

Aus der Klinik für Gynäkologie mit Schwerpunkt gynäkologische Onkologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Entwicklung und Machbarkeitsnachweis eines Luminex-basierten, QuantiGene
HPV-E7 mRNA genotypisierenden Nachweisverfahrens

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Paul Viktor Felix Hannemann

aus Berlin

Datum der Promotion: 23.06.2019

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	VI
Zusammenfassung	VII
Abstract	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Humane Papillomviren (HPV).....	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Pathogenese	2
1.2 Zervixkarzinomzelllinien.....	5
1.3 Screening zur Prävention des Zervixkarzinoms	5
1.3.1 Molekularbiologische Nachweismethoden	9
1.4 Grundlagen des QuantiGene 2.0 Plex Assay.....	13
1.5 Motivation der Arbeit	14
1.6 Ziele und Fragestellung	16
2 Material	17
2.1 Zellkulturen	17
2.1.1 Immortalisierte Zelllinien.....	17
2.1.2 Klinische Materialien	17
2.2 Chemikalien.....	18
2.2.1 Zellkultur.....	18
2.2.2 Asservierung nicht-klinischer/klinischer Proben	18
2.2.3 Puffer und Reagenzien für das QG-HPV V1 Assay.....	19

2.2.4	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	20
3	Methoden.....	21
3.1	Statistische Verfahren.....	21
3.1.1	Mittelwert und Standardabweichung.....	21
3.1.2	Berechnung des Variationskoeffizienten.....	21
3.1.3	Berechnung der Nachweisgrenze (Limit of Detection = LOD) mit Hilfe der vereinfachten Leerwertmethode und der Erfassungsgrenze.....	21
3.2	Zellkulturen	22
3.2.1	Kultivierung	22
3.2.2	Passagen	22
3.2.3	Bestimmung der Zellzahl	22
3.3	QG-HPV V1 Assay zur Bestimmung der E7 mRNA in HPV positiven Zellen.....	23
3.3.1	Hintergrund	23
3.3.2	Grundlegende Funktionsprinzipien des QG-HPV V1 Assays	24
3.3.3	Herstellung der verwendeten Zelllysate.....	25
3.3.4	Probenanalyse.....	27
4	Ergebnisse	29
4.1	Assay-Design und Sondenentwicklung.....	29
4.1.1	Nachweis der einzelnen HPV-Typen und der zellulären Marker in einem Ansatz.....	30
4.1.2	Einzelnachweis der verschiedenen HPV-Transkripte (Ausschluss von Kreuzreaktionen).....	36
4.1.3	Definition der Nachweisgrenze für eine Positivität	38
4.2	Bestimmung der Assay Präzision	41
4.2.1	Intra-Assay Variation	41
4.2.2	Inter-Assay Variation	43

4.2.3	Interobserver Varianz	44
4.3	Validierung zur ersten Einschätzung der Robustheit des QG-HPV V1 Assays.....	46
4.3.1	Einfluss der Zellkonzentration auf die Signalstärke (C33a-Lysat supplementiert mit HPV-Lysat)	46
4.3.2	Einfluss verschiedener Fixiermedien auf das QG-HPV V1 Assay	50
4.4	Untersuchung von klinischem Patientinnenmaterial	55
4.4.1	Vergleich mRNA-Nachweis per QG-HPV V1 mit DNA-Nachweis per Multiplex Genotyping (MPG) aus klinischen Proben.....	55
5	Diskussion	60
5.1	Entwicklung und generelle Funktionalität der Gensonden zum E7-mRNA-Nachweis .	60
5.2	Robustheit der Methode durch Messung der Variationskoeffizienten in Replikas und Versuchswiederholungen. (Intra-/Interassay- /Interobserver Variation).....	68
5.3	PreservCyt als optimales Medium zur Probenaufbewahrung.....	71
5.4	Erste Einschätzung der Spezifität des QG-HPV-V1 Assays bei klinischen Proben	74
5.5	Limitation der Methodik.....	76
5.6	Ausblick.....	77
6	Literaturverzeichnis.....	80
	Eidesstattliche Versicherung	84
	Lebenslauf/Curriculum Vitae	85
	Danksagung.....	86

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter	HPRT 1	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
Abb	Abbildung	HPV	humaner Papillomavirus
ACTB	β-Actin	hr	<i>high-risk</i>
AGC	<i>atypical glandular cells (engl.)</i>	HSIL	<i>High-grade squamous intraepithelial lesions (engl.)</i>
AIS	<i>adenocarcinoma in situ (engl.)</i>	L	<i>late</i>
ASC-H	<i>Atypical squamous cells cannot exclude HSIL (engl.)</i>	LOD	Limit of Detection (engl.)
ASC-US	<i>Atypical squamous cytology of undetermined significance (engl.)</i>	lr	<i>low-risk</i>
ATPase	Adenosintriphosphatase	LSIL	Low-grade squamous intraepithelial lesions
bDNA	<i>branched DNA (engl.)</i>	ME 180	HPV 68 infizierte Zervixkarzinomzellen
bzw	beziehungsweise	MFI	Median der Reporter-Fluoreszenz-Intensität
CaSki	HPV 16 infizierte Zervixkarzinomzellen	Min	Minute
CC33a	HPV negative Zervixkarzinomzellen	ml	Milliliter
CDKN2A, p16	<i>cyclin dependent kinase inhibitor 2A (engl.)</i>	MPG	Multiplex-HPV-Genotyping
CIN	<i>cervical intraepitheliale neoplasiea (engl.)</i>	MRHI – 215	HPV 45 infizierte Zervixkarzinomzellen
cm	Zentimeter	mRNA	messenger RNA
CV	Variationskoeffizient	MW	Mittelwert
CxCa	Zervixkarzinom	n	Fallzahl in einer statistischen Gruppe
d	<i>Tag</i>	NIH - 3T3	HPV negative nicht-humane Fibroblasten
DMEM	<i>Dulbeccos' s minimal essential medium (engl.)</i>	NILM	Negative for intraepithelial lesion or malignancy (engl.)
DNA	Desoxyribonukleinsäure	NOS	<i>not otherwise specified (engl.)</i>
E	<i>early</i>	OPO	Operationssaal
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor	ORF	<i>open reading frame (engl.)</i>
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	p	Protein
Eppi	Eppendorfgefäß	PAP	Einteilung nach Papanicolaou
Erin	HPV 59 infizierte Zervixkarzinomzellen	PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
etc	<i>et cetera (lat.)</i>	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
evtl	eventuell	pRB	Retinoblastom Tumorsuppressorprotein
Exp	Experimentator	QG-HPV V1	QuantiGene for human papillomavirus version 1
FCS	fötales Kälberserum	QGP	QuantiGene Plex 2.0
FDA	<i>Food and Drug Administration (engl.)</i>	RNA	Ribonukleinsäure
GenID	Genidentifikationsnummer ggfgegebenenfalls	rpm	Umdrehungen pro Minute
GP5+/6+	Konsensusprimer	RPMI	Zellkulturmedium
H/P	Histologie/Pathologie	RT	reverse Transkription
HC2	Hybrid Capture 2 Test	rtPCR	Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion
HeLa	HPV 18 infizierte Zervixkarzinomzellen	S	<i>Synthese</i>
HIV	humanes Immundefizienzvirus	SAPE	Streptavidin-konjugiertes R-Phycoerythrin
HPA	Hybridization Protection Assay	SD	Standardabweichung
		t	<i>Zeit</i>

Tab	Tabelle
TC	<i>target capture (engl.)</i>
TE	<i>Trypsin/EDTA-Lösung</i>
TMA	<i>Transcription Mediated Amplification (engl.)</i>
U.S.A.	Vereinigte Staaten von Amerika
vLys	verdünnter Lysis Mixture
xg	<i>x'fache Erdbeschleunigung</i>
xMAP	<i>multi-analyte profiling bead (engl.)</i>
z.B.	zum Beispiel
Z.n.	Zustand nach

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Weltweite Inzidenz des Zervixkarzinoms im Jahre 2012. Altersstandardisierte Inzidenzrate pro 100.000 Frauen pro Jahr (11).....**2**
- Abbildung 2:** Logarithmische Darstellung der Expressionsmuster verschiedener RNA-Transkripte in unterschiedlich schweren Dysplasien der Zervix uteri und dem Zervixkarzinom im Vergleich zum Normalbefund. Die Transkripte sind in drei Gruppen aufgeteilt: Hochreguliert im Zervixkarzinom (CxCa) (1), etwa gleich expremiert in allen dargestellten Gruppen (2), herunterreguliert im CxCa (3). Besonders zu beachten ist die deutlich ansteigende Expression von E6 und E7 (rot markiert) in Korrelation zum Dysplasiegrad der Zervixzellen. *CxCa = Zervixkarzinom, HSIL = High-grade Squamous Intraepithelial Lesion, LSIL = Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion, NIL/M = negative for intraepithelial lesion/malignancy (27)*.....**4**
- Abbildung 3:** Schematische Darstellung der einzelnen Hybridisierungsschritte des QG-HPV-V1 Assay. In Schritt 1 und 2 findet die spezifische Bindung der Ziel-mRNA an den magnetischen Beads statt (Tag 1). Die Schritte 3-6 veranschaulichen die schrittweis nicht-enzymatische Hybridisierung der DNA-Struktur zur Amplifikation des Signals (Tag 2). 2: Bindung der Ziel-mRNA an magnetische Beads über gekoppelte, spezifische Oligonukleotidsonden. 3: Bindung des „Label Extenders“ an der gebundenen Ziel-mRNA. Verbindet die Ziel-mRNA mit dem zur Amplifikation des RNA-Signals dienendem „DNA-Bäumchens“. 4: Bindung des „Preamplifier“ an den Label Extender. 5: Bindung der „Amplifier“ an den Preamplifier. 6: Bindung der „Label Probes“ an die Amplifier und Konjugation dieser mit SAPE (Fluoreszenzfarbstoff). Diese komplette Struktur wird anschließend mit einem Luminometer (z.B. von Luminex) gemessen. Die fluoreszierenden Beads ermöglichen die Qualifizierung (xMAP), das markierte „DNA-Bäumchen“ die direkte Quantifizierung (bDNA) der gesuchten mRNA mittels Luminometer.....**25**
- Abbildung 4:** Titration des HPV-Zelllysatsmixes. Logarithmische Darstellung der Messwerte für die target mRNAs bei absteigender Konzentration des eingesetzten Zelllysats bei 1:3 Verdünnungsschritten abzüglich des Leerwertes. Nicht enthalten waren die HPV-Typen 6 und 31. Zu erkennen ist, dass bei linear absteigender Konzentration bis zu einer Konzentration von 1:243, jeder enthaltene HPV-Typ und die drei zellulären Referenzgene ein positives Signal zeigen. *MFI = mean fluorescence intensity., ACTB = Actin β , HPV = Humanes Papillomavirus***32**
- Abbildung 5:** Titration der HPV-negativen Karzinomzellen C33a. Logarithmische Darstellung der Messwerte für die Ziel mRNAs in absteigender Konzentration des eingesetzten Zelllysats bei 1:3 Verdünnungsschritten abzüglich des Leerwertes. Zu erkennen ist, dass bei linear absteigender Konzentration bis zu einer Konzentration von 1:243 (ca. 165 HPV-negative Zellen) die drei zellulären Marker ein positives Signal (≥ 10 MFI) zeigen, ACTB sogar bis zu einer Verdünnung von 1:6561. Bis zu 1:27 zeigen mehrere HPV-Typen ein schwaches Signal, welches, mit Ausnahme von HPV45, als unspezifisches Hintergrundsignal gewertet werden kann. HPV45 zeigt einen vergleichsweise hohen Wert, der jedoch ebenfalls ab einer Konzentration von 1:27 verschwindet. Ab

dann taucht in insgesamt 4 Titrationsstufen ein schwaches, nicht durchgängig nachweisbares, HPV18 Signal auf. Ansonsten sind für die HPV Sonden keine störenden, unspezifischen Reaktionen mit zellulären mRNAs zu beobachten.....	34
Abbildung 6 (A-D): Logarithmische Darstellung der MFI-Werte der HPV-negativen und –positiven Karzinomzelllinien für die jeweiligen Analyten im Vergleich in vier verschiedenen Konzentrationen: A) 1:9 (889 Zellen, B) 1:243 (33 Zellen), C) 1:729 (11 Zellen), D) 1:19683 (0 Zellen). Nicht enthalten waren Zellen mit Infektion durch HPV 31 und 6.	35
Abbildung 7: Ergebnisse der Einzelnachweise für jeden durch das QG-HPV V1 Assay nachweisbaren HPV-Typ zum Ausschluss von Kreuzreaktivität. Mittelwerte von n = 3 Messungen der verschiedenen Karzinomzelllinien mit einfacher SD (+/- 1 SD) abzüglich des Leerwertes. Sechs davon sind HPV-positiv [HeLa, CaSki, MRHI-215, ME 180, Erin, Patientinnenprobe für HPV 31 und 6] und zwei HPV-negativ [NIH-3T3, C33a]. Deutlich zu erkennen ist der unspezifische Hintergrund für HPV 45 in den dafür eigentlich negativen Proben für HPV 18, 16, 68 und 59 und sogar in der HPV-Negativprobe mit CC33a-Zellysat (rot). Mit Ausnahme der HPV 6-Probe fällt jedoch der Wert für den enthaltenen HPV-Typ in den positiven Proben deutlich höher aus. Mit Ausnahme des Signals für HPV 45 in der CC33a-Probe, zeigen auch die Negativproben kein signifikantes Signal für sämtliche detektierbaren HPV-Typen.....	37
Abbildung 8: Lineare Darstellung des Intra-Assay Vergleiches.	42
Abbildung 9: Darstellung der normalisierten Daten des Intra-Assay Vergleiches für die einzelnen Analyten (CDKN2A, HPRT1, HPV16, HPV18, HPV45, HPV59 und HPV68) mit Datenpunkten. Messergebnisse der Proben (P) 1-6 aus dem Intra-Assay-Versuch. Die Werte wurden auf ACTB normalisiert. Darüber sind die Standardabweichung (SD) und der Variationskoeffizient in Prozent (CV) der auf ACTB normalisierten Werte von P1-P6 angegeben.	43
Abbildung 10: Inter-Assay-Vergleich. Darstellung von drei voneinander unabhängigen Messungen (P1-P3) für die enthaltene HPV mRNA und die Referenzgene HPRT1 und CDKN2A mit Datenpunkten, normalisiert auf das Referenzgen ACTB. Enthalten waren die HPV-Typen 16, 18, 45, 59 und 68. Die Standardabweichung und der Variationskoeffizient für die normalisierten, gemessenen Analyten sind darunter tabellarisch aufgelistet. SD = Standardabweichung, CV = Variationskoeffizient. HPV = humaner Papillomvirus.	44
Abbildung 11: Interobserver Vergleich (Rohdaten). Gegenüberstellung der Mittelwerte der Messungen von zwei unterschiedlichen Experimentatoren (Exp. 1 und 2) für die Transkripte CDKN2A, HPRT1 und HPV16. MW, SD und CV für die jeweiligen Analyten sind darunter nochmals tabellarisch angegeben. HPV = humanes Papillomvirus, CV = Variationskoeffizient, SD = Standardabweichung, MW = Mittelwert.	45
Abbildung 12: Interobserver Vergleich (Normalisierte Daten). Gegenüberstellung der Mittelwerte der Messungen von zwei unterschiedlichen Experimentatoren (Exp. 1 und 2) für die Transkripte CDKN2A, HPRT1 und HPV16, normalisiert auf ACTB angegeben in Prozent mit einfacher SD. MW, SD und CV für die jeweiligen Analyten sind darunter nochmals tabellarisch angegeben. HPV = humanes Papillomvirus, CV = Variationskoeffizient, SD = Standardabweichung, MW = Mittelwert..	45

Abbildung 13 (a-e): Gegenüberstellung des gemessenen HPV-Signals HPV-positiver Zellen vs. HPV-positiver Zellen versetzt mit CC33a Zellen in absteigender Konzentration. Das Verhältnis der Zellen in der versetzten Probe betrug 1 HPV-positiv zu 8 HPV-negativen Karzinomzellen. Die Werte sind für jede gemessene Zellreihe einzeln aufgeführt: a) HeLA, b) CasKi, c) MRHI-215, d) ME 180, e) Erin. Bei einer Probenkonzentration von 100% ist der gemessene HPV-Wert der unspiked Probe stets höher als der der spiked Probe. In den niedrigeren Konzentrationen bewegen sich die MFIs dann im selben Bereich. HPV = humane Papillomaviren, MFI = *mean fluorescence intensity***49**

Abbildung 14: Vergleich des gemessenen Signalabfalls über 28 Tage für HPV16 und die zellulären Marker in verschiedenen Fixiermedien bei unterschiedlicher Lagerungstemperatur. Darstellung der Signalstärke in Prozent bezogen auf die sofort fixierte Probe, die bei -80°C gelagert wurde. Dargestellt sind die Werte für ACTB, CDKN2A, HPRT1 und HPV16 für die bei Raumtemperatur und die bei 4°C gelagerten Proben über den Zeitverlauf von 28 Tagen aus verschiedenen Transportmedien. A) PBS, B) PreservCyt, C) BoonFix und D) verdünnter Lysis Mixture (vLys).....**51**

Abbildung 15: Streuung einer auf ACTB normalisierten HPV16 positive Proben aus PreservCyt und vLys über 3 Titrationsstufen hinweg im Vergleich. Mittelwerte der auf ACTB normalisierten Werte für HPV16, CDKN2A und HPRT1 mit einfacher SD (+/- 1). N = 3. PC. = Probe aus PreservCyt-Lösung, vLys. = Probe aus verdünntem Lysis Mixture.**54**

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Darstellung der einzelnen Virusproteine und ihrer jeweiligen Funktion im Lebenszyklus des HP Virus.....	3
Tabelle 2: Münchener Nomenklatur in der III Fassung, mit Gegenüberstellung des Bethesda Systems. Ergänzend ist das empfohlene Prozedere nach München III hinzugefügt (28).....	7
Tabelle 3: Tabellarische Darstellung der wichtigsten HPV-Nachweistests mit Name, Hersteller, FDA-Zulassung und kurzer Darstellung der wichtigsten Eigenschaften.	10
Tabelle 4: Verwendete Zelllinien.....	17
Tabelle 5: Zur Kultivierung der Zellen verwendete Chemikalien.....	18
Tabelle 6: Zur Asservierung der zellulären Proben verwendete Chemikalien.....	18
Tabelle 7: Puffer und Reagenzien aus dem Kit für das QuantiGene 2.0 Plex Assay mit Mengenangabe des jeweiligen Verbrauchs pro verwendetem Well, bzw. einer gesamten 96-Well-Platte.	19
Tabelle 8: Geräte und Verbrauchsmaterialien	20
Tabelle 9: GenID der mit dem QG-HPV V1 nachweisbaren mRNA Transkripte.....	29
Tabelle 10: Tabellarische Darstellung der MFI-Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten einzelner HPV-Typen in der HPV-positiven Probe, in absteigender Konzentration mit den jeweiligen Leerwerten.	31
Tabelle 11: MFI-Werte der HPV-negativen C33a Zellprobe in absteigender Konzentration.	33
Tabelle 12: Differenz der HPV-negativen C33a Probe zur HPV-positiven-Probe für alle enthaltenen Analyten für jede Titrationsstufe [(HPV-positiv) – (HPV-negativ)].	36
Tabelle 13: Mittelwerte und Standardabweichung zur Berechnung des LOD für alle nachweisbaren Transkripte aus 12 unabhängigen Messungen.	39
Tabelle 14: Exemplarische Gegenüberstellung von HPV positiver Probe (Typ 16, 18, 45 und 68) in der Konzentration 1:243 und 1:729 (ca. 33 und 11 Zellen pro HPV-Typ) und der errechneten Grenzwerte (Nachweisgrenze und Erfassungsgrenze).....	40
Tabelle 15: Ergebnisse des Intra-Assay-Vergleiches mit 6 verschiedenen Proben (P1-P6).....	41
Tabelle 16: Tabellarisch angeordnete Messergebnisse HPV-positiver Zellen vs. HPV-positiver Zellen versetzt mit CC33a Zellen.....	47
Tabelle 17: Gegenüberstellung der Signalverluste der Analyten ACTB, CDKN2A, HPRT1 und HPV16 bei Raumtemperatur und bei 4°C nach 4 und nach 28 Tagen.....	52
Tabelle 18: Gegenüberstellung von Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient für die auf ACTB normalisierten Daten.	55
Tabelle 19: Rohdaten der Messung der klinischen Proben P1-P16, dargestellt mit der pseudonymisierten Patientennummer.	56
Tabelle 20: Tabellarische Gegenüberstellung der Ergebnisse aus HPV-DNA-Nachweis (MPG) und QG-HPV V1-Methode für die jeweilige Probe mit klinischen Angaben.	58

Zusammenfassung

Die humanen Papillomviren (HPV) zählen zu den am häufigsten sexuell übertragenen Infektionen. Eine persistierende Infektion mit einem HP-Virus vom *high risk (hr)*-Typ gilt heute als Hauptursache für die Entstehung des Zervixkarzinoms. Ein HPV-DNA-Test ist hoch sensitiv (>95%), erfasst allerdings auch die transient verlaufenden HPV-Infektionen, die folgenlos ausheilen (ca. 90%). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit der auf dem direkten Nachweis von HPV-E7 mRNA basierende QG-HPV Version 1 Nachweistest konzipiert und auf seine grundlegende Funktionalität hin überprüft. Die HPV-E7 mRNA Expression ist während der Progression von Epithelzellen der Zervix zu hochgradig dysplastischen und maligne entarteten Zellen stark erhöht. Der Nachweistest verbindet die xMAP-Technologie (Luminex) mit der bDNA-Signalamplifikationsmethode und ist ausgestattet mit insgesamt 10 verschiedenen Sonden zum parallelen, typenspezifischen Nachweis von 6 hr-HPV-Typen (16, 18, 31, 45, 59 und 68), einem low risk-HPV (6), zwei zellulären Markern (Actin- β , HPRT1) und einem Marker für HPV infizierte Zellen (CDKN2A syn. P16^{INK4a}). Als Probenmaterial wurden hauptsächlich kultivierte und definierte Zervixkarzinomzelllinien (HeLa, CaSki, MRHI-215, ME180, Erin59, C33a und NIH 3T3) und eine geringe Anzahl authentischer Patientenproben verwendet. Alle Proben wurden mit dem Multiplex Genotyping HPV Test von Schmitt et al. gegengetestet (1).

Der QG-HPV-Test detektiert erfolgreich spezifisch die E7 mRNA der HPV-Typen 16, 18, 45, 59, und 68 in Korrelation zur eingesetzten Gesamtzellzahl (Actin- β , HPRT-) und den hr-HPV infizierten Zellen (p16). Für diese Analyten wird mit Proben aus kultiviertem Zervixkarzinomzellen eine Sensitivität von 100% erreicht. Eine Kreuzreaktivität wurde nicht beobachtet. Die Intra-Assay Variation lag bei allen auf Actin- β normalisierten Analyten unter 10%, die Inter-Assay Variation mit Ausnahme von HPV45 (16,1%) unter 15%. Die Interobserver Varianz für HPV16 lag bei 6,1%. Bei ca. 33 HPV-infizierten Zellen kann noch eine Quanti- und Qualifizierung der gemessenen Probe erfolgen, mit Ausnahme der Sonden für HPV45 und 59 sogar bei 11 Zellen. Valide Ergebnisse können durch das Assay in einem Bereich zwischen ca. 33-1.000 HPV-positiven Zellen erreicht werden. Die Detektion war auch in einem ca. 8fach höheren Hintergrund HPV-negativer Zellen und nach 28 Tagen in PBS vergleichbar möglich. Das Transportmedium PreservCyt (Hologic Inc.) ist kompatibel und bietet die optimale Konservierung des Probenmaterials. Bei einer ersten Messung von Patientenproben wurde in den eingeschlossenen Proben (n = 15) 100% aller detektierbaren Infektionen erkannt [HPV 16 (11/11), HPV 18 (3/3) und HPV 45 (3/3)]. Lediglich für HPV59 (1/16), HPV6 (3/16) und HPV45 (11/13)

wurden falsch-positive Ergebnisse gemessen, wobei für HPV6 und HPV45 auch schon zuvor bei kultivierten Zellen teils hohe, unspezifische Hintergründe gemessen wurden. Eine abschließende Beurteilung dieser beiden Sonden steht somit noch aus.

Das QG-HPV V1 Assay beweist somit grundsätzlich seine technische Funktionalität und ausreichend Potential für eine ausführliche klinische Testung.

Abstract

The human papillomaviruses (HPV) is one of the most common sexually transmitted diseases. A persistent infection with a high risk (hr) HPV-type is the primary cause for the emergence of cervical cancer. A HPV-DNA-Test is highly sensitive (>95%) but also catches the transient HPV-infections that heal without ramifications (~90%). Therefore the QG-HPV Version 1 detection assay was developed and checked for its based functionality. The test is based on the detection of HPV-E7 mRNA, which is upregulated in highly dysplastic and malignant epithelial cells of the cervix. The test connects the xMAP-technology with the bDNA-signal amplification method and is equipped with a total of 10 different gene probes for the parallel, type-specific detection of six hr-HPV-types (16, 18, 31, 45, 59 and 68), a single low risk-HPV (6), two cellular markers (Actin- β , HPRT1) and a single marker for HPV infected cells (CDKN2A syn. P16^{INK4a}). For the measurements mainly cultivated and defined cervical cancer cell lines were used (HeLa, CaSki, MRHI-215, ME180, Erin59, C33a and NIH 3T3) plus a small number of authentic patient samples. All samples were crosschecked with the multiplex genotyping HPV Test from Schmitt et al (1).

The QG-HPV test successfully detects specific E7 mRNA HPV-types 16, 18, 45, 59 and 68, in correlation to the used sum of cells (Actin- β , HPRT-) and the hr-HPV infected cells (p16). Measured with samples from cultivated cervical cancer cells, the sensitivity for this analyses reached 100% and a cross reactivity couldn't be observed. The intra-assay variation was below 10% for probes normalized to Actin- β . The inter assay variation was below 15% with the exception of the HPV45 (16.1%). The interobserver variation for HPV16 measured 6.1%. At least 33 (excluded the probes for HPV45 and 59 even 11) HPV-infected cells achieved a positive result above the calculated limit for quanti- and qualification. The detection range is between 33-1.000 HPV-positive cells. Signals could even be detected in a 8 times higher background of HPV-negative cells or after 28 days in PBS. The PreservCyt solution (Hologic Inc.) can be used with the QG-HPV V1 assay for the optimal conservation of the sample materials. On the first measuring of patient samples 100% of all included (n=15) and detectable infections [HPV16 (11/11), HPV 18 (3/3) and HPV 45 (3/3)] could be identified. Only HPV59 (1/16), HPV6 (3/16), and HPV45 (11/13) showed false-positive results, of which HPV6 and HPV45 showed high, unspecific backgrounds in cultured cells. A final assessment of these two probes is still pending.

The QG-HPV V1 assay therefore proves its fundamentally technical functionality and has enough potential for an expanded clinical test.

1 Einleitung

1.1 Humane Papillomviren (HPV)

1.1.1 Epidemiologie

Die humanen Papillomviren (HPV) gehören mit einer geschätzten Prävalenz bei Frauen von 2-44% weltweit (für Europa ca. 8-15%) zu den am häufigsten sexuell übertragenen Viren (1, 2). Insgesamt sind schon mehr als 206 verschiedene HPV Typen bekannt (3). Bezogen auf ihr epidemiologisch ermitteltes, kanzerogenes Potenzial werden sie entweder in „high-risk“ (hr) – oder „low-risk“ (lr)-Genotypen eingeteilt (4). Ca. 90% aller HPV-Infektionen sind transient (5) und heilen innerhalb von 2 Jahren aus, wobei die hr-HPV-Typen im Schnitt länger zu persistieren scheinen, als die lr-HPV-Typen (6). Bei persistierender Infektion mit einem lr-HPV-Typen (z.B. HPV 6 oder 11) kann es zur Ausbildung von Warzen in der Anogenitalregion oder anderen Bereichen der Haut und Schleimhaut kommen. Persistierende Infektionen mit einem der hr-HPV-Typen (z.B. HPV 16, 18) erhöhen das Risiko der Entstehung von dysplastischen Läsionen und Zervixkarzinomen (7, 8). Allein die beiden häufigsten hr-HPV-Typen 16 und 18 sind in 50% der hochgradigen zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN III) und in 70% aller Zervixkarzinome nachweisbar (9, 10).

Die Infektion mit einem hr-HPV-Typen kann somit als einer der bedeutendsten Risikofaktoren für die Entstehung eines Zervixkarzinoms angesehen werden, welches mit einer weltweiten Inzidenz von ca. 528.000 Neuerkrankungen und 266.000 Sterbefällen im Jahr 2012 das zweithäufigste Karzinom der Frau darstellt (11). Des Weiteren spielt die Infektion mit HPV eine maßgebliche Rolle bei der Genese der meisten Analkarzinome und auch Assoziationen mit bestimmten Gruppen der Vulva-, Vagina-, Penis- und Kopf/Hals-Karzinome werden beobachtet (12).

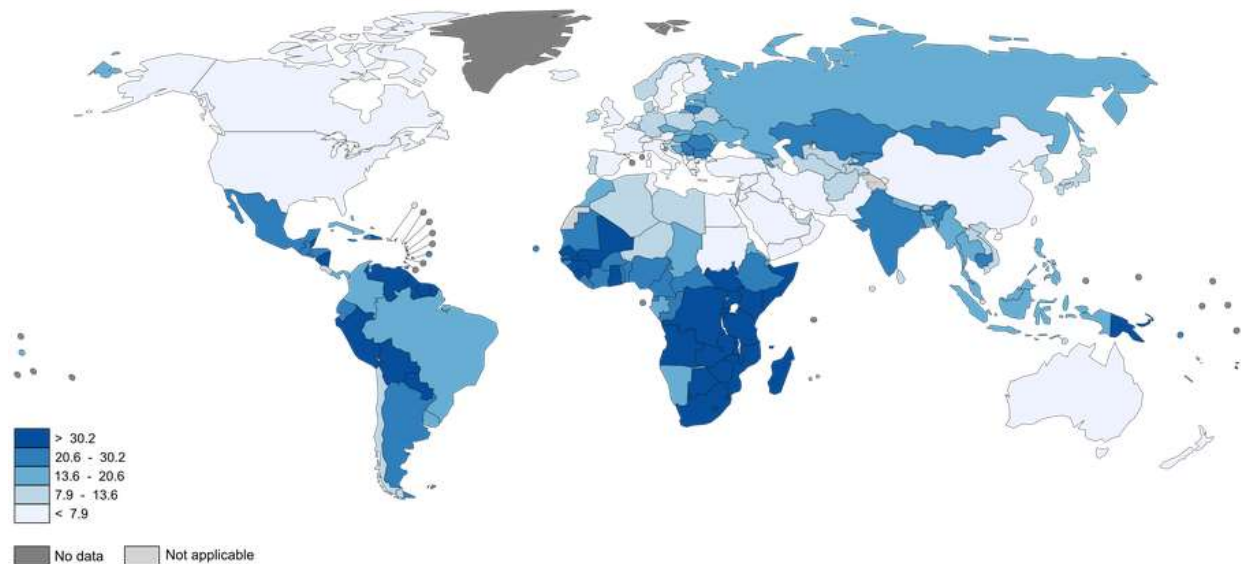


Abbildung 1: Weltweite Inzidenz des Zervixkarzinoms im Jahre 2012. Altersstandardisierte Inzidenzrate pro 100.000 Frauen pro Jahr (11).

1.1.2 Pathogenese

Die HP-Viren befallen ausschließlich die Epithelzellen von Haut und Schleimhaut. Die Primärinfektion findet dabei in der Basalzellschicht, meist über Mikroläsionen der Haut oder Schleimhaut statt. Im Unterschied zu vielen anderen Virusfamilien ist der HPV-Lebenszyklus stark abhängig vom Differenzierungsgrad des Epithels. Während in den primär infizierten Zellen der Basalzellschicht kaum virale RNA gemessen werden kann, steigt die intrazelluläre Expression viraler RNA und der dazugehörigen *early* (E) Proteine E1, E2, E4, E5, E6 und E7 mit zunehmendem Aufstieg der infizierten Zelle in die suprabasalen Zellschichten sprunghaft an, wobei sich das Expressionsmuster entsprechend dem Differenzierungsgrad der Zelle verändert. In den oberen epithelialen Schichten des stratum granulosum sind dann schon bereits die viralen Capsidproteine *late* (L)1 und L2 zu finden und die obersten epithelialen Schichten enthalten das komplette Virus, welches aus der infizierten Zelle nach dem Absterben freigesetzt wird und neue Zellen infizieren kann (13). In diesem Lebenszyklus des HP Virus übernehmen die einzelnen viralen Proteine jeweils wichtige Aufgaben (siehe Tabelle 1) (14, 15).

Tabelle 1: Darstellung der einzelnen Virusproteine und ihrer jeweiligen Funktion im Lebenszyklus des HP Virus.

VIRUSPROTEIN	FUNKTION/BESCHREIBUNG
E1	Bindet in einem Komplex mit E2 zusammen am Ursprungsort der viralen DNA-Synthese. Kodiert die Enzymaktivität von ATPase und Helicase und ermöglicht dadurch die Replikation der Virus-DNA.
E2	Verantwortlich für die spezifische Bindung des E1/E2-Komplexes an den Ort der viralen DNA-Syntheseinitiation. Außerdem hat es Einfluss auf die virale Transkriptionskontrolle. In niedrigen Konzentrationen aktiviert es, in hohen Konzentrationen blockiert es die <i>early promoter</i> Region.
E4	Wird mit E1 zusammen als Fusionsprotein E1-E4 exprimiert (16). Trotz der Zugehörigkeit zu den früh exprimierten Genen, wird es tatsächlich erst in der späten Phase des viralen Lebenszykluses vermehrt exprimiert. Es interagiert mit Keratin aus dem Zytoskelett der Zelle und kann dieses desintegrieren (17), was evtl. ein wichtiger Schritt bei der Freisetzung des Virus aus der Wirtszelle ist. Auch eine Rolle bei der Regulation der Genexpression und der Zellproliferation wird diskutiert.
E5	Interagiert mit dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) Rezeptor (18) und wirkt so positiv auf die Zellproliferationsrate. Aktiviert virale Funktionen in differenzierten Zellen. Wird erst in der späten Phase des viralen Lebenszykluses exprimiert.
E6	Inaktiviert den Tumorsuppressor p53 und BAK und verhindert so die Apoptose der Wirtszelle. Arbeitet synergistisch mit E7 zusammen. Überexpression in hochgradigen Vorstufen und malignen Tumoren (19, 20).
E7	Inaktiviert das Retinoblastom Tumorsuppressorprotein (pRB) und führt so zur permanenten DNA-Replikation der Wirtszelle und hochregulation von p16 ^{INK4a} . Überexpression in hochgradigen Vorstufen und malignen Tumoren (21).
L1	Capsid Strukturprotein (groß)
L2	Capsid Strukturprotein (klein)

Die wohl bedeutendsten und am besten untersuchten HP-Virusproteine mit den dazugehörigen Onkogenen sind E6 und E7. Sie sind entscheidend für den Immortalisierungsprozess der hr-HPV infizierten Zellen (22, 23).

Mit dem Aufstieg der infizierten Zelle in das *Stratum spinosum* und *granulosum*, kommt es zu einer vermehrten Expression von E6 und E7, die ihrerseits einen starken Einfluss auf verschiedene Regulationsmechanismen des Wirtszellzyklus nehmen, der zum Teil noch nicht vollends geklärt ist. E7 induziert dabei unter anderem die kontinuierliche Replikation der Wirtszell DNA über die Inaktivierung des Retinoblastom Tumorsuppressorproteins (pRB). Da pRB außerdem die Transkription des cyclinabhängigen Kinaseinhibitors p16^{INK4a} hemmt, führt dies zusätzlich zu

einer Hochregulation der p16^{INK4a}-Synthese (21). E6 arbeitet dabei synergistisch mit E7 zusammen. Es unterbindet die Apoptose der nun kontinuierlich in die S-Phase eintretenden Wirtszelle über die Inaktivierung der Tumorsuppressorproteine p53 und BAK und sichert so dauerhaft die virale DNA-Replikation (19, 20).

Bei gewöhnlichen produktiven Infekten werden die viralen Proteine E6 und E7 nur im geringen Maße synthetisiert. In hochgradigen Vorstufen und malignen Tumoren findet jedoch eine Überexpression von E6 und E7 mRNA statt (24) (siehe Abb. 2).

Der malignen Entartung geht meist eine über viele Jahre persistierende Infektion mit einem hr-HPV-Typ voraus, die das Immunsystem nicht suffizient bekämpfen konnte. Bei jahrelanger Inaktivierung wichtiger Tumorsuppressorproteine wie p53 oder pRB und dem damit verbundenen dauerhaften S-Phaseneintritt kommt es letztendlich zu einer Deregulation der Transkriptionskontrolle (13). Es lässt sich die Integration des Virusgenoms in die Wirtszell-DNA beobachten, die oft zu einer Deletion des viralen Repressors E2 führt (25). Es kommt nun zur typischen Überexpression von E6 und E7 und einer damit verbundenen unkontrollierten Zellproliferation (23, 26).

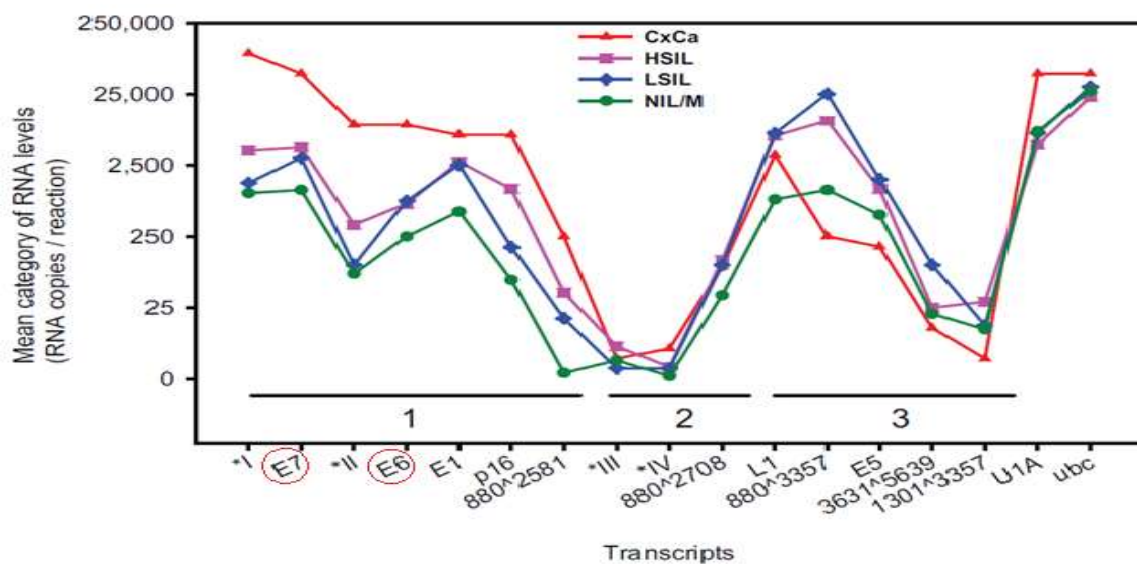


Abbildung 2: Logarithmische Darstellung der Expressionsmuster verschiedener RNA-Transkripte in unterschiedlich schweren Dysplasien der Zervix uteri und dem Zervixkarzinom im Vergleich zum Normalbefund. Die Transkripte sind in drei Gruppen aufgeteilt: Hochreguliert im Zervixkarzinom (CxCa) (1), etwa gleich expremiert in allen dargestellten Gruppen (2), herunterreguliert im CxCa (3). Besonders zu beachten ist die deutlich ansteigende Expression von E6 und E7 (rot markiert) in Korrelation zum Dysplasiegrad der Zervixzellen. CxCa = Zervixkarzinom, HSIL = High-grade Squamous Intraepithelial Lesion, LSIL = Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion, NIL/M = negative for intraepithelial lesion/malignancy (27).

1.2 Zervixkarzinomzelllinien

Als primäres Ausgangsmaterial zur Entwicklung und Validierung des E7 mRNA Assays wurden verschiedene, permanent kultivierbare Zervixkarzinomzelllinien verwendet. Dabei handelt es sich ursprünglich um von Patienten stammendes Zellmaterial (primäre, humane Zellen), welches nach der Entnahme *in vitro* weiter kultiviert wurde. Ein Nachteil dieser Zellen besteht darin, dass die Anzucht für den Langzeitgebrauch nur selten gelingt und somit nur eine begrenzte Anzahl an etablierten Zelllinien für den Laborgebrauch existiert. Die verwendeten Zervixkarzinomzelllinien sind in Tabelle 4: „Verwendete Zelllinien“ unter Punkt 2.1.1 aufgelistet. Die wohl bekanntesten und weitverbreitetsten unter ihnen sind die Zelllinien HeLa und CaSki.

Der Ursprung der HPV18 positiven HeLa-Zelllinie liegt in einer 1951 durch den Gynäkologen Howard Jones entnommen Biopsie der portio eines Zervixkarzinoms von der Patientin Henriette Lacks, welche vom Krankenhaus das Kürzel HeLa erhielt. Die entnommene Probe war ursprünglich zur Malignitätsprüfung gedacht. Bei der Untersuchung des Zellmaterials fiel dem Wissenschaftler George Otto Gey jedoch auf, dass sie sich in Kultur in beliebiger Zahl vermehren ließen und nicht abstarben. Sie war die erste unter Laborbedingung dauerhaft kultivierbare Zelllinie der Welt und wurde zum Grundstein einer Vielzahl bahnbrechender Experimente weltweit. Henriette Lacks selbst verstarb am 4. Oktober 1951.

Bei der CaSki-Zelllinie handelt es sich ebenfalls um eine aus Zervixkarzinomgewebe etablierte permanente Zelllinie. Sie ist HPV16 positiv.

Bei den in unserem Fall verwendeten Karzinomzellen handelt es sich überwiegend um mit HPV infizierte Zelllinien, die bereits sehr lange in Kultur sind und nur ein kleines Spektrum an HPV Typen repräsentieren. Diese Zelllinien ermöglichen jedoch die Testung an definierten, charakterisierten Proben. Es steht leider nicht für jeden gewünschten HPV-Typen eine passende HPV positive Karzinomzelllinie zur Verfügung. Für im klinischen Alltag häufig vorkommende und damit relevante HPV-Typen, wie z.B. dem lr-Typ 6, gibt es bisher keine passenden kultivierbaren Zelllinien.

Die Validierung eines Nachweistestes mit kultiviertem Zellmaterial, wie in unserem Fall geschehen, kann somit nur für einige HPV Typen vorgenommen werden.

1.3 Screening zur Prävention des Zervixkarzinoms

Die Früherkennungsuntersuchung für das Zervixkarzinom wird in der Bundesrepublik Deutschland seit 1971 durchgeführt. Es besteht aus einer gynäkologischen Untersuchung, sowie

der zytologischen Probenentnahme und Begutachtung. Dabei wird ein Abstrich von der Portiooberfläche und dem Zervixkanal unter kolposkopischer Sicht entnommen, zytologisch begutachtet und der entsprechenden Diagnose nach Papanicolaou (PAP) zugeordnet. Die Einteilung der zytologisch erhobenen Befunde in die verschiedenen PAP-Stadien (I–V) zur einheitlichen Befundwiedergabe erfolgt in der BRD durch die Münchener Nomenklatur (aktuell in der III. Fassung von 2014) (28), wohingegen im angloamerikanischen Raum das Bethesda System benutzt wird. In *Tabelle 2* sind beide Nomenklaturen gegenübergestellt. Bei unauffälligem Befund (PAP I) erfolgt ein erneuter Routineabstrich einmal pro Jahr.

Ist der Abstrich jedoch auffällig (PAP III D oder höher) oder unklar, wird eine Differentialkolposkopie mit ggf. bioptischer Probenentnahme und histologischer Aufarbeitung dieser empfohlen. Liegt eine zervikale intraepitheliale Neoplasie (CIN), eine Präkanzerose des Zervixkarzinoms, vor, wird sie in Deutschland histologisch in die Stadien CIN I (milde, epitheliale Dysplasien) bis CIN III (hochgradige, epitheliale Dysplasien) eingeteilt. Die jeweiligen Charakteristika sind:

- CIN I: Schichtung des Epithels noch weitgehend in Takt. Leichte Kernatypien in allen Epithelschichten erkennbar. Mitosen beschränken sich jedoch auf das basale Drittel des Epithels.
- CIN II: Horizontale Schichtung ist bis zur mittleren Epithelschicht aufgehoben. Deutliche Kernatypien in allen Schichten. Mitosen kommen nun bis in die mittleren Epithelschichten vor. In den oberen Schichten finden sich unreife Parabasal- oder Intermediärzellen, Superfizialzellen fehlen.
- CIN III/Carcinoma in situ: Aufhebung der epithelialen Schichtung im gesamten Epithel. Zellen nun basalzellartig mit stark atypischem Zellkern, die von Karzinomzellen kaum noch zu unterscheiden sind. Mitosen lassen sich in allen Schichten finden. Es lässt sich jedoch kein Durchbruch des atypischen Gewebes durch die Basalmembran und damit kein Tiefenwachstum beobachten.

Hat das atypische Gewebe die Basalmembran durchbrochen, liegt ein invasives Zervixkarzinom vor. Das mit Abstand am häufigsten auftretende Malignom der Zervix ist das Plattenepithelkarzinom, gefolgt vom Adenokarzinom. Alle anderen Karzinome wie z.B. neuroendokrine- oder kleinzellige Tumore kommen nur sehr selten vor (29).

Ein HPV-DNA-Nachweis wird in Deutschland momentan nur ergänzend durchgeführt, um das Risikopotential der Patientin besser abschätzen zu können und so die Therapie zu optimieren (30).

Er gehört also nicht zum gesetzlichen Krebsfrüherkennungsprogramm.

Nach aktueller Studienlage zeigt der HPV-Test allerdings in mehreren populationsbasierten und randomisierten Studien aus verschiedenen westlichen Ländern für den Nachweis hochgradiger Dysplasien (CIN 2+) und Karzinome eine signifikant höhere Sensitivität (31-35), jedoch geringere Spezifität als die zytologische Untersuchung. Eine alleinige oder mit anderen Methoden kombinierte Anwendung im Primärscreening wird deshalb seit längerem diskutiert (36, 37). In den U.S.A. z.B. ist der HPV-Test seit April 2014 für das reguläre Primärscreening von Frauen im Alter von über 25 Jahren von der FDA zugelassen worden (38). Zum Einsatz kommen dabei alle von der FDA zugelassenen HPV-Tests [vor allem das Cobas®-4800 System (Roche) aber auch der Hybrid Capture 2 HPV Test (HC2 Test), der Cervista® HPV HR/HPV 16/18 Test (Hologic) und APTIMA® HPV (Gen-Probe)]. In Deutschland sind die häufigsten eingesetzten HPV-Tests der HC2-Test oder eine PCR.

Tabelle 2: Münchener Nomenklatur in der III Fassung, mit Gegenüberstellung des Bethesda Systems. Ergänzend ist das empfohlene Prozedere nach München III hinzugefügt (28).

Zytologischer Befund (nach München III)	Prozedere (nach München III)	PAP-Stadium	Korrelat im Bethesda System
Unzureichendes Material	Abstrichwiederholung	0	Unsatisfactory for evaluation
Unauffällige und unverdächtige Befunde	Abstrich im Vorsorgeintervall	I	Negative for intraepithelial lesion or malignancy (NILM)
Unauffällige Befunde bei auffälliger Anamnese	Eventuell zytologische Kontrolle wegen auffälliger Anamnese	II-a	NILM
Befunde mit eingeschränkt protektivem Wert		II	
Plattenepithelzellen mit geringergradigen Kernveränderungen als bei CIN 1, auch mit koilozytärem Zytoplasma/Parakeratose	ggf. zytologische Kontrolle unter Berücksichtigung von Anamnese und klinischem Befund (evtl. nach Entzündungsbehandlung und/oder hormoneller Aufhellung; in besonderen Fällen additive Methoden und/oder Kolposkopie)	II-p	atypical squamous cytology of undetermined significance (ASC-US)
Zervikale Drüsenzellen mit Anomalien, die über das Spektrum reaktiver Veränderungen hinausreichen	ggf. zytologische Kontrolle in Abhängigkeit von Anamnese und klinischem Befund (evtl. nach Entzündungsbehandlung; in besonderen Fällen additive Methoden und/oder Kolposkopie)	II-g	atypical glandular cells (AGC) endocervical not otherwise specified (NOS)

Endometriumzellen bei Frauen > 40. Lebensjahr in der zweiten Zyklushälfte	Klinische Kontrolle unter Berücksichtigung von Anamnese und klinischem Befund	II-e	Endometrial cells
Unklare bzw. zweifelhafte Befunde		III	
CIN 2/CIN 3/Plattenepithelkarzinom nicht auszuschließen	Differentialkolposkopie, ggf. additive Methoden, evtl. kurzfristige zytologische Kontrolle nach Entzündungsbehandlung und/oder hormoneller Aufhellung	III-p	Atypical squamous cells cannot exclude HSIL (ASC-H)
Ausgeprägte Atypien des Drüsenepithels, Adenocarcinoma in situ/invasives Adenokarzinom nicht auszuschließen	Differentialkolposkopie, ggf. additive Methoden	III-g	AGC endocervical favor neoplasia
abnorme endometriale Zellen (insbesondere postmenopausal)	Weiterführende klinische Diagnostik, ggf. mit histologischer Klärung	III-e	AGC endometrial
Zweifelhafte Drüsenzellen ungewissen Ursprungs	Weiterführende Diagnostik (zum Beispiel fraktionierte Abrasio; ggf. additive Methoden/Differentialkolposkopie	III-x	AGC favor neoplasia
Dysplasiebefunde mit großen Regressionsneigungen		III D	
Zellbild einer leichten Dysplasie analog CIN 1	Zytologische Kontrolle in sechs Monaten, bei Persistenz > ein Jahr: ggf. additive Methoden/Differentialkolposkopie	III D1	Low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL)
Zellbild einer mäßigen Dysplasie analog CIN 2	Zytologische Kontrolle in drei Monaten, bei Persistenz > sechs Monate: Differentialkolposkopie, ggf. additive Methoden	III D2	High-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL)
Unmittelbare Vorstadien des Zervixkarzinoms		IV	
Zellbild einer schweren Dysplasie/eines Carcinoma in situ analog CIN 3	Differentialkolposkopie und Therapie	IVa-p	HSIL
Zellbild eines Adenocarcinoma in situ		IVa-g	adenocarcinoma in situ (AIS)

Zellbild einer CIN 3, Invasion nicht auszuschließen		IVb-p	HSIL with features suspicious for invasion
Zellbild eines Adenocarcinoma in situ, Invasion nicht auszuschließen		IVb-g	AIS with features suspicious for invasion
Malignome		V	
Plattenepithelkarzinom		V-p	Squamous cell carcinoma
Endozervikales Adenokarzinom	Therapie Weiterführende Diagnostik mit Histologie und	V-g	Endocervical adenocarcinoma
Endometriales Adenokarzinom		V-e	Endometrial adenocarcinoma
andere Malignome, auch unklaren Ursprungs		V-x	Other malignant neoplasms

CIN = Zervikale intraepitheliale Neoplasie, PAP = Einteilung nach Papanicolaou

1.3.1 Molekularbiologische Nachweismethoden

Auf Basis der bekannten pathophysiologischen Prozesse innerhalb einer hrHPV-Infizierten Zervixzelle wurde bereits eine Vielzahl an Nachweismethoden entwickelt, die an verschiedenen Stellen der Karzinogenese ansetzen. Es existieren mittlerweile über 193 verschiedene molekularbiologische Tests zum Nachweis potenziell kanzerogener hrHPV-Infektionen, auf die hier nicht alle im Einzelnen eingegangen werden soll (39). Sie basieren sowohl auf dem direkten Nachweis viraler Strukturen, wie z.B. DNA oder RNA, als auch auf dem indirekten Nachweis einer HPV-Infektion über zelluläre Proteine wie z.B. p16.

Die direkten Nachweismethoden sind momentan die in der Diagnostik am häufigsten genutzten Testverfahren. Sie können grob in amplifizierende und nicht-amplifizierende Nachweissysteme eingeteilt werden, also solche in denen der Nachweis entweder über die Amplifikation der Zielsequenz mittels *polymerase chain reaction* (PCR) erfolgt oder aber durch den Einsatz einer Signalsonde, welche an der gesuchten Zielstruktur spezifisch bindet. Im Folgenden wird eine Auswahl der am häufigsten verwendeten Tests erwähnt und ihr Grundprinzip erläutert. Dabei handelt sich ausschließlich um Tests, die auf dem Nachweis viraler Nukleinsäuresequenzen basieren und in mehreren klinischen Studien ihre Funktionalität beweisen konnten.

In Tabelle 3 werden sie namentlich mit Hersteller und FDA (Food and Drug Administration)-Zulassung erwähnt, Referenzen angegeben und kurz ihre wichtigsten Eigenschaften

stichpunktartig erwähnt. Die in unserem Labor verwendete Referenzmethode, das Multiplex-HPV-Genotyping (MPG) und der populärste auf dem Nachweis von mRNA basierende Test, APTIMA® HPV von Hologic werden wegen ihrer Bedeutung für diese Arbeit darunter noch einmal ausführlicher erläutert. Sämtliche Informationen über die beschriebenen Testverfahren stammen vom jeweiligen Hersteller und den im jeweiligen Kit enthaltenen Manuals, wenn nicht anders angegeben.

Tabelle 3: Tabellarische Darstellung der wichtigsten HPV-Nachweistests mit Name, Hersteller, FDA-Zulassung und kurzer Darstellung der wichtigsten Eigenschaften.

Name	Hersteller	FDA-Zulassung	Eigenschaften (40)
Hybrid Capture 2 HPV Test (HC2-Test)	Qiagen	31.03.2003	<ul style="list-style-type: none"> • Auf DNA-Nachweis basierender HPV-Test • Zielsequenz: Komplettes HPV-Genom • Nicht amplifizierendes System • Ausgelegt auf den Nachweis der 13 hr-HPV-Typen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 und der fünf lr-HPV-Typen 6, 11, 42, 43, 44 • Hr- und lr-Typen werden jeweils in einer gesonderten Reaktion gemessen • Es kann nur eine Aussage über eine generelle Infektion mit einem oder mehreren der oben genannten hr- oder lr- Typen getroffen werden, nicht jedoch über den genauen HPV-Typ • Somit keine differenzierte Risikoabschätzung bezogen auf den jeweiligen HPV-Typ möglich, da kein typenspezifischer HPV-Nachweis. • Literatur: (41, 42)
Cervista® HPV HR/HPV Cervista® HPV 16/18 Test	Hologic	12.03.2009	<ul style="list-style-type: none"> • Auf DNA-Nachweis basierender HPV-Test • Zielsequenz: L1-Region • Nicht amplifizierendes System • Sonden werden in einer isothermalen, nicht-enzymatischen Reaktion an die Ziel-DNA gebunden • Ausgelegt auf den Nachweis einer Infektion mit einem der 14 hr-HPV Typen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 und 68 • Eine genaue HPV-Typisierung ist lediglich mit der HPV 16/18 Version des Tests für die hr-HPV Typen 16/18 möglich. • Literatur: (43-45)

Cobas®-4800 System	Roche	19.03.2011	<ul style="list-style-type: none"> • Auf DNA-Nachweis basierender HPV-Test • Zielsequenz: L1-Region • PCR-amplifizierendes System • Ausgelegt auf den Nachweis von einem der 14 verschiedenen hr-HPV-Typen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 und 68 • Eine genaue Typisierung kann nur jeweils für die hr-HPV-Typen 16 und 18 erfolgen • Das System besteht aus zwei verschiedenen Einheiten, der Cobas x 480 Einheit zur vollautomatischen Aufarbeitung der DNA und der Cobas z 480 Einheit zur Detektion und Amplifikation der aufbereiteten Proben mittels real-time PCR (rtPCR). • Bis auf die Übertragung der Platte von der x480 zur z480 Einheit läuft der gesamte Nachweisprozess voll automatisiert ab, dadurch eine geringe „hands-on“-Zeit. • Abgesehen von den Typen 16 und 18 keine individuelle Risikoabschätzung für den jeweiligen HPV-Typ möglich, da kein typenspezifischer HPV-Nachweis. • Literatur: (46-49)
Papillocheck	Greiner Bio-One	Nein	<ul style="list-style-type: none"> • Auf DNA-Nachweis basierender HPV-Test • Zielsequenz: E1-Region • PCR-amplifizierendes System • Ausgelegt auf den Nachweis von insgesamt 24 verschiedenen HPV-Typen (6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 55, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, und 82) • Das gesamte Nachweisverfahren findet auf einem DNA-Chip statt, auf dem bis zu 12 verschiedene Proben gleichzeitig analysiert werden können. • Typenspezifischer Nachweis • Literatur: (50, 51)
APTIMA® HPV (im Folgenden ausführlicher beschrieben)	Gen-Probe	28.10.2011	<ul style="list-style-type: none"> • Basiert auf dem Nachweis von HPV- RNA • Zielsequenz: E6/E7 mRNA • Transcription Mediated Amplification (TMA) System -> Ähnlich einer PCR. Zielsequenzen (mRNA) werden amplifiziert • Ausgelegt auf den Nachweis von 14 verschiedenen hr-HPV-Typen (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) • Keine typenspezifischer HPV-Nachweis möglich • Literatur: (52-54)

<p>Multiplex-HPV-Genotyping (MPG) (im Folgenden ausführlicher beschrieben)</p>	<p>Schmitt et al.</p>		<ul style="list-style-type: none"> • Auf DNA-Nachweis basierender HPV-Test • Zielsequenz: L1-Region • PCR-amplifizierendes System • Entwickelt von Schmitt et al. Basierend auf der Luminex xMAP-Technologie (siehe 1.4.1) • Hochdurchsatzverfahren zum simultanen Nachweis von insgesamt 24 HPV-Typen, davon 15 hr-Typen (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 und 82), sechs lr-Typen (6, 11, 42, 43, 44 und 70), sowie die nicht sicher als hr-HPV eingestuften HPV-Typen 26, 53 und 66 • Exakte HPV-Typisierung und damit individuelle Risikoabschätzung bezogen auf den jeweiligen HPV-Typen möglich • Literatur: (55)
--	-----------------------	--	---

hr = *high risk*; lr = *low risk*; HPV = *humaner Papillomavirus*; PCR = *Polymerase chain reaction*; rtPCR = *real time polymerase chain reaction*; FDA = *Food and Drug Administration*

1.3.1.1 Multiplex-HPV-Genotyping (MPG)

MPG ist ein von Schmitt et al. entwickeltes Verfahren zum Nachweis einer Infektion mit hr- und lrHP-Viren basierend auf der Luminex xMAP-Technologie (55) (Ausführliche Beschreibung siehe „3.3.2.1 Multi analyte profiling bead (xMAP) – Technologie“). Es handelt sich dabei um ein Hochdurchsatzverfahren zum simultanen Nachweis von insgesamt 24 HPV-Typen, davon 15 hr-Typen (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 und 82), die sechs lr-Typen 6, 11, 42, 43, 44 und 70, sowie die nicht sicher als hr-HPV eingestuften HPV-Typen 26, 53 und 66. Die Quantifizierung und Typisierung erfolgt über den Nachweis von L1-Genomsequenzen.

Zunächst wird die gesuchte Virus-DNA-Sequenz von 150 Basenpaaren (bp) Länge aus dem *open reading frame* (ORF) der L1-Region mit Hilfe von Konsensusprimern (GP5+/GP6+ biotinyliert) amplifiziert und unter Verwendung von typenspezifischen Gensonden an die Luminex-Beads gebunden (die Gensonden müssen vorher in einem Extraschritt an die Beads gekoppelt werden). Die gebundene, amplifizierte Virus-DNA wird dann mit fluoreszierendem Streptavidin-R-Phycoerythrin (Reporter-Fluoreszenz) eingefärbt, um die an die Beads gebundenen PCR-Produkte messen zu können. Das Ergebnis wird mit dem Median der Reporter-Fluoreszenz-Intensität (MFI) angegeben. Dabei handelt es sich um die durchschnittlich gemessene Fluoreszenz-Intensität aller gebundenen Analyten des gleichen Bead-Typs, welche mit einem Luminex-Gerät durchflusszytometrisch gemessen wird (55).

1.3.1.2 APTIMA® HPV (Hologic)

Das APTIMA HPV System von Hologic ist in der Lage eine Infektion mit einem von 14 verschiedenen hr-HPV-Typen nachzuweisen (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68). Eine Typisierung ist nicht möglich. Der Nachweis erfolgt über die Identifikation der viralen E6/E7 mRNA.

Der Test läuft in drei Schritten ab. Beim ersten Schritt, dem so genannten *target capture* (TC), wird die HPV-mRNA an für die jeweilige Gensequenz spezifische Oligonucleotidsonden gebunden. Diese Oligonucleotide sind wiederum an magnetische Partikel gekoppelt. Mittels Magnet werden die magnetischen Partikel samt gebundener Ziel-mRNA an der Wand des Reaktionsgefäßes fixiert, während die Probe vom Restmaterial befreit wird. Als nächstes folgt die *Transcription-Mediated Amplification* (TMA). Ähnlich einer PCR werden die gebundenen Zielsequenzen aus dem vorherigen Schritt über mehrere Zyklen hinweg vervielfältigt. Anders als bei der PCR geschieht dies hier jedoch mit RNA in einer isothermalen Reaktion und deutlich höherer Kopienzahl pro Vervielfältigungszyklus (100-1000/Zyklus). Zum Einsatz kommen dabei eine RNA-Polymerase und eine reverse Transkriptase.

Im letzten Schritt erfolgt dann der Nachweis des Amplikons mit dem *Hybridization Protection Assay* (HPA). Dabei werden die entstandenen Amplikons sichtbar gemacht, indem eine spezifische Gensonde, welche mit einem Farbstoff markiert ist, an das Amplikon bindet. Nach Bindung an das Amplikon wird eine Leuchtreaktion in Gang gesetzt, die letztendlich die Messung der Probe durch ein Luminometer ermöglicht.

1.4 Grundlagen des QuantiGene 2.0 Plex Assay

Für den hier entwickelten Assay wurde der vorläufige Name QuantiGene for human papillomavirus version 1 (QG-HPV V1) bestimmt. Der QuantiGene Plex 2.0 Assay von Affymetrix bildet die Basis für das von uns hier entwickelte Assay. Im Folgenden wird deshalb das grundlegende Prinzip dieses Assays kurz beschrieben. Die detaillierte Beschreibung befindet sich im Abschnitt 3 „Methoden“.

Die Durchführung des QuantiGene Plex 2.0 Assay ist auf zwei Tage aufgeteilt. Zur Quantifizierung und Qualifizierung der nachzuweisenden (Ziel) mRNA verbindet es die „multi-analyte profiling bead (xMAP)“-Technologie mit der „branched DNA (bDNA)“-Methode (werden beide im Folgenden erläutert). Dies ermöglicht den spezifischen Nachweis von bis zu 80

verschiedenen RNA-Sequenzen in einer Probe. Der Nachweis erfolgt direkt aus Zelllysat. Die gesamten Nachweisreaktionen beruhen auf Nukleinsäurehybridisierungen.

Am ersten Tag werden die Proben entsprechend für die Messung vorbereitet und anschließend die in den Proben enthaltene Ziel-mRNA an die magnetischen „capture beads“ über Sonden mittels Hybridisierung spezifisch gebunden.

Am zweiten Tag erfolgt dann die Amplifikation des Signals durch das in mehreren Schritten entstehende „DNA-Bäumchen“ enzymfrei mit Hilfe der bDNA-Technologie. Nach Anfärbung durch Streptavidin R-Phycoerythrin Konjugat erfolgt die Messung der Proben mit dem Luminexgerät.

Das erhaltene Signal ist direkt proportional zur gebundenen mRNA und der Konzentration der mRNA in der Probe. Damit kann die mRNA direkt quantifiziert werden.

1.5 Motivation der Arbeit

Da der größte Anteil der HPV-Infektionen in der Altersgruppe der Frauen unter 30 Jahren transient verläuft und meist folgenlos ausheilt, ist die geringe Spezifität, also der Nachweis von harmlosen Infektionen, das größte Problem der HPV-DNA-Tests in dieser Alterskohorte. Erst ab einem Alter von 35 Jahren nimmt die relative Anzahl an kanzerogenen HPV-Infektionen stark zu, da der Anteil an transienten Infektionen stark zurück geht und der Anteil persistierender Infektionen mit hohem kanzerogenen Potential zunimmt (56). Ein HPV-DNA-Nachweis gibt also nur Auskunft über eine vorhandene HPV-Infektion, lässt jedoch keine Aussage über das tatsächliche Entartungsrisiko der jeweiligen Infektion zu. Dies führt unabdingbar zu notwendiger Zusatzdiagnostik und regelmäßigen Folgeuntersuchungen, um das individuelle Risiko der Patientin einschätzen zu können und ist einer der Hauptkritikpunkte an dem alleinigen Einsatz des HPV-Tests im Primärscreening. Patientinnen mit eigentlich harmlosem HPV-Infekt werden so für einen längeren Zeitraum unnötigen und belastenden Ängsten ausgesetzt. Dies führt zu starker Verunsicherung sowohl auf der Patientinnen-, als auch auf der ärztlichen Seite.

Ein auf dem Nachweis von HPV-E7 mRNA basierender Test stellt eine vielversprechende Alternative zu den etablierten DNA-Nachweisen dar (57).

So ist z.B. die Expression von HPV-E7 mRNA während der Progression zu hochgradig dysplastischen und maligne entarteten Zervixepithelzellen stark hochreguliert (27) (siehe Punkt 1.1.2) und anders als bei der häufig für HPV-DNA-Nachweisverfahren verwendeten E1/L1-

Region (z.B. MPG) besteht bei der Integration der viralen DNA in die Wirtszelle für die E6/E7-Region nicht die Gefahr einer Deletion (58), welche zu falsch-negativen Ergebnissen führen kann.

Als Zielstruktur bietet die E7 mRNA also die Möglichkeit HPV-infizierte Zellen im Übergang zur malignen Entartung zu identifizieren. Dadurch kann eine differenzierte Diagnostik von potentiell karzinogenen und nicht-karzinogenen HPV-Infektionen erfolgen. Bereits auf dem Markt erhältliche HPV-Tests, die auf dem Nachweis von HPV-mRNA-Transkripten basieren (z.B. PreTect Proofer Assay von NorChip, APTIMA HPV Assay von Hologic), zeigen im klinischen Vergleich eine verbesserte Spezifität im Vergleich zum DNA-Nachweis (59, 60) und das APTIMA HPV Assay sogar eine vergleichbare Sensitivität (54, 61). Die E7 mRNA ist somit ein potentieller Progressionsmarker und erlaubt möglicherweise eine frühzeitige und zuverlässige Detektion von transformierenden HPV-Infektionen mit einer erhöhten Spezifität.

Trotz der schon genannten Vorteile des E7 mRNA-Nachweises erweisen sich einige Punkte bei der Arbeit mit RNA als kritisch:

Die Isolation der RNA aus dem Probenmaterial ist sehr komplex und dadurch zeitaufwendig. Der schnelle Abbau mittels RNAsen macht das Material sehr empfindlich und damit weniger zuverlässig für Testverfahren. Die Quantifizierung der RNA erfolgt üblicherweise über die Vervielfältigung der Ziel-RNA mittels Polymerasen und reversen Transkriptasen (siehe z.B. APTIMA unter Punkt 1.3.1.2). Bei der reversen Transkription (RT) rtPCR kann es zu zusätzlichen Störungen z.B. durch Verunreinigungen kommen, zudem ist sie recht zeitaufwendig, benötigt zusätzliche geeignete Geräte und es lassen sich keine Rückschlüsse mehr auf die Ausgangsmenge der Zielsequenz ziehen.

Der RNA-Nachweis mittels QG-HPV V1 Assay erfolgt direkt aus dem Zelllysat. Es sind weder aufwendige Aufreinigungsverfahren noch eine Vervielfältigung der mRNA im Vorfeld der eigentlichen Messung nötig. Die Signalamplifikation erfolgt nicht-enzymatisch mittels bDNA-Methode (siehe Punkt 1.4), dadurch wird der Prozessaufwand zur Vorbereitung der Proben deutlich reduziert. Das bedeutet eine deutliche Zeitersparnis, eine potentielle Erhöhung der Sensitivität durch Reduktion möglicher Fehlerquellen und die Möglichkeit einer direkten Quantifizierung der vorhandenen Ziel-mRNA.

Somit ermöglicht das QG-HPV V1 Assay die Vorzüge des mRNA-Nachweises voll auszuschöpfen und gleichzeitig die bisher bekannten Nachteile eines RNA-Nachweises zu verringern. Damit hat es einen klaren Vorteil gegenüber dem populären ebenfalls auf mRNA-

Nachweis basierenden APTIMA HPV-Test, welcher zur Amplifikation eine der PCR äquivalente Technologie, die TMA, nutzt.

Ein weiterer Vorteil gegenüber dem APTIMA-HPV Test besteht in der Möglichkeit einer genauen Typisierung des hr-HPV-Virus und der zusätzlichen Erfassung und Differenzierung von lr-HPV-Typen. Dies ermöglicht auch die Unterscheidung zwischen persistierender Infektion, Reinfektion mit einem HP-Virus des gleichen Typs und Infektion mit einem neuen HPV-Typ. Dadurch kann eine genauere Risikoabschätzung für die jeweilige Patientin erfolgen. Prävention, Kontrollen und Therapie können so dem ermittelten Risikoprofil entsprechend genauer auf die jeweilige Patientin abgestimmt werden.

Der quantitative und qualitative Nachweis der E7 mRNA unter Verwendung des QG-HPV V1 Assays wäre somit eine verlässliche Methode für die Identifikation und Verlaufsbeurteilung einer HPV-Infektion bzw. der Erfassung progredienter HPV-Infektionen. Er ermöglicht dadurch, im Vergleich zu den momentan vornehmlich verwendeten Nachweisverfahren, eine wesentlich präzisere Einschätzung des individuellen Risikoprofils der jeweiligen Patientin.

1.6 Ziele und Fragestellung

Diese Arbeit befasst sich im Folgenden mit der Konzeption und der grundsätzlichen Prüfung der Kernfunktionalität („Proof of Principle“) eines auf der Luminex-xMAP-Technologie und der bDNA-Methode basierenden Nachweistests für HPV-E7 mRNA. Im Fokus steht dabei die Testung bzw. Adaptation der eigens entwickelten Sonden, Detektionssysteme und der technischen Abläufe. Dabei wird der Frage nachgegangen, ob sich der entwickelte E7 mRNA-Test generell für Qualifizierung und Quantifizierung der HPV-mRNA des Onkogens E7 eignet und wie sich die Durchführung des Assays optimieren lässt, mit dem Ziel das Potential für eine große klinische Testung zu beurteilen.

Zu diesem Zweck wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- 1) Wie hoch sind Sensitivität, Spezifität und Präzision des Assays im Rahmen eines generellen Machbarkeitsnachweises (Proof of Principle) bei der Messung von HPV-positivem Material aus kultivierten Zelllinien?
- 2) Welche Transportmedien und Verfahren eignen sich zur Probenaufarbeitung und wie müssen sie ggf. angepasst werden?
- 3) Ist der Assay auch in der Lage von Patientinnen stammende Proben zu messen und inwieweit lassen sich so die Ergebnisse auf eine mögliche klinische Anwendung übertragen?

2 Material

2.1 Zellkulturen

2.1.1 Immortalisierte Zelllinien

Die als standardisiertes Material verwendeten adhärennten Zelllinien wurden von PD Dr. A. M. Kaufmann, Leiter des Labors für gynäkologische Tumorummunologie an der Klinik für Gynäkologie, Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin und Mitte, zur Verfügung gestellt. Es handelt sich hierbei ausschließlich um etablierte Zelllinien, folgend in Tabelle 4 angegeben.

Tabelle 4: Verwendete Zelllinien

Name	Typ	Quelle
CaSki	HPV 16 infizierte, humane, epitheloide Zervixkarzinomzellen	ATCC
HeLa	HPV 18 infizierte, humane, epitheloide Zervixkarzinomzellen	ATCC
MRHI – 215	HPV 45 infizierte Zervixkarzinomzellen	ATCC
Erin	HPV 59 infizierte und immortalisierte, humane Vorhautkeratinozyten	Dr. D. Braun, University of Michigan Medical School, Indiana, U.S.A.
ME 180	HPV 68 infizierte Zervixkarzinomzellen	ATCC
CC33a	HPV negative Zervixkarzinomzellen	ATCC
NIH – 3T3	HPV negative, nicht-humane (Maus), embryonale Fibroblasten	ATCC

HPV = Humanes Papillomvirus, ATCC = American Type Culture Collection Inc.

2.1.2 Klinische Materialien

Für die Versuche mit klinischem Material wurden Abstriche der *Zervix uteri* von der gynäkologischen Dysplasiesprechstunde der Universitätsfrauenklinik der Charité Universitätsmedizin Berlin zur Verfügung gestellt. Ein Einverständnis der Patientinnen zum HPV-Nachweis und zur weiteren Verwendung des Abstrichmaterials (Behandlungsvertrag der Charité) liegt vor. Ethikvotum Nummer PIPAVIR: EA1/168/13

Die Abstriche wurden in PreservCyt bei 4°C asserviert. Mit jeder dieser Proben wurde sowohl der Standard-HPV-Nachweis mittels Multiplexed Genotyping (MPG), durchgeführt von unserem Labor ((62, 63) siehe Punkt 1.3.1.1), als auch der E7 mRNA Nachweistest mit dem QG-HPV V1 Assay durchgeführt.

Dabei handelt es sich um einen von uns entworfenen und von Panomics/eBioscience/Affymetrix entwickelten direkten Nachweistest von E7 mRNA aus Lysaten von zellulärem Material.

2.2 Chemikalien

2.2.1 Zellkultur

Tabelle 5: Zur Kultivierung der Zellen verwendete Chemikalien

<i>Chemikalie</i>	<i>Hersteller</i>
DMEM + GlutaMAX	Invitrogen GmbH, Carlsbad, U.S.A
RPMI 1640 Medium GlutaMAX, liquid	Invitrogen GmbH, Carlsbad, U.S.A
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Trypsin/EDTA in PBS, ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS) 1231T	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
PBS ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Nukleasefreies H ₂ O (Ampuwa)	Fresenius Kabi, Louviers, Frankreich

2.2.2 Asservierung nicht-klinischer/klinischer Proben

Tabelle 6: Zur Asservierung der zellulären Proben verwendete Chemikalien

<i>Chemikalie</i>	<i>Hersteller</i>
RNAlater	QIAGEN, Hilden, Deutschland
PreservCyt	Cytic Corporation, Marlborough, U.S.A.
PBS	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
BoonFix	Leids Cytologisch en Pathologisch Laboratorium, Leiden, Niederlande
Lysis Mixture aus QGP 2.0 Evaluation Kit, Tissue	Affymetrix, Santa Clara, U.S.A.

2.2.3 Puffer und Reagenzien für das QG-HPV V1 Assay

Tabelle 7: Puffer und Reagenzien aus dem Kit für das QuantiGene 2.0 Plex Assay mit Mengenangabe des jeweiligen Verbrauchs pro verwendetem Well, bzw. einer gesamten 96-Well-Platte.

	Reagenz	1-Well [μ L]	96-Wells [μ L]
Verdünnte Lysis Mixture (Nur falls Proben noch nicht in verdünntem Lysis Mixture gelöst sind)	Lysis Mixture*	13	1 248
	Wasser	27	2 592
	Summe	40	3 840
Working Bead Mix	Wasser	2,6	249,6
	Lysis Mixture*	3,3	316,8
	Blocking Reagent*	1	106
	Proteinase K*	0,1	10,6
	Probe Set*	2,5	265
	Capture Beads*	0,5	53
	Summe	10	1060
Pre-Amplifier/Amplifier/Label Probe/SAPE Working Mix	Pre-Amplifier-/Amplifier-/Label Probe-/SAPE-Diluent*	50	6000
	Pre-Amplifier/Amplifier/Label Probe/SAPE*	0,15	18
	Summe	50,15	6018
Waschpuffer	Wash Buffer Component 1*	0,15	0,3
	Wash Buffer Component 2*	2,5	5
	Wasser	47,3	94,5
	Summe	49,95	99,8

* Im QGP 2.0 Evaluation Kit enthaltene Reagenzien

2.2.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 8: Geräte und Verbrauchsmaterialien

<i>Gerät</i>	<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
<i>Thermoschüttler¹⁾</i>	PHMP	<i>Grant-Bio, Shepreth, UK</i>
<i>Sterile Werkbank</i>	HeraSafe KS 12	<i>Thermo, Waltham, U.S.A.</i>
<i>Pipetten</i>	Powerpette Plus ABS Research plus, 0,5 -10 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl	<i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland</i> <i>Eppendorf, Hamburg, Deutschland</i>
<i>Zentrifugen</i>	Heraeus Multifuge 1 S-R, Rotornr.: 75002005 Mini Spin	<i>Thermo, Waltham, U.S.A.</i> <i>Eppendorf, Hamburg, Deutschland</i>
<i>Automatischer Zellzähler</i>	Countess	<i>Invitrogen GmbH, Carlsbad, U.S.A</i>
<i>Inkubator</i>	BBD 6220 CO ₂	<i>Thermo, Waltham, U.S.A.</i>
<i>Absaugpumpe</i>	Vakuum-Sicherheits-Absaugsystem AF	<i>HLC, Bovenden, Deutschland</i>
<i>Mikroskop</i>	Axiovert 40 C	<i>Zeiss, Jena, Deutschland</i>
<i>Röhrchen</i>	PP Falcon steril 50 ml PS Falcon steril 15 ml 1,5 ml Safe – Lock Tubes 1,5 ml Cryo – Tubes, Vials	<i>BD, Franklin Lakes, U.S.A.</i> <i>Eppendorf, Hamburg, Deutschland</i> <i>Thermo, Waltham, U.S.A.</i>
<i>Wasserbad</i>	TW 8	<i>Julabo, Seelbach, Deutschland</i>
<i>Zellkultur</i>	Petrischalen 100 x 20 mm, Sterile, serologische Kunststoffpipetten (2; 5; 10 und 25 ml)	<i>BD, Franklin Lakes, U.S.A.</i>
<i>Well-Platten</i>	96 Well, PS, Flachboden; chimney well, µClear, med. Binding; black. 96 Well, Rundboden, unbehandelt, nicht steril	<i>Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, Österreich</i> <i>VWR International, Radnor, U.S.A.</i>
<i>Versiegelungsfolien für Well – Platten</i>	Rotilabo – Abdeckfolien für PCR – Platten Polyolefin – Abdeckfolien für Microtiterplatten.	<i>Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland</i> <i>HJ – Bioanalytik GmbH, Erkelenz, Deutschland</i>
<i>Luminex Reading – System</i>	Bio – Plex 200 System	<i>Bio – Rad, Hercules, U.S.A.</i>
<i>Thermometer</i>	QuantiGene Incubator Temp.Val.Kit.	<i>Affymetrix, Santa Clara, U.S.A.</i>
<i>Handheld Magnetic Plate Washer</i>	Bio – Plex	<i>Bio – Rad, Hercules, U.S.A.</i>

¹⁾Wurde mit dem *QuantiGene Incubator Temperature Validation Kit* über den Zeitraum von 24 h validiert.

3 Methoden

3.1 Statistische Verfahren

3.1.1 Mittelwert und Standardabweichung

Zur Darstellung der Werte in der vorliegenden Arbeit wird der Mittelwert (MW) mit Standardabweichung (+/-SD) angegeben. Als „Mittelwert“ ist immer der arithmetische Mittelwert gemeint ($\frac{\text{Summe aller Werte}}{\text{Gesamtanzahl der Wert}}$). Die Standardabweichung bezieht sich folglich auf alle durch den Mittelwert erfassten Werte und gibt die Streuung dieser um den Mittelwert an.

3.1.2 Berechnung des Variationskoeffizienten

Als Maß für die Präzision wird in dieser Arbeit der Variationskoeffizient (CV) verwendet. Er eignet sich zur Veranschaulichung des Streuungsbereiches der Einzelwerte um den Mittelwert, setzt also die Standardabweichung in Relation zum Mittelwert. Er wird in Prozent (%) angegeben und ist unabhängig von den gewählten Einheiten. Er wird wie folgt berechnet:

$$\%CV = \frac{SD}{MW} \cdot 100$$

SD = Standardabweichung, MW = Mittelwert der Signale.

Der Soll-Wert ist definiert als $\leq 15\%$.

3.1.3 Berechnung der Nachweisgrenze (Limit of Detection = LOD) mit Hilfe der vereinfachten Leerwertmethode und der Erfassungsgrenze

Der *LOD-Wert* setzt sich zusammen aus dem Mittelwert des Hintergrundsignals MW (Normalverteilung) addiert mit der dreifachen Standardabweichung SD des Hintergrundsignals (64). Dieser wird ermittelt, um den minimalen Grenzwert zu bestimmen, der für den qualitativen Nachweis eines Analyten überschritten werden muss.

$$LOD = MW + 3 * SD$$

SD = Standardabweichung, MW = Mittelwert des Hintergrundsignals (Leerprobe).

Da die Nachweisgrenze für eine sichere Quantifizierung als ungenügend sicher gilt, sollte zusätzlich die Erfassungsgrenze (EG) bestimmt werden (65). Sie wird definiert als MW des Hintergrundsignals addiert mit der sechsfachen SD des Hintergrundsignals.

$$EG = MW + 6 \cdot SD$$

3.2 Zellkulturen

3.2.1 Kultivierung

Die Zellen wurden auf 10 cm Petrischalen in 7 ml Kulturmedium bei 37°C, 5% CO₂ und 94% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das Medium wurde 24 h nach dem Auftauen der Zellen gewechselt. Eine Passage erfolgte abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit der Zelllinie alle zwei bis drei Tage bei maximal 80% Konfluenz der Kultur.

3.2.2 Passagen

Eine Passage erfolgte bei einer Konfluenz von 70 bis 80%. Nach der Entfernung des Mediums wurden die Platten mit 7 ml PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen für eine Minute in 1 ml Trypsin/EDTA Lösung (TE) bei Raumtemperatur inkubiert. Das TE wurde entfernt und die Zellen wurden für weitere 5 Minuten im Kulturschrank inkubiert. Durch vorsichtiges Klopfen der Kulturflasche, bzw. der Petrischale, wurden die Zellen endgültig von der Oberfläche gelöst. Abschließend wurden die Zellen in der benötigte Menge Medium aufgenommen und auf neue Kulturgefäße verteilt.

3.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Anzahl der Zellen wurde mit Hilfe von zwei verschiedenen Methoden ermittelt.

Bei der ersten handelt es sich um die Neubauer-Zählkammer. Hierfür wurde die Zellsuspension in einem Verhältnis von 1:1 mit einer Lösung des Farbstoffes Trypanblau (0,4% (w/v)) vermischt. Die Zählkammer wurde mit einem Deckgläschen bedeckt und die gefärbte Zellsuspension am Rand des Deckgläschens aufgetragen, sodass diese durch Kapillarkräfte in die Zählkammer gesogen wurde. Ausgezählt wurden vier Gruppenquadrate, die sich in je 4x4 Kleinquadrate unterteilen. Die Gesamtzellzahl n_{total} ergibt sich aus dem Mittelwert der gezählten Zellen n pro Gruppenquadrat, multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor f , der sich aus der Vermischung mit dem Farbstoff ergibt, dem Volumen V , in dem die Zellen gelöst sind, und $\times 10^4$.

$$n_{total} = \frac{n}{4} \cdot f \cdot V \cdot 10^4$$

Die zweite Methode wurde mit dem Countess Gerät von Invitrogen durchgeführt. Auch hier wurde die Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau im Well einer Mikrotiterplatte vermischt (10 µl:10 µl). Daraus wurden dann 10 µl entnommen und auf den Rand eines *Countess cell counting chamber slide* pipettiert, von wo die Suspension durch Kapillarkräfte ins Innere der Zählkammer gesogen wird. Die mit Suspension gefüllte Seite wird dann in das Gerät hineingeschoben und der Fokus so eingestellt, dass die lebenden Zellen einen hellen Kern und dunkle Ränder, die toten Zellen eine ziemlich homogene, blaue Färbung besitzen. Anschließend startet man die Zellzählung. Das Gerät gibt dann die Zahl der lebenden, toten und die Gesamtzellzahl an. Das Ergebnis wird dann mit 10^4 und dem Verdünnungsfaktor 2 multipliziert.

3.3 QG-HPV V1 Assay zur Bestimmung der E7 mRNA in HPV positiven Zellen

3.3.1 Hintergrund

Zum Nachweis potentiell maligner HPV-Infektionen bei HPV-infizierten Patientinnen wurde auf Basis des QuantiGene Plex 2.0 (QGP) Assays ein neuartiger, direkter Nachweistest von E7 mRNA aus Lysaten von zellulärem Material von uns entworfen und mit Panomics/eBioscience/Affymetrix entwickelt, das QuantiGene-HPV-Version 1 (QG-HPV V1) Assay. Dazu wurde das QGP-Assay in Zusammenarbeit mit Affymetrix entsprechend der Fragestellung modifiziert, weiterentwickelt und ein entsprechendes Versuchsprotokoll erstellt, um ein "proof-of-principle" durchzuführen.

Das Assay ist ausgelegt auf den Nachweis von 10 verschiedenen Transkripten. Die zellulären Transkripte Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT 1), β -Actin (ACTB) und der *cyclin dependent kinase inhibitor 2A* (CDKN2A, p16) werden als zelluläre Marker verwendet. ACTB und HPRT 1 als Parameter für die Gesamtzellzahl in der analysierten Probe, p16 als genereller Marker für HPV transformierte Zellen in der Probe. Für den direkten Nachweis der HPV E7 mRNA wurden die E7 Sequenzen von 6 verschiedenen HPV-Typen ausgewählt. Die am häufigsten in Zervixkarzinomen vorkommenden hr-HPV-Typen 16, 18, 31 und 45, die selteneren hr-HPV-Typen 59, 68, sowie den für die meisten Condylome verantwortlichen lr-HPV-Typen 6. Diese HPV-Typenselektion für die erste Version des Tests wurde auch zum Teil durch die Verfügbarkeit von Zelllinien bestimmt.

Entsprechend diesen Transkripten wurden von Panomics/eBioscience/Affymetrix die passenden Gensonden entwickelt (siehe auch Punkt 4.1 Assay-Design und Sonden Entwicklung).

3.3.2 Grundlegende Funktionsprinzipien des QG-HPV V1 Assays

3.3.2.1 *Multi analyte profiling bead (xMAP) – Technologie*

Die xMAP Technologie von Luminex basiert auf der spezifischen Bindung des gesuchten Analyten an sogenannte Mikrosphären oder „Beads“, die hier entsprechend einem „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) als Festphase fungieren. Bei den in unserem Assay verwendeten, magnetischen Beads handelt es sich im Durchmesser um ca. 5,6 µm große, magnetische Kügelchen, an deren Oberfläche ein spezifisches Nachweisreagenz gebunden ist, in unserem Fall eine für eine bestimmte mRNA-Sequenz spezifische Oligonukleotidsonde. In anderen Assays werden auch etwas kleinere, nicht-magnetische Beads aus Polyesterol verwendet, die sich in der Handhabung bei der Aufreinigung der zu messenden Probe unterscheiden, sonst aber nach demselben Prinzip funktionieren. Die einzelnen Beads unterscheiden sich in ihrem Fluoreszenzspektrum, wodurch bis zu 100 verschiedene Beads unterschieden werden können, von denen jeder ein anderes Nachweisreagenz an der Oberfläche tragen kann. Die an der Oberfläche der Beads gebundenen Analyten werden durch Kopplung an einen aus einem anderen Wellenlängenbereich stammenden Farbstoff, meist Streptavidin Phycoerythrin Konjugat, markiert. Mit Hilfe von zwei fest installierten Lasern im Inneren des Luminex-Messgerätes wird dann die zu analysierende Probe qualifiziert und quantifiziert. Der rote Laser und die zugehörige Photoelektrode „erkennen“ den Bead und ordnen ihn dem entsprechenden Analyten zu, parallel registrieren der grüne Laser und die Photoelektrode die Anzahl an gebundenen Analyten. Die Fluoreszenzstärke wird als „mean fluorescence intensity“ (MFI) angegeben.

3.3.2.2 *Branched DNA (bDNA)-Methode*

Die bDNA-Methode quantifiziert und qualifiziert mit Hilfe von synthetischen Oligonukleotiden spezifische DNA- und RNA-Sequenzen. Sie kann benutzt werden, um praktisch jede bekannte Nukleinsäuresequenz zu detektieren und wurde schon für diverse Virusnachweistests verwendet, z.B. zum Nachweis von HIV-RNA (66), Hepatitis B Virus DNA (67) oder von Cytomegalievirus DNA (68). Sie läuft dabei in mehreren, aufeinander folgenden Hybridisierungsschritten ab, jeder davon nicht-enzymatisch.

Im ersten Hybridisierungsschritt wird zunächst die gesuchte Nukleinsäuresequenz (in unserem Fall RNA = *Ziel-mRNA*) spezifisch gebunden. Das kann auf verschiedene Arten geschehen, z.B. mit Hilfe von an eine feste Phase gebundenen, spezifischen Antikörpern. In unserem QG-HPV-V1 Assay wird die Ziel-mRNA an eine von 6 verschiedenen, spezifischen, eigens für unsere Ansprüche entwickelte Oligonukleotidsonde gebunden, welche an einen magnetischen Bead gekoppelt ist (siehe Punkt 3.3.2.1). Im nächsten Schritt wird eine ebenfalls für diese Ziel-mRNA

spezifische Oligonukleotidsonde an dieser gebunden („Label Extender“). Dieser dient als Bindeglied zwischen der Ziel-mRNA und dem „Preamplifier“, der als Grundstamm für die Signalamplifikation fungiert. An jeden Preamplifier werden dann mehrere „Amplifier“ gebunden, die wiederum eine Vielzahl von mit Streptavidin-konjugiertem R-Phycoerythrin (SAPE) markierten „Labelprobes“ binden (siehe Abb. 3). Die durch die konjugierten Labelprobes erzeugte Lichtreaktion ermöglicht dann die Detektion des Analyten.

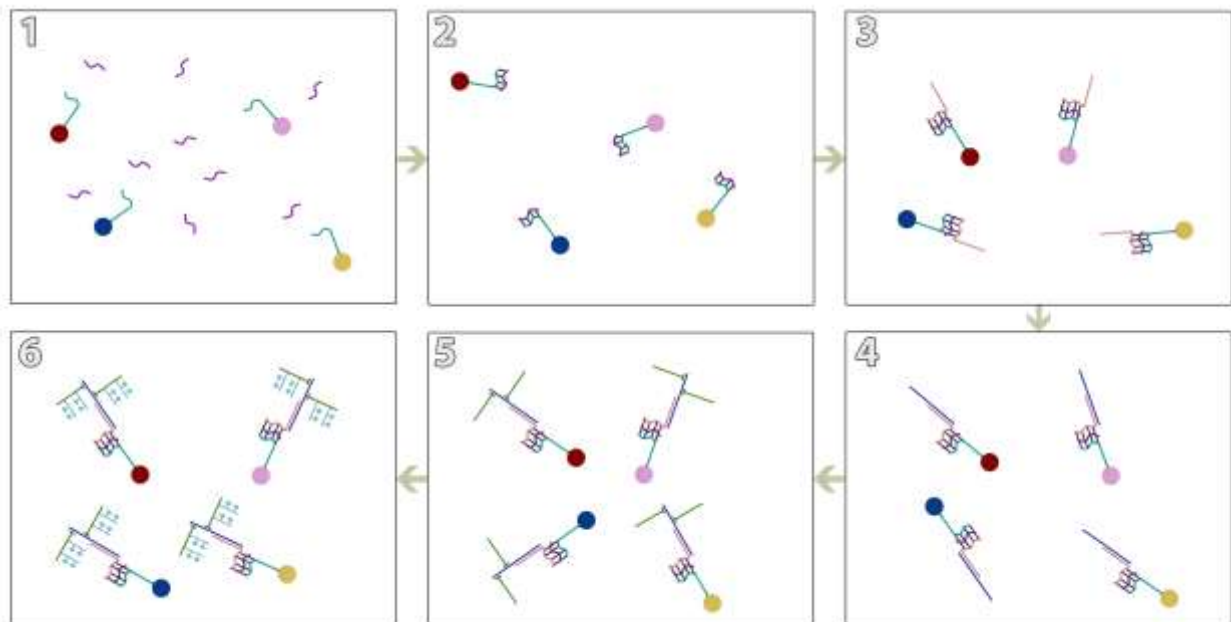


Abbildung 3: Schematische Darstellung der einzelnen Hybridisierungsschritte des QG-HPV-V1 Assay. In Schritt 1 und 2 findet die spezifische Bindung der Ziel-mRNA an den magnetischen Beads statt (Tag 1). Die Schritte 3-6 veranschaulichen die schrittweis nicht-enzymatische Hybridisierung der DNA-Struktur zur Amplifikation des Signals (Tag 2). 2: Bindung der Ziel-mRNA an magnetische Beads über gekoppelte, spezifische Oligonukleotidsonden. 3: Bindung des „Label Extenders“ an der gebundenen Ziel-mRNA. Verbindet die Ziel-mRNA mit dem zur Amplifikation des RNA-Signals dienendem „DNA-Bäumchens“. 4: Bindung des „Preamplifier“ an den Label Extender. 5: Bindung der „Amplifier“ an den Preamplifier. 6: Bindung der „Label Probes“ an die Amplifier und Konjugation dieser mit SAPE (Fluoreszenzfarbstoff). Diese komplette Struktur wird anschließend mit einem Luminometer (z.B. von Luminex) gemessen. Die fluoreszierenden Beads ermöglichen die Qualifizierung (xMAP), das markierte „DNA-Bäumchen“ die direkte Quantifizierung (bdNA) der gesuchten mRNA mittels Luminometer.

3.3.3 Herstellung der verwendeten Zellysate

3.3.3.1 Lysat aus kultiviertem Zellmaterial

Kultiviert wurden die Krebszelllinien in 100 x 20 mm Petrischalen bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit. Als Medium für die Zervixkarzinomzelllinien HeLa, CaSki, C33a und für die Mauszelllinie NIH3T3 wurde DMEM (Dulbeccos´ minimal essential medium), für die Zelllinien MRHI - 215 und ME 180 wurde RPMI eingesetzt. Beide Medien wurden kurz vor der Verwendung mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin versetzt. Das Ernten der

Zellen für den Versuchseinsatz erfolgte bei maximal 70 – 80% Konfluenz der Kulturen. Zum Herstellen der Zelllysate wurden die adhärenen Zellen zunächst mit PBS gewaschen (zweimal, jeweils 1 Min. mit 5 ml) und dann mit 1 ml Trypsin/EDTA – Lösung abgelöst (nach ca. 1 Min. der Überstand abgesaugt und dann für 5 Min. bei 37°C inkubiert). Anschließend wurden die Zellen zuerst in Medium resuspendiert (je nach Zelllinie 4 ml RPMI oder DMEM), mit dem automatischen Zellzähler (Countess) die genaue Zellkonzentration bestimmt, die Zellen abzentrifugiert (10 min. bei 1400 rpm bei 4°C) und dann in verdünntem Lysis Mixture (1/3 Lysis Mixture, 2/3 nukleasefreies H₂O) im Verhältnis 1*10⁶ Zellen /ml resuspendiert, die Zellen für ca. 30 Min. bei Raumtemperatur lysiert und schließlich in 1,5 ml Eppendorfröhrchen bei -80°C gelagert. Für die Testung wurden die benötigten Lysate dann aufgetaut, gevortext (ca. 20 Sek.) und die benötigte Menge entnommen. Die Lysate wurden während des Entnahmeprozesses zur Überbrückung auf Eis gelagert, der Rest wurde dann schnellstmöglich wieder eingefroren.

3.3.3.2 *Lysat aus klinischen Proben*

Zunächst wurde mit dem Programm Excel von der Firma Microsoft eine Liste für alle in der Ambulanz und dem OP gesammelten Proben erstellt, in der Name, Alter, HPV Genotyp („low-risk“ und „high-risk“, nachgewiesen mittels DNA-PCR-Nachweis), Histologie (CIN I-III), Zytologie (nach PAP) und klinische Diagnose der Zervix uteri für die jeweils dazugehörigen Patientinnen erfasst wurden. Anhand dieser Liste wurden dann die für das jeweilige Experiment relevanten Proben ausgewählt.

Gewonnen wurde das Probenmaterial aus Abstrichbürstchen welche entweder unmittelbar nach dem Abstrich in der Kolposkopieprechstunde der Charité oder im OP in PreservCyt aufbewahrt wurden (bei 4°C).

Zur Vorbereitung der PreservCyt – Proben wurden diese zunächst gevortext (ca. 15 Sek.) und anschließend aus einem Gesamtvolumen von 20 ml, 2 ml entnommen. Diese wurden dann zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet 1 min. kopfüber auf Zellstofftüchern getrocknet und dann je nach Größe (kann stark variieren, abhängig von verwendeter Abstrichtechnik, Anwender, Beschaffenheit der Zervix etc.) in 100 – 200 µl verdünntem Lysis Mixture resuspendiert. Bei Bedarf wurde die Probe dann noch für ca. 1 Min. Bei Zimmertemperatur gevortext und manuell mit der Pipette mehrfach resuspendiert, bis sich mit dem bloßen Auge sichtbare Gewebsstrukturen vollends gelöst hatten. Anschließend wurde die Probe für die Zelllyse ca. 30 Min. bei Raumtemperatur gelagert. Von diesem Zelllysate wurden dann 40 µl für die Testung verwendet, der Rest bei – 80°C eingefroren.

3.3.4 Probenanalyse

3.3.4.1 Vorbereitung der Messung mit dem QG HPV V1 Assay

Eigens für das von uns entwickelte QG-HPV-V1 wurde ein eigenes Versuchsprotokoll erstellt, welches sich zum größten Teil an dem im Manual stehenden Protokoll für das QuantiGene Plex 2.0 Assay orientiert, sich aber in einigen Punkten unterscheidet. Ein wesentlicher Unterschied besteht in der verwendeten Menge der Reagenzien. Die verwendeten Volumina wurden um 50% auf ein Gesamtvolumen von insgesamt 50 µl pro Well verringert, wodurch die benötigten Ausgangsvolumina des Zellysats verringert wurden, was für klinische Abstriche von Vorteil ist, bei denen häufig auch nur geringe Mengen von Zellmaterial gewonnen werden.

Ansonsten wurden in einigen Schritten die rpm und die Schüttelzeiten des Schüttelinkubators leicht erhöht, um die Resuspendierung der Probe zu verbessern und so starker Aggregation, welche die Messung beeinträchtigen würde, entgegen zu wirken.

Die Vorbereitung der Messung lief nach folgendem Standardprotokoll ab:

Es wurden 40 µL jeder Proben unverdünnt und wenn nötig in einer 1:10 bzw. 1:3 Verdünnung konsistent mit verdünnter *Lysis Mixture* (vLys) in eine 96-Well-Rundbodenplatte vorgelegt. Anschließend wurden 10 µl *Working Bead Mix* (siehe Tabelle 7) je Well hinzugegeben. Die Platte wurde mit durchsichtiger PCR-Folie versiegelt und für 18 bis 22 h bei 54°C unter Schütteln bei 600 rpm inkubiert. Danach wurde die Platte bei 240 xg für 1 Min. zentrifugiert, das Pellet und damit möglichst alle Beads resuspendiert und die Probenansätze mit einer Multikanalpipette in eine 96-Well-Flachbodenplatte überführt.

Für den Waschvorgang wurde die Platte auf einer Magnetplatte montiert. Nach einer Wartezeit von einer Minute wurde die Lösung in den Wells durch Invertieren ausgeschüttet. Gewaschen wurde dreimal mit je 50 µl Waschpuffer, wobei vor dem Invertieren jedes Mal eine Wartezeit von mindestens 15 Sekunden eingehalten wurde. Die Platte wurde dabei während des gesamten Waschvorgangs nicht von der Magnetplatte genommen.

Die Hybridisierung der Proben mit dem *Pre-Amplifier*, dem *Amplifier* und der *Label Probe* erfolgte durch sequenzielle Zugabe von je 50 µl des jeweiligen *Working Mix* (siehe Tabelle 7). Die Platte wurde mit PCR-Folie versiegelt und für 2 Minuten bei 800 rpm und 50°C geschüttelt und anschließend für 58 Minuten bei 50°C unter Schütteln bei 600 rpm inkubiert. Nach jedem Hybridisierungsschritt wurden die Ansätze wie oben beschrieben gewaschen.

Abschließend erfolgte die Bindung des *SAPe*. Hierfür wurde jeder Ansatz mit 50 µl *SAPe Working Mix* (siehe Tabelle 7) versetzt und für 2 Min. bei 800 rpm und Raumtemperatur geschüttelt und anschließend für 28 Min. bei Raumtemperatur unter Schütteln bei 600 rpm inkubiert. Der anschließende Waschvorgang erfolgte wie oben beschrieben, jedoch wurde der *SAPe*-Waschpuffer statt des Hybridisierungs-Waschpuffers verwendet. Nach dem Waschvorgang wurden die Ansätze zur Messung mit je 80 µl *SAPe* Waschpuffer versetzt und unmittelbar vor der Messung bei Raumtemperatur für 5 Min. bei 800 rpm geschüttelt.

3.3.4.2 *Messung*

Die Messung erfolgte mit einem BioPlex (Luminex) 200 System von der Firma Bio Rad unter Verwendung der BioPlex Software.

4 Ergebnisse

4.1 Assay-Design und Sondenentwicklung

Um das Prinzip zu entwickeln und die Funktionalität zu testen, wurde im ersten Schritt ein Prototyp-System aufgebaut und getestet. Zu diesem Zweck wurde zunächst eine Auswahl an Sonden getroffen, die in dem Assay enthalten sein sollten. Für die Herstellung der HPV-E7 mRNA Sonden wurde eine kleine Auswahl an bekannten hr-HPV-Typen, insgesamt sechs, getroffen. Aus der lr-HPV-Gruppe wurde der häufig vorkommende HPV-Typ 6 ausgewählt (69), für den keine passende Zelllinie zur Verfügung stand, der aber bei der Anwendung des Assays in epidemiologischen Studien von Bedeutung ist. Es wurden möglichst die HPV-Typen in das Assay mit aufgenommen, für die eine HPV-positive Zelllinie zur Verfügung stand. Mit Blick auf die spätere klinische Anwendung wurden neben den hr-HPV-Typen 16, 18, 45, 59 und 68, für die passende Zelllinien zur Verfügung standen, auch der hr-HPV-Typ 31 mit aufgenommen.

Des Weiteren wurden die zellulären Marker ACTB und HPRT1, sowie der Progressionsmarker für höhergradige Dysplasien der Zervix uteri p16^{INK4a} (CDKN2A) (21) als Kontroll-mRNA (Referenzgene) in das Assay mit aufgenommen.

Das Design der E7 mRNA-Sonden und die Kopplung an die magnetischen Beads wurden dann von Affymetrix durchgeführt. Die zu bestimmende Struktur (HPV, ACTB etc.) und die jeweilige GenID sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 9: GenID der mit dem QG-HPV V1 nachweisbaren mRNA Transkripte.

Protein (Zielstruktur)	GenID
Zelluläre Marker	
Actin-β	NM_001101
CDKN2A (p16 ^{INK4a})	NM_000194
HPRT1	NM_000077
HPV-Typen	
HPV6	L41216
HPV16	K02718
HPV18	X05015
HPV31	J04353
HPV45	X74479
HPV59	EU918767
HPV68	Y14591

Das Versuchsprotokoll des QuantiGene 2.0 Plex Assays diente als Ausgangspunkt der Entwicklung der Versuchsdurchführung des QG HPV V1-Assays. Das finale Versuchsprotokoll,

das letztendlich für die folgende Assaydurchführung verwendet wurde (siehe Methodenteil), entstand durch die schrittweise Optimierung von Konzentration der eingesetzten Reagenzien (siehe Punkt 2.2.3), Temperatur, Inkubationszeiten, Vortexzeiten und –intensitäten, Ablauf der einzelnen Waschschriffe (inklusive Waschpuffereinsatz), Vorbereitung und Lagerung der Proben.

Die jeweilige HPV-Infektion der als Probe verwendeten Zervixkarzinomzellen wurde zuvor mit Hilfe der MPG-Methode (siehe Einleitung Punkt 1.3.1.1) von unserem Labor verifiziert.

4.1.1 Nachweis der einzelnen HPV-Typen und der zellulären Marker in einem Ansatz

Zunächst wurde überprüft, ob das von uns entwickelte Assay mit den neu entwickelten Sonden generell dazu in der Lage ist suffizient die verschiedenen HPV-E7 mRNAs und die zellulären mRNAs parallel in einem Ansatz nachweisen zu können und bis zu welcher Zellmenge ein Nachweis noch möglich ist. Ein positives Signal ist hier noch definiert als ein Signal mit einem MFI-Wert von ≥ 10 über dem gemessenen Leerwert, da die Nachweisgrenze noch nicht bestimmt wurde. Dafür wurde ein Mix aus fünf verschiedenen HPV positiven Zelllysaten zu gleichen Anteilen hergestellt. Es wurden wie nach Protokoll 50 μl Gesamtvolumen pro Well verwendet (40 μl Probe + 10 μl „Working Bead Mix“). Dieser HPV-Mix wurde dann in 9 Schritten jeweils um den Faktor 1:3 verdünnt, so dass zum Schluss eine Verdünnungsreihe von 1 bis 1:19683 vorlag. Diese Titration wurde insgesamt dreimal mit der gleichen Probe durchgeführt (Triplets). Enthalten waren folgende Zelllinien: CaSki (HPV16), HeLa (HPV18), Erin59 (HPV59), ME180 (HPV68), MRHI-215 (HPV45). Die HPV-Typen 6 und 31 waren nicht vorhanden, da keine entsprechenden, kultivierbaren, HPV-positiven Zelllinien zur Verfügung standen. Der unverdünnte HPV-Mix (50 μl) enthielt von jeder Zellreihe zu gleichen Teilen ca. 8.000 Zellen pro 8 μl (10e6/ml), insgesamt also ein Mix aus 40.000 HPV-positiven Zellen in 40 μl . Parallel dazu wurde eine Messung mit einem HPV – negativen Karzinomzelllysate aus C33a-Zellen für eine Negativprobe hergestellt. Diese Negativprobe enthielt die gleiche Menge Zellen wie die HPV – positive Probenmischung insgesamt, also 40.000 pro 40 μl in der Ausgangsverdünnung.

Tab. 10 und Abb. 4 zeigen die Mittelwerte (MW) von $n = 3$ unabhängigen Messungen der HPV-positiven Probe in einem Durchlauf. Die Negativprobe (ebenfalls $n = 3$) wird in Tab. 11 und Abb. 5 präsentiert.

Tabelle 10: Tabellarische Darstellung der MFI-Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten einzelner HPV-Typen in der HPV-positiven Probe, in absteigender Konzentration mit den jeweiligen Leerwerten.

Analyt		Verdünnung										Leerprobe (MW)
		1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243	1:729	1:2187	1:6561	1:19683	
ACTB	MW	16632,5	16117,7	7850,5	2753,5	973,2	404,7	125,0	60,7	32,0	19,2	14,2
	SD	2534,3	359,4	1146,2	253,5	81,0	17,7	12,4	3,5	2,2	1,6	
	CV	15,2%	2,2%	14,6%	9,2%	8,3%	4,4%	9,9%	5,7%	6,8%	8,6%	
CDKN2A	MW	9758,3	4033,5	1768,0	596,7	192,2	88,5	35,7	20,2	17,7	13,8	13,3
	SD	649,4	74,0	298,6	80,4	6,8	1,1	2,7	0,2	2,5	1,4	
	CV	6,7%	1,8%	16,9%	13,5%	3,5%	1,2%	7,6%	1,2%	13,9%	10,4%	
HPRT1	MW	8274,0	3546,7	1448,5	546,0	196,3	76,3	36,7	21,0	13,7	11,3	12,5
	SD	70,9	127,1	58,6	15,0	11,4	2,9	2,6	2,4	1,2	1,7	
	CV	0,9%	3,6%	4,0%	2,7%	5,8%	3,8%	7,2%	11,7%	9,1%	15,0%	
HPV16	MW	2344,0	1089,8	434,7	169,0	63,5	32,0	18,7	15,7	15,7	16,3	14,3
	SD	75,4	58,4	27,2	1,1	5,5	4,3	0,2	0,5	2,1	1,2	
	CV	3,2%	5,4%	6,3%	0,6%	8,6%	13,5%	1,3%	3,0%	13,1%	7,6%	
HPV18	MW	9475,5	4893,0	2049,0	734,0	267,3	114,5	42,7	26,2	18,3	13,3	13,3
	SD	1172,7	185,4	178,1	10,1	9,9	2,3	4,7	2,7	2,1	0,9	
	CV	12,4%	3,8%	8,7%	1,4%	3,7%	2,0%	11,0%	10,4%	11,2%	7,1%	
HPV31*	MW	18,3	20,5	16,5	18,3	15,5	13,3	14,0	13,7	14,5	12,3	14,7
	SD	2,1	3,5	2,3	1,7	2,3	0,5	2,2	0,9	1,5	1,2	
	CV	11,2%	17,2%	13,8%	9,3%	14,7%	3,5%	15,4%	6,9%	10,2%	10,1%	
HPV45-E7	MW	1089,8	548,5	234,3	91,0	35,3	20,2	14,2	12,3	14,3	12,0	14,0
	SD	55,1	19,7	23,1	7,3	1,2	0,2	0,6	0,5	0,5	1,6	
	CV	5,1%	3,6%	9,9%	8,1%	3,5%	1,2%	4,4%	3,8%	3,3%	13,6%	
HPV59	MW	2564,8	1026,3	424,2	156,2	60,8	30,0	17,2	14,3	15,0	13,3	13,0
	SD	169,7	55,7	18,9	4,3	2,7	0,8	1,6	1,9	0,8	0,9	
	CV	6,6%	5,4%	4,5%	2,8%	4,5%	2,7%	9,6%	13,2%	5,4%	7,1%	
HPV6*	MW	20,0	19,0	17,3	14,2	14,0	12,7	12,0	11,7	12,8	12,8	14,0
	SD	0,4	2,9	1,7	1,8	1,6	0,5	0,4	1,9	0,8	1,5	
	CV	2,0%	15,5%	9,8%	13,0%	11,7%	3,7%	3,4%	16,2%	6,6%	12,0%	
HPV68	MW	16820,7	12090,5	5299,0	2007,8	733,3	277,2	104,7	43,2	25,3	15,3	14,0
	SD	2260,6	442,7	326,7	31,6	42,9	10,3	7,8	3,0	2,1	0,5	
	CV	13,4%	3,7%	6,2%	1,6%	5,8%	3,7%	7,5%	6,8%	8,1%	3,1%	

MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, CV = Variationskoeffizient, HPV = Humaner Papillomvirus

* Diese HPV Typen waren nicht enthalten: 6 und 31 (grau)

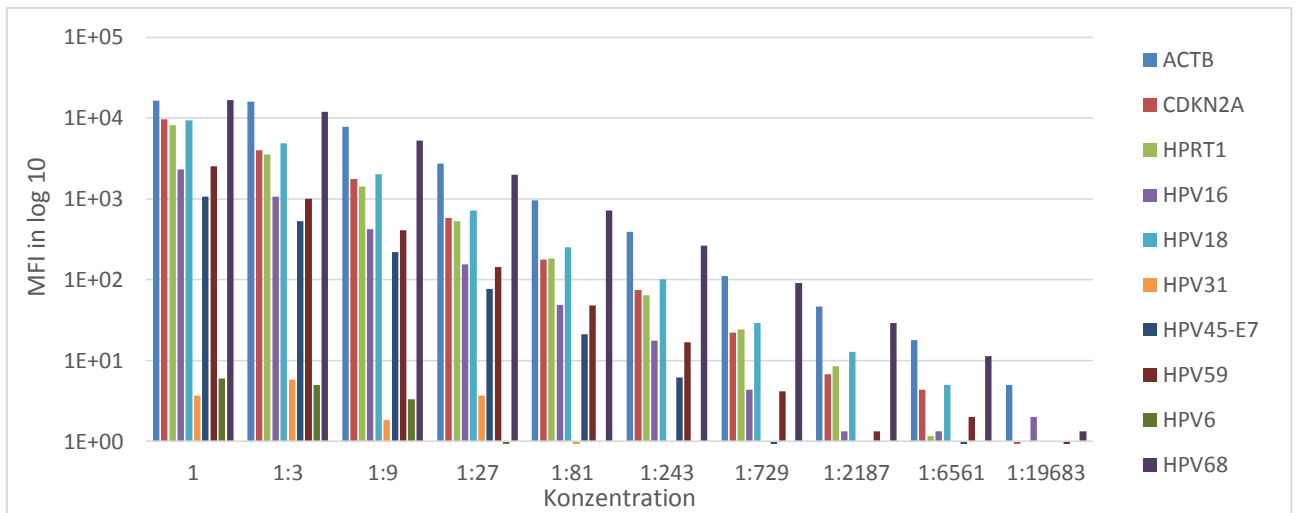


Abbildung 4: Titration des HPV-Zelllysatsmixes. Logarithmische Darstellung der Messwerte für die target mRNAs bei absteigender Konzentration des eingesetzten Zelllysats bei 1:3 Verdünnungsschritten abzüglich des Leerwertes. Nicht enthalten waren die HPV-Typen 6 und 31. Zu erkennen ist, dass bei linear absteigender Konzentration bis zu einer Konzentration von 1:243, jeder enthaltene HPV-Typ und die drei zellulären Referenzgene ein positives Signal zeigen. *MFI = mean fluorescence intensity*, *ACTB = Actin β* , *HPV = Humanes Papillomavirus*

Tabelle 11: MFI-Werte der HPV-negativen C33a Zellprobe in absteigender Konzentration.

Analyt		Verdünnung										Leerprobe (MW)
		1	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243	1:729	1:2187	1:6561	1:19683	
ACTB	MW	11803,8	4731,8	1449,8	524,7	190,7	75,8	37,5	20,3	18,0	14,3	14,2
	SD	970,0	494,0	119,1	18,8	8,6	3,9	2,5	1,9	1,4	0,5	
	CV	8,2%	10,4%	8,2%	3,6%	4,5%	5,1%	6,6%	9,3%	7,9%	3,3%	
CDKN2A	MW	7214,8	2829,8	888,5	312,5	122,3	46,8	25,3	17,7	14,0	12,7	13,3
	SD	759,6	271,1	43,5	16,1	11,3	2,0	3,1	3,3	1,6	0,9	
	CV	10,5%	9,6%	4,9%	5,2%	9,2%	4,3%	12,2%	18,7%	11,7%	7,4%	
HPRT1	MW	2631,3	940,3	338,0	129,3	57,7	23,3	16,3	13,3	11,7	11,3	12,5
	SD	209,1	59,8	6,4	4,0	4,7	0,9	1,2	2,5	1,7	0,9	
	CV	7,9%	6,4%	1,9%	3,1%	8,2%	4,0%	7,6%	18,7%	14,6%	8,3%	
HPV16	MW	24,5	17,7	18,5	16,7	15,3	14,8	13,7	15,0	13,7	13,7	14,3
	SD	1,2	1,2	0,7	0,9	0,9	0,2	0,5	1,4	1,7	1,9	
	CV	5,0%	7,1%	3,8%	5,7%	6,1%	1,6%	3,4%	9,4%	12,4%	14,1%	
HPV18	MW	19,0	17,7	16,3	15,3	15,7	15,3	13,8	15,2	15,0	13,3	13,3
	SD	1,1	3,3	1,2	1,2	0,5	0,9	1,3	2,1	1,4	0,9	
	CV	5,7%	18,7%	7,6%	7,7%	3,0%	6,1%	9,5%	13,8%	9,4%	7,1%	
HPV31	MW	19,2	16,8	17,0	17,0	15,8	13,2	13,7	15,3	14,0	12,8	14,7
	SD	2,7	2,1	1,1	2,7	1,2	0,2	1,2	2,5	0,8	0,2	
	CV	13,9%	12,4%	6,4%	15,7%	7,4%	1,8%	9,1%	16,3%	5,8%	1,8%	
HPV45-E7	MW	144,5	51,3	22,3	15,5	14,3	12,2	12,5	12,3	12,7	12,2	14,0
	SD	18,4	7,6	0,5	1,2	0,5	0,6	0,4	1,7	0,9	1,0	
	CV	12,8%	14,8%	2,1%	7,9%	3,3%	5,1%	3,3%	13,8%	7,4%	8,4%	
HPV59	MW	18,7	16,7	15,3	14,0	13,7	12,8	12,7	12,7	12,7	11,3	13,0
	SD	4,7	1,7	1,2	0,8	0,9	0,6	0,2	1,2	0,5	0,5	
	CV	25,2%	10,2%	8,1%	5,8%	6,9%	4,9%	1,9%	9,8%	3,7%	4,2%	
HPV6	MW	18,3	16,2	16,3	14,3	14,8	12,3	12,7	12,2	13,0	12,3	14,0
	SD	1,4	1,2	0,5	0,9	1,4	1,2	0,5	0,2	2,4	1,2	
	CV	7,8%	7,3%	2,9%	6,6%	9,7%	10,1%	3,7%	1,9%	18,8%	10,1%	
HPV68	MW	20,3	17,3	17,3	14,8	14,2	13,2	12,0	15,5	13,5	12,0	14,0
	SD	3,1	2,1	1,2	0,6	0,6	0,8	0,0	1,8	1,1	0,8	
	CV	15,2%	11,9%	7,2%	4,2%	4,4%	6,5%	0,0%	11,5%	8,0%	6,8%	

MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, CV = Variationskoeffizient, HPV = Humaner Papillomvirus

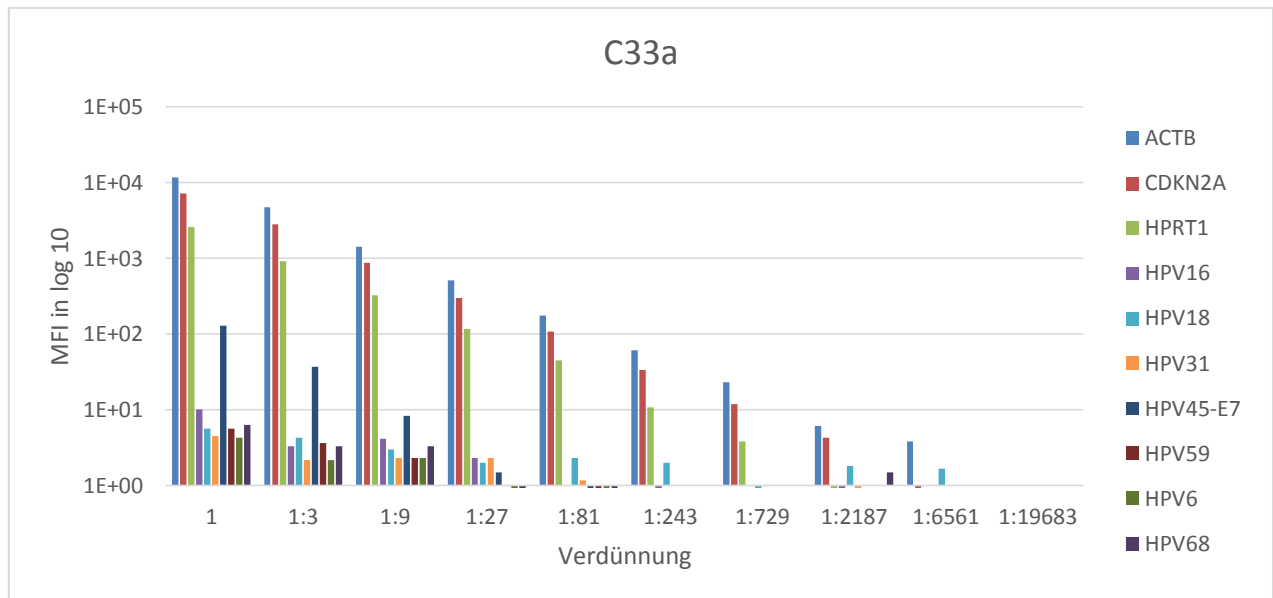


Abbildung 5: Titration der HPV-negativen Karzinomzellen C33a. Logarithmische Darstellung der Messwerte für die Ziel mRNAs in absteigender Konzentration des eingesetzten Zelllysats bei 1:3 Verdünnungsschritten abzüglich des Leerwertes. Zu erkennen ist, dass bei linear absteigender Konzentration bis zu einer Konzentration von 1:243 (ca. 165 HPV-negative Zellen) die drei zellulären Marker ein positives Signal (≥ 10 MFI) zeigen, ACTB sogar bis zu einer Verdünnung von 1:6561. Bis zu 1:27 zeigen mehrere HPV-Typen ein schwaches Signal, welches, mit Ausnahme von HPV45, als unspezifisches Hintergrundsignal gewertet werden kann. HPV45 zeigt einen vergleichsweise hohen Wert, der jedoch ebenfalls ab einer Konzentration von 1:27 verschwindet. Ab dann taucht in insgesamt 4 Titrationstufen ein schwaches, nicht durchgängig nachweisbares, HPV18 Signal auf. Ansonsten sind für die HPV Sonden keine störenden, unspezifischen Reaktionen mit zellulären mRNAs zu beobachten.

MFI = mean fluorescence intensity, ACTB = Actin β , HPV = Humanes Papillomavirus

Wie man den Tabellen (10, 11) und Abbildungen (4, 5) entnehmen kann, führen alle in der Probe enthaltenen HPV-Typen, also 16, 18, 45, 59 und 68 korrekt zu einem positiven Signal (hier noch definiert als MFI-Wert ≥ 10 über dem des Leerwertes, da Nachweisgrenze noch nicht bestimmt) und werden dadurch identifiziert. Die Werte aller enthaltenen Typen liegen bei einer Verdünnung von 1:243 (ca. 33 HPV infizierte Zellen/Typ) noch ausreichend über denen des Leerwertes, wohingegen die beiden nicht enthaltenen Typen HPV6 und 31 ab einer Verdünnung von 1:243 (ca. 33 HPV infizierte Zellen/Typ) unter dem jeweiligen Leerwert liegen, somit per definitionem als negativ gewertet werden können (siehe Tab. 10).

Die MFI der jeweiligen HPV-Typen fällt jedoch unterschiedlich stark aus. So liegt sie für den HPV-Typen 18 und besonders 68 bei einer Verdünnung von 1:243 deutlich mehr über dem Mittelwert der Leerprobe als bei den ebenfalls enthaltenen Typen 16, 45 und 59.

Die HPV-negative Probe C33a weist lediglich ein erhöhtes Signal für HPV45 bis zu einer Verdünnung von 1:9 (ca. 4.400 Zellen) auf, fällt dann aber in der weiteren Titration auf ein vergleichbar niedriges Niveau wie die anderen nicht enthaltenen HPV-Typen ab. Sonst weist kein

HPV – Typ in der Negativprobe so hohe Werte auf. Verglichen mit dem Leerwert liegen jedoch alle HPV – Signale zunächst leicht über dem Leerwert, fallen dann aber während der Titration bis um den Leerwert ab. Der unspezifische Hintergrund für HPV45 liegt damit bis zu einer Verdünnung von 1:9 deutlich höher als derjenige der anderen nicht enthaltenen Typen in der Negativprobe (siehe Tab. 11), was für eine Kreuzreaktion der verwendeten Sonde sprechen könnte. Eine mögliche Kreuzreaktion der verwendeten Sonden mit unterschiedlichen HPV-Typen wird im Folgenden noch ausgeschlossen.

Im Folgenden veranschaulicht Abbildung 6 A-D die Differenz zwischen negativer (HPV-negative Zelllinie) und positiver (Mix aus 5 verschiedenen HPV-positiven Zellen) Probe exemplarisch an den Titrationsstufen 1:9, 1:243, 1:729 und 1:19683 (rechnerisch ca. 889, 33, 11 und 0 HPV-positive Zellen je Typ).

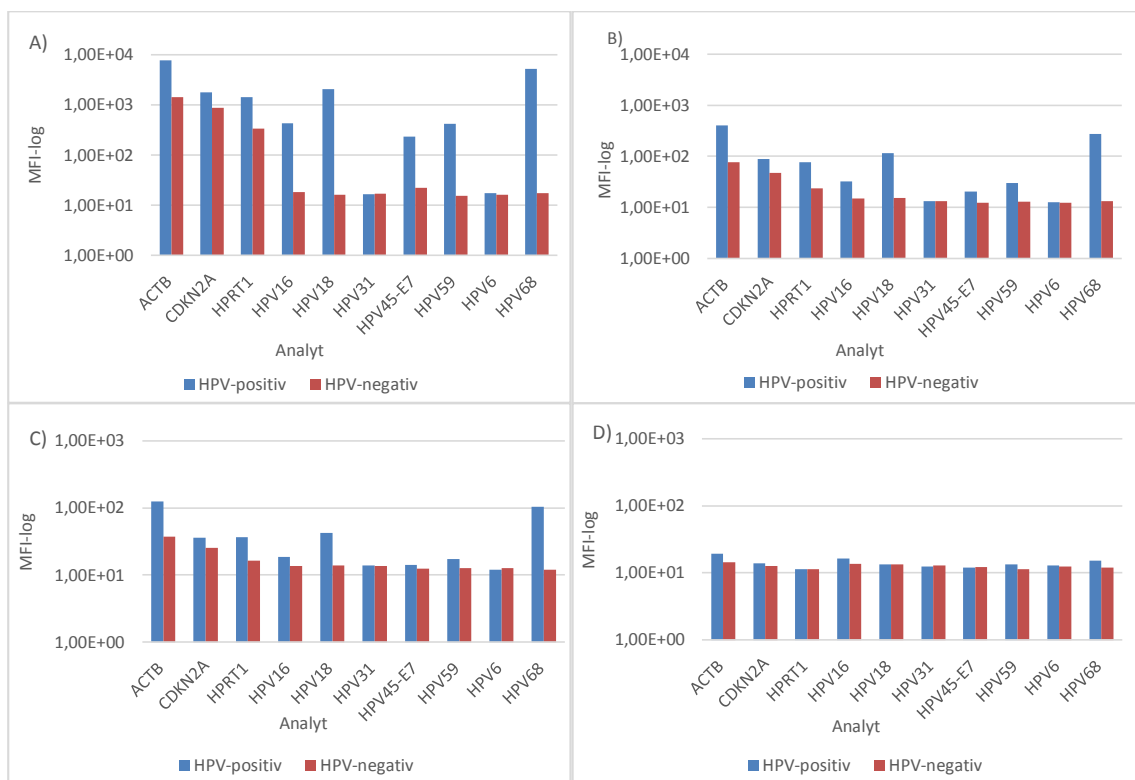


Abbildung 6 (A-D): Logarithmische Darstellung der MFI-Werte der HPV-negativen und -positiven Karzinomzelllinien für die jeweiligen Analyten im Vergleich in vier verschiedenen Konzentrationen: A) 1:9 (889 Zellen), B) 1:243 (33 Zellen), C) 1:729 (11 Zellen), D) 1:19683 (0 Zellen). Nicht enthalten waren Zellen mit Infektion durch HPV 31 und 6.

Vergleicht man die MFI-Werte der logarithmischen Darstellung der Positiv- und die der Negativ-Kontrolle bis zu einer Verdünnung von 1:729 (siehe Abb. 6C), so erkennt man am Beispiel von HPV 18 einen Unterschied der MFI von einer halben log-Stufe. Somit hat man sogar bei einer Anzahl von ca. 11 HPV 18 positiven Zellen für einzelne HPV-Typen immer noch ein deutlich

höheres Ergebnis. Bei dieser Verdünnung lässt sich bei den enthaltenen HPV-Typen stets ein höheres Signal in der HPV-positiven Probe erkennen, welches jedoch für einige Typen sehr knapp ausfällt. Es lassen sich sogar bei einer geschätzten Zellzahl von Null in den HPV-positiven Proben teilweise noch leicht höhere MFI-Werte erkennen, wenngleich hier als Nachweisgrenze lediglich der gemittelte Wert der im selben Durchlauf gemessenen drei HPV-negativen C33a-Proben verwendet wird. Durchweg deutliche Unterschiede zwischen Positiv- und Negativprobe lassen sich bei einer Verdünnung von 1:243 (ca. 33 Zellen, Abb. 6 B) erkennen. Für eine Gesamtübersicht ist die Differenz der MFI-Werte von HPV-positiver und –negativer Probe für alle Analyten in allen Titrationsstufen in der folgenden Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Differenz der HPV-negativen C33a Probe zur HPV-positiven-Probe für alle enthaltenen Analyten für jede Titrationsstufe [(HPV-positiv) – (HPV-negativ)].

	ACTB	CDKN2A	HPRT1	HPV16	HPV18	HPV45	HPV59	HPV68
1	4828,7	2543,5	5642,7	2319,5	9456,5	945,3	2546,2	16800,3
1:3	11385,8	1203,7	2606,3	1072,2	4875,3	497,2	1009,7	12073,2
1:9	6400,7	879,5	1110,5	416,2	2032,7	212,0	408,8	5281,7
1:27	2228,8	284,2	416,7	152,3	718,7	75,5	142,2	1993,0
1:81	782,5	69,8	138,7	48,2	251,7	21,0	47,2	719,2
1:243	328,8	41,7	53,0	17,2	99,2	8,0	17,2	264,0
1:729	87,5	10,3	20,3	5,0	28,8	1,7	4,5	92,7
1:2187	40,3	2,5	7,7	0,7	11,0	0	1,7	27,7
1:6561	14,0	3,7	2,0	2,0	3,3	1,7	2,3	11,8
1:19683	4,8	1,2	0,0	2,7	0	0	2,0	3,3

Nicht enthalten waren HPV 6 und 31. Die Differenz ist in MFI angegeben. Ergebnisse ≤ 0 werden mit 0 angegeben.

Wie man erkennen kann, ist sogar bei einer Verdünnung von 1:729 (ca. 11 Zellen) noch ein in Relation höherer Wert von HPV-mRNA in der HPV-positiven Probe zu erkennen, jedoch mit unterschiedlich starker Ausprägung, wie bereits in Tabelle 10 zu erkennen war.

Die Referenzgene weisen im Vergleich zwischen HPV – positiver und –negativer Probe insgesamt hohe Unterschiede auf.

Die E7 mRNA – Werte für die enthaltenen HPV-Typen liegen bis zu einer Verdünnung von 1:6561 in der Positivprobe stets über denen der Negativprobe (siehe Tab. 12). Die Werte der nicht enthaltenen HPV-Typen 6 und 31 zeigen konstant eine sehr geringe Differenz zwischen HPV – positiver und –negativer Probe mit nur geringer Schwankung.

4.1.2 Einzelnachweis der verschiedenen HPV-Transkripte (Ausschluss von Kreuzreaktionen)

Damit eine Kreuzreaktion zwischen den einzelnen Gensonden ausgeschlossen werden kann, wurden im folgenden Experiment 9 verschiedene Zelllinien getrennt voneinander in einem

Durchgang gemessen. Davon waren 7 HPV-positiv (HeLa, CaSki, MRHI-215, ME 180, Erin59 [kultivierte Zellen]; HPV6 und 31 [Patientinnenproben, da keinen Zelllinie vorhanden]) und zwei HPV negativ (Human: C33a, nicht human: NIH-3T3). In jedem Ansatz waren ca. 4.000 Zellen enthalten ($4 \cdot 10^3/40\mu\text{l}$). Die Ergebnisse sind in Abb. 7 dargestellt. Es handelt sich um die Mittelwerte aus $n = 3$ Messungen abzüglich des Leerwertes.

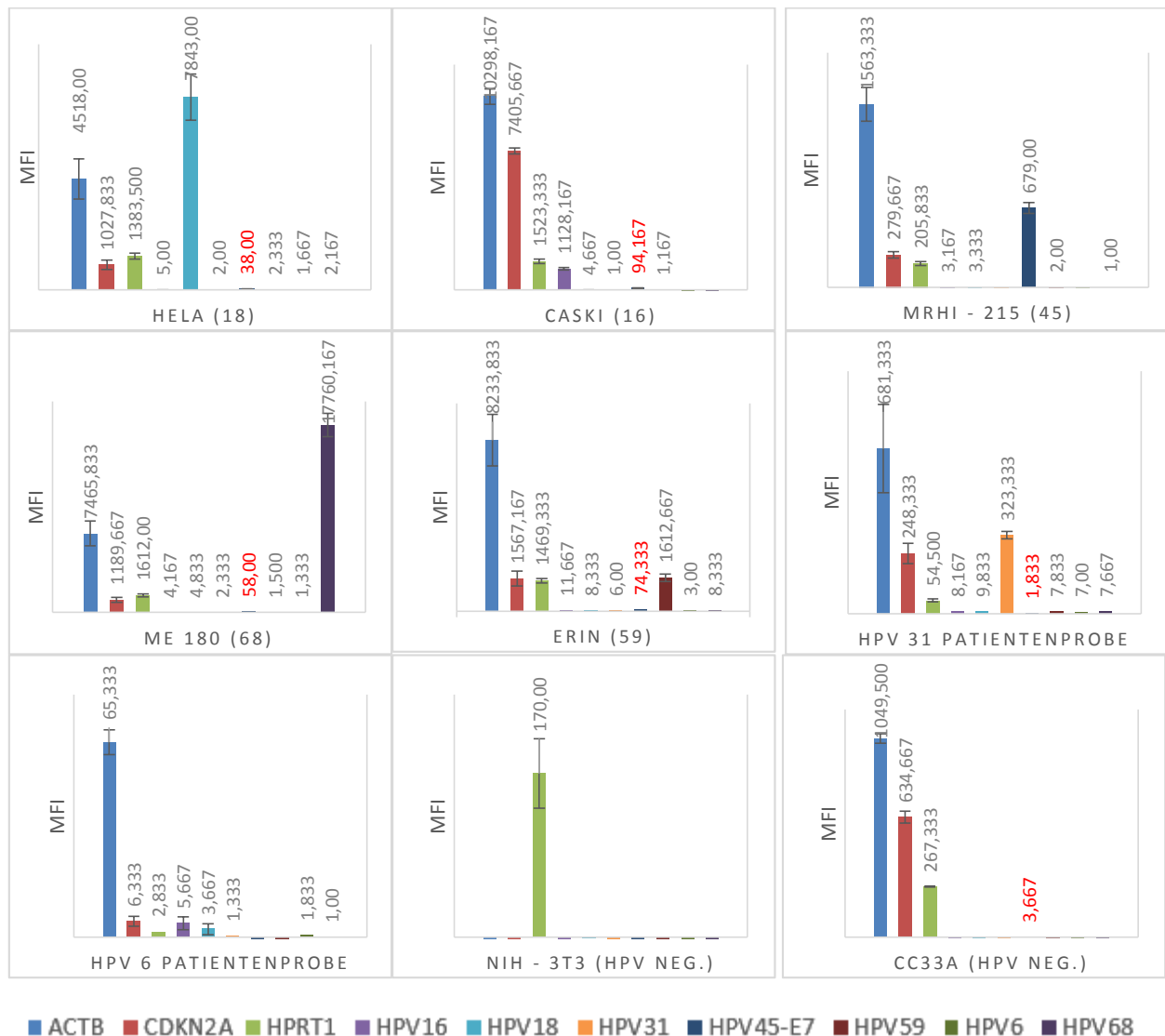


Abbildung 7: Ergebnisse der Einzelnachweise für jeden durch das QG-HPV V1 Assay nachweisbaren HPV-Typ zum Ausschluss von Kreuzreaktivität. Mittelwerte von $n = 3$ Messungen der verschiedenen Karzinomzelllinien mit einfacher SD (± 1 SD) abzüglich des Leerwertes. Sechs davon sind HPV-positiv [HeLa, CaSki, MRHI-215, ME 180, Erin, Patientinnenprobe für HPV 31 und 6] und zwei HPV-negativ [NIH-3T3, C33a]. Deutlich zu erkennen ist der unspezifische Hintergrund für HPV 45 in den dafür eigentlich negativen Proben für HPV 18, 16, 68 und 59 und sogar in der HPV-Negativprobe mit CC33a-Zellysate (rot). Mit Ausnahme der HPV 6-Probe fällt jedoch der Wert für den enthaltenen HPV-Typ in den positiven Proben deutlich höher aus. Mit Ausnahme des Signals für HPV 45 in der CC33a-Probe, zeigen auch die Negativproben kein signifikantes Signal für sämtliche detektierbaren HPV-Typen.

Wie bereits im Vorexperiment werden die einzelnen HPV-Typen in den HPV positiven Zellen richtig erkannt. Bei einer HPV positiven Zellzahl von ca. 4.000 wurden die einzelnen HPV-Typen, mit Ausnahme von HPV45, nur in der jeweils für sie positiven Probe gemessen. In der HPV-negativen Zelllinie C33a werden die zellulären Marker ACTB, p16 und HPRT1 nachgewiesen und in den nicht-humanen 3T3-Zellen lediglich eine geringe Menge des Referenzgens HPRT1. Die jeweils in der Probe vorhandenen HPV-Typen weisen mit Ausnahme der Probe für HPV6 immer das signifikant höchste detektierbare Signal auf (siehe Abb. 7).

Die Streuung der Werte liegt für jeden HPV-Typ (exklusive HPV6) unter einem CV von 15% und damit unter dem Soll-Wert. Für die HPV-Typen 16, 31, 45 und 68 liegt der CV unter 10%.

Auffällig ist das Vorkommen eines relativ geringen aber deutlichen Wertes an HPV45 E7 mRNA in den HPV positiven Proben für HPV16, 18, 59, 68 und der HPV-negativen C33a Probe.

Die HPV6-Sonde zeigt insgesamt nur sehr schwache Signale für HPV-mRNA. Es wird zwar auch ein sehr schwaches Signal für HPV6 gemessen (ca. 1,8 MFI), doch sind die Hintergrundsignale für die nicht vorhandenen HPV-Typen 16 und 18 deutlich stärker. Da jedoch alle in der HPV6-Probe gemessenen Werte nur sehr niedrig sind, wird diese Probe als HPV-negativ gewertet.

4.1.3 Definition der Nachweisgrenze für eine Positivität

Zur Erfassung des Grenzwertes wurde eine Stichprobe mit 12 voneinander unabhängigen Leermessungen (Messung ohne enthaltenen Analyt) mit dem Assay durchgeführt. Jede Messung wurde mit drei Leerproben durchgeführt (also insgesamt 36 Messungen). Die Leerproben wurden wie unter Punkt 3.3.4.1 beschrieben vorbereitet, mit dem Unterschied, dass statt Zellysats reiner vLys hinzugegeben wurde. Die Nachweisgrenze wurde definiert als:

$$MW + 3 * SD = LOD$$

MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, LOD = Nachweisgrenze (Limit of Detection)

Alles was darüber liegt, kann als positiv gewertet werden, eignet sich jedoch noch nicht für quantitative Aussagen. Für jede Messung (triplets) wurde der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Anschließend wurde der Mittelwert aller Mittelwerte und der jeweiligen SD's berechnet, um letztendlich daraus den LOD zu bestimmen.

Tabelle 13 zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der Leerwerte für jede der im Test enthaltenen Sonden (HPV - E7 mRNA, ACTB, HPRT1 und CDKN2A) aus einer Stichprobe von 12 unabhängigen Messungen und die daraus errechnete Nachweisgrenze.

Tabelle 13: Mittelwerte und Standardabweichung zur Berechnung des LOD für alle nachweisbaren Transkripte aus 12 unabhängigen Messungen.

	MFI	ACTB	CDKN2A	HPRT1	HPV16	HPV18	HPV31	HPV45	HPV59	HPV6	HPV68
Messung A	MW	8,3	9,7	9,0	7,5	10,3	8,7	10,7	10,3	16,0	13,7
	SD	1,2	1,2	0,0	0,9	1,5	0,6	0,6	1,2	1,0	1,5
Messung B	MW	11,8	10,7	10,5	10,0	12,3	9,0	9,5	10,5	16,3	15,0
	SD	1,3	0,6	3,0	2,7	1,5	1,3	0,9	1,8	2,9	1,0
Messung C	MW	10,0	8,5	10,5	5,5	8,0	7,8	7,5	8,5	18,3	14,8
	SD	2,0	2,5	1,0	0,5	0,0	0,8	1,5	1,5	1,3	1,3
Messung D	MW	5,2	5,8	7,2	3,7	9,7	6,2	7,2	8,2	15,8	17,7
	SD	0,8	2,5	2,4	0,2	2,9	1,8	4,1	3,1	1,4	5,4
Messung E	MW	5,3	6,2	7,0	7,0	7,2	8,8	5,2	10,3	8,3	5,5
	SD	1,9	1,6	1,6	2,4	0,8	2,3	1,0	2,5	1,9	3,1
Messung F	MW	12,2	16,0	22,0	9,0	8,2	13,7	11,5	9,0	16,5	8,3
	SD	2,1	4,9	5,1	4,4	0,6	10,2	2,3	1,4	18,1	1,6
Messung G	MW	6,0	10,7	6,8	5,7	5,8	6,5	6,7	6,7	16,0	15,0
	SD	2,2	0,6	1,6	0,9	1,0	0,7	1,9	0,6	0,8	2,4
Messung H	MW	14,2	13,3	12,5	14,3	13,3	14,7	14,0	13,0	14,0	14,0
	SD	0,6	0,9	0,4	0,9	0,5	0,5	0,8	0,8	1,4	0,8
Messung I	MW	5,0	6,0	7,0	6,7	5,0	5,3	7,0	5,0	6,0	5,0
	SD	1,2	0,8	0,0	0,9	0,8	0,9	0,8	0,7	1,4	0,8
Messung J	MW	5,2	7,3	8,0	6,2	9,0	5,5	7,3	7,5	16,3	13,2
	SD	1,9	1,7	2,8	1,5	2,2	1,2	0,9	1,1	0,9	1,8
Messung K	MW	7,7	7,2	10,3	6,5	7,0	6,7	6,0	8,0	7,0	6,2
	SD	0,9	1,0	0,5	0,4	0,8	0,5	0,8	0,8	0,0	0,2
Messung L	MW	10,2	9,3	7,7	7,0	9,0	7,2	7,7	9,7	16,2	16,3
	SD	0,2	0,9	0,5	0,8	0,0	0,2	0,9	1,7	1,3	0,9
	MW (insgesamt)	8,4	9,2	9,9	7,4	8,7	8,3	8,4	8,9	13,9	12,1
	SD	1,4	1,6	1,6	1,4	1,1	1,8	1,4	1,4	2,7	1,8
	LOD	12,5	14,1	14,6	11,6	11,9	13,6	12,5	13,2	22,0	17,3

Es handelt sich um Mittelwerte aus Messungen von Triplikaten. MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, LOD (limit of detection) = Nachweisgrenze, HPV = humaner Papillomvirus

Der höchste gemessene Grenzwert beträgt 22 MFI für HPV6. Signale, die kleiner als die hier festgelegte Nachweisgrenze sind, eignen sich nicht für quantitative und qualitative Aussagen über den jeweiligen Analyten und werden deshalb als negativ bewertet.

Um den ermittelten Grenzwert für die Diskriminierung von enthaltenen und nichtenthaltenen HPV-Typen bei möglichst niedrigen Konzentrationen zu überprüfen, wurde die HPV-positive Messung bei einer Verdünnung von 1:243 und 1:729 (ca. 33 und 11 HPV-positive Zelle/HPV-Typ) von Punkt 4.1.1 der berechneten Nachweisgrenze im Vergleich gegenübergestellt. Idealerweise sollten die Werte der HPV-positiven Probe, mit Ausnahme der beiden nicht enthaltenen Typen 6

und 31, oberhalb des LOD liegen, die beiden nicht enthaltenen Typen (6 und 31) darunter. Zusätzlich wurde die Erfassungsgrenze berechnet.

$$EG = MW + 6 * SD$$

EG = Erfassungsgrenze

Sie gilt in der Analytik als ausreichend sicher, um auch eine Aussage über den Gehalt einer Probe (Quantifizierung) treffen zu können. Während das LOD die technisch mögliche, minimalen Messgrenze des Assays darstellt (ist der Analyt in der Probe vorhanden Ja/Nein), ist die EG der Wert, ab dem auch eine Bestimmung der Menge des vorhandenen Analyten möglich ist (Quantifizierung und Qualifizierung) (70). Sie eignet sich daher, um eine bessere Einschätzung der Messergebnisse bezogen auf eine spätere klinische Anwendung zu bekommen, in der die Probe sowohl quantifiziert, als auch qualifiziert werden soll. In Tab. 14 werden die Messwerte der errechneten Nachweisgrenze und der Erfassungsgrenze gegenübergestellt.

Tabelle 14: Exemplarische Gegenüberstellung von HPV positiver Probe (Typ 16, 18, 45 und 68) in der Konzentration 1:243 und 1:729 (ca. 33 und 11 Zellen pro HPV-Typ) und der errechneten Grenzwerte (Nachweisgrenze und Erfassungsgrenze).

Konzentration	ACTB	CDKN2A	HPRT1	HPV16	HPV18	HPV31	HPV45	HPV59	HPV6	HPV68
HPV-Mix (1:243)	404,7	88,5	76,3	32,0	114,5	13,3	20,2	30,0	12,7	277,2
HPV-Mix (1:729)	125,0	35,7	36,7	18,7	42,7	14,0	14,2	17,2	12,0	104,7
LOD	12,5	14,1	14,6	11,6	11,9	13,6	12,5	13,2	22,0	17,3
EG	16,6	18,9	19,4	15,8	15,1	18,9	16,7	17,5	30,1	22,6

Alles unterhalb des LOD gilt als negativ, Werte darüber als positiv. Die unterhalb des LOD liegenden MFI-Werte sind in der Tabelle rot markiert. Werte die über der EG liegen gelten zusätzlich als quantifizierbar. Alle Werte sind in MFI-Einheiten angegeben. Nicht enthalten sind die HPV-Typen 31 und 6. HPV = humane Papillomaviren, LOD = Nachweisgrenze, EG = Erfassungsgrenze, ACTB = Actin β

Bis zu einer Verdünnung von 1:243 (ca. 33 Zellen pro HPV-Typ) liegen alle enthaltenen HPV-Typen oberhalb, alle nicht enthaltenen HPV-Typen (HPV 31 und 6) unterhalb der gemittelten Nachweisgrenze und der Erfassungsgrenze. Sie werden somit korrekt angezeigt. Bei einer Verdünnung von 1:729 (ca. 11 Zellen/HPV-Typ) werden durch das LOD alle enthaltenen HPV-Typen korrekt angezeigt, jedoch wird HPV31 knapp falsch positiv gemessen. Bei Anwendung der EG gibt es zwar keinen falsch-positiven Wert mehr, dafür werden aber die enthaltenen HPV-Typen 45 und 59 falsch- negativ angezeigt. Somit lässt sich die Probe bis zu einer Verdünnung von 1:243 für alle Werte korrekt quanti- und qualifizieren.

4.2 Bestimmung der Assay Präzision

Als Maß für die Robustheit des QG-HPV V1 Assays wurden in den folgenden Versuchen die Inter- und Intra-Assay Variation, sowie die Inter-Observer Variation bestimmt. Dies soll der Einschätzung der Reproduzierbarkeit der einzelnen Messergebnisse dienen.

Als zu messende Probe wurde für die Inter- und Intra-Assay Variation ein Mix aus den fünf kultivierten Zelllinien HeLa (HPV 18+), CaSki (HPV 16+), MRHI-215 (HPV 45+), ME 180 (HPV 68+) und Erin (HPV 59+) hergestellt. Es wurde Zelllysats für insgesamt 8 Messungen bereitgestellt. Bei einem benötigten Gesamtvolumen von 40 µl/Well wurden also 400 µl a 80 µl von jedem HPV positivem Zelllysats, also ca. 80.000 Zellen je Zelllinie, bereitgestellt (6 für den Intra-, weitere 2 für den Inter- Assay Versuch). Davon wurden 320 µl verwendet. Somit befanden sich ca. 8 000 Zellen jeder Zelllinie in jedem Well.

4.2.1 Intra-Assay Variation

Für den Intra-Assay Versuch wurden je 40 µl der Probe in 6 verschiedene Wells (Replikate) einer Microtiter-Platte aufgetragen, das Assay nach Standardprotokoll durchgeführt (siehe Punkt 3.3.4.1) und anschließend alle Replicate zusammen gemessen. Die ermittelten Werte samt Mittelwerten, Standardabweichung und Variationskoeffizienten sind in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Ergebnisse des Intra-Assay-Vergleiches mit 6 verschiedenen Proben (P1-P6).

	ACTB	CDKN2A	HPRT1	HPV16	HPV18	HPV45	HPV59	HPV68
P1	27281	22878	16774	4154	25135,5	5375	2414	18299
P2	25495,5	23367	16272	3928	24313,5	5934,5	2422	18193
P3	25872	20939	15861	4175,5	24275	6312,5	2522	20679,5
P4	24554	18469,5	13542	3815,5	24278	5010,5	2016,5	17073
P5	24322,5	17528	12568	3801	24090	5711	2219,5	15069
P6	22168,5	18822,5	13903	3895	21808	5203,5	2171,5	15835,5
MW	24948,9	20334	14820	3961,5	23983,3	5591,2	2294,3	17524,8
SD	1574,2	2223,8	1557,6	150,3	1028,9	444,7	173,4	1829,7
CV	6,31%	10,94%	10,51%	3,79%	4,29%	7,95%	7,56%	10,44%

Mittelwert = MW; Standardabweichung = SD; Variationskoeffizienten = CV. Angegeben sind die MFI-Rohdaten mit Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizienten für die einzelnen Analyten. Das Ergebnis für ACTB und HPV18 ist nur eingeschränkt beurteilbar, weil die mRNA-Konzentration so hoch war, dass sie evtl. im Sättigungsbereich der Sonde lag.

Wenn man diese Werte graphisch darstellt, so wird deutlich, dass einige Werte im Verlauf von P1 – P6 linear abnehmen. Sie sind in der chronologischen Reihenfolge der Messung im Luminex geordnet. Die Datenpunkte mit Trendlinie sind in Abb. 8 zu sehen.

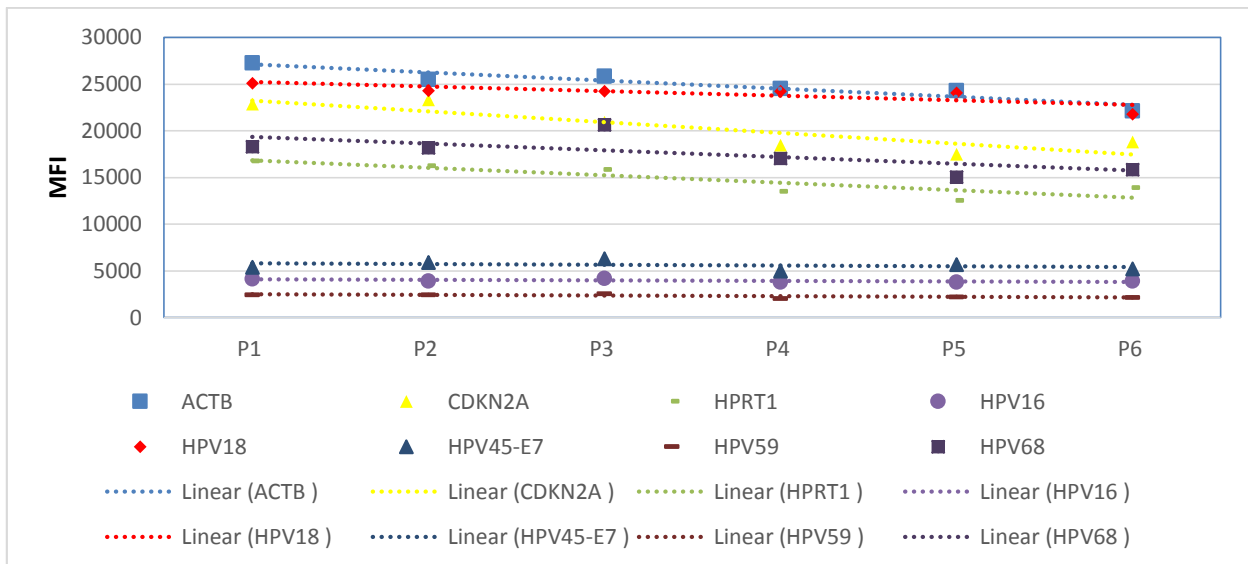


Abbildung 8: Lineare Darstellung des Intra-Assay Vergleiches.

Besonders betroffen sind die Referenzgene, CDKN2A sowie die HPV-Typen 18 und 68. Die anderen Typen zeigen hingegen keinen Abfall des Signals. Der Signalabfall scheint mit der absoluten Signalstärke zu korrelieren. Bei Signalen mit einem MFI < 6.000 lässt sich der lineare Abfall nicht beobachten. Der Variationskoeffizient der Daten bleibt jedoch für alle Analyten unter dem Soll-Wert von 15% (siehe Tab. 15).

Um einen genaueren Bezug zwischen enthaltener HPV mRNA und absoluter Zellmenge zu erhalten, wurden in der nächsten Abbildung (Abb. 9) alle Analyten auf das gleiche Referenzgen normalisiert. Dafür ausgewählt wurde im Folgenden Actin- β (ACTB), da es mit 6,31% den geringsten CV der beiden Referenzgene aufweist (siehe Tab. 15). Abbildung 9 zeigt die Streuung der sechs Messungen untereinander für die enthaltenen Transkripte nach Normalisierung auf das Referenzgen ACTB.

P1-P6	CDKN2	HPRT1	HPV 16	HPV 18	HPV 45	HPV 59	HPV 68
SD	0,06	0,04	0,01	0,03	0,02	0,01	0,05
CV	7,9%	7,4%	5,0%	2,8%	7,8%	6,0%	7,7%

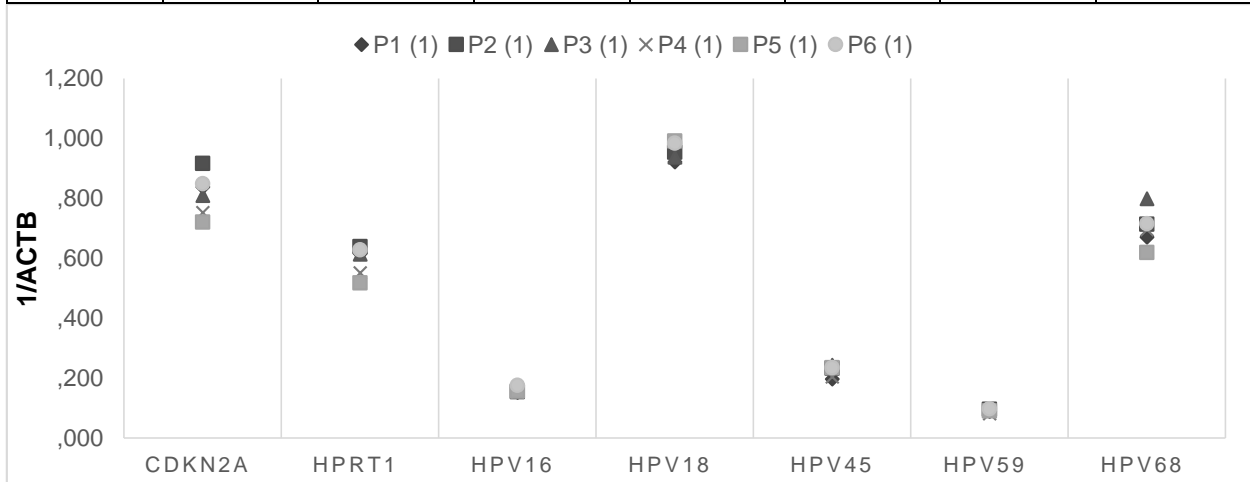
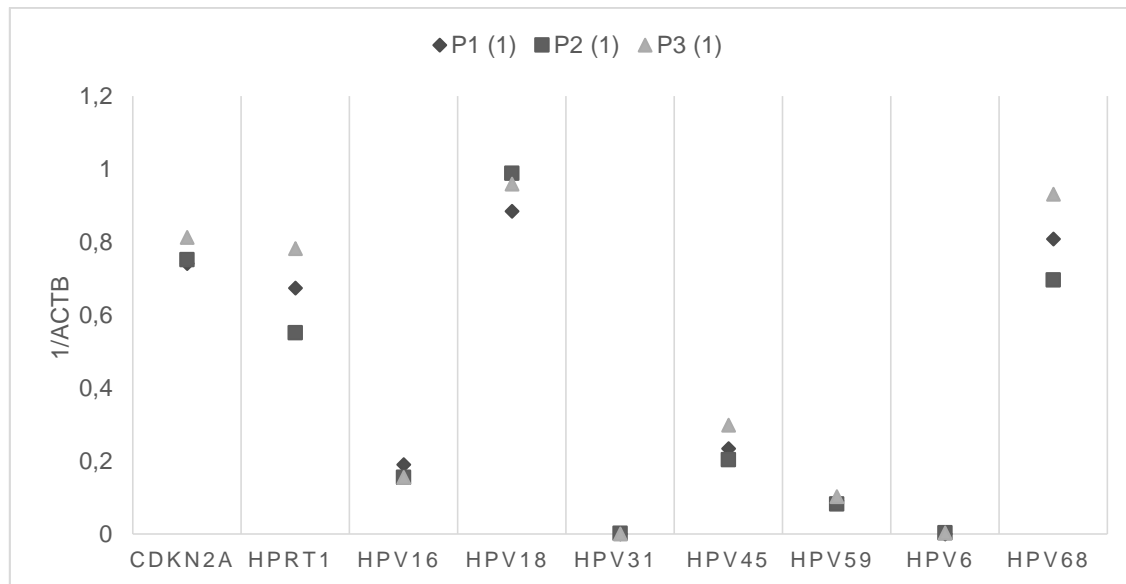


Abbildung 9: Darstellung der normalisierten Daten des Intra-Assay Vergleiches für die einzelnen Analyten (CDKN2A, HPRT1, HPV16, HPV18, HPV45, HPV59 und HPV68) mit Datenpunkten. Messergebnisse der Proben (P) 1-6 aus dem Intra-Assay-Versuch. Die Werte wurden auf ACTB normalisiert. Darüber sind die Standardabweichung (SD) und der Variationskoeffizient in Prozent (CV) der auf ACTB normalisierten Werte von P1-P6 angegeben.

Die größte Streuung zeigt sich bei CDKN2A mit einem CV von 7,9%. Den geringsten Wert zeigt HPV 18 mit einem CV von 2,8%. Insgesamt ist die Streuung der normalisierten Werte etwas geringer als bei den Rohdaten.

4.2.2 Inter-Assay Variation

Für den Inter-Assay Versuch wurde ein Teil der Probe an drei unterschiedlichen Tagen gemessen. Eine Messung stammt aus dem Intra-Assay Versuch, die beiden anderen wurden jeweils an den beiden folgenden Tagen gemessen. Bei dem Probenmaterial handelt es sich um das gleiche Material, welches schon zuvor beim Intra-Assay Versuch verwendet wurde. Dem entsprechend waren die HPV-Typen 16, 18, 45, 59 und 68 enthalten.



	CDKN2A	HPRT1	HPV16	HPV18	HPV45	HPV59	HPV68
SD	0,03	0,09	0,02	0,04	0,04	0,01	0,10
CV	4,1%	14,1%	9,9%	4,6%	16,1%	8,9%	11,8%

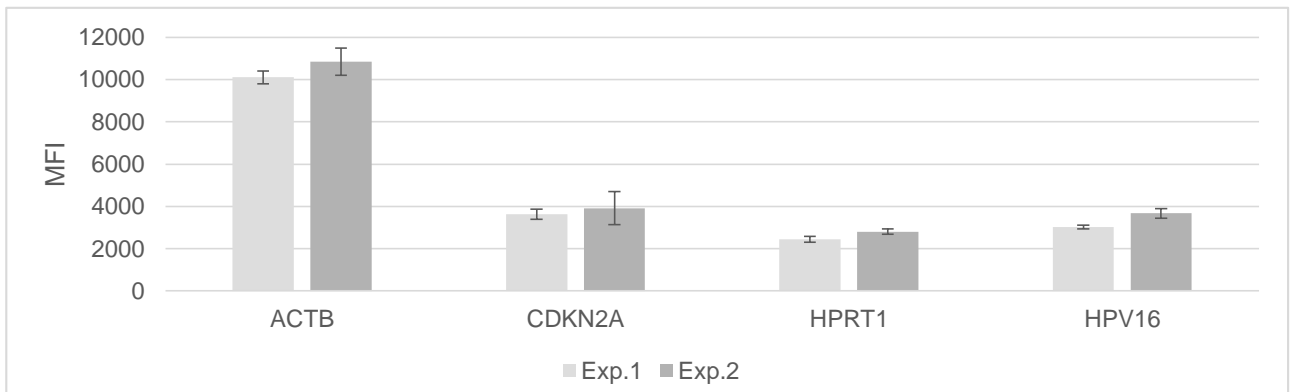
Abbildung 10: Inter-Assay-Vergleich. Darstellung von drei voneinander unabhängigen Messungen (P1-P3) für die enthaltene HPV mRNA und die Referenzgene HPRT1 und CDKN2A mit Datenpunkten, normalisiert auf das Referenzgen ACTB. Enthalten waren die HPV-Typen 16, 18, 45, 59 und 68. Die Standardabweichung und der Variationskoeffizient für die normalisierten, gemessenen Analyten sind darunter tabellarisch aufgelistet. SD = Standardabweichung, CV = Variationskoeffizient. HPV = humaner Papillomvirus.

Bis auf HPV45 bleibt der CV der drei Messungen für alle Analyten unter dem Soll-Wert von 15%. Im Vergleich zur Intra-Assay Varianz nimmt die Inter-Assay Varianz deutlich zu.

4.2.3 Interobserver Varianz

Zur finalen Bestätigung der generellen Funktionalität des QG-HPV V1 Assays wurde die Interobserver Varianz mit Hilfe technischer Replikate untersucht. Dazu wurde von zwei unterschiedlichen Experimentatoren (im Folgenden Experimentator 1 und 2 genannt) zu verschiedenen Zeitpunkten Messung der gleichen HPV16 positiven Probe durchgeführt. HPV16 positive Zellen wurden aus den begrenzten zur Verfügung stehenden HPV infizierten, kultivierbaren Zellen gewählt, da es sich um den mit am häufigsten vorkommenden hr-HPV-Typen bei intraepithelialen Neoplasien des Zervix uteri handelt und damit der Nachweis eine hohe Relevanz besitzt. Hierfür wurden von Experimentator 1 $n = 3$ und von Experimentator 2 $n = 4$ Ansätze mit je 4.000 CaSki (HPV16 pos.) Zellen aus der gleichen Probe angefertigt.

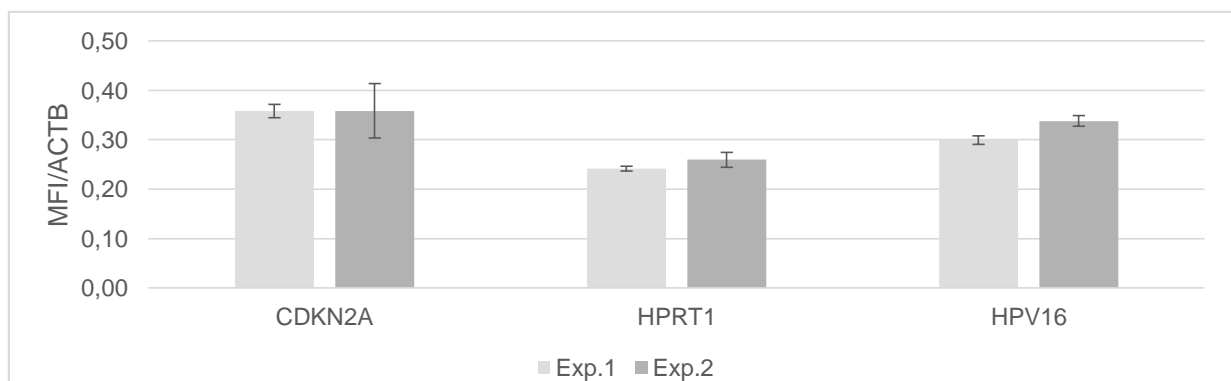
Die Rohdaten der Messung für die zellulären Marker ACTB, CDKN2A und HPRT1, sowie der HPV16 E7 mRNA werden in der folgenden Tabelle zusammengefasst.



	ACTB			CDKN2A			HPRT1			HPV16		
	MW	SD	CV	MW	SD	CV	MW	SD	CV	MW	SD	CV
Exp.1	10114	301	3,0%	3626	246	6,8%	2445	128	5,2%	3028	90,3	3,0%
Exp.2	10858	640	5,9%	3917	784	20,0%	2811	126	4,5%	3671	218	5,9%
Exp.1+Exp. 2	10486	372	3,5%	3772	146	3,9%	2628	183	7,0%	3349	321	9,6%

Abbildung 11: Interobserver Vergleich (Rohdaten). Gegenüberstellung der Mittelwerte der Messungen von zwei unterschiedlichen Experimentatoren (Exp. 1 und 2) für die Transkripte ACTB, CDKN2A, HPRT1 und HPV16. MW, SD und CV für die jeweiligen Analyten sind darunter nochmals tabellarisch angegeben. HPV = humanes Papillomvirus, CV = Variationskoeffizient, SD = Standardabweichung, MW = Mittelwert.

Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Ergebnisse der drei Transkripte CDKN2A, HPRT1 und HPV16 auf das Referenzgen ACTB normalisiert und die Mittelwert mit Angabe der SD und dem CV anschließend zum Vergleich gegenüber gestellt (siehe Abb. 12).



	CDKN2A			HPRT1			HPV16		
	MW	SD	CV	MW	SD	CV	MW	SD	CV
Exp.1	0,36	0,01	3,7%	0,24	0,00	1,9%	0,30	0,01	2,9%
Exp.2	0,36	0,05	15,3%	0,26	0,01	5,7%	0,34	0,01	3,1%
Exp.1 + Exp. 2	0,36	0,00	0,1%	0,25	0,01	3,6%	0,32	0,02	6,1%

Abbildung 12: Interobserver Vergleich (Normalisierte Daten). Gegenüberstellung der Mittelwerte der Messungen von zwei unterschiedlichen Experimentatoren (Exp. 1 und 2) für die Transkripte CDKN2A, HPRT1 und HPV16, normalisiert auf ACTB angegeben in Prozent mit einfacher SD. MW, SD und CV für die jeweiligen Analyten sind darunter nochmals tabellarisch angegeben. HPV = humanes Papillomvirus, CV = Variationskoeffizient, SD = Standardabweichung, MW = Mittelwert.

Wie aus den Abb. 11 und 12 zu entnehmen ist liegen die Ergebnisse von Experimentator 1 und 2 recht nahe beieinander. Die Streuung zwischen den gemessenen Mittelwerten der beiden Experimentatoren liegt für die Rohdaten aller Analyten mit einem maximalen CV von 9,6% (für HPV16) unter dem Soll-Wert von 15%: ACTB (3,5%), CDKN2A (3,9%), HPRT1 (7%) (siehe Abb. 15, Exp.1+ Exp.2). Die auf ACTB normalisierten Werte weisen im Vergleich zu den Rohdaten durchweg eine geringere Streuung untereinander auf (vergleiche dazu Abb. 15 mit Abb. 16). Für CDKN2A und HPRT1 liegt der CV zwischen den auf ACTB normalisierten Mittelwerten der beiden Experimentatoren bei 0,1% (3,9%) bzw. 3,6% (7%), für HPV16 bei 6,1 % (9,6%). Die Interobserver Varianz der normalisierten Transkripte bleibt somit unter dem Soll-Wert von 15%, mit Ausnahme von HPV16 sogar unter 5%.

Betrachtet man die Ergebnisse von Experimentator 1 und 2 jeweils isoliert, so fällt der erhöhte CV für CDKN2A bei Experimentator 2 auf, der mit 20%, bzw. 15,3% für den auf ACTB normalisierten Wert als Einziger über dem Soll-Wert liegt. Alle anderen Werte liegen im gewünschten Streuungsbereich (<15%). Auch hier weisen die normalisierten Werte alle eine geringere Streuung auf.

4.3 Validierung zur ersten Einschätzung der Robustheit des QG-HPV V1 Assays

4.3.1 Einfluss der Zellkonzentration auf die Signalstärke (C33a-Lysat supplementiert mit HPV-Lysat)

Im folgenden Experiment sollte der Einfluss von hohen Konzentrationen nichtinfizierten Zellmaterials auf die Sensitivität des Assays zur Detektion von HPV – Typspezifischer E7 mRNA untersucht werden.

Dafür wurden für die Zelllinien HeLa, CaSki, MRHI-215, ME 180 und Erin jeweils zwei Zelllysate hergestellt. In dem ersten Lysat wurde jede Zelllinie im Verhältnis 1 zu 8 mit HPV-negativen CC33a – Zellen versetzt (25 µl HPV-positive Zellen + 200 µl C33a Zellen = 25.000 HPV-positive Zellen + 200.000 C33a Zellen). In jedes Well wurde ein Gesamtvolumen von 40 µl a 35.500 C33a Zellen und 4.500 HPV-positiven Zellen = 40.000 Zellen insgesamt pipettiert.

Im zweiten Lysat wurden im selben Verhältnis die 25.000 HPV-positive Zellen mit reinem vLys vermischt (200 µl) und die identischen Volumen (40 µl) in jedes Well gegeben (pro Well 4.500 Zellen). Somit wurde sowohl eine Probe mit wenig Zellmaterial (4.500 Zellen), als auch eine mit CC33a Zellen versetzte Probe mit viel Zellmaterial (40.000 Zellen) gemessen. Beide Proben hatten

aber die gleiche Menge an HPV-positiven Zellen. Anschließend wurden die Probenansätze viermal um den Faktor 10 titriert und dann gemessen. Die Ergebnisse sind in Tab. 16 und Abb. 13 a-e zu sehen. Es handelt sich um einfache Bestimmungen.

Tabelle 16: Tabellarisch angeordnete Messergebnisse HPV-positiver Zellen vs. HPV-positiver Zellen versetzt mit CC33a Zellen.

Zellreihe/ Konzentration	ACTB	CDKN2A	HPRT1	HPV16	HPV18	HPV31	HPV45	HPV59	HPV6	HPV68	
HeLa V	100%	15749	13976	8894	142	8685	42	347	85	46,5	54
	10%	14271	9971	3388,5	40	4735,5	10	298	41	41,5	29
	1%	2464	1722	484	11	858	7	47,5	14	25	18
	0,1%	278,5	177	44	8	78	6	14	7,5	17	17,5
	0,01%	31	30	12	6	16	7,5	5	8	15	19,5
HeLa N	100%	17657	6352	7915	88	19604,5	25	515	59	48	53
	10%	3503,5	927	917	19	4991	10,5	61,5	13,5	28	20,5
	1%	447	129	120	7	751	7	12,5	7	14,5	17
	0,1%	50	24	16	4	108	9,5	10,5	8	20,5	14
	0,01%	8	9	11	4	15	6	5,5	7	13	15
CaSki V	100%	20683	20794	12005	3129,5	120	34,5	612,5	118,5	55	56
	10%	12936,5	9013	3287	683	27	13	335	32,5	34	22,5
	1%	2173	1567	430	83	15	5	46	7	23	16
	0,1%	227,5	150	63	15	12	8	9	11	18,5	14
	0,01%	28	23	10	6	5,5	5	5	8,5	24	14
CaSki N	100%	22604,5	11725,5	5113	5637,5	54	21	887	53,5	44	36
	10%	3785,5	1184,5	554	679	10	11	63	12,5	20	14
	1%	549	131	64	109	9	5	11	9	16	13
	0,1%	57	24	11	17	10	5	7,5	3	19	12,5
	0,01%	11	6,5	9	7	9	7	8,5	5	14	13,5
MRHI – 215 V	100%	19132	21397	10921,5	247,5	76	30,5	5264	88	60	67
	10%	12706	8637	2800	28	22,5	12	1227	24,5	29	17
	1%	2570	1644	548	9	13,5	8,5	221	10	18,5	16
	0,1%	280	214	54	5	7	9	27	10	19	13
	0,01%	42	36	11	6	8	5	10	7	17	14,5
MRHI – 215 N	100%	20877	7572,5	3574,5	58	44	11,5	8081	53	56	38
	10%	3985	914	471	9	9	8	1191,5	15	20	21
	1%	482,5	104,5	42,5	7	9	9	156	6	14	16
	0,1%	51	20	13	4	7	5	18	7	16	17

	0,01%	13	9,5	6	7	7	6	8	7	19	12
ME 180 V	100%	23577,5	23408	15242	198,5	74	23	621	137	73	14600,5
	10%	11111	9944,5	2882	20	27,5	9	238	21	29,5	3315,5
	1%	2111	1981	568	14	10,5	13	43	13	16	685
	0,1%	335	247,5	66,5	5	6	6	8	8	15	100,5
	0,01%	26	46	12	6	5	8,5	4,5	5	16	16
ME 180 N	100%	12244	2451,5	2045,5	24	23	14	219	35	29	22467
	10%	1088	213	159,5	9	6	8	15	11	22	4126
	1%	98	33,5	22	7	9	3	9	11	17	400
	0,1%	16	18	11	11	8	8	8	9	22	76
	0,01%	8	8	10	8,5	4	8	5	5,5	16,5	15
Erin V	100%	24963,5	26206	17630,5	54	42,5	14	1094	3990	48	33
	10%	9511	7486	2328	18,5	17	11,5	174,5	309,5	23	16
	1%	1356	1148	356	6	11	9	29,5	37,5	21	17
	0,1%	224	181	28	4	6	8	8,5	11	14	13
	0,01%	14	23	10	5	6	6	4,5	3	14	14
Erin N	100%	24504	9233	4422	22	15	9	302	6404	33,5	27
	10%	1649,5	386	287	8	11	5	24	321	14	17,5
	1%	240	46,5	35	8	10	8	8,5	48	15	12
	0,1%	32	13,5	5	5	9	6	6	10	12	11,5
	0,01%	11	11	4	4	7	3,5	7	8	11,5	12

MFI-Wert für den jeweils enthaltenen Der HPV-Typ ist grün markiert. V = mit CC33a versetzt, N = rein.

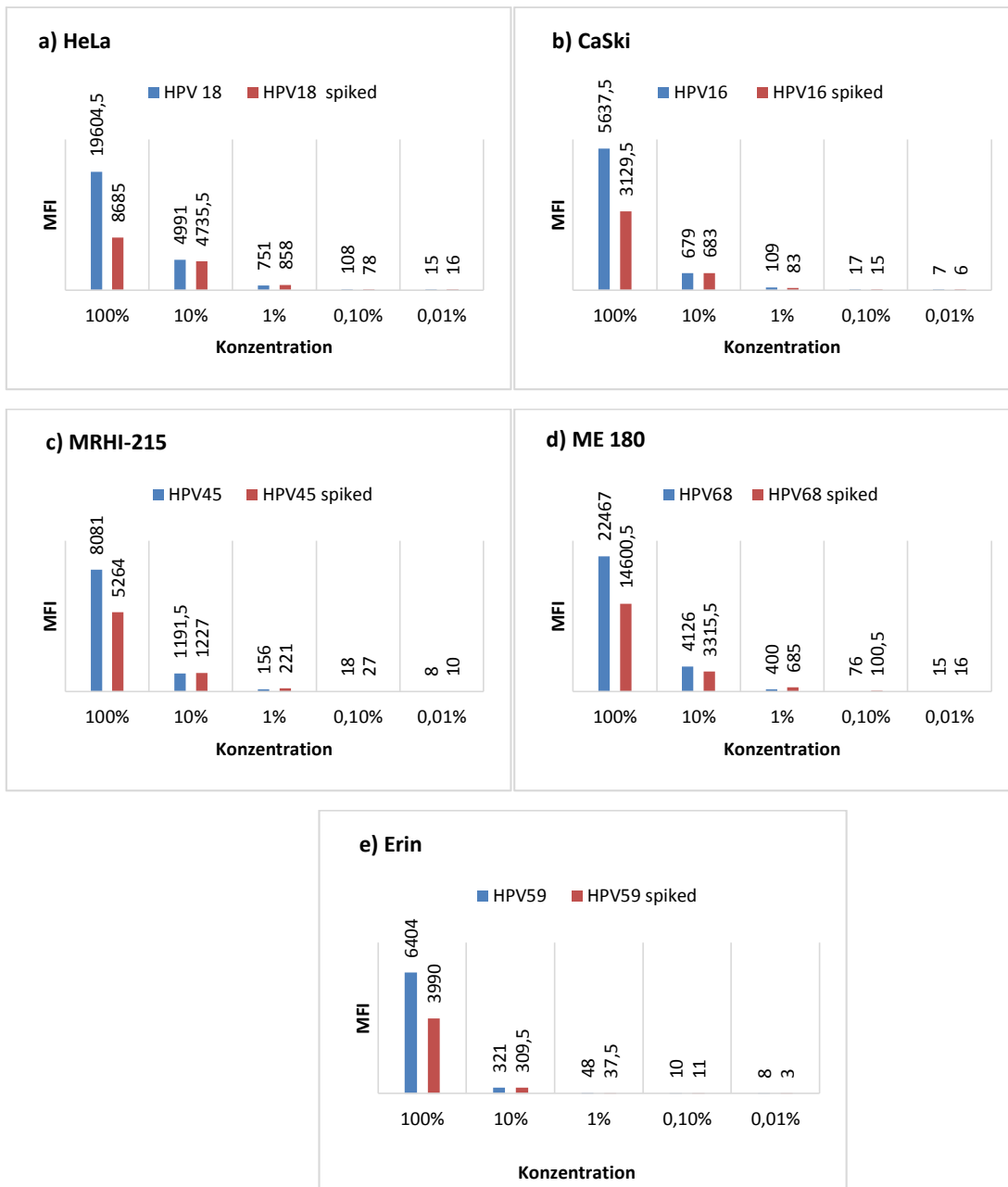


Abbildung 13 (a-e): Gegenüberstellung des gemessenen HPV-Signals HPV-positiver Zellen vs. HPV-positiver Zellen versetzt mit CC33a Zellen in absteigender Konzentration. Das Verhältnis der Zellen in der versetzten Probe betrug 1 HPV-positive zu 8 HPV-negativen Karzinomzellen. Die Werte sind für jede gemessene Zellreihe einzeln aufgeführt: a) HeLa, b) CasKi, c) MRHI-215, d) ME 180, e) Erin. Bei einer Probenkonzentration von 100% ist der gemessene HPV-Wert der unspiked Probe stets höher als der der spiked Probe. In den niedrigeren Konzentrationen bewegen sich die MFIs dann im selben Bereich. HPV = humane Papillomaviren, MFI = *mean fluorescence intensity*

Die gemessene HPV mRNA (absolute MFI) für 4.500 HPV-positive Zellen (100%) ist in der mit C33a versetzten Probe (40.000 Zellen) geringer als in der Probe, die nur HPV – positive Zellen enthielt (4.500 Zellen). Dies gilt für alle gemessenen Zelllinien. Ab 10%iger Konzentration (450 bzw. 4.000 Zellen) sind die gemessenen HPV mRNA-Mengen in den absteigenden Titrationen vergleichbar (siehe Abb. 13). Dies gilt für alle 5 gemessenen Proben.

4.3.2 Einfluss verschiedener Fixiermedien auf das QG-HPV V1 Assay

4.3.2.1 Einfluss der Fixanzien und der Fixierdauer auf die Signalstärke des QG-HPV-V1 mRNA Nachweis

Ein wesentlicher Faktor bei der Untersuchung von Patientinnenmaterial sind der Transport und die Aufbewahrung des entnommenen Materials. Nur wenn die Asservierungsmethode die Zielstrukturen, die der Test erfassen soll, zuverlässig konserviert, kann eine genaue Beurteilung der Messwerte erfolgen.

Um das optimale Medium zur Aufbewahrung von HPV-positivem Zellmaterial zu ermitteln, wurde eine Zellsuspension aus HPV 16 positiven CaSki-Zellen hergestellt und in vier verschiedenen Medien aufbewahrt. Als Medium wurden verwendet: PBS (Phosphate buffered saline), Boonfix und PreservCyt (PC), sowie der aus dem Kit des QuantiGene – Assays stammende vLys, welcher optimal RNA-stabilisierend wirkt.

Zunächst wurde von jedem dieser Fixanzien in zwei Eppendorfgefäße je 900µl gegeben. In jedes Gefäß wurden dann weitere 100 µl eine CaSki Zellsuspension mit 10.000.000 Zellen/ml gegeben (= 1.000.000 CaSki-Zellen in jedem Eppendorfgefäß) und durch 10maliges Invertieren kurz durchgemischt. Von den so hergestellten Proben wurden vier bei Raumtemperatur (RT, ca. 22°C) und vier im Kühlschrank bei ca. 4°C aufbewahrt, so dass jedes Fixanz bei zwei unterschiedlichen Temperaturen aufbewahrt wurde. In definierten Zeitintervallen wurden dann von jeder dieser Proben Stichproben entnommen.

Dafür wurde die Probe erst für ca. 30 Sek. gevortext und dann 40 µl (\cong 40.000 Zellen) abpipettiert. Anschließend wurde dieser entnommene Teil für ca. 5 min. bei 3.000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in 40 µl vLys resuspendiert, kurz gevortext und bei -80°C eingefroren.

Die Entnahmen ab Probenherstellung fanden jeweils nach t = 0, 12, 24, 48 Stunden (h), 4, 8, 14 und 28 Tagen (d) statt. Vier Tage nach der letzten Entnahme wurden dann alle so gewonnenen Zelllysate mit dem QG-HPV V1 im Luminex-Gerät gemeinsam gemessen und so die Abnahme des Signals der zellulären Gene und der HPV 16 mRNA in den unterschiedlichen Medien und zwei unterschiedlichen Lagern/Temperaturen über den gesamten Zeitraum von 28 Tagen abgebildet. Es handelt sich um einfache Messungen.

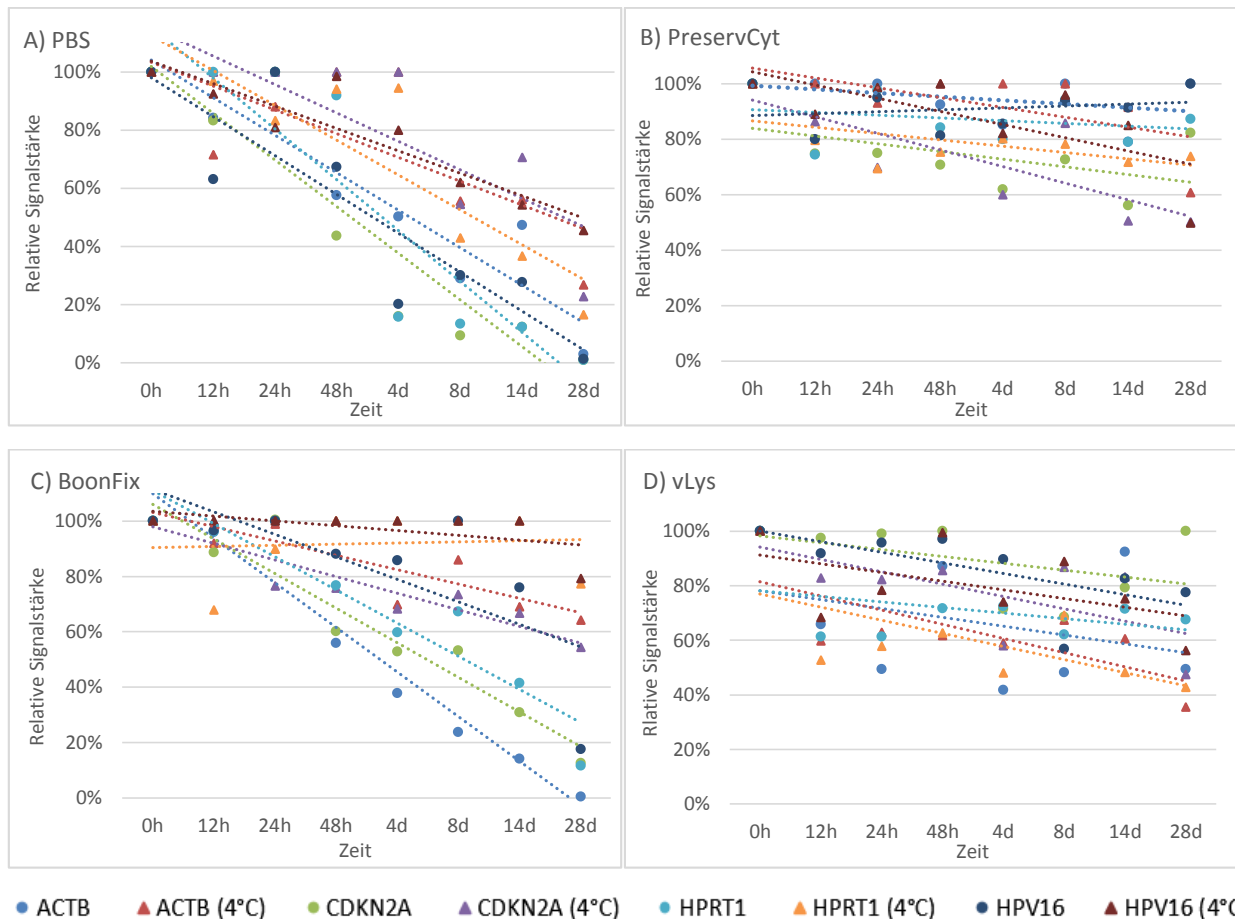


Abbildung 14: Vergleich des gemessenen Signalabfalls über 28 Tage für HPV16 und die zellulären Marker in verschiedenen Fixiermedien bei unterschiedlicher Lagerungstemperatur. Darstellung der Signalstärke in Prozent bezogen auf die sofort fixierte Probe, die bei -80°C gelagert wurde. Dargestellt sind die Werte für ACTB, CDKN2A, HPRT1 und HPV16 für die bei Raumtemperatur und die bei 4°C gelagerten Proben über den Zeitverlauf von 28 Tagen aus verschiedenen Transportmedien. A) PBS, B) PreservCyt, C) BoonFix und D) verdünnter Lysis Mixture (vLys).

100% = Messung der Probe bei $t = 0\text{h}$, $h = \text{Stunden}$, $d = \text{Tage}$

Insgesamt ist bei allen Proben ungeachtet des Fixiermediums und der Lagerungstemperatur eine Abnahme der Signalstärke mit zunehmender Lagerungszeit zu beobachten. Sie variiert jedoch teilweise erheblich je nach Lagerungstemperatur und Fixiermedium. Bis auf die Proben aus PBS liegt für alle Analyten ein deutlich positiver Wert für Lagerung bei RT und/oder 4°C nach 28 Tagen vor, wobei trotz starkem Signalverlust, selbst dort noch Signale messbar waren. Bei den Proben aus BoonFix und PBS liegen sämtliche Werte für die gekühlten Proben über denen bei Raumtemperatur gelagerten Proben. Bei PreservCyt liegen die Werte recht nahe bei einander, wobei bei allen vier Analyten (ACTB, CDKN2A, HPRT1, HPV16) der Signalverlust in der gekühlten Probe erhöht ist (siehe Tab. 17). Bei Zimmertemperatur nach 28 Tagen (d) liegen die MFI-Werte zwischen 100% (HPV16, ACTB) und 82% (CDKN2A) Restsignal der ursprünglichen Signalstärke der ersten Messung (nach $t = 0\text{h}$). Bei 4°C liegen sie zwischen 74% (HPRT1) und 50% (HPV16, CDKN2A). Die Proben aus vLys weisen bei den gekühlten Proben einen höheren

Signalverlust auf, der teilweise stark erhöht ist (36% Restsignal für CDKN2A) im Vergleich zur bei Raumtemperatur gelagerten Probe. Die durchweg geringsten Signalverluste bei 4°C Lagerungstemperatur nach 28 d zeigt BoonFix (siehe Tab. 17).

Der Signalabfall der einzelnen Analyten nach vier Tagen und der gesamten Versuchsdauer von 28 Tagen in Prozent ist zur besseren Übersicht nochmal in Tab. 17 dargestellt.

Tabelle 17: Gegenüberstellung der Signalverluste der Analyten ACTB, CDKN2A, HPRT1 und HPV16 bei Raumtemperatur und bei 4°C nach 4 und nach 28 Tagen.

MEDIUM	ACTB (RT)	ACTB (4°C)	CDKN2A (RT)	CDKN2A (4°C)	HPRT1 (RT)	HPRT1 (4°C)	HPV16 (RT)	HPV16 (4°C)
Nach t = 4 Tagen								
PBS	50	0	84	0	84	5	80	20
PRESERV CYT	15	0	38	40	20	20	14	18
BOONFIX	62	30	47	32	40	0	14	0
VLYS.	58	41	29	42	28	52	10	26
Nach t = 28 Tagen								
PBS	97	73	99	77	99	84	99	54
PRESERV CYT	0	39	18	50	13	26	0	50
BOONFIX	100	36	87	46	88	23	82	21
VLYS.	51	64	0	53	32	57	22	44

vLys. = verdünnter Lysepuffer aus *QuantiGene Assay*; RT = Raumtemperatur. Der Signalverlust ist angegeben in Prozent, ausgehend von der Messung bei t=0h. Der jeweils geringste Signalverlust ist grün markiert.

Bei einer Betrachtung der Werte nach 4 Tagen ist noch kein eindeutiger Vorteil eines Mediums für alle Analyten zu sehen. Mit einem Maximalverlust von 40% (für CDKN2A bei 4°C) für alle Werte und drei der geringsten Signalverluste für einzelne Analyten (ACTB, ACTB (4°C), HPRT1), zeigt PreservCyt die beste Konservierung. Je nach Lagerungstemperatur folgen auf dem zweiten Platz BoonFix (besser bei 4°C) oder vLys. (besser bei RT).

Betrachtet man den absoluten Signalverlust nach 28 Tagen (siehe Tab. 17), so zeigt sich, dass in 3 von 8 Messungen die Proben welche in PreservCyt asserviert waren, den geringsten Signalverlust erlitten haben (alle bei RT). Außerdem wies PreservCyt als einziges getestetes Medium bei keinem Analyten einen Signalverlust über 50% auf, sowohl bei Raumtemperatur, als auch bei 4°C. Betrachtet man die Werte für Raumtemperatur und 4°C getrennt, zeigen sich jedoch teilweise starke Differenzen zwischen den Medien. BoonFix zeigt bei 4 von 8 Messungen den niedrigsten Signalverlust (alle bei 4°C), zeigt aber einen deutlichen Signalverlust (zwischen 100 – 82%) bei der Lagerung bei RT (z.B. 65% Signalunterschied zwischen RT und 4°C für HPRT1). vLys. und PreservCyt liefern bei 4°C durchweg schlechtere Ergebnisse als bei RT (siehe Tab. 17). BoonFix zeigt somit die beste Konservierung bei 4°C, PreservCyt bei RT, wobei die Unterschiede zwischen

diesen Beiden Medien bei RT weitaus größer ausfallen als bei 4°C, zu Gunsten von PreservCyt. Bei optimaler Lagerungstemperatur zeigt PreservCyt den absolut geringsten Signalverlust der hier getesteten Medien und damit die besten Konservierungseigenschaften.

Bei allen getesteten Medien zeigt sich für HPV16 im Schnitt der geringste Signalverlust (nach 28 Tagen in PBS bei 4°C noch 46% des Ursprungssignals), wobei PreservCyt bei diesem ausschlaggebenden Wert die geringsten Verluste unter den getesteten Medien aufweist (bei RT).

4.3.2.2 Direkter Vergleich des Einflusses der Fixiermedien PreservCyt und vLys auf das Messergebnis

Um den direkten Einfluss des Fixiermediums auf das Messergebnis und somit das optimale Fixiermedium für zu messenden Proben zu finden, wurde die gleiche Zellprobe in zwei verschiedenen Fixiermedien für ca. 1 Stunden bei Raumtemperatur asserviert, anschließend dem Protokoll entsprechend vorbereitet, gemessen und die Messergebnisse verglichen.

Verglichen wurde das in der HPV-Diagnostik weit verbreitete und etablierte *ThinPrep*-Medium PreservCyt, welches im vorangegangenen Experiment die besten Ergebnisse geliefert hat, mit dem im QG-HPV-V1-Assay enthaltenen vLys, welcher für die Lagerung und Aufbereitung der zu messenden Zellproben geeignet ist und ähnlich gute Werte bei RT erzielte. Trotz guter Ergebnisse im vorangegangenen Vergleich wurde BoonFix für eine direkte Testung nicht mehr mit eingeschlossen, da die Verfügbarkeit mittlerweile sehr stark eingeschränkt ist und es somit für eine zukünftige Anwendung keine praktikable Option mehr ist.

Es soll gezeigt werden, ob Zellmaterial aus *PreservCyt*-Medium vergleichbare Ergebnisse liefert, wie das vom Hersteller empfohlene Fixiermedium (siehe Punkt 3.3.4.1).

Die Probenvorbereitung erfolgte wie in Punkt 3.3.4.1 beschrieben. Lediglich im letzten Schritt wurde ein Teil der Zellen in *PreservCyt* statt in vLys gelöst.

Als Probe wurden kultivierte CaSki-Zellen (HPV16+) verwendet, ca. $4,5 \cdot 10^3$ Zellen pro Ansatz. Um die Stabilität der Messergebnisse bei sinkender Konzentration vergleichen zu können, wurde die Probe jeweils in Zehnerpotenzschritten bis auf 1/1.000 verdünnt, so dass man insgesamt n = drei Proben des gleichen Lysats mit unterschiedlicher Konzentration erhalten hat (10%, 1%, 0,1%). Um das Problem der mangelnden Quantifizierung von ACTB bei hohen Konzentrationen zu vermeiden, wurde in dieser Analyse auf eine Probenkonzentration von 100% verzichtet. Eine vergleichbare Quantifizierung der verschiedenen Analyten bei dieser Konzentration (100%) kann

auf Basis der vorangegangenen Ergebnisse wegen der Sättigung der Nachweisreagenzien nicht gewährleistet werden.

Die Ergebnisse für HPV16, CDKN2A und HPRT der unterschiedlichen Konzentrationen wurden dann auf das Referenzgen ACTB normalisiert und dann gemittelt. Die Mittelwerte mit einfacher SD werden in Abbildung 15 gegenübergestellt.

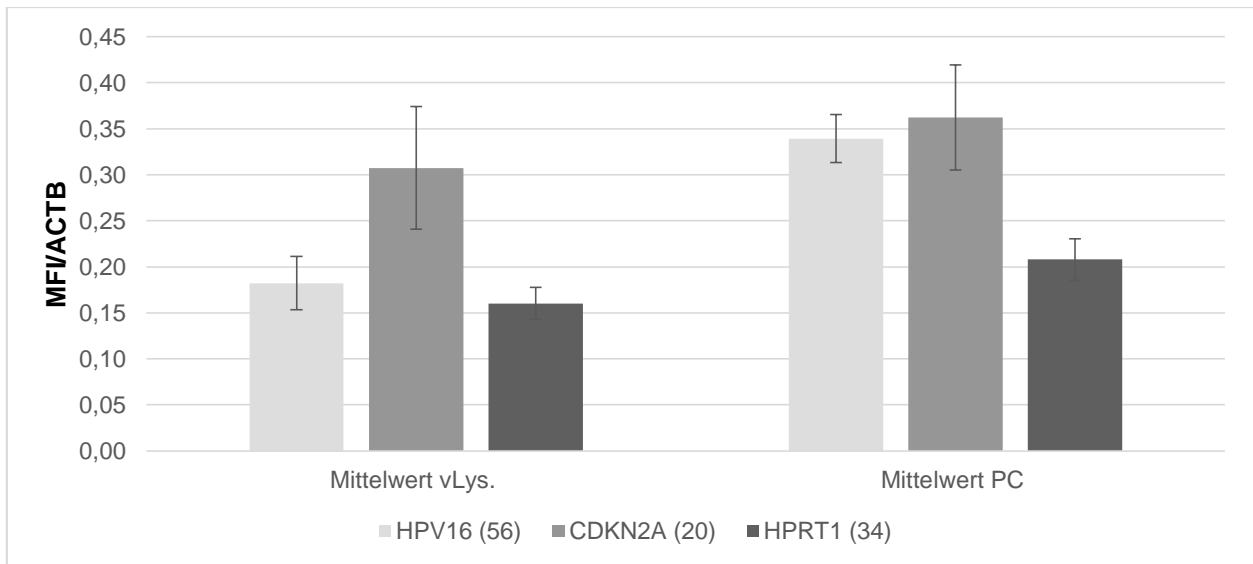


Abbildung 15: Streuung einer auf ACTB normalisierten HPV16 positive Proben aus PreservCyt und vLys über 3 Titrationsstufen hinweg im Vergleich. Mittelwerte der auf ACTB normalisierten Werte für HPV16, CDKN2A und HPRT1 mit einfacher SD (+/- 1). N = 3. PC. = Probe aus PreservCyt-Lösung, vLys. = Probe aus verdünntem Lysis Mixture.

Tabelle 18: Gegenüberstellung von Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient für die auf ACTB normalisierten Daten.

	CDKN2A		HPRT1		HPV 16	
	vLys.	PC	vLys.	PC	vLys.	PC.
MW	0,31	0,36	0,16	0,21	0,18	0,34
SD	0,07	0,06	0,02	0,02	0,03	0,03
CV%	21,67	15,81	10,84	10,85	15,92	7,67

PC = Probe aus PreservCyt-Lösung, vLys. = Probe aus verdünntem Lysis Mixture, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, CV% = Variationskoeffizient in Prozent. Die Proben wurden vorher jeweils in zwei unterschiedlichen Fixiermedien aufbewahrt.

Die auf ACTB normalisierten Mittelwerte der in PreservCyt aufbewahrten Probe liegen für alle drei Analyten höher als die der Probe aus vLys. Der CV bei PreserCyt (PC) liegt bei zwei von drei Analyten ebenfalls unter dem von vLys. (CDKN2A -5,86% und HPV16 -8,25%). Lediglich für HPRT1 (+0,01% im Vergleich zu vLys.) ist er fast identisch. Den Soll-Wert für den CV von 15% überschreiten 2 von 3 Analyten in vLys. (CDKN2A 21,67% und HPV16 15,92%) und nur 1 von 3 in PC (CDKN2A 15,81%). Den größten Streubereich der Werte zeigt in beiden Medien der Analyt CDKN2A (siehe Tab 18).

4.4 Untersuchung von klinischem Patientinnenmaterial

Nachdem die Messungen des kultivierten Zellmaterials bereits Ergebnisse geliefert haben, wurde im zweiten Schritt der Assay in Ansätzen an Abstrichmaterial von Patientinnen getestet, um mögliche Korrelationen zu den präklinischen Versuchen aufzuzeigen und so generell die klinische Verwendbarkeit zu prüfen.

4.4.1 Vergleich mRNA-Nachweis per QG-HPV V1 mit DNA-Nachweis per Multiplex Genotyping (MPG) aus klinischen Proben

Um die Genauigkeit der Messergebnisse bei klinischen Proben zu überprüfen, wurden die Ergebnisse des QG-HPV V1-Assays mit denen des DNA-Nachweises per MPG-Methode, welches den etablierten Standard in unserem Labor darstellt, verglichen.

Es wurden 16 klinische Proben herausgesucht, bei denen bereits durch unser Labor mittels DNA-Nachweis eine HPV-Infektion mit einem im QG-HPV-Kit enthaltenen HPV-Typ nachgewiesen wurde. Dabei wurden sowohl klinisch auffällige (mindestens eine CIN III und/oder PAP 3d) als auch unauffällige Proben verwendet. Nach Möglichkeit wurde versucht, für jede der im QG-HPV

V1 Assay enthaltenen Sonden mindestens eine Probe mit entsprechendem HPV-Typ in die Messung mit einzubeziehen. Um Kreuzreaktionen der Sonden in klinischen Proben auszuschließen, wurden auch zwei Proben mit dem nicht nachweisbaren HPV-Typen 39 ausgewählt. Für den lr-HPV-Typen 6 und die hr-HPV-Typen 59 und 68 konnten leider keine passenden Patientinnenproben gefunden werden.

Es wurden am häufigsten HPV 16 pos. Proben herausgesucht, da für diesen Typ die meisten positiven Proben zur Verfügung standen. Des Weiteren sind Proben mit den hr-Typen HPV 18, 31, 39 und 45 enthalten. Die Proben wurden zweimal um den Faktor 10 verdünnt.

In Tab. 19 sind die Ergebnisse der Messung der 16 Patientinnenproben dargestellt.

Tabelle 19: Rohdaten der Messung der klinischen Proben P1-P16, dargestellt mit der pseudonymisierten Patientenummer.

Proben (Konzentration)	HPV-Typ (per MPG)	ACTB	CDKN2A	HPRT1	HPV16	HPV18	HPV31	HPV45	HPV59	HPV6	HPV68
226	16	2777,0	394,0	744,0	704,0	9,0	7,5	28,0	8,5	20,0	18,0
226 (10%)		877,0	97,0	99,0	112,0	7,0	4,5	14,0	10,0	18,5	11,0
226 (1%)		56,5	18,5	13,0	9,0	8,0	5,0	6,5	6,0	14,5	11,0
235	16	1640,5	2007,0	528,0	1852,5	6,0	10,5	10,0	11,0	15,5	9,0
235 (10%)		360,5	337,0	108,0	356,5	6,0	5,0	10,0	5,0	15,0	11,5
235 (1%)		46,0	28,5	10,0	26,0	5,0	6,0	5,5	7,0	13,0	12,0
239	16	6795,0	635,0	450,5	792,5	8,0	9,5	60,5	5,5	22,5	16,0
239 (10%)		1332,5	82,5	55,0	112,0	6,5	7,0	18,0	5,5	15,0	13,0
239 (1%)		156,0	20,0	13,0	15,5	7,0	6,0	15,0	7,0	16,5	13,0
251	16	2837,0	1425,5	644,0	1556,0	7,0	7,0	46,0	7,0	19,0	14,0
251 (10%)		515,0	202,5	84,0	197,0	6,0	5,0	13,0	7,0	15,0	12,5
251 (1%)		59,0	33,0	17,5	27,5	6,0	6,0	8,0	4,0	14,0	12,0
267	16	2286,5	2681,0	1184,0	1893,5	8,0	5,0	24,0	7,0	20,0	13,0
267 (10%)		1017,0	499,0	150,5	322,0	5,0	4,0	12,5	8,0	15,5	17,0
267 (1%)		124,0	60,0	18,0	33,5	6,0	5,5	9,0	6,0	19,0	10,5
271	16	2518,5	548,0	346,5	138,0	7,0	7,0	37,5	10,0	14,0	14,5
271 (10%)		316,0	75,0	55,0	14,0	8,0	3,0	7,0	5,0	15,0	10,0
271 (1%)		31,5	10,0	6,5	2,5	5,0	5,0	3,0	7,5	13,0	14,0
291	16	6720,5	6424,0	615,0	646,0	9,0	8,0	33,5	12,0	22,0	12,5
291 (10%)		526,5	345,0	35,0	38,0	8,0	7,0	12,0	6,5	14,0	11,0
291 (1%)		119,5	85,0	8,0	14,0	6,0	7,0	9,0	9,0	12,0	8,0
174	16, 18	3717,0	395,5	249,0	79,0	35,0	5,0	59,0	10,0	15,0	17,5
174 (10%)		506,0	44,5	38,0	15,0	9,0	4,5	10,0	4,0	16,0	12,0
174 (1%)		56,0	11,0	6,0	6,0	8,0	6,0	11,0	6,0	14,0	12,0

237	45	5506,5	1388,5	412,0	7,5	9,0	10,0	1228,0	6,5	18,0	10,0
237 (10%)		506,0	110,0	38,0	6,0	5,0	4,0	143,5	5,0	8,0	9,0
237 (1%)		105,0	36,5	13,0	7,0	5,0	4,0	28,0	7,0	15,0	11,5
256	16	9764,5	522,0	207,0	355,0	8,0	5,0	92,0	10,0	17,5	15,5
256 (10%)		1644,0	70,0	25,5	34,0	7,0	8,0	33,5	9,0	15,0	12,0
256 (1%)		93,0	17,0	10,0	10,0	7,0	7,0	6,0	3,0	16,0	7,5
272	45	4483,5	630,0	586,0	5,0	7,0	6,0	72,0	7,5	17,0	13,0
272 (10%)		1399,5	106,0	96,0	5,0	9,0	4,0	19,0	10,0	17,0	12,0
272 (1%)		28,0	20,5	10,0	4,0	6,0	4,0	6,0	6,0	12,5	11,0
292	18, 39, 45	4035,0	90,0	80,0	11,0	18,0	4,0	38,0	14,0	31,0	16,0
292 (10%)		3614,5	18,0	58,0	6,5	7,0	7,0	48,0	9,0	19,0	14,5
292 (1%)		347,5	12,0	7,0	6,0	5,0	4,0	13,0	6,0	17,0	11,0
300	16	854,0	17,0	110,5	15,0	6,0	4,0	25,0	7,0	11,0	12,5
300 (10%)		90,5	10,0	9,0	4,5	9,0	5,5	5,0	5,0	17,0	17,0
300 (1%)		84,0	3,0	11,0	6,0	5,5	7,0	6,0	7,0	14,0	13,0
316	16	3013,0	2471,0	633,0	769,0	10,5	6,0	64,5	13,5	23,0	14,0
316 (10%)		1123,0	515,0	59,0	104,0	11,0	9,0	16,0	6,0	17,5	13,0
316 (1%)		24,0	14,0	10,0	7,0	10,0	7,0	7,0	6,0	13,0	13,5
320	31	371,0	13,0	68,0	7,0	8,0	4,0	14,0	4,5	16,5	11,0
320 (10%)		91,0	8,0	14,0	4,0	8,0	4,0	9,0	6,0	15,0	9,0
320 (1%)		9,5	7,0	12,0	8,0	5,0	5,0	6,0	7,0	12,0	13,5
322	18, 39	27,0	9,0	14,0	4,0	97,0	5,0	7,0	5,0	15,0	15,0
322 (10%)		11,5	9,0	6,0	7,0	19,0	4,0	5,0	4,0	12,5	12,0
322 (1%)		9,0	8,0	6,0	5,0	7,0	6,0	4,0	7,0	13,0	13,0
Leerprobe (Mittelwert)		6,0	10,7	6,8	5,7	5,8	6,5	6,7	6,7	16,0	15,0
LOD		12,5	14,1	14,6	11,6	11,9	13,6	12,5	13,2	22,0	17,3

HPV = humaner Papillomvirus, MPG = Multiplex genotyping, LOD = technischer Grenzwert. Alle Werte, die über dem errechneten technischen Grenzwert liegen, wurden rot markiert. Sie werden als positiv gewertet. Die jeweils per MPG-Methode ermittelten HPV-Infektionen werden ebenfalls aufgeführt.

Aus den Daten wird ersichtlich, dass bestimmte HPV-Werte im Vergleich zu den andern überdurchschnittlich erhöht sind. Mit Hilfe der von uns errechneten Nachweisgrenze (LOD) können wir die Ergebnisse der Messung mit dem QG-HPV V1 Assay mit denen des DNA-Nachweises (MPG) vergleichen (Werte > LOD = positiv gewertet = rot markiert). Zusammen mit den histologischen und pathologischen Untersuchungsergebnissen wurden die oben angeführten Ergebnisse denen des DNA-Nachweises für die jeweilige Patientin gegenübergestellt. Die Patientinnen wurden jeweils mit einer Nummer versehen und so die Daten pseudonymisiert (siehe Tab. 20).

Tabelle 20: Tabellarische Gegenüberstellung der Ergebnisse aus HPV-DNA-Nachweis (MPG) und QG-HPV V1-Methode für die jeweilige Probe mit klinischen Angaben.

Patientin	HPV-Typ		Pathologischer Befund, evtl. Vorbehandlung
	DNA-Nachweis (MPG)	QG-HPV V1	
226	16	16,45 ^{x1}	CxCa, CIN 3
235	16	16	CxCa
239	16	16, 45 ^{x1} , 6 ^{x2}	CxCa
251	16	16, 45 ^{x1}	CxCa, CIN 3
267	16	16, 45 ^{x1}	CxCa
271	16	16, 45 ^{x1}	CxCa
291	16	16, 45 ^x	CxCa, CIN 3
174	16,18	16, 18, 45 ^{x1}	PAP 4a, CIN 2
237	45	45	CxCa
256	16	16, 45 ^{x1}	CIN 2-3
272	45	45	Keine Angaben
292	18,39 ^{x3} ,45	18 (schwach), 59, 45 ^{x1} , 6 ^{x2}	CIN 1, schlecht beurteilbar →starke Zervizitis
300	16	16, 45 ^{x1}	Keine Angaben
316	16	16, 45 ^{x1} , 6 ^{x2}	CIN 3
320 ^{x4}	31	45 ^{x1}	PAP 2, CIN 1, eingeschränkt beurteilbar → Zervizitis
322	18,39 ^{x3}	18	Adeno Ca, PAP 4a

x¹ = evtl. unspezifischer Hintergrund der HPV 45-Sonde; x² = unspezifischer Hintergrund der HPV 6-Sonde; x³ = HPV 39 nicht im QG-HPV-V1-Assay enthalten; x⁴ = Probe musste wegen mangelnder Beurteilbarkeit des Abstriches von der Beurteilung ausgeschlossen werden. CA = Karzinom, Z.n. = Zustand nach, CIN = zervikale intraepitheliale Neoplasie, CxCa = Zervixkarzinom. Grau = aus der Wertung genommene Proben. Es sind lediglich die unter Beachtung des errechneten Grenzwertes als positiv bewertete HPV-Typen aufgelistet auf Basis aller Titrationen (Tab. 19, 100%, 10%, ,1%). Für HPV45 und 6 kann auf Grund der vorangegangenen Ergebnisse ein zu hoher unspezifischer Hintergrund nicht ausgeschlossen werden. Sie wurden entsprechend markiert. Pathologische Befunde, sowie evtl. Vorbehandlungen der Patientin sind angegeben soweit vorhanden.

Von den durch MPG ermittelten gesamten Infektionen werden 100% (17/17) durch QG-HPV V1 detektiert.

Diese Infektionen liegen in den gewerteten 15 der 16 Patientenproben vor (Tab. 20). In zwei Proben (#174, #292) wurden multiple Infektionen detektiert. Im Falle der HPV16 positiven Proben

wurde eine Übereinstimmung der richtig-positiven Ergebnisse von 100% (11 von 11), für HPV18 von 100% (3 von 3) und für HPV45 100% (3 von 3) erreicht (bezogen auf die MPG-Ergebnisse).

Auffällig war, dass in ca. 85% aller untersuchten Proben, welche kein HPV45 enthielten (nach MPG), trotzdem ein positives Ergebnis für HPV45 vorlag (11/13). Dies lässt sich durch den vorher beschriebenen unspezifischen Hintergrund der HPV45 Sonde erklären. HPV6 wird in 3/16 HPV6-negativen Proben falsch-positiv gemessen. Auch hier handelt es sich evtl. um einen zu hohen unspezifischen Hintergrund der HPV6 Sonde, da diese auch schon mit kultiviertem Zellmaterial falsch-positive Ergebnisse lieferte. Es wurden mit Ausnahme für einen falsch-positiven Wert für HPV59 (Probe 292, jedoch nur beschränkt beurteilbar, siehe Tab. 20), ausschließlich HPV6 und HPV45 falsch-positiv gemessen. Bei den meisten Proben handelte es sich jedoch um verhältnismäßig niedrige falsch-positive Werte.

Ausgenommen aus der Berechnung der Sensitivität wurde Probe 320. Dort zeigen die Rohdaten (Tab. 19) einen vergleichsweise sehr geringen Wert für ACTB. Daraus lässt sich schließen, dass in der Probe nur sehr geringe Mengen an zu messenden Zellen vorhanden waren. Des Weiteren lag laut pathologischem Befund (Tab. 20) nur eine CIN 1/PAP 2 bei Zervizitis vor, was die Genauigkeit weiter beeinflussen kann. Es muss also davon ausgegangen werden, dass keine oder zu wenig E7 mRNA in der Probe vorhanden waren.

Das Ergebnis für HPV59 und 31 konnte vom QG-HPV V1 Assay nicht bestätigt werden. Sie waren lediglich in den ausgeschlossenen Proben 233 (HPV59) und 320 (HPV31) vorhanden.

5 Diskussion

Für die vorliegende Arbeit wurde ein auf der QuantiGene 2.0 Plex – Assay Plattform von Affymetrix/eBioscience basierender Nachweistest für HPV E7 mRNA in Kooperation mit der Firma Affymetrix entwickelt. Der Nachweistest wurde als möglicher Früherkennungstest für potentiell maligne hr-HPV-Infektionen konzipiert. Dafür wurde zunächst die passende Ziel-mRNA definiert und die entsprechenden mRNA-Detektionssonden ausgewählt oder wenn erforderlich, neu entwickelt. Mit Hilfe von definierten, HPV-positiven Zelllinien wurde dann unter Aspekten wie technischer Sensitivität, Spezifität und Handhabung (z.B. optimales Ausgangsmaterial, Transportmedium, Robustheit etc...) die generelle Funktionalität und Durchführbarkeit untersucht und entsprechend optimiert. Es konnte der Prototyp eines Assay etabliert werden, welcher generell in der Lage ist die in der derzeitigen Testversion des QG-HPV-Assays (V1) nachweisbaren HPV-Typen 16, 18, 31, 45, 59 und 68 korrekt und ausreichend sensitiv zu qualifizieren und quantifizieren. Eine erste Testung an klinischem Material brachte positive Ergebnisse, weshalb eine Übertragbarkeit der Anwendung auf klinisches Material anzunehmen und somit die Basis für eine ausführliche klinische Testung des Assays gegeben ist.

5.1 Entwicklung und generelle Funktionalität der Gensonden zum E7-mRNA-Nachweis

Als erster Schritt für die Sondenentwicklung mussten die benötigten spezifischen Sondensequenzen identifiziert werden. Aus einer Auswahl von besonders oft mit einem Zervixkarzinom assoziierten HPV-Typen, wurden zunächst 6 hr-HPV Typen für den ersten Assay-Prototypen ausgewählt, vorrangig jene, für die auch kultivierbare HPV-positive Zelllinien für die Testung verfügbar waren. Darunter auch die in Zervixkarzinomen am häufigsten vorkommenden hr-HPV-Typen 16, 18, 31 und 45, die dementsprechend besondere klinische Bedeutung besitzen (71). Außerdem wurde noch der lr-HPV-Typ 6 hinzugefügt, um zu testen, ob auch diese HPV-Typen im Prinzip nachweisbar sind. Um die jeweiligen Testergebnisse durch interne Kontrollen abzusichern und die Expressionsstärke auf die Abstrichzellularität relativieren zu können und so die Aussagekraft der Messergebnisse des Assays zu erhöhen, wurden außerdem drei Referenzmarker als interne Kontrolle ausgewählt. Als Marker für die relative vorhandene Zellzahl wurden die häufig in molekulargenetischen Testverfahren als Kontrolle verwendeten Referenzgene Actin- β und HPRT1 ausgewählt. Um zusätzlich noch den Anteil hr-HPV infizierter Zellen an der Gesamtzellzahl zu bestimmen, wurde der Biomarker p16^{INK4a}(CDKN2A) in das

Assay mit aufgenommen. Er wird in höhergradigen Dysplasien und Karzinomzellen überexprimiert, die hr-HPV induziert sind und ist somit ein verlässlicher Marker für diese Zellen (21).

An unseren Kooperationspartner Affymetrix wurde dann die GenID Nummern der von uns ausgewählten HPV Genotypen und der Referenzgene aus der Genbank des NCBI gegeben sowie die Angabe des *open reading frame* (ORF) für das E7 Gen. Hieraus wurden von Affymetrix die geeignetsten Sequenzen mittels eines eigenen Algorithmus identifiziert, synthetisiert und die Assay-Reagenzien damit hergestellt. Dieses Kit wurde dann zur Austestung und Bestimmung der Sensitivität, Spezifität und der Durchführungsbedingungen an uns verkauft. Auf diesem Weg konnte letztendlich ein Kit bereitgestellt werden mit insgesamt 10 verschiedenen Gensonden. Sechs dienten dem Nachweis der HPV-Typen 16, 18, 31, 45, 59, 68 und 6, drei weitere dem Nachweis der Marker Actin- β , CDKN2A und HPRT1.

Zur Testung des Prototyp-Assay wurden fast ausschließlich definierte, kultivierte Zervixkarzinomzelllinien mit entsprechenden HPV-Infektionen ausgewählt, welche zuvor noch einmal per PCR basierter Genotypisierung (MPG) verifiziert wurden. Sie lassen sich in gewünschter Anzahl kultivieren, weshalb sie sich besonders gut für eine erste Testung der Spezifität der einzelnen mRNA-Sonden eignen.

Bei den HPV-positiven Proben handelte es sich um HPV 16, 18, 45, 59 und 68 positive Zelllinien, die aus Zervixkarzinomen etabliert worden waren, jeweils mit Monoinfektion (siehe Punkt 2.1.1). Als Negativproben wurden sowohl die HPV-negativen C33a-Zervixkarzinomzellen (HPV-neg., pos. für alle drei Referenzgene), als auch die nicht-humanen, HPV-negativen NIH 3T3-Zellen (neg. für alle getesteten Transkripte bis auf HPRT1 wegen spezieübergreifender Kreuzreaktion) verwendet. Die Leerproben enthielten entsprechend kein Probenmaterial.

Ein wesentlicher Vorteil unseres konzipierten Testsystems ist die Möglichkeit zur genauen Genotypisierung jedes vorhandenen hr-HPV Typen (typenspezifisch). Viele in der aktuellen Diagnostik verwendeten HPV-Tests (darunter auch der momentane Goldstandard, der HC2-Test, der Cervista® HR/HPV-Test, oder der auf mRNA-Nachweis basierende APTIMA® HPV-Test) sind lediglich in der Lage durch den Einsatz sogenannter „Konsensusprimer bzw. -sonden“ eine generelle Infektion mit einem oder mehreren der nachweisbaren HPV-Typen zu identifizieren, eine genaue Genotypisierung findet nicht statt (41, 44, 52). Einige Hersteller bieten Testverfahren an, welche die bedeutendsten hr-HPV-Typen 16 und 18 typenspezifisch nachweisen können (z.B.

Cervista® HPV 16/18 Test oder das Cobas®-4800 System). Alle anderen Typen werden nur als Gruppe angezeigt (43, 46).

Da jeder HPV-Typ ein unterschiedlich hohes Vorkommen in hochgradigen Dysplasien und Zervixkarzinomen aufweist, aus welchem ein unterschiedlich hohes, kanzerogenes Potential abgeleitet werden kann (9, 10), trägt die genaue Kenntnis über den HPV-Typen dazu bei, das individuelle Risikopotential der jeweiligen Patientin für die Entstehung eines Zervixkarzinoms besser bestimmen zu können und so die passende Therapie bereitzustellen. So kann z.B. bei Zustand nach Konisation zwischen Persistenz einer schon zuvor vorhandenen, evtl. auch in der entfernten Läsion nachweisbaren Infektion und einer nach der Konisation bzw. nach dem Zeitpunkt der letzten Testung neuerworbenen Infektion (geringerer Persistenzzeitraum) mit einem anderen HPV-Typen unterschieden werden. Dies ermöglicht eine bessere Einschätzung des Therapieerfolges und eine typenspezifische Abschätzung des Karzinomrisikos für die Patientin.

Lr-HPV-Typen, allen voran HPV6 und HPV11, sind häufig mit der Entstehung von Condylomata acuminata assoziiert (72). Daher ist ihre Erfassung für epidemiologische Untersuchungen zu Inzidenzen und Prävalenzen von Lr-HPV-Typen von Bedeutung. Außerdem kann durch die Erfassung eines möglichst breiten Spektrums an bekannten HPV-Typen (hr- und Lr-Typen) in einer klinischen Probe das Risikoprofil der einzelnen HPV - Typen weiter präzisiert werden. Das QG - HPV V1 Assay lässt sich um bis zu 80 potentiellen Sonden für weitere zelluläre Marker, hr- und Lr-HPV-Typen zur spezifischen Genotypisierung erweitern. Somit lässt sich das Spektrum detektierbarer HPV – Typen und relevanter Zellmarker in der HPV – Diagnostik zur Früherkennung der Zervixkarzinoms in Zukunft weiter vergrößern.

Sowohl bei der Messung verschiedener HPV-Typen in einem Ansatz, als auch in Proben mit je nur einem enthaltenen HPV-Typen war das QG-HPV V1 Assay in der Lage verschiedene HPV-Typen in einem Ansatz spezifisch zu differenzieren und im Einzelnen (HPV16, 18, 31, 45, 59 und 68) korrekt zu identifizieren.

Die E7-mRNA-Gensonden der HPV-Typen 16, 18, 45, 59 und 68 erreichten mit kultiviertem HPV-positivem Zelllinienmaterial eine Sensitivität von 100%. Dies gilt nicht nur für den jeweiligen HPV-Typ, sondern auch für die drei zellulären Marker (ACTB, HPRT1 und p16 [CDKN2A]). Unter den getesteten Sonden kam es mit Ausnahme von HPV6 zu keinem falsch-negativem HPV-Ergebnis.

HPV31 und 6 konnte nur mit Patientinnenmaterial getestet werden, da für diese HPV Typen kein Zelllinienmaterial verfügbar ist. Die vorliegende HPV-Infektion wurde zuvor per MPG-Methode verifiziert und die entsprechenden Proben für die Testung der beiden Sonden verwendet. Die Sonde für HPV Typ 31 E7 mRNA zeigte ebenfalls in jeder Messung richtig positive Werte. HPV 6 hingegen konnte in einer HPV6 enthaltenen klinischen Probe durch das Assay nicht bestätigt werden (siehe 4.1.2) und lieferte insgesamt drei positive Ergebnisse, welche mittels PCR-basierter MPG-Methode jedoch nicht verifiziert werden konnten und somit als falsch positiv gewertet wurden (siehe 4.4.1). Da aber wegen Mangels geeigneten Materials insgesamt nur eine (Patientinnen-) Probe mit HPV6 - Infektion gemessen wurde, kann noch keine abschließende Beurteilung der HPV6 - Sonde erfolgen, bedarf aber in der Zukunft einer besonders kritischen Beurteilung.

Da in zukünftigen Assay-Versionen vorerst auf die Testung von lr-HPV Typen verzichtet werden soll, wurde diese Sonde nicht weiter verfolgt.

Als Negativkontrolle wurde die HPV negative Zervixkarzinomzelllinie C33a eingesetzt. Diese zeigte korrekterweise deutlich positive Reaktion für die zellulären Marker ACTB und HPRT1, sowie CDKN2A, welcher sonst ausschließlich in durch HPV transformierten Zellen vorkommt, in C33a-Zellen jedoch trotz fehlender HPV-Infektion aus noch ungeklärten Gründen nachgewiesen werden kann. Die MFI-Werte für sämtliche HPV E7-Transkripte liegen bei dieser Zelllinie nahe dem Leerwert. In höheren Konzentrationen (40.000 – 1.481 infizierten Zellen/40µl) beobachtet man einen geringfügig höheren (wenige MFI) Hintergrundwert. Da diese Signale über die Titration hinweg relativ stabil bleiben, kann hier von einer unspezifischen Hintergrundreaktion ausgegangen werden. Das Assay zeigt also für keinen der HPV-Typen falsch-positive Signale mit dieser Zelllinie.

Bei einer Gegenüberstellung dieser Negativkontrolle mit einer multipel positiven Kontrolle aus einer Mischung verschiedener hr-HPV positiven Zelllinien, die ebenfalls titriert wurde, kann eine erste Einschätzung vorgenommen werden, bei welcher theoretischen Menge HPV-infiziertem Materials das QG-HPV V1 Assay noch eine deutliche, typenspezifische Differenzierung zwischen infizierten und nicht-infizierten Zellen ermöglicht.

Die Gegenüberstellung der HPV-positiven Werte (HPV16, 18, 45, 59 und 68) mit der Negativkontrolle (C33a), weist auf eine eindeutige Differenzierung der Zervixkarzinomzellen hinsichtlich der jeweiligen HPV-Infektion noch bei sehr geringen Zellkonzentrationen hin. Bei einer Konzentration von ca. 11 HPV-infizierten Zellen/HPV-Typ (Verdünnung: 1:729) lässt sich

für jeden HPV-Typ noch ein in Relation zu den HPV-negativen Zervixkarzinomzellen höherer MFI-Wert feststellen (siehe Abb. 6).

Setzt man nun die errechnete Nachweisgrenze (LOD) und die Erfassungsgrenze (EG) als maßgebliches Kriterium für den Nachweis eines Analyten (LOD) bzw. seine Quantifizierung (EG) ein, so ergibt sich ein korrekter qualitativer und quantitativer Nachweis für die jeweiligen Analyten bei einer Verdünnung von 1:243 (ca. 33 HPV-infizierten Zellen/HPV-Typ). Da es sich bei dem QG-HPV V1 Assay auch um ein quantifizierendes System handelt, lässt sich nur bei Zellkonzentrationen welche auch die EG überschreiten ein ausreichend sicherer Rückschluss auf eine mögliche klinische Anwendung ziehen.

Das bedeutet, die MFI-Werte für sämtliche enthaltenen HPV E7-Transkripte liegen bei einer errechneten Zellzahl von ca. 33 HPV-infizierten Zellen/HPV-Typ/Well immer noch über der Nachweisgrenze und der Erfassungsgrenze. Die der nicht enthaltenen aber nachweisbaren HPV-Typen (HPV 31 und 6) liegt darunter. Somit lässt sich bei dieser Karzinomzellkonzentration die enthaltene E7-mRNA für alle Analyten durch das QG-HPV V1 Assay sicher quantifizieren und qualifizieren.

Auffällig ist dabei jedoch ein hoher Unterschied der MFI-Werte zwischen den einzelnen HPV E7 mRNA's, obwohl die Zellkonzentration für jede der HPV-positiven Zelllinien ungefähr gleich ist. So lässt sich bei der gleichen Konzentration (z.B. für 33 HPV-positive Zellen/ Messung) bei HPV68 noch ein um 15 fach erhöhter MFI-Wert über dem errechneten MFI-Wert des LOD erkennen, wohingegen die MFI-Werte für die anderen enthaltenen E7-Transkripte nur um das 1,7 fache (HPV16) oder das 0,6 fache (HPV45) des MFI-Wertes des LOD erhöht sind. Das hat zur Folge, dass ab einer Konzentration von 1:729 die beiden HPV-Typen mit den niedrigsten Messwerten (HPV45, 59) unter der Erfassungsgrenze liegen, somit also als nicht quantifizierbar gelten. Alle anderen Werte können bei dieser Konzentration (11 HPV-positive Zellen/ Messung) unter Verwendung der EG noch korrekt abgebildet werden (siehe Tab. 14).

Betrachtet man die auf ACTB normalisierten Werte (Siehe z.B. Abb. 9), die mit den identischen Zelllysaten generiert worden sind, so lassen sich starke Unterschiede in der HPV-mRNA Konzentration/Zelle zwischen den verschiedenen Zelllinien erkennen, die wahrscheinlich für diese Schwankungen verantwortlich sind und ähnliche Relationen untereinander aufweisen. Möglich wäre, dass die verschiedenen Zelllinien tatsächlich unterschiedliche Mengen an E7 mRNA exprimieren, evtl. beeinflusst durch Faktoren wie z.B. der jeweiligen Passage oder Zelldichte.

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Sensitivität der eingesetzten E7 mRNA-Sonden untereinander tatsächlich unterschiedlich hoch ausfällt, wodurch ebenfalls unterschiedlich hohe E7 mRNA-Werte/Zelle dargestellt werden könnten. Das würde bedeuten, dass mit Ausnahme der beiden Sonden für HPV45 und 59, das Assay sogar in der Lage ist einen Nachweis von ca. 11 HPV-positiven Zellen zu liefern.

Letztendlich bedarf es weiterer experimenteller Abklärung, um die unterschiedlich hohen MFI – Werte zwischen den verschiedenen Zelllinien bei gleicher Zellzahl hinreichend zu erklären. So müsste für jede Zelllinie die genaue Menge an enthaltener E7 mRNA/Probe mittels eines etablierten Nachweisverfahrens, z.B. mittels rtPCR, ermittelt werden. Das Ergebnis der rtPCR könnte dann in Relation zu der mit dem QG-HPV V1 Assay gemessenen MFI und der theoretischen Zellzahl in der Probe gesetzt werden. Dadurch wäre es möglich sowohl die vom QG-HPV V1 gemessene MFI/E7 mRNA – Menge (und damit die Sensitivität der jeweiligen E7 mRNA - Sonde), als auch die E7 mRNA/Zelle für jede der verwendeten Zelllinien zu bestimmen.

Die Zellzahl kann somit nur als ungefährender Richtwert für die Sensitivität des Assays verwendet werden. Für uns ausschlaggebend ist, dass alle enthaltenen HPV Typen in einer Probe erkannt werden und noch in geringsten Konzentrationen (33 – einige Sonden sogar bei bis zu 11 - HPV- positive Zellen/HPV-Typ) eine ausreichende Differenzierung positiver (> 1 SD über dem LOD) und negativer Werte mit Hilfe des Assays erfolgen kann.

Diese Aussage gilt jedoch nur eingeschränkt. Bei höheren Zellkonzentrationen ab ca. 1.000 Zellen (sowohl HPV-positiv als auch –negativ) liegt der unspezifische Hintergrund der Sonden (außer für HPV6) über dem LOD und steigt dabei in Korrelation zur Gesamtzellzahl leicht an (siehe z.B. MFI der nicht enthaltenen E7 mRNA, Tab. 11). Bei ca. 1.000 sind es ≤ 10 MFI, so dass mit Hilfe des errechneten LODs keine klare Trennung mehr zwischen Positiv- und Negativsignal möglich ist, wobei die Differenz der MFI zwischen HPV-positivem Zellpool und HPV-negativen C33a-Zellen für alle E7 mRNA-Sonden bei einer Konzentration von 1:9 (ca. 889 Zellen) einen Unterschied von $>$ einer log-Stufe bzw. mehrere Hundert bis Tausend MFI aufweisen (siehe dazu Punkt 4.1.1, Abb. 6 A und Tab. 12).

Das stärkste Hintergrundsignal zeigte dabei die Sonde für HPV45 und das in jeder Karzinomzellprobe, auch bei der HPV-negativen C33a, nicht jedoch in den beiden Patientinnenproben (HPV6 und 31) und der nicht-humanen Karzinomzelllinie NIH 3T3. Der MFI-Wert für HPV45 liegt dabei häufig über dem errechneten LOD. Dieser Effekt zeigt sich in fast jeder Messung (siehe z.B. Punkt 4.1.2, Abb. 7; Punkt 4.3.1, Tab. 16) und nimmt mit jeder

Titrationstufe linear ab. Bei der Messung der klinischen Proben kommt es sogar bei 80% der gemessenen Proben zu einem falsch-positiven Ergebnis für HPV45. Eine Kontamination kann ausgeschlossen werden, da:

- Sowohl kultivierte, als auch Patientenproben grundlegend kontaminiert sein müssten. HPV 45 wurde mittels MPG-Methode in keiner der Proben gemessen (außer den HPV45 positiven MRHI-215-Zellen).
- Eine Kontamination während der Probenvorbereitung auch die Leerproben und die nicht-humanen NIH-3T3 betreffen müsste.

Eine Kreuzreaktivität der HPV45 Sonde kann somit nicht ausgeschlossen werden und sie eignet sich damit nicht für die klinische Anwendung. Sie bedarf deshalb einer Überarbeitung, um die Spezifität zu verbessern.

Auch die Sonde für HPV6 bedarf einer kritischen Prüfung, falls irgendwann der Bedarf besteht sie dauerhaft in das Assay mit aufzunehmen. In dieser Arbeit konnte sie jedenfalls kein richtig-positives Signal liefern (Punkt 4.1.2). Die Funktionalität dieser Sonde ließ sich somit nicht bestätigen.

Um eine ausreichende Sensitivität aber auch Spezifität für das Assay zu erreichen, muss man also einerseits eine möglichst geringe Zellkonzentration einsetzen, um den unspezifischen Hintergrund auf ein Minimum zu verringern und damit die Spezifität zu verbessern (weniger falsch-positive Ergebnisse). Andererseits muss die Zellmenge noch ausreichend hoch sein, um positive Signale der enthaltenen E7-mRNA zu erhalten, sprich eine hohe Sensitivität zu erhalten. Für das QG-HPV V1 Assay liegt dieser Bereich zwischen ca. 33-1000 HPV-positiven Zellen/gemessener Probe. Ideal sind Mengen im unteren Drittel. Dies wäre eine Zellzahl, die man in Abstrichproben erwarten kann.

Mit dieser Zellzahl lässt sich nun eine ungefähre Vorstellung darüber gewinnen, wo der optimale Arbeitsbereich des Assays bezogen auf die nachzuweisenden infizierten Zellen liegt. Nun muss noch die Frage geklärt werden, ob und inwieweit die Sensitivität des Assays durch Anwesenheit von HPV-negativem Zellmaterial, sprich großer Mengen anderer mRNA's, beeinflusst wird. Ein HPV-Test muss auch bei Proben mit einer hohen Konzentration an Zellmaterial verlässliche Ergebnisse liefern, da in einer zu messenden Probe sowohl die absolute Menge an Zellmaterial, als auch das Verhältnis zwischen relevanten (in diesem Fall HPV-infizierten) und irrelevanten Zellen stark variieren kann.

Um den Einfluss solcher Störfaktoren auf die Ergebnisse des QG-HPV-V1 Assays darzustellen, wurde mit kultivierten Zellen der Unterschied der Signalstärke zwischen einer rein HPV positiven Probe (Monoinfektion) und einer mit HPV-negativen Zervixkarzinomzellen (C33a) versetzten, HPV-positiven Probe mit identischer HPV-Infektion und Zellzahl untersucht (Einfluss der Zellkonzentration auf das Messergebnis, siehe Punkt 4.3.1). Die Menge an HPV-positivem Material war in beiden Proben identisch (100% = 4.500 Zellen). In der gemischten Probe wurde jedoch durch die C33a-Zellen die Gesamtzellzahl der Probe erhöht (100% = 4.500 HPV-positive + 35.500 HPV-negative Zellen = 40.000 Zellen). Somit hat man zwei Proben mit identischer Menge an HPV-positivem Material des gleichen Typs (4.500 Zellen), jedoch unterschiedlicher Gesamtzellzahl (4.500 vs. 40.000 Zellen) Durch die Titration der beiden Proben kann dann beurteilt werden, ob und ab welcher Zellkonzentration ein Unterschied in der Signalstärke der HPV E7-mRNA zu beobachten ist.

Man sieht, dass der hohe zelluläre Hintergrund (100% = 40.000 Zellen) von HPV-negativen Zervixkarzinomzellen (C33a) das Signal vermindert. Die Proben mit geringerer Zellzahl (4.500 Zellen) zeigen eine um 54% - 126% höhere MFI für den jeweils enthaltenen HPV-Typ als die Probe mit hoher Zellzahl (40.000 Zellen). Doch schon ab einer Zellzahl von 4.000 (vs. 450) Zellen (10%) ist in der Titration das gemessene Signal der HPV Typen 16, 18, 45, 59 und 68 zwischen beiden Ansätzen vergleichbar (Punkt 4.3.1, Abb. 13 A-E). Der mittlere CV (gemittelt durch die 3 CV's zwischen beiden Proben der Titrationsstufen 10%, 1% und 0,1%, ausgenommen 100%, da dort hoher Signalunterschied erkennbar) beträgt für HPV 16: 6,9%, HPV 18: 7,1%, HPV 45: 12,4%, HPV 59: 16% und HPV 68: 13,6%. Der CV als Maß für die Streuung der Werte zwischen hoch- und normalkonzentrierter Probe liegt somit im Mittel für die absteigende Titration ab 450 HPV-Zellen/4.000 Zellen für alle untersuchten HPV-Typen bis auf HPV59 (mit 16% knapp darüber) unter dem Soll-Wert von 15%, d.h. es gibt keine größeren Interferenzen durch andere mRNA's.

Einen weiteren interessanten Aspekt stellt das Verhalten der drei zellulären Marker (ACTB, CDKN2A und HPRT1) bei hohen und niedrigen Zellkonzentrationen dar. ACTB, ein Marker für die Gesamtzellularität der Probe, erreicht häufig schon bei einer Zellzahl von 4.500 (geringkonzentrierte Probe) eine MFI von durchschnittlich um die 20.000 (siehe Tab.16). Bei einer fast 10mal höheren Zellkonzentration (40.000) wird dieser Wert kaum überschritten. Die MFI der anderen beiden Referenzgene hingegen liegen bei dieser Zelldifferenz deutlich weiter auseinander. Erst ab dem ersten Verdünnungsschritt (4.000 vs. 450 Zellen) ist ein deutlicher Unterschied auch bei der MFI von ACTB zu erkennen. Das legt die Vermutung nahe, dass entweder die Sonde für

ACTB im Gegensatz zu den anderen beiden Referenzgenen bei einer vergleichsweise geringen mRNA-Menge schon im Sättigungsbereich liegt oder aber bei vergleichbarer Sättigung die mRNA für ACTB weitaus höher exprimiert wird. Somit eignet sie sich nicht als Referenz bei Proben mit hohen Zellkonzentrationen schätzungsweise ≥ 4.500 Zellen. Die Verwendung der einzelnen Referenzgene wird unter Punkt 5.2 weiter diskutiert.

Eine Erklärung für den signalmindernden Effekt auf die HPV E7-mRNA bei hoher Zellkonzentration (40.000 Zellen) wäre ein erschwerter Zugang zur Ziel-mRNA für die Sonden auf Grund der hohen Dichte an zellulärem Material. Dadurch sinkt der Anteil an gebundener HPV E7-mRNA und die MFI verringert sich. Mit sinkender Konzentration anderer mRNA's minimiert sich auch deren Einfluss auf die Bindungsaffinität der Ziel-mRNA, bis sie eine störungsfreie Grenze unterschritten hat und kein weiterer Einfluss mehr auf die Signalstärke besteht.

Da diese beiden beobachteten Effekte jedoch nur bei sehr hohen Konzentrationen an zellulärem Material zu beobachten sind, deren MFI (> 10.000) zumindest in den hier gemessenen klinischen Proben praktisch nie erreicht wurde (siehe Punkt 4.4.1), könnten diese Effekte für einen Großteil der klinischen Proben keine Relevanz haben. Da man jedoch vorher nicht weiß, wie hoch die Zellkonzentration in einer Probe wirklich ist, empfiehlt es sich bei Messungen mindestens einen weiteren Verdünnungsschritt je Probe z.B. um den Faktor 10 (10%) durchzuführen. Bei zu hohen Zellkonzentrationen lässt sich so das Ergebnis zusätzlich absichern. Durch diese Absicherung erhöht man die Wahrscheinlichkeit bei geringkonzentrierten Proben noch genügend mRNA für einen Nachweis zu erhalten und verringert bei hochkonzentrierten Proben Interferenzen z.B. durch zu viel Ziel-mRNA (Sättigung der Sonden, unspezifischer Hintergrund) oder andere mRNA's (relative Signalminderung).

5.2 Robustheit der Methode durch Messung der Variationskoeffizienten in Replikas und Versuchswiederholungen. (Intra-/Interassay- /Interobserver Variation)

Ein wichtiger Aspekt bei der Anwendung diagnostischer Messverfahren ist die Reproduzierbarkeit der erhaltenen Ergebnisse. Nur so lassen sich die Messergebnisse vergleichen und damit hinreichend interpretieren. Ein genaues Messverfahren sollte einem genauen Protokoll folgen, mit standardisierten Abläufen (Anzahl der verwendeten Mengen, gut reproduzierbare Handgriffe,

feste Zeiten etc.). Viele HPV-Tests versuchen deshalb möglichst viele Prozesse zu vereinheitlichen. Das Cobas®-4800 System z.B. hat mit Ausnahme der Übertragung der Platte von einer zur anderen Einheit den gesamten Nachweisprozess (inkl. Probenaufbereitung) automatisiert, um die Reproduzierbarkeit zu steigern (73). Neben der Durchführung nimmt natürlich auch das verwendete Nachweisverfahren an sich Einfluss auf die Genauigkeit der Ergebnisse.

Aus diesem Grund wurde ein möglichst genaues Versuchsprotokoll konzipiert, welches bei allen Experimenten und von allen Experimentatoren verwendet wurde.

Für die Messungen der sechs Replikate im Intraassay-Vergleich mit HPV16, 18, 45, 59 und 68 positiven Zelllysaten zeigt sich für die zellulären Marker und die HPV E7 mRNA eine Intra-Assay-Varianz von unter 15% (vorbestimmter Soll-Wert). Der CV der verschiedenen HPV-Werte liegt, mit Ausnahme der Werte für HPV68, unter 10%.

Die Relativierung der vorliegenden HPV-mRNA-Werte auf das Referenzgen ACTB (ausgewählt, da geringsten CV unter den Referenzgenen: ACTB = 6,31% vs. HPRT1 = 10,94%) führte zu einer Reduktion des CV für alle Werte (<10%) (vergleiche dazu Punkt 4.2.1, CV in Tab. 15 und Abb. 9).

Um die Varianzen im Folgenden besser vergleichen zu können, wurden alle weiteren Ergebnisse auf das Referenzgen ACTB normalisiert. In diesem Fall eignete sich ACTB als Referenz am besten, weil die Werte die geringste Streuung aufweisen. Betrachtet man jedoch die Mittelwerte aller Referenzgene (z.B. Tab. 11), so zeigt sich ein Unterschied in der absoluten Signalstärke der einzelnen Transkripte. Während ACTB mit einem Mittelwert von 11803,8 MFI recht hoch liegt, beträgt der MFI-Wert von HPRT1 2631,3. In verschiedenen Experimenten konnte diese Relation zwischen den Referenzgenen im ähnlichem Maße beobachtet werden (siehe z.B. HPV Messungen unter den Punkten 4.1.1; 4.1.2 und 4.1.3). ACTB wäre auf Grund seines recht hohen Ausgangswertes bei einem hohen Anteil normalen Zellabstrichmaterials in der klinischen Probe schnell auf einem sehr hohen Niveau zum Teil über dem Sättigungsbereich der Sonde, wodurch sie als Referenzwert nicht mehr zu verwenden wäre. Diesem schon bei der Sondenentwicklung diskutierten Problem (siehe Punkt 5.1) lässt sich durch einen zusätzlichen Verdünnungsschritt der Probe entgegenwirken. Durch die dann nötigen, zusätzlichen Messungen würden dann aber erhöhte Kosten entstehen.

Alternativ könnte man bei sättigendem ACTB-Wert den niedrigeren HPRT1-Wert zur Relativierung der E7 mRNA-Werte verwenden. Diese Hypothese lässt sich jedoch erst in größeren, klinischen Versuchsreihen überprüfen.

Ein interessanter weiterer Aspekt zeigt sich, wenn man die einzelnen Werte der Messungen P1-P6 aus Tab. 15 in absteigender chronologischer Reihenfolge betrachtet. Es kommt zu einem linearen Abfall der Signalstärke bei einigen Analyten. Während des Versuchs kam es zu keinen zusätzlichen Verzögerungen oder Wartezeiten. Dieser Effekt muss also schon nach relativ kurzer Zeit eingesetzt haben.

Dieser lineare Abfall der MFI von P1-P6 (siehe Abb. 8), vornehmlich bei den Analyten mit Werten > 10.000 MFI (ACTB, CDKN2A, HPRT1, HPV 18 und HPV 68), könnte verschiedene Ursachen haben. Denkbar wäre z.B. eine Art „Verblassungseffekt“, der im Laufe der Zeit eintritt. Da der mit den Beads gekoppelte Fluoreszenzfarbstoff (SAPE) sehr lichtempfindlich ist, kann eine zu starke Lichtexposition eine Ausbleichung des Fluoreszenzfarbstoffs induzieren, die wiederum zu einer kontinuierlichen Abnahme des emittierten Lichtsignals führen könnte. Somit würde das vom Luminex gemessene Signal im Schnitt von Messung zu Messung abnehmen. Warum dieser Effekt dann aber besonders stark bei den hohen Werten zu beobachten ist, würde dadurch nicht erklärt werden. Da alle drei zellulären Marker, wie auch hier zu sehen, immer mit die höchsten MFI-Werte aufweisen, kann es bei solch hochkonzentrierten Proben zu Verzerrungen von Werten kommen, wenn man die HPV mRNA (die gleich bleibt) mit Hilfe z.B. von ACTB (welches mit der Zeit abnimmt) quantifizieren möchte. Auch in diesem Fall könnte die bereits erwähnte Verdünnung der Probe Abhilfe schaffen. Denn auch dieser mögliche „Verblassungseffekt“ des Fluoreszenzfarbstoffes, welcher bei allen Sonden der gleiche ist, lässt sich nur bei sehr hohen MFI-Werten beobachten, die in niedriger konzentrierten Proben nicht erreicht werden.

Die CVs zwischen verschiedenen Messungen desselben Experimentators (Inter-Assay-Varianz) nehmen im Vergleich zur Intra-Assay-Varianz deutlich zu. Der Wert von unter 10% wird nur noch von drei HPV-Werten von insgesamt fünf erreicht, einer (HPV45) liegt sogar knapp über dem Sollwert von 15% (Punkt 4.2.2, Abb. 10). Dabei handelt es sich um die als fehlerhaft eingestufte Sonde. Eine nötige Bestimmung der Inter-Assay Varianz kann also erst nach einer erneuten Überarbeitung der HPV45 Sonde erfolgen.

Es wurde eine maximale Inter-Assay-Varianz von 15% angenommen. Die hier gemessene Varianz, wieder ausgenommen der als fehlerhaft geltenden HPV45 Sonde, würde ausreichen, um valide Ergebnisse zu liefern (unter Sollwert von 15%).

Für die Sonden für HPV6 und 31 kann wegen Mangels an geeigneten Proben keine Aussage getroffen werden.

Ein sogar besseres Ergebnis liefert die Interobserver-Varianz. Hier liegen die CVs alle unter 10%. Auch hier führt eine Relativierung der gemessenen MFI-Werte auf ACTB zu einer Reduktion der Streuung. Da es sich hierbei um Messungen handelt, bei denen ausschließlich HPV16 positives Material verwendet wurde, kann hier lediglich über das Verhalten der zellulären Marker und der HPV16 Sonde diskutiert werden. Eine Testung mehrerer HPV-Typen durch Experimentator 2 war leider aus organisatorischen Gründen nicht möglich, weshalb hier lediglich HPV16 als wichtigster Vertreter der hr-HPV-Typen ausgewählt wurde. Auch die Einbeziehung eines dritten Experimentators war auf Grund des Mangels an in der Methode ausreichend eingearbeiteter Personen nicht möglich. Mit $n = 3$ (Exp. 1) und $n = 4$ (Exp. 2) Messungen kann zwar noch nicht von einer hohen statistischen Relevanz der Daten gesprochen werden, doch lässt sich in Verbindung mit den Ergebnissen der Inter- und Intra-Assay Varianz durchaus eine positive Beurteilung abgeben. Die Streuung der Daten überschreitet in allen drei Versuchen nicht den CV von 15%, was bedeutet, dass das Assay ausreichend reproduzierbare Ergebnisse liefert. Die Robustheit der Methode reicht also aus, um weiterführende Untersuchungen mit ihr durchzuführen. Über die Präzision der Sonden für HPV 6, 31 und 45 lässt sich jedoch keine Aussage treffen.

5.3 PreservCyt als optimales Medium zur Probenaufbewahrung

Um verlässliche Ergebnisse durch unser QG-HPV-V1 Assay zu erhalten ist es unerlässlich ein geeignetes Fixier- und Transportmedium für die zu messenden Proben zu finden. Sensitive Gensonden und ein optimiertes Versuchsprotokoll können nur zu präzisen und vor allem reproduzierbaren Ergebnissen führen, wenn die Probe im bestmöglichen Zustand gemessen werden kann. Das bedeutet, dass die Zielstruktur, in diesem Fall mRNA, so gut es geht im originalen Zustand erhalten bleibt und zwar über einen möglichst langen Zeitraum und weitestgehend unabhängig von äußeren Faktoren, wie z.B. Temperatur oder Licht. Des Weiteren sollte das Transportmedium möglichst gut zu handhaben sein, um es in den klinischen Alltag gut implementieren zu können und selbst keine Interferenzen bei den Messungen mit dem QG-HPV V1 Assay zu erzeugen.

Aus diesem Grund wurden vier verschiedene Transportmedien miteinander verglichen:

1. vLys aus dem QGP 2.0 Evaluation Kit: Liegt dem Kit als Lyse- und Fixiermedium bei, welches als Grundlage unseres Assays dient und somit gut auf unser System abgestimmt sein sollte.
2. PreservCyt von Hologic: Weit verbreitetes System zur Aufbewahrung von gynäkologischem Patientinnenmaterial. Findet Verwendung in flüssigkeitsbasierten Zytologiesystemen (LBC) wie ThinPrep zum zytologischen Screening des Zervixkarzinoms. Wird auch in unserem Labor verwendet und ist kompatibel mit anderen, auf dem Nachweis von Nukleinsäuresequenzen basierenden HPV-Tests, wie z.B. dem HC2 oder APTIMA HPV (74, 75).
3. BoonFix: Ein Transportmedium, welches in einem kooperierenden Labor aus den Niederlanden entwickelt und dort zur Aufbewahrung von HPV-positivem Material eingesetzt wird (Leids Cytologisch en Pathologisch Laboratorium).
4. PBS: Es besitzt keine besonderen Eigenschaften zur Konservierung von mRNA und dient deshalb als Negativkontrolle für die mRNA-konservierenden Eigenschaften der drei anderen Transportmedien.

Beim Vergleich dieser vier Substanzen zeigt PreservCyt von Hologic die besten Ergebnisse mit dem QG-HPV V1 Assay. Auch nach Aufbewahrungszeiten von bis zu 28 Tagen der zu untersuchenden Probe in PreservCyt (bei 4°C und bei RT), sind die Signalverluste $\leq 50\%$ des Ursprungssignals und liefert absolut betrachtet immer den geringsten Signalverlust für jeden hier gemessenen Analyten. Damit liefert es im Schnitt den geringsten Signalverlust. Besonders für die enthaltene HPV16 E7-mRNA konnte im Vergleich zu den anderen getesteten Medien nach 28 Tagen bei RT ein Signalverlust von 0% registriert werden und liefert damit die besten Ergebnisse bei der Konservierung von HPV16 E7 mRNA. PreservCyt zeigt sowohl im Kurzzeit- (bis 4 Tage), als auch Langzeitverlauf (28 Tage) das günstigste Konservierungsprofil der getesteten Medien, bezogen auf das im QG-HPV V1 Assay messbare Restsignal (siehe Punkt 4.3.2.1, Tab. 17).

PreservCyt stabilisiert die Ziel-mRNA auch unter Temperaturänderungen am besten unter den hier getesteten Medien. Verschiedene Temperaturen (RT und 4°C) haben im Vergleich zu den anderen Medien den geringsten Einfluss auf die Messwerte, was den Umgang mit Transport und Lagerung der Proben vereinfacht. Der Unterschied der Signalstärke zwischen den beiden unterschiedlich temperierten Proben für alle Analyten beträgt max. 50% für HPV16 (Punkt 4.3.2.1, Tab. 17 nach $t = 28$ Tagen). Es zeigt sich ein deutlicher Vorteil bei der Lagerung bei Zimmertemperatur (bei 4 von 4 Analyten geringerer Signalverlust). Größere Kühlräume wären somit nicht nötig. Dies deckt sich mit den Herstellerangaben, die eine Lagerungstemperatur von 15-30°C (Proben für den

ThinPrep PAP Test) bzw. 4-25°C (Proben für den COBAS AMPLICOR CT/NG-Test von Roche) empfehlen (76).

Bei alleiniger Betrachtung der gemessenen Signalverluste bei 4°C liefert BoonFix zwar die durchschnittlich besten Ergebnisse, fällt jedoch stark ab mit der Konservierung bei RT und ist bei Einhaltung seiner hier ermittelten, optimalen Lagerungstemperatur (4°C) den unter optimaler Lagerungstemperatur gemessenen Werten von PreservCyt unter RT stets unterlegen.

Des Weiteren lässt sich beobachten, dass selbst in einem für mRNA-Aufbewahrung ungeeigneten Medium wie PBS bei einer Lagerungstemperatur von 4°C noch Restsignale zwischen 16-46% des Ursprungssignals nach 28 Tagen gemessen werden können. Das spricht für die Robustheit der Nachweismethode gegen mRNA Degradation.

Der direkte Vergleich der auf ACTB normalisierten Messergebnisse einer identischen Zellprobe einmal aus vLys (eigentliches dafür im Kit enthaltenes Fixiermedium) und einmal aus PreservCyt (hier erstplatziertes Medium bei den Konservierungseigenschaften) kommt zu dem Ergebnis, dass die MFI der Probe aus PreservCyt über mehrere Titrationsstufen hinweg (10%, 1%, 0,1%) stabiler bleibt, als die der in vLys. aufbewahrten Probe.

Die Variationskoeffizienten als Maß der Streuung der auf ACTB normalisierten Werte verschiedener Konzentrationen zeigen akzeptable Ergebnisse für PreservCyt. HPRT1 und HPV 16 liegen für PreservCyt beide unter dem Soll-Wert (<15%), CDKN2A knapp darüber. Im Vergleich zum vLys ist die Streuung der Werte aus PreservCyt-Medium geringer. Über drei Titrationsstufen hinweg ist die Reproduzierbarkeit der Werte ausreichend. Dadurch ergibt sich auch eine gute Handhabung von mit PreservCyt asservierten Proben bei Verdünnungen.

Abschließend ist noch zu erwähnen, dass sich bei PreservCyt der schon früh einsetzende Signalverlust für CDKN2A und der deutliche Unterschied im Signalverlust der Referenzgene untereinander als problematisch erweist. Dies könnte bei Einbeziehung der zellulären Marker zu Verzerrungen der gemessenen Signale abhängig von der Lagerungsdauer führen. Wenn es an einem unterschiedlich starken Abbau der verschiedenen Ziel-mRNAs läge, so müsste dieser über einen Zeitraum unter genormten Bedingungen genau quantifiziert werden und in die Beurteilung der Messung mit einfließen, um eine Vergleichbarkeit der Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten z.B. Zweitmessungen einer Probe, herzustellen.

Generell ist zu empfehlen bei der Asservierung aller zu messenden Proben das gleiche Fixiermedium zu verwenden, da die einzelnen Analyten einer Probe untereinander von den hier

getesteten Substanzen unterschiedlich gut konserviert werden. Nur so ließe sich eine verlässliche Relation der Werte untereinander ermöglichen. PreservCyt erzielte unter den hier gemessenen Fixiermedien die besten Ergebnisse bei Signalkonservierung, Temperaturbereich und Verdünnung. Außerdem ist es in vielen Laboren verbreitet und bietet den Vorteil, dass aus der asservierten Probe ebenfalls eine zytologische Untersuchung erfolgen kann. Es wird deshalb als Erstwahl für die Konservierung von Abstrichmaterial aus dem Zervix uteri für die anschließende Verwendung durch das QG-HPV V1 Assay empfohlen und bestätigt damit seine Kompatibilität, die es auch schon mit anderen Nachweisverfahren bewiesen hat (74, 75).

5.4 Erste Einschätzung der Spezifität des QG-HPV-V1 Assays bei klinischen Proben

Die Untersuchungen an von Patientinnen stammenden Abstrichproben erlaubt eine erste Einschätzung der Anwendung im klinischen Bereich. In diesem Abschnitt soll nun an Hand einer begrenzte Zahl von Patientinnenproben (n = 16) eine erste Einschätzung darüber erfolgen, inwiefern sich die erhobenen präklinischen Daten auf die Anwendung bei Abstrichmaterial von Patientinnen übertragen lassen. Bei den für die Berechnung eingeschlossenen Proben (15/16) stellt man folgendes fest: Durch das QG-HPV V1 Assay werden 100% (17/17) aller durch das Assay detektierbaren Infektionen (ausgenommen des als Negativprobe enthaltenen HPV-Typs 39) erkannt, die auch mit der auf PCR basierten MPG-Methode zur Kontrolle nachgewiesen wurden. Darunter waren Proben für: HPV16 (11/11), HPV18 (3/3) und HPV45 (3/3), die teilweise auch als multiple Infektionen gemeinsam detektiert werden konnten und keine Kreuzreaktivität untereinander aufwiesen. Der nicht eingeschlossene HPV Typ 39 hatte ebenfalls kein positives Signal ausgelöst und hat also zu keiner Kreuzreaktion mit andern HPV-Sonden geführt (Punkt 4.4.1. Tab. 20). Nimmt man die Ergebnisse für HPV45 und HPV6 heraus, da diese Werte wie bereits erwähnt fehlerhaft zu sein scheinen, so ergibt sich mit Ausnahme einer Probe für HPV59 (Punkt 4.4.1, Tab. 20, Probe 292) kein falsch-positives Ergebnis für HPV. Zwar verringert sich die Sensitivität des Assays mit sinkender Probenkonzentration, doch zeigen die Messungen des Patientinnenmaterials unter der primären Probenkonzentration vergleichbare Werte mit den zuvor erhobenen präklinischen Daten in Bezug auf Sensitivität und Spezifität.

Aus der Wertung für die Sensitivität ausgeschlossen wurde die Probe 320. Hier muss an Hand der Ergebnisse und der pathologischen- und/oder klinischen Befunde eine zu niedrige Konzentration an HPV E7-mRNA vermutet werden.

Betrachtet man die Ergebnisse der beiden Proben mit niedriger CIN und/oder PAP-Werten (292, 320) genauer, könnte man die Hypothese aufstellen, dass im Gegensatz zum DNA-Nachweis, das Signal des QG-HPV V1 Assay korreliert zum pathologischen/klinischen Befund der Probe. Die MFI-Werte für Probe 292 (Punkt 4.4.1, Tab. 19) liegen für HPV18 nur knapp über dem LOD (6,1 MFI über LOD). Auch bei HPV45 ist der MFI im Vergleich zu den anderen HPV45 positiven Proben niedrig. Wenn man nun noch den schon beobachteten hohen unspezifischen Hintergrund für HPV45 bedenkt, liegt auch dieser Wert nur knapp über dem LOD. Probe 320 zeigt im DNA-Nachweis den hr-HPV-Typ 31, jedoch keinen klinisch auffälligen Befund (PAP2, CIN I). Es scheint sich also (momentan) um keine karzinogene Infektion mit hochgradiger Dysplasie zu handeln und wäre folglich vom QG-HPV V1 Assay richtig negativ gemessen worden.

Somit wären die Ergebnisse der beiden Proben 292 und 320 vereinbar mit dem klinisch-pathologischen Befund (schwach positiv bzw. negativ). Geringgradige Dysplasien und hochgradige Dysplasien bzw. Karzinome werden also evtl. unterschiedlich detektiert (HPV-Infektion ohne auffälligen PAP-/CIN-Level = (noch) keine potentiell kanzerogene Infektion = richtig negativ bzw. schwach positiv bezüglich einer klinischen Sensitivität). Da in dieser Arbeit jedoch nur die unterste Messgrenze für die Unterscheidung zwischen positiven und negativen Signalen errechnet wurde, ist eine Beurteilung der klinischen Proben nach klinischer Relevanz der Signalstärke (Korrelation zwischen histologischen-/pathologischen Befunden und Höhe des gemessenen Signals), sprich wie hoch das Entartungsrisiko bei entsprechender Signalstärke wirklich ist, noch nicht möglich. Dennoch sollte dieses Ergebnis den Anlass dazu geben in folgenden Untersuchungen die Korrelation zwischen den gemessenen MFI-Werten und den histologischen- bzw. pathologischen Befunden an Hand einer größeren Anzahl von Patientinnenproben zu untersuchen.

Hier wird deutlich, dass zu diesem Zeitpunkt ein direkter Vergleich der positiven Ergebnisse einer klinischen Probe zwischen einem DNA- und einem mRNA-Nachweisverfahren nur sehr eingeschränkt möglich ist und lediglich als erstes Indiz für große klinische Studien dienen kann und soll.

Der hohe Anteil an falsch positiven Werten für HPV45 war nach dem hohen unspezifischen Hintergrundsignal in den vorangegangenen Ergebnissen zu erwarten (vergleiche Punkt 4.1) und zählt als weiteres Indiz dafür, dass die HPV45-Sonde einer generellen Überarbeitung bedarf. Auch die Sonde für HPV6 lieferte in mehreren klinischen Proben falsch-positive Ergebnisse.

Dies könnte durch eine Erhöhung des LOD behoben werden, sofern dies nicht zu einer zu starken Beeinträchtigung der Sensitivität führen würde. Dazu bedarf es einer weiteren Validierung dieser Sonde mit einer größeren Menge an HPV6-positivem Material, am Besten im Rahmen einer größeren klinischen Studie, um genug geeignetes Probenmaterial zur Verfügung zu haben.

Da hier keine verwendbaren Ergebnisse für die Bewertung der Sonde gemessen werden konnten und auch insgesamt nicht genug HPV6-positives Material bzw. gar kein kultiviertes Zellmaterial für die Testung zur Verfügung stand, wird in der vorliegenden Arbeit von einer weiteren Validierung der in diesem Prototyp verwendeten HPV6-Sonde abgesehen.

Letztendlich zeigt sich, dass die entwickelten Gensonden auch bei Anwendung an Patientinnenmaterial in der Lage sind HPV-Infektionen bei höhergradigen Dysplasien und Karzinomen zu detektieren und zu differenzieren, was ein Potential für die Anwendung im klinischen Bereich vermuten lässt.

Da es sich bei dieser Testentwicklung um die Darstellung eines neuen Prinzips handelt, ist ein direkter Vergleich mit anderen Methoden zum jetzigen Zeitpunkt kaum möglich (daher stellenweise wenig Referenzen). Ein direkter Vergleich mit anderen Methoden lässt sich erst auf Basis einer größer angelegten klinischen Studie und den damit einhergehenden Daten valide durchführen. Die hier erhobenen Daten zeigen jedoch das große Potential des QG-HPV V1 Assays, so dass der weiteren Testentwicklung mit dem Ziel der klinischen Anwendung nichts entgegensteht.

5.5 Limitation der Methodik

Zu beachten ist, dass es sich hier um einen ersten Funktions- und Machbarkeitsnachweis („*proof of principles*“) des konzipierten Assays handelt. Die Aussagekraft ist folglich beschränkt. Die Validierung wurde mit einer begrenzten Zahl an Messungen durchgeführt, hauptsächlich mit definierten Proben aus kultiviertem Zellmaterial. Die Ergebnisse basieren somit auf artifiziellen Proben, die zwar ursprünglich aus HPV-infizierten Karzinomgewebe des Zervix stammen, jedoch von vielen Einflüssen, welche im Normalfall auf eine von Patientinnen entnommenen, klinischen Proben einwirken, nicht betroffen sind (z.B. Verunreinigungen mit unterschiedlichem Zellmaterial oder anderen mikrobiologischen Organismen, unterschiedliche Abstrichtechniken, Koinfektionen mit anderen Erregern etc.). Durch dieses Versuchsdesign lässt sich die Kernfunktionalität des Assay sehr gut darstellen, eine direkte Übertragung auf die klinische Anwendung ist jedoch nicht möglich, weshalb die Erprobung in groß angelegten, klinischen Studien unabdingbar ist.

Die Verwendung des kultivierten Zellmaterials ist auch unter dem Aspekt kritisch zu betrachten, dass die Zellzahl bei der Lysatherstellung für alle Lysate auf 10^6 Zellen/ml normiert wurde, nicht aber auf die tatsächlich enthaltene HPV E7-mRNA. Somit kann zur Abschätzung der messbaren Größen lediglich die Konzentration infizierter Zellen, nicht aber die mRNA-Menge herangezogen werden. Im Ergebnis erhält man zwar eine ungefähre Vorstellung, wie sensitiv das Assay ist (positive Signale bei x infizierten Zellen), doch ein direkter Vergleich unter den verschiedenen HPV-Typen ist nicht möglich, da jede Zelllinie unterschiedlich viel E7-mRNA exprimieren kann. Die Normalisierung der Daten aus kultiviertem Zellmaterial auf das Referenzgen Actin- β (als Maß für die relative Zellzahl) unter Punkt 4.2.1 deutet darauf hin, dass in einigen Proben (z.B. HPV18) mehr E7-mRNA enthalten war als in anderen. Um eine genauere Vorstellung der Sensitivität der Sonden pro mRNA-Molekül und somit einen Vergleich der Sonden untereinander zu ermöglichen, wäre eine parallele Messung der gleichen Probe mittels eines etablierten, mRNA quantifizierenden Verfahrens (z.B. der rtPCR) nötig gewesen.

Die erhobenen Daten sind auch auf Grund der begrenzt verfügbaren Probenart (für HPV31 und 6 kein kultiviertes Material, nur geringe Mengen an Patientinnenmaterial) nicht für jede Sonde im gleichen Umfang enthalten. In einigen Versuchen ging der Schwerpunkt auf Funktionalität und Durchführbarkeit des Assay zu Lasten der Ergebnisvielfalt.

So wurden die Versuche aus Punkt 4.2.3 und 4.3.2 nur mit HPV16 positivem Material durchgeführt, da hier zu Gunsten der Übersicht und der praktischen Umsetzung der Versuchsdurchführung zunächst nur der häufigste HPV Typ ausgewählt wurde. Somit fehlen diese Werte für die anderen Sonden. Um genauere Erkenntnisse über die Funktionsweise des Assays zu erhalten, wäre eine Testung und Validierung aller Sonden mit klinischem Material nötig gewesen.

Die Darstellung ausreichender Signifikanz bezüglich der Spezifität, Sensitivität und Präzision des QG-HPV-V1 im vollen Umfang ist somit noch nicht möglich. Dies muss dann in größeren klinischen Studien folgen. In dieser Phase kann dann auch ein besserer Vergleich des QG-HPV V1 Assays mit anderen Methoden zum HPV-Nachweis erfolgen.

5.6 Ausblick

Die Bestätigung der Kernfunktionalität des Assay-Prototyps (QG-HPV V1) hat die generelle Durchführbarkeit des Assays bestätigt. Als nächsten Schritt sollte nun das Assay an einer größeren Menge von Patientinnenproben im Rahmen klinischer Studien validiert und u.a. die Korrelation der Ergebnisse des QG-HPV V1 Assay mit den bei der Patientin festgestellten Dysplasiegraden

ermittelt werden. Dazu sollte das QG-HPV V1 Assay um weitere Gensonden für klinisch relevante hr-HPV-Typen ergänzt und validiert werden. Zur Orientierung der noch zu ergänzenden HPV-Sonden könnten z.B. die von der WHO als karzinogen eingestuften HPV-Typen (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 und 66) herangezogen werden (12). Im Laufe der Zeit sollte das Nachweisspektrum dann immer den jeweils aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnissen angepasst werden. Zur besseren Abschätzung des Malignitätsgrades der nachgewiesenen Infektion sollten, neben den drei im Assay schon enthaltenen zellulären Markern, weitere Marker auf ihre Eignung zum Nachweis früher oder potentiell maligner Infektionen hin überprüft und entsprechende Gensonden entwickelt und validiert werden. Beispiele wären Ki-67 (77) der bereits erfolgreich im CINtec PLUS Test von Roche gemeinsam mit p16 zum Nachweis von CIN 3+ Läsionen bei unsicherem Pap-Befund eingesetzt wird (78, 79) oder die Marker *minichromosome maintenance protein 2* (MCM-2) und Topoisomerase II- α (TOP2A) aus dem Antikörperreagenz ProEx™ C von BD, der in Verbindung mit etablierten Methoden wie einem HPV-DNA Nachweis oder dem PAP-Screening Verwendung findet (80). Dabei sollten erprobte Schemata zur Validierung von HPV-Tests als Orientierung herangezogen werden (81). Erst dadurch lassen sich genauere Aussagen über die Verwendung im klinischen Alltag treffen. Dafür sollte das hier konzipierte Design entsprechend der klinischen Anforderungen geprüft und weiter modifiziert werden.

Es sollte darauf geachtet werden, dass zunächst für jede im QG-HPV V1 Assay enthaltene HPV-Sonde (HPV 6, 16, 18, 45, 59 und 68) und alle in Zukunft hinzugefügten HPV-Typen genügend positives Patientinnenmaterial zur Verfügung steht, welches z.B. mittels MPG-Methode verifiziert wird. Für die Durchführung an klinischen Proben sollte zunächst das hier erstellte Versuchsprotokoll als Basis dienen und bei entsprechendem Bedarf weiter angepasst werden. Besonders die Sonden für HPV-Typen 6 und 45 sollten auf Grund der Ergebnisse in dieser Arbeit bei der klinischen Validierung einer kritischen Bewertung unterzogen werden, sofern sie in Zukunft eingesetzt werden sollen.

Mit den entsprechenden Daten sollen dann Sensitivität, Spezifität, Präzision und klinischer Cut-Off bestimmt und mit den Dysplasiegraden der jeweiligen Patientin abgeglichen werden. Wenn sich die Ergebnisse des hier durchgeführten Machbarkeitsnachweises weitestgehend bestätigen sollten, könnte als nächstes ein klinischer Vergleich des QG-HPV Assays mit den aktuell häufig eingesetzten HPV-Nachweistests folgen (z.B. den unter Punkt 1.3.1 erwähnten).

Damit ließen sich Spezifität und Sensitivität des QG-HPV V1 Assays für die Früherkennung einer durch HPV-Infektion induzierten Dysplasie der Zervix uteri potentiell weiter steigern. Das Ergebnis wäre ein quantitativer und qualitativer HPV-Test mit einer vorher noch nie dagewesenen Spezifität bei vergleichbarer Sensitivität für den Nachweis kanzerogener HPV-Infektionen der Zervix uteri in einem prämaligen Stadium.

Darüber hinaus könnte er durch die direkte Bestimmung und Quantifizierung der einzelnen HPV-Typen und den potentiellen Tumormarkern dazu beitragen, neue wissenschaftliche Erkenntnisse über die Risikoabschätzung, den Verlauf und die einzelnen Vorgänge in einer HPV-infizierten Zelle im Speziellen aber auch der Karzinogenese im Allgemeinen zu gewinnen. Somit ist ein Nutzen des hier entworfenen Testsystems in Zukunft auch über die Grenzen der HPV-Diagnostik hinaus für die Frühdiagnostik anderer Karzinome denkbar.

6 Literaturverzeichnis

1. Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2005;32 Suppl 1:S16-24.
2. Bosch F, dSS, Castellsagué X., Moreno V., Muñoz N. Epidemiology of human papillomavirus infections and associations with cervical cancer: New opportunities for prevention

In: Campo MS, editor. *Papillomavirus Research: From Natural History To Vaccines and Beyond*: Wymondham, Caister Academic Press; 2006. p. 19-39.

3. International Human Papillomavirus Reference Center KI. Human papillomavirus reference clones 2016 [cited 2017 05.02.2017]. Available from: <http://www.hpvcenter.se/html/refclones.html>.
4. Bernard H-U. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *Journal of Clinical Virology*. 2005;32, Supplement(0):1-6.
5. Schneider A, Durst M, Kaufmann AM. [HPV infection and cervical carcinoma--epidemiology, detection and immunology]. *Zentralblatt fur Gynakologie*. 2001;123(4):179-85.
6. Trottier H, Franco EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine*. 2006;24, Supplement 1(0):S4-S15.
7. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJLM, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *Journal of clinical pathology*. 2002;55(4):244-65.
8. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet*. 2007;370(9590):890-907.
9. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Munoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2003;88(1):63-73.
10. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: A meta-analysis update. *International Journal of Cancer*. 2007;121(3):621-32.
11. IARC. Cervical Cancer Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 2012 [cited 2016 01.08.2016]. Available from: <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/cervix-new.asp>.
12. Coglianò V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, Ghissassi FE. Carcinogenicity of human papillomaviruses. *The lancet oncology*. 2005;6(4):204.
13. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical science*. 2006;110(5):525-41.
14. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology*. 2005;32, Supplement(0):7-15.
15. Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2004;68(2):362-72.
16. Chow LT, Reilly SS, Broker TR, Taichman LB. Identification and mapping of human papillomavirus type 1 RNA transcripts recovered from plantar warts and infected epithelial cell cultures. *Journal of virology*. 1987;61(6):1913-8.
17. Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C, Crawford L. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature*. 1991;352(6338):824-7.
18. Straight SW, Hinkle PM, Jewers RJ, McCance DJ. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and effects the downregulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes. *J Virol*. 1993;67(8):4521-32.
19. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*. 1990;63(6):1129-36.
20. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*. 1990;248(4951):76-9.
21. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, Dallenbach-Hellweg G, Schmidt D, von Knebel Doeberitz M. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2001;92(2):276-84.
22. Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, Schiller JT. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *The EMBO journal*. 1989;8(12):3905-10.
23. Münger K, Phelps WC, Bubb V, Howley PM, Schlegel R. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *Journal of Virology*. 1989;63(10):4417-21.
24. Doeberitz M, Vinokurova S. Host factors in HPV-related carcinogenesis: cellular mechanisms controlling HPV infections. *Archives of medical research*. 2009;40(6):435-42.
25. 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(1):307-13.
26. Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, zur Hausen H. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature*. 1985;314(6006):111-4.
27. Schmitt M, Dalstein V, Waterboer T, Clavel C, Gissmann L, Pawlita M. The HPV16 transcriptome in cervical lesions of different grades. *Mol Cell Probes*. 2011;25(5-6):260-5.
28. V. DGfZe, Griesser PDmH, Marquardt DmK, Schenck PDmU, Gesellschaft D, V. fGuGe, Neis PDmK, Arbeitsgemeinschaft, V. fZuKe, Kühn PDmW, Deutsche Gesellschaft für Pathologie e. V., Zytopathologie Af, Neumann DmHH, Arbeitsgemeinschaft, V. ztAiDe, Jordan DmB, V. BdFe, Steiner DmM, V. BDPe, Bollmann PDR, Berufsverband, V. ztAde,

- Pöschel D-BB. Münchener Nomenklatur III 2014 [cited 2015 08.09.2015]. Available from: <http://www.zytologie.org/muenchner-nomenklatur/>.
29. Bubendorf L, Feichter GE, Obermann EC, Klöppel G, Remmele W, Dalquen P, Kreipe HH. Pathologie: Zytopathologie: Springer; 2011.
 30. Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR, Rush BB, Glass AG, Schiffman M. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97(14):1072-9.
 31. Bulkman NW, Berkhof J, Rozendaal L, van Kemenade FJ, Boeke AJ, Bulk S, Voorhorst FJ, Verheijen RH, van Groningen K, Boon ME, Ruitinga W, van Ballegooijen M, Snijders PJ, Meijer CJ. Human papillomavirus DNA testing for the detection of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 and cancer: 5-year follow-up of a randomised controlled implementation trial. *Lancet.* 2007;370(9601):1764-72.
 32. Mayrand MH, Duarte-Franco E, Rodrigues I, Walter SD, Hanley J, Ferenczy A, Ratnam S, Coutlee F, Franco EL. Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. *N Engl J Med.* 2007;357(16):1579-88.
 33. Naucler P, Ryd W, Tornberg S, Strand A, Wadell G, Elfgrén K, Radberg T, Strander B, Johansson B, Forslund O, Hansson BG, Rylander E, Dillner J. Human papillomavirus and Papanicolaou tests to screen for cervical cancer. *N Engl J Med.* 2007;357(16):1589-97.
 34. Ronco G, Giorgi-Rossi P, Carozzi F, Confortini M, Dalla Palma P, Del Mistro A, Ghiringhello B, Girlando S, Gillio-Tos A, De Marco L, Naldoni C, Pierotti P, Rizzolo R, Schincaglia P, Zorzi M, Zappa M, Segnan N, Cuzick J. Efficacy of human papillomavirus testing for the detection of invasive cervical cancers and cervical intraepithelial neoplasia: a randomised controlled trial. *The lancet oncology.* 2010;11(3):249-57.
 35. Leinonen M, Nieminen P, Kotaniemi-Talonen L, Malila N, Tarkkanen J, Laurila P, Anttila A. Age-specific evaluation of primary human papillomavirus screening vs conventional cytology in a randomized setting. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101(23):1612-23.
 36. 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 Journal international du cancer.* 2006;119(5):1095-101.
 37. Bulk S, Bulkman NW, Berkhof J, Rozendaal L, Boeke AJ, Verheijen RH, Snijders PJ, Meijer CJ. Risk of high-grade cervical intra-epithelial neoplasia based on cytology and high-risk HPV testing at baseline and at 6-months. *International journal of cancer Journal international du cancer.* 2007;121(2):361-7.
 38. Administration USFaD. FDA approves first human papillomavirus test for primary cervical cancer screening 2014 [cited 2016 10.10.2016]. Available from: <http://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm394773.htm>.
 39. 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.
 40. Wentzensen PDDmN. Molekulare Diagnostik der HPV Infektion. *Der Pathologe.* 2011;32(6):461-6.
 41. Meijer CJ, Berkhof H, Heideman DA, Hesselink AT, Snijders PJ. Validation of high-risk HPV tests for primary cervical screening. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology.* 2009;46 Suppl 3:S1-4.
 42. Ronco G, Arbyn M, Segnan N. Cervical screening according to age and HPV status. *BMJ (Clinical research ed).* 2009;339:b3005.
 43. Bartholomew DA, Luff RD, Quigley NB, Curtis M, Olson MC. Analytical performance of Cervista HPV 16/18 genotyping test for cervical cytology samples. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology.* 2011;51(1):38-43.
 44. Day SP, Hudson A, Mast A, Sander T, Curtis M, Olson S, Chehak L, Quigley N, Ledford J, Yen-Lieberman B, Kohn D, Quigley DI, Olson M. Analytical performance of the Investigational Use Only Cervista HPV HR test as determined by a multi-center study. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology.* 2009;45 Suppl 1:S63-72.
 45. Einstein MH, Martens MG, Garcia FA, Ferris DG, Mitchell AL, Day SP, Olson MC. Clinical validation of the Cervista HPV HR and 16/18 genotyping tests for use in women with ASC-US cytology. *Gynecologic oncology.* 2010;118(2):116-22.
 46. Castle PE, Sadorra M, Lau T, Aldrich C, Garcia FA, Kornegay J. Evaluation of a prototype real-time PCR assay for carcinogenic human papillomavirus (HPV) detection and simultaneous HPV genotype 16 (HPV16) and HPV18 genotyping. *Journal of clinical microbiology.* 2009;47(10):3344-7.
 47. Castle PE, Stoler MH, Wright TC, Jr., Sharma A, Wright TL, Behrens CM. Performance of carcinogenic human papillomavirus (HPV) testing and HPV16 or HPV18 genotyping for cervical cancer screening of women aged 25 years and older: a subanalysis of the ATHENA study. *The lancet oncology.* 2011;12(9):880-90.
 48. Heideman DA, Hesselink AT, Berkhof J, van Kemenade F, Melchers WJ, Daalmeijer NF, Verkuijden M, Meijer CJ, Snijders PJ. Clinical validation of the cobas 4800 HPV test for cervical screening purposes. *Journal of clinical microbiology.* 2011;49(11):3983-5.
 49. Stoler MH, Wright TC, Jr., Sharma A, Apple R, Gutekunst K, Wright TL. High-risk human papillomavirus testing in women with ASC-US cytology: results from the ATHENA HPV study. *American journal of clinical pathology.* 2011;135(3):468-75.
 50. Schopp B, Holz B, Zago M, Stubenrauch F, Petry KU, Kjaer SK, Iftner T. Evaluation of the performance of the novel PapilloCheck HPV genotyping test by comparison with two other genotyping systems and the HC2 test. *Journal of medical virology.* 2010;82(4):605-15.
 51. Hesselink AT, Heideman DA, Berkhof J, Topal F, Pol RP, Meijer CJ, Snijders PJ. Comparison of the clinical performance of PapilloCheck human papillomavirus detection with that of the GP5+/6+-PCR-enzyme immunoassay in population-based cervical screening. *Journal of clinical microbiology.* 2010;48(3):797-801.

52. Clad A, Reuschenbach M, Weinschenk J, Grote R, Rahmsdorf J, Freudenberg N. Performance of the Aptima high-risk human papillomavirus mRNA assay in a referral population in comparison with Hybrid Capture 2 and cytology. *Journal of clinical microbiology*. 2011;49(3):1071-6.
53. Monsonego J, Hudgens MG, Zerat L, Zerat JC, Syrjanen K, Halfon P, Ruiz F, Smith JS. Evaluation of oncogenic human papillomavirus RNA and DNA tests with liquid-based cytology in primary cervical cancer screening: the FASE study. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2011;129(3):691-701.
54. Ratnam S, Coutlee F, Fontaine D, Bentley J, Escott N, Ghatage P, Gadag V, Holloway G, Bartellas E, Kum N, Giede C, Lear A. Aptima HPV E6/E7 mRNA test is as sensitive as Hybrid Capture 2 Assay but more specific at detecting cervical precancer and cancer. *Journal of clinical microbiology*. 2011;49(2):557-64.
55. Schmitt M, Bravo IG, Snijders PJ, Gissmann L, Pawlita M, Waterboer T. Bead-based multiplex genotyping of human papillomaviruses. *Journal of clinical microbiology*. 2006;44(2):504-12.
56. Kyndi M, Frederiksen K, Kruger Kjaer S. Cervical cancer incidence in Denmark over six decades (1943-2002). *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*. 2006;85(1):106-11.
57. Cuschieri K, Wentzensen N. Human papillomavirus mRNA and p16 detection as biomarkers for the improved diagnosis of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008;17(10):2536-45.
58. Morris BJ. Cervical human papillomavirus screening by PCR: advantages of targeting the E6/E7 region. *Clin Chem Lab Med*. 2005;43(11):1171-7.
59. Szarewski A, Ambroisine L, Cadman L, Austin J, Ho L, Terry G, Liddle S, Dina R, McCarthy J, Buckley H, Bergeron C, Soutter P, Lyons D, Cuzick J. Comparison of predictors for high-grade cervical intraepithelial neoplasia in women with abnormal smears. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008;17(11):3033-42.
60. Ratnam S, Coutlee F, Fontaine D, Bentley J, Escott N, Ghatage P, Gadag V, Holloway G, Bartellas E, Kum N, Giede C, Lear A. Clinical performance of the PreTect HPV-Proofer E6/E7 mRNA assay in comparison with that of the Hybrid Capture 2 test for identification of women at risk of cervical cancer. *Journal of clinical microbiology*. 2010;48(8):2779-85.
61. Dockter J, Schroder A, Hill C, Guzinski L, Monsonego J, Giachetti C. Clinical performance of the APTIMA HPV Assay for the detection of high-risk HPV and high-grade cervical lesions. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2009;45 Suppl 1:S55-61.
62. Schmitt M, Dondog B, Waterboer T, Pawlita M. Homogeneous amplification of genital human alpha papillomaviruses by PCR using novel broad-spectrum GP5+ and GP6+ primers. *Journal of clinical microbiology*. 2008;46(3):1050-9.
63. 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(1):249-56.
64. Hallbach J. *Klinische Chemie und Hämatologie für den Einstieg*; Thieme Verlag; 2006. 15-6 p.
65. Kunze URS, G.; *Grundlagen der quantitativen Analyse*: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2009 [10.10.2016]. Available from: https://application.wiley-vch.de/books/sample/352732075X_c01.pdf.
66. Kern D, Collins M, Fultz T, Detmer J, Hamren S, Peterkin JJ, Sheridan P, Urdea M, White R, Yeghiazarian T, Todd J. An enhanced-sensitivity branched-DNA assay for quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *Journal of clinical microbiology*. 1996;34(12):3196-202.
67. Hendricks DA, Stowe BJ, Hoo BS, Kolberg J, Irvine BD, Neuwald PD, Urdea MS, Perrillo RP. Quantitation of HBV DNA in human serum using a branched DNA (bDNA) signal amplification assay. *American journal of clinical pathology*. 1995;104(5):537-46.
68. Pellegrin I, Garrigue I, Ekouevi D, Couzi L, Merville P, Merel P, Chene G, Schrive MH, Trimoulet P, Lafon ME, Fleury H. New molecular assays to predict occurrence of cytomegalovirus disease in renal transplant recipients. *The Journal of infectious diseases*. 2000;182(1):36-42.
69. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003;348(6):518-27.
70. Normung Df. DIN 32645: Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen - Begriffe, Verfahren, Auswertung. Beuth Verlag GmbH; 2008.
71. Klug SJ, Hukelmann M, Hollwitz B, Duzenli N, Schopp B, Petry KU, Iftner T. Prevalence of human papillomavirus types in women screened by cytology in Germany. *Journal of medical virology*. 2007;79(5):616-25.
72. Chow LT, Nasser M, Wolinsky SM, Broker TR. Human papillomavirus types 6 and 11 mRNAs from genital condylomata acuminata. *J Virol*. 1987;61(8):2581-8.
73. Cui M, Chan N, Liu M, Thai K, Malaczynska J, Singh I, Zhang D, Ye F. Clinical Performance of Roche Cobas 4800 HPV Test. *Journal of clinical microbiology*. 2014;52(6):2210-1.
74. Binnicker MJ, Pritt BS, Duresko BJ, Espy MJ, Grys TE, Zarka MA, Kerr SE, Henry MR. Comparative evaluation of three commercial systems for detection of high-risk human papillomavirus in cervical and vaginal ThinPrep PreservCyt samples and correlation with biopsy results. *Journal of clinical microbiology*. 2014;52(10):3763-8.
75. Cuzick J, Ahmad AS, Austin J, Cadman L, Ho L, Terry G, Kleeman M, Ashdown-Barr L, Lyons D, Stoler M, Szarewski A. A comparison of different human papillomavirus tests in PreservCyt versus SurePath in a referral population-PREDICTORS 4. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2016;82:145-51.
76. Hologic. *Betriebshandbuch ThinPrep 2000 System* [PDF]. [updated 2017; cited 2016]. Dokument-Nr. MAN-02060-801:[Available from: http://www.hologic.com/sites/default/files/package%20inserts/MAN-02060-801_002_02.pdf].
77. Reuschenbach M, Seiz M, von Knebel Doeberitz C, Vinokurova S, Duwe A, Ridder R, Sartor H, Kommos F, Schmidt D, von Knebel Doeberitz M. Evaluation of cervical cone biopsies for coexpression of p16INK4a and Ki-67 in epithelial cells. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2012;130(2):388-94.
78. Schmidt D, Bergeron C, Denton KJ, Ridder R. p16/ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL papanicolaou cytology: results from the European equivocal or mildly abnormal Papanicolaou cytology study. *Cancer cytopathology*. 2011;119(3):158-66.

79. Uijterwaal MH, Polman NJ, Witte BI, van Kemenade FJ, Rijkaart D, Berkhof J, Balfoort-van der Meij GA, Ridder R, Snijders PJ, Meijer CJ. Triaging HPV-positive women with normal cytology by p16/Ki-67 dual-stained cytology testing: baseline and longitudinal data. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2015;136(10):2361-8.
80. Depuydt CE, Makar AP, Ruymbeke MJ, Benoy IH, Vereecken AJ, Bogers JJ. BD-ProExC as adjunct molecular marker for improved detection of CIN2+ after HPV primary screening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011;20(4):628-37.
81. 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 Journal international du cancer*. 2009;124(3):516-20.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Paul Viktor Felix Hannemann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Entwicklung und Machbarkeitsnachweis eines Luminex-basierten, QuantiGene HPV E7 mRNA genotypisierenden Nachweisverfahrens“ 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/Curriculum Vitae

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

Danksagung

Als erstes möchte ich Herrn Privatdozent Dr. Andreas M. Kaufmann danken, für die Vergabe und Betreuung dieser Dissertation. Er gab mir nicht nur die Chance in seiner Arbeitsgruppe zu diesem interessanten Thema zu promovieren, sondern unterstützte mich auch dabei sowohl fachlich als auch moralisch durch seine kompetente und freundliche Betreuung.

Ursula Schiller und Tina Kube möchte ich nicht nur für meine Einarbeitung im Labor danken, sondern auch ganz besonders für Ihre freundliche und hilfsbereite Art. Mit allen Problemen die der Laboralltag mit sich bringt konnte ich mich an sie wenden. Mit ihnen verbinde ich viele schöne Erinnerungen an die Laborzeit.

Ich danke all meinen Freunden für ihre unterstützenden Worte und ihr Verständnis während dieser Zeit.

Einen besonderen Dank verdient auch Carolin Hermsdorf, die immer für mich da war, wenn ich sie brauchte.

Abschließend möchte ich meiner ganzen Familie danken, die mich von Beginn des Studiums an auf vielfache Art und Weise unterstützte und an mich glaubte. Ohne diesen Rückhalt wäre das alles nicht möglich gewesen.

Danke.