

ULRIKE WIELAND, KÖLN

HPV – Infektion: Virologische Aspekte

Humane Papillomviren sind weit verbreitet. Sie infizieren mehrschichtige Plattenepithelien, wobei die meisten Infektionen meist transient sind. Risikofaktoren für persistierende Infektionen, die zu Karzinomen führen können, sind unter anderem Rauchen und Immunsuppression. Für die virologische HPV-Diagnostik stehen verschiedene Testsysteme zur Verfügung, die den morphologischen HPV-Nachweis sinnvoll ergänzen können.

Humane Papillomviren (HPV) sind unbehüllte DNA-Viren mit einem Durchmesser von 55 nm. Das zirkuläre doppelsträngige HPV-Genom umfasst circa 8.000 Basenpaare und kodiert für sechs frühe Proteine (E1, E2, etc., E steht für early) und für zwei spät im viralen Vermehrungszyklus exprimierte Proteine (L1 und L2, L steht für late). Die frühen Proteine sind für die virale DNA-Replikation (E1, E2), für die Transkription der viralen Gene (E2, E4) und für die Virusfreisetzung (E4) notwendig. L1 und L2 sind die Haupt- bzw. Neben-Kapsid-Proteine. E5, E6 und E7 bestimmter HPV-Typen (Tab. 1) können als Onkoproteine wirken, indem sie z.B. zelluläre Tumorsuppressor-Proteine wie p53 (E6) oder pRB (E7) inaktivieren oder die zelluläre DNA-Synthese und die Transkription aktivieren (Moody et al. 2010). Momentan kennt man 170 komplett klassifizierte HPV-Typen (Bernard et al. 2010; www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser) sowie zahlreiche partielle HPV-Sequenzen, die voraussichtlich weitere HPV-

Typen repräsentieren. HPV-Typen sind Genotypen, wobei verschiedene Typen sich in mindestens 10% ihrer Haupt-Kapsid (L1) Gensequenz unterscheiden.

HPV-REPLIKATION UND PATHOGENESE

HPV infizieren mehrschichtige Plattenepithelien von Haut und Schleimhaut. Phylogenetisch lassen sich HPV in fünf Genera einteilen (alpha, beta, gamma, mu und nu), wobei alphaHPV vorwiegend den Anogenital-Trakt des Menschen infizieren, während die HPV-Typen der restlichen vier Genera die Haut bevorzugen (kutaner Tropismus). HPV gelangen über Mikroläsionen der Haut und Schleimhaut an die Basalmembran des zu infizierenden mehrschichtigen Plattenepithels und binden zunächst mit ihrem L1-Kapsidprotein an die Basalmembran. Dies führt zu einer Konformationsänderung des Kapsids und über weitere Zwischenschritte schließlich zu einer Infektion der Basalzellen des mehrschichtigen Plattenepithels (Kines et al.

2009). Die initialen Schritte der HPV-Infektion geschehen somit an der Basalmembran, und nicht wie bei anderen Viren an der Zell- bzw. Epitheloberfläche.

Die HPV-DNA Replikation und die HPV-Protein Expression sind eng an den Differenzierungsgrad der infizierten Keratinozyten gekoppelt. Nach der Primärinfektion findet man in den Basalzellen (Stratum basale) nur wenige virale Genome sowie eine schwache Transkription der frühen Gene E1, E2 und E5. In den darüber liegenden Zellen (unteres Stratum spinosum) werden alle frühen Gene exprimiert (E1, E2, E4, E5, E6, E7). Im oberen Stratum spinosum setzt die vegetative DNA Replikation ein und man findet viele virale Genome. Neben den frühen Genen werden jetzt auch die Kapsidproteine L1 und L2 synthetisiert und der Zusammenbau neuer Viruspartikel (Assembly) beginnt. Im Stratum granulosum liegen reife, infektiöse Virionen vor, die in der obersten Zellschicht (bei der Haut Stratum corneum) mit abschilfernden Zellen freigesetzt werden (Howley&Lowy, 2007). AlphaHPV, die vorwiegend den Anogenitaltrakt infizieren (genitale/mukosale HPV-Typen), lassen sich bezüglich ihres onkogenen Potenzials in Niedrig- (low risk, LR) und in Hochrisiko- (high risk, HR) Typen einteilen (ermittelt für das Zervixkarzinom-Risiko) (Munoz et al. 2003). Unter den Hochrisiko-HPV-Typen (Tab. 1) spielt HPV16 eine besondere Rolle, da sein Krebsrisiko etwa 1 Log-Stufe über dem der restlichen HR-HPV-Typen liegt, und da man HPV16 häufig auch in HPV-assoziierten Karzinomen jenseits des Zervixkarzinoms findet (Abb. 1, Tab. 2) (Bouvard et al. 2009, IARC 2011). Neben dem Zervixkarzi-

Karzinogenitäts- Gruppe	Definition	HPV-Typen
1	karzinogen für den Menschen	HPV16*, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59
2A	wahrscheinlich karzinogen für den Menschen	HPV68
2B	möglicherweise karzinogen für den Menschen	HPV26, 30, 34, 53, 66, 67, 69, 70, 73, 82, 85, 97

* Für HPV16 ist das Krebsrisiko vermutlich 1 Log-Stufe höher als für die restlichen Hochrisiko-HPV-Typen.

Tab. 1 Das onkogene Potential verschiedener Hochrisiko-HPV-Typen gemäß der Klassifikation der „International Agency for Research on Cancer“ (Bouvard et al. 2009; IARC, 2011).

nom können HR-HPVs, und insbesondere HPV16, auch andere anogenitale Karzinome wie Vulva-, Vagina-, Penis-, und Analkarzinome, sowie oropharyngeale Karzinome induzieren (Abb. 1, Tab. 2) (de Martel et al. 2012, Wu et al. 2012, Schiller & Lowy 2012). Mukosale Niedrigrisiko-HPV-Typen, wie z.B. HPV6 oder HPV11, findet man in Genitalwarzen (*Condylomata acuminata*) oder in niedrig-gradigen anogenitalen Dysplasien, aber in der Regel nicht oder nur sehr selten in hochgradigen Dysplasien oder Karzinomen (Munoz et al. 2003, Bouvard et al. 2009, IARC 2011).

HPV-EPIDEMIOLOGIE

AlphaHPVs werden durch Sexualkontakte übertragen. Die große Mehrheit (>80%, in manchen Studien bis 100%) sexuell aktiver Menschen infiziert sich im Laufe des Lebens mit zahlreichen HPV-Typen, aber die meisten Infektionen sind transient (und asymptomatisch bzw. folgenlos) und nach 6-18 Monaten nicht mehr nachweisbar (Schiffman et al. 2007, Stanley et al. 2010; Weaver et al. 2011). Bei jungen Frauen liegt die zervikale HPV-Prävalenz in verschiedenen Studien und in verschiedenen geographischen Regionen zwischen 10 und 52% und nimmt mit zunehmenden Alter für HR-HPV auf unter 10% ab (Cuzick et al. 2006, Stanley et al. 2010, Wheeler et al. 2013). Im Gegensatz zu Frauen, ist bei Männern aller Altersstufen die genitale HPV-Prävalenz in den meisten Studien über 30% (-50%) und nimmt mit zunehmendem Alter kaum ab. Anogenitale HPV-Infektionen sind demgemäß bei gesunden, sexuell aktiven Männern sehr häufig und die meisten Infektionen sind transient. Die hohe Prävalenz wird mit häufigen Reinfektionen erklärt (Smith et al. 2011, Giuliano et al. 2011). Orale HPV-Infektionen findet man bei gesunden Frauen und Männern

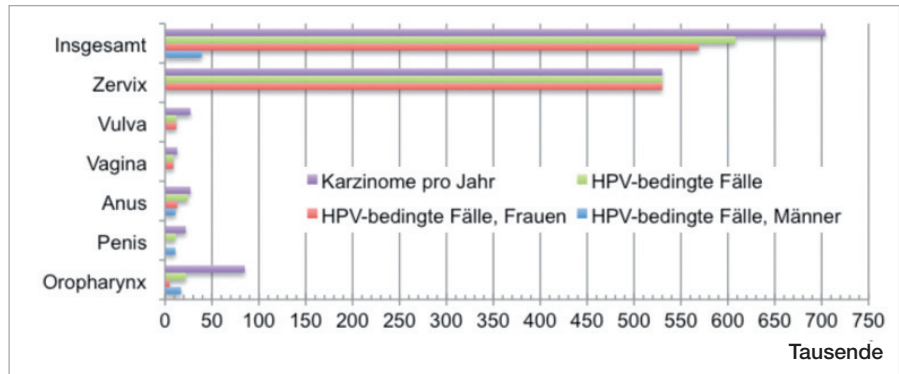


Abb. 1 Weltweite jährliche Anzahl und Verteilung HPV-bedingter Karzinome (Angaben für das Jahr 2008 nach de Martel et al. Lancet Oncology 13, 2012).

Karzinom	Wu et al. 2012 (USA)	de Martel et al. 2012 (Global)
Cervix	96% (95-97%)	100%
Vagina	64% (43-82%)	70%
Vulva	51% (37-65%)	43%
Penis	36% (26-47%)	50%
Anal	93% (86-97%)	88%
Oropharynx*	63% (50-75%)	25,6% (13-56%)

* inklusive Tonsillen und Zungenbasis

Tab. 2 HPV-Prävalenz in verschiedenen Karzinomen in zwei aktuellen Studien.

in 4-7%, wobei bei 1,3-3,7% HR-HPV-DNA nachgewiesen wurde, mit HPV16 als dem häufigsten Typ (0,6-1%). Risikofaktoren für orale HPV-Infektionen sind Rauchen und Sexualkontakte (Kreimer et al. 2011, Gillison et al. 2012).

Circa 10-15% der genital HPV-infizierten Frauen bauen keine erfolgreiche (zelluläre) Immunität gegen HPV auf und eliminieren die Viren nicht. Personen mit persistierenden HR-HPV-Infektionen haben ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung anogenitaler Karzinome und deren Vorstufen, den hochgradigen Dysplasien, wie CIN Grad 2 und Grad 3 oder AIN2 und AIN3 (CIN bzw. AIN steht für zervikale bzw. anale intraepitheliale Neoplasie) (Schiffman et al. 2007, Stanley et al. 2010). Persistierende HR-HPV-Infektionen können zum Teil innerhalb weniger Monate zu Dysplasien führen, aber die Karzinom-Entstehung (Invasion) erfolgt bei Immunkompe-

tenten erst nach einer langen präkanzerösen Phase von mehreren Jahren (Schiffman et al. 2007).

HPV-ASSOZIIERTE KARZINOME

Circa 5% aller menschlichen Karzinome sind HPV-bedingt (Schiller & Lowy 2012). Für die USA rechnet man momentan mit fast 35.000 HPV-bedingten Karzinomen pro Jahr (13.446 bei Männern und 21.342 bei Frauen) (Jemal et al. 2013). So gut wie alle Zervixkarzinome, circa 90% der Analkarzinome, 60-70% der Vaginal-Karzinome, 40-50% der Vulva- und der Penis-Karzinome, sowie 13 bis über 50% der Oropharynx-Karzinome (inklusive Tonsillen- und Zungenbasis-Karzinome) sind HR-HPV-bedingt (Wu et al. 2012, de Martel et al. 2012, Schiller & Lowy, 2012) (Abb. 1, Tab. 2). Das Zervixkarzinom ist das häufigste HPV-bedingte Karzinom und weltweit gesehen mit 450.000-530.000 Neuer-

krankungen pro Jahr die zweithäufigste (nach Brustkrebs) Krebsart bei Frauen (Abb. 1) (Forouzanfar et al. 2011, de Martel et al. 2012). In Deutschland gibt es trotz eines von den Krankenkassen finanzierten Screening-Angebots (Pap-Screening) 4.600-4.900 neu diagnostizierte Zervixkarzinome und über 1.500 Sterbefälle (infolge Zervixkarzinom) pro Jahr (Robert Koch-Institut, 2012). Die Zervixkarzinom-Inzidenzrate liegt in Deutschland bei 11,6 pro 100.000 Frauen pro Jahr und damit im europaweiten Vergleich in der oberen (schlechteren) Hälfte (Robert Koch-Institut, 2012). Im Vergleich zum Zervixkarzinom sind andere HPV-bedingte Karzinome seltener (Abb. 1). Für das Analkarzinom beispielsweise liegt die Inzidenz in der Allgemeinbevölkerung bei 1-2 Neuerkrankungen pro 100.000 pro Jahr (Clark et al. 2004).

RISIKOFAKTOREN

Wichtige Risikofaktoren für persistierende HPV-Infektionen, für HPV-bedingte Dysplasien und für HPV-assoziierte Karzinome sind Rauchen und Immunsuppression (Tota et al. 2011). So haben Raucher, im Vergleich zu Nichtrauchern, ein über zweifach erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Zervix- oder eines Analkarzinoms (Plummer et al. 2003, Nordenvall et al. 2011). Bei HIV-infizierten Männern und Frauen sind genitale und anale HPV-Infektionen, oft mit multiplen Typen, sehr häufig (>50% bis >90%) und dementsprechend findet man bei diesen Patienten anogenitale Dysplasien und Karzinome wesentlich häufiger als in der Allgemeinbevölkerung (Kreuter & Wieland, 2009, Shiels et al. 2011, Silverberg et al. 2012). 35-52% HIV-positiver Männer mit gleichgeschlechtlichen Kontakten haben hochgradige anale Dysplasien (AIN2/3) und die Analkarzinom-Inzidenz liegt bei diesen Patienten bei über 100 Neuerkrankungen pro

100.000 pro Jahr (Palefsky et al. 2005, Kreuter et al. 2010, Silverberg et al. 2012). Im Gegensatz zu anderen erregerbedingten Neoplasien HIV-infizierter Patienten, wie z.B. dem Kaposi-Sarkom (Humanes Herpesvirus 8), hat die (erfolgreiche) antiretrovirale Therapie keinen relevanten Einfluss auf die hohen Analkarzinom-Inzidenzraten HIV-positiver Patienten (Shiels et al. 2011, Silverberg et al. 2012).

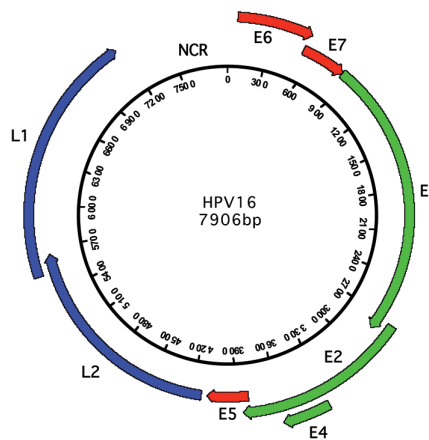


Abb. 2 HPV16-Genom. Die HPV-Oncogene E5, E6 und E7 sind rot dargestellt. L1 und L2 (blau) sind die Haupt- und Nebenkapsidprotein-Gene. NCR, nicht codierende Region.

HPV-TYP UND KARZINOMRISIKO

In allen HPV-bedingten Karzinomen ist HPV16 der am häufigsten vorkommende HPV-Typ, gefolgt von HPV18. So findet man weltweit gesehen in 71% (Europa 73%) aller Zervixkarzinome HPV16 (61%) oder HPV18 (10%). In Adenokarzinomen der Zervix ist der Anteil von HPV18 (32%) und HPV45 (12%) größer als in Plattenepithelkarzinomen der Zervix (8% und 5%), und der von HPV16 kleiner (50% vs 62%) (de Sanjose et al. 2010). In HPV-positiven Vulva-, Vagina-, Penis- und Analkarzinomen dominiert ebenfalls HPV16 (Gross & Pfister 2004, de Vuyst et al. 2009), wobei man in Analkarzinomen HIV-positiver Patienten regelmäßig auch andere HR-HPV-Typen findet (Kreuter et al. 2010, Abramowitz et al. 2011). Auch in HPV-bedingten oro-

pharyngealen Karzinomen dominiert HPV16 (Klussmann et al. 2009, Chaturvedi et al., 2011).

CONDYLOMATA ACUMINATA

Die häufigsten HPV-bedingten Läsionen sind Condyломata acuminata (Feigwarzen, Genitalwarzen). Circa 1% aller sexuell aktiven Erwachsenen hat zu einem bestimmten Zeitpunkt Condylome. In Deutschland rechnet man mit über 100.000 (bis 500.000) Diagnosen pro Jahr. Die Inzidenzrate für Condylome liegt in Deutschland bei 170 pro 100.000 pro Jahr und bei jungen Menschen (unter 30 Jahren) in Großstädten bei 700-900 pro 100.000 pro Jahr. Das geschätzte Lebenszeitrisiko für Genitalwarzen wird (für HIV-negative Personen) auf 10% geschätzt, für HIV-positive Patienten ist es wesentlich höher. Bei 54% von 640 HIV-positiven Männern wurden innerhalb von 8 Jahren Condylome diagnostiziert, vorwiegend anale Condylome (bei 51%), gefolgt von penilen (bei 9%) und oralen (bei 3%) Läsionen. Rezidive sind bei HIV-positiven Patienten wesentlich häufiger als bei Immunkompetenten. Mehr als 90% der Condyломata acuminata sind HPV6 oder HPV11-bedingt, aber man findet in Condyломomen auch andere LR-HPV-Typen wie z.B. HPV40, 41, 42, 44 und 61. Dies gilt insbesondere für HIV-infizierte Patienten (Kraut et al. 2010, Wieland & Kreuter 2011, Hartwig et al. 2012).

HPV-DIAGNOSTIK

Anogenitale HPV-Infektionen lassen sich klinisch (Inspektion, Kolposkopie, Anoskopie), morphologisch (Zytologie, Histologie) oder durch direkten und indirekten Nachweis von HPV (Nachweis viraler Nukleinsäuren, Immunhistochemie, Immunzytochemie) diagnostizieren. Da nur ein geringer Anteil (<50%) der HPV-infizierten Antikörper gegen HPV bildet (Michael et al. 2008), spielt die HPV-

Serologie für die Diagnostik von HPV-Infektionen keine Rolle. Das Ziel der HPV-Diagnostik im klinischen Alltag sollte nicht der Nachweis jeglicher HPV-Mengen sein, sondern der Nachweis von klinisch relevanten HPV-Mengen, die mit (therapiebedürftigen) Läsionen, wie z.B. CIN2/3+ assoziiert sind (Meijer et al. 2009, Kinney et al. 2010).

HPV-DNA lässt sich aus Genitalabstrichen mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR, DNA-Amplifikation) oder mittels Hybrid Capture Test (Signal-Amplifikation) nachweisen. Vorteile des Hybrid Capture Tests im Vergleich zur PCR sind die leichtere, standardisierte Durchführbarkeit, die Robustheit des Tests, die etwas höhere klinische Spezifität (wegen höherer analytischer Nachweisgrenze) und die niedrigeren Testkosten. Vorteile der PCR sind die mögliche sehr hohe analytische Sensitivität (bei niedrigerer klinischer Spezifität), die damit einhergehende bessere Nachweisbarkeit von HPV-Persistenz, und die Möglichkeit einer umfassenden HPV-Typisierung. Tests zum Nachweis von HR-HPV-Onkogen (E6/E7) mRNA haben im Vergleich zu HPV-DNA-Testen eine höhere Spezifität (für die Erkennung von CIN2+/CIN3+), bei etwas geringerer Sensitivität (Szarewski et al. 2008, Burger et al. 2011).

Mittels Immunhistochemie oder Immunzytologie ist der Nachweis von HPV-Proteinen oder der Nachweis von zellulären Proteinen, deren Expression durch die HPV-Infektion verändert wird, möglich. Ein weit verbreiteter Test für letztere Option ist der Nachweis des p16-Proteins in histologischen (Biopsien) oder zytologischen (Abstriche) Proben. Das zelluläre Protein p16INK4a ist ein cyklin-abhängiger Kinase-Inhibitor, dessen normale Funktion die Kontrolle des Zellzyklus ist. In HPV-transformierten Zellen wird p16 überexprimiert, da die Expression des HPV-Onkoproteins E7 zu einer Inakti-

vierung des Tumorsuppressorproteins pRB führt. Dadurch entfällt die negative Feedback-Kontrolle von pRB auf die p16-Expression und das p16-Protein wird überexprimiert. Mit ansteigendem Dysplasiegrad nimmt die p16-Expression zu und umfasst bei hochgradigen Dysplasien/Carcinoma in situ die gesamte Epithel-höhe (Klaes et al. 2001). Die p16-Immun-histochemie ist auch zur Diagnostik nicht-zervikaler Dysplasien, wie z.B. peniler intraepithelialer Neoplasien (PIN) geeignet (Kreuter et al. 2008). Eine Weiterentwicklung des p16-Nachweises ist die p16/Ki-67 Doppelfärbung. Ki-67 ist ein zellulärer Proliferationsmarker. Die Doppelfärbung erlaubt unter anderem die Beurteilung/Triage nicht eindeutiger oder verdächtiger Histologien oder Zytologien. In dysplastischen Zellen sind beide Marker positiv und man sieht rot angefärbte Zellkerne (Ki-67) und braunes Zytoplasma (p16). Bei HR-HPV-DNA-positiven Frauen mit normalem Zytologie-Befund lässt sich durch die Doppel-Färbung ausschließen, dass dysplastische Zellen vorliegen (Petry et al. 2011, Reuschenbach et al. 2012).

INDIKATIONEN ZUR DIAGNOSTIK

Anerkannte Indikationen für die genitale HPV-Diagnostik bei Frauen sind Kontrolluntersuchungen (zusammen mit Zytologie/Histologie) 6 und 12 Monate nach CIN- oder Zervixkarzinom-Therapie, die Entscheidungshilfe (Triage) bei unklaren zytologischen Befunden sowie die Risikoabschätzung/Triage bei niedrig-gradigen Dysplasien (Chan et al. 2009, Arbyn et al. 2012, Wentzensen et al. 2012).

Momentan wird auch für Deutschland (zum Teil kontrovers) diskutiert, das gegenwärtige Zytologie-basierte Pap-Screening durch ein primäres HPV-Screening mit verlängerten Screening-Intervallen (alle 3-5 Jahre bei negativem HPV-Test) bei Frauen ab 30 Jahren (bei jüngeren

Frauen wäre die HPV-Prävalenz zu hoch) zu ersetzen (IQWiG, 2011). Dies würde bedeuten, dass zunächst ein HPV-DNA Test durchgeführt wird, und ein nachfolgender Zytologie-Test nur, wenn bei der Patientin HR-HPV-DNA nachweisbar ist. Vorteile des HPV-Testes gegenüber der Zytologie sind eine deutlich höhere Sensitivität für die Erkennung hochgradiger Dysplasien (95-100% vs 43-58%), ein sehr hoher negativer prädiktiver Wert (fast 100%), eine bessere Reproduzierbarkeit, eine geringere Subjektivität bei der Auswertung sowie eine geringere Abhängigkeit von der Qualität des Probenmaterials. Nachteile des HPV-Tests im Vergleich zur Zytologie sind die geringere Spezifität für die Erkennung hochgradiger Dysplasien, der niedrigere positive prädiktive Wert (12% vs 91%), eine mögliche Überdiagnostik regredierender CIN2-Läsionen bei jüngeren Frauen, sowie eine mögliche Verunsicherung der Patientinnen durch den Nachweis onkogener Viren (Cuzick et al. 2006, Mayrand et al. 2007, Lazcano-Ponce et al. 2011, de Kok et al. 2012, Rijkaart et al. 2012, Arbyn et al. 2012). In den Niederlanden wurde ein organisiertes primäres HPV-Screening mit Zytologie-Triage bei positivem HR-HPV Nachweis für Frauen zwischen 30 und 60 Jahren im Jahr 2011 eingeführt, wobei für Frauen mit negativen HR-HPV-Befunden nur 5 Screening-Untersuchungen mit 30, 35, 40, 50 und 60 Jahren notwendig sind (HPV Today, 2011). Nicht sinnvoll ist ein HPV-Test bei (asymptomatischen) Männern, bei jungen Frauen (<30 Jahre) im Rahmen der Krebsvorsorge sowie für die Entscheidung ob gegen HPV geimpft werden soll (Cuzick et al. 2006, Gross et al. 2010).

Literatur bei Verfasserin

*Prof. Ulrike Wieland
Institut für Virologie der Uniklinik Köln
Nationales Referenzzentrum für Papillom-
und Polyomaviren
Fürst-Pückler-Straße 56, 50935 Köln
E-Mail: ulrike.wieland@uni-koeln.de*