

Molekularpathologische HPV-Detektion

Methodische und differentialdiagnostische Aspekte

Prof. Dr. med. Klaus Richter
Dr. med.vet. Katrin Henneicke
Vortrag in Jesteburg 2001

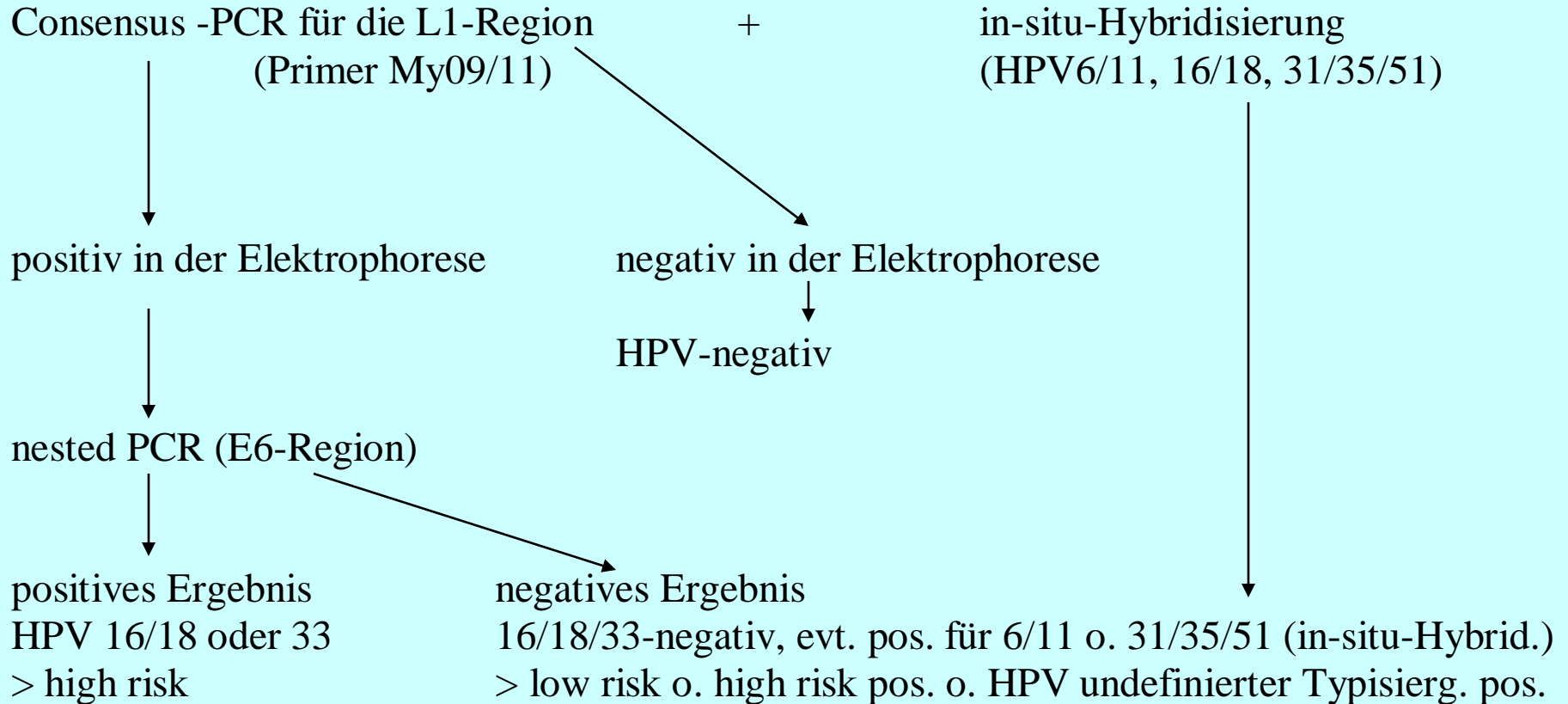
Methoden der Detektion von human papilloma virus (HPV)

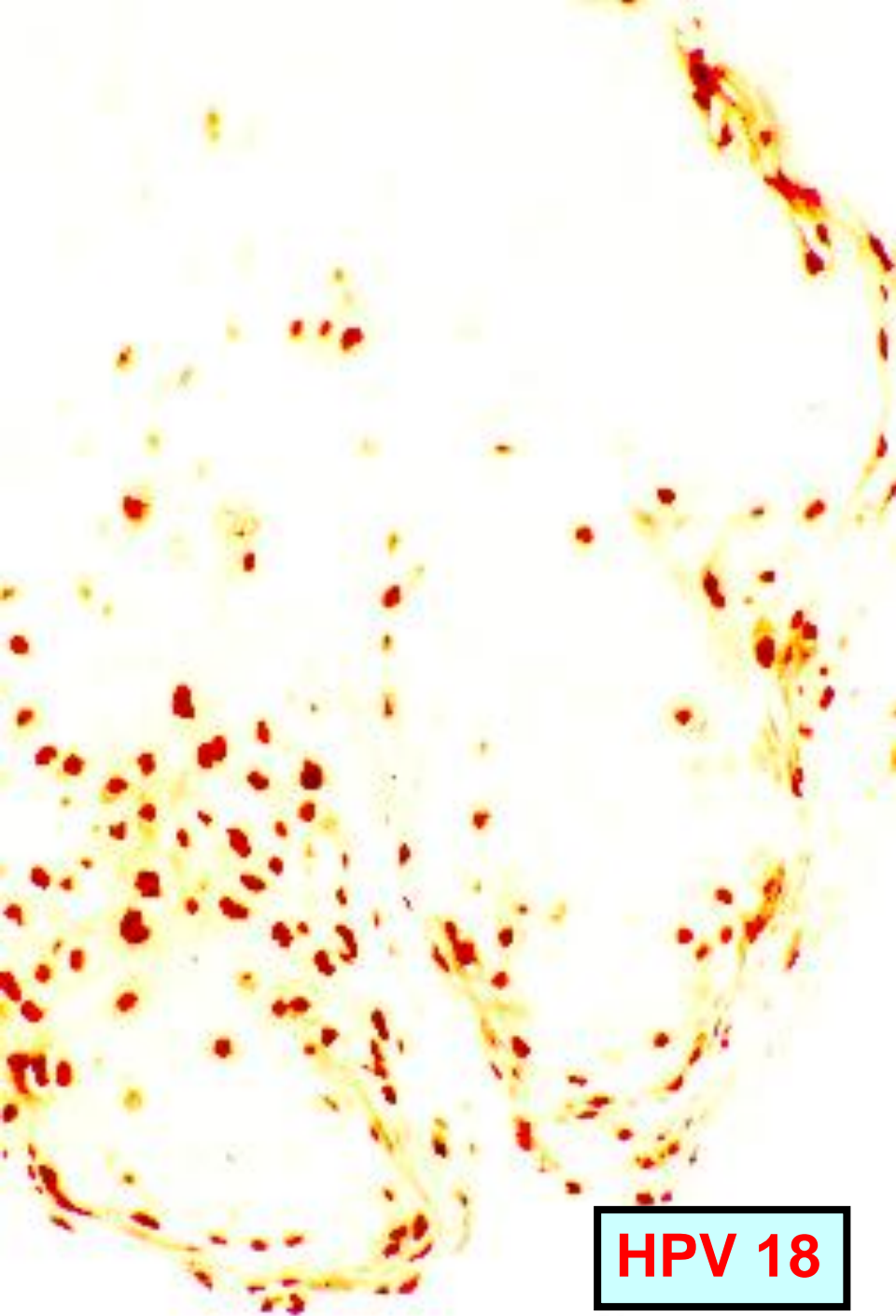
- **Hybridisierungstechniken**
- **Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**
- **DNA-Sequenzierungen**
- **Fragment- und Restriktionsanalysen**

Aus welchem Material wird HPV-DNA in Instituten für Pathologie i.d.R. bestimmt ?

- **Gewebeproben**, die vorher lichtmikroskopisch auf kondylomatöse Läsionen mit oder ohne Dysplasien oder Atypien untersucht wurden (ggf. Makro- oder Mikrodissektion)
- **histologische Schnittpräparate**
- **Ausstrichpräparate**
- **Ergüsse**
- **sonstige Flüssigkeiten**

HPV-Typisierung am Institut für Pathologie 1994 - 1995:





HPV 18

**DNA- in situ-
Hybridisierung
(DISH)
eines papillären
Viruskondyloms
der Portio**

**Detektionssystem:
Peroxidase-Anti -
Peroxidase bzw.
PAP-Methode**



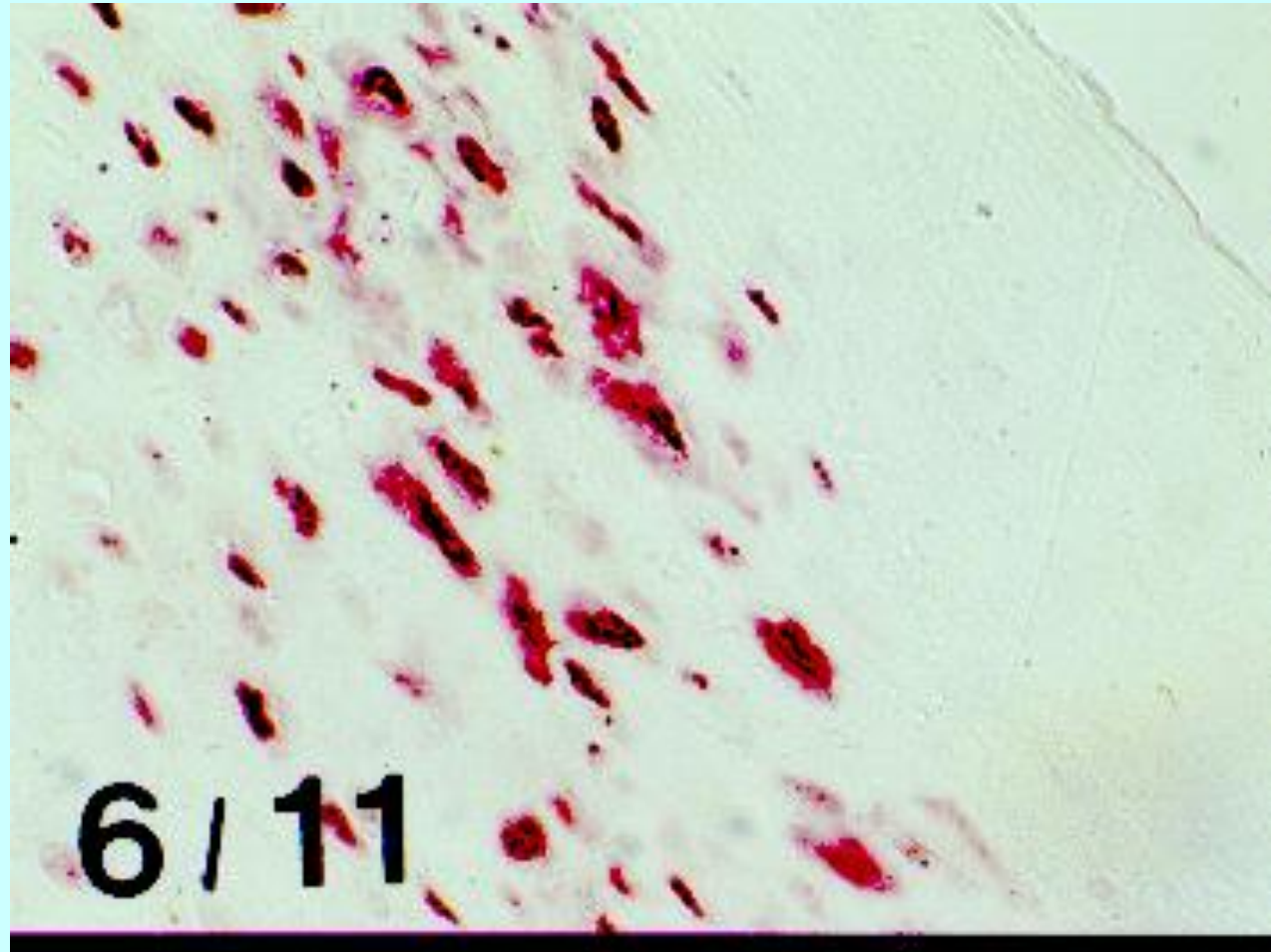
HPV 31/35/51

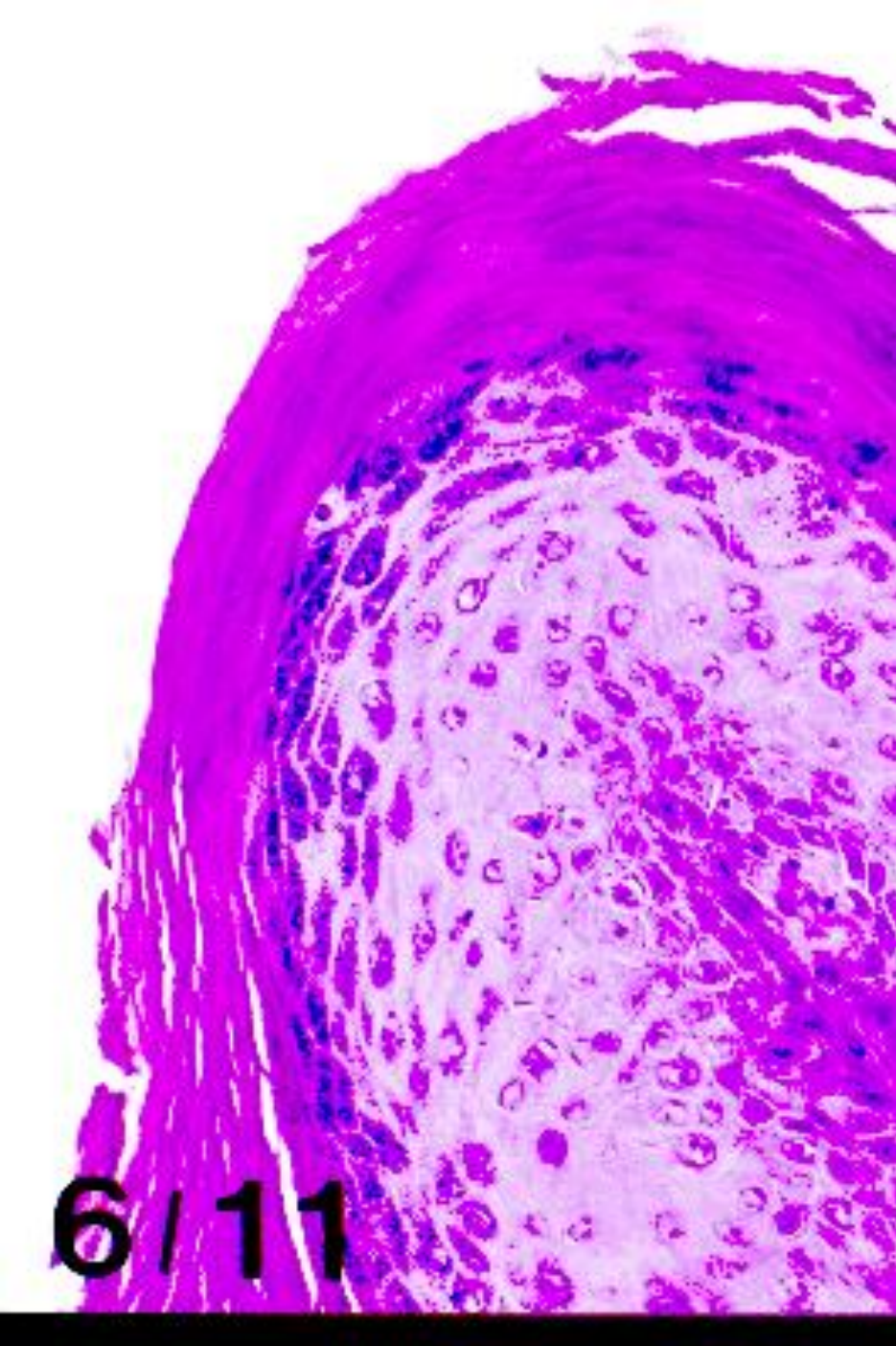
**DNA- in situ-
Hybridisierung
(DISH)
eines papillären
Viruskondyloms
der Portio**

**Detektionssystem:
Peroxidase-Anti -
Peroxidase bzw.
PAP-Methode**

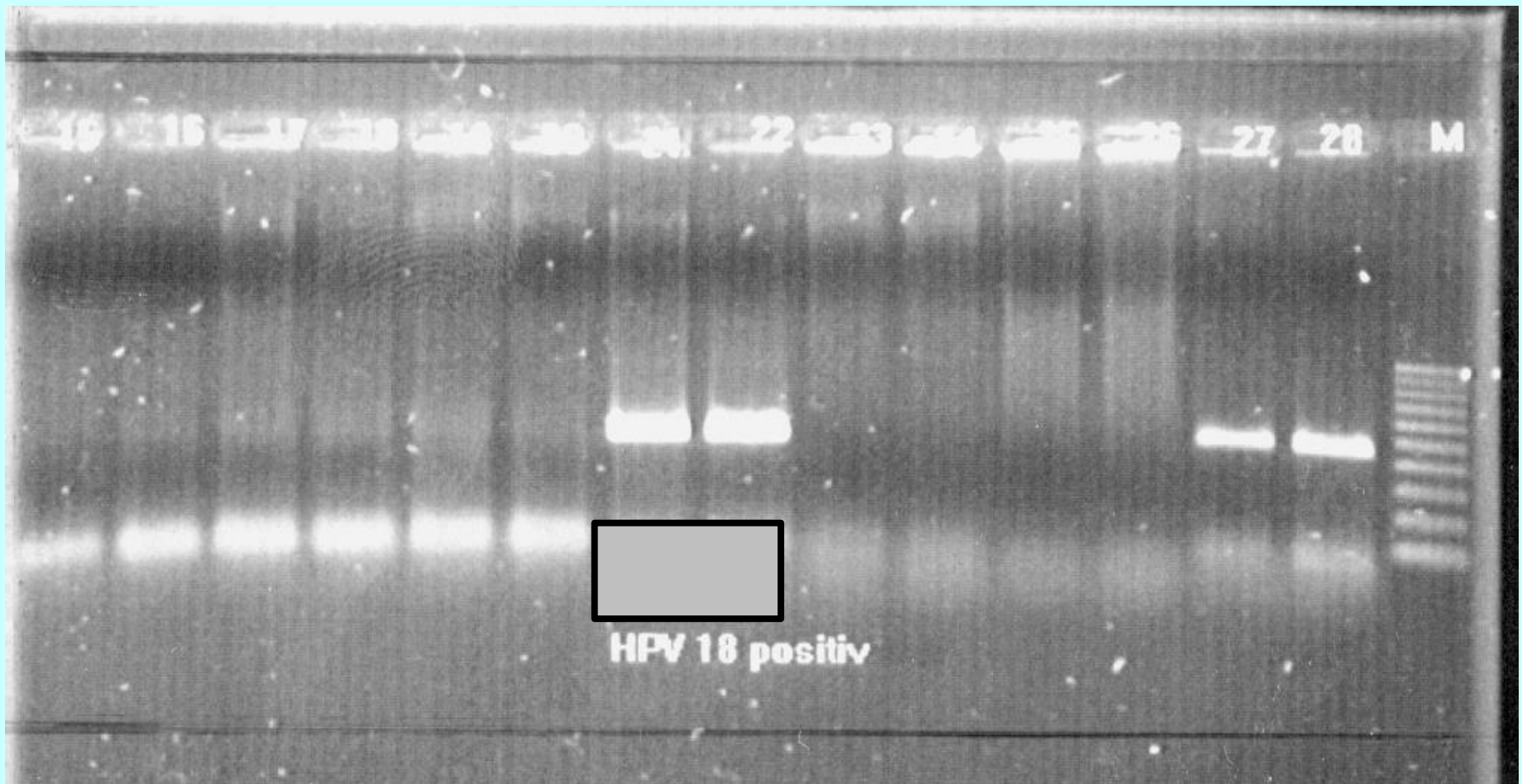
**DNA- in situ-
Hybridisierung
(DISH)
eines papillären
Viruskondyloms
der Portio**

**Detektionssystem:
Avidin-Biotin-
Methode**





6 / 11



Line 21/22: Elektrophorese nach DNA-Amplifikation von HPV 18

Line 27/28: Positiv-Kontrolle für HPV 18

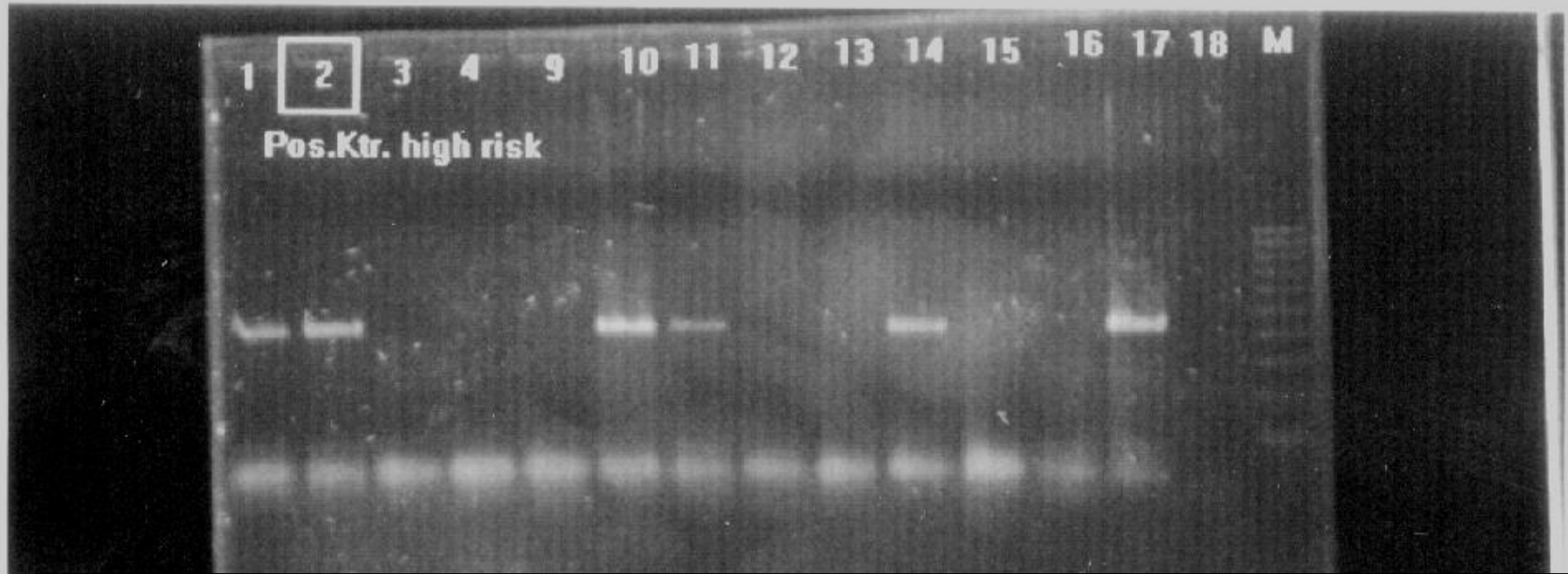
STRATAGENE EAGLEENE II 01 33 01 11:47:25

MY09-11Pos. Ktr. high risk

FILE 0: EAGLEENE 0005001.TIF

INTEGRATE PERIOD IS 3.83 SECONDS OR 115 COUNTS.

IMAGE CREATED ON WED JAN 24 12:20:57 2001.



Line 1/2 : Elektrophorese nach DNA-Amplifikation von HPV der high risk-Gruppe (Positivkontrolle)

Line 10/11 + 14 + 17: positive Patientinnen-Proben von kondylomatösen Läsionen der Portio



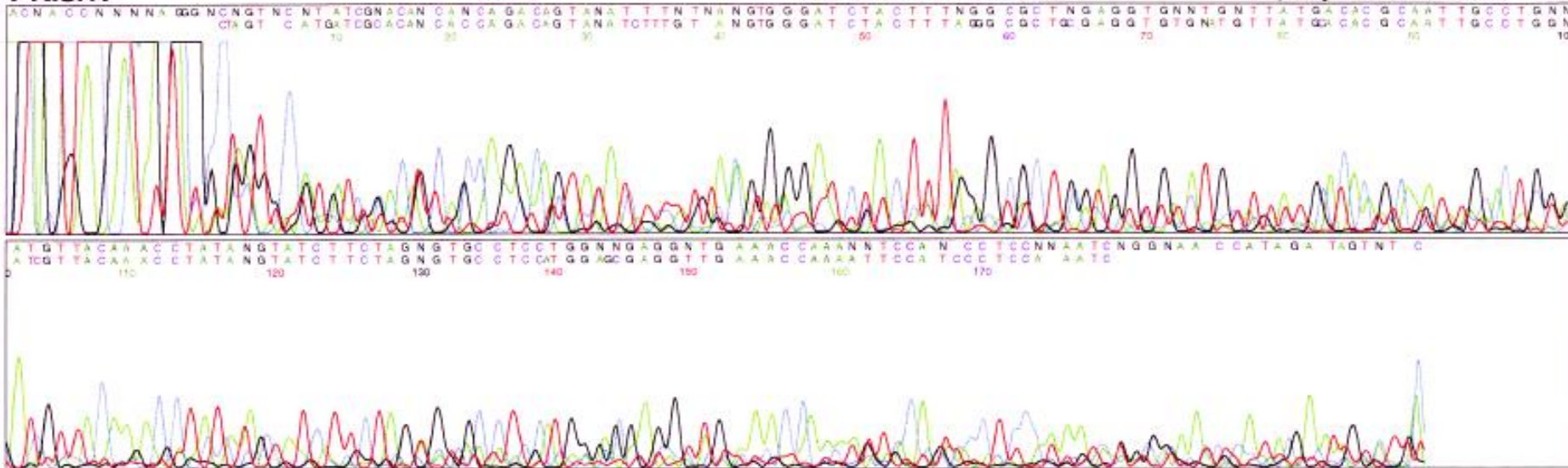
Model 310
Version 2.1.2b1



HSV-1g

Signal G:221 A:83 T:89 C:71
DT POP6(BD Set-Any Primer)
big dye Rhod
Points 1360 to 3840 Base 1: 1360

Page 1 of 1
Don, 25. Jan 2001 14:06 Uhr
Don, 25. Jan 2001 12:28 Uhr
Spacing: 12.80 ABI-CE2 2.1.2



Sequenzanalyse des DNA-Amplifikats von Patientinnenprobe mit Sequenzierer ABI 310 der Firma Perkin-Elmer

[NCBI](#) [BLAST](#) [Entrez](#) [?](#)

BLASTN 2.1.2 [Nov-13-2000]

Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

RID: 980425915-22391-13812

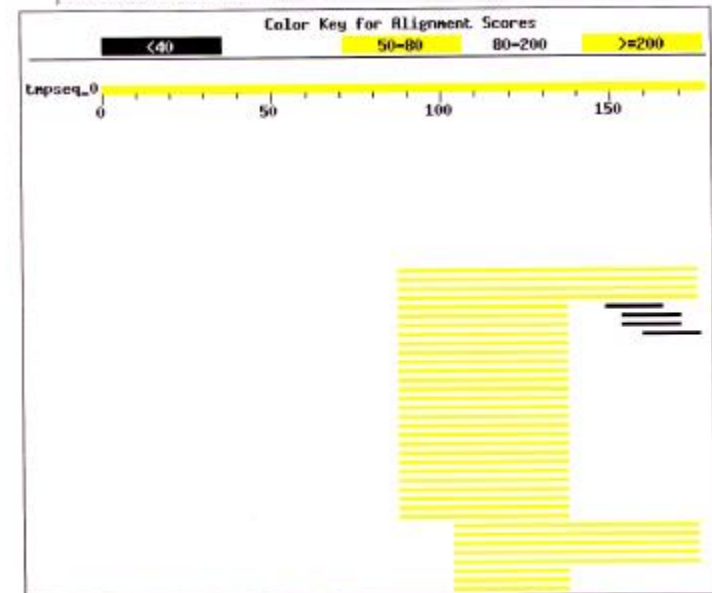
Query= (178 letters)

Database: nt
752,244 sequences; 2,673,049,203 total letters

If you have any problems or questions with the results of this search please refer to the

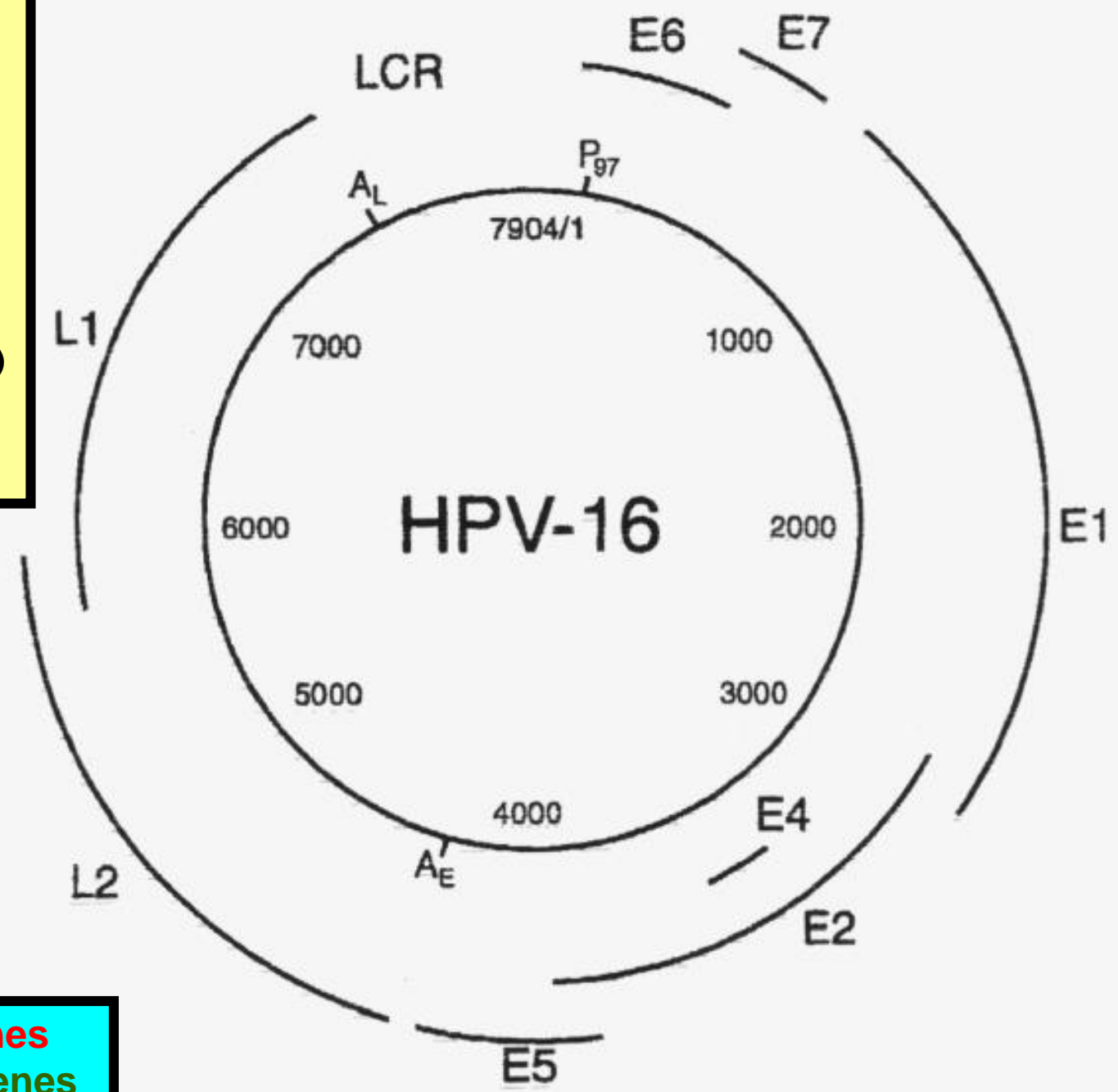
Datenbank:
Blast Search Result
gleich gefundene DNA-Sequenz der Probe mit zahlreichen gespeicherten DNA-Sequenzen in abnehmender Trefferhäufigkeit ab

Mouse-over to show define and scores. Click to show alignments



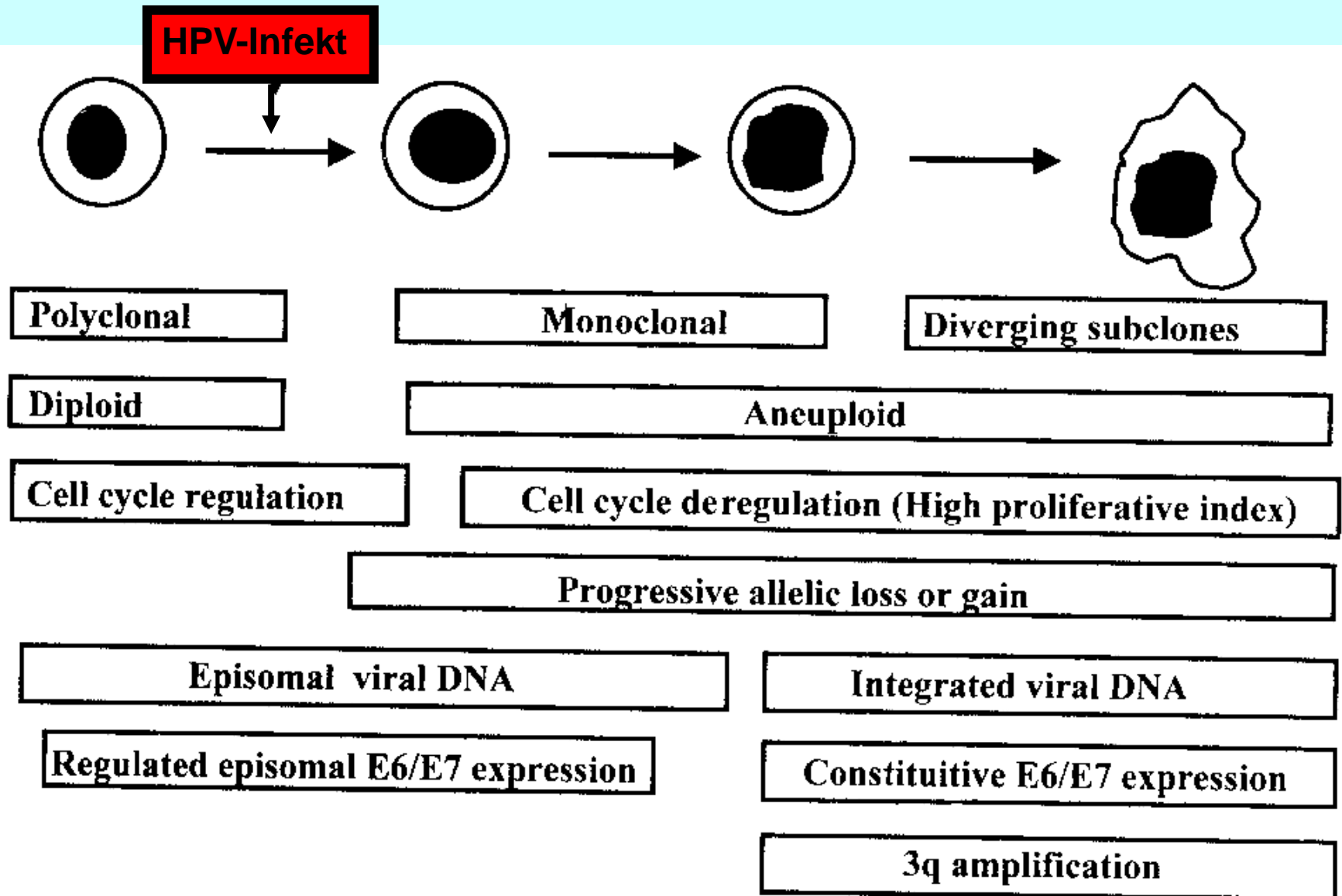


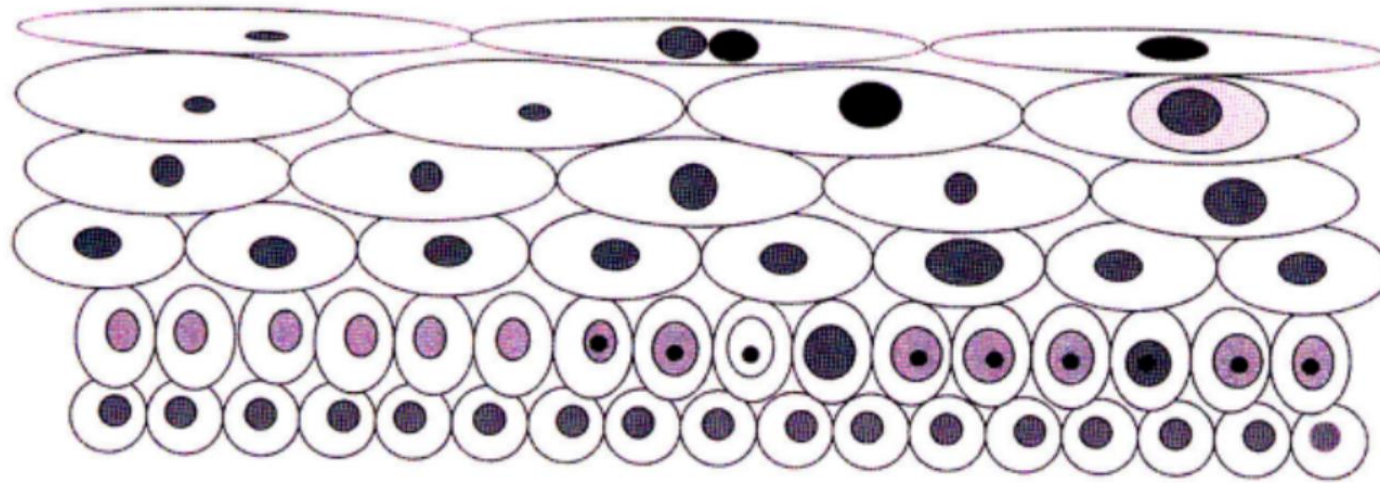
- L1 = major capsid protein**
- L2 = minor capsid protein**
- LCR = long control region**
- E1 = replication**
- E2 = replication + control of viral transcription**
- E4 = coding for late cytoplasmic protein**
- E5 = transformation (HPV6)**
- E6,7 = transformation**



L1 + L2 = sog. late genes
E6 + E7 = sog. early genes

Schema über virale und zelluläre Veränderungen nach HPV-Infektion

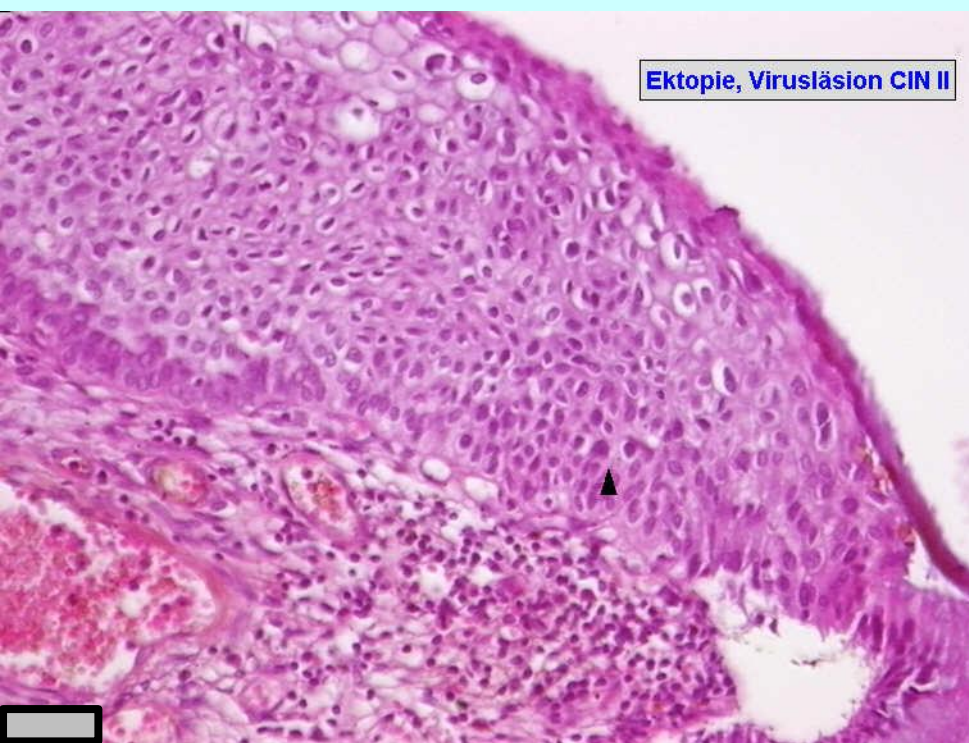




**Terminally
Differentiated
cells**

**Committed
cells**

Basal and stem cells

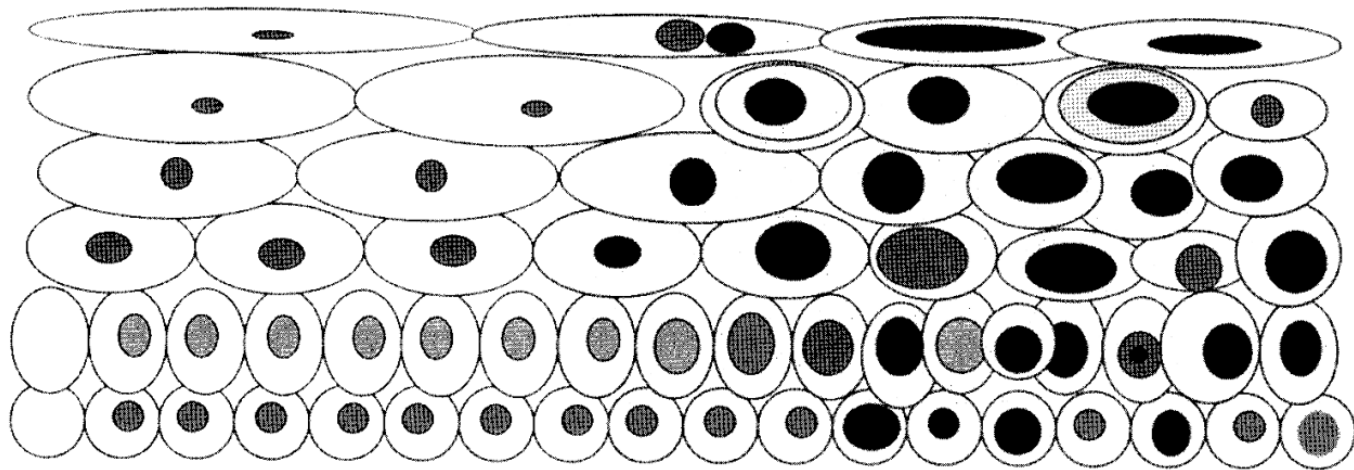


Ektopie, Virusläsion CIN II



Ektopie mit Virusläsion (CIN II)

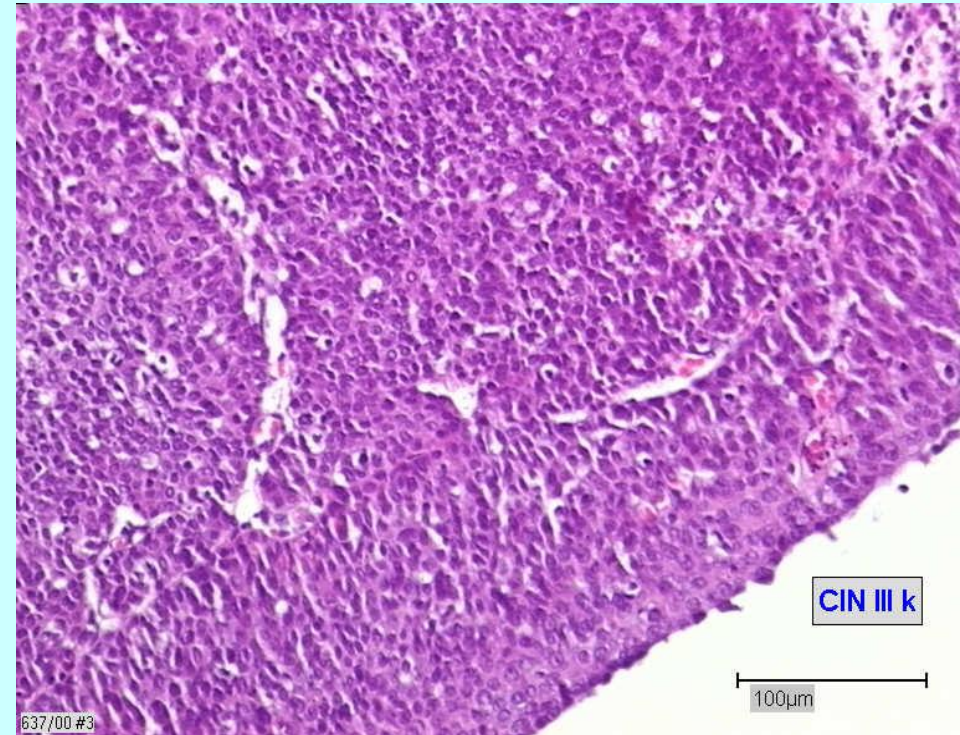
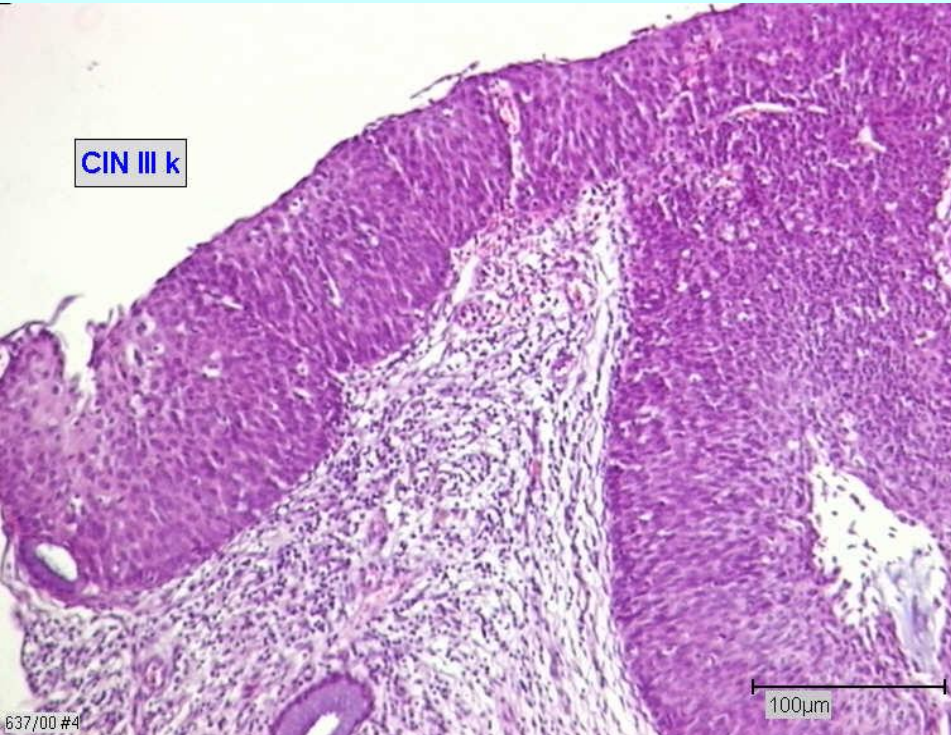
200µm



**Terminally
Differentiated
cells**

Committed cells

Basal and stem cells



Fehlermöglichkeiten der HPV-Detektion in Untersuchungsproben

- **inadäquates Untersuchungsmaterial bzw. Probenfehler**
- **Protokoll-Fehler**
- **Formolfixation**
durch Formalin könnte das zu amplifizierende lange Segment MY09/11 (450 bp) aus der L1-Region in Bruchstücke zerlegt und dadurch nicht mehr nachweisbar werden
- **Hemmstoffe in der PCR**
z.B. Blutfarbstoffe können PCR hemmen
- **L1-Integration**
das L1-Gen ist als sog. Late-Gen erst in späteren Stadien der Entdifferenzierung nachweisbar
- **Early-Genes**
Zeitpunkt des Nachweises von sog. Early-Genes überschritten oder zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht untersucht
- **Immunität**
aufgrund der Immunitätslage der Patientinnen ist zum Zeitpunkt der Untersuchung das Virus bereits eliminiert
- **lokale und systemische Wirtsfaktoren (z.B. Östrogengehalt)**
- **Sensitivität des Nachweises in Abhängigkeit von DNA-Gehalt der Probe**

I. Consensus-PCR

negativ

positiv

Nested-PCR

HC II

negativ

positiv

positiv

negativ

negativ

Subtypisierung
HPV16/18/33

HPV hr/lr

Sequenzrg.

II. Hybrid Capture II (HCII)

positiv

negativ

Consensus-PCR

positiv

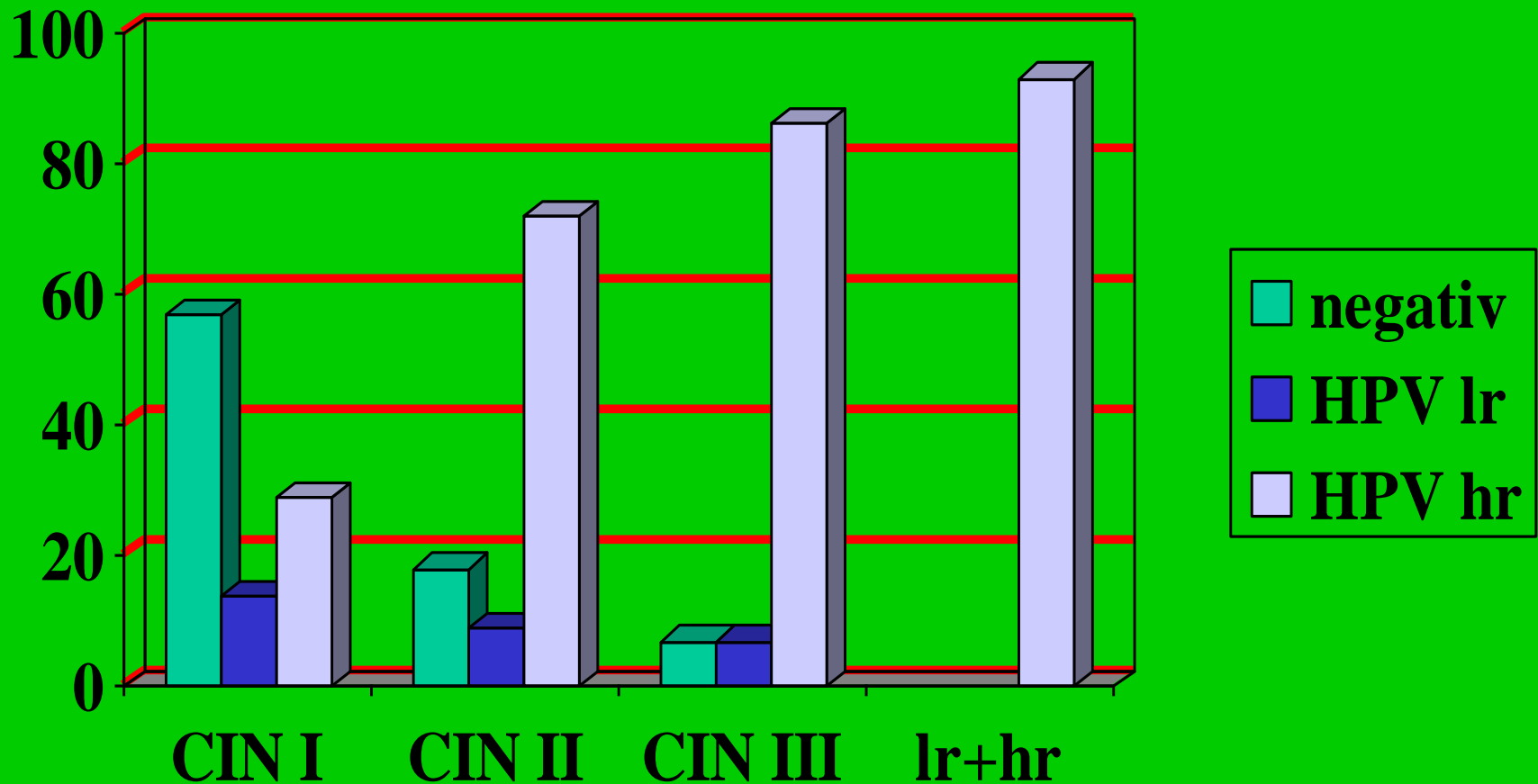
negativ

HPV hr/lr

Sequenzrg.

negativ

Nachweis von HPV-DNA in viralen Läsionen der Portio in%



Molekularpathologische HPV-Detektion

Methodische und differentialdiagnostische Aspekte

Prof. Dr. med. Klaus Richter
Dr. med.vet. Katrin Henneicke

Prof.Dr.med Klaus Richter
www.pathologie-richter.de eMail: richter@pathologie-richter.de