

Aus der Hals-Nasen-Ohrenklinik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. J. Schipper

**Epitope des Humanen Papilloma Virus (HPV) Typ 16 als
Zielstruktur einer T-Zell-Immunantwort gegen
Plattenepithelkarzinome des Oropharynx**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Christian Arsov

2006

Als Inauguraldissertation gedruckt
mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg
Dekan

Referent: Priv.-Doz. Dr. T.K. Hoffmann
Korreferent: Prof. Dr. B. Homey

Wer glaubt etwas zu sein, hat aufgehört etwas zu werden.

(Sokrates)

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	6
2. Einführung in die Thematik	9
2.1 Das Oropharynxkarzinom	9
2.2 Humane Papilloma Viren	16
2.3 Tetramer-Komplexe	26
2.4 Dendritische Zellen	29
3. Fragestellung und Zielsetzung	36
4. Material und Methoden	38
4.1 Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes	38
4.2 Tetramer Peptid-MHC Klasse I Komplexe (Tetramere)	40
4.3 HPV16 E7 Immunhistochemie	42
4.4 p16 Immunhistochemie	46
4.5 Expansion anti-HPV16 E7 spezifischer T-Zellen mittels Peptid beladener dendritischer Zellen	48
4.6 IFN- γ Enzyme-Linked Immuno Spot (ELISPOT) Versuche	49
4.7 Kultur der Zielzellen	52

4.8 Statistische Auswertung	53
5. Ergebnisse	54
5.1 Quantifizierung HPV16 E7 spezifischer CD8 ⁺ T-Zellen im peripheren Blut	54
5.2 HPV16 E7 und p16 Immunhistochemie	58
5.3 Korrelation zwischen HPV16 E7 spezifischen T-Zellen und HPV16 E7 Expression	61
5.4 In vitro Stimulation HPV16 E7 spezifischer T-Zellen mit autologen dendritischen Zellen	63
6. Diskussion	66
7. Zusammenfassung	73
8. Literaturverzeichnis	74
9. Abkürzungsverzeichnis	93
10. Danksagung	95
11. Lebenslauf	96

1. Einleitung

Für das Jahr 2002 wurden weltweit mehr als 500.000 bösartige Neuerkrankungen im Kopf-Hals-Bereich registriert (Parkin et al. 2005). Histologisch handelt es sich hierbei in über 90 % um Plattenepithelkarzinome. Dabei zeigen sich bezüglich der Inzidenz sowohl geographische als auch geschlechtsspezifische Unterschiede. So findet sich für Karzinome der Mundhöhle einschließlich des Oropharynx die höchste Inzidenz in Melanesien (31,5 / 100.000 für Männer bzw. 20,2 / 100.000 für Frauen). Weitere Regionen mit einer hohen Rate an bösartigen Neuerkrankungen im Bereich der Mundhöhle / des Oropharynx sind für Männer West-Europa, Süd-Europa, Süd-Asien, das südliche Afrika sowie Australien / Neuseeland. Bei Frauen dagegen sind Karzinome der Mundhöhle / des Oropharynx neben Melanesien vor allem in Süd-Asien häufiger. Unterteilt nach ihrer Lokalisation stehen Neoplasien von Mundhöhle und Rachen bei Männern mit 7.9% an vierter und bei Frauen mit 3.9% an achter Stelle der zehn häufigsten Tumormanifestationen. Diese Daten reflektieren die Prävalenz spezifischer Risikofaktoren wie z.B. den übermäßigen Genuß von Tabak und Alkohol in West-Europa, Süd-Europa und im südlichen Afrika. Die hohe Neuerkrankungsrate von Kopf-Hals-Karzinomen in Süd-/Zentral-Asien und in Melanesien ist dagegen auf das dort gehäufte Kauen von Betelnüssen zurückzuführen (Ho et al. 2002).

Für die Bundesrepublik Deutschland ergibt sich aus den Daten der Krebsregister für bösartige Neoplasien der Mundhöhle und des Rachens ebenfalls ein deutlich häufigeres Auftreten bei Männern im Vergleich zu Frauen (Altersstandardisierte Erkrankungsrate je 100.000 Einwohner [Stand 2000]: Saarland: 24,44 zu 6,18, Hamburg: 20,57 zu 6,24, Sachsen: 15,13 zu 3,41). Die jährliche Neuerkrankungsrate beträgt für die Bundesrepublik Deutschland etwa 15.000 Fälle (Lang et al. 2002).

Neben dem Genuß von Alkohol, Tabak, Mate-Tee (verbreitet in Südamerika) und Betelnüssen (verbreitet in asiatischen Ländern) sowie einer obst- und gemüsearmen Ernährung als klassische Risikofaktoren (Mendenhall et al. 2005, Licitra et al. 2002, Sanchez et al. 2003, Ho et al. 2002, Neville et al. 2002, Goldenberg et al. 2003) konnte in den letzten Jahren in mehreren Studien eine Infektion mit Humanen Papillomaviren (HPV) als unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung bösartiger Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich identifiziert werden (Mork et al. 2002). Bereits in den frühen 80er Jahren des letzten Jahrhunderts fanden sich Hinweise für Humane Papillomaviren als ätiologischer Faktor für bösartige Neoplasien des Kopf-Hals-Bereiches (Syrjanen et al. 1982, Syrjanen et al. 1983, deVilliers et al. 1985, Loning et al. 1985). Weitere Untersuchungen führten zu der

Erkenntnis, daß Infektionen mit Humanen Papillomaviren - speziell mit dem onkogenen Typ 16 - im Kopf-Hals-Bereich mit der Entstehung von Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx (v.a. Gaumenmandeln) assoziiert sind.

Brandsma und Kollegen untersuchten 1989 mittels Southern Blot Hybridisation insgesamt 101 Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches auf das Vorliegen von HPV-DNA der Typen 11, 16 und 18. Hier zeigte sich eine Dominanz des HPV Typ 16. Der HPV Typ 18 konnte in keinem der 101 Tumoren nachgewiesen werden, der Typ 16 dagegen in 2 der 11 Zungenkarzinome (18%), in 2 der 7 Tonsillenkarcinome (29%), in einem der 8 Pharynxkarzinome (13%) sowie in 3 der 60 Larynxkarzinome (5%). Ein HPV Nachweis gelang weder bei den Karzinomen der Nase, des Mundes noch des Ösophagus.

Niedobitek und Kollegen untersuchten 1990 insgesamt 28 Tonsillenkarcinome auf die Infektion mit den Humanen Papillomaviren Typen 6, 11, und 16. Bei 6 der insgesamt 28 Tonsillenkarcinome (21%) konnte mittels in situ Hybridisation der HPV Typ 16 nachgewiesen werden.

Snijders und Kollegen konnten 1992 mittels GP-PCR (general-primer-mediated polymerase chain reaction) in allen der 10 Biopsien aus Tonsillenkarcinomen die DNA von Humanen Papillomaviren nachweisen. Durch Typen-spezifische PCR wurde zusätzlich der beteiligte HPV Typ bestimmt. Es zeigte sich, daß bei 4 der 10 Biopsien (40 %) eine Infektion mit dem HPV Typ 16 vorlag.

In einer großen retrospektiven Serie haben Gillison und Kollegen im Jahre 2000 bei 62 von 253 (25%) Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches mittels PCR, Southern Blot Hybridisation und in situ Hybridisation eine HPV Infektion nachweisen können. Dabei wiesen im Bereich der Mundhöhle nur 12% der Tumoren eine HPV Positivität auf, im Hypopharynx waren es 10%, im Larynx 19% und im Oropharynx über 57%. Auch in dieser Studie zeigte sich die eindeutige Dominanz des onkogenen Typen 16 unter den nachgewiesenen HPV Typen. So handelte es sich bei 56 der insgesamt 62 HPV⁺ Tumoren (90%) um den Typ 16.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß in etwa 25% aller Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches Humane Papillomaviren nachgewiesen werden, von denen etwa 90% den onkogenen Subtyp 16 aufweisen (Niedobitek et al. 1990, Snijders et al. 1992, Paz et al. 1997, Schwartz et al.1998). Bei den Oropharynxkarzinomen liegt eine HPV-Infektion sogar in bis zu 50 bis 60% der Fälle vor (Haraf et al. 1996, Paz et al. 1997, Gillison et al. 2000), wohingegen in entsprechenden Kontrollgeweben die Frequenz unter 5% zu liegen scheint (Brandsma et al. 1989, Paz et al. 1997, Schwartz et al. 1998). Gleichzeitig findet sich bei

Patienten mit HPV positiven Oropharynxkarzinomen im Vergleich zu den übrigen Kopf-Hals-Karzinompatienten ein signifikant niedrigerer Anteil von Rauchern und starken Alkoholkonsumenten (Haraf et al. 1996, Gillison et al. 2000), was auf die Eigenständigkeit von HPV als Risikofaktor für die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs hinweist. (Smith et al. 1998, Schwartz et al. 1998).

2. Einführung in die Thematik

2.1 Das Oropharynxkarzinom

2.1.1 Definition des Oropharynx

Die Region des Oropharynx umfaßt als Unterbezirke die Seitenwände (Gaumenmandeln einschließlich Gaumenbögen), die Vorderwand (Zungengrund einschließlich Valleculae und linguale Epiglottisfläche), die Hinterwand (Rachenhinterwand) sowie die Oberwand (Vorderwand des weichen Gaumens einschließlich Uvula).

2.1.2 Regionale Lymphknoten des Oropharynx

Das regionale Lymphabflußgebiet des Kopf- und Halsbereiches umfaßt die Lymphknoten, die parallel zu den Jugularvenen, dem Nervus accessorius (N.XI) und der Arteria facialis verlaufen sowie die Lymphknoten, die im Trigonum submandibulare liegen. Zur stadiengerechten Therapie oropharyngealer Karzinome (s.u.) ist eine Einteilung der regionalen Lymphknoten in sogenannte Level (Level I bis V) üblich:

Level I: Nn. ll. submentales et submandibulares

Level II: kraniale Nn. ll. jugulares

Level III: mittlere Nn. ll. jugulares

Level IV: kaudale Nn. ll. jugulares

Level V: dorsale zervikale (trianguläre) Lymphknoten sowie supraklavikuläre Lymphknoten

2.1.3 TNM: Klassifikation des Oropharynxkarzinoms nach UICC (Union Internationale Contre Cancer / International Union Against Cancer)

Wie bei den meisten Malignomen des Menschen erfolgt auch beim Oropharynxkarzinom die Klassifikation nach dem TNM-System:

Tabelle 1. Pathologische TNM-Klassifikation (pTNM) des Oropharynx-Karzinoms (Quelle: UICC – Union Internationale Contre Cancer / International Union Against Cancer; <http://www.uicc.org/>).

Primärtumor: T	
pTx	Ausdehnung der Tumorinvasion histopathologisch nicht bestimmbar
pTis	Präinvasives Karzinom (Carcinoma in situ)
pT0	Keine histologische Evidenz für einen Primärtumor bei der Untersuchung des Resektats
pT1	Tumor <2 cm im größten Durchmesser
pT2	Tumor >2 cm aber <4 cm im größten Durchmesser
pT3	Tumor >4 cm im größten Durchmesser
pT4a	Tumor infiltriert den Larynx, die tiefe/extrinsische Muskulatur der Zunge, den M. pterygoideus medialis, den harten Gaumen oder den Unterkieferknochen
pT4b	Tumor infiltriert den M. pterygoideus lateralis, die Pterygoid Platten, den lateralen Nasopharynx / die Schädelbasis / umschließt die A. carotis
Regionale Lymphknoten : N	
pNx	Ausdehnung der Tumorinvasion in die regionalen Lymphknoten nicht bestimmbar
pN0	Keine Evidenz für den Befall regionärer Lymphknoten
pN1	Metastase in einem solitären ipsilateralen Lymphknoten, <3 cm im größten Durchmesser
pN2	Metastase(n) in einem solitären ipsilateralen Lymphknoten, >3 cm aber <6 cm im größten Durchmesser oder in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, <6 cm im größten Durchmesser oder in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, <6 cm im größten Durchmesser
pN2a	Metastase in einem solitären ipsilateralen Lymphknoten, >3 cm aber <6 cm im größten Durchmesser
pN2b	Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, <6 cm im größten Durchmesser
pN2c	Metastase(n) in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, <6 cm im größten Durchmesser
pN3	Metastase(n) in einem Lymphknoten, >6 cm im größten Durchmesser
Fernmetastasen: M	
pMx	Vorliegen von Fernmetastasen nicht bestimmbar
pM0	Keine Evidenz für Fernmetastasen
pM1	Evidenz für Fernmetastasen

2.1.4 Stadieneinteilung des Oropharynxkarzinoms nach AJCC (American Joint Committee on Cancer)

Zur stadiengerechten Therapie wurde vom AJCC (American Joint Committee on Cancer) die folgende Stadieneinteilung oropharyngealer Karzinome vorgeschlagen:

Tabelle 2. Stadieneinteilung des Oropharynx-Karzinoms nach AJCC (Quelle: AJCC – American Joint Committee on Cancer; <http://www.cancerstaging.org/>).

Stadium	
0	Tis, N0, M0
I	T1, N0, M0
II	T2, N0, M0
III	T3, N0, M0 T1, N1, M0 T2, N1, M0 T3, N1, M0
IVa	T4a, N0, M0 T4a, N1, M0 T1, N2, M0 T2, N2, M0 T3, N2, M0 T4a, N2, M0
IVb	T4b, jedes N, M0 Jedes T, N3, M0
IVc	Jedes T, jedes N, M1

2.1.5 Aktuelle Therapie oropharyngealer Plattenepithelkarzinome

Eine definierte Standardtherapie oropharyngealer Plattenepithelkarzinome lässt sich bis heute nicht festlegen. In der Literatur finden sich zahlreiche Berichte, die den verschiedenen Therapiemodalitäten (Operation, Radiotherapie, Chemotherapie sowie Kombinationen der vorgenannten Verfahren als adjuvante/neoadjuvante Schemata) eine Überlegenheit zuschreiben (z.B. Harrision et al. 1994). Allerdings existieren bis dato keinerlei validen

Vergleichsstudien der unterschiedlichen therapeutischen Optionen, die eine eindeutige Überlegenheit eines bestimmten Verfahrens belegen. Letztendlich muß sich das therapeutische Vorgehen oftmals auch an den individuellen Charakteristika der einzelnen Patienten orientieren (Lokalisation und Ausdehnung der Erkrankung, Allgemeinzustand des Patienten aber auch Erfahrung des Therapeuten mit den unterschiedlichen Therapieverfahren u.v.a.). Im Folgenden wird nur ein kurzer Überblick über die derzeit (Stand 2002) in der Bundesrepublik Deutschland geltenden Richtlinien für die Therapie oropharyngealer Karzinome gegeben. Die folgenden Angaben sind den „Interdisziplinären kurzgefaßten Leitlinien“ der Deutschen Krebsgesellschaft und ihrer Arbeitsgemeinschaften, der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie und der Deutschen Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie entnommen. Ausführlichere Informationen und die jeweils aktuellen Richtlinien zur Therapie oropharyngealer Karzinome können der Homepage der AWMF entnommen werden (<http://www.awmf.online.de/>).

2.1.5.1 Chirurgische Therapie

Das allgemeine Prinzip der Tumorchirurgie und somit auch der operativen Therapie von Oropharynxkarzinomen besteht in der Entfernung des Tumors und seiner Lymphabflußwege im Gesunden. Als Instrumente der resezierenden Verfahren stehen das Skalpell, der Laser und das elektrische Messer zur Verfügung. Defektschäden nach ausgedehnten Resektionen bedürfen oftmals einer anschließenden plastischen Rekonstruktion (z.B. Radialislappen, Musculus pectoralis major Lappen). Operative Verfahren werden nicht nur in kurativer sondern auch in palliativer Intention eingesetzt (z.B. zur Verbesserung der Lebensqualität bei nicht komplett resezierbaren Primärtumoren oder bei Rezidivtumoren). Bei der operativen Therapie des Primärtumors wird oftmals gleichzeitig eine Entfernung verschiedener Lymphknotengruppen durchgeführt (Neck dissection), deren Ausmaß von vielen Begleitfaktoren abhängig ist (z.B. Metastasierungswege, Lokalisation und Ausdehnung des Primarius, Anzahl, Lokalisation und Größe der Lymphknotenmetastasen u.a.). Diese Neck dissection erfolgt meistens zeitgleich mit der Resektion des Primärtumors, kann aber auch im Anschluß an eine Radiotherapie durchgeführt werden. Als Formen der Neck dissection stehen zur Verfügung:

- Radikale Neck dissection (RND)
- Modifiziert radikale Neck dissection (MRND)
- Selektive Neck dissection

- Erweiterte radikale Neck dissection (ERND)

Häufige Indikationen der operativen Therapie und deren Verfahren:

Tis: Exzision des Carcinoma in situ.

T1: Transorale Resektion des Tumors, in Ausnahmefällen (z.B. Tumor am Zungengrund) auch transzervikale Resektion, bei Tumoren dieser Größe (<2 cm) ist ein Defektverschluß nur ausnahmsweise erforderlich.

T2: Transzervikale Resektion des Tumors in Form einer lateralen Pharyngotomie oder transorale Resektion, anschließend in der Regel plastische Rekonstruktion.

T3: Transzervikale Resektion des Tumors in Form einer lateralen Pharyngotomie, evtl. auch temporäre Mandibulotomie, eine Laryngektomie ist selten erforderlich, alternativ auch transorale Resektion des Tumors, nach operativer Resektion des Tumors plastische Rekonstruktion.

T4: Transzervikale Resektion des Tumors in Form einer lateralen Pharyngotomie, evtl. auch temporäre Mandibulotomie, bei Befall des Zungengrundes kann eine Laryngektomie notwendig werden, nach operativer Resektion des Tumors plastische Rekonstruktion.

N0: Selektive Neck dissection, evtl. Beobachtung.

N1: Selektive Neck dissection oder modifizierte radikale Neck dissection.

N2: Selektive Neck dissection oder modifizierte radikale Neck dissection, in besonderen Fällen auch radikale Neck dissection.

N3 Radikale Neck dissection, evtl. modifizierte radikale Neck dissection oder erweiterte radikale Neck dissection.

2.1.5.2 Radiotherapie

Die Radiotherapie wird entweder als alleiniges Verfahren angewandt oder aber im Rahmen adjuvanter oder neoadjuvanter Therapieprotokolle. Zum Einsatz kommt in der Regel ein perkutanes Bestrahlungsverfahren. Analog dem operativen Vorgehen kann auch die Radiotherapie als kurative oder palliative Maßnahme eingesetzt werden. Die Indikationen zur Radiotherapie sind vielfältig und von weiteren Faktoren abhängig (z.B. vorausgegangene Bestrahlung bei einem Rezidiv, Infiltration von lebenswichtigen Strukturen u.a.).

Indikationen zur primären Radio- bzw. primären Radiochemotherapie:

- In den frühen Stadien I und II (entsprechend T1 N0 bzw. T2 N0 nach UICC, s.o.) kann bei entsprechenden Kontraindikationen gegen ein operatives Vorgehen die alleinige primäre Radiotherapie in kurativer Intention eine Alternative zur Operation sein.
- In den fortgeschrittenen Stadien (III und IV) kann ebenfalls alternativ zur Operation eine primäre Radiotherapie durchgeführt werden, sie wird in diesen fortgeschrittenen Stadien jedoch in der Regel mit einer Chemotherapie kombiniert.

Indikationen zur postoperativen Radiotherapie (adjuvante Radiotherapie):

- Der Tumor konnte nicht vollständig im Gesunden reseziert werden (d.h. R1- bzw. R2-Resektion) und eine Nachresektion ist nicht möglich.
- Karzinome der Uvula bzw. des Gaumenbogens mit einem T2-4 Stadium.
- Karzinome der Tonsillen bzw. des Zungengrundes mit einem T2-4 Stadium.
- Jedes Stadium >N1.
- Fakultativ bei N0 Stadien, wenn sich im histologischen Resektionspräparat am Primärtumor eine Invasion von Lymphgefäßen nachweisen läßt.

2.1.5.3 Kombinierte Radiotherapie und Chemotherapie

Hauptindikation für dieses Verfahren sind hauptsächlich Tumoren, die inoperabel sind oder organerhaltend therapiert werden sollen. Da die Langzeitergebnisse solcher Tumoren bei alleiniger Bestrahlung unbefriedigend sind, werden simultan zur Radiotherapie neben radiosensibilisierenden Substanzen auch Zytostatika gegeben. Zum Einsatz kommen dabei vor allem 5-FU (5-Fluorouracil) und Cisplatin aber auch Carboplatin, Taxane und Mitomycin. Vorteile der simultanen Therapie liegen in einer höheren lokoregionären Tumorfreiheit und in der Organerhaltung, nachteilig wirken sich dagegen therapieassoziierte Nebenwirkungen wie z.B. Mukositis und Osteonekrose aus (Olmi et al. 2003).

2.1.5.4 Zytostatische Chemotherapie

Eine alleinige zytostatische Therapie wird derzeit nur in palliativer Intention durchgeführt und auch nur dann, wenn keine Optionen auf eine chirurgische oder Radiotherapie bestehen (z.B. lokoregionäres Rezidiv mit Fernmetastasen). Wirksamkeit zeigten Cisplatin, Carboplatin, 5-FU, MTX (Methotrexat), Ifosfamid, Cyclophosphamid, Paclitaxel und Vincaalcaloide. Die Kombination der Zytostatika Cisplatin/Carboplatin mit 5-FU zeigt dabei die höchsten

Remissionsraten, wobei eine solche Polychemotherapie wesentlich häufiger toxische Nebenwirkungen mit sich bringt als eine Monochemotherapie (Welkoborsky et al. 1992).

2.1.5.5 Immuntherapie

In den letzten Jahren wurden unterschiedliche Ansätze einer Immuntherapie bei Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches entwickelt. Jedoch befindet sich der größte Teil dieser Ansätze nach wie vor im experimentellen Stadium und die Wirksamkeit der Verfahren konnte bisher noch nicht durch kontrollierte klinische Studien wissenschaftlich belegt werden. Ziel der immuntherapeutischen Ansätze ist die Behandlung lokoregionärer und systemischer Tumorzellreste im Sinne einer adjuvanten Therapie nach Durchführung der primär ablativen Therapie (Chirurgie, Strahlentherapie). Bei den immuntherapeutischen Konzepten unterscheidet man grob vier Prinzipien: aktive bzw. passive und spezifische bzw. unspezifische Immuntherapie. Die folgende Kurzübersicht gibt einen groben Überblick über einige immuntherapeutische Konzepte (Quelle: Hoffmann et al. 2005):

- passiv-unspezifische Therapie: IL-2 (perilymphatisch), IFN- γ (systemisch), IFN- α (systemisch)
- passiv-spezifische Therapie: Antikörper (z.B. anti-EGFR)
- aktiv-unspezifische Therapie: BCG (Bacille Calmette Guerin)
- aktiv-spezifische Therapie: DNA-basierte Vakzine, Vakzine aus dendritischen Zellen und p53-Wildtyp-Peptiden, Vakzine aus dendritischen Zellen und apoptotischen Tumorzellen

2.2 Humane Papilloma Viren

2.2.1 Einteilung und Epidemiologie der Humanen Papillomaviren

Die Humanen Papillomaviren (HPV) sind kleine doppelsträngige DNA (ds-DNA) Viren, die zur Familie der Papovaviridae gehören. Mittlerweile beträgt die Anzahl vollständig beschriebener, das heißt vollständig sequenzierter HPV Typen, nahezu 120 (deVilliers et al. 2004). Darüber hinaus sind beinahe 100 weitere bekannte Typen bisher noch nicht vollständig charakterisiert. Die Klassifikation der HPV erfolgt durch Sequenzanalyse der viralen Gene E6, E7 und L1. Dabei liegt definitionsgemäß dann ein neuer HPV-Typ vor, wenn sich mindestens 10% der Sequenzen in der Region der Gene E6, E7 und L1 von den bisher bekannten HPV-Typen unterscheiden (Tilston 1997). Subtypen und Varianten unterscheiden sich von primären Typen durch Unterschiede in den Gensequenzen im Bereich von 2 bis 5%. HPV werden fortlaufend numerisch nach ihrer Entdeckung benannt.

Papillomaviren zeigen eine weltweite Verbreitung und können neben dem Menschen auch andere Wirbeltiere infizieren (z.B. Kaninchen, Hasen und Vögel). Daß Viren ein ätiologischer Faktor für die Entstehung humaner Warzen darstellen, wurde bereits 1898 von M'Fadyan und Hobday beschrieben. Ihnen gelang es, Hundewarzen mittels eines ultrafiltrierten Warzenlysats zu übertragen (zur Hausen 1996). Im Jahre 1909 benutzte Ciuffo eine ähnliche Methode um humane Warzen zu übertragen. Bis in die 70er Jahre des letzten Jahrhunderts wurden die vielfältigen Formen humaner Warzen und Papillome als lokale Varianten eines einzigen infektiösen Agens, nämlich des HPV, angesehen. Erst durch den rasanten Fortschritt molekularbiologischer Techniken konnten nach und nach unterschiedliche HPV Typen identifiziert und charakterisiert werden. Ein enormes Aufsehen erregten HPV in den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts als man entdeckte, daß gewisse Typen mit einer der weltweit häufigsten bösartigen Neoplasien assoziiert sind - dem Karzinom der Zervix uteri sowie dessen dysplastischen Vorläufern (Pilotti et al. 1982, Baird 1983, Collins et al. 1988, McDance 1988, Sharma et al. 1988, Meanwell et al. 1987, Choo et al. 1987, Cardillo 1985).

Typisch für HPV ist ihr ausgeprägter Epitheliotropismus, d.h. der Befall von Epithelgewebe. In einigen seltenen Fällen konnte ihr Genom jedoch auch in mesenchymalen Zellen des Stromas gefunden werden (Unger et al. 1996). Dabei unterteilt man die unterschiedlichen HPV Typen grob in solche, die bevorzugt die Haut befallen und solche, die eher die Schleimhäute des Anogenitaltraktes sowie des oberen Aerodigestivtraktes infizieren. Üblicher ist dagegen die Einteilung der HPV in sogenannte „low risk“ und „high risk“ Typen. Die Bezeichnung „high risk“ rührt daher, daß bestimmte HPV Typen oft in Karzinomen der

Zervix uteri und anderen Neoplasien des weiblichen als auch des männlichen unteren Genitaltraktes gefunden werden. Zu den „high risk“ Typen zählen vor allem die HPV Typen 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 und 68 (Nindl et al. 1999). Dennoch verursachen die „high risk“ Typen nicht ausschließlich maligne Veränderungen, sondern werden auch in benignen Veränderungen wie z.B. perianalen Warzen angetroffen (Suzuki et al. 2001). Ebenso können von „high risk“ HPV Typen befallene Läsionen einer spontanen Regression unterliegen (Syrjanen 1996), nicht jedoch Karzinome. Obwohl der Begriff genitale HPV eine allgemein gewöhnliche Bezeichnung für die „high risk“ Typen ist, können sie auch mehrere nicht-genitale Regionen des menschlichen Körpers infizieren, dazu gehören der obere Aerodigestivtrakt - hier vor allem der Oropharynx bzw. die Tonsillen (Haraf et al. 1996, Paz et al. 1997, Gillison et al. 2000) - daneben aber auch z.B. die Konjunktiven.

Die sogenannten „low risk“ HPV Typen zeigen dagegen eine ausgeprägte Assoziation zu benignen Läsionen. Die typischsten benignen Läsionen, die durch „low risk“ HPV-Typen verursacht werden, sind die Condylomata acuminata („Feigwarzen“), verursacht durch die HPV-Typen 6 und 11 (Daling et al. 1986). Der Nachweis von „low risk“ HPV Typen in Karzinomen stellt dagegen eine Rarität dar, dennoch werden sie aber auch alleine wie auch in Gesellschaft mit „high risk“ HPV Typen in dysplastischen prämaligen Läsionen wie z.B. der zervikalen intraepithelialen Neoplasie (CIN) angetroffen (Nuovo 1998). Die geringe Potenz der „low risk“ HPV Typen zur malignen Transformation im Vergleich zu den „high risk“ HPV Typen beruht vor allem auf funktionellen Unterschieden der E6 und E7 Gene. Von zentraler Bedeutung ist dabei die Unfähigkeit des E6 Gens der „low risk“ HPV Typen 6 und 11 den Abbau des Tumorsuppressors p53 zu induzieren (s.u.) (Gage et al. 1990, Barbosa et al. 1991, Halbert et al. 1992).

Tabelle 3. Assoziation einiger HPV Typen mit benignen und malignen Läsionen.

Manifestation	Häufige HPV Typen	Weniger häufige HPV Typen
Hautwarzen		
Warzen der Fußsohlen	1	2,4,63
Gewöhnliche Warzen	2,27	1,4,7,26,28,29,57,60,65
Flache Warzen	3,10	2,26,27,28,29,41,49

Anogenitale Läsionen		
Condylomata acuminata	6,11	2,16,30,40,41,42,44,45,54,55,61
CIN, VIN, VAIN, PIN*	16,18,31	6,11,30,34,35,39,51,52,56-59,61,62,64,66,67,69
Bösartige Neoplasien		
Zervixkarzinom	16,18,31,45	6,10,11,2633,35,39,51,52,55,56,58,59,66,68
Andere anogenitale Karzinome	6,16,18	11,31,33
Larynxkarzinom	6,11	16,18,35
Karzinome des oberen Aerodigestivtraktes	16,18,3,6,57	
Oropharynxkarzinome	16	18,31,33

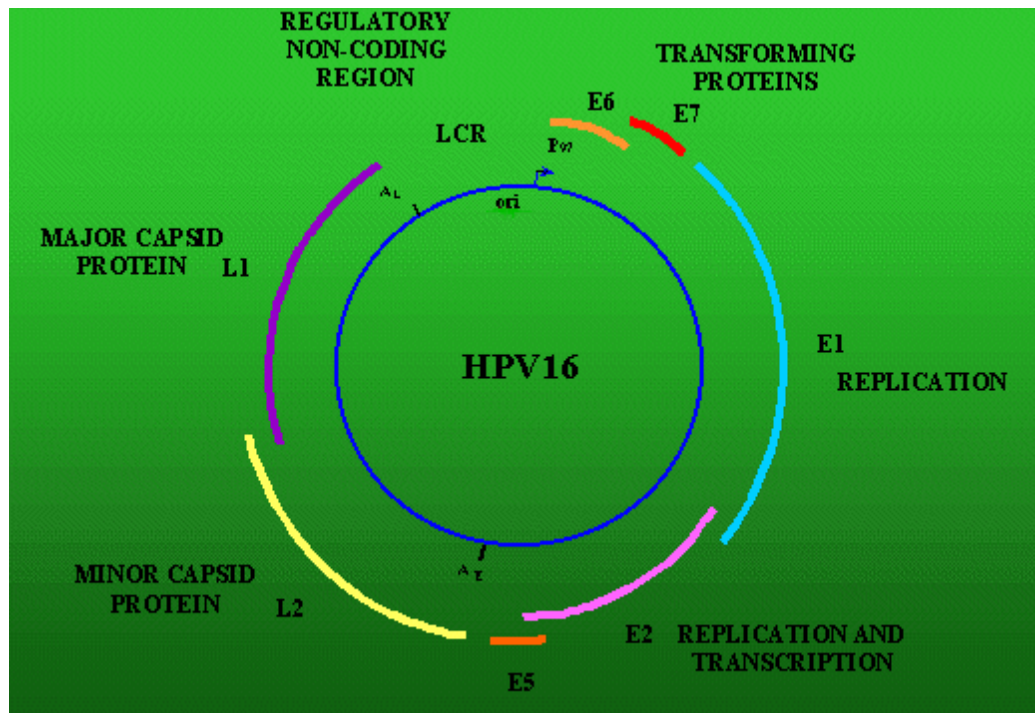
(*CIN = Cervicale intraepitheliale Neoplasie, VIN = Vulväre intraepitheliale Neoplasie, VAIN = Vaginale intraepitheliale Neoplasie, PIN = Penile intraepitheliale Neoplasie).

2.2.2 Aufbau des HPV-Genoms

Alle Papillomaviren Typen besitzen ein doppelsträngiges und kreisförmiges DNA-Genom, das zwischen 7000 und 8000 Basenpaare enthält (zur Hausen 1996). Der stabile genomische Aufbau ist ein charakteristisches Merkmal der Papillomaviren. Trotz der großen Diversität besitzen Papillomaviren eine hohe Übereinstimmung in der Sequenz der Nukleotide. Der Aufbau des HPV Genoms soll im Folgenden am Beispiel des HPV Typ 16 beschrieben werden. Man unterscheidet bei allen Papillomaviren drei Hauptregionen: die *early region* (E), die *late region* (L) und die *long control region* (LCR). Die early region ist für das Potential der Papillomaviren verantwortlich infizierte Zellen transformieren und immortalisieren zu können. Sie besteht aus einer Anzahl unterschiedlicher regulatorischer Gene mit Relevanz für die virale Transkription und Replikation als auch für die Kontrolle des Zellzyklus (zur Hausen 1999). Die Bezeichnung early region rührt daher, daß die dort befindlichen Gene für die virale Transkription und Replikation verantwortlich sind. Da diese Vorgänge am Anfang des viralen Lebenszyklus innerhalb der infizierten Zelle liegen, werden die Gene der early region auch als erstes aktiviert. Die late region kodiert für zwei Kapsid-Gene (L1 und L2). Da die Kapsid-Proteine erst am Ende des viralen Lebenszyklus zur Herstellung neuer Virione erforderlich

sind, werden die in der late region liegenden Gene erst spät aktiviert. Die long control region, auch als URR (upstream regulating region) bezeichnet, beinhaltet alle cis-regulatorischen Elemente die notwendig sind für die HPV Transkription einschließlich des frühen Promotors und des „origin“ der Replikation (ori).

Abb. 1. Aufbau des HPV 16 Genoms (Quelle: LTG Laboratoriade Terapia Genica).



2.2.2.1 E6 und E7 Gene

Die Gene E6 und E7 kodieren für kleine nukleäre Proteine mit einer Größe von 16-19 bzw. 10-14 kD (Greenfield et al. 1991, Fujikawa et al. 1994). Beide Gene werden in allen HPV infizierten Zellen gefunden und dort auch exprimiert (Smotkin et al. 1986, Androphy et al. 1987). E6 und E7 stellen sich als wichtigste Faktoren für die Wachstumsstimulation und Zell-Transformation heraus. So können die Produkte beider Gene unterschiedliche humane Zelltypen immortalisieren (Mc Dougall 1994), dabei zeigen sie eine synergistische Wirkung. Beide stellen multifunktionale Proteine dar:

E6 der HPV Typen 16 und 18 interagiert sehr wirkungsvoll mit dem antionkogenen zellulären Regulator p53 und dem Protein E6AP des Ubiquitin-Abbau-Signalwegs. Dies führt letztendlich zu einem beschleunigten Abbau des p53 (Werness et al. 1990, Huibregtse et al. 1991, Hubbert et al. 1992). Das p53 (Lokus: 17p13.1) kodiert für ein kurzlebiges

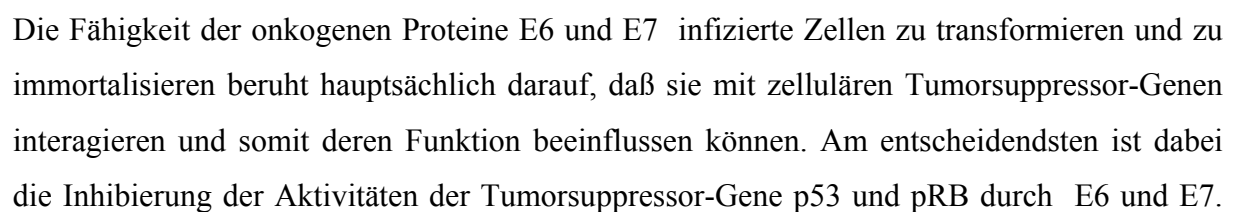
intranukleäres Protein, das auch als „Genomwächterprotein“ bezeichnet wird (Riede 2004). Kommt es durch Noxen zu DNA-Schäden, so reichert sich das von p53 kodierte Protein sehr schnell an und aktiviert die Transkription weiterer Gene, deren Produkte im Zusammenwirken mit p53 wiederum folgende Hauptwirkungen aufweisen:

1. Zellzyklus-Arrest: Das p53 bewirkt die Transkription des CDK-Inhibitors p21, der über eine Hemmung des Zyklin-CDK-Komplexes die inaktivierende Phosphorylierung des pRB110 verhindert. Dadurch macht die Zelle in der G1-Phase des Zellzyklus eine Pause. Diese nutzt sie, indem sie über eine p53 vermittelte Transkription des in die DNA-Reparatur involvierten „Growth-Arrest-and-DNA-Damage-inducible“-Proteins (GADD45) den DNA-Schaden wieder ausbessert. Danach schaltet das p53 das mdm2-Gen ein und inaktiviert sich damit selbst. Gelingt dies der Zelle nicht, wird sie von p53 auf den „Friedhof“ geschickt (Riede 2004).
2. Apoptose: In diesem Fall aktiviert p53 das bax-Protein und das IGF-BP3 (insulin-like growth factor). Dabei antagonisiert das bax-Protein das Apoptose-Hemmprotein bcl-2; der programmierte Zelltod wird eingeleitet (Riede 2004).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß p53 als sogenanter „Wächter des Genoms“ den Zellzyklus bei eingetretenen DNA-Schäden unterbricht bzw. bei nicht erfolgreicher DNA-Reparatur die Apoptose einleitet. Daher führt ein durch das E6 der „high risk“ HPV Typen induzierter Mangel an funktionsfähigem p53 zu einer erhöhten Empfänglichkeit der infizierten Zellen für DNA-Schäden bzw. verhindert deren Apoptose. Das E6 Protein der „low risk“ HPV Typen 6 und 11 induziert dagegen keinen Abbau des p53, was mit deren schwachen Potential zur Zell-Transformation korreliert (Gage et al. 1990, Barbosa et al. 1991, Halbert et al. 1992). Darüber hinaus hat E6 noch weitere Funktionen: Es aktiviert die Telomerase, interagiert mit einem Calcium bindenden Protein und bildet Komplexe mit Paxillin. Weiterhin interagiert es mit dem Cyclin abhängigen Kinase Inhibitor p16^{INK4}, was wiederum zu einer funktionellen Beeinträchtigung des E6 führen kann (zur Hausen 1999).

E7 repräsentiert ein kleines Phosphoprotein, das normalerweise durch die Casein-Kinase II phosphoryliert wird (Barbosa et al. 1991) und in einer Vielzahl von verschiedenen Zellkompartimenten vorkommt. Es bindet sehr effektiv an viele zelluläre Proteine wie z.B. pRB (Retinoblastom), p107 und p130 (zur Hausen 1999, Tommasino 1997). Unter Berücksichtigung der natürlichen Funktionen der genannten zellulären Proteine, kann man feststellen, daß E7 vornehmlich die normale Zellzyklus-Kontrolle beeinträchtigt. Von zentraler Bedeutung ist dabei die Bindung von E7 an pRB100 und pRB ähnliche „pocket“-

Abbildung 2. Zentrale Rolle des p53 und des RB Gens für die Regulation der Apoptose und des Zellzyklus; Quelle Biocarta).



pRB und p53 besitzen als wichtigste Funktion die Zellzyklus-Kontrolle sowie die Induktion der Apoptose. Der Verlust der pRB und p53 Funktion durch E6 und E7 stellt die Hauptursache für die Transformation und Immortalisation der infizierten Zellen dar (Boyer et al. 1996). Da „high risk“ HPV in der Lage sind beide Tumorsuppressor-Gene zu inaktivieren, können sie auf diese Weise die Zell-Replikation aktivieren, was gleichzeitig zu einer vermehrten Replikation des HPV-Genoms führt. Der Weg der infizierten Zellen in Richtung Apoptose wird dagegen blockiert (Ledwaba et al. 2004).

Das p16 Protein, kodiert durch das CDKN2A (MTS1, INK4A) Tumorsuppressor-Gen auf Chromosom 9p21, gehört zu den zyklinabhängigen Kinaseinhibitoren (Klussman et al. 2003). Es spielt im Zellzyklus eine bedeutende Rolle, indem es an die CDK4- und CDK6-Zykin-D Komplexe festmacht und so die Phosphorylierung des pRB-E2F Proteins hemmt. Das pRB-E2F Protein wiederum setzt im phosphorylierten Zustand den Transkriptionsfaktor E2F frei und ermöglicht so den Übergang von der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus. p16 reguliert also negativ den Zellzyklus, indem es die Hyperphosphorylierung und damit funktionelle Inaktivierung des pRB (Kamb et al. 1994, Serrano et al. 1993, Nobori et al. 1994) supprimiert. pRB wiederum ist ein negativer Regulator der p16 Expression, was an Zelllinien mit einem Defekt des pRB, die p16 überexprimierten, gezeigt werden konnte (Li et al. 1994). Da das E7 Protein von HPV16 wie schon beschrieben zu einer Inaktivierung des pRB führt, müßte eine mit HPV 16 infizierte Tumorzelle folglich das p16 Protein überexprimieren. Und tatsächlich konnte dies nicht nur für HPV induzierte Zervixtumoren gezeigt werden (Sano et al. 1998, Sano et al. 1998, Klaes et al. 2001) sondern auch für mit HPV 16 infizierte oropharyngeale Karzinome (Klussmann et al. 2003, Li et al. 2004, Weinberger et al. 2004, Wittekindt et al. 2005). Die Assoziation zwischen einer Infektion mit HPV16 und einer Überexpression von p16 in den Tumoren war so deutlich, daß Klussmann und Kollegen den p16 Status bei oropharyngealen Karzinomen als Surrogatmarker für eine Infektion mit HPV vorschlugen (Klussmann et al. 2003).

2.2.2.2 E Gene

Das E1 Gen kodiert für das größte HPV Protein (68-76 kD). E1 ist ein nukleäres Phosphoprotein, das eine essentielle Funktion in der Replikation des HPV Genoms besitzt. Es bindet an E2 und besitzt eine hohe Affinität zum origin der Replikation, der selber innerhalb der long control region lokalisiert ist (Chiang et al. 1992, Kuo et al. 1994). Weiterhin

interagiert es mit einer Vielzahl unterschiedlicher zellulärer Komponenten der DNA-Replikation wie z.B. der DNA-Polymerase und der Primase (Conger et al. 1999, Liu et al. 1995, Swindle et al. 1999) und besitzt eine ATP bindende Helicase Aktivität.

Das E2 Gen kodiert für ein 48 kD schweres und stark phosphoryliertes Protein. In HPV reguliert E2 neben der viralen DNA-Replikation auch die virale DNA-Transkription, indem es mit den teilweise palindromischen Sequenzen 5`- ACCN6G[GT]T-3`, die sich innerhalb der long control region befinden, interagiert (Spalholz et al. 1985, Phelps et al. 1987, McBride et al. 1988, Thierry et al. 1987).

Das Genprodukt von E4 scheint das Zytokeratin-Netzwerk zu zerstören (zur Hausen 1999).

Das E5 Gen kodiert für ein kleines hydrophobes Protein, das typischerweise in Membran-Kompartimenten wie z.B. dem Golgi-Apparat gefunden wird (Schlegel et al. 1986, Bubb et al. 1988, Horwitz et al. 1988, Burkhardt et al. 1989). Es kann den PDGF-Rezeptor (platelet derived growth factor) binden und aktivieren und vermittelt mitogene Signale, indem es die MAP-Kinase (mitogen-activated protein) und über diesen Signalweg wahrscheinlich auch die Expression von E6 und E7 fördert (zur Hausen 1999).

2.2.2.3 L1 und L2 Gene

Das L1 Gen kodiert für das 56-60 kD schwere Hauptstrukturprotein des Kapsids. L1 ist von allen Proteinen der Papillomaviren dasjenige mit den stärksten antigenen Eigenschaften. L1 ist nur gering phosphoryliert und bindet nicht an die DNA, es kann glykosiliert und mit Disulfidbrücken quervernetzt werden, die Bedeutung dieser chemischen Veränderungen ist jedoch weiterhin unklar. L1 ist das dominierende Molekül im viralen Kapsid (Christensen et al. 1994, Le Cann et al. 1994).

Das L2 Gen kodiert für das 49-60 kD schwere Nebenstrukturprotein des Kapsids. Im Gegensatz zu L1 ist es wesentlich stärker phosphoryliert und bindet anders als dieses DNA und besitzt auch nicht die Fähigkeit, sich mit sich selbst zu vernetzen (Day et al. 1998). L2 ist für die Bindung und Enkapsidierung des Virus-Genoms verantwortlich (Zhou et al. 1994) und trägt entscheidend zum Internalisierungsprozeß bei (Kawana et al. 2001).

2.2.2.4 Long Control Region (LCR)

Als long control region (gelegentlich auch als URR upstream regulatory region oder auch als nichtkodierende Region bezeichnet) versteht man die Region beginnend am Ende des L1 Gens bis zum ersten Methionin des E6 Gens (bei einigen Autoren der Beginn des E6 Gens). Die long control region ist der Bestandteil des HPV Genoms, der am geringsten konserviert ist. Sie beinhaltet den frühen Promotor und verschiedene regulatorische transkriptionale Motive. Der „ori“ ist ebenfalls innerhalb der long control region lokalisiert und zwar in der Regel zwischen den beiden E2 Bindungsstellen (Broudy et al. 1998).

2.2.3 Infektionszyklus der HPV und Transformation infizierter Zellen

Die Infektion mit HPV erfolgt über minimale Verletzungen des Epithelgewebes, dabei kommt es zu einer Infektion basaler Zellen. Der Rezeptor, über den sich die Viren den Eintritt in die Körperzellen verschaffen ist bisher nicht bekannt, diskutiert werden unter anderem das α_6 -Integrin (Evander et al. 1997) sowie der Fc γ -Rezeptor (Da Silva et al. 2001). Die Basalzellen des Epithelgewebes unterliegen einer ständigen Zellteilung, dabei verbleibt eine Tochterzelle als Basalzelle, die zu weiteren Zellteilungen in der Lage ist, während die andere Tochterzelle den Weg der Differenzierung einschlägt. Da bei der Zellteilung der Basalzellen das HPV-Genom an die Tochterzellen weitergegeben wird, können die HPV auf diese Weise im Körper persistieren (Longworth et al. 2004). In den Basalzellen des Epithelgewebes ist eine Vervielfältigung der Viren jedoch nicht möglich, für diesen Vorgang sind sie auf terminal differenzierte Zellen des Epithelgewebes angewiesen (Longworth et al. 2004). Dies zeigt sich daran, daß in den Basalzellen des Epithels lediglich die Gene der early region exprimiert werden. Erst in den oberflächlich gelegenen differenzierten Epithelzellen kommt es zu einer Aktivierung der Gene der late region und damit auch zu einer Produktion der durch sie kodierten Kapsid-Proteine, was letztendlich wiederum mit einer hohen Zahl an Viruspartikeln einhergeht. Von den oberflächlichen Epithelzellen werden schließlich fertige Virionen freigesetzt.

Der genaue Infektionszyklus der Viren einschließlich der exakten Reihenfolge aktivierter viraler Gene ist sehr komplex und bis heute nicht vollständig bekannt und soll an dieser Stelle auch nicht weiter erörtert werden. Für das Verständnis, warum nur ein geringer Anteil von HPV Infektionen zur malignen Transformation führt, ist die Kenntnis des exakten Replikationszyklus der HPV auch nicht entscheidend. Entscheidend bei der malignen Transformation infizierter Epithelzellen ist dagegen die Tatsache, daß in den meisten HPV

assoziierten malignen Tumorzellen das virale Genom anders als bei den gutartigen HPV assoziierten Tumoren nicht episomal vorliegt sondern in der Wirtszell-DNA integriert wird. Im normalen Replikationszyklus der HPV liegt das virale Genom episomal vor. Dabei besitzt das E2 Gen neben der viralen DNA-Replikation und der Regulation der Transkription der late control region eine weitere entscheidende Funktion, nämlich die Kontrolle der Expression von E6 und E7 (Moon et al. 2001). Durch derzeit noch unbekannte Ereignisse kann es zu einer Integration des HPV Genoms in die Wirtszell-DNA kommen, wobei das E2 Gen zerstört wird bzw. von der long control region separiert wird und somit nicht mehr exprimiert werden kann (Sathish et al. 2004). Als Folge des Verlusts der Negativkontrolle durch E2 können nun E6 und E7 überexprimiert werden (Ishiji 2000). Die Folgen einer Überexpression von E6 und E7 auf die Regulation der Apoptose und des Zellzyklus (Abbau von p53 und RB) sind bereits dargestellt worden (s.o.). Unterstützt wird die Bedeutung der Überexpression von E6 und E7 für die maligne Transformation durch experimentelle Untersuchungen an zervikalen Karzinomzelllinien. Dabei wurde in den Karzinomzelllinien die Expression von E6 und E7 experimentell herunterreguliert. Infolgedessen kam es zu einer reduzierten Proliferations-tendenz der malignen Zellen, was zeigt, daß E6 und E7 eine entscheidende Rolle bei der malignen Transformation infizierter Zellen spielen (Moon et al. 2001, Um et al. 2002). Die Integration der Virus-DNA in die Wirtszell-DNA und die aus ihr resultierende Überexpression der E6 und E7 Gene wurde zunächst an malignen Läsionen der Zervix uteri nachgewiesen. Weitere Untersuchungen zum physikalischen Status der HPV-DNA (episomal oder integriert) zeigten, daß das am Zervixkarzinom entwickelte Modell der HPV induzierten Karzinogenese auch für HPV16 positive Oropharynxkarzinome zu gelten scheint (Klussmann et al. 2004). Abschließend muß betont werden, daß allein die Infektion mit HPV nicht ausreichend für die Entstehung eines Tumors ist. Vielmehr müssen weitere bisher noch nicht vollständig verstandene exogene Co-Faktoren hinzukommen, die schließlich aus einer transformierten Zelle eine Tumorzelle werden lassen (z.B. Nikotinabusus beim Zervixkarzinom). Dies drückt sich auch in der sehr langen Zeit zwischen Infektion und Entstehung eines Tumors aus, die mehrere Dekaden betragen kann. Es bleibt also festzuhalten, daß eine Infektion mit „high risk“ HPV-Typen nicht zwingend zu einem Tumor führt, das Risiko dafür jedoch wesentlich erhöht (Hof et al. 2000).

2.3 Tetramer-Komplexe

Anders als die durch B-Lymphozyten vermittelte humorale Immunität ist die durch T-Lymphozyten vermittelte zelluläre Immunität wesentlich schwerer zu messen. Dies liegt zum einen daran, daß T-Lymphozyten anders als B-Lymphozyten keine löslichen Antigene erkennen können sondern nur zellgebundene Antigene, die in Form von 9-20 Aminosäure großen Peptiden mit Hilfe sogenannter MHC-I-Moleküle (major histocompatibility complexes) auf der Oberfläche Antigen-präsentierender Zellen exprimiert werden (Lanzavevecchia 1985). Erst durch die Bindung des intrazellulär fragmentierten Antigens an das MHC-I-Molekül kann der T-Zell-Rezeptor sein spezifisches Antigen erkennen. Der zweite wesentliche Punkt für die schwer meßbare Immunantwort der T-Lymphozyten ist die relativ geringe Bindungsaffinität des T-Zell-Rezeptors für sein spezifisches Antigen (Matsui et al. 1991), die um mehrere Größenordnungen geringer ausgeprägt ist als die der B-Lymphozyten (B-Lymphozyten erkennen ihr Antigen über einen an der Zelloberfläche exprimiertes Immunglobulin). Durch die Einführung sogenannter Tetramer-Komplexe - entwickelt an der Universität Stanford (USA) - ist nunmehr die Messung der T-Zell vermittelten Immunantwort wesentlich vereinfacht (Altman et al. 1996).

Tetramer-Komplexe bestehen aus mehreren Komponenten. Hauptbausteine sind insgesamt vier schwere HLA-Ketten (human leucocyte antigen) an die jeweils ein beta-2-Mikroglobulin-Molekül gebunden ist. Sowohl die schwere HLA-Kette als auch das beta-2-Mikroglobulin-Molekül werden rekombinant, meist aus E.coli Bakterien, gewonnen. Das rekombinant hergestellte HLA-Molekül ist gering modifiziert um eine über den CD8 Rezeptor vermittelte Bindung an T-Lymphozyten möglichst weitestgehend zu reduzieren (Bodinier et al. 2000, Meidenbauer et al. 2003). Das rekombinante HLA-Molekül besitzt weiterhin eine biotinylierbare Stelle als Substrat für das Enzym BirA von E.coli. Nachdem die rekombinanten Moleküle gereinigt worden sind, erfolgt die Zugabe eines bekannten Peptids, das an das HLA-Molekül bindet. Anschließend wird die enzymatische Biotinylierung eingeleitet und Streptavidin zugegeben. Das Streptavidin kann aufgrund seiner vier Biotin-Bindungsstellen insgesamt vier Monomere, bestehend aus einem HLA-Molekül, einem beta-2-Mikroglobulin-Molekül und dem bekannten Peptid, zu einem Tetramer-Komplex verbinden. Ein solcher Tetramer-Komplex ist in der Lage hochspezifisch an CD8⁺ T-Lymphozyten zu binden, deren T-Zell-Rezeptor das an die schwere HLA-Kette gebundene bekannte Peptid erkennt. Dabei wird die Bindungsaffinität des Tetramers durch Oligomerisierung der Monomere um mehrere Größenordnungen erhöht (Meidenbauer et al.

2003). Das Streptavidin-Molekül, das durch seine vier Biotin-Bindungsstellen die vier Monomere trägt, kann wiederum durch einen fluoreszierenden Farbstoff markiert werden, meist ist dies Phycoerythrin (PE) oder Allophycocyanin (APC). Die Kopplung eines fluoreszierenden Moleküls an den Tetramer-Komplex ermöglicht nunmehr die Analyse markierter T-Lymphozyten in der Durchflußzytometrie.

Die wesentliche Bedeutung der Tetramer-Komplexe liegt darin, daß sie sehr stark an CD8⁺ Zellen binden, die spezifisch für das verwendete Peptid sind, gleichzeitig durch Verwendung mutierter HLA-Ketten eine ausgeprägte unspezifische Bindung an die Gesamt-CD8-Population jedoch verhindert wird. Somit ermöglichen sie es auch extrem niedrige Frequenzen gesuchter Subpopulationen innerhalb der Gesamt-CD8-Population zu identifizieren (Bodinier et al. 2000, Ogg et al. 1998, Hoffmann et al. 2000, Meidenbauer et al. 2003).

Die nachstehenden Abbildungen zeigen im Modell den Aufbau eines Tetramer-Komplexes.

*Abbildung 3. Schematische Darstellung eines MHC Klasse I Tetramer-Komplexes: Das an Phycoerythrin gekoppelte Streptavidin trägt über seine Biotinbindungsstellen vier HLA-Ketten (hier HLA-A*0201). Durch Oligomerisierung der HLA-Ketten bindet das verwendete Peptid sehr spezifisch an den T-Zell Rezeptor (Quelle: PD Dr. T.K. Hoffmann, Universität Düsseldorf).*

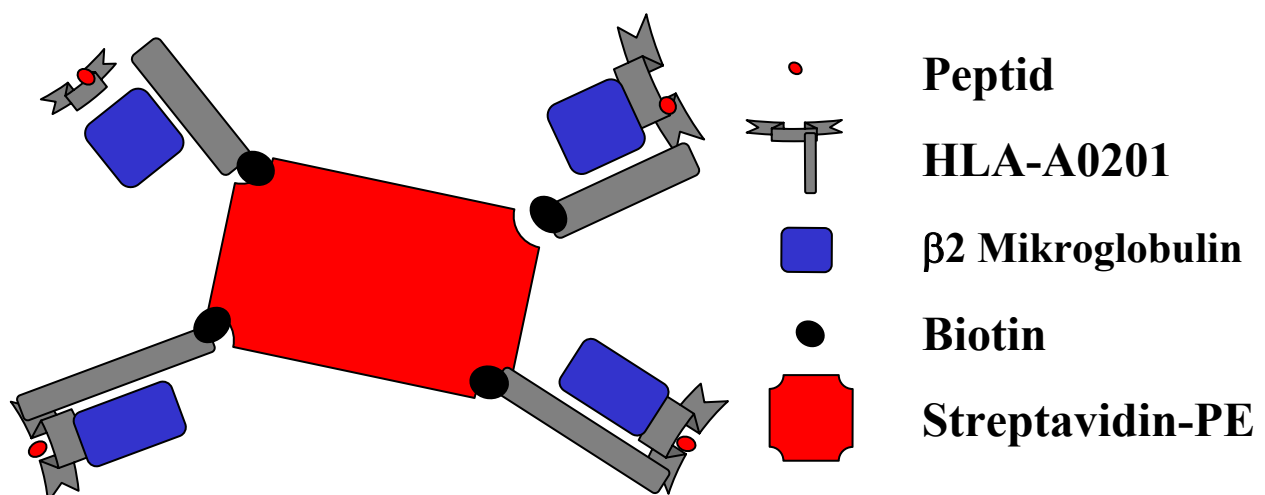


Abbildung 4. Dreidimensionale Darstellung eines MHC Klasse I Tetramer Komplexes
hellblau=Streptavidin, dunkelblau=schwere HLA-Kette, mittleres blau=beta-2-Mikroglobulin, rot=Peptid (Quelle: Dr. Chris O 'Callaghan).

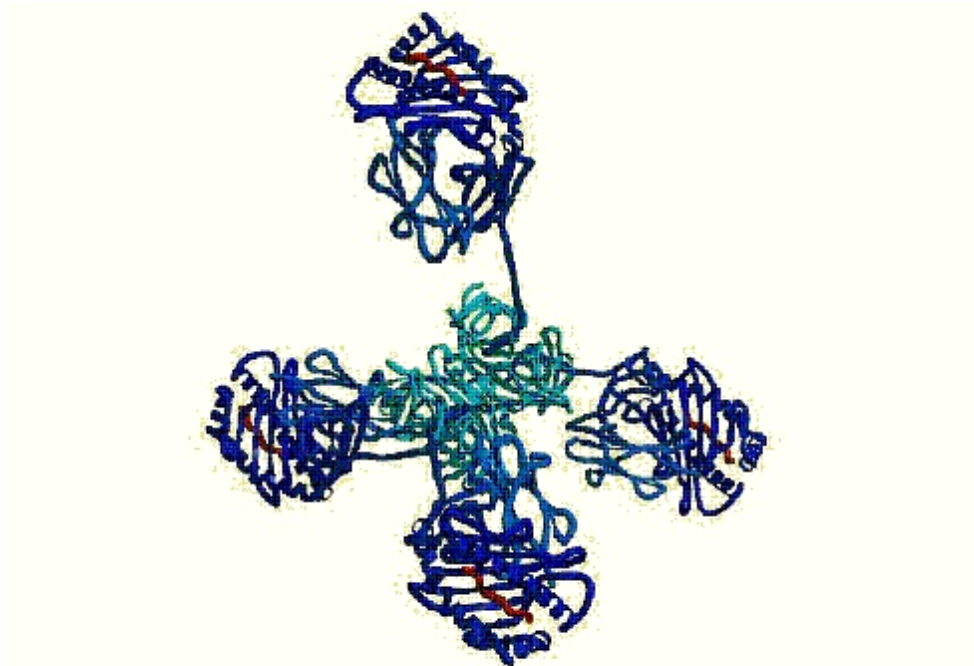
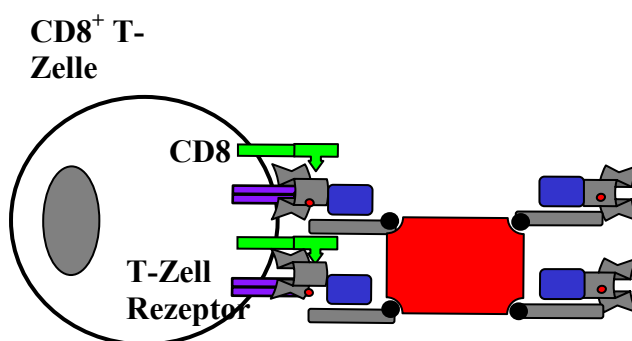


Abbildung 5. Schematische Darstellung der spezifischen Bindung eines MHC Klasse I Tetramer-Komplexes an den T-Zell-Rezeptor einer CD8⁺ Zelle (Quelle: PD Dr. T.K. Hoffmann, Universität Düsseldorf).



In der vorliegenden Arbeit wurden Tetramer-Komplexe verwendet, um Frequenzen HPV spezifischer T-Zellen bei Patienten mit oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen zu erfassen. Die benutzten Tetramer-Komplexe bestanden aus vier HLA-A*0201 MHC

Molekülen, da dieses HLA-Allel mit 40 bis 50 % von allen HLA Klasse I Allelen weltweit am häufigsten gefunden wird (<http://www.allelefreqencies.net>).

2.4 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DZ) bilden eine komplexe, heterogene Gruppe multifunktionaler Antigen präsentierender Zellen. Sie gehören zu den Leukozyten und finden sich sowohl in lymphatischen als auch nicht lymphatischen Geweben wie im peripheren Blut (Banchereau et al. 1998). Es konnte gezeigt werden, daß dendritische Zellen nach Aktivierung durch verschiedene Stimuli reifen und in einer hohen Konzentration verschiedene Moleküle wie MHC I und II sowie andere akzessorische Moleküle auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Dendritische Zellen nehmen Einfluß auf andere Immunzellen und zwar hauptsächlich in den sekundären lymphatischen Organen. So präsentieren sie naiven T-Zellen und T-Gedächtniszellen Nicht-Selbst-MHC-Komplexe um die durch diese Zellen vermittelte spezifische Immunität zu aktivieren (Steinmann 1991, Austyn 1987, Metlay et al. 1989). Andererseits spielen sie aber auch eine wichtige Rolle in der Induktion der T-Zell Toleranz, indem sie den Thymozyten des Thymus Selbst-Peptid-MHC Komplexe präsentieren (Fairchild et al. 1990). Ihre Fähigkeit eine primäre Immunantwort zu initiieren beruht auf der Ausschüttung kostimulatorischer Signale, die unverzichtbar sind für die Aktivierung von naiven in Effektor-T-Zellen. Sie können aber auch die Funktion regulatorischer T-Zellen, die aktivierte T-Zellen durch hemmende Signale kontrollieren, beeinflussen. Weiterhin spielen sie eine wichtige Rolle in der angeborenen (unspezifischen) Immunität, indem sie Zytokine wie IL-12 und Interferone sezernieren und Natürliche Killer (NK) Zellen aktivieren.

Dendritische Zellen entstammen den hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks. Die Vorläuferzellen wandern über den Blutstrom in periphere Gewebe, wo sie mit vielen Wachstumsfaktoren (sezerniert aus einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen wie Endothelzellen, Mastzellen, Keratinozyten) zusammentreffen. Die Wachstumsfaktoren (z.B. GM-CSF, IL-4, TNF- α u.a.) bewirken eine Differenzierung der Vorläuferzellen in die reifen Formen (Langerhans Zellen, interstitielle DZ, plasmazytoide DZ).

Eines der Kennzeichen dendritischer Vorläuferzellen ist ihre Fähigkeit zur Migration (Larsen et al. 1990). So konnte gezeigt werden, daß isolierte dendritische Zellen, die Tieren reinfundiert worden waren, innerhalb von 24 Stunden in die T-Zell reichen Areale der drainierenden Lymphknoten wandern (sogenanntes Homing) . Dort prüfen und selektieren sie die seltenen Antigen spezifischen T-Zellen aus dem rezirkulierenden Strom. Außerdem können dendritische Zellen eindringenden Pathogenen entgegentreten. Dabei nehmen sie Antigene über verschiedene Mechanismen wie z.B. Phagozytose (Austyn 1996) und rezeptorvermittelte Endozytose (Sallusto et al. 1995) auf. So sind dendritische Zellen in der Lage Antigene zu

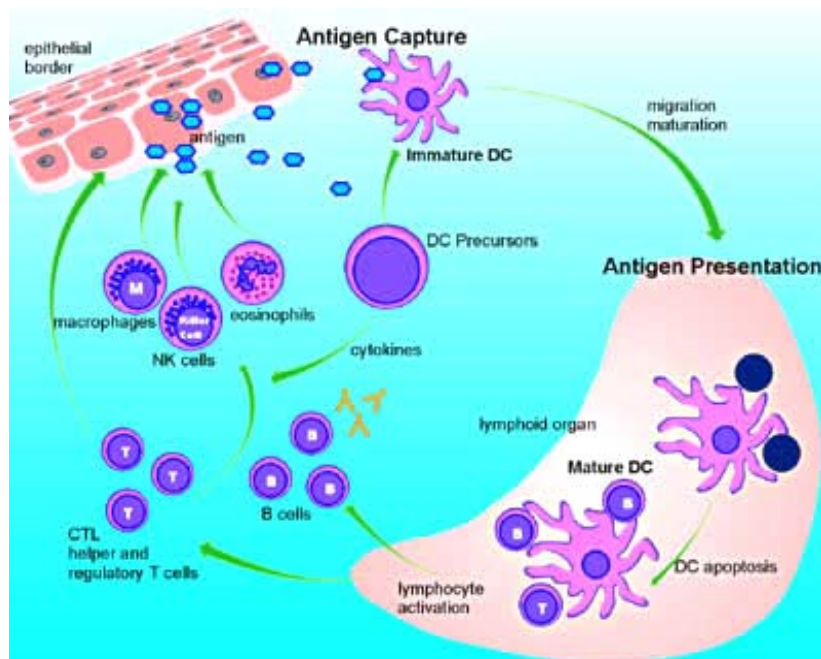
phagozytieren, zu prozessieren und anschließend immunogene Peptide den T-Zellen zu präsentieren (Banchereau et al. 1998, Sallusto et al. 1995, Mohmadzadeh et al. 1994). Antigene Agenzien induzieren eine Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (z.B. TNF- α), diese wiederum treiben die Reifung der dendritischen Zellen in den lymphatischen Organen, wo sie in die T-Zell reichen Areale wandern, voran. Während der Reifung und Migration unterlaufen die dendritischen Zellen phänotypischen und funktionellen Veränderungen. Die Zellen, die nun mit antigenen Peptiden auf MHC I bzw. MHC II Molekülen beladen sind, regulieren Marker wie z.B. CD1a, CCR6 und E-Cadherin herunter und verlieren somit während des Reifungsprozesses ihre Fähigkeit weitere Antigene aufzunehmen (Mohmadzadeh et al. 2001, Cella et al. 1997). Die gereiften dendritischen Zellen stellen eine Endstufe der Differenzierung dar und können sich weder in Makrophagen noch in Lymphozyten umwandeln. Sie können auch nicht proliferieren und nach einem gewissen Zeitraum unterliegen sie einer Apoptose und werden durch einen neuen Zellpool ersetzt (Banchereau et al. 1998).

Die dendritischen Zellen stellen eine sehr heterogene Gruppe sowohl unter phänotypischen als auch funktionellen Gesichtspunkten dar. Dennoch exprimieren sie weder die phänotypischen Marker der T-Lymphozyten (z.B. CD3, CD 16, CD28) noch die der B-Lymphozyten (Immunglobuline, CD20, CD19) oder die der Natürlichen Killerzellen (CD 56, CD57, CD16). In einigen Fällen exprimieren sie Marker auf ihrer Oberfläche, die auch auf dem anderen Typus Antigen präsentierender Zellen, den Makrophagen, exprimiert werden, so daß eine phänotypische Unterscheidung zwischen diesen beiden Zelltypen nicht immer eindeutig möglich ist.

Die Rolle der dendritischen Zellen bei Krebserkrankungen wird immer wieder hervorgehoben (Banchereau et al. 1998). Es ist mittlerweile bekannt, daß Krebszellen Tumor assoziierte Antigene (TAA) exprimieren können, die von T-Zellen erkannt werden. Diese T-Zellen sind aber in der Regel nicht in der Lage eine Tumorabwehr herbeizuführen - die Tumor assoziierten Antigene sind nicht ausreichend immunogen. Damit sie immunogen werden, müssen diese Moleküle durch professionelle Antigen präsentierende Zellen prozessiert und präsentiert werden. In Tierversuchen gibt es mittlerweile Hinweise dafür, daß dendritische Zellen eine Tumorimmunität induzieren können, wenn sie den Tumor assoziierten Antigenen ausgesetzt werden bevor der entsprechende Tumor in den Tieren inokuliert wird (Hsu et al. 1996, Nestle et al. 1998, Banchereau et al. 2001). Mehrere Studien zeigten, daß Tumor spezifische CD8⁺ zytotoxische T-Lymphozyten einen wichtigen Effektorarm der anti-Tumor Immunantwort darstellen (Knight et al. 1985, Greenberg 1991). In diesem Zusammenhang

waren dendritische Zellen, die mit Proteinen oder Peptiden beladen worden waren, in der Lage *in vitro* eine primäre Antwort zytotoxischer T-Lymphozyten zu etablieren (auszugsweise entnommen aus Mohmadzadeh et al. 2004).

Abbildung 6. Unreife dendritische Zellen nehmen exogene Antigene auf. Anschließend wandern sie in die regionären Lymphknoten. Während ihrer Migration machen sie einen Reifungsprozeß durch, bei dem sie die Fähigkeit zur Antigenaufnahme immer mehr verlieren und gleichzeitig durch vermehrte MHC Expression zu Antigen präsentierenden Zellen werden. In den T-Zell reichen Arealen der Lymphknoten präsentieren sie dann über MHC die in ihrem Inneren prozessierten Antigene. Über eine Aktivierung von T-Helferzellen können sie die Immunglobulin-Produktion der B-Lymphozyten induzieren, gleichzeitig sind sie aber auch potente Aktivatoren der zytotoxischen T-Lymphozyten (Quelle: SRI International).



Zytotoxische T-Lymphozyten erkennen und eliminieren Zellen, die von *endogenen* Antigenen abgeleitete Peptide in Verbindung mit MHC Klasse I Molekülen präsentieren, wohingegen T-Helferzellen aktiviert werden, wenn ihnen Peptide *extrazellulärer* Antigene durch MHC Klasse II Moleküle präsentiert werden (Germain 1986). Allerdings sind die eigentlichen Wege der Antigenprozessierung, die zu einer Präsentation der Peptide durch MHC Klasse I und MHC Klasse II Moleküle führen, nicht streng voneinander getrennt. So wurde in mehreren Studien berichtet, daß exogene Proteine ggf. auch den Klasse I Prozessierungsweg

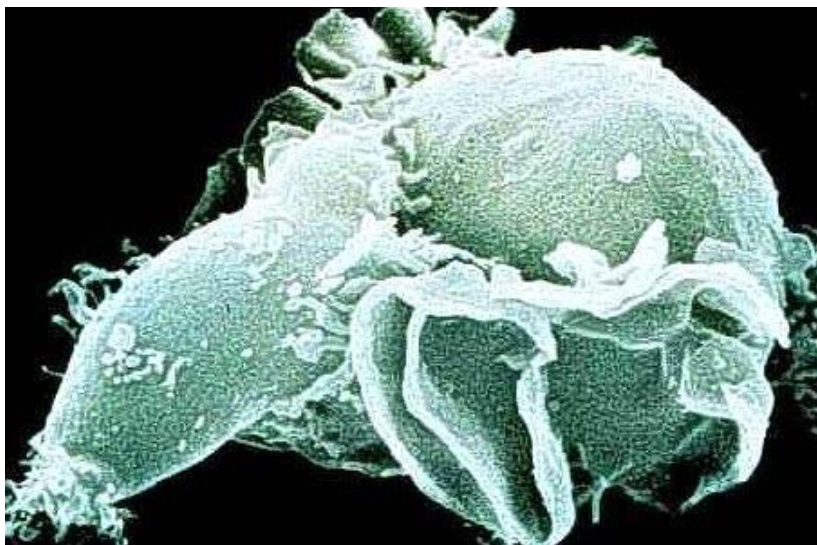
erreichen können (Rock et al. 1990, Reimann et al. 1994, Ulmer et al. 1994, Martinez-Kinader et al. 1995). Somit ist ein Priming zytotoxischer T-Lymphozyten auch durch *exogene* Proteine möglich (Schirmbeck et al. 1992, Raychaudhuri et al. 1992, Reddy et al. 1992, Schirmbeck et al. 1994, Bachmann et al. 1994, Bachmann et al. 1994, Hariharan et al. 1995, Ke et al. 1995, Schirmbeck et al. 1995, Jondal et al. 1996). Antigen präsentierende Zellen sind erforderlich für die MHC-restriktive Präsentation der Antigene an T-Zellen. Viele Zelltypen, die die dazugehörigen MHC Allele exprimieren, können als Antigen präsentierende Zellen dienen. Jedoch sind vor allem die dendritischen Zellen, die konstitutiv hohe Mengen an MHC Klasse I und II Molekülen sowie weiterer kostimulatorischer Moleküle exprimieren, sehr effektive Induktoren einer T-Zell Immunität (Steinman 1991). In mehreren Studien gelang es dann auch mit Hilfe Peptid beladener dendritischer Zellen primäre Immunantworten zytotoxischer T-Lymphozyten zu generieren (Inaba et al. 1987, Macatonia et al. 1989, De Bruijn et al. 1992). Dendritische Zellen haben sich somit als vielversprechende Werkzeuge zur Tumorzellvakzinierung herausgestellt, da Tumoren selber nur eine geringe Immunogenität aufweisen und nicht in der Lage sind naive T-Zellen direkt zu aktivieren, da sie keine kostimulatorischen Moleküle wie CD80 und CD86 - unerlässlich für eine T-Zell Aktivierung - auf ihrer Oberfläche exprimieren (Chen et al. 1992, Weaver et al. 1990). Daraufhin wurden verschiedene Vakzinierungsstrategien unter Zuhilfenahme dendritischer Zellen entwickelt:

- Beladen der dendritischen Zellen mit m-RNA oder DNA aus dem Tumor: Nach Aufnahme der m-RNA in die dendritische Zelle folgt eine Translation der m-RNA, das entstehende Protein wird prozessiert und auf der Zelloberfläche durch MHC Klasse I Moleküle präsentiert (Boczkowski et al. 1996).
- Beladen dendritischer Zellen mit Tumor-Proteinen (De Bruijn et al. 1998, Nonn et al. 2003).
- Beladen der dendritischen Zellen mit Tumor-assoziierten Peptiden (Ressing et al. 1996, Evans et al. 1997, Youde et al. 2000, Hoffmann et al. 2002).
- Fusion dendritischer Zellen mit Tumorzellen (Gong et al. 1997).
- Gentransfer in dendritische Zellen mittels Retroviren (Aicher et al. 1997), Adenoviren (Kaplan et al. 1997), Liposomen (Zheng et al. 1999) und Rezeptor-vermittelt (Diebold et al. 1999).

Die Vor- und Nachteile sowie Probleme, die bei den unterschiedlichen Ansätzen beschrieben worden sind (z.B. Entwicklung von Autoimmunitätsreaktionen beim Beladen dendritischer

Zellen mit Proteinen oder Epitopverluste auf der Tumoroberfläche durch Selektionsdruck bei der Verwendung von Peptiden) sollen an dieser Stelle nicht weiter erläutert werden.

Abbildung 7. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer dendritischen Zelle (Quelle: Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg).



Im Falle von HPV16 infizierten Oropharynxkarzinomen bietet sich für die Induktion einer zytotoxischen T-Zell-Antwort die Verwendung von Peptid oder Protein beladenen dendritischen Zellen an, da mit dem HPV16 E7 Protein, das in den Tumoren konstitutiv exprimiert wird, ein bereits bekanntes tumorspezifisches Antigen vorliegt und nicht erst noch identifiziert werden muß. Weiterhin sind bereits immunogene Epitope (Peptide) von HPV16 E7 in der Vergangenheit identifiziert worden (Ressing et al. 1995, Alexander et al. 1996). Darüberhinaus ist das HPV16 E7 Protein, wie bereits beschrieben, neben dem E6 Protein entscheidend für die maligne Transformation sowie für die Aufrechterhaltung der Proliferationstendenz der malignen Zellen. Hinzu kommt, daß das für eine therapeutische Vakzinierung in Betracht gezogene Onkoprotein E7 des „high risk“ Subtyps HPV16 in allen Phasen der Tumorprogression exprimiert wird. Entscheidend jedoch, warum das E7 Protein als attraktiver Kandidat für eine Beladung dendritischer Zellen in Frage kommt, ist die Tatsache, daß es als virales Protein ein Fremd-Antigen darstellt. Die bei anderen soliden Tumoren bisher identifizierten Tumor assoziierten Antigene sind nämlich im überwiegenden Teil der Fälle keine Fremd-Antigene sondern Autoantigene, also Antigene, denen gegenüber der Organismus in der Regel eine Immuntoleranz aufweist (z.B. p53, EGFR, CEA).

Drei von HPV16 E7 abgeleitete Peptide mit den Aminosäuresequenzen 11-20 (HPV16 E7₁₁₋₂₀; YMLDLQPETT), 82-90 (HPV16 E7₈₂₋₉₀; LLMGTLGIV) und 86-93 (HPV16 E7₈₆₋₉₃; TLGIVCPI) binden mit hoher Affinität an den in der kaukasischen Bevölkerung häufig vorkommenden MHC Klasse I Subtyp HLA-A2.1 (Kast et al. 1993, Kast et al. 1994). Diese HLA-A2.1 restringierten Epitope sind im Rahmen von Untersuchungen bei Patientinnen mit einem Zervixkarzinom als endogen prozessierte sowie präsentierte, immunogene und von zytotoxischen T-Lymphozyten erkannte Strukturen identifiziert worden (Ressing et al. 1995, Alexander et al. 1996). Diese Peptide werden bereits im Rahmen von klinischen Vakzinierungsstudien beim HPV assoziierten Zervixkarzinom eingesetzt (McNeil 1997, van Driel et al. 1999, Steller et al. 1998, Ressing et al. 2000).

Auf der anderen Seite muß bei Patienten mit Oropharynxkarzinomen, wie auch bei anderen soliden Tumoren, eine Immunkompromitierung berücksichtigt werden, die eine antitumorale T-Zell Antwort erschweren oder gar verhindern mag (Whiteside et al. 1999). Weiterhin könnte im Sinne eines „Immune-Escape“ die adäquate Präsentation von HPV assoziierten Proteinbestandteilen (Epitope, Peptide) durch die Tumorzellen nicht zustande kommen (Marincola et al. 2000, Hoffmann et al. 2000).

3. Fragestellung und Zielsetzung

Trotz nicht zu unterschätzender Fortschritte in der Radio- und Chemotherapie wie auch bei der Rekonstruktion nach Resektion fortgeschrittener Plattenepithelkarzinome des Oropharynx ist die Prognose dieser Tumoren bei den derzeit vorhandenen Behandlungsstrategien immer noch äußerst unbefriedigend. So beträgt nach den Daten der deutschen Krebsregister für alle Kopf-Hals-Karzinome die Letalität, d.h. der Schätzwert für die krebsbedingte Sterblichkeit als Quotient aus den jährlichen Sterbezahlen und den Neuerkrankungen bei den Männern 52,3 % und bei den Frauen 41,7 % (Schlesinger-Raab et al. 2003). Gleichzeitig ist seit dem Jahr 1968 bei den Tumoren der Mundhöhle und des Rachens eine Verdreifachung der altersstandardisierten Mortalität zu beobachten, im Vergleich dazu ist die Mortalität des Bronchialkarzinoms im selben Zeitraum nur um 12 % gestiegen (Schlesinger-Raab et al. 2003).

Die Tatsache, daß bei Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx in 50-60 % eine HPV Infektion nachweisbar ist, worunter der „high risk“ Subtyp HPV16 mit etwa 90 % vertreten ist, lassen die Entwicklung immuntherapeutischer Behandlungsstrategien auf Basis einer HPV Vakzinierung attraktiv erscheinen, da die HPV16 Infektion sehr wahrscheinlich über die onkogenen Proteine E6 und E7 an der Karzinomenstehung ursächlich beteiligt ist und diese beiden viralen Onkoproteine anders als viele bekannte Tumorantigene keine Autoantigene darstellen sondern Fremd-Antigene. Hinzu kommt, daß entsprechende Strategien bei der Behandlung des Zervixkarzinoms erste vielversprechende Erfolge zeigten.

Hieraus ergaben sich für die vorliegende Arbeit folgende Fragestellungen:

1. Warum werden HPV-infizierte Plattenepithelkarzinome des Oropharynx nicht durch das Immunsystem eliminiert?
2. Finden sich bei Patienten mit Oropharynxkarzinomen als Ausdruck einer stattgefundenen T-Zell-Tumor-Interaktion erhöhte Frequenzen von HPV-spezifischen T Zellen?

Zur Beantwortung dieser Frage wurden in dieser Arbeit aus dem peripheren Blut von 20 HLA-A2.1⁺ Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx mononukleäre Zellen isoliert und anschließend mit Hilfe der Tetramer-Technologie und der Durchflußzytometrie die Frequenzen HPV16 E7 spezifischer T Zellen bestimmt. Als Epitope wurden dazu drei Peptide des HPV16 E7 Onkoproteins gewählt (HPV16 E7₁₁₋₂₀, HPV16 E7₈₂₋₉₀ und HPV16 E7₈₆₋₉₃), von denen bekannt war, daß sie geeignete Epitope für eine CTL Erkennung darstellen und an das unter der kaukasischen

Bevölkerung häufig vertretene HLA-A2.1 Molekül binden. Zunächst sollten die von den Patienten erhaltenen Frequenzen spezifischer T-Zellen mit denen von Nichttumorkranken (20 HLA-A2.1⁺ Normalkontrollen) verglichen werden.

3. Korreliert die Frequenz von HPV-spezifischen T-Zellen mit dem HPV Status des jeweiligen Tumors und wie unterscheiden sich die Frequenzen dieser Zellen im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen?

Von allen Tumorpatienten standen entsprechende Operationspräparate zur Verfügung. Zur Bestimmung des HPV Status der Tumoren wurden immunhistochemische Färbungen mit einem monoklonalen Antikörper gegen das HPV16 E7 Onkoprotein sowie mit einem monoklonalen Antikörper gegen das p16 Tumorsuppressor-Gen, das bei HPV 16 infizierten Tumorzellen überexprimiert wird und dessen Überexpression von Klusmann und Kollegen als Surrogatparameter für eine HPV 16 Infektion vorgeschlagen worden ist (Klusmann et al. 2003), durchgeführt. Die Frequenzen HPV16 E7 spezifischer Zellen bei den Patienten mit HPV16⁺ Tumoren wurden anschließend mit denen der Normalkontrollen und denen der Patienten mit HPV16⁻ Tumoren verglichen. Schließlich wurde die p16 Expression mit dem HPV16 E7 Status der Tumoren verglichen.

4. Korreliert die Frequenz von HPV-spezifischen T-Zellen bzw. der HPV Status der Tumoren mit dem Tumorstadium?

Diese Fragestellung erschien interessant, da in der Literatur beschrieben ist, daß eine HPV16 Infektion bei Oropharynx Tumoren mit einem fortgeschrittenen TNM-Stadium assoziiert ist bei gleichzeitig verbesserter Prognose im Vergleich zu Patienten mit positiver Alkohol- und Tabakanamnese.

5. Läßt sich die im Peripheralblut gefundene HPV-spezifische Immunantwort auf ein in vitro System übertragen und läßt sie sich expandieren?

Dazu wurde bei den Patienten, bei denen im peripheren Blut peptidspezifische Vorläufer T-Zellen gefunden worden waren, Stimulationsexperimente mit peptidbeladenen dendritischen Zellen durchgeführt. Die Reaktivität der durch in vitro Stimulation gewonnenen Effektor T-Zellen wurde mittels γ -IFN ELISPOT getestet. Als Zielzellen fungierten in den ELISPOT Versuchen die Zelllinie K562, die mit den jeweils drei untersuchten HPV16 E7 Epitopen beladen worden war sowie die zervikale Karzinomzelllinie CaSki, die nicht nur einzelne Epitope sondern das komplette E7 Onkoprotein des HPV Subtyps 16 exprimiert.

4. Material und Methoden

4.1 Mononukleäre Zellen des peripheren Bluts

Blutproben konnten von 20 HLA-A2.1⁺ Patienten mit einer bösartigen Tumorerkrankung des Oropharynx und von 20 HLA-A2.1⁺ Normalkontrollen gewonnen werden. Die Blutproben der Tumorpatienten – allesamt Patienten der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Heinrich-Heine-Universität-Düsseldorf (Direktor Univ.-Prof. Dr. med. J. Schipper) wurden unmittelbar präoperativ oder im Rahmen der postoperativen Tumornachsorgeuntersuchungen entnommen. Alle Tumorpatienten waren bei Vorliegen eines positiven Votums der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf über Sinn und Zweck der Blutentnahme informiert und aufgeklärt und gaben ihr Einverständnis zur Blutentnahme sowie zu den weiteren Untersuchungen. Jedem Tumorpatienten wurden ca. 30 ml Vollblut entnommen, das in Heparinröhrchen aufgefangen wurde. Die Blutproben der Normalkontrollen waren freundlicherweise von der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Direktor Univ.-Prof. Dr. med. B.-E. Strauer) zur Verfügung gestellt worden. Bei den Normalkontrollen handelte es sich um Patienten, die sich aufgrund einer koronaren Herzkrankheit (KHK) in stationärer Behandlung befanden. Ausschlusskriterien für die Blutentnahme bei den Normalkontrollen waren das Vorliegen einer Neoplasie sowie einer immunologischen Erkrankung. Das Durchschnittsalter der Tumorpatienten (Männer n=16, Frauen n=4) betrug 49,4 Jahre, das der Normalkontrollen (Männer n=14, Frauen n=6) 50,2 Jahre.

Unmittelbar nach der Blutentnahme schloß sich die Separation mononukleärer Zellen (T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Monozyten etc.) aus dem Vollblut der Tumorpatienten und der Normalkontrollen mit Hilfe des Leucosep®-Systems (Firma Greiner Bio-One GmbH D-72636 Frickenhausen) an. Leucosep® besteht aus 3 Komponenten: Röhrchen, Filterscheibe und Trennlösung. Unterhalb der Filterscheibe in dem Röhrchen befindet sich die Trennlösung. Die Blutprobe wird zugegeben und das Teströhrchen anschließend zentrifugiert. Dabei werden die Erythrozyten unterhalb der Filterscheibe angesammelt, während sich oberhalb der Filterscheibe ein deutlich abgrenzbarer Ring aus mononukleären Zellen bildet.

Die Separation mononukleärer Zellen mit Leucosep® erfolgt in folgenden Einzelschritten:

1. Die Trennlösung (Lymphoprep® Firma Nycomed Pharma, München) wird mittels Wasserbad auf Zimmertemperatur erwärmt.
2. 3 ml der Trennlösung werden zum Teströhrchen gegeben.
3. Das Teströhrchen wird für 60 Sekunden bei 1000g und Raumtemperatur zentrifugiert. Die Trennlösung befindet sich danach unterhalb der Filterscheibe.
4. 6 ml des mit Heparin versehenen Vollblutes der Tumorpatienten bzw. der Normalkontrollen werden zugegeben.
5. Das Teströhrchen wird für 10 Minuten bei 1400 U/min und Raumtemperatur zentrifugiert.
6. Nach dem Zentrifugieren ergibt sich von oben nach unten folgende Schichtung: Plasma – mononukleäre Zellen – Trennlösung – Filterscheibe – Trennlösung – Erythrozyten. Das Plasma wird abpipetiert und verworfen.
7. Die mononukleären Zellen können mit einer Pasteurpipette aus dem Teströhrchen transferiert werden.
8. Die mononukleären Zellen werden mit 10 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) resuspendiert und für 10 Minuten bei 1400 U/min und Raumtemperatur zentrifugiert.
9. Der Schritt 8 wird zweimal wiederholt, dabei wird das Zellpellet mit den mononukleären Zellen mit jeweils nur 5 ml phosphatgepufferter Salzlösung resuspendiert.

Nach Gewinnung der mononukleären Zellen wurden diese mit dem monoklonalen anti-HLA-A2 Antikörper BB7.2 (ATCC, Manassas, USA) sowie mit einem IgG Isotypen-Antikörper als Kontrollantikörper gefärbt. In einer anschließend durchgeführten durchflußzytometrischen Messung konnten die gefärbten mononukleären Zellen bezüglich einer Expression von HLA-A2 Molekülen phänotypisiert werden. Nach Identifizierung der HLA-A2 positiven Patienten und Normalkontrollen war die Bestätigung des HLA-A2 Status zusätzlich durch eine Färbung mit dem Influenza Tetramer, das HLA-A2.1 restringent bindet, möglich (Tetramer-Färbung s.u.).

4.2 Tetramer Peptid-MHC Klasse I Komplexe (Tetramere)

Die verwendeten Tetramere stammten alle von der Firma Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland. Die Tetramere enthielten die folgenden HLA-A2.1 bindenden Peptide: GILGFVFTL, ein Influenza-Virus Matrix dominantes Peptid (FLU₅₈₋₆₆); ILKEPVHGV, das HIV-1 Reverse Transkriptase Peptid (pol₄₇₄₋₄₈₄); YMLDLQPETT entsprechend dem HPV16 E7₁₁₋₂₀; LLMGTLGIV entsprechend dem HPV16 E7₈₂₋₉₀; TLGIVCPI entsprechend dem HPV16 E7₈₆₋₉₃.

Um eine Hintergrundfärbung weitestgehend zu reduzieren, mußte jedes Tetramer in der niedrigsten Konzentration titriert werden, die bei einem gegen Influenza geimpften Donor (für das FLU₅₈₋₆₆ Tetramer) bzw. bei einer HPV16 E7₁₁₋₂₀ spezifischen T-Zell Linie (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Stephen Man, Universität von Wales, College of Medicine, Cardiff, U.K.; Youde et al. 2000) gerade noch eine klar erkennbare positive Population ergab.

4.2.1 Tetramer Färbung und durchflußzytometrische Analyse

Unmittelbar vor der Färbung war ein zweimaliger Waschvorgang der mononukleären Zellen mit einem Medium, bestehend aus PBS mit 0,1% (w/v) bovinen Serum Albumin (BSA) und 0,1% (w/v) Natrium-Azid vorausgegangen. Die Zellen wurden nach den Waschvorgängen in dem oben genannten Medium bei einer Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml in einem Volumen von 150 µl resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit 5 µl einer 1:10 Verdünnung der Tetramer Stammlösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, gefolgt von einer 30 minütigen Inkubation bei 4 °C mit jeweils 7,5 µl der Antikörper gegen CD3, CD8 und CD14 (CD3-FITC, CD8-APC, CD14-PerCP, alle Becton Dickinson PharMingen, Heidelberg, Deutschland). Nach zwei weiteren Waschvorgängen erfolgte die Resuspension der Zellen in 1 ml einer PBS Lösung mit 0,5%igem methanolfreien Formaldehyd. Die Kontrollfärbung mit Isotypen-Antikörpern gestaltete sich analog zu der beschriebenen. Unmittelbar nach Abschluß des Färbeprozesses konnten die Zellen einer durchflußzytometrischen Messung mit dem Vier-Farben FACS Calibur Cytometer (Becton Dickinson) unterzogen werden. Dabei war für jede Probe die Messung von mindestens 1×10^6 Ereignissen erforderlich. Unter Verwendung der Beckman-Coulter System II Software konnten die durchflußzytometrischen Daten in Echtzeit analysiert werden. In den anfänglichen Experimenten wurde die Region, die die Tetramer positiven Ereignisse definiert durch Messung mononukleärer Zellen, die mit Antikörpern (CD3, CD8, CD14) nicht jedoch mit Tetrameren angefärbt worden waren, bestimmt. Diese

Region wurde in der Analyse durchwegs konstant gehalten. Die Speicherung der Daten für weitere Analysen erfolgte mit dem System II bzw. WinMDI Programm (Version 2.8, Joseph Trotter, Scripps Inst., LaJolla, USA).

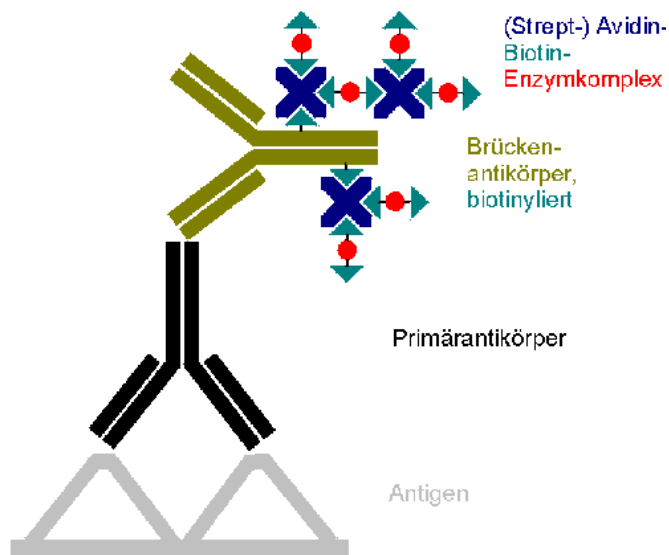
4.3 HPV16 E7 Immunhistochemie

Von allen 20 HLA-A2.1⁺ Patienten standen entsprechende Tumorproben zur Verfügung. Die Tumorproben wurden als Paraffin-Blöcke freundlicherweise vom Institut für Pathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Direktor Univ.-Prof. Dr. med. H.-E. Gabbert) zur Verfügung gestellt. Die Histologie jedes Operationspräparates der Tumorpatienten war vorher von einem Pathologen überprüft worden. Anschließend wurden aus dem Operationspräparat Gewebsabschnitte, die repräsentative Ausschnitte des invasiven oropharyngealen Plattenepithelkarzinoms enthielten, für die weitergehende Immunhistochemie ausgewählt. Als interne Nicht-Tumorkontrolle diente aus demselben Operationspräparat histologisch normal erscheinendes Speicheldrüsengewebe bzw. histologisch normal erscheinende quergestreifte Skelettmuskulatur.

Für die anschließende immunhistochemische Färbung wurden die formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Tumorgewebsproben in 5 µm dicke Scheiben geschnitten, auf einen Adhäsionsobjektträger (Histo Bond® Superior, Marienfeld) überführt und über Nacht bei einer Temperatur von 37 °C im Wärmeschrank luftgetrocknet. Im Anschluß an die Lufttrocknung erfolgten eine Entparaffinisierung und Rehydrierung der Präparate durch eine absteigende Alkoholreihe: zunächst wurden die Objektträger für 2 mal 10 Minuten in eine mit Xylol gefüllte Glasküvette eingetaucht, danach für 2 mal 5 Minuten in absoluten Alkohol, für 5 Minuten in 96 %igen Alkohol, und zuletzt für 5 Minuten in 70 %igen Alkohol. Bevor dann die eigentliche immunhistochemische Färbung durchgeführt werden konnte, waren noch zwei weitere Schritte erforderlich. Zunächst wurde an den histologischen Präparaten eine sogenannte Antigendemaskierung bzw. ein Antigen „Retrieval“ durchgeführt. Hierunter versteht man den Prozeß der Wiederherstellung der Antigenität (Immunreaktivität) eines Immunogens. Die Immunreaktivität mancher Antigene geht unter Einwirkung bestimmter Fixative teilweise oder ganz verloren; man spricht auch von Antigen- bzw. Epitop-„Maskierung“. Mit den Methoden der Antigendemaskierung – hauptsächlich Hitze oder Proteolyse – kann man einige fixierungsbedingte strukturelle Änderungen der Antigene (Proteine) wieder rückgängig machen (Handbuch Immunhistochemische Färbemethoden DakoCytomation 3. Auflage S. 80). Die Antigendemaskierung erfolgte mit Hilfe der Epitope Retrieval Solution (Firma Dako, Glastrop, Dänemark). Dazu wurden die Präparate in eine 1:10 Verdünnung der Epitope Retrieval Lösung gegeben, für 2 mal 10 Minuten in einer Mikrowelle bei 800 Watt erwärmt und anschließend in der Lösung langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Um Hintergrundfärbungen zu vermeiden und somit eine eindeutige Interpretation der Ergebnisse zu ermöglichen, war vor Durchführung der

immunhistochemischen Färbung eine Inaktivierung der endogenen Peroxidaseaktivität erforderlich. Die Peroxidaseaktivität bewirkt die Freisetzung molekularen Sauerstoffs (O_2) aus Peroxiden (also auch die Aufspaltung von Wasserstoffperoxid: H_2O_2) und ist eine gemeinsame Eigenschaft aller Hämoproteine, wie z.B. Hämoglobin (Erythrozyten), Myoglobin (Muskelzellen) und Cytochrom (Granulozyten, Monozyten). Interstitielle Peroxidaseaktivität kann verursacht werden durch die Diffusion von Blut vor der Fixierung (Handbuch Immunhistochemische Färbemethoden DakoCytomation 3. Auflage S. 48). Die Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität erfolgte durch 20 minütiges Eintauchen der Präparate in einer Lösung bestehend aus 245 ml Methanol und 5 ml H_2O_2 . Nach Inaktivierung der in den Gewebsschnitten vorhandenen endogenen Peroxidase schloß sich die Färbung der Präparate mit einem monoklonalen IgG₁ Maus-Antikörper gegen HPV16 E7 (Clone 8C9, Zymed Lab., WAK-Chemie, Bad Soden, Deutschland) an. In Western Blot Untersuchungen gegen ein von Bakterien abgeleitetes HPV16 E7 Fusionsprotein konnte gezeigt werden, daß dieser Antikörper eine 52 kD Bande detektiert, die sich aus dem HPV16 E7 protein (M_r 15 kD) und dem trpE Protein (M_r 37 kD) zusammensetzt (Fierz et al. 1987). Eine positive Reaktivität des Antikörpers gegenüber dem 15 kD schweren HPV16 E7 Protein konnte mittels Western Blot an der CaSki Zelllinie (Zelllinie, die HPV16 DNA enthält) gezeigt werden. Um das HPV16 E7 Antigen sichtbar zu machen, fand die sogenannte (Strept)Avidin-Biotin-Peroxidase Methode (ABC-Methode) Verwendung. Die Avidin-Biotin-Methode gehört zu den sensitivsten Methoden der Immunhistochemie (Hsu et al. 1981) und stellt ein indirektes Verfahren zum Nachweis eines Antigens dar. Das Verfahren beruht auf der hohen Affinität von Streptavidin (*Streptomyces avidinii*) und Avidin (Hühnereiweiß) für Biotin, die beide 4 Bindungsstellen für Biotin besitzen. Das Prinzip der ABC Methode ((Strept)Avidin-Biotin-Enzymkomplex) soll im Folgenden kurz erläutert werden: Zuerst reagiert ein unkonjugierter Primärantikörper mit dem gesuchten Antigen, danach wird ein sekundärer Antikörper hinzugegeben, an den Biotin kovalent gebunden ist (biotinylierter Antikörper). Dieser sekundäre Antikörper wiederum bindet an den Fc Teil des Primärantikörpers. Anschließend wird bei der ABC-Methode ein (Strept)Avidin-Biotin-Enzymkomplex zugefügt, der mit dem biotinylierten Sekundärantikörper reagiert. Als Enzym werden üblicherweise Meerrettichperoxidase (HRP) oder alkalische Phosphatase (AP) verwandt. Abgeschlossen wird der Vorgang dann mit der Zugabe einer Substrat-Chromogen-Lösung, die das Substrat des gewählten Enzyms enthält (Quelle: Handbuch Immunhistochemische Färbemethoden DakoCytomation 3. Auflage S.36 f.).

Abbildung 8. Bei der ABC-Methode reagiert der Avidin- (oder Streptavidin-) Biotin-Enzymkomplex mit dem biotinylierten Sekundärantikörper. Das Tertiärreagenz wird bei der ABC-Methode durch Mischen zweier Komponenten, a) (Strept)Avidin und b) biotinmarkiertes Enzym, und Bildung eines Komplexes (AB-Complex) hergestellt. (Quelle: <http://www.pathologie-online.de/meth/immunhisto.php> Pathologie-Online Methoden: Immunhistologie).



(Strept-) Avidin-Biotin-Complex

ABC-Methode

Die HPV16 E7 Färbung wurde in der vorliegenden Arbeit als Liegendfärbung in einer feuchten Kammer durchgeführt, für die ABC-Reaktion fand das Vectastain-Elite-ABC-Kit (Vector Laboratories, Burlingame, USA) Verwendung. Alle folgenden Inkubationsschritte fanden bei Raumtemperatur statt. Zunächst wurde das Gewebe mit Pferdenormalserum (0,5 ml einer Lösung aus 10 ml PBS und 150 µl Pferdenormalserum) für 30 Minuten inkubiert, nach der Inkubationszeit wurde das Pferdenormalserum abgekippt und überschüssiges Reagenz um den Gewebeschnitt herum vorsichtig abgetupft. Danach schloß sich ein Spülvorgang mit Waschpuffer (PBS) für 2 mal 1 Minute an. Dieser Waschvorgang fand analog nach jedem der folgenden Färbeschritte statt. Im nächsten Schritt wurde das Gewebe mit 0,5 ml einer 1:2 Verdünnung der Lösung des primären HPV16 E7 Antikörpers (Clone 8C9, Zymed Lab., WAK-Chemie) für 60 Minuten inkubiert. Analog zum ersten Schritt wurde

nach 60 Minuten der Antikörper abgekippt und das überschüssige Reagenz vorsichtig abgetupft. Daran anschließend erfolgte die 30 minütige Inkubation mit dem biotinylierten Antikörper (0,5 ml einer Lösung aus 10 ml PBS und 50 µl des biotinylierten Anti IgG Antikörpers (Bestandteil des Vectastain Kits)). Als nächster Schritt war dann die Zugabe von 0,5 ml des AB-Komplexes (10 ml PBS + jeweils 100 µl aus dem Röhrchen A bzw. aus dem Röhrchen B des Vectastain Kits, angesetzt 30 Minuten vor Verwendung) erforderlich, woran sich eine 30 minütige Inkubation anschloß. Im letzten Färbeschritt wurde dann das Gewebe für 20 Minuten mit der Substrat-Chromogenlösung (0,5 ml einer Lösung aus 10 ml Aqua + 1 Tablette DAB (3,3'-Diaminobenzidin) + 10 µl 30 %iges H₂O₂) inkubiert. Zum Abschluß wurde das Gewebe für 20 Sekunden in Mayer's Hämalaun gegengefärbt und dann 15 Minuten lang gewässert. Nach der immunhistochemischen Färbung wurden die Präparate noch mit jeweils einem Tropfen des Crystal/Mount Eindeckmittels (Biomedica Corp., Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching) überschichtet und über Nacht bei 37 °C im Wärmeschränk getrocknet.

Als Negativ-Kontrolle diente eine Färbung mit einem monoklonalen IgG Isotypen Antikörper (Universal Negative Control +, Dako Cytomation), als Positiv-Kontrolle wurde die HPV16 E7 Färbung an einem Monolayer mit der CaSki-Zelllinie (zervikale Karzinomzelllinie, die HPV16 E7 positiv ist) durchgeführt, die Färbungen gestalteten sich analog zu der oben beschriebenen.

Die Gewebsschnitte konnten nach ihrer immunhistochemischen Anfärbung einer lichtmikroskopischen Untersuchung zwecks Erfassung der HPV16 E7 Expression im Tumorgewebe unterzogen werden. Das Tumorgewebe wurde als HPV16 E7 positiv erachtet, wenn mehr als 25 % der Tumorzellen auf einer Skala von 0 bis 4+ eine Färbeintensität von 2+ und höher zeigten.

4.4 p16 Immunhistochemie

Die Durchführung der immunhistochemischen p16 Färbung an den Tumorproben der 20 HLA-A2.1⁺ Patienten gestaltete sich prinzipiell wie die der HPV16 E7 Färbung. Die Herstellung der Gewebsschnitte sowie deren Entparaffinisierung und Rehydrierung folgte dem bereits beschriebenen Protokoll (s.o.). Anders als bei der HPV16 E7 Färbung wurde bei dieser Färbung die Antigendemaskierung (Antigen Retrieval) mit der Epitope Retrieval Solution (Firma Dako) nicht in der Mikrowelle sondern im Wasserbad durchgeführt. Dazu war die Epitope Retrieval Lösung für 1 Stunde im Wasserbad auf 95 °C erwärmt worden. Daran schloß sich eine Inkubation der Gewebsschnitte mit der Lösung für 40 Minuten an. Nach der Inkubation wurden die Gewebsschnitte auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität gestaltete sich ebenfalls wie bei der HPV16 E7 Färbung. Bei der p16 Färbung fand das p16^{INK4a} Research Kit (Dako) Verwendung. Dieses Kit enthält einen monoklonalen Maus-Antikörper (Klon E6H4) gegen das humane p16^{INK4a} Protein sowie ein „Visualization Reagent“, welche die immunhistochemische Färbung vereinfacht in zwei Hauptschritten ermöglichen. Die p16 Färbung wurde ebenfalls als Liegendfärbung in einer feuchten Kammer durchgeführt. Zunächst wurden die mit Parafilm abgedeckten Adhäsionsobjektträger mit 200 µl einer 1:25 Verdünnung des primären Antikörpers inkubiert. Nach 30 Minuten erfolgte ein Waschvorgang (1 Minute mit Aqua, 1 Minute mit Waschpuffer, im Kit enthalten, anschließend noch einmal 5 Minuten mit Waschpuffer). Nach der Färbung mit dem Primärantikörper folgte eine 30 minütige Inkubation mit dem im Kit enthaltenen „Visualization Reagent“. Dieses Reagenz basiert auf der Dextrantechnologie. Es enthält an einen gemeinsamen Dextranpolymer-Backbone gekoppelte sekundäre Ziege-Anti-Maus-Immunglobulin- und Meerrettichperoxidase-Moleküle, wodurch die Notwendigkeit der sequentiellen Anwendung von Link-Antikörper und peroxidasekonjugiertem Antikörper (s. ABC Methode bei der HPV16 E7 Färbung) entfällt. Die Möglichkeit einer Kreuzreaktivität des Visualisierungsreagenz mit humanen Immunglobulinen und fetalem Kälberserum wurde durch Festphasen-Absorption ausgeschlossen. Die enzymatische Umwandlung des anschließend zugesetzten Chromogens führt zur Bildung eines sichtbaren Reaktionsproduktes an der Antigen determinante (entnommen aus CINtecTM p16^{INK4a} Histology Kit for the DakoCytomation Autostainer Code No. K5336, 1st edition).

Nach der 30 minütigen Inkubation mit dem „Visualization Reagent“ erfolgten noch die Zugabe der Substrat-Chromogen-Lösung (4ml Substratpuffer + 4 Tropfen DAB Chromogen, beides im Vectastain Kit enthalten) und anschließend die Gegenfärbung mit Mayer's

Hämalaun Lösung (20 Minuten). Analog zur HPV16 E7 Färbung wurden die Gewebeproben abschließend mit einem Abdeckmittel (Crystal/Mount Biomedica Corp., Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching) überschichtet und im Wärmeschrank bei 37 °C über Nacht getrocknet.

Als Negativ-Kontrolle diente eine Färbung mit einem monoklonalen IgG Isotypen Antikörper (Universal Negative Control+, Dako Cytomation), als Positiv-Kontrolle wurde die p16 Färbung an einem Monolayer mit der CaSki-Zelllinie (zervikale Karzinomzelllinie, die das p16 Protein überexprimiert) durchgeführt, die Färbungen erfolgten analog zu der oben dargestellten.

Nach der immunhistochemischen Färbung konnten die Präparate lichtmikroskopisch untersucht werden. Dabei folgten das Scoring und Grading der Färbung der Einteilung nach Klaes und Kollegen (Klaes et al. 2001). Die Tumoren wurden als p16 positiv gewertet, wenn mehr als 25 % der Zellen eine diffuse Färbung (sowohl nukleär als auch zytoplasmatisch) zeigten.

4.5 Expansion anti-HPV16 E7 spezifischer T-Zellen mittels Peptid beladener dendritischer Zellen

Humane dendritische Zellen konnten in Anlehnung an eine modifizierte Methode nach Sallustro und Lanzavecchia gewonnen werden (Sallustro et al. 1994). Die aus dem Blut der Patienten separierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes wurden für zwei Stunden bei einer Temperatur von 37 °C in AIM-V Medium (Life Technologies, Grand Island, USA) inkubiert, anschließend folgte die Entfernung der nichtadhärenten Zellen durch vorsichtiges Waschen mit warmem Medium. Die verbleibenden adhären Zellen wurden in AIM-V Medium zusammen mit 1000 U/ml GM-CSF (Immunex, Seattle, USA) und 1000 U/ml IL-4 (Schering Plough, Kenilworth, USA) inkubiert. Unreife dendritische Zellen konnten an Tag 6 mit kalter Hank's Lösung (Life Technologies) geerntet werden und fanden als Antigen präsentierende Zellen Verwendung. Die dendritischen Zellen wurden dann bei einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml in einer PBS-Lösung, die 10 µg/ml des entsprechenden Peptids enthielt, für 45 Minuten bei einer Temperatur von 37 °C resuspendiert. Danach wurden die Peptid beladenen dendritischen Zellen zusammen mit mononukleären Zellen des Patienten in 24-well Gewebekulturplatten (Costar, Corning, USA) in einer Lösung, bestehend aus 2 ml/well X-Vivo Medium (Cambrex, Apen, Deutschland) und 25 ng/ml IL-7 (BD Biosciences) für 72 Stunden kokultiviert. Nach diesen 72 Stunden erfolgte dann noch die Zugabe von 20 IU/ml IL-2 für die restliche Zeit der Kultur. Die Lymphozyten wurden wöchentlich mit den Peptid beladenen autologen dendritischen Zellen restimuliert und nach insgesamt 3 Stimulationszyklen geerntet. Die anschließend durchgeführten 24 Stunden γ -IFN ELISPOT Versuche dienten der Reaktivitätsmessung der so gewonnenen T-Zellen. Die Spezifität der gewonnenen T- Zellen wurde in Experimenten mit blockierenden Antikörpern bestimmt und durch eine Tetramer Färbung bestätigt.

4.6 IFN- γ Enzyme-Linked Immuno Spot (ELISPOT) Versuche

Unter den verschiedenen Methoden zur Messung funktioneller Eigenschaften Antigen-spezifischer T-Lymphozyten erlaubt der ELISPOT Versuch eine direkte Quantifizierung einzelner T-Zellen, die auf deren schnellen Zytokin-Sekretion nach Antigen-Kontakt beruht (Britten et al. 2002).

Für einen γ -IFN ELISPOT-Versuch eigneten sich in dieser Arbeit als Antigen präsentierende Zellen / Zielzellen zwei verschiedene Zelllinien: Zum einen war dies die HLA-A2.1⁺ und HPV16 infizierte zervikale Karzinomzelllinie CaSki, die das komplette HPV16 E7 Onkoprotein exprimiert. Zur Präsentation der drei untersuchten HPV16 E7 Peptide fand die HLA-A2.1⁺ Zelllinie K562 Verwendung (freundlicherweise von W. Herr, Universität Mainz, zur Verfügung gestellt). Bei der humanen Zelllinie K562 handelt es sich um eine Zelllinie, die aus einem Pleuraerguß einer Patientin mit chronisch myeloischer Leukämie (CML) in einer terminalen Blastenkrise gewonnen worden ist (Lozzio et al. 1975). Diese Zelllinie zeichnet sich dadurch aus, daß sie an sich weder MHC Klasse I noch MHC Klasse II Moleküle exprimiert. Durch Transfektion der Zelllinie mit dem HLA-A*0201 Gen wurden die Zellen in die Lage versetzt, bekannte exogen angebotene Peptidantigene aufzunehmen und HLA-A2.1 restriktiv auf der Oberfläche zu präsentieren (Britten et al. 2002). Die K562 Zelllinie war daher geeignet mit den in dieser Arbeit untersuchten HPV16 E7 Peptiden beladen zu werden um sie dann im ELISPOT Versuch als Zielzellen für die mit dendritischen Zellen stimulierten Antigen spezifischen T-Zellen zu verwenden.

Der ELISPOT Versuch wurde in 96-well Mikrotiterplatten (MaxiSorp, Nunc, Roskilde, Dänemark) durchgeführt. Die Antikörper und AEC Trägerreagentien stammten von BD Biosciences, Heidelberg (Human IFN-gamma ELISPOT Pair, AEC Substrate Reagent Set). Für die Antikörper Blockierungsexperimente wurden die Zielzellen für 30 Minuten mit 10 μ g/ml des anti-HLA Klasse I spezifischen monoklonalen Antikörpers W6/32 (HB95, ATCC) bzw. mit einer IgG Isotypen Kontrolle (IgG2_a Pharmingen, San Diego, USA) präinkubiert. Das Verhältnis Effektor- zu Zielzellen betrug in allen Untersuchungen 1:1, dabei wurden 10.000 Zellen/well für jede Gruppe verwandt. Im Folgenden wird das ausführliche ELISPOT-Protokoll aufgeführt:

1. Verdünnung des unmarkierten Anti-Zytokin Capture Antikörpers im Verhältnis 1:200 mit Coating Puffer (PBS: 8g NaCl, 0,2g KCl, 1,44g Na₂HPO₄x7H₂O, 0,24g KH₂PO₄ aufgelöst auf 1 Liter H₂O).
2. Jedes well wird mit 100 μ l der verdünnten Antikörperlösung inkubiert.

3. Die Mikrotiterplatten werden über Nacht bei 4 °C aufbewahrt.
4. Verwerfen der Antikörperlösung und Waschen der wells mit 200µl/well mit einer Blocking Solution (RPMI 1640 mit 10% fetalem bovines Serum (FBS) und 1% Penizillin-Streptomycin-L-Glutamin).
5. Jedes well wird mit 200µl der Blocking Solution für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.
6. Verwerfen der Blocking Solution.
7. Jedes well wird mit ca. 10.000 Zielzellen inkubiert (Zellen suspendiert in 100µl des kompletten Kulturmediums (RPMI 1640 mit FBS, Penizillin/Streptomycin und L-Glutamin)).
8. Jedes well wird mit ca. 10.000 stimulierten T Lymphozyten inkubiert.
9. Die Mikrotiterplatten werden mit dem Deckel verschlossen und über Nacht bei 37 °C, 5% CO₂ und 99% Luftfeuchtigkeit inkubiert.
10. Aspirieren der Zellsuspension und zweimaliges Waschen mit destilliertem Wasser (jeweils für 5 Minuten).
11. Dreimaliges Waschen mit 200µl/well Waschpuffer I (PBS mit 0,05% Tween-20) und jeweils Verwerfen des Waschpuffers.
12. Verdünnung des biotinylierten Anti-Zytokin Detection Antikörpers im Verhältnis 1:250 mit Verdünnungspuffer (PBS mit 10% FBS).
13. Jedes well wird mit 100µl des verdünnten Detection Antikörpers inkubiert.
14. Verschuß der Mikrotiterplatte und anschließend zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur.
15. Verwerfen der Detection Antikörperlösung und dreimaliges Waschen mit 200µl/well Waschpuffer I.
16. Verdünnung der Avidin-Meerrettich-Peroxidase (HRP) mit dem Dilution Puffer im Verhältnis 1:200.
17. Jedes well wird mit 100µl der verdünnten Avidin-HRP-Lösung inkubiert.
18. Verschuß der Mikrotiterplatte und anschließend einstündige Inkubation bei Raumtemperatur.
19. Verwerfen der Avidin-HRP-Lösung und viermaliges Waschen mit 200µl/well Wasch-Puffer I.
20. Zweimaliges Waschen mit 200µl/well Wasch-Puffer II (PBS).
21. Jedes well wird mit 100µl der Final Substrate Solution (BD Parmingen AEC Substrate Reagent Set) inkubiert.

22. Überwachen der Spot-Bildung über einen Zeitraum von einer Stunde.
23. Nach einer Stunde Stoppen der Substrat-Reaktion durch Waschen mit destilliertem Wasser.
24. Mikrotiterplatten werden für 2 Stunden bei Raumtemperatur und Dunkelheit luftgetrocknet und dann bis zur Analyse unter Lichtausschluß aufbewahrt.
25. Auszählen der Spots durch zwei voneinander unabhängige Untersucher mit Hilfe eines Mikroskops.

4.7 Kultur der Zielzellen

Die adhärenenten Zelllinien waren in Plastikkulturflaschen (Greiner, Solingen, Deutschland) unter Standardbedingungen gewachsen (37 °C, 5% CO₂, 100% wasserdampfgesättigte Luft). Als Medium fand ein modifiziertes Medium nach Eagle Verwendung, dem 10%iges hitzeinaktiviertes fetales Kalbsserum (beide Gibco, Eggenstein, Deutschland), 2mM L-Glutamin, 50 µg/ml Streptomycin und 50 IU/ml Penizillin zugefügt worden waren (alle ICN, Meckenheim, Deutschland). Um die adhärenenten Zelllinien zu transferieren bzw. zu passagieren mußten sie mit einer 0,05% Trypsin/0,02% EDTA Lösung (Böhringer, Mannheim, Deutschland) abgelöst werden. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Medium gewaschen und in 96-well Flachboden-Mikrotiter-Platten (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) bzw. Kulturflaschen resuspendiert.

4.8 Statistische Auswertung

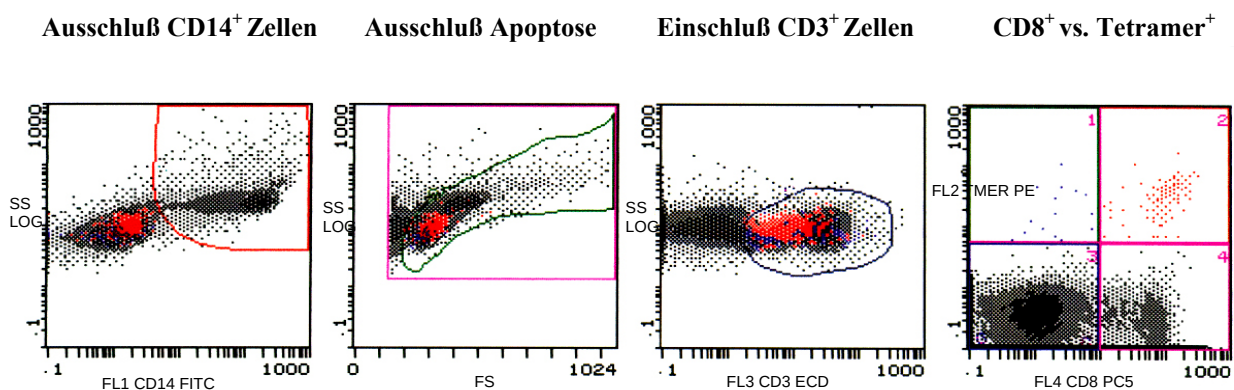
Tetramer positive Zellen wurden mittels Durchflußzytometrie quantifiziert und als Frequenzen (z.B. 1/1.000) bzw. als reziproke Frequenzen (z.B. 1.000) unter den CD8⁺ Zellen angegeben. Die erhaltenen reziproken Frequenzen wurden unter Verwendung einer normalen Wahrscheinlichkeitsdarstellung in eine logarithmisierte Form transformiert (Hoffmann et al., 2000). Bei allen drei Tetrameren zeigten die log-transformierten Daten eine Normalverteilung. Dementsprechend wurden deskriptive Statistik (Standardabweichungen, Mittelwerte, Konfidenzintervalle) und statistische Analyse (zweiseitiger Student's t-Test) an log-transformierten reziproken Frequenzen durchgeführt.

5. Ergebnisse

5.1 Quantifizierung HPV16 E7 spezifischer CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut

Zur Bestimmung der Frequenzen HPV16 E7 spezifischer T Zellen in der peripheren Zirkulation wurde eine Vier-Farben Durchflußzytometrie, die gleichzeitig die Tetramer-, CD3-, CD8- und CD14-Bindung mißt, verwendet.

Abbildung 9. Protokoll der Vier-Farben-Durchflußzytometrie zur Erhöhung der Spezifität und Sensitivität. In der rechten Graphik kommen nach Ausschluß von apoptotischen Zellen sowie CD14⁺ Zellen (beide Populationen binden Tetramere unspezifisch) und dem Einschluss von CD3⁺ T-Zellen im oberen rechten Quadranten die Tetramer⁺ und CD8⁺ T-Zellen zur Darstellung.



Die Bindung der HPV16 E7 Tetramer-Komplexe wurde mit der Bindung des Influenza-Tetramers sowie des HIV-Tetramers verglichen. Beim Influenza-Tetramer Komplex wurde als Antigen das HLA-A2.1 restringierte Matrix Peptid GILGFVFTL verwendet, beim HIV-Tetramer Komplex dagegen das ILKEPVHGV Peptid der HIV Reversen Transkriptase. Bei dem ausgewählten Influenza-Virus Peptid handelt es sich um ein sogenanntes Recall-Antigen. Da sich Recall-Antigene dadurch auszeichnen, daß sie bei einem Großteil gesunder Probanden eine zelluläre Immunreaktion auslösen, eignete sich dieses Peptid als Positivkontrolle um HLA-A2.1 positive Patienten bzw. Normalkontrollen zu identifizieren. Bei dem verwendeten HIV Peptid handelt es sich dagegen um ein für das Immunsystem neues Antigen, daher eignete sich dieses Peptid für die Verwendung als Negativkontrolle. Analog einer vorangehenden Arbeit (Hoffmann et al. 2002), wurde in der vorliegenden Untersuchung die untere Bestimmungsgrenze zur Identifizierung Tetramer positiver Zellen bei einer Rate

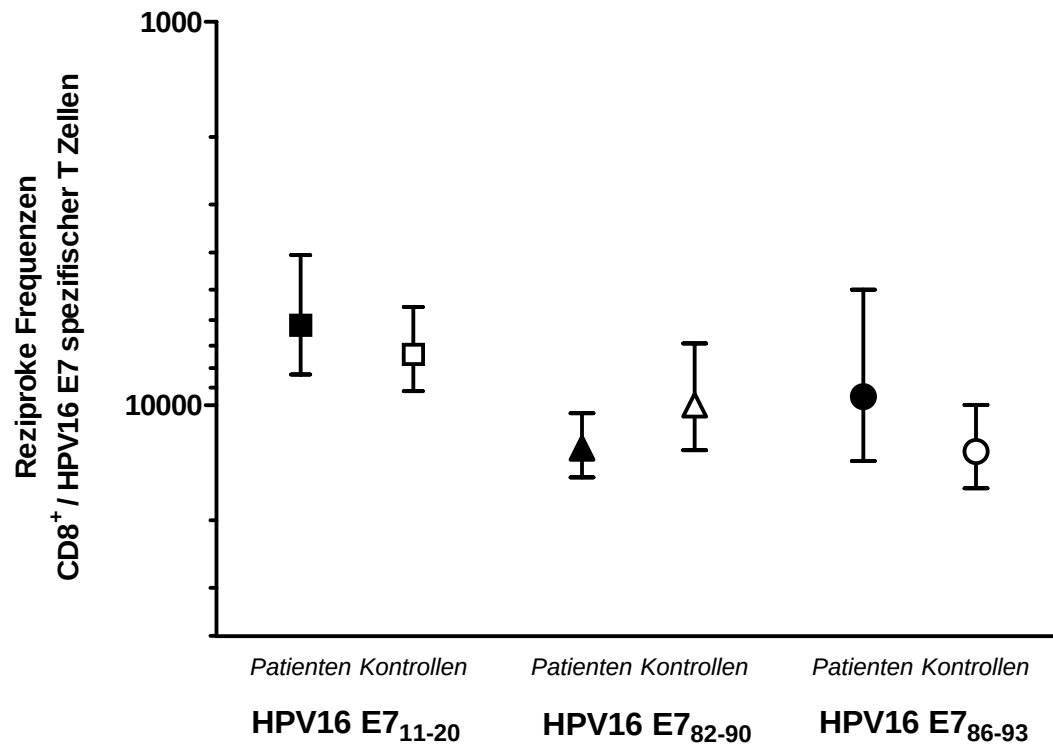
von 1/12821 bestimmt. Diese untere Detektionsgrenze bezieht sich sowohl auf die Patienten als auch auf die Normalkontrollen. Die durchschnittlichen Frequenzen für Influenza und HIV spezifische T-Lymphozyten betrugen in dieser Arbeit 1/2515 (Influenza) bzw. 1/11992 (HIV). Für das HPV16 E7₁₁₋₂₀ Epitop lag der Mittelwert der Frequenzen der Tetramer positiven CD8⁺ T-Zellen bei den Patienten mit oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen bei einem Wert von 1/6189. Er war damit höher als der Durchschnittswert bei den Normalkontrollen, der 1/7364 betrug, jedoch war der Unterschied zwischen den beiden untersuchten Gruppen statistisch nicht signifikant ($p=0,54$). Für das HPV16 E7₈₂₋₉₀ Epitop zeigten sich sogar höhere Frequenzen Tetramer positiver CD8⁺ Zellen bei den Normalkontrollen. So betrug die mittlere Frequenz Tetramer positiver CD8⁺ Zellen beim HPV16 E7₈₂₋₉₀ Epitop bei den Normalkontrollen 1/10008 während sie bei den Tumorpatienten lediglich 1/12961 betrug. Der Unterschied zwischen den beiden Werten war aber auch hier nicht groß genug um eine statistische Signifikanz zu ergeben ($p=0,394$). Bei dem HPV16 E7₈₆₋₉₃ Epitop ergab sich dagegen wiederum eine höhere durchschnittliche Frequenz Tetramer positiver CD8⁺ Zellen bei den Patienten mit oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen als bei den gesunden Kontrollpersonen. Hier lag die Durchschnittsrate bei den Patienten bei 1/9497 im Vergleich zu 1/13225 bei den Normalkontrollen. Eine statistisch signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Normalkontrollen ließ sich auch bei dem dritten untersuchten HPV16 E7 Epitop nicht feststellen ($p=0,466$).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß in der Patientengruppe für zwei der drei untersuchten HPV16 E7 Epitope höhere Frequenzen spezifischer T-Zellen in der peripheren Zirkulation nachweisbar waren als in der Normalkontrolle. Für eines der drei Epitope zeigten sich sogar höhere Frequenzen spezifischer T-Zellen in der Gruppe der gesunden Kontrollen. Bei allen drei HPV16 E7 Epitopen waren die Unterschiede aber nicht groß genug um eine statistische Signifikanz zu erreichen.

Tabelle 4. Zusammenfassung der klinischen Parameter (TNM Klassifikation) und der Frequenzen HPV16 E7 spezifischer T-Zellen bei 20 HLA-A2.1 positiven Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx. n.v.=nicht verfügbar.

<i>Patient</i>	TNM Klassifikation	Frequenzen HPV16 E7₁₁₋₂₀ spezifischer T Zellen	Frequenzen HPV16 E7₈₂₋₉₀ spezifischer T Zellen	Frequenzen HPV16 E7₈₆₋₉₃ spezifischer T Zellen
1	T2 N0 M0	1/3360	1/22910	1/3543
2	T1 N0 M0	1/13621	1/27253	1/83032
3	T3 N1 M0	1/22805	1/19912	1/2533
4	T1 N0 M0	1/25575	1/15105	1/15222
5	T3 N1 M0	1/5143	1/10855	1/807
6	T3 N1 M0	1/13262	1/7353	1/10275
7	T2 N1 M0	1/1664	1/14304	1/22245
8	T4a N3 M0	1/12212	1/9823	1/25680
9	T3 N2c M0	1/32483	1/9399	1/14616
10	T2 N0 M0	1/7072	1/31186	1/8807
11	T4a N2b M0	1/7677	n.v.	1/1901
12	T2 N1 M0	1/10624	1/37381	1/4872
13	T3 N2b M0	1/1458	n.v.	1/36695
14	T3 N3 M0	1/1112	1/32850	1/33627
15	T2 N0 M0	1/2773	1/5835	1/8194
16	T2 N0 M0	1/2345	1/9934	1/10014
17	T2 N0 M0	1/1441	n.v.	1/13641
18	T4a N2b M0	1/28143	1/1019	n.v.
19	T1 N2b M0	1/3691	1/9254	1/4459
20	T2 N2b M0	1/6217	1/19834	n.v.

Abbildung 10. Reziproke Frequenzen von HPV16 E7 Tetramer⁺, CD8⁺ und CD3⁺ T-Zellen bei 20 HLA-A2.1⁺ gesunden Kontrollen und 20 HLA-A2.1⁺ Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx. Die Symbole kennzeichnen das geometrische Mittel, die Fehlerindikatoren (Balken) den Standardfehler des Mittelwertes.



5.2 HPV16 E7 und p16 Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbung auf das Vorliegen des HPV16 E7 Proteins in den oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen der 20 HLA-A2.1⁺ Patienten wurde durchgeführt um zum einen zu untersuchen inwieweit diese Tumoren das Potential besitzen die Epitope zu präsentieren und zum anderen um die daraus gewonnenen Ergebnisse mit denen aus der Frequenzbestimmung (Tetramer⁺ CD8⁺ T-Zellen) in der peripheren Zirkulation in Beziehung zu setzen.

Unter Verwendung eines HPV16 E7 spezifischen Antikörpers wurde eine immunhistochemische Färbung an 20 in Paraffin eingebetteten Tumoren des Oropharynx durchgeführt. Eine positive HPV16 E7 Färbung konnte bei 12 der 20 Oropharynxtumoren (60%) beobachtet werden. In diesen 12 Fällen fand sich sowohl eine nukleäre als auch eine zytoplasmatische Anfärbung mit dem Antikörper, die vergleichbar war mit der Anfärbung in den Positivkontrollen (CaSki Zelllinie und andere Proben aus HPV16 positiven Karzinomen der Zervix uteri). Bei den positiv gefärbten Tumoren zeigten nahezu alle neoplastischen Zellen eine starke Immunreaktivität (s. Abbildung 11). Nichtdysplastische Plattenepithelien dienten dabei als interne Negativkontrolle. Eine statistische Korrelation zwischen der HPV16 E7 Färbung und dem Tumorstadium bzw. Tumorgrad konnte nicht festgestellt werden (s. Tabelle 4 und 5).

Die immunhistochemische p16 Färbung zeigte in 10 von 20 Fällen (50%) eine starke Immunreaktivität in den Kernen und im Zytoplasma der malignen Zellen (s. Tabelle 5). Mesenchymale Zellen zeigten keine Anfärbbarkeit für das p16 Protein, gelegentlich ließen sich jedoch Lymphozyten und Speicheldrüsen im Tumorpräparat schwach anfärben. Eine statistische Korrelation zwischen der p16 Färbung und dem Tumorstadium bzw. Tumorgrad konnte wie bei der HPV 16 E7 Färbung nicht festgestellt werden (s. Tabelle 4 und 5)

Von den 12 Tumoren, die sich als HPV16 E7 positiv herausstellten, zeigten 10 gleichzeitig eine positive p16 Färbung (83 %). Umgekehrt zeigten somit alle p16 positiven Tumoren auch eine Anfärbbarkeit für HPV16 E7 (100%) und alle HPV16 E7 negativen Tumoren waren somit auch gleichzeitig p16 negativ (s. Tabelle 5).

Abbildung 11. HPV16 E7 Immunhistochemie am Beispiel eines repräsentativen Oropharynxkarzinoms.

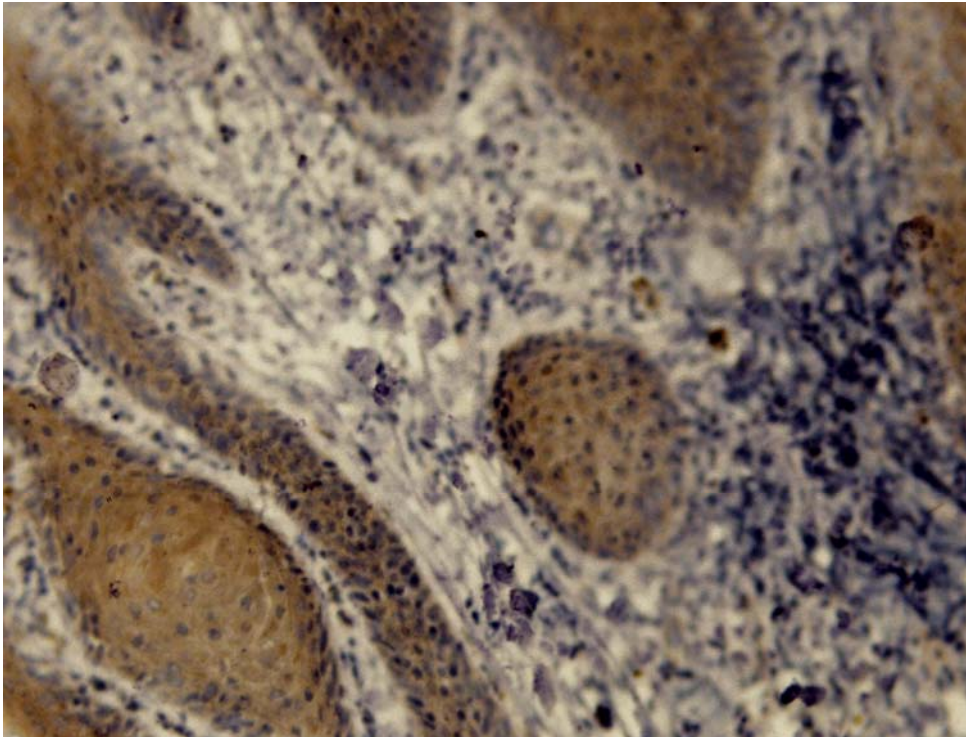


Abbildung 12. p16 Immunhistochemie am Beispiel eines repräsentativen Oropharynxkarzinoms.

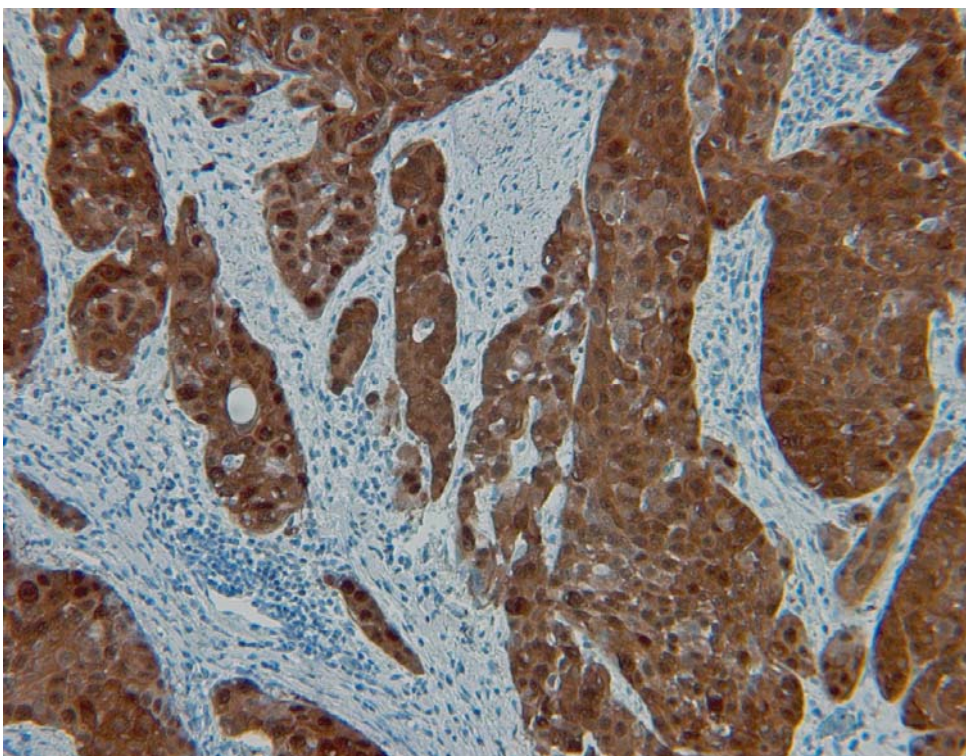


Tabelle 5. Frequenzen HPV16 E7₁₁₋₂₀ spezifischer T Zellen sowie HPV16 E7 als auch p16 Status in 20 Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx.

Patient	Frequenzen HPV16 E7₁₁₋₂₀ spezifischer T Zellen	Tumor HPV16 E7 Protein	Tumor p16 Protein
1	1/3360	-	-
2	1/13621	-	-
3	1/22805	-	-
4	1/25575	-	-
5	1/5143	+	+
6	1/13262	-	-
7	1/1664	+	+
8	1/12212	+	+
9	1/32483	+	-
10	1/7072	+	+
11	1/7677	-	-
12	1/10624	+	+
13	1/1458	+	+
14	1/1112	+	+
15	1/2773	+	+
16	1/2345	+	+
17	1/1441	+	+
18	1/28143	-	-
19	1/3691	+	-
20	1/6217	-	-

5.3 Korrelation zwischen HPV16 E7 spezifischen T-Zellen und HPV16 E7 Expression

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der immunhistochemischen HPV16 E7 Färbung wurden die Patienten mit oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen bezüglich der HPV16 E7 Expression in zwei Untergruppen eingeteilt. Die eine Gruppe bestand aus den 12 Patienten deren Tumoren das HPV16 E7 Onkoprotein exprimierten, die andere Gruppe aus den 8 Patienten deren Tumoren dafür negativ waren. Beide Gruppen wurden anschließend bezüglich des Nachweises spezifischer T-Zellen für die drei HPV16 E7 Epitope (HPV16 E7₁₁₋₂₀, HPV16 E7₈₂₋₉₀ und HPV16 E7₈₆₋₉₃) gegenübergestellt. Dabei zeigte sich, daß die Patienten mit HPV16 E7⁺ Tumoren im peripheren Blut im Durchschnitt eine deutlich höhere Frequenz spezifischer T-Zellen für das HPV16 E7₁₁₋₂₀ Epitop aufwiesen als die Patienten mit HPV16 E7 negativen Tumoren. Die durchschnittliche Frequenz HPV16 E7₁₁₋₂₀ spezifischer T-Zellen betrug in der ersten Patientengruppe (HPV16 E7 positiv) 1/3947 im Vergleich zu lediglich 1/12152 in der zweiten Patientengruppe (HPV16 E7 negativ). Nach Durchführung eines zweiseitigen Student t-Tests zeigte sich, daß die ermittelten Frequenzen HPV16 E7₁₁₋₂₀ spezifischer T-Zellen in der ersten Patientengruppe (s.o) im Vergleich zu der zweiten Gruppe (s.o.) signifikant erhöht waren ($p=0,0172$). Die individuellen Frequenzen HPV16 E7₁₁₋₂₀ spezifischer T-Zellen bei den Patienten mit und ohne Nachweis des HPV16 E7 Onkoproteins im Tumor sowie bei den Normalkontrollen sind in der Abbildung 14 dargestellt. Für die beiden anderen untersuchten HPV16 E7 Epitope (HPV16 E7₈₂₋₉₀ und HPV16 E7₈₆₋₉₃) konnten dagegen zwischen den beiden Patientengruppen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Frequenzen spezifischer T-Zellen festgestellt werden. Zusammenfassend lassen die gewonnenen Ergebnisse erkennen, daß die Expression des HPV16 E7 Onkoproteins in Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx mit einer signifikant erhöhten Frequenz HPV16 E7₁₁₋₂₀ spezifischer CD8⁺ Zellen in der peripheren Zirkulation assoziiert ist. Dies gilt jedoch nicht für HPV16 E7₈₂₋₉₀ und HPV16 E7₈₆₋₉₃ spezifische CD8⁺ Zellen. Trotz der signifikant erhöhten Frequenzen HPV16 E₁₁₋₂₀ spezifischer T Zellen bei den Patienten mit HPV16 E7 positiven Tumoren muß jedoch erwähnt werden, daß diese Frequenzen mit einem Mittelwert von 1/3947 immer noch unter den gemessenen Frequenzen Influenza-Virus spezifischer T-Zellen (FLU₅₈₋₆₆) lagen, deren Wert 1/2515 betrug und damit fast doppelt so hoch war.

Abbildung 13. Erhöhte reziproke Frequenzen HPV16 E7₁₁₋₂₀ spezifischer CD8⁺ Zellen bei Patienten, deren Tumoren HPV16 E7 exprimieren. Das Sternchen kennzeichnet einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$).

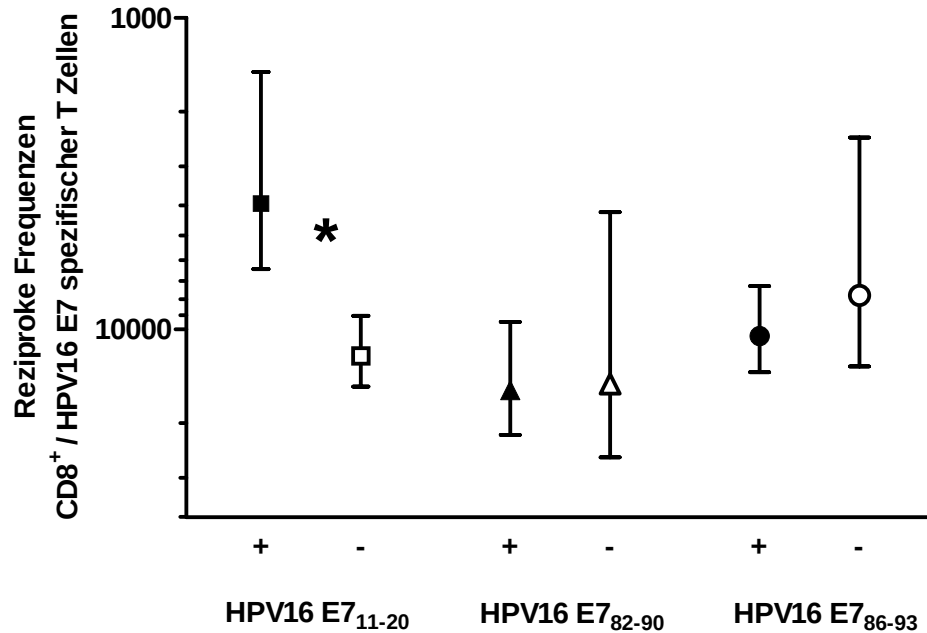
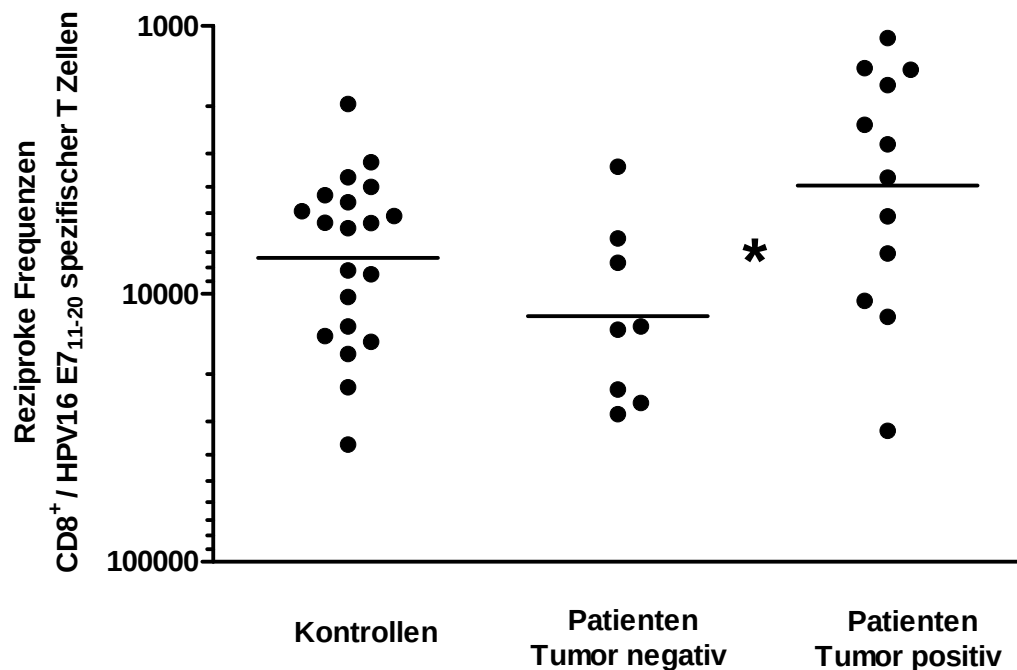


Abbildung 14. Vergleich der individuellen reziproken Frequenzen HPV16 E7₁₁₋₂₀ spezifischer CD8⁺ Zellen bei 20 HLA-A2.1⁺ Normalkontrollen sowie von 20 HLA-A2.1⁺ Patienten deren Tumoren immunhistochemisch positiv bzw. negativ für das HPV16 E7 Onkoprotein sind. Das Sternchen kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zwischen den Patienten mit HPV16 E7 positiven bzw. HPV16 E7 negativen Tumoren.

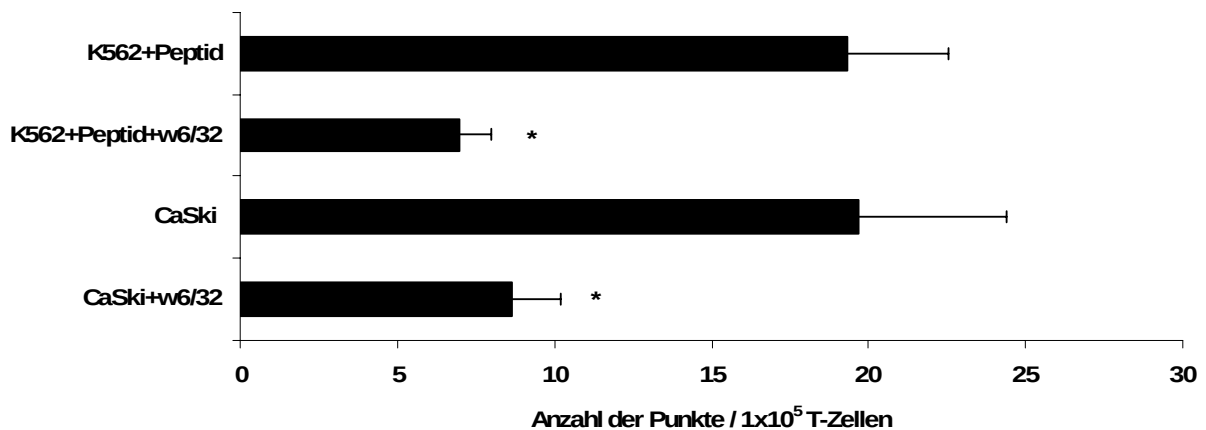


5.4 In vitro Stimulation HPV16 E7 spezifischer T-Zellen mit autologen dendritischen Zellen

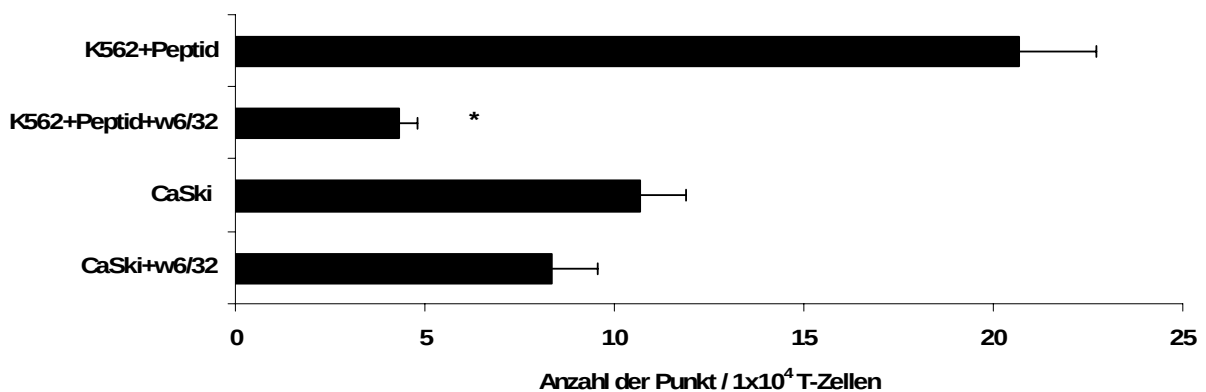
Um die T-Zell Antwort auf das HPV16 E7 Antigen zu testen, wurde bei Patienten, bei denen im peripheren Blut HPV16 E7 spezifische Vorläufer T-Zellen gefunden worden waren, eine in vitro Stimulation durchgeführt. Als Antigen präsentierende Zellen dienten in diesen in vitro Stimulationstests autologe dendritische Zellen. Diese Experimente wurden bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx durchgeführt, die eine hohe Frequenz spezifischer Vorläufer T-Zellen zumindest eines der drei untersuchten HPV16 E7 Epitope aufwiesen. Die Reaktivität der durch in vitro Stimulation gewonnenen Effektor T-Zellen wurde mittels γ -IFN ELISPOT Versuchs getestet. Die Ergebnisse eines repräsentativen ELISPOT Versuchs sind in Abbildung 15 dargestellt. Effektor T-Zellen, die durch Stimulierung peripherer mononukleärer Zellen mit dem HPV16 E7₁₁₋₂₀ Peptid auf beladenen dendritischen Zellen gewonnen werden konnten, zeigten im γ -IFN ELISPOT Versuch eine Reaktivität sowohl gegenüber K562 Zellen, die vorher mit dem entsprechenden Peptid beladen worden waren als auch gegen die Tumor-Zelllinie CaSki, die das HPV16 E7 Onkoprotein exprimiert (s. Abbildung 15 Feld A). Beide Reaktionen konnten durch den anti-HLA Klasse I Antikörper w6/32 signifikant inhibiert werden. Für die Stimulierung mononukleärer Zellen mit dem HPV16 E7₈₂₋₉₀ Peptid konnte eine solche Reaktivität gewonnener Effektor T-Zellen wie sie für das HPV16 E7₁₁₋₂₀ Peptid gefunden worden war, dagegen weder gegenüber beladenen K562 Zellen noch gegenüber CaSki Zellen beobachtet werden. Für das HPV16 E7₈₆₋₉₃ Peptid wiederum zeigte sich im γ -IFN ELISPOT Versuch lediglich gegenüber den K562 Zellen, die mit dem korrespondierenden Peptid beladen worden waren, eine Reaktivität, die mittels anti-HLA Klasse I Antikörper w6/32 signifikant blockiert werden konnte (s. Abbildung 15 Feld B). Eine entsprechende Reaktivität der Effektor T-Zellen gegenüber den HPV16 E7 exprimierenden CaSki Tumorzellen konnte dagegen nicht nachgewiesen werden (s. Abbildung 15 Feld B). Auch eine signifikante Verminderung der IFN- γ Produktion nach entsprechendem Blockierungsversuch mit dem anti-HLA Klasse I Antikörper w6/32 war im γ -IFN ELISPOT Versuch nicht beobachtbar.

Abbildung 15. Ergebnisse eines repräsentativen γ -IFN ELISPOT Versuchs. Effektor T-Zellen wurden durch Stimulation peripherer mononukleärer Zellen mit Peptid beladenen autologen dendritischen Zellen gewonnen. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse nach Stimulation mit dem HPV16 E7₁₁₋₂₀ Peptid (Feld A) bzw. dem HPV16 E7₈₆₋₉₃ Peptid (Feld B). Der ELISPOT Versuch wurde nach drei in vitro Stimulationszyklen durchgeführt. Die gewonnenen T-Zellen wurden auf ihre Reaktivität sowohl gegenüber K562 Zellen, die mit dem korrespondierenden Peptid beladen worden waren als auch gegenüber das HPV16 E7 Onkoprotein exprimierende CaSki Zellen getestet. Die vorliegende Abbildung zeigt repräsentativ die Ergebnisse der Stimulationstests, die an peripheren mononukleären Zellen des Patienten Nr. 15 durchgeführt wurden. Die Sternchen kennzeichnen einen signifikanten Unterschied zwischen den Anzahlen der Punkte im ELISPOT Versuch.

A



B



Diese Ergebnisse zeigen, daß Vorläufer T-Zellen, die spezifisch für das HPV16 E7₁₁₋₂₀ Peptid bzw. für das HPV16 E7₈₆₋₉₃ Peptid sind, in der peripheren Zirkulation vorhanden sind und daß diese in der Lage sind - zumindest in vitro - in HPV spezifische Effektor T-Zellen zu differenzieren.

6. Diskussion

Eine Prädisposition der oropharyngealen Schleimhaut für eine maligne Transformation durch „high risk“ HPV16 wurde in mehreren Studien beschrieben. Diese Prädisposition konnte insbesondere für Tumoren des Zungengrunds, der Gaumenmandeln und des Pharynx nachgewiesen werden, nicht jedoch in entsprechenden Kontrollgeweben (Brandsma et al. 1989, Haraf et al. 1996, Paz et al. 1997, Schwartz et al. 1998, Andl et al. 1998, Gillison et al. 2000, Klusmann et al. 2001, Ritchie et al. 2003). Eine kausale Beziehung zwischen dem viralen Onkoprotein und bis zu 50 % der oropharyngealen Karzinome konnte in den letzten Jahren festgestellt werden, jedoch gibt es bis heute nur wenige Anstrengungen die Immunantwort gegen HPV16 Proteinbestandteile insbesondere gegen die bislang identifizierten HLA-A2.1 restriktiven HPV16 E7 Epitope zu beschreiben und zu charakterisieren bzw. diese Epitope für eine Tumorimmunisierung zu verwenden. Ebenfalls ist momentan nur wenig über die Interaktionen von T-Lymphozyten und dem im oropharyngealen Tumorgewebe exprimierten HPV16 E7 Onkoprotein bekannt. Dies steht im völligen Kontrast zu den umfangreichen Studien über HPV spezifische Immunantworten beim Zervixkarzinom (Muderspach et al. 2000, Devaraj et al. 2003).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß Patienten mit HPV16 transformierten Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx im Vergleich zu Patienten mit HPV16 E7 negativen Tumoren im peripheren Blut signifikant höhere Frequenzen an T-Lymphozyten, die spezifisch für das HPV16 E7₁₁₋₂₀ Epitop sind, aufweisen. Von den drei untersuchten HPV16 E7 Epitopen stellte sich hier lediglich das HPV16 E7₁₁₋₂₀ Epitop als immunogen heraus, da sich die Frequenzen der T-Lymphozyten, die spezifisch für das HPV16 E7₈₂₋₉₀ bzw. HPV16 E7₈₆₋₉₃ Epitop sind, in den beiden Patientengruppen (HPV16 E7 positiv vs. negativ) statistisch nicht unterschieden. Interessanterweise lassen Ergebnisse aus Untersuchungen an HLA-A2.1 transgenen Mäusen vermuten, daß die letzteren HPV16 E7 Epitope gar nicht prozessiert bzw. nur unzureichend von Antigen präsentierenden Zellen präsentiert werden (Bauer et al. 2000, Street et al. 2002). Diese Tatsache könnte erklären, warum in der vorliegenden Arbeit der Nachweis von T-Lymphozyten, die spezifisch für das HPV16 E7₈₂₋₉₀ bzw. für das HPV16 E7₈₆₋₉₃ Epitop sind, nicht gelungen ist. Somit ist bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx offensichtlich nur das HPV 16 E7₁₁₋₂₀ Epitop immunogen, was letztendlich zu einer erhöhten Frequenz an Epitop-spezifischen T-Lymphozyten in der peripheren Zirkulation führt. Unterstützt wird diese Annahme durch Untersuchungen von Youde und Kollegen, die bei Patientinnen mit Karzinomen der Zervix uteri im Vergleich zu Normalkontrollen eine

wesentlich höhere Empfindlichkeit HPV16 E7₁₁₋₂₀ spezifischer T-Lymphozyten für eine *in vitro* Expansion beschreiben konnten (Youde et al. 2000).

In Studien von Hoffmann et al. wurden T-Zell Antworten gegen das „Selbst-Antigen“ p53 bei Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen untersucht. Dabei zeigte sich bei Patienten, deren Tumoren eine normale p53 Expression aufwiesen, eine erhöhte Frequenz an p53 spezifischen T-Lymphozyten in der peripheren Zirkulation (Hoffmann et al. 2000). Im Gegensatz dazu hatten Patienten, deren Tumoren eine p53 Überexpression zeigten, niedrige Frequenzen p53 spezifischer T-Lymphozyten. Dies legte nahe, daß es bei „Selbst-Antigenen“ wie dem p53 zu einer Immunselektion von Tumorzellen kommt, die diese Epitope verloren haben (Hoffmann et al. 2000, Hoffmann et al. 2002). In dieser Arbeit, in der ein „Nicht-Selbst-Antigen“ in Form eines viralen Fremd-Antigens benutzt wurde um T-Zell Antworten aufzudecken bzw. zu induzieren, konnte dagegen diese Immunselektion nicht beobachtet werden. Stattdessen zeigte sich bei Patienten mit oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen, deren Tumore HPV16 E7 positiv waren, eine erhöhte Rate an T-Lymphozyten spezifisch für das HPV16 E7₁₁₋₂₀ Epitop. Darüber hinaus waren diese T-Lymphozyten *in vitro* in der Lage in Antitumor-Effektorzellen zu differenzieren. Es bleibt daher die Frage, warum diese T-Lymphozyten dagegen nicht in der Lage waren *in vivo* den Tumor zu eliminieren. Man könnte erwarten, daß HPV16 E7₁₁₋₂₀ spezifische T-Lymphozyten genauso potent und effektiv sind wie Influenza spezifische T-Lymphozyten. Jedoch scheint die zelluläre Immunantwort auf Influenza assoziierte Epitope wesentlich stärker zu sein, was sich auch in den höheren Frequenzen Epitop-spezifischer T-Lymphozyten, die in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden konnten, widerspiegelt. So lag die Rate der T-Lymphozyten, die spezifisch für das Influenza Matrix immundominate Peptid (FLU₅₈₋₆₆) sind, bei 1/2515, während die Rate der HPV16 E7₁₁₋₂₀ spezifischen T-Lymphozyten bei den Patienten mit HPV16 E7 positiven Tumoren mit einem Wert von 1/3947 wesentlich niedriger war. Man könnte annehmen, daß das HPV16 Antigen im Vergleich zum Influenza-Virus nicht so immunogen ist oder aber daß der Tumor nicht von den spezifischen T-Lymphozyten erkannt wird, da es diesem an einer Präsentation des Epitops in Verbindung mit einem HLA-A2.1 Molekül an der Zelloberfläche mangelt. Andererseits könnte der Tumor auch aktiv die anti-Tumor Immunantwort unterdrücken, indem er durch Induktion einer T-Zell Apoptose zur Eliminierung HPV16 E7 spezifischer Effektorzellen führt. Die letztgenannte Möglichkeit ist Gegenstand aktueller Untersuchungen.

In der vorliegenden Arbeit gelangen die Induktion und Expansion spezifischer T-Lymphozyten bei zwei der drei untersuchten HPV16 E7 Peptide. Dabei waren die expandierten Zellen sowohl in der Lage Peptid-beladene Ziele zu erkennen (HPV16 E7₁₁₋₂₀ und HPV16 E7₈₆₋₉₃) als auch CaSki Zellen (nur HPV16 E7₁₁₋₂₀), die naturgemäß HPV16 E7 exprimieren. In Übereinstimmung mit den aus der Tetramer Analyse gewonnenen Daten wurde lediglich eine erfolgreiche Induktion bzw. Expansion der für das HPV16 E7₁₁₋₂₀ spezifischen T-Lymphozyten erwartet. Überraschenderweise gelang auch die Expansion der für das HPV16 E7₈₆₋₉₃ Epitop spezifischen T-Lymphozyten, obwohl die korrespondierenden Frequenzen in der peripheren Zirkulation weder bei diesem einen Donor noch bei den anderen Patienten mit oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen erhöht waren. Jedoch anders als beim HPV16 E7₁₁₋₂₀ Peptid, konnten die generierten T-Lymphozyten, die spezifisch für das HPV16 E7₈₆₋₉₃ Peptid waren, die HPV16 E7 exprimierende CaSki Zelllinie nicht erkennen. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, daß die Erkennung von Epitopen auf der Tumorzelloberfläche von kritischer Bedeutung für anti-Tumor Immunantworten ist. Bauer und Kollegen haben ähnliche Beobachtungen mit dem HPV16 E7₈₆₋₉₃ Peptid bei transgenen Mäusen gemacht (Bauer et al. 2000). Sie schlußfolgerten, daß das HPV16 E7₈₆₋₉₃ Peptid in der Lage ist Immunantworten im Sinne der Induktion zytotoxischer T-Lymphozyten zu generieren, wenn es künstlich auf die Antigen präsentierenden HLA Klasse I Moleküle geladen wird, daß es aber offensichtlich von HPV16 infizierten Zellen nicht prozessiert bzw. präsentiert wird.

Die Prävalenz einer Infektion mit HPV16 E7 bei den Tumorpatienten betrug in dieser Arbeit 60 % was vergleichbar mit den Angaben in der Literatur ist (Brandsma et al. 1989, Haraf et al. 1996, Paz et al. 1997, Schwartz et al. 1998, Andl et al. 1998, Gillison et al. 2000, Klussmann et al. 2000, Ritchie et al. 2003). Ebenso wurde eine Expression des Tumorsuppressors p16 in nahezu allen (10 von 12) HPV16 E7 exprimierenden oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen gefunden. Dies erklärt sich durch den Umstand, daß das HPV16 E7 Onkogen-Produkt die Aktivität des pRB Proteins inhibiert und dadurch die Expression von p16 über den Verlust des durch pRB vermittelten negativen Feedback-Kontrollmechanismus heraufreguliert wird. Die beiden anderen Fälle (HPV16 E7 positiver Tumor aber p16 negativ) könnten Tumoren mit einer geringen viralen Last repräsentieren, wie es Klussmann und Kollegen vorgeschlagen haben (Klussmann et al. 2003). Diese Hypothese wird unterstützt durch die Ergebnisse der Tetramer basierten Frequenzanalyse bei den beiden p16 negativen Tumorpatienten. So lag die Frequenz der für das HPV16 E7₁₁₋₂₀ spezifischen T-

Lymphozyten bei dem einen Patienten mit 1/3691 im Bereich des geometrischen Mittelwertes der spezifischen CD8⁺ T Zellen der Patienten mit HPV16 E7 infizierten oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen (1/3947). Bei dem zweiten Patienten lag die Frequenz HPV16 E7₁₁₋₂₀ spezifischer T-Lymphozyten mit einer Rate von 1/32483 sogar signifikant unter diesem geometrischen Mittelwert.

In der vorliegenden Arbeit erfolgten die Blutentnahmen bei nahezu allen Tumorpatienten präoperativ. Lediglich bei einigen Patienten wurde das Blut im Intervall der ersten Tumornachsorgeuntersuchung entnommen. Von Interesse ist daher sicherlich die Frage, inwieweit sich die Frequenzen HPV16 E7₁₁₋₂₀ spezifischer T-Zellen in der Patientengruppe mit den HPV positiven Tumoren im Vergleich zu der HPV negativen Patientengruppe im longitudinalen Zeitverlauf nach erfolgter Primärtherapie entwickeln. Da es sich bei dem HPV16 E7₁₁₋₂₀ Epitop um ein relativ starkes Antigen zu handeln scheint, wären in der HPV positiven Gruppe weiterhin erhöhte Frequenzen spezifischer T-Zellen zu erwarten - entsprechend dem Nachweis hoher Frequenzen Influenza spezifischer T-Zellen sowohl bei den Patienten als auch bei den Normalkontrollen bei teilweise Jahre zurückliegendem Kontakt zum Influenzavirus. Ein stärkeres Absinken der HPV16 E7₁₁₋₂₀ spezifischen T-Zell-Frequenzen im Vergleich zu den Influenza spezifischen T-Zellen würde tendenziell gegen eine starke Antigenität dieses Epitops sprechen.

Interessanterweise wiesen auch einige der Normalkontrollen verhältnismäßig hohe Frequenzen HPV16 E7 spezifischer T-Zellen auf. Die naheliegendste Erklärung hierfür ist sicherlich ein vorangegangener Kontakt mit dem HPV Subtypus 16. Von Interesse wäre sicherlich, ob bei diesen Normalkontrollen möglicherweise eine latente Infektion mit dem onkogenen Subtyp 16 vorliegt, die kein klinisches Korrelat zeigt und die zu der höheren Frequenz HPV16 E7 spezifischer T-Zellen geführt hat. Möglicherweise liegt bei den besagten Normalkontrollen mit relativ hohen Frequenzen spezifischer T-Zellen aber auch eine klinisch nicht erkannte HPV16 induzierte Läsion vor - zum Beispiel eine zervikale intraepitheliale Neoplasie oder sogar ein Zervixkarzinom.

In einer anderen Patientenstudie konnte gezeigt werden, daß HPV16 infizierte Tumore des Oropharynx im Vergleich zu HPV negativen Tumoren sowohl mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium als auch mit einer schlechteren Differenzierung (Tumorgrading) einhergehen (Gillison et al. 2000). Interessanterweise haben HPV positive Tumoren dennoch eine

signifikant bessere Prognose als die nicht infizierten Tumore. So betrug in der Studie von Gillison et al. das geschätzte mediane Überleben der HPV negativen Gruppe lediglich 76 Monate im Vergleich zu mehr als 91 Monaten in der HPV positiven Gruppe. Weiterhin hatte die HPV positive Gruppe ein um 40% reduziertes Sterberisiko. In der vorliegenden Arbeit konnte keine Korrelation zwischen TNM-Stadium bzw. Tumorgrading und dem HPV Status des Tumors (p16 und HPV16 E7 Immunhistochemie) festgestellt werden. Dies ist sicherlich auch auf die zu geringe Fallzahl zurückzuführen, die daraus resultiert, daß aufgrund der HLA-Restriktivität der Tetramer-Untersuchungen lediglich Patienten mit einem HLA-A2.1 positiven Status berücksichtigt werden konnten – für 20 HLA-A2.1 positive Patienten mußten etwa 40-50 Oropharynxkarzinompatienten gescreent werden. Eine Aussage über eine Beziehung zwischen HPV16 Status und Prognose waren in der vorliegenden Arbeit neben der verhältnismäßig geringen Fallzahl auch aufgrund des bisher nur kurzen Follow-up nicht möglich. Erklärungen für eine bessere Prognose von Patienten mit HPV positiven Tumoren werden momentan noch diskutiert (Gillison et al. 2000, Klusmann et al. 2003, Ritchie et al. 2003). So findet sich bei HPV negativen Tumoren wesentlich häufiger eine Alkohol- und Tabakanamnese. Diese wiederum geht vermehrt mit der Entwicklung synchroner oder metasynchroner Malignome im Bereich der Lunge, des Ösophagus und anderen Abschnitten des Kopf-Hals-Bereiches sowie mit anderen Komorbiditäten einher und kann somit einen Einfluß auf das Langzeitüberleben haben. Ein weiterer Faktor, der die Prognose HPV infizierter Oropharynxkarzinome positiv beeinflusst, könnte möglicherweise in der Tumorbilogie liegen. Obwohl es keine direkten Hinweise dafür gibt, daß die Anwesenheit von HPV die Radiosensitivität der Tumoren verändert (DeWeese et al. 1997, Huang et al. 1996, Rantanen et al. 1998), konnte gezeigt werden, daß es bei HPV positiven Tumoren unter einer Strahlentherapie zu einer vermehrten Expression sowohl der Onkoproteine E6 und E7 als auch von MHC Klasse I Molekülen kommt (Santin et al. 1998). Auf diesem Weg könnte es über eine gesteigerte „Immun-Surveillance“ zu einer verbesserten Überlebensrate kommen.

In der vorliegenden Arbeit wurde bei den Patienten eine Bestimmung von Serumantikörpern gegen HPV16 nicht durchgeführt. Die Existenz einer humoralen Immunantwort gegen HPV 16 bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx wurde in einer von Mork et al. publizierten Studie (2001) gezeigt. So war in dieser Studie die Odds Ratio für den Nachweis von anti-HPV16 Antikörpern im Serum bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen aller Lokalisationen des Kopf-Hals-Bereiches um den Faktor 2,2 und für Plattenepithelkarzinome des Oropharynx sogar um das 14,4 fache erhöht. Diese Tatsache ist ein weiterer Hinweis auf

die Bedeutung von HPV16 bei der Entstehung oropharyngealer Plattenepithelkarzinome. In Tierversuchen konnte nicht nur gezeigt werden, daß Virus-neutralisierende Antikörper den Wirt vor einer Infektion mit dem Virus schützen können, inzwischen gibt es sogar klinische Phase III Studien mit Impfstoffen, die auf rekombinant gewonnene Virus-ähnliche Partikel (VLP, virus-like particles) aus dem L1 Kapsidprotein beruhen (Devaraj et al. 2003). Diese Impfstoffe stellen jedoch lediglich eine *prophylaktische* Vakzine dar - so gelingt es mit den durch diese Vakzine erzeugten Virus-neutralisierenden Antikörpern nicht signifikante *therapeutische* Effekte bei bereits bestehenden HPV Infektionen zu generieren (Devaraj et al. 2003). Bestehende HPV Infektionen können sich nämlich der Antikörper-vermittelten Neutralisation entziehen, da die Kapsidgene erst in den terminal differenzierten oberflächlichen Zellen des Epithels exprimiert werden, nicht jedoch in den undifferenzierten Basalzellen, in denen der Virus persistieren kann (Devaraj et al. 2003). Bei bereits existenten HPV infizierten malignen Läsionen ist dagegen die Beschreibung und Kenntnis zellulär vermittelter Immunantworten auf eine HPV Infektion von zentraler Bedeutung für die Entwicklung zukünftiger *therapeutischer* Vakzinierungsstrategien. Die vorliegende Arbeit konzentrierte sich daher nicht auf die Beschreibung der humoralen Immunität sondern auf die T-Zell vermittelte Immunantwort. Daß die zelluläre Immunität eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle sowohl von HPV Infektionen als auch von HPV assoziierten Neoplasien spielt, konnte durch mehrere Beobachtungen bestätigt werden. So zeigen sich bei Empfängern von Organtransplantaten und bei HIV-infizierten Patienten erhöhte Prävalenzen von Erkrankungen die mit HPV in Verbindung stehen (Wu 1994). Weiterhin konnten in spontan regredierenden Warzen infiltrierende T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen nachgewiesen werden (Tagami 1983). Eine zukünftige *therapeutische* Vakzinierung bei malignen HPV induzierten Neoplasien des Oropharynx wird daher eine robuste HPV spezifische T-Zell vermittelte Immunantwort erzeugen müssen. Als sehr effektives Werkzeug zur Erzeugung einer solchen T-Zell Immunantwort haben sich die dendritischen Zellen herausgestellt. In dieser Arbeit konnte zumindest für das HPV16 E7₁₁₋₂₀ Epitop mit Hilfe Peptid beladener autologer dendritischer Zellen eine in vitro Expansion HPV16 E7₁₁₋₂₀ spezifischer T-Effektorzellen durchgeführt werden, gleichzeitig zeigten diese Zellen in γ -IFN ELISPOT Versuchen eine Reaktivität sowohl gegenüber der CaSki Zelllinie als auch gegenüber der mit dem korrespondierenden Peptid beladenen K562 Zelllinie. Zukünftige Studien werden zeigen müssen, ob sich die in vitro durchführbare Expansion HPV16 E7₁₁₋₂₀ spezifischer T-Effektorzellen auch in vivo ermöglichen läßt.

Zusammenfassend ließen sich in der vorliegenden Arbeit unter Anwendung von Tetrameren in der Durchflußzytometrie Frequenzen HPV16 E7 spezifischer T-Lymphozyten bei Patienten mit oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen bestimmen, die vergleichbar waren mit denen gesunder Kontrollen. Allerdings fand sich eine signifikante Frequenzerhöhung von spezifischen T-Lymphozyten für das HPV 16 E7₁₁₋₂₀ Peptid bei Patienten, deren Tumoren das HPV16 E7 bzw. p16 Protein exprimierten. Während das HPV16 E7₁₁₋₂₀ Epitop bei Patienten mit HPV16 E7 infizierten oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen offensichtlich immunogen ist, sind die gebildeten Epitop-spezifischen T-Lymphozyten unfähig den Tumor in vivo zu eliminieren. Weitergehende Studien werden notwendig sein um die mögliche Resistenz von Tumoren gegenüber zytotoxischen T-Zellen zu erklären und potentielle Strategien zu finden, welche die Möglichkeiten zur Entwicklung einer zukünftigen HPV basierten Vakzinierung verbessern.

7. Zusammenfassung

Die aktive Immunisierung mit Tumor-assoziierten Antigenen zielt auf die Induktion einer zytotoxischen T-Zell Antwort und könnte sich im Sinne einer Impfung zur Vernichtung kleiner, durch die konventionelle Behandlung nicht erfasster Tumormanifestationen eignen. Kürzlich wurden bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen (PEK) des Kopf-Hals-Bereichs spezifische T-Zell Reaktionen gegen Epitope des Tumorsuppressors p53 beschrieben. Um konzeptionelle Nachteile des in Tumor- und Normalgewebe zwar unterschiedlich, aber letztendlich ubiquitär exprimierten p53-Antigens zu umgehen, befasst sich die vorliegende Arbeit mit einem Tumor-assoziierten *de novo* Antigen, dem bei PEK des Oropharynx häufig anzutreffenden E7 Onkoprotein des Humanen Papillomavirus (HPV) 16.

Bei 20 HLA-A2.1⁺ Patienten mit einem PEK des Oropharynx und 20 gesunden HLA-A2.1⁺ Individuen wurde mit entsprechenden Antigen-HLA-A2.1 Komplexen in der Mehrfarben-Durchflußzytometrie die spezifische T-Zell Antwort gegenüber den Oligopeptiden (Epitope) HPV16 E7₁₁₋₂₀, E7₈₂₋₉₀ und E7₈₆₋₉₃ analysiert (Tetramertechnologie). Anschließend erfolgte die Korrelation dieser Immunparameter mit der immunhistochemischen Expression von HPV16 E7 und p16 (Surrogatparameter für HPV16 Infektion) in den jeweiligen Tumoren. In weiterführenden Untersuchungen wurden Blutlymphozyten mit autologen dendritischen Zellen, die mit den genannten E7-Epitopen beladen worden waren, *in vitro* stimuliert und propagiert. Die Austestung der spezifischen Reaktivität der resultierenden T-Zellpopulationen erfolgte gegen HLA-A2.1/HPV16⁺ CaSki- sowie Peptid-beladene/HLA-A2.1⁺-transfizierte K562-Zellen (IFN- γ ELISPOT Assay).

Patienten mit PEK des Oropharynx wiesen insgesamt für 2 der 3 Epitope erhöhte Frequenzen HPV16 E7 spezifischer T-Zellen im Vergleich zu gesunden Kontrollen auf. Eine signifikante Erhöhung zeigte sich aber ausschließlich für das HPV16 E7₁₁₋₂₀ Epitop bei Patienten mit HPV16 E7 exprimierenden Oropharynxkarzinomen. HPV16 E7₁₁₋₂₀-spezifische T-Zellen konnten *in vitro* erfolgreich expandiert und ihre spezifische Immunreaktivität durch anti-HLA Klasse I Antikörper unterbunden werden.

Die vorliegende Arbeit zeigt, daß Patienten mit HPV-positiven Oropharynxkarzinomen zirkulierende HPV16 E7-spezifische T-Vorläuferzellen besitzen, die *in vitro* zu entsprechenden Effektorzellen ausdifferenzieren können. Somit ist eine wichtige Voraussetzung für das Konzept einer HPV16 E7-basierten Tumorimpfung gegeben.

8. Literaturverzeichnis

Aicher, A., Westermann, J., Cayeux, S., Willimsky, G., Daemen, K., Blankenstein, T., Uckert, W., Dorken, B., Pezzutto, A.:

Successful retroviral mediated transduction of a reporter gene in human dendritic cells: feasibility of therapy with gene-modified antigen presenting cells
Exp Hematol 1:39-44, 1997

Alexander, M., Salgaller, M.L., Celis, E.C., Sette, A., Barnes, W.A., Rosenberg, S.A., Steller, M.A.:

Generation of tumor-specific cytolytic T lymphocytes from peripheral blood of cervical cancer patients by in vitro stimulation with a synthetic human papillomavirus type 16 E7 epitope
Am J Obstet Gynecol 175:1587-1593, 1996

Altman, J.D., Moss, P.A., Goulder, P.J., Barouch, D.H., McHeyzer-Williams, M.G., McMichael, A.J., Davis, M.M.:

Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes
Science 247:94-6, 1996

Andl, T., Kahn, T., Pfuhl, A., Nicola, T., Erber, R., Conradt, C., Klein, W., Helbig, M., Weidauer, H., Bosch, F.X.:

Etiological involvement of oncogenic human papillomavirus in tonsillar squamous cell carcinoma lacking retinoblastoma cell cycle control
Cancer Res 58:5-13, 1998

Androphy, E.J., Lowy, D.R., Schiller, J.T.:

Bovine papillomavirus E2 trans-activating gene product binds to specific sites in papillomavirus DNA
Nature 325:70-3, 1987

Austyn, J.M.:

New insights into the mobilization and phagocytic activity of dendritic cells
J Exp Med 183:1287, 1996

Austyn, J.M. :

Lymphoid dendritic cells
Immunol 62:161-170, 1987

Bachmann, M.F., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M.:

Immunization with recombinant protein: conditions for cytotoxic T cell and/or antibody induction
Med Microbiol Immunol (Berl): 183:315-24, 1994

Bachmann, M.F., Kundig, T.M., Freer, G., Li, Y., Kang, C.Y., Bishop, D.H., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M.:

Induction of protective cytotoxic T cells with viral proteins
Eur J Immunol 24:2228-36, 1994

- Baird, P.J.
Serological evidence for the association of papillomavirus and cervical neoplasia
Lancet 2:17-8, 1983
- Banchereau, J., Steinman, R.:
Dendritic cells and the control of immunity
Nature 392:245-252, 1998
- Banchereau, J., Shuler-Thumer, B., Palucka, A.K., Schuler, G.:
Dendritic cells as vectors for therapy
Cell 106:271-4, 2001
- Barbosa, M.S., Vass, W.C., Lowy, D.R., Schiller, J.T.:
In vitro biological activities of the E6 and E7 genes vary among human papillomaviruses of different oncogenic potential
J Virol 65:292-8, 1991
- Bauer, M., Wagner, H., Lipford, G.B.:
HPV type 16 protein E7 HLA-A2 binding peptides are immunogenic but not processed and presented
Immunol Lett 71:55-59, 2000
- Boczkowski, D., Nair, S.K., Snyder, D., Gilboa, E.:
Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo
J Exp Med 184:465-72, 1996
- Bodinier, M., Peyrat, M.A., Tournay C.:
Efficient detection and immunomagnetic sorting of specific T cells using multimers of MHC class I and peptide with reduced CD8 binding
Nat Med 6:707-710, 2000
- Boyer, S.N., Wazer, D.E., Band, V.:
E7 protein of human papilloma virus -16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway.
Cancer Res 56:4620-4, 1996
- Brandsma, J.L., Abramson, A.L.:
Association of papillomavirus with cancers of the head and neck
Arch Otolaryngol Head Neck Surg 115:621-625, 1989
- Britten, C.M., Meyer, R.G., Kreer, T., Drexler, I., Wolfel, T., Herr, W.:
The use of HLA-A*0201-transfected K562 as standard antigen presenting cells for CD(+) T lymphocytes in IFN-gamma ELISPOT assays.
J Immunol Methods 259:95-110, 2002
- Broudy, V.C., Lin, N.L., Buhring, H.J., Komatsu, N., Kavanagh, T.J.:
Analysis of c-kit receptor dimerization by fluorescence resonance energy transfer
Blood 91:898-906, 1998

- Bubb, V., McCance, D.J., Schlegel, R.:
DNA sequence of the HPV-16 E5 ORF and the structural conservation of its encoded protein
Virology 163:243-6, 1998
- Burkhardt, A., Willingham, M., Gay, C., Jeang, K.T., Schlegel, R.:
The E5 oncoprotein of bovine papillomavirus is oriented asymmetrically in Golgi and plasma membranes
Virology 170:334-9, 1989
- Cardillo, M.R.:
Association of human papilloma virus and Chlamydia trachomatis infections with incidence cervical neoplasia
Eur J Gynaecol Oncol 6:218-21, 1985
- Cella, M., Sallusto, F., Lanzavecchia, A.:
Origin maturation and antigen presenting function of dendritic cells
Curr Opin Immunol 9:10-6, 1997
- Chen, L., Ashe, S., Brady, W.A., Hellstrom, I., Hellstrom, K.E., Ledbetter, J.A., McGowan, P., Linsley P.S.:
Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4
Cell 71:1093-102, 1992
- Chiang, C.M., Dong, G., Broker, T.R., Chow, L.T.:
Control of human papillomavirus type 11 origin of replication by the E2 family of transcription regulatory proteins
J Virol 66:5224-31, 1992
- Choo, K.B., Pan, C.C., Liu, M.S., Ng, H.T., Chen, C.P., Lee, Y.N., Chao, C.F., Meng, C.L., Yeh, M.Y., Han, S.H.:
Presence of episomal and integrated human papillomavirus DNA sequences in cervical carcinoma
J Med Virol 21:101-7, 1987
- Christensen, N.D., Hopfl, R., DiAngelo, S.L., Cladel, N.M., Patrick, S.D., Welsh, P.A., Budgeon, L.R., Reed, C.A., Kreider, J.W.:
Assembled baculovirus-expressed human papillomavirus type 11 L1 capsid protein virus-like particles are recognized by neutralizing monoclonal antibodies and induce high titres of neutralizing antibodies
J Gen Virol 75:2271-6, 1994
- Collins, J.E., Jenkins, D., McCance, D.J.:
Detection of human papillomavirus DNA sequences by in situ DNA-DNA hybridisation in cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma: a retrospective study
J Clin Pathol 41:289-95, 1988
- Conger, K.L., Liu, J.S., Kuo, S.R., Chow, L.T., Wang, T.S.:
Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human DNA polymerase alpha/primase
J Biol Chem 274:2696-705, 1999

- Daling, J.R., Sherman, K.J., Weiss, N.S.:
Risk factors for condyloma acuminatum in women
Sex Transm Dis 13:16-8, 1986
- Da Silva, D.M., Velders, M.P., Nieland, J.D., Schiller, J.T., Nickoloff, B.J., Kast, W.M.:
Physical interaction of human papilloma virus-like particles with immune cells
Int Immunol 13:633-41, 2001
- Day, P.M., Roden, R.B., Lowy, D.R., Schiller, J.T.:
The papillomavirus minor capsid protein, L2, induces localization of the major capsid protein, L1, and the viral transcription/replication protein, E2, to PML oncogenic domains
J Virol 72:142-50, 1998
- De Bruijn, M.L., Schuurhuis, D.H., Vierboom, M.P., Vermeulen, H., de Cock, K.A., Ooms, M.E., Rensing, M.E., Toebes, M., Franken, K.L., Drijfhout, J.W., Ottenhoff, T.H., Offringa, R., Melief, C.J.:
Immunization with human papillomavirus type 16 (HPV16) oncoprotein-loaded dendritic cells as well as protein in adjuvant induces MHC class I-restricted protection to HPV 16-induced tumor cells
Cancer Res 58:724-31, 1998
- De Bruijn, M.L., Nieland, J.D., Schumacher, T.N., Ploegh, H.L., Kast, W.M., Melief, C.J. :
Mechanisms of induction of primary virus-specific cytotoxic T lymphocyte responses
Eur J Immunol 22:3013-20, 1992
- De Weese, T.L., Walsh, J.C., Dillehay, L.E., Kessis, T.D., Hedrick, L., Cho, K.R., Nelson, W.G. :
Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins alter cell cycle progression but not radiosensitivity of carcinoma cells treated with low-dose-rate radiation
Int J Radiat Oncol Biol Phys 37:145-54, 1997
- Devaraj, K., Gillison, M.L., Wu, T.C.:
Development of HPV vaccines for HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma
Crit Rev Oral Biol Med 14:345-62, 2003
- De Villiers, E.M., Weidauer, H., Otto, H., zur Hausen, H.:
Papillomavirus DNA in human tongue carcinomas
Int J Cancer 36:575-8, 1985
- De Villiers, E.M., Fauquet, C., Broker, T.R., Bernard, H.U., zur Hausen, H.:
Classification of papillomaviruses
Virol 324:17-27, 2004
- Diebold, S.S., Kurs, M., Wagner, E., Cotten, M., Zenke, M.:
Mannose polyethylenimine conjugates for targeted DNA delivery into dendritic cells
J Biol Chem 274:19087-94, 1999
- Evander, M., Frazer, I.H., Payne, E., Qi, Y.M., Hengst, K., McMillan, N.A.:
Identification of the $\alpha 6$ integrin as a candidate receptor for papillomaviruses
J Virol 71:2449-2456, 1997

Evans, E.M., Man, S., Evans, A.S., Borysiewicz, L.K.:
Infiltration of cervical cancer tissue with human papillomavirus specific cytotoxic T lymphocytes
Cancer Res 57:2943-2950, 1997

Fairchild, P.J., Austyn, J.M.:
Thymic dendritic cells: phenotype and function
Int Rev Immunol 6:187-96, 1990

Firzlaff, J.M., et al. 1987
In Cancer Cells 5/Papillomaviruses (B.M. Steinberg, et al., Eds.), pp. 105-113 Cold Spring Harbor, Cold Springs Harbor, NY

Fujikawa, K., Furuse, M., Uwabe, K., Maki, H., Yoshie, O.:
Nuclear localization and transferring activity of human papillomavirus type 16 E7-beta-galactosidase fusion protein: characterization of the nuclear localization sequence
Virology 204:789-93, 1994

Gage, J.R., Meyers, C., Wettstein, F.O.:
The E7 proteins of the nononcogenic human papillomavirus type 6b (HPV-6b) and of the oncogenic HPV-16 differ in retinoblastoma protein binding and other properties
J Virol 64:723-30, 1990

Germain, R.N.:
Immunology. The ins and outs of antigen processing and presentation
Nature 322:687-9, 1986

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.:
Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers
J Natl Cancer Inst 92:709-20, 2000

Goldenberg, D., Golz, A., Joachims, H.Z.:
The beverage mate: a risk factor for cancer of the head and neck
Head Neck 25:595-601, 2003

Gong, J., Chen, D., Kashiwaba, M., Kufe, D.:
Induction of antitumor activity by immunization with fusions of dendritic and carcinoma cells
Nat Med 3:558-61, 1997

Greenberg, P.D.:
Adoptive T cell therapy of tumors: Mechanisms operative in the recognition and elimination of tumor cells
Adv in Immunol 49:281, 1991

Greenfield, I., Nickerson, J., Penman, S., Stanley, M.:
Human papillomavirus 16 E7 protein is associated with the nuclear matrix
Proc Natl Acad Sci USA 88:11217-21, 1991

- Halbert, C.L., Demers, G.W., Galloway, D.A.:
The E6 and E7 genes of human papillomavirus type 6 have weak immortalizing activity in human epithelial cells
J Virol 66:2125-34, 1992
- Haraf, D.J., Nodzenski, E., Brachman, D., Mick, R., Montag, A., Graves, D., Vokes, E.E., Weichselbaum, R.R.:
Human papilloma virus and p53 in head and neck cancer: clinical correlates and survival
Clin Cancer Res 2:755-62, 1996
- Hariharan, K., Braslawsky, G., Black, A., Raychaudhuri, S., Hanna, N.:
The induction of cytotoxic T cells and tumor regression by soluble antigen formulation
Cancer Res 55:3486-9, 1995
- Harrision, L.B., Zelefsky, M.J., Armstrong, J.G., Carper, E., Gaynor, J.J., Sessions, R.B.:
Performance status after treatment for squamous cell cancer of the base of tongue – a comparison of primary radiation therapy versus primary surgery
Int J Radiat Oncol Biol Phys 30:953-7, 1994
- Ho, P.S., Ko, Y.C., Yang, Y.H.:
The incidence of oropharyngeal cancer in Taiwan: an endemic betel quid chewing area
J Oral Pathol Med 31:213-9, 2002
- Hof, H. Dörries, R., Müller, R.L.:
Lehrbuch der Mikrobiologie Georg Thieme Verlag Stuttgart S. 215, 2000
- Hoffmann, T.K., Donnenberg, V., Friebe U., Meyer, M., Rinaldo, C.R., DeLeo, A.B., Whiteside, T.L., Donnenberg, A.D.:
Competition of peptide-MHC class I tetrameric complexes with anti-CD3 provides evidence for specificity of peptide binding to the TCR complex
Cytometry 41:321-28, 2000
- Hoffmann, T.K., Donnenberg, A.D., Finkelstein, S.D., Donnenberg, V.S., Friebe-Hoffmann, U., Myers, E.N., Appella, E., DeLeo, A.B., Whiteside, T.L.:
Frequency of Tetramer⁺ T cells specific for the wild-type sequence p53₂₆₄₋₂₇₂ peptide in the circulation of patients with head and neck cancer
Cancer Res 62:3521-29, 2002
- Hoffmann, T.K., Nakano, K., Elder, E., Dworacki, G., Finkelstein, S.D., Apella, E., Whiteside, T.L., DeLeo, A.B.:
Generation of T cells specific for the wild-type sequence p53₂₆₄₋₂₇₂ peptide in cancer patients – implications for immunoselection of epitope-loss variants
J Immunol 165:5938-5944, 2000
- Hoffmann, T.K., Whiteside, T.L., Bier, H.:
Squamous cell carcinoma of the head and neck. Principles and current concepts of immunotherapy
HNO 53:285-97, 2005

- Horwitz, B.H., Burkhardt, A.L., Schlegel, R., DiMaio, D.:
44-amino-acid E5 transforming protein of bovine papillomavirus requires a hydrophobic core and specific-terminal amino acids
Mol Cell Biol 8:4071-8, 1988
- Hsu, F.J., Benike, C., Fagnoni, F., Liles, T.M., Czerwinski, D., Taidi, B., Engleman, E.G., Levy, R.:
Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells
Nat Med 2:52-8, 1996
- Hsu, S.M., Raine, L., Fanger, H. :
Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques : a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures
J Histochem Cytochem 29:577-80, 1981
- Huang, H., Li, C.Y., Little, J.B.:
Abrogation of p53 function by transfection of HPV 16 E6 gene does not enhance resistance of human tumor cells to ionizing radiation
Int J Radiat Biol 70:151-60, 1996
- Hubbert, N.L., Sedman, S.A., Schiller, J.T.:
Human papillomavirus type 16 E6 increases the degradation rate of p53 in human keratinocytes
J Virol 66:6237-41, 1992
- Huibregtse, J.M., Scheffner, M., Howley, P.M.:
A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18
EMBO J 10:4129-35, 1991
- Inaba, K., Young, J.W., Steinman, R.M.:
Direct activation of CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells
J Exp Med 166:182-94, 1987
- Ishiji, T.:
Molecular mechanism of carcinogenesis by human papillomavirus-16
J Dermatol 27:73-86, 2000
- Jondal, M., Schirmbeck, R., Reimann, J.:
MHC class I restricted CTL responses to exogenous antigens
Immunity 5:295-302, 1996
- Kamb, A., Gruis, N.A., Weaver-Feldhaus, J., Liu, Q., Harshman, K., Tavitgian, S.V., Stockert, E., Day, R.S., Johnson, B.E., Skolnick, M.H.:
A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types
Science 264:436-440, 1994

Kaplan, J.M., Yu, Q., Piraino, S.T., Pennington, S.E., Shankara, S., Woodworth, L.A., Roberts, B.L.:

Induction of antitumor immunity with dendritic cells transduced with adenovirus vector-encoding endogenous tumor-associated antigens
J Immunol 163:699-707, 1999

Kast, W.M., Brandt, R.M.P., Drijfhout, J.W., Melief, C.J.M.:

Human leukocyte antigen-A2.1 restricted candidate cytotoxic T lymphocyte epitopes of human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins identified by using processing-defective human cell line T2
J Immunother 14:115, 1993

Kast, W.M., Brandt, R.M.P., Sidney, J., Drijfhout, J.W., Kubo, R.T., Melief, C.J.M., Sette, A.:

Role of HLA-A motifs in identification of potential CTL epitopes in human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins
J Immunol 152:3904, 1994

Kawana, Y., Kawana, K., Yoshikawa, H., Taketani, Y., Yoshiike, K., Kanda, T.:

Human papillomavirus type 16 minor capsid protein 12 N-terminal region containing a common neutralization epitope binds to the cell surface and enters the cytoplasm
J Virol 75:2331-6, 2001

Ke, Y., Ying, L., Kapp, J.A.:

Ovalbumin injected with complete Freund's adjuvant stimulates cytolytic responses
Eur J Immunol 25:549-553, 1995

Klaes, R., Friedrich, T., Spitkovsky, Ridder, R. Rudy, W., Petry, U., Dallenbach-Hellweg, G., Schmidt, D., von Knebel Doeberitz, M.:

Overexpression of p16(INKA4) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri
Int J Cancer 92:276-84, 2001

Klussman, J.P., Dinh, S., Wittekindt, C., Turek, L., Speel, E.J., Weißenborn, S., Pfister, H., Stennert, E.:

HPV-DNA-Integration in Oropharynxkarzinomen
Vortrag zur 75. Jahreshauptversammlung 2004 der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie; 19.-23. Mai 2004, Bad Reichenhall

Klussmann, J.P., Gültekin, E., Weissenborn, S.J., Wieland, U., Dries Vdienes, H.P., Eckel, H.E., Pfister, H.J., Fuchs, P.G.:

Expression of p16 Protein Identifies a Distinct Entity of Tonsillar Carcinomas Associated with Human Papillomavirus
Am J Pathol 162:747-53, 2003

Klussmann, J.P., Weissenborn, S., Wieland, U., Dries, V., Kolligs, J., Jungehuelsing, M., Eckel, H.E., Dienes, H.P., Pfister, H., Fuchs, P.:

Prevalence, distribution and viral load of human papillomavirus 16 DNA in tonsillar carcinomas
Cancer 92:2875-84, 2001

Knight, S.C., Hunt, R., Dore, C., Medawar, P.B.:
Influence of dendritic cells on tumor growth
Proc Natl Acad Sci USA 82:4495-7, 1985

Kuo, S.R., Liu, J.S., Broker, T.R., Chow, L.T.:
Cell-free replication of the human papillomavirus DNA with homologous viral E1 and E2
proteins human cell extracts
J Biol Chem 269:24058-65, 1994

Lang, S., Wollenberg, B., Dellian, M., Steuer-Vogt, M.K., Schwenzer, K., Sautier, W.,
Chucholowski, M., Eckel, R., Faas, I., Wilmes, E., Ehrenfeld, M., Arnold, W., Kastenbauer,
E., Holzel, D.:
Clinical and epidemiological data of patients with malignomas of the head and neck
Laryngorhinootologie 81:499-508, 2002

Lanzavecchia, A.:
Antigen-specific interaction between T and B cells
Nature 314:537-9, 1985

Larsen, C.P., Morris, P.J., Austyn, J.M.:
Migration of dendritic leukocytes from cardiac allografts into host spleen. A novel pathway
for initiation of rejection
J Exp Med 171:307-14, 1990

LeCann, P., Coursaget, P., Iochmann, S., Touze, A. :
Self-assembly of human papillomavirus type 16 capsids by expression of the L1 protein in
insect cells
FEMS Microbiol Lett 117:269-74, 1994

Ledwaba, T., Dlamini, Z., Naicker, S., Bhoola, K.:
Molecular genetics of human cervical cancer: role of papillomavirus and the apoptotic
cascade
Biol Chem 385:671-82, 2004

Li, W., Thompson, C.H., Cossart, Y.E., O'Brien, C.J., McNeil, E.B., Scolyer, R.A., Rose,
B.R.:
The expression of key cell cycle markers and presence of human papillomavirus in squamous
cell carcinoma of the tonsil
Head Neck 26:1-9, 2004

Li, Y., Nichols, M.A., Shay, J.W., Xiong, Y.:
Transcriptional repression of the susceptibility gene product pRb
Cancer Res 54:6078-6082, 1994

Licitra, L., Bernier, J., Grandi, C., Merlano, M., Bruzzi, P., Lefebvre, J.L.:
Cancer of the oropharynx
Crit Rev Oncol Hematol 41:107-22, 2002

- Liu, J.S., Kuo, S.R., Broker, T.R., Chow, L.T.:
The functions of human papillomavirus type 11 E1, E2, and E2C proteins in cell-free DNA replication
J Biol Chem 270:27283-91, 1995
- Longworth, M.S., Laimins, L.A.:
Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia.
Microbiol Mol Biol Rev 68:362-72, 2004
- Loning, T., Ikenberg, H., Becker, J., Gissmann, L., Hoepfer, I., zur Hausen, H.:
Analysis of oral papillomavirus type related DNA
J Invest Dermatol 84:417-20, 1985
- Lozzio, C.B., Lozzio, B.B.:
Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome
Blood 45:321, 1975
- Macatonia, S.E., Taylor, P.M., Knight, S.C., Askonas, B.A.:
Primary stimulation by dendritic cells induces antiviral proliferative and cytotoxic T cell responses in vitro
J Exp Med 169:1255-64, 1989
- Marincola, F.M., Jaffee, E.M., Hicklin, D.J., Ferrone, S.:
Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance
Adv Immunol 74:181, 2000
- Martinez-Kinader, B., Lipford, G.B., Wagner, H., Heeg, K.:
Sensitization of MHC class I restricted T cells to exogenous proteins: evidence for an alternative class I restricted antigen presentation pathway
Immunology 86:287-95, 1995
- Matsui, K., Boniface, J.J., Reay, P.A., Schild, H., Fazekas de St Groth, B., Davis, M.M.:
Low affinity interaction of peptide-MHC complexes with T cell receptors
Science 254:1788-91, 1991
- McBride, A.A., Schlegel R., Howley, P.M.:
The carboxy-terminal domain shared by the bovine papillomavirus E2 transactivator and repressor proteins contains a specific DNA binding activity
EMBO J 7:533-9, 1988
- McDance, D.J.:
Human Papillomavirus (HPV) infections in the aetiology of cervical cancer
Cancer Surv 7:499-506, 1988
- McDougall, J.K.:
Immortalization and transformation of human cells by human papillomavirus
Curr Top Microbiol Immunol 186:101-119, 1994

- McNeil, C.:
HPV vaccines for cervical cancer move toward clinic, encounter social issues
J Natl CancerInst 89:1664-6
- Meanwell, C.A., Cox, M.F., Blackledge, G., Maitland, N.J.:
HPV 16 DNA in normal and malignant cervical epithelium: implications for the aetiology and behaviour of cervical neoplasia
Lancet 1:703-7, 1987
- Meidenbauer, N., Hoffmann, T.K., Donnenberg, A.D.:
Direct visualization of antigen-specific T cells using peptide-MHC-class I tetrameric complexes.
Methods 31:111-2, 2003
- Mendenhall, W.M., Riggs, C.E., Cassisi, N.J.:
Treatment of head and neck cancers
In: Cancer: Principles and Practice of Oncology, 2005
- Metlay, J.P., Pure, E., Steinman, R.M.:
Control of the immune response at the level of antigen-presenting cells: a comparison of the function of dendritic cells and B lymphocytes
Adv Immunol 47:45-116, 1989
- Mohmadzadeh, M., Pavlidou, A., Enk, A., Knop, J., Ruede, E., Gradehandt, G.:
Freshly isolated mouse 4F7+ splenic dendritic cells process and present exogenous antigens to T cells
Eur J Immunol 24:3170-4, 1994
- Mohmadzadeh, M., Berard, F., Essert, G., Chaloini, C., Pulendran, B., Davoust, J., Palucka, K., Banchereau, J.:
Interleukin-15 skews monocytes differentiation into dendritic cells with features of Langerhans cells
J Exp Med 194:1013-20, 2001
- Mohmadzadeh, M., Luftig, R.:
Dendritic cells: In the forefront of immunopathogenesis and vaccine development – A review
Journal of Immune Based Therapies and Vaccines 2:1 doi:10.1186/1476-8518-2-1, 2004
- Moon, M.S., Lee, C.J., Um, S.J., Park, J.S., Yang, J.M., Hwang, E.S.:
Effect of BPV1 E2-mediated inhibition of E6/E7 expression in HPV16 positive cervical carcinoma cells.
Gynecol Oncol 80:168-75, 2001
- Mork, J., Lie, A.K., Glatte, E., Clark, S., Hallmans, G., Jellum, E., Koskela, P., Moller, B., Pukkala, E., Schiller, J.T., Wang, Z., Youngman, L., Lehtinen, M., Dillner, J.:
Human Papillomavirus Infection as a Risk Factor for Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck
N Eng J Med 344:213-9, 2002

Muderspach, L., Wilczynski, S., Roman, L., Bade, L., Felix, J., Small, L.A., Kast, W.M., Fascio, G., Marty, V., Weber, J.:

A phase I trial of a human papillomavirus (HPV) peptide vaccine for women with high-grade cervical and vulvar intraepithelial neoplasia who are HPV 16 positive

Clin Cancer Res 6:3406-16, 2000

Nestle, F.O., Alijagic, S., Gilliet, M., Sun, Y., Grabbe, S., Dummer, R., Burg, G., Schadendorf, D.:

Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate – pulsed dendritic cells

Nat Med 4:328-32, 1998

Neville, B.W., Day, T.A.:

Oral Cancer and Precancerous Lesions

CA Cancer J Clin 52:195-215, 2002

Niedobitek, G., Pitteroff, S., Herbst, H., Shepherd, P., Finn, T., Anagnostopoulos, I., Stein, H.:

Detection of human papillomavirus type 16 DNA in carcinomas of the palatine tonsil

J Clin Pathol 43:918-21, 1990

Nindl, I., Lotz, B., Kuhne-Heid, R., Endisch, U., Schneider, A.:

Distribution of 14 high risk HPV types in cervical intraepithelial neoplasia detected by a non-radioactive general primer PCR mediated enzyme immunoassay

J Clin Pathol 52:17-22, 1999

Nobori, T., Miura, K., Wu, D.J., Lois, A., Takabayashi, K., Carson, D.A.:

Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers

Nature 368:753-756, 1994

Nonn, M., Schinz, M., Zumbach, K., Pawlita, M., Schneider, A., Dürst, M., Kaufmann, A.M.:

Dendritic cell-based tumor vaccine for cervical cancer I: in vitro stimulation with recombinant protein-pulsed dendritic cells induces specific T cells to HPV 16 E7 or HPV 18 E7

J Cancer Res Clin Oncol 129:511-520, 2003

Nuovo, G.J.:

Detection of human papillomavirus in Papanicolaou smears: correlation with pathologic findings and clinical outcome

Diagn Mol Pathol 7:158-63, 1998

Ogg, G.S., McMichael, A.J.:

HLA-peptide tetrameric complexes

Curr Opin Immunol 10:393-396, 1998

Olmi, P., Crispino, S., Fallai, C., Torri, V., Rossi, F., Bolner, A., Amichetti, M., Signor, M., Taino, R., Squadrelli, M., Colombo, A., Ardizzioia, A., Ponticelli, P., Franchin, G., Minatel, E., Gobitti, C., Atzeni, G., Gava, A., Flann, M., Marsoni, S.:

Locoregionally advanced carcinoma of the oropharynx: conventional radiotherapy vs. accelerated hyperfractionated radiotherapy vs. concomitant radiotherapy and chemotherapy – a multicenter randomized trial.

Int J Radiat Oncol Biol Phys 55:78-92, 2003

Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay J., Pisani, P. :
Global cancer statistics 2002
CA Cancer J Clin 55:74-108, 2005

Paz, I.B., Cook, N., Odom-Maryon, T., Xie, Y., Wilczynski, S.P.:
Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. An association of HPV 16 with
squamous cell carcinoma of Waldeyer 's tonsillar ring
Cancer 79:595-604, 1997

Phelps, W.C., Howley, P.M.:
Transcriptional trans-activation by the human papillomavirus type 16 E2 gene product
J Virol 61:1630-8, 1987

Pilotti, S., Rilke, F., Alasio, L., Fontanelli, R.:
Histologic evidence for an association of cervical intraepithelial neoplasia with human
papilloma virus infection
Diag Gynecol Obstet 4:357-62, 1982

Rantanen, V., Grenman, S., Kurvinen, K., Hietenen, S., Raitanen, M., Syrjanen, S.:
p53 mutations and presence of HPV DNA do not correlate with radiosensitivity of
gynecological cancer cell lines
Gynecol Oncol 71:352-8, 1998

Raychaudhuri, S., Tonks, M., Carbone, F.R., Ryskamp, T., Morrow, W.J.:
Induction of antigen specific class I restricted cytotoxic T cells by soluble proteins in vivo
Proc Natl Acad Sci USA 89:8308-12, 1992

Reddy, R., Zhou, F., Nair, S., Huang, L., Rouse, B.T.:
In vivo cytotoxic T lymphocyte in induction with soluble proteins administered in liposomes
J Immunol 148:1585-9, 1992

Reimann, J., Bohm, W., Schirmbeck, R.:
Alternative processing pathways for MHC class I restricted epitope presentation of CD8⁺
cytotoxic lymphocytes
Biol Chem 375:731-6, 1994

Ressing, M.E., Sette, A., Brandt, R.M.P., Ruppert, J., Wentworth, P.A., Hartmann, M.,
Oseroff, C., Grey, H.M., Melief, C.J.M., Kast, W.M.:
Human CTL epitopes encoded by human papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through
in vivo and in vitro immunogenicity of HLA-A*0201-binding peptides
J Immunol 154:5934-43, 1995

Ressing, M.E., van Driel, W.J., Celis, E., Sette, A., Brandt, M.P., Hartman, M., Anholts, J.D.,
Schreuder, G.M., ter Harmsel, W.B., Fleuren, G.J., Trimbos, B.J., Kast, W.M., Melief, C.J.:
Occasional memory cytotoxic T-cell responses of patients with human papillomavirus type
16-positive cervical lesions against a human leucocyte antigen-A*0201-restricted E7-
encoded epitope
Cancer Res 56:582-588, 1996

Ressing, M.E., van Driel, W.J., Brandt, R.M.P., Kenter, G.G., de Jong, J.H., Bauknecht, T., Fleuren, G.J., Hoogerhout, P., Offringa, R., Sette, A., Celis, E., Grey, H., Trimbos, B.J., Kast, W.M., Melief, C.J.M.:

Detection of T helper responses, but not of human papillomavirus specific cytotoxic T lymphocyte responses, after peptide vaccination of patients with cervical carcinoma
J Immunother 23:255-266, 2000

Riede, U.N., Werner, M., Schäfer, H.E.:

Lehrbuch der Allgemeinen und speziellen Pathologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart, S.350 f., 2004

Ritchie, J.M., Smith, E.M., Summersgill, K.F., Hoffman, H.T., Wang, D., Klusmann, J.P., Turek, L.P., Haugen, T.H.:

HPV infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx
Int J Cancer 104:336-44, 2003

Rock, K.L., Gamble, S., Rothstein, L.:

Presentation of exogenous antigen with class I major histocompatibility complex molecules
Science 249:918-21, 1990

Sallusto, F., Lanzavecchia, A. :

Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin-4 and down regulated by tumor necrosis factor alpha.

J Exp Med 179:1109-18, 1994

Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., Lanzavecchia, A.:

Dendritic cells use macropinocytosis and mannose receptor to concentrate antigen in the MHC class II compartment. Downregulation by cytokines and bacterial products

J Exp Med 182:389-400, 1995

Sanchez, M.J., Martinez, C., Nieto, A. :

Oral and oropharyngeal cancer in Spain : influence of dietary patterns

Eur J Cancer Prev 12:49-56, 2003

Sano, T., Oyama, T., Kashiwabara, K., Fukuda, T., Nakajima, T.:

Immunohistochemical overexpression of p16 protein associated with intact retinoblastoma protein expression in cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia

Pathol Int 48:580-5, 1998

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 153:1741-8, 1998

Sathish, N., Abraham, P., Peedicayil, A., Sridharan, G., John, S., Chandy, G.:

Human papillomavirus 16 E6/E7 transcript and E2 gene status in patients with cervical neoplasia

Mol Diagn 8:57-64, 2004

- Santin, A., Hermonat, P.L., Ravaggi, A., Chiriva-Internati, M., Pecorelli, S., Parham, G.P.:
Radiation-enhanced expression of E6/E7 transforming oncogenes of human papillomavirus-16 in human cervical carcinoma
Cancer 83:2346-52, 1998
- Schirmbeck, R., Zerrahn, J., Kuhrober, A., Kury, A., Deppert, W., Reimann, J.:
Immunization with soluble simian virus 40 large T antigen induces a specific response of CD3⁺ CD4⁻ CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes in mice
Eur J Immunol 22:759-66, 1992
- Schirmbeck, R., Bohm, W., Reimann, J.:
Injection of detergent-denatured ovalbumin primes murin class I restricted cytotoxic T cells in vivo
Eur J Immunol 24:2068-72, 1994
- Schirmbeck, R., Deml, L., Melber, K., Wolf, H., Wagner, R., Reimann, J.:
Priming of class I restricted cytotoxic T lymphocytes by vaccination with recombinant protein antigens
Vaccine 13:857-65, 1995
- Schlegel, R., Wade-Glass, M., Rabson, M.S., Yang, Y.C.:
The E5 transforming gene of bovine papillomavirus encodes a small, hydrophobic polypeptide
Science 233:464-7, 1986
- Schlesinger-Raab, A., Lang, S., Steuer-Vogt, M.K., Hölzel, D.:
Zur Epidemiologie der Kopf-Hals-Malignome
Manual Kopf-Hals-Malignome Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München, 2003
- Schwartz, S.M., Daling, J.R., Doody, D.R., Wipf, G.C., Carter, J.C., Madeleine, M.M., Mao, E.-J., Fitzgibbons, E.D., Huang, S., Beckmann, A.M., McDougall, J.K., Galloway, D.:
Oral Cancer Risk in Relation to Sexual History and Evidence of Human Papillomavirus Infection
Journal of the National Cancer Institute 90:1626-1636, 1998
- Serrano, M., Hannon, G.J., Beach, D.:
A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4
Nature 366:704-707, 1993
- Sharma, B.K., Gupta, M.M., Das, D.K., Singh, V., Luthra, U.K.:
Immunohistochemical identification of human papillomavirus infection in tissues from cervical precancerous and early cancerous lesions among Indian women
Ann Biol Clin 46:113-5, 1988
- Smith, E.M., Hoffman, H.T., Summersgill, K.S., Kirchner, H.L., Turek, L.P., Haugen, T.H.:
Human papillomavirus and risk of oral cancer
Laryngoscope 108:1098-103, 1998

Smotkin, D., Wettstein, F.O.:

Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein

Proc Natl Acad Sci USA 83:4680-4, 1986

Snijders, P.J., Cromme, F.V., van den Brule, A.J., Schrijnemakers, H.F., Snow, G.B., Meijer, C.J., Walboomers, J.M.:

Prevalence and expression of human papillomavirus in tonsillar carcinomas, indicating a possible viral etiology

Int J Cancer 51:845-50, 1992

Spalholz, B.A., Yang, Y.C., Howley, P.M.:

Transactivation of a bovine papilloma virus transcriptional regulatory element by the E2 gene product

Cell 42:183-91, 1985

Steinman, R.M.:

The dendritic cell system and its role in immunogenicity

Annu Rev Immunol 9:271-296, 1991

Steller, M.A., Gurski, K.J., Murakami, M., Daniel, R.W., Shah, K.V., Celis, E., Sette, A., Trimble, E.L., Park, R.C., Marincola, F.M.:

Cell-mediated immunological responses in cervical and vaginal cancer patients immunized with alipidated epitope of human papillomavirus type 16 E7

Clin Cancer Res 4:2103-2109, 1998

Street, M.D., Doan, T., Herd, K.A., Tindle, R.W.:

Limitations of HLA-transgenic mice in presentation of HLA-restricted cytotoxic T-cell epitopes from endogenously processed human papillomavirus type 16 E7 protein

Immunology 106:526-36, 2002

Suzuki, T., Adachi, A., Tomita, Y.:

Characteristic intracytoplasmic material in a perianal wart that contains human papillomavirus type 56 and 16 DNA

Dermatology 203:14-8, 2001

Swindle, C.S., Zou, N., Van Tine, B.A., Shaw, G.M., Engler, J.A., Chow, L.T.:

Human papillomavirus DNA replication compartments in a transient DNA replication system

J Virol 73:1001-9, 1999

Syrjanen, K., Syrjanen, S., Pyrhonen, S.:

Human papilloma virus (HPV) antigens in lesions of laryngeal squamous cell carcinomas

ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec 44:323-34, 1982

Syrjanen, K., Syrjanen, S., Lamberg, M., Pyrhonen, S., Nuutinen, J.:

Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis

Int J Oral Surg 12:418-24, 1983

Syrjanen, K.J.:

Spontaneous evolution of intraepithelial lesions according to the grade and type of the implicated human papillomavirus (HPV).

Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 65:45-53, 1996

Tagami, H.:

Regression phenomenon of numerous flat warts-an experiment on the nature of tumor immunity in man

Int J Dermatol 22:570-571, 1983

Thierry, F., Yaniv, M.:

The BPV1-E2 trans-acting protein can be either an activator or a repressor of the HPV 18 regulatory region

EMBO J 6:3391-7, 1987

Tilston, P.:

Anal human papillomavirus and anal cancer

J Clin Pathol 50:625-34, 1997

Tommasino, M.:

Papillomaviruses in human cancer: the Role of E6 and E7 oncoproteins

Heidelberg: Springer-Verlag, 1997

Ulmer, J.B., Donnelly, J.J., Liu, M.A.:

Presentation of an exogenous antigen by major histocompatibility complex class I molecules

Eur J Immunol 24:1590-6, 1994

Um, S.J., Lee, S.Y., Kim, E.J., Myoung, J., Namkoong, S.E., Park, J.S.:

Down-regulation of human papillomavirus E6/E7 oncogene by arsenic trioxide in cervical carcinoma cells

Cancer Lett 181:11-22, 2002

Unger, E.R., Vernon, S.D., Hewan-Lowe, K.O., Lee, D.R., Thoms, W.W., Reeves, W.C.:

An unusual cervical carcinoma showing exception to epitheliotropism of human papillomavirus

Hum Pathol 30:483-5, 1996

Van Driel, W.J., Rensing, M.E., Kenter, G.G., Brandt, R.M., Krul, E.J., van Rossum, A.B., Schuurin, E., Offringa, R., Bauknecht, T., Tamm-Hermelink, A., van Dam, P.A., Fleuren, G.J., Kast, W.M., Melief, C.J., Trimbos, J.B.:

Vaccination with HPV16 peptides of patients with advanced cervical carcinoma: clinical evaluation of a phase I-II trial

Eur J Cancer 35:946-52

Weaver, C.T., Unanue, R.T.:

The costimulatory function of antigen presenting cells

Immunol Today 11:49-55, 1990

Weinberger, P.M., Yu, Z., Haffty, B.G., Kowalski, D., Harigopal, M., Sasaki, C., Rimm, D.L., Psyrri, A.:
Prognostic significance of p16 protein levels in oropharyngeal squamous cell cancer
Clin Cancer Res 10:5684-91, 2004

Welkoborsky, H.J., Bleier, R., Wissen-Siegert, I.:
Antineoplastic effectiveness and unwanted side effects of polychemotherapy of extensive oro- and hypopharyngeal cancers – results of a prospective therapy study with 5-FU/cisplatin versus 5-FU/carboplatin
Laryngorhinootologie 71:261-6, 1992

Werness, B.A., Levine, A.J., Howley, P.M.:
Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53
Science 248:76-9, 1990

Whiteside, T.L.:
Signaling defects in T lymphocytes of patients with malignancy
Cancer Immunol Immunother 48:346-351, 1999

Wittekindt, C., Gultekin, E., Weissenborn, S.J., Dienes, H.P., Pfister, H.J., Klussmann, J.P.:
Expression of p16 protein is associated with human papillomavirus status in tonsillar carcinomas and has implications on survival
Adv Otorhinolaryngol 62:72-80, 2005

Wu, T.C.:
Immunology of the human papilloma virus in relation to cancer
Curr Opin Immunol 6:746-754, 1994

Youde, S.J., Dunbar, P.R., Evans, E.M., Fiander, A.N., Borysiewicz, L.K., Cerundolo, V., Man, S.:
Use of fluorogenic histocompatibility leukocyte antigen-A*201/HPV 16 E7 peptide complexes to isolate rare human cytotoxic T-lymphocyte-recognizing endogenous human papillomavirus antigens
Cancer Res 60:365-71, 2000

Zhou, J., Sun, X.Y., Louis, K., Frazer, I.H.:
Interaction of human papillomavirus (HPV) type 16 capsid proteins with HPV DNA requires an intact L2 N-terminal sequence
J Virol 68:619-25, 1994

Zheng, L., Huang, X.L., Fan, Z., Borowski, L., Wilson, C.C., Rinaldo, C.R. Jr.:
Delivery of liposome-encapsulated HIV type 1 proteins to human dendritic cells for stimulation of HIV type 1-specific memory cytotoxic T lymphocyte responses
AIDS Res Hum Retroviruses 15:1011-20, 1999

Zur Hausen, H.:
Papillomavirus infections – a major cause of human cancers
Biochem Biophys Acta 1288:55-78, 1996

Zur Hausen, H.:
Papillomaviruses in Human Cancers
Proceedings of the Association of American Physicians 111:6 1999

9. Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Complex
AJCC	American Joint Committee on Cancer
APC	Allophycocyanin
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
BSA	Bovines Serum Albumin
bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2 Gen
CD	Cluster of differentiation
CDK	Cyclin dependant kinase
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CIN	Zervikale intraepitheliale Neoplasie
CTL	Cytotoxic T lymphocyte
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
ds-DNA	doppelsträngige DANN
DZ	Dendritische Zelle
ELISPOT	Enzyme-linked immunospot
ERND	Erweiterte radikale Neck dissection
FBS	Fetales Bovines Serum
FITC	Fluorescein-isothiocyanate
GADD45	Growth-arrest-and DNA damage-inducible gene
GM-CSF	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
GP-PCR	General-primer-mediated polymerase chain reaction
HLA	Human leucocyte antigen
HPV	Humane Papilloma Viren
HRP	Horseradish-peroxidase
IFN	Interferon
IGF-BP3	Insulin-like growth factor binding protein 3
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
kD	Kilo-Dalton
LCR	Long control region
MAP	Mitogen activated protein

MHC	Major histocompatibility complex
m-RNA	messenger-RNA
MRND	Modifiziert radikale Neck dissection
MTX	Methotrexat
NK	Natürliche Killerzellen
Nn. II.	Nodi lymphatici
PBS	Phosphate buffered saline
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PDGF	Platelet derived growth factor
PE	Phycoerythrin
PEK	Plattenepithelkarzinom
PIN	Penile intraepitheliale Neoplasie
TAA	Tumor assoziierte Antigene
TNF	Tumornekrosefaktor
UICC	Union Internationale Contre Cancer
URR	Upstream regulating region
RB	Retinoblastom-Gen
RND	Radikale Neck dissection
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
VAIN	Vaginale intraepitheliale Neoplasie
VIN	Vulvaäre intraepitheliale Neoplasie
VLP	Virus-like particles
5-FU	5-Fluorouracil

10. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. T.K. Hoffmann für die Überlassung des Themas, die umfassende Betreuung und großzügige Unterstützung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H. Bier danke ich herzlichst für seine wertschätzende Unterstützung, da er mir stets mit seinem Rat zur Seite stand.

Mein Dank gilt natürlich auch allen Patienten, die diese Arbeit durch ihr Einverständnis erst ermöglicht haben.

Frau K. Schirlau bin ich für die Einarbeitung sowie ihre stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung im Laboralltag zu sehr großem Dank verpflichtet.

Bei Herrn Dr. M. Bas und Frau I. Depke möchte ich mich für die Einarbeitung in die Durchflußzytometrie bedanken.

Zuletzt danke ich meinen Eltern, die mir das Studium der Humanmedizin ermöglicht haben.

Die vorliegende Arbeit wurde zum Teil von der Deutschen Krebshilfe gefördert (Antragsnummer: 70-2976-Ho I).

11. Lebenslauf

Name: Arsov
Vorname: Christian
Geburtstag: 11.07.1976
Geburtsort: Duisburg
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulischer/beruflicher Werdegang

08/1983 – 06/1987	Katholische Grundschule Eschenstraße Duisburg
08/1987 – 01/1994	Steinbart-Gymnasium Duisburg
01/1994 – 06/1996	Landfermann-Gymnasium Duisburg Abschluß: Allgemeine Hochschulreife
08/1996 – 06/1998	Ausbildung zum Bankkaufmann Deutsche Bank AG Duisburg
06/1998 – 09/1998	Kaufmännischer Angestellter bei der Deutschen Bank AG Duisburg
seit 10/1998	Studium der Humanmedizin an der Heinrich Heine Universität Düsseldorf
08/2000	Ärztliche Vorprüfung in Düsseldorf Gesamtnote sehr gut (1,00)
08/2001	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Düsseldorf Note sehr gut
11/2001	Aufnahme als Stipendiat in die Studien- stiftung des deutschen Volkes
03/2004	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Düsseldorf Gesamtnote sehr gut (1,00)

Praktisches Jahr

04/2004 – 08/2004	Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Universität Düsseldorf
08/2004 – 12/2004	Klinik für Chirurgie Kantonsspital St. Gallen Schweiz
12/2004 – 01/2005	Klinik für Nephrologie der Universität Düsseldorf
01/2005 – 02/2005	Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie der Universität Düsseldorf
06/2005	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Düsseldorf (Gesamtnote der Ärztlichen Prüfung: sehr gut (1,00))
seit 09/2005	Wissenschaftlicher Assistent am Zentrum für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Universität Bonn

Zusammenfassung

Die aktive Immunisierung mit Tumor-assoziierten Antigenen zielt auf die Induktion einer zytotoxischen T-Zell Antwort und könnte sich im Sinne einer Impfung zur Vernichtung kleiner, durch die konventionelle Behandlung nicht erfasster Tumormanifestationen eignen. Kürzlich wurden bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen (PEK) des Kopf-Hals-Bereichs spezifische T-Zell Reaktionen gegen Epitope des Tumorsuppressors p53 beschrieben. Um konzeptionelle Nachteile des in Tumor- und Normalgewebe zwar unterschiedlich, aber letztendlich ubiquitär exprimierten p53-Antigens zu umgehen, befasst sich die vorliegende Arbeit mit einem Tumor-assoziierten *de novo* Antigen, dem bei PEK des Oropharynx häufig anzutreffenden E7 Onkoprotein des Humanen Papillomavirus (HPV) 16.

Bei 20 HLA-A2.1⁺ Patienten mit einem PEK des Oropharynx und 20 gesunden HLA-A2.1⁺ Individuen wurde mit entsprechenden Antigen-HLA-A2.1 Komplexen in der Mehrfarben-Durchflußzytometrie die spezifische T-Zell Antwort gegenüber den Oligopeptiden (Epitope) HPV16 E7₁₁₋₂₀, E7₈₂₋₉₀ und E7₈₆₋₉₃ analysiert (Tetramertechnologie). Anschließend erfolgte die Korrelation dieser Immunparameter mit der immunhistochemischen Expression von HPV16 E7 und p16 (Surrogatparameter für HPV16 Infektion) in den jeweiligen Tumoren. In weiterführenden Untersuchungen wurden Blutlymphozyten mit autologen dendritischen Zellen, die mit den genannten E7-Epitopen beladen worden waren, *in vitro* stimuliert und propagiert. Die Austestung der spezifischen Reaktivität der resultierenden T-Zellpopulationen erfolgte gegen HLA-A2.1/HPV16⁺ CaSki- sowie Peptid-beladene/HLA-A2.1⁺-transfizierte K562-Zellen (IFN-γ ELISPOT Assay).

Patienten mit PEK des Oropharynx wiesen insgesamt für 2 der 3 Epitope erhöhte Frequenzen HPV16 E7 spezifischer T-Zellen im Vergleich zu gesunden Kontrollen auf. Eine signifikante Erhöhung zeigte sich aber ausschließlich für das HPV16 E7₁₁₋₂₀ Epitop bei Patienten mit HPV16 E7 exprimierenden Oropharynxkarzinomen. HPV16 E7₁₁₋₂₀-spezifische T-Zellen konnten *in vitro* erfolgreich expandiert und ihre spezifische Immunreaktivität durch anti-HLA Klasse I Antikörper unterbunden werden.

Die vorliegende Arbeit zeigt, daß Patienten mit HPV-positiven Oropharynxkarzinomen zirkulierende HPV16 E7-spezifische T-Vorläuferzellen besitzen, die *in vitro* zu entsprechenden Effektorzellen ausdifferenzieren können. Somit ist eine wichtige Voraussetzung für das Konzept einer HPV16 E7-basierten Tumorimpfung gegeben.

gez. Priv-Doz. Dr. med. T.K. Hoffmann

