

Nachweis und Organisationsstruktur der DNS menschlicher Papillomviren beim Kehlkopf- und Hypopharynxkarzinom¹

A. Stremlau*, H. P. Zenner*, L. Gissmann**, H. zur Hausen**

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten im Kopfklinikum Würzburg (Direktor: Prof. Dr. med. W. Kley)

Einleitung

Die humanen Papillomviren (HPV) stellen eine große, heterogene Gruppe mit zur Zeit mehr als vierzig bekannten Typen dar. Die Papillomviren rufen infektiöse Epitheliome des Menschen hervor, die sich klinisch im Bereich der Haut als Warzen, an den Schleimhäuten als Papillome und im Übergangsbereich der Schleimhäute des Genitales als Kondylome manifestieren.

Es gibt verschiedene Beobachtungen, die darauf hinweisen, daß Papillomviren nicht nur gutartige Tumore induzieren, sondern auch bei der Entstehung von Malignomen beteiligt sind, vor allem im Zusammenwirken mit physikalischen oder chemischen Karzinogenen (16). So treten nach Röntgenbestrahlung von papillomvirusinduzierten juvenilen Kehlkopfpapillomen nach relativ langer Latenzzeit vermehrt Larynxkarzinome auf (15). Bei Patienten mit erblich bedingter Epidermodysplasia verruciformis, einer Erkrankung, die sich durch besondere Anfälligkeit gegenüber Warzenvirus-Infektionen auszeichnet, entstehen oft Karzinome in Hautbereichen, die von HPV-induzierten, gutartigen Tumoren befallen sind und dem Sonnenlicht exponiert waren (7).

Zur Hausen und seine Mitarbeiter konnten zeigen, daß Genitalkarzinome in besonderer Weise mit der Infektion durch zwei HPV-Typen (HPV 16 und HPV 18) in Verbindung stehen (17).

Mehr als 80% aller Biopsien von Karzinomen der Cervix uteri enthalten HPV 16, HPV 18 oder verwandte Sequenzen (2, 4). Neben ersten Berichten über Papillomvirus-Infektionen in Tumoren des Mundes (1, 3, 8), konnten wir zusammen mit anderen erste Einzelfallstudien einer Papillom-Virus-Infektion bei Tumoren des Kehlkopfes (10), wie auch des unteren Respirationstraktes (13) vorlegen. Um eine klinische Bedeutung dieser Befunde zu überprüfen, ent-

Zusammenfassung

Bei 30 Karzinomen des Larynx und Hypopharynx wurde molekularbiologisch geprüft, ob eine Assoziation mit humanen Papillomviren (HPV) vorliegt. Die DNS jedes einzelnen Tumors wurde auf die Anwesenheit von Virussequenzen überprüft (HPV Typen 1, 2, 4, 8, 9, 10, 11, 13, 16 und 18). Es konnte gezeigt werden, daß ein Plattenepithelkarzinom des Hypopharynx (postcricoideale Region) virale DNS des HPV 16 enthält. Der Nachweis gerade dieser DNS ist von großer Bedeutung, da HPV 16 DNS auch in einer großen Zahl menschlicher Genitalkarzinome identifiziert werden konnte. In den Hypopharynx-Karzinomzellen befindet sich die HPV 16 DNS hauptsächlich außerhalb der Chromosomen. Die Größe der Virus-DNS beträgt zum einen 7,9 kbp, zum anderen fanden sich auch größere, „rearrangierte“ ringförmige Moleküle (18,4 kbp). Es konnte zudem ein wahrscheinlicher Einbau (Integration) der fremden viralen DNS in die zelluläre DNS des Tumors gezeigt werden. Integration und Rearrangement werden für die Induktion und Aufrechterhaltung eines transformierten Zustandes mitverantwortlich gemacht.

Darüber hinaus konnten in zwei weiteren Karzinomen virale Sequenzen nachgewiesen werden, die unter semistringenten Bedingungen mit HPV DNS reagieren; dies kann bedeuten, daß weitere Papillomvirusinfektionen im Bereich des Larynx und Hypopharynx vorkommen.

Human Papilloma Virus – DNA in Laryngeal Carcinomas: Physical State and Analysis of the Viral Genome

Thirty biopsy specimens from various histological types of human carcinomas of the larynx and hypopharynx were analysed for the presence of human papillomavirus (HPV) DNA: DNA from the individual specimens were tested for the presence of homologous sequences to HPV genotypes 1, 2, 4, 8, 9, 10, 11, 13, 16 and 18. One squamous cell carcinoma of the hypopharynx (postcricoideal area) contained multiple copies of DNA hybridizing under stringent conditions with HPV 16 DNA. The latter DNA has been found to be frequently associated with human genital cancer. HPV 16 DNA was found mostly episomally as oligomeric circles of 7.9 kbp size, and as larger rearranged circular molecules. Integration of the viral DNA in the host cell DNA seems quite likely. Integration and rearrangement of viral DNA into cellular DNA may play a role in the induction and maintenance of the transformed state.

The presence of sequences reacting under semistringent conditions with HPV DNA was observed in two additional biopsy specimens of this study. This could suggest that additional laryngeal cancers are associated with papilloma virus infections.

¹ Herrn Prof. Dr. W. Kley zum 65. Geburtstag gewidmet

* Universitätsklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, Würzburg
** Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg

hält die vorliegende Arbeit die Ergebnisse einer systematischen Untersuchung von 30 Larynx- und Hypopharynxkarzinomen auf Papillomvirus-DNS.

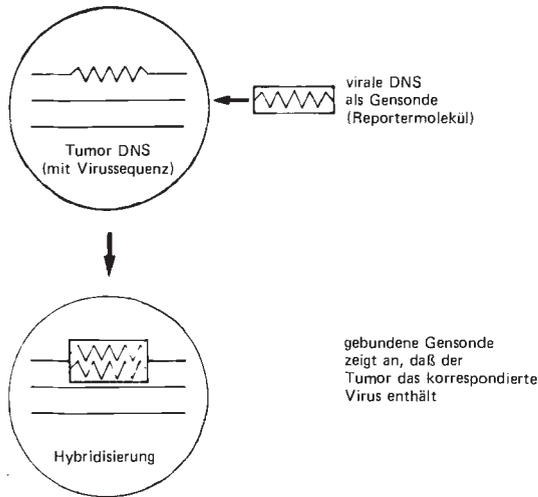


Abb. 1 Nachweis von Virus DNS in Kopf- und Halskarzinomen
Tumor DNS wird durch Restriktionsenzyme gespalten, aufgetrennt und auf Filter übertragen. Radioaktiv markierte virale (HPV) DNS wird als Gensonde zugegeben. Die Tumor DNS und die virale DNS liegen als Einzelstränge vor. Befinden sich virale Sequenzen in der Tumor DNS, so bilden sich DNS Doppelstränge, die virale DNS wird spezifisch an die Tumor DNS gebunden. Dieser Vorgang heißt Hybridisierung. Je nachdem man die Versuchsbedingungen wählt, kann man stringent hybridisieren, dann binden komplementäre DNS Einzelstränge nur, wenn die Basenpaare 100%ig zueinander passen, oder semist stringent, dann binden komplementäre DNS-Stränge bereits bei eng verwandter Basensequenz. Nach Abwaschen der ungebundenen DNS kann man die Hybridisierung autoradiographisch nachweisen.

Material und Methoden

Nach der operativen Entfernung wurde ein Teil des Tumorgewebes histologisch aufgearbeitet, der andere Teil zur DNS Extraktion verwendet.

Die gesamte zelluläre DNS wurde nach der Methode, wie von *Gissmann* u. Mitarb. (6) beschrieben, mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. 10 µg jeder DNS wurden mit Hilfe eines Restriktionsenzymes spezifisch gespalten und elektrophoretisch über 0,7%ige Agarosegele aufgetrennt. Nach Färbung mit Ethidium Bromid wurde die DNS in situ denaturiert und auf Nitrozellulosefilter transferiert (9). Klonierte HPV-DNS wurde durch eine Nicktranslation mit 32 P-TTP radioaktiv markiert und hitzedenaturiert. Die Nitrozellulosefilter wurden nun mit drei Cocktails dieser radioaktiv markierten viralen DNS hybridisiert (Cocktail A enthielt HPV-DNS der Typen 1, 2 und 4; Cocktail B enthielt die Typen 8, 9 10 und 11 und Cocktail C enthielt die Typen 13, 16 und 18). Die Hybridisierungsbedingungen wurden einmal stringent (18 °C unter dem Schmelzpunkt) und einmal semist stringent (28 °C unter dem Schmelzpunkt) gewählt. Nach dem Abwaschen der ungebundenen HPV-DNS wurden die Filter autoradiographisch daraufhin untersucht, ob eine spezifische Bindung zwischen der Tumor-DNS und der zugegebenen viralen DNS stattgefunden hat (Abb. 1). Zeigten sich positive Banden, wurde der spezifische HPV-Typ durch Hybridisierung mit der DNS der einzelnen HPV-Typen identifiziert.

Ein zweidimensionales Gel wurde präpariert, wie von *Wettstein und Stevens* beschrieben (14).

Aus der zellulären DNS einer Hypopharynxkarzinombiopsie wurde eine Genbank hergestellt. Nach Spaltung mit dem Restriktionsenzym

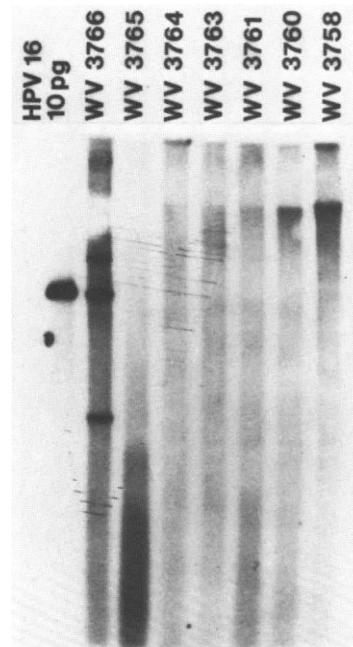


Abb. 2 Nachweis von HPV 16 Sequenzen im Hypopharynxkarzinom WV 3766

Die Tumor DNS wurde mit dem Restriktionsenzym Bam HI gespalten und mit radioaktiv markierter HPV 16 DNS als Gensonde stringent hybridisiert. Die Banden in der Spur der Tumor DNS WV 3766 zeigen eine spezifische Bindung der Gensonde an die Tumor DNS an und weisen so virale Sequenzen in der Tumor DNS nach. Die Tumoren WV 3758 – WV 3765 sind negativ.

Eco RI wurde die DNS in den Bacteriophagen Lambda L47 inseriert. Die Klonierung, das Screening und die Aufarbeitung der rekombinierten Phagen wurde ausgeführt, wie von *Maniatis* (9) beschrieben.

Ergebnisse:

30 Karzinome des Larynx und des Hypopharynx wurden auf die Anwesenheit von HPV DNS getestet. Hierzu wurde Virus-DNS präpariert, radioaktiv markiert und als Reporter-molekül (Gensonde) in die für die Untersuchung aufbereitete Tumor-DNS eingeschleust (Abb. 1). In einem Hypopharynxkarzinom aus der postcricoidalen Region konnte virale DNS nachgewiesen und als HPV 16 identifiziert werden (Einzelheiten siehe Abb. 2). Der HPV positive Tumor (Patient WV. 3766) zeigte histologisch das Bild eines Plattenepithelkarzinoms.

Die DNS des Tumors 3766 wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen spezifisch gespalten. Es ergaben sich das bekannte Spaltungsmuster von HPV 16 (12) und einige zusätzliche Banden. Dies bedeutet, daß HPV 16 nicht nur in seiner regulären Form, sondern auch in einer veränderten, „rearrangierten“ Form vorliegen muß. Das reguläre HPV 16 Genom besteht nämlich aus der Kontrollregion und den Regionen für die sogenannten „frühen“ und „späten“ Proteine. Es hat eine Länge von etwa 7900 Basenpaaren (bp) (Abb. 4 a). In dem rearrangierten HPV 16 Genom des

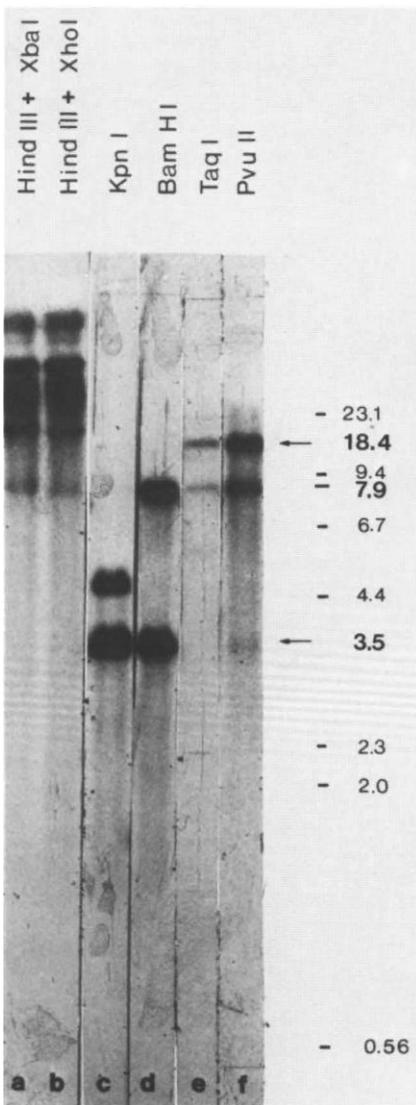


Abb. 3 a

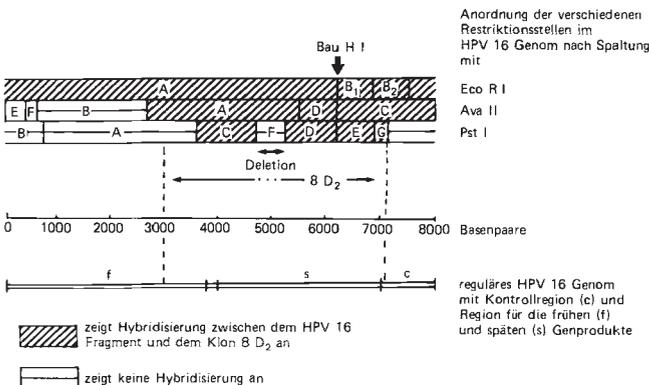


Abb. 3 b

untersuchten Tumors liegt ein Genomfragment (Interne Bezeichnung 8 D₂) nicht wie üblich nur einmal, sondern viermal hintereinander vor („Amplifikation“). Dieses Fragment 8 D₂ hat eine Länge von etwa 3500 Basenpaaren und

Abb. 3 a und 3 b: Analyse des HPV 16 im Hypopharynxkarzinom WV 3766

Je 10 µg der zellulären DNS wurden mit verschiedenen Restriktionsenzymen gespalten (Kpn I, Bam HI, Eco RI, Taq I und Pvu II) und mit HPV 16 als Probe stringent hybridisiert. Außer dem regulären Spaltungsmuster von HPV 16 (12) wurden einige zusätzliche Banden entdeckt. So zeigte sich nach Verdau mit Enzymen, die eine Schnittstelle auf dem HPV 16 Genom zwischen 3000 Basenpaaren (bp) und 7000 bp haben (Kpn I, Bam HI und Eco RI), eine überzählige Bande mit einer Größe von etwa 3500 bp (Abb. 3a, Spur c und d). Die DNS, die dieser Bande entspricht, wurde in den Vektor Lambda L 47 kloniert (Laborcode Klon 8D₂).

Um zu zeigen, mit welchem Bereich von HPV 16 Klon 8D₂ identisch ist, wurde klon 8D₂ radioaktiv markiert. Mit dieser Probe wurde ein Filter hybridisiert, auf dem das HPV 16 Genom, durch Restriktionsenzyme (Eco RI, Ava II, Pst I) in spezifische Fragmente gespalten, vorlag. Mit Klon 8D₂ hybridisierten die HPV Fragmente Eco RI A, B₁ und B₂, Ava II A, C und D sowie Pst I C, D, E und G; die übrigen Fragmente, insbesondere Fragment Pst IF, zeigten keine Hybridisierung (Abb. 3b).

Da die Anordnung der Restriktionsenzym – Schnittstellen im HPV 16 Genom bekannt ist (12), läßt sich Klon 8D₂ der HPV 16 DNS zuordnen; in der Region von 3000–7000 bp mit einer Deletion im Bereich von Fragment Pst IF (Abb. 3b).

Klon 8D₂ enthält folgende HPV 16 Regionen: fast die gesamte Region für die späten Genprodukte (s) und das kaudale Viertel der Region für die frühen Genprodukte (f) (Abb. 3b). Wird die zelluläre DNS mit Enzymen gespalten, die auf dem HPV 16 Genom zwischen 3000 und 7000 bp nicht schneiden (Taq I und Pvu II), so zeigt sich neben der regulären HPV 16 Bande bei 7900 bp eine zusätzliche Bande bei 18400 bp (Abb. 3a, Spur e und f). Es muß also neben dem regulären HPV 16 Genom ein verändertes, rearrangiertes HPV 16 vorliegen. Betrachtet man die Größe von 18400 bp, so muß man annehmen, daß in dem rearrangierten HPV 16 Genom das Fragment 8D₂ 3fach amplifiziert ist (Abb. 4b).

Abb. 3a, Spur a und b, zeigt die Spaltungsfragmente der zellulären DNS nach Verdau mit Restriktionsenzymen (Hind III, Xba I und Xho I), die im HPV 16 Genom nicht schneiden (12). Aufgrund der Bandengröße, der Gleichheit des Spaltungsmusters auf den Spuren a und b und nach Auswertung eines 2-dimensionalen Gels (siehe später) kann man zeigen, daß der reguläre HPV 16 wie auch der rearrangierte HPV 16 im Tumor hauptsächlich extrachromosomal in Form von Oligomeren vorliegt. Unter Berücksichtigung der Intensitäten der HPV spezifischen Banden bei 18400 bp und 7900 bp (Abb. 3, Spur e und f) wurde das Verhältnis von rearrangiertem zu regulärem HPV 16 auf drei zu eins geschätzt.

enthält das kaudale Ende für die frühen Proteine und fast die gesamte Erbinformation für die späten Proteine (ein kleines Subfragment PST 1F fehlt, es ist deletiert). Das rearrangierte HPV 16 Genom hat die pathologische Länge von 18400 Basenpaaren (Abb. 4 b). Das Mengenverhältnis von pathologischen (rearrangierten) HPV 16 Genomen zu regulären HPV 16 Genomen beträgt etwa drei zu eins. (Weitere Erläuterungen siehe Abb. 3 und 4).

Das HPV 16 Genom liegt in hoher Zahl („Kopienzahl“) pro Zelle vor (etwa 500 Genome/Zelle). Der größte Teil des viralen Genoms befindet sich kreisförmig angeordnet, außerhalb der Chromosomen. Mit Hilfe einer zweidimensionalen Auftrennung konnte gezeigt werden, daß das virale Genom wahrscheinlich nicht nur extrachromosomal zu finden ist, sondern wohl auch direkt in die Tumor-DNS eingebaut („integriert“) wird. Mit HPV 16 DNS als Suchprobe zeigte sich nicht nur für die extrachromosomale DNS (Spur A) des Tumors, sondern auch bei der zellulären DNS

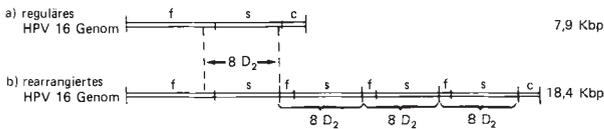


Abb. 4 Reguläres und rearrangiertes HPV 16 Genom

- a) regulärer HPV 16, Länge 7.9 kbp, bestehend aus früher Region (f), später Region (s) und Kontrollregion (c).
- b) rearrangierter HPV 16, Länge 18.4 kbp; das HPV 16 Fragment 8D₂, bestehend aus dem Ende der frühen Region und fast der gesamten späteren Region, liegt 4fach vor.

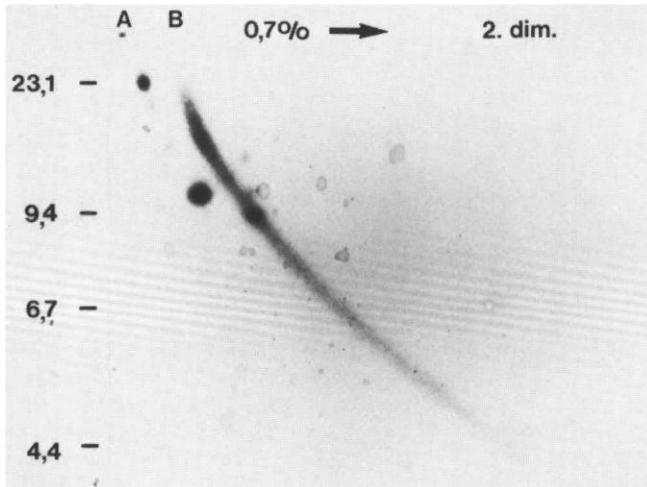


Abb. 5 Nachweis des Einbaus viraler DNS in die zelluläre DNS des Hypopharynxkarzinoms WV 3766 mit Hilfe eines zweidimensionalen Gels

Nach Spaltung wurde die zelluläre DNS über ein 0,4%iges Agarosegel (1. Dimension) und daraufhin über ein 0,7%iges Agarosegel (2. Dimension) aufgetrennt. Das Gel wurde geblottet und mit HPV 16 als Probe hybridisiert. Diese Methode erlaubt die Differenzierung zwischen zirkulären und linearen DNS-Molekülen, da die Wanderungsgeschwindigkeit zirkulärer DNS zu der linearen DNS in Gelen unterschiedlicher Agarosekonzentration variiert (12).

Spur A beinhaltet die zirkulären DNS-Moleküle, die extrachromosomal vorliegen müssen; Spur B besteht aus linearer DNS, die hauptsächlich aus den Chromosomen stammt.

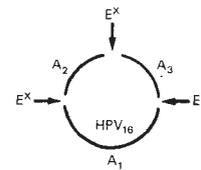
Spur A: jeder distinkte Punkt steht für ein Oligomer. Monomere 8 kbp Zirkel sollten auf der Höhe von 4.4 kbp laufen und lassen sich nicht nachweisen.

Spur B: die starke Hybridisierung selbst unter stringenten Bedingungen sowie die diskreten Banden sind Hinweise auf eine Integration des viralen Genoms in die zelluläre DNS.

(Spur B) eine starke Hybridisierung (Abb. 5). Die Annahme einer Integration wird unterstützt durch Experimente mit Restriktionsenzymen, die in dem viralen Genom schneiden (Eco RI) und Restriktionsenzymen, die nur in der Tumor DNS, nicht jedoch in dem viralen Genom schneiden (Hind III) (Abb. 6).

In zwei Tumorbiopsien (2 Stimmlippenkarzinome) wurden Sequenzen nachgewiesen, die eng mit Papillomvirus-Sequenzen verwandt sind, da sie unter „semistringenten“ Bedingungen mit HPV DNS hybridisierten. Das läßt vermuten, daß im Kehlkopfbereich weitere Papillomvirusinfektionen vorkommen.

- a) Virales Genom (HPV 16) nicht eingebaut in menschliche Tumor DNS



- b) Virales Genom, eingebaut in menschliche Tumor DNS

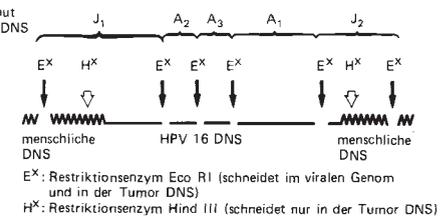


Abb. 6 Nachweis des Einbaus („Integration“) der viralen DNS in das menschliche Genom.

Abb. 6a Das virale Genom ist nicht in die menschliche Tumor DNS eingebaut („integriert“). Wird die DNS mit einem Restriktionsenzym gespalten, das im viralen Genom schneidet E^X (Eco RI), ergibt sich ein spezifisches und reproduzierbares Spaltungsmuster: Banden A₁, A₂ und A₃. Eine Doppelspaltung mit einem zusätzlichen Restriktionsenzym, das nicht im viralen Genom, sondern ausschließlich in der Tumor DNS schneidet H^X (Hind III), ändert das Spaltungsmuster nicht.

Abb. 6b Das virale Genom ist in die menschliche DNS eingebaut. Spaltung mit dem Restriktionsenzym Eco RI ergibt ein spezifisches Muster: Banden A₁, A₂, A₃ sowie zusätzlich die Virus-Zell-Übergänge („Integrationssides“) I₁ und I₂. Eine Doppelspaltung mit Eco RI und Hind III kann das Spaltungsmuster ändern. Das Restriktionsenzym Hind III schneidet in der menschlichen Tumor DNS und die Größe der „Integrationssides“ I₁ und I₂ nimmt ab.

Diskussion

DNS des humanen Papillomvirus 16 (HPV 16) konnte in einer von 30 Biopsien aus Karzinomen des Larynx und Hypopharynx nachgewiesen werden. Aus der vorliegenden Arbeit ergeben sich erste Hinweise, daß die HPV 16 DNS in das menschliche Erbgut eingebaut („integriert“) worden ist. Eine derartige HPV 16 Beteiligung wird für die Entstehung menschlicher Malignome, insbesondere menschlicher Karzinome des Genitalbereiches, mitverantwortlich gemacht (17). Im Bereich des Mundes als auch des Kehlkopfes wurde HPV 16 DNS kürzlich in drei Mundbodenkarzinomen gefunden (3). Über einen Einbau des viralen Genoms in die DNS der untersuchten Patienten wurde jedoch nicht berichtet.

Bei dem HPV 16 positiven Tumor handelt es sich um ein Hypopharynxkarzinom (postcricoidale Region). Die virale DNS liegt in einer hohen Kopienzahl pro Zelle vor und wird hauptsächlich außerhalb der Chromosomen in Form kreisförmiger DNS vorgefunden.

Die Zirkel bestehen aus dem regulären HPV 16 Genom der Größe 7.9 kbp und einem veränderten, rearrangiertem HPV 16 Genom, welches eine Größe von 18.4 kbp besitzt. Rearrangiertes HPV 16 Genom, hervorgerufen durch Verlust (Deletion) oder Vervielfachung (Amplifikation) eines Teiles des viralen Genoms, wurde bereits beschrieben (2). Es scheint unmöglich, daß HPV Moleküle der Größe 18.4 kbp vor dem Befall der späteren Tumorzelle zu infektiösen Partikeln zusammengefaßt wurden. Deshalb muß

die Zielzelle von einem viralen Partikel infiziert worden sein, in dem das HPV 16 Genom noch regulär, noch nicht rearrangiert, vorlag. Das Rearrangement kann erst nach der Infektion stattgefunden haben.

Es ist auffällig, daß der Großteil des viralen Genoms in der pathologischen, rearrangierten Form vorliegt. Durch die Veränderung der viralen Genomstruktur ist die Bildung modifizierter Proteine möglich. Die genaue biologische Funktion der modifizierten Struktur- oder Regulationsgene in dem untersuchten postcricoidalen Karzinom ist jedoch unklar, zumal verschiedene Teile (frühe und späte Region) des HPV 16 Genoms an dem Rearrangement beteiligt sind.

Weiterhin konnte ein wahrscheinlicher Einbau (Integration) der HPV 16 DNS in die zelleigene DNS des Patienten innerhalb des Hypopharynxkarzinoms gezeigt werden. In Malignomen des Genitalbereichs sind HPV 16 und HPV 18 in das zelluläre Genom des Tumors integriert und rufen somit Genomveränderungen hervor (5, 11). In gutartigen Tumoren, wie Kondylomen, wird HPV 16 sicherlich ganz überwiegend extrachromosomal vorgefunden (5). Dies unterstützt die Hypothese, daß die Integration von HPV 16 bei der Induktion und Aufrechterhaltung eines malignen Zustandes des untersuchten Hypopharynxkarzinoms eine Rolle spielt.

Literatur

- (1) Beaudenon, S., F. Praetorius, D. Kremsdorf, M. Lutzner, N. Worsaae, G. Orth: A new type of human papillomavirus associated with oral focal epithelial hyperplasia (eingereicht)
- (2) Boshart, M., L. Gissmann, H. Ikenberg, W. Scheurlen, A. Kleinheinz, H. zur Hausen: A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J.* 3 (1984) 51–57
- (3) De Villiers, E.-M., H. Weidauer, J.-Y. Le, C. Neumann, H. zur Hausen: Papillomviren in benignen und malignen Tumoren des Mundes und des oberen Respirationstraktes. *Laryng. Rhinol. Otol.* 65 (1986) 177–179
- (4) Dürst, M., L. Gissmann, H. Ikenberg, H. zur Hausen: A new type of papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsies from different geographical regions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80 (1983) 3812–3815
- (5) Dürst, M., A. Kleinheinz, M. Hotz, L. Gissmann: The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumors. *J. Gen. Virol.* 66 (1985) 1515–1522
- (6) Gissmann, L., V. Diehl, H.-J. Schultz-Coulon, H. zur Hausen: Molecular cloning and characterization of human papillomavirus DNA derived from a laryngeal papilloma. *J. Virology* 44 (1982) 393–400
- (7) Jablonska, S., J. Dabrowski, K. Jakubowicz: Epidermodysplasia verruciformis as a model in studies on the role of papova viruses in oncogenesis. *Cancer Res.* 32 (1972) 583
- (8) Löning, T., H. Ikenberg, J. Becker, L. Gissmann, I. Hoepfner, H. zur Hausen: Analysis of oral papillomas, leukoplakias and invasive carcinomas for human papillomavirus type related DNA. *Journal of Investigative Dermatology* 84 (1985) 417–420
- (9) Maniatis, T., E. F. Fritsch, J. Sambrook: Molecular cloning: A laboratory manual, erschienen bei Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y. (1982)
- (10) Scheurlen, W., A. Stremlau, L. Gissmann, D. Höhn, H.-P. Zenner, H. zur Hausen: Rearranged HPV 16 Molecules in an Anal Carcinoma and in a Laryngeal Carcinoma. *Int. J. Cancer* (im Druck)
- (11) Schwarz, E., U. K. Freese, L. Gissmann, W. Mayer, B. Roggenbuck, A. Stremlau, H. zur Hausen: Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 34 (1985) 111–114
- (12) Seedorf, K., G. Krämmer, M. Dürst, S. Suhai, W. Röwekamp: Human Papillomavirus Type 16 DNA Sequence. *Virology*, im Druck
- (13) Stremlau, A., L. Gissmann, H. Ikenberg, M. Stark, P. Bannasch, H. zur Hausen: Human papillomavirus Type 16 related DNA in an Anaplastic Carcinoma of the Lung. *Cancer* 55 (1985) 737–740
- (14) Wettstein, F. O., J. G. Stevens: Variable-sized free episomes of Shope papilloma virus DNA are present in all non-virus-producing neoplasms and integrated episomes are detected in some. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79 (1982) 790–794
- (15) zur Hausen, H.: Human papilloma viruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 78 (1977) 1–30
- (16) zur Hausen, H.: The role of viruses in human tumors. *Advances in Cancer Res.* 33 (1980) 77
- (17) zur Hausen, H., A. Schneider: The Role of Papillomaviruses in Human Anogenital cancer. In: *The Papillomaviruses* (eds P. M. Howley and N. P. Salzman) (zum Druck eingereicht)

Dr. med. A. Stremlau
Universitätsklinik und Poliklinik
für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten
im Kopfklinikum Würzburg
Josef-Schneider-Str. 11
8700 Würzburg