

Aus dem Medizinischen Zentrum für Hals-, Nasen- und
Ohrenheilkunde

Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. Boris. A. Stuck
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Untersuchung zur möglichen Assoziation von Humanen
Papillomaviren bei der Pathogenese vaskulärer Anomalien des
Kopf-Hals-Bereiches - eine explorative immunhistochemische
Studie**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Christopher Samuel Kurz

aus Karlsruhe

Marburg, 2022

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
29.08.2022

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

Dekanin: Frau Prof. Dr. D. Hilfiker-Kleiner

Referent: Herr Prof. Dr. R. Mandic

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. M. Bette

Inhaltsverzeichnis

i.	Abkürzungsverzeichnis	III
ii.	Abbildungsverzeichnis.....	IV
iii.	Tabellenverzeichnis	VI
1	Einleitung	1
1.1	Vaskuläre Anomalien	1
1.1.1	Vaskuläre Tumore.....	3
1.1.2	Vaskuläre Malformationen	10
1.2	Virale Infektionen in der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde	17
1.2.1	Humane Papillomaviren.....	19
1.3	Zielsetzung.....	22
2	Material	23
2.1	Patientengewebe	23
2.2	Patientenkollektiv	23
2.3	Antikörper.....	25
2.4	Chemikalien	26
2.5	Puffer & Lösungen	27
2.6	Geräte	28
2.7	Software und Programme	28
3	Methoden	29
3.1	Immunhistochemie	31
3.1.1	Fixieren und Einbetten	31
3.1.2	Schneiden der Präparate	31
3.1.3	Immunhistochemische Färbung	31
3.1.4	Färbung mit dem CINtec® Kit.....	33
3.1.5	Färbung mit dem CINtec Plus® Kit.....	34
3.1.6	Positiv- und Negativkontrollen.....	35

4	Ergebnisse und Diskussion	37
4.1	Ergebnisse nach Gewebeart.....	37
4.1.1	Arteriovenöse Malformationen (AVM)	37
4.1.2	Lymphatische Malformationen (Lymphangiome)	44
4.1.3	Venöse Malformationen (VeM)	49
4.1.4	Vaskuläre Malformationen, nicht näher bezeichnet	55
4.1.5	Paragangliome.....	61
4.1.6	Hämangiome.....	67
4.1.7	Hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie	73
4.2	CINtec Plus®	78
4.3	Oropharynxkarzinome.....	80
4.4	HPV16 L1.....	87
4.5	Virom-Sequenzierung	88
5	Zusammenfassung.....	90
6	Summary.....	92
7	Literaturverzeichnis	93
8	Anhang.....	107
8.1	Verzeichnis der akademischen Lehrer/-innen	107
8.2	Danksagungen.....	108

i. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
ABC	(Strept)Avidin-Biotin Complex
AIDS	Akquiriertes Immun-Defizienz-Syndrom
AVM	Arteriovenöse Malformation
CLOVES	congenital lipomatous overgrowth, vascular malformations, epidermal nevi, and skeletal anomalies
cm	Centimeter
CM	Kapilläre Malformation
CMV	Cytomegalievirus
CT	Computertomographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus
EHE	epitheloides Hämangioendotheliom
GNAQ	Guanine nucleotide-binding protein
GP	Granuloma pyogenicum
h	Stunde
H ₂ O	Wasserstoffdioxid, Wasser
HA	Hämangiom
HAART	hochaktive antiretrovirale Therapie
HHT	hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie
HHV8	Humanes Herpesvirus 8
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPV	Humanes Papillomavirus
ISSVA	International Society for the Study of Vascular Anomalies
KHE	kaposiformes Hämangioendotheliom
KS	Kaposi-Sarkom
LM	Lymphatische Malformation
MAP2K1	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinasen
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute

ml	Milliliter
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR.....	mechanistic Target of Rapamycin
n.o.s.	not otherwise specified
n-BCA.....	n-butyl cyanoacrylate glue
NICH	noninvoluting congenital hemangiomas
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDL	programmed death-ligand
PG	Paragangliom
PHACE...posterior fossa anomalies, hemangioma, arterial anomalies, cardiac anomalies, and eye anomalies	
PIK3CA...Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha	
PILA	papilläres intralymphatisches Angioendotheliom
RICH	rapidly involuting congenital hemangioma
SWS	Sturge-Weber-Syndrom
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TGF	Transforming Growth Factor
VA	Vaskuläre Anomalie
VEGFR.....	vascular endothelial growth factor receptor
VeM.....	Venöse Malformation
VM.....	Vaskuläre Malformation
z.B.	zum Beispiel

ii. **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1. Einfluss von E6 und E7 auf den Zellzyklus.....	21
Abbildung 2. Zusammenfassung des Ablaufes der Untersuchungen.....	30
Abbildung 3. Färbungen der AVM auf HPV16/18 E6.....	37
Abbildung 4. Färbung der AVM auf HPV16 E1/E4, HPV16 E7, HPV16 L1 und Anti-Human Papillomavirus-Antikörper.....	39
Abbildung 5. Färbung der AVM auf HPV18 E7 und CINtec® Histology.	42
Abbildung 6. Färbung der Lymphangiome auf HPV16/18 E6.....	44

Abbildung 7. Färbung der Lymphangiome auf HPV16 E1/E4, HPV16 E7, HPV16 L1 und Anti-Human Papillomavirus-Antikörper.....	46
Abbildung 8. Färbung der Lymphangiome auf HPV18 E7 und CINtec® Histology.	48
Abbildung 9. Färbung der VeM auf HPV16/18 E6.	49
Abbildung 10. Färbung der VeM auf HPV16 E1/E4, HPV16 E7, HPV16 L1 und Anti-Human Papillomavirus-Antikörper.....	51
Abbildung 11. Färbung der VeM auf HPV18 E7 und CINtec® Histology.....	53
Abbildung 12. Färbung der VM nos auf HPV16/18 E6.	55
Abbildung 13. Färbung der VM nos auf HPV16 E1/E4, HPV16 E7, HPV16 L1 und Anti-Human Papillomavirus-Antikörper.....	57
Abbildung 14. Färbung der VM nos auf HPV18 E7 und CINtec® Histology.	59
Abbildung 15. Färbung der Paragangliome auf HPV16/18 E6.	61
Abbildung 16. Färbung der Paragangliome auf HPV16 E1/E4, HPV16 E7, HPV16 L1 und Anti-Human Papillomavirus-Antikörper.....	63
Abbildung 17. Färbung der Paragangliome auf HPV18 E7 und CINtec® Histology.....	65
Abbildung 18. Färbung der Hämangiome auf HPV16/18 E6.	67
Abbildung 19. Färbung der Hämangiome auf HPV16 E1/E4, HPV16 E7, HPV16 L1 und Anti-Human-Papillomavirus-Antikörper.....	69
Abbildung 20. Färbung der Hämangiome auf HPV18 E7 und CINtec® Histology.	71
Abbildung 21. Färbung M. Osler auf HPV16/18 E6.	73
Abbildung 22. Färbung M. Osler auf HPV16 E1/E4, HPV16 E7, HPV16 L1 und Anti-Human-Papillomavirus-Antikörper.	75
Abbildung 23. Färbung M. Osler auf HPV18 E7 und CINtec® Histology.....	76
Abbildung 24. Färbung mit CINtec Plus® I.....	78
Abbildung 25. Färbung mit CINtec Plus® II.....	79
Abbildung 26. Übersicht p16 ^{INK4a} - Färbung Tumore.....	80
Abbildung 27. Färbung Tumore mit HPV16 E6/18 E6.....	81
Abbildung 28. Färbung Tumore mit HPV16 E7.	83
Abbildung 29. Färbung Tumore mit HPV16 E1/E4.....	84
Abbildung 30. Färbung Tumore mit HPV18 E7..	85

Abbildung 31. Färbung Tumore mit dem Anti-Human-Papillomavirus-Antikörper der Firma Dako (Klon K1H8).	86
---	----

iii. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Klassifikation der Vaskulären Anomalien (entsprechend der International Society for the Study of Vascular Anomalies, 2018).....	3
Tabelle 2. Klinische Einteilung der arteriovenösen Malformationen nach Schobinger	15
Tabelle 3. Übersicht über bedeutende Humane Papillomaviren-Typen nach high und low risk	19
Tabelle 4. Übersicht Präparate Vaskuläre Malformationen	24
Tabelle 5. Übersicht Tumorpräparate.....	25
Tabelle 6. Liste der verwendeten Antikörper	25
Tabelle 7. Liste der verwendeten Chemikalien.....	26
Tabelle 8. Liste der verwendeten Geräte	28

1 Einleitung

1.1 Vaskuläre Anomalien

Vaskuläre Anomalien (VA) zählen zu den häufigsten angeborenen und frühkindlichen Fehlbildungen (Kanada et al. 2012; Werner et al. 2006). Während vaskuläre Tumore wie Hämangiome mit einer Inzidenz von 4-5% relativ häufig vorkommen, gehören Vaskuläre Malformationen zu den seltenen Erkrankungen (*Rare Diseases*) (Munden et al. 2014). Die klinische Relevanz dieser Krankheiten ergibt sich nicht nur aus den kosmetischen Beeinträchtigungen und sozialen Stigmatisierungen, sondern auch durch die anatomische Lage der Fehlbildungen. Sie können von einfachen Geburtsmalen bis hin zu komplexen, je nach Lokalisation, das umliegende Gewebe oder Organ(e) durchsetzenden Fehlbildungen reichen und damit z.B. zu einer Verlegung der Atemwege führen. Auch Blutungen aus diesen Anomalien können beachtlich sein und mitunter letal enden (Colletti und Ierardi 2017; Werner et al. 2006). Aufgrund der Heterogenität der VA sind Untersuchungen zur Entwicklung und Entstehung dieser Erkrankungen wichtig und notwendig.

In aktuellen Studien konnte ein Zusammenhang zwischen somatischen Mutationen im *PIK3CA*-Gen und der Entstehung lymphatischer Malformationen gezeigt werden (Boscolo et al. 2015a; Luks et al. 2015). Weitere Untersuchungen zeigten, dass auch bei venösen Malformationen Mutationen im *PIK3CA*-Gen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese spielen können (Castillo et al. 2019). Auch in syndromalen Erkrankungen wie dem CLOVES (*congenital lipomatous overgrowth, vascular malformations, epidermal nevi, and skeletal anomalies*)- oder dem Klippel-Trenaunay-Syndrom (Fehlbildungssyndrom mit Naevus flammeus, Lymphangiomen und begrenztem Riesenwuchs) konnten diese Mutationen nachgewiesen werden (Boscolo et al. 2015a; Luks et al. 2015). Neuere Untersuchungen konnten *GNAQ* (Guanine nucleotide-binding protein) *R183Q*-Mutationen in kapillären Malformationen identifizieren. Jedoch ist der genaue Mechanismus, der zur Entstehung der Malformationen führt, nicht endgültig geklärt (Bichsel and Bischoff 2019; Iruela-Arispe 2019). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in den letzten Jahren eine Reihe von

Kandidatengeneten, die für die Entstehung vaskulärer Anomalien verantwortlich sein können, identifiziert wurden. Häufig ist jedoch der genaue Mechanismus dahinter noch nicht vollständig geklärt, was die Notwendigkeit, weiterführende Untersuchungen durchzuführen, unterstreicht.

Zur Einteilung der Vaskulären Anomalien wurden im Laufe der Zeit zahlreiche verschiedene Klassifikationen entwickelt. Die Klassifikation, welche von Mulliken und Glowacki aufgestellt wurde, berücksichtigt physikalische Befunde, klinisches Verhalten und zelluläre Reaktionen (Mulliken and Glowacki 1982). Sie erlaubt außerdem, den klinischen Verlauf vorauszusehen und lässt sich im klinischen Alltag leicht anwenden. Auch die *International Society for the Study of Vascular Anomalies (ISSVA)* (ISSVA Classification of Vascular Anomalies ©2018 International Society for the Study of Vascular Anomalies Available at "issva.org/classification") orientiert sich bei der offiziellen Klassifikation der Vaskulären Anomalien an der Klassifikation von Mulliken und Glowacki. Die offizielle ISSVA-Klassifikation unterteilt die Vaskulären Anomalien in Vaskuläre Tumore, die von veränderten Endothelzellen ausgehen, und Vaskuläre Malformationen, die normale Endothelzellen besitzen, jedoch eine vaskulogene Entwicklungsstörung aufweisen. Ein weiterer Unterschied ist, dass sich Vaskuläre Tumore im Laufe des Lebens der Patienten und Patientinnen spontan zurückbilden können, wohingegen Vaskuläre Malformationen im Laufe des Lebens meist an Größe zunehmen (Mylonas et al. 2018; Sadick et al. 2018). Die letzte Aktualisierung dieser Klassifikation erfolgte im Januar 2018 (Tabelle 1). Darüber hinaus existieren auch weitere Einteilungen. So unterteilt beispielsweise die *Hamburger Klassifikation* die Vaskulären Malformationen in entweder extratrunculare oder trunculare Malformationen und gibt somit das Entwicklungsstadium wieder, in welcher die Malformation entsteht.

Tabelle 1. Klassifikation der Vaskulären Anomalien (entsprechend der International Society for the Study of Vascular Anomalies, 2018)

Vaskuläre Anomalien				
Vaskuläre Tumore	Vaskuläre Malformationen			
	Einfache	Kombinierte	Anomalien von Major-Gefäßen ("channel type" or "truncal")	Assoziiert mit anderen Anomalien
Benigne	Kapillare	CVM, CLM	Betreffen: - Arterien - Venen - Lymphgefäße	Klippel-Trenaunay Syndrom
Lokal aggressive oder borderline	Lymphatische	LVM, CLVM		Parkes Weber Syndrom
	Venöse	CAVM		Sturge-Weber Syndrom
Maligne	Arteriovenöse	CLAVM		Servelle-Martorell Syndrom
	Arteriovenöse Fisteln	andere		Maffucci Syndrom

CVM: kapillär-venöse Malformation; CLM: kapillär-lymphatische Malformation; LVM: lymphatisch-venöse Malformation; CLVM: kapillär-lymphatisch-venöse Malformation; CAVM: kapillär-arteriovenöse Malformation; CLAVM: kapillär-lymphatische-arteriovenöse-Malformation

1.1.1 Vaskuläre Tumore

1.1.1.1 Benigne Tumore

1.1.1.1.1 Hämangiome

Hämangiome (HA) lassen sich in zwei große Untergruppen aufteilen: die infantilen Hämangiome und die kongenitalen Hämangiome. Infantile Hämangiome sind hierbei die am häufigsten vorkommenden und treten vorwiegend bei weißen weiblichen Patientinnen auf (3:1 Frauen- zu Männer Verhältnis) (Chiller et al. 2002). Typischerweise treten sie isoliert an Kopf und Hals auf, können jedoch an der gesamten Haut, den inneren Organen oder auch

als multiple Läsionen bzw. in Assoziation mit dem PHACE (posterior fossa anomalies, hemangioma, arterial anomalies, cardiac anomalies, and eye anomalies)-Syndrom auftreten. Infantile Hämangiome unterliegen einem typischen Lebenszyklus. Bei Geburt sind sie in der Regel noch nicht ausgeprägt. In den ersten Wochen und Monaten des Lebens, in der sogenannten Proliferationsphase, werden die infantilen Hämangiome sichtbar und wachsen schnell. In der darauffolgenden, häufig spontan einsetzenden Involutionsphase gehen die Hämangiome über Jahre zurück und verbleiben meist als Residuen in Form von Vernarbungen oder Teleangiektasien (Razon et al. 1998). Aufgrund des meist guten Verlaufs wird meist im „*wait and see*“-Prinzip beobachtet, eine Therapie ist nur bei zunehmendem Wachstum ohne Regression bzw. Komplikationen wie Blutung, Ulzeration oder Verlegung vitaler Strukturen notwendig. Als First-Line-Therapie wird aktuell die orale Gabe des β -Blockers Propranolol empfohlen, alternativ können Kryotherapie, systemische Glukokortikoide, Vincristin oder Interferon alpha eingesetzt werden (Drolet et al. 2013a; Kim et al. 2017).

Die zweite große Gruppe der Hämangiome sind die kongenitalen Hämangiome. Diese lassen sich in zwei weitere wichtige Gruppen unterteilen: die *rapidly involuting congenital hemangiomas* (RICH) und die *noninvoluting congenital hemangiomas* (NICH). Im Unterschied zu den infantilen Hämangiomen sind kongenitale Hämangiome bereits bei Geburt in voller Größe vorhanden und meist an Kopf, Hals oder den unteren Extremitäten zu finden. Als mögliche Ursache werden aktuell Mutationen im *GNAQ*- oder *GNA11*- Gen angesehen (Ayturk et al. 2016). RICH beginnen typischerweise Tage bis wenige Wochen nach der Geburt sich zurückzubilden und sind meistens nach sechs bis vierzehn Monaten komplett verschwunden (Berenguer et al. 2003). Im Gegensatz hierzu bilden sich die NICH nicht spontan zurück, sondern wachsen proportional zum Wachstum des Kindes (Lee et al. 2014). Eine Therapie ist bei den RICH in der Regel nicht notwendig, auch NICH werden nur im Falle von Komplikationen (Blutung, Schmerzen oder Größenzunahme) therapiert. Als Mittel der Wahl werden für oberflächliche NICH gepulste Farbstofflaser oder für größere Läsionen die chirurgische Entfernung eingesetzt.

1.1.1.1.2 Granuloma pyogenicum

Das Granuloma pyogenicum (GP) ist ein gutartiger Tumor der Haut oder Schleimhaut und tritt bevorzugt am Hals, Gesicht oder den Akren auf. Das Granuloma pyogenicum kann in jedem Alter auftreten, scheint jedoch eine Häufung in der zweiten und dritten Lebensdekade zu haben (Harris et al. 2000). Eine Geschlechtsspezifität scheint nicht vorzuliegen, Männer und Frauen sind gleich häufig betroffen (Harris et al. 2000). Der Auslöser für diese Erkrankung ist aktuell noch unbekannt, jedoch gibt es einige Berichte über einen möglichen Zusammenhang mit Traumata oder Medikamenten wie Retinoiden (Sarwal und Lapumnuaypol 2020). Typischerweise besitzen GP eine rötliche Farbe und eine bröckelige Oberfläche und zeigen ein rasches Wachstum. Zudem bluten sie meist bei schon kleinen Verletzungen und neigen zu Ulzerationen (Giblin et al. 2007). Das GP wird auch als kapilläres lobuläres Hämangiom bezeichnet. Da es sich weder um eine granulomatöse noch um eine infektiöse Erkrankung handelt, ist diese Bezeichnung angebrachter. Die Therapie des GP besteht in der chirurgischen Entfernung der Läsion, Shaveexzision mit anschließender Elektrokoagulation oder Laser-Photokoagulation (Lee et al. 2011).

1.1.1.2 Lokal aggressive oder borderline Tumore

1.1.1.2.1 Hämangioendotheliome

Hämangioendotheliome stellen eine heterogene Gruppe der lokal aggressiven vaskulären Tumore da. Sie unterscheiden sich häufig stark in der klinischen Ausprägung. Die Hämangioendotheliome werden in das kaposiforme Hämangioendotheliom, das retiforme Hämangioendotheliom und das papilläre intralymphatische Angioendotheliom, auch Dabska-Tumor genannt, und weitere seltene Unterformen eingeteilt.

Das kaposiforme Hämangioendotheliom (KHE) ist ein seltener vaskulärer Tumor, der meist im Säuglingsalter oder in der frühen Kindheit auftritt. Ein Auftreten im Erwachsenenalter ist möglich, jedoch sehr selten. In aktuellen Studien zeigt sich ein leicht gehäuftes Auftreten bei männlichen Patienten. Eine genaue Ursache, die das Auftreten von KHE erklärt konnte bisher nicht gefunden werden. Jedoch zeigt sich, wie auch in anderen vaskulären Anomalien, in den kaposiformen Hämangioendotheliomen ein gehäuftes Auftreten somatischer Mutationen im

GNAQ-Gen (Lim et al. 2016). Die klinische Manifestation des KHE ist sehr heterogen. Der häufigste Manifestationsort ist die Haut, das klinische Bild reicht von erythematösen Plaques oder Papeln bis hin zu indolenten, violetten und zum Teil sehr derben Tumoren. Eine viszerale Beteiligung ist selten, es wurden jedoch Fälle mit Beteiligung von Knochen, Retroperitoneum oder Mediastinum beschrieben. Das KHE scheint lokal invasiv oder verdrängend zu wachsen, neigt aber nicht zu Fernmetastasen. Zudem weist das KHE in den meisten Fällen ein rasches Größenwachstum auf. Neben Blutungen, Ulzerationen und Verlegung oder Infiltration vitaler Strukturen entwickeln 40-70% der Patienten und Patientinnen das lebensbedrohliche *Kasabach-Merritt-Syndrom*, welches eine Thrombozytopenie mit einer gleichzeitigen Verbrauchskoagulopathie beschreibt (Croteau et al. 2013; Kelly 2010). Das Risiko, ein *Kasabach-Merritt-Syndrom* zu entwickeln, steigt mit der Größe des Tumors an. Die Diagnostik bei den kaposiformen Hämangioendotheliomen erweist sich aufgrund des heterogenen Erscheinungsbildes als schwierig. MRT und Ultraschall können die Ausdehnungsbestimmung erleichtern. Als Goldstandard gilt die pathologische Untersuchung, sofern eine Biopsie des Tumors ohne zu großes Risiko möglich ist (Rosenberg and Agulnik 2018). Die Therapie kleinerer KHEs besteht in der chirurgischen Resektion. Bei Patienten und Patientinnen mit *Kasabach-Merritt-Syndrom* wird aktuell eine Therapie mit dem Zytostatikum Vincristin und systemischen Glukokortikoiden oder eine Therapie mit Sirolimus und systemischen Glukokortikoiden empfohlen (Drolet et al. 2013b). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es sich bei kaposiformen Hämangioendotheliomen zwar um seltene vaskuläre Tumore handelt, welche jedoch mit einer hohen Mortalität einhergehen können.

Das papilläre intralymphatische Angioendotheliom (PILA), oder auch *Dabska-Tumor* genannt, wurde durch Maria Dabska im Jahr 1969 zuerst beschrieben (Dabska 1969). Das PILA ist ein sehr seltener Tumor, derzeit sind weniger als 40 Fälle beschrieben (Li et al. 2013; Silva et al. 2020). Der *Dabska-Tumor* zeigt oft ein lokal aggressives Wachstum, metastasiert jedoch selten. Meist sind die Haut und das subkutane Gewebe der Extremitäten betroffen. Es sind jedoch auch weitere Manifestationsorte wie Milz, Zunge oder Knochen beschrieben (Li et al. 2013). Klinisch präsentiert sich das PILA als diskreter Knoten mit violetter, rosa oder bläulicher Verfärbung und einer Größenausdehnung von bis zu 40 mm

(Schwartz et al. 2000). Die Therapie besteht in einer vollständigen chirurgischen Resektion mit Sicherheitsabständen zu den Schnitträndern (McCarthy et al. 1999; Ji et al. 2020).

1.1.1.2.2 Kaposi-Sarkom

Das Kaposi-Sarkom (KS) ist ein niedrigmaligner vaskulärer Tumor, der stark mit dem Humanen Herpesvirus 8 (HHV-8) assoziiert ist. Der Name geht auf den Erstbeschreiber, den Wiener Dermatologen Moritz Kaposi zurück (Bishop und Lynch 2020). Das Kaposi-Sarkom kann in allen Altersgruppen auftreten und betrifft häufiger männliche Patienten. Aktuell werden vier Formen des Kaposi-Sarkoms unterschieden, je nach den klinischen Umständen, unter welchen sie entstehen: das klassische, das endemische, das AIDS-assoziierte und das iatrogene Kaposi-Sarkom. Bei allen Formen ist jedoch die Pathogenese gleich: Das Humane Herpesvirus 8 befällt Endothelzellen und führt dadurch zu Dysregulationen von Genen in der Zelle (Hong et al. 2004). Die alleinige Infektion mit HHV-8 scheint jedoch nicht auszureichen, um ein Kaposi-Sarkom entstehen zu lassen. Hierzu ist ein Immundefizit des Patienten oder Patientin sowie ein lokales inflammatorisches Milieu notwendig (Radu and Pantanowitz 2013).

Das klassische Kaposi-Sarkom betrifft vor allem ältere Männer aus dem mediterranen Raum oder aus Zentral- und Ost-Europa. Klinisch präsentiert sich das klassische KS meist mit violetten, rotbläulichen oder dunklen Hautläsionen an den unteren Extremitäten, oft einhergehend mit Lymphödemen. Das klassische Kaposi-Sarkom ist in der Regel ein langsam wachsender und lokaler Tumor. Jedoch kann es in einigen Fällen zu Schleimhautbefall oder viszeraler Beteiligung kommen, die mit einer raschen Größenprogression, Ausbreitung und erhöhter Morbidität und Mortalität einhergeht.

Das endemische Kaposi-Sarkom betrifft vor allem dunkelhäutige Erwachsene mittleren Alters und Kinder aus der Sub-Sahara-Region in Afrika. Klinisch präsentiert sich das endemische KS durch multipel lokalisierte Hauttumore, die auch die unteren Extremitäten und/oder Lymphknoten befallen können, was häufig bei jüngeren Patienten und Patientinnen auftritt. Verglichen mit dem klassischen KS verläuft das endemische Kaposi-Sarkom fortschreitend, vor allem bei Lymphknotenbefall zeigt es ein aggressives Verhalten.

Das HIV-assoziierte Kaposi-Sarkom zählt bei HIV-positiven Patienten und Patientinnen zu den AIDS-definierenden Erkrankungen. Die Tatsache, dass die

HIV-Infektion die Replikation des HHV-8 beeinflusst bzw. verstärkt, führt zu einem deutlich aggressiveren Verhalten des KS. Es liegen meist disseminierte Läsionen und eine viszerale Beteiligung vor. Unter einer hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) können sich die Kaposi-Sarkom-Läsionen wieder zurückbilden jedoch bei Absetzen der Therapie auch wieder erneut auftreten.

Das iatrogene Kaposi-Sarkom tritt im Rahmen einer Immunsuppression, meist nach Transplantation bzw. unter Therapie von Autoimmunerkrankungen, auf. Am häufigsten wird das iatrogene Kaposi-Sarkom nach Nierentransplantation, seltener nach Transplantation anderer Organe oder Knochenmarkstransplantation, beobachtet. Klinisch liegt entweder ein lokalisierter Schleimhautbefall oder ein disseminierter Befall mit möglichen viszeralen Läsionen vor. Das iatrogene Kaposi-Sarkom kann sich jedoch bei Aussetzen der immunsuppressiven Therapie zurückbilden. Eine einheitliche Empfehlung zum Staging gibt es aufgrund der Heterogenität der Erkrankung nicht. Daher richtet sich die Therapie nach der klinischen Ausprägung der Erkrankung. Diese reicht von Kompressionsstrümpfen bei einem Ödem der unteren Extremitäten über lokale Maßnahmen wie Laserablation oder chirurgische Exzision, bis hin zu einer systemischen Chemotherapie mit liposomalem Doxorubicin oder Paclitaxel (Requena et al. 2018; Schneider and Dittmer 2017).

1.1.1.3 Maligne Tumore

1.1.1.3.1 Angiosarkome

Angiosarkome sind sehr seltene und hochmaligne Tumore der Blut- oder Lymphgefäße und machen <1% aller Weichgewebssarkome aus. Da sie aus Endothelzellen entstehen, können sie überall im Körper auftreten. Bevorzugt treten sie jedoch als kutane Angiosarkome am Hals, im Gesicht oder auf der Kopfhaut auf. Von Angiosarkomen sind insbesondere ältere Männer mit hellem Hauttyp betroffen. Ein chronisches Lymphödem und eine durchgemachte Strahlentherapie sind aktuell als zwei unabhängige Risikofaktoren beschrieben. Klinisch präsentiert sich das Angiosarkom sehr heterogen und kann in frühen Stadien häufig mit gutartigen Hautveränderungen verwechselt werden (Gaballah

et al. 2017). Vor allem im Kopf-Hals-Bereich kommt es zu einem diffusen, teils tief infiltrierenden Wachstum (Lydiatt et al. 1994). In bereits fortgeschrittenen Stadien kommt es oft zu Blutungen oder Ulzerationen. Eine bereits frühe hämatogene Metastasierung und häufige Lokalrezidive erschweren die Therapie und führen zu einer schlechten 5-Jahres-Überlebensrate von unter 40 %. Die Größe des Tumors spielt für die Prognose eine wichtige Rolle, so haben Patienten und Patientinnen mit einem Tumor <5 cm eine bessere 5-Jahres-Überlebensrate. Sollte eine chirurgische Resektion im Gesunden mit ausreichend weiten Sicherheitsabständen möglich sein, ist es die Therapie der Wahl. Eine chirurgische Therapie sollte mit einer postoperativen Bestrahlung kombiniert werden um ein besseres *Outcome* zu erhalten (Guadagnolo et al. 2011). Bei nicht resektablen oder metastasierten Tumoren kann eine Chemotherapie mit z.B. Taxanen erfolgen. Aktuelle Studien zeigen in ersten Versuchen einen vielversprechenden Therapieansatz mit PDL-1 Checkpoint-Inhibitoren. Hier sind jedoch weiterführende Studien notwendig (Ishida et al. 2018; Florou et al. 2019).

1.1.1.3.2 Epitheloide Hämangioendotheliome

Das epitheloide Hämangioendotheliom (EHE) ist ein sehr seltener vaskulärer Tumor mit einer geschätzten Inzidenz von 1/1.000.000 Einwohner. Prinzipiell können EHE in allen Altersgruppen auftreten (Sardaro et al. 2014). Der Zeitpunkt der Diagnose ist oft abhängig von den betroffenen Organen, welche die EHE befallen haben. Ursachen sowie Risikofaktoren, welche die Entstehung begünstigen, sind aktuell keine bekannt. Die klinischen Beschwerden sind sehr heterogen und von den betroffenen Organen abhängig. Am häufigsten liegt ein Leberbefall mit Gewichtsverlust, *Fatigue* oder abdominellen Schmerzen und ein Lungenbefall mit Hämoptysen, Dyspnoe oder Husten vor. Jedoch können EHE auch in der Haut, der Milz, den Knochen oder im Gehirn auftreten (Sardaro et al. 2014). Bei einem Großteil der Patienten und Patientinnen zeigt sich bei Diagnosestellung bereits ein multifokales oder metastasiertes Wachstum. Das Gesamtüberleben liegt bei symptomatischen Patienten und Patientinnen bei ca. einem Jahr. Bei Patienten und Patientinnen, bei denen die Diagnose z.B. als radiologischer Zufallsbefund erfolgte, zeigen sich mit 10 Jahren deutlich bessere mediane Überlebenszeiten. Therapeutisch sollte, falls möglich, eine vollständige Resektion des Tumors angestrebt werden. Bei fortgeschrittenen multifokalen,

metastasierten oder nicht-resektablen Tumoren sind Therapien mit antiangiogenen Medikamenten wie Pazopanib (VEGFR, PDGFR, KIT - Tyrosinkinase-Inhibitor) oder eine Chemotherapie mit z.B. Gemcitabine möglich (Semenisty et al. 2015; Yousaf et al. 2015).

1.1.2 Vaskuläre Malformationen

Im Gegensatz zu Vaskulären Tumoren entstehen Vaskuläre Malformationen während der Schwangerschaft bei der Ausbildung des Gefäßsystems und sind somit bereits bei der Geburt vorhanden, wenn auch nicht immer sichtbar. Das klinische Bild der vaskulären Malformationen ist stark von den betroffenen Gefäßen abhängig und damit sehr heterogen. Nach der Klassifikation der ISSVA aus dem Jahr 2018 werden sie in einfache Malformationen, nur ein Gefäßsystem wie Arterien, Venen, Kapillaren oder Lymphgefäße, oder in kombinierte Malformationen, mehrere dieser Gefäßsysteme betreffend, eingeteilt. Die Vaskulären Malformationen werden häufig klinisch weiter anhand ihrer Flussdynamik in Niederfluss (Low flow)- (kapilläre, venöse oder lymphatische) oder in Hochfluss (High flow)-Malformationen (arteriovenöse) unterteilt (ISSVA Classification of Vascular Anomalies ©2018 International Society for the Study of Vascular Anomalies Available at "issva.org/classification").

1.1.2.1 Einfache Malformationen

1.1.2.1.1 Kapilläre Malformationen

Kapilläre Malformationen (CM) sind eine sehr seltene Erkrankung und treten bei 0,1 – 0,2 % der Neugeborenen auf (Kanada et al. 2012). Sie zählen zu den Niedrigfluss-Malformationen und betreffen überwiegend die oberflächlichen Hautkapillaren. Laut der ISSVA Klassifikation zählen dazu der *Naevus simplex* (auch „Storchenbiss“ genannt), der *Portweinfleck* oder *Teleangiektasien*, wie z.B. bei der hereditären hämorrhagischen Teleangiektasie (M. Osler). Klinisch zeigt sich ein scharf begrenzter, pinker bis dunkelroter Fleck der Haut, der am ganzen Körper auftreten kann und sehr größenvariabel ist. Im Gesicht scheinen kapilläre Malformationen sich entlang des N. trigeminus auszubreiten. Im zeitlichen Verlauf werden die Läsionen dicker, dunkler und können sich knotig verändern.

Da kapilläre Malformationen auch bei Syndromen auftreten können, sollte vor allem bei Lokalisation im Gesicht ein *Sturge-Weber-Syndrom* (SWS) ausgeschlossen werden. Hierbei handelt es sich um eine sehr seltene Erkrankung mit der typischen Trias aus Portweinflecken im Gesicht, ipsilateraler leptomeningealer Angiomatose und einer Augenbeteiligung mit erhöhtem Glaukomrisiko. Aufgrund der zerebralen Beteiligung leidet ein Großteil der Patienten und Patientinnen an epileptischen Anfällen bis hin zu Hemiparesen oder geistiger Retardierung (Higueros et al. 2017). Ursächlich für das SWS ist eine Mosaikmutation im *GNAQ*-Gen (Shirley et al. 2013). Isolierte kapilläre Malformationen müssen nicht zwingend behandelt werden. Sollte ein Therapiewunsch z.B. aus kosmetischen Gründen vorliegen, ist eine Therapie mittels gepulstem Farbstofflaser möglich (Faurich et al. 2011).

1.1.2.1.2 Lymphatische Malformationen

Lymphatische Malformationen (LM), oder auch Lymphangiome genannt, sind, wie andere Vaskuläre Malformationen auch, bereits bei Geburt ausgebildet und betreffen das lymphatische System. Als ursächlich für die Entstehung von Lymphangiomen werden ein Fehlen von muskularisierten Wänden der Lymphgefäße sowie Infektionen oder Traumata in der Schwangerschaft diskutiert (Morrow et al. 2016). In neueren Studien konnten in gewöhnlichen lymphatischen Malformationen Mutationen im *PIK3CA* (*Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha*)-Gen nachgewiesen werden (Greene and Goss 2018). Die häufigste Lokalisation von Lymphangiomen ist der Kopf-Hals-Bereich, vor allem Zunge oder Mundboden (Wiegand und Werner 2016). Klinisch stellen sich Lymphangiome als schmerzlose, weiche und komprimierbare Raumforderungen dar. Morphologisch handelt es sich um ein- bis mehrkammerige Hohlräume mit Lymphflüssigkeit, die in Größe, Form und Anzahl variieren können. Unterschieden werden sie nach Größe ihrer Zysten in makrozystische (> 1 cm), mikrozystische (< 1 cm) oder gemischte lymphatische Malformationen. Das Wachstum von lymphatischen Malformationen zeigt sich proportional zum Körperwachstum des Patienten oder der Patientin und ist damit in der Regel eher langsam. Jedoch können äußere Faktoren wie Traumata oder Infektionen zu einer raschen Größenprogredienz führen und bei entsprechender

anatomischer Lage zu lebensbedrohlichen Komplikationen wie einer Verlegung der Atemwege führen. Vor allem makrozystische Läsionen können bereits in der Schwangerschaft im Ultraschall erkannt und diagnostiziert werden. Bei der Geburt erfolgt eine sogenannte EXIT (*ex-utero intra-partum treatment*) - Prozedur, um das Risiko einer tödlichen Atemwegsverlegung zu reduzieren. Hierbei handelt es sich um ein Verfahren im Rahmen eines Kaiserschnitts, bei dem die Atemwege des Kindes vor Unterbindung der Nabelschnur inspiziert werden und ggf. eine Intubation oder Tracheotomie zur Sicherung der Atemwege durchgeführt wird.

Therapeutisch kommen die chirurgische Resektion, welche bei den makrozystischen Lymphangiomen häufiger gelingt als bei den mikrozystischen, sowie die Sklerosierung zum Einsatz. An Sklerotherapeutika werden aktuell OK-432 (Picibanil), Doxycyclin, Ethanol oder Bleomycin eingesetzt. Zudem gibt es neuere Therapieversuche mit Sirolimus, die einen Therapieeffekt zeigen, jedoch mit einer Immunsuppression einhergehen, und in größeren randomisierten Studien weiter untersucht werden müssen (Wiegand et al. 2018).

1.1.2.1.3 Venöse Malformationen

Die häufigsten vaskulären Malformationen sind die Venösen Malformationen (VeM). Sie treten in über 90 % sporadisch auf, wobei auch autosomal dominante Erbgänge bekannt sind (Brouillard and Vikkula 2007). Zu diesen vererbaren Malformationen gehören die kutaneomukosalen venösen Malformationen, die glomusvenösen Malformationen oder auch Syndrome wie das Maffucci- oder das Klippel-Trenaunay-Syndrom. Ursächlich konnten bisher eine Mutation im *TIE2*-Gen, einem Tyrosinkinase-Rezeptor auf Endothelzellen, und im *PIK3CA*-Gen ausgemacht werden (Limaye et al. 2015; Soblet et al. 2013). Beide Mutationen führen über eine Störung intrazellulärer Signalwege zu einer verminderten Rekrutierung von Perizyten. Dies führt zu dilatierten und dysfunktionalen Venen, aus denen die venösen Malformationen bestehen. Wie die anderen vaskulären Malformationen sind venöse Malformationen bereits bei der Geburt vorhanden und wachsen mit dem Patienten oder der Patientin. Jedoch können die Pubertät oder andere hormonelle Veränderungen des Körpers zu einem verstärkten Größenwachstum führen. Die Kopf-Hals-Region ist neben den Extremitäten am

häufigsten betroffen. Klinisch sind venöse Malformationen als weiche, komprimierbare Raumforderungen, die bläulich durch die Haut schimmern, zu erkennen. Zwar sind Haut und Schleimhaut am häufigsten betroffen, venöse Malformationen können aber auch in allen anderen Organen auftreten. Die Symptomatik der Betroffenen hängt sehr stark von der betroffenen Region, der Größe und der Verdrängung umliegender Organe ab. So können venöse Malformationen im Kopf-Hals-Bereich zu Exophthalmus, Asymmetrie im Gesicht mit Kiefer- und Zahnfehlstellungen oder sogar zu einer lebensbedrohlichen Verlegung der Atemwege führen (Behravesch et al. 2016). Das häufigste Symptom, über das die Patienten und Patientinnen berichten, sind starke Schmerzen. Auch eine chronische Anämie aufgrund dauerhafter leichter Blutungen tritt häufig auf. Aufgrund ihrer langsamen Fließgeschwindigkeit kann es zur Bildung von Thromben in den Malformationen kommen. Obwohl diese Thrombosen gehäuft vorkommen, sind keine vermehrten Lungenarterienembolien beschrieben. Dies liegt daran, dass insbesondere die Teile der Malformationen, in denen die Thromben entstehen, vom Hauptdurchfluss entfernt liegen oder abgetrennt sind. Die Thromben gelangen dadurch nicht in das normale vaskuläre System des Körpers, wo sie zur Entstehung von Phlebolith führen könnten. Bei sehr großen venösen Malformationen kann es aufgrund der aktivierten intravasalen Gerinnung zu Verbrauchskoagulopathien kommen (Dompmartin et al. 2010). Zur Diagnostik können Ultraschall oder MRT genutzt werden, um die genaue Größenausbreitung festzustellen. Eine Therapie sollte nur bei Beschwerden wie ästhetischer Beeinträchtigung, ausgeprägten Schmerzen oder Verdrängung wichtiger Organe oder Strukturen und nur nach interdisziplinärer Beratung erfolgen. Eine invasive Therapie sollte immer zusammen mit konservativen Maßnahmen wie Kompression oder einer medikamentösen Schmerztherapie erfolgen. Sklerotherapien, Operationen oder die Kombination aus beiden stehen zur weiteren Therapie aktuell zur Verfügung. Da es an randomisierten Studien fehlt, werden verschiedene Sklerotherapeutika wie Ethanol, Polidocanol oder Mikroschaum eingesetzt (Horbach et al. 2016; Behravesch et al. 2016). Aufgrund der häufigen Mutationen in *TIE2* und *PIK3CA* werden aktuell klinische Studien mit dem *mTOR* (*mechanistic Target of Rapamycin*) - Inhibitor Sirolimus und dem

direkten *PIK3CA*-Inhibitor „Alpelisib“ durchgeführt (Boscolo et al. 2015b; Hammer et al. 2018; Venot et al. 2018).

1.1.2.1.4 Arteriovenöse Malformationen

Arteriovenöse Malformationen (AVM) sind wie alle vaskulären Malformationen bereits bei Geburt vorhanden und können bei Säuglingen leicht mit Hämangiomen verwechselt werden. Sie treten am häufigsten im Kopf-Hals-Bereich auf. Zudem sind sie oft im Rahmen von erblichen Erkrankungen wie dem Morbus Osler (hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie) als pulmonale oder cerebrale AVMs zu finden. Neue Untersuchungen beobachteten eine Mutation in *MAP2K1* (Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinasen) als mögliche Ursache der Entstehung der AVMs (Qiao et al. 2019). Arteriovenöse Malformationen zählen zu den *High-Flow* Malformationen. Sie bestehen aus Arterien und Venen, die direkt ohne zwischengeschaltete Kapillaren kommunizieren. Dieser Kurzschluss oder Shunt, in dem die Arterien in die Venen übergehen, wird als „Nidus“ bezeichnet. Durch den hohen Blutfluss und der fehlenden Regulation der Kapillaren kommt es zu einer Überlastung der drainierenden Venen, die sich deshalb ausdehnen (Wiegand und Dietz 2021). Zudem kommt es zu einem kontinuierlichen Wachstum der arteriovenösen Malformation durch kontinuierliche Ausdehnung des Nidus. Typischerweise präsentieren sich AVMs als rötlich-bläuliche Hautläsionen, bei denen sich im Gegensatz zu Niedrigfluss-Malformationen oder Hämangiomen, eine Pulsation palpieren lässt. Aufgrund der zunehmenden Größenausdehnung kommt es im Verlauf zu dystrophen Hautveränderungen, Ischämie und Gewebeabbau und hierdurch zu Blutungen, Ulzerationen oder Nekrosen. Bei sehr großen AVMs kann es aufgrund des großen Volumens in der Malformation zu einer hyperdynamen Herzinsuffizienz kommen. Aufgrund dieser Komplikationen gehören arteriovenöse Malformationen zu den gefährlichsten vaskulären Anomalien mit einer hohen Mortalitätsrate. Klinisch werden arteriovenöse Malformationen nach Schobinger eingeteilt (Tabelle 2) (Nosher et al. 2014). Zur Diagnosestellung ist in der Regel eine weitere bildgebende Diagnostik mittels Angiographie oder MRT notwendig. Die Therapie stellt sich insgesamt als sehr komplex dar. Therapeutisch stehen Embolisation und Operation zur Verfügung. Eine Embolisation sollte immer das

Ziel haben, den Nidus komplett zu verschließen. Zudem ist ein Ausschalten der zuführenden Arterien von distal nach proximal notwendig, da es sonst zu einer Kollateralbildung kommt. Auch eine perkutane Direktpunktion zur Embolisation ist möglich (Ranieri et al. 2017). Es stehen verschiedenen Mittel zur Embolisation zur Verfügung: Ethanol, n-BCA (n-butyl cyanoacrylate glue), Onyx® oder Coils (Müller-Wille et al. 2018). Aktuell gibts es keine klare Empfehlung, da jedes Mittel seine Vor- und Nachteile hat. Mit Ethanol werden z.B. sehr gute Ergebnisse von 40-88% Heilung erzielt, jedoch birgt die Behandlung mit Ethanol auch die höchste Komplikationsrate. Die Verwendung von *Coils* wird aktuell kontrovers diskutiert, da das Coiling häufig zu Endothelschäden führt und mit einer erhöhten Rekanalisierungsrate einhergeht. Eine operative Entfernung sollte nur nach einer vorher durchgeführten Embolisation durchgeführt werden. Aufgrund des zu erwartenden Größenwachstums sollte eine Therapie so früh wie möglich erfolgen. Trotz allem ist eine komplette Heilung nicht immer möglich und es besteht lebenslang die Gefahr einer Rekanalisierung, sodass ein lebenslanges Monitoring mit regelmäßigen Kontrollen stattfinden sollte (Wiegand und Dietz 2021).

Tabelle 2. Klinische Einteilung der arteriovenösen Malformationen nach Schobinger

Stadien		Klinisches Bild
I	Ruhephase	Überwärmung, rötliches Schimmern, leichtes Schwirren
II	Evolution	Größenzunahme, Pulsation
III	Destruktion	Ulzeration, Nekrosen, Schmerz, Blutung, dystrophe Hautveränderungen
IV	Dekompensation	hyperdynamie Herzinsuffizienz durch hohes Shunt-Volumen

1.1.2.1.5 Arteriovenöse Fisteln

Wie die Arteriovenösen Malformationen zählen auch die arteriovenösen Fisteln zu den Hochfluss Malformationen. Im Gegensatz zu den AVMs haben sie keinen Nidus, sondern sind direkt kurzgeschlossen. Sie können wie die anderen Malformationen bei Geburt bereits vorhanden sein, aber auch nach Trauma

entstehen oder iatrogen angelegt worden sein. Die häufigste Lokalisation der Fisteln ist das Gehirn in Form einer arteriovenösen Durafistel oder Karotis-Sinus-cavernosus Fistel. Sie werden meist erst bei Symptomen wie pulssynchronem Tinnitus, Exophthalmus oder zerebraler Blutung auffällig. Eine weitere bildgebende Diagnostik mittels MRT oder CT ist notwendig. Die Therapie ist ähnlich der Therapie der arteriovenösen Malformationen und sollte aufgrund der hohen Gefahr für Hirnblutungen frühzeitig erfolgen (Li et al. 2018).

1.1.2.1.6 Hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie

Die hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie (HHT), auch Morbus Osler genannt, ist eine autosomal dominant vererbte Erkrankung. In Deutschland sind ca. 35.000 Menschen betroffen. Aktuell sind 3 Major-Gene als Auslöser bekannt: *ENG*, *ACVRL1* und *SMAD4* (Govani and Shovlin 2009). Patienten und Patientinnen mit HHT wissen oft nichts von ihrer Erkrankung, da sie sich erst im Laufe des Lebens entwickelt. Die internationalen Curaçao-Kriterien können zur Erkennung der Erkrankung herangezogen werden. Diese umfassen rezidivierende Epistaxis, multiple kutane oder mukokutane Teleangiektasien sowie eine positive Anamnese für Verwandte ersten Grades, die an HHT leiden (Faughnan et al. 2020). Die ersten Symptome sind meist bereits im Kindesalter spontan rezidivierende Epistaxis. Bei HHT können auch weitere vaskuläre Malformationen wie pulmonale, hepatische oder zerebrale arteriovenöse Malformationen auftreten. Gerade pulmonale AVMs können zu lebensbedrohlichen Komplikationen wie Schlaganfällen durch paradoxe Embolien, Hirnabszessen durch paradoxe septische Emboli oder Hämatothoraces durch Blutungen führen (Cottin et al. 2004). Eine bildgebende Diagnostik sollte daher bei Diagnosestellung durchgeführt werden. Therapeutisch kommen bei der Epistaxis lokale Maßnahmen mit Nasensalben und die Patientenschulung zum Einsatz. Bei häufig rezidivierender Epistaxis kann eine systemische Therapie mit z.B. Tranexamsäure erfolgen (Geisthoff et al. 2014). Als *Ultima ratio* kann z.B. ein Nasenverschluss nach Young erfolgen. Bei pulmonalen AVMs sollte eine konsequente antibiotische Prophylaxe bei chirurgischen Eingriffen erfolgen. Therapeutisch kann hier eine Embolisation erfolgen. Die Behandlung zerebraler AVMs ist oft schwierig und sollte nur in

spezialisierten Zentren durchgeführt werden (Faughnan et al. 2020). Die Prognose bei HHT ist sehr abhängig von der klinischen Ausprägung und den zur Verfügung stehenden Therapieoptionen. Bei entsprechender Therapie können Patienten und Patientinnen mit HHT heutzutage eine fast normale Lebenserwartung haben.

1.1.2.1.7 Paragangliome

Paragangliome (PG), auch Glomustumore genannt, sind seltene gutartige neuroendokrine Tumore, die von extraadrenalen Paraganglien ausgehen und mit dem Phäochromozytom verwandt sind. Paragangliome im Kopf-Hals-Bereich gehen meist von parasymphatischen Ganglien aus und sind bevorzugt an der Carotisbifurkation (Glomus caroticum), dem Foramen jugulare (Glomus jugulare) oder der Paukenhöhle (Glomus tympanicum) zu finden (Welander et al. 2011). Histologisch ist eine starke Vaskularisation und das Vorliegen sogenannter Zellballen typisch (Persky et al. 2002). Die klinischen Symptome sind je nach Lokalisation sehr unterschiedlich. Patienten und Patientinnen mit einem Glomus caroticum-Tumor werden meist mit einer schmerzlosen, weichen Masse am Hals vorstellig, während Patienten und Patientinnen mit einem Glomus tympanicum-Tumor über einen pulsierenden Tinnitus oder Hörminderung berichten. Aufgrund ihrer Herkunft können manche PG auch Katecholamine produzieren und zu Hypertension, Kopfschmerzen oder Tachykardie führen. Zur Bestimmung der Tumorausdehnung sind bildgebende Verfahren wie CT, MRT oder digitale Subtraktionsangiographie notwendig. Eine Messung von Metanephrinen oder Katecholaminen im Urin und im Blut ist, bei sezernierenden Tumoren, eine notwendige weitere Diagnostik (Erickson et al. 2001). Als therapeutische Verfahren stehen aktuell die chirurgische Resektion oder alternativ die Radiotherapie zur Verfügung (Lloyd et al. 2020).

1.2 Virale Infektionen in der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde

Virale Infektionen sind ein sehr häufiges Krankheitsbild in der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde. Die Reichweite und Auswirkungen dieser Infektionen sind sehr unterschiedlich. So sind z.B. Rhinoviren als Auslöser für eine einfache Sinusitis

(Nasennebenhöhlenentzündung) oder einen „gewöhnlichen grippalen Infekt“ verantwortlich. Diese Infekte sind in der Regel selbstlimitierend und klingen nach fünf bis sieben Tagen wieder ab (Winther et al. 1998). In neueren Studien wird jedoch den Rhinoviren eine entscheidende Rolle bei der Exazerbation von Asthma zugeschrieben (Heymann et al. 2005). Auch Mandelentzündungen (Tonsillitis) sind meistens primär durch Viren bedingt. Eine besondere Rolle kommt hier dem Epstein-Barr-Virus (EBV) zu. Meistens ist eine EBV-Infektion klinisch inapparent und verläuft ohne schwerwiegende Symptome. Allerdings kann vor allem bei jungen Erwachsenen eine EBV-Infektion mit Schluckbeschwerden aufgrund einer Tonsillenhyperplasie und zervikaler Lymphadenopathie einhergehen sowie mit abdominellen Beschwerden durch eine Hepatosplenomegalie oder selten auch einer Milzruptur assoziiert sein (Dunmire et al. 2018). Aufgrund der transformierenden Wirkung des EB-Virus in den Wirtszellen kann es zur Entstehung von Tumoren, wie dem Burkitt-Lymphom oder T-Zell-Lymphomen kommen (Kanda et al. 2019). Auch bei Karzinomen im Nasenrachenraum ist EBV der Hauptauslöser und kann sehr häufig nachgewiesen werden (Brooks et al. 1992). Ein weiteres Virus, das sein Hauptreservoir im HNO-Bereich zu haben scheint, ist das aktuell sehr präsente SARS-CoV-2, dass die COVID-19-Erkrankung verursacht, und vor allem im Nasenrachen zu finden ist (Freni et al. 2020). In der HNO-Heilkunde sind jedoch nicht nur akute Erkrankungen durch Viren anzutreffen, sondern auch die Spätfolgen von intrauterinen viralen Infektionen. So sind mehrere Viren bekannt, die bei einer intrauterinen Infektion zu fetalen Fehlbildungen bis hin zu Aborten führen können (Keighley et al. 2019). Die weltweit meisten kongenitalen viralen Infektionen werden durch das Humane Cytomegalievirus (CMV) ausgelöst und können zu neurologischen Entwicklungsstörungen, sensorineuraler Hörminderung oder epileptischen Anfällen führen. So ist der Hauptgrund einer nicht erblich-bedingten sensorineuralen Hörminderung die kongenitale CMV-Infektion (Dreher et al. 2014). Ein weiterer Grund für eine sensorineurale Hörminderung ist eine kongenitale Rötelninfektion. Außerdem führen diese Infektionen typischerweise zu Katarakten und angeborenen Herzfehlern. In Ländern mit Impfungen gegen Röteln ist heutzutage eine kongenitale Rötelninfektion selten geworden (Leung et al. 2019). Mehrere Studien konnten zudem bei pränatalen CMV- und Röteln-Infektionen eine angioproliferative

Wirkung sowie ein vaskuläres Remodeling nachweisen (Tabata et al. 2012; Gustafsson et al. 2015; Esterly and Oppenheimer 1967). Ein weiteres Virus, das aufgrund seiner perinatalen Übertragung aber auch durch kanzerogene Wirkung in der Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde eine wichtige Rolle spielt, ist das Humane Papilloma-Virus (HPV).

1.2.1 Humane Papillomaviren

Das Humane Papillomavirus (HPV) ist ein Doppelstrang-DNA-Virus, das auch den Menschen infiziert. Heute sind über 200 HP-Viren bekannt, welche sich jedoch in ihrer klinischen Bedeutung stark unterscheiden. So sind einige Genotypen mit der Entstehung verschiedener Tumore assoziiert. Eine Übersicht der häufigsten *High risk* und *Low risk* Genotypen ist in Tabelle 3 dargestellt (Sanjose et al. 2010).

Tabelle 3. Übersicht über bedeutende Humane Papillomaviren-Typen nach high und low risk

High risk	HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 58, 59 und 68
Low risk	HPV 6, 11, 40, 42 43, 44, 53, 54, 61, 72, 73 und 81

Das Genom des HP-Virus kodiert sechs *early*-Proteine (E), die hauptsächlich für die virale Genregulation und Zelltransformation verantwortlich sind, und zwei *late*-Proteine (L), welche die Virushülle formen. Die Proteine E1 und E2 arbeiten zusammen und sind zuständig für die Regulation der viralen DNA-Replikation. E2 wiederum sorgt für die Down-Regulation der E6- und E7- Expression (Graham 2016). Das Protein ist unter anderem für das Wachstum der Zelle zuständig. Weiter führt das Protein E5 über eine *Downregulierung* von *Major Histocompatibility Complex I* (MHC) und MHC II zu einem *Immun escape* der infizierten Zelle, d.h. das Entdecken von infizierten Zelle durch das Immunsystem ist erschwert (Scarath et al. 2021). Die Rolle von E4 ist aktuell noch nicht abschließend geklärt. Die Proteine E6 und E7 gehören zu den *Major-Onkoproteinen* und regulieren die Zellteilung der Wirtszelle. Das Protein p53 ist als negativer Regulator des Zellzyklus und zentrales Tumorsuppressor-Protein bei DNA-Schäden bekannt, es wird daher auch „Wächter des Genoms“ genannt.

E6 sorgt über eine direkte Bindung an p53 zu seiner Degradierung und damit Inaktivierung (Scheffner et al. 1993; Storey et al. 1998). Dies erlaubt unkontrollierte Zellteilungen, hat einen antiapoptotischen Effekt und führt bei high-risk HP-Viren zu einer chromosomalen Instabilität aufgrund nicht behobener DNA-Schäden. Das zweite *Major-Onkoprotein* E7 bindet an das *Retinoblastomprotein* (Rb) und besetzt die Bindungsstelle des E2F-Transkriptionsfaktors. Die damit verbundene Freisetzung von E2F führt zu einem Übergang der Zelle aus der *G1*- in die *S-Phase* des Zellzyklus und stimuliert unter anderem die Bildung von Cyclin A und DNA- Polymerase. Hierbei kommt es aufgrund der fehlenden Bindung von E2F und Rb relativ zu einer Überexpression des Tumorsuppressor-Proteins p16^{INK4a}. Normalerweise verhindert p16^{INK4a} die Bildung eines aktiven Komplexes von Cyclin D und CDK4 (Sritippho et al. 2015). Diese Komplexe phosphorylieren sonst Rb und führen zur Freisetzung von E2F. Durch Ausschalten dieses Mechanismus durch Bindung von E7 an Rb kommt es zu einer unkontrollierten paradoxen Expression von p16^{INK4a}, welches sich als Surrogatmarker in HPV assoziierten Tumoren immunhistochemisch nachweisen lässt (Zur Hausen 2000; Demers et al. 1994). Weiter inhibiert das Protein E7 die cyclin-abhängigen Kinaseinhibitoren p21 und p27. All dies führt zu einem unkontrollierten Übergang der Zelle in die *S-Phase* und kann zu malignen Veränderungen führen.

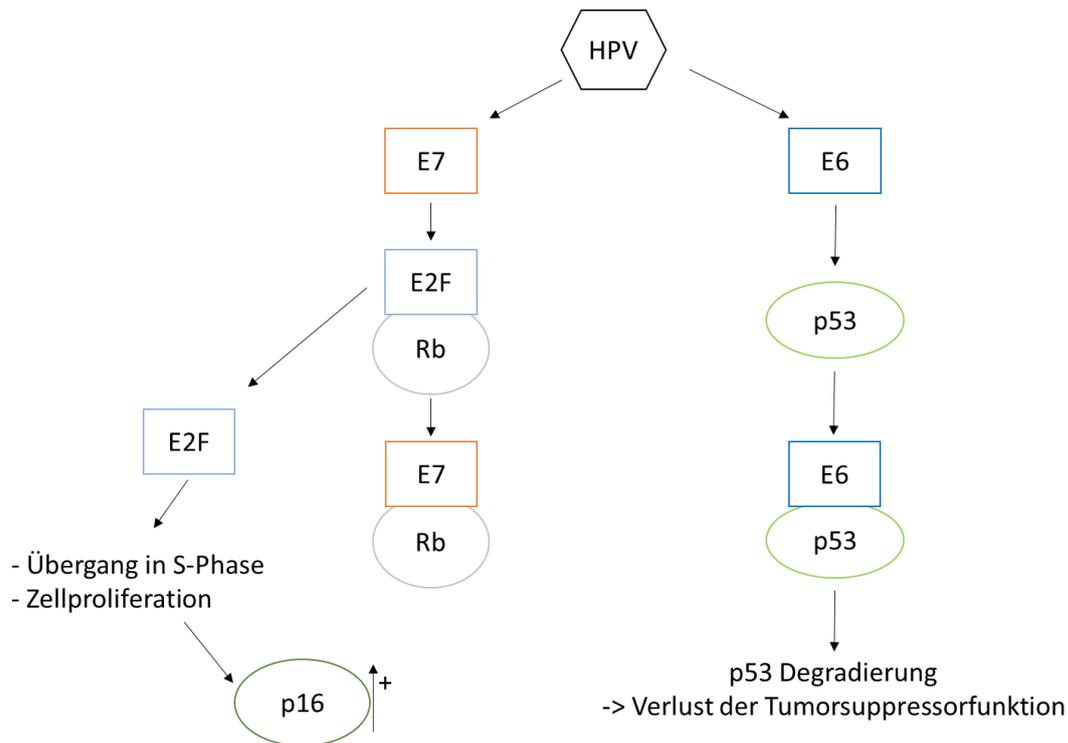


Abbildung 1. Einfluss von E6 und E7 auf den Zellzyklus. Dargestellt ist der Einfluss der Proteine E6 und E7 auf den Zellzyklus der Zelle. Das Protein E6 bindet an p53 und führt über dessen Degradierung zum Verlust der p53-Tumorsuppressor-Funktion. Das Protein E7 bindet anstatt von E2F an Rb und induziert über die Freisetzung von E2F die Zellproliferation. Das freigewordene E2F steigert relativ die p16^{INK4a} Expression, das aufgrund der Bindung von Rb und E7 nicht zur Gegenregulation fähig ist.

Das klinische Krankheitsbild variiert ebenso abhängig vom Virustyp. Die meisten Infektionen sind nach spätestens 12 Monaten abgeklungen, jedoch persistieren die Viren in den meisten Patienten und Patientinnen. So führt eine Infektion mit HPV1 oder 2 zu kutanen Warzen, während eine Infektion mit HPV6, 11, 16 oder 18 zu Condylomata acuminata, Genitalwarzen, zu Präkanzerosen oder Karzinomen von Cervix, Vulva, Penis, Anus oder Oropharynx führen können (Brianti et al. 2017; D'Souza et al. 2007). In der HNO-Heilkunde ist in den letzten Jahren eine Zunahme der HPV-assoziierten Oropharynxkarzinome zu beobachten. Im Gegensatz zu HPV-negativen Tumoren sind bei HPV-positiven Tumoren vor allem jüngere Patienten und Patientinnen betroffen, die jedoch eine bessere Prognose und ein besseres Therapieansprechen zeigen (Sritippho et al. 2015). Perinatale Infektionen im Geburtskanal mit HPV6 oder 11 können zu einer Larynxpapillomatose führen. Dies ist ein gutartiger Tumor des Kehlkopfes, der jedoch zu häufigen Rezidiven neigt und mehrfacher operativen Entfernungen bedarf, die vollständige Entfernung gelingt trotzdem nicht immer (Derkey and

Wiatrak 2008). Eine kurative Therapie gegen Humane Papillomaviren existiert aktuell nicht. Seit einigen Jahren sind mehrere Impfstoffe gegen HPV zugelassen. So werden mit dem neunfach-Impfstoff Gardasil die wichtigsten low- und high-risk Genotypen (HPV6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58) abgedeckt (Joura et al. 2015).

1.3 Zielsetzung

Die genaue Entstehung von Vaskulären Anomalien ist trotz einiger in den letzten Jahren entdeckten Genmutationen nicht vollständig geklärt. Eine virale Infektion, die zur Veränderung des Endothelzellwachstums führt, könnte ein möglicher Auslöser sein. In nicht publizierten Daten aus unserer Forschungsgruppe zeigten immunhistochemische Färbungen von Präparaten Vaskulärer Anomalien unter Einsatz von Antikörpern gegen ein Protein des Humanen Papillomavirus potenziell positive Signale. Das Ziel dieser Arbeit ist es daher, das Vorhandensein einer aktiven HPV-Infektion in Vaskulären Anomalien weiter zu untersuchen und eine mögliche Assoziation viraler Infekte bei der Pathogenese vaskulärer Anomalien zu analysieren. Im positiven Falle könnte das Ergebnis zum weiteren Verständnis der Entstehung vaskulärer Anomalien beitragen und Optionen für neue Therapien eröffnen.

2 Material

2.1 Patientengewebe

Die Untersuchungen der Patientenproben erfolgten nach einem positiven Votum der Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg (AZ: 111/12 vom 09.07.2012). Die Gewebeproben wurden nur im Rahmen medizinisch notwendiger Operationen entnommen. Die Proben wurden erst nach der Diagnosestellung durch das Institut für Pathologie untersucht. Es wurden keine Versuche an Patienten und Patientinnen durchgeführt.

2.2 Patientenkollektiv

Insgesamt wurde Gewebe von 27 Patienten und Patientinnen mit Vaskulären Anomalien untersucht (Tabelle 4). Die Proben wurden im Rahmen der Behandlung der Patienten und Patientinnen im Zeitraum 2000 – 2004 und 2012 - 2014 gewonnen. Als Kontrollgewebe wurden Tumorproben aus Oropharynxkarzinomen verwendet (Tabelle 5) (Amendment I vom 04.11.2019 zum Ethikantrag AZ: 111/12). Das Gewebe der Tumorpräparate wurde im Jahr 2018 im Rahmen von Tumoroperationen in der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde entnommen. Die Diagnosestellung aller Proben erfolgte am Institut für Pathologie des Universitätsklinikum Marburg. Die Fallnummerkennzeichnung der Präparate wurde aus Datenschutzgründen pseudonymisiert.

Tabelle 4. Übersicht Präparate Vaskuläre Malformationen

Präparat	Vaskuläre Anomalie
AVM-1	Arteriovenöse Malformation
AVM-2	Arteriovenöse Malformation
AVM-3	Arteriovenöse Malformation
AVM-4	Arteriovenöse Malformation
HA-1	Hämangiom
HA-2	Hämangiom
HA-3	Hämangiom
HA-4	Hämangiom
HA-5	Hämangiom
HHT-1	Hereditäre hämorrhagische Teleangiectasie (M. Osler)
HHT-2	Hereditäre hämorrhagische Teleangiectasie (M. Osler)
HHT-3	Hereditäre hämorrhagische Teleangiectasie (M. Osler)
LM-1	Lymphangiom
LM-2	Lymphangiom
LM-3	Lymphangiom
PG-1	Paragangliom
PG-2	Paragangliom
PG-3	Paragangliom
PG-4	Paragangliom
VeM-1	Venös-lymphatische Malformation
VeM-2	Venöse Malformation
VeM-3	Venöse Malformation
VM-1	Vaskuläre Malformation, n.o.s.
VM-2	Vaskuläre Malformation, n.o.s.
VM-3	Vaskuläre Malformation, n.o.s.
VM-4	Vaskuläre Malformation, n.o.s.
VM-5	Vaskuläre Malformation, n.o.s.

Tabelle 5. Übersicht Tumorpräparate

Präparat	p16 ^{INK4a}	Lokalisation	Geschlecht
K1	positiv	Zungengrund	männlich
K2	positiv	Zungengrund	weiblich
K3	positiv	Zungengrund	weiblich
K4	positiv	Tonsille	männlich
K5	positiv	Tonsille	männlich
K6	positiv	Tonsille	männlich
K7	positiv	Seitenwand des Oropharynx	männlich
K8	positiv	Seitenwand des Oropharynx	männlich
K9	positiv	Mehrere Teilbereiche überlappend	männlich
K10	positiv	Mehrere Teilbereiche überlappend	männlich
K11	positiv	Mehrere Teilbereiche überlappend	männlich
K12	positiv	Oropharynx, nicht näher bezeichnet	männlich
K13	positiv	Oropharynx, nicht näher bezeichnet	männlich
K14	negativ	Zungengrund	männlich
K15	negativ	Zungengrund	männlich
K16	negativ	Gaumenbogen	männlich
K17	negativ	Tonsille	weiblich
K18	negativ	Tonsille	männlich
K19	negativ	Vorderfläche der Epiglottis	männlich
K20	negativ	Seitenwand des Oropharynx	weiblich

2.3 Antikörper

Tabelle 6. Liste der verwendeten Antikörper

Produkt	Firma	Spezies	Zielstruktur	Cat#	Dilution
HPV16/18 E6 (C1P5)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	mouse monoclonal IgG ₁	purified HPV 18 E6 β- galactidase fusion protein	sc-460 Lot #: A3013, E1208, J1410	1:200
HPV18 E7 (N-19)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	goat polyclonal IgG ₁	N-terminus of HPV18 E7	sc-1590 Lot #: L0414	1:200

HPV16 E7 (ED17)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	mouse monoclonal IgG ₁	amino acids 1- 98, full length	sc-6981 Lot #: C2713	1:200
HPV16 E1/E4 (TVG 402)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	mouse monoclonal IgG ₁	amino acids 36- 41	sc-53324 Lot #: B2707	1:200
HPV16 L1 (CAMVIR-1)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	mouse monoclonal IgG _{2b}	amino acids 198-531 recombinant L1	sc-47699 Lot #: I1710	1:200
Anti-Human Papillomavirus (Clone K1H8)	Dako Deutschland GmbH	mouse monoclonal IgG ₁	Alkine disrupted HPV type 1,	M3528 Lot #: 10096494	1:200
CINtec Histology (Clone E6H4)	Roche mtm laboratories AG	mouse monoclonal IgG	humanes p16 ^{INK4a}	Ref: 9511 Lot #: 5.151301	-
CINtec Plus Cytology	Roche mtm laboratories AG	mouse monoclonal IgG (Clone E6H4) rabbit monoclonal IgG (Clone 277-11AC3)	humanes p16 ^{INK4a} humanes Ki-67 protein	Ref: 9531 Lot #: 5.120902	-
negative Control mouse	Dako Deutschland GmbH	mouse	mouse IgG ₁	Ref: X0931 Lot #: 00050647	1:100
Normal goat IgG	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Goat	-	sc-2028 Lot #: H0709	1:400

2.4 Chemikalien

Tabelle 7. Liste der verwendeten Chemikalien

Produkt	Firma	Cat#
Antibody Diluent with Background Reducing components	Dako, Glostrup, Dänemark	S3022

Biotinymated Link	Dako Deutschland GmbH	Ref: K0690
Corbit-Balsam	I. Hecht, Stadtrade	-
Ethanol absolut	Otto Fischer GmbH & Co. KG	-
Hämalaun	Merck, Darmstadt	109249
Hematoxylin Lösung	Merck, Darmstadt	105175
Lipuid DAB + Substrate, Chromogen System	Dako Deutschland GmbH	Ref: K3468 Lot #10076445
Liquid DAB + Substrat Chromogen System	Dako Deutschland GmbH	Ref: K3468
Methanol	Sigma Aldrich Chemie GmbH	-
Roti-Histol®	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe	-
Streptavidin-HRP	Dako Deutschland GmbH	Ref: K0690
Tris-(hydroxymethyl) - aminomethan (Tris)	Sigma, München	-
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt	-

2.5 Puffer & Lösungen

TBS (Tris-Buffer-Saline) Waschpuffer 10x (pH 7.4)

53 g NaCl; 12 g Tris auf 1000 ml Aqua dest. und auf pH 7,4 einstellen, zum Gebrauch 1:10 verdünnen

PBS (Phosphate buffer saline)- Puffer 0,15 M (pH 7,4)

7,2g PBS auf 5l Aqua dest. und auf pH 7,4 einstellen

Natrium- Citrat- Puffer 10mM (pH 6)

14,8g NatriumCitrat auf 5 l Aqua dest und auf pH 6 einstellen

2.6 Geräte

Tabelle 8. Liste der verwendeten Geräte

Produkt	Firma
AxioCam HRc Zeiss Imager.M2	Carl Zeiss AG, Schweiz
Autoklav	Vitaris, Baar
Automatische Pipettierhilfe	Thermo Scientific, Braunschweig
Ceran-Laborkocher SLK 6	Schott Instruments GmbH, Mainz
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen GmbH, Isernhagen
Kochtopf Clipso	Tefal, Group SEB Deutschland GmbH, Frankfurt am Main
Labor-Spülautomat, G 7883 CD	Miele, Gütersloh
Leica MC 170 HD	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Lichtmikroskop	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Objektträger geschnitten	Thermo Scientific, Braunschweig
Pipetten	Gilson Germany, Limburg-Offheim
Pipettenspitzen	Gilson Germany, Limburg-Offheim
Tissue cool plate Cop20	Medite Medizintechnik, Burdorf
Schlittenmikrotom RM2135	Leica, Bensheim
Wärmeschrank	Heraeus Instruments

2.7 Software und Programme

Citavi 6, Version 6.1.0.0, Swiss Academic Software GmbH

Leica Application Suite, Version 4.8.0, Leica Microsystems CMS GmbH

Microsoft Word, Version 2111, Microsoft Office 365

Microsoft Excel, Version 2111, Microsoft Office 365

Microsoft PowerPoint, Version 2111, Microsoft Office 365

3 Methoden

Die Reihenfolge der durchgeführten Untersuchungen wird in Abbildung 2 vereinfacht dargestellt. Aufgrund der positiven Reaktionen gegen HPV Proteine in nicht veröffentlichten Voruntersuchungen von Präparaten Vaskulärer Anomalien, erfolgte eine immunhistochemische Färbung auf HPV16 E6/18 E6. Dies wurde zunächst an neun VA-Präparaten durchgeführt. Anschließend folgte eine immunhistochemische Untersuchung mit Antikörpern gegen HPV16 L1, HPV16 E1/E4, HPV16 E7, HPV18 E7 und dem Anti-Human-Papillomavirus-Antikörper der Firma Dako. Als nächster Schritt wurden die neun Präparate mit dem CINtec[®] Kit untersucht zur Färbung von p16^{INK4a}. Es erfolgte dann die Färbung mit dem CINtec[®] Plus Kit zur weiteren Untersuchung von p16^{INK4a} und Ki67. Zur Validierung der bisherigen Ergebnisse wurden an den restlichen 18 Präparaten mit allen bisher verwendeten Antikörpern immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt. Abschließend erfolgten immunhistochemische Färbungen an 20 Oropharynxkarzinompräparaten als Kontrollgewebe. Hier wurden nach dem gleichen Färbeschema wie bei den VA-Präparaten vorgegangen und die gleichen Antikörper gegen HPV eingesetzt. Aufgrund der durch das Institut für Pathologie bereits durchgeführten p16^{INK4a}-Färbung wurde bei den Karzinompräparaten auf eine Färbung mit dem CINtec[®] Kit verzichtet. Zusätzliche erfolgte durch andere Mitglieder unserer Arbeitsgruppe die Untersuchung von VA-Präparaten mit der hochsensitiven VirCapSeq-VERT-Methode.

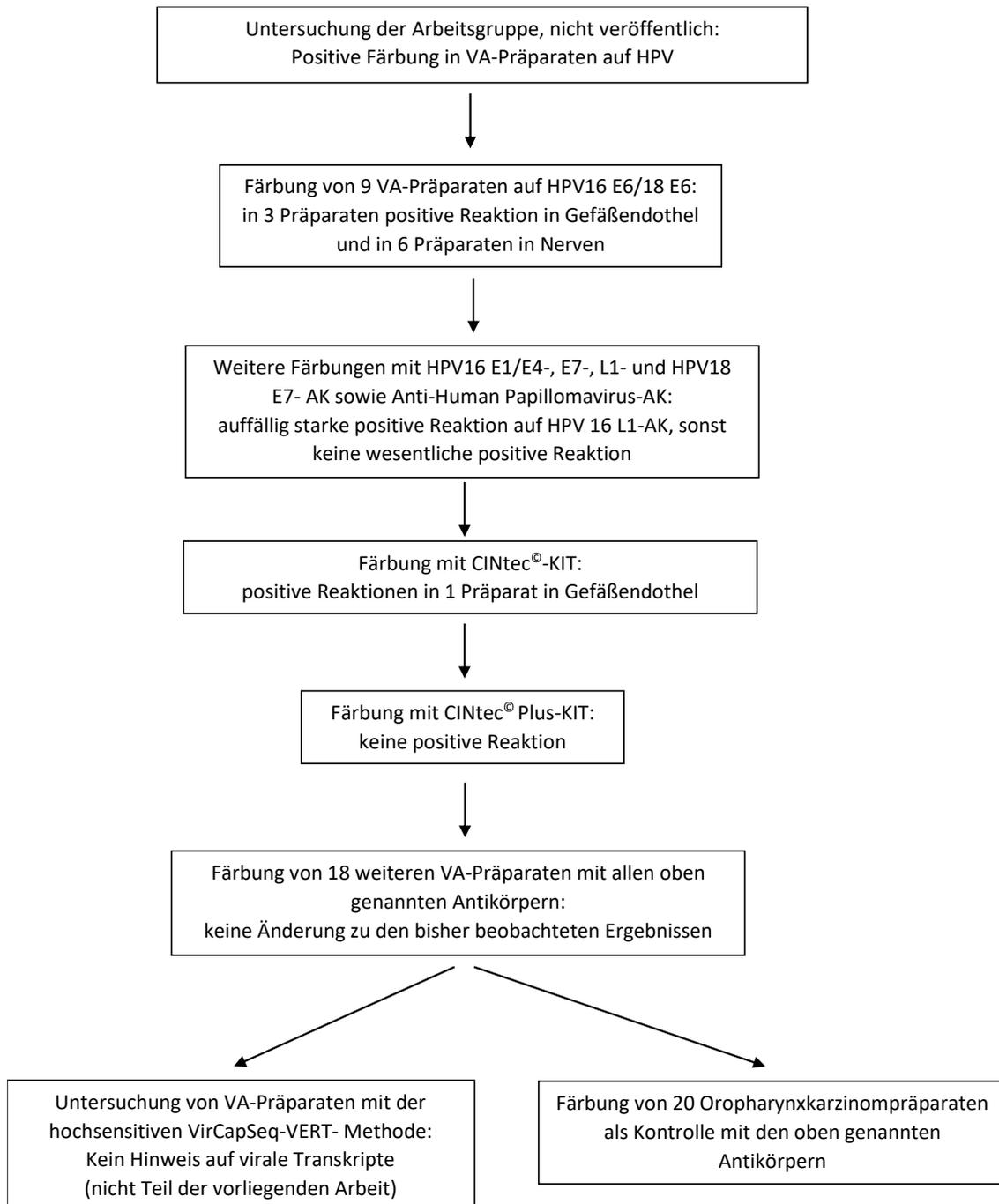


Abbildung 2. Zusammenfassung des Ablaufes der Untersuchungen. Positive Reaktionen auf HPV- Proteine in VA-Präparaten in nicht veröffentlichten Untersuchungen. Anschließend Färbung von neun VA-Präparaten gegen HPV16 E6/18 E6. Im Anschluss weitere Untersuchungen mit den Antikörpern HPV16 L1, HPV16 E1/E4, HPV16 E7, HPV18 E7 und dem Anti-Human-Papillomavirus-Antikörper der Firma Dako. Im nächsten Schritt wurden die neun Präparate mit dem CINtec® Kit und dann dem CINtec® Plus Kit untersucht. Anschließend wurden 18 weitere VA-Präparate mit den bisherigen Antikörpern untersucht. Zuletzt wurden 20 Oropharynxkarzinompräparate als Kontrollgewebe mit den bisher benutzten Antikörpern gefärbt. Zusätzlich wurden durch weitere Mitglieder der Arbeitsgruppe VA-Präparate mit der VirCapSeq-VERT-Methode untersucht.

3.1 Immunhistochemie

3.1.1 Fixieren und Einbetten

Um die frischen Präparate zu fixieren, wurden sie zuerst in 4 % Formalin gelegt. Dabei wurden die Schnitte je nach Größe 24 - 48 Stunden in Formalin belassen. Als nächster Schritt erfolgte die Entwässerung der Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Die Schnitte wurden für jeweils 2 h in 70 %, 90 % und 100 % Ethanol gelegt und anschließend für weitere 2 h in RotiHistol. Alle Schritte der Fixierung wurden bei 40 °C durchgeführt. Zuletzt wurden die Gewebeproben über Nacht in eine Ausgussstation mit flüssigem Paraffin gelegt und in vorgefertigten Formen zu Blöcken gegossen.

3.1.2 Schneiden der Präparate

Die Paraffinblöcke wurden bei 4 °C über Nacht gelagert. Vor dem Schneiden der Blöcke wurden sie auf einer Kühlplatte auf -20 °C heruntergekühlt und anschließend in 3 µm dicke Scheiben geschnitten. Danach wurden die Präparate in einer mit H₂O gefüllten Küvette auf die Objektträger gezogen. Als letzter Schritt wurden die Objektträger in ein 45 °C warmes Wasserbad (Aqua dest.) gelegt, um die Präparate zu glätten.

3.1.3 Immunhistochemische Färbung

Zur immunhistochemischen Färbung der Präparate wurde die (Strept-) Avidin-Biotin-Methode verwendet. Dies ist eine immunhistochemische Standardmethode zum qualitativen Nachweis Antigen- bindender Antikörper. Bei dieser Methode wird zuerst ein gewebsspezifisches Antigen mit einem Primärantikörper markiert. Anschließend wird ein biotinylierter Sekundärantikörper hinzugegeben, der den Primärantikörper bindet und spezifisch für die Immunglobuline der Primärantikörper-herstellenden Spezies ist. Durch die Hinzugabe des Avidins, welche Peroxidase enthält, bindet dieses an das Biotin des Sekundärantikörper. Diese Avidin-Peroxidase + Biotin-Verbindung kann mit Hilfe eines Chromogens sichtbar gemacht werden.

Vor Durchführung der Färbung wurden die zu färbenden Präparate für eine

Stunde in einen Wärmeschrank bei 60 °C gelegt. Anschließend lagen die Schnitte für 30 min in RotiHistol (Entparaffinierung) und danach für 10 min in 100 % Ethanol . Als nächstes erfolgte die Blockierung der endogenen Peroxidasen für 30 min in 200 ml Methanol, welches 6 ml 30 % H₂O₂ enthält. Daraufhin wurde die Entparaffinierung mit einer absteigenden Alkoholreihe fortgesetzt. Die Präparate wurden für jeweils 10 min in je 100 %, 90 % und 70 % Ethanol gelegt. Dann wurden die Schnitte in Aqua dest. für 5 min gespült. Sodann wurden die Präparate in einem 10 mmol/l Na-Citrat Puffer bei 100 °C gekocht und kühlten danach für 30 – 45 min in diesem ab. Anschließend wurden die Schnitte für 30 min in TBS gelegt. Als nächster Schritt wurde das zu färbende Gewebe mit einem Fettstift umkreist, um ein Abschwemmen der Antikörperlösung zu verhindern. Der Primärantikörper wurde im oben (Tabelle 6) angegebenen Verhältnis mit Antibody Diluent verdünnt. Nun wurde der verdünnte Primärantikörper auf den Proben verteilt und die Präparate in einer feuchten Kammer für 12 h bei 5 °C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit kamen die Schnitte bei 37 °C für 60 min in einen Wärmeschrank. Anschließend wurden sie in drei frischen Küvetten für jeweils 5 min in PBS gespült. Danach wurde der Sekundärantikörper hinzugegeben und alles für 30 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Daraufhin erfolgte wieder ein Spülgang mit PBS für jeweils 5 min in 3 verschiedenen Küvetten. Anschließend erfolgte die Zugabe des Avidin-Biotin Komplex (ABC) und eine 30-minütige Inkubation in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Die Schnitte wurden dann erneut in PBS für jeweils 5 min gespült. Darauf folgte die 15-minütige Inkubation mit dem DAB-Gemisch in der feuchten Kammer. Als nächstes wurden die Präparate in Leitungswasser und danach dreimal in Aqua dest. für jeweils 5 min gespült. Es erfolgte im Anschluss die Gegenfärbung mit Hämalaun, dazu wurden die Präparate insgesamt sechsmal kurz in Hämalaun eingetaucht, erst unter fließendem Leitungswasser gespült, danach eine Minute in Leitungswasser gewaschen. Daraufhin wurden die Schnitte kurz in Aqua dest. eingetaucht und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Vor dem Eindecken wurden die Präparate zwei Mal jeweils für 5 min in RotiHistol getaucht und anschließend eingedeckt.

3.1.4 Färbung mit dem CINtec® Kit

Das CINtec® Kit wurde eingesetzt, um das Protein p16^{INK4a} in Zellen anzufärben. Die Färbung wurde nach der Anleitung zur manuellen Färbung im Handbuch des CINtec® Kits durchgeführt. Die Rehydrierung wurde analog zu Kapitel 3.1.3 durchgeführt. Zuerst wurden die Präparate für 20 min in RotiHistol gelegt. Anschließend folgte eine absteigende Alkoholreihe mit 100 %, 90 % und 70 % Ethanol für je 5 min. Zuletzt wurden die Schnitte für 5 min in Aqua dest. gestellt. Die *Epitope Retrieval Solution* wurde gemäß Protokoll im Verhältnis 1:10 mit Aqua dest. verdünnt. Diese Lösung wurde zur Demarkierung der Präparate verwendet und im Wasserbad auf 90 °C erhitzt. Als nächstes wurden die Schnitte in dieser Demarkierungslösung für 20 min bei Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurden die Objekte für 5 min in Waschpuffer gespült; alle Waschpuffer wurden gemäß der Anleitung mit Aqua dest. im Verhältnis 1:10 verdünnt. Jeder weitere Inkubationsschritt der Färbung bis zur Gegenfärbung erfolgte in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Zuerst wurden 200 µl Peroxidase-Blockierungsreagenz auf jedes Präparat pipettiert und dann für 5 min inkubiert. Als nächstes erfolgte ein Waschgang für 5 min in Waschpuffer. Daraufhin wurden 200 µl der Primärantikörperlösung auf jeden Schnitt gegeben und für 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte wieder eine Waschung für 5 min in Waschpuffer. Danach wurde jeweils 200 µl Visualisierungsreagenz auf jedes Präparat pipettiert und für 30 min in der feuchten Kammer belassen. Für das DAB-Gemisch wurden 2 ml DAB-Substrat und zwei Tropfen DAB-Chromogen gemischt, von diesem Gemisch wurden dann 200 µl auf jeden Schnitt pipettiert und 10 min inkubiert. Als letzter Schritt vor der Gegenfärbung wurden die Objektträger in Aqua dest. gespült. Anschließend wurden die Präparate insgesamt sechsmal in Hämalan eingetaucht. Danach wurden diese erst unter fließend Leitungswasser, dann für eine Minute in einer Küvette mit Leitungswasser gespült. Anschließend wurden die Objekte kurz in Aqua dest. getaucht. Daraufhin erfolgte die Rehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Als letztes wurden die Präparate für jeweils 5 min in zwei Küvetten mit RotiHistol gestellt und dann eingedeckt.

3.1.5 Färbung mit dem CINtec Plus® Kit

Im Gegensatz zum CINtec® Kit färbt das CINtec-Plus® Kit nicht nur das Protein p16^{INK4a}, sondern auch Ki67 als Proliferationsmarker an. Die p16^{INK4a}-Färbung zeigt sich als braunes Signal in gefärbten Zellen, die Ki67-Färbung hingegen ergibt ein rotes Signal im Zellkern. Sofern beide Färbungen in der gleichen Zelle auftreten, ist eine Infektion mit HP-Viren sehr wahrscheinlich.

Die manuelle Färbung mit dem CINtec-Plus® Kit wurde entsprechend der Anleitung zur maschinellen Färbung und der manuellen Anleitung für das normale CINtec® Kit abgeleitet. Als erster Schritt wurde eine Rehydrierung der Präparate durchgeführt. Die zu färbenden Präparate wurden zunächst für 20 min in RotiHistol gelegt (Entparaffinierung). Anschließend folgte eine absteigende Alkoholreihe mit 100 %, 90 % und 70 % Ethanol für jeweils 10 min. Zuletzt wurden die Schnitte für 5 min in Aqua dest. gespült. Die *Epitope Retrieval Solution* wurde gemäß Anleitung im Verhältnis 1:10 mit Aqua dest. verdünnt und danach im Wasserbad auf 90 bis 95 °C erhitzt (= Demarkierungslösung). Als nächstes kamen die Objektträger in die erhitzte Demarkierungslösung und wurden mit dieser im Wasserbad auf 90 °C erhitzt und für 20 min bei dieser Temperatur belassen. Danach erfolgte die Abkühlung der Präparate in der Demarkierungslösung bei Raumtemperatur und anschließender Spülung für 5 min in Waschpuffer. Alle Waschpufferlösungen wurden gemäß der Anleitung mit Aqua dest. im Verhältnis 1:10 verdünnt. Alle nachfolgenden Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer durchgeführt. Als nächster Schritt folgte die Blockierung der endogenen Peroxidasen. Dazu wurden 200 µl Peroxidase-Blockierungsreagenz auf jedes Präparat pipettiert und anschließend für 5 min inkubiert. Danach erfolgte eine Spülung für 5 min in Waschpuffer. Darauf folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper, je 200 µl pro Schnitt, für 30 min. Als nächstes wurden die Objektträger wieder für 5 min in Waschpuffer gewaschen. Der nächste Schritt war die Inkubation mit dem *Visualisierungsreagenz HRP* mit je 200 µl pro Präparat für 15 min. Danach wurden diese dreimal je 5 min in Waschpuffer gespült. Die *Visualisierungsreagenz AP* wurde auf die Präparate pipettiert (200 µl pro Präparat) und dann für 15 min inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger dreimal für jeweils 5 min in Waschpuffer gewaschen. Für das DAB-Gemisch wurde 1 ml DAB-Substrat mit einem Tropfen DAB-Chromogen

gemischt. Dann wurde jeweils 200 µl DAB-Gemisch auf jedes Präparat pipettiert und für 10 min inkubiert. Anschließend folgte je ein Waschschrift für 5 min in Leitungswasser und Waschpuffer. Als nächstes wurde je 200 µl Fast-Red auf die Präparate gegeben. Dieses wurde aus 1 ml Naphthol-Phosphat-Substrat und einem Tropfen Fast-Red-Chromogen hergestellt. Nach 15 min Inkubation folgte je ein Waschschrift in Aqua dest. für 5 min und für die gleiche Dauer in Waschpuffer. Vor der Gegenfärbung mit Hämalaun wurden die Objektträger in Aqua dest. gewaschen und anschließend insgesamt sechsmal in Hämalaun eingetaucht. Um das überschüssige Hämalaun abzuspielen, wurden die Schnitte erst unter fließendem Leitungswasser, dann für eine Minute in Leitungswasser gewaschen. Es folgte ein erneutes Waschen der Präparate für eine Minute in Aqua dest. Danach wurde die überschüssige Flüssigkeit abgeklopft und die Unterseite des Objektträgers vollständig trockengewischt. Anschließend wurden 8 Tropfen CINtec Plus® Mount auf jedes Präparat gegeben und darauf geachtet, dass jedes vollständig damit bedeckt war. Die Präparate wurden dann über Nacht waagrecht trocknen gelassen, bevor am darauffolgenden Tag die Schnitte für 20 min in RotiHistol gelegt und anschließend eingedeckt wurden.

3.1.6 Positiv- und Negativkontrollen

Zum Nachweis der Validität bzw. der Spezifität wurden Positiv- und Negativkontrollen angefertigt. Diese wurden ebenfalls immunhistochemisch untersucht. Die Negativkontrollen wurden zum Ausschluss falsch positiver Ergebnisse durchgeführt. Hierfür wurde in der immunhistochemischen Untersuchung der Primärantikörper gegen ein unspezifisches Negativserum der gleichen Antikörper-Isotyps ausgetauscht. Die übrigen Färbungsschritte wurden analog zu Kapitel 3.1.3 durchgeführt. Dies erfolgte zeitgleich mit der normalen immunhistochemischen Untersuchung. Ein positives Signal in der Negativkontrolle spricht somit für eine entweder fehlerhaft durchgeführte Färbung, fehlerhafte Anwendung der Reagenzien oder für eine niedrige Spezifität des Antikörpers. Zur Kontrolle, dass der jeweilige Antikörper auch die angegebenen Proteine erkennt, erfolgten immunhistochemische Färbungen an Oropharynxkarzinompräparaten, die durch das Institut für Pathologie einen gesicherten positiven oder negativen p16^{INK4a} - Status haben. Eine positive

Reaktion in einer p16^{INK4a} - positiven Kontrolle lässt auf eine technisch korrekt durchgeführte immunhistochemische Färbung schließen

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Ergebnisse nach Gewebeart

Im Folgenden werden die unterschiedlichen Färbungen in den verschiedenen Gewebsarten betrachtet. Dargestellt ist je ein Bild des jeweiligen Gewebes mit der entsprechenden Färbung.

4.1.1 Arteriovenöse Malformationen (AVM)

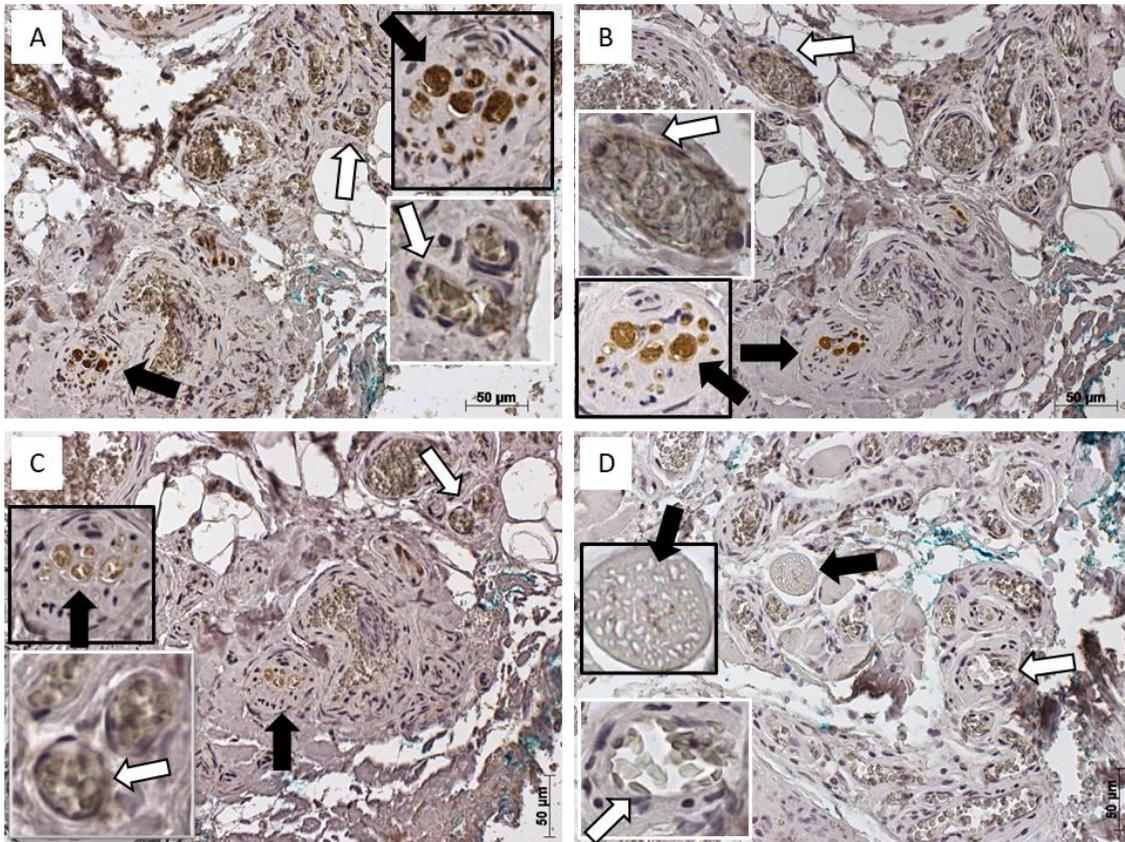


Abbildung 3. Färbungen der AVM auf HPV16/18 E6. Beispielhaft dargestellt am Präparat AVM-2 (Tabelle 4). **(A)** Färbung mit einem Antikörper gegen HPV16/18 E6 (C1P5) #E1208. Es zeigen sich neuronale Strukturen (schwarzer Pfeil) positiv angefärbt, eine Vergrößerung des Ausschnitts befindet sich am rechten oberen Bildrand. Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt keine positive Färbung auf, eine Vergrößerung des Ausschnitts befindet sich am rechten Bildrand. **(B)** Färbung mit einem Antikörper gegen HPV16/18 E6 (C1P5) #A3013. Es zeigen sich neuronale Strukturen (schwarzer Pfeil) positiv gefärbt, eine Vergrößerung des Ausschnitts befindet sich am linken unteren Bildrand. Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt zudem eine leicht positive Färbung auf, eine Vergrößerung des Ausschnitts befindet sich am linken Bildrand. **(C)** Färbung mit einem Antikörper gegen HPV16/18 E6 (C1P5) #J1410. Es zeigen sich neuronale Strukturen (schwarzer Pfeil) schwach positiv gefärbt, eine Vergrößerung des Ausschnitts befindet sich am linken Bildrand. Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt keine positive Reaktion, eine Vergrößerung des Ausschnitts befindet sich am linken unteren Bildrand. **(D)** Färbung mit *negative Control mouse IgG*. Es zeigen sich neuronale Strukturen (schwarzer Pfeil) nicht gefärbt, eine Vergrößerung des Ausschnitts befindet sich am linken Bildrand. Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt ebenfalls keine positive Färbung auf, eine Vergrößerung des Ausschnitts

befindet sich am linken unteren Bildrand. **(A–C)** Dargestellt sind Färbungen mit dem gleichen Antikörper jedoch verschiedener Chargen.

Unter den untersuchten Präparaten entsprechen AVM-1, AVM-2, AVM-3 und AVM-4 den arteriovenösen Malformationen (siehe Tabelle 4). Die Färbung mit dem Antikörper gegen HPV16/18 E6 wurde mit drei unterschiedlichen Chargen desselben Antikörpers durchgeführt. In zwei der vier Präparate wiesen sowohl das Zytoplasma als auch der Nukleus der Endothelzellen der Gefäße eine positive Reaktion auf den Antikörper HPV16/18 E6 auf. Hierbei fällt auf, dass sich meist nur kleinere Venen positiv gefärbt zeigten, seltener Arterien. Zudem waren nicht alle kleinen Gefäße der Präparate positiv gefärbt, oft lagen positive Gefäße jedoch in unmittelbarer Nähe zueinander vor. In zwei der vier Präparate war zudem eine positive Färbung vor allem der Axone kleiner peripherer Nerven zu erkennen. Falls eine positive Reaktion der Nerven vorlag, zeigten sich dann auch die meisten der Nerven mit einer positiven Reaktion auf den eingesetzten Antikörper. Wie in Abbildung 3 dargestellt, zeigte sich auch ein deutlicher Unterschied in der Intensität der gefärbten Strukturen abhängig von der verwendeten Charge. Die Charge #A3013 zeigte hierbei die stärkste Anfärbung, während die Charge #J1410 die schwächste Färbung zeigte. Da sich in der Negativkontrolle mit *negative control mouse IgG* keine Anfärbung der oben genannten Strukturen zeigte, konnte eine unspezifische Bindung des Erstantikörpers ausgeschlossen werden (siehe Abbildung 3).

Das Protein E6 ist eines der beiden zentralen Onkoproteine von HPV und wurde in Cervix-, Oropharynx- und anderen Karzinomen immunhistochemisch nachgewiesen (Stiasny et al. 2016). Auch das Vorliegen von HPV16 E6 im Zytoplasma konnte bereits nachgewiesen werden (Kudzina und Golovan' 1972). Die positive Reaktion der Endothelzellen könnte ein Hinweis auf eine mögliche Rolle von HPV bei der Entstehung bzw. Aufrechterhaltung von AVMs sein. Dass nicht alle Gefäße eine positive Reaktion zeigten und die positiv gefärbten oft nahe beieinander lagen, könnte darauf schließen lassen, dass nur in den Gefäßen der vaskulären Anomalien eine Infektion mit HP-Viren vorliegt und diese zum weiteren Verlauf der Erkrankung beitragen. Die positive Reaktion der nervalen Strukturen ist hingegen ein ungewöhnliches Ergebnis, da humane Papillomaviren typischerweise nur Epithelzellen befallen. Ein Befall von nicht epithelialen Zellen

wie Endothel oder Nervenzellen, würde eine neue Sichtweise auf Epidemiologie, Pathophysiologie und vielleicht sogar für die Therapie bedeuten. Ähnliche Beobachtungen machten auch die Forschungsgruppe um Füle et al. (Füle et al. 2006). Alternativ muss dennoch auch die Möglichkeit einer unspezifischen Reaktion des Primärantikörpers auf β -Galaktosidase mit den beschriebenen Strukturen in Betracht gezogen werden, da ein β -Galaktosidase-E6-Fusionsprotein bei der Herstellung des Antikörpers als Antigen eingesetzt wurde.

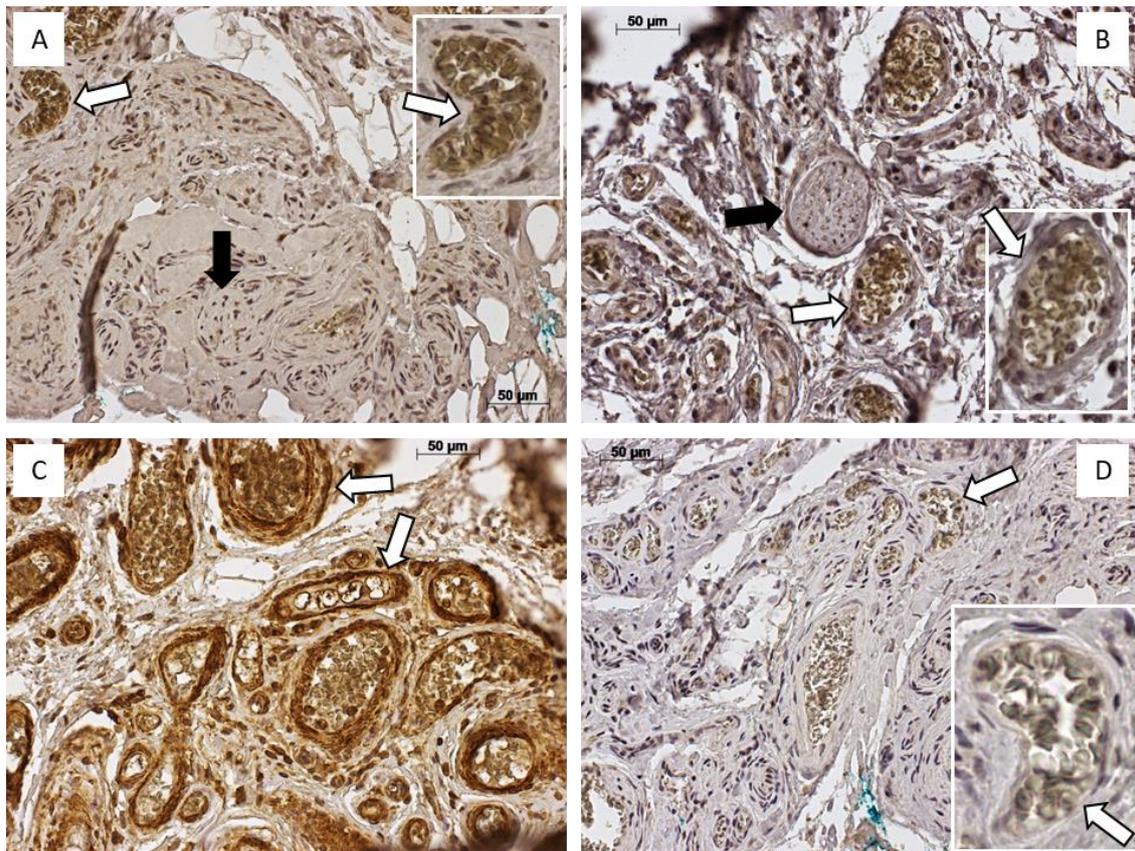


Abbildung 4. Färbung der AVM auf HPV16 E1/E4, HPV16 E7, HPV16 L1 und Anti-Human Papillomavirus-Antikörper. Beispielhaft dargestellt am Präparat AVM-2 (Tabelle 4). **(A)** Färbung mit einem Antikörper gegen HPV16 E1/E4. Es zeigen sich neuronale Strukturen (schwarzer Pfeil) negativ gefärbt. Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt zudem eine negative Färbung auf, eine Vergrößerung des Ausschnitts befindet sich am rechten oberen Bildrand. **(B)** Färbung mit einem Antikörper gegen HPV16 E7 (ED17). Es zeigen sich neuronale Strukturen (schwarzer Pfeil) negativ gefärbt. Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt ebenfalls eine negative Färbung auf, eine Vergrößerung des Ausschnitts befindet sich am rechten unteren Bildrand. **(C)** Färbung mit einem Antikörper gegen HPV16 L1. Es zeigen sich das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) mit einer stark positiven Reaktion. **(D)** Färbung mit dem Anti-Human Papillomavirus-Antikörper der Firma Dako (Klon K1H8). Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt keine positive Reaktion auf, eine Vergrößerung des Ausschnitts befindet sich am rechten unteren Bildrand.

Die Färbung mit dem Antikörper HPV16 L1 (Klon *CAMVIR-1*) zeigte eine auffällig starke positive Reaktion in allen vier getesteten Präparaten. Hierbei waren

sowohl Endothelzellen als auch Epithel der Haut, Muskelfasern und Nerven positiv gefärbt. Jedoch zeigte sich die Intensität der Färbung teilweise unterschiedlich stark ausgeprägt. Im Präparat AVM-2 waren nahezu alle Gefäße sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma positiv (siehe Abbildung 4C). Im Gegensatz dazu waren im Präparat AVM-1 nur das Zytoplasma der Endothelzellen gefärbt und auch einige Gefäße ohne positive Reaktion mit dem Antikörper. Auch die Intensität der positiven Reaktion in den Nerven war im Präparat AVM-1 schwächer und meist auf Axone begrenzt, während im Präparat AVM-2 sowohl Axone als auch Schwannzellen positiv mit dem Antikörper reagierten. Das Protein L1 ist ein sogenanntes „Late-protein“ und für die Bildung des HPV- Kapsids verantwortlich. Vor allem die vermehrte Anreicherung des Antikörpers im Epithel der Haut würde einer typischen positiven Färbung bei HPV-Infektion entsprechen. Die immunhistochemischen Signale im Endothel und den Nerven unterstützen zwar die aufgestellte Hypothese einer HPV-Assoziation des Gewebes, jedoch konnten Shafti-Keramat et al. zeigen, dass der verwendete Antikörper (*CAMVIR-1*) eine unspezifische Kreuzreaktion mit einem ubiquitär vorhandenen zellulären Protein hat (Shafti-Keramat et al. 2003). Eine Reaktion mit diesem zellulären Protein würde die Reaktion des Endothels auch bei HPV E6 negativen Proben, erklären. Aus den genannten Gründen erscheint daher der Einsatz des *CAMVIR-1*-Antikörpers in der Immunhistochemie nicht geeignet. Bei der Färbung mit dem Antikörper gegen HPV16 E1/E4 zeigte sich bei den vier Präparaten weder eine positive Reaktion der Endothelzellen noch der neuronalen Strukturen. Auch die immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper HPV16 E7 zeigte in keinem der Fälle eine positive Reaktion des Endothels oder der Nerven (siehe Abbildung 4A, B). Diese Ergebnisse sprechen eher gegen das Vorliegen einer Infektion mit HP-Viren. Die Proteine E6 und E7 sind die einzigen Proteine des HP-Virus, die in Krebszellen dauerhaft exprimiert werden und für die Zellteilung verantwortlich sind (McLaughlin-Drubin and Münger 2009). Das Fehlen einer positiven Reaktion auf E7 lässt daher auch eher gegen eine Infektion mit HPV schließen. Auch eine Infektion in der Frühphase scheint eher unwahrscheinlich, da auch die in der frühen Phase exprimierten Proteine, wie E1/E4, immunhistochemisch nicht nachgewiesen werden konnten. Da zudem bekannt ist, dass die Expression von E4 mit dem Einbau der Virus-DNA in die Wirtszelle korreliert, kann im Gegenzug vermutet werden, dass bei nicht

vorhandenem E4 auch wenige bzw. keine Virus-DNA in den Wirt integriert wird, was auch die fehlende positive Reaktion auf HPV16 E7 erklären könnte (Chow et al. 2009).

Die Färbung mit dem Anti-Human-Papillomavirus-Antikörper der Firma Dako, Clone K1H8, zeigte ebenfalls keine positive Reaktion des Endothels oder der Nerven des Antikörpers in allen vier Präparaten (siehe Abbildung 4D). Der Antikörper von Dako ist ein etablierter Antikörper, der für die histopathologische Diagnostik zugelassen ist und in vielen Studien als Antikörper zur Detektion von HPV eingesetzt und validiert wurde (Pávai et al. 2006; Iwasaki et al. 1992). Eine fehlende positive Reaktion auf diesen Antikörper in allen Gewebearten in den Proben der AVMs ist ein weiterer Hinweis darauf, dass keine HPV-Proteine in den Proben exprimiert sind. Der Antikörper von Dako, Klon K1H8, erkennt, wie von Iwasaki et al. beschrieben (Iwasaki et al. 1992), ebenfalls das Kapsid-Protein L1 von HPV. Die nicht vorhandene positive Reaktion mit dem Klon K1H8 unterstützt daher die Vermutung einer unspezifischen Reaktion des Klons *CAMVIR-1*.

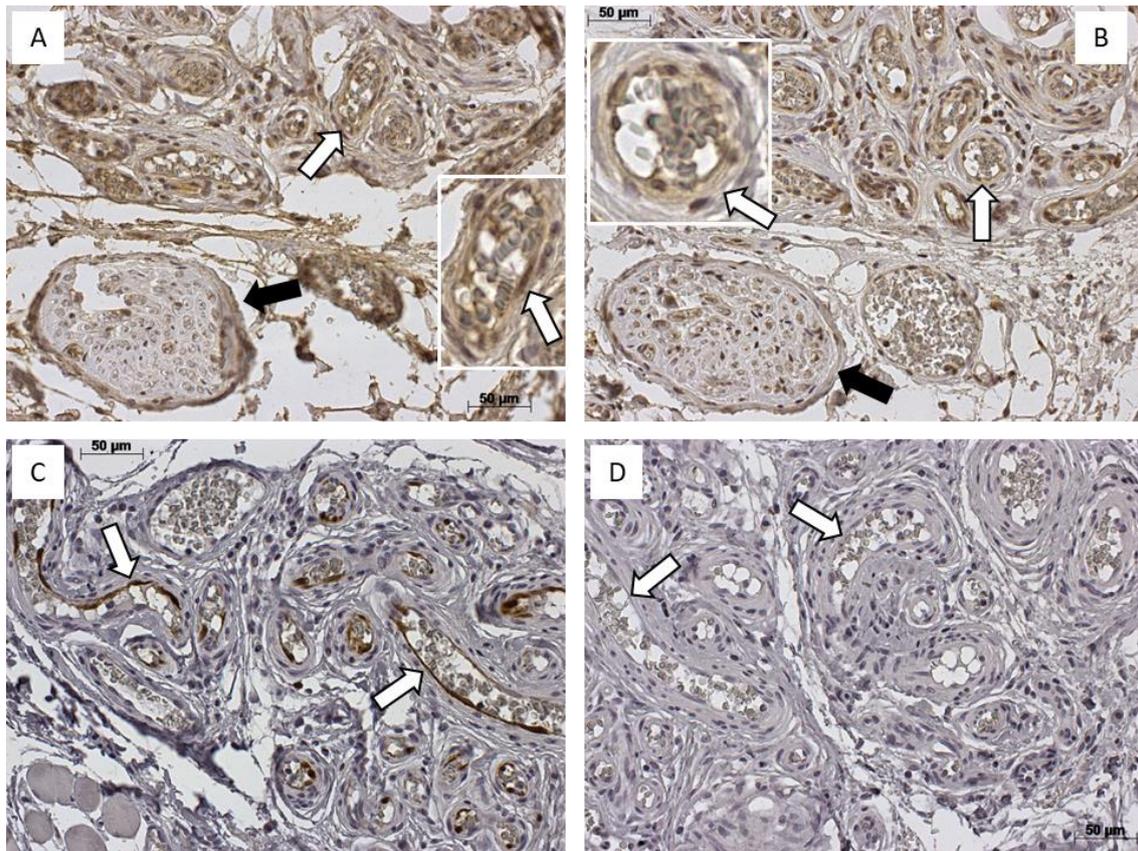


Abbildung 5. Färbung der AVM auf HPV18 E7 und CINtec® Histology. Beispielhaft dargestellt am Präparat AVM-2 (Tabelle 4). **(A)** Färbung mit einem Antikörper gegen HPV18 E7 (N-19). Es zeigen sich neuronale Strukturen (schwarzer Pfeil) schwach positiv gefärbt. Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt zudem eine schwache positive Färbung auf, eine Vergrößerung des Ausschnitts befindet sich am rechten Bildrand. **(B)** Färbung mit *normal goat IgG*. Es zeigen sich neuronale Strukturen (schwarzer Pfeil) schwach positiv gefärbt. Auch das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt eine schwache positive Färbung, eine Vergrößerung des Ausschnitts befindet sich am linken Bildrand. **(C)** Färbung mit CINtec® Histology auf p16^{INK4a}. Das Endothel der Gefäße (weiße Pfeile) zeigt eine klare positive Reaktion. **(D)** Färbung mit CINtec® Histology, negative control. Das Endothel der Gefäße (weiße Pfeile) zeigt keine positive Färbung.

Die Färbung mit dem Antikörper HPV18 E7 zeigte bei den beiden Präparaten AVM-1 und AVM-2 eine schwache positive Reaktion an den Endothelzellen der Gefäße sowie teilweise an den Nerven. Im Vergleich mit der negativen Kontrolle mit *normal goat IgG* zeigte sich jedoch eine vergleichbare positive Reaktion an den gleichen Geweben, sodass das Ergebnis als unspezifische Reaktion des Antikörpers HPV18 E7 zu deuten ist (siehe Abbildung 5A, B). Für die beiden übrigen Präparate AVM-3 und AVM-4 wurde aufgrund der bekannten unspezifischen Reaktion auf den Antikörper und der Limitierung der Proben (*rare disease*) auf die immunhistochemische Färbung verzichtet. Kritisch anzumerken ist, dass laut Herstellerangaben der Antikörper HPV18 E7 nicht spezifisch für die Immunhistochemie ausgewiesen ist. Dies könnte die unspezifische Reaktion erklären.

Die Färbung mit dem CINtec® Histology Kit zeigte bei drei der vier AVM-Proben keine positiven Reaktionen auf p16^{INK4a}. Im Präparat AVM-2 zeigten sich einzelne Gefäße der arteriovenösen Malformation mit einer positiven Färbung im Bereich des Zytoplasmas als auch im Zellkern (siehe Abbildung 5C). Zusätzlich waren in tieferen epithelialen Schichten der Haut eine positive Reaktion auf den p16^{INK4a} - Antikörper zu erkennen. Das CINtec® Histology Kit ist ein etabliertes Färbungskit zum Nachweis von p16^{INK4a} (Bergeron et al. 2010; Darragh et al. 2012; Galgano et al. 2010; Ordi et al. 2009). Die positive Reaktion im Bereich des Gefäßendothels in Präparat AVM-2 kann als Hinweis auf eine Infektion mit HPV gedeutet werden. Meijer-Jorna und Mitarbeiter konnten ebenfalls in ihrer Untersuchung eine positive Reaktion auf p16^{INK4a} in einer AVM nachweisen (Meijer-Jorna et al. 2012). Andere Gründe, die zu einer Erhöhung der p16^{INK4a}-Konzentration in den Zellen führen, wie z.B. Seneszenz der Zellen, können mit dieser Färbemethode jedoch nicht ausgeschlossen werden (Salama et al. 2014). Zur Erhöhung der Nachweis-Wahrscheinlichkeit auf eine Infektion mit HPV sollten weitere Untersuchungen wie z.B. eine zusätzliche Färbung mit Ki67 als Proliferationsmarker durchgeführt werden. Die positive Reaktion im Hautepithel im Präparat AVM-2 sind als normal zu interpretieren, da sich die Epithelzellen der Haut ständig teilen und p16^{INK4a} eine unkontrollierte Teilung in den ausdifferenzierten Epithelzellen verhindert (Idda et al. 2020).

4.1.2 Lymphatische Malformationen (Lymphangiome)

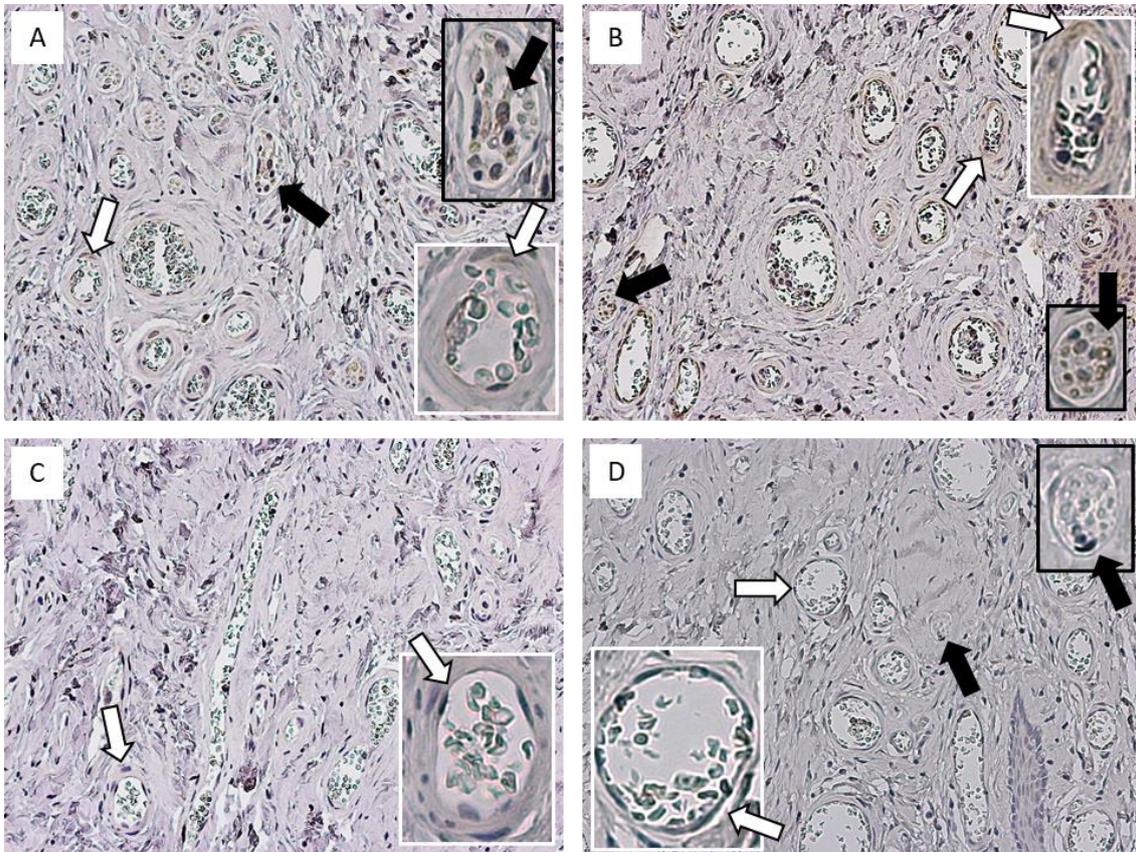


Abbildung 6. Färbung der Lymphangiome auf HPV16/18 E6. Beispielhaft dargestellt am Präparat LM-1 (Tabelle 4). **(A)** Färbung mit einem Antikörper gegen HPV16/18 E6 (C1P5) #E1208. Es zeigen sich neuronale Strukturen (schwarzer Pfeil) nur sehr schwach positiv gefärbt, eine Vergrößerung des Ausschnitts befindet sich am rechten oberen Bildrand. Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt zudem eine sehr leicht positive Reaktion, eine Vergrößerung des Ausschnitts befindet sich am rechten unteren Bildrand. Insgesamt müssen die nur sehr schwach positiven Reaktion hier als unspezifisch gewertet werden. **(B)** Färbung mit einem Antikörper gegen HPV16/18 E6 (C1P5) #A3013. Es zeigen sich neuronale Strukturen (schwarzer Pfeil) nur sehr schwach positiv gefärbt, eine Vergrößerung des Ausschnitts befindet sich am rechten unteren Bildrand. Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt auch eine nur schwach positive Reaktion, eine Vergrößerung des Ausschnitts befindet sich am rechten oberen Bildrand. **(C)** Färbung mit einem Antikörper gegen HPV16/18 E6 (C1P5) #J1410. Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt sich hier negativ gefärbt, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten unteren Bildrand. **(D)** Färbung mit *negative Control mouse IgG*. Es zeigen sich neuronale Strukturen (schwarzer Pfeil) und Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) ohne positive Reaktion, eine Vergrößerung der relevanten Ausschnitte befindet sich am rechten bzw. linken Bildrand. **(A–C)** Dargestellt sind Färbungen mit dem gleichen Antikörper jedoch mit verschiedenen Chargen.

Unter den untersuchten Präparaten zählen LM-1, LM-2 und LM-3 zu den Lymphangiomen (siehe Tabelle 4). Die Färbung mit dem Antikörper gegen HPV16/18 E6 wurde mit drei unterschiedlichen Chargen desselben Antikörpers durchgeführt. In zwei der drei Präparate reagierte das Zytoplasma der Endothelzellen der Gefäße schwach positiv auf den Antikörper HPV16/18 E6. Die

positiv angefärbten Gefäße lagen dabei meist im Bereich der Malformation. In zwei der drei Präparate war zudem eine positive Färbung vor allem der Axone kleiner peripherer Nerven zu erkennen. Dies war besonders deutlich im Präparat LM-3 zu erkennen. Die positive Reaktion der Nerven zeigte sich in den meisten Präparaten. Zudem, wie in Abbildung 6 dargestellt, zeigte sich auch bei den Lymphangiomen ein deutlicher Unterschied in der Intensität der gefärbten Strukturen abhängig von der verwendeten Charge. Die Charge #A3013 zeigte hierbei die stärkste Anfärbung, während Charge #J1410 die schwächste Färbung zeigte. Da sich in der Negativkontrolle mit *negative control mouse IgG* keine Anfärbung der oben genannten Strukturen zeigte, gab es keine Hinweise auf eine unspezifische Reaktion gegen das verwendete Isotop.

Das Protein E6 ist eines der Major-Onkoproteine von HPV und wurde in Cervix-, Oropharynx- und anderen Karzinomen immunhistochemisch nachgewiesen (Stiasny et al. 2016). Auch das Vorliegen von HPV16 E6 im Zytoplasma ist bekannt (Kudzina und Golovan' 1972). So könnte hier die positive Reaktion der Endothelzellen ein Hinweis auf eine Assoziation von HPV mit der Entstehung bzw. Aufrechterhaltung von Lymphangiomen sein, vor allem da fast alle gefärbten Präparate eine solche positive Reaktion zeigten. Die positive Reaktion der nervalen Strukturen in 2/3 der Präparate deutet verstärkt auf einen möglichen, nicht epithelialen Befall von HP-Viren hin. Die Forschungsgruppe um Füle et al. beschrieb bereits im Jahr 2006 vergleichbare Beobachtungen (Füle et al. 2006). Ein Befall von nicht epithelialen Zellen, wie Endothel oder Nerven, würde eine neue Sichtweise auf Epidemiologie, Pathophysiologie und vielleicht sogar für die Therapie bedeuten. Eine weitere Möglichkeit wäre eine unspezifische Reaktion des Primärantikörpers auf β -Galaktosidase, da bei der Herstellung des Primärantikörpers ein β -Galaktosidase-E6-Fusionsprotein verwendet wurde.

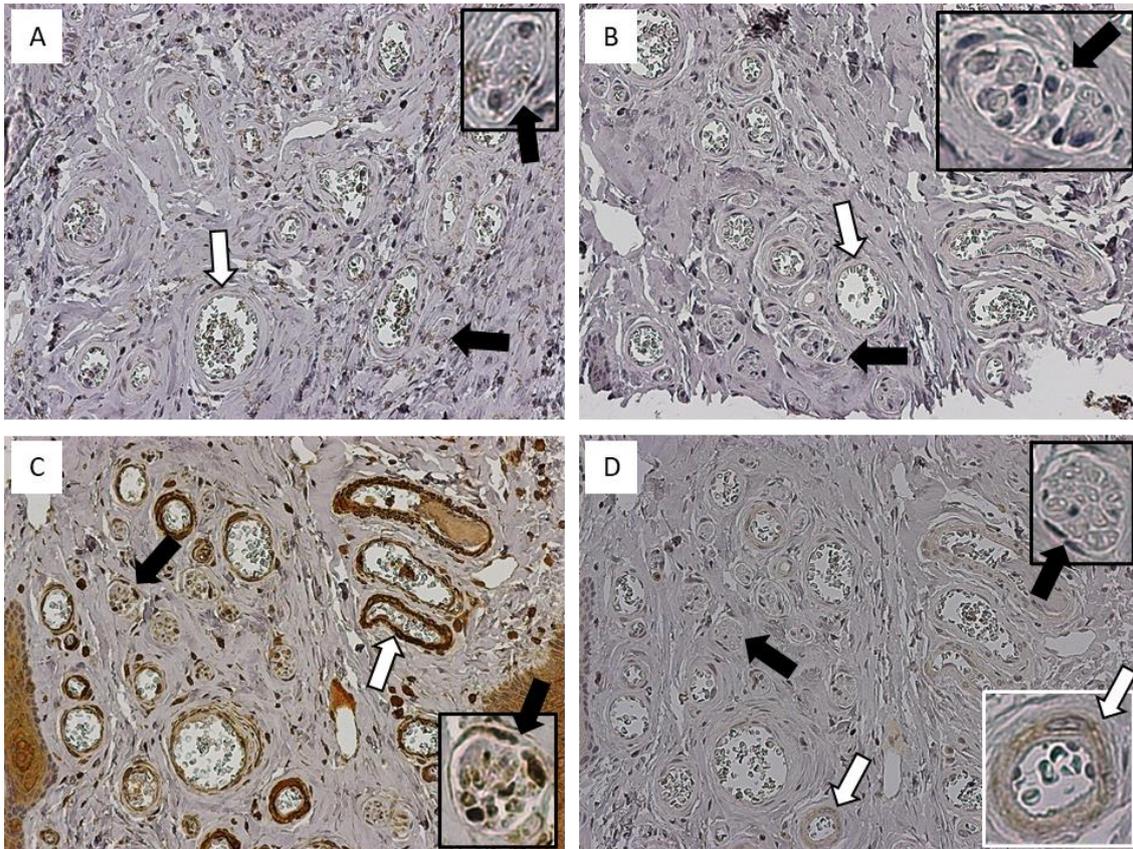


Abbildung 7. Färbung der Lymphangiome auf HPV16 E1/E4, HPV16 E7, HPV16 L1 und Anti-Human Papillomavirus-Antikörper. Beispielhaft dargestellt am Präparat LM-1 (Tabelle 4). **(A)** Färbung mit einem Antikörper gegen HPV16 E1/E4. Es zeigen sich neuronale Strukturen (schwarzer Pfeil) negativ gefärbt, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten oberen Bildrand. Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt ebenfalls eine negative Färbung auf. **(B)** Färbung mit einem Antikörper gegen HPV16 E7 (ED17). Neuronale Strukturen (schwarzer Pfeil) und Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigen keine positive Reaktion, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten oberen Bildrand. **(C)** Färbung mit einem Antikörper gegen HPV16 L1 (Klon CAMVIR-1). Es zeigen sich neuronale Strukturen (schwarzer Pfeil) positiv gefärbt, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten unteren Bildrand. Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt zudem eine positive Färbung auf. Weiter ist eine positive Reaktion des Epithels der Haut zu erkennen. **(D)** Färbung mit dem Anti-Human-Papillomavirus-Antikörper der Firma Dako (Klon K1H8). Es zeigen sich neuronale Strukturen (schwarzer Pfeil) negativ gefärbt, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten oberen Bildrand. Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt hier eine leicht positive Reaktion, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten unteren Bildrand.

Die Färbung mit dem Antikörper HPV16 L1 zeigte eine stark positive Reaktion in allen drei Präparaten. Es zeigten sich hier sowohl Gefäßendothel als auch Hautepithel, Muskelfasern und Nerven positiv gefärbt. Die positiven Reaktionen im Hautepithel traten vor allem in den oberflächlicheren Schichten auf. Die Färbeintensität war bei allen drei Präparaten ungefähr gleich. Im Gefäßendothel war eine deutliche positive Reaktion des Zytoplasmas und des Zellkerns erkennbar. Die positive Reaktion der Nerven beschränkte sich auf die Axone, die Schwannzellen zeigten keine positive Reaktion (siehe Abbildung 7C, schwarzer

Pfeil). Das Protein L1 ist ein sogenanntes „Late-protein“ des HPV-Zyklus und für die Bildung des Kapsids, der Virushülle, verantwortlich. Die positive Reaktion der Epithelzellen entspricht dem typischen Infektionsort des HPV. Der immunhistochemische Nachweis von HPV16 L1 in den Nerven und dem Endothel unterstützt zunächst die Hypothese einer möglichen Rolle von Humanen Papillomaviren bei der Entstehung von Vaskulären Malformationen. Dass der verwendete Antikörper-Klon *CAMVIR-1* unspezifische Kreuzreaktionen mit einem zellulären Protein aufweist, welches in fast allen Zellen vorkommt, konnten Shafti-Keramat und Mitarbeiter bereits im Jahr 2003 belegen (Shafti-Keramat et al. 2003). Diese unspezifische Kreuzreaktion liefert zudem eine Begründung, warum alle Gefäße eine positive Reaktion zeigten, im Vergleich zur Färbung mit HPV16/18 E6. Ein Vorliegen von HP-Viren in Gefäßen oder Nerven, die in beiden immunhistochemischen Färbungen eine positive Reaktion zeigten, konnte weder ausgeschlossen noch bestätigt werden.

Bei der Färbung mit einem Antikörper gegen HPV16 E1/E4 zeigte sich bei keinem der drei Präparate eine positive Reaktion der Endothelzellen oder der Nerven. Auch die immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper HPV16 E7 zeigte bei keinem der drei Präparate eine positive Reaktion in diesen beiden Gewebstypen (siehe Abbildung 7A, B). Diese Ergebnisse sprechen eher gegen die Hypothese einer Infektion mit HP-Viren. Zudem macht das Fehlen einer positiven Reaktion auf E4 einen aktiven Einbau der Virus-DNA in die Wirtszelle unwahrscheinlich (Chow et al. 2009).

Die Färbung mit dem Anti-Human-Papillomavirus-Antikörper von Dako zeigte in den Proben LM-2 und LM-3 keine positive Reaktion des Endothels oder der Nerven. Im Präparat LM-1 zeigte sich hingegen eine schwach positive Reaktion im Zytoplasma des Gefäßendothels (siehe Abbildung 7D). Eine positive Reaktion der Nerven war nicht zu beobachten. Der Antikörper von Dako ist ein etablierter Antikörper, der auch für pathologische Untersuchungen zugelassen ist und in vielen Studien als Antikörper zur Detektion von HPV eingesetzt und bestätigt wurde (Iwasaki et al. 1992; Pávai et al. 2006). Die schwach positive Reaktion des Lymphangioms unterstützt weiter die aufgestellte Hypothese.

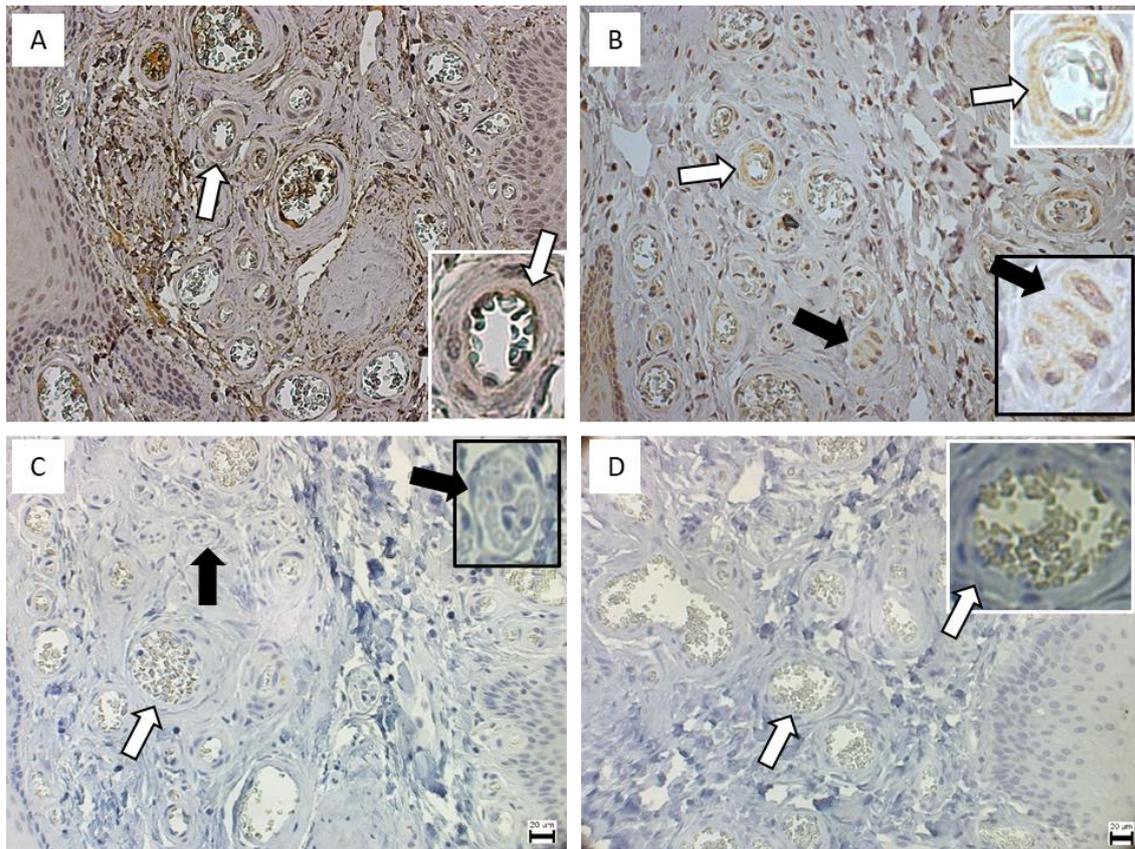


Abbildung 8. Färbung der Lymphangiome auf HPV18 E7 und CINtec® Histology. Beispielhaft dargestellt am Präparat LM-1 (Tabelle 4). **(A)** Färbung mit einem Antikörper gegen HPV18 E7 (N-19). Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt eine positive Reaktion auf, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten unteren Bildrand. **(B)** Färbung mit *normal goat IgG*. Es zeigen neuronale Strukturen (schwarzer Pfeil) und Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) eine braune Färbung auf, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten Bildrand. **(C)** Färbung mit CINtec® Histology auf p16^{INK4a}. Es zeigen sich neuronale Strukturen (schwarzer Pfeil) negativ gefärbt, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten oberen Bildrand. Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt ebenfalls eine negative Reaktion. **(D)** Färbung mit CINtec® Histology, negative control. Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt keine positive Färbung auf, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten oberen Bildrand.

Die Färbung mit dem Antikörper HPV18 E7 zeigte bei allen Präparaten eine positive Reaktion an den Endothelzellen der Gefäße sowie teilweise an den Nerven. Im Vergleich mit der negativen Kontrolle mit *normal goat IgG* zeigte sich jedoch eine positive Reaktion an den gleichen Stellen, weshalb das Ergebnis als unspezifische Reaktion (Hintergrund) zu deuten ist (siehe Abbildung 8A, B). Auch hier ist kritisch anzumerken, dass laut Herstellerangaben der Antikörper HPV18 E7 nicht spezifisch für die Immunhistochemie ausgewiesen ist, wodurch die unspezifische Reaktion unter anderem zu erklären wäre.

Die Färbung mit dem CINtec® Histology Kit zeigte bei allen drei Proben (LM-1, LM-2, LM-3) keine positiven Reaktionen auf p16^{INK4a}. Das CINtec® Histology Kit

ist ein etabliertes Färbungskit zur Erkennung von überexprimiertem $p16^{INK4a}$ und damit verbundenem Hinweis auf einen Tumor und wird in der histopathologischen Diagnostik regelmäßig eingesetzt (Bergeron et al. 2010; Darragh et al. 2012; Galgano et al. 2010; Ordi et al. 2009). Die negative $p16^{INK4a}$ -Reaktion in Lymphangiomproben spricht daher eher gegen eine Infektion mit HPV. Unsere Ergebnisse liefern für die Lymphangiome einige Hinweise, die für eine Infektion mit HPV sprechen. In der Literatur sind zudem Fälle beschrieben, die eine HPV-Infektion bei erworbenen genitalen Lymphangiomen beschreiben (Cestaro et al. 2015). Eine Untersuchung zum Nachweis von HPV-DNA wurde immunhistochemisch hier jedoch nicht durchgeführt. Hierzu wurde durch die Arbeitsgruppe um Franke et al. eine Analyse mittels Virom-Sequenzierung durchgeführt, wie unten beschrieben (Franke et al. 2018).

4.1.3 Venöse Malformationen (VeM)

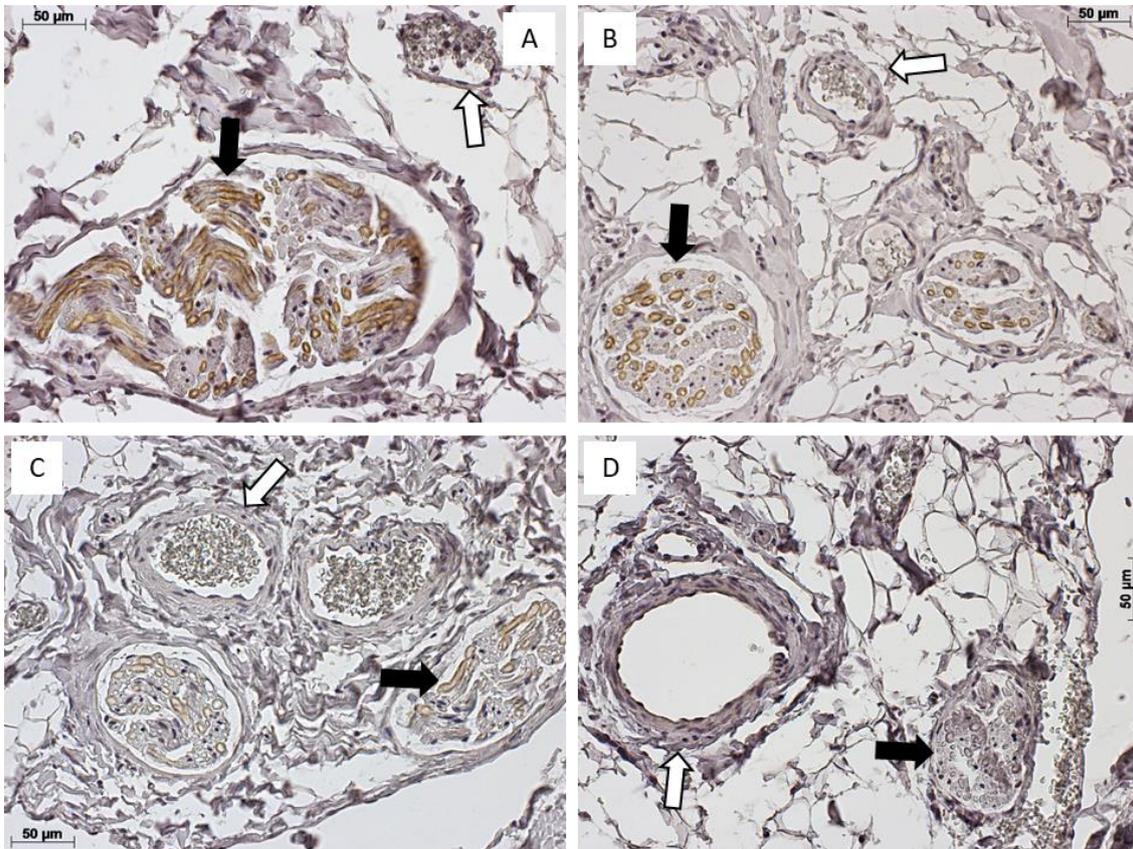


Abbildung 9. Färbung der VeM auf HPV16/18 E6. Beispielhaft dargestellt am Präparat VeM-3 (Tabelle 4). **(A)** Färbung mit einem Antikörper gegen HPV16/18 E6 (C1P5) #E1208. Es zeigen sich neuronale Strukturen (schwarzer Pfeil) deutlich positiv gefärbt. Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt im Gegensatz eine negative Färbung auf. **(B)** Färbung mit einem Antikörper

gegen HPV16/18 E6 (C1P5) #A3013. Es zeigen sich neuronale Strukturen (schwarzer Pfeil) stark positiv gefärbt. Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt zudem keine Reaktion. **(C)** Färbung mit einem Antikörper gegen HPV16/18 E6 (C1P5) #J1410. Es zeigen sich neuronale Strukturen (schwarzer Pfeil) positiv gefärbt. Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt zudem eine negative Färbung auf. **(D)** Färbung mit *negative Control mouse IgG*. Es zeigen sich neuronale Strukturen (schwarzer Pfeil) und Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) ohne positive Reaktion. **(A-C)** Dargestellt sind Färbungen mit dem gleichen Antikörper jedoch mit verschiedenen Chargen.

Unter den untersuchten Präparaten zählen VeM-1, VeM-2 und VeM-3 zu den venösen Malformationen (siehe Tabelle 4). Die Färbung mit dem Antikörper gegen HPV16/18 E6 wurde mit drei unterschiedlichen Chargen (Lots) desselben Antikörpers durchgeführt. In keinem der drei Präparate reagierten Gefäßendothelzellen positiv auf den Antikörper HPV16/18 E6. In zwei der drei Präparate zeigte sich jedoch eine deutliche positive Reaktion der peripheren Nerven mit dem Antikörper. In den Nerven waren vor allem die Axone positiv gefärbt. Wie in Abbildung 9 dargestellt, zeigte sich auch ein deutlicher Unterschied in der Intensität der gefärbten Strukturen abhängig von der verwendeten Charge. Diesmal ist jedoch zu beobachten, dass die Chargen #A3013 und #E1208 eine vergleichbare Intensität in der Färbung zeigten. Die immunhistochemische Reaktion mit Charge #J1410 zeigte ein vergleichsweise schwaches Färbergebnis. Da sich in der Negativkontrolle (*negative control mouse IgG*) keine Anfärbung der oben genannten Strukturen zeigte, konnte eine unspezifische Reaktion des Primärantikörpers ausgeschlossen werden.

Das HPV-Onkoprotein E6 wurde zuvor in Cervix-, Oropharynx- und anderen Karzinomen immunhistochemisch nachgewiesen (Zur Hausen 2000). Ein Nachweis von HPV E6 in nervalen Strukturen ist jedoch bisher, wie bereits oben beschrieben, nur von der Arbeitsgruppe um Füle et al. beobachtet worden (Füle et al. 2006). Die Arbeitsgruppe um Füle verwendete für ihre Untersuchung den gleichen Antikörper (HPV16/18 E6 (Klon C1P5), Tabelle 6), die auch in dieser Studie eingesetzt wurden. Weitere Beschreibungen einer positiven Reaktion nervaler Strukturen auf HPV E6 finden sich aktuell nicht in der Literatur. Die Bedeutung im Falle einer nervalen Infektion mit HPV für die Epidemiologie, Pathophysiologie und Therapie ist aktuell noch nicht abschließend geklärt. Jedoch ist auch aufgrund der unterschiedlich starken Reaktion der verschiedenen Antikörper-Chargen eine unspezifische Reaktion in nervalen Strukturen auf β -Galaktosidase mit diesen Antikörpern nicht auszuschließen. Diese unspezifischen Reaktionen sind möglich, da das Antigen für die

Antikörperherstellung in einigen Fällen an β -Galaktosidase gebunden war. Da es sich bei diesen Antikörpern auch um monoklonale Antikörper handelt, wäre eine suboptimale Selektierung von Klonen bei der Antikörperherstellung denkbar.

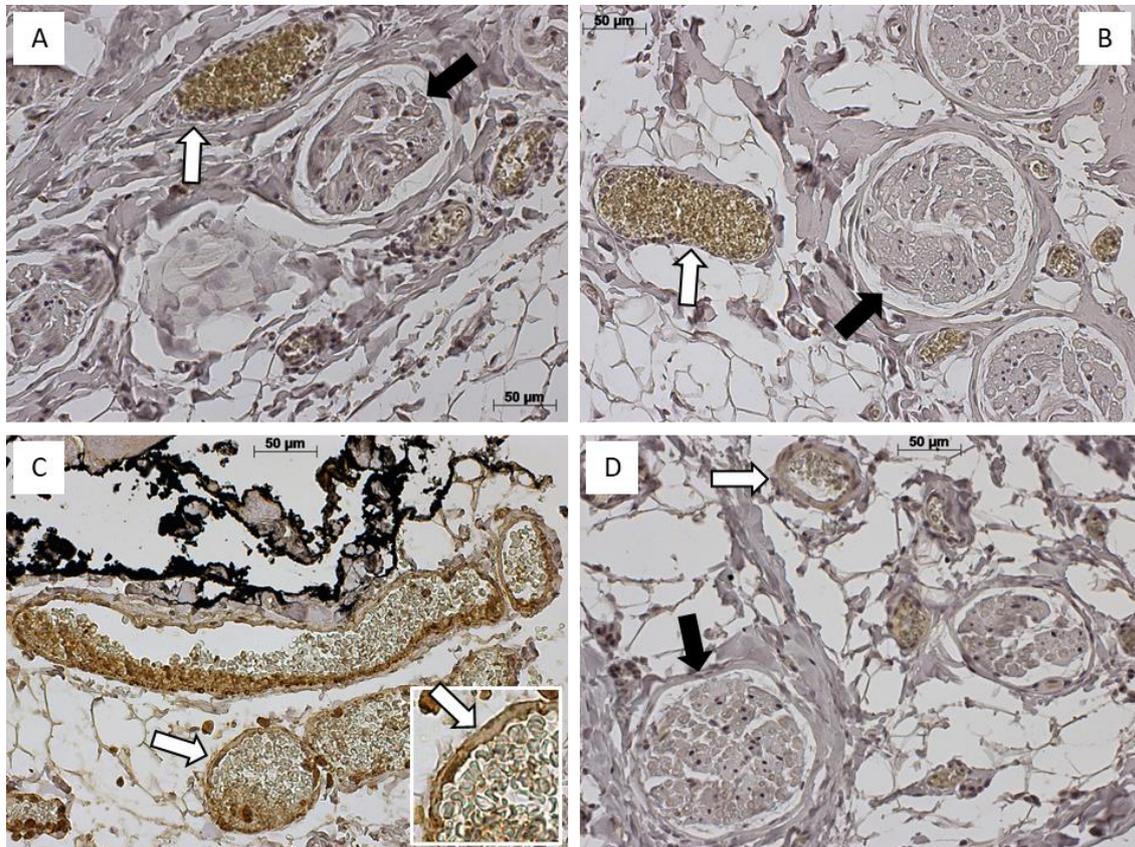


Abbildung 10. Färbung der VeM auf HPV16 E1/E4, HPV16 E7, HPV16 L1 und Anti-Human Papillomavirus-Antikörper. Beispielhaft dargestellt am Präparat VeM-3 (Tabelle 4). **(A)** Färbung mit einem Antikörper gegen HPV16 E1/E4. Es zeigen neuronale (schwarzer Pfeil) und endotheliale Strukturen (weißer Pfeil) eine negative Färbung. **(B)** Färbung mit einem Antikörper gegen HPV16 E7 (ED17). Es zeigen sich neuronale (schwarzer Pfeil) und endotheliale Strukturen (weißer Pfeil) ohne positive Reaktion. **(C)** Färbung mit einem Antikörper gegen HPV16 L1. Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt eine positive Färbung auf, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten unteren Bildrand. **(D)** Färbung mit dem Anti-Human-Papillomavirus- Antikörper der Firma Dako (Klon K1H8). Es zeigen sich neuronale Strukturen (schwarzer Pfeil) negativ gefärbt. Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt ebenfalls eine negative Färbung auf.

Die Färbung mit dem Antikörper HPV16 L1 zeigte eine stark positive Reaktion in allen drei Präparaten. Sowohl Gefäßendothel als auch Epithel der Haut, Muskelfasern und Nerven zeigten sich positiv. Ein Unterscheid der Intensität der positiven Reaktion war zwischen den Proben nicht zu erkennen. Im Gefäßendothel war eine deutliche positive Reaktion des Zytoplasmas und des Zellkerns zu erkennen (siehe Abbildung 10C). Als *Late-protein* L1 ist für die

Bildung des Kapsids, der Virushülle, verantwortlich. Die positiven Reaktionen der Haut entsprechen einer normalen HPV-Infektion. Der Nachweis des Proteins L1, vor allem in den Zellkernen des Gefäßendothels und in den Nerven, unterstützte zunächst die Annahme einer möglichen Rolle humaner Papillomaviren bei der Entstehung von Vaskulären Anomalien. Die Gruppe um Shafiqi-Keramat et al. zeigte bereits vor einigen Jahren, dass der verwendete Antikörperklon *CAMVIR-1* eine unspezifische Kreuzreaktion mit einem nicht viralen zellulären Protein hat (Shafiqi-Keramat et al. 2003). Diese unspezifische Kreuzreaktion erklärt zudem, warum alle Gefäße im Vergleich zur Färbung mit HPV16/ 18 E6 eine positive Reaktion zeigten. Ein Vorliegen von HP-Viren in Gefäßen oder Nerven konnte hierdurch weder ausgeschlossen noch bestätigt werden. Ein weiterer Einsatz des *CAMVIR-1*-Antikörpers in der Immunhistochemie ist daher aus unserer Sicht nicht empfehlenswert.

Die Färbung mit einem Antikörper gegen HPV16 E1/E4 ergab keine positive Reaktion der Endothelzellen oder der Nerven. Auch in der Färbung mit einem Antikörper HPV16 E7 war keine positive Reaktion in den Präparaten erkennbar (siehe Abbildung 10A, B). Diese Ergebnisse sprechen daher eher gegen das Vorliegen einer Infektion mit Humanen Papillomaviren. In mit HPV infizierten Zellen werden die Proteine E6 und E7 dauerhaft exprimiert, das Fehlen eines Nachweises von E7 spricht somit eher gegen die Annahme einer Infektion. Dies wird durch das Fehlen der Proteine der frühen Infektionsphase, wie z.B. E4, unterstützt.

Die Färbung mit dem Anti-Human-Papillomavirus- Antikörper der Firma Dako zeigte in den Proben VeM-1, VeM-2 und VeM-3 keinerlei positive Reaktion des Endothels oder der Nerven (siehe Abbildung 10D). Der von der Firma Dako produzierte Antikörper ist in der histopathologischen Diagnostik weit verbreitet. Viele Studien setzten diesen Antikörper ein und bestätigten seinen Nutzen zur Erkennung von HPV (Iwasaki et al. 1992; Pávai et al. 2006). Da die Zielstruktur des Antikörpers der Firma Dako das Kapsid von HPV ist (Iwasaki et al. 1992), stehen die negativen Färbungen im Gegensatz zu den Färbeergebnissen mit dem Antikörper für L1 (*CAMVIR-1*). Aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse scheint jedoch die Färbung mit dem Antikörper von Dako die plausiblere, sodass nicht von einem Vorliegen von HPV in Venösen Malformationen auszugehen ist.

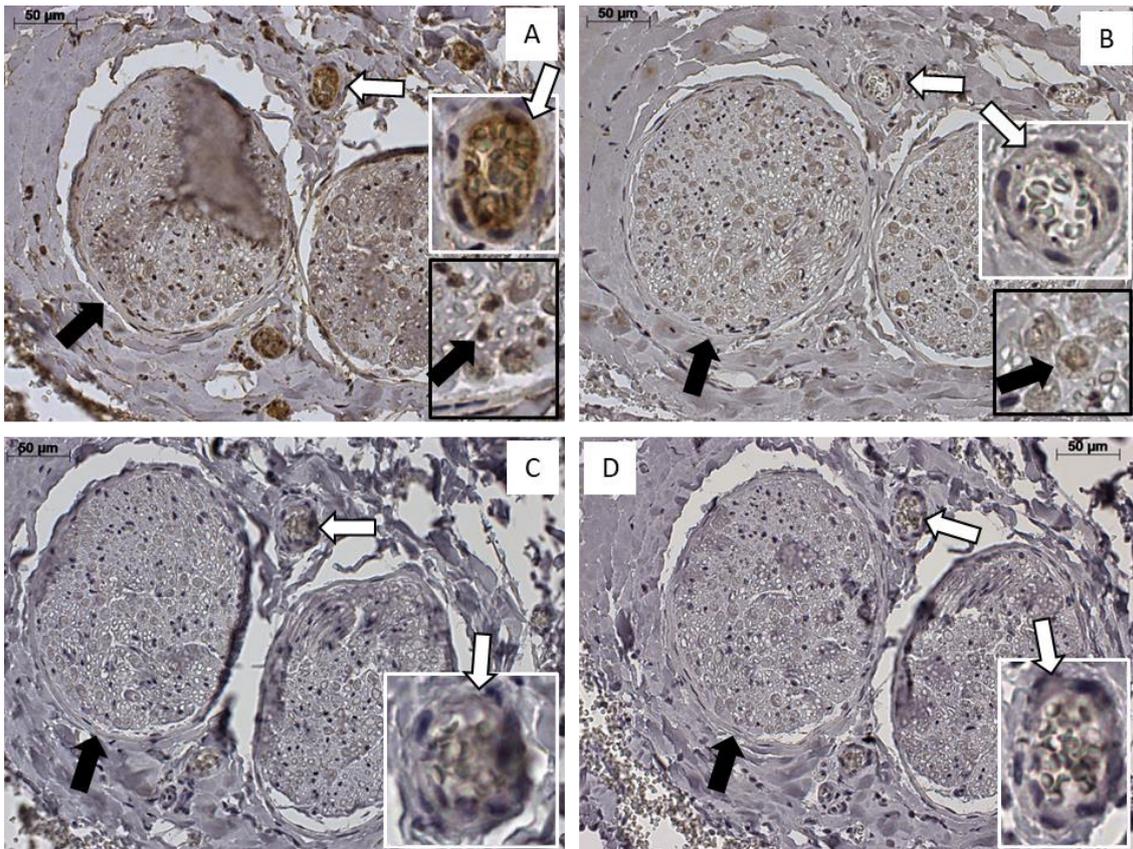


Abbildung 11. Färbung der VeM auf HPV18 E7 und CINtec® Histology. Beispielhaft dargestellt am Präparat VeM-3 (Tabelle 4). **(A)** Färbung mit einem Antikörper gegen HPV18 E7 (N-19). Es zeigen sich neuronale Strukturen (schwarzer Pfeil) positiv gefärbt, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten unteren Bildrand. Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt ebenfalls eine positive Färbung auf, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten Bildrand. **(B)** Färbung mit *normal goat IgG*. Es zeigen sich neuronale (schwarzer Pfeil) und endotheliale Strukturen (weißer Pfeil) mit einer schwach braunen Reaktion, eine Vergrößerung der relevanten Ausschnitte befindet sich am rechten Bildrand. **(C)** Färbung mit CINtec® Histology auf p16^{INK4a}. Es zeigen sich neuronale Strukturen (schwarzer Pfeil) negativ gefärbt. Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt zudem keine positive Reaktion, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten unteren Bildrand. **(D)** Färbung mit CINtec® Histology, negative control. Auch hier zeigen sich neuronale Strukturen (schwarzer Pfeil) und das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) ohne positive Reaktion, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten unteren Bildrand.

Die Färbung mit dem Antikörper HPV18 E7 zeigte bei allen Präparaten eine positive Reaktion an Endothelzellen sowie teilweise auch an Nerven. Im Vergleich mit der negativen Kontrolle (*normal goat IgG*) zeigte sich jedoch eine im direkten Vergleich leicht abgeschwächte positive Reaktion an den Endothelzellen und Nerven (siehe Abbildung 11A, B), sodass das Ergebnis als unspezifische Reaktion (Hintergrundfärbung) des Antikörpers HPV18 E7 zu deuten ist. Die unspezifischen Reaktionen lassen sich auch damit erklären, dass laut Herstellerangaben der Antikörper HPV 18 E7 nicht spezifisch für Immunhistochemie ausgewiesen ist.

Die Färbung mit dem CINtec® Histology Kit zeigte in keiner der untersuchten

Proben eine positive Reaktion auf p16^{INK4a} (Abbildung 11C). Das CINtec® Histology Kit wird zur Erkennung von überexprimiertem p16^{INK4a} eingesetzt und liefert dadurch Hinweise auf eine mögliche Karzinogenese in den untersuchten Proben (Bergeron et al. 2010; Darragh et al. 2012; Galgano et al. 2010; Ordi et al. 2009). Diese negative Reaktion auf die Proben der Venösen Malformationen sprechen daher eher gegen eine HPV-Assoziation.

Insgesamt zeigt die Mehrheit der Proben keine Hinweise auf eine Assoziation mit HPV sondern eher unspezifische Reaktionen auf die eingesetzten HPV16 E6/18 E6- und HPV16 L1-Antikörper. Kritisch anzumerken ist jedoch, dass mit der immunhistochemischen Untersuchung keine DNA von HP-Viren bestimmt werden kann und somit eine bereits stattgehabte Infektion mit den vorliegenden Ergebnissen nicht ausgeschlossen werden kann. Hierzu wurden durch unsere Arbeitsgruppe weitere Untersuchungen mittels einer Virom-Analyse durchgeführt, welche weiter unten beschrieben werden (Franke et al. 2018) und nicht Teil der vorliegenden Arbeit sind.

4.1.4 Vaskuläre Malformationen, nicht näher bezeichnet

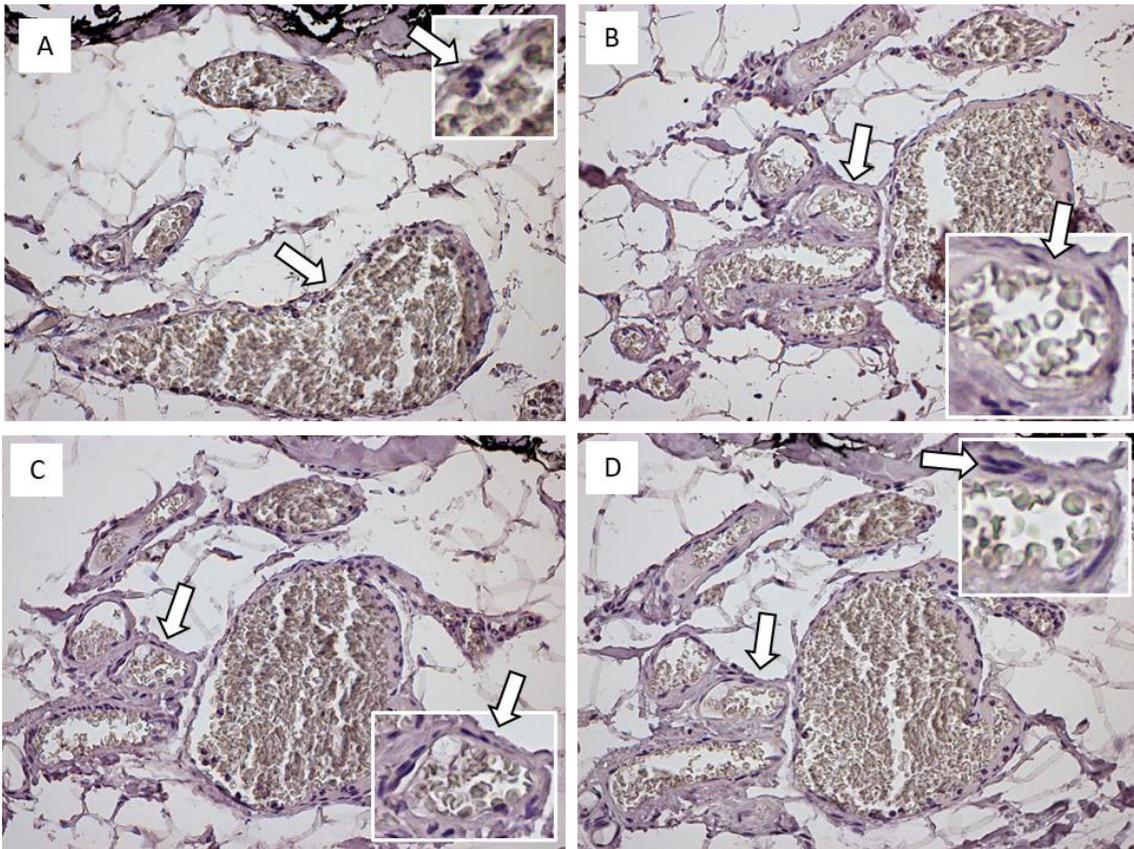


Abbildung 12. Färbung der VM nos auf HPV16/18 E6. Beispielhaft dargestellt am Präparat VM-1 (Tabelle 4). **(A)** Färbung mit einem Antikörper gegen HPV16/18 E6 (C1P5) #E1208. Es zeigt sich das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) ohne positive Reaktion, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten oberen Bildrand. **(B)** Färbung mit einem Antikörper gegen HPV16/18 E6 (C1P5) #A3013. Es zeigt sich das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) ohne positive Reaktion, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten unteren Bildrand. **(C)** Färbung mit einem Antikörper gegen HPV16/18 E6 (C1P5) #J1410. Es zeigt sich das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) ohne positive Reaktion, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten unteren Bildrand. **(D)** Färbung mit *negative Control mouse IgG*. Es zeigt sich das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) ohne positive Reaktion, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten unteren Bildrand. **(A–C)** Dargestellt sind Färbungen mit dem gleichen Antikörper, jedoch mit verschiedenen Chargen.

Unter den untersuchten Präparaten zählen VM-1, VM-2, VM-3, VM-4 und VM-5 zu den nicht näher bezeichneten vaskulären Malformationen (VM nos) (siehe Tabelle 4). Die Färbung mit dem Antikörper gegen HPV16 E6/18 E6 wurde mit drei unterschiedlichen Chargen desselben Antikörpers durchgeführt. In keinem der fünf Präparate zeigte sich in Endothelzellen eine positive Reaktion auf den Antikörper HPV16 E6/18 E6 (siehe Abbildung 12A-C). Im Präparat VM-2 zeigte sich jedoch eine positive Reaktion in peripheren Nerven. In den Nerven waren vor allem die Axone positiv gefärbt, die Schwannzellen zeigten sich überwiegend ohne Reaktion. Ein Unterschied in der Intensität der gefärbten Strukturen

abhängig von der verwendeten Charge zeigte sich hierbei nicht. Da sich in der Negativkontrolle mit *negative control mouse IgG* keine Anfärbung der oben genannten Strukturen zeigte, erscheint eine unspezifische Reaktion des Primärantikörpers zunächst als unwahrscheinlich (siehe Abbildung 12D).

Die Rolle von E6 als eines der beiden Major-Onkoproteine von HPV in Cervix-, Oropharynx- und anderen Karzinomen ist gut bekannt (Stiasny et al. 2016; Zur Hausen 2000). Die positive Reaktion der nervalen Struktur ist hingegen ausschließlich von der Arbeitsgruppe um Füle et al. beschrieben (Füle et al. 2006). Weitere Beschreibungen einer positiven Reaktion der Nerven auf HPV E6 finden sich aktuell in der Literatur nicht. Die Bedeutung im Falle einer nervalen Infektion mit HPV für die Epidemiologie, Pathophysiologie und Therapie ist aktuell noch nicht geklärt. Kritisch zu sehen ist jedoch, dass nur in einem Präparat eine solche positive Reaktion nachweisbar war. Das kann entweder darauf hindeuten, dass Infektionen mit HPV nur selten vorkommen, wobei eine alleinige Infektion der Nerven nicht sehr wahrscheinlich ist, da typisches Gewebe wie Epithel keine positive Reaktion zeigte oder dass eine unspezifische Reaktion gegen ein in Nerven vorkommendes Protein vorliegt. Eine solche Reaktion wäre mit β -Galaktosidase denkbar, da bei der Herstellung des Antikörper HPV16 E6/18 E6 ein β -Galaktosidase-Fusionsprotein verwendet wurde. Das Vorliegen von β -Galaktosidase in neuronalen Strukturen ist bereits durch mehrere Studien bekannt (Clevenger et al. 2008; Mera-Rodríguez et al. 2019).

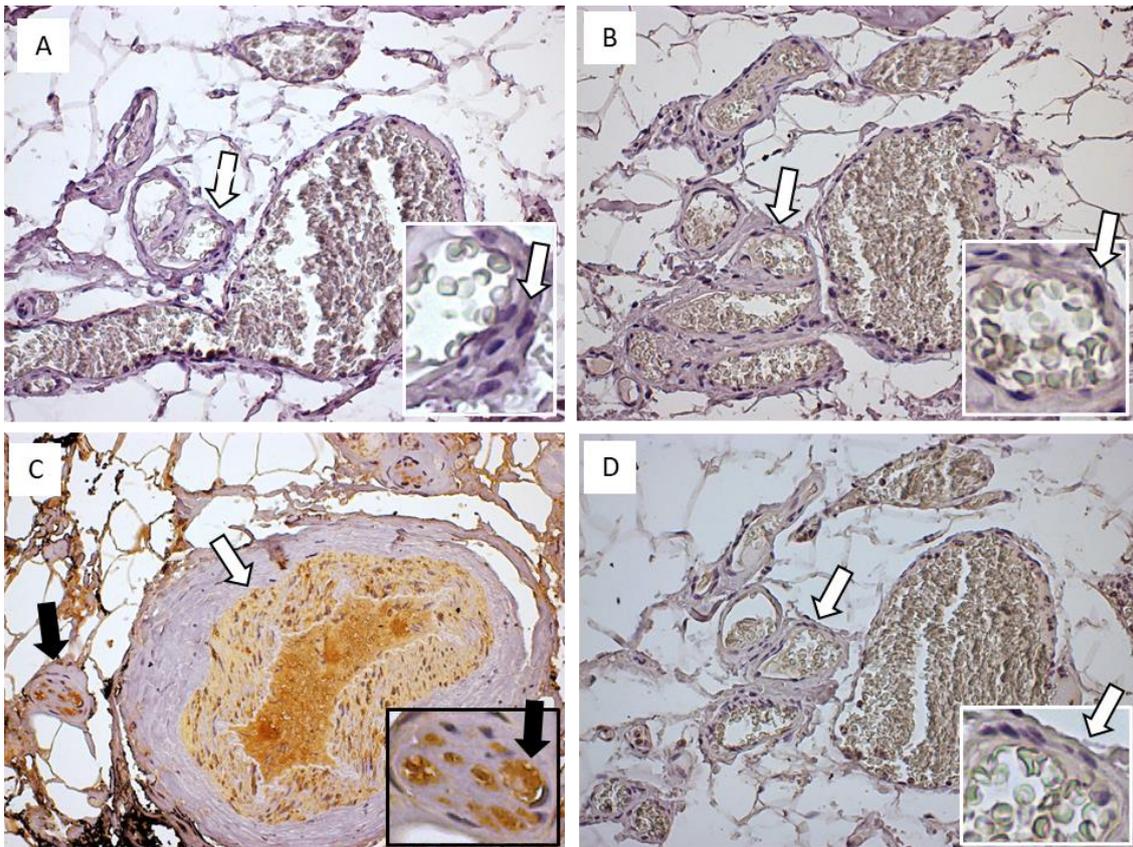


Abbildung 13. Färbung der VM nos auf HPV16 E1/E4, HPV16 E7, HPV16 L1 und Anti-Human Papillomavirus-Antikörper. Beispielhaft dargestellt am Präparat VM-1 (Tabelle 4). **(A)** Färbung mit einem Antikörper gegen HPV16 E1/E4. Es zeigt sich das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) ohne positive Reaktion, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten unteren Bildrand. **(B)** Färbung mit einem Antikörper gegen HPV16 E7 (ED17). Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt eine negative Färbung auf, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten unteren Bildrand. **(C)** Färbung mit einem Antikörper gegen HPV16 L1. Es zeigen sich neuronale Strukturen (schwarzer Pfeil) positiv gefärbt, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten unteren Bildrand. Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt ebenfalls eine positive Färbung. **(D)** Färbung mit dem Anti-Human-Papillomavirus- Antikörper der Firma Dako (Klon K1H8). Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt sich negativ, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten unteren Bildrand.

Die Färbung mit dem Antikörper HPV16 L1 zeigte eine deutlich positive Reaktion in allen fünf Präparaten. Es zeigten sich hier, wie bereits auch in den vorherigen Untersuchungen, Gefäßendothelien, Muskelfasern und Nerven positiv. Nur in den Gefäßendothelzellen waren auch die Zellkerne deutliche positiv. In den Nerven waren vor allem die Axone positiv zu erkennen (siehe Abbildung 13C). Als *Late-protein* im HPV- Zyklus ist L1 für die Bildung des Viruskapsids verantwortlich. Kritisch zu bemerken ist, dass L1, in HPV infizierten Zellen in den Zellkernen zu finden ist, was in unserer Untersuchung nur in den Gefäßendothelzellen der Fall ist (Le Wang et al. 2018). Diese Beobachtung würde unsere aufgestellte Hypothese unterstützen. Jedoch zeigte sich, dass der

verwendete Antikörperklon *CAMVIR-1* bereits in Studien untersucht wurde und eine unspezifische Kreuzreaktion mit einem ubiquitär vorhandenen zellulären Protein hat (Shafti-Keramat et al. 2003). Die vielen positiven Reaktionen in unterschiedlichen Geweben lassen sich mit dieser unspezifischen Reaktion des verwendeten Antikörpers erklären.

Bei der Färbung mit dem Antikörper gegen HPV16 E1/E4 zeigte sich bei allen fünf Präparaten weder eine positive Reaktion der Endothelzellen noch der neuronalen Strukturen. Auch die immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper HPV16 E7 zeigte in keinem Präparat eine positive Reaktion des Endothels oder der Nerven. Diese Ergebnisse sprechen eher gegen eine Infektion mit HP-Viren (siehe Abbildung 13A, B). Die Proteine E6 und E7 sind die einzigen Proteine des HP-Virus, die in Krebszellen dauerhaft exprimiert werden und für die Zellteilung verantwortlich sind. Das Fehlen einer positiven Reaktion auf E7 lässt damit eher gegen eine Infektion mit HPV schließen. Unwahrscheinlich ist auch das Vorliegen einer frühen Phase einer Infektion, da sich keine positive Reaktion auf E4 zeigte. Ein absoluter Ausschluss der Präsenz von Virus-DNA ist jedoch mit dieser rein immunhistochemischen Methode nicht möglich.

Die Färbung mit dem Anti-Human-Papillomavirus-Antikörper von Dako zeigte ebenfalls keine positive Reaktion des Endothels oder der Nerven des Antikörpers in allen fünf Präparaten (siehe Abbildung 13D). In pathologischen Untersuchungen ist der Antikörper von Dako etabliert und geprüft (Iwasaki et al. 1992; Pávai et al. 2006). Da der Antikörper der Firma Dako, ähnlich wie der Klon *CAMVIR-1*, das Kapsidprotein von HPV erkennt, stehen die beobachteten Ergebnisse im Gegensatz zu den Ergebnissen der Färbung mit dem Klon *CAMVIR-1*, sodass die dort beobachteten Reaktionen weiter als unspezifisch betrachtet werden müssen.

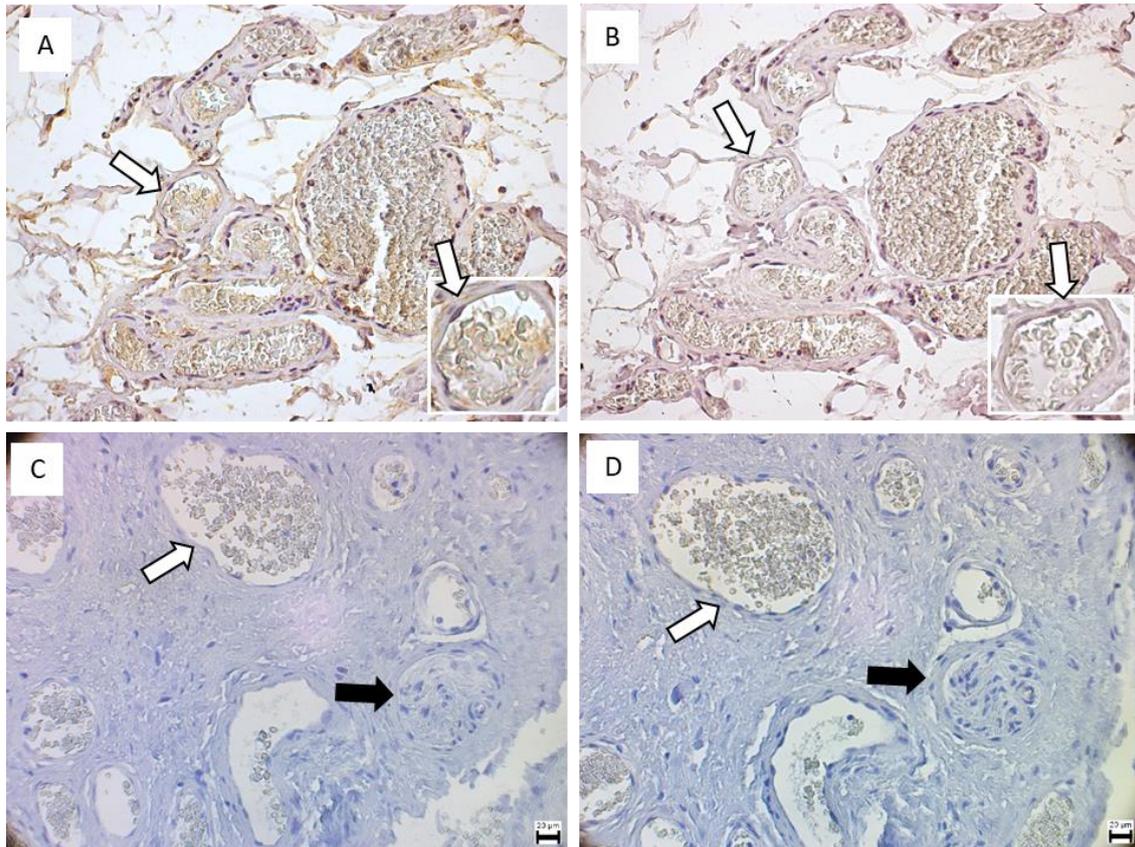


Abbildung 14. Färbung der VM nos auf HPV18 E7 und CINtec® Histology. Beispielhaft dargestellt am Präparat VM-1 (A-B) und VM-3 (C-D) (Tabelle 4). **(A)** Färbung mit einem Antikörper gegen HPV18 E7 (N-19). Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt negative Reaktion auf, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten unteren Bildrand. **(B)** Färbung mit *normal goat IgG*. Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt hier ebenfalls eine negative Reaktion, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten unteren Bildrand. **(C)** Färbung mit CINtec® Histology auf p16^{INK4a}. Es zeigen sich neuronale Strukturen (schwarzer Pfeil) negativ gefärbt. Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt keine positive Reaktion. **(D)** Färbung mit CINtec® Histology, negative control. Es zeigen sich neuronale (schwarzer Pfeil) und endotheliale Strukturen (weißer Pfeil) ohne eine positive Reaktion.

In der Färbung mit einem Antikörper HPV18 E7 zeigten sich in den Präparaten VM-1 und VM-2 teilweise Endothelzellen sowie Nerven positiv. Wie bereits in den vorherigen Untersuchungen beschrieben, zeigte sich im Vergleich mit der negativen Kontrolle mit *normal goat IgG* eine identische Reaktion an den gleichen Geweben (siehe Abbildung 14B). So ist das Ergebnis der Antikörperfärbung als Hintergrundreaktion zu deuten. Für die übrigen Präparate VM-3, VM-4 und VM-5 wurde aufgrund der bereits bekannten unspezifischen Reaktion auf den Antikörper und der Knappheit der Proben aufgrund der *rare disease* auf die immunhistochemische Färbung mit HPV18 E7 verzichtet. Wie bereits beschrieben muss kritisch angemerkt werden, dass laut Herstellerangaben der Antikörper HPV18 E7 nicht spezifisch für Immunhistochemie ausgewiesen ist. Dies könnte die unspezifische Reaktion in der Färbung mit dem Primärantikörper

als auch in der Negativkontrolle erklären.

Die Färbung mit dem CINtec® Histology Kit zeigte bei keiner der fünf Proben eine positive Reaktion der Endothelzellen oder der Nerven auf p16^{INK4a} (Abbildung 14C). Als Färbungskit zur Erkennung von überexprimiertem p16^{INK4a} und damit verbundenem Hinweis auf Karzinogenese wird das CINtec® Histology Kit regelmäßig in histopathologischen Untersuchungen eingesetzt (Bergeron et al. 2010; Darragh et al. 2012; Galgano et al. 2010; Ordi et al. 2009). Die fehlenden positiven Reaktionen sprechen dafür, dass keine HPV-Assoziation besteht.

Insgesamt deuten die Untersuchungen bei den VM nos gegen eine Infektion mit HPV. Die positive Reaktion der Nerven auf HPV16 E6/18 E6 in VM-2 sowie die ubiquitäre positive Reaktion auf HPV L1 in allen fünf Präparaten sind in der Zusammenschau als unspezifische Kreuzreaktionen zu bewerten. Kritisch anzumerken ist jedoch, dass mit immunhistochemischen Untersuchung allein keine DNA von HP-Viren bestimmt werden kann und somit eine bereits stattgehabte Infektion mit den vorliegenden Ergebnissen nicht ausgeschlossen werden kann. Eine Untersuchung, ob Virus-DNA in Proben von VA vorliegt, wurde von der Arbeitsgruppe im Rahmen der Virom-Analyse durchgeführt (Franke et al. 2018) und ist nicht Teil der vorliegenden Arbeit.

4.1.5 Paragangliome

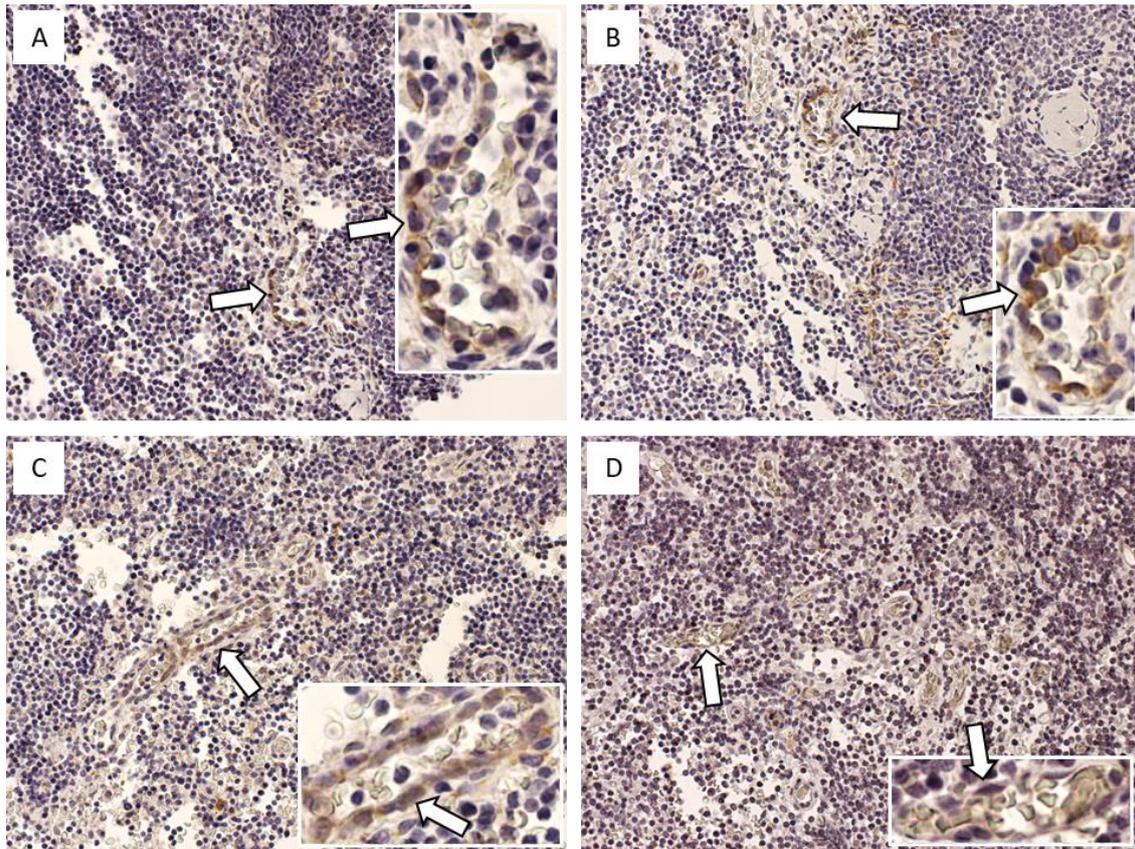


Abbildung 15. Färbung der Paragangliome auf HPV16/18 E6. Beispielhaft dargestellt am Präparat PG-2 (Tabelle 4). **(A)** Färbung mit einem Antikörper gegen HPV16/18 E6 (C1P5) #E1208. Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt eine positive Reaktion, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten Bildrand. **(B)** Färbung mit einem Antikörper gegen HPV16/18 E6 (C1P5) #A3013. Auch hier ist eine positive Reaktion des Endothels (weißer Pfeil) zu erkennen, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten unteren Bildrand. **(C)** Färbung mit einem Antikörper gegen HPV16/18 E6 (C1P5) #J1410. Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt eine positive Reaktion, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten unteren Bildrand. **(D)** Färbung mit *negative Control mouse IgG*. Am Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) ist keine positive Färbung zu erkennen, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten unteren Bildrand. **(A–C)** Dargestellt sind Färbungen mit dem gleichen Antikörper jedoch mit verschiedenen Chargen.

Unter den untersuchten Präparaten zählen PG-1, PG-2, PG-3 und PG-4 zu den Paragangliomen (siehe Tabelle 4). Die Färbung mit dem Antikörper gegen HPV16 E6/18 E6 wurde mit drei unterschiedlichen Chargen desselben Antikörpers durchgeführt. Nur im Präparat PG-2 zeigten sich Gefäßendothelzellen positiv (siehe Abbildung 15A-C). Hierbei war meist das Zytoplasma positiv gefärbt, Anfärbungen im Zellkern waren nur selten zu erkennen. Da im Präparat PG-2 keine nervalen Strukturen zu erkennen waren, ließ sich hier keine Reaktion feststellen. Die Präparate PG-1 und PG-3 zeigten jedoch eine schwach positive Reaktion der peripheren Nerven mit dem

Antikörper. In den Nerven waren vor allem die Axone positiv gefärbt, die Schwannzellen zeigten sich überwiegend ohne Reaktion. Wie in Abbildung 15 dargestellt, zeigte sich kein wesentlicher Unterschied in der Intensität der gefärbten Strukturen abhängig von der verwendeten Antikörpercharge im Gegensatz zu den anderen Vaskulären Malformationen. Da sich in der Negativkontrolle mit *negative control mouse IgG* keine Anfärbung der oben genannten Strukturen zeigte, war eine unspezifische Reaktion des Primärantikörpers zunächst nicht wahrscheinlich.

Das Protein E6 ist eines der besten untersuchten Proteine von humanen Papillomaviren. Seine Rolle in der Entstehung verschiedener Tumore ist gut erforscht und durch viele Publikationen belegt (Stiasny et al. 2016; Zur Hausen 2000). Einen Hinweis auf eine mögliche HPV- Assoziation liefert die positive Reaktion des Endothels sowie der Nerven in den zwei oben beschriebenen Präparaten. In der Literatur konnte jedoch bisher nur eine Publikation von der Arbeitsgruppe um Füle et al. gefunden werden, die eine ähnliche Beobachtung beschreibt (Füle et al. 2006). Da bei der Herstellung des Antikörpers HPV16 E6/18 E6 ein β -Galaktosidase-Fusionsprotein eingesetzt wurde, ist auch eine unspezifische Reaktion des Antikörpers gegen β - Galaktosidase denkbar. Ein Vorkommen von β -Galaktosidase in Nerven wurde bereits durch mehrere Publikationen beschrieben (Clevenger et al. 2008; Mera-Rodríguez et al. 2019).

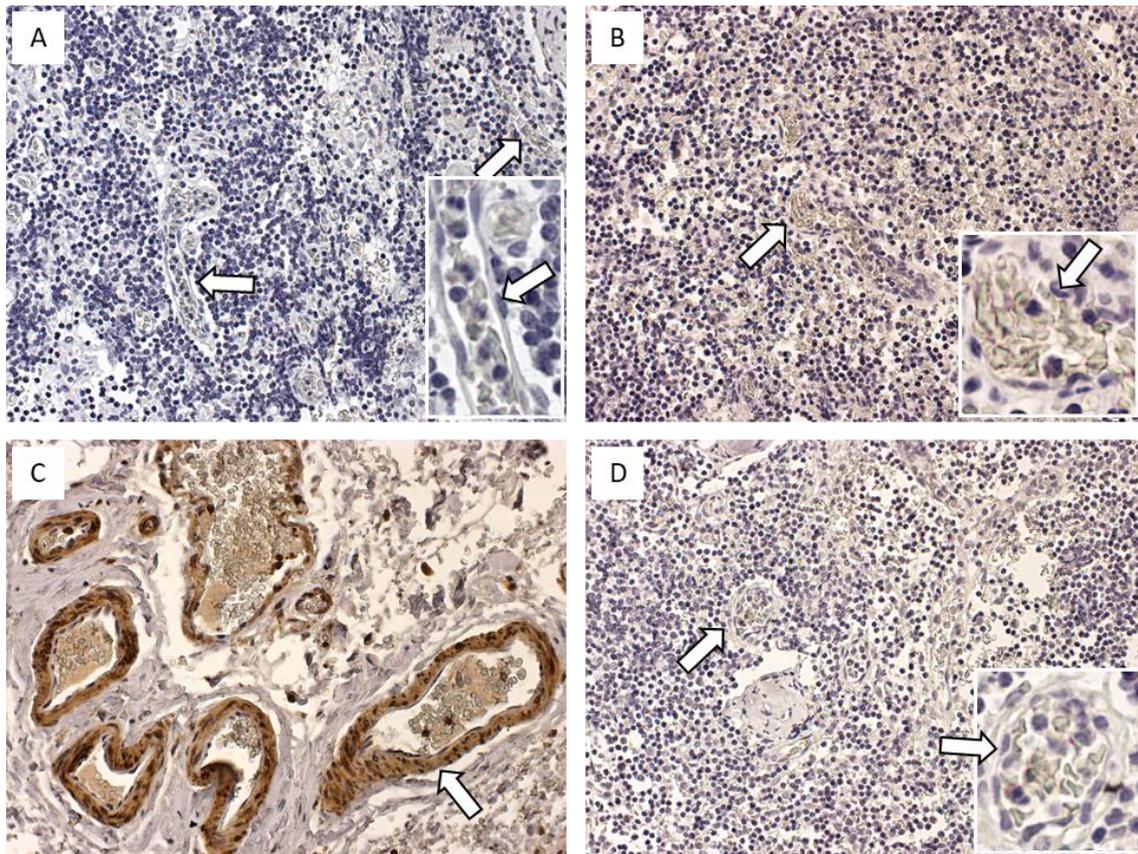


Abbildung 16. Färbung der Paragangliome auf HPV16 E1/E4, HPV16 E7, HPV16 L1 und Anti-Human Papillomavirus-Antikörper. Beispielhaft dargestellt am Präparat PG-2 (Tabelle 4). **(A)** Färbung mit einem Antikörper gegen HPV16 E1/E4. Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) weist eine negative Färbung auf, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten unteren Bildrand. **(B)** Färbung mit einem Antikörper gegen HPV16 E7 (ED17). Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt hier ebenfalls keine positive Reaktion, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten unteren Bildrand. **(C)** Färbung mit einem Antikörper gegen HPV16 L1. Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt hier eine positive Reaktion. **(D)** Färbung mit dem Anti-Human Papillomavirus- Antikörper der Firma Dako (Klon K1H8). Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) stellt sich negativ dar, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten unteren Bildrand.

Die Färbung mit dem Antikörper HPV16 L1 zeigte eine stark positive Reaktion in allen vier Präparaten. Es stellten sich hier vor allem das Endothel, aber auch Muskelfasern und Nerven überall in den Proben positiv dar. Die stark positive Reaktion in den Gefäßendothelzellen zeigte sich sowohl in den Zellkernen als auch im Zytoplasma (siehe Abbildung 16C). Die Anfärbung in den Nerven beschränkte sich meistens auf die Axone. Für die Bildung des HPV-Kapsids wird das Protein L1 benötigt. Bekannterweise ist das Protein L1 bei immunhistochemischen Färbungen vermehrt im Zellkern zu finden, was sich mit den Ergebnissen der Endothelzellen deckt (Le Wang et al. 2018). Die positive Reaktion im Bereich der Endothelzellen weist somit auf eine aktive HPV-Infektion

mit Expression von L1 hin und würde somit unsere aufgestellte Hypothese unterstützen. Wie bereits in den vorherigen Abschnitten beschrieben, konnten Shafti-Keramat et al. jedoch bereits im Jahr 2003 zeigen, dass der verwendete Antikörper *CAMVIR-1* eine unspezifische Kreuzreaktion mit einem zellulären Protein hat (Shafti-Keramat et al. 2003). Trotz der deutlichen Reaktion des Endothels und nur teilweise Reaktion von anderen Gewebsarten ist eine solche unspezifische Reaktion auch in unseren Ergebnissen wahrscheinlich.

Bei der Färbung mit dem Antikörper gegen HPV16 E1/E4 zeigte sich bei keinem der Präparate eine positive Reaktion der Endothelzellen oder der neuronalen Strukturen. Ebenso ergab sich in der Färbung mit dem Antikörper HPV16 E7 bei keinem Präparat eine positive Reaktion (siehe Abbildung 16A, B). Diese Ergebnisse sprechen eher gegen eine Assoziation mit HP-Viren. Aufgrund des Fehlens einer positiven Reaktion auf E7 kann nicht von einer Infektion in einer späteren Phase ausgegangen werden. Ebenso spricht die fehlende positive Reaktion gegen E1/E4 gegen eine Infektion in einer frühen Phase (Chow et al. 2009).

Die Färbung mit dem Anti-Human-Papillomavirus-Antikörper von Dako zeigte ebenfalls keine positiven Ergebnisse in den getesteten Präparaten (siehe Abbildung 16D). Der von uns genutzte Antikörper der Firma Dako ist für histopathologische Diagnostik zugelassen und kommt dort regelmäßig zum Einsatz (Iwasaki et al. 1992; Pávai et al. 2006). Ebenso wie der Antikörper des Klons *CAMVIR-1* erkennt der Antikörper von Dako, Klon K1H8, das Kapsidprotein L1 (Iwasaki et al. 1992). Die fehlende Reaktion des Antikörpers von Dako in den Gewebeproben der Paragangliome unterstützt die Hypothese einer unspezifischen Reaktion des Klons *CAMVIR-1*.

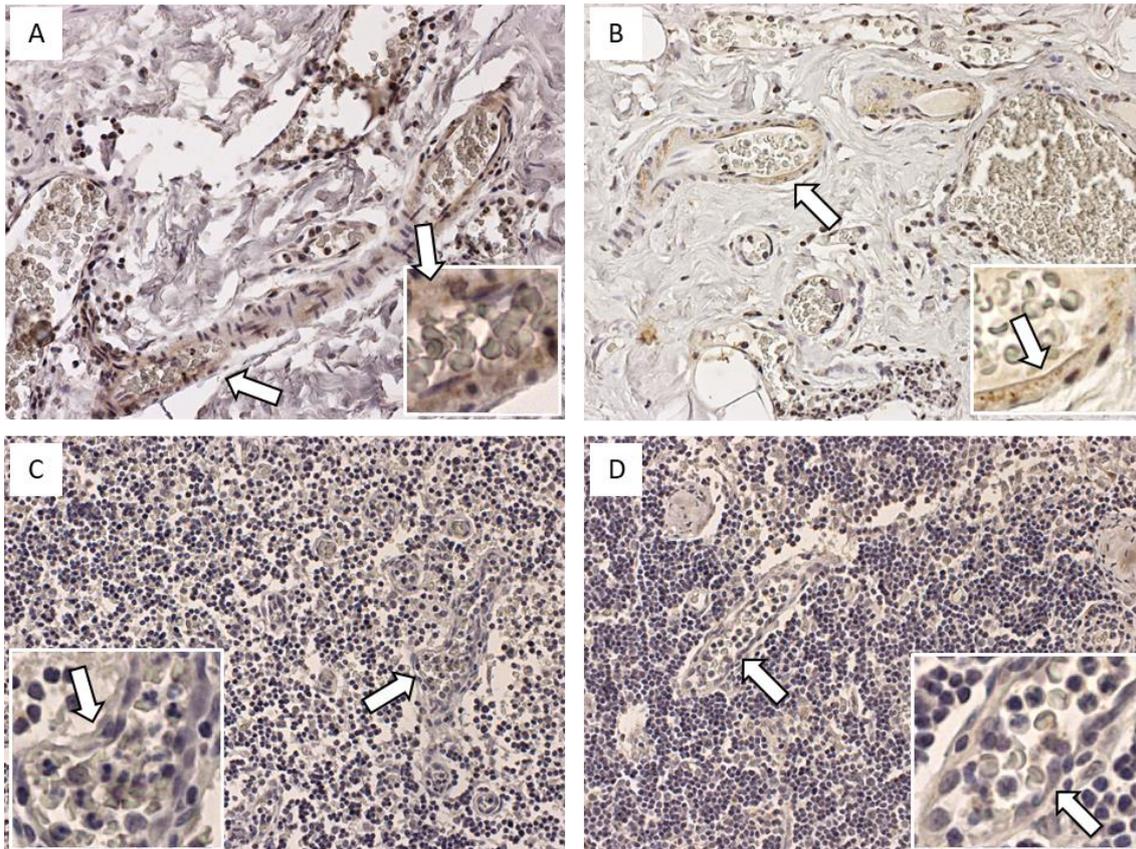


Abbildung 17. Färbung der Paragangliome auf HPV18 E7 und CINtec® Histology. Beispielhaft dargestellt am Präparat PG-2 (Tabelle 4). **(A)** Färbung mit einem Antikörper gegen HPV18 E7 (N-19). Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt hier eine leichte positive Reaktion, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten unteren Bildrand. **(B)** Färbung mit *normal goat IgG*. Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt hier ebenfalls eine positive Reaktion, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten unteren Bildrand. **(C)** Färbung mit CINtec® Histology auf p16^{INK4a}. Eine positive Reaktion des Endothels der Gefäße (weißer Pfeil) ist nicht zu erkennen, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am linken unteren Bildrand. **(D)** Färbung mit CINtec® Histology, negative control. Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) weist ebenfalls eine negative Färbung auf, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten unteren Bildrand.

Die Färbung mit dem Antikörper HPV18 E7 zeigte bei den beiden Präparaten PG-2 und PG-1 eine positive Reaktion an den Endothelzellen sowie an den Nerven. Insgesamt war die Reaktion im Präparat PG-2 nur sehr schwach positiv im Zytoplasma der Endothelzellen. Im Präparat PG-1 zeigte sich eine stärkere positive Reaktion der Endothelzellen, wobei auch hier hauptsächlich das Zytoplasma gefärbt war. Im Vergleich mit der negativen Kontrolle mit *normal goat IgG* zeigte sich jedoch eine vergleichbare Reaktion an den gleichen Geweben, sodass das Ergebnis als unspezifische Hintergrundreaktion des Antikörpers HPV18 E7 zu deuten ist (siehe Abbildung 17A, B). Für die übrigen Präparate PG-3 und PG-4 wurde aufgrund der bereits bekannten unspezifischen Reaktion auf

den Antikörper und der Knappheit der Proben (*rare disease*) auf die immunhistochemische Färbung mit HPV18 E7 verzichtet. Wie bereits in den vorherigen Abschnitten beschrieben ist darauf hinzuweisen, dass laut Angaben des Herstellers der Antikörper HPV18 E7 nicht spezifisch für immunhistochemische Untersuchungen ausgewiesen ist. Dies könnte die unspezifische Reaktion sowohl in der Färbung mit dem Primärantikörper als auch in der Negativkontrolle erklären.

Die Färbung mit dem CINtec® Histology Kit zeigte bei keiner der vier Proben eine positive Reaktion der Gefäßendothelzellen oder der Nerven auf p16^{INK4a} (siehe Abbildung 17C, D). Das CINtec® Histology Kit ist ein inzwischen sehr etabliertes Färbungskit zur Erkennung von überexprimiertem p16^{INK4a} und damit verbundenem Hinweis auf Karzinogenese in Verbindung mit HPV, welches in der Pathologie, wie oben bereits beschrieben, regelmäßig angewandt wird (Bergeron et al. 2010; Darragh et al. 2012; Galgano et al. 2010; Ordi et al. 2009). Der fehlende Nachweis von p16^{INK4a} spricht somit gegen die unkontrollierte Zellteilung durch eine aktive HPV-Infektion.

Insgesamt deuten die Untersuchungen bei den Paragangliomen gegen eine Infektion mit HPV. Die positive Reaktion der Gefäße auf HPV16 E6/18 E6 sowie die positive Reaktion auf HPV L1 in allen Präparaten sind in der Zusammenschau als unspezifische Kreuzreaktionen zu bewerten. Da sich Paragangliome wesentlich in ihrer Entstehung von den vaskulären Anomalien unterscheiden, und diese Entstehung bereits gut untersucht ist, sind unserer Ergebnisse im Einklang mit der aktuellen Studienlage (Neumann et al. 2004; Welander et al. 2011). Es wurden zwar Untersuchungen bei den verwandten Phäochromozytomen auf Infektionen mit Viren durchgeführt, aber auch diese zeigten sich ohne viralen Nachweis (Badani et al. 2016). Schlussendlich ist darauf hinzuweisen, dass mittels immunhistochemischer Untersuchung keine DNA von HP-Viren bestimmt und damit eine abgelaufene Infektion nicht ausgeschlossen werden kann. Zum Ausschluss einer solchen abgelaufenen Infektion führte unsere Arbeitsgruppe weitere Untersuchungen in Virom-Analysen durch (Franke et al. 2018), welche nicht Teil der vorliegenden Arbeit sind.

4.1.6 Hämangiome

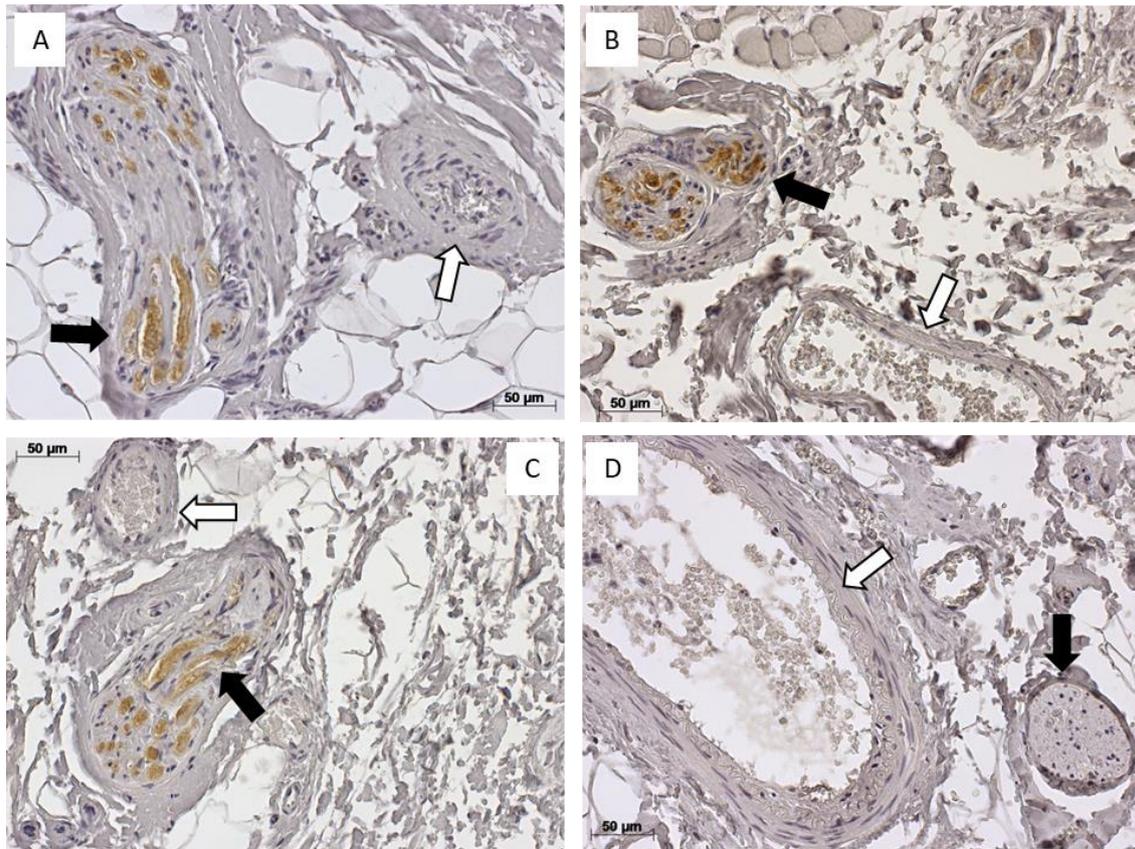


Abbildung 18. Färbung der Hämangiome auf HPV16/18 E6. Beispielhaft dargestellt am Präparat HA-3 (Tabelle 4). Es zeigt sich eine deutliche positive Reaktion in den Nerven (schwarzer Pfeil), während in den Gefäßen (weißer Pfeil) keine positive Reaktion erkennbar ist. **(A)** Färbung mit einem Antikörper gegen HPV16/18 E6 (C1P5) #E1208. **(B)** Färbung mit einem Antikörper gegen HPV16/18 E6 (C1P5) #A3013. **(C)** Färbung mit einem Antikörper gegen HPV16/18 E6 (C1P5) #J1410. **(D)** Färbung mit *negative Control mouse IgG*. Es zeigen sich neuronale Strukturen (schwarzer Pfeil) ohne positive Reaktion. Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt sich auch negativ. **(A–C)** Dargestellt sind Färbungen mit dem gleichen Antikörper, jedoch mit verschiedenen Chargen.

Unter den untersuchten Präparaten zählen HA-1, HA-2, HA-3, HA-4 und HA-5 zu den Hämangiomen (Tabelle 4). Die Färbung mit dem Antikörper gegen HPV16 E6/18 E6 wurde mit drei unterschiedlichen Chargen desselben Antikörpers durchgeführt. Es zeigte sich nur im Präparat HA-2 eine positive Reaktion der Endothelzellen auf den Antikörper HPV16 E6/18 E6. Auch in dieser Untersuchung war die positive Reaktion vor allem im Zytoplasma der Zellen erkennbar, die Zellkerne zeigten sich nur sehr selten positiv. Die Präparate HA-1, HA-2, HA-3 und HA-5 zeigten eine positive Reaktion in peripheren Nerven (siehe Abbildung 18A-C). Wie auch bereits in den vorherigen Untersuchungen zeigten sich hauptsächlich die Axone der Nerven positiv. Nur im Präparat HA-4

zeigte sich keine positive Reaktion. In der Intensität der gefärbten Strukturen zeigte sich ein leichter Unterschied abhängig von der verwendeten Antikörpercharge. Die Charge #J1410 zeigte hier eine schwächere Intensität der gefärbten Strukturen. Aufgrund der unauffälligen Negativkontrolle mit *negative control mouse IgG* (siehe Abbildung 18D) erschien eine unspezifische Reaktion des Primärantikörpers unwahrscheinlich.

Das Protein E6 ist ein Onkoprotein von HPV und wurde in Cervix-, Oropharynx- und anderen Karzinomen immunhistochemisch nachgewiesen (Stiasny et al. 2016; Zur Hausen 2000). Da Hämangiome anders als vaskuläre Malformationen bei Geburt noch nicht ausgeprägt sind, ist eine virale Infektion z.B. im Rahmen der Geburt, ein möglicher Faktor, der zur Entstehung der Hämangiome beiträgt. Aktuell sind Berichte über Hämangiome bei Hühnern bekannt, die durch Viren ausgelöst wurden (Meng et al. 2018). Durch Viren verursachte Hämangiome sind aktuell bei Menschen jedoch noch nicht beschrieben. Auffällig ist die deutliche Häufung der positiven Reaktion in den Nerven im Vergleich mit den anderen Vaskulären Anomalien. Eine positive Reaktion der nervalen Struktur ist hingegen, wie zuvor bereits erwähnt, ausschließlich von der Arbeitsgruppe um Füle et al. beschrieben worden (Füle et al. 2006). Weitere Beschreibungen einer positiven Reaktion der Nerven auf HPV E6 finden sich aktuell nicht in der Literatur. Die Bedeutung im Falle einer nervalen Infektion mit HPV für die Epidemiologie, Pathophysiologie und Therapie ist aktuell noch nicht geklärt. Wie bereits zuvor angesprochen, ist eine unspezifische Reaktion mit β -Galaktosidase als Erklärung der positiven Reaktion denkbar, da der Antikörper HPV16 E6/18 E6 als Zielstruktur ein β -Galaktosidase-E6-Fusionsprotein hat. Das Vorhandensein von β -Galaktosidase in Nerven wurde bereits in mehreren Studien belegt (Clevenger et al. 2008; Mera-Rodríguez et al. 2019).

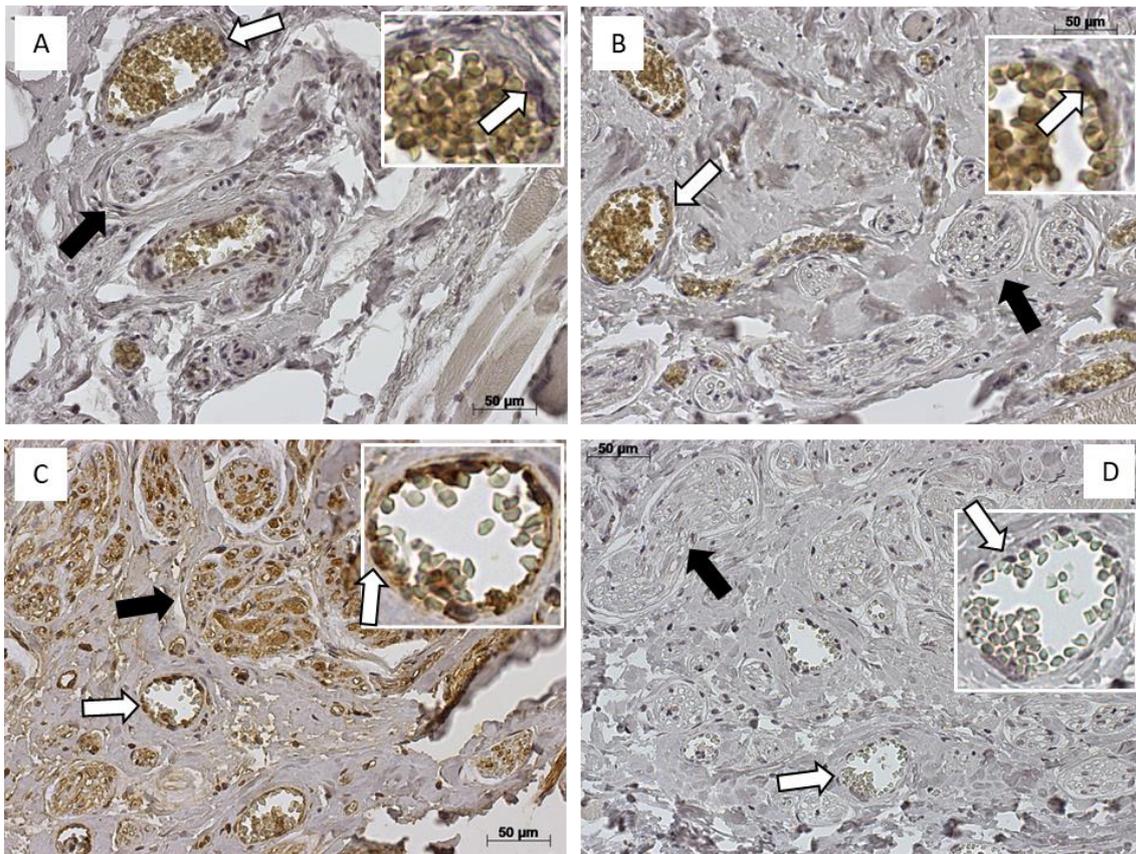


Abbildung 19. Färbung der Hämangiome auf HPV16 E1/E4, HPV16 E7, HPV16 L1 und Anti-Human-Papillomavirus-Antikörper. Beispielhaft dargestellt am Präparat HA-3 (Tabelle 4). **(A)** Färbung mit einem Antikörper gegen HPV16 E1/E4. Es zeigen sich neuronale Strukturen (schwarzer Pfeil) negativ gefärbt. Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt auch eine negative Färbung auf, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten oberen Bildrand. **(B)** Färbung mit einem Antikörper gegen HPV16 E7 (ED17). Es zeigen sich nervale (schwarzer Pfeil) und endotheliale Strukturen (weißer Pfeil) ohne positive Reaktion, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten oberen Bildrand. **(C)** Färbung mit einem Antikörper gegen HPV16 L1. Es zeigen sich neuronale Strukturen (schwarzer Pfeil) positiv gefärbt. Auch das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt eine positive Reaktion auf, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten oberen Bildrand. **(D)** Färbung mit dem Anti-Human-Papillomavirus- Antikörper der Firma Dako (Klon K1H8). Es zeigen sich neuronale Strukturen (schwarzer Pfeil) negativ gefärbt. Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt eine negative Färbung auf, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten oberen Bildrand.

Die Färbung mit dem Antikörper HPV16 L1 zeigte eine stark positive Reaktion in allen fünf Präparaten. Es zeigten sich hier sowohl Gefäßendothelien als auch Muskelfasern und Nerven positiv. Die Anfärbung in den Nerven beschränkt sich meist auf die Axone. Im Endothel hingegen zeigen sich sowohl Zytoplasma als auch Nuklei positiv (siehe Abbildung 19C). Die Bildung des HPV-Kapsids wird über das Protein L1 gesteuert, welches erst in späteren Virusphasen exprimiert wird. Eine solche Expression von HPV L1 wurde bei HPV-assoziierten Tumoren im Zellkern beschrieben (Le Wang et al. 2018). Unsere Beobachtungen deuten

somit auf eine aktive Expression des Proteins L1 hin und machen eine Assoziation mit HPV möglich. Jedoch ist durch die Untersuchung von Shafti-Keramat et al. eine unspezifische Reaktion des verwendeten Antikörpers *CAMVIR-1* bekannt. Diese richtet sich gegen ein in vielen Zellen vorkommendes nicht-näher definiertes Protein (Shafti-Keramat et al. 2003). Diese unspezifische Reaktion ist eine gute Erklärung der positiven Reaktionen der vielen verschiedenen Gewebsarten wie Muskeln, Nerven und Endothelzellen, welche sich in den bisherigen Färbungen teilweise ohne Reaktion zeigten.

Bei der Färbung mit dem Antikörper gegen HPV16 E1/E4 zeigten sich keine positiven Reaktionen. Auch die Untersuchung mit dem Antikörper HPV16 E7 zeigte in keinem Präparat eine positive Reaktion des Endothels oder der Nerven (siehe Abbildung 19A, B). Diese Ergebnisse sprechen eher gegen eine Assoziation mit HP-Viren. Die Rolle des Onkoproteins E7 für die Zellteilung und damit den Zyklus von HPV ist gut untersucht (Zur Hausen 2000). Die nicht vorhandene Reaktion auf den Antikörper E7 lässt daher vermuten, dass keine aktive Infektion vorliegt. Eine Infektion in einer früheren Phase, in der noch kein E7 vorliegt, ist durch das Fehlen von E1/E4 ebenso unwahrscheinlich. Die Färbung mit dem Anti-Human-Papillomavirus-Antikörper von Dako zeigte ebenfalls keine positive Reaktion in allen fünf Präparaten (siehe Abbildung 19D). Durch viele wissenschaftliche Studien belegt, ist der Antikörper der Firma Dako ein inzwischen häufig eingesetzter Antikörper in der histopathologischen Diagnostik zur Erkennung von Präkanzerosen oder Tumoren (Iwasaki et al. 1992). Dass der Antikörper der Firma Dako ebenso wie der Klon *CAMVIR-1* das Kapsid-Protein von HPV erkennt, steht im Widerspruch zu den beobachteten Ergebnissen mit dem Klon *CAMVIR-1*, lässt jedoch eine mögliche Assoziation von HPV in den untersuchten Hämangiomen unwahrscheinlich erscheinen.

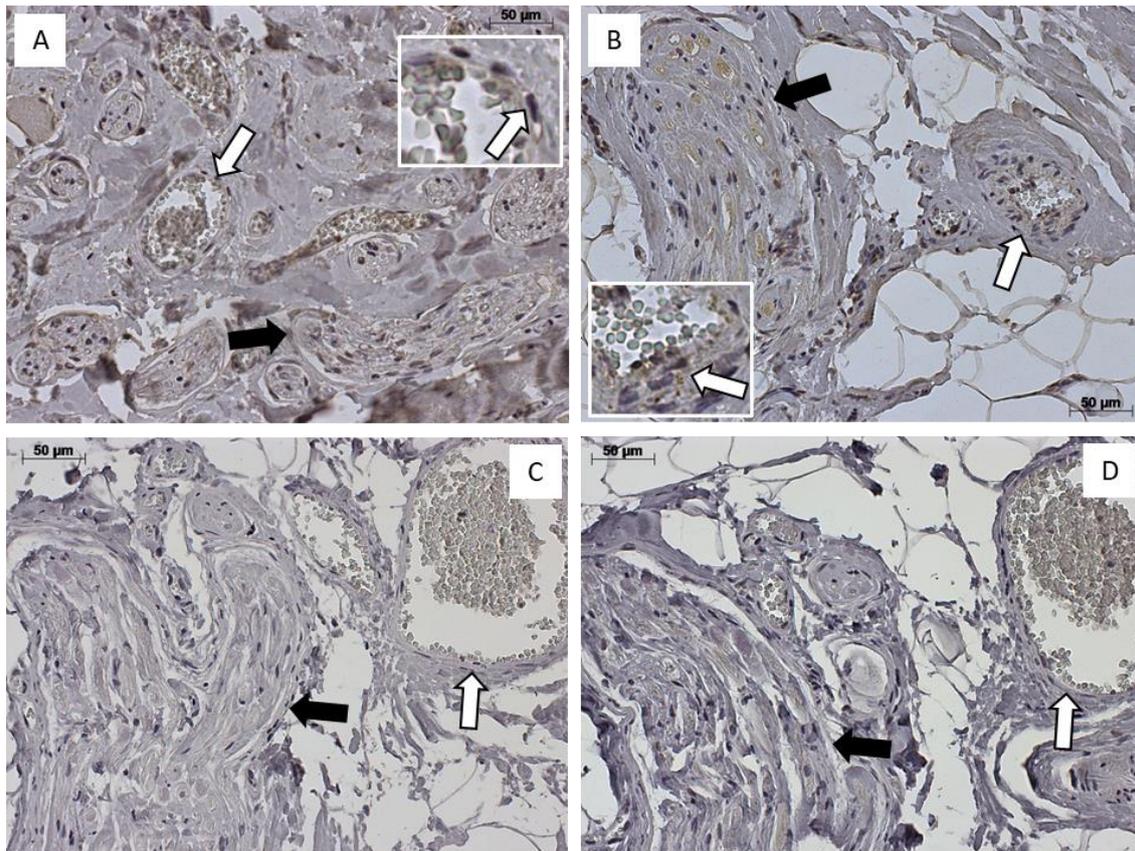


Abbildung 20. Färbung der Hämangiome auf HPV18 E7 und CINtec® Histology. Beispielhaft dargestellt am Präparat HA-3 (Tabelle 4). **(A)** Färbung mit einem Antikörper gegen HPV18 E7 (N-19). Es zeigen sich neuronale Strukturen (schwarzer Pfeil) negativ. Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt zudem eine negative Färbung, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten oberen Bildrand. **(B)** Färbung mit *normal goat IgG*. Es zeigen sich neuronale Strukturen (schwarzer Pfeil) leicht positiv gefärbt. Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt ebenfalls eine nur schwach braune Reaktion, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am linken unteren Bildrand. **(C)** Färbung mit CINtec® Histology auf p16^{INK4a}. Es zeigen sich neuronale Strukturen (schwarzer Pfeil) und Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) ohne eine positive Reaktion. **(D)** Färbung mit CINtec® Histology, negative control. Es zeigen sich neuronale Strukturen (schwarzer Pfeil) und Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) ohne eine positive Reaktion.

Die Färbungen mit dem Antikörper HPV18 E7 zeigten bei den Präparaten HA-1, HA-2 und HA-3 keine positive Reaktion an den Nerven. Das Endothel der Gefäße zeigte sich schwach positiv angefärbt. Im Vergleich mit der negativen Kontrolle mit *normal goat IgG* zeigte sich jedoch eine vergleichbare positive Reaktion an den Endothelzellen, sodass das Ergebnis als unspezifische Reaktion des Antikörpers HPV18 E7 zu deuten ist (siehe Abbildung 20A, B). Für die übrigen Präparate HA-4 und HA-5 wurde aufgrund der bereits bekannten unspezifischen Reaktion auf den Antikörper und der Knappheit der Proben aufgrund der *rare disease* auf die immunhistochemische Färbung mit HPV18 E7 verzichtet. Wie bereits in den vorherigen Abschnitten erwähnt muss angemerkt werden, dass

laut Angaben des Herstellers der Antikörper HPV18 E7 nicht spezifisch für Immunhistochemie ausgewiesen ist. Dies könnte die unspezifische Reaktion sowohl in der Färbung mit dem Primärantikörper als auch in der Negativkontrolle erklären.

Die Färbung mit dem CINtec® Histology Kit zeigte bei keiner der fünf Proben eine positive Reaktion der Gefäßendothelzellen, der Nerven oder des Epithels auf p16^{INK4a} (siehe Abbildung 20C, D). Das CINtec® Histology Kit wird heute regelmäßig in der histopathologischen Diagnostik eingesetzt. Die Erkennung von überexprimiertem p16^{INK4a} und damit verbundenem Hinweis auf Präkanzerosen ist vor allem in der Krebsfrüherkennung wichtig (Darragh et al. 2012; Galgano et al. 2010). Eine fehlende positive Reaktion deutet auf einen normalen Zellzyklus ohne p16^{INK4a}-Überexpression bzw. Mutationen hin, was das Vorliegen einer aktiven HPV- Infektion unwahrscheinlich macht.

Insgesamt sprechen die Untersuchungen bei den Hämangiomen gegen eine Infektion mit HPV. Die positive Reaktion der Endothelzellen in HA-2, der Nerven auf HPV16 E6/18 E6 in den anderen Proben sowie die ubiquitäre positive Reaktion auf HPV L1 in allen fünf Präparaten, sind in der Zusammenschau aller Ergebnisse als unspezifische Kreuzreaktionen zu bewerten. Kritisch anzumerken ist jedoch, dass mit der immunhistochemischen Untersuchung keine DNA von HP-Viren bestimmt werden kann und somit eine bereits stattgehabte Infektion mit den vorliegenden Ergebnissen nicht ausgeschlossen werden kann. Um das Vorliegen von Virus-DNA zu untersuchen, führte die Arbeitsgruppe um Franke et al. weitere Untersuchungen mittels Virom-Sequenzierung durch (Franke et al. 2018).

4.1.7 Hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie

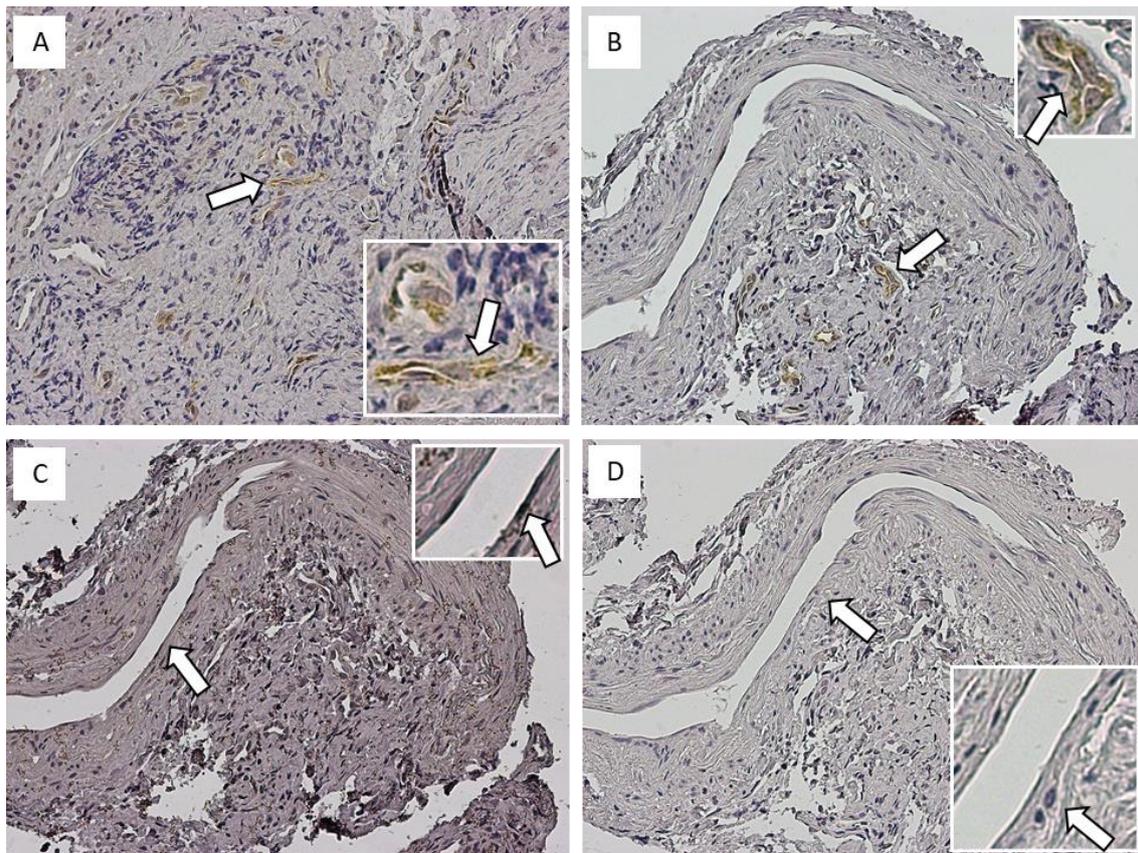


Abbildung 21. Färbung M. Osler auf HPV16/18 E6. Beispielhaft dargestellt am Präparat HHT-1 (Tabelle 4). **(A)** Färbung mit einem Antikörper gegen HPV16/18 E6 (C1P5) #E1208. Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt eine positive Färbung, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten unteren Bildrand. **(B)** Färbung mit einem Antikörper gegen HPV16/18 E6 (C1P5) #A3013. Auch hier zeigt das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) eine positive Reaktion, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten oberen Bildrand. **(C)** Färbung mit einem Antikörper gegen HPV16/18 E6 (C1P5) #J1410. Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt keine positive Färbung, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten oberen Bildrand. **(D)** Färbung mit *negative Control mouse IgG*. Im Endothel (weißer Pfeil) ist keine positive Färbung erkennbar, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten unteren Bildrand. **(A–C)** Dargestellt sind Färbungen mit dem gleichen Antikörper jedoch mit verschiedenen Chargen.

Unter den untersuchten Präparaten zählen HHT-1, HHT-2 und HHT-3 zum Krankheitsbild der hereditären hämorrhagischen Teleangiektasien (M. Osler) (siehe Tabelle 4). Die Färbung mit dem Antikörper gegen HPV16 E6/18 E6 wurde mit drei unterschiedlichen Chargen desselben Antikörpers durchgeführt. In zwei der drei Präparate, HHT-1 und HHT-2 zeigten sich in Endothelzellen der Gefäße eine schwache positive Reaktion auf den Antikörper HPV16 E6/18 E6. Auffallend hierbei ist, dass sich meist nur kleine Venen positiv gefärbt zeigten, seltener Arterien. Zudem waren nicht alle kleinen Gefäße der Präparate positiv gefärbt. Eine positive Reaktion der peripheren Nerven mit dem Antikörper zeigte sich

hingegen in keinem der Präparate. Wie in Abbildung 21 dargestellt, zeigte sich auch ein deutlicher Unterschied in der Intensität der gefärbten Endothelzellen abhängig von der verwendeten Antikörpercharge. Die Charge #A3013 zeigte hierbei die stärkste Anfärbung, während die Charge #J1410 die schwächste Färbung zeigte (siehe Abbildung 21A - C).

Die Rolle des Proteins E6 im HPV-Zyklus und in der Entstehung verschiedener Tumore ist bereits gut untersucht worden (Stiasny et al. 2016; Zur Hausen 2000). Die Entstehung von M. Osler als autosomal dominante Erbkrankheit ist auf Gendefekte im TGF (Transforming Growth Factor)-beta Signalweg zurückzuführen (Bertolino et al. 2005). Das Gewebe der M. Osler-Proben wurde als Kontrollgewebe Vaskulärer Anomalien eingesetzt, da aufgrund der oben beschriebenen autosomalen Vererbung keine Virusassoziation anzunehmen ist. Bei Patienten und Patientinnen mit HHT treten jedoch verschiedene vaskuläre Malformationen wie Teleangiektasien und arteriovenöse Malformationen auf. Die positive Färbung der Endothelzellen ist in Zusammenschau der vorherigen Untersuchungsergebnisse ein weiterer Hinweis auf eine unspezifische Reaktion des Antikörpers. Diese unspezifische Reaktion wäre z.B. gegen in Nerven vorkommende β -Galaktosidase möglich, da der Antikörper als Antigen ein β -Galaktosidase-E6-Fusionsprotein hat und in Nerven β -Galaktosidase bereits nachgewiesen werden konnte (Clevenger et al. 2008).

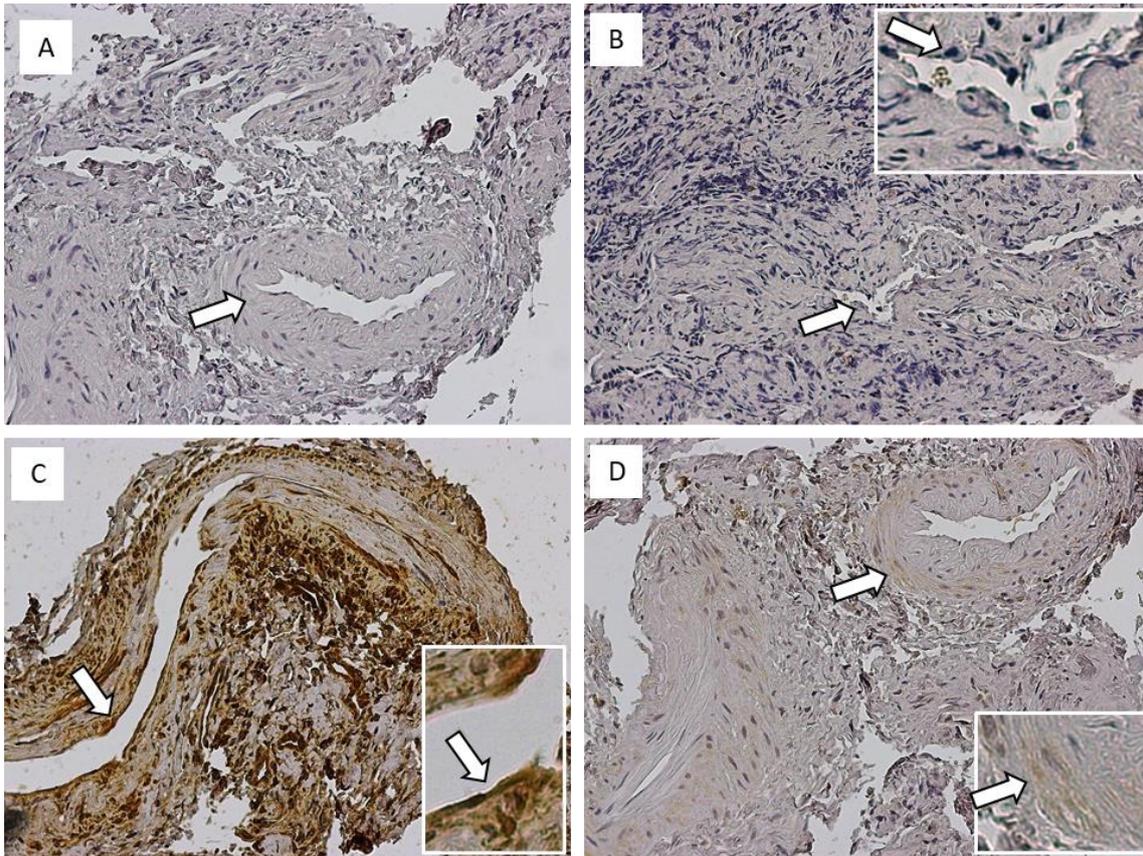


Abbildung 22. Färbung M. Osler auf HPV16 E1/E4, HPV16 E7, HPV16 L1 und Anti-Human-Papillomavirus-Antikörper. Beispielhaft dargestellt am Präparat HHT-1 (Tabelle 4). **(A)** Färbung mit einem Antikörper gegen HPV16 E1/E4. Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt eine negative Färbung auf. **(B)** Färbung mit einem Antikörper gegen HPV16 E7 (ED17). Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt hier ebenfalls keine Reaktion, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten oberen Bildrand. **(C)** Färbung mit einem Antikörper gegen HPV16 L1. Hier ist eine deutliche positive Reaktion der Endothelzellen der Gefäße (weißer Pfeil) zu erkennen, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten unteren Bildrand. **(D)** Färbung mit dem Anti-Human Papillomavirus- Antikörper der Firma Dako (Klon K1H8). Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt eine nur teilweise leichte Anreicherung, welche als unspezifisch gewertet wird, auf, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten unteren Bildrand.

Die Färbung mit dem Antikörper HPV16 L1 zeigte eine stark positive Reaktion in allen drei Präparaten. Sowohl Gefäßendothel, Drüsengewebe als auch Nerven zeigten eine positive Reaktion (siehe Abbildung 22C). Auch in den Nerven zeigten sich erneut die Axone positiv. Aufgrund der bekannten Pathogenese von HHT und der bereits bekannten unspezifischen Reaktion des Antikörperklons *CAMVIR-1* sind die Ergebnisse dieser Färbung im Rahmen der unspezifischen Reaktion des Antikörpers zu deuten (Shafti-Keramat et al. 2003). Dies erklärt die beobachteten Reaktionen in Geweben, welche in den vorherigen Untersuchungen keine Reaktion zeigten.

Bei der Färbung mit dem Antikörper gegen HPV16 E1/E4 und bei der Färbung mit dem Antikörper gegen HPV16 E7 zeigte sich bei keinem der drei Präparate eine positive Reaktion (siehe Abbildung 22A, B). Die Proteine E6 und E7 sind die einzigen Proteine des HP-Virus, die in Krebszellen dauerhaft exprimiert werden und für die Zellteilung verantwortlich sind (McLaughlin-Drubin and Münger 2009). Durch das Fehlen einer positiven Reaktion gegen E7 ist das Vorliegen einer aktiven HPV-Infektion eher unwahrscheinlich. Das Fehlen positiver Reaktionen auf E4 macht eine Infektion in einer frühen Phase unwahrscheinlich.

Die Färbung mit dem Anti-Human-Papillomavirus-Antikörper von Dako zeigte ebenfalls keine positive Reaktion des Endothels oder der Nerven (siehe Abbildung 22D). Der Antikörper von Dako ist für histopathologische Untersuchungen zugelassen und durch Studien belegt worden (Pávai et al. 2006). Eine fehlende positive Reaktion auf diesen Antikörper in den Gewebeproben der HHT ist ein weiterer Hinweis darauf, dass keine HPV-Assoziation vorliegt.

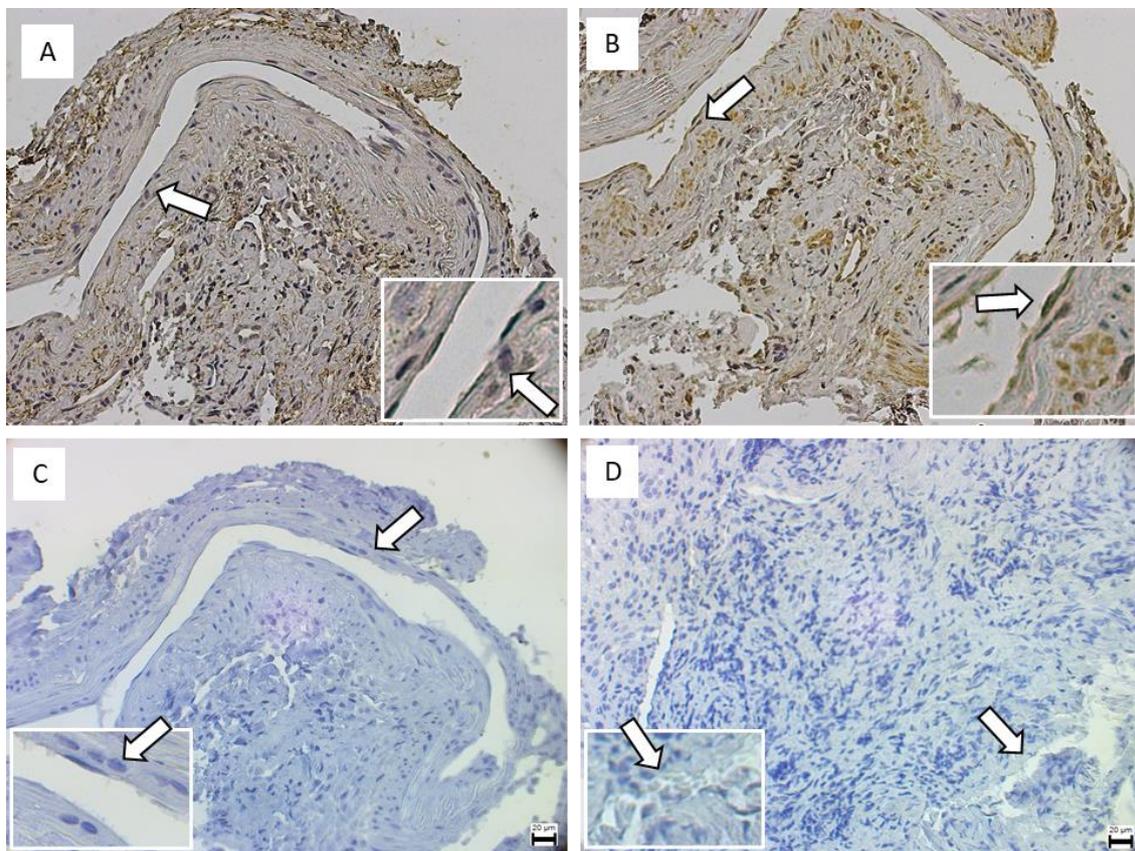


Abbildung 23. Färbung M. Osler auf HPV18 E7 und CINtec® Histology. Beispielhaft dargestellt am Präparat HHT-1 (Tabelle 4). (A) Färbung mit einem Antikörper gegen HPV18 E7

(N-19). Es sind unspezifische positive Reaktionen im Gewebe zu erkennen. Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt sich ohne positive Reaktion, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten unteren Bildrand. **(B)** Färbung mit *normal goat IgG*. Auch hier sind unspezifische Reaktionen im Gewebe zu erkennen, die Endothelzellen der Gefäße (weißer Pfeil) weisen nur selten eine braune Färbung auf, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten unteren Bildrand. **(C)** Färbung mit CINtec® Histology auf p16^{INK4a}. Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt keine positive Reaktion, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am linken unteren Bildrand. **(D)** Färbung mit CINtec® Histology, negative control. Das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) zeigt keine positive Reaktion, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am linken unteren Bildrand.

Die Färbung mit dem Antikörper HPV18 E7 zeigte bei allen drei Präparaten vereinzelte positive Reaktion an den Endothelzellen der Gefäße sowie an den Nerven. Da sich in der negativen Kontrolle mit *normal goat IgG* jedoch eine vergleichbare positive Reaktion an den gleichen Geweben zeigte, muss das Ergebnis als unspezifische Hintergrundreaktion des Antikörpers HPV18 E7 gedeutet werden (siehe Abbildung 23A, B). Auch hierbei ist erneut kritisch anzumerken, dass laut Datenblatt des Herstellers der Antikörper nicht spezifisch für Immunhistochemie ausgewiesen ist. Dies könnte die unspezifische Reaktion in der Färbung mit dem Primärantikörper als auch in der Negativkontrolle erklären.

Die Färbung mit dem CINtec® Histology Kit zeigte bei keiner der drei Proben einen Hinweis auf überexprimiertes p16^{INK4a} (Abbildung 23C, D). Zur Erkennung von überexprimiertem p16^{INK4a} findet das CINtec® Histology Kit in histopathologischen Untersuchungen Einsatz und liefert Hinweis auf mögliche Präkanzerosen oder Tumore (Bergeron et al. 2010; Ordi et al. 2009). Der fehlende Nachweis eines überexprimierten p16^{INK4a} deutet auf einen normalen Zellzyklus hin. Das Vorliegen einer aktiven HPV- Infektion scheint damit unwahrscheinlich.

Insgesamt deuten die Untersuchungen bei HHT gegen das Vorliegen einer Infektion mit HPV hin. Die positive Reaktion des Endothels auf HPV16 E6/18 E6 sowie die ubiquitäre positive Reaktion auf HPV L1 in allen drei Präparaten sind in der Zusammenschau als unspezifische Kreuzreaktionen zu bewerten. Kritisch anzumerken ist jedoch, dass mit der immunhistochemischen Untersuchung keine DNA von HP-Viren bestimmt werden kann und somit eine bereits stattgehabte Infektion mit den vorliegenden Ergebnissen nicht ausgeschlossen werden kann, jedoch aufgrund der bekannten Pathogenese äußerst unwahrscheinlich ist. Wie

bereits erwähnt wurden durch unserer Arbeitsgruppe in weiteren Virom-Analysen fortführende Untersuchungen zum Nachweis von Virus-Nukleinsäuren durchgeführt (Franke et al. 2018), wobei kein Hinweis auf eine aktiven viralen Zusammenhang gefunden wurde.

4.2 CINtec Plus®

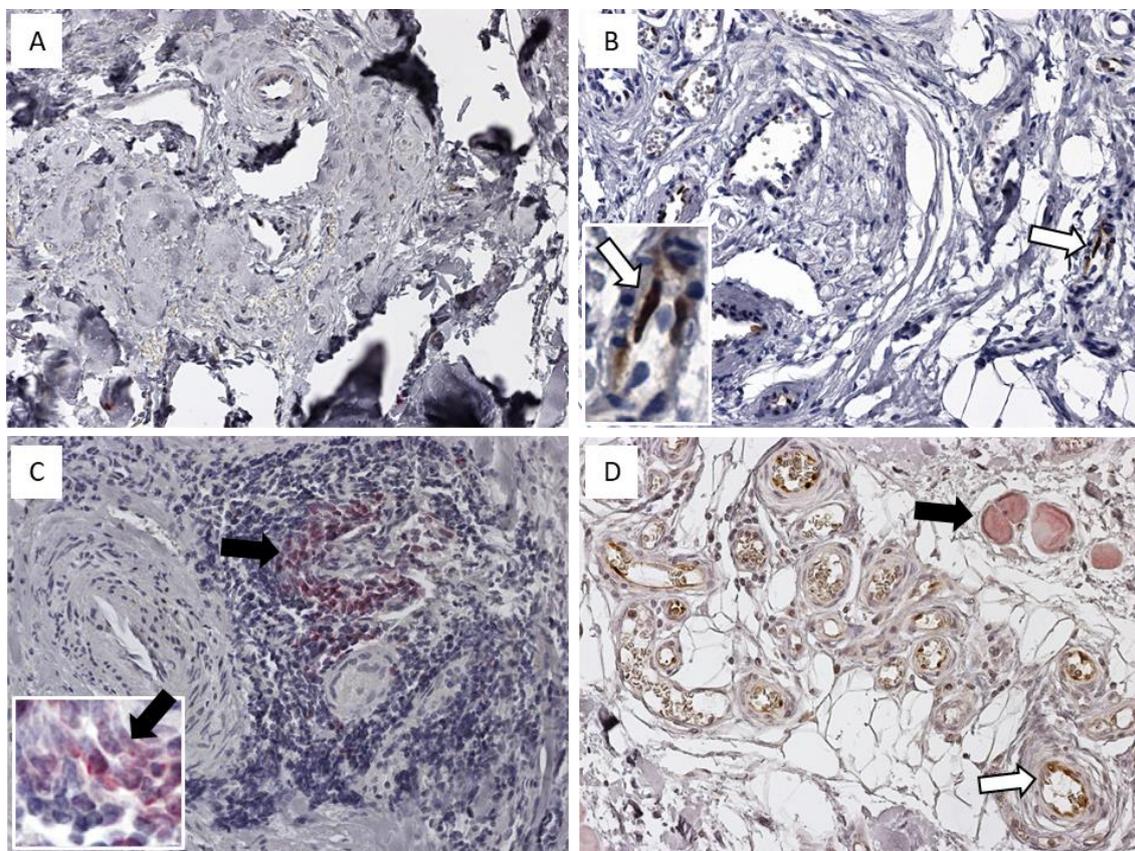


Abbildung 24. Färbung mit CINtec Plus® I. Dargestellt ist die Färbung mit den CINtec Plus®-Cytology Kit in den unterschiedlichen Präparaten. Eine positive Reaktion auf p16^{INK4a} zeigt sich bräunlich (weißer Pfeil), die positive Färbung auf Ki67 zeigt sich als rötliche Färbung in Muskelzellen, welche als unspezifisch gewertet werden muss, und Lymphozyten (schwarzer Pfeil). **(A)** Präparat VeM-2; **(B)** Präparat HA-3, eine Vergrößerung des relevanten Ausschnittes befindet sich am linken unteren Bildrand; **(C)** Präparat AVM-1, eine Vergrößerung des relevanten Ausschnittes befindet sich am linken unteren Bildrand; **(D)** Präparat AVM-2.

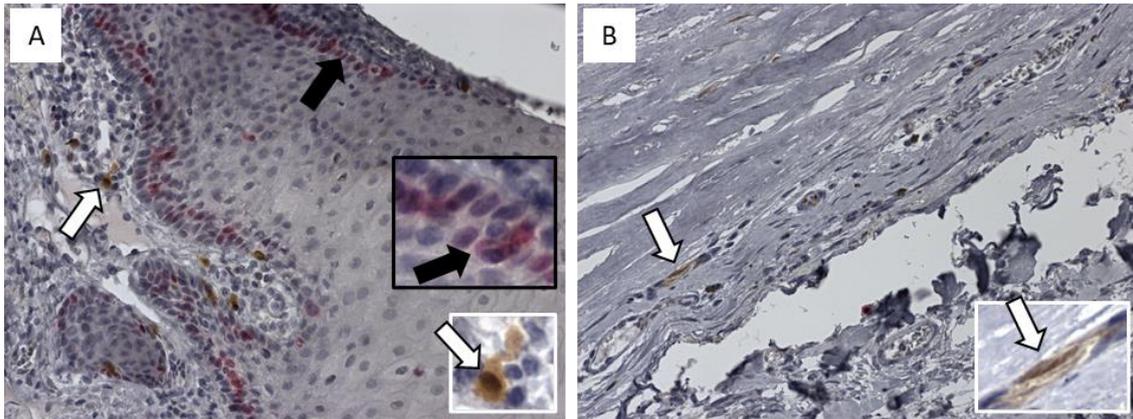


Abbildung 25. Färbung mit CINtec Plus® II. Dargestellt ist die Färbung mit den CINtec Plus®-Cytology Kit in den unterschiedlichen Präparaten. Eine positive Reaktion auf p16^{INK4a} zeigt sich bräunlich (weißer Pfeil), die positive Färbung auf Ki67 zeigt sich als rötliche Färbung im Zellkern (schwarzer Pfeil). **(A)** Präparat LM-3, eine Vergrößerung des relevanten Ausschnittes befindet sich am rechten Bildrand; **(B)** Präparat VeM-3, eine Vergrößerung des relevanten Ausschnittes befindet sich am rechten unteren Bildrand.

Die Untersuchung mit CINtec Plus® wurde mit den Präparaten VeM-2, HA-3, AVM-1, AVM-2, LM-3 und VeM-3 durchgeführt. Die CINtec Plus® Färbung erfolgte aufgrund der positiven Färbung auf p16^{INK4a} in Endothelzellen im Präparat AVM-2 sowie den in der gleichen Untersuchung gefärbten Präparaten, auch wenn diese keine positive Reaktion auf p16^{INK4a} zeigten. Die Färbung mit dem CINtec Plus Kit® zeigte in allen Proben Bereiche, die eine positive Reaktion auf Ki67 zeigten. Dies waren vor allem Muskelzellen, welche als unspezifische Hintergrundreaktion gewertet werden muss, und Hautepithelien. Zudem zeigte sich in AVM-2 und LM-3 p16^{INK4a}-positive Zellen der Haut. Weiter war eine positive Reaktion des Gefäßendothels in AVM-2 und vereinzelt in HA-3 und VeM-3 zu erkennen. In keinem Präparat lag eine gemeinsame positive Expression von p16^{INK4a} und Ki67 in einer einzelnen Zelle vor (Abbildung 24, 25).

Ki67 ist ein weit etablierter Proliferationsmarker, der vor allem in der Mitosephase vermehrt vorliegt (Sun and Kaufman 2018). Ein Vorliegen von p16^{INK4a} und Ki67 in der gleichen Zelle spricht daher für eine hohe Mitoserate trotz vorhandenem Suppressor-Protein und damit für eine Aushebelung des p16^{INK4a}-Mechanismus, wie es in HPV infizierten Zellen auftritt. Die Verwendung der Doppelfärbung mit Ki67 und p16^{INK4a} ist ein etabliertes Screeningverfahren in der Krebsfrüherkennung bei Cervixkarzinomen (Petry et al. 2011). Dass in keinem der untersuchten Präparate eine solche Co-Expression zu erkennen ist, lässt darauf schließen, dass trotz vorhandenem p16^{INK4a} keine gesteigerte Zellteilung

vorliegt und somit keine akute Infektion mit HPV besteht. Die Tatsache, dass sich in den Präparaten unterschiedliche Zellen mit Ki67 und p16^{INK4a} anfärben ließen, bestätigt zudem die technisch erfolgreiche Durchführung der Färbung.

4.3 Oropharynxkarzinome

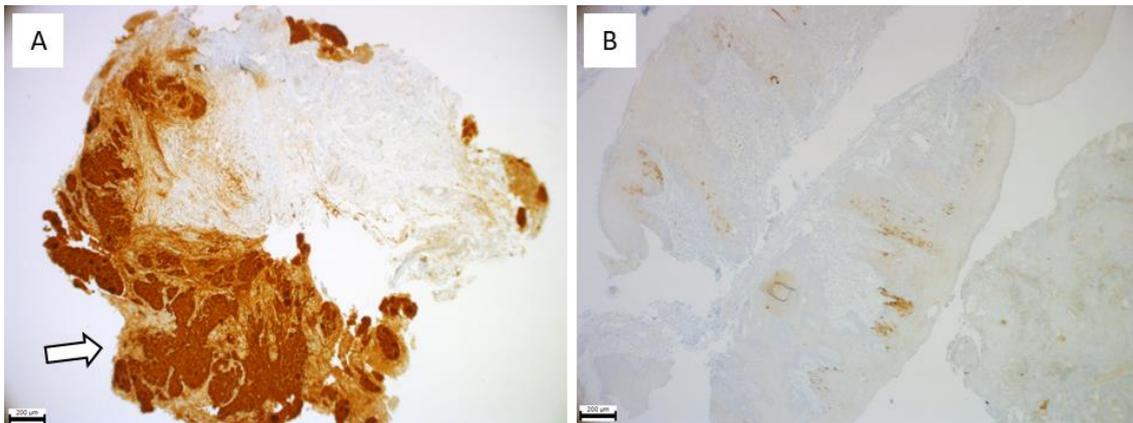


Abbildung 26. Übersicht p16^{INK4a}- Färbung Tumore. Dargestellt ist die im Institut für Pathologie des UKGM angefertigte Färbung auf p16^{INK4a} beispielhaft an einem p16^{INK4a}- positiven und einem p16^{INK4a}- negativen Präparat. **(A)** Präparat K11. **(B)** Präparat K14.

Als Kontrolle erfolgte die Färbung mit denselben Antikörpern bei Proben aus Oropharynxkarzinomen, welche bereits im Pathologischen Institut des Universitätsklinikums Marburg auf p16^{INK4a} gefärbt wurden. Insgesamt wurden 20 Kontrollproben aus Tumoren verwendet. Sieben der 20 Präparate wurden als p16^{INK4a} negativ klassifiziert, 13 als p16^{INK4a} positiv (Tabelle 5, Abbildung 26).

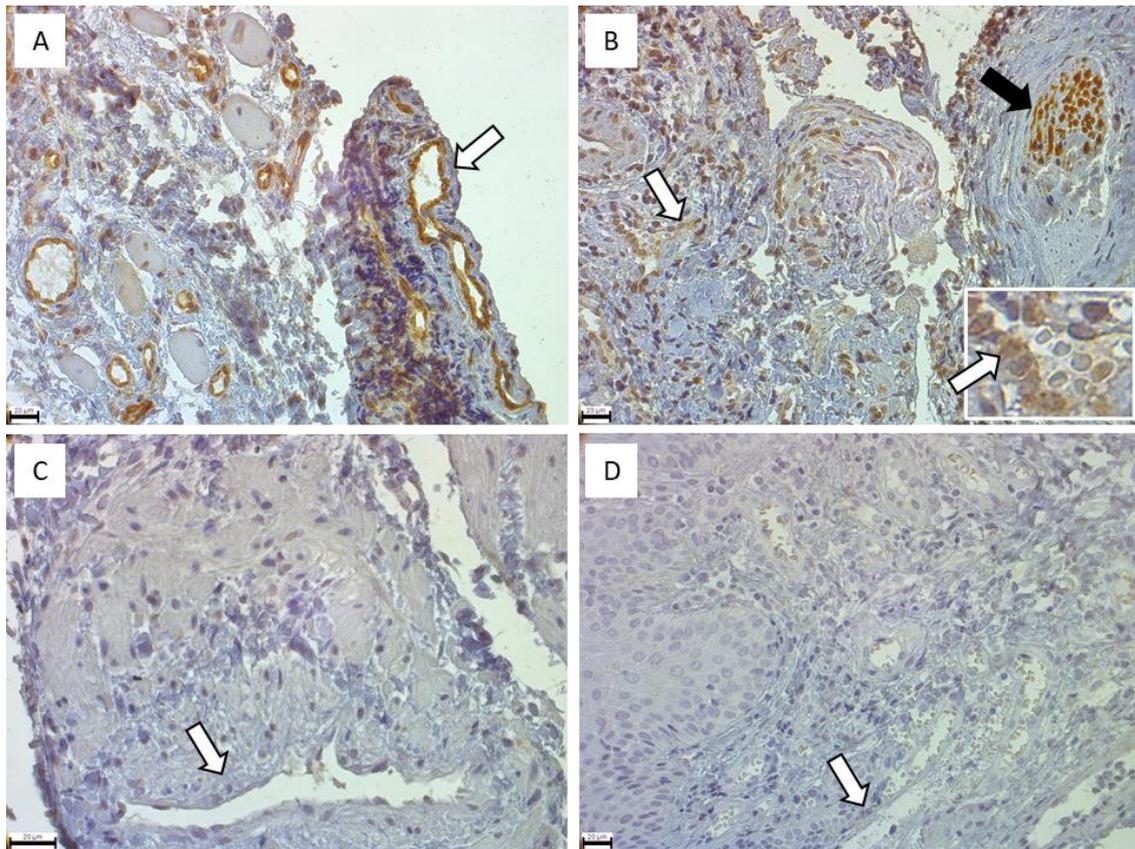


Abbildung 27. Färbung Tumore mit HPV16 E6/18 E6. Dargestellt ist die Färbung mit HPV16 E6/18 E6 sowie die Negativkontrolle an je einem p16^{INK4a}-positiven und einem p16^{INK4a}-negativen Präparat. **(A)** Präparat K11, Färbung mit HPV16 E6/18 E6. Es zeigt sich das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) positiv gefärbt. **(B)** Präparat K14, Färbung mit HPV16 E6/18 E6. Es zeigt sich das Endothel der Gefäße (weißer Pfeil) positiv gefärbt, eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten unteren Bildrand. Zudem zeigt sich ein Nerv (schwarzer Pfeil) ebenfalls mit einer positiven Reaktion. **(C)** Präparat K11, Färbung mit *negative Control mouse IgG*. Es zeigt sich das Endothel (weißer Pfeil) ohne eine positive Reaktion. **(D)** Präparat K14, Färbung mit *negative Control mouse IgG*. Es zeigt sich das Endothel (weißer Pfeil) ohne eine positive Reaktion.

Die Färbung mit dem Antikörper gegen HPV16 E6/18 E6 wurde nur mit einem der drei bisher verwendeten Chargen desselben Antikörpers durchgeführt. Bei den p16^{INK4a}-positiven Tumorproben zeigte sich bei allen eine positive Reaktion des Endothels der Gefäße auf den Antikörper gegen HPV16 E6/18 E6 (Abbildung 27A). Die Intensität und prozentuale Anzahl der gefärbten Gefäße unterscheiden sich von Probe zu Probe. Im Präparat K4 waren nur sehr wenige Gefäße positiv nach Anfärbung mit dem Antikörper. Die positiven Endothelzellen lagen alle in der unmittelbaren Nähe zu dem p16^{INK4a}-positiven Tumorbereich oder darin. Eine positive Reaktion an Nerven war nur im Präparat K7 zu beobachten. Hier waren vor allem die Axone positiv angefärbt. Bei den Präparaten K4, K7, K8 und K13 zeigte sich nur eine schwache positive Reaktion der Tumorzellen. In den restlichen Präparaten war eine hohe Intensität der positiven Reaktionen an den

Tumorzellen zu erkennen. In den p16^{INK4a}-negativen Proben war in allen Präparaten eine positive Reaktion des verwendeten Antikörpers an Gefäßendothelzellen zu erkennen (Abbildung 27B). Zudem war in den Tumoren K14, K17 und K20 eine positive Färbung der peripheren Nerven mit dem Antikörper zu beobachten. Hier präsentierten sich vor allem die Axone mit einer Reaktion auf den Antikörper, die Schwannzellen zeigten keine Reaktion. Die Präparate K14, K18, K19 und K20 zeigten eine starke positive Reaktion im Bereich des Tumors (Abbildung 27).

Die positive Reaktion der Endothelzellen in unmittelbarer Tumornähe unterstützt die Hypothese, dass Infektionen mit HPV in Endothelzellen möglich sind. Wenn solche Infektionen vorliegen, unterstützt dies unsere aufgestellte Hypothese, dass HPV mit der Entstehung vaskulärer Anomalien assoziiert sein könnte. Das Vorkommen von HPV E6 in Oropharynxtumoren ist bekannt (Biron et al. 2016; Brown et al. 2017). Die teilweise schwachen Reaktionen auf p16^{INK4a}-positive Oropharynxkarzinome lassen sich auch dadurch erklären, dass nicht zwangsläufig jeder p16^{INK4a}-positive Tumor mit HP-Viren assoziiert ist. Deswegen wird heutzutage bei p16^{INK4a}-positiven Tumorproben eine Typisierung des HPV empfohlen (Randén-Brady et al. 2019; Rietbergen et al. 2014). Die positive Reaktion auf HPV16 E6/18 E6 in den Nerven wurde bisher nur von Füle et al. beschrieben (Füle et al. 2006). Weitere Beschreibungen einer positiven Reaktion der Nerven auf HPV E6 findet sich aktuell in der Literatur nicht. Vor allem bei den Nerven muss jedoch eine unspezifische Kreuzreaktion auf β -Galaktosidase diskutiert werden, da der Antikörper HPV16 E6/18 E6 als Antigen-Zielstruktur ein β -Galaktosidase-E6-Fusionsprotein besitzt, welches auch in Nerven vorkommt (Clevenger et al. 2008; Mera-Rodríguez et al. 2019).

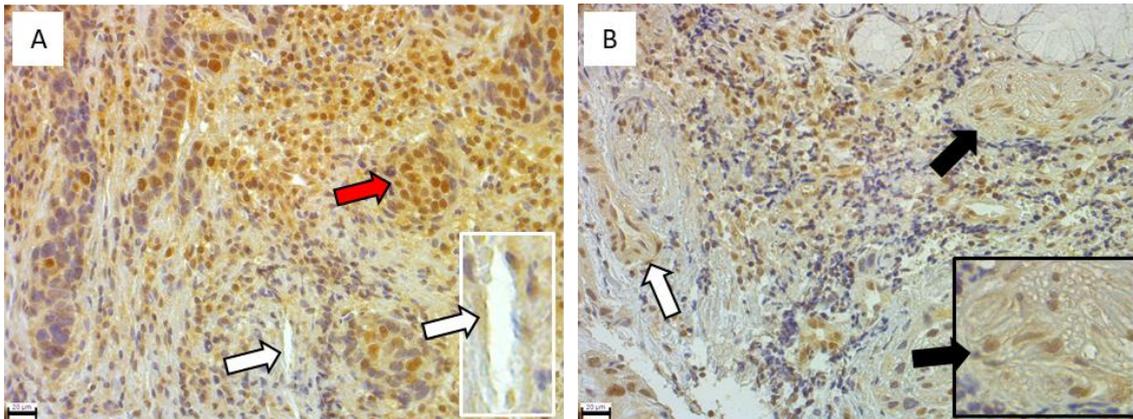


Abbildung 28. Färbung Tumore mit HPV16 E7. Dargestellt ist die Färbung mit HPV16 E7 an je einem p16^{INK4a}-positiven und einem p16^{INK4a}-negativen Präparat. **(A)** Präparat K11. Zu erkennen ist eine positive Reaktion der Tumorzellen (roter Pfeil) sowie eine schwach positive Reaktion in den Endothelzellen (weißer Pfeil), eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten unteren Bildrand. **(B)** Präparat K14. Es zeigt sich eine positive Reaktion der Endothelzellen (weißer Pfeil) sowie eines peripheren Nervens (schwarzer Pfeil), eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten unteren Bildrand.

Die Färbung mit HPV16 E7 zeigte bei allen p16^{INK4a}-positiven Tumorproben eine positive Reaktion. In den Präparaten K6, K7 und K8 zeigte die immunhistochemische Färbung nur eine schwach positive Reaktion. Meist war das Zytoplasma, seltener die Zellkerne im Bereich der Tumore positiv gefärbt. In diesen drei Präparaten war in den Endothelzellen der Gefäße keine positive Reaktion erkennbar. In den restlichen Präparaten zeigte sich hingegen eine starke positive Reaktion in den Tumoren und vor allem in den Zellkernen sowie in den Endothelien der Gefäße. Bei den p16^{INK4a}-negativen Tumoren zeigten die Präparate K14 und K15 eine ebenfalls stark positive Reaktion des Tumors. Zudem waren auch bei den Tumorgefäßen eine positive immunhistochemische Färbung zu erfassen. Im Präparat K14 präsentierten sich die Axone von peripheren Nerven mit einer positiven Reaktion auf den Antikörper HPV16 E7 (Abbildung 28B). In den Proben K16, K17, K18 und K20 war nur eine schwach positive Reaktion zu bemerken. Hier zeigten sich nur kleinere Areale des Tumors mit einer schwach positiven Reaktion, auch die Endothelzellen waren hier nur selten positiv angefärbt. Im Präparat K19 zeigte sich keine positive Reaktion, weder im Tumor noch an Endothelzellen oder anderen Geweben.

Das Protein HPV E7 ist eines der beiden major-Onkoproteine des HP-Virus und ist für die unkontrollierte Zellteilung und damit verbundene onkogene Transformation verantwortlich (McLaughlin-Drubin and Münger 2009). Unsere

Ergebnisse entsprechen vor allem bei den p16^{INK4a}-positiven Tumoren einer typischen immunhistochemischen Färbung bei HPV-Infektion (Valdovinos-Torres et al. 2008). Bei den p16^{INK4a}-negativen Tumoren hingegen sprechen die Ergebnisse auch für eine mögliche HPV-Infektion, die jedoch keine p16^{INK4a}-Überexpression verursachte, oder für eine mögliche unspezifische Reaktion des Antikörpers im Bereich des Tumors mit anderen Proteinen. Im Präparat K19 ist eine Infektion mit HPV aufgrund der negativen Färbung hingegen unwahrscheinlich.

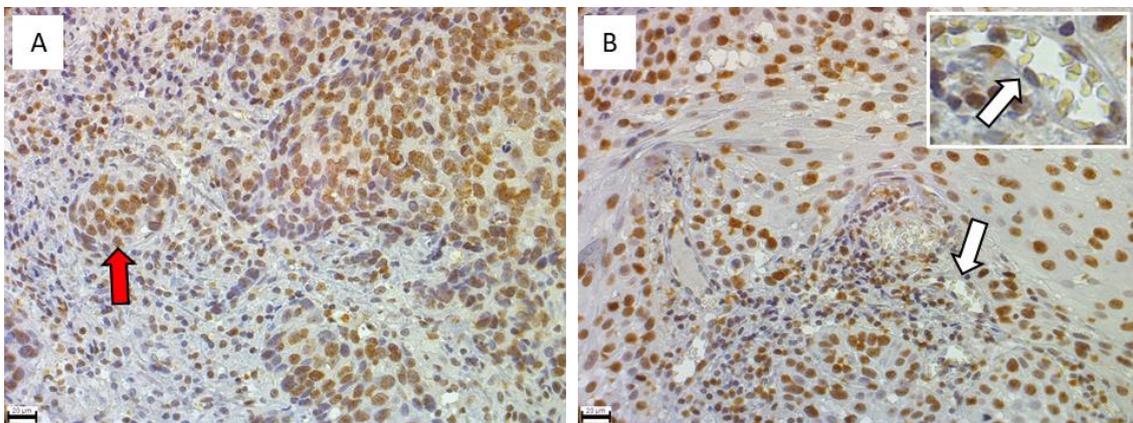


Abbildung 29. Färbung Tumore mit HPV16 E1/E4. Dargestellt ist die Färbung mit HPV16 E1/E4 an je einem p16^{INK4a}-positiven und einem p16^{INK4a}-negativen Präparat. **(A)** Präparat K11. Zu erkennen ist eine positive Reaktion der Tumorzellen im Zellkern (roter Pfeil). **(B)** Präparat K14. Zu erkennen ist eine positive Färbung der Tumorzellen. Endothelzellen zeigen hingegen keine positive Reaktion (weißer Pfeil), eine Vergrößerung des Ausschnittes ist am rechten oberen Bildrand dargestellt.

In der immunhistochemischen Färbung mit HPV16 E1/E4 zeigte sich bei den p16^{INK4a}-positiven Tumorproben in allen Präparaten eine positive Reaktion. In den Präparaten K4, K5, K6 und K7 zeigte sich eine überwiegende positive Reaktion von Lymphozyten im Tumorgebiet. Teilweise zeigten sich auch vereinzelte positive Reaktionen im Zellkern der Hautepithelien oder Tumorzellen. In den restlichen p16^{INK4a}-positiven Tumorproben war eine Anfärbung des Zellkerns in den Tumorzellen mit dem Antikörper zu erkennen. Die Endothelzellen und peripheren Nerven weisen hingegen in keiner Probe eine positive Reaktion auf (Abbildung 29A). In den p16^{INK4a}-negativen Tumorpräparaten zeigten K14, K15, K16 und K17 eine positive Reaktion des Antikörpers in Tumorzellen. Hier war vor allem der Zellkern positiv gefärbt (siehe

Abbildung 29B). Im Präparat K18 zeigte sich lediglich eine positive Reaktion der Epithelzellen der Haut. Positive Reaktionen von Tumor- oder Endothelzellen waren nicht ersichtlich. Eine überwiegende positive Immunhistochemie der Lymphozyten zeigte sich im Präparat K20. Hier war das Resultat vergleichbar mit den Proben K4, K5, K6 und K7. Im Tumorpräparat K19 war keine positive Färbung der Tumorzellen oder des Endothels zu erkennen.

Die Ergebnisse deuten vor allem bei K14, K15, K16 und K17 auf eine HPV-Assoziation hin. Die Rolle von E4 ist unter anderem der Einbau der Virus-DNA in die Wirtszelle. Ein positiver Nachweis im Zellkern der Tumore spricht somit für eine aktive Infektion mit vorhandener Virus-DNA (Chow et al. 2009). Die positive Reaktion der Lymphozyten könnte durch bereits abgebaute Virusproteine zu erklären sein, da der Antikörper nur eine kurze Sequenz des Proteins erkennt und es dadurch zur Anfärbung von zerstörten Teilen des Proteins kommt. Die positive Reaktion der p16^{INK4a}-negativen Tumorproben könnte auf eine HPV-Assoziation deuten, die zu keiner p16^{INK4a}-Überexpression geführt hat oder mittels p16^{INK4a}-Färbung nicht erkannt wurde. So wurde in HPV-positiven Oropharynxkarzinomen bei 86,7% eine positive p16^{INK4a}-Reaktion beschrieben (Ndiaye et al. 2014).

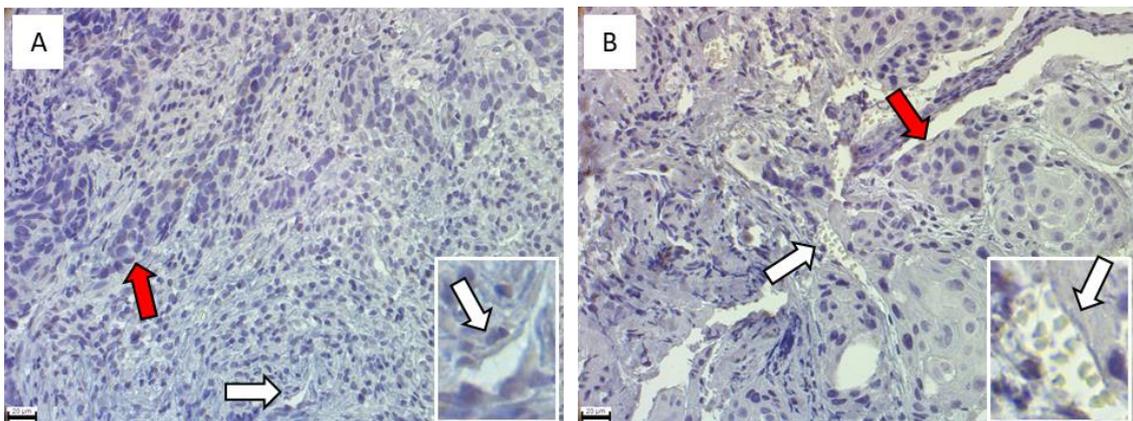


Abbildung 30. Färbung Tumore mit HPV18 E7. Dargestellt ist die Färbung mit HPV18 E7 an einem p16^{INK4a}-positiven und einem p16^{INK4a}-negativen Präparat. **(A)** Präparat K11. Zu erkennen ist weder eine positive Reaktion der Tumorzellen (roter Pfeil) noch der Endothelzellen (weißer Pfeil), eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten unteren Bildrand. **(B)** Präparat K14. Zu erkennen ist weder eine positive Reaktion der Tumorzellen (roter Pfeil) noch der Endothelzellen (weißer Pfeil), eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten unteren Bildrand.

Die Immunhistochemie mit dem Antikörper HPV18 E7 zeigte weder in den p16^{INK4a}-positiven noch in den p16^{INK4a}-negativen Tumorpräparaten eine positive Reaktion. Weder Tumorzellen noch Endothel oder Epithel der Haut wurden angefärbt (Abbildung 30). Bei den p16^{INK4a}-negativen Tumoren scheint eine mögliche Erklärung zu sein, dass es keine HPV-Assoziation mit HPV18 in den Tumoren gibt. Bei den p16^{INK4a}-positiven Tumoren könnte ebenfalls eine Assoziation mit einem anderen HPV-Genotyp vorliegen. Eine weitere mögliche Ursache könnte sein, dass laut Herstellerangaben der Antikörper HPV18 E7 nicht spezifisch für die Immunhistochemie ausgewiesen ist. Dies könnte eine fehlende positive Reaktion erklären.

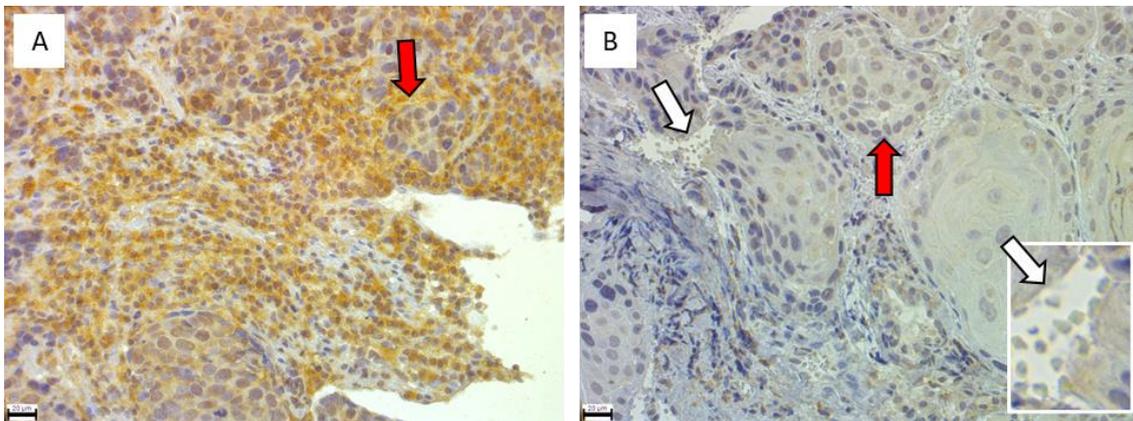


Abbildung 31. Färbung Tumore mit dem Anti-Human-Papillomavirus-Antikörper der Firma Dako (Klon K1H8). Dargestellt ist die Färbung mit dem Anti-Human-Papillomavirus-Antikörper der Firma Dako (Klon K1H8) an je einem p16^{INK4a}-positiven und einem p16^{INK4a}-negativen Präparat. **(A)** Präparat K11. Zu erkennen ist eine positive Reaktion der Tumorzellen (roter Pfeil). **(B)** Präparat K14. Es zeigt sich weder eine positive Reaktion der Endothelzellen (weißer Pfeil), eine Vergrößerung des Ausschnittes befindet sich am rechten unteren Bildrand, noch der Tumorzellen (roter Pfeil).

Auch die immunhistochemische Färbung mit Anti-Human-Papillomavirus-Antikörper von Dako zeigte nur im Präparat K11 eine positive Reaktion im Bereich des Tumors. Hier zeigte vor allem das Zytoplasma eine positive Anfärbung. Die Zellkerne präsentierten keine positive Reaktion. Auch die Endothelzellen waren ohne Nachweis von HPV (siehe Abbildung 31A). In allen anderen 19 Tumorpräparaten zeigte sich weder eine Anreicherung des Antikörpers in den Tumorzellen noch im Endothel der Gefäße. Es war lediglich eine leichte unspezifische Reaktion von Bindegewebsresten in den Proben zu erkennen. Der Antikörper von Dako ist ein gut etablierter Antikörper für

pathologische Untersuchungen und konnte seinen Nutzen in vielen Publikationen beweisen (Pávai et al. 2006; Iwasaki et al. 1992). Die fehlende Reaktion in fast allen Proben wirft die Frage auf, ob bei den Tumoren eine p16^{INK4a}-Positivität ohne Assoziation von HPV vorliegt und damit die bisherigen positiven Reaktionen der Antikörper als unspezifische Reaktionen angenommen werden müssen. Eine fehlerhaft durchgeführte immunhistochemische Färbung scheint aufgrund des einen positiven Präparates und gleichzeitiger Färbung aller Präparate unwahrscheinlich.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse vor allem bei den p16^{INK4a}-positiven Tumoren auf eine durchgemachte Infektion mit HPV hin. Diese Untersuchungen dienen vor allem als Nachweis, dass die verwendeten Antikörper HPV-Antigene erkennen und somit die überwiegend negativen Ergebnisse der Untersuchungen an Vaskulären Malformationen unterstützt.

4.4 HPV16 L1

Die mit dem Antikörper HPV16 L1 durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen zeigten in allen verwendeten Präparaten eine auffällig positive Reaktion. Da sich die Reaktion nicht auf ein Gewebe beschränkte, sondern mehrere verschiedene Gewebsarten wie Muskelfasern, Epithel oder Endothel anfärbte, ist eine unspezifische Reaktion des Antikörpers auf ein ubiquitär vorkommendes Protein nicht unwahrscheinlich. Eine Literaturrecherche zeigte, dass solche unspezifischen Reaktionen bereits beschrieben wurden (Ludmerer et al. 1997; Shafti-Keramat et al. 2003). Zudem findet sich im Datenblatt des Antikörpers die Angabe zum molekularen Gewicht von HPV16 L1 mit 55 kDa. Im beigefügten Western Blot zeigt sich jedoch eine Bande deutlich unterhalb von 55 kDa, welche als L1-spezifisch ausgegeben wird. Dieser Widerspruch wurde dem Vertreiber des Antikörpers durch unsere Arbeitsgruppe kommuniziert, welcher daraufhin die Abbildung aus dem Datenblatt entfernte.

4.5 Virom-Sequenzierung

Zur weiteren Untersuchung auf das Vorhandensein von viralen Transkripten in Vaskulären Anomalien erfolgte nach unserer Studie die weitere Untersuchung mittels der hochsensitiven *virome capture platform VirCapSeq-VERT*, welche von Briese et al. im Jahr 2015 publiziert wurde (Briese et al. 2015). Die Ergebnisse dieser Untersuchung wurden bereits veröffentlicht (Franke et al. 2018). Obwohl in den letzten Jahren einige Kandidatengene für die Entstehung von vaskulären Anomalien gefunden wurden, ist die genaue Pathogenese noch nicht vollständig geklärt (Greene and Goss 2018). Der ausschlaggebende Faktor, der zur Fehlbildung der vaskulären Architektur und damit zur Entwicklung von VAs führt, ist noch unbekannt. Da viele der VA bereits bei Geburt ausgeprägt sind oder sich kurz nach Geburt manifestieren scheint es einen pathogenen Faktor zu geben, der die Ausbildung vaskulärer Strukturen während der Schwangerschaft stört. Die Rolle viraler Infektionen während der Schwangerschaft als auslösender Faktor wurde in den letzten Jahren immer wieder diskutiert, jedoch konnten aufgrund technischer Limitationen vergleichende Analysen nicht durchgeführt werden (Franke et al. 2018). Mit der durchgeführten hochsensitiven *VirCapSeq-VERT*- Methode konnten keine signifikanten viralen Transkripte gefunden werden, die auf eine Assoziation mit den getesteten vaskulären Anomalien hindeuten. Vor allem in Verbindung mit den immunhistochemischen Untersuchungen erscheint daher eine aktive HPV-Infektion unwahrscheinlich. Jedoch kann eine abgelaufene virale Infektion (HPV und andere Viren) während der Schwangerschaft, die zur Entstehung der VA führt, nicht ausgeschlossen werden. So sind einige virale Erreger bekannt, die zur Veränderung der vaskulären Strukturen führen können. Hierzu zählen z.B. Infektionen mit dem Herpesvirus 6, welche Gefäße des Feto-Plazenta-Systems betreffen (Vygivska et al. 2017) oder Infektionen mit dem CMV, welches die Gefäßbildung in der Plazenta stört oder nach Infektion von Endothelzellen zu Veränderungen der Gefäßmorphologie führt (Gustafsson et al. 2015).

Abschließend lässt sich sagen, dass in Zusammenschau aller erhobenen Daten keine Hinweise auf eine aktive virale Infektion in Vaskulären Anomalien gesehen werden. Eine virale Infektion während der Schwangerschaft, die zu

Gefäßveränderungen und Entstehung von Vaskulären Anomalien führt, lässt sich jedoch nicht ausschließen. Diese Hypothese zu untersuchen, wird Aufgabe weiterer Studien sein.

5 Zusammenfassung

Vaskuläre Anomalien (VA) manifestieren sich häufig im Kopf-Hals-Bereich und können zu lebensbedrohlichen Komplikationen führen. Obwohl in den letzten Jahren vereinzelt auslösende Genmutationen gefunden wurden, ist die genaue Entstehung der meisten vaskulären Anomalien noch nicht abschließend geklärt. In dieser Arbeit wurde die mögliche Rolle von humanen Papilloma-Viren (HPV) mittels immunhistochemischen Färbungen untersucht. Hierfür wurden insgesamt 27 VA-Proben untersucht und mikroskopisch beurteilt. Zur Kontrolle wurden dieselben immunhistochemischen Untersuchungen an 20 Oropharynx tumorproben durchgeführt.

Es zeigte sich in 7 VA-Präparaten eine positive Reaktion des Gefäßendothels auf den Antikörper HPV16 E6/18 E6. Weiter konnte in 11 VA-Präparaten eine positive Reaktion von Nerven auf den gleichen Antikörper beobachtet werden. Die Untersuchungen mit den Antikörpern HPV16 E7, HPV16 E1/E4 und HPV18 E7 zeigten keine positiven Reaktionen. Die Untersuchung mit dem Anti-Human-Papillomavirus-Antikörper von Dako zeigte nur in drei Proben schwach positive Reaktionen von den insgesamt 27 untersuchten Proben. Die Färbungen mit dem anti-HPV16 L1-Antikörper (*CAMVIR-1*) zeigte bei allen Proben eine positive Reaktion in Muskeln, Epithelien der Haut, Endothelzellen und Nerven. Es zeigte sich jedoch in nur einem Präparat eine positive p16^{INK4a}-Färbung der Gefäße, welche auch Ki67 negativ war, wodurch eine virale Ursache der p16^{INK4a}-Hochregulation unwahrscheinlich erscheint.

Die immunhistochemischen Färbungen ergaben zum großen Teil negative Ergebnisse. Nach ausführlicher Analyse sind die positiven Reaktionen des HPV16 L1 Antiköpers der Firma Santa Cruz Biotechnology, Inc. als unspezifische Reaktion zu werten. Ebenso deuten die Reaktionen des Antiköpers gegen HPV16 E6/18 E6 auf eine unspezifische Reaktion möglicherweise gegen β -Galaktosidase hin, da bei der Antikörperherstellung ein β -Galaktosidase-E6-Fusionsprotein eingesetzt wurde.

In der vorliegenden rein explorativen Studie fand sich kein Anhaltspunkt dafür, dass in vaskulären Anomalien eine aktive virale Infektion vorliegt. Eine transiente Infektion, z.B. während der Schwangerschaft, die zu einer Veränderung der

Gefäßbildung und zur Entstehung von vaskulären Anomalien führt, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Dies sollte in weiteren Studien untersucht werden.

6 Summary

Vascular anomalies (VA) often manifest in the head and neck area and can lead to life-threatening complications. Although a few causative gene mutations have been found in recent years, the exact origin of most vascular anomalies has not yet been conclusively clarified. In this thesis the possible role of human papilloma viruses (HPV) was examined by means of immunohistochemical staining. For this purpose, a total of 27 VA samples were examined and assessed microscopically. As a control, the same immunohistochemical examinations were carried out on 20 oropharyngeal tumour samples.

A positive reaction of the vascular endothelium to the antibody HPV16 E6 /18 E6 was detected in 7 VA samples. A positive reaction in neural structures to the same antibody was also observed in 11 VA samples. Investigations deploying the antibodies HPV16 E7, HPV16 E1 /E4 and HPV18 E7 did not show any positive reactions. The anti-human papillomavirus antibody test from Dako showed only three out of 27 weakly positive reactions. The staining with the anti-HPV16 L1 antibody (*CAMVIR-1*) showed a positive reaction in muscles, epithelia of the skin, endothelial cells and nerves in all samples. A positive p16^{INK4a} staining of the vessels was shown in only one sample, which, however, was negative for Ki67, so that a viral cause of the p16^{INK4a} upregulation appears unlikely.

The immunohistochemical staining gave mostly negative results. After a detailed analysis, the positive reactions of the HPV16 L1 antibody have to be regarded as non-specific reactions. The reactions of the antibody directed against HPV16 E6/18 E6 also indicate a non-specific reaction possibly against β -galactosidase, which was used during antibody production.

In the present, purely exploratory study, there was no evidence that active viral infections are present in vascular abnormalities. However, a transient infection during pregnancy, which leads to a change in the formation of blood vessels and the development of vascular anomalies, cannot be ruled out. This should be investigated in further studies.

7 Literaturverzeichnis

Ayturk UM, Couto JA, Hann S, Mulliken JB, Williams KL, Huang AY, Fishman SJ, Boyd TK, Kozakewich HPW, Bischoff J et al. (2016): Somatic Activating Mutations in GNAQ and GNA11 Are Associated with Congenital Hemangioma. *Am J Hum Genet* 98, 789–795

Badani H, White T, Schulick N, Raeburn CD, Topkaya I, Gilden D, Nagel MA (2016): Frequency of varicella zoster virus DNA in human adrenal glands. *J Neurovirol* 22, 400–402

Behravesch S, Yakes W, Gupta N, Naidu S, Chong BW, Khademhosseini A, Oklu R (2016): Venous malformations: clinical diagnosis and treatment. *Cardiovasc. Diagn. Ther.* 6, 557–569

Berenguer B, Mulliken JB, Enjolras O, Boon LM, Wassef M, Josset P, Burrows PE, Perez-Atayde AR, Kozakewich HPW (2003): Rapidly involuting congenital hemangioma: clinical and histopathologic features. *Pediatr Dev Pathol* 6, 495–510

Bergeron C, Ordi J, Schmidt D, Trunk MJ, Keller T, Ridder R (2010): Conjunctive p16INK4a testing significantly increases accuracy in diagnosing high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Clin Pathol* 133, 395–406

Bertolino P, Deckers M, Lebrin F, Dijke P ten (2005): Transforming growth factor-beta signal transduction in angiogenesis and vascular disorders. *Chest* 128, 585S-590S

Bichsel C, Bischoff J (2019): A somatic missense mutation in GNAQ causes capillary malformation. *Curr Opin Hematol* 26, 179–184

Biron VL, Kostiuik M, Isaac A, Puttagunta L, O'Connell DA, Harris J, Côté DWJ, Seikaly H (2016): Detection of human papillomavirus type 16 in oropharyngeal squamous cell carcinoma using droplet digital polymerase chain reaction. *Cancer* 122, 1544–1551

Bishop BN, Lynch DT: *StatPearls: Kaposi Sarcoma*, Treasure Island (FL) 2020

Boscolo E, Coma S, Luks VL, Greene AK, Klagsbrun M, Warman ML, Bischoff J (2015a): AKT hyper-phosphorylation associated with PI3K mutations in lymphatic

endothelial cells from a patient with lymphatic malformation. *Angiogenesis* 18, 151–162

Boscolo E, Limaye N, Huang L, Kang K-T, Soblet J, Uebelhoer M, Mendola A, Natynki M, Seront E, Dupont S et al. (2015b): Rapamycin improves TIE2-mutated venous malformation in murine model and human subjects. *J Clin Invest* 125, 3491–3504

Brianti P, Flammoneis E de, Mercuri SR (2017): Review of HPV-related diseases and cancers. *New Microbiol* 40, 80–85

Briese T, Kapoor A, Mishra N, Jain K, Kumar A, Jabado OJ, Lipkin WI (2015): Virome Capture Sequencing Enables Sensitive Viral Diagnosis and Comprehensive Virome Analysis. *MBio* 6, e01491-15

Brooks L, Yao QY, Rickinson AB, Young LS (1992): Epstein-Barr virus latent gene transcription in nasopharyngeal carcinoma cells: coexpression of EBNA1, LMP1, and LMP2 transcripts. *J Virol* 66, 2689–2697

Brouillard P, Vikkula M (2007): Genetic causes of vascular malformations. *Hum Mol Genet* 16 Spec No. 2, R140-9

Brown RE, Naqvi S, McGuire MF, Buryanek J, Karni RJ (2017): Morphoproteomics, E6/E7 in-situ hybridization, and biomedical analytics define the etiopathogenesis of HPV-associated oropharyngeal carcinoma and provide targeted therapeutic options. *J Otolaryngol Head Neck Surg* 46, 52

Castillo SD, Baselga E, Graupera M (2019): PIK3CA mutations in vascular malformations. *Curr Opin Hematol* 26, 170–178

Cestaro G, Rosa M de, Gentile M, Massa S (2015): A case of HPV and acquired genital lymphangioma: over-lapping clinical features. *Ann Ital Chir* 86

Chiller KG, Passaro D, Frieden IJ (2002): Hemangiomas of infancy: clinical characteristics, morphologic subtypes, and their relationship to race, ethnicity, and sex. *Arch Dermatol* 138, 1567–1576

Chow LT, Duffy AA, Wang H-K, Broker TR (2009): A highly efficient system to produce infectious human papillomavirus: Elucidation of natural virus-host interactions. *Cell Cycle* 8, 1319–1323

- Clevenger AC, Salcedo E, Jones KR, Restrepo D (2008): BDNF promoter-mediated beta-galactosidase expression in the olfactory epithelium and bulb. *Chem Senses* 33, 531–539
- Colletti G, Ierardi AM (2017): Understanding venous malformations of the head and neck: a comprehensive insight. *Med Oncol* 34, 327
- Cottin V, Plauchu H, Bayle J-Y, Barthelet M, Revel D, Cordier J-F (2004): Pulmonary arteriovenous malformations in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Respir Crit Care Med* 169, 994–1000
- Croteau SE, Liang MG, Kozakewich HP, Alomari AI, Fishman SJ, Mulliken JB, Trenor CC (2013): Kaposiform hemangioendothelioma: atypical features and risks of Kasabach-Merritt phenomenon in 107 referrals. *J Pediatr* 162, 142–147
- Dabska M (1969): Malignant endovascular papillary angioendothelioma of the skin in childhood. Clinicopathologic study of 6 cases. *Cancer* 24, 503–510
- Darragh TM, Colgan TJ, Cox JT, Heller DS, Henry MR, Luff RD, McCalmont T, Nayar R, Palefsky JM, Stoler MH et al. (2012): The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *J Low Genit Tract Dis* 16, 205–242
- Demers GW, Foster SA, Halbert CL, Galloway DA (1994): Growth arrest by induction of p53 in DNA damaged keratinocytes is bypassed by human papillomavirus 16 E7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4382–4386
- Derkay CS, Wiatrak B (2008): Recurrent respiratory papillomatosis: a review. *The Laryngoscope* 118, 1236–1247
- Domp Martin A, Vikkula M, Boon LM (2010): Venous malformation: update on aetiopathogenesis, diagnosis and management. *Phlebology* 25, 224–235
- Dreher AM, Arora N, Fowler KB, Novak Z, Britt WJ, Boppana SB, Ross SA (2014): Spectrum of disease and outcome in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr* 164, 855–859
- Drolet BA, Frommelt PC, Chamlin SL, Haggstrom A, Bauman NM, Chiu YE, Chun RH, Garzon MC, Holland KE, Liberman L et al. (2013a): Initiation and use of

propranolol for infantile hemangioma: report of a consensus conference. *Pediatrics* 131, 128–140

Drolet BA, Trenor CC, Brandão LR, Chiu YE, Chun RH, Dasgupta R, Garzon MC, Hammill AM, Johnson CM, Tloughan B et al. (2013b): Consensus-derived practice standards plan for complicated Kaposiform hemangioendothelioma. *J Pediatr* 163, 285–291

D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, Westra WH, Gillison ML (2007): Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 356, 1944–1956

Dunmire SK, Verghese PS, Balfour HH (2018): Primary Epstein-Barr virus infection. *J Clin Virol* 102, 84–92

Erickson D, Kudva YC, Ebersold MJ, Thompson GB, Grant CS, van Heerden JA, Young WF (2001): Benign paragangliomas: clinical presentation and treatment outcomes in 236 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 5210–5216

Esterly JR, Oppenheimer EH (1967): Vascular lesions in infants with congenital rubella. *Circulation* 36, 544–554

Faughnan ME, Mager JJ, Hetts SW, Palda VA, Lang-Robertson K, Buscarini E, Deslandres E, Kasthuri RS, Lausman A, Poetker D et al. (2020): Second International Guidelines for the Diagnosis and Management of Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Ann Intern Med* 173, 989–1001

Faurschou A, Olesen AB, Leonardi-Bee J, Haedersdal M (2011): Lasers or light sources for treating port-wine stains. *Cochrane Database Syst Rev*, CD007152

Florou V, Rosenberg AE, Wieder E, Komanduri KV, Kolonias D, Uduman M, Castle JC, Buell JS, Trent JC, Wilky BA (2019): Angiosarcoma patients treated with immune checkpoint inhibitors: a case series of seven patients from a single institution. *J Immunother Cancer* 7, 213

Franke N, Bette M, Marquardt A, Briese T, Lipkin WI, Kurz C, Ehrenreich J, Mack E, Baying B, Beneš V et al. (2018): Virome Analysis Reveals No Association of Head and Neck Vascular Anomalies with an Active Viral Infection. *In Vivo* 32, 1323–1331

- Freni F, Meduri A, Gazia F, Nicastro V, Galletti C, Aragona P, Galletti B, Galletti F (2020): Symptomatology in head and neck district in coronavirus disease (COVID-19): A possible neuroinvasive action of SARS-CoV-2. *Am J Otolaryngol* 41, 102612
- Füle T, Máthé M, Suba Z, Csapó Z, Szarvas T, Tátrai P, Paku S, Kovalszky I (2006): The presence of human papillomavirus 16 in neural structures and vascular endothelial cells. *Virology* 348, 289–296
- Gaballah AH, Jensen CT, Palmquist S, Pickhardt PJ, Duran A, Broering G, Elsayes KM (2017): Angiosarcoma: clinical and imaging features from head to toe. *BJR* 90, 20170039
- Galgano MT, Castle PE, Atkins KA, Brix WK, Nassau SR, Stoler MH (2010): Using biomarkers as objective standards in the diagnosis of cervical biopsies. *Am J Surg Pathol* 34, 1077–1087
- Geisthoff UW, Seyfert UT, Kübler M, Bieg B, Plinkert PK, König J (2014): Treatment of epistaxis in hereditary hemorrhagic telangiectasia with tranexamic acid - a double-blind placebo-controlled cross-over phase IIIB study. *Thromb Res* 134, 565–571
- Giblin AV, Clover AJP, Athanassopoulos A, Budny PG (2007): Pyogenic granuloma - the quest for optimum treatment: audit of treatment of 408 cases. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 60, 1030–1035
- Govani FS, Shovlin CL (2009): Hereditary haemorrhagic telangiectasia: a clinical and scientific review. *Eur J Hum Genet* 17, 860–871
- Graham SV (2016): Human Papillomavirus E2 Protein: Linking Replication, Transcription, and RNA Processing. *J Virol* 90, 8384–8388
- Greene AK, Goss JA (2018): Vascular Anomalies: From a Clinicohistologic to a Genetic Framework. *Plast Reconstr Surg* 141, 709e-717e
- Guadagnolo BA, Zagars GK, Araujo D, Ravi V, Shellenberger TD, Sturgis EM (2011): Outcomes after definitive treatment for cutaneous angiosarcoma of the face and scalp. *Head Neck* 33, 661–667
- Gustafsson RKL, Jeffery HC, Yaiw K-C, Wilhelmi V, Kostopoulou ON, Davoudi B, Rahbar A, Benard M, Renné T, Söderberg-Nauclér C et al. (2015): Direct

infection of primary endothelial cells with human cytomegalovirus prevents angiogenesis and migration. *J Gen Virol* 96, 3598–3612

Hammer J, Seront E, Duez S, Dupont S, van Damme A, Schmitz S, Hoyoux C, Chopinet C, Clapuyt P, Hammer F et al. (2018): Sirolimus is efficacious in treatment for extensive and/or complex slow-flow vascular malformations: a monocentric prospective phase II study. *Orphanet J Rare Dis* 13, 191

Harris MN, Desai R, Chuang TY, Hood AF, Mirowski GW (2000): Lobular capillary hemangiomas: An epidemiologic report, with emphasis on cutaneous lesions. *J Am Acad Dermatol* 42, 1012–1016

Heymann PW, Platts-Mills TAE, Johnston SL (2005): Role of viral infections, atopy and antiviral immunity in the etiology of wheezing exacerbations among children and young adults. *Pediatr Infect Dis J* 24, S217-22, discussion S220-1

Higueros E, Roe E, Granell E, Baselga E (2017): Síndrome de Sturge-Weber: revisión. *Actas Dermosifiliogr* 108, 407–417

Hong Y-K, Foreman K, Shin JW, Hirakawa S, Curry CL, Sage DR, Libermann T, Dezube BJ, Fingerroth JD, Detmar M (2004): Lymphatic reprogramming of blood vascular endothelium by Kaposi sarcoma-associated herpesvirus. *Nat Genet* 36, 683–685

Horbach SER, Lokhorst MM, Saeed P, Goüyon Matignon Pontouraude CMF de, Rothová A, van der Horst CMAM (2016): Sclerotherapy for low-flow vascular malformations of the head and neck: A systematic review of sclerosing agents. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 69, 295–304

Idda ML, McClusky WG, Lodde V, Munk R, Abdelmohsen K, Rossi M, Gorospe M (2020): Survey of senescent cell markers with age in human tissues. *Aging (Albany NY)* 12, 4052–4066

Iruela-Arispe ML (2019): A focus on vascular malformations. *Curr Opin Hematol* 26, 152–153

Ishida Y, Otsuka A, Kabashima K (2018): Cutaneous angiosarcoma: update on biology and latest treatment. *Curr Opin Oncol* 30, 107–112

Iwasaki T, Sata T, Sugase M, Sato Y, Kurata T, Suzuki K, Ohmoto H, Iwamoto S, Matsukura T (1992): Detection of capsid antigen of human papillomavirus

(HPV) in benign lesions of female genital tract using anti-HPV monoclonal antibody. *J Pathol* 168, 293–300

Ji Y, Chen S, Yang K, Xia C, Li L (2020): Kaposiform hemangioendothelioma: current knowledge and future perspectives. *Orphanet J Rare Dis* 15, 39

Joura EA, Giuliano AR, Iversen O-E, Bouchard C, Mao C, Mehlsen J, Moreira ED, Ngan Y, Petersen LK, Lazcano-Ponce E et al. (2015): A 9-valent HPV vaccine against infection and intraepithelial neoplasia in women. *N Engl J Med* 372, 711–723

Kanada KN, Merin MR, Munden A, Friedlander SF (2012): A prospective study of cutaneous findings in newborns in the United States: correlation with race, ethnicity, and gestational status using updated classification and nomenclature. *J Pediatr* 161, 240–245

Kanda T, Yajima M, Ikuta K (2019): Epstein-Barr virus strain variation and cancer. *Cancer Sci* 110, 1132–1139

Kelly M (2010): Kasabach-Merritt phenomenon. *Pediatr Clin North Am* 57, 1085–1089

Kim KH, Choi TH, Choi Y, Park YW, Hong KY, Kim DY, Choe YS, Lee H, Cheon J-E, Park J-B et al. (2017): Comparison of Efficacy and Safety Between Propranolol and Steroid for Infantile Hemangioma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Dermatol* 153, 529–536

Kudzina GD, Golovan' DI (1972): Sravnitel'naya otsenka gerbitsidov gruppy khlorbenzoĭnoĭ kisloty sanitarno-toksikologicheskim metodom i metodom kul'tur kletok. *Vrach Delo* 1, 125–128

Le Wang, Hu Y-C, Xiao C-Y, Wang F, Liu Y-F, Tang L-H, Xiao R-S (2018): Comparative testing of HPV L1 protein monoclonal antibody panel for the detection of HPV in cervical exfoliated cells. *J Virol Methods* 257, 33–41

Lee J, Sinno H, Tahiri Y, Gilardino MS (2011): Treatment options for cutaneous pyogenic granulomas: a review. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 64, 1216–1220

Lee PW, Frieden IJ, Streicher JL, McCalmont T, Haggstrom AN (2014): Characteristics of noninvoluting congenital hemangioma: a retrospective review. *J Am Acad Dermatol* 70, 899–903

- Leung AKC, Hon KL, Leong KF (2019): Rubella (German measles) revisited. *Hong Kong Med J* 25, 134–141
- Li B, Li Y, Tian X-y, Li Z (2013): Unusual multifocal intraosseous papillary intralymphatic angioendothelioma (Dabska tumor) of facial bones: a case report and review of literature. *Diagn Pathol* 8, 160
- Li C, Yu J, Li K, Hou K, Yu J (2018): Dural arteriovenous fistula of the lateral foramen magnum region: A review. *Interv Neuroradiol* 24, 425–434
- Lim YH, Bacchiocchi A, Qiu J, Straub R, Bruckner A, Bercovitch L, Narayan D, McNiff J, Ko C, Robinson-Bostom L et al. (2016): GNA14 Somatic Mutation Causes Congenital and Sporadic Vascular Tumors by MAPK Activation. *Am J Hum Genet* 99, 443–450
- Limaye N, Kangas J, Mendola A, Godfraind C, Schlögel MJ, Helaers R, Eklund L, Boon LM, Vikkula M (2015): Somatic Activating PIK3CA Mutations Cause Venous Malformation. *Am J Hum Genet* 97, 914–921
- Lloyd S, Obholzer R, Tysome J (2020): British Skull Base Society Clinical Consensus Document on Management of Head and Neck Paragangliomas. *Otolaryngol Head Neck Surg* 163, 400–409
- Ludmerer SW, Benincasa D, Mark GE, Christensen ND (1997): A neutralizing epitope of human papillomavirus type 11 is principally described by a continuous set of residues which overlap a distinct linear, surface-exposed epitope. *J Virol* 71, 3834–3839
- Luks VL, Kamitaki N, Vivero MP, Uller W, Rab R, Bovée JVMG, Rialon KL, Guevara CJ, Alomari AI, Greene AK et al. (2015): Lymphatic and other vascular malformative/overgrowth disorders are caused by somatic mutations in PIK3CA. *J Pediatr* 166, 1048-54.e1-5
- Lydiatt WM, Shaha AR, Shah JP (1994): Angiosarcoma of the head and neck. *Am J Surg* 168, 451–454
- McCarthy EF, Lietman S, Argani P, Frassica FJ (1999): Endovascular papillary angioendothelioma (Dabska tumor) of bone. *Skeletal Radiol* 28, 100–103
- McLaughlin-Drubin ME, Münger K (2009): The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology* 384, 335–344

Meijer-Jorna LB, van der Loos CM, Teeling P, Boer OJ de, Florquin S, van der Horst CMAM, van der Wal AC (2012): Proliferation and maturation of microvessels in arteriovenous malformations--expression patterns of angiogenic and cell cycle-dependent factors. *J Cutan Pathol* 39, 610–620

Meng F, Li Q, Zhang Y, Cui Z, Chang S, Zhao P (2018): Isolation and characterization of subgroup J Avian Leukosis virus associated with hemangioma in commercial Hy-Line chickens. *Poult Sci* 97, 2667–2674

Mera-Rodríguez JA de, Álvarez-Hernán G, Gañán Y, Martín-Partido G, Rodríguez-León J, Francisco-Morcillo J (2019): Senescence-associated β -galactosidase activity in the developing avian retina. *Dev Dyn* 248, 850–865

Merrow AC, Gupta A, Patel MN, Adams DM (2016): 2014 Revised Classification of Vascular Lesions from the International Society for the Study of Vascular Anomalies: Radiologic-Pathologic Update. *Radiographics* 36, 1494–1516

Müller-Wille R, Wildgruber M, Sadick M, Wohlgemuth WA (2018): Gefäßanomalien (Teil II): Interventionelle Therapie von peripheren Gefäßmalformationen. *Rofo*

Mulliken JB, Glowacki J (1982): Hemangiomas and vascular malformations in infants and children: a classification based on endothelial characteristics. *Plast Reconstr Surg* 69, 412–422

Munden A, Butschek R, Tom WL, Marshall JS, Poeltler DM, Krohne SE, Alió AB, Ritter M, Friedlander DF, Catanzarite V et al. (2014): Prospective study of infantile haemangiomas: incidence, clinical characteristics and association with placental anomalies. *Br J Dermatol* 170, 907–913

Mylonas S, Brunkwall S, Brunkwall J (2018): Vaskuläre Anomalien. Teil I: Gefäßtumoren. *Chirurg* 89, 245–254

Ndiaye C, Mena M, Alemany L, Arbyn M, Castellsagué X, Laporte L, Bosch FX, Sanjosé S de, Trottier H (2014): HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol* 15, 1319–1331

Neumann HPH, Pawlu C, Peczkowska M, Bausch B, McWhinney SR, Muresan M, Buchta M, Franke G, Klisch J, Bley TA et al. (2004): Distinct clinical features

of paraganglioma syndromes associated with SDHB and SDHD gene mutations. *JAMA* 292, 943–951

Nosher JL, Murillo PG, Liszewski M, Gendel V, Gribbin CE (2014): Vascular anomalies: A pictorial review of nomenclature, diagnosis and treatment. *World J Radiol* 6, 677–692

Ordi J, Garcia S, Del Pino M, Landolfi S, Alonso I, Quintó L, Torné A (2009): p16 INK4a immunostaining identifies occult CIN lesions in HPV-positive women. *Int J Gynecol Pathol* 28, 90–97

Pávai Z, Füle T, Horváth E, Máthé M, Pap Z, Denes L, Jung J (2006): Comparative detection of high-risk HPV (16, 18, 33) in cervical bioptic material of county hospital of Tg. Mures. *Rom J Morphol Embryol* 47, 229–234

Persky MS, Setton A, Niimi Y, Hartman J, Frank D, Berenstein A (2002): Combined endovascular and surgical treatment of head and neck paragangliomas--a team approach. *Head Neck* 24, 423–431

Petry KU, Schmidt D, Scherbring S, Luyten A, Reinecke-Lüthge A, Bergeron C, Kommos F, Löning T, Ordi J, Regauer S et al. (2011): Triaging Pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16/Ki-67 Dual-stained cytology. *Gynecol Oncol* 121, 505–509

Qiao C, Richter GT, Pan W, Jin Y, Lin X (2019): Extracranial arteriovenous malformations: from bedside to bench. *Mutagenesis* 34, 299–306

Radu O, Pantanowitz L (2013): Kaposi sarcoma. *Arch Pathol Lab Med* 137, 289–294

Randén-Brady R, Carpén T, Jouhi L, Syrjänen S, Haglund C, Tarkkanen J, Remes S, Mäkitie A, Mattila PS, Silén S et al. (2019): In situ hybridization for high-risk HPV E6/E7 mRNA is a superior method for detecting transcriptionally active HPV in oropharyngeal cancer. *Hum Pathol* 90, 97–105

Ranieri M, Wohlgemuth W, Müller-Wille R, Prantl L, Kehrer A, Geis S, Klein S, Lamby P, Schiltz D, Uller W et al. (2017): Vascular malformations of upper and lower extremity - from radiological interventional therapy to surgical soft tissue reconstruction - an interdisciplinary treatment. *Clin Hemorheol Microcirc* 67, 355–372

- Razon MJ, Kråling BM, Mulliken JB, Bischoff J (1998): Increased apoptosis coincides with onset of involution in infantile hemangioma. *Microcirculation* 5, 189–195
- Requena C, Alsina M, Morgado-Carrasco D, Cruz J, Sanmartín O, Serra-Guillén C, Lombart B (2018): Sarcoma de Kaposi y angiosarcoma cutáneo: directrices para el diagnóstico y tratamiento. *Actas Dermosifiliogr* 109, 878–887
- Rietbergen MM, Snijders PJF, Beekzada D, Braakhuis BJM, Brink A, Heideman DAM, Hesselink AT, Witte BI, Bloemena E, Baatenburg-De Jong RJ et al. (2014): Molecular characterization of p16-immunopositive but HPV DNA-negative oropharyngeal carcinomas. *Int J Cancer* 134, 2366–2372
- Rosenberg A, Agulnik M (2018): Epithelioid Hemangioendothelioma: Update on Diagnosis and Treatment. *Curr Treat Options Oncol* 19, 19
- Sadick M, Müller-Wille R, Wildgruber M, Wohlgemuth WA (2018): Gefäßanomalien (Teil I): Klassifikation und Diagnostik von Gefäßanomalien. *Rofo* 190, 825–835
- Salama R, Sadaie M, Hoare M, Narita M (2014): Cellular senescence and its effector programs. *Genes Dev* 28, 99–114
- Sanjose S de, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, Tous S, Felix A, Bravo LE, Shin H-R et al. (2010): Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol* 11, 1048–1056
- Sardaro A, Bardoscia L, Petruzzelli MF, Portaluri M (2014): Epithelioid hemangioendothelioma: an overview and update on a rare vascular tumor. *Oncol Rev* 8, 259
- Sarwal P, Lapumnuaypol K: StatPearls: Pyogenic Granuloma, Treasure Island (FL) 2020
- Scarth JA, Patterson MR, Morgan EL, Macdonald A (2021): The human papillomavirus oncoproteins: a review of the host pathways targeted on the road to transformation. *J Gen Virol* 102

- Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM (1993): The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75, 495–505
- Schneider JW, Dittmer DP (2017): Diagnosis and Treatment of Kaposi Sarcoma. *Am J Clin Dermatol* 18, 529–539
- Schwartz RA, Dabski C, Dabska M (2000): The Dabska tumor: a thirty-year retrospect. *Dermatology* 201, 1–5
- Semenisty V, Naroditsky I, Keidar Z, Bar-Sela G (2015): Pazopanib for metastatic pulmonary epithelioid hemangioendothelioma-a suitable treatment option: case report and review of anti-angiogenic treatment options. *BMC Cancer* 15, 402
- Shafti-Keramat S, Handisurya A, Kriehuber E, Meneguzzi G, Slupetzky K, Kirnbauer R (2003): Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. *J Virol* 77, 13125–13135
- Shirley MD, Tang H, Gallione CJ, Baugher JD, Frelin LP, Cohen B, North PE, Marchuk DA, Comi AM, Pevsner J (2013): Sturge-Weber syndrome and port-wine stains caused by somatic mutation in GNAQ. *N Engl J Med* 368, 1971–1979
- Silva TS, Araujo LRd, Paiva GR, Andrade RG (2020): Papillary intralymphatic angioendothelioma: Dabska tumor. *An Bras Dermatol* 95, 214–216
- Soblet J, Limaye N, Uebelhoer M, Boon LM, Vikkula M (2013): Variable Somatic TIE2 Mutations in Half of Sporadic Venous Malformations. *Mol Syndromol* 4, 179–183
- Sritippho T, Chotjumlong P, Iamaroon A (2015): Roles of Human Papillomaviruses and p16 in Oral Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 16, 6193–6200
- Stiasny A, Kuhn C, Mayr D, Alexiou C, Janko C, Wiest I, Jeschke U, Kost B (2016): Immunohistochemical Evaluation of E6/E7 HPV Oncoproteins Staining in Cervical Cancer. *Anticancer Res* 36, 3195–3198
- Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, Breuer J, Leigh IM, Matlashewski G, Banks L (1998): Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* 393, 229–234

- Sun X, Kaufman PD (2018): Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma* 127, 175–186
- Tabata T, Petitt M, Fang-Hoover J, Rivera J, Nozawa N, Shiboski S, Inoue N, Pereira L (2012): Cytomegalovirus Impairs Cytotrophoblast-Induced Lymphangiogenesis and Vascular Remodeling in an in Vivo Human Placentation Model. *Am J Pathol* 181, 1540–1559
- Valdovinos-Torres H, Orozco-Morales M, Pedroza-Saavedra A, Padilla-Noriega L, Esquivel-Guadarrama F, Gutierrez-Xicotencatl L (2008): Different Isoforms of HPV-16 E7 Protein are Present in Cytoplasm and Nucleus. *Open Virol J* 2, 15–23
- Venot Q, Blanc T, Rabia SH, Berteloot L, Ladraa S, Duong J-P, Blanc E, Johnson SC, Huguin C, Boccara O et al. (2018): Targeted therapy in patients with PIK3CA-related overgrowth syndrome. *Nature* 558, 540–546
- Vygivska LA, Tuchkina IO, Kalnytska VB (2017): The impact of emergent infections on the fetal state. *Wiad Lek* 70, 731–736
- Welander J, Söderkvist P, Gimm O (2011): Genetics and clinical characteristics of hereditary pheochromocytomas and paragangliomas. *Endocr Relat Cancer* 18, R253-76
- Werner J, Eivazi B, Folz B, Dünne A-A (2006): „State of the Art“ zur Klassifikation, Diagnostik und Therapie von zervikofazialen Hämangiomen und vaskulären Malformationen. *Laryngorhinootologie* 85, 883–891
- Wiegand S, Dietz A (2021): Vaskuläre Malformationen im Hals-Nasen-Ohren-Bereich. *Laryngorhinootologie* 100, 65–76
- Wiegand S, Werner JA (2016): Lymphatische Malformationen im Kopf-Hals-Bereich. *HNO* 64, 133–142
- Wiegand S, Wichmann G, Dietz A (2018): Treatment of Lymphatic Malformations with the mTOR Inhibitor Sirolimus: A Systematic Review. *Lymphat Res Biol* 16, 330–339
- Winther B, Gwaltney JM, Mygind N, Hendley JO (1998): Viral-induced rhinitis. *Am J Rhinol* 12, 17–20

Yousaf N, Maruzzo M, Judson I, Al-Muderis O, Fisher C, Benson C (2015): Systemic treatment options for epithelioid haemangioendothelioma: the Royal Marsden Hospital experience. *Anticancer Res* 35, 473–480

Zur Hausen H (2000): Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 92, 690–698

ISSVA Classification of Vascular Anomalies ©2018 International Society for the Study of Vascular Anomalies Available at "[issva.org/classification](https://www.issva.org/classification)": Accessed 01.03.2021

8 Anhang

8.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer/-innen

Meine akademischen Lehrenden waren in Marburg:

Adamkiewicz, Alter, Barth, Bartsch, Bauer, Baum, Baumann, Becker, Bender, Bette, Bien, Bliemel, Braun, Brehm, Bücking, Cetin, Czubayko, Daut, Decher, del Rey, Dietz, Dodel, Donner-Banzhoff, Eienbröker, Eming, Eubel, Fendrich, Feuser, Geks, Görg, Gress, Grundmann, Hartmann, Hertl, Heverhagen, Hildebrandt, Hinnerk-Wulf, Holland, Hoyer, Kann, Kanngießler, Kinscherf, Kircher, Kirschbaum, Köhler, König, Koolmann, Kühne, Kühnert, Leonhardt, Librizzi, Lill, Löffler, Lohoff, Mahnken, Maier, Mann, Maurer, Meyer, Mittag, Moll, Moosdorf, Mueller, Neff, Neubauer, Neumüller, Nimsky, Oertel, Oliver, Opitz, Pagenstecher, Peterlein, Pfestroff, Pfützner, Plant, Reese, Renz, Richter, Riera Knorrenschild, Ruchholtz, Schäfer, Schieffer, Schratt, Schu, Schwarz, Seitz, Sekundo, Sevinc, Steiniger, Strauch, Tackenberg, Teymoortash, Thieme, Timmesfeld, Vogelmeier, Voigt, Wagner, Waldmann, Weihe, Werner, Westermann, Wilhelm, Wissniowski, Wolf, Wollmer, Wrocklage, Zavorotnyy, Ziring

8.2 Danksagungen

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Boris Stuck für die Bereitstellung dieser Promotionsarbeit. Die Zeit an seiner Klinik prägte meine Ausbildung und meinen Werdegang.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Robert Mandic, der mich die ganze Zeit dieser Promotionsarbeit unterstützte und mich bestmöglich betreute. Insbesondere in schwierigen Zeiten, wo mir selbst der Antrieb fehlte, war er stets geduldig mit mir. Vielen Dank dafür, Robert.

Außerdem danke ich Frau Roswitha Peldszus und Frau Grazyna Sadowski für die Unterstützung im Labor sowie die ausdauernden Erklärungen und gemeinsame Zeit und Gespräche zwischen den Untersuchungen.

Weiter danke ich Julia, die mich die Zeit des Schreibens begleitete, unterstützte und mir bei Rückfragen mit Rat aushalf.

Zuletzt danke ich meinen Eltern, meinen Brüdern und meinen Freunden, die mir immer zu Seite standen, mich durch das Studium getragen haben, geduldig mit mir waren und mich auf dem langen Weg dieser Promotion unterstützt haben. Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die stets an mich glauben und immer ein offenes Ohr für mich haben.