

Aus dem
Department für Diagnostische Labormedizin
der Universität Tübingen
Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie der
Viruskrankheiten

**Prävalenz und Risikofaktoren oraler HPV-Infektionen im
ersten Jahr nach Transplantation bei Patienten der
DZIF-Transplantationskohorte am Standort Tübingen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Klostermann, Alisha

2024

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. T. Ganzenmüller

2. Berichterstatter: Professor Dr. R. Ladurner

Tag der Disputation: 29.09.2023

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	7
Abbildungsverzeichnis	7
Tabellenverzeichnis	7
Abkürzungsverzeichnis	9
Genderhinweis	10
1 Einleitung	11
1.1 Humane Papillomviren	11
1.2 Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich	12
1.3 Orale HPV-Infektionen bei immunsupprimierten Patienten	14
1.4 Risikofaktoren für die Entwicklung oraler HPV-Infektionen	15
1.5 DZIF-Transplantationskohorte	16
1.6 Wissenschaftliche Fragestellung dieser Dissertation	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Geräte	19
2.2 Fertige Reaktionssysteme	20
2.3 Medien und Puffer	20
2.4 Oligonukleotide	21
2.5 Verbrauchsmaterialien	21
2.6 Sonstige Materialien	22
2.7 Studiendesign	22
2.8 Ethikvoten	23
2.9 Aufklärung und Einverständniserklärung der Patienten	23
2.10 Zusammensetzung der Patientenkohorte für diese Studie aus der DZIF-Tx Studienpopulation	23
2.11 Patientendemographie und klinische Daten	25
2.12 Entnahme und Lagerung der bukkalen Abstriche (DZIF-Tx-Kohorte)	29
2.13 Aufbereitung von Abstrichprobenaliquots und DNA-Extraktion	29
2.14 Durchführung des Line-Probe-Assays (Inno-LiPA)	30
2.15 HPV-PCR mit dem CP4/5-Primerpaar	31
2.16 HPV nested-PCR ("MY09/11" bzw. "GP5 ⁺ /6 ⁺ ")	32
2.17 Aufreinigung der DNA-Fragmente aus dem Agarosegel	33

2.18	Sanger-Sequenzierungen	33
2.19	Quantitative Real-Time PCRs (qPCR) für HPV18 bzw. das zelluläre PGK 1 Gen	34
2.20	Zellkultur	35
2.21	Kontrollgruppe	35
2.22	Statistik	36
3	Ergebnisse	37
3.1	Vorbereitende Experimente und Methodenetablierung	37
3.1.1	Etablierung des Einsatzvolumen der in PreservCyt-Fixiermedium konservierten bukkalen Abstriche	37
3.1.2	Analyse des Einflusses des Abstrichnehmers auf die Abstrichqualität	38
3.1.3	Validierung des Line-Probe-Assays mithilfe der zellulären PGK 1 qPCR	39
3.1.4	Validierung der Aufbereitungsmethode der Probenaliquots	40
3.2	Ergebnisse des HPV-Screenings und der Genotypisierung	41
3.3	Ergebnisse der quantitativen Messung des Referenzgens PGK 1 mittels qPCR bei allen bukkalen Abstrichen der Kohorte	42
3.4	Zusammenfassung der erhobenen klinischen Daten und Patientendemographie	45
3.4.1	Alter, Geschlecht und Art der Transplantation	45
3.4.2	Immunsuppressive Medikation (Subkohorte)	48
3.4.3	Primäre Nichtfunktion des transplantierten Organs/Abstoßungsreaktionen (Subkohorte)	49
3.5	Auswertung der Ergebnisse der HPV-Testungen	49
3.5.1	HPV-Epidemiologie in der Gesamtgruppe	49
3.5.2	HPV-Epidemiologie in der Subkohorte	53
3.6	Einfluss von Alter und Geschlecht als Risikofaktor für eine HPV-Infektion	53
3.7	Analyse weiterer Risikofaktoren für eine HPV-Infektion	55
3.8	Statistische Auswertung nach Ausschluss von Patienten mit Proben mit niedrigem Zellgehalt	58
3.9	Untersuchung weiterer Folgeabstriche von HPV-positiven Patienten	60
3.10	HPV-Screening der Kontrollgruppe	60
4	Diskussion	61
4.1	Reaktivierung von HPV-Infektionen nach Transplantation	61

4.2	Einordnung der HPV-Prävalenz _____	62
4.3	Vorkommen von HPV Typen und Infektionsdauer _____	66
4.4	Risikofaktoren für eine orale HPV-Infektion _____	67
4.5	Limitationen der Studie _____	70
4.6	Schlussfolgerung _____	71
5	Zusammenfassung _____	72
6	Literaturverzeichnis _____	74
7	Erklärung zum Eigenanteil _____	78
8	Anhang _____	79
8.1	Patienteninformation und Einwilligungserklärung zur Transplantationskohorte des Deutschen Zentrums für Infektionsforschung _____	79
8.2	PCR-Programme _____	94
8.2.1	Thermocycler Programm mit Inno-LiPA Primern _____	94
8.2.2	Thermocycler Programm für die PCR mit dem CP4/5-Primerpaar ____	94
8.2.3	Thermocycler Programm für die PCR „My09/11“ im Rahmen der nested- PCR „My09/11“ bzw. „GP5 ⁺ /6 ⁺ “ _____	95
8.2.4	Thermocycler Programm für die PCR „GP5 ⁺ /6 ⁺ “ im Rahmen der nested- PCR „My09/11“ bzw. „GP5 ⁺ /6 ⁺ “ _____	95
8.2.5	Thermocycler Programm für die qPCR auf PGK 1 und HPV18 _____	96
9	Danksagung _____	97
10	Lebenslauf _____	98

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht HPV-assoziiierter Tumoren in den USA.	13
Abbildung 2: Übersicht der Menge (A), Verarbeitung und Lagerung (B) der Bioproben.	17
Abbildung 3: Zusammensetzung der Patientenkohorte für diese Studie aus der DZIF-Tx Studienpopulation.	25
Abbildung 4: Beispielsformular aus der DZIF-Datenbank.	26
Abbildung 5: Analyse des Einflusses der Abstrichnehmer auf die Abstrichqualität.	38
Abbildung 6: Bukkale Abstriche der Kohorte nach Zeitpunkten und HPV-Status (Inno-LiPA) aufgeteilt.	41
Abbildung 7: Anteil der HPV-positiven Abstriche zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation (Kohorte).	42
Abbildung 8: Quantitative Messung des Referenzgens PGK 1 mittels qPCR bei allen BS der Kohorte.	43
Abbildung 9: Quantitative Messung des Referenzgens PGK 1 bei allen bukkalen Abstrichen in Abhängigkeit zum HPV-Status.	44
Abbildung 10: Anteil der Transplantationsempfänger aufgeteilt nach Transplantationsart bei den verschiedenen Messzeitpunkten (0, 6, 12 Monate und Subkohorte (S)).	46
Abbildung 11: Patienten der Subkohorte aufgeteilt nach zur Transplantation führender Vorerkrankung.	47
Abbildung 12: Patienten aufgeteilt nach immunsuppressiver Medikation.	48
Abbildung 13: Alter zum Transplantationszeitpunkt aufgeteilt nach HPV-Status in der Gesamtkohorte.	54
Abbildung 14: HPV-Status in der Subkohorte aufgeteilt auf die Medikamentengruppen.	57

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der Geräte.	19
Tabelle 2: Fertige Reaktionssysteme.	20
Tabelle 3: Medien und Puffer.	20
Tabelle 4: Oligonukleotide.	21
Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien.	21
Tabelle 6: Sonstige Materialien.	22
Tabelle 7: Kategorisierung der Transplantationsgründe in 5 Kategorien.	28
Tabelle 8: Mastermix für die PCR mit dem CP4/5-Primerpaar.	31
Tabelle 9: Mastermix für die PCR mit „My09/11“.	32
Tabelle 10: Mastermix für „GP5 ⁺ /GP6 ⁺ “.	33
Tabelle 11: Mastermixansatz für die qPCR.	35
Tabelle 12: Etablierung des Einsatzvolumens der Aliquots mittels qPCR auf PGK 1.	37
Tabelle 13: Validierung des Inno-LiPAs mittels qPCR auf PGK 1 und einer HeLa-Zellverdünnung.	39

Tabelle 14: HPV Detektion in verschieden aufbereiteten Proben mittels Inno-LiPA und qPCR auf HPV18	40
Tabelle 15: Geschlechterverhältnis und Altersmedian zu verschiedenen Messzeitpunkten	45
Tabelle 16: Klinische Daten der HPV-positiven Patienten in der Kohorte (n=17)	50
Tabelle 17: Risikofaktoren der Patienten in der Subkohorte aufgeteilt nach HPV-Status.....	55
Tabelle 18: Risikofaktoren nach HVP-Status aufgeteilt bei dem Subkollektiv-Patienten mit mindestens 3 Abstrichen mit C_P-Wert <33 (n=90)	59
Tabelle 19: Programm PCR mit Inno-LiPA Primern.....	94
Tabelle 20: Programm Thermocycler für die PCR mit dem CP4/5-Primerpaar ...	94
Tabelle 21: Programm im Thermocycler für die PCR „My09/11“.....	95
Tabelle 22: Programm im Thermocycler für die PCR mit „GP5⁺/6⁺“ Primern.....	95
Tabelle 23: Programm qPCR	96

Abkürzungsverzeichnis

ADPKD	Autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung
ATG	Antithymozytenglobulin
BS	Buccal swab
C _P -Wert	Crossing Point
DZIF	Deutsches Zentrum für Infektionsforschung
DZIF-Tx-Kohorte	DZIF-Transplantationskohorte
EBV	Epstein-Barr-Virus
GvHD	Graft-versus-Host-Disease
HHV-8	Humanes Herpes Virus-8
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HNSSC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma
HR-HPV	High-Risk HPV
HSCT	Stammzelltransplantation
HUS	Hämolytisch urämisches Syndrom
Inno-LiPA	Inno-LiPA HPV Genotyping EXTRA II
LR-HPV	Low-Risk HPV
LTX	Lebertransplantation
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MMF	Mycophenolat-Mofetil
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PGK 1	Phosphoglyceratkinase-1
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
QPCR	Quantitative Realtime PCR
RCF	Relative Zentrifugalkraft
RPTX	Nieren- und Pankreastransplantation
RTX	Nierentransplantation
SD	Standardabweichung
Tx	Transplantation

Genderhinweis

In der vorliegenden Dissertation wird zwecks leichter Lesbarkeit und Übersichtlichkeit die männliche Sprachform bei personenbezogenen Substantiven und Pronomen verwendet. Hierdurch soll keine Benachteiligung des weiblichen Geschlechts impliziert werden, sondern dies lediglich im Sinne der sprachlichen Vereinfachung als geschlechtsneutral verstanden werden.

1 Einleitung

1.1 Humane Papillomviren

Bei den humanen Papillomviren (HPV) handelt es sich um kleine, unbehüllte Viren mit einem doppelsträngigen DNA-Genom. Dieses ist zirkulär aufgebaut und umfasst ungefähr 8000 Basenpaare. Das ikosaedrische Kapsid hat einen Durchmesser von 52-55 nm. HPV gehören zur Familie der Papillomaviridae. Mittlerweile sind über 200 Typen bekannt (Bzhalava et al., 2015). Papillomviren sind wirtsspezifisch und epitheliotrop, das heißt HPV infizieren nur Epithelzellen des Menschen.

Die Transmission von HPV findet hauptsächlich über den Sexualverkehr statt (D'Souza et al., 2009). Die HPV-Infektion ist eine der häufigsten sexuell übertragbaren Krankheiten weltweit (Haedicke and Iftner, 2013). Vertikale Transmission von der Mutter auf das Kind unter der Geburt beispielsweise bei Kindern mit rekurrerender Larynxpapillomatose wurden ebenfalls beschrieben (Fields Virologie, 2013). Vermutlich dienen Mikrotraumata an der obersten Epithelschicht als Eintrittspforte. Die Viren infizieren Zellen in der Basalzellschicht, wo sie sich intrazellulär replizieren und persistieren (Doorbar et al., 2012, Haedicke and Iftner, 2013, McBride, 2008).

HPV-Infektionen werden für die Entstehung verschiedener benignen und malignen anogenitalen Erkrankungen wie zum Beispiel Zervixkarzinome, Krebsvorstufen und anogenitale Warzen verantwortlich gemacht (Di Domenico et al., 2018). Zudem wird HPV mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich in Verbindung gebracht (HNSSC für engl. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma) (Syrjänen et al., 2011, Marur et al., 2010, Gillison et al., 2000).

Humane Papillomviren lassen sich je nach Entartungsrisiko in verschiedene Gruppen unterteilen. Als High-Risk HPV (HR-HPV) gelten die Typen: HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, mit denen die Entstehung maligner Tumore besonders an der Zervix assoziiert ist. Die Typen 26, 30, 34, 53, 66, 67, 68, 69, 70, 73, 82, 85, 97 gelten als Intermediate-Risk Typen. Bei Menschen mit Epidermodysplasia verruciformis gelten die HPV Typen 5 und 8 ebenfalls als Intermediate-Risk Typen (International Agency for Research on Cancer, April 2022). Zu den Low-Risk HPV (LR-HPV) Typen zählen: 6,

11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81. LR-HPV führen eher zu gutartigen Veränderungen wie Warzen oder Kondylomen (Muñoz et al., 2003).

Anhand der Gensequenz für das Oberflächenprotein L1 lassen sich HPV weiter in die Genera Alpha, Beta, Gamma, My und Ny unterteilen (de Villiers et al., 2004). Das Genus Alpha enthält die meisten HR-HPV Typen, welche vor allem mukosal vorkommen. Typen der Genera Beta und Gamma finden sich vor allem an der Haut (de Villiers et al., 2004).

HR-HPV können persistente Infektionen der Zervix oder anderer Prädispositionsstellen verursachen, im weiteren Verlauf können onkogene Veränderungen am Gewebe entstehen (Rositch et al., 2013, Alsidawi et al., 2017, Kjaer et al., 2010, Cogliano et al., 2005).

1.2 Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich

Zu den Kopf-Hals-Tumoren zählen Tumore im Mund und Rachenraum, an Lippen, Hypopharynx, Nasopharynx und Larynx. 90 % der Kopf-Hals-Tumore sind Plattenepithelkarzinome. Im Jahr 2020 waren Kopf-Hals-Tumore weltweit die sechsthäufigste Krebsart (Sung et al., 2021). In Deutschland erkrankten jährlich ungefähr 4500 Frauen und 13000 Männer an Kopf-Hals-Tumoren. Dabei ist das 10-Jahres-Überleben mit 50 % bei Frauen und 39 % bei Männern relativ schlecht (Barnes et al., 2016). Patienten unter Immunsuppression erkrankten deutlich häufiger an solchen Krebserkrankungen als die Normalbevölkerung (Alsidawi et al., 2017, Grulich et al., 2007, Öhman et al., 2015). Lange galten Alkohol- und Nikotinkonsum, sowie das in Asien verbreitete Kauen von Betelnüssen als einzige Risikofaktoren für Tumore in der Mundhöhle (Lee et al., 2005, Yete et al., 2018, Parkin and Bray, 2006, Shiu and Chen, 2004). International fiel vor einigen Jahren eine steigende Tendenz an Kopf-Hals-Tumoren bei gleichzeitig sinkendem Nikotin- und Alkoholkonsum auf. Dies wird mit einer steigenden Inzidenz von persistierenden oralen HPV-Infektionen in Zusammenhang gebracht (Barnes et al., 2016, Chaturvedi et al., 2013, Chaturvedi et al., 2011, Syrjänen et al., 1983). Die prozentuale Anzahl an HPV-DNA positiven Tumoren schwankt weltweit zwischen 6,8 % und 47,7 % und je nach Region (Yete et al., 2018,

Anantharaman et al., 2017). Aus Deutschland sind diesbezüglich bisher nur wenige Daten bekannt.

In oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen kommen am häufigsten die HPV Typen HPV16 und HPV18 vor (Kreimer et al., 2005, Syrjänen et al., 2011, Marur et al., 2010). Mittlerweile werden orale HPV-Infektionen mit den Typen 16 und 18 ebenfalls als Risikofaktoren betrachtet (Gillison et al., 2012, Marur et al., 2010). Allerdings wird in den meisten Studien nur auf bestimmte HR-Typen getestet, sodass exakte Daten darüber, welche HPV Typen oral vorkommen, bislang fehlen (Syrjänen et al., 2011).

Oropharyngeale Tumore, die HPV-assoziiert sind, haben in den USA mittlerweile sogar die Zervixtumore als häufigste HPV-bedingte Tumorart überholt (Jemal et al., 2013).

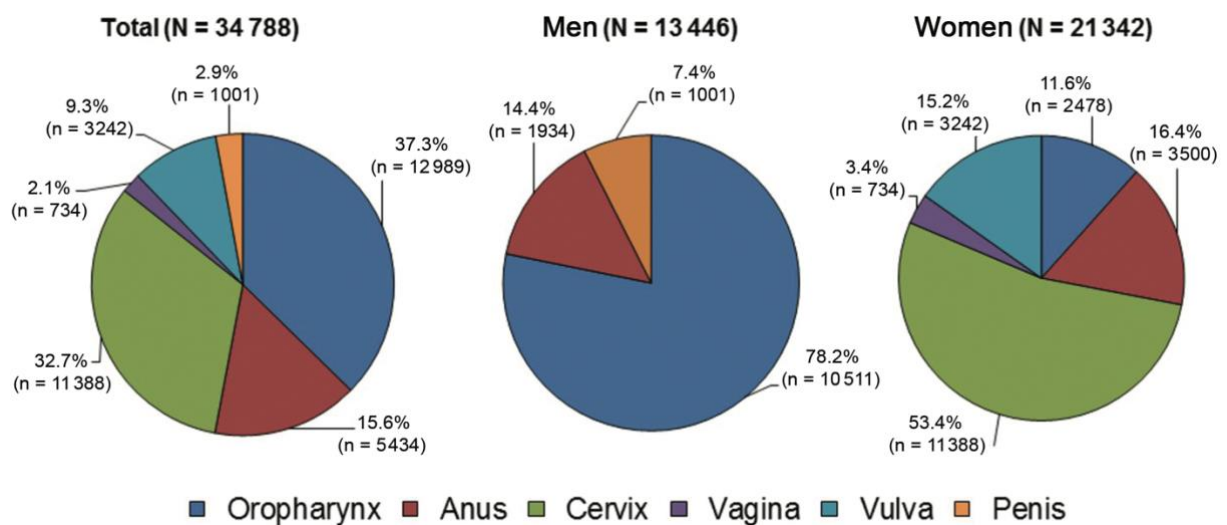


Abbildung 1: Übersicht HPV-assoziiierter Tumoren in den USA. Die Abbildung wurde im Original aus der Publikation von Jemal et al., 2013 übernommen (Jemal et al., 2013). Während bei Frauen die HPV-assoziierten Zervix und Analkarzinome noch häufiger sind, ist bei Männern das Oropharynxkarzinom bereits die häufigste HPV-assoziierte Tumorart. Oropharynxkarzinome machen insgesamt 37,3 % der HPV-assoziierten Tumore aus und haben damit die Zervixtumore als häufigste durch HPV-bedingte Tumorart überholt.

Patienten mit HPV-DNA positiven Tumoren sind häufiger Nichtraucher und haben ein früheres Erkrankungsalter als Patienten mit HPV-DNA negativen Tumoren. Insgesamt konnte bei ihnen auch eine bessere Prognose beobachtet werden (Deschler et al., 2014). Wie genau orale HPV-Infektion zur Entstehung von Hals-Kopf-Tumoren führen, kann bisher nicht erklärt werden.

1.3 Orale HPV-Infektionen bei immunsupprimierten Patienten

Im Vergleich zur Normalbevölkerung haben immunsupprimierte Menschen ein deutlich erhöhtes Risiko an Krebs zu erkranken. Dies wird vor allem auf ein erhöhtes Risiko an Infektionen mit potentiell onkogenen Viren wie zum Beispiel Epstein-Barr-Virus (EBV), Humanes Herpesvirus-8 (HHV-8) und HPV zurückgeführt (Alsidawi et al., 2017, Grulich et al., 2007).

HPV-assoziierte Krebsarten wie zum Beispiel Kopf-Hals-Tumore kommen bei Transplantierten deutlich häufiger vor (Alsidawi et al., 2017, Harris and Penn, 1981, Collett et al., 2010, Attner et al., 2010). HIV-positive Probanden erkranken signifikant häufiger und länger an HPV-Infektionen als HIV-negative Probanden (Beachler et al., 2012, Gravitt, 2012, Strickler et al., 2005). Woran das liegt, ist nicht vollständig geklärt. Möglicherweise werden alte HPV-Infektionen durch das unterdrückte Immunsystem wieder reaktiviert (Maglennon et al., 2014, Maglennon et al., 2011, Doorbar, 2013). Es konnte gezeigt werden, dass das Auftreten von HPV-Infektionen invers mit der CD4-Zellzahl korreliert (Beachler et al., 2012, Gravitt, 2012). Dies lässt vermuten, dass es einen Zusammenhang zwischen HPV-Infektionen und der T-Zell Immunität gibt (Gravitt, 2012).

Bei Patienten nach Transplantation (Tx) mit iatropher Immunsuppression gibt es bisher nur wenige Studien, in denen die orale HPV-Prävalenz untersucht wird. In den meisten Studien wurden nur Patienten einer transplantierten Organgruppe auf HPV untersucht (Nieren- oder Stammzelltransplantationen). Daten zu anderen Organgruppen wie zum Beispiel Leber fehlen größtenteils völlig (Faber et al., 2020, Rose et al., 2006, Winer et al., 2015). Zudem sind die Patientenkollektive meistens sehr klein und häufig fehlt eine Kontrollgruppe (Winer et al., 2015, Sindrewicz et al., 2020, Szubinska-Lelonkiewicz et al., 2018). Außerdem gibt es kaum Daten zur Dauer oraler HPV-Infektionen bei Transplantierten.

1.4 Risikofaktoren für die Entwicklung oraler HPV-Infektionen

Bisher ist wenig über die Risikofaktoren von persistenten, oralen HPV-Infektionen bekannt (D'Souza et al., 2020, D'Souza et al., 2017, Conway et al., 2016). Bei anogenitalen Infektionen ist klar, dass Rauchen und wechselnde Sexualpartner eine HPV-Infektion begünstigen können (Gillison et al., 2012). Besonders zu Alter und Geschlecht als Risikofaktoren gibt es bisher widersprüchliche Daten (Kreimer et al., 2010, Gillison et al., 2012, Faber et al., 2020).

Transplantierte bekommen häufig jahrelang eine Kombinationstherapie aus mehreren immunsupprimierenden Medikamenten zur Verhinderung einer Organabstoßung (Alsidawi et al., 2017). Dabei sind die häufigsten Medikamentengruppen Kortikosteroide, Calcineurininhibitoren (Tacrolimus und Cyclosporin A), Mycophenolat-Mofetil (MMF) und mTor-Inhibitoren (Everolimus, Sirolimus), Methotrexat und Azathioprin. Die meisten Immunsuppressiva wirken dabei unterschiedlich stark auf die T-Zell-Immunität: Calcineurininhibitoren hemmen die Produktion von Interleukin-2 und vermindern damit die Aktivierung von T-Lymphozyten, Kortikosteroide hemmen verschiedene Entzündungsmediatoren und mTor-Inhibitoren hemmen einen Interleukin-vermittelten Zellzyklus, wodurch die Produktion von T-Lymphozyten gesenkt wird. MMF senkt selektiv die Produktion von T- und B-Lymphozyten. Methotrexat und Azathioprin gelten als Zytostatika und hemmen beide die IL-2-induzierte Zellproliferation. Dabei hemmt Azathioprin vor allem T-Lymphozyten, Methotrexat dagegen vor allem B-Lymphozyten (Thomas Karow, 2022). Insgesamt gilt Tacrolimus bisher als eines der stärksten Immunsuppressiva (Halleck et al., 2013).

Der Einfluss der jeweiligen immunsupprimierenden Medikation von Transplantpatienten auf die orale HPV-Prävalenz ist bisher kaum untersucht worden. Allerdings konnte beobachtet werden, dass Patienten unter Einnahme von Calcineurininhibitoren, vor allem bei der Einnahme von Tacrolimus, häufiger Tumorerkrankungen bekommen (Rabinovics et al., 2014, Alsidawi et al., 2017).

1.5 DZIF-Transplantationskohorte

Die DZIF-Transplantationskohorte (DZIF-Tx-Kohorte) ist eine multizentrische, prospektive Studie des Deutschen Zentrums für Infektionsforschung (DZIF) zur Sammlung und Untersuchung longitudinaler Daten und biologischer Proben von Patienten nach Transplantation. In den Transplantationszentren Tübingen, München, Heidelberg und Hannover-Braunschweig werden Patienten mit geplanter Herz-, Lungen-, Nieren-, Pankreas- und Stammzelltransplantation in die Studie aufgenommen. Einschlusskriterien sind die Transplantation, sowie eine Einverständniserklärung des Patienten oder Erziehungsberechtigten (Karch et al., 2021). Bis Januar 2022 konnten so insgesamt 204 Patienten rekrutiert werden (DZIF-Transplantationskohorte, 2022).

Zum Zeitpunkt der Transplantation, nach 3 Monaten, 6 Monaten, 9 Monaten, 12 Monaten und danach jährlich, sowie bei infektiologischen Komplikationen, werden die Patienten erneut einbestellt und biologische Proben gesammelt, sowie medizinische Daten erhoben. In allen teilnehmenden Zentren werden bei jedem Termin zusätzlich Informationen zur Immunsuppression, dem infektiologischen Geschehen und Organfunktion erfasst. Zusätzlich werden Bioproben wie Blut, aufgearbeitete periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC für engl. *Peripheral Blood Mononuclear Cell*), Urin und Stuhl als Bioproben von Studienassistenten nach einem Standardprotokoll gesammelt. Am Standort Tübingen werden zusätzlich noch bukkale Abstriche, das heißt Wangenschleimhaut-Abstriche, die in einem speziellen Medium aufbewahrt werden, gesammelt.

Zum Baseline-Datum, am Tag der Transplantation, werden unter anderem auch Ergebnisse von serologischen Tests und andere transplantationsrelevanten Daten erfasst. Zudem werden Informationen über die Transplantation und den postoperativen Verlauf gesammelt (Karch et al., 2021).

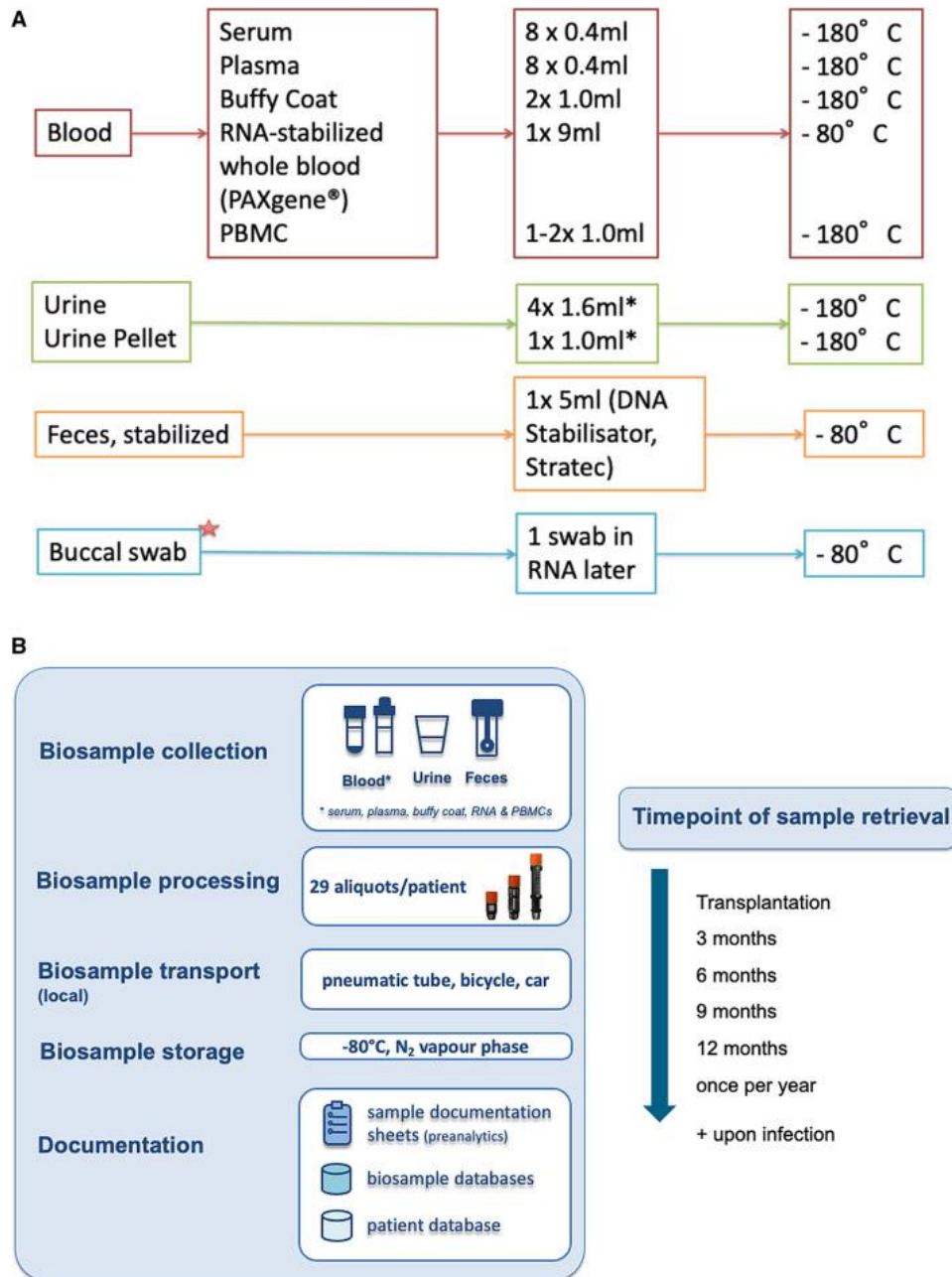


Abbildung 2: Übersicht der Menge (A), Verarbeitung und Lagerung (B) der Bioproben.

Die Abbildung wurde im Original aus der Publikation von Karch et al. 2021 übernommen (Karch et al., 2021). Pro Patient der DZIF-Tx-Kohorte werden Urin-, Stuhl-, Blutproben und bukkale Abstriche* (nur am Tübinger Standort) entnommen und in 29 Aliquots aufbereitet und gelagert. Die bukkalen Abstriche wurden in Tübingen allerdings in einem PreservCyt-Fixiermedium konserviert. Die Proben werden im ersten Jahr nach Tx alle drei Monate und dann jährlich gesammelt.

1.6 Wissenschaftliche Fragestellung dieser Dissertation

Die DZIF-Tx-Kohorte bietet die Möglichkeit bukkale Abstriche über einen longitudinalen Zeitraum zu untersuchen. Zudem ermöglicht die DZIF-Datenbank eine Analyse von Patientendaten wie zum Beispiel Alter, Geschlecht und medikamentöser Immunsuppression.

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass transplantierte Patienten im Vergleich zur Normbevölkerung ein erhöhtes Risiko haben an Kopf-Hals-Tumoren zu erkranken (Alsidawi et al., 2017, Grulich et al., 2007). Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass es bei transplantierten Patienten aufgrund der Immunsuppression häufiger zu Reaktivierung von HPV-Infektionen kommt (Maglennon et al., 2014, Maglennon et al., 2011, Doorbar, 2013). Womöglich akquirieren sie auch häufiger High-Risk HPV Infektionen und/oder haben länger andauernde Infektionen. Inwiefern diese Hypothesen zutreffen und ob die HPV-Prävalenz, sowie die Anzahl verschiedener HPV Typen im ersten Jahr nach Transplantation wirklich ansteigt, wurde in dieser Arbeit genauer untersucht.

Daten bezüglich der oralen HPV-Prävalenz in Deutschland fehlen bislang weitestgehend. Ob Alter und Geschlecht eine Rolle beim Auftreten von oralen HPV-Infektionen spielen ist bisher umstritten (Kreimer et al., 2010, Gillison et al., 2012, Faber et al., 2020). Zu potentiellen Risikofaktoren wie Vorerkrankungen, transplantierte Organgruppe oder verschiedenen Immunsuppressionsklassen ist die Datenlage sehr dünn.

Ziel dieser Arbeit war es das Auftreten von HPV-Infektionen im ersten Jahr nach Transplantation besonders bezüglich der Prävalenz solcher Infektionen, auftretender HPV Genotypen und Infektionsdauer genauer zu untersuchen, sowie potentielle Risikofaktoren zu ermitteln. Das Wissen über die Prävalenz der verschiedenen HPV Genotypen und Persistenz bei Transplantierten ist relevant, um die Zusammenhänge zwischen Kopf-Hals-Tumoren und HPV zu begreifen.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Tabelle 1: Auflistung der Geräte

Geräte	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese-Kammern, Sub Cell GT Mini-Sub Cell GT Wide Mini-Sub CII GT	Bio-Rad
CO ₂ Inkubator, C200	Labotect
Elektrische Einkanalpipette Mehrfachpipette Research Pipetten, Pipetman 10, 20, 200, 1000 Pipettierhilfe pipetus	Eppendorf Research Pro Eppendorf Gilson Hirschmann Laborgeräte
Feinwaage, GJ und 770	Kern
Kamerasystem (Agarosegele), Gel Imager	Intas
Gerät zur HPV Detektion: Auto Lipa 48	Innogenetics
Geräte zur Nukleinsäure-Extraktion Magnapure96 DNA EZ1 Qiasymphony	Roche Qiagen Qiagen
Mikroskop Leica DM IRB	Leica
PCR-Gerät, PCT 200 Peltier Thermal Cycler	MJ Research Bio-Rad
PCR-Maschine Lightcycler 480 II	Roche
Photometer- ND-1000	Nanodrop
Sterilbank HERA safe	Heraeus Instrument
Thermomixer compact	Eppendorf
Vortexer, REAXTop	Heidolph
Zählkammer, Neubauer 0, 100 mm Tiefe, 0,0025 mm ²	Assistent
Zentrifugen: 5415C, 5417C, 5424R, 5804R Rotina 420	Eppendorf Hettich

2.2 Fertige Reaktionssysteme

Tabelle 2: Fertige Reaktionssysteme

Name	Hersteller	Verwendungszweck
EZ1 DNA Tissue KIT	Qiagen	DNA-Extraktion
HPV Genotyping EXTRA II	Fujirebio	HPV Genotypisierung
Viral NA Small Volume Kit	Roche	DNA-Extraktion
Qiaquick Gel Extraktionskit	Qiagen	Gelextraktion
Qiasymphony DSPD NA Midi Kit	Qiagen	DNA-Extraktion
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen	Für die Herstellung einer Standardreihe mit E. coli

2.3 Medien und Puffer

Tabelle 3: Medien und Puffer

Name	Hersteller
DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle Medium)	Fertiglösung mit 2,5 ml Zusatz von 50g/l Gentamycin und 10 % (v/v) fötalem Kälberserum (FKS, PAA Laboratories)
Ethidiumbromidlösung 0,025 %	Tropfflaschen einer fertigen Lösung (250ug/ml) Carl Roth
Lightcycler 480 SYBR Green I Master	Roche
PBS	Dulbecco`s Gibco
Preserve Cyt (Thin Prep)	Hologic
Trypsin-EDTA (Invitrogen)	0,5g Trypsin (1:250) und 0,2g EDTA pro Liter Modifizierter Pucks` Salzlösung A
Wasser für Chromatographie	Merck
50x TAE Puffer	2M Tris 1M Essigsäure 0,1M EDTA

2.4 Oligonukleotide

Tabelle 4: Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz 5' → 3'	Zweck
PGK Forward	CTGTGGGGGTATTTGAATGG	qPCR
PGK Reverse	CTTCCAGGAGCTCCAAACTG	qPCR
HPV 18 E6*I Forward	CAAGACAGTATTGGAACCTACAGAGGTG	qPCR
HPV 18 E6*I Reverse	CTGGCCTCTATAGTGCCCAGC	qPCR
CP 4	ATGGTACARTGGGCATWTGA	PCR
CP 5	GAGGYTGCAACCAAAAAMTGRCT	PCR
My09	CGTCCMARRGGAWACTGATC	PCR
My11	GCMCAGGGWCATAAYAATGG	PCR
GP5 ⁺	TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC	PCR
GP6 ⁺	GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC	PCR

2.5 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Polyethylenabstriche	Sterile Polyester applicator swab, Texwipe e-Swab™, Virokult, Amies
LiPA Wanne, Scan Reading und Liras Reading Template	Fujirebio
Zellkulturschalen 100 mm	Thermo Scientific
Pipettenspitzen, diverse	Molecular Bio Products, Biozym, Greiner, Eppendorf, Sarstedt
Plastikpipette: 5, 10, 25 ml	Beckton/Dickinson
PCR Reaktionsgefäße: 0,2 ml	Biozym
Reaktionsgefäße: 1,5 und 2ml	Eppendorf, Sarstedt

Fluid X External Thread Screw Cap	Brooks Life Science
Lightcycler 480 multi well plate, 96 white	Roche
Blue Cap Tubes, 15 ml und 50 ml	Greiner bio-one

2.6 Sonstige Materialien

Tabelle 6: Sonstige Materialien

Sonstige Materialien	Beschreibung
HeLa (ATCC-Nr: CCL-2™)	HPV18 positive Zervixkarzinom-Zelllinie ^a
SiHa (ATCC HTB-35™)	HPV16 positive Zelllinie ^b
Generuler™ 1kb DNA-Ladder, 0,1 µg/µl (ThermoFisher Scientific)	DNA – Größenstandard für die Gelelektrophorese
E. coli DH5 alpha	Bakterienstamm

^a(Gey et al., 1952).

^b(Friedl et al., 1970).

2.7 Studiendesign

Alle Patienten der DZIF-Tx-Kohorte mit mindestens einem bukkalen Abstrich (BS für engl. *buccal swab*) zur Baseline wurden in unsere Studie aufgenommen. Abstriche von verschiedenen Zeitpunkten (0, 6, 12 Monate und ggf. später) wurden mittels Line-Probe-Assays (Inno-LiPA für Inno-LiPA HPV Genotyping EXTRA II) auf HPV-DNA untersucht. HPV-positive Proben, die im Inno-LiPA nicht eindeutig typisiert werden konnten (= „HPV-X“), wurden mittels der Sanger-Methode mit Hilfe der Primer CP4/5, MY09/11 und GP5⁺/6⁺ sequenziert.

Zur Qualitätskontrolle wurde von allen Abstrichen eine quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) spezifisch für ein konstitutives zelluläres Referenzgen (= engl. *housekeeping gene*) Phosphoglyceratkinase-1 (PGK 1) durchgeführt.

Die klinischen Daten wurden aus der DZIF-Datenbank entnommen und statistisch auf Zusammenhänge mit einer oropharyngealen HPV-Infektion untersucht.

2.8 Ethikvoten

Diese Studie wurde durch die Ethikkommission der Eberhard-Karls-Universität Tübingen bewilligt. Es liegt jeweils ein Ethikvotum für das Sammeln der bukkalen Abstriche und Daten im Rahmen der DZIF-Tx-Kohorte (327/2014BO1), die HPV-Genotypisierung der bukkalen Abstriche (629/2020BO2) und die Kontrollgruppe (205/2021A) vor. Die DZIF-Tx-Kohorte an sich wurde umfangreich bezüglich des Datenschutzes und der Ethik begutachtet. Die Nutzung der Biomaterialien für die hier durchgeführte Studie wurde zudem vom Scientific Steering Committee der Tx-Kohorte nach einem Antragsprozess genehmigt.

2.9 Aufklärung und Einverständniserklärung der Patienten

Alle Patienten, die an der Studie teilnehmen, wurden durch einen Arzt aufgeklärt und haben eine Einverständniserklärung für die Teilnahme an der DZIF-Tx-Kohorte unterschrieben. Darin wurde darauf hingewiesen, dass ihre Daten pseudonymisiert werden. Zudem wurden die Patienten darüber aufgeklärt, dass sie jederzeit ihre Studienteilnahme widerrufen können. In der Einverständniserklärung wurde darüber aufgeklärt, dass die Patienten nicht über die Ergebnisse der durchgeführten Studien informiert werden.

Der verwendete Einwilligungsbogen für Erwachsene ist im Anhang hinterlegt. Bei minderjährigen Patienten wurden die Erziehungsberechtigten aufgeklärt.

2.10 Zusammensetzung der Patientenkohorte für diese Studie aus der DZIF-Tx Studienpopulation

Im Zeitraum von April 2015 bis zum 21. Juli 2020 wurden 328 Patienten am Universitätsklinikum Tübingen in die DZIF-Transplantationskohorte aufgenommen. Transplantiert wurden solide Organe wie zum Beispiel Nieren (RTX für engl. *renal transplantation*), Leber (LTX für engl. *liver transplantation*) und Pankreas sowie Stammzellen (HSCT für engl. *haematopoietic stem cell transplantation*). In wenigen Fällen wurden Multitransplantationen wie Leber- und Nierentransplantationen oder

Nieren- und Pankreastransplantationen (RPTX für engl. *renal and pancreas transplantation*) durchgeführt.

Einschlusskriterien für diese Studie zur Prävalenz von oropharyngealem HPV nach Transplantation und der damit assoziierten Risikofaktoren waren:

- erfolgte Transplantation
- unterschriebene Einverständniserklärung des Studienteilnehmers oder des Erziehungsberechtigten
- das Vorhandensein von bukkalen Abstrichen mindestens zum Zeitpunkt der Baseline

Der Zeitpunkt der Baseline wurde als maximal 31 Tage vor Transplantation (dieser lange Zeitraum erklärt sich durch die Konditionierung der Stammzelltransplantatempfänger) und maximal 9 Tage nach Transplantation definiert. Von 328 Studienteilnehmern am Standort Tübingen bis zum 21.07.2020 waren 47 Patienten Organspender und 66 Patienten hatten entweder doch keine Transplantation erhalten oder die Einverständniserklärung widerrufen (Abbildung 3). Insgesamt erfüllten 215 Patienten aller Altersklassen die Einschlusskriterien und wurden in diese Studie aufgenommen.

Zur Erforschung der Prävalenz und Dauer von oralen HPV-Infektionen nach Transplantation, wurden bukkale Abstriche dieser 215 Probanden, soweit vorhanden, zum 6 Monats-follow-up Termin und zum 12 Monats-follow-up Termin untersucht. Abstriche, welche 140 Tage-220 Tage nach Transplantation entnommen wurden, galten als 6 Monats-follow-up, solche, die 310 Tage-548 Tage nach der Transplantation entnommen wurden, als 12 Monats-follow-up.

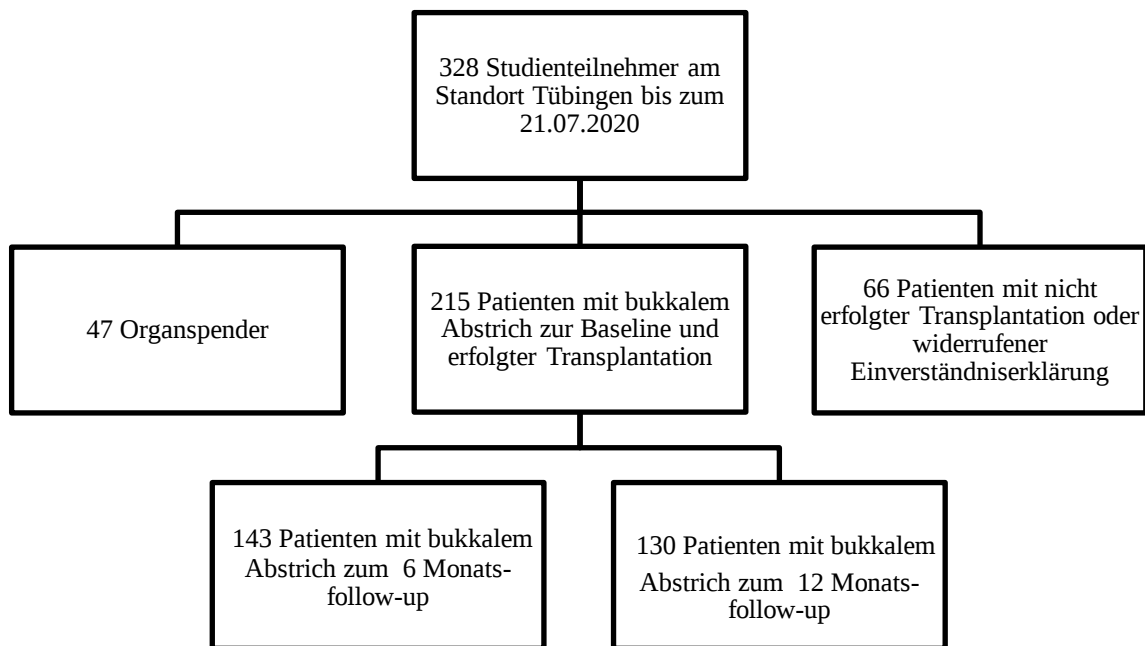


Abbildung 3: Zusammensetzung der Patientenkohorte für diese Studie aus der DZIF-Tx Studienpopulation. 142 der 215 Patienten haben einen Abstrich zum 6 Monats-follow-up abgegeben und 130 einen Abstrich zum 12 Monats-follow-up. Dabei hat nicht jeder Patient, dem ein Abstrich zum 12 Monats-follow-up entnommen wurde, auch ein Abstrich zum 6 Monats-follow-up abgegeben.

Aus 109 der untersuchten Patienten, von denen zu allen drei Zeitpunkten Abstriche entnommen wurden, wurde für diese Arbeit eine Subkohorte gebildet um die Risikofaktoren statistisch zu untersuchen.

Zum Ausschluss von Verfälschungen durch die Probenqualität wurde eine weitere Untergruppe gebildet: Hierbei wurden nur Patienten berücksichtigt, bei denen alle Proben in der zellulären PCR (siehe 2.19) einen maximalen C_P -Wert von 33 aufwiesen.

Um die Dauer oraler HPV-Infektionen zu analysieren, wurde von Patienten mit mindestens einem HPV-positiven Abstrich, alle zusätzlich abgegebenen Abstriche (3 M, 9 M, 2 J, 3 J, 4 J) in die Studie eingeschlossen.

2.11 Patientendemographie und klinische Daten

In der übergeordneten multizentrischen DZIF-Tx-Studie werden viele Parameter der Transplantationspatienten (zum Beispiel Laborbefunde, immunsuppressive Therapie, Transplantationsverlauf), sowie Daten zu den Organspendern erfasst. Die Dokumentation

in der DZIF-Datenbank erfolgt durch Studienkoordinatoren und Study Nurses bzw. medizinische Dokumentare am jeweiligen Standort (Abbildung 4).

The screenshot shows a web-based patient form in the DZIF database. The patient is Max Mustermann, born 01.01.2000. The form is divided into sections for recipient and donor information. Key fields include date of initial diagnosis, height, weight, and a table for ICD-10 codes. A 'Zelle hinzufügen' button is visible in the ICD-10 table. The form also includes checkboxes for various medical conditions and a section for previous transplantations.

Abbildung 4: Beispielsformular aus der DZIF-Datenbank.

Für diese Doktorarbeit wurden folgende Patientenparameter als mögliche Risikofaktoren für eine orale HPV-Infektion untersucht:

- Alter zum Messzeitpunkt
- Biologisches Geschlecht
- Aktuell transplantiertes Organ, Multiorgantransplantation
- Frühere Transplantation
- Zur Transplantation führende Vorerkrankungen (Tabelle 7)
- Primäre Nicht-Funktion des transplantierten Organs
- Abstoßungsreaktion
- Immunsuppressive Therapie

Die Daten wurden teils manuell in der DZIF-Datenbank abgefragt und teils durch die zentrale Studienkoordinatorin der DZIF-Tx-Kohorte als Excel-Tabellen bereitgestellt.

Bei fehlender Dokumentation wurden die Patienten aus der jeweiligen statistischen Untersuchung ausgeschlossen.

Die zur Transplantation führenden Vorerkrankungen wurden in fünf Kategorien unterteilt: Tumorerkrankungen, Autoimmunerkrankungen, metabolische Erkrankungen, andere Erkrankungen und unbekannt. Nebendiagnosen und andere Vorerkrankungen

wurden in der Studie nicht berücksichtigt. In (Tabelle 7) ist die kategoriale Unterteilung mit allen vorgekommenen Krankheiten aufgelistet.

Beim Parameter Immunsuppression wurden alle immunsuppressiven Medikamente, die bis zum 12 Monats-follow-up für mindestens 14 Tage eingenommen wurden, berücksichtigt. Nicht berücksichtigt wurde die Gabe von Antithymozytenglobulin (ATG) und Basiliximab zum Transplantationszeitpunkt aufgrund von unzuverlässiger Dokumentation. Dosisänderungen konnten ebenfalls nicht berücksichtigt werden.

Die Medikamente wurden nach Wirkmechanismus in verschiedene Klassen eingeteilt. Es wurde zwischen Kortikosteroiden, Calcineurininhibitoren (Tacrolimus und Cyclosporin A), Mycophenolat-Mofetil, mTor-Inhibitoren (Everolimus und Sirolimus), Azathioprin, Methotrexat und anderen Medikamenten (Rituximab, Cyclophosphamid und Alemtuzumab) unterschieden.

Tabelle 7: Kategorisierung der Transplantationsgründe in 5 Kategorien

Metabolische Vorerkrankung	Tumor-erkrankung	Autoimmun-erkrankung	Andere Erkrankungen	Unbekannte Erkrankungen*
Alkoholbedingte Leberzirrhose	Leber und Gallenblasentumore	IgA-Nephritis	Leberzirrhose ^e	Nephritisches Syndrom
Nephrosklerose	Leukämien ^a	Lupus Erythematodes	Purpura anaphylactoides	Nephrotisches Syndrom
Diabetes Mellitus Typ 1,2	MDS ^b	PSC ^d	Glomerulonephritiden ^f	Nephrektomie aus unbekanntem Grund
Nichtalkoholische Fettlebererkrankung	Primäre Myelofibrose	Leberzirrhose bei Autoimmunhepatitis	Fehlbildungen und Erbkrankheiten ^g	Erkrankung nicht bekannt
Alkoholische Fettlebererkrankung	Neuroendokrine Tumor	Mikroskopische Polyangitis	T-Zelldefekt	
Störung des Glykoprotein-stoffwechsels	Myeloproliferative Neoplasie		Aplastische Anämie	
	Osteomyelofibrose		HUS ⁱ	
			Vesikourethraler Reflux	

^a Leukämien (Akute lymphatische Leukämie, akute myeloische Leukämie, chronisch myeloische Leukämie).

^b MDS als Abkürzung für myelodysplastisches Syndrom.

^c Lymphome enthält Burkittlymphom und Mantelzelllymphom.

^d PSC als Abkürzung für primär sklerosierende Cholangitis.

^e Leberzirrhose unklarer Ätiologie/ Leberzirrhose durch chronische Hepatitis Infektionen.

^f Zum Beispiel fokal segmentierte Glomerulonephritis und Membranproliferative Glomerulonephritis.

^g Erbkrankheiten wie zum Beispiel ADPKD (autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung), Morbus Osler, Thalassämien, Diamond-Blackfan Anämie.

^h Tx-Organ als Abkürzung für transplantiertes Organ. Dabei akutes Organversagen, oder Versagen aufgrund von Spender-gegen Empfänger Reaktion (GvHD für engl. *Graft-versus-Host-Disease*).

ⁱ Hämolytisch urämisches Syndrom.

*Unbekannt bedeutet in diesem Fall entweder nicht dokumentiert oder die Transplantationsursache ist tatsächlich unbekannt.

2.12 Entnahme und Lagerung der bukkalen Abstriche (DZIF-Tx-Kohorte)

Die Rekrutierung der Studienteilnehmer/innen sowie die Entnahme der Abstriche erfolgte meist stationär in verschiedenen Abteilungen des Universitätsklinikums Tübingen. Die Abstriche zu den Follow-ups wurden in den Transplantationsambulanzen entnommen. Zum Abstreichen wurden Polyethylenabstrichtupfer verwendet, die mit einer sterilen Schere gekürzt und dann in 20 ml PreservCyt-Fixiermedium ans Labor versandt wurden. Die Bearbeitung der Proben erfolgte im Institut für Medizinische Virologie Tübingen durch eine medizinisch-technische Assistentin. Die Proben wurden in 5 ml Behälter aliquotiert und bei -30 °C eingelagert. Lagerort der Proben und Details zur Verarbeitung wurden in der Datenbank Centrxxx (Kairos) dokumentiert.

2.13 Aufbereitung von Abstrichprobenaliquots und DNA-Extraktion

Jeweils ein 5 ml Aliquot des Abstrichmediums wurde bei Raumtemperatur aufgetaut und gevortext. 3,5 ml hiervon wurden in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 2900 relativer Zentrifugalkraft (RCF) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein weiteres Zentrifugenröhrchen dekantiert und bei -20 °C archiviert. Weitergearbeitet wurde mit den Zell-Pellets, die in 310 µl ATL-Puffer (Qiagen) resuspendiert und in ein 2 ml Probenröhrchen überführt wurden.

Die DNA-Extraktion erfolgte dann mit dem DSP DNA Midi Kit nach Herstellerangaben auf der Qiasymphony Extraktionsplattform (Programm Complex 200 pathogen) und einem Elutionsvolumen von 60 µl.

Bei jedem Lauf wurden 10^5 SiHa-Zellen (HPV16 positiv) als Positivkontrolle und ATL-Puffer als Negativkontrolle mitgeführt. Die Überprüfung der Negativkontrollen erfolgte mit dem Inno-LiPA und die der Positivkontrolle mittels HPV Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit CP4/5 Primern (Methodik in 2.15 ausgeführt). Die extrahierte DNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.14 Durchführung Line-Probe-Assays (Inno-LiPA)

Die HPV-DNA Detektion und Genotypisierung erfolgte mithilfe des Geräts Auto-LiPA 48 und dem Kit Inno-LiPA Genotyping Extra II Tests von Fujirebo, nach dem Prinzip eines Line-Probe-Assays. Der Inno-LiPA ist ein hoch sensibler Test zur Detektion von HPV und ermöglicht die Erkennung selbst bei niedrigem Zellgehalt (Bihl et al., 2017, (Kleter et al., 1999, van Hamont et al., 2006). Die zugehörigen SPF10 Primer amplifizieren ein 65 Basenpaar langes Stück aus der L1 Genregion von HPV. Dadurch können mindestens 54 verschiedene HPV Typen gefunden werden. Der Mastermix enthält einen zusätzlichen Primer zur Amplifikation des HLA-DPB1 Gens als Qualitätskontrolle.

Der Mastermix wurde im Mastermix-Raum aufgetaut und 40 µl in jedes PCR-Tube gegeben. In einem weiteren Raum wurde jeweils 10 µl der eluierten Proben-DNA dazugegeben. Als Positivkontrolle diente die dem Kit beigelegte HPV6 positive DNA und als Negativkontrolle DNase freies Wasser. Um eine Reihenkontamination auszuschließen, wurden für je 48 Proben zwei Negativkontrollen benutzt.

Für die Amplifikation wurden die PCR-Tubes in den kalibrierten Thermocycler mit Deckelheizung gegeben (Programm siehe Tabelle 19 im Anhang).

Inno-LiPA Teststreifen wurden in die Vertiefungen der Testwanne gegeben und je 10 µl Denaturierungsreagenz dazugegeben. Mit einer Multikanalpipette wurden 10 µl des biotinylierten amplifizierten PCR-Produkts dazugegeben. Anschließend wurde die Testwanne in das vorgeheizte Auto-LiPA Gerät (Fujirebio 2016) gestellt und das Programm „HPV1“ gestartet. Das Testverfahren beruht auf reverser Hybridisierung. Die amplifizierten biotinylierten Proben binden gegebenenfalls an die, auf den Streifen, immobilisierten Oligonukleotide, wodurch eine violettfarbene Bande entsteht. Nach dem Testdurchlauf wurden die Streifen auf ein Datenauswertungsblatt geklebt. Die Auswertung erfolgte manuell mithilfe der im Kit beigelegten Ableseschablone nach dem Vier-Augen-Prinzip (mit einer erfahrenen Laborfachkraft) und mit dem Softwareprogramm LIRA HPV.

Durch den Inno-LiPA Genotyping Extra II können 32 spezifische HPV Typen erkannt werden. Es werden die High-Risk HPV Typen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58,

59 und die Low-Risk oder noch nicht klassifizierten Typen 26, 53, 66, 70, 73, 82, 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 62, 67, 68, 81, 83, 89 erkannt. Weitere HPV Typen können mithilfe der HPV-DNA Bande als HPV positiv, jedoch ohne spezifische Typenangabe erkannt werden. Diese wurden als „HPV-X“ gewertet. Bei Proben, die eine sehr schwache Bande oder ein „HPV-X“ zeigten, wurde der Inno-LiPA wiederholt.

2.15 HPV-PCR mit dem CP4/5-Primerpaar

Das Primerpaar CP4/5 amplifiziert ein 450 Basenpaar langes Amplifikat aus der E1 Region des HPV Gens. Dabei ist CP4 der Primer in 5`-Leserichtung und CP5 der Primer in 3`-Leserichtung. Mit diesem Primerpaar können kutan und zervikal relevante HPV Typen wie z.B. HPV 1-5, HPV 6b, 7, 8, 10a, 11, 14a, 16, 18-21, 24, 25, 31, 33, 36, 46, 9, 22, 37, 38, 50, 65 detektiert werden (Tieben et al., 1994). Der Mastermix wurde wie in Tabelle 8 gezeigt angesetzt.

Tabelle 8: Mastermix für die PCR mit dem CP4/5-Primerpaar

Reagenz	Pro Probe
10x Puffer	5,0 µl
MgCl ₂ (3,5 mmol)	7,0 µl
DNTP`s Mix (à 6,25 mmol/µl)	4,0 µl
CP4 (200 ng/µl)	0,2 µl
CP5 (200 ng/µl)	0,2 µl
H ₂ O	23,5 µl

40 µl Mastermix, 5 µl H₂O und 0,4 µl Taq Gold pro Probe wurden im Mastermix-Raum in ein PCR-Tube gegeben. Im Prä-PCR Raum wurde in jedes Tube 5 µl DNA dazugegeben.

Im Anhang ist das Programm des Thermocyclers dargestellt (Tabelle 20).

Die PCR-Produkte wurden in einem zweiprozentigen Agarosegel mit Ethidiumbromid bei 130 Volt für 35 Minuten aufgetrennt. Die Sequenzierung erfolgte mit dem CP4 Primer.

2.16 HPV nested-PCR („MY09/11“ bzw. „GP5⁺/6⁺“)

Die „MY09/11“ PCR, sowie die „GP5⁺/6⁺“ PCR amplifizieren einen Teil aus dem L1 Gen von HPV. „MY09/11“ amplifiziert ein Stück mit der Länge von ungefähr 450 Basenpaaren (Şahiner et al., 2014). Die „GP5⁺/6⁺“ PCR amplifiziert wiederum aus diesem einen Abschnitt von ungefähr 140 Basenpaaren (Baay et al., 1996). Die nested-PCR ist eine sensitivere Methode HPV zu detektieren als die jeweilige Einzel-PCR (Dabić et al., 2004).

Der Mastermix für die „My09/11“ PCR pro Ansatz wurde wie folgt (Tabelle 9) angesetzt.

Tabelle 9: Mastermix für die PCR mit „My09/11“

Material	Menge für eine Probe
10x Puffer	5,0 µl
MgCl ₂ (3,5 mmol)	12,0 µl
dNTP's (ABI)	4,0 µl
My09 Primer 200 ng/µl	0,2 µl
MY11 Primer 200 ng/µl	0,2 µl
H ₂ O	23,2 µl

45 µl Mastermix, 0,4 µl Taq Gold und 5 µl der jeweiligen DNA wurden pro Reaktion verwendet. Als Negativkontrolle wurde DNase freies Wasser verwendet, als Positivkontrolle eine bekannte HPV-positive Probe, sowie die HPV6 Positivkontrolle aus dem Inno-LiPA-Kit.

Für die GP5⁺/6⁺ PCR wurde der Mastermix, wie in Tabelle 10 beschrieben, angesetzt.

Tabelle 10: Mastermix für „GP5⁺/GP6⁺“

Material	Menge für einen Ansatz
10x Puffer	5,0 µl
MgCl ₂	7,0 µl
dNTP`s Mix (ABI)	4,0 µl
GP5 ⁺ Primer (200 ng/µl)	0,2 µl
GP6 ⁺ Primer (200 ng/µl)	0,2 µl
H ₂ O	32,2 µl

45 µl Mastermix und 0,4 µl Taq Gold Polymerase wurden in ein PCR-Tube gegeben. In einem anderen Raum wurde 5 µl des PCR-Produktes der MY09/11 PCR dazu pipettiert. Die Thermocycler Programme finden sich im Anhang (Tabelle 21 und Tabelle 22). Die PCR-Produkte wurden in einem dreiprozentigen Agarosegel mit Ethidiumbromid elektrophoretisch aufgetrennt. Die Sequenzierung erfolgte mit dem GP6⁺ Primer.

2.17 Aufreinigung der DNA-Fragmente aus dem Agarosegel

Die Agarosegele wurden nach der Elektrophorese mithilfe einer UV-Fotokamera fotografiert. Positive Banden wurden anschließend unter UV-Sicht (366nm) ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA-Fragmente aus dem Gel erfolgte mit dem Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Vorgaben des Herstellers.

2.18 Sanger-Sequenzierungen

Zum Sequenzieren wurden 20 µl, der aus dem Agarosegel extrahierten, DNA mit den entsprechenden PCR-Primern (10 µmol/ml) zur Firma Eurofins geschickt. Die Analyse der Sequenzen erfolgte mithilfe der Programme SnapGene 4.1.9 (Insightful Science; verfügbar unter snapgene.com) und Nucleotide Blast (NCBI).

2.19 Quantitative Real-Time PCRs (qPCR) für HPV18 bzw. das zelluläre PGK 1 Gen

Über die Quantifizierung des konstitutiven Referenzgens Phosphoglyceratkinase 1 (PGK 1) mittels real-time PCR (SYBR Green) auf dem LightCycler 480 wurde eine Aussage über die Qualität der Proben gewonnen. PGK 1 ist ein Enzym im Glykolyse-Stoffwechsel und wird konstitutiv exprimiert. In zervikalen Zellen ist es als stabiles Housekeeping Gen unabhängig von einer HPV-Infektion etabliert (Daud and Scott, 2008), so dass es als Marker für den Zellgehalt einer Probe dienen kann.

Der Fluoreszenzfarbstoff im SYBR Green lagert sich unspezifisch mit jedem neuen Zyklus an die neu gebildete, doppelsträngige DNA an. Somit erhöht sich die Fluoreszenzintensität proportional mit dem PCR-Produkt. Die Software des Lightcyclers erkennt, bei welchem Zyklus die Fluoreszenzintensität des PCR-Produkts, die der Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Dieser Punkt wird als Crossing Point (C_P -Wert) bezeichnet und verhält sich umgekehrt proportional zur DNA-Menge in der Probe. Anhand des C_P -Werts kann unter Zuhilfenahme der Standardkurve die ursprüngliche Konzentration der DNA in den bukkalen Proben bestimmt werden.

Der Mastermix wurde wie in Tabelle 11 beschrieben unter Laminar Airflow pipettiert. Es wurden 15 μ l Mastermix und 5 μ l DNA pro PCR-Reaktion verwendet. Eine Standardkurve wurde mit Hilfe einer E.Coli-Plasmidreihe mit 10^8 - 10^1 Kopien von PGK 1 und HPV18 erstellt. Für weitere quantitative PCRs wurden die Verdünnungsstufen $10^5/10^6$ in Doppelbestimmung als Referenz für die Konzentrationsbestimmung eingesetzt. Zum Ausschluss von Pipettierfehlern, wurden stets Doppelwerte erhoben. Die qPCR der Probe wurde wiederholt, wenn die Doppelwerte um mehr als einen Zyklus voneinander abwichen. Pro Platte wurde als Negativkontrolle in vier Wells an verschiedenen Stellen 5 μ l DNase-freies Wasser zum Mastermix gegeben. Anschließend wurde die Platte mit einer Folie luftdicht verschlossen und für 3 Minuten bei 600 RCF zentrifugiert.

Tabelle 11: Mastermixansatz für die qPCR

Reagenz	Pro Probe
Primer Reverse ^a	2 µl
Primer Forward ^a	2 µl
SYBR Green	10 µl
Wasser	1 µl
DNA	5 µl

^aPGK 1 beziehungsweise HPV18.

Das Lightcyclerprogramm findet sich im Anhang (Tabelle 23).

2.20 Zellkultur

Die HeLa-Zellen wuchsen konfluent in 100 mm Plastik Zellkulturschalen in einem Medium mit DMEM mit 10 Prozent FKS und Gentamycin in einem Zellinkubator bei 37 °C und mit 5 Prozent CO₂.

Die Ernte der Zellen erfolgte in Werkbänken mit Laminar Flow. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurde auf die Schale 2 ml Trypsin gegeben und diese für 3 Minuten bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde auf die Zellschalen Medium gegeben, um das Trypsin abzustoppen. Die abgelösten Zellen wurden in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 Minuten bei 250×g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 5 ml PBS resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mithilfe einer Neubauer Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt.

2.21 Kontrollgruppe

Eine nach Alter und Geschlecht gematchte Kontrollgruppe, in der oropharyngeale Abstriche aus der SARS-CoV-2 Diagnostik retrospektiv auf HPV untersucht wurden, ermöglichte die orientierende Untersuchung der oralen HPV-Prävalenz am UKT.

Hierzu wurden 90 Personen ausgewählt, die 2020 einen Abstrich zur SARS-CoV-2 Diagnostik in der Virologie abgegeben hatten. Die genaue Auswahl der eingeschlossenen

Menschen erfolgte Gender und Alters gematcht zur Vergleichsgruppe von Transplantierten mit abgegebenem Abstrich 12 Monaten nach Tx aus unserer Kohorte. Dabei wurde das Alter in Kategorien von 0-10, 10-20 etc. unterteilt. In der Kontrollgruppe wurden ausschließlich SARS-CoV-2 negative Proben berücksichtigt.

Die DNA-Extraktion erfolgte in der Diagnostik der Virologie Tübingen mit dem Magpure96 DNA und dem Viral NA Small Volume Kit (Roche). Dabei wurden 200 µl der Probe eingesetzt und ein Elutionsvolumen von 100 µl ausgewählt. Die extrahierte DNA wurde bei -80 °C gelagert.

Die Bearbeitung der Proben zur HPV-Prävalenz erfolgte wie oben beschrieben (2.13-2.19).

2.22 Statistik

Die erhobenen Ergebnisse aus den Abstrichen und die klinischen Daten wurden in Microsoft Excel 2019 zusammengetragen. Alle statistischen Auswertungen und Berechnungen erfolgten mit IBM SPSS 27.0 (statistical packages for social sciences). Die Graphiken wurden mit dem Programm GraphPad Prism 9 erstellt.

Patienten, bei denen die zu untersuchenden Daten fehlten, wurden von der jeweiligen statistischen Analyse ausgeschlossen. Zur Darstellung der deskriptiven Daten wurden relative und absolute Häufigkeiten, Median, Standardabweichung, Mittelwert, Minimum, Maximum und Interquartilbereich benutzt. Zur Auswertung der nominalskalierten Parameter wurde der Chi-Quadrat-Test verwendet. Bei einer Zelhäufigkeit < 5 wurde der exakte Test nach Fisher angewendet. Es wurde immer zweiseitig getestet.

Alle ordinal- und intervallskalierten Daten wurden auf eine Normalverteilung überprüft. Da diese in keinem Fall bestand, wurde der Man-Whitney U Test bei den Parametern Alter, C_p-Wert und vorherige Transplantationen angewandt.

Für alle Testverfahren wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ festgelegt.

Zur graphischen Darstellung wurden Punktdiagramme und Balkendiagramme genutzt.

3 Ergebnisse

3.1 Vorbereitende Experimente und Methodenetablierung

3.1.1 Etablierung des Einsatzvolumen der in PreservCyt-Fixiermedium konservierten bukkalen Abstriche

Die bukkalen Abstriche wurden in 20 ml PreservCyt-Fixiermedium konserviert und als 5 ml Aliquots bei -20 °C eingelagert. Es wurde die Höhe des Zellgehalts in den Aliquots untersucht und ermittelt welcher Volumenanteil der Aliquots für weitere Versuche (HPV Genotypisierung etc.) in die DNA-Extraktion eingesetzt werden soll.

Dazu wurde ein BS eines freiwilligen Probanden in 20 ml PreservCyt-Fixiermedium konserviert. Um den Zellgehalt in Abhängigkeit zum Volumen zu ermitteln, wurden daraus verschiedenen Volumina (1-5 ml) entnommen. Mittels qPCR, die das konstitutive Gen (sog. Housekeeping Gene) Phosphoglyceratkinase 1 (PGK 1) detektiert, konnte der relative Zellgehalt ermittelt werden (Siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Etablierung des Einsatzvolumens der Aliquots mittels qPCR auf PGK 1

Eingesetztes Volumen	C _p -Werte ^a
1 ml	30,8 / 29,8/ 30,4
2 ml	30,8 / 31,9 / 30,6
3 ml	28,9 / 27,7 / - ^b
4 ml	28,6 / 27,4 / 27,8
5 ml	28,6 / 26,8 / 27,9

^a qPCR auf PGK 1, DNA-Extraktion noch mit EZI DNA Tissue.

^b qPCR aus Pandemie-bedingtem Materialmangel nur zwei Mal wiederholt.

In Tabelle 12 wird deutlich, dass selbst bei einem Einsatzvolumen von 1 ml noch Zellen zu finden waren. Um ein Restvolumen für mögliche Wiederholungen zu behalten, wurde ein Einsatzvolumen von 3,5 ml als Standard festgelegt.

3.1.2 Analyse des Einflusses des Abstrichnehmers auf die Abstrichqualität

Die bukkalen Abstriche wurden auf unterschiedlichen Stationen und Transplantationsambulanzen des Uniklinikums Tübingen von verschiedenen Personen entnommen. Um den Einfluss der Abstrichnehmer auf die Abstrichqualität zu untersuchen, entnahmen zwei Personen jeweils bei sieben freiwilligen Probanden bukkale Abstriche. Diese wurden in einem PreservCyt-Fixiermedium konserviert. Daraus wurden 3,5 ml entnommen, um den Zellgehalt mittels qPCR auf PGK 1 zu ermitteln (siehe Abbildung 5).

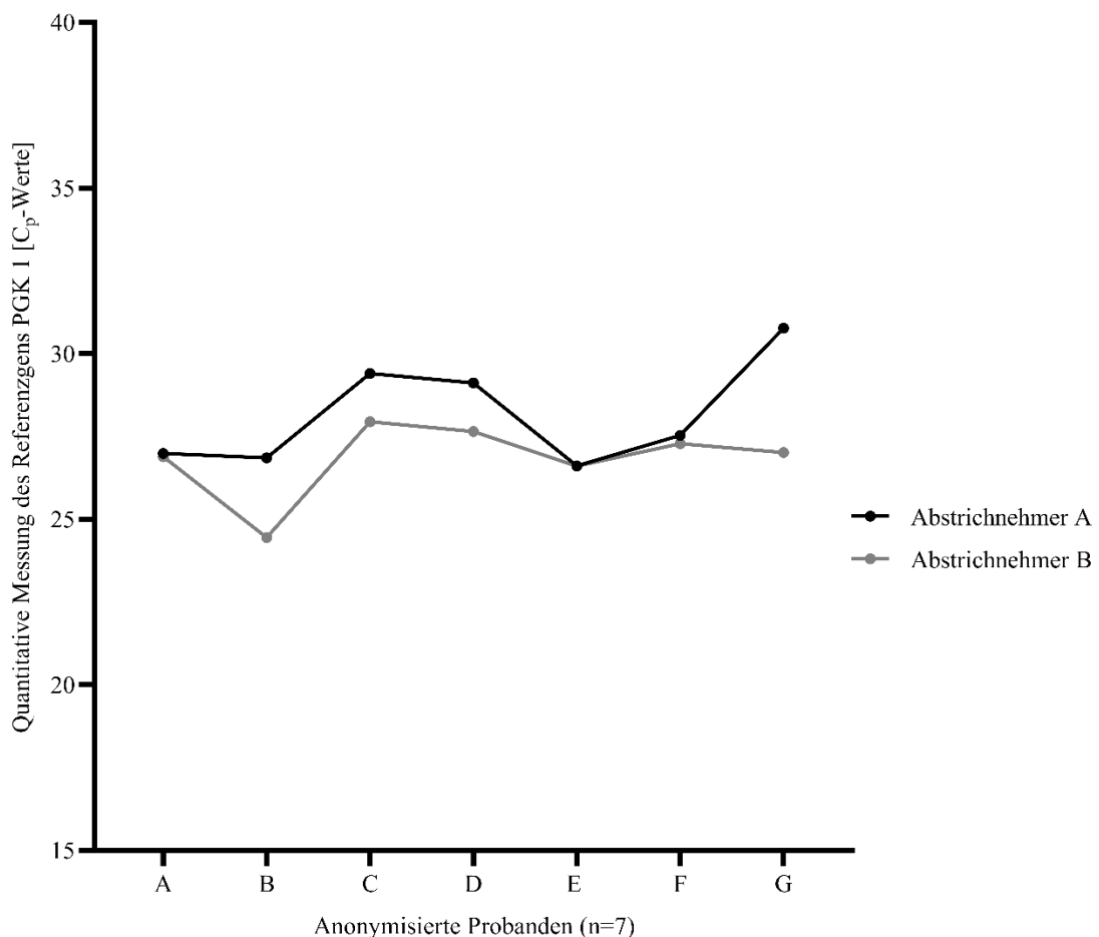


Abbildung 5: Analyse des Einflusses der Abstrichnehmer auf die Abstrichqualität. Die X-Achse zeigt die verschiedenen Probanden, die einen Abstrich abgegeben haben. Die Y-Achse stellt die gemessenen Cp-Werte der qPCR auf das zelluläre Referenzgen PGK 1 dar.

Es zeigte sich, dass die C_P -Werte je nach Abstrichnehmer beim selben Probanden um bis zu 3,75 Zyklen variieren können. Ein Einfluss des Abstrichnehmers auf die Probenqualität kann somit nicht ausgeschlossen werden.

3.1.3 Validierung des Line-Probe-Assays mithilfe der zellulären PGK 1 qPCR

Die Sensitivität des Inno-LiPA wurde mithilfe einer Verdünnungsreihe von HeLa-Zellen, einer epithelialen HPV18-positiven Zervixkarzinom Zelllinie, getestet. Eine bestimmte Menge HeLa-Zellen wurde zu einem HPV-negativen Mundabstrich und zu zellfreiem PreservCyt-Fixiermedium gegeben (Spiking^a). Um die Qualität der Proben sicherzustellen, wurde zusätzlich eine qPCR auf PGK 1 durchgeführt.

Es zeigt sich, dass der Inno-LiPA bereits in einem zellfreien Medium HPV-DNA ab 10 HeLa-Zellen/ml erkannte (siehe Tabelle 13). In dem gespikten Mundabstrich erkannte der Inno-LiPA-Assay die HPV-DNA ab 100 HeLa-Zellen pro ml.

Tabelle 13: Validierung des Inno-LiPAs mittels qPCR auf PGK-1 und einer HeLa-Zellverdünnung

Anzahl der HeLa-Zellen/ml	Inno-LiPA Ergebnis ^a	C_P -Werte PGK 1 PCR
PreservCyt-Fixiermedium		
100	positiv	33,9
10	positiv	40,0
1	negativ	40,0
HPV-negativer Mundabstrich ^b		
100	positiv	27,8
10	negativ	28,4
1	negativ	29,0

^a Eine HPV18 Bande wurde als positives Ergebnis gewertet.

^b Der Abstrich wurde vor der Zugabe von HeLa-Zellen auf HPV gescreent.

3.1.4 Validierung der Aufbereitungsmethode der Probenaliquots

Mithilfe einer HeLa-Verdünnungsreihe (10, 100, 1000 Zellen/ ml) in 3,5 ml PreservCyt-Fixiermedium wurde untersucht mit welcher Aufbereitungsmethode (zentrifugierter Überstand, Pellet oder nicht zentrifugierte Probe) am sensitivsten HPV-DNA gefunden werden kann. Die HPV Detektion erfolgte durch den Inno-LiPA und einer qPCR auf HPV18.

Tabelle 14: HPV Detektion in verschieden aufbereiteten Proben mittels Inno-LiPA und qPCR auf HPV18

Anzahl der HeLa-Zellen/ml	Inno-LiPA Ergebnis	C _p -Werte HPV18 PCR
Pellet nach Zentrifugation		
1000	nicht durchgeführt	29,6
100	positiv*	32,5
10	negativ	37,5
Überstand nach Zentrifugation		
1000	positiv	38,0
100	negativ	35,8
10	negativ	35,6
Nicht zentrifugierte Probe		
1000	positiv	31,9
100	negativ	36,2
10	negativ	37,5

* HPV18 Bande im Inno-LiPA.

Die Ergebnisse (Tabelle 14) zeigen, dass bei Einsatz des zentrifugierten Pellets HPV18 DNA am häufigsten mit dem Inno-LiPA detektiert werden konnte. Zudem wies diese Methode ab 100 HeLa-Zellen, die niedrigsten C_p-Werte in der qPCR auf HPV18 auf.

Damit kann davon ausgegangen werden, dass durch die Untersuchung der Pellets keine hochpositiven HPV-Infektionen übersehen wurden.

3.2 Ergebnisse des HPV-Screenings und der Genotypisierung

Mittels Inno-LiPA wurden insgesamt 487 BS von 215 Patienten zur Baseline, 142 Patienten nach 6 Monaten und 130 Patienten nach 12 Monaten auf HPV-DNA untersucht. In 21 BS konnte HPV-DNA detektiert werden. Dabei erkannte der Inno-LiPA-Assay die HPV Typen: -66 (n = 2), - 16 (n = 2), - 53 (n = 1) und 16-mal HPV-DNA ohne nähere Typisierung (HPV-X).

Für eine genauere Genotypisierung der unspezifischen „HPV-X“ Ergebnisse wurden Sequenzierungen nach Sanger durchgeführt. Mithilfe der Sequenzierung mit dem CP4/5-Primerpaar konnten drei „HPV-X“-Fälle als HPV -10 (n = 1), -107 (n = 1) und -138 (n = 1) identifiziert werden. Die Sequenzierung mit der MY 09 /GP5⁺6⁺ nested-PCR ordnete zwei HPV-X als HPV-76 (n = 1) bzw. -31 (n = 1) zu. Dabei sind die meisten detektierten HPV Typen aus der Alphagattung, bei den Typen 107 und 76 handelt es sich jedoch um Beta HPV und bei HPV 138 um Gamma HPV. Für die anderen 11 BS konnte das unspezifische HPV-Ergebnis nicht genauer genotypisiert werden. Jedoch ist es unwahrscheinlich, dass es sich dabei um High-Risk Infektionen handelte.

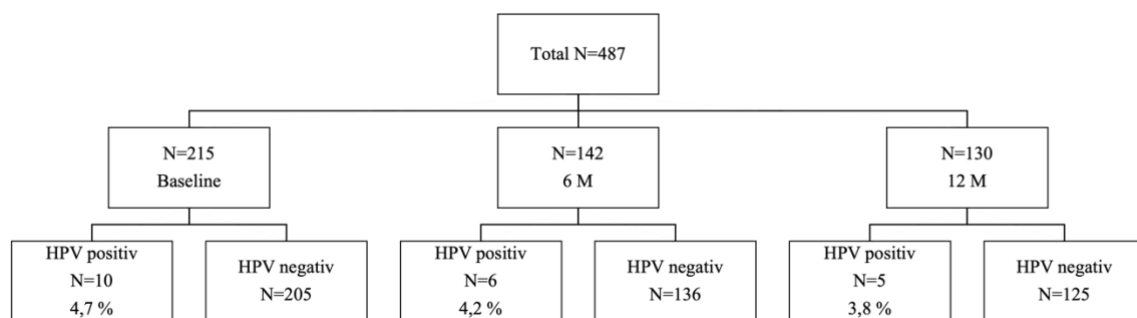


Abbildung 6: Bukkale Abstriche der Kohorte nach Zeitpunkten und HPV-Status (Inno-LiPA) aufgeteilt.

Auf Individuen bezogen war bei 7,9 % (n = 17/215) der Patienten in der Gesamtgruppe eine orale HPV-Infektion in den ersten 12 Monaten nach Transplantation nachweisbar. In der folgenden Abbildung wird die HPV-Prävalenz zu den drei Zeitpunkten (0, 6, 12 Monate) nach Tx nochmal dargestellt.

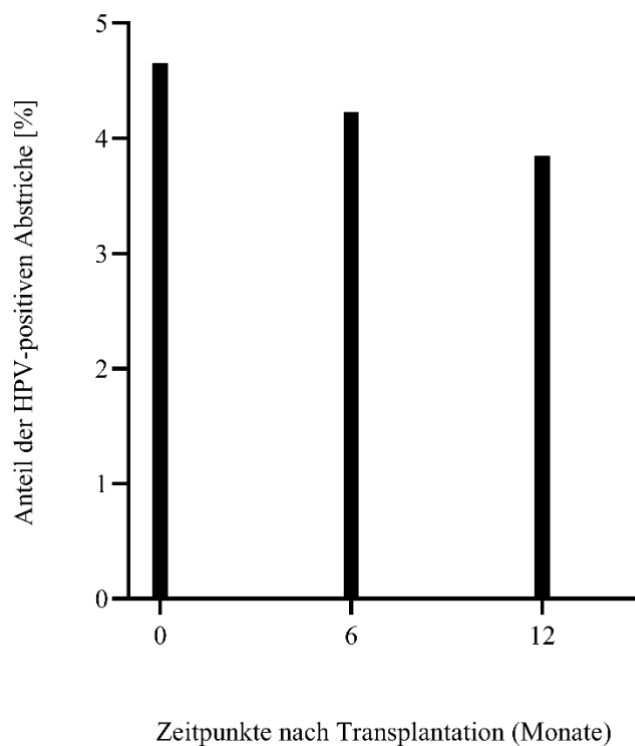


Abbildung 7: Anteil der HPV-positiven Abstriche zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation (Kohorte). Insgesamt wurde 21 Mal HPV zu drei Zeitpunkten gefunden.

HVDV-DNA konnte in 4,7 % ($n = 10/215$) aller Abstriche bei BL, in 4,2 % ($n = 6/142$) nach 6 Monaten und in 3,8 % ($n = 5/130$) der Proben nach 12 Monaten detektiert werden. Es zeigte sich keine Veränderung der Prävalenz oraler HPV-Infektionen während des ersten Jahres nach Tx ($p = 1$ bei BL/6 M und $p = 0,4$ bei BL/12 M).

3.3 Ergebnisse der quantitativen Messung des Referenzgens PGK 1 mittels qPCR bei allen bukkalen Abstrichen der Kohorte

Der Inno-LiPA erkennt mit sehr hoher Sensitivität ein humanes Kontrollgen und beinhaltet damit schon eine Kontrolle der Probenqualität (siehe Seite 30). Zur quantitativen Bestimmung des relativen Zellgehaltes in den Proben und zum Ausschluss eines Zusammenhangs zwischen HPV Detektion und Höhe des Zellgehalts wurde von allen BS ($n = 487$) zusätzlich eine real-time qPCR auf das Housekeeping Gen PGK 1 durchgeführt. Damit sollte vermieden werden, dass aufgrund schlechter Probenqualität, die HPV-Prävalenz falsch niedrig ausfällt.

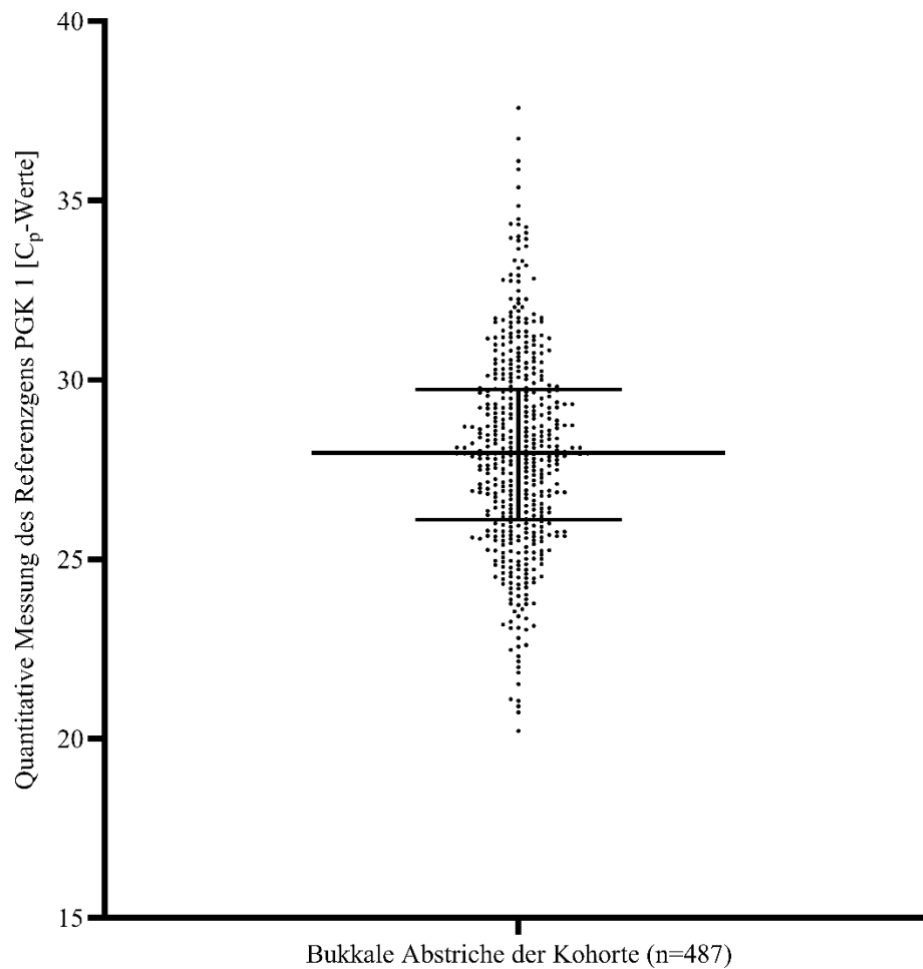


Abbildung 8: Quantitative Messung des Referenzgens PGK 1 mittels qPCR bei allen BS der Kohorte. Der Graph zeigt die C_p -Werte (Y-Achse) aller 487 BS in der Kohorte. Dazu ist der Interquartilsbereich dargestellt.

Die C_p -Werte zwischen den Proben variierten stark zwischen 20,22 und 37,58 mit einem medianen C_p -Wert von 27,97 (Standardabweichung (SD) 2,77) (siehe Abbildung 8). Dies ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine heterogene Abstrichqualität zurückzuführen.

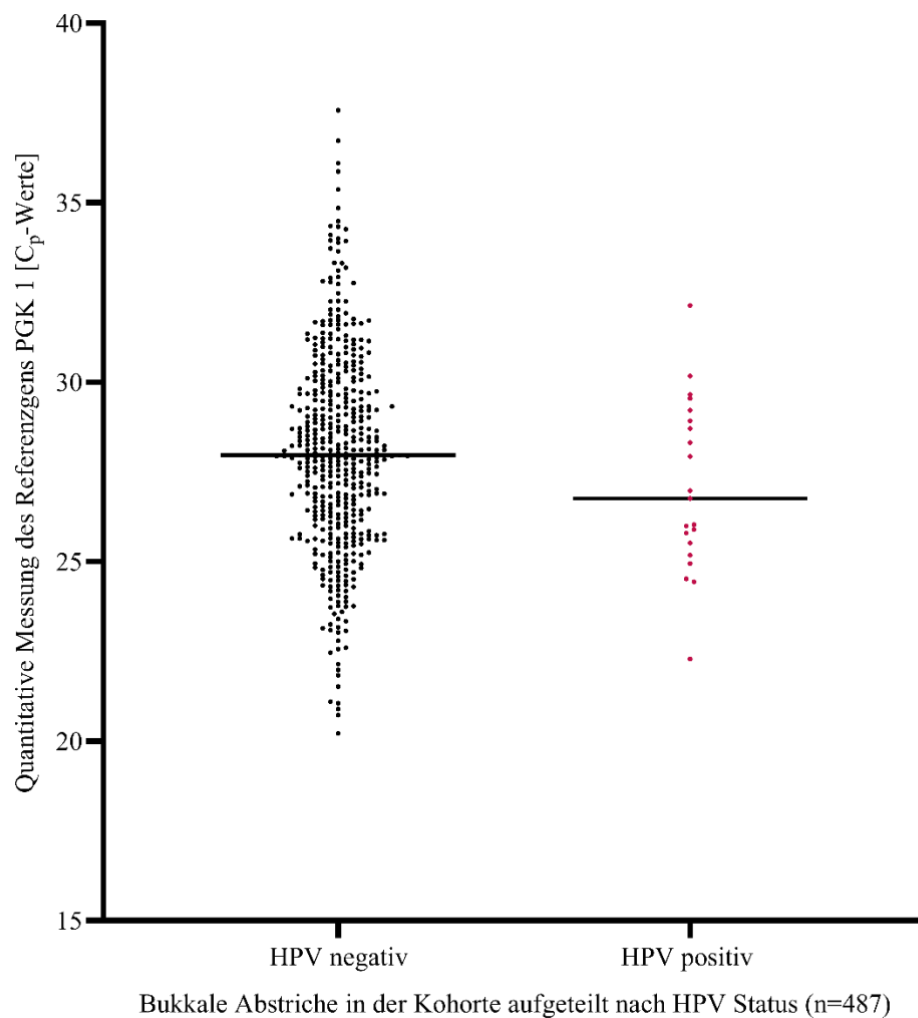


Abbildung 9: Quantitative Messung des Referenzgens PGK 1 bei allen bukkalen Abstrichen in Abhängigkeit zum HPV-Status.

Die Abbildung stellt in der Y-Achse die C_p -Werte der BS in Abhängigkeit ihres HPV-Status dar (X-Achse). HPV-positiv ist rot und HPV-negativ schwarz gefärbt. Zudem ist der mediane C_p -Wert dargestellt. Es liegt kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Detektion von HPV-DNA und dem zellulären DNA-Gehalt vor ($p = 0,118$ im Mann-Whitney U Test).

Der Median für den C_p -Wert bei HPV-positiven Proben lag mit 26,77 (SD 2,38) etwas unter dem der HPV-negativen Proben (Median 27,97, SD 2,79) (Abbildung 9).

Dennoch war der Gehalt an zellulärer DNA nicht signifikant mit der Detektion von HPV-DNA assoziiert ($p = 0,118$). Um eine Verfälschung der statistischen Analyse auszuschließen, wurde die statistische Auswertung einmal für alle Proben und einmal für Proben unterhalb des Cut-off C_p -Wert von 33 durchgeführt. Die Festlegung des Cut-Offs begründete sich darin, dass keine Probe mit einem C_p -Wert von 33 oder höher im Inno-LiPA als HPV positiv detektiert wurde.

3.4 Zusammenfassung der erhobenen klinischen Daten und Patientendemographie

3.4.1 Alter, Geschlecht und Art der Transplantation

Es konnten von 215 Patienten insgesamt 487 bukkale Abstriche auf eine orale HPV-Infektion untersucht werden. Davon haben 52 Patienten ausschließlich zur Baseline einen BS abgegeben. Aus den 109 Patienten, die bei allen drei Messzeitpunkten (0 M, 6 M, 12 M) einen BS abgegeben haben, wurde eine „Subkohorte“ gebildet. Diese ermöglichte eine systematischere longitudinale Untersuchung der HPV-Prävalenz, Persistenz und der assoziierten Risikofaktoren.

In Tabelle 15 ist das Geschlechterverhältnis und der Altersmedian bei allen Messzeitpunkten sowie in der Subkohorte dargestellt.

Tabelle 15: Geschlechterverhältnis und Altersmedian zu verschiedenen Messzeitpunkten

Charakteristika	Baseline N = 215	6 Monate N = 142	12 Monate N = 130	Subkohorte N = 109*	P-Wert**a (6 M, 12 M, Subkohorte)
Geschlecht					
Frauen	74 (34,4 %)	48 (33,8 %)	44(33,8 %)	39 (35,8 %)	0,5/0,8/0,8
Männer	141 (65,6 %)	94 (66,2 %)	86 (66,2 %)	70 (64,2 %)	
Medianalter ± SD	56 ± 19,8	53,5 ± 20,9	54 ± 20,1	53± 20,3	0,4/0,4/0,6

* Patienten, die bei allen drei Zeitpunkten einen BS abgegeben haben.

** P-Wert < 0,05 gilt als signifikant.

^a Vergleich mit BL.

34,4 % der eingeschlossenen Patienten waren Frauen und 65,6 % Männer. Das Alter der Patienten variierte in der ausgewerteten Gesamtgruppe, sowie in der Subkohorte zwischen 0 und 77 Jahren bei Baseline mit einem Durchschnittsalter von 48,5 Jahren in der Gesamtgruppe und 47,5 Jahren in der Subkohorte. Wie in der Tabelle dargestellt, änderte sich das relative Geschlechterverhältnis trotz unterschiedlicher Patientenzahl bei allen Messzeitpunkten und in der Subkohorte nicht signifikant. Das Medianalter unterlag bei den verschiedenen Messzeitpunkten bzw. in der gebildeten Subkohorte ebenfalls keinen signifikanten Schwankungen.

Patienten mit Nierentransplantation bildeten bei allen drei Messzeitpunkten den höchsten Anteil. Wie in Abbildung 10 dargestellt, veränderte sich das Verhältnis der Patienten mit den transplantierten Organgruppen weder bei den verschiedenen Messzeitpunkten noch in der Subkohorte. 6,4 % (n = 7) der Patienten in der Subkohorte hatten bereits eine Transplantation vor Studienbeginn. Bei allen wurde dieselbe Organgruppe erneut transplantiert. Bei 5 Patienten erfolgte eine erneute Nierentransplantation, bei einem Patienten eine Lebertransplantation, ein Patient erhielt zum dritten Mal eine Stammzelltransplantation.

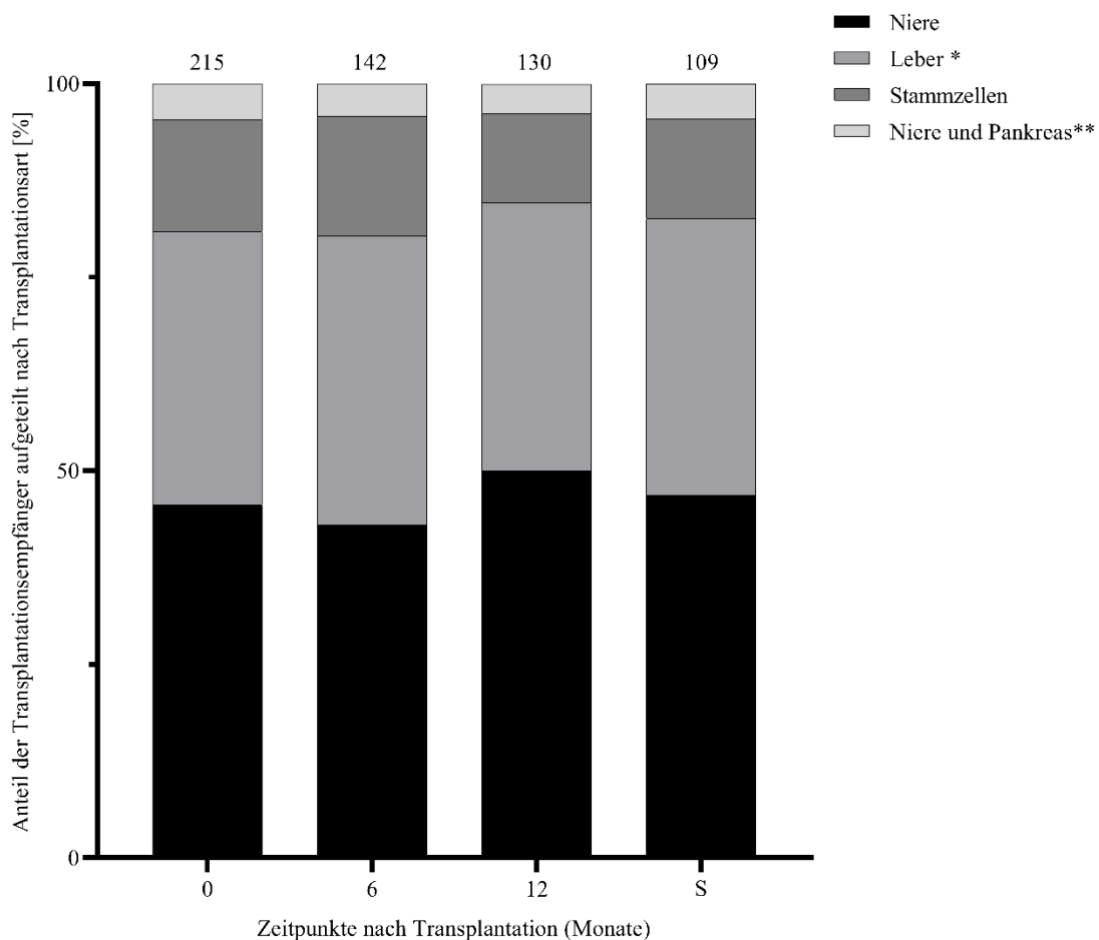


Abbildung 10: Anteil der Transplantationsempfänger aufgeteilt nach Transplantationsart bei den verschiedenen Messzeitpunkten (0, 6, 12 Monate und Subkohorte (S)).

*Enthält Patienten mit Multiorgantransplantation Niere und Leber. ** Enthält einen Patienten mit einer Pankreastransplantation ohne zusätzliche Nierentransplantation. In der Subkohorte befinden sich 52 % der RTX, 51 % der LTX, 45 % der HSCT und 50 % der RPTX aus der Kohorte (n=215). Damit bildete die Subkohorte das gleiche Organverhältnis ab. Die meisten Patienten in der Subkohorte haben eine Nierentransplantation (46,8 %) oder eine Lebertransplantation (35,8 %) erhalten. Es gab es nur 4 Patienten (3,7 %) mit RPTX als Multiorgantransplantation.

In der Gesamtgruppe hatten Patienten nach LTX (71,1 %) den höchsten und Patienten mit RPTX (50 %) den niedrigsten Männeranteil. Am jüngsten waren Patienten mit RPTX (Median 38, SD 9,8). Patienten der Organgruppen Leber, Niere und Stammzellen hatten im Durchschnitt und als Median ein ähnliches Alter.

Die für die Transplantation ursächlichen Vorerkrankungen wurden nur für die Subkohorte ausgewertet. Tumorerkrankungen waren mit 24,8 % der häufigste Transplantationsgrund. Bei 18,3 % war die ursächliche Vorerkrankung unbekannt.

Da die Ursachen für die Transplantation selbst mit den genutzten Kategorien sehr heterogen waren (siehe Abbildung 11), wurde dieser Parameter aus der statistischen Analyse ausgeschlossen.

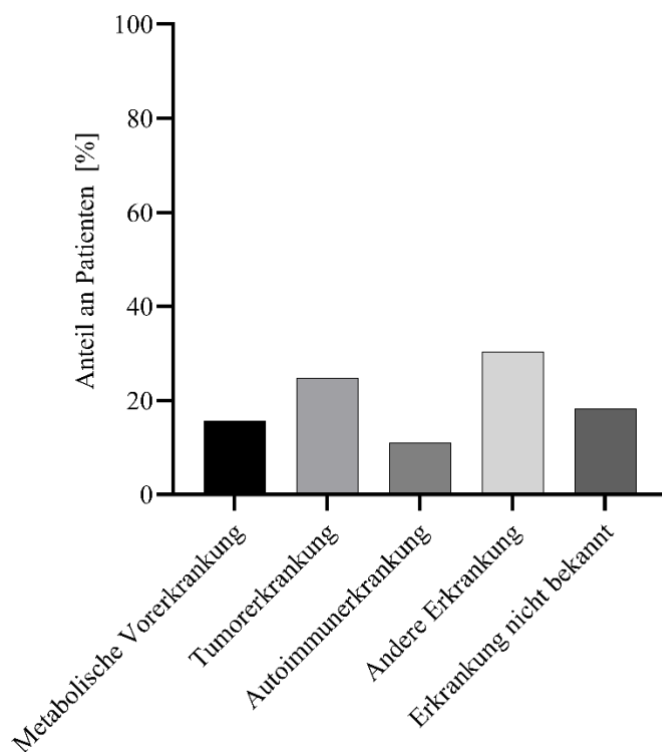


Abbildung 11: Patienten der Subkohorte aufgeteilt nach zur Transplantation führender Vorerkrankung.

3.4.2 Immunsuppressive Medikation (Subkohorte)

Die Auswertung der Immunsuppressiva erfolgte ebenfalls nur in der Subkohorte. Das folgende Diagramm stellt dar, wie viele Patienten ein immunsuppressives Medikament mindestens 14 Tage innerhalb des ersten Jahres eingenommen haben. Aufgrund unzuverlässiger Dateneintragungen konnte die Gabe von Basiliximab und ATG nicht berücksichtigt werden.

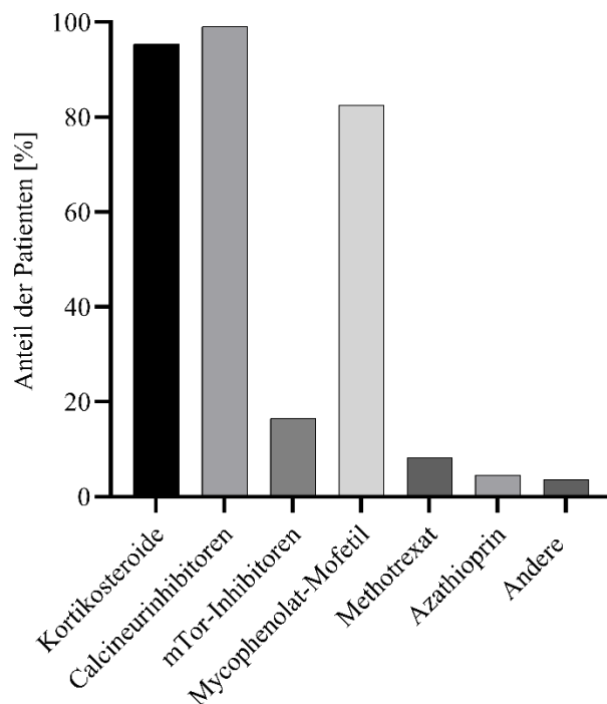


Abbildung 12: Patienten aufgeteilt nach immunsuppressiver Medikation. Anmerkung: Calcineurininhibitoren: Cyclosporin A und Tacrolimus. mTor-Inhibitoren: Everolimus, Sirolimus. Andere: Alemtuzumab, Rituximab und Cyclophosphamid.

Die meisten Patienten erhielten eine Kombinationstherapie aus mehreren Immunsuppressiva. Die Medikamentendosis wurde aufgrund häufiger Änderungen nicht berücksichtigt. Bedingt durch die verschiedenen Transplantationstypen wurde ein breites Spektrum an Immunsuppressiva eingesetzt. 95,4 % der Patienten haben im ersten Transplantationsjahr Kortikosteroide und 99,1 % der Patienten Calcineurininhibitoren eingenommen.

3.4.3 Primäre Nichtfunktion des transplantierten Organs/Abstoßungsreaktionen (Subkohorte)

Bei 3,5 % (3/85) der Patienten mit verfügbaren Daten bezüglich dieses Punktes in der Subkohorte fiel eine primäre Nichtfunktion des transplantierten Organs auf. 4,6 % (5/108) Patienten zeigten innerhalb der ersten 12 Monate nach Tx Zeichen einer Abstoßung. In beiden Fällen erfolgte eine Anpassung der immunsuppressiven Medikation.

3.5 Auswertung der Ergebnisse der HPV-Testungen

3.5.1 HPV-Epidemiologie in der Gesamtgruppe

Bei 1,4 % (n = 3) der Patienten konnte eine HR-HPV Infektion im ersten Jahr detektiert werden, das entspricht 0,5 % bei BL, 0,7 % nach 6 Monaten und 0,8 % nach 12 Monaten. Dabei konnte bei keinem Probanden derselbe HPV Typ mehrfach nachgewiesen werden. Bei 2,5 % (n = 4) der Patienten, die mehr als einen Abstrich abgegeben hatten (n = 163), konnte bei mehr als einem Zeitpunkt eine orale HPV-Infektion gefunden werden. Dies entspricht einem Anteil von 23,5 % (4/17) der Patienten mit mindestens einem Nachweis einer oralen HPV-Infektion. Es wurde – soweit genotypisierbar – nie derselbe HPV Typ mehrfach detektiert, allerdings wiesen drei der Patienten einmal einen „HPV-X“ Abstrich auf (Siehe Tabelle 16).

In der folgenden Tabelle sind alle Patienten der Kohorte mit mindestens einem HPV positiven BS (n = 17) aufgeführt.

Tabelle 16: Klinische Daten der HPV-positiven Patienten in der Kohorte (n=17)

HPV	C _p -Wert ^a	BL HPV-Status	6 M HPV-Status	12 M HPV-Status	Organ-gruppe	Ge-schlecht	Alter	Vor-herige Tx	Primäre Organ-Nicht-funktion	Vorer-krankung	Zeichen einer Ab-stoßung	Wann nach Tx
HPV53	28,1	HPV53	Negativ	Negativ	LTX	m	64	Nein	Nein	Leber-zirrhose	Nicht bekannt	
HPV66/ HPV16	32,5/29,6	HPV66	HPV16	Kein Abstrich	LTX	m	61	Nein	Nein	Leber-tumor durch Hepatitis C Infektion	Nein	
HPV31	28,3	HPV31	Negativ	Negativ	RTX	w	60	Nein	Nein	Un-bekannt	Nein	
HPV-X/ HPV138	27,0/29,2	Negativ	HPV-X	HPV138	HSCT	m	66	Ja ^b	Nein	Multiples Myelom	Ja	3 M
HPV-X	24,9	HPV-X	Kein Abstrich	Negativ	LTX	m	27	Nein	Nein	PSC ^c	Nein	
HPV-X	25,2	HPV-X	Negativ	Negativ	RTX	w	65	Nein	Un-bekannt	Un-bekannt	Nein	

HPV-X/ HPV107	25,8/28,7	HPV-X	Kein Abstrich	HPV107	LTX	m	68	Nein	Nein	C ₂ ^d - bedingtes HCC ^e	Nein	
HPV-X	25,7	HPV-X	Kein Abstrich	Negativ	RTX	m	77	Nein	Nein	Un- bekannt	Nein	
HPV-X	28,9	HPV-X	Negativ	Negativ	LTX	m	4	Nein	Ja	Hepato- blastom	Nein	
HPV-X	27,9	HPV-X	Negativ	Negativ	LTX	m	58	Nein	Un- bekannt	Leber- zirrhose nach Hepatitis B/D Infektion	Nein	
HPV-X	22,9	HPV-X	Negativ	Negativ	LTX	w	59	Nein	Nein	C ₂ - bedingte Leber- zirrhose	Nein	
HPV76	30,2	Negativ	HPV76	Kein Abstrich	HSCT	m	68	Nein	Nein	AML ^f	Ja	2 M
HPV-X	25,5	Negativ	HPV-X	Kein Abstrich	RPTX	m	36	Nein	Nein	DM 1 ^g	Nein	
HPV-X / HPV66	26,0/29,7	Negativ	HPV-X	HPV66	LTX	m	64	Nein	Ja	PSC	Ja	6 M
HPV10	25,9	Negativ	HPV10	Negativ	LTX	m	59	Nein	Nein	HCC	Nein	

HPV16	24,5	Negativ	Negativ	HPV16	LTX	m	63	Nein	Nein	C ₂ - bedingte Leber- zirrhose	Nein
HPV-X	26,0	Negativ	Negativ	HPV-X	RTX	m	62	Nein	Un- bekannt	DM 2	Nein

^aC_P-Werte der HPV-positiven Abstriche in der zellulären qPCR auf PGK 1.

^b Patient hat bereits zwei Stammzelltransplantationen vor dieser Studie gehabt.

^c PSC=Primär sklerosierende Cholangitis.

^d C₂ für Alkohol.

^e HCC=Hepatozelluläres Karzinom.

^f AML=Akute Myeloische Leukämie.

^g DM=Diabetes Mellitus.

Von den HPV-positiven Patienten waren 82,4 % (14/17) Männer. 58,8 % (10/17) haben eine LTX, 23,5 % (4/17) eine RTX, 11,8 % (2/17) eine HSCT und 5,9 % (1/17) eine RPTX erhalten. Auf die jeweiligen Organarten aufgeteilt entsprach dies einer HPV-Positivitätsrate (mindestens 1 positiver Abstrich) von 10/76 (13,2 %) bei den Lebertransplantierten, 4/98 (4,1 %) bei Nierentransplantierten, 2/31 (6,5 %) bei Stammzelltransplantierten und 1/10 (10 %) bei Pankreas- und Nierentransplantierten. 75 % der Patienten mit mehreren HPV-positiven Abstrichen haben eine Lebertransplantation erhalten.

Die BS, welche „HPV-X“ positiv waren, zeigten keine höheren C_P-Werte als die genotypisierbaren HPV-Proben (siehe Tabelle 16).

Bei allen drei HPV-positiven Patienten mit Abstoßungszeichen traten diese innerhalb der ersten 6 Monate nach Transplantation auf. Bei zwei dieser Patienten äußerte sich die Abstoßungsreaktion als GvHD. Beim dritten Patienten mit klinischen Zeichen einer Abstoßungsreaktion, zeigte sich diese als Transaminasenanstieg, der nach einer Kortisonstoßtherapie rückläufig war.

50 % der Patienten mit mehreren HPV-positiven Abstrichen zeigten eine Abstoßungsreaktion in den ersten 12 Monaten.

3.5.2 HPV-Epidemiologie in der Subkohorte

In 13 von den 327 BS dieser Gruppe konnte HPV-DNA gefunden werden. 10,1 % (n = 11) der Patienten in der Subkohorte wiesen eine orale HPV-Infektion innerhalb des ersten Jahres nach Tx auf, davon zwei zu mehr als einem Zeitpunkt. Dabei war diese bei 5,5 % (6/109) der Abstriche bei Baseline, bei 2,8 % (3/109) der Abstriche 6 Monate und bei 3,7 % (4/109) der Abstriche 12 Monate nach Tx detektiert worden.

3.6 Einfluss von Alter und Geschlecht als Risikofaktor für eine HPV-Infektion

In der Gesamtgruppe waren 4,1 % (3/74) der Frauen und 9,9 % (14/141) der Männer HPV positiv. Es gab innerhalb der ersten 12 Monate nach Transplantation keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer oralen HPV-Infektion und dem Geschlecht (p = 0,1).

Ein signifikanter Zusammenhang bestand zwischen dem Alter des Patienten und einer oralen HPV-Infektion ($p = 0,035$). In Abbildung 13 wird deutlich, dass Patienten mit einer HPV-Infektion einen höheren Altersmedian von 62 Jahren (SD 17,9) als Patienten ohne HPV-Infektion zeigten (Median 54, SD 19,9).

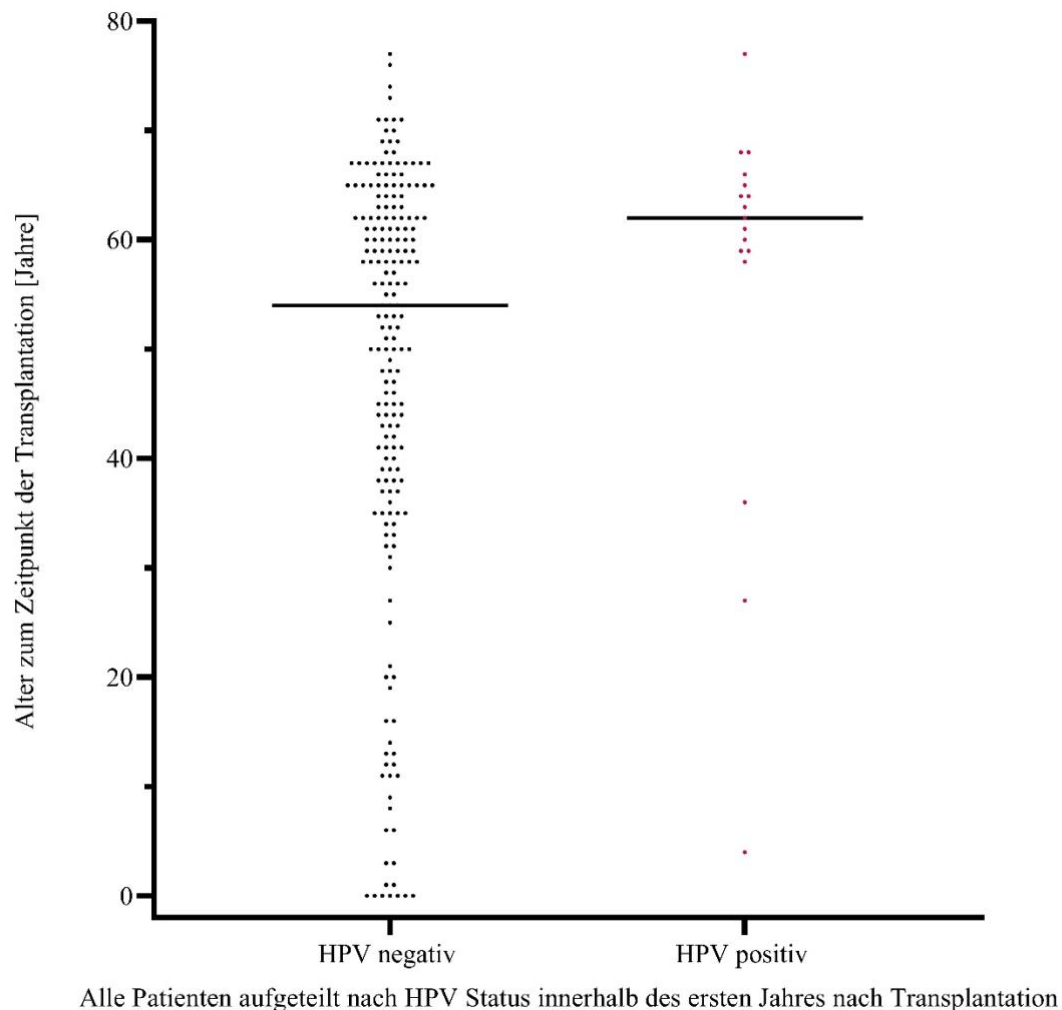


Abbildung 13: Alter zum Transplantationszeitpunkt aufgeteilt nach HPV-Status in der Gesamtkohorte. Die Abbildung zeigt alle Patienten der Kohorte ($n=215$) mit ihrem Alter bei Transplantation nach HPV-Status aufgeteilt. Der Median des Alters ist eingezeichnet. Der Zusammenhang zwischen Alter und HPV-Infektion wurde mit dem Man-Whitney U Test statistisch untersucht. Mit einem P-Wert von 0,035 war dieser Zusammenhang statistisch signifikant.

In der Subkohorte war der Altersmedian der HPV-positiven Patienten ebenfalls höher als der Median der HPV-negativen Patienten. Es kann ein signifikanter Trend zwischen dem Alter und HPV-Status beobachtet werden ($p = 0,05$, Man-Whitney U Test).

3.7 Analyse weiterer Risikofaktoren für eine HPV-Infektion

Im Folgenden wurden weitere klinische Daten aus der gebildeten Subkohorte auf mögliche Risikofaktoren unter Berücksichtigung des HPV-Status untersucht (siehe Tabelle 17).

Tabelle 17: Risikofaktoren der Patienten in der Subkohorte aufgeteilt nach HPV-Status

Charakteristika	HPV positiv ^a (%)	HPV negativ (%)	Total	P-Wert*
Total	11 (10,1)	98 (89,9)	109	
Geschlecht				0,7
Frauen	3 (7,7)	36 (92,3)	39	
Männer	8 (11,4)	62 (88,6)	70	
Organgruppe				0,3
Niere	3 (5,9)	48 (94,1)	51	
Leber	7 (17,9)	32 (82,1)	39	
HSCT	1 (7,1)	13 (92,9)	14	
Pankreas, Niere ^b	0	5 (100)	5	
	HPV positiv nach 6/12 M (%)	HPV negativ nach 6/12 M (%)		
Vorkommen einer primären Organ- Nichtfunktion				0,136
Ja	1 (33,3)	2 (66,6)	3	
Nein	3 (3,7)	79 (96,3)	82	
Vorkommen einer Abstoßungsreaktion				0,016
Ja	2 (40)	3 (60)	5	
Nein	3 (2,9)	100 (97,1)	103	

* P-Wert < 0,05 gilt als signifikant. Da alles nominale Kategorien sind, wurden der Chi-Quadrat-Test und der exakte Test nach Fisher (bei einer Zelhäufigkeit unter 5) angewandt.

^aEs wurden alle Patienten der Subkohorte mit mindestens einem HPV-positiven Abstrich berücksichtigt.

^b Enthält einen Pankreastransplantierten.

Wie in der Tabelle oben dargestellt, zeigte sich in der Subkohorte für Geschlecht und transplantierte Organgruppe kein signifikanter Zusammenhang mit dem Auftreten einer oralen HPV-Infektion im ersten Jahr nach Transplantation. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass mehr Männer (11,4 %) als Frauen (7,7 %) eine HPV-Infektion aufwiesen. 17,9 % der Patienten mit einer Lebertransplantation entwickelten im ersten Jahr nach Transplantation eine orale HPV-Infektion.

33,3 % der Patienten mit einer primären Nichtfunktion des transplantierten Organs wiesen einen HPV-positiven Abstrich nach 6 und oder 12 Monaten auf. Allerdings ist dieser Zusammenhang nicht signifikant ($p = 0,136$).

40 % der Patienten, die klinisch Abstoßungszeichen zeigten, wiesen im späteren Verlauf einen HPV-positiven Abstrich auf ($p = 0,016$).

Multiorgantransplantierte ($n=4$ in der Subkohorte, $n=0$ HPV positiv) oder mehrfach Transplantierte ($n=2$ in der Subkohorte, $n=1$ HPV positiv) bekamen nicht signifikant häufiger orale HPV-Infektionen ($p = 0,1$ bzw. $p = 0,7$; Exakter Fisher Test bzw. Mann-Whitney U Test).

Für die statistische Auswertung des HPV-Status bezogen auf eingenommene Immunsuppressiva innerhalb des ersten Jahres, wurde nur der HPV-Status zum Zeitpunkt 12 Monate nach Tx berücksichtigt. In der folgenden Abbildung wird der HPV-Status nach 12 Monaten aufgeteilt auf die Medikamentengruppen in der Subkohorte dargestellt.

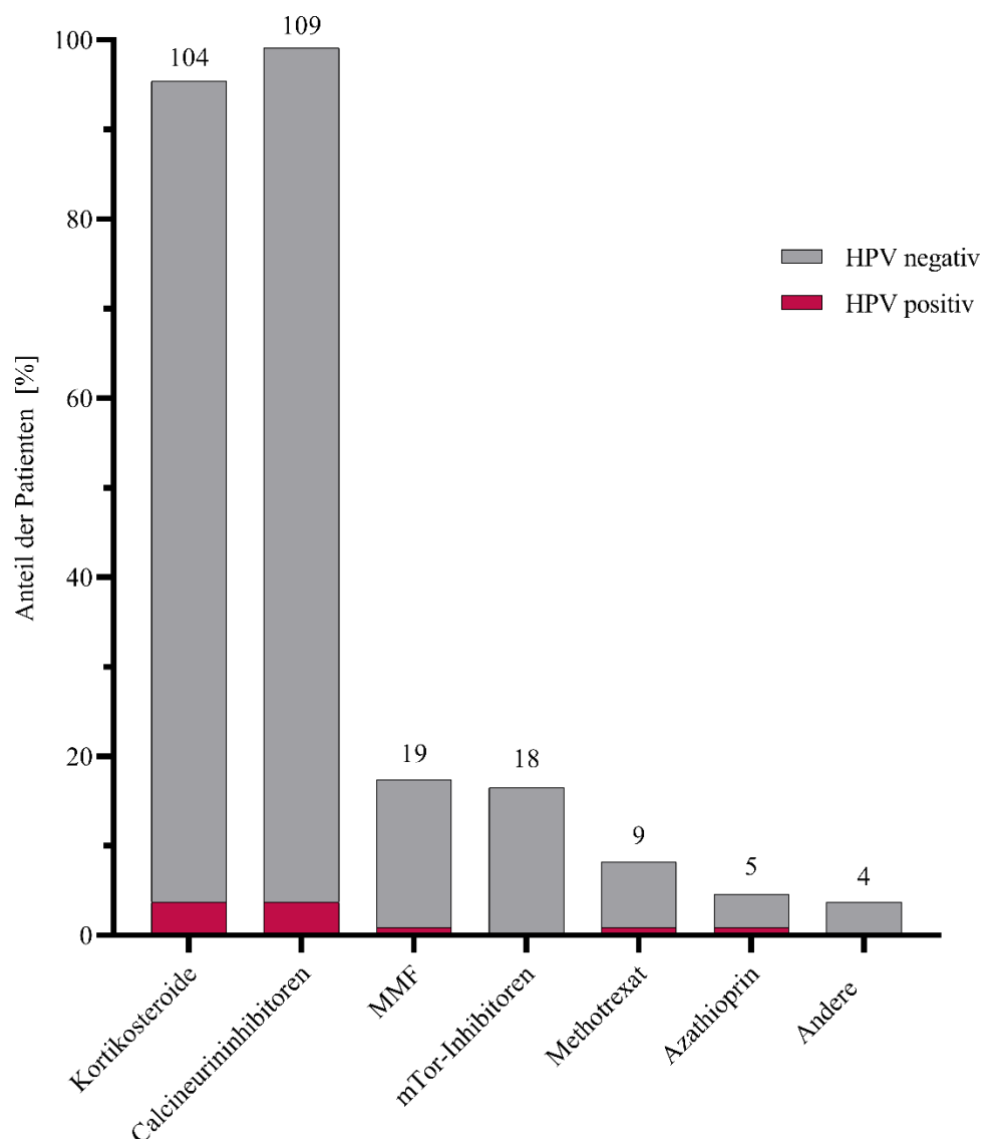


Abbildung 14: HPV-Status in der Subkohorte aufgeteilt auf die Medikamentengruppen. Anmerkung: Die X-Achse zeigt die verschiedenen Medikamentengruppen. Zu Calcineurininhibitoren wurden Patienten gezählt die Tacrolimus oder/und Cyclosporin A eingenommen haben. Unter mTor-Inhibitoren fallen die Medikamente Everolimus und Sirolimus. Unter „Andere“ die Medikamente Cyclophosphamid, Rituximab und Alemtuzumab. Die Y-Achse zeigt den Anteil an Patienten aus der Subkohorte, die das jeweilige Medikament für mindestens 14 Tage innerhalb des ersten Jahres nach Transplantation genommen haben. Als HPV positiv galten Patienten, die zum 12 Monats-follow-up einen HPV-positiven Abstrich aufwiesen (n=4).

Bei keiner Medikamentengruppe konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Einnahme und einer oralen HPV-Infektion nach 12 Monaten gefunden werden (Chi-Quadrat-Test/ Exakter Fisher-Test).

3.8 Statistische Auswertung nach Ausschluss von Patienten mit Proben mit niedrigem Zellgehalt

Bei 466 Abstrichen lagen die C_P -Werte in der zellulären PGK 1 qPCR unter 33. Das entsprach 205 BS bei BL, 135 nach 6 Monaten und 126 nach 12 Monaten. Die übrigen Proben wurden von der Auswertung ausgeschlossen, um den Einfluss einer schlechteren Probenqualität (z.B. durch zu wenig enthaltene Zellen) auf die Daten zu überprüfen.

66,3 % ($n = 136$) der verbliebenen Patienten waren Männer. Bei BL gab es 72 Patienten mit LTX, 93 Patienten mit RTX, 10 Patienten mit RPTX und 30 Patienten mit HSCT. Es waren insgesamt 4,5 % ($n = 21$) aller Abstriche mit C_P -Werten unter 33 ($n=466$) HPV positiv, was auf Individuen gerechnet 8,3 % orale HPV-Infektionen ergab ($n = 17$). Zum Zeitpunkt der Baseline waren 4,9 % der BS, nach 6 Monaten 4,4 % der BS und nach 12 Monaten 4,0 % der BS HPV positiv. Hier war ebenfalls das Alter als Risikofaktor für eine orale HPV-Infektion signifikant ($p = 0,04$, Man-Whitney U Test).

90 der Patienten hatten drei BS mit jeweils C_P -Werten unter 33 in der zellulären qPCR auf PGK 1 auf. Davon waren 62,2 % Männer ($n = 56$). Insgesamt zeigten 11,1 % ($n = 10$) eine orale HPV-Infektion innerhalb der ersten 12 Monate nach Transplantation. Das entsprach 5,6 % der BS bei BL, 3,3 % der BS nach 6 Monaten und 4,4 % der BS nach 12 Monaten. In diesem Kollektiv war das Alter als Risikofaktor für eine orale HPV-Infektion ebenfalls signifikant ($p = 0,03$ Man-Whitney U Test).

Der Zusammenhang zwischen Geschlecht und oraler HPV-Infektion war nicht signifikant.

Bei 89 Patienten in der Subgruppe mit C_P -Werten < 33 gab es Daten zur Abstoßungsreaktion in den ersten 12 Monaten nach Transplantation. Hier zeigte sich, wie in der Subkohorte ohne C_P -Wert Begrenzung ein signifikanter Zusammenhang ($p = 0,024$). Von 70 Patienten in der Subkohorte mit C_P -Werten < 33 gab es Daten zur primären Organ-Nichtfunktion. Es konnte keine Signifikanz zwischen HPV-Status nach 6 bzw. 12 Monaten und der primären Nichtfunktion eines Organs gefunden werden ($p = 0,112$).

Auch die Analyse aller anderen Risikofaktoren hat kein signifikantes Ergebnis bei einem Ausschluss aller BS mit einem $C_P < 33$ hervorgebracht (siehe Tabelle 18).

Tabelle 18: Risikofaktoren nach HVP-Status aufgeteilt bei dem Subkollektiv- Patienten mit mindestens 3 Abstrichen mit C_P-Wert <33 (n=90)

Charakteristika	HPV positiv ^a (%)	HPV negativ (%)	Total	P-Wert*
Total	10 (11,1)	80 (88,9)	90	
Geschlecht				0,737
Männer	7 (12,5)	49 (87,5)	56	
Frauen	3 (8,8)	31 (91,2)	34	
Organgruppe				0,421
Niere	3 (7,3)	38 (92,7)	41	
Leber	6 (18,8)	26 (81,3)	32	
HSCT	1 (8,3)	11 (91,7)	12	
Niere, Pankreas ^b	0 (0)	5 (100)	5	
	HPV positiv nach 6/12 M (%)	HPV negativ nach 6/12 M (%)		
Vorkommen einer primären Organ- Nichtfunktion				0,112
Ja	1 (50)	1 (50)	2	
Nein	3 (4,4)	65 (95,6)	68	
Vorkommen einer Abstoßungsreaktion				0,024
Ja	2 (40)	3 (60)	5	
Nein	3 (3,6)	81 (96,4)	84	

*Signifikant bei einem P-Wert<0,05. Es wurden der Chi-Quadrat-Test und der Exakter Fisher-Test (bei einer Zelhäufigkeit < 5) angewandt.

^aEs wurden alle Patienten der Subkohorte mit mindestens einem HPV-positiven Abstrich berücksichtigt.

^bEnthält einen Patienten mit Pankreastreansplantation.

3.9 Untersuchung weiterer Folgeabstriche von HPV-positiven Patienten

Um die Dauer der oralen HPV-Infektionen zu ermitteln, wurde bei den 17 Patienten mit HPV-positiven BS, alle weiteren in der DZIF Biobank verfügbaren Abstriche auf HPV untersucht. Das umfasste die Abstriche zu den Zeitpunkten 3 Monate (n = 11), 9 Monate (n = 7), 2 Jahre (n = 6), 3 Jahre (n = 11) und 4 Jahre (n = 1) nach Transplantation, sofern vorhanden.

Nur bei einem Patienten konnte zu weiteren Zeitpunkten HPV-DNA gefunden werden. Dieser Patient zeigte bereits nach 6 Monaten eine „HPV-X“ Infektion, bei 9 Monaten wieder eine „HPV-X“ Infektion, bei 12 Monaten eine HPV138 Infektion und nach 2 Jahren erneut eine „HPV-X“ Infektion.

Es zeigte sich, dass die meisten HPV-Infektionen nur zu einem Zeitpunkt detektierbar waren.

3.10 HPV-Screening der Kontrollgruppe

Als Kontrollgruppe dienten 90 Patienten, die bei einem Klinikbesuch einen oropharyngealen Abstrich für die COVID-19 Diagnostik abgegeben haben. Obwohl sich das Transportmedium (Virocult oder Liquid Amies) und die Abstrichtechnik von der DZIF-Studie unterschied, wurde dies als provisorische Kontrollgruppe für sinnvoll erachtet. Die Kontrollgruppe wurde bezüglich Alter und Geschlecht mit unserer Transplantationskohorte nach 12 Monaten gematcht.

Hier hatten 7,8 % (n = 7) der Probanden eine orale HPV-Infektion. Es konnten die HPV Typen 51 (n = 3), 6 (n = 2) und X (n = 3) gefunden werden. Dabei wies ein Patient eine multiple HPV-Infektion mit Typ 51 und 6 auf. Dementsprechend hatten 3,3 % der Probanden in der Kontrollgruppe eine HR-HPV-Infektion.

3,3 % der Frauen (n = 1) und 10 % der Männer (n = 6) zeigten eine orale HPV-Infektion, dies war aber nicht signifikant (p = 0,417). Alle HPV-positiven Patienten waren zwischen 40 und 70 Jahre alt. Trotz unterschiedlicher Abstrichmethoden zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den C_p-Werten der Kontrollgruppe und der Transplantationsgruppe (p = 0,371, Man-Whitney U Test). Patienten aus der Tx-Kohorte zeigten 12 Monate nach Transplantation nicht häufiger orale HPV-Infektionen als die Kontrollgruppe (p = 0,24 mit dem exakten Test nach Fisher).

4 Diskussion

4.1 Reaktivierung von HPV-Infektionen nach Transplantation

Die letzten Jahre konnte ein - vermutlich HPV-bedingter - Anstieg an Kopf-Hals-Tumoren beobachtet werden (Barnes et al., 2016, Marur et al., 2010, Chaturvedi et al., 2013). Besonders auffällig ist eine Häufung an Kopf-Hals-Tumoren bei Patienten unter Immunsuppression nach Transplantation im Vergleich zur Normbevölkerung (Alsidawi et al., 2017, Harris and Penn, 1981, Collett et al., 2010). Eine mögliche Erklärung dafür ist ein durch die Immunsuppression vermehrtes Vorkommen an oralen HPV-Infektionen (Grulich et al., 2007). Bei sexuell inaktiven Frauen konnte eine ähnlich hohe HPV-Prävalenzrate wie bei sexuell aktiven Frauen beobachtet werden. Dies lässt auf eine mögliche Reaktivierung von HPV schließen (Doorbar, 2013).

Einige Studien weisen darauf hin, dass HPV durch Läsionen in den oberen Hautschichten in die Basalzellen gelangen und dort latent persistieren (Gravitt, 2012, Maglennon and Doorbar, 2012). Möglicherweise wird die Aktivität bei oral vorkommenden HPV stark durch das Immunsystem kontrolliert, so dass sie in den basalen Zellen des Epithels in eine Latenzphase eintreten. Eine Suppression des Immunsystems könnte zu einer Reaktivierung und einem erneuten Anstieg der viralen Kopien führen. Dieses Phänomen konnte bisher bei einigen Tierexperimenten beobachtet werden (Maglennon et al., 2014, Maglennon and Doorbar, 2012, Doorbar, 2013). In den Arbeiten von Gravitt et al. und Beachler et al. konnte ein Anstieg von HPV-Infektionen bei einer Abnahme an CD4-T-Zellen nachgewiesen werden (Gravitt, 2012, Beachler et al., 2012). Daraus lässt sich schließen, dass T-Zellen einen Einfluss auf das Vorkommen von oralen HPV-Infektionen haben (Gravitt, 2012).

Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, inwiefern eine Immunsuppression zu einer Reaktivierung oder erhöhten Suszeptibilität gegen HPV führt und ob es noch weitere Risikofaktoren für eine orale HPV-Infektion gibt.

Für diese Studie wurden Patienten der DZIF-Transplantationskohorte gewählt, um ein möglichst breites Spektrum an Transplantationspatienten bei gleichzeitig fest definierten Probenentnahmezeitpunkten zu untersuchen. Dadurch konnte die HPV-Prävalenz bei Patienten aller Altersgruppen nach verschiedenen Organtransplantationen untersucht

werden. Bisher gibt es nur Studien, die die orale HPV-Prävalenz bei einer Organgruppe und zu einem Zeitpunkt untersuchen (Ammatuna et al., 2001, Rose et al., 2006, Szubinska-Lelonkiewicz et al., 2018, Winer et al., 2015). Im Gegensatz dazu wurde in dieser Arbeit die orale HPV-Prävalenz bei und sowie 6 und 12 Monate nach Transplantation untersucht.

Dadurch sollte die Entwicklung der oralen HPV-Infektionen unter Immunsuppression beobachtet werden. Zusätzlich wurden potentielle Risikofaktoren für eine orale HPV-Infektion untersucht.

4.2 Einordnung der HPV-Prävalenz

Mit 215 Transplantpatienten, die insgesamt 487 bukkale Abstriche abgegeben haben, konnte in dieser Studie ein großes Patientenkollektiv auf das Vorkommen oraler HPV-Infektionen untersucht werden. Die Untersuchung von 142 beziehungsweise 130 Abstrichen von Probanden 6 und 12 Monate nach Transplantation ermöglichte die Einschätzung der HPV-Prävalenz über einen längeren Zeitraum in einer Kohorte.

In der Transplantationskohorte konnte eine HPV-Prävalenz von circa 4 % bei allen drei Zeitpunkten (0, 6, 12 Monate nach Tx) gefunden werden. Dabei zeigte sich weder ein Anstieg der Prävalenz in den ersten 12 Monaten nach Transplantation noch ein gehäuftes Auftreten von High-Risk HPV Typen.

Es konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen der HPV-Prävalenz 12 Monate nach Transplantation (3,8 %) und der HPV-Prävalenz in der von uns gebildeten provisorischen Kontrollgruppe (7,9 %) beobachtet werden.

Einschränkend muss gesagt werden, dass die Abstriche der Transplantationsgruppe in der Wangenschleimhaut erfolgten und die der Kontrollgruppe oropharyngeal. Zudem ist die detaillierte Zusammensetzung der Kontrollgruppe unbekannt (SARS-CoV-2 Screening am Tübingen Universitätsklinikum), so dass sich Lebensstil und Vorerkrankungen von den Transplantpatienten unterscheiden können. Die beiden Gruppen können aufgrund der methodischen Unterschiede nur orientierend verglichen werden.

Jedoch zeigte sich in den qPCRs auf das zelluläre Gen PGK 1 kein signifikanter Unterschied in der Zellqualität zwischen der Abstreichmethode der Kontrollgruppe und der Transplantationskohorte. Damit sind beide Gruppen qualitativ grob miteinander

vergleichbar. Zudem ließ sich kein Zusammenhang zwischen der Menge an zellulärer DNA und dem HPV-Status eines Abstriches nachweisen. Dies deutet auf eine ausreichende Qualität der Abstriche hin. Mäßig bis hochpositive HPV-Infektionen wurden mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht übersehen.

Die in unserer Arbeit gefundene Prävalenz von 4-8 % deckt sich mit anderen großen Studien und Reviews zu oralen HPV-Infektionen. Dabei werden orale HPV-Prävalenzen von 6,9 % (Gillison et al., 2012), 4,5 % (Kreimer et al., 2010) und 4 % (Kreimer et al., 2011) beschrieben. Dabei haben Gillison et al. 5579 Probanden im Alter von 14-69 Jahren aus den USA und Kreimer et al., 2011 1688 Männer im Alter von 18-74 Jahren aus Mexiko, USA und Brasilien auf orale HPV-Infektionen untersucht. Beide Studien haben als Material Mundspülungen verwendet. Kreimer et al., 2010 haben dagegen in ihrem Review 18 internationale Studien zu oralem HPV mit unterschiedlicher Probenentnahme und verschiedenem Patientenkollektiv analysiert (Kreimer et al., 2010, Kreimer et al., 2011, Gillison et al., 2012). Insgesamt wurden in die Analyse 4581 Proben von krebsfreien Probanden eingeschlossen.

In der Transplantationskohorte, in der alle Proben mit derselben Methode entnommen wurden, kam es innerhalb des ersten Jahres zu keinem detektierbaren Anstieg an Infektionen. Eine durch die Immunsuppression bedingte Zunahme an HPV-Infektionen ist somit - zumindest im ersten Jahr nach Transplantation - unwahrscheinlich.

Ähnliche Ergebnisse zur HPV-Prävalenz nach Transplantation wurden bereits in zwei anderen Studien mit Nierentransplantierten und Stammzelltransplantierten diskutiert. Beide konnten keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontrollgruppe und Transplantationsgruppe beobachten. Allerdings gab es jeweils nur einen Messzeitpunkt (Faber et al., 2020, Winer et al., 2015). Im Gegensatz dazu konnten Rose et al. und Ammatuna et al. in ihren Studien eine deutliche Erhöhung der HPV-Prävalenz bei Transplantierten im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen: Während Rose et al. bei 18 % der Transplantierten und bei 1 % der Kontrollgruppe orale HPV-DNA nachweisen konnten, fanden Ammatuna et al. diese bei 20 % der Transplantierten und bei 3 % der Kontrollgruppe (Ammatuna et al., 2001, Rose et al., 2006).

Szubinska-Lelonkiewicz et al. konnten bei Transplantierten mit 36,1 % eine sehr hohe orale HPV-Prävalenz aufzeigen. Allerdings wurden nur Biopsien von Patienten mit makroskopisch sichtbaren Läsionen mittels Hybrid Capture II auf HPV untersucht, so dass dies nicht mit unserem Studien-Setting vergleichbar ist (Szubinska-Lelonkiewicz et al., 2018).

Auch Sindrewicz et al. konnten mit 28 % eine hohe HPV-Prävalenz in oralen Abstrichen von Nierentransplantierten mit mindestens 5 Jahren Immunsuppression finden (Sindrewicz et al., 2020). Beide Studien haben jedoch keine Kontrollgruppe, sodass eine erhöhte HPV-Prävalenz aufgrund regionaler Unterschiede nicht ausgeschlossen werden kann.

Kreimer et al. konnten in ihrem Review zeigen, dass möglicherweise durch einen Publikationsbias, die Probandenzahl einer Studie invers mit der HPV-Prävalenz korreliert. Dies könnte auch eine Erklärung für die Unterschiede in der HPV-Prävalenz sein (Kreimer et al., 2010). Während in unserer Studie 142 beziehungsweise 130 Transplantierte nach 6 beziehungsweise 12 Monaten untersucht wurden, haben andere Transplantationsstudien nur sehr kleine Kohorten mit 32-88 Probanden untersucht (Ammatuna et al., 2001, Rose et al., 2006, Szubinska-Lelonkiewicz et al., 2018, Winer et al., 2015, Sindrewicz et al., 2020).

Denkbar ist auch eine Korrelation der Dauer der Immunsuppression und der oralen HPV-Prävalenz. Die bisherigen Studien zur oralen HPV-Prävalenz hatten im Gegensatz zu unserer Studie keine festen Abstrichintervalle. Der Abstand zwischen Transplantation und HPV-Testung variierte zwischen mindestens 6 Monaten und 5 Jahren nach Transplantation (Faber et al., 2020, Sindrewicz et al., 2020). In der Studie von Rose et al. war der Median zwischen Transplantation und Abstreichdatum 6 Jahre, Ammatuna et al. machten dazu keine Angaben.

Die Häufigkeit von oralem HPV ist abhängig von der geographischen Region und dem Entwicklungsstatus eines Landes (Kreimer et al., 2010, Kreimer et al., 2011), was die unterschiedlichen Beispiele für HPV-Prävalenzen erklären kann.

Insgesamt unterscheiden sich die Studien zur oralen HPV-Prävalenz sehr in der Methodik und sind daher schwierig zu vergleichen. Art und anatomische Lokalisation für die

Probengewinnung könnten daher ein weiterer möglicher Grund für die unterschiedlichen HPV-Prävalenzen sein.

Bisher ist wenig über das Vorkommen von HPV an verschiedenen anatomischen Orten der Mundregion bekannt. In einer Studie wurde HPV häufiger bukkal als lingual detektiert (Ammatuna et al., 2001). Zudem finden sich nach Transplantation orale Läsionen am häufigsten am Zahnfleisch und in der Wangenschleimhaut (Szubinska-Lelonkiewicz et al., 2018). Eine weitere Studie deutet auf ein HPV-Reservoir in der Nase hin (Forslund et al., 2013).

Plattenepithelkarzinome hingegen sind häufiger im Oropharynx als in der oralen Schleimhaut zu finden. Daher könnten HPV-Infektionen möglicherweise auch häufiger oropharyngeal als bukkal zu finden sein (Migaldi et al., 2012, Gillison et al., 2000). Mehrere Studien verwendeten Mundspülungen (Faber et al., 2020, Gillison et al., 2012, Kreimer et al., 2011) und orale Abstriche (Winer et al., 2015, Sindrewicz et al., 2020), wohingegen andere Zytobrush (Ammatuna et al., 2001), Zahnbürsten (Rose et al., 2006) oder Biopsien (Szubinska-Lelonkiewicz et al., 2018) nutzten. Mundspülungen enthalten dabei deutlich mehr DNA als Proben, die durch Zahnbürsten und Mundabstriche gewonnen werden (Rogers et al., 2007, García-Closas et al., 2001). In einem Vorversuch unserer Studie konnte zudem gezeigt werden, dass die DNA-Qualität zum Teil vom Abstrichnehmer abhängt.

Es lässt sich also insgesamt nicht völlig ausschließen, dass die bukkale Abstreichweise in der Transplantationskohorte eventuell zu niedrigeren HPV-Prävalenzen führt. Jedoch ist davon auszugehen, dass bei einer produktiven HPV-Infektion an einer bestimmten Stelle im Mund auch im gesamten Mund-Rachenraum HPV-DNA detektierbar sein sollte, zumal es sich beim Inno-LiPA um eine hochsensitive Methode handelt.

Bisher existiert noch kein Goldstandard für die molekulare Detektion von oralem HPV (Sindrewicz et al., 2020), sodass in den bisherigen Studien unterschiedliche Methoden mit verschiedenen Primern angewendet werden. Der Inno-LiPA wird bei mehreren Studien zur Detektion von oraler HPV-DNA verwendet (de Araujo et al., 2011, Faber et al., 2020). Er gilt als sehr sensitive Methode um HPV-DNA nachzuweisen und kann HR-HPV bereits bei geringen DNA Mengen detektieren. Van Hamont et al., beobachteten in ihrer Studie jedoch eine etwas geringere Sensitivität des Inno-LiPA beim Vorliegen

multipler HPV-Infektionen. Daher wäre es möglich, dass niedrig positive Mehrfachinfektionen in dieser Arbeit nicht immer detektiert werden konnten (Bihl et al., 2017, Kleter et al., 1999, van Hamont et al., 2006).

4.3 Vorkommen von HPV Typen und Infektionsdauer

In den untersuchten Probanden der Transplantationskohorte konnte bei 1,4 % und in der Kontrollgruppe bei 3,3 % HR-HPV gefunden werden. Diese Beobachtung deckt sich weitestgehend mit der Literatur. Dabei haben Gillison et al., 2012 und Kreimer et al. 2011 in ihren Studien 5579 bzw. 1680 Probanden auf orales HPV untersucht und 3,7 % bzw. 1,3 % High-Risk HPV oral detektiert (Gillison et al., 2012, Kreimer et al., 2011). Eine weitere Studie hat eine High-Risk Prävalenz von 3,5 % in 4581 Proben ermittelt (Kreimer et al., 2010).

Im ersten Jahr nach Tx gab es keinen durch Immunsuppression bedingten Anstieg an HR-HPV Infektionen in dieser Studie. Jedoch konnte das Vorkommen unterschiedlicher HPV Typen in der Kontrollgruppe und der Transplantationskohorte beobachtet werden. Während bei Transplantierten bukkal am häufigsten HPV16 (n=2) und 66 (n=2) nachweisbar war, kam in der Kontrollgruppe oropharyngeal am häufigsten HPV51 (n=3) vor.

In einem Großteil der Studien wird HPV16 oral am häufigsten gefunden (Antonsson et al., 2021, Kreimer et al., 2011, Gillison et al., 2012, Kreimer et al., 2010, Szubinska-Lelonkiewicz et al., 2018, Winer et al., 2015). In zwei der Transplantationsstudien wurden die HPV Typen nicht genauer genotypisiert (Ammatuna et al., 2001, Sindrewicz et al., 2020). Faber et al. fanden ebenfalls HPV51 als häufigsten HPV Typ, Rose et al. dagegen HPV13. Die unterschiedlichen HPV Typen könnten durch die unterschiedlichen Abstrichorte, sowie die unterschiedlichen HPV-Detektionsmethoden bedingt sein (Faber et al., 2020).

HPV16 persistiert oral häufiger als andere HPV Typen (Tommasino, 2014, D'Souza et al., 2020). In den USA sind bereits bis zu 60 % der Oropharynxtumore HPV16 positiv, HPV51 kommt dagegen nicht vor (Marur et al., 2010, Gillison et al., 2008). Daher scheint HPV16 eine wichtige Rolle in der Karzinogenese zu spielen.

Auffällig ist das hohe Vorkommen von „HPV-X“ in dieser Arbeit. Möglicherweise handelt es sich dabei um Beta und Gamma HPV Typen, welche größtenteils vom Inno-LiPA nicht genotypisiert werden. Forslund et al. und Bottalico et al. konnten zeigen, dass diese beiden Genera häufig in der Mundhöhle vorkommen (Forslund et al., 2013, Bottalico et al., 2011).

23,5 % (n=4) der HPV-positiven Patienten in der Transplantationskohorte wiesen zu zwei Messzeitpunkten eine HPV-Infektion auf. Kein Patient zeigte zu mehr als zwei Messzeitpunkten eine Infektion. Dabei wurde nie derselbe (typisierbare) HPV Typ gefunden, jedoch hatten drei der Patienten an je einem Zeitpunkt eine Infektion mit „HPV-X“. Somit kann eine persistente Infektion aufgrund der nicht durchführbaren Typisierung nicht vollständig ausgeschlossen werden. Bei 76,5% der HPV-positiven Transplantierten war beim nächsten Follow-up keine HPV-Infektion mehr nachweisbar. Unsere Daten weisen also darauf hin, dass orale HPV-Infektionen unabhängig von ihrem HPV Typ innerhalb eines Jahres ausheilen bzw. nicht so hochreplikativ sind, als dass sie mehrfach detektierbar wären. (Gravitt, 2012). Dies deckt sich mit den bisherigen Studienergebnissen zur Clearance von oralem HPV (Kreimer et al., 2013, Antonsson et al., 2021, D'Souza et al., 2007).

4.4 Risikofaktoren für eine orale HPV-Infektion

In unserer Arbeit konnte weder in der Kontrollgruppe noch in der Transplantationskohorte ein eindeutiger Unterschied in der HPV-Prävalenz zwischen Männern und Frauen festgestellt werden. Dieses Ergebnis ist in der Literatur bisher umstritten (Kreimer et al., 2010, Gillison et al., 2012). Andere Autoren finden hier Unterschiede, die sich möglicherweise auf regional unterschiedliches geschlechtsspezifisches Verhalten bei Lifestylefaktoren wie Rauchen, Alkoholkonsum oder Sexualverhalten zurückführen lassen (Migaldi et al., 2012).

In unserer Studie zeigt sich ein knapp signifikanter Zusammenhang zwischen Alter und der oralen HPV-Prävalenz. Dies hat sich sowohl in der Transplantationskohorte als auch in der Kontrollgruppe bestätigt. Verschiedene Studien beobachten ebenfalls einen solchen Trend (Kreimer et al., 2011, Conway et al., 2016, Rose et al., 2006, Gillison et al., 2012).

Im Gegensatz dazu geht die Anzahl zervikaler HPV-Infektionen mit steigendem Alter tendenziell eher zurück (Cañadas et al., 2004, D'Souza et al., 2007). Womöglich spielt das Immunsystem bei oralen Infektionen eine größere Rolle, weshalb oral eine niedrigere Prävalenz als genital nachweisbar ist (Kreimer et al., 2011, Tommasino, 2014). Eine altersbedingte Schwächung hat daher möglicherweise einen größeren Einfluss auf das Vorkommen oraler HPV-Infektionen (D'Souza et al., 2007, Kreimer et al., 2011, Gillison et al., 2012).

Bei Frauen gibt es zudem einen Zusammenhang zwischen Menopause und einer Reaktivierung der HPV-Infektionen aufgrund einer hormonbedingten Immunsuppression (Gravitt, 2012). Die höhere Prävalenz an oralen HPV-Infektionen bei älteren Probanden könnte aber auch an einer Veränderung des Sexualverhaltens und den dadurch bedingten Neuinfektionen liegen (D'Souza et al., 2007). Konsum von Alkohol und Nikotin, sowie die Hygiene und das Mikrobiom könnten ebenfalls einen Einfluss auf die orale HPV-Prävalenz haben (Kreimer et al., 2011, Gillison et al., 2008).

In einigen Studien kann beobachtet werden, dass Nierentransplantierte häufiger als Lebertransplantierte an Kopf-Hals-Tumoren erkranken (Alsidawi et al., 2017, Öhman et al., 2015, Krynitz et al., 2013). Allerdings konnten in dieser Arbeit keine Unterschiede in der Häufigkeit oraler HPV-Infektion bei Patienten verschieden transplanteder Organgruppen gefunden werden. Bemerkenswerterweise zeigten Lebertransplantierte in unserer Studie am häufigsten orale HPV-Infektionen und am häufigsten andauernde Infektionen. Eine Erklärung dafür könnte der Lebenswandel der Leberpatienten sein, da Leberzirrhosen ein häufiger Grund für Lebertransplantationen sind und nicht selten durch Alkoholabusus oder chronischen Hepatitis-Infektionen verursacht werden (Wiegand et al., 2013). Jedoch wurden in unserer Studie keine Informationen zum Sexualverhalten, Rauchen oder Alkoholkonsum erhoben, sodass dies nicht genauer untersucht werden konnte.

Möglicherweise erklären sich die Unterschiede zwischen den Organgruppen auch durch die unterschiedliche Stärke der Immunsuppression je nach transplantiertem Organ (Öhman et al., 2015).

In dieser Arbeit konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen oraler HPV-Prävalenz und bestimmten Klassen an immunsuppressiven Medikamenten gefunden werden. Allerdings war in unserer Kohorte die Gesamtzahl der HPV-positiven Probanden nach 12 Monaten

sehr klein ($n=5$). Um dies bei einer so niedrigen Prävalenz genauer untersuchen zu können, wäre also eine deutlich größere Studiengruppe notwendig. Auch war die Dauer der Immunsuppression in dieser Studie möglicherweise nicht lang genug, um einen Effekt zu beobachten. Ob ein Zusammenhang zwischen bestimmten Medikamentenklassen und der HPV-Prävalenz besteht, war trotz sorgfältiger und detaillierter Erhebung der Medikationsdaten schwierig zu bewerten. Dies ist einerseits durch die Vielfalt an verschiedenen Organklassen und damit multiplen verschiedenen Immunsuppressions-Schemata in der DZIF-Tx-Kohorte bedingt, andererseits den häufigen Medikamentenwechseln über die Zeit für individuelle Patienten aufgrund der Nebenwirkungen geschuldet. Nach der stationären Entlassung werden Patienten zudem häufig heimatnah betreut und mögliche Medikationswechsel entgehen der Dokumentation. Zudem erfolgt die Dosierung der Immunsuppressiva anhand der Talspiegel im Blut und daher sehr individuell (Alsidawi et al., 2017, Thomas Karow, 2022). Die Schwierigkeit, den Grad der Immunsuppression systematisch darzustellen spiegelt sich in der Tatsache wider, dass es offenbar noch sehr wenig Studien gibt, die den Einfluss verschiedener immunsupprimierender Medikamente auf die orale HPV-Prävalenz untersuchen.

Es wurde berichtet, dass Patienten unter Therapie mit Cyclosporin A häufiger orale Läsionen oder Zahnfleischwucherungen (Rose et al., 2006, Szubinska-Lelonkiewicz et al., 2018) entwickeln, ein Zusammenhang mit HPV ist hier allerdings unklar. Sindrewicz et al. konnten ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen den Medikamenten und der oralen HPV-Prävalenz finden (Sindrewicz et al., 2020).

In unserer Studie fanden wir eine tendenzielle Korrelation einer Organabstoßung mit der oralen HPV-Prävalenz, jedoch nur für eine sehr geringe Patientenzahl ($n=2$), so dass Schlussfolgerungen mit Vorsicht zu ziehen sind. Eine Abstoßung wird mit einer intensivierten Immunsuppression behandelt. Interessanterweise konnten Bhatia et al. zeigen, dass alle Patienten nach Stammzelltransplantation, die an einem oralen Tumor (Speicheldrüsentumore ausgeschlossen) erkrankten, auch eine Abstoßungsreaktion hatten (Bhatia et al., 2001). Ein größeres Studienkollektiv ist notwendig, um weitere Aussagen bezüglich eines möglichen Zusammenhangs zwischen Organabstoßung und oraler HPV-Prävalenz treffen zu können.

4.5 Limitationen der Studie

Es ist bekannt, dass Lifestylefaktoren wie Rauchen, Alkohol und Sexualverhalten einen Einfluss auf die orale HPV-Prävalenz haben können (Gillison et al., 2012, Migaldi et al., 2012). Da solche Daten in dieser Studie nicht erhoben wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine niedrigere HPV-Prävalenz durch die Lebensweise zustande kommt, z.B. durch besonders gesundheitsbewusstes Verhalten nach Transplantation.

Zudem wurde der HPV-Impfstatus nicht abgefragt. Da die HPV-Impfung jedoch in Deutschland erst seit 2007 für Frauen und seit 2018 für Männer zugelassen ist und der Altersmedian der Patienten in unserer Studie zwischen 54 und 56 (12M versus BL) Jahren liegt, ist eine Verfälschung der Daten dadurch eher unwahrscheinlich (RKI, 2018).

Leider existieren keine systematischen Daten zur oralen HPV-Prävalenz in der deutschen Allgemeinbevölkerung bzw. in gesunden (Non-Tx-) Probanden. Auch wenn für diese Studie die provisorische Kontrollgruppe (Abstriche ursprünglich für das SARS-CoV-2 Screening entnommen) gebildet wurde, wäre eine größer angelegte, möglichst regionale und methodisch identische Kontrollgruppe von Vorteil.

Um schlechte Probenqualität als Ursache nicht signifikanter Ergebnisse auszuschließen, wurden alle Tests mit Proben höherer Qualität wiederholt. Es wurde keine Differenz in der Signifikanz beobachtet. Ein Einfluss der Probenqualität als Ursache der geringen HPV-Prävalenz ist somit unwahrscheinlich.

Aufgrund der Heterogenität des Patientenkollektivs, waren einige Unterkategorien für eine sinnvolle Auswertung der Daten noch zu klein.

Ein größeres Studienkollektiv, sowie möglicherweise der Einschluss späterer Abnahmezeitpunkte ist notwendig, um den Einfluss der medikamentösen Immunsuppression und Vorerkrankungen genauer zu untersuchen.

4.6 Schlussfolgerung

Zusammenfassend konnte keine Erhöhung der HPV-Prävalenz im Verlauf der Immunsuppression im ersten Jahr nach Tx beobachtet werden. Ein allgemeines Screening nach Transplantation erscheint daher nicht sinnvoll (D'Souza et al., 2017). Transplantierte Patienten waren oral nicht häufiger als die Kontrollgruppe mit HPV infiziert. Allerdings wiesen sie häufiger den HR-HPV Typ16 auf, der eine Rolle in der oropharyngealen Karzinogenese spielt, als die Probanden der Kontrollgruppe.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass höheres Alter und eine Organabstoßung statistisch tendenziell mit dem Nachweis von oralem HPV assoziiert waren. Ein größeres Studienkollektiv und ein längerer Untersuchungszeitraum sind nötig, um das Vorkommen und Verhalten von oralen HPV-Infektionen besser zu begreifen. Das Fortlaufen der Studie mit den neueren Daten und späteren Proben aus der DZIF-Tx-Kohorte wäre sinnvoll, um mehr über die Risikofaktoren einer HPV-Infektion zu verstehen.

5 Zusammenfassung

Für immunsupprimierte Menschen, wie zum Beispiel Organtransplantierte, besteht ein deutlich erhöhtes Risiko an persistenten Viruserkrankungen wie dem humanen Papillomvirus (HPV) zu erkranken. Orale HPV-Infektionen sind mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich, besonders im Oropharynx assoziiert. Bisher ist jedoch wenig über die orale Prävalenz, das Vorkommen der verschiedenen HPV Typen und die Infektionsdauer bei Transplantierten bekannt.

Um die Häufigkeit oraler HPV-Infektionen, der vorkommenden HPV-Genotypen und der damit assoziierten Risikofaktoren zu untersuchen, wurden Wangenabstriche (buccal Swabs) von Leber-, Nieren-, Stammzell- und Pankreas-Nierentransplantierten der DZIF-Transplantationskohorte, die zu definierten Zeitpunkten nach Transplantation (0, 6 und 12 Monate) am DZIF-Standort Tübingen gesammelt wurden, analysiert.

Bei der DZIF-Transplantationskohorte (DZIF-Tx-Kohorte) handelt es sich um eine Studie des Deutschen Zentrums für Infektionsforschung (DZIF) an verschiedenen Transplantationszentren zur Sammlung und Untersuchung longitudinaler Daten und biologischer Proben von Patienten nach Transplantation.

Die Qualität der Wangenabstriche wurde mittels einer quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) auf das zelluläre Referenzgen Phosphoglyceratkinase 1 (PGK 1) kontrolliert. Für das HPV-Screening wurde ein Line-Probe-Assay (Inno-LiPA) verwendet, der 32 spezifische HPV Typen, darunter verschiedene High- und Low-Risk Typen detektieren kann. Unklare Ergebnisse („HPV-X“) wurden mit der Sanger-Methode sequenziert. Klinische Patientendaten wurden aus der DZIF-Datenbank entnommen. Als Kontrollgruppe wurden oropharyngeale, negative SARS-CoV-2 Screening Abstriche (n=90), die nach Alter und Geschlecht verwendet. Die Alters- und Geschlechtsverteilung entsprach jener in der Patientengruppe.

Insgesamt wurden 487 Wangenabstriche von 215 Probanden nach Transplantation auf HPV untersucht. Die C_P-Werte (als Indikator des Zellgehalts) der PCR auf das zelluläre Gen PGK 1 variierten. Dies kann als Anzeichen für eine schwankende Probenqualität interpretiert werden. Es konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen der HPV-Positivität und der Höhe des Zellgehalts gefunden werden.

HPV wurde in 10/215 (4,7 %), 6/142 (4,2 %) und 5/130 (3,8 %) Abstrichen nach 0 bzw. 6 bzw. 12 Monaten nach Transplantation entdeckt. Dabei wurde HPV-66 (n=2), -16 (n=2), -53 (n=1), -31 (n=1), -10 (n=1), -76 (n=1), -107 (n=1) und -138 (n=1) detektiert. Bei den anderen 11 Abstrichen konnte das unspezifische HPV-Ergebnis nicht genauer genotypisiert werden („HPV-X“). Nach Transplantationstyp aufgeteilt, entspricht dies einer HPV-Positivrate von 13,2 % (10/76) bei Lebertransplantatierten, 4,1 % (4/98) Nierentransplantatierten, 6,5 % (2/31) Stammzelltransplantatierten und 10,0 % (1/10) Nieren-Pankreastransplantatierten mit mindestens einem positiven Abstrich.

Eine Subgruppe mit 109 Probanden, die alle drei Abstriche abgegeben hatten, ermöglichte eine exaktere longitudinale Untersuchung der HPV-Infektionen oral nach Transplantation. 11 Probanden waren HPV positiv, dabei zwei an zwei Zeitpunkten. Jedoch konnte nicht sicher derselbe HPV Typ gefunden werden. Mit der Ausnahme, dass ältere Patienten und Patienten nach Organabstoßung tendenziell häufiger HPV positiv sind, konnten keine weiteren statistisch signifikanten Risikofaktoren (Geschlecht, immunsuppressive Medikation oder transplantierte Organgruppe, Transplantationsursache) gefunden werden. In der Kontrollgruppe waren 7,8 % (n=7) der Abstriche HPV-positiv. Dabei konnten die Typen -51 (n=3) und -6 (n=2) gefunden werden.

Unsere Daten deuten mit einer HPV-Prävalenz von etwa 4 % pro Zeitpunkt auf ein niedriges Vorkommen von HPV nach Transplantation hin, ohne Hinweise auf persistente Infektionen im ersten Jahr nach Transplantation. Möglicherweise hat der anatomische Abstrichort einen Einfluss auf die HPV-Prävalenz und das Vorkommen von HPV Typen. Insgesamt war bei Patienten im ersten Jahr nach einer Organtransplantation am Standort Tübingen im Vergleich zu der gebildeten Kontrollgruppe nicht häufiger oralen HPV-DNA nachweisbar. Aufgrund der niedrigen HPV-Prävalenz ist die Relevanz der möglichen Risikofaktoren schwer fassbar. Ein größeres Studienkollektiv, sowie spätere Abnahmezeitpunkte sind notwendig, um diesbezüglich weitere Aussagen treffen zu können.

6 Literaturverzeichnis

- ALSIDAWI, S., PRICE, K. A., CHINTAKUNTLAWAR, A. V., WESTIN, G. F., GARCIA, J. J., MA, D. J. & OKUNO, S. H. 2017. Characteristics and long-term outcomes of head and neck squamous cell carcinoma after solid organ transplantation. *Oral Oncol*, 72, 104-109.
- AMMATUNA, P., CAMPISI, G., GIOVANNELLI, L., GIAMBELLUCA, D., ALAIMO, C., MANCUSO, S. & MARGIOTTA, V. 2001. Presence of Epstein-Barr virus, cytomegalovirus and human papillomavirus in normal oral mucosa of HIV-infected and renal transplant patients. *Oral Dis*, 7, 34-40.
- ANANTHARAMAN, D., ABEDI-ARDEKANI, B., BEACHLER, D. C., GHEIT, T., OLSHAN, A. F., WISNIEWSKI, K., WUNSCH-FILHO, V., TOPORCOV, T. N., TAJARA, E. H., LEVI, J. E., MOYSES, R. A., BOCCIA, S., CADONI, G., RINDI, G., AHRENS, W., MERLETTI, F., CONWAY, D. I., WRIGHT, S., CARREIRA, C., RENARD, H., CHOPARD, P., MCKAY-CHOPIN, S., SCELO, G., TOMMASINO, M., BRENNAN, P. & D'SOUZA, G. 2017. Geographic heterogeneity in the prevalence of human papillomavirus in head and neck cancer. *Int J Cancer*, 140, 1968-1975.
- ANTONSSON, A., DE SOUZA, M., WOOD, Z. C., CARROLL, A., VAN, K., PATERSON, L., PANDEYA, N. & WHITEMAN, D. C. 2021. Natural history of oral HPV infection: Longitudinal analyses in prospective cohorts from Australia. *Int J Cancer*, 148, 1964-1972.
- ATTNER, P., DU, J., NÄSMAN, A., HAMMARSTEDT, L., RAMQVIST, T., LINDHOLM, J., MARKLUND, L., DALIANIS, T. & MUNCK-WIKLAND, E. 2010. The role of human papillomavirus in the increased incidence of base of tongue cancer. *Int J Cancer*, 126, 2879-84.
- BAAY, M. F., QUINT, W. G., KOUDSTAAL, J., HOLLEMA, H., DUK, J. M., BURGER, M. P., STOLZ, E. & HERBRINK, P. 1996. Comprehensive study of several general and type-specific primer pairs for detection of human papillomavirus DNA by PCR in paraffin-embedded cervical carcinomas. *J Clin Microbiol*, 34, 745-7.
- BARNES, B., KRAYWINKEL, K., NOWOSSADECK, E., SCHÖNFELD, I., STARKER, A., WIENECKE, A. & WOLF, U. 2016. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Robert Koch-Institut.
- BEACHLER, D. C., WEBER, K. M., MARGOLICK, J. B., STRICKLER, H. D., CRANSTON, R. D., BURK, R. D., WILEY, D. J., MINKOFF, H., REDDY, S., STAMMER, E. E., GILLISON, M. L. & D'SOUZA, G. 2012. Risk factors for oral HPV infection among a high prevalence population of HIV-positive and at-risk HIV-negative adults. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 21, 122-33.
- BHATIA, S., LOUIE, A. D., BHATIA, R., O'DONNELL, M. R., FUNG, H., KASHYAP, A., KRISHNAN, A., MOLINA, A., NADEMANEE, A., NILAND, J. C., PARKER, P. A., SNYDER, D. S., SPIELBERGER, R., STEIN, A. & FORMAN, S. J. 2001. Solid Cancers After Bone Marrow Transplantation. *J Clin Oncol*, 19, 464-471.
- BIHL, M. P., TORNILLO, L., KIND, A. B., OBERMANN, E., NOPPEN, C., CHAFFARD, R., WYNNE, P., GRILLI, B., FOERSTER, A., TERRACCIANO, L. M. & HOELLER, S. 2017. Human Papillomavirus (HPV) Detection in Cytologic Specimens: Similarities and Differences of Available Methodology. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 25, 184-189.
- BOTTALICO, D., CHEN, Z., DUNNE, A., OSTOLOZA, J., MCKINNEY, S., SUN, C., SCHLECHT, N. F., FATAHZADEH, M., HERRERO, R., SCHIFFMAN, M. & BURK, R. D. 2011. The oral cavity contains abundant known and novel human papillomaviruses from the Betapapillomavirus and Gammapapillomavirus genera. *J Infect Dis*, 204, 787-92.
- BROUTIAN, T. R., HE, X. & GILLISON, M. L. 2011. Automated high throughput DNA isolation for detection of human papillomavirus in oral rinse samples. *J Clin Virol*, 50, 270-5.
- BZHALAVA, D., EKLUND, C. & DILLNER, J. 2015. International standardization and classification of human papillomavirus types. *Virology*, 476, 341-344.
- CAÑADAS, M. P., BOSCH, F. X., JUNQUERA, M. L., EJARQUE, M., FONT, R., ORDOÑEZ, E. & DE SANJOSÉ, S. 2004. Concordance of prevalence of human papillomavirus DNA in anogenital and oral infections in a high-risk population. *J Clin Microbiol*, 42, 1330-2.
- CHATURVEDI, A. K., ANDERSON, W. F., LORTET-TIEULENT, J., CURADO, M. P., FERLAY, J., FRANCESCHI, S., ROSENBERG, P. S., BRAY, F. & GILLISON, M. L. 2013. Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. *J Clin Oncol*, 31, 4550-9.
- CHATURVEDI, A. K., ENGELS, E. A., PFEIFFER, R. M., HERNANDEZ, B. Y., XIAO, W., KIM, E., JIANG, B., GOODMAN, M. T., SIBUG-SABER, M., COZEN, W., LIU, L., LYNCH, C. F., WENTZENSEN, N., JORDAN, R. C., ALTEKRUSE, S., ANDERSON, W. F., ROSENBERG, P. S. & GILLISON, M. L. 2011. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol*, 29, 4294-301.
- COGLIANO, V., BAAN, R., STRAIF, K., GROSSE, Y., SECRETAN B., El Ghissassi F.; WHO International Agency for Research on Cancer. Carcinogenicity of human papillomaviruses. *Lancet Oncol*. 2005 Apr;6(4):204.

- COLLETT, D., MUMFORD, L., BANNER, N. R., NEUBERGER, J. & WATSON, C. 2010. Comparison of the incidence of malignancy in recipients of different types of organ: a UK Registry audit. *Am J Transplant*, 10, 1889-96.
- CONWAY, D. I., ROBERTSON, C., GRAY, H., YOUNG, L., MCDAID, L. M., WINTER, A. J., CAMPBELL, C., PAN, J., KAVANAGH, K., KEAN, S., BHATIA, R., CUBIE, H., CLARKSON, J. E., BAGG, J., POLLOCK, K. G. & CUSCHIERI, K. 2016. Human Papilloma Virus (HPV) Oral Prevalence in Scotland (HOPSCOTCH): A Feasibility Study in Dental Settings. *PLoS One*, 11, e0165847.
- D'SOUZA, G., AGRAWAL, Y., HALPERN, J., BODISON, S. & GILLISON, M. L. 2009. Oral sexual behaviors associated with prevalent oral human papillomavirus infection. *J Infect Dis*, 199, 1263-9.
- D'SOUZA, G., CLEMENS, G., STRICKLER, H. D., WILEY, D. J., TROY, T., STRUIJK, L., GILLISON, M. & FAKHRY, C. 2020. Long-term Persistence of Oral HPV Over 7 Years of Follow-up. *JNCI Cancer Spectr*, 4, pkaa047.
- D'SOUZA, G., FAKHRY, C., SUGAR, E. A., SEABERG, E. C., WEBER, K., MINKOFF, H. L., ANASTOS, K., PALEFSKY, J. M. & GILLISON, M. L. 2007. Six-month natural history of oral versus cervical human papillomavirus infection. *Int J Cancer*, 121, 143-50.
- D'SOUZA, G., MCNEEL, T. S. & FAKHRY, C. 2017. Understanding personal risk of oropharyngeal cancer: risk-groups for oncogenic oral HPV infection and oropharyngeal cancer. *Ann Oncol*, 28, 3065-3069.
- DABIĆ, M. M., HLUPIĆ, L., BABIĆ, D., JUKIĆ, S. & SEIWERTH, S. 2004. Comparison of polymerase chain reaction and catalyzed signal amplification in situ hybridization methods for human papillomavirus detection in paraffin-embedded cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *Arch Med Res*, 35, 511-6.
- DAUD, II & SCOTT, M. E. 2008. Validation of reference genes in cervical cell samples from human papillomavirus-infected and -uninfected women for quantitative reverse transcription-PCR assays. *Clin Vaccine Immunol*, 15, 1369-73.
- DE ARAUJO, M. R., RUBIRA-BULLEN, I. R., SANTOS, C. F., DIONÍSIO, T. J., BONFIM, C. M., DE MARCO, L., GILLIO-TOS, A. & MERLETTI, F. 2011. High prevalence of oral human papillomavirus infection in Fanconi's anemia patients. *Oral Dis*, 17, 572-6.
- DE VILLIERS, E. M., FAUQUET, C., BROKER, T. R., BERNARD, H. U. & ZUR HAUSEN, H. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324, 17-27.
- DESCHLER, D. G., RICHMON, J. D., KHARIWALA, S. S., FERRIS, R. L. & WANG, M. B. 2014. The "new" head and neck cancer patient-young, nonsmoker, nondrinker, and HPV positive: evaluation. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 151, 375-80.
- DI DOMENICO, M., GIOVANE, G., KOUIDHI, S., IORIO, R., ROMANO, M., DE FRANCESCO, F., FEOLA, A., SICILIANO, C., CALIFANO, L. & GIORDANO, A. 2018. HPV epigenetic mechanisms related to Oropharyngeal and Cervix cancers. *Cancer Biol Ther*, 19, 850-857.
- DOORBAR, J. 2013. Latent papillomavirus infections and their regulation. *Curr Opin Virol*, 3, 416-21.
- DOORBAR, J., QUINT, W., BANKS, L., BRAVO, I. G., STOLER, M., BROKER, T. R. & STANLEY, M. A. 2012. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*, 30 Suppl 5, F55-70.
- DZIF-TRANSPLANTATIONSKOHORTE. 2022. *Transplantationskohorte* [Online]. Available: <https://www.dzif.de/de/arbeitsgruppe/transplantationskohorte> [Accessed 04.05.2022].
- FABER, M. T., KJAER, A. K., LARSEN, H. K., THOMSEN, L. T., HAEDERSDAL, M., BONDE, J., HANSEN, J. M., SORENSEN, S. S. & KJAER, S. K. 2020. Prevalence, type distribution and risk factors for oral HPV in Danish renal transplant recipients. *Oral Dis*, 26, 484-488.
- FIELDS, B., KNIPE, D., HOWLEY, P., COHEN, J., GRIFFIN, D., LAMB, R., MARTIN, M., RACANIELLO, V., ROIZMAN, B., 2013 Fields Virology, 6th Edition, Volume 2
- FORSLUND, O., JOHANSSON, H., MADSEN, K. G. & KOFOED, K. 2013. The Nasal Mucosa Contains a Large Spectrum of Human Papillomavirus Types from the Betapapillomavirus and Gammapapillomavirus Genera. *J Infect Dis*, 208, 1335-1341.
- FRIEDL, F., KIMURA, I., OSATO, T. & ITO, Y. 1970. Studies on a new human cell line (SiHa) derived from carcinoma of uterus. I. Its establishment and morphology. *Proc Soc Exp Biol Med*, 135, 543-5.
- GARCÍA-CLOSAS, M., EGAN, K. M., ABRUZZO, J., NEWCOMB, P. A., TITUS-ERNSTOFF, L., FRANKLIN, T., BENDER, P. K., BECK, J. C., LE MARCHAND, L., LUM, A., ALAVANJA, M., HAYES, R. B., RUTTER, J., BUETOW, K., BRINTON, L. A. & ROTHMAN, N. 2001. Collection of genomic DNA from adults in epidemiological studies by buccal cytobrush and mouthwash. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 10, 687-96.
- GILLISON, M. L., BROUTIAN, T., PICKARD, R. K., TONG, Z. Y., XIAO, W., KAHLE, L., GRAUBARD, B. I. & CHATURVEDI, A. K. 2012. Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009-2010. *JAMA*, 307, 693-703.
- GILLISON, M. L., D'SOUZA, G., WESTRA, W., SUGAR, E., XIAO, W., BEGUM, S. & VISCIDI, R. 2008. Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*, 100, 407-20.
- GILLISON, M. L., KOCH, W. M., CAPONE, R. B., SPAFFORD, M., WESTRA, W. H., WU, L., ZAHURAK, M. L., DANIEL, R. W., VIGLIONE, M., SYMER, D. E., SHAH, K. V. & SIDRANSKY, D. 2000. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*, 92, 709-20.

- GRAVITT, P. E. 2012. Evidence and impact of human papillomavirus latency. *Open Virol J*, 6, 198-203.
- GRULICH, A. E., VAN LEEUWEN, M. T., FALSTER, M. O. & VAJDIC, C. M. 2007. Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *Lancet*, 370, 59-67.
- HAEDICKE, J. & IFTNER, T. 2013. Human papillomaviruses and cancer. *Radiother Oncol*, 108, 397-402.
- HALLECK, F., FRIEDERSDORFF, F., FULLER, T. F., MATZ, M., HUBER, L., DÜRR, M., SCHÜTZ, M. & BUDDE, K. 2013. New perspectives of immunosuppression. *Transplant Proc*, 45, 1224-31.
- HARRIS, J. P. & PENN, I. 1981. Immunosuppression and the development of malignancies of the upper airway and related structures. *Laryngoscope*, 91, 520-8.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, W. H. O. April 2022. *IARC Monographs on the identification of carcinogenic hazards to humans, Agents Classified by the IARC Monographs* [Online]. Available: <https://monographs.iarc.who.int/agents-classified-by-the-iarc/> [Accessed 04.05.2022].
- JEMAL, A., SIMARD, E. P., DORELL, C., NOONE, A. M., MARKOWITZ, L. E., KOHLER, B., EHEMAN, C., SARAIYA, M., BANDI, P., SASLOW, D., CRONIN, K. A., WATSON, M., SCHIFFMAN, M., HENLEY, S. J., SCHYMURA, M. J., ANDERSON, R. N., YANKEY, D. & EDWARDS, B. K. 2013. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2009, featuring the burden and trends in human papillomavirus(HPV)-associated cancers and HPV vaccination coverage levels. *J Natl Cancer Inst*, 105, 175-201.
- KARCH, A., SCHINDLER, D., KUHN-STEVEN, A., BLASER, R., KUHN, K. A., SANDMANN, L., SOMMERER, C., GUBA, M., HEEMANN, U., STROHAKER, J., GLOCKNER, S., MIKOLAJCZYK, R., BUSCH, D. H., SCHULZ, T. F. & FOR THE TRANSPLANT COHORT OF THE GERMAN CENTER FOR INFECTION RESEARCH, C. 2021. The transplant cohort of the German center for infection research (DZIF Tx-Cohort): study design and baseline characteristics. *Eur J Epidemiol*, 36, 233-241.
- KAROW, T, R.L.-R. 2022. Immunsuppressiva Seite 931-941, Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 30. Auflage, Karow, Köln.
- KJAER, SK., FREDERIKSEN, K., MUNK C., IFTNER T., Long-term absolute risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or worse following human papillomavirus infection: role of persistence. *J Natl Cancer Inst*. 2010 Oct 6;102(19):1478-88.
- KLETER, B., VAN DOORN, L. J., SCHRAUWEN, L., MOLIJN, A., SASTROWIJOTO, S., TER SCHEGGET, J., LINDEMAN, J., TER HARMSEL, B., BURGER, M. & QUINT, W. 1999. Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. *J Clin Microbiol*, 37, 2508-17.
- KREIMER, A. R., BHATIA, R. K., MESSEGUER, A. L., GONZALEZ, P., HERRERO, R. & GIULIANO, A. R. 2010. Oral human papillomavirus in healthy individuals: a systematic review of the literature. *Sex Transm Dis*, 37, 386-91.
- KREIMER, A. R., PIERCE CAMPBELL, C. M., LIN, H. Y., FULP, W., PAPENFUSS, M. R., ABRAHAMSEN, M., HILDESHEIM, A., VILLA, L. L., SALMERÓN, J. J., LAZCANO-PONCE, E. & GIULIANO, A. R. 2013. Incidence and clearance of oral human papillomavirus infection in men: the HIM cohort study. *Lancet*, 382, 877-87.
- KREIMER, A. R., VILLA, A., NYITRAY, A. G., ABRAHAMSEN, M., PAPENFUSS, M., SMITH, D., HILDESHEIM, A., VILLA, L. L., LAZCANO-PONCE, E. & GIULIANO, A. R. 2011. The epidemiology of oral HPV infection among a multinational sample of healthy men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 20, 172-82.
- KRYNITZ, B., EDGREN, G., LINDELÖF, B., BAECKLUND, E., BRATTSTRÖM, C., WILCZEK, H. & SMEDBY, K. E. 2013. Risk of skin cancer and other malignancies in kidney, liver, heart and lung transplant recipients 1970 to 2008--a Swedish population-based study. *Int J Cancer*, 132, 1429-38.
- LEE, K. W., KUO, W. R., TSAI, S. M., WU, D. C., WANG, W. M., FANG, F. M., CHIANG, F. Y., HO, K. Y., WANG, L. F., TAI, C. F., KAO, E. L., CHOU, S. H., LEE, C. H., CHAI, C. Y. & KO, Y. C. 2005. Different impact from betel quid, alcohol and cigarette: risk factors for pharyngeal and laryngeal cancer. *Int J Cancer*, 117, 831-6.
- MAGLENNON, G. A. & DOORBAR, J. 2012. The biology of papillomavirus latency. *Open Virol J*, 6, 190-7.
- MAGLENNON, G. A., MCINTOSH, P. & DOORBAR, J. 2011. Persistence of viral DNA in the epithelial basal layer suggests a model for papillomavirus latency following immune regression. *Virology*, 414, 153-63.
- MAGLENNON, G. A., MCINTOSH, P. B. & DOORBAR, J. 2014. Immunosuppression facilitates the reactivation of latent papillomavirus infections. *J Virol*, 88, 710-6.
- MARUR, S., D'SOUZA, G., WESTRA, W. H. & FORASTIERE, A. A. 2010. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol*, 11, 781-9.
- MCBRIDE, A. A. 2008. Replication and partitioning of papillomavirus genomes. *Adv Virus Res*, 72, 155-205.
- MIGALDI, M., PECORARI, M., FORBICINI, G., NANNI, N., GROTTOLA, A., GRANDI, T., DELLE DONNE, G., LEOCATA, P., TROVATO, D. & SGAMBATO, A. 2012. Low prevalence of human papillomavirus infection in the healthy oral mucosa of a Northern Italian population. *J Oral Pathol Med*, 41, 16-20.
- MUÑOZ, N., BOSCH, F. X., DE SANJOSÉ, S., HERRERO, R., CASTELLSAGUÉ, X., SHAH, K. V., SNIJDERS, P. J. & MEIJER, C. J. 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, 348, 518-27.

- NCBI. *National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information* [Online]. Available: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_SPEC=GeoBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch [Accessed 19.08.2022].
- ÖHMAN, J., REXIUS, H., MJÖRNSTEDT, L., GONZALEZ, H., HOLMBERG, E., DELLGREN, G. & HASSEÜS, B. 2015. Oral and lip cancer in solid organ transplant patients--a cohort study from a Swedish Transplant Centre. *Oral Oncol*, 51, 146-50.
- PARKIN, D. M. & BRAY, F. 2006. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine*, 24 Suppl 3, S3/11-25.
- RABINOVICS, N., MIZRACHI, A., HADAR, T., AD-EL, D., FEINMESSER, R., GUTTMAN, D., SHPITZER, T. & BACHAR, G. 2014. Cancer of the head and neck region in solid organ transplant recipients. *Head Neck*, 36, 181-6.
- RKI 2018. Wissenschaftliche Begründung für die Empfehlung der HPV-Impfung für Jungen im Alter von 9 bis 14 Jahren. *Epidemiologisches Bulletin* 26/2018, Robert Koch Institut.
- ROGERS, N. L., COLE, S. A., LAN, H. C., CROSSA, A. & DEMERATH, E. W. 2007. New saliva DNA collection method compared to buccal cell collection techniques for epidemiological studies. *Am J Hum Biol*, 19, 319-26.
- ROSITCH, A. F., KOSHIOL, J., HUDGENS, M. G., RAZZAGHI, H., BACKES, D. M., PIMENTA, J. M., FRANCO, E. L., POOLE, C. & SMITH, J. S. 2013. Patterns of persistent genital human papillomavirus infection among women worldwide: a literature review and meta-analysis. *Int J Cancer*, 133, 1271-85.
- ROSE, B., WILKINS, D., LI, W., TRAN, N., THOMPSON, C., COSSART, Y., MCGEECHAN, K., O'BRIEN, C. & ERIS, J. 2006. Human papillomavirus in the oral cavity of patients with and without renal transplantation. *Transplantation*, 82, 570-3.
- ŞAHINER, F., KUBAR, A., GÜMRAL, R., ARDIÇ, M., YIĞİT, N., ŞENER, K., DEDE, M. & YAPAR, M. 2014. Efficiency of MY09/11 consensus PCR in the detection of multiple HPV infections. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 80, 43-9.
- SHIU, M. N. & CHEN, T. H. 2004. Impact of betel quid, tobacco and alcohol on three-stage disease natural history of oral leukoplakia and cancer: implication for prevention of oral cancer. *Eur J Cancer Prev*, 13, 39-45.
- SINDREWICZ, K., KĘDZIERSKA-KAPUZA, K., JAWOROWSKA, E. & CIECHANOWSKI, K. 2020. Prevalence of Human Papillomavirus Infection in the Head and Neck Area of Patients After Kidney Transplantation Treated With Immunosuppressive Therapy. *Transplant Proc*, 52, 2388-2393.
- STRICKLER, H. D., BURK, R. D., FAZZARI, M., ANASTOS, K., MINKOFF, H., MASSAD, L. S., HALL, C., BACON, M., LEVINE, A. M., WATTS, D. H., SILVERBERG, M. J., XUE, X., SCHLECHT, N. F., MELNICK, S. & PALEFSKY, J. M. 2005. Natural history and possible reactivation of human papillomavirus in human immunodeficiency virus-positive women. *J Natl Cancer Inst*, 97, 577-86.
- SUNG, H., FERLAY, J., SIEGEL, R. L., LAVERSANNE, M., SOERJOMATARAM, I., JEMAL, A. & BRAY, F. 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 71, 209-249.
- SYRJÄNEN, K., SYRJÄNEN, S., LAMBERG, M., PYRHÖNEN, S. & NUUTINEN, J. 1983. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg*, 12, 418-24.
- SYRJÄNEN, S., LODI, G., VON BÜLTZINGSLÖWEN, I., ALIKO, A., ARDUINO, P., CAMPISI, G., CHALLACOMBE, S., FICARRA, G., FLAITZ, C., ZHOU, H. M., MAEDA, H., MILLER, C. & JONTELL, M. 2011. Human papillomaviruses in oral carcinoma and oral potentially malignant disorders: a systematic review. *Oral Dis*, 17 Suppl 1, 58-72.
- SZUBINSKA-LELONKIEWICZ, D., OSIĄK, M., WYCHOWANSKI, P., SIEWERT-GUTOWSKA, M. & FIEDOR, P. 2018. Frequency of Human Papilloma Virus Occurrence Among Pathological Changes of the Oral Cavity in Kidney Allotransplant Recipients Undergoing Long-Term Pharmacological Immunosuppressive Therapy. *Transplant Proc*, 50, 1878-1880.
- TIEBEN, L. M., BERKHOUT, R. J., SMITS, H. L., BOUWES BAVINCK, J. N., VERMEER, B. J., BRUIJN, J. A., VAN DER WOUDE, F. J. & TER SCHEGGET, J. 1994. Detection of epidermodysplasia verruciformis-like human papillomavirus types in malignant and premalignant skin lesions of renal transplant recipients. *Br J Dermatol*, 131, 226-30.
- TOMMASINO, M. 2014. The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol*, 26, 13-21.
- VAN HAMONT, D., VAN HAM, M. A., BAKKERS, J. M., MASSUGER, L. F. & MELCHERS, W. J. 2006. Evaluation of the SPF10-INNO LiPA human papillomavirus (HPV) genotyping test and the roche linear array HPV genotyping test. *J Clin Microbiol*, 44, 3122-9.
- WIEGAND, J.; BERG, T. 2013. The Etiology, Diagnosis and Prevention of Liver Cirrhosis. *Deutsches Ärzteblatt Online*, 110(6), 85-91
- WINER, R. L., HUANG, C. E., CHERNE, S., STERN, J. E., BUTSCH KOVACIC, M. S., MEHTA, P. A., SAUTER, S. L., GALLOWAY, D. A. & KATZENELLENBOGEN, R. A. 2015. Detection of human papillomavirus in the oral cavities of persons with Fanconi anemia. *Oral Dis*, 21, 349-54.
- YETE, S., D'SOUZA, W. & SARANATH, D. 2018. High-Risk Human Papillomavirus in Oral Cancer: Clinical Implications. *Oncology*, 94, 133-141.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten der Universitätsklinik Tübingen unter Betreuung von PD. Dr. med Tina Ganzenmüller durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Thomas Iftner, PD. Dr. med Tina Ganzenmüller (beide Projektleiter der DZIF-Tx-Kohorte am Standort Tübingen) und Dr. Juliane Hädicke-Jarboui, der damaligen Koordinatorin der Kohorte am Standort.

Der experimentelle Laborteil wurde nach Einarbeitung durch Angelika Iftner und Karin Kegreiß von mir eigenständig durchgeführt.

Bei der HPV-Genotypisierung und der Quantifizierung eines humanen Referenzgens in der Kontrollgruppe erhielt ich Unterstützung durch Karin Kegreiß (medizinisch-technische Assistentin) und der Arbeitsgruppe Iftner.

Die statistische Auswertung, sowie alle Abbildungen im Ergebnisteil erfolgten eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 01.02.2023

.

8 Anhang

8.1 Patienteninformation und Einwilligungserklärung zur Transplantationskohorte des Deutschen Zentrums für Infektionsforschung



Patienteninformation und Einwilligungserklärung zur Transplantationskohorte des Deutschen Zentrums für Infektionsforschung

Klinik :

Name der Klinik/Abteilung

Adresse

Verantw. Arzt

Vertreter DZIF-Transplantationskohorte Tübingen:

Patienteninformation zur Transplantationskohorte des Deutschen Zentrums für Infektionsforschung

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient

Sie kommen als Empfänger eines Spenderorganes oder einer Stammzelltransplantation in Frage oder haben am Universitätsklinikum Tübingen bereits ein Spenderorgan oder eine

Stammzelltransplantation erhalten. Das Klinikum beteiligt sich an der Transplantationskohorte e.V. des Deutschen Zentrums für Infektionsforschung e.V. (DZIF) (im Folgenden: Transplantationskohorte). Das DZIF wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung gegründet, um Universitäten, Universitätskliniken, Leibniz- und Max-Planck-Institute und Helmholtz-Zentren sowie Bundesforschungseinrichtungen zusammenzuführen, um den wichtigsten infektiologischen Herausforderungen in Deutschland mit einem integrativen Ansatz zu begegnen. Die Kohorte ist hierbei eine deutschlandweite Biodatenbank mit dem Zweck Zusammenhänge zwischen Organ- und Zelltransplantationen und später auftretenden gesundheitlichen Beeinträchtigungen, vor allem Infektionskrankheiten, aufzudecken. Durch diese Erkenntnisse soll die Behandlung und Versorgung von Patienten verbessert werden, die ein Spenderorgan erhalten haben. Durch die Auswertung möglichst vieler Patientendaten, sowie der Untersuchung von Biomaterialien kann das Verständnis für die Entstehung von Krankheiten verbessert werden. Dies kann dazu beitragen, dass Patienten zukünftig noch besser behandelt bzw. frühzeitig Vorbeugungsmaßnahmen entwickelt werden können, um Krankheiten zu verhindern oder in ihrer Ausprägung abzumildern.

Wir möchten Sie hiermit um Ihr Einverständnis bitten, dass wir Sie als Patienten in die Transplantationskohorte mit aufnehmen dürfen.

Dazu möchten wir Ihre Daten in eine zentrale Datenbank der Transplantationskohorte am Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie der TU München (Prof. Klaus Kuhn) übertragen. Es wird jedoch sichergestellt, dass keine Rückschlüsse auf Ihre Person gezogen werden können, da Ihre medizinischen Daten streng getrennt von Ihren identifizierenden Daten aufbewahrt werden. Für spätere Auswertungen sind ausschließlich Angaben zu Ihrer Erkrankung, Behandlung, Analyseergebnisse und allgemeine Angaben z.B. zu Ihrer Altersgruppe und Geschlecht von Interesse. Identifizierende Angaben zu Ihrer Person wie z.B. Ihr Name, Ihr genaues Geburtsdatum, Ihre Anschrift, etc. werden niemals an Dritte weiter gegeben. Ihre Daten liegen zudem in einer pseudonymisierten Form in der Datenbank vor. Dies bedeutet, dass diese durch ein Pseudonym, wie z.B. eine Nummer ersetzt werden, das keinerlei Rückschlüsse auf Ihre

Person mehr erlaubt. Lediglich Ihre behandelnden Ärzte können in der Datenbank ihre identifizierenden Daten einsehen, so wie es auch in Ihrer Krankenakte der Fall ist.

Darüber hinaus möchten wir Biomaterialien sammeln. Bei den Biomaterialien handelt es sich z.B. um Blut, Urin, Spülflüssigkeit, Stuhlproben, Abstriche aus der gesamten Mundhöhle oder Gewebe, sowie den dazugehörigen medizinischen Daten. Diese Biomaterialien und medizinischen Daten können für wissenschaftliche Studien verwendet werden. Darin eingeschlossen sind auch solche Forschungsvorhaben, deren Zielsetzung gegenwärtig noch nicht überschaubar ist und die deswegen nicht exakt bestimmt werden kann. In jedem Fall beschäftigen sich die Forschungsvorhaben allerdings mit den medizinischen Belangen transplanterter Patienten. Die Entnahme bzw. Gewinnung dieser Biomaterialien erfolgt ausschließlich im Rahmen der eigentlichen Heilbehandlung, so dass Beeinträchtigungen für Sie weitestgehend vermieden werden können. Auch die Lagerung und Verwendung dieser Biomaterialien erfolgt pseudonymisiert.

In Einzelfällen werden Sie nach verschiedenen Zeiträumen gebeten, einen Fragebogen zu Ihrem Gesundheitszustand und Erkrankungen auszufüllen.

Im Folgenden informieren wir Sie über die Ziele der Transplantationskohorte, die Verfahrensweise und über die Maßnahmen zum Schutz Ihrer Daten, damit Sie auf dieser Grundlage Ihre eigene Meinung bilden und eine Entscheidung treffen können. Sollte Ihnen etwas unklar sein, stehen die Ärzte Ihnen für Rückfragen und zusätzliche Erläuterungen gerne zur Verfügung. Bitte fragen Sie nach, bevor Sie Ihre Einwilligung erteilen.

Auf welcher Rechtsgrundlage findet die Studienteilnahme statt?

Die Rechtsgrundlage der Studie ist Ihre Einwilligung.

Ziele der Transplantationskohorte:

Die Transplantationskohorte ist Teil des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung gegründeten Deutschen Zentrums für Infektionsforschung. Es dient ausschließlich der Förderung biomedizinischer Forschung. Dazu werden medizinische

Daten sowie Biomaterial gesammelt, aufbereitet, aufbewahrt und für medizinische oder epidemiologische Forschungsvorhaben zur Verfügung gestellt. Dadurch sollen insbesondere die Möglichkeiten der Vorbeugung, Erkennung und Behandlung von Erkrankungen sowie die Entwicklung von Medikamenten und Diagnostika durch forschende Unternehmen ermöglicht und verbessert werden. Dies betrifft insbesondere Erkrankungen, die im Zusammenhang mit einer Organtransplantation stehen.

Mit Ihrer Einwilligung zur Erhebung, Speicherung, Archivierung, Nutzung, Verarbeitung und Auswertung Ihrer Daten und Biomaterialien verzichten Sie unwiderruflich auf eventuelle urheber- bzw. patentrechtliche Ansprüche, soweit diese aus dem Erkenntnisgewinn eines Forschungsprojektes resultieren. Ferner stimmen Sie zu, dass Eigentumsrechte an den von Ihnen zur Verfügung gestellten Proben auf das behandelnde Klinikum übergehen.

Finanzierung der Transplantationskohorte:

Die Transplantationskohorte wird finanziert durch Mittel des Deutschen Zentrums für Infektionsforschung, welches seine Gelder vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) erhält. Zusätzlich wird ein Teil der laufenden Kosten direkt vom Universitätsklinikum Tübingen übernommen. Unter Umständen können auch forschende Pharmaunternehmen in Kooperation mit einer an der Transplantationskohorte beteiligten Institution die Nutzung von Daten und Proben beantragen. Studienprotokolle forschender Pharmaunternehmen, die Daten und/oder Proben aus der Transplantationskohorte verwenden wollen, müssen von der für das Unternehmen zuständigen Ethikkommission genehmigt werden. Die Bereitstellung dieser Biomaterialien und zugehörigen Daten erfolgt zwar ausschließlich nach nicht-kommerziellen Gesichtspunkten und dient keinen gewerblichen Zwecken, es kann in diesem Fall allerdings eine angemessene Aufwandsentschädigung erhoben werden, die der Transplantationskohorte zugutekommt. Sämtliche Mittel werden dabei ausschließlich für Zwecke der medizinischen Forschung verwendet.

Auf welche Weise werden Daten und Biomaterialien gewonnen?

Die Abfrage der Daten, sowie die Gewinnung von Biomaterialien erfolgt im Allgemeinen im Rahmen der Transplantation selbst, sowie während der routinemäßigen Kontrolluntersuchungen. Sollten Sie darüber hinaus zu weiteren Untersuchungen oder Behandlungen in der Klinik oder bei Ihrem niedergelassenen Arzt erscheinen, können auch im Rahmen dieser Maßnahmen zusätzliche medizinische Daten, sowie Biomaterial der Transplantationskohorte zur Verfügung gestellt werden. Hierbei handelt es sich ausschließlich um Biomaterial, welches in Zusammenhang und während Ihrer Behandlung gewonnen wurde. Die Daten werden von geschulten Mitarbeitern des Klinikums oder Ihres niedergelassenen Arzt in die Datenbank der Transplantationskohorte eingegeben. Dort werden Ihre Daten doppelt pseudonymisiert, d.h. sie werden in einem doppelten Verfahren unter einem Pseudonym, z.B. einer Nummer, abgelegt, welche keinerlei Rückschlüsse auf Ihre Person mehr zulässt. Die Biomaterialien, die wir von Ihnen erhalten, werden ebenfalls pseudonymisiert in einer Biobank aufbewahrt. Hierbei handelt es sich um die Gewebekbank und die Biobank des Universitätsklinikums Tübingen.

Wie werden die Biomaterialien und Daten verwendet?

Die weitere Verwendung der Biomaterialien und der zugehörigen pseudonymisierten Daten im Rahmen der Transplantationskohorte dient ausschließlich der biomedizinischen, wissenschaftlichen Forschung. Als Grundlage dient dabei:

- Gewebe/Blut/Urin, etc. selbst bzw. die darin enthaltenen Zellen und ggf. Krankheitserreger, deren Erscheinungsbild, Beschaffenheit sowie biochemischer Eigenschaften
- Zellbestandteile (z. B. Fett- und Eiweißstoffe, Stoffwechselprodukte) einschließlich der Erbsubstanz (DNS)

Die Transplantationskohorte hat in der Geschäftsordnung Verfahren festgelegt, welche die Nutzung dieser Biomaterialien regeln. Es besteht für Wissenschaftler, andere Kliniken und Forschungseinrichtungen, sowie Unternehmen in Kooperation mit einer wissenschaftlichen Forschungseinrichtung die Möglichkeit, die Nutzung von Daten und Biomaterialien für wissenschaftliche Studien zu beantragen. Die Transplantationskohorte

prüft den Zweck der Studien und stellt sicher, dass diese ausschließlich dem Erkenntnisgewinn gemäß den besonderen Zielen der Transplantationskohorte dienen.

Wird einem Antrag zugestimmt, so können die angeforderten Biomaterialien bzw. pseudonymisierten Daten an die entsprechenden Einrichtungen geschickt werden, die diese ausschließlich gemäß dem Antrag nutzen dürfen.

Jegliche Speicherung, Verarbeitung und Nutzung von Daten und Biomaterial im Rahmen eines Forschungsprojektes, d. h. verbunden mit einer spezifischen wissenschaftlichen Fragestellung, muss bei der Transplantationskohorte des Deutschen Zentrums für Infektionsforschung gemäß den Vorgaben der Geschäftsordnung beantragt werden. Über den Antrag entscheidet nach jeweils gesonderter Prüfung eine Kommission unter Berücksichtigung der mit der Forschung verfolgten Ziele. Des Weiteren darf die Nutzung der Biomaterialien und Daten erst nach Vorlage eines zustimmenden Votums der für den Antragsteller zuständigen Ethikkommission erfolgen. Eine Mitteilung über die Ergebnisse der Untersuchungen der Biomaterialien an Sie persönlich ist dabei nicht vorgesehen.

Welche Risiken sind damit verbunden?

Gesundheitliche Risiken:

Da die Entnahme des Biomaterials im Rahmen einer aus medizinischen Gründen sowieso vorgesehenen Maßnahme erfolgt, ist Ihre Bereitschaft, körpereigene Materialien für die Transplantationskohorte zu spenden, mit keinem zusätzlichen gesundheitlichen Risiko verbunden. Die Entnahme der Proben erfolgt dabei während einer Routineentnahme, d.h. es ist auch kein zusätzlicher Eingriff notwendig. Die Probenmenge wird so bemessen, dass hierdurch weder eine Gefahr für Ihre Gesundheit entsteht noch diagnostische Maßnahmen eingeschränkt werden. Keinesfalls wird jedoch eine zusätzliche Entnahmemenge von 50 ml überschritten. Andere Körperflüssigkeiten werden ebenfalls anlässlich von medizinisch notwendigen Eingriffen abgenommen, wobei der nicht für Therapie/Diagnostik benötigte Anteil bzw. eine geringfügig erweiterte Entnahme der Transplantationskohorte zugeführt wird. Entsprechend wird auch bei der Gewebeentnahme für diagnostische/therapeutische Zwecke vorgegangen.

Weitere Risiken:

Der Schutz Ihrer Privatsphäre, Ihrer Persönlichkeitsrechte und Ihres Selbstbestimmungsrechtes hat für die Transplantationskohorte den höchsten Stellenwert. Bezüglich des bei jeder Datenerhebung, Datenspeicherung und Datenübermittlung bestehenden Vertraulichkeitsrisikos wurden alle möglichen Maßnahmen zum Ausschluss oder zur Minimierung von Risiken getroffen. Insbesondere die Vorschriften des Datenschutzes werden stets eingehalten. Wir müssen Sie jedoch darauf hinweisen, dass es nicht möglich ist, einen 100 %-igen Schutz zu gewährleisten.

Welcher Nutzen ergibt sich für Sie persönlich?

Für Sie ergeben sich durch die Sammlung und Lagerung bzw. Nutzung von Biomaterialien/Daten im Rahmen der Transplantationskohorte keine unmittelbaren Vorteile.

Welcher Nutzen ergibt sich für unsere Gesellschaft und die Gesamtheit transplanteder Patienten?

Alle derzeit durchgeführten, wie auch zukünftige medizinisch-wissenschaftliche Forschungsvorhaben, zielen auf eine Verbesserung unseres Verständnisses für die Krankheitsentstehung, die Diagnosestellung und auf dieser Basis auf die Neuentwicklung von verbesserten Behandlungsansätzen. Das bedingt, dass an den Biomaterialien auch genetische Analysen, also Untersuchungen der Erbsubstanz, durchgeführt werden können, da Veränderungen der Erbsubstanz zur Diagnosestellung beitragen oder die Krankheitsursache darstellen können. Auf den Schutz dieser Daten legen wir besonderen Wert. Dadurch, dass Ihre Biomaterialien auf unbegrenzte Zeit gelagert werden, können sie auch zu einem späteren Zeitpunkt für Untersuchungen nach dem dann neuesten Stand der Wissenschaft herangezogen werden und Basis für die Entwicklung von neuen Therapien sein.

Wie werden meine Biomaterialien und meine Daten geschützt? Welche

Voraussetzungen gelten für die Nutzung meiner Biomaterialien und Daten?

- Voraussetzung für die Gewinnung und Verwendung von Biomaterial samt den zugehörigen Daten zu Forschungszwecken ist Ihre schriftliche Einwilligung. Diese Einwilligung umfasst auch die Möglichkeit, neue Fragestellungen ohne Ihr

erneutes Einverständnis zu erforschen. Ihre Zustimmung ist freiwillig und kann auch jederzeit widerrufen werden.

- Ihre im Rahmen der Behandlung angefallenen Biomaterialien und Daten gehen in das Eigentum und den Besitz des Universitätsklinikums Tübingen über und werden dort oder im Auftrag des Klinikums in einer professionellen Biobank unter strengen Qualitäts- und Sicherheitsbedingungen unbefristet aufbewahrt, d. h. bis sie aufgebraucht sind. Die Lagerung erfolgt unter zugriffsgesicherter Verwahrung.
- Ihre Daten liegen in der Datenbank doppelt pseudonymisiert vor. Dadurch sind Rückschlüsse auf Ihre Person allein auf Grund der Bezeichnung von Biomaterialien/Daten praktisch ausgeschlossen. Eine Entschlüsselung, d. h. eine Zuordnung der Biomaterialien und Daten zu Ihrer Person (Name, Geburtsdatum, Anschrift, etc.), ist an strengste Inhalts- und Verfahrensvoraussetzungen gebunden. Zudem darf eine Entschlüsselung nur aus wissenschaftlichen Gründen erfolgen oder wenn dies zu Ihrem eigenen Schutz notwendig ist. Im ersten Fall bedarf es zur Entschlüsselung eines zusätzlichen zustimmenden Votums einer Ethikkommission. Alle Entschlüsselungsvorgänge werden dokumentiert.
- Nur pseudonymisierte Biomaterialien und Daten werden im Rahmen von zukünftigen Forschungsprojekten verarbeitet, analysiert und ggf. an andere Forscher weitergegeben. Dies beinhaltet auch die Kooperation und den Austausch mit anderen Kohorten oder Registern im In- und Ausland. Bei einzelnen Forschungsprojekten kann es auch erforderlich sein, dass Biomaterialien und Daten an auswärtige Forschungslabore weitergegeben werden.
- Alle zukünftigen wissenschaftlichen Vorhaben, bei denen Ihre Biomaterialien und medizinischen Daten genutzt werden sollen, bedürfen einer zustimmenden Bewertung durch die für das Vorhaben zuständige Ethikkommission. Dies geschieht um sicherzustellen, dass die Nutzung auch angemessen und wissenschaftlich sinnvoll ist.

Wer hat Zugang zu meinen Biomaterialien und Daten?

- Biomaterial und unmittelbar identifizierende Daten (Name, Geburtsdatum, Anschrift etc.) sowie medizinische Daten (z. B. Diagnose, Symptome, Laborwerte etc.) werden getrennt an unterschiedlichen Stellen gelagert und gespeichert.
- Ihre behandelnden Ärzte haben jederzeit Zugriff auf Ihren vollständigen Datensatz, so wie es auch in Ihrer Patientenakte der Fall ist.
- Zur Qualitätskontrolle ist es möglich, dass speziell geschultes Personal stichprobenartig einzelne Patientenakten einsieht, und die Daten mit denen der Datenbank vergleicht. Zudem können für weitergehende Analysen der Datenqualität und Datenquantität anonymisierte Datensätze an Kooperationspartner zur Analyse weiter gegeben werden, z.B. an Experten aus dem Bereich Epidemiologie. Ebenfalls ist es zur Sicherstellung der Probenqualität erforderlich, dass stichprobenartig eine kleine Menge von Biomaterial auf ihre Qualität hin analysiert wird. Diese Analysen können hausintern erfolgen oder durch spezialisierte Firmen durchgeführt werden. Hierbei werden ausschließlich geringe Mengen Probenmaterial heraus gegeben sowie allgemeine Angaben zur Herkunft, z.B. Geschlecht des dazugehörigen Patienten oder Art der Transplantation. In jedem Fall erfolgt nur die Weitergabe von pseudonymisierten Daten und Identifikationsnummern.
- Es wird sichergestellt, dass kein unbefugter Dritter Zugang zu den Biomaterialien/Daten hat und die erforderliche Dokumentation der Vorgänge erfolgt. So muss z. B. jede Weitergabe in einem Daten- und Probennutzungsvertrag geregelt und nachvollziehbar dokumentiert werden.
- Die doppelt pseudonymisierten Biomaterialien und Daten können auf Antrag an der Transplantationskohorte beteiligten Ärzten und Wissenschaftlern weitergegeben werden. Es können auch Anträge von kooperierenden anderen Kohorten oder Registern aus dem In- und Ausland genehmigt werden. Voraussetzung für die Weitergabe und die Verwendung für medizinische Forschungsprojekte ist, dass das Forschungsvorhaben durch die für den Antragsteller zuständige Ethikkommission zustimmend bewertet wurde. Biomaterialien und Daten, die an Dritte weitergegeben wurden, dürfen nur für den beantragten Forschungszweck verwendet und nicht nochmals weitergegeben

werden. Nicht verbrauchtes Material wird an die Biobank zurückgegeben oder vernichtet.

Welcher Form der Überprüfung bzw. externen Kontrolle und welcher Berichtspflicht

unterliegt die Transplantationskohorte?

Die geschilderten Verfahren zur Aufbewahrung der gewonnenen Biomaterialien sowie zur Speicherung von Daten wurden mit der für das Universitätsklinikum Tübingen zuständigen Ethikkommission abgestimmt. Die Transplantationskohorte veröffentlicht regelmäßig Berichte, insbesondere zu Entscheidungen über die Vergabe von Nutzungsrechten und die erfolgte Nutzung. Informationen dazu finden sich auf der Homepage der Transplantationskohorte unter www.tx-kohorte.dzif.de.

Die Nutzung der Daten und Proben muss in einem speziellen Verfahren beantragt werden. Ein Expertengremium stellt dabei sicher, dass nur Anträge akzeptiert werden, die der Zielsetzung der Transplantationskohorte entsprechen. Zur Qualitätskontrolle kann es zudem notwendig sein, dass speziell geschultes Personal stichprobenartig einzelne Patientenakten einsieht, und die Daten mit denen der Datenbank vergleicht.

Wann erfolgt eine erneute Kontaktaufnahme?

Zur Erhebung von Daten zum weiteren Verlauf Ihrer Genesung bzw. Erkrankung kann die Transplantationskohorte erneut Kontakt mit Ihnen aufnehmen, um ergänzende Informationen und/oder Biomaterialien von Ihnen zu erhalten. Falls Sie Ihre Behandlung bei einem niedergelassenen Arzt fortführen, wird die Transplantationskohorte diesen um seine Mitarbeit bitten. Dieser wird hierzu mit dieser Einwilligung von der Schweigepflicht entbunden. Die Kontaktaufnahme wird im Zusammenhang mit den regulär geplanten Terminen der Nachsorgeuntersuchungen stehen. Es ist jedoch möglich, dass Sie in Ausnahmefällen zusätzlich kontaktiert werden, falls weitere Absprachen nötig sind. Die Kontaktaufnahme erfolgt durch Ihre behandelnde Klinik/Praxis.

Was beinhaltet mein Widerrufs- und Informationsrecht?

Ihre Daten und Biomaterialien dürfen von den Beteiligten der Transplantationskohorte ohne erneute Einwilligung maximal 30 Jahre für medizinische Forschungszwecke genutzt

werden. Die Entscheidung über Ihre Teilnahme ist völlig freiwillig. Sie können Ihre Zustimmung auch jederzeit ohne Angabe von Gründen und ohne nachteilige Folgen für Sie schriftlich oder mündlich mit anschließender schriftlicher Bestätigung zurückziehen. Im Falle des Widerrufs können Sie entscheiden, ob Ihre Biomaterialien und Daten in nach Art. 4, Abs. 1 DSGVO nicht mehr personenbezogener (=anonymisierter) Form für weitere wissenschaftliche Zwecke verwendet werden dürfen. Dazu werden Maßnahmen getroffen, die einen direkten oder indirekten Bezug zu Ihrer Person faktisch ausschließen bzw. unmöglich machen. Um dies zu erreichen werden insbesondere Kennungen wie Name, Adressdaten und Identifizierungscode gelöscht sowie besondere Merkmale in Ihren medizinischen Daten verändert oder gelöscht. Eine solche Anonymisierung Ihrer Biomaterialien kann eine spätere Zuordnung von - insbesondere genetischen - Daten zu Ihrer Person über andere Quellen allerdings niemals völlig ausschließen. Sie haben alternativ das Recht, die Löschung all Ihrer Daten und die Vernichtung Ihrer Biomaterialien zu verlangen. Allerdings ist dies technisch nicht mehr möglich, falls zuvor bereits der Bezug der Daten zu den Biomaterialien Ihrer Person gelöscht wurde. Daten aus bereits abgeschlossenen Studien können ebenfalls nicht mehr gelöscht werden. Wissenschaftliche Veröffentlichungen erfolgen in jedem Fall in einer Form, die Rückschlüsse auf Ihre Person ausschließen. Die Prüfarzte vor Ort können jedoch mit Hilfe einer Patientenliste bei Rückfragen die Daten zu Ihrer Person zurückführen.

Sie können jederzeit Auskunft über die von Ihnen gespeicherten personenbezogenen Daten verlangen. Dabei haben Sie das Recht, eine kostenlose Kopie der verarbeiteten Daten zu erhalten, sowie diese Daten gegebenenfalls berichtigen oder löschen zu lassen.

Ab dem 25.05.2018 gilt die neue europäische Datenschutzgrundverordnung (EU-DSGVO). Der Gesetzgeber verpflichtet uns, Ihnen zusätzliche Informationen zum Datenschutz- und zum Beschwerderecht zur Verfügung zu stellen. Hiermit möchten wir dieser Verpflichtung nachkommen.

Sollten Sie Ihre Teilnahme an der Studie beenden wollen, wenden Sie sich bitte an:

Bei dem Universitätsklinikum Tübingen handelt es sich um die verantwortliche juristische Person für die Datenverarbeitung im Rahmen der genannten Studie.

Sollten Sie einen direkten Kontakt zu zuständigen Datenschutzbeauftragten des Klinikums wünschen, so wenden Sie sich bitte an:

Datenschutzbeauftragter des Universitätsklinikums Tübingen
Calwerstraße 7/4, 72076 Tübingen,

Nach dem Gesetz hat jeder Studienteilnehmer das Recht, sich bei der zuständigen Datenschutzaufsichtsbehörde zu beschweren. In Ihrem Falle handelt es sich um folgende Institution:

Landesbeauftragter für den Datenschutz und die Informationsfreiheit in Baden-Württemberg

Einwilligungserklärung zur Teilnahme an der Transplantationskohorte des Deutschen Zentrums für Infektionsforschung

Name, Vorname teilnehmende/r Patient/in: _____

Geb.-Datum: _____

Hiermit erkläre ich meine Einwilligung zur Teilnahme an der Transplantationskohorte des Deutschen Zentrums für Infektionsforschung gemäß der Patienteninformation.

- Ich habe den Inhalt der Patienteninformation gelesen und verstanden. Eventuelle Fragen wurden zufriedenstellend beantwortet.
- Ich weiß, dass meine Teilnahme freiwillig ist und ich meine Einwilligung jederzeit mündlich oder schriftlich ohne Angabe von Gründen widerrufen kann. Die Einwilligung ist dabei gegenüber der behandelnden Einrichtung zu widerrufen. Sollte ich nicht teilnehmen, entstehen mir dadurch keinerlei Nachteile.
- Beim Widerruf meiner Einwilligung gegenüber dem Universitätsklinikum Tübingen und der Transplantationskohorte e.V., habe ich das Recht, die Löschung der Verknüpfung zu den unmittelbar identifizierenden Daten (Name, Geburtsdatum, Anschrift, spezielle medizinische Daten, etc.) zu verlangen. Meine Daten und Proben stehen der Transplantationskohorte daraufhin ausschließlich anonym zur Verfügung.
- Alternativ kann auch die Löschung aller meiner bis dahin gespeicherten personenbezogenen und medizinischen Daten bzw. die Vernichtung der Biomaterialien verlangt werden. Dies ist aber nur vor oder zeitgleich mit dem Widerruf der Einwilligung möglich, da nach der Löschung der Verknüpfung eine Identifizierung meiner Daten und Proben unmöglich ist.
- Ich bin damit einverstanden, dass meine identifizierenden Daten (z. B. Name, Geburtsdatum) und klinischen Daten aus den Krankenakten übernommen werden. Die identifizierenden Daten werden speziell abgesichert und getrennt von den klinischen Daten gespeichert.
- Ich bin damit einverstanden, dass ich nach voraussichtlich 3, 6, 12 Monaten und anschließend einmal jährlich erneut kontaktiert werde und/oder ggf. mein niedergelassener behandelnder Arzt gebeten wird, meine medizinischen Daten und Biomaterialien der Transplantationskohorte zur Verfügung zu stellen. Hierzu wird dieser von mir von der Schweigepflicht entbunden. Zudem ist es in seltenen Fällen möglich, dass ich zu anderen Zeitpunkten kontaktiert werde, um weitere Einwilligungen oder Informationen einzuholen.
- Ich bin damit einverstanden, dass meine medizinischen Daten und meine Bioproben pseudonymisiert, also getrennt von meinen unmittelbar identifizierenden Daten (Name, Geburtsdatum, Anschrift, etc.), langfristig gespeichert werden und für die zukünftige wissenschaftliche Nutzung zur Verfügung stehen. Dies beinhaltet auch Analysen meiner Biomaterialien für medizinisch bedeutsame Fragestellungen im Sinne der Ursachenforschung und Prävention, der Diagnostik, der Linderung, Behandlung und Heilung von Krankheiten und der

- Förderung der Heilkunde, die derzeit noch nicht präzise benannt werden können. Es ist nicht erforderlich, dass ich vor der Bearbeitung neuer Fragestellungen erneut um mein Einverständnis gebeten werde.
- Ich bin mit der Durchführung von genetischen Analysen des von mir zur Verfügung gestellten Materials einverstanden.
- Ich bin darüber informiert worden, dass keine Rückmeldung von Ergebnissen aus der Untersuchung von Biomaterialien an mich erfolgt.
- Ich bin damit einverstanden, dass das Universitätsklinikum Tübingen Eigentümer der Proben wird und gemäß der Patienteninformation das Verfügungs- und Weitergaberecht erhält.
- Mir ist bewusst, dass ich keinen persönlichen Vorteil durch die Teilnahme haben werde und dass mir die Ergebnisse nicht mitgeteilt werden.

Datenschutzerklärung:

Mir ist bekannt, dass die Verwendung meiner Daten nach gesetzlichen Bestimmungen erfolgt. Hierzu gebe ich freiwillig folgende Einwilligungserklärung ab, ohne die ich nicht an der Transplantationskohorte teilnehmen kann:

- Mir ist bekannt, dass im Universitätsklinikum Tübingen personenbezogene Daten, das sind Informationen, die dazu genutzt werden können, meine Identität zu erfahren, insbesondere Name, Adresse, Postanschrift, medizinische Befunde, erhoben, gespeichert, verarbeitet und genutzt werden sollen. Diese Daten werden auch in die Datenbank der Transplantationskohorte eingetragen.
- Mir wurde durch das Universitätsklinikum Tübingen und der Transplantationskohorte e.V. versichert, meine Daten entsprechend den datenschutzrechtlichen Bestimmungen vertraulich zu behandeln.
- Mir ist bekannt, dass es in seltenen Fällen möglich ist, dass neben meinen behandelnden Ärzten Monitore Einsicht in meine Patientenakte erhalten. Dies dient ausschließlich der Kontrolle der klinikinternen Abläufe und soll die Qualität und Richtigkeit der übermittelten Daten überprüfen. Alle beteiligten Personen sind hierbei jedoch zu strengster Vertraulichkeit verpflichtet.
- Ich erkläre mich damit einverstanden, dass die Transplantationskohorte biologische Proben langfristig lagert, verarbeitet und nutzt, sowie auch medizinische Daten, insbesondere Angaben über meine Gesundheit, über mich erhoben und in der Datenbank der Transplantationskohorte aufgezeichnet werden. Im Rahmen wissenschaftlicher Arbeiten dürfen die erhobenen Daten pseudonymisiert an Kliniken, Universitäten, Forschungsinstitute und forschende Unternehmen, ggf. auch ins Ausland, weitergegeben werden. Mir ist bewusst, dass die Ergebnisse dieser Studie in medizinischen Fachzeitschriften veröffentlicht werden, allerdings in anonymisierter Form, so dass ein direkter Bezug zu meiner Person nicht hergestellt werden kann.
- Ich erkläre mich damit einverstanden, dass meine Daten und Biomaterialien maximal 30 Jahre aufbewahrt werden.

- Ich wurde darüber informiert, dass ich jederzeit Auskunft über meine gespeicherten Daten und die Berichtigung von fehlerhaften Daten verlangen kann.
- Ich weiß, dass ich jederzeit, beispielsweise beim Widerruf der Studienteilnahme, verlangen kann, dass meine bis dahin erhobenen Daten gelöscht oder unverzüglich anonymisiert werden.
- Ich erkläre, dass ich über die Erhebung und Verarbeitung meiner in dieser Studie erhobenen Daten und meine Rechte angemessen informiert wurde.
- Ich stimme der Verwendung der im Rahmen dieser Studie erhobenen Daten in der oben beschriebenen Form zu.

Die dargestellte Vorgehensweise wurde von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät und am Universitätsklinikum Tübingen genehmigt.

Mit meiner Unterschrift erkläre ich, dass ich diese Patienteninformation gelesen habe und dass ich bereit bin an der oben genannten Studie freiwillig teilzunehmen.

Ich kann jederzeit meine Daten beim Studienleiter einsehen.

Ein Exemplar der Patienten-Information und –Einwilligung habe ich erhalten. Das unterzeichnete Original verbleibt im Universitätsklinikum Tübingen.

Name des Teilnehmers in Druckbuchstaben

Ort, Datum

(vom Teilnehmer einzutragen)

Unterschrift Teilnehmer

Ich habe das Aufklärungsgespräch geführt und alle gestellten Fragen beantwortet.
Der Patient hat seine Einwilligung erteilt.

Name des Arztes in Druckbuchstaben

Ort, Datum

Unterschrift des Arztes

8.2 PCR-Programme

8.2.1 Thermocycler Programm mit Inno-LiPA Primern

Tabelle 19: Programm PCR mit Inno-LiPA Primern

	Zyklen	Temperatur in Grad Celsius	Dauer
Dekontamination von Uracil enthaltender DNA	1	37	10 Min
Denaturierung zur Aktivierung der Taq Polymerase	1	94	9 Min
Denaturierung	40	94	30 Sek
Annealing der Primer	40	52	45 Sek
Erweiterung der Primer	40	72	45 Sek
Elongation	1	72	10 Min

8.2.2 Thermocycler Programm für die PCR mit dem CP4/5-Primerpaar

Tabelle 20: Programm Thermocycler für die PCR mit dem CP4/5-Primerpaar

Schritte	Temperatur in Grad Celsius ^a	Dauer
1	95	10 Min
2	95	30 Sek
3	55	30 Sek
4	72	1 Min
5	72	5 Min

^a Anm. Bei dieser PCR wird die Temperatur immer mit 1 Grad Celsius/Sek geändert. Schritte 2-4 werden 39-mal wiederholt.

8.2.3 Thermocycler Programm für die PCR „My09/11“ im Rahmen der nested-PCR „My09/11“ bzw. „GP5⁺/6⁺“

Tabelle 21: Programm im Thermocycler für die PCR My09/11

	Temperatur in Grad Celsius	Dauer
Schritt 1	95	10 Min
Schritt 2	95	1 Min
Schritt 3	55	1 Min
Schritt 4	72	1 Min
Schritt 5	72	10 Min

Schritt 2-4 wurden 39-mal wiederholt.

8.2.4 Thermocycler Programm für die PCR „GP5⁺/6⁺“ im Rahmen der nested-PCR „My09/11“ bzw. „GP5⁺/6⁺“

Tabelle 22: Programm im Thermocycler für die PCR mit GP5⁺/6⁺ Primern

	Temperatur in Grad Celsius	Dauer
Schritt 1	94	10 Min
Schritt 2	94	45 Sek
Schritt 3	48	4 Sek
Schritt 4	38	30 Sek
Schritt 5	42	5 Sek
Schritt 6	66	5 Sek
Schritt 7	72	90 Sek
Schritt 8	72	10 Min

Schritt 2-7 wurden 39-mal wiederholt.

8.2.5 Thermocycler Programm für die qPCR auf PGK 1 und HPV18

Tabelle 23: Programm qPCR

	Zyklen	Temperatur in Grad Celsius	Dauer
Denaturierung	1	95 ^a	10 Min
Amplifikation	45	95 ^a	10 Sek
		55 ^b	15 Sek
		72 ^a	15 Sek
Schmelzkurve	1	95 ^a	10 Sek
		60 ^b	30 Sek
Schmelzpunktbestimmung		90 ^c	Bis 90 Grad Celsius erreicht sind
Kühlung	1	40	30 Sek

^a Bei diesem Schritt wird die Temperatur mit 4,4 Grad Celsius/Sek geändert.

^b Bei diesem Schritt wird die Temperatur mit 2,2 Grad Celsius/Sek geändert.

^c Bei diesem Schritt wird die Temperatur mit 0,11 Grad Celsius/Sek geändert.

9 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Thomas Iftner für die Möglichkeit am Institut für Medizinische Virologie zu diesem interessanten Thema promovieren zu dürfen, sowie für seine Anregungen, fachlichen Hinweise und die Möglichkeit der Kongressteilnahme.

Vielen Dank an das Deutsche Zentrum für Infektionsforschung für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Mein größter Dank gilt meiner Doktormutter PD Dr. Tina Ganzenmüller für ihre Ideen, Anregungen, ihr Engagement und ihre rund um die Uhr währende Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit, sowie für ihre Unterstützung beim Bewerbungsprozess für mein Stipendium.

Bedanken möchte ich mich auch bei Angelika Iftner und Karin Kegreiß für die Geduld beim Einlernen im Labor und ihre vielen Tipps und Tricks, sowie die hervorragende technische Unterstützung.

Mein Dank gilt auch meinen beiden Betreuerinnen Dr. Diana Pohle und Dr. Juliane Hädicke- Jarboui für ihre Hilfestellungen und Korrekturen.

Vielen Dank an Dr. Daniela Schindler für die schnelle Bereitstellung der Daten aus der DZIF-Datenbank.

Herzlichen Dank an die Arbeitsgruppen Stubenrauch und Iftner für die vielen unterhaltsamen Kaffeepausen, Diskussionen und fachlichen Tipps.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Freunden für ihre Geduld, ihr Verständnis und ihren Glauben an mich.

Meinen Eltern bin ich unendlich dankbar für die ständige Fürsorge, Unterstützung und die Ermöglichung meines Medizinstudiums.

10 Lebenslauf