

# Molekulare Diagnostik der zervikalen Neoplasie: Zukunft oder Irrweg?

Volker Schneider

Internationale Akademie für Zytologie, Freiburg, Deutschland

## Schlüsselwörter

Zervikale Karzinogenese · Zervikale Neoplasie · Zervixkarzinom · Carcinoma in situ · Dysplasie · Humanes Papillomvirus · Virales Onkogen E6 · Virales Onkogen E7 · Zellzyklusregulation · Zykline · Protein p16ink4a · «Minichromosome maintenance proteins»

## Zusammenfassung

Trotz der unbestreitbaren Erfolge der Krebsvorsorge zur Vermeidung des Zervixkarzinoms mittels zytologischem Abstrich bestehen Bereiche mit erkennbarem Handlungsbedarf. So bedeutet die operative Entfernung aller CIN 3 eine erhebliche Übertherapie, da nur eine Minderzahl dieser Läsionen letztlich invasiv werden. Aufgrund erheblicher Erkenntnisgewinne über die zervikale Karzinogenese in den letzten Jahren ergeben sich erstmals Ansatzpunkte für eine mögliche Prognoseerfassung auf individueller Basis. Die Infektion mit HPV vom Hochrisikotyp ist inzwischen als notwendige Ursache des Zervixkarzinoms anerkannt. Ein entscheidender Schritt dieser virusinduzierten Neoplasie ist die Dysregulation des Zellzyklus, der über die Überexpression der viralen Onkogene E6 und E7 läuft. Der direkte Nachweis dieser Onkogene mittels eines mRNS-Tests oder die Erfassung eines der Zellzyklusproteine als Substitutionsmarker kann unter Umständen bei der Bestimmung des invasiven Potentials einer Läsion dienlich sein. Erste Ergebnisse liegen für den Marker p16 vor. Für weitere Biomarker laufen derzeit Untersuchungen. Die Aufklärung weiterer Schritte der molekularen Karzinogenese des Zervixkarzinoms und seiner Vorstufen wird unter Umständen in der Zukunft weitere diagnostische und therapeutische Fortschritte ermöglichen.

## Key Words

Cervical carcinogenesis · Cervical neoplasia · Cervical carcinoma · Carcinoma in situ · Dysplasia · Human papillomavirus · Viral oncogen E6 · Viral oncogen E7 · Cell cycle regulation · Cyclins · Protein p16ink4a · Minichromosome maintenance proteins

## Molecular Diagnosis of Cervical Neoplasia: Future Potential or Academic Playground?

Despite major progress in the reduction of incidence and mortality of cervical carcinoma through systematic screening by cytology,

there are areas which deserve further improvement, one of them being the obvious overtreatment of CIN 3 which has to be removed in all patients although the invasive potential is limited to a minority of those lesions. Based on new knowledge of cervical carcinogenesis uncovered in the last few years, new potential targets for an individualized determination of prognostic behaviour may become possible. Infection by high-risk HPV types has been recognized as an essential step in the development of cervical carcinoma. In virally induced cervical carcinogenesis, dysregulation of the cell cycle is induced by an overexpression of the oncogenes E6 and E7. Direct determination of these oncogenes may become possible by mRNA measurements. Other biomarkers of cell cycle dysregulation such as p16 may serve in the future to determine the invasive potential of the precursors of cervical carcinoma. Further discoveries in molecular carcinogenesis may possibly allow to develop new diagnostic markers and possibly therapeutic agents in the future.

Copyright © 2004 S. Karger AG, Basel

## Diagnostic moléculaire des néoplasies cervicales: perspectives d'avenir ou spéculations académiques?

En dépit des indéniables succès des frottis de dépistage du cancer du col de l'utérus, certains domaines restent à améliorer. Ainsi l'élimination chirurgicale de tous les CIN 3 peut paraître excessif dans la mesure où seule une minorité de ces lésions finit par prendre un caractère invasif. Pour la première fois, compte tenu des progrès considérables accomplis dans le domaine de la carcinogenèse cervicale au cours des dernières années, la possibilité de pronostics individuels semble se concrétiser. L'infection à HPV à haut risque est désormais une étape reconnue du développement du cancer du col. Le dérèglement du cycle cellulaire par le biais de la surexpression des oncogènes viraux E6 et E7 constitue une phase décisive de cette néoplasie d'origine virale. La mise en évidence directe de ces oncogènes au moyen d'un test d'ADN ou la prise en compte, en tant que marqueur substitutif, d'une protéine issue du cycle cellulaire peut éventuellement s'avérer utile pour l'évaluation du potentiel invasif d'une lésion. Des résultats préliminaires sont disponibles pour le marqueur p16. Des études avec d'autres marqueurs biologiques sont en cours. La clarification d'autres étapes de la carcinogenèse moléculaire du col de l'utérus et de ses débuts offre la perspective d'autres progrès diagnostiques et thérapeutiques.

**KARGER**

Fax + 41 61 306 12 34  
E-Mail [karger@karger.ch](mailto:karger@karger.ch)  
[www.karger.com](http://www.karger.com)

© 2004 S. Karger AG, Basel

Accessible online at:  
[www.karger.com/ggr](http://www.karger.com/ggr)

Doz. Dr. Volker Schneider, FIAC  
Internationale Akademie für Zytologie  
Burgunder Strasse 1, DE-79104 Freiburg i. Br. (Deutschland)  
Tel. +49 761 292 3801, Fax +49 761 292 3802  
E-Mail [schneider@cytology-iac.org](mailto:schneider@cytology-iac.org)

## Einleitung

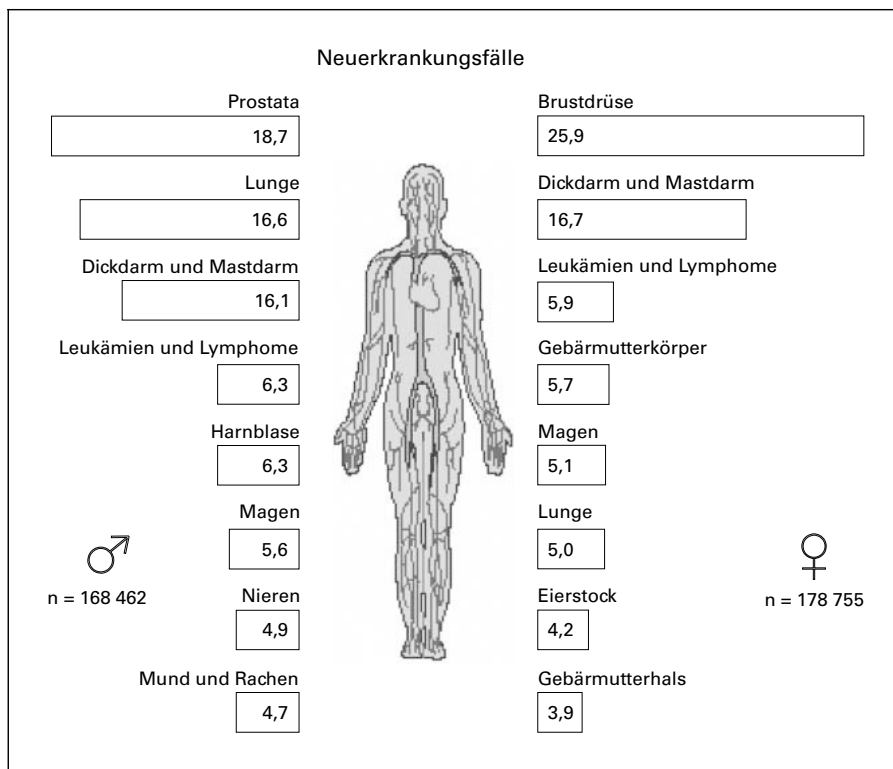
Seit Einführung des Zervixabstrichs im Rahmen der Krebsfrüherkennung ist die Inzidenz des Zervixkarzinoms in allen Ländern mit einem funktionierenden Früherkennungsprogramm signifikant gefallen. In Deutschland ist die Inzidenz um über 60% von 35,8/100000 [1] vor dem Screening auf 12,0/100 000 [2] gesunken. Das Zervixkarzinom ist in Deutschland ein seltener Organkrebs der Frau geworden und ist auf die 8. Stelle der häufigsten Organkrebse der Frau gefallen [3] (Abb. 1). Dieser Abfall ist umso bemerkenswerter als gleichzeitig die Rate des Carcinoma in situ, wohl aufgrund geänderten Sexualverhaltens, signifikant angestiegen ist [4]. Für das Jahr 2004 wird mit etwa 7000 Neuerkrankungen und 2000 Sterbefällen an Zervixkarzinom in Deutschland gerechnet [3]. In der Schweiz treten noch etwa 400 Zervixkarzinome pro Jahr auf, in Österreich sind es etwa 700.

Dieser Erfolg beruht auf dem Konzept der systematischen, regelmässigen Durchuntersuchung der Bevölkerung mittels Zervixabstrich und der Elimination der höhergradigen intraepithelialen Vorstufen [5–7]. Dazu werden entweder Konisation oder Schlingenexzision genutzt. Seit dem Beginn der systematischen Krebsvorsorge ist die operative Entfernung der CIN 3 (schwere Dysplasie, Ca in situ) unbestritten. Die von H.R. Green in den 70er Jahren in Neuseeland vertretene These, dass das Ca in situ der Zervix eine zu vernachlässigende Läsion sei, hat sich im

Nachhinein als Desaster mit schweren juristischen und ethischen Folgen erwiesen [8]. Es besteht jedoch auch Einigkeit darüber, dass längst nicht alle CIN 3 in ein invasives Karzinom übergehen. Im Gegenteil, Schätzungen gehen davon aus, dass der Prozentsatz nur zwischen 15 und 30% liegt. Kürzlich hat Angela Raffle aus Bristol, UK, in einer Langzeitstudie eine Progressionsrate von nicht höher als 20% ermittelt [9].

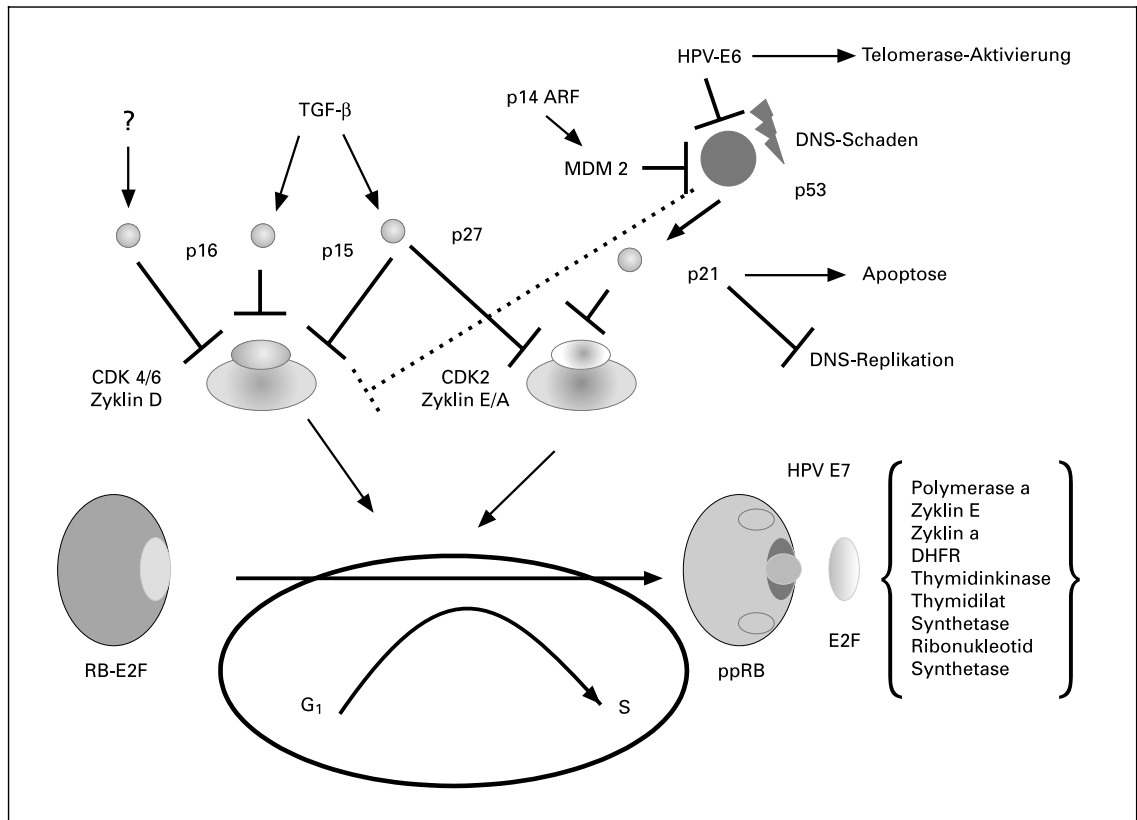
Damit offenbart sich ein Dilemma, das noch seiner Lösung harret: Aus ethischen Gründen ist es nicht statthaft, ein CIN 3 abwartend zu verfolgen, da die Möglichkeit der Invasion jederzeit gegeben ist. Auf der anderen Seite stellt die gegenwärtige Strategie der Elimination aller hochgradigen Läsionen eine massive Überbehandlung für 80% der Trägerinnen dar, da eine Prognostizierung auf individueller Basis unmöglich ist. In der täglichen Praxis erfassen und behandeln wir vorsichtshalber alle Patientinnen mit CIN 3, weil wir die Möglichkeit einer individuellen Risikoabschätzung nicht besitzen. Dieses Konzept war in der Vergangenheit zwar immens erfolgreich, muss jedoch in seiner langfristigen Anwendung in Frage gestellt werden [10].

Ist die Suche nach einer Prognostizierung des invasiven Potentials einer CIN-3-Läsion im Einzelfall überhaupt ein realistisches Ziel? Wenn überhaupt, wird eine Lösung nur im Bereich der molekularen Diagnostik liegen. Dies erklärt das Interesse, das in den letzten Jahren den Gebieten der Zellzyklusregulation, der molekularen



**Abb. 1.** Prozentuale Anteile der häufigsten Krebsformen an der Gesamtzahl 1998 in Deutschland (Quelle: Robert-Koch-Institut, Berlin).





**Abb. 3.** Molekulare Faktoren des G<sub>1</sub>-S-Phasen-Übergangs im Zellzyklus.

Die Aktivierung der Enzymaktivität erfolgt über Phosphorylierung, CDK-inhibierende Proteine spielen eine Rolle. Insgesamt handelt es sich um äußerst komplexe Prozesse, die zum großen Teil bekannt sind.

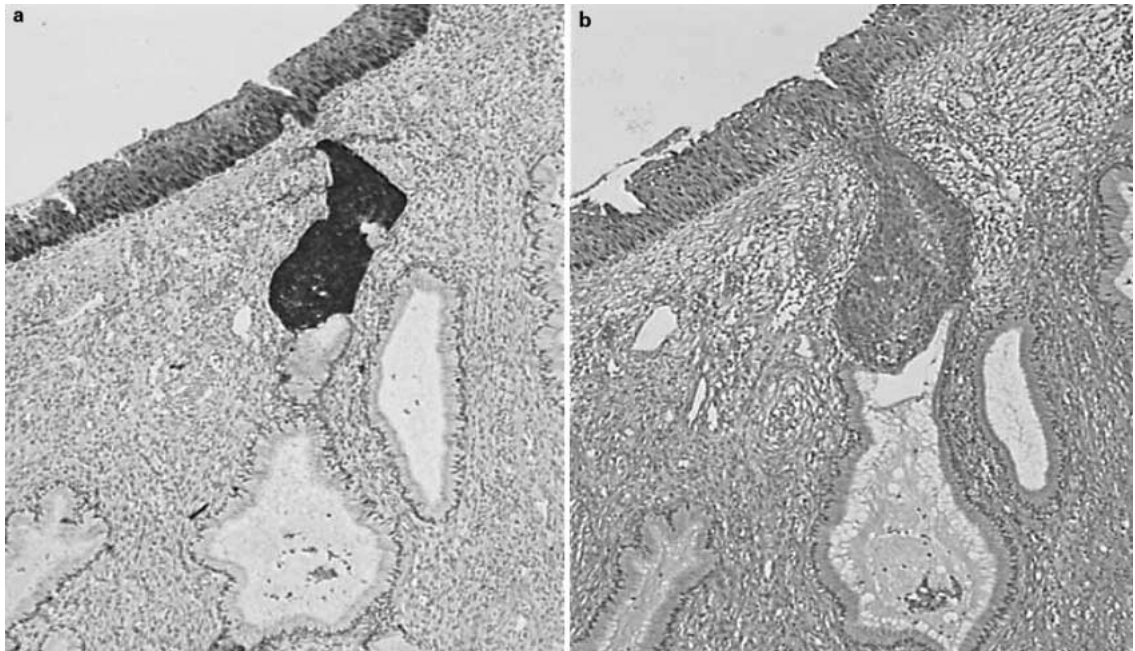
Der Übergang von der G<sub>1</sub>- zur S-Phase ist am besten und intensivsten untersucht worden, da er entscheidend für den Eintritt der Zelle in eine Teilungsphase ist (Abb. 3). Dieser G<sub>1</sub>-S-Übergang benötigt die Phosphorylierung des Retinoblastomproteins Rb durch CDKs, wobei E2F-Transkriptionsfaktoren freigesetzt werden. Diese wiederum kontrollieren andere Gene, die für die DNS-Synthese notwendig sind. Für einen geordneten Eintritt in die S-Phase benötigt die Zelle eine koordinierte Aktivierung sowohl der von Zyclin D wie von Zyclin E abhängigen Kinase und die anschließende Inaktivierung des Zellzyklusrepressors Rb. Die Bedeutung der zyklusregulierenden Proteine für die Karzinogenese zeigt sich in der Tatsache, dass die meisten von ihnen in experimentellen Studien als Protoonkogene oder Tumorsuppressorgene identifiziert wurden.

Im Gegensatz zum G<sub>1</sub>-S-Übergang ist über die Rolle der CDKs in der G<sub>2</sub>- und M-Phase weniger bekannt. Die experimentellen Daten sprechen dafür, dass die Überwindung des sog. Restriktionspunktes in der G<sub>1</sub>-Phase der entscheidende Punkt der Zellzykluskontrolle ist. Es

scheint, dass die weitere Zellzyklusprogression mehr oder weniger automatisch abläuft, sobald der Restriktionspunkt überwunden ist.

### Zervikale Karzinogenese

Die intraepitheliale Neoplasie und die sich daraus entwickelnden invasiven Karzinome der Zervix werden durch eine dauerhaft bestehende, persistierende Infektion mit HPV vom Hochrisikotyp verursacht [12]. Die entscheidenden Vorgänge der neoplastischen Transformation des Zervixepithels werden durch eine Deregulation der Expression zweier viraler Gene, E6 and E7, in den undifferenzierten Basal- und Parabasalzellen ausgelöst. Es kommt zu einer massiven Überproduktion dieser Onkogene. Während das E6 durch Bindung und Abbau des p53 die DNS-Reparatur und Apoptose hemmt, bindet sich das E7 an das zelluläre Retinoblastomprotein, das, wie oben beschrieben, eine entscheidende Rolle im Regulationsmechanismus des G<sub>1</sub>-S-Übergangs einnimmt. Durch die Bindung des im Überschuss gebildeten viralen Onkogens E7 kommt es zu einer Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F, durch den eine unregelmäßige und gesteigerte Proliferation der Zellteilung in Gang kommt.



**Abb. 4.** Vergleichende Darstellung eines CIN 3 in der p16- (a) und HE-Färbung (b). Histologischer Schnitt.  $\times 80$ .

Damit ist der Schritt zu einer unkontrollierten Zellproliferation eingeleitet. Durch den Transkriptionsfaktor wird die Bildung eines weiteren Proteins, p16ink4a, ausgelöst. Dieses Protein verhindert in der normalen Zellteilung durch negative Rückkopplung eine weitere Teilung. Da jedoch das Retinoblastomprotein durch E7 blockiert ist, läuft dieser Rückkopplungseffekt ins Leere, und p16 wird in grossen Mengen überexprimiert. Der immunzytochemische Nachweis von p16ink4a zeigt die durch eine fortgeschrittene HPV-Infektion bedingte Störung der Zellzyklusregulierung und ist somit ein möglicher Biomarker für eine beginnende maligne Entartung.

Die Überproduktion der viralen Onkogene verursacht auch eine chromosomale Instabilität aufgrund von multiplen Interferenzen mit zellulären Proteinen. Deshalb sind diese Zellen für ausgeprägte genomische Aberrationen anfällig [13–15]. Dies zeigt sich in einer zunehmenden Aneuploidie der Kerne und den daraus folgenden morphologischen Veränderungen, die die Basis für eine morphologische Karzinomdiagnostik darstellen. Diese äussern sich in Form von Hyperchromasie der Kerne, grob granuliertem Chromatin, prominenten Nukleolen, Anisonukleose und erhöhter Kern-Plasma-Relation. Die Wertung dieser Veränderungen durch den untersuchenden Morphologen ist ein höchst komplexer und subjektiver Prozess, der deshalb eine deutliche Interpretationsvarianz zur Folge hat. Eine Objektivierung durch die Messung von Biomarkern könnte die diagnostische Grauzone erheblich verkleinern und zu einer Reduktion der subjektiven Einschätzung führen.

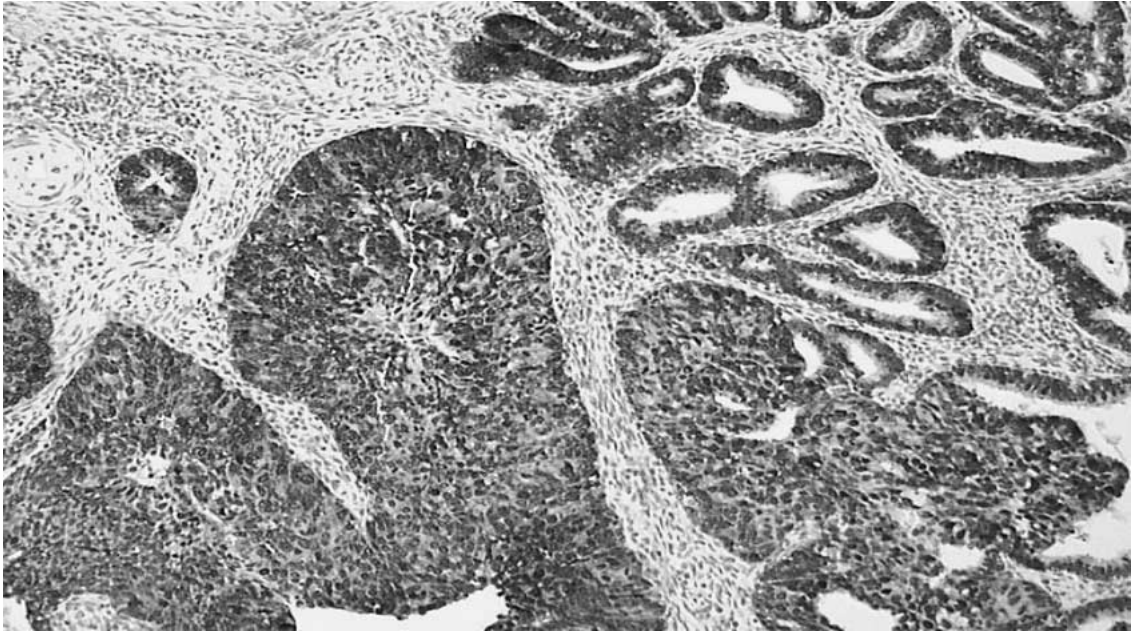
### Molekulare Biomarker

Wie oben dargestellt, lassen sich möglicherweise einige der den Zellzyklus regulierenden Proteine im Rahmen einer differenzierten Diagnostik einsetzen. Dazu liegen mehrere Übersichtsarbeiten vor [16–20], die den gegenwärtigen Stand darstellen. Im Folgenden sollen einige Marker näher dargestellt werden.

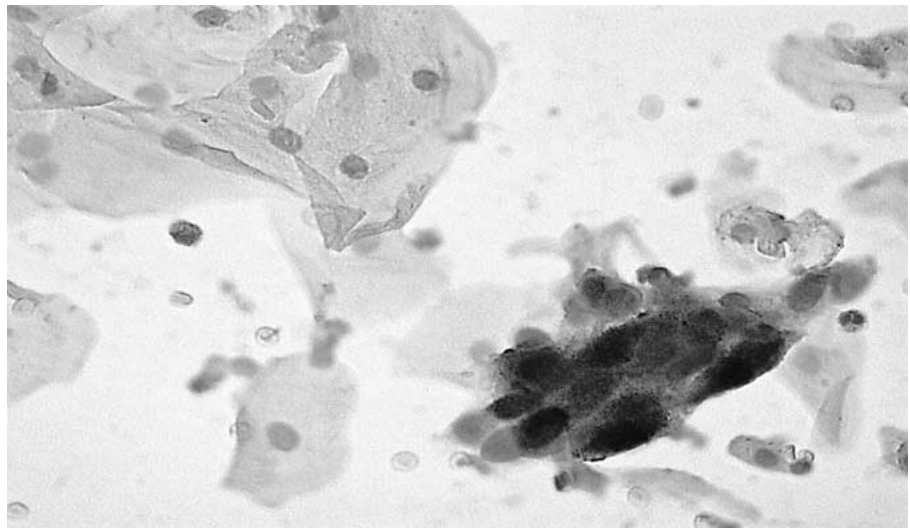
#### *Protein p16ink4a*

Antikörper gegen dieses Protein werden von mehreren Firmen angeboten, sie lassen sich mit der immunhistochemischen Technik sowohl für histologische Schnitte wie zytologische Abstriche verwenden. Wie bereits dargelegt, ist p16ink4a ein Protein der Zellzyklusregulation, das als Inhibitor der zyklinabhängigen Kinasen CDK4 und CDK6 eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des G<sub>1</sub>-S-Übergangs spielt. «ink4a» bezeichnet den Genlokus dieses Proteins auf Chromosom 9p21. Die Expression von p16 ist im normalen Zyklus streng reguliert. Liegt jedoch eine HPV-Infektion mit Hochrisikotypen vor, die die Onkogene E6 und E7 exprimieren, kommt es zu einer massiven Überexpression von p16 als Folge der Inaktivierung des Retinoblastomproteins. Was bedeutet ein positiver Nachweis von p16?

Während bei einem HPV-Test lediglich die Anwesenheit von Viren oder deren DNS nachgewiesen wird, gelingt mit der p16-Reaktion bereits eine Selektion der Patienten, bei denen eine Dysregulation des Zellzyklus vorliegt. Da HPV-Infektionen ausgesprochen häufig sind,



**Abb. 5.** Vergleichende Darstellung eines invasiven Adenokarzinoms der Zervix in der p16-Färbung. Histologischer Schnitt.  $\times 80$ .



**Abb. 6.** Dysplastische Epithelzellen im zytologischen Abstrich nach p16-Färbung. Hämalaun-Gegenfärbung.  $\times 200$ .

ist der HPV-Nachweis als Screeningtest umstritten. Bis zu 40% der Frauen im Alter zwischen 20 und 35 Jahren können mit Hochrisiko-HPV-Typen infiziert sein. In den meisten Fällen klärt sich die Infektion spontan und ohne Folgen. Im Gegensatz dazu lässt sich mit der p16-Reaktion eine hochgradige Selektion unter den HPV-positiven Frauen durchführen und ein Risikokollektiv definieren.

Ein weiterer Vorteil der p16-Methode liegt darin, dass sie direkt am histologischen Schnitt oder im zytologischen Präparat verwandt wird (Abb. 4–6). Dies bedeutet, dass der Pathologe die Information über den p16-Expressions-

status mit dem histologischen Bild der vorliegenden intraepithelialen Läsion in Beziehung setzen kann.

Im Jahre 1998 haben Sano et al. [21]. zuerst auf die mögliche Rolle des p16 hingewiesen. Seitdem ist eine Reihe von Studien zur Wertigkeit dieser Methode in der Beurteilung präneoplastischer Veränderungen nicht nur der Zervix, sondern auch der oralen Mukosa, des Ösophagus und anderer Organe erschienen. Übereinstimmend ergibt sich, dass p16 als wertvoller Marker in ausgewählten Fällen der Zervixhistologie eine Rolle spielen kann [22–26]. So liess sich mit der p16-Färbung die Überein-

stimmung in der Beurteilung schwieriger Differentialdiagnosen, z.B. unreife Metaplasie versus Dysplasie, auch unter Experten wesentlich verbessern [23]. Auch ein Einsatz im Bereich der Zytologie ist denkbar [27, 28]. Wegen der unterschiedlichen Fixierungstechniken zytologischer und histologischer Präparate (Alkohol vs. Formalin) lassen sich die vorhandenen Nachweismethoden nicht wechselseitig verwenden. Im Augenblick werden von verschiedenen Herstellern unterschiedliche Kits für zytologische und histologische Präparate entwickelt. Es ist denkbar, dass durch die selektive Anfärbung dysplastischer Zellen mit p16 der mühsame und unter Umständen mit Fehlern behaftete Such- und Interpretationsprozess im zytologischen Routinelabor in Zukunft erleichtert oder sogar maschinell auswertbar wird. Studien hierzu liegen im Augenblick noch nicht vor.

#### Nachweis von E6 und E7

Wie bereits diskutiert, ist die kontinuierliche Expression der viralen Onkogene E6 und E7 der entscheidende Schritt in der HPV-induzierten Karzinogenese der Zervix. Es ist deshalb naheliegend, einen direkten Nachweis dieser Produkte als diagnostischen Test zu entwickeln. Da sämtliche Papillomviren die genetische Information zur E6- und E7-Bildung besitzen, ist ein Nachweis auf DNS-Ebene für diagnostische Zwecke ungeeignet. Der Nachweis muss deshalb als Ausdruck der Genexpression auf

RNS-Ebene erfolgen [29]. Damit sind jedoch erhebliche technische Probleme verbunden, da die RNS instabil ist und ausserdem vor einem Nachweis erst amplifiziert werden muss. Von der Biotech-Firma Norchip wird derzeit ein Nachweis entwickelt, der in der klinischen Erprobung ist [30, 31]. Ein Direktnachweis mittels eines Antikörpers, der gegen E7 gerichtet ist, ist ebenfalls in Erprobung [pers. Mitteilung W. Zwerschke, www.amunyon.com].

#### Zykline

Von den Zyklinen liegen Untersuchungen über Zyklin B, D und E vor [19, 32]. Dabei fand sich eine deutliche Assoziation von Zyklin E mit HPV-Infektion sowie niedrig wie hochgradigen intraepithelialen Läsionen der Zervix. Ähnlich wie mit dem Ki-67-Nachweis erscheint eine Anwendung in der diagnostischen Praxis zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht in Sicht.

#### «Minichromosome Maintenance Proteins»

«Minichromosome maintenance proteins» spielen eine wichtige Rolle in der DNS-Replikation [32, 33]. Dabei werden 7 verschiedene Typen unterschieden. Der immunhistochemische Nachweis ist mittels eines Antikörpers möglich und in mehreren Studien untersucht worden. Diese Untersuchungen sind erfolversprechend, aber noch nicht in einem Stadium, das ihre baldige klinische Anwendung ermöglicht.

## Literatur

- Gustafsson L, Ponten J, Bergström R, Adami HO: International incidence rates of invasive cervical cancer before cytological screening. *Int J Cancer* 1997;71:159–165.
- Black RJ, Bray F, Felay J, Parkin DM: Cancer incidence and mortality in the European Union: Cancer registry data and estimates of national incidence for 1990. *Eur J Cancer* 1997;33:1075–1107.
- Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland 2002: Krebs in Deutschland – Häufigkeiten und Trends, 3., aktualisierte Ausgabe (Verantw. Autoren: Batzler WU, Bertz J, Eisinger B, Hentschel S, Husmann G, Kieschke J, Lehnert M, Oberhausen R, Schmidtman I, Schneider D). Saarbrücken, 2002. <http://www.rki.de/GBE/KREBS/BROSCHUERE2002.PDF>.
- Anderson GH, Boyes DA, Benedet JL, Le Riche JC, Maticic JP, Suen KC, Worth AJ, Millner A, Bennett OM: Organisation and results of the cervical cytology screening programme in British Columbia, 1955–1985. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1988;296:975–978.
- Riethdorf L, Ramirez-Ponas J, Kühler-Obbarius C: Diagnostik und Therapie zervikaler Plattenepitheldysplasien. *Pathologie* 1999;20:34–41.
- Riethdorf L, Park TW, Thomssen C: Diagnostik und Therapie zervikaler Plattenepithelkarzinome. *Pathologie* 1999;20:42–49.
- Schneider V, Henry MR, Jimenez-Ayala M, Turnbull LS, Wright TC: Cervical Cancer Screening, Screening Errors and Reporting. *Acta Cytol* 2001;45:493–498.
- Chang AR: Carcinoma in situ of the cervix and its malignant potential: A lesson from New Zealand. *Cytopathology* 1990;1:321–328.
- Raffle AE, Alden B, Quinn M, Babb PJ, Brett MT: Outcomes of screening to prevent cancer: Analysis of cumulative incidence of cervical abnormality and modelling of cases and deaths prevented. *BMJ* 2003;326:901.
- Schneider V: CIN prognostication: Will molecular techniques do the trick? *Acta Cytol* 2003;47:115–116.
- Milde-Langosch K, Riethdorf S: Role of cell-cycle regulatory proteins in gynecological cancer. *J Cell Physiol* 2003;196:224–244.
- zur Hausen H: Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002;2:342–350.
- White AE, Livanos EM, Tlsty TD: Differential disruption of genomic integrity and cell cycle regulation in normal human fibroblasts by the HPV oncoproteins. *Genes Dev* 1994;8:666–677.
- Munger K, Howley PM: Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res* 2002;89:213–228.
- Duensing S, Munger K: The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability. *Cancer Res* 2002;62:7075–7082.
- Keating JT, Ince T, Crum CP: Surrogate biomarkers of HPV infection in cervical neoplasia screening and diagnosis. *Adv Anat Pathol* 2001;8:83–92.
- Patterson B, Domanik R, Wernke P, Gombrich M: Molecular biomarker-based screening for early detection of cervical cancer. *Acta Cytol* 2001;45:36–47.
- van de Putte G, Holm R, Lie AK, Trope CG, Kristensen GB: Expression of p27, p21, and p16 protein in early squamous cervical cancer and its relation to prognosis. *Gynecol Oncol* 2003;89:140–147.
- Keating JT, Cviko A, Riethdorf S, Riethdorf L, Quade BJ, Sun D, Duensing S, Sheets EE, Munger K, Crum CP: Ki-67, cyclin E, and p16INK4 are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2001;25:884–891.
- von Knebel DM: New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur J Cancer* 2002;38:2229–2242.

- 21 Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T: Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol* 1998;153:1741–1748.
- 22 Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, Dallenbach-Hellweg G, Schmidt D, von Knebel DM: Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 2001;92:276–284.
- 23 Klaes R, Benner A, Friedrich T, Ridder R, Herrington S, Jenkins D, Kurman RJ, Schmidt D, Stoler M, von Knebel DM: p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2002;26:1389–1399.
- 24 Murphy N, Ring M, Killalea AG, Uhlmann V, O'Donovan M, Mulcahy F, Turner M, McGuinness E, Griffin M, Martin C, Sheils O, O'Leary JJ: p16INK4A as a marker for cervical dyskaryosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and ThinPrep smears. *J Clin Pathol* 2003;56:56–63.
- 25 Negri G, Egarter-Vigl E, Kasal A, Romano F, Haitel A, Mian C: p16INK4a is a useful marker for the diagnosis of adenocarcinoma of the cervix uteri and its precursors: An immunohistochemical study with immunocytochemical correlations. *Am J Surg Pathol* 2003;27:187–193.
- 26 Agoff NS, Lin P, Morihara J, Mao C, Kiviat NB, Koutsky N: p16ink4a expression correlates with degree of cervical neoplasia: A comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types. *Mod Pathol* 2003;16:665–673.
- 27 Bibbo M, Klump WJ, DeCecco J, Kovatich AJ: Procedure for immunocytochemical detection of P16INK4A antigen in thin-layer, liquid-based specimens. *Acta Cytol* 2002;46:25–29.
- 28 Saqi A, Pasha TL, McGrath CM, Yu GH, Zhang P, Gupta P: Overexpression of p16INK4A in liquid-based specimens (Sure-Path trade mark) as marker of cervical dysplasia and neoplasia. *Diagn Cytopathol* 2002;27:365–370.
- 29 Sotlar K, Selinka HC, Menton M, Kandolf R, Bultmann B: Detection of human papillomavirus type 16 E6/E7 oncogene transcripts in dysplastic and nondysplastic cervical scrapes by nested RT-PCR. *Gynecol Oncol* 1998;69:114–121.
- 30 Molden T, Kraus I, Nordstrom T, Skomedal H, Hagmar B, Karlsen F: PreTect HPV-Proofer, a new assay for detection and typing of oncogenic human papillomavirus (HPV) mRNA. Submitted.
- 31 Kraus I, Molden T, Erno LE, Skomedahl H, Karlsen F, Hagmar B: Human papillomavirus (HPV) oncogenic expression in the dysplastic portio: An investigation of biopsies from 190 cervical cones. Submitted. [www.norchip.com](http://www.norchip.com).
- 32 Zwerschke W. Personal communication. [www.amunyon.com](http://www.amunyon.com).
- 33 Ishimi Y, Okayasu I, Kato C, Kwon HJ, Kimura H, Yamada K, Song SY: Enhanced expression of Mcm proteins in cancer cells derived from uterine cervix. *Eur J Biochem* 2003;270:1089–1101.
- 34 Davidson EJ, Morris LS, Scott IS, Rushbrook SM, Bird K, Laskey RA, Wilson GE, Kitchener HC, Coleman N, Stern PL: Minichromosome maintenance (Mcm) proteins, cyclin B1 and D1, phosphohistone H3 and in situ DNA replication for functional analysis of vulval intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer* 2003;88:257–262.