitsstadium besonderer Wert auf eine hohe Sensitivität gelegt werden soll, eignet sich der Cutoff 0,19 mit einer Sensitivität von 82,4 % bei 63,3 % Spezifität besser.

Tabelle 24: Ergebnis der ROC-Analyse des Risikoscores für das Vorliegen einer CIN3+ nach Formel 3 (n = 1135).

AUC	95 % CI	Cutoff für p (CIN3+)	Sensitivität (%)	Spezifität (%)
0,808 ^{***}	0,780–0,836	0,19	82,4	63,3
		0,27	77,6	73,3

AUC = area under the curve; CI = Konfidenzintervall

^{***} $p \leq 0,001$

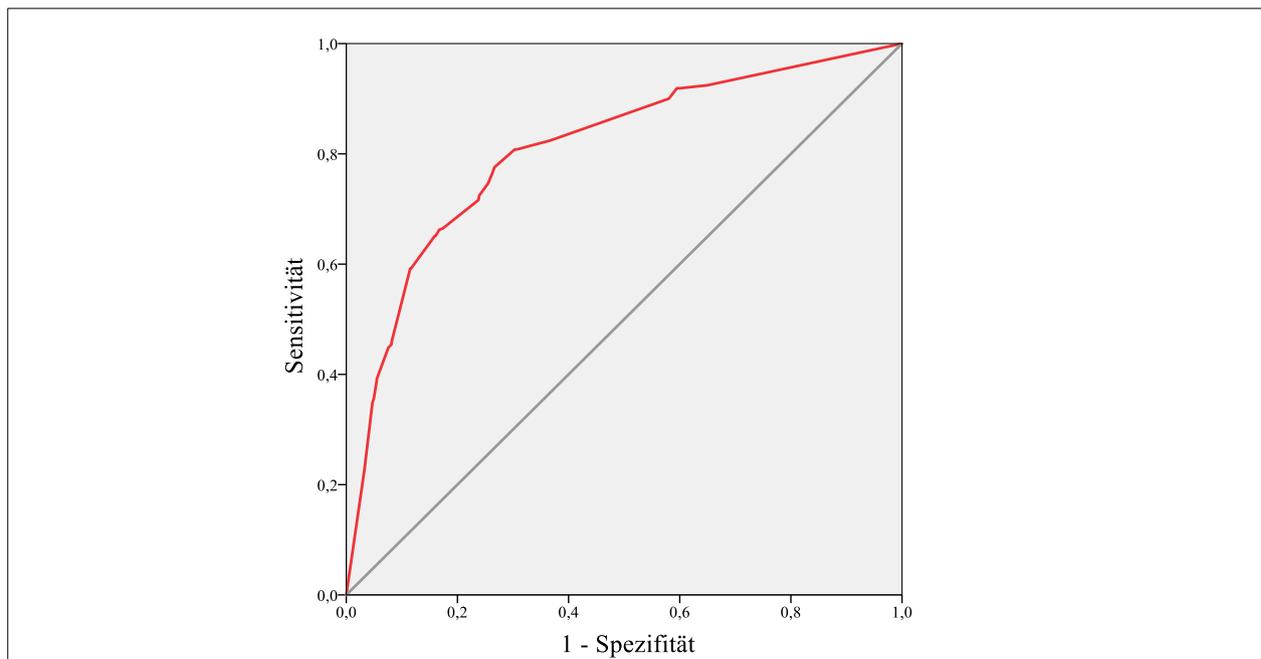


Abbildung 13: ROC-Kurve des Risikoscores für das Vorliegen einer CIN3+ nach Formel 3 (n = 1135).

Krankheitsschwelle zum Zervixkarzinom

Nach den Ergebnissen der ROC-Analyse zu urteilen eignete sich MCM2 (AUC = 0,90) am besten zur Diagnose des Zervixkarzinoms, gefolgt von Ki67, Topo2 α , BIRC5 und Stathmin. Mit Ausnahme von Stathmin wurden hier andere Biomarker relevant als bei den Krankheitsschwellen CIN2+ und CIN3+. Die ROC-Kurven der Biomarker mit den höchsten AUC sind in **Abbildung 14** dargestellt. Außer MMP7 und GDA wiesen alle Biomarker signifikante AUC auf, die insgesamt deutlich über den AUC für CIN2+ und CIN3+ lagen (**Tabelle 25**).

Tabelle 25: AUC (*areas under the curve*) der ROC-Kurven aller Biomarker für die Krankheitsschwelle zum Zervixkarzinom (n = 1135).

Biomarker	AUC	95 % CI
MCM2	0,901 ^{***}	0,849–0,953
Ki67	0,895 ^{***}	0,845–0,945
Topo2 α	0,886 ^{***}	0,836–0,937
BIRC5	0,877 ^{***}	0,814–0,941
Stathmin	0,871 ^{***}	0,811–0,930
TERT	0,849 ^{***}	0,791–0,908
Führender HPV	0,838 ^{***}	0,783–0,892
ALDH1A1	0,812 ^{***}	0,729–0,894
HPV 16 E6*I	0,810 ^{***}	0,749–0,872
NANOG	0,800 ^{***}	0,730–0,869
p53	0,788 ^{***}	0,696–0,879
POU5FI	0,785 ^{***}	0,704–0,866
p63	0,778 ^{***}	0,710–0,846
GDA	0,754 ^{***}	0,672–0,835
HPV 16 E7	0,740 ^{***}	0,650–0,829
HPV 16 E1C	0,709 ^{***}	0,620–0,797
KRT17	0,695 ^{***}	0,605–0,785
HPV 16 E1^E4	0,692 ^{***}	0,607–0,776
p16	0,687 ^{***}	0,599–0,776
SOX2	0,685 ^{***}	0,592–0,779
KRT7	0,664 ^{**}	0,574–0,754
ALDH1L1	0,632 ^{**}	0,532–0,728
CD63	0,630 ^{**}	0,532–0,728
ARG2	0,588	0,498–0,679
MMP7	0,585	0,485–0,684

CI = Konfidenzintervall

*** $p \leq 0,001$; ** $p \leq 0,01$

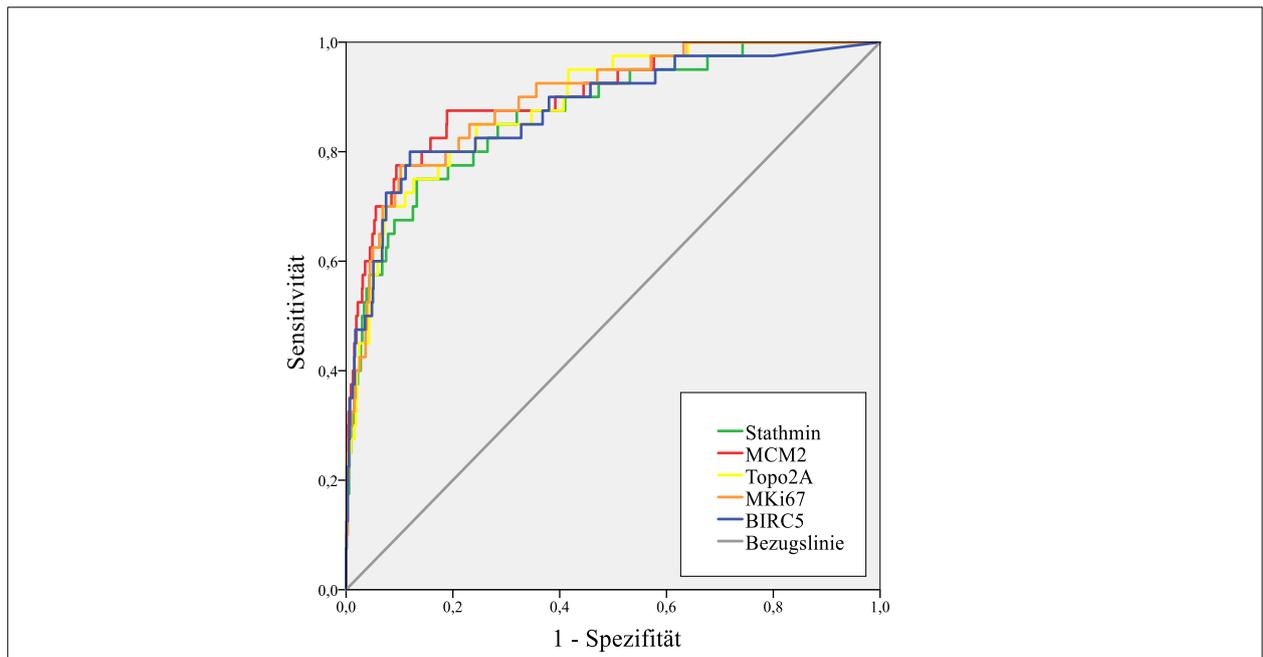


Abbildung 14: ROC-Kurven der Biomarker mit den höchsten AUC (*areas under the curve*) für die Krankheitsschwelle zum Zervixkarzinom (n = 1135).

Wie bei den Krankheitsschwellen zuvor wurden alle Biomarker mit signifikanter AUC, dichotomisiert anhand des besten Cutoffs nach Youden-Index, in die univariate logistische Regression einbezogen. Für MCM2, Topo2 α und Ki67 ergaben sich hierbei OR von 30, sodass ein Messwert dieser Biomarker über den jeweiligen Cutoffs mit einer 30-fach erhöhten Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen eines Zervixkarzinoms gegenüber dem Vorliegen einer gesunden Zervix oder einer CIN einhergeht. Um ein stabiles Regressionsmodell zu erhalten wurden in die multivariate Analyse nur die Biomarker mit einer $OR \geq 10$ eingeschlossen. Die Kombination aus MCM2, BIRC5, ALDH1A1, TERT und dem führenden HPV ergab den besten diagnostischen Vorhersagewert. Die OR dieser Biomarker lagen in der multivariaten Analyse zwischen 3 und 4, wobei ALDH1A1 in dieser Kombination den besten Biomarker darstellte ($OR = 4,2$). Die durch ROC-Analyse ermittelten Cutoffs sowie die zugehörigen Werte für Sensitivität und Spezifität und die durch die logistische Regression ermittelten OR sind in **Tabelle 26** zusammengefasst.

Tabelle 26: Cutoffs aus der ROC-Analyse mit zugehöriger Sensitivität und Spezifität und Ergebnis der logistischen Regression für die Krankheitsschwelle zum Zervixkarzinom (n = 1135). Die Biomarker, die in die multivariate Analyse eingeschlossen wurden, sind fett gedruckt.

Biomarker	Cutoff (rMFI)	Sens. (%)	Spez. (%)	Univariat		Multivariat	
				OR	95 % CI	OR	95 % CI
MCM2	7,96	87,5	81,1	30,029***	11,623–77,582	4,020*	1,295–12,478
Topo2α	6,44	70,0	92,8	30,008***	14,695–61,278	—	—
Ki67	5,25	77,5	89,8	29,933***	13,898–64,470	—	—
BIRC5	1,52	80,0	88,0	25,347***	11,804–54,429	3,411*	1,315–8,845
Stathmin	28,77	75,0	86,8	19,655***	9,409–41,060	—	—
ALDH1A1	2,99	77,5	80,4	14,098***	6,613–30,054	4,236***	1,838–9,767
TERT	0,49	80,0	77,1	13,312***	6,058–29,256	3,208*	1,277–8,062
p53	13,73	72,5	80,9	11,176***	5,494–22,737	—	—
Führender HPV	13,43	80,0	71,3	9,949***	4,535–21,828	3,133*	1,303–7,533
NANOG	1,76	67,5	81,3	9,017***	4,573–17,778	—	—
POU5FI	3,33	82,5	64,5	8,488***	3,720–19,367	—	—
p63	5,55	67,5	79,8	8,214***	4,170–16,179	—	—
HPV 16 E6*I	1,20	77,5	72,7	7,987***	3,857–16,538	—	—
GDA	3,86	77,5	67,1	7,032***	3,313–14,929	—	—
HPV 16 E7	2,05	65,0	76,2	5,934***	3,054–11,533	—	—
p16	23,07	42,5	88,6	5,736***	2,982–11,031	—	—
HPV 16 E1^E4	0,53	70,0	69,5	5,248***	2,637–10,446	—	—
HPV 16 E1C	0,45	55,0	81,1	4,770***	2,518–9,035	—	—
KRT17	115,24	60,0	72,6	3,957***	2,073–7,552	—	—
ALDH1L1	11,91	37,5	86,8	3,931***	2,025–7,633	—	—
SOX2	0,40	70,0	65,3	3,908***	1,993–7,662	—	—
KRT7	58,77	80,0	46,3	3,449**	1,575–7,552	—	—
CD63	32,45	62,5	62,4	2,763**	1,440–5,302	—	—

Sens. = Sensitivität; Spez. = Spezifität; rMFI = relative mean fluorescence intensity; CI = Konfidenzintervall

*** $p \leq 0,001$; ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$

Zur Berechnung des Risikos für das Vorliegen eines Zervixkarzinoms ergab sich aus der multivariaten logistischen Regression **Formel 4**.

Formel 4: Risikoscore für das Vorliegen eines Zervixkarzinoms (CxCa).

$$p(\text{CxCa}) = \frac{1}{1 + e^{-(-6,563 + 1,391 \cdot x_1 + 1,227 \cdot x_2 + 1,444 \cdot x_3 + 1,166 \cdot x_4 + 1,142 \cdot x_5)}}$$

$x_1 = 0$ bzw. 1 , wenn MCM2 < bzw. > 7,96 rMFI
 $x_2 = 0$ bzw. 1 , wenn BIRC5 < bzw. > 1,52 rMFI
 $x_3 = 0$ bzw. 1 , wenn ALDH1A1 < bzw. > 2,99 rMFI
 $x_4 = 0$ bzw. 1 , wenn TERT < bzw. > 0,49 rMFI
 $x_5 = 0$ bzw. 1 , wenn führender HPV < bzw. > 13,43 rMFI

Der Risikoscore für das Vorliegen eines Zervixkarzinoms wies in der ROC-Analyse eine AUC von 0,92 auf. Die ROC-Kurve und ermittelte Cutoffs mit entsprechender Sensitivität und Spezifität sind in **Abbildung 15** und **Tabelle 27** dargestellt. Der ideale Cutoff (nach Youden-

Index) betrug 0,12 und erreichte eine Sensitivität von 80,0 % bei 93,2 % Spezifität. Aufgrund der Schwere der Diagnose wurde der Cutoff 0,02 bevorzugt, da er mit einer deutlich höheren Sensitivität (90,0 %) auf Kosten einer geringeren Spezifität (79,9 %) assoziiert ist.

Tabelle 27: Ergebnis der ROC-Analyse des Risikoscores für das Vorliegen eines Zervixkarzinoms nach Formel 4 (n = 1135).

AUC	95 % CI	Cutoff für p (CxCa)	Sensitivität (%)	Spezifität (%)
0,920^{***}	0,871–0,969	0,02	90,0	79,9
		0,12	80,0	93,2

AUC = area under the curve; CI = Konfidenzintervall

**** $p \leq 0,001$*

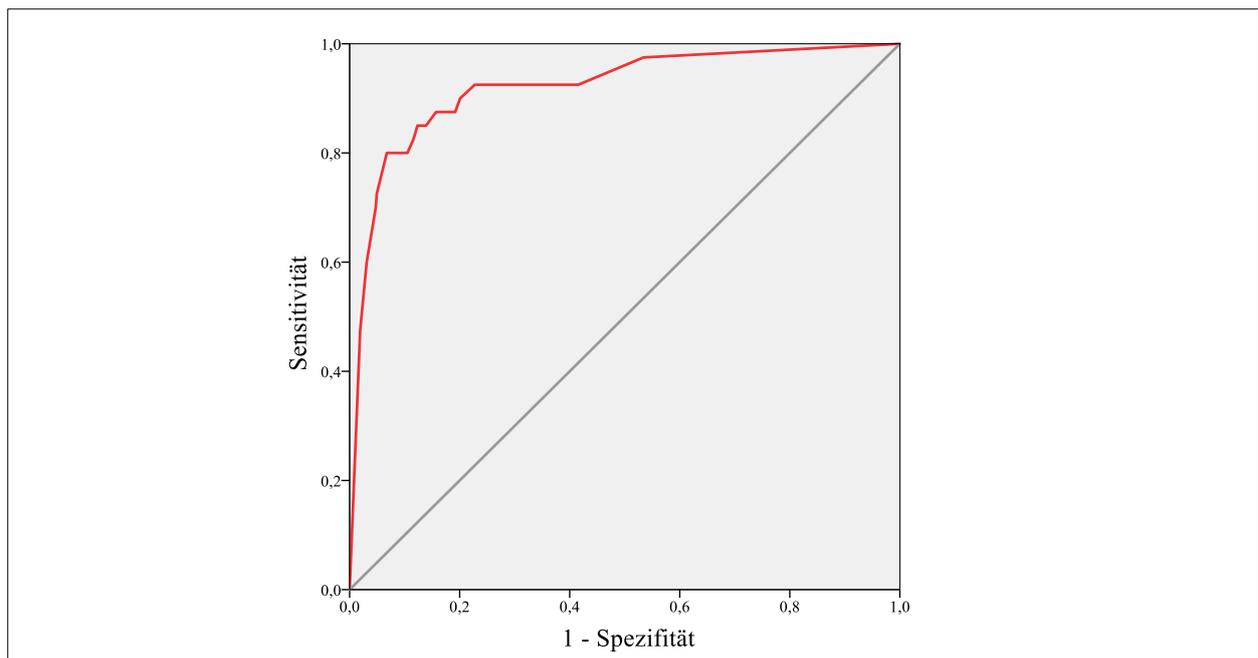


Abbildung 15: ROC-Kurve des Risikoscores für das Vorliegen eines Zervixkarzinoms nach Formel 4 (n = 1135).

4.3.3 Confounder der Biomarkerexpression

Aus den vorhergehenden Teilen dieser Arbeit ergibt sich, dass von der quantitativen Expression der Biomarker Rückschlüsse auf das Krankheitsstadium gezogen werden können. Möglicherweise wird dieser Zusammenhang jedoch auch durch eine gemeinsame Drittvariable (Confounder) ausgelöst, der sowohl die Biomarkerexpression als auch das Krankheitsstadium gleichermaßen beeinflusst. Mögliche Confounder könnten beispielsweise das Alter der Patientin oder das Vorliegen bestimmter hrHPV-Infektionen darstellen. Um den Einfluss der Confounder auf die Korrelation zwischen Biomarkerexpression und Krankheitsstadium zu untersuchen, wurden partielle Korrelationen mit Alter und hrHPV-Typ als Kontrollvariablen durchgeführt. Die Korrelationskoeffizienten sind in **Tabelle 28** dargestellt.

Alter

Das Alter der Patientin wies in der bivariaten Korrelation eine schwache aber signifikante Korrelation ($r_s = -0,12$) mit dem Krankheitsstadium auf. Ein höheres Alter geht also tendenziell mit einem niedrigeren Dysplasiestadium einher. Die partielle Korrelation der Biomarker mit der klinischen Gruppe und dem Alter als stabiler Kontrollvariable lieferte für fast alle Biomarker einen geringeren Korrelationskoeffizienten als die bivariate Korrelation ohne Kontrollvariable. Bei vielen Biomarkern (z. B. p16, Stathmin, Ki67, Topo2 α) nahm der Korrelationskoeffizient um weniger als 0,1 ab, was darauf hin deutet, dass das Alter keinen starken Confounder darstellt. Beim führenden HPV und dem HPV-16-Splicemarker E1^{E4} lag der Korrelationskoeffizient der partiellen Korrelation nur noch bei $< 0,1$ vs. 0,54 bzw. 0,38 in der bivariaten Korrelation. Das Alter der Patientin beeinflusst folglich erheblich den Zusammenhang zwischen diesen Biomarkern und dem Krankheitsstadium und erklärt deren Korrelation fast vollständig. p16 wies in der partiellen Korrelation den höchsten Korrelationskoeffizienten ($r_p = 0,42$) auf und besitzt somit die höchste altersunabhängige Aussagekraft für das Krankheitsstadium.

hrHPV-Typ

Die Patientinnen wurden entsprechend ihrer risikoreichsten hrHPV-Infektion in vier Gruppen eingeteilt: Gruppe 3 (HPV 16, 18, 31, 33, 45), Gruppe 2 (HPV 35, 39, 51, 56, 58, 59, 68, 73, 82), Gruppe 1 (HPV 26, 53, 66), Gruppe 0 (keine der genannten hrHPV-Infektion). Diese Gruppen der hrHPV-Infektion korrelierten sehr stark mit der Schwere der zervikalen Dysplasie ($r_s = 0,56$). In der partiellen Korrelation der Biomarker mit den Krankheitsstadien und dem Typ der hrHPV-Infektion als Kontrollvariable ergaben fast alle Marker deutlich verringerte Korrelationskoeffizienten im Vergleich zur bivariaten Korrelation und auch zur partiellen Korrelation mit dem Alter als Kontrollvariable. Die hrHPV-Infektion im Allgemeinen und der hrHPV-Typ im Besonderen stellen folglich einen sehr starken Confounder der Korrelation zwischen Biomarker und Krankheitsstadium dar. Trotzdem korrelierte in der partiellen Korrelation die Mehrheit der Biomarker zwar schwächer aber signifikant mit dem Krankheitsstadium. Auch bei der hrHPV-Gruppe als Kontrollvariable wiesen der führende HPV und der Splicemarker HPV 16 E1^{E4} einen geringen bzw. keinen signifikanten Korrelationskoeffizienten mehr auf.

Tabelle 28: Korrelationskoeffizienten der bivariaten Korrelation nach Spearman (r_s) und der partiellen Korrelation (r_p) der Biomarker mit den Krankheitsstadien.

	r_s	r_p	
		Alter	hrHPV-Gruppe ^{a)}
n	1135	1124	1135
Alter	-0,118 ^{***b)}	—	—
hrHPV-Typ	0,558 ^{***}	—	—
Biomarker			
Führender HPV	0,543 ^{***}	0,096 ^{***}	0,063 [*]
p16	0,449 ^{***}	0,420 ^{***}	0,275 ^{***}
HPV 16 E7	0,391 ^{***}	0,183 ^{***}	0,142 ^{***}
HPV 16 E6*I	0,385 ^{***}	0,169 ^{***}	0,138 ^{***}
HPV 16 E1^E4	0,378 ^{***}	0,095 [*]	0,045
MCM2	0,305 ^{***}	0,209 ^{***}	0,175 ^{***}
Stathmin	0,305 ^{***}	0,260 ^{***}	0,187 ^{***}
Ki67	0,298 ^{***}	0,266 ^{***}	0,194 ^{***}
Topo2 α	0,292 ^{***}	0,238 ^{***}	0,189 ^{***}
KRT7	0,233 ^{***}	0,196 ^{***}	0,131 ^{***}
KRT17	0,229 ^{***}	0,194 ^{***}	0,142 ^{***}
BIRC5	0,228 ^{***}	0,172 ^{***}	0,149 ^{***}
p63	0,214 ^{***}	0,134 ^{***}	0,074 [*]
MMP7	-0,162 ^{***}	-0,092 ^{**}	-0,035
SOX2	0,161 ^{***}	0,093 ^{**}	0,054
ALDH1L1	0,147 ^{***}	0,110 ^{***}	0,039
HPV 16 E1C	0,127 ^{***}	0,105 ^{***}	0,065 [*]
TERT	0,117 ^{***}	0,088 ^{**}	0,081 ^{**}
ALDH1A1	0,070 [*]	0,095 ^{***}	0,073 [*]
p53	0,067 [*]	0,121 ^{***}	0,098 ^{***}
GDA	0,066 [*]	-0,023	0,005 ^{***}
CD63	-0,026	-0,074 [*]	-0,107 ^{***}
POU5FI	0,020	-0,004	0,099 ^{***}
ARG2	-0,001	-0,072 [*]	-0,032
NANOG	< 0,001	0,067 [*]	0,070 [*]

hrHPV = high-risk Humanes Papillomvirus

*** $p \leq 0,001$; ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$

^{a)} Gruppe 3 (16, 18, 31, 33, 45), Gruppe 2 (35, 39, 51, 56, 58, 59, 68, 73, 82), Gruppe 1 (26, 53, 66), Gruppe 0 (keine der genannten hrHPV-Infektionen); ^{b)} $n = 1124$

Confounder in den Risikoscores

Aufgrund des starken Einflusses der beiden Confounder, Alter und hrHPV-Gruppe, wurden diese auch in die multivariate Regression für die verschiedenen Krankheitsschwellen aufgenommen, um zu überprüfen, inwiefern sie die Aussage der Biomarker in den Risikoscores ersetzen oder ergänzen. Für alle drei Schwellen (CIN2+, CIN3+, Zervixkarzinom) wurden beide Confounder durch die multivariate logistische Regression ausgewählt und ein Biomarker dadurch ersetzt. Das Alter wurde dabei als kontinuierliche Variable und der hrHPV-Typ als nach Risiko gruppierte Variable eingeschlossen. Die OR stellt also eine Zu- bzw. Abnahme des Krankheitsrisikos pro Lebensjahr bzw. pro höhere Risikogruppe dar. Zum Vergleich eignen sich Tabelle 20, Tabelle 23

und Tabelle 26, die die Ergebnisse der multivariaten Regression auf Basis der Biomarker ohne Confounder darstellen.

In der multivariaten Regression für die Krankheitsschwelle CIN2+ ersetzen das Alter und die hrHPV-Gruppe den Splicemarker HPV 16 E1^E4. Während ohne die Confounder der führende HPV die höchste OR aufwies, besaß in dem Risikoscore mit den Confoundern p16 die höchste OR (vgl. Tabelle 20 und **Tabelle 29**). Durch Aufnahme der Confounder in den Risikoscore für das Vorliegen einer CIN2+ wurde die AUC des Risikoscores von 0,81 (Tabelle 21) auf 0,84 erhöht.

Tabelle 29: Cutoffs aus der ROC-Analyse mit zugehöriger Sensitivität und Spezifität und Ergebnis der logistischen Regression für die Krankheitsschwelle CIN2+ unter Berücksichtigung der Confounder (n = 1135).

Biomarker	Cutoff (rMFI)	Sensitivität (%)	Spezifität (%)	Univariat		Multivariat	
				OR	95% CI	OR	95% CI
Führender HPV	1,34	80,9	64,4	7,649***	5,841–10,016	2,007***	1,373–2,932
HPV 16 E7	1,42	42,7	91,0	7,571***	5,352–10,710	—	—
HPV 16 E6*I	1,17	44,4	90,4	7,547***	5,380–10,587	2,922***	1,965–4,345
HPV 16 E1^E4	1,00	41,8	89,6	6,189***	4,451–8,604	—	—
p16	6,47	71,9	66,0	4,963***	3,851–6,396	3,046***	2,235–4,152
Stathmin	17,33	33,4	87,2	3,405***	2,494–4,647	1,592*	1,071–2,368
MCM2	5,60	38,8	83,9	3,288***	2,464–4,386	—	—
Topo2α	2,10	36,5	84,9	3,195***	2,379–4,290	—	—
hrHPV-Gruppe ^{a)}	—	—	—	2,242***	2,005–2,507	1,464***	1,258–1,702
Alter ^{b)}	—	—	—	0,968	0,958–0,979	0,958***	0,945–0,971

hrHPV = high-risk Humanes Papillomvirus

*** $p \leq 0,001$; * $p \leq 0,05$

^{a)} Gruppe 3 (16, 18, 31, 33, 45), Gruppe 2 (35, 39, 51, 56, 58, 59, 68, 73, 82), Gruppe 1 (26, 53, 66), Gruppe 0 (keine der genannten hrHPV-Infektionen); ^{b)} als kontinuierliche Variable, n = 1124

In der multivariaten Regression für die Krankheitsschwelle CIN3+ ersetzen das Alter und die hrHPV-Gruppe den führenden HPV. Den aussagekräftigsten Biomarker stellte in beiden Modellen, mit und ohne Confounder, p16 dar (vgl. Tabelle 23 und **Tabelle 30**). Das Alter erreichte keine signifikante OR. Durch Berücksichtigung der Confounder im Risikoscore erhöhte sich die AUC von 0,81 (Tabelle 24) auf 0,82.

Tabelle 30: Cutoffs aus der ROC-Analyse mit zugehöriger Sensitivität und Spezifität und Ergebnis der logistischen Regression für die Krankheitsschwelle CIN3+ unter Berücksichtigung der Confounder (n = 1135).

Biomarker	Cutoff (rMFI)	Sensitivität (%)	Spezifität (%)	Univariat		Multivariat	
				OR	95% CI	OR	95% CI
HPV 16 E6*I	1,34	55,1	85,0	6,946***	5,223–9,238	1,887*	1,147–3,105
HPV 16 E1^E4	1,05	53,2	84,3	6,121***	4,615–8,117	1,879*	1,152–3,065
HPV 16 E7	1,09	55,1	83,3	6,116***	4,625–8,086	—	—
Führender HPV	1,40	84,9	50,5	5,711***	4,156–7,846	—	—
p16	11,10	62,2	77,1	5,539***	4,231–7,252	3,295***	2,400–4,523
Stathmin	12,21	54,6	77,5	4,145***	3,178–5,408	—	—
MCM2	5,19	51,9	79,2	4,111***	3,143–5,377	1,784***	1,283–2,479
Topo2α	1,87	50,0	80,0	4,000***	3,053–5,240	—	—
Ki67	0,94	70,5	59,9	3,545***	2,718–4,625	—	—
hrHPV-Gruppe ^{a)}	—	—	—	2,211***	1,908–2,561	1,540***	1,318–1,800
Alter ^{b)}	—	—	—	0,993	0,981–1,004	0,988	0,974–1,002

hrHPV = high-risk Humanes Papillomvirus

*** $p \leq 0,001$; * $p \leq 0,05$

^{a)} Gruppe 3 (16, 18, 31, 33, 45), Gruppe 2 (35, 39, 51, 56, 58, 59, 68, 73, 82), Gruppe 1 (26, 53, 66), Gruppe 0 (keine der genannten hrHPV-Infektionen); ^{b)} als kontinuierliche Variable, n = 1124

Für die Krankheitsschwelle zum Zervixkarzinom wurde in der multivariaten logistischen Regression der führende HPV durch die beiden Confounder ersetzt. Während die OR von ALDH1A1 bei der Regression ohne Confounder eine höhere OR aufwies als bei der Regression mit Confoundern (4,2 vs. 3,3), besaß BIRC5 in der Regression mit Confoundern eine höhere OR (3,4 vs. 3,6). ALDH1A1 stellte ohne Confounder und BIRC5 mit Confoundern den aussagekräftigsten Marker dar (vgl. Tabelle 26 und **Tabelle 31**). Das Alter zeigte bei dieser Schwelle im Gegensatz zu den vorherigen Krankheitsschwellen eine OR größer als 1. Während das Risiko für CIN2+ und CIN3+ mit dem Alter folglich nachlässt, steigt es für das Karzinom mit dem Alter an. Die AUC des Risikoscores mit Confoundern betrug 0,92. Bei diesem Risikoscore wurde durch die Berücksichtigung der Confounder im Gegensatz zu den anderen beiden Risikoscores keine höhere diagnostische Güte erreicht.

Tabelle 31: Cutoffs aus der ROC-Analyse mit zugehöriger Sensitivität und Spezifität und Ergebnis der logistischen Regression für die Krankheitsschwelle zum Zervixkarzinom unter Berücksichtigung der Confounder (n = 1135).

Biomarker	Cutoff (rMFI)	Sens. (%)	Spez. (%)	Univariat		Multivariat	
				OR	95% CI	OR	95% CI
MCM2	7,96	87,5	81,1	30,029***	11,623–77,582	3,318*	1,040–10,582
Topo2α	6,44	70,0	92,8	30,008***	14,695–61,278	—	—
Ki67	5,25	77,5	89,8	29,933***	13,898–64,470	—	—
BIRC5	1,52	80,0	88,0	25,347***	11,804–54,429	3,577*	1,208–10,593
Stathmin	28,77	75,0	86,8	19,655***	9,409–41,060	—	—
ALDH1A1	2,99	77,5	80,4	14,098***	6,613–30,054	3,311*	1,317–8,320
TERT	0,49	80,0	77,1	13,312***	6,058–29,256	2,685	0,955–7,552
p53	13,73	72,5	80,9	11,176***	5,494–22,737	—	—
Führender HPV	13,43	80,0	71,3	9,949***	4,535–21,828	—	—
hrHPV-Gruppe ^{a)}	—	—	—	5,316**	1,878–15,052	3,211*	1,176–8,765
Alter ^{b)}	—	—	—	1,042**	1,014–1,070	1,045*	1,010–1,081

Sens. = Sensitivität; Spez. = Spezifität; hrHPV = high-risk Humanes Papillomvirus

*** $p \leq 0,001$; ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$

^{a)} Gruppe 3 (16, 18, 31, 33, 45), Gruppe 2 (35, 39, 51, 56, 58, 59, 68, 73, 82), Gruppe 1 (26, 53, 66), Gruppe 0 (keine der genannten hrHPV-Infektionen); ^{b)} als kontinuierliche Variable, n = 1124

4.3.4 Prognostische Aussagekraft

Alle bestehenden diagnostischen Tests liefern eine Momentaufnahme der zervikalen Dysplasie, besitzen jedoch nicht die Fähigkeit eine Vorhersage zu Regression oder Progression der Läsion zu machen. Der QG erfasst durch das breite Spektrum an gemessenen Biomarkern und die quantitativen Messwerte die zervikale Läsion in ihrer Komplexität und verfügt über die Möglichkeit, klinische Veränderungen vorherzusagen.

Bei 24 Studienteilnehmerinnen wurde ohne zwischenzeitliche Therapie nach mindestens zwei und höchstens zehn Monaten eine Follow-Up-Probe entnommen. Anschließend wurden die Frauen in drei Gruppen eingeteilt, je nachdem, ob sie einen regredienten (n = 6, davon zwei schwanger), einen persistenten (n = 10) oder einen progredienten (n = 8) Befund aufwiesen. Die Korrelationsanalyse nach Spearman ergab bei sehr geringer Fallzahl lediglich für den Biomarker MMP7 eine signifikante Korrelation ($r_s = 0,41$; $p = 0,049$). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass MMP7 ein geeigneter Biomarker sein könnte, um eine Vorhersage über Progression oder Regression einer zervikalen Läsion zu machen. Die Expressionshöhe von MMP7 in Abhängigkeit von der klinischen Veränderung einer Läsion ist in dem Boxplot in **Abbildung 16** dargestellt.

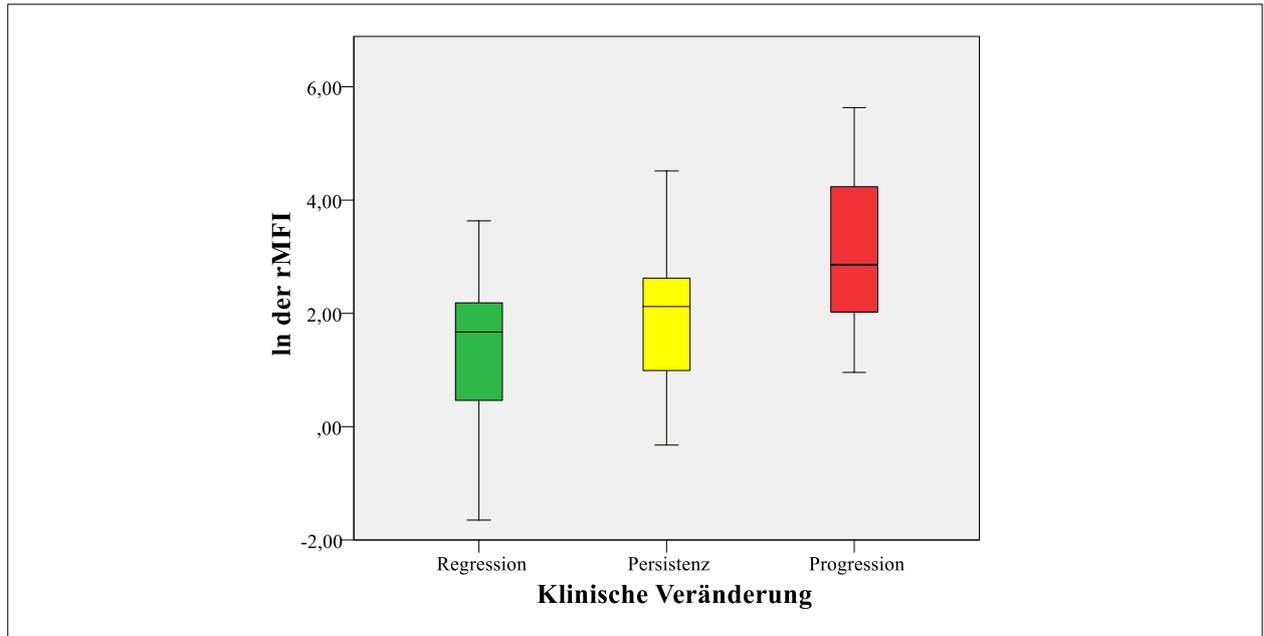


Abbildung 16: Boxplot der relativen *mean fluorescence intensity* (rMFI) von MMP7 bei Frauen, die im Follow-Up einen regredienten (grün), einen persistenten (gelb) oder einen progredienten (rot) Befund der zervikalen Dysplasie aufwiesen (n = 24). Zur besseren Darstellung sind die natürlichen Logarithmen (ln) abgebildet.

4.4 Methoden zur Diagnose von Zervixdysplasien im Vergleich

Im Folgenden werden anhand der Studienpopulation die bereits bestehenden diagnostischen Methoden und der QG in ihrer Sensitivität und Spezifität für CIN2+ und CIN3+ miteinander verglichen. Die Immunhistochemie wurde hier bewusst nicht ausgewertet, da sie die histologische Diagnose und somit die klinische Gruppe entscheidend beeinflusst, was möglicherweise zu falsch hohen Werten für Sensitivität und Spezifität führt.

Für die Zytologie wurde ein Ergebnis \geq Pap IIID2 als positiv gewertet. Sowohl für die Schwelle CIN2+ als auch für die Schwelle CIN3+ erreichte die Zytologie die höchste Spezifität (90,3 % bzw. 74,8 %) und die geringste Sensitivität (64,4 % bzw. 73,7 %). Die HPV-Testung mittels BD erzielte ein umgekehrtes Ergebnis: HPV-Positivität war zwar hochsensitiv für CIN2+ (98,3 %) und CIN3+ (98,5 %), aber unspezifisch (57,4 % für CIN2+ und 38,2 % für CIN3+). Die Immunzytochemie und die Kolposkopie übertrafen die Zytologie in der Sensitivität und die HPV-Testung in der Spezifität.

Auch der QG erreichte eine höhere Sensitivität als die Zytologie (73,4 % vs. 64,4 % für CIN2+ und 82,4 % vs. 73,3 % für CIN3+) und eine geringere Spezifität (78,0 % vs. 90,3 % für CIN2+ und 63,3 % vs. 74,8 % für CIN3+). Er übertraf die HPV-Testung deutlich in ihrer Spezifität (78,0 % vs. 57,4 % für CIN2+ und 63,3 % vs. 38,2 % für CIN3+), erreichte aber nicht deren hohe Sensitivität (73,4 % vs. 98,3 % für CIN2+ und 82,4 % vs. 98,5 % für CIN3+).

Eine ideale Kombination von hoher (> 80 %) Sensitivität und Spezifität vor allem für die Diagnose von CIN3+ erzielte keine der Methoden.

Alle Ergebnisse dieses Vergleichs befinden sich in **Tabelle 32** und sind in **Abbildung 17** visualisiert.

Tabelle 32: Sensitivität und Spezifität verschiedener diagnostischer Methoden zur Detektion von CIN2+ und CIN3+.

	n	CIN2+		CIN3+	
		Sensitivität (%)	Spezifität (%)	Sensitivität (%)	Spezifität (%)
Zytologie (\geq Pap IIID2)	1028	64,4	90,3	73,3	74,8
Immunzytochemie (p16/Ki67)	843	82,6	81,4	92,9	62,8
Kolposkopie (\geq major changes)	1000	77,8	84,4	87,2	64,8
HPV-Testung mit BD Onclarity™	1056	98,3	57,4	98,5	38,2
QG Risikoscores	1135	73,4	78,0	82,4	63,3

QG = *QuantiGene*®

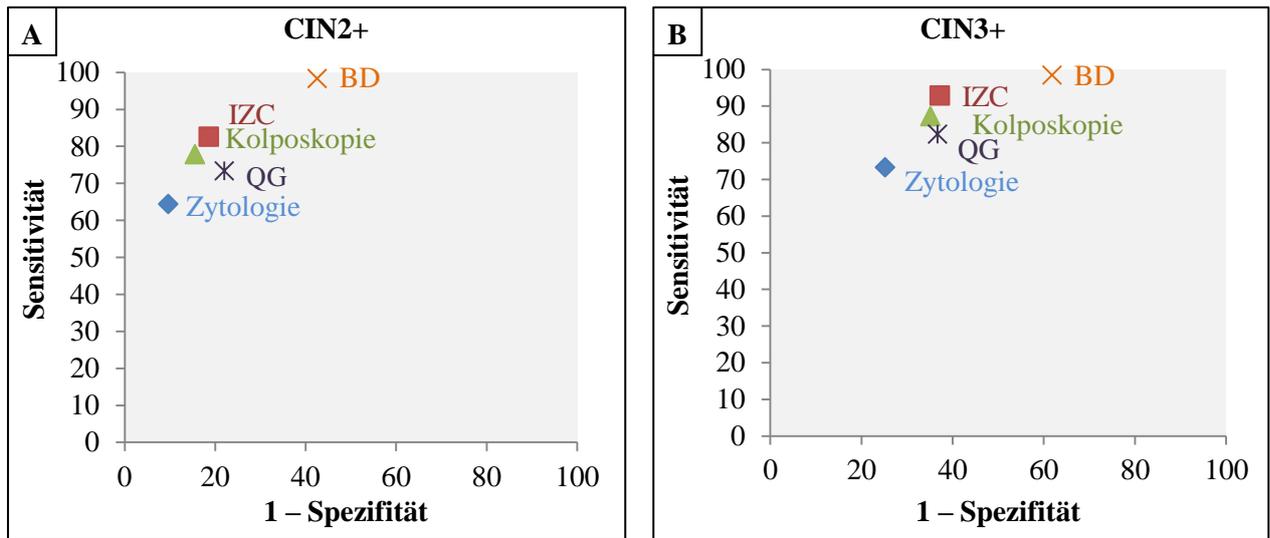


Abbildung 17: Darstellung der Sensitivität und Spezifität verschiedener diagnostischer Methoden zur Detektion von **A)** CIN2+ und **B)** CIN3+. (CIN = zervikale intraepitheliale Neoplasie; BD = BD OnclarityTM; IZC = Immunzytochemie; QG = QuantiGene[®])

5 Diskussion

In diesem Teil der Arbeit werden die Ergebnisse zunächst in Bezug auf die in Kapitel 2 vorgestellten Hypothesen diskutiert (5.1) und im Vergleich mit den Ergebnissen der Pilotstudie und weiterer verwandter Studien interpretiert (5.2.1). Der QG wird außerdem anderen diagnostischen Methoden gegenübergestellt (5.2.2). Anschließend werden mögliche Rückschlüsse von der Biomarkerexpression auf das Pathogenesekonzept zervikaler Dysplasien eruiert (5.2.3). Den Abschluss der Diskussion bilden die Limitationen dieser Studie (5.3) und die Schlussfolgerungen samt Ausblick bezüglich des Potenzials und zukünftiger Entwicklungen des QG (5.4).

5.1 Hypothesenbezogene Ergebnisdiskussion

Hauptthesen:

- Mit dem QG kann eine zufriedenstellende hrHPV-Diagnostik im Vergleich mit BD und MPG erreicht werden.

Die hrHPV-Diagnostik mittels QG erreichte 77 % Konkordanz ($\kappa = 0,49$) mit MPG und 80 % ($\kappa = 0,57$) mit BD. Die etwas bessere Übereinstimmung mit BD erklärt sich möglicherweise durch das gemeinsame Target E7, welches im BD jedoch als DNA und im QG als RNA detektiert wird. MPG hingegen nutzt L1-DNA als Target. Die beiden etablierten hrHPV-Tests zeigten trotz unterschiedlicher Targets in dieser Studie eine Konkordanz von 93 % ($\kappa = 0,84$). In einem Review von de Thurah et al. variierte die Konkordanz verschiedener etablierter hrHPV-Tests mit dem anerkannten Vergleichstest Hybrid Capture 2 zwischen 48 % und 69 % ($\kappa = 0,59$ – $0,79$).¹³¹ Die Kappa-Werte des QG, die im Gegensatz zur Konkordanz weniger von der Zusammensetzung des Probenkollektivs beeinflusst werden, bleiben etwas hinter denen des genannten Reviews zurück. Daran gemessen erreicht der QG zwar eine zufriedenstellende hrHPV-Diagnostik, jedoch noch nicht die Übereinstimmung etablierter Tests.

Die diagnostische Übereinstimmung für einzelne HPV-Typen variierte stark. So lag die geringste Konkordanz zwischen QG und MPG bei 79 % ($\kappa = 0,08$) für HPV 68 und die höchste Konkordanz bei 99 % ($\kappa = 0,82$) für HPV 35. Die minimale Übereinstimmung bei HPV 68 könnte in dem Vorkommen zweier Varianten (68a und 68b) dieses Typen begründet liegen.¹³²

Insgesamt könnte die mangelhafte Übereinstimmung entweder aus zu wenig sensitiven oder zu wenig spezifischen Sonden resultieren.

Die konkordante Positivität verschiedener hrHPV-Tests erwies sich in der Studie von Rebolj et al. als Risikofaktor für CIN2+. In einer Screening-Population zeigte sich bei keiner von knapp 260 Frauen mit nur einem positiven Testergebnis eine CIN2+. Von knapp 190 Patientinnen mit vier positiven Tests hatten hingegen 84 % eine CIN2+.¹³³ Diese Ergebnisse suggerieren, dass trotz suboptimaler Konkordanz klinisch relevante Infektionen von den meisten HPV-Tests detektiert werden. Aufgrund dieser Erkenntnis und weil der QG ein RNA-basierter Assay ist und somit aktive Transkription nachweist, wurde angenommen, dass er gezielter klinisch relevante Infektionen detektiert als die Vergleichstests. Diese Annahme bewahrheitete sich nicht. Der QG erreichte eine Sensitivität von 84 % für CIN2+ und 87 % für CIN3+, während MPG und BD eine Sensitivität von 94 % für CIN2+ und CIN3+ aufwiesen. Die Spezifität des QG lag bei vergleichbar niedrigen Werten wie die der etablierten Tests (53 % für CIN2+ und 40 % für CIN3+). Da der QG ein quantitativer Test ist, kann durch Anhebung des Cutoffs für HPV-Positivität unter Verlusten in der klinischen Sensitivität (70 % für CIN2+ und 80 % für CIN3+) die klinische Spezifität (75 % für CIN2+ und 55 % für CIN3+) weit über das Niveau der Vergleichstests gehoben werden.

- Mit dem QG können Veränderungen in der Biomarkerexpression gemessen werden, die charakteristisch für das Dysplasiestadium der Patientin sind und so zur Diagnose führen.

Zur Auswertung des Verhältnisses zwischen Biomarkerexpression und Krankheitsstadium wurden zwei unterschiedliche Modelle untersucht. Die Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman zeigten für die Expression der meisten Biomarker signifikante Korrelationen mit dem Krankheitsstadium und wiesen so auf einen kontinuierlichen Zusammenhang hin. Die Ergebnisse der ROC-Analyse zeigten, dass ein Großteil der Biomarker zur Diagnose zervikaler Dysplasien und des Zervixkarzinoms genutzt werden können. Die Konstellation der am besten geeigneten Biomarker unterschied sich dabei jedoch in Abhängigkeit von der Krankheitsschwelle (CIN2+, CIN3+, Zervixkarzinom) und wies so auf einen stufenartigen Zusammenhang hin, bei dem manche Marker erst ab bestimmten Krankheitsstadien relevante Veränderungen aufweisen. Im Kapitel 5.2.3 werden diese Modelle in das Pathogenesekonzept der zervikalen Dysplasie integriert.

Zum jetzigen Stand der Entwicklung können durch den QG und die mittels multivariater logistischer Regression ermittelten Risikoscores (Formeln 2–4) CIN2+ mit einer Sensitivität von

73 % und einer Spezifität von 78 %, CIN3+ mit einer Sensitivität von 82 % und einer Spezifität von 63 % und Zervixkarzinome mit einer Sensitivität von 90 % und einer Spezifität von 80 % detektiert werden. Insgesamt ist für einen Screening-Test die Sensitivität, für einen Bestätigungstest die Spezifität des QG etwas zu gering. Im Kapitel 5.2.2 werden diese Ergebnisse mit anderen diagnostischen Methoden verglichen.

Nebenhypothesen:

- Außer der Biomarkerexpression existieren weitere Faktoren (Alter, hrHPV-Typ), die das Krankheitsstadium als Confounder beeinflussen und somit zur Diagnostik genutzt werden können.

Es ist bekannt, dass die Prävalenz von hrHPV-Infektionen mit zunehmendem Alter abnimmt und, dass die verschiedenen hrHPV-Typen unterschiedlich stark mit zervikalen Dysplasien assoziiert sind.^{8,38,134} In dieser Arbeit korrelierte das Alter schwach negativ ($r_s = -0,12$) und die Infektion mit bestimmten hrHPV-Typen (gruppiert nach Risiko für Dysplasien) stark positiv ($r_s = 0,56$) mit der Schwere der zervikalen Dysplasie. Die hrHPV-Gruppe der Infektion korrelierte stärker mit dem Krankheitsstadium als der beste HPV-unabhängige Biomarker, p16 ($r_s = 0,45$). Es ist anzunehmen, dass das Alter der Patientin, die hrHPV-Infektion und die Biomarkerexpression bei der Pathogenese zervikaler Dysplasien kausal eng miteinander verbunden sind. Durch partielle Korrelationen konnte eine Scheinkorrelation zwischen Biomarkerexpression und Krankheitsstadium, die aufgrund der gemeinsamen Beeinflussung durch die Confounder (hrHPV-Infektion, Alter) zustande kommt, ausgeschlossen werden. Nur zwei Biomarker, der führende HPV und der Splicemarker HPV 16 E1^{E4}, verlieren in der partiellen Korrelation die hohen Koeffizienten der bivariaten Korrelation. Ihre Expression kann also fast vollständig durch den Einfluss der Confounder erklärt werden. Alle anderen Biomarker wiesen in der partiellen Korrelation nur leicht verminderte, aber deutlich signifikante Koeffizienten auf. Ihr linearer Zusammenhang mit dem Krankheitsstadium erklärt sich also teilweise, jedoch nicht vollständig, durch den Einfluss der Confounder. Die Biomarker werden durch das Alter der Patientin und die HPV-Infektion beeinflusst, liefern aber trotzdem einen von diesen Faktoren unabhängigen Nutzen für die Diagnostik.

Diese Ergebnisse deuten auch auf eine elementare Aussagekraft der Confounder für die Diagnostik hin. In der multivariaten logistischen Regression wurde bei CIN2+ HPV 16 E1^{E4} und bei CIN3+ und dem Zervixkarzinom der führende HPV durch die beiden Confounder ersetzt. Die diagnostische Qualität der Risikoscores für das Vorliegen einer CIN2+ oder CIN3+

wurde durch die Berücksichtigung des Alters und der hrHPV-Gruppe gesteigert, was sich in einer Erhöhung der AUC der ROC-Analyse zeigte. Die diagnostische Qualität des Risikoscores für das Vorliegen eines Zervixkarzinoms veränderte sich durch Einbezug der Confounder nicht.

- Das Ergebnis des QG gibt nicht nur Auskunft über das Krankheitsstadium, sondern kann auch eine Vorhersage über das Progressions- bzw. Regressionsrisiko der Läsion treffen.

Trotz eines sehr kleinen Follow-Up-Kollektivs ($n = 24$) wurde für MMP7 eine signifikante Korrelation zwischen Expressionsstärke und Progressions- bzw. Regressionsrisiko der zervikalen Dysplasie berechnet. Eine niedrigere MMP7-Expression in der initialen Probe wies dabei eher auf Regression, eine höhere Expression häufiger auf Progression bis zum Zeitpunkt der Follow-Up-Probe hin. MMP7 ist ein charakteristischer Marker für die SCJ-Zellen, die nach Herfs et al. den Ursprung der Zervixkarzinome darstellen.⁹⁹ Die verstärkte Expression von Matrix-Metalloproteasen (MMP), die proteolytisch am Ab- und Umbau der extrazellulären Matrix beteiligt sind, wurde in vitro bereits in den Zusammenhang mit einem erhöhtem Progressions- und Invasionsrisiko von Zervixkarzinom-Zelllinien gebracht.¹³⁵

Sowohl bei den Korrelationen mit dem Krankheitsstadium als auch bei den ROC-Analysen für die Krankheitsschwellen, wies MMP7 teilweise signifikante Ergebnisse auf, die jedoch im Vergleich mit anderen Biomarkern eher schwach ausfielen. Dies lässt vermuten, dass die Höhe der MMP7-Expression zwar eher keine diagnostische, jedoch möglicherweise eine prognostische Aussage über zervikale Dysplasien erlaubt.

5.2 Interpretation

5.2.1 Vergleich mit den Ergebnissen der Pilotstudie und weiterer Studien

Pilotstudie

Im Rahmen ihrer Forschungsarbeit hat N. Nevermann eine explorative Pilotstudie (n = 238 für die HPV-Diagnostik, n = 216 für die Auswertung der Biomarker) zur Anwendung des QG in der Diagnostik zervikaler Dysplasien durchgeführt. Im Folgenden sollen die Ergebnisse der Pilotstudie und der vorliegenden Validierungsstudie vergleichend dargestellt werden.

Bei der HPV-Diagnostik erreichte die Pilotstudie mit MPG eine deutlich niedrigere Konkordanz von 60 % (143/238) für die 18 eingeschlossenen hrHPV (Tabelle 5) im Vergleich zu 77 % (1077/1403) für die 14 wichtigsten hrHPV (Tabelle 15) in der Validierungsstudie. Das deutlich bessere Ergebnis der Validierungsstudie lässt sich durch eine optimierte Auswertung der HPV-Diagnostik erklären. In der Pilotstudie wurde der Cutoff für HPV-Positivität bei jeder Messung neu definiert. Dabei galt: „Cutoff = Mittelwert der drei Negativkontrollen + dreifache Standardabweichungen der drei Negativkontrollen“. Durch die teilweise geringe Varianz der drei Negativkontrollen und folglich zu niedrige Cutoffs zeigten sich bei Anwendung dieser Methode zahlreiche falsch positive Ergebnisse. Um dieses Problem zu beheben, wurden in der vorliegenden Validierungsstudie mittels ROC-Analysen die idealen Cutoffs mit der höchsten Summe aus Sensitivität und Spezifität im Vergleich zu MPG erhoben.

Alle signifikanten Korrelationen der Biomarker mit den Krankheitsstadien aus der Pilotstudie konnten in dieser Arbeit validiert werden. Dabei wurde in beiden Studien der führende HPV als aussagekräftigster Biomarker identifiziert. Während p16 im Vergleich zu den anderen Biomarkern bei der Validierung am zweitstärksten korrelierte, erreichte er in der Pilotstudie eine deutlich geringere (siebtstärkste) Korrelation. KRT7 wies nur in der Validierungsstudie eine signifikante Korrelation auf. Dem Assay der vorliegenden Arbeit wurden außerdem drei neue Biomarker hinzugefügt, von denen besonders Topo2 α eine hohe Aussagekraft beinhaltet. TERT und p53 korrelierten zwar ebenfalls signifikant, jedoch deutlich schwächer mit den Krankheitsstadien.

Auch in der Pilotstudie sind Risikoscores für die Krankheitsschwellen (CIN2+, CIN3+, Zervixkarzinom) modelliert worden. Die Risikoscores für CIN2+ und CIN3+ zeigten dabei eine Sensitivität von 86 % bzw. 87 % bei einer Spezifität von 86 % bzw. 81 %. Sie erreichten damit

eine höhere diagnostische Güte als die Risikoscores der Validierungsstudie. Der Risikoscore für das Zervixkarzinom wies in der Pilotstudie eine niedrigere Sensitivität (85 %) und Spezifität (77 %) auf als der Risikoscore dieser Arbeit. Auch die Zusammensetzung der Risikoscores unterschied sich in den beiden Studien. Zwar berücksichtigten beide Risikoscores für jede Schwelle den führenden HPV, jedoch wurden in der Pilotstudie statt der HPV-16-Splicemarker das HPV-16-Onkogen E7 in die Risikoscores für CIN2+ und CIN3+ einbezogen. Außerdem beinhaltete der Risikoscore für CIN2+ in der Pilotstudie BIRC5 und jener für CIN3+ ALDH1A1 und MCM2. Der Risikoscore für das Zervixkarzinom enthielt in der Pilotstudie außer dem führenden HPV den HPV-16-Splicemarker E6*I, Stathmin und KRT17. Trotz der hohen diagnostischen Güte der Risikoscores aus der Pilotstudie erscheinen diese in diverser Hinsicht biologisch fragwürdig. BIRC5 sollte als zelluläres Onkoprotein noch keine Rolle für die Diagnose von CIN2+ spielen und ALDH1A1 als Stammzellmarker keine Relevanz für CIN3+ besitzen. Dafür fehlen dem Risikoscore für das Zervixkarzinom die pathogenetisch wichtigen Onkoproteine und Stammzellmarker als Biomarker der Krebsstammzellen. Der biologische Hintergrund der Risikoscores dieser Arbeit wird in Kapitel 5.2.3 erörtert.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit die Aussage der Pilotstudie, dass eine Anwendbarkeit des QG in der Diagnostik von Zervixdysplasien möglich ist, validiert und um weitere Erkenntnisse (zusätzliche Biomarker, Confounder, Vergleich mit anderen diagnostischen Methoden) ergänzt werden.

Weitere Studien

In einer Studie von Santin et al. wurden mittels DNA-Microarray 14.500 Gene auf ihre differenzielle Expression in Zervixkarzinom-Zelllinien und gesunden zervikalen Keratinozyten untersucht.¹³⁶ Die ungefähr 500 Gene (u. a. für p16, MCM2 und Topo2 α), bei denen eine veränderte Expression festgestellt wurde, weisen allgemein auf die Komplexität der zellulären Vorgänge und die Möglichkeiten zur besseren diagnostischen Einordnung zervikaler Dysplasien durch die Messung der Biomarkerexpression hin.

Für die immunzyto- bzw. immunhistochemische Anwendung einiger Biomarker dieser Arbeit (p16, Ki67, Topo2 α , MCM2, BIRC5) konnte bereits in anderen Studien eine verbesserte Sensitivität und Spezifität bei der Diagnose zervikaler Dysplasien gezeigt werden.^{70,86,105,113} Die Färbung der Proteine erlaubt dabei eine qualitative, subjektive Beurteilung der Biomarkerexpression in einem begrenzten Ausschnitt der abgestrichenen bzw. biopsierten Zervix. Habis et al. zeigten, dass aus ThinPrep® PreservCyt-Medium RNA zervikal

abgestrichener Zellen in zufriedenstellender Menge und Qualität detektiert werden kann.¹³⁷ Diese Erkenntnis liefert die wissenschaftliche Grundlage für die quantitative Messung der mRNA und folglich die Objektivierung der Expression der gesamten abgestrichenen Zervix. Besonders für die Analyse der viralen Onkogene E6 und E7 liegen Studien vor, die für CIN2+ eine höhere Spezifität (bei niedrigerer Sensitivität) der mRNA im Vergleich zu DNA konstatieren.^{93,138} Die Messung der Biomarkerexpression, auch auf Basis von mRNA, ist folglich möglich und ist von diagnostischem Nutzen.

Eine prognostische Aussage der Biomarkerexpression über den Verlauf einer CIN1 konnten Rossi et al. und Del Pino et al. bisher für die mRNA von E6/E7 und die immunhistochemische Färbung von p16 zeigen.^{110,139} Quint et al. fanden jedoch zwischen progredienten und regredienten Läsionen keinen signifikanten Unterschied der immunhistochemischen Ergebnisse für p16, p53 und Ki67.¹⁰⁸ Dass die Biomarkerexpression eine Aussage über die Prognose zervikaler Dysplasien treffen kann, ist biologisch naheliegend, in Anbetracht der aktuellen Studienlage jedoch umstritten.

Die in dieser Studie verwendete Methode der Biomarkerquantifizierung, der QG, detektiert im Gegensatz zur geläufigen qRT-PCR die mRNA direkt aus dem Zelllysat und umgeht so die aufwendige RNA-Isolation. Hierdurch wird ein hoher Durchsatz möglich, der für eine Screening-Methode unumgänglich ist. Warrior et al. resümierten in ihrer Studie zur IL-8-Quantifizierung in epithelialen Lungenzellen, dass der QG eine sensitive, reproduzierbare und kosteneffiziente Methode darstelle.¹⁴⁰ Eine fast vollständige Korrelation der quantitativen Ergebnisse von p53-mRNA zwischen QG und qRT-PCR zeigten Morten et al. in ihrer Studie an kryokonservierten Brusttumoren (*fresh frozen tissue*). Die Ergebnisse aus formalinfixierten, paraffineingebetteten Geweben korrelierten im QG im Gegensatz zur qRT-PCR nicht mit den Ergebnissen aus den kryokonservierten Proben.¹⁴¹ In nicht-zervikalen Geweben konnte bereits nachgewiesen werden, dass der QG methodisch gleichwertig zur qRT-PCR ist und die Ergebnisse der beiden Laborverfahren, zumindest in RNA-schonend aufbereiteten Proben (z. B. Kryokonservierung), gut miteinander korrelieren.

Die Modellierung von Risikoscores aus quantitativ gemessenen Biomarkern zur Diagnostik zervikaler Dysplasien wurde bereits von anderen Autoren erfolgreich durchgeführt. Durch Literaturrecherche konnten zwei Studien mit ähnlichem Studiendesign (mRNA-basierte Messung von Biomarkern in Zervixdysplasien) ausgemacht werden. Beide nutzten jedoch die qRT-PCR zur Quantifizierung der mRNA. Del Pino et al. zeigten dabei eine signifikant höhere

Expression der Biomarker p16, BIRC5, Topo2 α , Ki67 und MMP9 in schweren (HSIL) im Vergleich zu leichten Dysplasien (LSIL). Eine Kombination von p16 und Topo2 α erzielte in ihrer Studie 96 % Sensitivität und 71 % Spezifität für CIN2+.¹⁴² In einer ähnlichen Studie von Bourmenskaya et al. war die höhere mRNA-Konzentration von p16, BIRC5 und Ki67 ebenfalls mit schwereren Krankheitsstadien assoziiert. Umgekehrt war die Expression des proapoptotischen BAX und des Progesteronrezeptors in Karzinomen herunterreguliert. Auf der Basis dieser Erkenntnisse entwickelten die Autoren ein Modell zur Berechnung des individuellen Zervixkarzinomrisikos von Frauen, das die Verhältnisse von p16 zu BAX und vom Progesteronrezeptor zu Ki67 beinhaltet.¹⁴³

Aus den hier aufgeführten Studien lässt sich folgendes Fazit ziehen: Die differenzielle Genexpression der Zervix in verschiedenen Krankheitsstadien wird zwar erforscht, jedoch nur in Ansätzen in der Diagnostik verwendet. Der Nutzung von mRNA als Target kommt hierbei bisher wenig Bedeutung zu, obwohl bereits gezeigt wurde, dass qualitativ und quantitativ ausreichende Mengen aus zervikalen Abstrichen isoliert werden können. Die vorhandenen Studien zur mRNA-Konzentration in Zervixdysplasien nutzten allesamt qRT-PCR, welche aufgrund der notwendigen RNA-Isolation ein aufwendiges Verfahren darstellt und deshalb nur bedingt Screening-kompatibel ist. Der QG als alternatives Verfahren erwies sich in nicht-zervikalem Gewebe bereits als anwendbar und aussagekräftig.

Die vorliegende Arbeit stellt die bisher größte Studie im Bereich der mRNA-basierten Biomarkerdiagnostik zervikaler Dysplasien dar und verwendet dabei gemeinsam mit der Pilotstudie als einzige die beschriebene Methodik des QuantiGene[®] 2.0 Plex Assays.

5.2.2 Vergleich des QuantiGenes[®] mit anderen Methoden

Die in dieser Arbeit erhobene Sensitivität von 64 % und Spezifität von 90 % der Zytologie für CIN2+ entspricht den Ergebnissen eines großen Reviews.⁶⁹ Während Ikenberg et al. resümierten, dass die Immunzytochemie mit p16 und Ki67 bei gleichbleibender Spezifität von 95 % die Sensitivität für CIN2+ auf 87 % anhebt, liegen die entsprechenden Werte in dieser Arbeit etwas darunter (83 % Sensitivität und 81 % Spezifität).⁷⁰ Diese Abweichung könnte durch unterschiedliche Studienkohorten zustande gekommen sein, da Ikenberg et al. Frauen aus dem Routine-Screening, im Gegensatz zu Patientinnen einer Dysplasiesprechstunde (*referral population*) wie in der vorliegenden Arbeit, einschlossen.

Davies et al. erhoben für CIN2+ eine kolposkopische Sensitivität von 87 % bei einer Spezifität von 45 %.⁸⁴ Die im Vergleich zu Davies et al. verminderte Sensitivität (78 %) und erhöhte Spezifität (84 %) dieser Arbeit für die Kolposkopie ergibt sich aus unterschiedlichen Definitionen von auffälligen kolposkopischen Befunden. Während bei Davies et al. bereits leichtgradige Veränderungen als auffällig definiert wurden, wurden in dieser Arbeit erst Befunde ab *major change* und somit schwerwiegende Veränderungen als positiv gedeutet.

Die hrHPV-Testung erreichte bei Cuzick et al. (Hybrid Capture 2, GP5+/6+ PCR) 96 % Sensitivität bei 91 % Spezifität in einer Screening-Population und bei Szarewski et al. (BD OnclarityTM) 95 % Sensitivität bei 24 % Spezifität in einer *referral population* (Frauen, die aufgrund auffälliger Zytologie zur Kolposkopie überwiesen worden sind).^{73,138} Die Population der vorliegenden Studie entstammt einer Dysplasiesprechstunde und entspricht somit am ehesten einer *referral population*. Der BD erreichte hier für CIN2+ bei 98 % Sensitivität eine Spezifität von 54 %, was im Mittelfeld zwischen den beiden Vergleichsstudien liegt.

Der QG mit den ermittelten Risikoscores erzielte sowohl für CIN2+ als auch für CIN3+ eine bessere Sensitivität bei schlechterer Spezifität als die Zytologie und eine bessere Spezifität bei schlechterer Sensitivität als die HPV-Testung mittels BD (Tabelle 32). Daher erreicht der QG zum jetzigen Entwicklungsstand nicht das Ziel, die Stärken von Zytologie (hohe Spezifität) und HPV-Testung (hohe Sensitivität) zu verbinden.

Die Umstrukturierung des Screening-Programms zu einem HPV-Test-basierten Screening, wie es unter anderem Ronco et al. und Luyten et al. vorschlugen, benötigt dringend ein überzeugendes Diagnostikum zur Triagierung HPV-positiver Frauen, da besonders bei jungen Frauen die niedrige Spezifität der HPV-Testung zu vielen falsch positiven Ergebnissen

führt.^{74,127} Der QG beinhaltet das Potenzial, Screening und Triagierung in einem zweistufigen Test zu verbinden, da er HPV-Diagnostik und Dysplasiediagnostik auf Grundlage der Biomarkerexpression kombiniert. So könnten mit dem QG CIN2+ und CIN3+ durch die HPV-Diagnostik mit 84 % bzw. 87 % Sensitivität und durch die Biomarkerdiagnostik mit 78 % bzw. 73 % Spezifität diagnostiziert werden.

Im Gegensatz zur Zytologie und Histologie erfasst der QG die zervikale Läsion nicht morphologisch, sondern in ihrer molekularen Komplexität. Dabei werden die Biomarker nicht qualitativ, wie bei der Immunzyto- und Immunhistochemie, sondern quantitativ erfasst. Dies ermöglicht Objektivität und erfasst die Entstehung des Zervixkarzinoms nicht als stufenförmigen Prozess, sondern als Kontinuum. In der Tatsache, dass nur ca. 50 % der CIN3 progredieren, zeigt sich der Bedarf einer differenzierteren Betrachtung der Zervixkarzinomvorstufen.⁸⁸ Die histologische Klassifikation stellt aktuell den Goldstandard dar und dient daher als schwer anfechtbarer Vergleichstest.

5.2.3 Biomarker im Pathogenese-konzept des Zervixkarzinoms und seiner Vorstufen

Aus der medianen Expression der Biomarker in den Krankheitsstadien (Abbildung 9), den Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman und den ROC-Analysen ergibt sich ein mRNA-basiertes, quantitatives Modell der Biomarker im Pathogenese-konzept der zervikalen Dysplasie. Dabei nimmt die Onkogenexpression (E7) des führenden HPV-Typen mit der Schwere der Erkrankung kontinuierlich zu. Der Tumorsuppressor p16 ist ein Biomarker für HPV-induzierte Dysplasien, dessen Expression durch die E7-bedingte Überexpression von E2F stimuliert wird.¹⁰⁹ Aus diesem Grund steigt seine Expression ebenfalls mit zunehmender Dysplasieschwere an. Für das Karzinom besitzt p16 im Vergleich zu anderen Biomarkern jedoch nur eine eingeschränkte Aussagekraft.

Die mehrfache Berücksichtigung von HPV 16 (führender HPV, E6*I, E1^E4, E7) in der multivariaten Regression und den Risikoscores verdeutlicht die zentrale Rolle dieses Typen für die Entstehung zervikaler Dysplasien. Während die Expression von HPV 16 E1^E4 für produktive Infektionen charakteristisch ist, nimmt die Expression der HPV-16-Onkogene mit der Dysplasieschwere zu.⁹⁶

Zwischen den Krankheitsschwellen CIN2+ und CIN3+ unterscheiden sich die Biomarker mit den höchsten AUC in der ROC-Analyse und die daraus ermittelten Cutoffs nur minimal, was darauf hinweist, dass die histologische Abgrenzung der beiden Schweregrade schwierig ist. Für

beide Schwellen eignen sich besonders p16, HPV 16 E6*I, HPV 16 E7 und Stathmin. Abbildung 9 zeigt einen Anstieg der medianen Expression der Proliferationsmarker (Stathmin, Ki67, MCM2, Topo2 α) bei Patientinnen mit CIN3 im Gegensatz zu Patientinnen mit CIN2. Diese erhöhte Proliferationsaktivität deutet auf den präkanzerösen Charakter der CIN3 hin.

Die gemessen an der AUC der ROC-Analyse relevantesten Biomarker zur Diagnostik des Zervixkarzinoms unterscheiden sich stark von denen der Schwellen CIN2+ und CIN3+, da das Karzinom im Gegensatz zu seinen dysplastischen Vorstufen eine eigene und deutlich abgrenzbare histologische Entität darstellt. Die Expression der Proliferationsmarker erreichen bei betroffenen Frauen ein noch höheres Niveau als bei Patientinnen mit CIN3. Hinzu kommt die erhöhte Expression des Apoptose-Inhibitors BIRC5 und des Stammzellmarkers TERT als Zeichen der Malignität.

Die **Abbildung 18** stellt zusammenfassend die Veränderungen der Biomarker in den verschiedenen Krankheitsstadien dar.

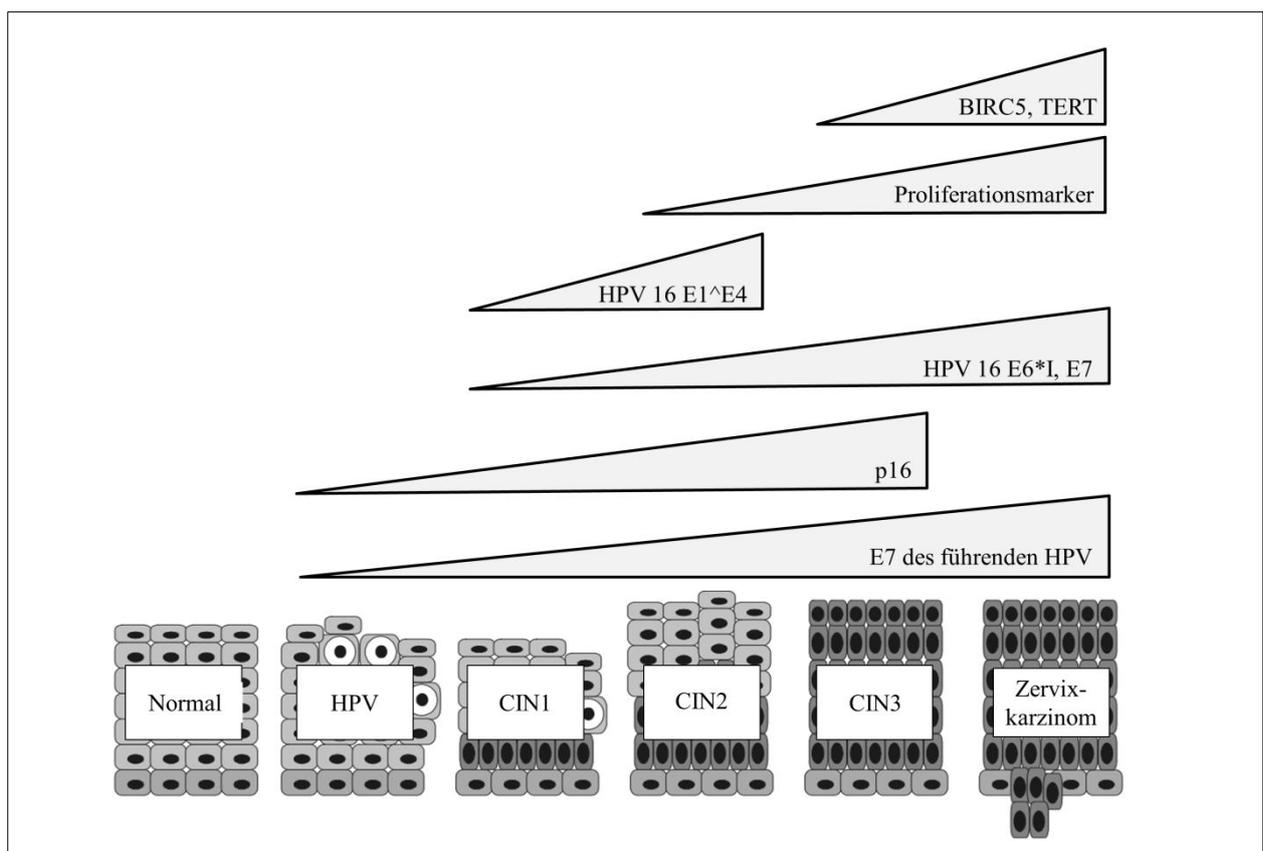


Abbildung 18: Biomarkerexpression in der Pathogenese zervikaler Dysplasien und des Zervixkarzinoms. (HPV = Humanes Papillomvirus; CIN = zervikale intraepitheliale Neoplasie; TERT = Telomerase Reverse Transkriptase) [Modifiziert nach Wentzensen et al., 2007⁹¹]

5.3 Limitationen

Bei der Interpretation der Ergebnisse dieser Studie müssen einige Limitationen bezüglich der Repräsentativität der Studienpopulation, der Messmethodik, der Datennormierung und Auswertung berücksichtigt werden.

Die Population dieser Studie entstammt dem Patientenkollektel einer Dysplasiesprechstunde (*referral population*), weshalb die Prävalenz der HPV-Infektion und der Zervixdysplasien die der Allgemeinbevölkerung übersteigt. Die Übertragung der Ergebnisse auf eine Screening-Population ist aufgrund dieses Selektionsbias nur zurückhaltend vorzunehmen. Für den angestrebten Einsatz des QG als Screening-Test muss eine Validierung an einer hierfür repräsentativen Kohorte (weibliche Allgemeinbevölkerung) erfolgen.

Trotz Anreicherung des Probenkollektivs mit Zervixkarzinomen, die mehrheitlich nicht aus den prospektiv gesammelten Proben entstammten, blieb ihre Anzahl relativ gering ($n = 40$). Die niedrige Anzahl und vermutlich schlechtere Probenqualität (z. B. durch lange Lagerung) könnten die Ergebnisse beeinflusst haben, sodass die ROC-Analysen, die logistische Regression und der Risikoscore für die Krankheitsschwelle zum Zervixkarzinom mit besonderer Vorsicht betrachtet werden sollten.

Möglicherweise existieren Varianzen zwischen verschiedenen Chargen von Messreagenzien (Tabelle 9), vor allem bei den Capture Beads. Da diese die Messergebnisse beeinflussen können, müssen die ermittelten Cutoffs und Risikoscores gegebenenfalls an die jeweilige Charge angepasst werden. Aus diesem Grund ist der Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit derer der Pilotstudie nur eingeschränkt möglich. Um eine Reliabilität der Messergebnisse sicherzustellen, ist hierfür zukünftig eine zuverlässige Qualitätskontrolle zu etablieren.

Für die Auswertung der Biomarkerexpression wurden alle Werte auf das Haushaltsgen Actin- β normiert, welches in gesunden und dysplastisch veränderten zervikalen Zellen gleichermaßen exprimiert wird. Da bei einem zervikalen Abstrich eine Mischung aus gesunden und dysplastischen Zellen verschiedener Schweregrade entnommen wird, die Biomarker aber nur in den dysplastischen Zellen vermehrt exprimiert werden, kommt es durch die Normierung auf Actin- β zu falsch niedrigen relativen Werten für die Biomarkerexpression. Dies ist wahrscheinlich vor allem der Fall, wenn die Dysplasie flächenmäßig sehr klein ist oder aus anderen Gründen nur wenig abgestrichen wurde. Eine Normierung auf einen dysplasiespezifischen Marker (z. B. p16) könnte dieses Problem zukünftig beheben.

Sensitivität und Spezifität des QG und der etablierten diagnostischen Methoden (Zytologie, HPV-Testung) ergaben sich aus dem Vergleich mit dem Goldstandard, der Histopathologie. Da in der klinischen Praxis die zytologische und infektiologische Diagnostik (Screening-Tests) die Grundlage für die anschließende histopathologische Untersuchung (Bestätigungstest) darstellen, besteht zwischen den Ergebnissen dieser Methoden im vorliegenden Studiendesign eine Abhängigkeit. Diese führt womöglich zu falsch hohen Werten für die Sensitivität und Spezifität der Zytologie und der HPV-Testung.

Um eine potenzielle Überlegenheit des QG gegenüber dem Goldstandard mit seinen Schwächen (besonders Subjektivität und fehlende prognostische Aussagekraft) zu beweisen, wird eine große longitudinale Studie mit zahlreichen und langfristigen Follow-Ups benötigt. Aufgrund der geringen Anzahl der verwertbaren Follow-Ups ($n = 24$) und der Kürze der Zeitintervalle dieser Studie, ließen sich kaum signifikante Rückschlüsse auf eine prognostische Überlegenheit des QG ziehen, jedoch konnten erste Hinweise (MMP7) hierfür geliefert werden.

5.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Der aktuelle Diskurs zur Umstrukturierung des Zervixkarzinom-Screenings wird durch zwei Methoden, die Zytologie und die HPV-Testung, geprägt. Während die Subjektivität und niedrige Sensitivität der Zytologie jährliche Untersuchungen erforderlich machen und so einen hohen personellen und finanziellen Aufwand verursachen, führt die HPV-Testung wegen ihrer vergleichsweise niedrigen Spezifität im Screening zu vielen falsch positiven Ergebnissen und erfordert eine anschließende Triagierung der positiv getesteten Frauen.

Den diagnostischen Goldstandard der zervikalen Dysplasien stellt die Histopathologie dar. Da schätzungsweise 50 % der CIN3 zum Karzinom progredieren, wird in diesem Krankheitsstadium leitliniengerecht die Konisation empfohlen.⁸⁸ Da der Goldstandard keine Aussage zu Progressions- bzw. Regressionsrisiken einer zervikalen Läsion treffen kann, kommt es entsprechend bei 50 % der Patientinnen mit CIN3 zur potenziell vermeidbaren Übertherapie mit gesundheitlichen Folgen für die Patientin und unnötigen Kosten für das Gesundheitssystem.

Der QuantiGene[®] 2.0 Plex Assay stellt einen objektiven, quantitativen und mRNA-basierten Test dar, der HPV- und Dysplasiediagnostik auf der Grundlage von Biomarkern kombiniert. Im Gegensatz zur histopathologischen, stufenförmigen Klassifikation begreift der QG die zervikale Läsion in ihrer molekularbiologischen Komplexität. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass der QG sich sowohl zum Zervixkarzinom-Screening als auch zur Diagnostik der therapierbaren Krebsvorstufen eignet. Eine mögliche Aussagekraft über die Progressions- bzw. Regressionsrisiken einer zervikalen Läsion wird angenommen.

Zukünftig denkbar wäre eine Anwendung des QG als zweistufiger „HPVplus“-Test, der zunächst durch die HPV-Diagnostik Risikopatientinnen selektiert und zeitgleich die Triagierung anhand der Biomarkerexpression vornimmt. Zur weiteren Verbesserung der diagnostischen Güte könnten weitere Biomarker, insbesondere die Splicemarker anderer HPV-Typen, in den Assay eingeschlossen werden. Dabei sollten fehlerhafte (HPV 68, AGR2) und wenig aussagekräftige (CD63) Sonden ersetzt werden.

Um die Stärken des QG gegenüber den etablierten diagnostischen und Screening-Methoden zu beweisen, wird diese Studie zur Sammlung zahlreicher und langfristiger Follow-Ups weitergeführt.

Literaturverzeichnis

- 1 Gasparini R, Panatto D. Cervical cancer: from Hippocrates through Rigoni-Stern to zur Hausen. *Vaccine* 2009; 27 Suppl 1:A4-5.
- 2 Singh GK. Rural-urban trends and patterns in cervical cancer mortality, incidence, stage, and survival in the United States, 1950-2008. *Journal of community health* 2012; 37:217-23.
- 3 Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer* 2015; 136:E359-86.
- 4 Cervical Cancer - Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. International Agency for Research on Cancer, 2012. (Accessed August 22, 2017 at http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.)
- 5 de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324:17-27.
- 6 Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Reviews in medical virology* 2015; 25 Suppl 1:2-23.
- 7 Antonsson A, Forslund O, Ekberg H, Sterner G, Hansson BG. The ubiquity and impressive genomic diversity of human skin papillomaviruses suggest a commensalic nature of these viruses. *Journal of virology* 2000; 74:11636-41.
- 8 Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Munoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *British journal of cancer* 2003; 88:63-73.
- 9 Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of pathology* 1999; 189:12-9.
- 10 Alemany L, Saunier M, Alvarado-Cabrero I, Quiros B, Salmeron J, Shin HR, Pirog EC, Guimera N, Hernandez-Suarez G, Felix A, Clavero O, Lloveras B, Kasamatsu E, Goodman MT, Hernandez BY, Laco J, Tinoco L, Geraets DT, Lynch CF, Mandys V, Poljak M, Jach R, Verge J, Clavel C, Ndiaye C, Klaustermeier J, Cubilla A, Castellsague X, Bravo IG, Pawlita M, Quint WG, Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S. Human papillomavirus DNA prevalence and type distribution in anal carcinomas worldwide. *International journal of cancer* 2015; 136:98-107.

-
- 11 Alemany L, Saunier M, Tinoco L, Quiros B, Alvarado-Cabrero I, Alejo M, Joura EA, Maldonado P, Klaustermeier J, Salmeron J, Bergeron C, Petry KU, Guimera N, Clavero O, Murillo R, Clavel C, Wain V, Geraets DT, Jach R, Cross P, Carrilho C, Molina C, Shin HR, Mandys V, Nowakowski AM, Vidal A, Lombardi L, Kitchener H, Sica AR, Magana-Leon C, Pawlita M, Quint W, Bravo IG, Munoz N, de Sanjose S, Bosch FX. Large contribution of human papillomavirus in vaginal neoplastic lesions: a worldwide study in 597 samples. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 2014; 50:2846-54.
 - 12 Faber MT, Sand FL, Albieri V, Norrild B, Kjaer SK, Verdoodt F. Prevalence and type distribution of human papillomavirus in squamous cell carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva. *International journal of cancer* 2017; 141:1161-9.
 - 13 Alemany L, Cubilla A, Halc G, Kasamatsu E, Quiros B, Masferrer E, Tous S, Lloveras B, Hernandez-Suarez G, Lonsdale R, Tinoco L, Alejo M, Alvarado-Cabrero I, Laco J, Guimera N, Poblet E, Lombardi LE, Bergeron C, Clavero O, Shin HR, Ferrera A, Felix A, Germar J, Mandys V, Clavel C, Tzardi M, Pons LE, Wain V, Cruz E, Molina C, Mota JD, Jach R, Velasco J, Carrilho C, Lopez-Revilla R, Goodman MT, Quint WG, Castellsague X, Bravo I, Pawlita M, Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S. Role of Human Papillomavirus in Penile Carcinomas Worldwide. *European urology* 2016; 69:953-61.
 - 14 Castellsague X, Alemany L, Quer M, Halc G, Quiros B, Tous S, Clavero O, Alos L, Biegner T, Szafarowski T, Alejo M, Holzinger D, Cadena E, Claros E, Hall G, Laco J, Poljak M, Benevolo M, Kasamatsu E, Mehanna H, Ndiaye C, Guimera N, Lloveras B, Leon X, Ruiz-Cabezas JC, Alvarado-Cabrero I, Kang CS, Oh JK, Garcia-Rojo M, Iljazovic E, Ajayi OF, Duarte F, Nessa A, Tinoco L, Duran-Padilla MA, Pirog EC, Viarheichyk H, Morales H, Costes V, Felix A, Germar MJ, Mena M, Ruacan A, Jain A, Mehrotra R, Goodman MT, Lombardi LE, Ferrera A, Malami S, Albanesi EI, Dabed P, Molina C, Lopez-Revilla R, Mandys V, Gonzalez ME, Velasco J, Bravo IG, Quint W, Pawlita M, Munoz N, de Sanjose S, Xavier Bosch F. HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients. *Journal of the National Cancer Institute* 2016; 108:djv403.
 - 15 Roberts JN, Buck CB, Thompson CD, Kines R, Bernardo M, Choyke PL, Lowy DR, Schiller JT. Genital transmission of HPV in a mouse model is potentiated by nonoxynol-9 and inhibited by carrageenan. *Nature medicine* 2007; 13:857-61.
 - 16 Johnson KM, Kines RC, Roberts JN, Lowy DR, Schiller JT, Day PM. Role of heparan sulfate in attachment to and infection of the murine female genital tract by human papillomavirus. *Journal of virology* 2009; 83:2067-74.
 - 17 Kines RC, Thompson CD, Lowy DR, Schiller JT, Day PM. The initial steps leading to papillomavirus infection occur on the basement membrane prior to cell surface binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009; 106:20458-63.
 - 18 Bousarghin L, Touze A, Sizaret PY, Coursaget P. Human papillomavirus types 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells. *Journal of virology* 2003; 77:3846-50.
-

-
- 19 Kamper N, Day PM, Nowak T, Selinka HC, Florin L, Bolscher J, Hilbig L, Schiller JT, Sapp M. A membrane-destabilizing peptide in capsid protein L2 is required for egress of papillomavirus genomes from endosomes. *Journal of virology* 2006; 80:759-68.
 - 20 Florin L, Becker KA, Lambert C, Nowak T, Sapp C, Strand D, Streeck RE, Sapp M. Identification of a dynein interacting domain in the papillomavirus minor capsid protein L2. *Journal of virology* 2006; 80:6691-6.
 - 21 Doeberitz M, Vinokurova S. Host factors in HPV-related carcinogenesis: cellular mechanisms controlling HPV infections. *Archives of medical research* 2009; 40:435-42.
 - 22 Maglennon GA, Doorbar J. The biology of papillomavirus latency. *The open virology journal* 2012; 6:190-7.
 - 23 Pyeon D, Pearce SM, Lank SM, Ahlquist P, Lambert PF. Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. *PLoS pathogens* 2009; 5:e1000318.
 - 24 Seo YS, Muller F, Lusky M, Hurwitz J. Bovine papilloma virus (BPV)-encoded E1 protein contains multiple activities required for BPV DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993; 90:702-6.
 - 25 Mohr IJ, Clark R, Sun S, Androphy EJ, MacPherson P, Botchan MR. Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science (New York, N.Y.)* 1990; 250:1694-9.
 - 26 You J, Croyle JL, Nishimura A, Ozato K, Howley PM. Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. *Cell* 2004; 117:349-60.
 - 27 Steger G, Corbach S. Dose-dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type 18 by the viral E2 protein. *Journal of virology* 1997; 71:50-8.
 - 28 Bodily J, Laimins LA. Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. *Trends in microbiology* 2011; 19:33-9.
 - 29 Kabsch K, Mossadegh N, Kohl A, Komposch G, Schenkel J, Alonso A, Tomakidi P. The HPV-16 E5 protein inhibits TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in human keratinocyte raft cultures. *Intervirology* 2004; 47:48-56.
 - 30 Ashrafi GH, Haghshenas M, Marchetti B, Campo MS. E5 protein of human papillomavirus 16 downregulates HLA class I and interacts with the heavy chain via its first hydrophobic domain. *International journal of cancer* 2006; 119:2105-12.
 - 31 Nakahara T, Peh WL, Doorbar J, Lee D, Lambert PF. Human papillomavirus type 16 E1circumflexE4 contributes to multiple facets of the papillomavirus life cycle. *Journal of virology* 2005; 79:13150-65.
 - 32 Peh WL, Brandsma JL, Christensen ND, Cladel NM, Wu X, Doorbar J. The viral E4 protein is required for the completion of the cottontail rabbit papillomavirus productive cycle in vivo. *Journal of virology* 2004; 78:2142-51.
-

-
- 33 Doorbar J. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology* 2013; 445:80-98.
- 34 Johansson C, Somberg M, Li X, Backstrom Winquist E, Fay J, Ryan F, Pim D, Banks L, Schwartz S. HPV-16 E2 contributes to induction of HPV-16 late gene expression by inhibiting early polyadenylation. *The EMBO journal* 2012; 31:3212-27.
- 35 Cardone G, Moyer AL, Cheng N, Thompson CD, Dvoretzky I, Lowy DR, Schiller JT, Steven AC, Buck CB, Trus BL. Maturation of the human papillomavirus 16 capsid. *mBio* 2014; 5:e01104-14.
- 36 Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *The New England journal of medicine* 1998; 338:423-8.
- 37 Rositch AF, Koshiol J, Hudgens MG, Razzaghi H, Backes DM, Pimenta JM, Franco EL, Poole C, Smith JS. Patterns of persistent genital human papillomavirus infection among women worldwide: a literature review and meta-analysis. *International journal of cancer* 2013; 133:1271-85.
- 38 Kjaer SK, Frederiksen K, Munk C, Iftner T. Long-term absolute risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or worse following human papillomavirus infection: role of persistence. *Journal of the National Cancer Institute* 2010; 102:1478-88.
- 39 Winer RL, Kiviat NB, Hughes JP, Adam DE, Lee SK, Kuypers JM, Koutsky LA. Development and duration of human papillomavirus lesions, after initial infection. *The Journal of infectious diseases* 2005; 191:731-8.
- 40 Moscicki AB, Schiffman M, Kjaer S, Villa LL. Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. *Vaccine* 2006; 24 Suppl 3:S3/42-51.
- 41 Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature reviews. Cancer* 2010; 10:550-60.
- 42 Hwang SG, 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. *The Journal of biological chemistry* 2002; 277:2923-30.
- 43 Munger K, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E, Howley PM. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *The EMBO journal* 1989; 8:4099-105.
- 44 Chellappan S, Kraus VB, Kroger B, Munger K, Howley PM, Phelps WC, Nevins JR. Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992; 89:4549-53.
- 45 Jones DL, Alani RM, Munger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21^{Cip1}-mediated inhibition of cdk2. *Genes & development* 1997; 11:2101-11.
-

- 46 Sherr CJ,McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer cell* 2002; 2:103-12.
- 47 Nomine Y, Masson M, Charbonnier S, Zanier K, Ristriani T, Deryckere F, Sibling AP, Desplancq D, Atkinson RA, Weiss E, Orfanoudakis G, Kieffer B,Trave G. Structural and functional analysis of E6 oncoprotein: insights in the molecular pathways of human papillomavirus-mediated pathogenesis. *Molecular cell* 2006; 21:665-78.
- 48 Galloway DA, Gewin LC, Myers H, Luo W, Grandori C, Katzenellenbogen RA,McDougall JK. Regulation of telomerase by human papillomaviruses. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 2005; 70:209-15.
- 49 Klingelhutz AJ, Foster SA,McDougall JK. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* 1996; 380:79-82.
- 50 Duensing S, Duensing A, Crum CP,Munger K. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein-induced abnormal centrosome synthesis is an early event in the evolving malignant phenotype. *Cancer research* 2001; 61:2356-60.
- 51 Melsheimer P, Vinokurova S, Wentzensen N, Bastert G,von Knebel Doeberitz M. DNA aneuploidy and integration of human papillomavirus type 16 e6/e7 oncogenes in intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the cervix uteri. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2004; 10:3059-63.
- 52 Duensing S,Munger K. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability. *Cancer research* 2002; 62:7075-82.
- 53 Durst M, Gallahan D, Jay G,Rhim JS. Glucocorticoid-enhanced neoplastic transformation of human keratinocytes by human papillomavirus type 16 and an activated ras oncogene. *Virology* 1989; 173:767-71.
- 54 Jeon S,Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995; 92:1654-8.
- 55 Jeon S, Allen-Hoffmann BL,Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *Journal of virology* 1995; 69:2989-97.
- 56 Romanczuk H,Howley PM. Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992; 89:3159-63.
- 57 Bechtold V, Beard P,Raj K. Human papillomavirus type 16 E2 protein has no effect on transcription from episomal viral DNA. *Journal of virology* 2003; 77:2021-8.

-
- 58 Pett MR, Herdman MT, Palmer RD, Yeo GS, Shivji MK, Stanley MA, Coleman N. Selection of cervical keratinocytes containing integrated HPV16 associates with episome loss and an endogenous antiviral response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006; 103:3822-7.
- 59 Peter M, Rosty C, Couturier J, Radvanyi F, Teshima H, Sastre-Garau X. MYC activation associated with the integration of HPV DNA at the MYC locus in genital tumors. *Oncogene* 2006; 25:5985-93.
- 60 Vinokurova S, Wentzensen N, Kraus I, Klaes R, Driesch C, Melsheimer P, Kisseljov F, Durst M, Schneider A, von Knebel Doeberitz M. Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer research* 2008; 68:307-13.
- 61 Day PM, Kines RC, Thompson CD, Jagu S, Roden RB, Lowy DR, Schiller JT. In vivo mechanisms of vaccine-induced protection against HPV infection. *Cell host & microbe* 2010; 8:260-70.
- 62 Epidemiologisches Bulletin Nr. 16. Robert-Koch-Institut, 2016. (Accessed August 22, 2017 at https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2016/Ausgaben/16_16.pdf?__blob=publicationFile.)
- 63 Delere Y, Bohmer MM, Walter D, Wichmann O. HPV vaccination coverage among women aged 18-20 years in Germany three years after recommendation of HPV vaccination for adolescent girls: results from a cross-sectional survey. *Human vaccines & immunotherapeutics* 2013; 9:1706-11.
- 64 Delere Y, Renschmidt C, Leuschner J, Schuster M, Fesenfeld M, Schneider A, Wichmann O, Kaufmann AM. Human Papillomavirus prevalence and probable first effects of vaccination in 20 to 25 year-old women in Germany: a population-based cross-sectional study via home-based self-sampling. *BMC infectious diseases* 2014; 14:87.
- 65 Paavonen J, Naud P, Salmeron J, Wheeler CM, Chow SN, Apter D, Kitchener H, Castellsague X, Teixeira JC, Skinner SR, Hedrick J, Jaisamrarn U, Limson G, Garland S, Szarewski A, Romanowski B, Aoki FY, Schwarz TF, Poppe WA, Bosch FX, Jenkins D, Hardt K, Zahaf T, Descamps D, Struyf F, Lehtinen M, Dubin G. Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): final analysis of a double-blind, randomised study in young women. *Lancet (London, England)* 2009; 374:301-14.
- 66 Bogaards JA, Coupe VM, Xiridou M, Meijer CJ, Wallinga J, Berkhof J. Long-term impact of human papillomavirus vaccination on infection rates, cervical abnormalities, and cancer incidence. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)* 2011; 22:505-15.
- 67 Petry KU, Wormann B, Schneider A. Benefits and risks of cervical cancer screening. *Oncology research and treatment* 2014; 37 Suppl 3:48-57.
- 68 Zhu J, Norman I, Elfgrén K, Gaberi V, Hagmar B, Hjerpe A, Andersson S. A comparison of liquid-based cytology and Pap smear as a screening method for cervical cancer. *Oncology reports* 2007; 18:157-60.
-

-
- 69 Nanda K, McCrory DC, Myers ER, Bastian LA, Hasselblad V, Hickey JD, Matchar DB. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. *Annals of internal medicine* 2000; 132:810-9.
- 70 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 HH, Puig-Tintore LM, Sideri M, Rehm S, Ridder R. Screening for cervical cancer precursors with p16/Ki-67 dual-stained cytology: results of the PALMS study. *Journal of the National Cancer Institute* 2013; 105:1550-7.
- 71 Stoler MH, Schiffman M. Interobserver reproducibility of cervical cytologic and histologic interpretations: realistic estimates from the ASCUS-LSIL Triage Study. *Jama* 2001; 285:1500-5.
- 72 Münchner Nomenklatur III für die gynäkologische Zytodiagnostik der Zervix. Arbeitsgemeinschaft Zervixpathologie und Kolposkopie e.V. (Accessed September 20, 2017 at <http://www.ag-cpc.de/pages/muenchen-iii.php>.)
- 73 Cuzick J, Clavel C, Petry KU, Meijer CJ, 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. *International journal of cancer* 2006; 119:1095-101.
- 74 Ronco G, Dillner J, Elfstrom KM, Tunesi S, Snijders PJ, Arbyn M, Kitchener H, Segnan N, Gilham C, Giorgi-Rossi P, Berkhof J, Peto J, Meijer CJ. Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials. *Lancet (London, England)* 2014; 383:524-32.
- 75 Poljak M, Kocjan BJ, Ostrbenk A, Seme K. Commercially available molecular tests for human papillomaviruses (HPV): 2015 update. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 2016; 76 Suppl 1:S3-s13.
- 76 Meijer CJ, Berkhof J, Castle PE, Hesselink AT, Franco EL, Ronco G, Arbyn M, Bosch FX, Cuzick J, Dillner J, Heideman DA, Snijders PJ. Guidelines for human papillomavirus DNA test requirements for primary cervical cancer screening in women 30 years and older. *International journal of cancer* 2009; 124:516-20.
- 77 Arbyn M, Depuydt C, Benoy I, Bogers J, Cuschieri K, Schmitt M, Pawlita M, Geraets D, Heard I, Gheit T, Tommasino M, Poljak M, Bonde J, Quint W. VALGENT: A protocol for clinical validation of human papillomavirus assays. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 2016; 76 Suppl 1:S14-21.
- 78 Arbyn M, Snijders PJ, Meijer CJ, Berkhof J, Cuschieri K, Kocjan BJ, Poljak M. Which high-risk HPV assays fulfil criteria for use in primary cervical cancer screening? *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2015; 21:817-26.
- 79 Heideman DA, Hesselink AT, van Kemenade FJ, Iftner T, Berkhof J, Topal F, Agard D, Meijer CJ, Snijders PJ. The Aptima HPV assay fulfills the cross-sectional clinical and reproducibility criteria of international guidelines for human papillomavirus test requirements for cervical screening. *Journal of clinical microbiology* 2013; 51:3653-7.
-

-
- 80 Ejegod DM SI, Cuschieri KS, Nussbaumer WA. Clinical Validation of the BD Onclarity™ HPV Assay Using a Non- Inferiority Test. *J Med Microb Diagn* 2013; S3:003.
- 81 Geraets DT, Cuschieri K, de Koning MN, van Doorn LJ, Snijders PJ, Meijer CJ, Quint WG, Arbyn M. Clinical evaluation of a GP5+/6+-based luminex assay having full high-risk human papillomavirus genotyping capability and an internal control. *Journal of clinical microbiology* 2014; 52:3996-4002.
- 82 Petry KU, Bohmer G, Iftner T, Davies P, Brummer O, Kuhnle H. Factors associated with an increased risk of prevalent and incident grade III cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer among women with Papanicolaou tests classified as grades I or II cervical intraepithelial neoplasia. *American journal of obstetrics and gynecology* 2002; 186:28-34.
- 83 Kuhn W. [Colposcopy in the diagnosis of early cervical cancer]. *Der Pathologe* 2011; 32:497-504.
- 84 Davies KR, Cantor SB, Cox DD, Follen M. An alternative approach for estimating the accuracy of colposcopy in detecting cervical precancer. *PloS one* 2015; 10:e0126573.
- 85 Jenkins D. Histopathology and cytopathology of cervical cancer. *Disease markers* 2007; 23:199-212.
- 86 Howitt BE, Nucci MR, Drapkin R, Crum CP, Hirsch MS. Stathmin-1 expression as a complement to p16 helps identify high-grade cervical intraepithelial neoplasia with increased specificity. *The American journal of surgical pathology* 2013; 37:89-97.
- 87 Petry KU. Management options for cervical intraepithelial neoplasia. *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology* 2011; 25:641-51.
- 88 McCredie MR, Sharples KJ, Paul C, Baranyai J, Medley G, Jones RW, Skegg DC. Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: a retrospective cohort study. *The Lancet. Oncology* 2008; 9:425-34.
- 89 Munro A, Powell RG, P AC, Bowen S, Spilsbury K, O'Leary P, Semmens JB, Codde J, Williams V, Steel N, Leung Y. Spontaneous regression of CIN2 in women aged 18-24 years: a retrospective study of a state-wide population in Western Australia. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica* 2016; 95:291-8.
- 90 Kyrgiou M, Athanasiou A, Paraskevaidi M, Mitra A, Kalliala I, Martin-Hirsch P, Arbyn M, Bennett P, Paraskevaidis E. Adverse obstetric outcomes after local treatment for cervical preinvasive and early invasive disease according to cone depth: systematic review and meta-analysis. *BMJ (Clinical research ed.)* 2016; 354:i3633.
- 91 Wentzensen N, von Knebel Doeberitz M. Biomarkers in cervical cancer screening. *Disease markers* 2007; 23:315-30.
-

-
- 92 Agorastos T, Chatzistamatiou K, Moysiadis T, Kaufmann AM, Skenderi A, Lekka I, Koch I, Soutschek E, Boecher O, Kilintzis V, Angelidou S, Katsiki E, Hagemann I, Boschetti Gruetzmacher E, Tsertanidou A, Angelis L, Maglaveras N, Jansen-Duerr P. Human papillomavirus E7 protein detection as a method of triage to colposcopy of HPV positive women, in comparison to genotyping and cytology. Final results of the PIPAVIR study. *International journal of cancer* 2017; 141:519-30.
- 93 Baron C, Henry M, Tamalet C, Villeret J, Richet H, Carcopino X. Relationship between HPV 16, 18, 31, 33, 45 DNA detection and quantitation and E6/E7 mRNA detection among a series of cervical specimens with various degrees of histological lesions. *Journal of medical virology* 2015; 87:1389-96.
- 94 Woodman CB, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nature reviews. Cancer* 2007; 7:11-22.
- 95 Schmitt M, Depuydt C, Benoy I, Bogers J, Antoine J, Pawlita M, Arbyn M. Viral load of high-risk human papillomaviruses as reliable clinical predictor for the presence of cervical lesions. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2013; 22:406-14.
- 96 Schmitt M, Dalstein V, Waterboer T, Clavel C, Gissmann L, Pawlita M. Diagnosing cervical cancer and high-grade precursors by HPV16 transcription patterns. *Cancer research* 2010; 70:249-56.
- 97 Tang S, Tao M, McCoy JP, Jr., Zheng ZM. The E7 oncoprotein is translated from spliced E6*I transcripts in high-risk human papillomavirus type 16- or type 18-positive cervical cancer cell lines via translation reinitiation. *Journal of virology* 2006; 80:4249-63.
- 98 Alloul N, Sherman L. Transcription-modulatory activities of differentially spliced cDNAs encoding the E2 protein of human papillomavirus type 16. *The Journal of general virology* 1999; 80 (Pt 9):2461-70.
- 99 Herfs M, Yamamoto Y, Laury A, Wang X, Nucci MR, McLaughlin-Drubin ME, Munger K, Feldman S, McKeon FD, Xian W, Crum CP. A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012; 109:10516-21.
- 100 Schmitt S, Safferling K, Westphal K, Hrabowski M, Muller U, Angel P, Wiechert L, Ehemann V, Muller B, Holland-Cunz S, Stichel D, Harder N, Rohr K, Germann G, Matthaus F, Schirmacher P, Grabe N, Breuhahn K. Stathmin regulates keratinocyte proliferation and migration during cutaneous regeneration. *PloS one* 2013; 8:e75075.
- 101 Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of cellular physiology* 2000; 182:311-22.
- 102 Bullwinkel J, Baron-Luhr B, Ludemann A, Wohlenberg C, Gerdes J, Scholzen T. Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *Journal of cellular physiology* 2006; 206:624-35.
-

-
- 103 Labib K, Kearsley SE, Diffley JF. MCM2-7 proteins are essential components of prereplicative complexes that accumulate cooperatively in the nucleus during G1-phase and are required to establish, but not maintain, the S-phase checkpoint. *Molecular biology of the cell* 2001; 12:3658-67.
- 104 Watt PM, Hickson ID. Structure and function of type II DNA topoisomerases. *The Biochemical journal* 1994; 303 (Pt 3):681-95.
- 105 Badr RE, Walts AE, Chung F, Bose S. BD ProEx C: a sensitive and specific marker of HPV-associated squamous lesions of the cervix. *The American journal of surgical pathology* 2008; 32:899-906.
- 106 Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144:646-74.
- 107 Chang MS, Oh S, Jung EJ, Park JH, Jeon HW, Lee TS, Kim JH, Choi E, Byeon SJ, Park IA. High-risk human papillomavirus load and biomarkers in cervical intraepithelial neoplasia and cancer. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 2014; 122:427-36.
- 108 Quint KD, de Koning MN, Quint WG, Pirog EC. Progression of cervical low grade squamous intraepithelial lesions: in search of prognostic biomarkers. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 2013; 170:501-6.
- 109 Khleif SN, DeGregori J, Yee CL, Otterson GA, Kaye FJ, Nevins JR, Howley PM. Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996; 93:4350-4.
- 110 Del Pino M, Garcia S, Fuste V, Alonso I, Fuste P, Torne A, Ordi J. Value of p16(INK4a) as a marker of progression/regression in cervical intraepithelial neoplasia grade 1. *American journal of obstetrics and gynecology* 2009; 201:488.e1-7.
- 111 Mita AC, Mita MM, Nawrocki ST, Giles FJ. Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2008; 14:5000-5.
- 112 Branca M, Giorgi C, Santini D, Di Bonito L, Ciotti M, Costa S, Benedetto A, Casolati EA, Favalli C, Paba P, Di Bonito P, Mariani L, Syrjanen S, Bonifacio D, Accardi L, Zanconati F, Syrjanen K. Survivin as a marker of cervical intraepithelial neoplasia and high-risk human papillomavirus and a predictor of virus clearance and prognosis in cervical cancer. *American journal of clinical pathology* 2005; 124:113-21.
- 113 Barbosa LC, da Silva ID, Correa JC, Ribalta JC. Survivin and telomerase expression in the uterine cervix of women with human papillomavirus-induced lesions. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society* 2011; 21:15-21.
- 114 Feng D, Peng C, Li C, Zhou Y, Li M, Ling B, Wei H, Tian Z. Identification and characterization of cancer stem-like cells from primary carcinoma of the cervix uteri. *Oncology reports* 2009; 22:1129-34.
-

-
- 115 Martens JE, Arends J, Van der Linden PJ, De Boer BA, Helmerhorst TJ. Cytokeratin 17 and p63 are markers of the HPV target cell, the cervical stem cell. *Anticancer research* 2004; 24:771-5.
- 116 Mighty KK, Laimins LA. p63 is necessary for the activation of human papillomavirus late viral functions upon epithelial differentiation. *Journal of virology* 2011; 85:8863-9.
- 117 Escobar-Hoyos LF, Shah R, Roa-Pena L, Vanner EA, Najafian N, Banach A, Nielsen E, Al-Khalil R, Akalin A, Talmage D, Shroyer KR. Keratin-17 Promotes p27KIP1 Nuclear Export and Degradation and Offers Potential Prognostic Utility. *Cancer research* 2015; 75:3650-62.
- 118 Rao QX, Yao TT, Zhang BZ, Lin RC, Chen ZL, Zhou H, Wang LJ, Lu HW, Chen Q, Di N, Lin ZQ. Expression and functional role of ALDH1 in cervical carcinoma cells. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 2012; 13:1325-31.
- 119 Yao T, Wu Z, Liu Y, Rao Q, Lin Z. Aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) positivity correlates with poor prognosis in cervical cancer. *The Journal of international medical research* 2014; 42:1038-42.
- 120 Boiani M, Scholer HR. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2005; 6:872-84.
- 121 Ji J, Zheng PS. Expression of Sox2 in human cervical carcinogenesis. *Human pathology* 2010; 41:1438-47.
- 122 Ye F, Zhou C, Cheng Q, Shen J, Chen H. Stem-cell-abundant proteins Nanog, Nucleostemin and Musashi1 are highly expressed in malignant cervical epithelial cells. *BMC cancer* 2008; 8:108.
- 123 Wang YD, Cai N, Wu XL, Cao HZ, Xie LL, Zheng PS. OCT4 promotes tumorigenesis and inhibits apoptosis of cervical cancer cells by miR-125b/BAK1 pathway. *Cell death & disease* 2013; 4:e760.
- 124 Steinau M, Rajeevan MS, Unger ER. DNA and RNA references for qRT-PCR assays in exfoliated cervical cells. *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 2006; 8:113-8.
- 125 Pressemitteilung: Eckpunkte für zukünftiges Screening auf Gebärmutterhalskrebs geändert. Gemeinsamer Bundesausschuss, 2016. (Accessed July 7, 2017 at <https://www.g-ba.de/institution/presse/pressemitteilungen/641/>.)
- 126 Hillemanns P. The paradigm shift in cervical cancer screening in Germany. *Archives of gynecology and obstetrics* 2016; 293:3-4.
- 127 Luyten A, Scherbring S, Reinecke-Luthge A, Braun BE, Pietralla M, Theiler K, Petry KU. Risk-adapted primary HPV cervical cancer screening project in Wolfsburg, Germany--experience over 3 years. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 2009; 46 Suppl 3:S5-10.
- 128 User Manual QuantiGene Plex Assay. Affymetrix Inc, 2014. (Accessed September 21, 2017 at https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/QuantiGene_Plex_User_Manual.pdf.)
-

-
- 129 Bio-Plex® 200 Systems. Bio-Rad Laboratories Inc., 2018. (Accessed January 23, 2018 at <http://www.bio-rad.com/en-nz/product/bio-plex-200-systems>.)
- 130 Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977; 33:159-74.
- 131 de Thurah L, Bonde J, Lam JUH, Rebolj M. Concordant testing results between various human papillomavirus assays in primary cervical cancer screening: systematic review. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2017; 24(1):29-36.
- 132 Calleja-Macias IE, Kalantari M, Allan B, Williamson AL, Chung LP, Collins RJ, Zuna RE, Dunn ST, Ortiz-Lopez R, Barrera-Saldana HA, Cubie HA, Cuschieri K, Villa LL, Bernard HU. Papillomavirus subtypes are natural and old taxa: phylogeny of human papillomavirus types 44 and 55 and 68a and -b. *Journal of virology* 2005; 79:6565-9.
- 133 Rebolj M, Bonde J, Preisler S, Ejegod D, Rygaard C, Lyng E. Differential Detection of Human Papillomavirus Genotypes and Cervical Intraepithelial Neoplasia by Four Commercial Assays. *Journal of clinical microbiology* 2016; 54:2669-75.
- 134 Bruni L, Diaz M, Castellsague X, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjose S. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *The Journal of infectious diseases* 2010; 202:1789-99.
- 135 Sato T, Sakai T, Noguchi Y, Takita M, Hirakawa S, Ito A. Tumor-stromal cell contact promotes invasion of human uterine cervical carcinoma cells by augmenting the expression and activation of stromal matrix metalloproteinases. *Gynecologic oncology* 2004; 92:47-56.
- 136 Santin AD, Zhan F, Bignotti E, Siegel ER, Cane S, Bellone S, Palmieri M, Anfossi S, Thomas M, Burnett A, Kay HH, Roman JJ, O'Brien TJ, Tian E, Cannon MJ, Shaughnessy J, Jr., Pecorelli S. Gene expression profiles of primary HPV16- and HPV18-infected early stage cervical cancers and normal cervical epithelium: identification of novel candidate molecular markers for cervical cancer diagnosis and therapy. *Virology* 2005; 331:269-91.
- 137 Habis AH, Vernon SD, Lee DR, Verma M, Unger ER. Molecular quality of exfoliated cervical cells: implications for molecular epidemiology and biomarker discovery. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2004; 13:492-6.
- 138 Szarewski A, Mesher D, Cadman L, Austin J, Ashdown-Barr L, Ho L, Terry G, Liddle S, Young M, Stoler M, McCarthy J, Wright C, Bergeron C, Soutter WP, Lyons D, Cuzick J. Comparison of seven tests for high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women with abnormal smears: the Predictors 2 study. *Journal of clinical microbiology* 2012; 50:1867-73.
- 139 Giorgi Rossi P, Benevolo M, Vocaturo A, Caraceni D, Ciccocioppo L, Frega A, Terrenato I, Zappacosta R, French D, Rosini S. Prognostic value of HPV E6/E7 mRNA assay in women with negative colposcopy or CIN1 histology result: a follow-up study. *PloS one* 2013; 8:e57600.
-

- 140 Warrior U, Fan Y, David CA, Wilkins JA, McKeegan EM, Kofron JL, Burns DJ. Application of QuantiGene nucleic acid quantification technology for high throughput screening. *Journal of biomolecular screening* 2000; 5:343-52.
- 141 Morten BC, Scott RJ, Avery-Kiejda KA. Comparison of the QuantiGene 2.0 Assay and Real-Time RT-PCR in the Detection of p53 Isoform mRNA Expression in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues- A Preliminary Study. *PloS one* 2016; 11:e0165930.
- 142 Del Pino M, Svanholm-Barrie C, Torne A, Marimon L, Gaber J, Sagasta A, Persing DH, Ordi J. mRNA biomarker detection in liquid-based cytology: a new approach in the prevention of cervical cancer. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2015; 28:312-20.
- 143 Bourmenskaya O, Shubina E, Trofimov D, Rebrikov D, Abdulaeva E, Nepsha O, Bozhenko V, Rogovskaya S, Sukhikh G. Host gene expression profiling of cervical smear is eligible for cancer risk evaluation. *Journal of clinical pathology* 2013; 66:282-5.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Mirka Basten, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „mRNA-basierte Quantifizierung von Biomarkern zur Diagnose von zervikalen intraepithelialen Neoplasien und von Zervixkarzinomen: Validierung des QuantiGene[®] 2.0 Plex Assays“ 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 dem/der Betreuer/in, 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

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater, PD Dr. Andreas Kaufmann, für die Bereitstellung des Themas und seine zuverlässige, kompetente, vor allem fördernde und fordernde Betreuung danken. Seine Begeisterung für Forschung ist ansteckend!

Für die Einarbeitung, viele hilfreiche Ratschläge und Unterstützung im Labor geht mein Dank an Ursula Schiller. Des Weiteren danke ich Amrei Krings und Nora Nevermann für die Beantwortung von Fragen aller Art, gute wissenschaftliche Zusammenarbeit und für inspirierende und motivierende Gespräche.

Ein großes Dankeschön für die hervorragende Kooperation möchte ich an Prof. Dr. Achim Schneider und das gesamte Team des Medizinischen Versorgungszentrums im Fürstenberg-Karree in Berlin richten, ohne deren Unterstützung diese Studie nicht realisierbar gewesen wäre.

Für die Bereitstellung der Ergebnisse des Multiplex Genotypings und ebenfalls gute Zusammenarbeit danke ich Dr. Michael Pawlita und Dr. Daniela Höfler aus dem Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg.

Für die statistische Beratung möchte ich mich bei Dr. Rolf Richter und Dipl.-Math. Andrea Stroux bedanken.

Für das Korrekturlesen dieser Arbeit danke ich meinem Vater, Michael Basten, meinem Freund, Nico Borgsmüller und meiner Freundin, Marie Schafstedde.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und Großeltern, meinen beiden Schwestern und meinem Freund. Ihr verleiht mir Wurzeln und Flügel.