

Aus der Klinik für Gynäkologie mit Schwerpunkt gynäkologischer
Onkologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Immunogenität der quadrivalenten HPV-Impfung und Effekte
auf HPV-spezifische Antikörpertiter bei trachelektomierten
Patientinnen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Florian Peter

aus Freiburg i. Br.

Datum der Promotion: 04.09.2015

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	IV
ABSTRACT	VI
1. EINLEITUNG	1
Das humane Papillomavirus	1
Das Zervixkarzinom	2
Epidemiologie des Zervixkarzinoms	2
Pathogenese des Zervixkarzinoms	3
Condyloma acuminata	6
Klassifikation des Zervixkarzinoms	7
Diagnostik	8
Therapie	8
Operative Verfahren mit Entfernung des Uterus	9
Die radikale vaginale Trachelektomie	9
Die radikale abdominale Trachelektomie	13
Präventive Maßnahmen	13
Sekundärprävention – Krebsfrüherkennung	13
Primärprävention – Impfung	14
<i>Immunantwort nach HPV-Impfung</i>	16
Zielsetzung und Fragestellung	17
2. PATIENTINNEN, MATERIAL UND METHODEN	19
Patientinnen	19
Patientinnenkollektiv	19
Einschlusskriterien	19
Follow-Up	22
Material	22
Blutentnahmen	22
Zervix-Abstriche	22
Konisationspräparate zur Typisierung des ursprünglichen HPV	23
Tabelle 4: Verwendete Labormaterialien und –geräte	23

Methoden	25
Impfzeitpunkt	25
Abstrich- und Blutentnahmezeitpunkt	25
Bestimmung der Antikörpertiter im Blutplasma	26
<i>Gewinnung des Plasmas</i>	26
<i>Erhebung der Antikörpertiter durch einen serologischen Multiplex-Assay (Luminex)</i>	26
Typisierung des HPV im Primärtumor	27
<i>Herstellung von Paraffinschnitten aus Paraffinblöcken:</i>	27
<i>Aufreinigung der DNA aus den Paraffinschnitten</i>	27
<i>Amplifikation der DNA mittels GP5⁺/6⁺-Bio-PCR</i>	28
Aufarbeitung der HPV-Zervixabstriche	28
<i>HPV-Typisierung der Abstriche mittels Luminex-Technologie</i>	29
Statistische Auswertung	30
3. ERGEBNISSE	33
Deskriptive Beschreibung der Studienpopulation	33
Deskriptive Titerentwicklung	35
Ergebnisse des gemischten linearen Modells	38
Einfluss von Impfung und HPV-Typ im Primärtumor auf die Antikörpertiter gegen HPV-16	39
Einfluss von Impfung und HPV-Typ im Primärtumor auf die Antikörpertiter gegen HPV-18	42
Einfluss von Impfung und HPV-Typ im Primärtumor auf die Antikörpertiter gegen HPV-31	44
Einfluss von Impfung und HPV-Typ im Primärtumor auf die Antikörpertiter gegen HPV-45	46
Einfluss von Impfung und HPV-Typ im Primärtumor auf die Antikörpertiter gegen HPV-6	49
Einfluss von Impfung und HPV-Typ im Primärtumor auf die Antikörpertiter gegen HPV-11	51
Auffällige Titerentwicklungen	53
4. DISKUSSION	54
Einfluss der Impfungen auf die Titerentwicklung	54
Positiver Einfluss von HPV-16, -18 oder -31 positiven Primärtumoren auf die Titerentwicklung der HPV-16, -18, -31 und -45 E6- und E7-Antikörper	57
Negativer Einfluss von HPV-16, -18 oder -31 positiven Primärtumoren auf die Titerentwicklung der HPV-16, -18, -31 und -45 L1-Antikörper	57
Positiver Einfluss von HPV-16, -18 oder -31 negativen Primärtumoren auf die Titerentwicklung der HPV-16, -18, -31 und -45 L1-Antikörper	58
Einfluss des Blutabnahmezeitpunkts auf die L1-Titerhöhe	58
Limitationen der Methodik	59
Vorteile der gemischten linearen Modelle	61
Auffällige Titerentwicklungen	61
5. FAZIT	62
6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	64

7.	TABELLENVERZEICHNIS	66
8.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS:	66
9.	LITERATURVERZEICHNIS	67
10.	LEBENS LAUF	72
11.	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	74
12.	DANKSAGUNG	75

Zusammenfassung

Einleitung Das Zervixkarzinom tritt mit hoher Inzidenz auf, wobei das mittlere Alter der Erstdiagnose stetig sinkt. Durch die Standardtherapie, die radikale Hysterektomie, wird die Familienplanung vieler Frauen beeinträchtigt. Die radikale vaginale Tachelektomie ermöglicht es, das Zervixkarzinom bis zum Stadium FIGO Ib2 stadiengerecht und zugleich fertilitätserhaltend zu therapieren. Unser Ziel war es, die Effekte der prophylaktischen, quadrivalenten HPV-Impfung bei Applikation post-Trachelektomie zu quantifizieren und die Stimulation einer Immunreaktion nachzuweisen.

Methoden Den 75 zwischen 2002 und 2008 in unserer Klinik trachelektomierten Frauen wurde die quadrivalente HPV-Impfung empfohlen. 19 Patientinnen lehnten die Studienteilnahme ab, 37 entschieden sich für, 16 gegen die Impfung (Kontrollgruppe). Um die Titerentwicklung der Impf- und Kontrollgruppe beurteilen zu können, wurden die Antikörpertiter (L1-, E6- und E7-Antikörper der HPV-Typen 6, 11, 16, 18, 31 und 45) im Plasma der Patientinnen vor und gegebenenfalls nach Impfung an mehreren, longitudinal verteilten Zeitpunkten, durch GST-Luminex bestimmt (Anzahl der Messungen pro Patientin: 1-13, Median=5). Die Titer wurden deskriptiv dargestellt und zwischen den Messzeitpunkten durch den Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test verglichen. Unter Miteinbeziehung der Daten zum HPV-Typ im Primärtumor und dem Blutabnahmezeitpunkt bildeten wir gemischte lineare Modelle zur Testung der Titerveränderungen nach Impfung bzw. in der Kontrollgruppe.

Ergebnisse Wir konnten nachweisen, dass die L1-Antikörper aller geimpfter HPV-Typen sowie der Typen 31 und 45 als Folge der Impfung stark anstiegen. Der aggregierte Median der Titer der gegen die im Impfstoff enthaltenen L1-Antigene gerichteten Antikörper stieg von 162,3 MFI vor der ersten Impfung auf 3218 MFI nach mindestens einer Impfung ($p < 0,001$). Auf die serologische Antwort gegen die jeweils untersuchten HPV-Typen hatte die zweite Impfung den stärksten Effekt (Range: 3,3- [HPV 18] bis 9,6-fach [HPV 11] des L1- Baseline-Titers) (Tab. 13-24). Die dritte Impfung hatte einen schwächeren Effekt (Range 1,8 [HPV 45] – 8,1-fach [HPV 11] im Vergleich zu vor der Impfung), gefolgt von der ersten Impfung (Range 1,4 [HPV 45] – 6,6-fach [HPV 11] im Vergleich zu vor der Impfung). Dieser Effekt konnte, wenngleich deutlich schwächer, auch für die E6- und E7-Antikörper der HPV-Typen 6, 11, 18 und 45 sowie die E6-Antikörper des HPV-Typ 31 nachgewiesen werden. Ebenso zeigten wir, dass der Effekt der Impfung auf den Titeranstieg bei Patientinnen, bei denen

HPV-16, -18 oder -31 im Primärtumor nachgewiesen werden konnte, schwächer war als bei Probandinnen mit anderen HPV-Typen im Primärtumor. Begründet ist dies durch den vorhergehenden Antigenkontakt – und die dadurch bereits erhöhten Baseline-Antikörpertiter. Die L1-Antikörpertiter stiegen im Verlauf auf ein letztendlich hohes Niveau.

Diskussion Wir konnten einen zuverlässig starken Anstieg der L1-Antikörpertiter der HPV-Typen 6,11,16,18,31 und 45 um mehr als das 10-Fache im Vergleich zu den Werten vor der Impfung signifikant nachweisen. Dieser Effekt ist der Impfung zuzuschreiben, in der Kontrollgruppe war er nicht nachweisbar. Dieser Nachweis wurde hier erstmalig bei Patientinnen nach Behandlung eines Karzinoms erbracht. Die Immunogenität der Impfung post-Trachelektomie ist gegeben. Ein leichter, aber dennoch signifikanter Anstieg der E6- und E7-Antikörper der HPV-Typen 18, 45, 6 und 11 sowie den E6-Antikörper des HPV-Typs 31 konnte ebenso nachgewiesen werden, die Bedeutung dieser indirekt stimulierten Reaktion, insbesondere der Langzeitauswirkungen, bedarf weiterer Forschung.

Abstract

Introduction The carcinoma of the uterine cervix has a high incidence. The median age of first diagnosis is constantly decreasing. Today's standard therapy, the hysterectomy, leaves treated patients infertile. Radical Vaginal Trachelectomy permits treatment of the carcinoma, including stages up to FIGO Ib2, being safe and sparing fertility at a time. Our goal was to quantify the effects of the quadrivalent HPV vaccination, as well as characterizing the immune reaction, when applied to patients post-trachelectomy.

Methods We suggested the quadrivalent HPV vaccination to all 75 patients treated by trachelectomy in our clinic between 2002 and 2008. Nineteen patients decided to not take part in our study, 37 decided for and 16 against vaccination (control). To compare the titers of the antibodies (L1-, E6- and E7-antibodies against HPV-Type 6, 11, 16, 18, 31 und 45), we took blood samples of the patients on several time points longitudinally, before and, if applicable, after receiving the vaccination (measurements per patient: 1-13, median=5) to be analyzed by GST-Luminex. We described these titers between the time-points measured and compared them by Wilcoxon-Rank-Sum-Test. We also created mixed linear models to test the effects on titer elevation after vaccination and in the control group. We used the predictors "HPV-type detected in the primary tumor" and "time point the blood sample was taken" to visualize this random intercept model.

Results We found that the L1-antibody titers of the antigens present in the vaccine, as well as the L1-antibody titers of HPV Type 31 and 45 increased strongly after vaccination. The aggregated median of the antibody titers directed against the antigens present in the vaccination rose from 162.3 MFI before vaccination to 3218 MFI after one vaccination or more ($p < 0.001$). The effect on the serological response of the tested HPV-types was strongest for the second vaccination (Range: 3.3 [HPV 18] to 9.6-fold [HPV 11] the baseline L1-antibody titer) (table 13-24). The third vaccination had a weaker effect (Range 1.8 [HPV 45] – 8.1-fold [HPV 11] compared to titers before vaccination), followed by the first vaccination (Range 1.4 [HPV 45] – 6.6-fold [HPV 11] compared to titers before vaccination). This effect could also be demonstrated for the E6- and E7 antibody titers of HPV Type 6, 11, 18 and 45, as well as for the E6 titers of HPV-31. We could also prove that the effect of the vaccination was weaker for patients that suffered from a carcinoma in which HPV 16, 18 or 31 had been detected. The reason for this is most

likely to be found in the previous antigen contact and subsequently higher baseline antibody titers. Nevertheless, the HPV L1-antibody titer rose to a high level.

Discussion We were able to prove a reliable, significantly strong increase of the L1-antibody titers of HPV Type 6, 11, 16, 18, 31 and 45 of more than the 10-fold, compared to titers before vaccination. This effect is attributable to the vaccination, it was not present in the control group after surgery. This was proved here for the first time in patients after they had been surgically treated for carcinoma. Immunogenicity of the vaccination is given. An increase of E6- and E7 antibodies of the HPV-Types 18, 45, 6, 11, and the E6 antibodies of HPV-Type 31 was revealed as well. The significance of this indirectly stimulated reaction, especially regarding long term effects, needs further investigation.

1. Einleitung

Das humane Papillomavirus

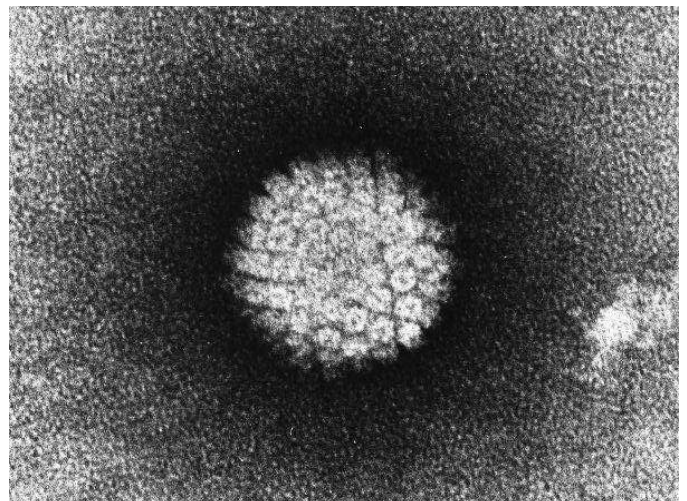
Das HPV gehört zur Gruppe der Papillomaviridae. Diese besitzen ein doppelsträngiges DNA-Genom. 1932 wurde das Papillomavirus von Shope erstmals aus Kaninchen isoliert, ebenso zeigte er, dass die durch das Papillomavirus hervorgerufenen gutartigen Geschwüre in bösartige Tumore übergehen können (1, 2). Harald zur Hausen erhielt im Jahr 2008 den Nobelpreis für Medizin, da er die ursächliche Beziehung zwischen der HPV-Infektion und dem Zervixkarzinom nachweisen konnte (3). Hieraus folgte die Entwicklung der heute verfügbaren Impfstoffe.

Papillomaviren sind hochspezifisch für ihre Wirtsspezies und strikt epithelotrop. HPV bestehen aus ikosaedrischen Capsiden mit einem Durchmesser von 55-60 nm. Sie sind unbehüllt. Diese Capside des humanen Papillomavirus bestehen aus den zwei Strukturproteinen L1 und L2. Das Hauptcapsidprotein L1 bildet 72 pentamere Capsomere. Vom Capsidprotein L2 finden sich an der Innenseite der viralen Partikel 12-72 Moleküle. Im Inneren der aus den Strukturproteinen gebildeten Hülle befindet sich das Genom des HPV (4).

Die virale DNA liegt als doppelsträngige Superhelix von 8000 Basenpaaren vor. Es handelt sich um ein zirkuläres Genom. Unterscheiden lassen sich die im Vermehrungszyklus früh synthetisierten Proteine E1 bis E8 und die im Vermehrungszyklus spät synthetisierten Strukturproteine L1 und L2.

Zwischen diesen beiden Bereichen befindet sich die Long Control Region (LCR). Sie ist in etwa 1000 Basenpaare lang und kodiert statt für virale Proteine für Kontrollelemente wie Promotoren, Enhancer und den ORI (3, 4).

Abbildung 1: HPV in der elektronenmikroskopischen Aufnahme (5)



Humane Papillomviren sind strikt epithelotrop, befallen also ausschließlich Epithelien der Haut und der Schleimhäute. Allerdings sind sie nicht auf die Transformationszone der Zervix limitiert, sondern sind auch für die Pathogenese anderer Neoplasien wie das Peniskarzinom, Analkarzinome, oropharyngeale Karzinome, Vulva- oder Vaginalkarzinome relevant (6). In dieser Dissertation soll jedoch der Schwerpunkt auf den gynäkologisch relevanten genitalen HPV-Infektionen liegen.

Das Zervixkarzinom

Epidemiologie des Zervixkarzinoms

Das Zervixkarzinom ist die vierthäufigst diagnostizierte Krebserkrankung weltweit, bei Frauen zwischen 15 und 44 Jahren sogar die zweithäufigst diagnostizierte Krebserkrankung. Es war für 9% (527.624) der Krebsneuerkrankungen im Jahr 2012 verantwortlich (7). Hierbei tritt es in unterschiedlichen Ländern verschieden häufig auf. So liegt die Inzidenz in Finnland bei 3,7, während sie in Guinea bei 56 / 100.000 Frauen pro Jahr liegt (8). Dies lässt sich durch die großen Unterschiede in Vorsorgeprogrammen und der Aufklärung der Frauen erklären. So treten 80% der Fälle in Entwicklungsländern auf (8). In Deutschland wurden 2010 4660 Neuerkrankungen gezählt, die Zahl der Todesfälle lag bei 1524 (9). Die Vorstufen des Zervixkarzinoms, die cervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN), sind schon häufig bei jungen Frauen im Alter von 20-30 Jahren zu finden (6). Das invasive Karzinom tritt mit zwei Häufigkeitsgipfeln auf, diese liegen zwischen 40 und 44, beziehungsweise 55 und 59 Jahren (9). Der Trend ist fallend, so sank das mittlere Alter bei Erstdiagnose in den letzten 25 Jahren um 14 Jahre (6). Weltweit gesehen steht das Zervixkarzinom auf Platz zwei bezüglich der krankheitsbedingt verlorenen Lebensjahre (potential years of life lost, PYLL) und krankheitsbedingter Lebensjahre mit Behinderung (years lived with disabilities, YLDs). Damit rangiert es deutlich vor dem Kolonkarzinom und zeichnet für mehr als doppelt so viele disability adjusted life-years (DALYs) verantwortlich wie Ovarial- und Endometriumkarzinom zusammen (10).

Aus histologischer Sicht sind die meisten bösartigen Neubildungen der Zervix Plattenepithelkarzinome. In über 99% der Zervixkarzinome kann HPV-DNA nachgewiesen werden, in über 70% DNA der HPV-Typen 16 und 18 (6, 11). Die 5-Jahres-

Überlebenswahrscheinlichkeit über alle Stadien beträgt 60%, für das Stadium FIGO I liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei 85–90% (6, 8).

Pathogenese des Zervixkarzinoms

Humane Papillomaviren (HPV) werden durch direkten Kontakt übertragen, also im Falle der genitalen HPV-Typen durch Geschlechtsverkehr mit einem infizierten Partner. Seltenere ist die Übertragung durch kontaminierte Gegenstände. Diese ist möglich, da die Viren wahrscheinlich resistent gegen Austrocknung und deshalb eine Schmierinfektion nicht auszuschließen ist (12). Auch perinatal kann das HPV übertragen werden. Hier handelt es sich um die Infektion von Neugeborenen infizierter Mütter in vertikaler Richtung (13).

Die HPV werden in zwei Gruppen eingeteilt, welche über ein unterschiedlich stark onkogenes Potential verfügen: Die „Low-risk“ (LR)-HPV-Typen (u.a. LR-HPV: 6, 11, 42, 44, 53, 83) und die „High-Risk“ (HR)-Typen (u.a. HR-HPV: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 82). Während die LR-Typen über ein nur schwach onkogenes Potential verfügen, werden die HR-Typen stark mit malignen Erkrankungen des weiblichen Genitaltraktes und deren Vorstufen assoziiert (3).

Andere Faktoren wie Nikotinabusus, Multiparität, die langfristige Einnahme von oralen Kontrazeptiva, ein Lebensalter von über 30 Jahren sowie die HIV-Koinfektionen und viele Geschlechtsverkehrspartner begünstigen die Krebsentstehung bei gleichzeitiger HR-HPV Infektion (14, 15).

Die Infektion mit den HPV geschieht über Mikrotraumata, die die basalen Zellschichten des Epithels freilegen. Im Stratum basale befinden sich die Stammzellen des Epithels. Nachdem sich die Viren in einem Heparinsulfat-induzierten Prozess an die Stammzellen geheftet haben, dringen sie in diese ein und exprimieren ihre Virus-DNA bis sie eine Kopienanzahl von ca. 100 erreicht haben. Vor allem die frühen Proteine E1 und E2 werden exprimiert. Sie bilden einen Komplex der am Origin of Replication (ORI) bindet und die für die Replikation notwendigen zellulären Polymerasen und Proteine rekrutiert. E1 fungiert darüber hinaus als Helikase, während E2 die Transkription und somit die Virenlast in den basalen Zellschichten reguliert. Die sich teilenden und differenzieren-

den Zellen steigen in die oberen Schichten des Epithels, das Stratum spinosum und Stratum granulosum, auf. Das Protein E6 fungiert in den HR-HPV als Onkoprotein. Die karzinogene Wirkung entsteht durch die Komplexbildung mit der Ubiquitin-Ligase und dem E6-assoziierten Protein (E6AP). Dieser Komplex bindet an das Tumorsuppressorprotein p53 und verhindert so eine Apoptose der Zelle. Das Protein E7 bindet an das Retinoblastom-Tumorsuppressorprotein (Rb) und beeinflusst andere Regulatoren des Wirtszellzyklus. So sorgt es für die gesteigerte Replikation der DNA der Wirtszelle. Während die nicht infizierten Keratinozyten während ihres Aufstiegs vom Stratum basale in die oberflächlichen Zellschichten ihren Kern verlieren und keine Mitosen mehr vollziehen, bleiben die infizierten Zellen durch das Onkoprotein E7 länger teilungsaktiv und exprimieren weiter zelluläre Replikationsfaktoren, die für die virale Replikation benötigt werden (16).

Die typische Lokalisation der Neoplasie ist der Bereich der Zervix, an dem das Plattenepithel der Vagina und Portio in das Zylinderepithel des Zervikalkanals übergeht. Diese Transformationszone der Zervix ist prädisponiert für Veränderungen wie Entzündungen und Infektionen. Bevor aus einer Krebsvorstufe in diesem metaplastischen Epithel ein Karzinom entsteht, vergeht eine durchschnittliche Latenzzeit von 15-30 Jahren, 7-8 Jahre werden jedoch nicht unterschritten (3, 17).

Diese Vorstufen werden anhand ihrer Größe und der Schwere ihrer Atypien unterschieden (Tabelle 1). Die World-Health-Organisation (WHO) hat für die Vorstufen des Plattenepithelkarzinoms die CIN-Klassifikation definiert.

Die für das in Deutschland implementierte Krebsfrüherkennungsprogramm (siehe S. 34, *Präventive Maßnahmen*) entnommenen Abstriche werden nach Papanikolaou gefärbt und auf morphologische Veränderungen untersucht. Die Beschreibung dieses Befunds wird durch die 2014 aktualisierte Münchner Nomenklatur III geregelt. Die hier definierten Befundkategorien spiegeln das Risiko für Entwicklung oder Vorliegen eines Zervixkarzinoms wider (18).

Tabelle 1: PAP-Abstriche und CIN in der Münchner Nomenklatur III (18)

PAP	CIN	Münchner Nomenklatur III (2014)	Bethesda-System
0		Unzureichendes Material	Unsatisfactory for evaluation
I		Unauffällige und unverdächtige Befunde	NILM
IIa		Unauffällige Befunde bei auffälliger Anamnese	NILM
II		Befunde mit eingeschränkt protektivem Wert	
II		Befunde mit eingeschränkt protektivem Wert	
II-p		Plattenepithelzellen mit geringergradigen Kernveränderungen als bei CIN 1, auch mit koilozytärem Zytoplasma/Parakeratose	ASC-US
II-g		Zervikale Drüsenzellen mit Anomalien, die über das Spektrum reaktiver Veränderungen hinausreichen	AGC endocervical NOS
II-e		Endometriumzellen bei Frauen > 40. Lebensjahr in der zweiten Zyklushälfte	Endometrial cells
III		Unklare bzw. zweifelhafte Befunde	
III-p		CIN 2/CIN 3/Plattenepithelkarzinom nicht auszuschließen	ASC-H
III-g		Ausgeprägte Atypien des Drüsenepithels, Adenocarcinoma in situ/invasives Adenokarzinom nicht auszuschließen	AGC endocervical favor neoplastic
III-e		Abnorme endometriale Zellen (insbesondere postmenopausal)	AGC endometrial
III-x		Zweifelhafte Drüsenzellen ungewissen Ursprungs	AGC favor neoplastic
IIID		Dysplasiebefunde mit größerer Regressionsneigung	
IIID1	CIN 1	Zellbild einer leichten Dysplasie	LSIL
IIID2	CIN 2	Zellbild einer mäßigen Dysplasie	HSIL
IV		Unmittelbare Vorstadien des Zervixkarzinoms	
IVa-p	CIN 3	Zellbild einer schweren Dysplasie/eines Carcinoma in situ	HSIL
IVa-g		Zellbild eines Adenocarcinoma in situ	
IVb-p	CIN 3	Zellbild einer CIN 3, Invasion nicht auszuschließen	HSIL with features suspicious for invasion
IVb-g		Zellbild eines Adenocarcinoma in situ, Invasion nicht auszuschließen	AIS with features suspicious for invasion
IVb-g		Zellbild eines Adenocarcinoma in situ, Invasion nicht auszuschließen	AIS with features suspicious for invasion
V		Malignome	
V-p		Plattenepithelkarzinom	Squamous cell carcinoma
V-g		Endozervikales Adenokarzinom	Endocervical adenocarcinoma
V-e		Endometriales Adenokarzinom	Endometrial adenocarcinoma
V-x		Andere Malignome, auch unklaren Ursprungs	Other malignant neoplasms

Zwar werden Spontanheilungen von CIN III beobachtet, jedoch ist die maligne Progression der CIN III kasuistisch gut belegt (19-21). Eine neuseeländische Studie verglich je eine Gruppe Frauen ohne und mit adäquater Therapie nach der Diagnose einer CIN III. 30 Jahre nach Diagnosestellung waren über die Hälfte der unbehandelten Frauen an einem Karzinom der Zervix erkrankt, während es in der Interventionsgruppe lediglich 0,7% waren (21).

Glanduläre Dysplasien, welche die Vorstufen des Adenokarzinoms sind, sind zwischen 100 und 237-fach seltener als die vergleichbaren CIN III-Dysplasien des Plattenepithels. In diesen Adenocarcinoma in situ (AIS) sind häufiger HPV Typ 18 oder 45 nachweisbar (22).

Condyloma acuminata

Sogenannte Feigwarzen (*Condylomata acuminata*) finden sich bei etwa 1–2% der sexuell aktiven Bevölkerung. Die Inzidenz wird auf etwa 57.000 Neuerkrankungen pro Jahr (700/100.000 Einwohner) geschätzt, die Tendenz ist steigend. Nicht diagnostiziert werden in der Regel subklinische, HPV-assoziierte Läsionen im Anogenitalbereich, die mit bloßem Auge nicht zu erkennen, aber bei 5–10% der Bevölkerung vorhanden sind (6).

Verantwortlich für Kondylome ist die Persistenz von LR-HPV. Im Gegensatz zum Zervixkarzinom handelt es sich um HPV-LR-Typen, in 90% der Fälle HPV 6 und 11. Übertragen wird die Kontaktinfektion durch Hautkontakt, unter Umständen auch durch Gegenstände (23).

Die Inkubationszeit beträgt Wochen bis Jahre. Kondylome können an Vagina, Vulva, Penis, Anus, aber auch an der Zervix lokalisiert sein. Durch ihr starkes Wachstum können sie äußerst unangenehm sein und neben Schamgefühl Symptome wie Brennen, Jucken und Schmerzen verursachen (6).

Kondylome sind per se nicht gefährlich, da sie nicht zur Entartung neigen. Dies liegt an der unterschiedlichen Funktionsweise der viralen Onkogene. Das E6-Onkoprotein der LR-Viren bindet weniger effizient an das Tumorsuppressorgen p53 und degradiert es aus diesem Grund nicht vollständig. Die durch das Onkoprotein E7 induzierte Inaktivierung des Rb verläuft ebenfalls inkomplett. So kommt es lediglich zu einer Proliferation des Gewebes, nicht aber zur malignen Entartung (23).

Kondylome sind medikamentös oder operativ behandelbar. Etwa jeder dritte Fall von Kondylomen heilt von alleine und ohne Behandlung (6).

Klassifikation des Zervixkarzinoms

Die Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO) teilt die Stadien des Zervixkarzinoms basierend auf einem klinischen Staging ein (Tabelle 2). Dieses Staging beinhaltet unter anderem die gynäkologische und körperliche Untersuchung sowie angemessene Bildgebung. Allerdings ist die Unterscheidung einzelner Untergruppen des Stadiums FIGO I bzw. T1 nur durch histologische Untersuchung des Gewebes möglich (24).

Es folgt die tabellarische Darstellung der TNM- und FIGO-Stadien:

Tabelle 2: Klassifikation des Zervixkarzinoms (12, 24)

TNM-	FIGO-Stadien	
Tx		Primärtumor nicht beurteilbar
T0		Kein Primärtumor
Tis	0	Carcinoma in situ, keine Stromainvasion
T1	I	Tumor begrenzt auf die Zervix
T1a	IA	Invasives Karzinom, ausschließlich durch Mikroskopie diagnostiziert. Stromainvasion bis maximal 5 mm Tiefe, gemessen von der Basis des Epithels, mit horizontaler Ausbreitung von 7 mm oder weniger.
T1a1	IA1	Gemessene Stromainvasion von 3 mm oder weniger in die Tiefe und 7 mm oder weniger in horizontaler Ausbreitung
T1a2	IA2	Gemessene Stromainvasion von mehr als 3 mm, aber nicht mehr als 5 mm mit einer horizontalen Ausbreitung von 7 mm oder weniger
T1b	IB	Klinisch (makroskopisch) sichtbare Läsion, auf die Zervix beschränkt, oder mikroskopische Läsion >T1a2/IA2
T1b1	IB1	Klinisch (makroskopisch) sichtbare Läsion 4,0 cm oder weniger in größter Ausdehnung
T1b2	IB2	IB2 Klinisch (makroskopisch) sichtbare Läsion >4,0 cm in größter Ausdehnung
T2	II	Ausdehnung jenseits des Uterus, aber nicht zur Beckenwand und nicht zum unteren Vaginaldrittel
T2a	IIA	Parametrien frei
T2b	IIB	Parametrien befallen
T3	III	Ausdehnung zu unterem Vaginaldrittel / Beckenwand / oder Hydronephrose
T3a	IIIA	Unteres Vaginaldrittel
T3b	IIIB	Beckenwand / Hydronephrose
T4	IV	Schleimhautinfiltration von Harnblase oder Rektum und / oder Tumor

Histologisch lassen sich die Karzinome in Plattenepithel-, Adeno-, adenosquamöse und neuroendokrine Karzinome unterteilen. Sehr selten finden sich Sonderformen wie das seröse, klarzellige, kleinzellige, muzine oder endometroide Zervixkarzinom. Die häufigsten histologischen Typen sind das Plattenepithelkarzinom mit fast 80% der Fälle und das Adenokarzinom. Bei Letztgenanntem hat sich der Anteil in den letzten 25 Jahren von 10 auf fast 20% erhöht. Der Anteil der adenosquamösen Karzinome beläuft sich auf 2-3% (25).

Diagnostik

Fallen bei der Inspektion oder im Zellbild des Pap-Abstrichs der Portio suspektere Veränderungen auf, so ist eine Differentialkolposkopie mit Knipsbiopsie indiziert. Um eine maligne Veränderung im Zervikalkanal auszuschließen, kann eine Kürettage durchgeführt werden. Weitere Untersuchungen beinhalten sowohl die bimanuelle vaginale, als auch die rektovaginale Untersuchung.

Als bildgebende Verfahren werden ein Röntgenthorax, eine transvaginale Sonographie sowie die sonographische Untersuchung von Nieren und der Leber durchgeführt. Ab dem Tumorstadium IB2 wird die Durchführung einer Magnetresonanztomographie (MRT) empfohlen (25).

Therapie

Die Therapieentscheidungen zur Behandlung des Zervixkarzinoms werden multidisziplinär getroffen. Außer der gynäkologischen Onkologie werden besonders die Fachrichtungen der Strahlentherapie, Radiologie und Anästhesie mit einbezogen.

In frühen Stadien ist nur die operative Therapie indiziert. Dies gilt besonders bei prämenopausalen Patientinnen. Bis zum Stadium Ia1 L0 V0 besteht die Standardtherapie, im Falle eines Kinderwunsches oder auch bei Wunsch nach Uteruserhaltung auch bei älteren Frauen, aus der Konisation. Besteht dieser Wunsch nicht, ist die Therapie die einfache Hysterektomie. Diese kann über den abdominalen, laparoskopischen oder über kombinierte Zugangswege durchgeführt werden.

Im Falle einer Lymphangiosis carcinomatosa (L1) wird zusätzlich eine pelvine Lymphadenektomie, beziehungsweise eine Sentinel-Lymphonodektomie, durchgeführt.

Im Stadium Ib und II erzielen Operation und simultane Radiochemotherapie vergleichbare Langzeitergebnisse, unterscheiden sich jedoch in Bezug auf Nebenwirkungen und Rezidivmuster. Hingegen ist ab dem Stadium III eine simultane Radiochemotherapie indiziert. Die primäre therapeutische Radiotherapie besteht, um eine ausreichende Dosis zu erreichen, aus einer perkutan applizierten und einer brachytherapeutischen Komponente. Um die Afterloading-Therapie zu umgehen, kann eine einfache Hysterektomie nach erfolgter perkutaner Radiatio durchgeführt werden (25-27).

Operative Verfahren mit Entfernung des Uterus

Die radikale Hysterektomie (RH), also eine Hysterektomie unter Entfernung der Parametrien, wurde in einer einfachen Version von Clark und Reis im Jahr 1895 beschrieben. Wertheim publizierte sie detaillierter und führte sie als radikale abdominale Hysterektomie durch. Meigs modifizierte sie erneut, er führte die vollständige Entfernung der pelvinen Lymphknoten ein (28, 29).

Bis zum heutigen Tag wird die radikale Hysterektomie nach Wertheim-Meigs durchgeführt. Sie besteht aus der systematischen Inspektion der Bauchhöhle, dem Eröffnen der paravesikalen Grube, unter Umständen mit Schnellschnittkontrolle suspekten Gewebes, der Eröffnung der pararektalen Grube mit Entfernung des Binde- und Fettgewebes, der iliakalen Lymphknoten und dem Ausräumen der Fossa obturatoria (25, 26).

Die Schauta-Stoeckel-Operation erfolgt über den vaginalen Zugangsweg. Wie auch die Operation nach Wertheim beinhaltet sie die Entfernung der Parametrien. Da über den vaginalen Zugangsweg die Entfernung aller pelvinen Lymphknoten nicht möglich ist, war die Schauta-Stoeckel-Operation in der Vergangenheit unattraktiv für onkologische Operationen. Dieser Nachteil kann heute durch eine laparoskopische Lymphadenektomie, auch nach dem Sentinelkonzept, umgangen werden (30).

Die Hysterektomie wird in fünf Grade nach Piver unterteilt, die Klassifikation erfolgt nach Radikalität der Entfernung der Parametrien (31).

Die radikale vaginale Trachelektomie

Die uteruserhaltende Herangehensweise zur Behandlung des Zervixkarzinoms wurde erstmals vom rumänischen Gynäkologen Aburel in Form der subfundalen radikalen

Hysterektomie vorgeschlagen und 1956 publiziert. Zusammen mit seinem Schüler Sirbu verfolgte er das Ziel der fertilitätserhaltenden Operation. Diese wurde durch eine mediane Laparatomie durchgeführt. Allerdings gelang es keiner Patientin eine Schwangerschaft erfolgreich auszutragen und die Technik wurde vorübergehend verlassen (32).

Die Idee wurde von Daniel Dargent wieder aufgenommen, der ab 1987 Operationen durchführte, die als radikale vaginale Trachelektomie (RVT) bekannt wurden. Als Zugangsweg wählte er eine Kombination aus vaginalem und laparoskopischem Vorgehen. Seit er diese Operation 1994 erstmals publizierte (33), wird sie von mehreren europäischen und amerikanischen Teams angewendet (34).

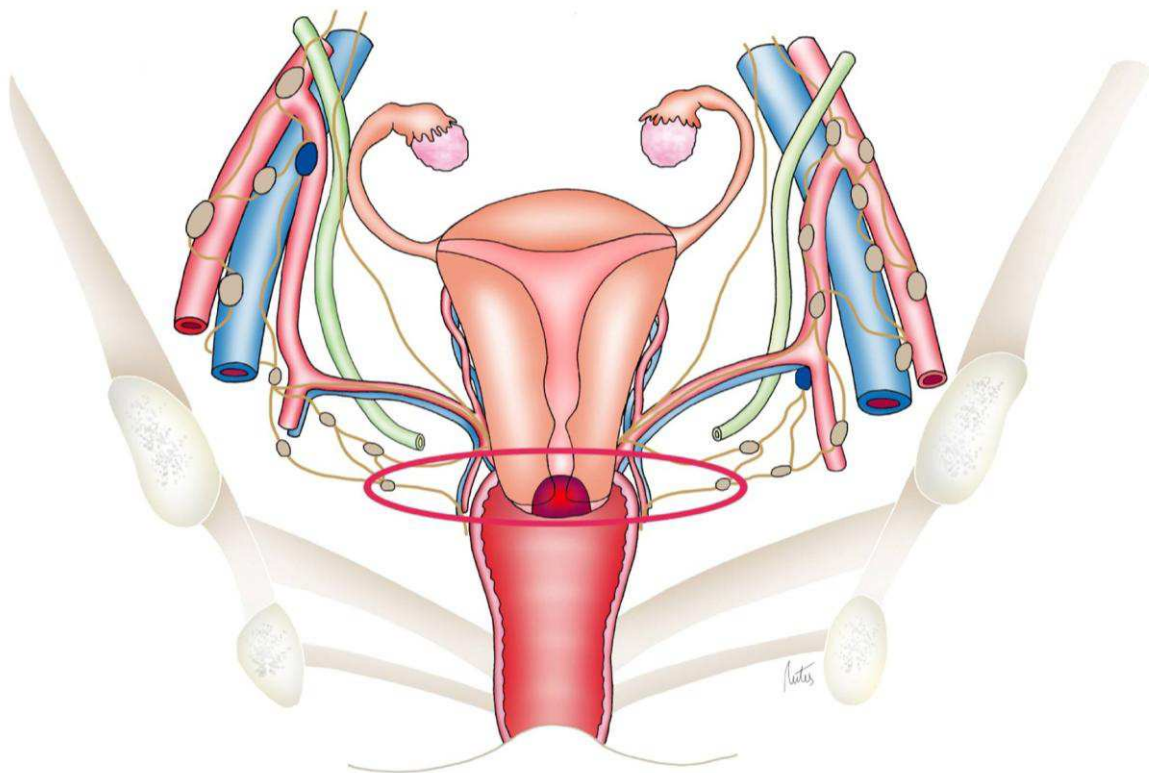
Die RVT ist im Vergleich zur Hysterektomie deutlich weniger invasiv und wird sogar als konservative Chirurgie bezeichnet. Es handelt sich zwar um eine onkologische Operation, jedoch werden Funktion und Gestalt des behandelten Organs erhalten. Gerade in Bezug auf das Zervixkarzinom erscheint die konservative Chirurgie in Gestalt der Trachelektomie sehr sinnvoll, denn durch sie bleibt den oft noch sehr jungen Patientinnen die Möglichkeit einer späteren Schwangerschaft trotz suffizienter Therapie erhalten (34).

Die radikale vaginale Trachelektomie ist kein Routineverfahren, jedoch ist sie in den Leitlinien für spezielle Fälle vorgesehen. Somit unterliegt ihre Anwendung einer strengen Indikationsstellung (siehe Tabelle 3) und bleibt speziellen Zentren vorbehalten. Diese ist für Patientinnen mit Zervixkarzinomen FIGO Ia1 mit vorhandenen Risikofaktoren, FIGO Ia2, Stadium Ib1 bei einer Tumorgröße unter 2 cm (ohne vorliegende Risikofaktoren) oder Stadium Ib2 (ohne Lymphknotenbefall) erfüllt. Ebenso wird sie nur bei Patientinnen mit Kinderwunsch durchgeführt. Ausgeschlossen wird eine Trachelektomie durch eine nachgewiesene Hämangiosis und eine Tumorgröße über 2 cm (vergleiche Tabelle 3) (25).

Tabelle 3: Indikationen der RVT (25, 35)

RVT möglich	Ausschlusskriterien RVT
Kinderwunsch	Kein Kinderwunsch
pT1A1L1	Tumor > 2cm (ggf. NACT)
pT1A2	Restzervix < 1 cm
pT1B1<2 cm	Neuroendokriner Tumor
Tumorfremie pelvine Lymphknoten, pN0	Hämangiosis

Neue Studien legen allerdings nahe, dass im Falle eines ausgeprägten Kinderwunsches auch Tumore von über 2 cm Durchmesser mittels RVT behandelt werden können sofern keine Lymphknoten befallen sind (36). Dies wird mittels einer laparoskopischen Lymphadenektomie ausgeschlossen. Fällt diese negativ aus, werden 2-3 Zyklen neoadjuvanter Chemotherapie (NACT) mit den Präparaten Paclitaxel, Ifosfamid und Cisplatin appliziert. Nach Abschluss der Chemotherapie wird eine RVT durchgeführt. Bislang ist dieses Vorgehen rein experimenteller Natur, die Bestätigung der Ergebnisse durch weitere, größer angelegte Studien steht noch aus. Jedoch scheint der Ansatz eine gute Möglichkeit die Vorzüge der RVT zukünftig auch bei fortgeschritteneren Tumorstadien zu nutzen zu können (36).



Rote Linie: Resektionslinie RVT
 Rote Fläche: Tumor
 Blauer Lymphknoten: Sentinel-Lymphknoten

Abbildung 2: Anatomie der radikalen vaginalen Trachelektomie (37)

Die Trachelektomie lässt sich in zwei Phasen unterteilen: Ein laparoskopischer und ein vaginaler Teil. Während ersterem werden die pelvinen und die parametranen Lymphknoten entfernt. Nach entsprechender Aufklärung ist es auch möglich, das Konzept des Sentinel-Lymphknotens anzuwenden, hierbei wird über eine Patentblaufärbung, die am

Vortag in die Portio injiziert wird, der Wächterlymphknoten angefärbt. Dieser wird laparoskopisch entnommen und im Schnellschnittverfahren histologisch untersucht. Ist er tumorfrei, so ist eine RVT möglich und die Operation wird fortgeführt (38-40). Nun wird bis auf die vorderen Scheidenwandungen präpariert, ebenso erfolgt die Präparation der paravesikalen Gruben (41, 42).

Der transvaginale Teil der Trachelektomie beginnt mit dem Fassen einer der Tumorgroße angepasste Scheidenmanschette, deren Faszie nach Unterspritzung mit einer Mischung aus Xylocitin und Adrenalin auf ca. 0,5 cm Breite dargestellt und im Anschluss mit einer fortlaufenden Naht verschlossen wird. Nun wird der Douglasraum eröffnet, das Septum uterovesicale eingeschnitten und die geleerte Harnblase nach kranial geschoben. Das Rektum wird nach Inzision des Peritoneums über den uterorektalen Bändern stumpf präpariert und nach dorsal verlagert. Die Scheide wird nun bis zum Erreichen der paravesikale Grube präpariert. Nachdem der Ureter identifiziert ist, kann der restliche infrauretrale Blasenpfeiler gekappt werden. Anschließend werden die medialen Anteile der Parametrien, welche aus dem Ligamentum sacrouterina, Ligamentum cardinalia und den Ligamentum vesicocervicalia bestehen, durchtrennt. Je nachdem wie großzügig die vorangegangene Konisation erfolgte, wird nun ein Drittel bis die Hälfte der Zervix abgesetzt und eine Abrasio der verbliebenen Zervix durchgeführt. Um ein Stenosieren des Zervikalkanals in den ersten postoperativen Tagen zu verhindern, wird ein Einmalkatheter für die Dauer von 3-5 Tagen eingenäht. An die so entstandene Restzervix wird die Scheide readaptiert und eine permanente Cerclage angelegt. Um eine Blutung auszuschließen wird eine Kontroll-Laparoskopie durchgeführt (35, 38, 41, 42).

Nach einer RVT gelingt es zwischen 40 und 80% der Patientinnen schwanger zu werden. Spontanaborte treten nicht häufiger auf als in der restlichen Bevölkerung (43). Die häufigste Komplikation dieser Schwangerschaften ist die Frühgeburtslichkeit. Durch die Zervixverkürzung kommt es gehäuft zu vorzeitigem Blasensprung und Amnioninfektionen. Ebenso muss die Geburt durch die eingelegte Cerclage zwangsläufig als primäre Sectio erfolgen (43). Es konnte gezeigt werden, dass die postnatale Sterblichkeit der Neugeborenen durch die intensive medizinische Überwachung sogar verringert ist (44).

Die radikale abdominale Trachelektomie

Vereinfacht gesprochen entspricht die radikale abdominale Trachelektomie (RAT) der klassischen radikalen abdominalen Hysterektomie, jedoch unter Erhaltung des Uterus. Sie beginnt mit der Eröffnung des Retroperitoneums und der Entfernung der pelvinen Lymphknoten, die in einer Schnellschnittuntersuchung histologisch untersucht werden. Stellen sie sich als tumorfrei heraus, werden die zervikalen Äste der Arteria Uterina und Arteria Vaginalis an ihrem Ursprung ligiert. Die Zervix wird en bloc mit den Parametrien und dem oberen Teil der Vagina reseziert, die Zervix wird auf dem Niveau des Os internum abgesetzt. Der verbleibende Teil der Vagina wird an den Fundus uteri adaptiert und eine verbleibende Cerclage eingelegt (45, 46).

Die Vorteile der RAT gegenüber der RVT sind, dass sowohl größere Tumore operiert werden können, als auch dass das Verfahren deutlich leichter zu erlernen ist. Es ist keine Erfahrung in vaginalen oder laparoskopischen Operationsverfahren nötig, ebenso entfällt die hierfür benötigte Ausstattung. Große Reviews kamen zu dem Ergebnis, dass die onkologische Sicherheit von RAT und RVT vergleichbar ist, jedoch sind die Chancen nach einer RVT schwanger zu werden besser als nach einer RAT (47).

Generell lässt sich jedoch sagen, dass das Ergebnis der RVT stark vom Können und der Erfahrung des Operateurs abhängig ist.

Präventive Maßnahmen

Sekundärprävention – Krebsfrüherkennung

Seit 1971 ist die gynäkologische Krebsvorsorge für Frauen ab dem 20. Lebensjahr eine Leistung der gesetzlichen Krankenkassen Deutschlands. Von Anfang an lag das Hauptaugenmerk auf der Erkennung der Vorstufen des Zervixkarzinoms durch den zytologischen Papanikolaoutest. Das Zervixkarzinom war zum damaligen Zeitpunkt das Karzinom des weiblichen Genitaltraktes mit der höchsten Inzidenz. Bis heute wurde die Alterszielgruppe für die Vorsorgeuntersuchung nicht geändert. Der untersuchende Arzt kann von der Patientin selbst gewählt werden, ihm sind die vorzunehmenden Maßnahmen jedoch vorgegeben. Diese bestehen unter anderem aus der SpekulumEinstellung der Portio, der Entnahme von Untersuchungsmaterial von der Portio-Oberfläche und

aus dem Zervikalkanal (in der Regel mithilfe von Spatel und Bürste), Fixierung des Untersuchungsmaterials und dessen zytologischer Untersuchung, bimanuelle gynäkologische Untersuchung und die Befundmitteilung (auch zur Zytologie) mit anschließender diesbezüglicher Beratung. Die weitergehende Untersuchung und Beurteilung der Abstriche muss von entsprechend qualifizierten und zugelassenen Laboratorien vorgenommen werden. Die Zahl der zur gynäkologischen Krebsvorsorge berechtigten Frauen betrug 2009 in Deutschland 30 Mio., wovon unter Berücksichtigung der Wiederholungsuntersuchungen etwa 50% jährlich von ihrem Recht Gebrauch machen (16 Mio. Abstriche pro Jahr). Die Teilnahmerate über 3 Jahre liegt bei 79% (48).

Das deutsche Modell zur Gebärmutterhalskrebsvorsorge sieht keine routinemäßige Testung auf HPV-DNA vor. Wird dieser von der Patientin gewünscht, so sind die Kosten hierfür selbst zu tragen. Im Falle einer leichten oder mäßigen Veränderung im Pap-Test (Pap IIw, Pap III, Pap III D) wird der HPV-DNA-Test von der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe in ihrer aktuellen S2k-Leitlinie empfohlen. Bei einem positiven Befund sollte dieser nach einem halben Jahr erneut durchgeführt und gegebenenfalls durch Kolposkopie kontrolliert werden. Im Rahmen der Tumornachsorge, z.B. nach Konisation oder auch Trachelektomie, wird die HPV-DNA-Testung ebenfalls empfohlen. So kann die vollständige Entfernung des virushaltigen Gewebes verifiziert werden. Die Kosten für die Testung bei auffälligen Pap-Abstrichen und im Rahmen der Tumornachsorge werden von den Krankenkassen übernommen. Als zukunftsweisend darf die Kombination von Zytologie und HPV-Testung angesehen werden. In mehreren Studien wurden deutliche Vorteile bezüglich des negativen Vorhersagewertes und der Detektion von CIN III festgestellt. Da die Screeningintervalle verlängert werden können und die Folgekosten sinken, wird das Modell als kosteneffektiv angesehen (12, 49-51).

Primärprävention – Impfung

Im Oktober 2006 wurde der Impfstoff Gardasil zugelassen. Es handelt sich um einen quadrivalenten Impfstoff, der sich gegen die L1-Proteine der HR-HPV Typen 16 und 18 sowie die LR-HPV Typen 6 und 11 richtet. Eine Einzeldosis Gardasil von 0,5 ml enthält jeweils 20 µg Virus-like-particles (VLP) der HPV-Typen 6 und 18 sowie jeweils 40 µg VLP der HPV-Typen 11 und 16. Als Adjuvanz ist amorphes Aluminium-Hydroxyphosphat-Sulfat zugesetzt.

Diese prophylaktische Impfung induziert die Bildung virusneutralisierender Antikörper. Bei den in die Immunantwort eingebundenen Epitopen handelt es sich um konformationelle Epitope des Kapsids, die auf dem L1-Gen der HPV-DNA codiert sind. Diese Epitope sollen dem Immunsystem durch die Impfung angeboten werden, so dass Antikörper gegen die Oberflächenproteine gebildet werden. Zu diesem Zweck wurde das L1-Gen der HPV-Typen 6, 11, 16 und 18 isoliert und im Herstellungsprozess des von uns untersuchten Impfstoffs durch Hefebakterien des Typs *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert. Die so synthetisierten Proteine fügen sich nach Aufreinigung spontan zu Pentameren zusammen. Diese verbinden sich weiter zu sogenannten Viruslike-particles (VLP). Da diese VLP nur aus Hüllprotein bestehen, aber weder DNA noch onkogenes Material beinhalten, ist eine HPV-Infektion durch sie ausgeschlossen (52).

Die Wirksamkeit des Impfstoffs wurde in der über 12.000 Frauen einschließenden, Placebo-kontrollierten, randomisierten, doppelblinden, multizentrischen FUTURE II-Studie nachgewiesen. Die Effizienz betrug in der protokolltreuen Gruppe 98%, in der Intention-to-treat-Analyse waren 17% Effizienz während der Studiendauer von 36 Monaten nachweisbar (53).

In Deutschland empfiehlt die ständige Impfkommission (STIKO) des Robert Koch-Instituts die generelle Impfung aller Mädchen im Alter zwischen 9-14 Jahren, spätestens aber 18 Jahren gegen die HPV-Typen 16 und 18. Nach Möglichkeit sollte die Immunisierung vor Beginn der sexuellen Aktivität abgeschlossen sein. Bei Verwendung des Impfstoffs Gardasil ist ein 2-Dosen-Impfschema mit einem Impfabstand von 6 Monaten zugelassen. Zur Vervollständigung von Impfserien bei älteren Frauen oder einem Impfabstand von über 6 Monaten zwischen den beiden ersten Vakzinationen ist eine dritte Impfung erforderlich (54).

Es existieren aber auch Studien, die sich auch von der Impfung älterer, nicht HPV-naiver Frauen, deutliche Vorteile versprechen. Monsonogo et. al (55) argumentieren mit einem zwar geringeren Vorteil der bereits exponierten Frauen von der Impfung selbst, dem gegenüber steht aber auch ein höheres Risiko dieser Frauen an einer HPV-Infektion zu erkranken. Auch wir vertreten die Auffassung, dass es sich bei den Frauen, die an einem Zervixkarzinom erkrankt sind, um eine Population handelt, deren immunologische Kompetenz eine HPV-Infektion abzuwehren geringer ist als die der Gesamtbevölkerung. Somit könnten diese Patientinnen besonders von der HPV-Impfung profitieren.

Neben der in dieser Studie verwendeten quadrivalenten Vakzine existiert eine weitere, bivalente Vakzine: Cervarix. Sie enthält jeweils 20 µg VLP der HR-HPV-Typen 16 und 18, die in der quadrivalenten Impfung enthaltenen VLP der HPV-Typen 6 und 11 sind nicht enthalten. Als Adjuvanz enthält Cervarix AS04. Hierbei handelt es sich um ein Lipopolisaccharid der bakteriellen Zellwand. Durch dieses Adjuvanz werden nach Impfung höhere Antikörpertiter erreicht.

Da die Patientinnen dieser Studie mit dem quadrivalenten Impfstoff geimpft wurden und die Immunogenität ebendieses Impfstoffs untersucht werden soll, wird an dieser Stelle nicht weiter auf den Impfstoff Cervarix eingegangen (56, 57).

Immunantwort nach HPV-Impfung

Die durch die HPV-Impfung erzielte Immunität basiert hauptsächlich auf der Bildung von Antikörpern gegen das Virusoberflächenprotein L1. Nach intramuskulärer Injektion des Impfstoffs werden die in diesem enthaltenen, aus L1-Proteinen bestehenden VLPs, von den dendritischen Zellen phagozytiert. Diese antigenpräsentierenden Zellen prozessieren die VLP und präsentieren sie mit ihren Major Histocompatibility Complex-II-Rezeptoren (MHC-II-Rezeptoren) in den lokalen Lymphknoten den naiven CD4⁺ T-Lymphozyten. Diese nun aktivierten T-Zellen entwickeln sich zu T-Helferzellen Typ 1, Typ 2 oder zu Memory-Zellen (58, 59).

Die T-Helferzellen Typ 1 (TH1) sind in der Lage, Makrophagen zu aktivieren. Diese Aktivierung findet über einen Komplex des MHC II mit dem T-Zellrezeptor und dem CD4-Oberflächenmolekül statt. Des Weiteren bindet die TH1-Zelle mit dem Oberflächenmolekül CD154 an das Oberflächenmolekül CD40 der Makrophagen. Diese phagozytieren nun die dem präsentierten Antigen entsprechenden Antigene. Durch die Sekretion von Interleukin-2 (IL-2) stimulieren die T-Zellen die eigene Proliferation und Differenzierung. Über Sezernierung von Interferon- γ und Tumornekrosefaktor- β (TNF- β) kann die TH1-Zelle CD8⁺ T-Zellen aktivieren. Diese sind in der Lage, kernhaltige Zellen, die über ihren MHC I Rezeptor die korrespondierenden Antigene präsentieren, eigenständig zu lysieren. Diese TH1-vermittelte Immunantwort entspricht der zellulären Immunität. Sie folgt auf eine natürliche Exposition mit HPV. Allerdings ist sie meist insuffizient. Dies erklärt sich durch die fehlende Virämie des epithelotropen Virus. Ebenso werden keine proinflammatorischen Zytokine sezerniert, welche antigenpräsentierende

Zellen, hier die dendritischen Zellen, aktivieren würden (vgl. S.3: *Pathogenese des Zervixkarzinoms*). Trotzdem heilen 80-90% der HPV-Infektionen sowie CIN I und II als Folge einer zellulären Immunantwort gegen die Virusproteine E2 und E6 aus. Häufig wird keine Serokonversion beobachtet (59-61).

Entwickelt sich die aktivierte T-Zelle zur TH2-Zelle, so ist dies die Verbindung zur humoralen Immunantwort. Die TH2-Zelle tritt über die gleichen Rezeptoren mit einer B-Zelle in Kontakt wie dies bei einer TH1-Zelle mit T-Zellen geschieht, statt IL-2 und Interferon- γ werden jedoch vorwiegend Interleukin-4 und -5 sezerniert. Wenn diese B-Zelle zuvor Kontakt mit dem Antigen hatte, findet ein class-switch statt. Die nun gebildeten Plasmazellen sezernieren verschiedene Ig-Subtypen die gegen die im Impfstoff enthaltenen L1-Proteine gerichtet sind. So führt der durch die HPV-Impfung erreichte class-switch zu hohen IgA-Antikörpertitern gegen das im Impfstoff enthaltene L1-Protein (62, 63).

Zielsetzung und Fragestellung

Das Zervixkarzinom ist bei Frauen im fertilen Alter die zweithäufigst diagnostizierte Krebserkrankung (7). Das mittlere Alter der Erstdiagnose sinkt stetig, wohingegen in Deutschland das Alter der Erstgebärenden steigt (6). Die Standardtherapie des frühen Zervixkarzinoms, die radikale Hysterektomie, macht eine spätere Schwangerschaft der so behandelten Frauen unmöglich. Die radikale vaginale Tachelektomie hingegen ermöglicht es, das Zervixkarzinom bis zum Stadium FIGO Ib2 stadiengerecht und zugleich fertilitätserhaltend zu therapieren (25, 34).

Wir stellen uns die Frage, ob es durch die seit 2007 in Deutschland zugelassene, prophylaktische quadrivalente HPV-Impfung möglich ist, auch bei den Frauen eine Immunantwort hervorzurufen, deren Zervixkarzinom zuvor durch eine Trachelektomie therapiert wurde. Zwar wird bei der Trachelektomie der Infektionsherd reseziert, somit sind die Frauen in der Regel infektionsfrei, jedoch verbleiben Teile der Zervix in situ. Eine spätere Reinfektion ist somit nicht ausgeschlossen.

In diesem Zusammenhang sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Können durch die Impfung steigende Titer gegen die im Impfstoff enthaltenen Antigene erreicht werden?
- Lässt sich eine Korrelation zwischen dem im Primärtumor nachgewiesenen HPV-Typ und dem Anstieg einzelner Antikörpertiter nachweisen?

- Ziel ist es auch, ein statistisches Modell zu entwickeln, mit dem die Immunantwort von Patientinnen post Trachelektomie auf die quadrivalente HPV-Impfung beschrieben werden kann. Hierbei soll geprüft werden, welche Prädiktoren die Vorhersagegenauigkeit der Titerhöhe verbessern können.

Um diese Fragen zu beantworten, wurden von 53 trachelektomierten Frauen 37 geimpft, 16 Frauen wurden als Kontrollgruppe nicht geimpft (vergleiche *Patientinnenkollektiv*, S. 19). Den Patientinnen wurde zu mehreren Zeitpunkten vor und nach Trachelektomie und Impfung Blut entnommen (vergleiche *Material*, S. 22). In diesem wurden mittels Luminex-Technologie die Titer der gegen HPV gerichteten Antigene bestimmt (vergleiche *Luminex*, S. 26). Um aus diesen Titern ein Modell unter Berücksichtigung der longitudinal verteilten Messzeitpunkte an verschiedenen Individuen zu berücksichtigen, entwickelten wir ein gemischtes lineares Random-Intercept-Modell. Eine einfachere, deskriptive Übersicht über die Entwicklung der Titer erreichten wir durch den Vergleich der Mediane mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (vergleiche *Statistische Auswertung*, S. 30).

2. Patientinnen, Material und Methoden

Patientinnen

Patientinnenkollektiv

Die vorliegende Studie betrachtet 53 Patientinnen mit invasivem Zervixkarzinom im Frühstadium. Als Ausgangsmaterial wurde Blut der Patientinnen verwendet, bei denen ein Zervixkarzinom FIGO Ia1 bis FIGO Ib1 mit einer Tumorgroße unter 2 cm diagnostiziert wurde und die durch radikale vaginale Trachelektomie therapiert wurden. Die Operationen fanden in den Jahren 2002 bis 2008 am Universitätsklinikum Charité Berlin, Campus Benjamin Franklin und Campus Mitte, sowie der Universitätsklinik Jena statt. Das Patientenkollektiv schließt eine Patientin ein, welche zum Zeitpunkt der Operation an einem Zervixkarzinom im FIGO-Stadium 1b1 > 2 cm litt. Somit entsprach die Patientin nicht den Einschlusskriterien für eine Trachelektomie. Bei bestehendem Kinderwunsch konnte die Patientin nach ausführlicher Aufklärung experimentell durch neoadjuvante Chemotherapie und RVT behandelt werden.

Die Studie wurde vom Ethikkomitee der Charité durch ein Ethikvotum bestätigt (EA4/036/07). Die Aufnahme der Patientinnen in die Studie erfolgte nach ausführlicher ärztlicher Aufklärung, sowie der schriftlichen Einwilligung. Die Entscheidung, sich impfen zu lassen, wurde von jeder Frau eigenständig gefällt und war unabhängig von der Teilnahme an der Studie. Die Teilnahme an Blutentnahmen war freiwillig. Die Kosten des Impfstoffs wurden von den Patientinnen selbst getragen, sofern sie nicht im Rahmen einer Einzelfallregelung von der Krankenkasse übernommen wurden. Eine Aufwandsentschädigung wurde nicht gezahlt.

Einschlusskriterien

Um als an einem Zervixkarzinom erkrankte Frau durch eine Trachelektomie behandelt werden zu können, müssen bestimmte Voraussetzungen erfüllt sein. Eine Trachelektomie ist volljährigen Frauen mit (zukünftigem) Kinderwunsch vorbehalten. Die FIGO-Klassifizierung des Tumors darf IB1 nicht überschreiten, wobei der Durchmesser des Tumors nicht größer als 2 cm sein darf. Gerade die Größe des Tumors wird als das

wichtigste Kriterium bei der Entscheidung für oder gegen eine Trachelektomie angesehen (41). Die Anwendung der Trachelektomie beschränkt sich auf Tumore mit histopathologischer Differenzierung als Adeno-, Plattenepithel- und adenosquamösem Karzinom. Neuroendokrine Tumore sind ausgeschlossen. Gleiches gilt bei Vorhandensein von Metastasen, dem Befall von pelvinen oder parametranen Lymphknoten, sowie dem kombinierten Befall der lymphovaskulären und angiovasculären Räume. Auch andere, das Allgemeinbefinden stark beeinträchtigende Begleiterkrankungen (Karnofsky-Index < 90%) oder eine Schwangerschaft gelten als Ausschlusskriterien für die radikale vaginale Trachelektomie (25).

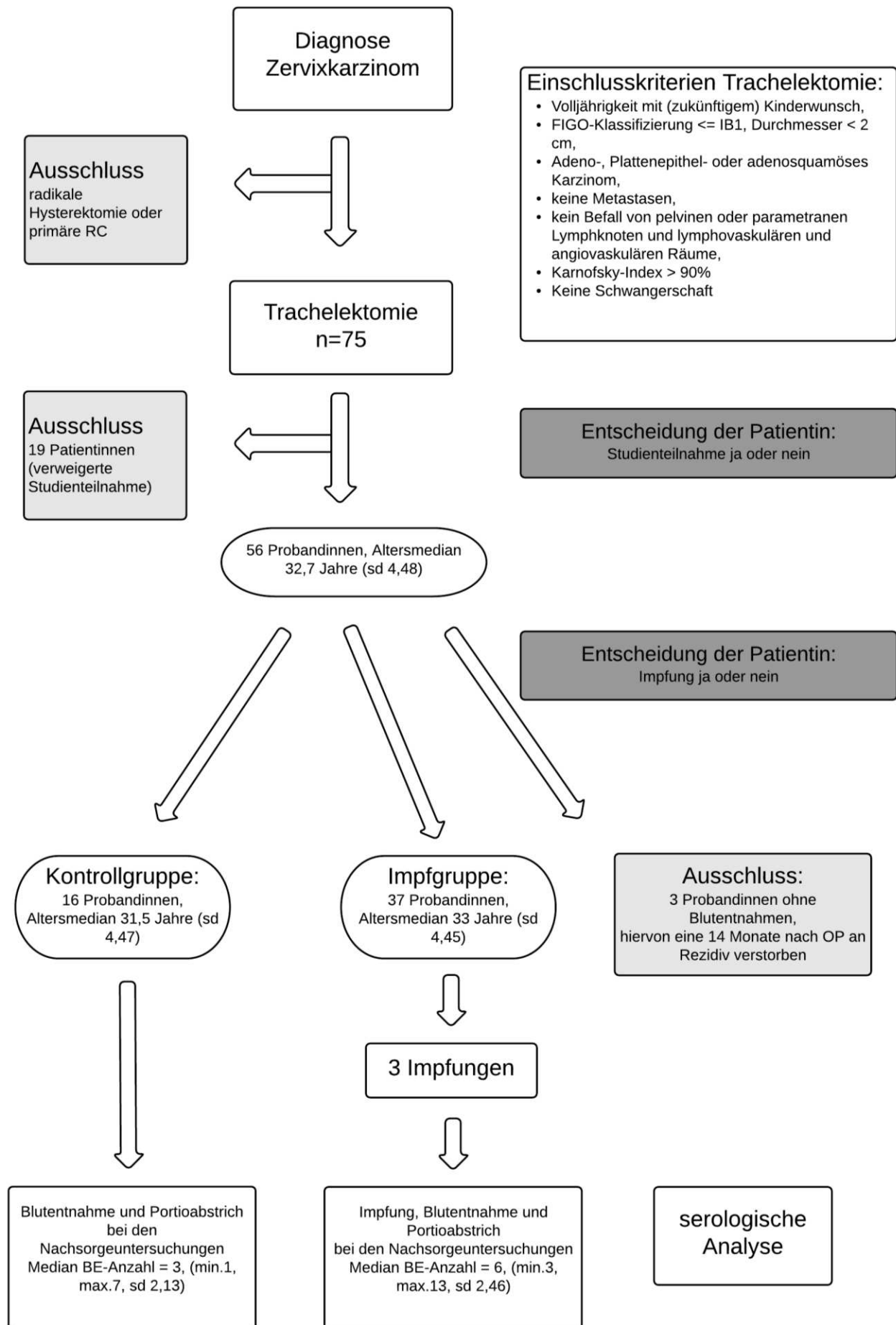


Abbildung 3: Übersicht über Ein- und Ausschluss der Patientinnen

Follow-Up

Bei der regulären Nachsorge des Zervixkarzinoms stehen die Anamnese, die klinische Untersuchung und die zytologische Untersuchung im Mittelpunkt. Apparative Diagnostik über die Sonographie hinaus bleibt den Fällen, bei denen ein Rezidivverdacht besteht, vorbehalten. Nachsorgeuntersuchungen sind während der ersten beiden Jahre vierteljährlich, im dritten bis fünften Jahr halbjährlich und danach jährlich vorgesehen. Hierbei werden eine Kolposkopie, die vaginale und rektale Tastuntersuchung, eine Sonographie des inneren Genitale, der ableitenden Harnwege und ein Abstrich von der Portiooberfläche zur Durchführung einer Zytologie nach Papanicolaou sowie des Nachweises von HPV-DNA durchgeführt. Tumormarker werden nicht routinemäßig bestimmt. Bei den in dieser Studie durchgeführten Nachsorgeuntersuchungen wurde gleich verfahren. Die Untersuchungen wurden lediglich um eine Blutentnahme erweitert. Diese dienten der Erhebung der Titer der gegen HPV gerichteten Antikörper, um so die durch die durchgeführte Impfung hervorgerufene Immunantwort quantifizieren zu können.

Material

Blutentnahmen

Die erste Blutentnahme erfolgte bei Entlassung nach Durchführung der Trachelektomie, vor Erhalt der Impfung, sofern vorgesehen. Die folgenden Blutentnahmen fanden bei den planmäßigen Nachsorgeuntersuchungen statt. Bei Patientinnen, die vor Zulassung des Impfstoffs operiert worden waren, wurde erst im Verlauf der Nachsorgeuntersuchungen mit Blutentnahmen und gegebenenfalls Impfungen begonnen. So konnten für jede Patientin zwischen einer und 13 Blutproben gewonnen werden (Median 5, SD 2,7). Aus diesen Blutproben wurde das Plasma gewonnen, dieses wurde bis zur endgültigen Bestimmung der Antikörpertiter bei -80°C gelagert.

Zervix-Abstriche

Um eine erneute Infektion mit HPV oder ein Rezidiv zu erkennen, wurde die Zervixoberfläche der Patientinnen abgestrichen. Diese Abstriche wurden auf HPV-DNA

überprüft und gegebenenfalls typisiert. So konnten je Patientin zwischen null und elf Abstrichen gewonnen werden (Median 4, SD 3,5).

Konisationspräparate zur Typisierung des ursprünglichen HPV

Die Konisationspräparate zur Bestimmung des HPV-Typen im Primärtumor der Frauen wurden mit dem Einverständnis der Probandinnen von den sie behandelnden Frauenärzten, beziehungsweise den verantwortlichen Pathologen angefordert. Die in Paraffin eingebetteten Gewebeproben konnten problemlos mittels Briefpost versendet werden. Nach Abschluss der Typisierung wurden die Gewebeproben an den entsprechenden Pathologen zurückgesendet.

Tabelle 4: Verwendete Labormaterialien und -geräte

0,2 ml PCR-Gefäße	AB Gene
1 Kb-DNA-Ladder	Fermentas
1 x TAE-Puffer	50 x pH 8,3 Tris-Acetat-EDTA Puffer, verdünnt, Merck
1,5 ml Safe-Lock Reaktionsgefäße	Eppendorf
2 ml Safe-Lock Reaktionsgefäße	Eppendorf
-20°C Kühlakkuständer 96-well	Eppendorf
6 x Ladepuffer	Fermentas
96-well Hyb-Platte Multiscreen HTS, BV	Millipore
96-well Polypropylen PCR-Thermoplatten	HJ-Bioanalytik GmbH
Aerosol resistente Filtertips	Greiner Bioone
AE-Puffer AL-Puffer ATL-Puffer AW1-Puffer AW2-Puffer	QIAamp DNA-Minikit (Cat. No. 51306), Qiagen
Bioplex-Luminex-Messstation	Bio-Rad
Blockpuffer-Waschpuffer	Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) 1 mg/ml Casein, pH 7.4± 0,1: 0,5g Cas. auf 500 ml PBS
Boplex COOH-Beads, jeweils an HPV-typspezifische Oligonukleotidsonde gekoppelt	Bio-Rad

DNA-Exitus	Roth
Einweg-Handschuhe	Diverse
Einwegkanülen	Braun
Ethanol absolut	Merck
Färbepuffer	2 M TMAC 75 mM Tris-HCl, pH8.0 6 mM EDTA, pH 8.0 1,5 g/L I-Sarkosyl 1 mg/ml Casein
Ficoll-Lösung	FICOLL 400 Reagent, Merck
Gel-Dokumentationsgerät	Syngene Gene Genius
Greiner-Röhrchen	Greiner bio-one
Horizontale Elektrophorese	Bio-Rad
Horizontalschüttler IKA	Scientific Laboratories
Hybridisierungspuffer	0,15M Tetramethylammoniumchlorid (TMAC) 75 mM Tris-HCl, pH 8.0 6 mM EDTA, pH 8.0 1,5 g/L I-Sarkosyl/N-Lauroylsarcosine (Sigma)
Leucosept-Greiner-Röhrchen, 50 ml	Greiner bio-one
Mikrotom-Messer	Microm
PBS	phosphate buffered saline, pH 7.2, BD
PCR-Gerät „Mastercycler EP Gradient“	Eppendorf
PCR-Thermocycler EP-Gradient	Eppendorf
Pipettenspitzen	Roth
Polyolefin Abdeckfolie für Thermo PCR Platten	HJ-Bioanalytik GmbH, Art.Nr. 900320
Schlittenmikrotom	R. Jung AG
Streptavidin-R-Phycoerythrin	Molecular Probes (Invitrogen) Cat. No S866
Thermomixer	Biozym
Thermomixer mit Aufsatz für 96-Well Platten	Eppendorf
Tris-EDTA Puffer	10 mM Tris-HCl, pH8.0 1 mM EDTA, pH 8.0
Vakuum Waschstation	Millipore
Vortexer	Scientific Laboratories
Zentrifuge Biofuge Primo R	Heraeus
DMSO	Merck Millipore

FCS	Biochrom
RPMI-1640	Merck Millipore

Methoden

Impfzeitpunkt

Die Probandinnen wurden, sofern möglich, in den ersten Tagen nach Durchführung der Trachelektomie mit der ersten Dosis des quadrivalenten Impfstoffs (Handelsname Gardasil®) geimpft. Die zweite und dritte Dosis des Impfstoffs wurde bei den folgenden Nachsorgeuntersuchungen verabreicht. War die Operation bereits vor Zulassung des Impfstoffs erfolgt, so wurden nach der Zulassung alle drei Impfungen bei den Nachsorgeuntersuchungen verabreicht. Durch die Kopplung von Nachsorgeuntersuchungen und Impfungen sollte die Compliance erhöht und die Belastung der Patientinnen vermindert werden. Allerdings konnte hierdurch in einigen Fällen das Impfschema, welches Impfungen zu den Zeitpunkten 0, 2 und 6 Monate empfiehlt, nicht eingehalten werden. Hier wurde das Medikament in geringem Maße zeitlich verzögert appliziert. Nach aktueller Studienlage darf aber davon ausgegangen werden, dass dies keinen Einfluss auf die Immunogenität der Impfung hat (64).

Abstrich- und Blutentnahmezeitpunkt

Sowohl Abstriche als auch Blutentnahmen wurden bei den regulären Nachsorgeterminen vorgenommen (siehe S. 22, *Follow-Up*). Da die Patientinnen aus dem gesamten Bundesgebiet stammen, wurden die Nachsorgetermine teilweise bei den die Patientinnen in der Heimat betreuenden Gynäkologen vorgenommen. Diese Proben wurden per Nachtexpress in unser Labor versandt und hier analysiert. Diese Praxis erhöhte Komfort, Autonomie, aber auch die Eigenverantwortung der Probandinnen. Dies erklärt die Unterschiede (Tabelle 5) in der Anzahl der Blutentnahmen.

Tabelle 5: Blutentnahmen pro Patientin

n Patientinnen	53		Minimum	1
Median	5		Maximum	13
Standardabweichung	2,7			

Bestimmung der Antikörpertiter im Blutplasma

Aus den Blutproben, die den Frauen abgenommen wurden, wurde Plasma gewonnen. In ihm wurden die Titer der gegen die Virusproteine L1, E6 und E7 der HPV-Typen 6, 11, 16, 18, 31 und 45 bestimmt.

Gewinnung des Plasmas

Da aus den Blutproben zur Durchführung anderer Untersuchungen auch die peripheren Blutlymphozyten gewonnen und kryokonserviert werden sollten, wurde kein Serum, sondern Plasma gewonnen. Zur Durchführung der von uns gewählten Glutathion-S-Transferase (GST) -Luminex-Analyse ist dieses ebenso geeignet.

Zur Gewinnung des Blutplasmas wird das Lithium-Heparin-Blut innerhalb von 24h für 20 Minuten bei 2200 rpm zentrifugiert. Der Überstand dieser zentrifugierten Proben wird abpipettiert und bis zur Analyse bei -80°C gelagert.

Erhebung der Antikörpertiter durch einen serologischen Multiplex-Assay (Luminex)

Die quantitative Bestimmung der gegen HPV gerichteten Antikörper wurde freundlicherweise durch Tim Waterboer und seine Arbeitsgruppe „Infektionen und Krebs-Epidemiologie“ am deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg übernommen. Sie erfolgte durch einen Multiplex-Assay mit dem die spezifischen Antikörper gegen L1, E6 und E7 der HPV-Typen 6, 11, 16, 18, 31 und 45 gleichzeitig gemessen werden (65). Dies geschieht in einem speziellen Durchflusszytometer (xMAP, Luminex Corp). Dieses misst die Fluoreszenz, welche von Polystyren-Beads emittiert wird. Da die Beads über Glutathion-S-Transferase mit dem entsprechenden Antigen verbunden sind, können die Beads nach Binden der Antikörper durch sekundäre, biotinylierte Antikörper und Streptavidin-R-Phycoerythrin markiert werden. Die so emittierte Fluoreszenz wird in Median Fluorescence Intensity (MFI) gemessen (65).

Typisierung des HPV im Primärtumor

Herstellung von Paraffinschnitten aus Paraffinblöcken:

Von jeder in Paraffin eingebetteten Gewebeprobe werden 10 – 15 Scheibchen der Stärke 10 µm mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms geschnitten. Mittels einer sterilen Einwegkanüle werden sie in ein 2 ml fassendes Safe-Lock Reaktionsgefäß überführt. Um zu garantieren, dass die so gewonnenen Präparatscheiben frei von Fremd-DNA sind, werden die Anschnitte der Blöcke verworfen und die Klinge zwischen den verschiedenen Blöcken, aber auch zwischen Anschnitten und Schnitt der zu prozessierenden Scheiben gewechselt. Das Mikrotom wird mit Ethanol absolut gereinigt und um eine Kontamination durch HPV-DNA zu verhindern, mit DNA-Exitus plus gemäß Datenblatt für eine Minute benetzt. Diese Reinigungsprozedur wird vor Arbeitsbeginn, aber auch zwischen den verschiedenen Gewebeproben sowie zwischen Anschnitt und Schnitt der zu prozessierenden Scheibchen wiederholt. Der Wechsel der Einweg-Handschuhe erfolgt sowohl vor als auch nach jeder Reinigungsprozedur.

Der HPV-Typ der so gewonnenen Scheibchen wird, wie in den folgenden Abschnitten beschrieben, in der Laborroutine typisiert:

Aufreinigung der DNA aus den Paraffinschnitten

Die Paraffinschnitte werden in 2 ml Reaktionsgefäßen mit 1,2 ml Xylol auf höchster Stufe gevortext und für 5 Minuten bei 15.000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nachdem der Überstand abpipettiert wurde, werden diese Schritte wiederholt. Nun wird 1 ml Ethanol absolut zugegeben, die Probe erneut auf höchster Stufe gevortext, für 5 Minuten bei 21.000 rpm zentrifugiert und der Überstand wird abpipettiert. Diese Schritte werden im Anschluss wiederholt.

Nachdem die Gewebepellets unter Sicht bei 37°C getrocknet wurden, werden 180 µl ATL-Puffer zu den geschnittenen Präparatscheibchen in die Reaktionsgefäße pipettiert und diese kurz gevortext. Nach Zugabe von 30 µl Proteinase K werden die Proben erneut kurz gevortext und eine Stunde im Thermomixer bei 56°C und 900 rpm schüt-

telnd inkubiert. Nach Abzentrifugieren des Kondensationswassers werden 200 µl AL-Puffer zugegeben, gevortext und erneut bei 70°C für 10 Minuten im Thermomixer inkubiert. Es folgt die Zugabe von 200 µl Ethanol absolut, nach erneutem Vortexen wird die Probe auf eine QIAamp-Spinnsäule überführt. Diese wird bei 8000 rpm für eine Minute zentrifugiert um anschließend das Sammelröhrchen durch ein neues zu ersetzen, 50 µl AW1-Puffer zuzugeben und bei 8000 rpm erneut für eine Minute zu zentrifugieren. Das Sammelröhrchen wird wieder verworfen und 500 µl AW2-Puffer hinzupipettiert, gefolgt von Zentrifugieren bei 8000 rpm für eine Minute. Nach Verwerfen des Sammelröhrchens wird der Filter durch Zentrifugation bei 14.000 rpm für 2 Minuten getrocknet. Die DNA-Säule wird nun mit 40 µl AE-Puffer für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend mit 8000 rpm für eine Minute in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß abzentrifugiert. Dieser Vorgang wird mit 30 µl AE-Puffer erneut durchgeführt.

Amplifikation der DNA mittels GP5+/6+-Bio-PCR

Die so gewonnene DNA wird mittels PCR amplifiziert. Hierzu werden je Probe 20 µl G5+/6+-Bio-PCR Mastermix-Ansatz mit 5 µl Patienten-DNA in ein PCR-Gefäß pipettiert. Parallel werden 20 µl Mastermix ohne DNA-Zugabe als Negativkontrolle angesetzt. Die so vorbereiteten Proben werden im Eppendorf-Cycler im Programm Amplitaq amplifiziert. Dieses beinhaltet eine vierminütige Denaturierung bei 94°C, gefolgt von 40 Amplifikationszyklen. Jeder dieser Zyklen besteht aus einer erneuten Denaturierung (94°C für 20 s), der Primerhybridisierung (38°C für 30 s) und der Extension (71°C für 80 s). Die letzte Extension wird auf vier Minuten verlängert (66, 67).

Sollten in einer Probe keine HPV-DNA nachgewiesen werden, gilt es zu prüfen, ob ausreichend Material vorhanden war. Dies geschieht mittels Elektrophorese einer β-Globin PCR, wie von Schmitt et al. beschrieben (66).

Aufarbeitung der HPV-Zervixabstriche

In die Probenröhrchen, in denen die Abstrichtupfer gelagert wurden, werden 2 ml PBS/0,005% Thimerosal pipettiert, anschließend werden sie wieder verschlossen. Der Abstrich wird nun nach kurzem Vortexen 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Suspension wird in ein 2 ml Safe-Lock-Reaktionsgefäß überführt und bei 2200 rpm für 5

Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abgekippt und das verbleibende Pellet in 400 µl PBS/Thimerosal resuspendiert. Aus 200 µl dieses Materials wird die DNA mit dem QIAamp DNA-Minikit (Qiagen, Hilden) extrahiert und mit 160 µl AE-Puffer eluiert. Die Typisierung erfolgt mit 5 µl dieses Materials mittels Luminex-Technologie.

HPV-Typisierung der Abstiche mittels Luminex-Technologie

Ziel der Methode ist es, die PCR-Produkte aus dem GP5+/6+-Bio-PCR Primersystem mit HPV-spezifischen Sonden zu typisieren. Hierzu werden 5 µl des PCR-Produkts, 33 µl gevortexter Bead-Mix und 7 µl Tris-EDTA Puffer pH 7,2 (TE-Puffer) in je ein Well einer 96-Well Hybridisierungsplatte pipettiert, diese wird nun mit Polyolefin-Folie verklebt. Im PCR-Mastercycler wird die Platte für 10 Minuten bei 95°C denaturiert, im Anschluss auf einem -20°C kalten Kühlakku abgekühlt, um im Thermomixer für 35 Minuten bei 41°C und 650 rpm zu hybridisieren.

Bevor die Hybridisierungszeit abgelaufen ist, wird eine 96-Well-Millipore Waschplatte mit 100 µl Waschpuffer pro Well versehen. Dieser wirkt nun 15 Minuten ein, bevor er über eine Vakuumpumpe abgesaugt wird. Nach Ablauf der Hybridisierungszeit wird die Hybridisierungsplatte aus dem Thermomixer genommen, die Polyolefin-Folie entfernt und nach einmaligem Auf- und Abpipettieren auf die Waschplatte übertragen. Die Flüssigkeit aus der Hybridisierungsplatte wird nun durch erneutes Anschalten der Vakuumpumpe entfernt. Pro Well werden 100 µl Waschpuffer zugegeben, auch dieser wird durch die Vakuumpumpe entfernt. Die Färbung erfolgt, indem pro Well 75 µl Färbepuffer mit Streptavidin-PE (1:1600) hinzupipettiert werden, gefolgt von einer 30-minütigen Inkubation auf einem horizontalen Schüttler (650 rpm). Auch diese Lösung wird nach Ablauf der Inkubationszeit wie oben beschrieben entfernt, es folgen zwei weitere Waschvorgänge mit Waschpuffer. Die mit 80 µl Waschpuffer pro Well in Lösung gebrachten Beads sind nun bereit für die Messung im BioRad-Luminexgerät. Diese erfolgt komplett automatisiert und direkt aus der Waschplatte (66, 67).

Statistische Auswertung

Die statistische Analyse wurde mit dem Programm IBM SPSS Statistics, Version 22 durchgeführt.

Die Verteilung der HPV-Typen im Primärtumor wurde deskriptiv beschrieben. Der explorative Teil der Statistik umfasst die Altersverteilung der Probandinnen, das FIGO-Stadium, die aufgetretenen Rezidive sowie den histologischen Typ des Karzinoms. Die kontinuierliche Variable „Alter“ wurde mit Median sowie erstem und dritten Quartil dokumentiert. Um die Abhängigkeit zwischen dieser unabhängigen Variable und der Zugehörigkeit der Probandinnen zu Impf- oder Kontrollgruppe zu prüfen, verwendeten wir den Mann-Whitney U-Test. Kategoriale Variablen wurden als absolute Häufigkeit und Prozentzahl angegeben. Um die Abhängigkeit zwischen den kategorialen Variablen und der Zugehörigkeit der Probandinnen zu Impf- oder Kontrollgruppe zu prüfen, verwendeten wir den exakten Test nach Fisher-Freeman-Halton. Dieser ist für Kontingenztafeln mit mehr als 2x2 Variablen und Zellen mit erwarteten Werten unter 5 geeignet. Die Ergebnisse dieses Teils der statistischen Auswertung haben explorativen Charakter.

Um die Entwicklung der Antikörpertiter deskriptiv abzubilden, wurden die Titerwerte, nach Probandin und Impfstadium (vor Impfung oder nach mindestens einer Impfung) aggregiert. Da unterschiedlich viele Blutentnahmen pro Probandin durchgeführt wurden, wurde zunächst der Median der Titer je einer Frau vor der ersten, beziehungsweise nach mindestens einer Impfung, bestimmt. Erst aus diesen Medianen wurde nun der Median der Impftiter bestimmt. So wurde für die Darstellung der Werte immer nur ein Wert pro Patientin und Impfstatus verwendet. Auf diese Weise konnten 114 Mediane der Titer vor der ersten Impfung, beziehungsweise nach Applikation mindestens einer Impfung gewonnen werden. Diese wurden durch Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests (Wilcoxon Signed Rank Test) verglichen. Dieser nichtparametrische Test basiert auf den Rangzahlen der Werte und ist für den paarweisen Vergleich nicht-normalverteilter, verbundener Daten geeignet.

Ebenso wurde unterschieden, ob es sich um Titer der HPV-Typen handelt gegen welche geimpft wurde (HPV-Typ 6, 11, 16 und 18) oder nicht (HPV-Typ 31 und 45) sowie ob es sich bei betreffendem Antikörper um ein in der Impfung enthaltenes (L1) oder nicht enthaltenes (E6 und E7) Antigen handelt.

Um Regressionsmodelle für die Testung der Titerveränderung nach Impfung zu bilden, entwickelten wir gemischte lineare Modelle (mixed linear models). Für jeden HPV-Typ und jeden Antikörper wurden eigene Prädiktoren errechnet, um antikörperspezifisch „gefittete Outcomes“ zu erhalten. Diese gemischten linearen Modelle ermöglichen die Modellbildung unter Berücksichtigung der inter-individuellen Unterschiede zwischen den Probandinnen (unabhängige Daten) bei mehreren, longitudinal verteilten Messzeitpunkten (abhängige Daten) (68-70).

Die abhängige Variable (y_{ij}) ist der Antikörpertiter gegen die verschiedenen HPV-Typen gemessen in MFI. Als feste Prädiktoren wurden in diesem ersten Modell die Anzahl der vorangegangenen Impfungen sowie die seit den Impfungen vergangene Zeit gewählt. Der Zeitpunkt (x_j) wird als kontinuierliche Variable in Tagen angegeben und in Bezug zur ersten Impfung gesetzt. Für die Kontrollgruppe bleibt sie über den gesamten Messzeitraum kleiner Null und schließt mit dem letzten Blutentnahmezeitpunkt ($x_j = 0$) ab.

Die vorangegangenen Impfungen wurden als Dummy-Variable (x_{2ij} - x_{4ij}) codiert, diese beträgt je nach Impfstadium den Wert 1 oder 0. So wird die Unterscheidung zwischen den Kategorien vor erster Impfung bzw. Kontrollgruppe, nach erster Impfung, nach zweiter Impfung und nach dritter Impfung ermöglicht. Als zufälliger Effekt des „Random Intercept Modells“ fungiert die Identität der Probandinnen. $P < 0.05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

Unser Gesamtmodell wird durch folgende Formel, im Folgenden Modell 1 genannt, beschrieben:

$$y_{ij} = \beta_0 + (\beta_1 * x_j) + (\beta_2 * x_{2ij}) + (\beta_3 * x_{3ij}) + (\beta_4 * x_{4ij}) + \varepsilon_{ij} + U_{0i}$$

y_{ij} stellt den Antikörpertiter (in MFI) der Probandin i zum Zeitpunkt j dar,

β_0 steht für den Fixed Effect Intercept,

β_1 steht für den Fixed Effect des Zeitpunkts

β_2 steht für die Fixed Effect der Impfung 1

β_3 steht für die Fixed Effect der Impfung 2

β_4 steht für die Fixed Effect der Impfung 3

x_{2ij} , x_{3ij} , x_{4ij} steht für die vorangegangene Impfung (Impfung 1, 2 oder 3) der Probandin i zum Zeitpunkt j,

ε_{ij} steht für das Residuum der Probandin i zum Zeitpunkt j,

x_j steht für den Zeitpunkt (gemessen in Tagen, in Bezug zur 1. Impfung)

u_{0i} steht für das Residuum oder den Random Effect des Achsenabschnitts des Zeitpunkts j,

Es konnte gezeigt werden, dass wir unser oben beschriebenes Modell 1, welches sich alleinig auf die vorangegangenen oder nicht vorangegangenen Impfungen als Prädiktor verlässt, durch das Implementieren weiterer Prädiktoren für einige der Ausgabevariablen verbessern können. Dieser Prädiktor ist der HPV-Typ, der im Primärtumor nachgewiesen wurde. Um ihn mit einzubeziehen, bildeten wir drei Gruppen: die Gruppe der Frauen, bei denen HPV- 16, -18 oder -31 (also Impfstofftypen und jener HPV Typ 31, für den eine Kreuzprotektion besteht) im Primärtumor-Präparat nachgewiesen werden konnte, die Gruppe der Frauen, bei denen ein anderer HPV-Typ nachgewiesen wurde und die Gruppe, bei denen der HPV-Typ des Primärtumors nicht bekannt ist. Die Typen der ersten Gruppe entsprechen somit den HR-HPV-Typen gegen die geimpft wurde und dem HPV-Typ 31, für den eine Kreuzprotektivität mit HPV 16 nachgewiesen wurde (71). Unser so modifiziertes Gesamtmodell wird formal wie folgt beschrieben:

Modell 2:

$$y_{ij} = \beta_0 + (\beta_1 * x_j) + (\beta_2 * x_{2ij}) + (\beta_3 * x_{3ij}) + (\beta_4 * x_{4ij}) + (\beta_5 * x_{5ij}) + (\beta_6 * x_{6ij}) + \varepsilon_{ij} + u_{0i}$$

y_{ij} stellt den Antikörpertiter (in MFI) der Probandin i zum Zeitpunkt j dar,

β_0 steht für den Fixed Effect Intercept,

β_1 steht für den Fixed Effect des Zeitpunkts

β_2 steht für die Fixed Effect der Impfung 1

β_3 steht für die Fixed Effect der Impfung 2

β_4 steht für die Fixed Effect der Impfung 3

β_5 steht für die Fixed Effect von HPV-16, 18 oder 31 im Primär-TU

β_6 steht für die Fixed Effect der unbekanntem HPV-Typen im Primär-TU

$x_{2ij}, x_{3ij}, x_{4ij}$ steht für die vorangegangene Impfung (Impfung 1, 2 oder 3) der Probandin i zum Zeitpunkt j

x_{5i}, x_{6i} , steht für den im Primär-TU vorhandenen HPV-Typ der Probandin i

ε_{ij} steht für das Residuum der Probandin i zum Zeitpunkt j

x_j steht für den Zeitpunkt (gemessen in Tagen, in Bezug zur 1. Impfung)

u_{0i} steht für das Residuum oder den Random Effect des Achsenabschnitts des Zeitpunkts j

3. Ergebnisse

Deskriptive Beschreibung der Studienpopulation

Der Altersmedian in der Gruppe der geimpften Frauen betrug zum Zeitpunkt der Trachelektomie 33 Jahre, der der Kontrollgruppe 31,5 Jahre (Tabelle 6). Der Altersunterschied zwischen den Gruppen ist nicht signifikant ($p=0,31$).

Tabelle 6: Altersverteilung im Patientinnenkollektiv

Altersverteilung	n	Median Alter	erstes Quartil Alter	drittes Quartil Alter	P ^a
geimpft	37	33	30	36	0,311
nicht geimpft	16	32	29	35	

^a Mann-Whitney-U-Test

Die HPV-DNA des Primärtumors wurde aus den Tumorpräparaten isoliert und typisiert. Dieser entsprach bei 45% (24) der Probandinnen Typ 16, bei 3,8% (2) Typ 18. Die Kombination von Typ 16 und 18 kam bei einer Probandin vor (1,9%). Der Nachweis gelang bei 9,4% (5) der Probandinnen nicht. Die Tumorpräparate von 19 Probandinnen konnten nicht typisiert werden.

Das Zervixkarzinom der Frauen entsprach zum Zeitpunkt der Diagnose zu 8,1% (geimpfte Frauen) bzw. 18,8% (Kontrollgruppe) dem Stadium FIGO Ia1, zu 21,6% bzw. 18,8% dem Stadium FIGO Ia2, 67,6% bzw. 62,5% dem Stadium FIGO Ib1 und einer geimpften Probandin (2,7%) mit einem FIGO-Stadium über Ib2. Der exakte χ^2 -Wert nach Fisher-Freeman-Halton beträgt 1,8 mit $p=0,721$ (Tabelle 8). Somit kann davon ausgegangen werden, dass keine signifikanten Unterschiede bezüglich des FIGO-Stadiums zwischen Impf- und Kontrollgruppe bestehen.

Bei 59,5% (Impfgruppe), bzw. 62,5% (Kontrollgruppe) der Frauen handelte es sich um ein Plattenepithelkarzinom, wohingegen bei 40,5% (Impfgruppe), bzw. 31,5% (Kontrollgruppe) der Frauen ein Adenokarzinom vorlag. Eine Patientin der Kontrollgruppe (6,3%) litt an einem adenosquamösen Karzinom. Der exakte χ^2 -Wert nach Fisher-Freeman-Halton beträgt 2,3 mit $p=0,314$ (Tabelle 9). Dies bedeutet, dass zwischen Impf- und

Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede bezüglich des histologischen Typs der Karzinome bestehen.

Bei 83,8% der geimpften Probandinnen konnte über den gesamten Beobachtungszeitraum keine erneute HSIL (im Sinne einer CIN I, II oder III) und kein Rezidiv festgestellt werden. Bei 5,4% (n=2) trat eine CIN I, bei 8,1% (n=3) eine CIN II und bei 2,7% (n=1) eine CIN III auf. In der Impfgruppe kam es auch zu einem Rezidiv (Tabelle 10). Das Rezidiv trat fünf Monate nach der Operation auf, zu diesem Zeitpunkt war lediglich die erste Impfdosis administriert worden. Aus Mangel an verwendbaren Blutentnahmen wurde die Patientin nicht in die Titer-Auswertung der Studie aufgenommen. Elf Monate nach Bekanntwerden des Rezidivs verstarb die Patientin trotz Radiochemotherapie und erfolgter Radikaloperation.

In der Kontrollgruppe konnte bei 87,4% (n=14) der Probandinnen kein Rezidiv oder HSIL festgestellt werden. Bei 6,3% (n=1) wurde eine CIN I diagnostiziert. CIN II und III traten nicht auf. Allerdings kam es zu einem Rezidivfall (6,3%). Das Rezidiv wurde 18 Monate nach der Operation diagnostiziert. Nach Radikaloperation und Radiochemotherapie ist die Patientin bis heute (Dezember 2014) rezidivfrei.

Bei sämtlichen Patientinnen (n=3), bei denen eine CIN I nach Trachelektomie auftrat, war zuvor HPV-16 im Primärtumor nachgewiesen worden. Unter den Patientinnen, bei denen post-Trachelektomie eine CIN II diagnostiziert wurde, waren zwei, bei denen ein „anderer“ HPV-Typ (nicht HPV Typ 16, 18, 31 oder 45) im Primärtumor nachgewiesen wurde. Bei einer CIN II-Probandin blieb der HPV-Typ im Primärtumor unbekannt. Nur bei einer Probandin trat eine CIN III auf, bei ihr war zuvor HPV Typ 18 im Primärtumor nachgewiesen worden. Der Primärtumor der Patientin, bei der 18 Monate nach OP ein Rezidiv diagnostiziert wurde, war HPV-16 positiv getestet worden.

Der exakte χ^2 -Wert nach Fisher-Freeman-Halton beträgt 3,6 mit $p=0,539$ (Tabelle 10, Tabelle 9), somit ist von keinem signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen unserer Population bezüglich des Auftretens eines Rezidivs oder einer HSIL auszugehen.

Tabelle 7: HPV-Typ im Primärtumor

HPV-Typ	16	18	16+18	45	Andere HPV-Typen	HPV-Typ nicht bestimmt
Häufigkeit n (%)	24 (45)	2,0 (3,8)	1 (1,9)	2 (3,8)	5 (9,4)	19 (35,8)

Tabelle 8: Tumorstadium nach FIGO

	n	FIGO Ia1	FIGO Ia2	FIGO Ib1	FIGO > Ib2	Fisher ^a	P ^b
Geimpft (n)	37	8,1% (3)	21,6 % (8)	67,6% (25)	2,7% (1)		
Kontrollgruppe (n)	16	18,8% (3)	18,8% (3)	62,5% (10)	0		
						1,8 (df=3)	0,712

^a exakter Test nach Fisher-Freeman-Halton^b exakte Signifikanz, zweiseitig

Tabelle 9: Histologischer Typ der Karzinome

	n	Platten-CA	Adeno-CA	Adenosquamöses CA	Fisher ^a	P ^b
Geimpft	37	59,5% (22)	40,5% (15)	0		
Kontrollgruppe	16	62,5% (10)	31,5% (5)	6,3% (1)		
					2,3 (df=2)	0,314

^a exakter Test nach Fisher-Freeman-Halton^b exakte Signifikanz, zweiseitig

Tabelle 10: Rezidive und HSIL

	n	kein Rezi- div	CIN I	CIN II	CIN III	Rezidiv	Fisher ^a	P ^b
Geimpft	3 7	83,8% (31)	5,4% (2)	8,1% (3)	2,7% (1)	0 ^c		
Kontrollgruppe	1 6	87,4% (14)	6,3% (1)	0	0	6,3% (1)		
							3,6 (df=4)	0,53 9

^a exakter Test nach Fisher-Freeman-Halton^b exakte Signifikanz, zweiseitig^c Die im Text beschriebene Rezidiv-Patientin der Impfgruppe wurde mangels verwertbarer Blutproben aus der Studie ausgeschlossen (vgl. S. 34)

Deskriptive Titerentwicklung

Die Mediane der Impftiter wurden getrennt nach Probandin, Impfstadium, HPV-Typ der Antikörper und Antigen mittels des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests verglichen (siehe S. 30, *Statistische Auswertung*). In dieser Rangfolge konnten 114 Mediane für Titer vor der ersten Impfung, beziehungsweise nach Applikation mindestens einer Impfung, verwendet werden.

Die Tabelle 11 gibt einen Überblick über die HPV-Antikörpertiter, getrennt nach L1-, E6- und E7-Antikörpern, je vor und nach mindestens einer Impfung. Um einen Überblick über die Streuung zu geben, ist zusätzlich zum Median das 25. und das 75. Perzentil angegeben. Ersteres umfasst alle Werte die kleiner als ein Viertel aller Werte sind. Das 75. Perzentile gibt den Wert an, über dem die höchsten 25% der erfassten Werte liegen.

Tabelle 11: Mediane der L1-, E6- und E7-Antikörper vor und nach Impfung

	n	Perzentile		
		25.	50. (Median)	75.
L1-MW vor Impfung (HPV-6,11,16,18)	114	84,1	162,3	292,5
L1-MW nach Impfung (HPV-6,11,16,18)	114	1927,5	3218,0	3876,3
L1-MW vor Impfung (HPV-31,45)	114	84,9	172,3	325,0
L1-MW nach Impfung (HPV-31,45)	114	788,4	1488,5	2746,4
E6-MW vor Impfung (HPV-6,11,16,18)	114	14,9	38,8	147,3
E6-MW nach Impfung (HPV-6,11,16,18)	114	48,8	147,3	221,8
E6-MW vor Impfung (HPV-31,45)	114	16,1	50,3	163,0
E6-MW nach Impfung (HPV-31,45)	114	76,8	156,3	261,0
E7-MW vor Impfung (HPV-6,11,16,18)	114	2,9	31,0	122,0
E7-MW nach Impfung (HPV-6,11,16,18)	114	45,1	126,5	206,8
E7-MW vor Impfung (HPV-31,45)	114	2,5	27,0	134,6
E7-MW nach Impfung (HPV-31,45)	114	54,5	137,0	213,0

Bestätigt durch den Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (siehe S. 30, *Statistische Auswertung*) zeigte sich, dass die kumulativen L1-Titer der HPV-Typen 6, 11, 16 und 18 nach Impfung (Median 3218) über 19 mal höher waren als vor der Impfung (Median 162,3). Aus der auf den Rangzahlen der Mediane basierenden Teststatistik $U = -9,1$ ergibt sich ein p-Wert $<0,001$. Dies bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit, dass der gemessene Median in der zu vergleichenden Stichprobe vorkommt, wenn H_0 (kein Unterschied zwischen den Gruppen) gilt, sehr klein ist. Somit wirkt die Impfung auch in unserem Patientenkollektiv immunogen (Tabelle 11 und Tabelle 12).

Auch für die L1-Titer der nicht in der Impfung enthaltenen HPV-Typen 31 und 45 konnte eine deutliche Steigerung um das 8,6-fache gezeigt werden (Median vor Impfung = 172,3 / nach Impfung = 1488,5). Auch diese Steigerung ist signifikant ($P < 0,001$ $U = -8$).

Dies deutet auf eine immunogene Wirkung der Impfung auch gegen diese HPV-Typen hin, obwohl die entsprechenden Antigene nicht im Impfstoff vorhanden sind.

Die Mittelwerte der L1-Titer der HPV-Typen 6, 11, 16 und 18 waren nach Impfung (Median 3218) mehr als doppelt so hoch wie die L1-Titer der HPV-Typen 31 und 45 (Median 1488,5; U=-9,1; P<0,001) (Tabelle 11 und Tabelle 12). Somit steigen die Titer derjenigen HPV-Typen, deren Antigene im Impfstoff enthalten sind, deutlich stärker an, als die Titer der HPV-Typen, deren Antigene nicht im Impfstoff enthalten sind.

Der Vergleich der Titerwerte vor und nach Impfung der E6- und E7-Antigene zeigte signifikante Titeranstiege um das Zwei- bis Fünffache sowohl für die im Impfstoff enthaltenen (HPV 6, 11, 16 und 18) als auch die nicht im Impfstoff enthaltenen Antikörper (HPV 31 und 45). Allerdings handelt es sich, in Relation zu den L1-Antigentitern, um deutlich geringere MFI-Werte (Tabelle 11 und Tabelle 12).

Tabelle 12: Wilcoxon-Tests der Titer vor bzw. nach Impfung

Wilcoxon-Tests	U	P ^a
L1-MW vor Impfung (HPV-6,11,16,18) L1-MW nach Impfung (HPV-6,11,16,18)	-9,1	<0,001
L1-MW vor Impfung (HPV-31,45) L1-MW nach Impfung (HPV-31,45)	-8,0	<0,001
E6-MW vor Impfung (HPV-6,11,16,18) E6-MW nach Impfung (HPV-6,11,16,18)	-4,6	<0,001
E6-MW vor Impfung (HPV-31,45) E6-MW nach Impfung (HPV-31,45)	-4,9	<0,001
E7-MW vor Impfung (HPV-6,11,16,18) E7-MW nach Impfung (HPV-6,11,16,18)	-4,9	<0,001
E7-MW vor Impfung (HPV-31,45) E7-MW nach Impfung (HPV-31,45)	-4,7	<0,001
L1-MW nach Impfung (HPV-6,11,16,18) L1-MW nach Impfung (HPV-31,45)	-9,1	<0,001

a. Monte-Carlo-Sig. (2-seitig)

Die folgende Abbildung 4 stellt die HPV-Antikörpertiter im Verlauf dar. Sie unterscheidet zwischen den im Impfstoff enthaltenen HPV-Antigenen, ungeimpften und geimpften Probandinnen sowie dem Zeitpunkt der Blutabnahme in Relation zu erfolgten Impfungen. Die Titer der E6- und E7-Antikörper sind aus Gründen der Übersichtlichkeit zusammengefasst.

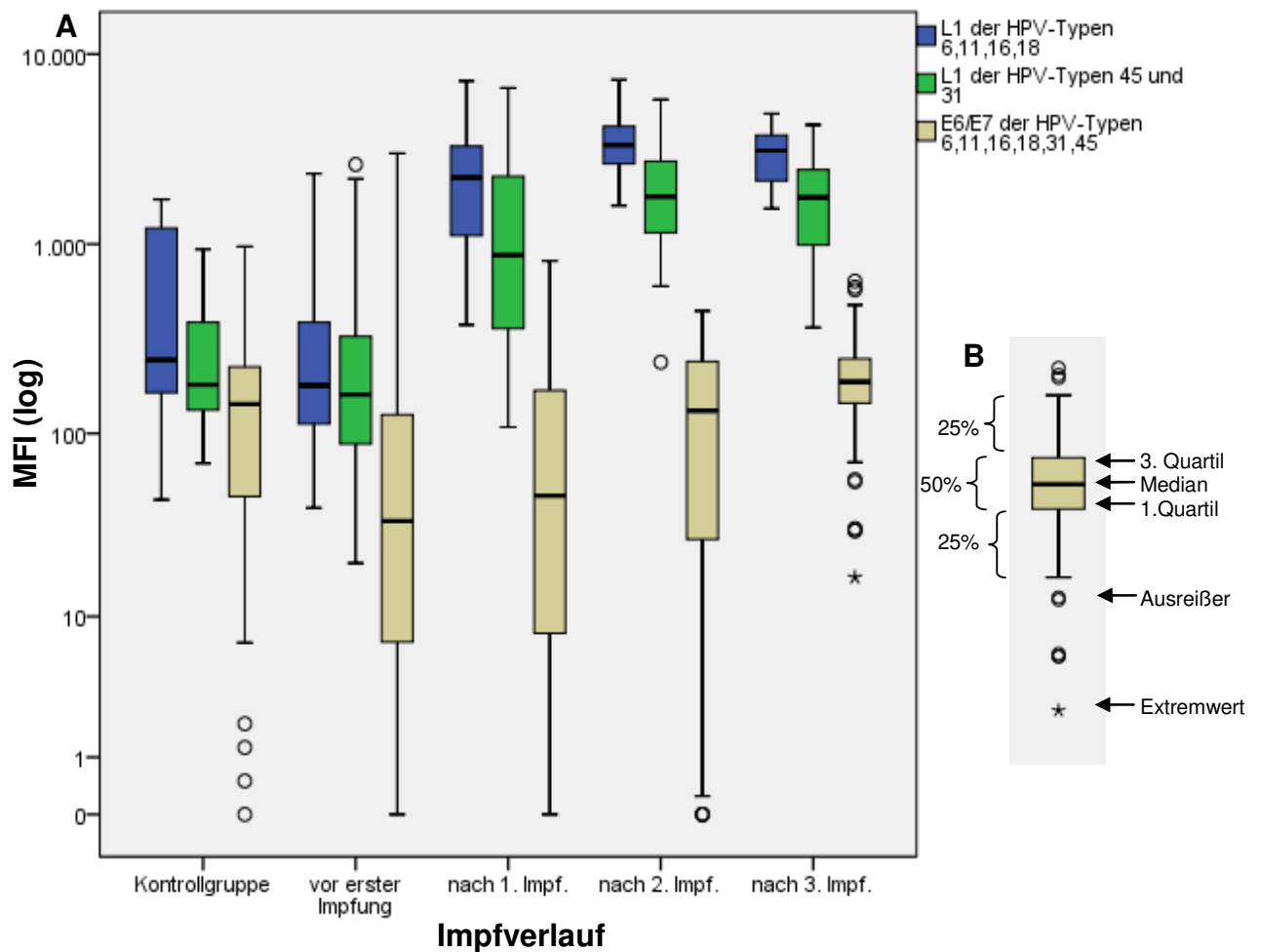


Abbildung 4: A) Darstellung der gemessenen Antikörpertiter per Boxplot.

B) Erklärung der Boxplotdarstellung

Ergebnisse des gemischten linearen Modells

Durch die Verwendung der gemischten linearen Modelle (siehe S. 30, *Statistische Auswertung*) kann der direkte Zusammenhang der Prädiktoren (erfolgte Impfungen, HPV-Typ im Primärtumor und verstrichene Zeit seit der ersten Impfung) mit den Zielvariablen (Antikörpertiter L1, E6 und E7 der HPV-Typen 6, 11, 16, 18, 31, 45) nachgewiesen werden. Durch das Berechnen verschiedener Modelle konnte geklärt werden, dass die

Prädiktoren mit signifikantem Zusammenhang die Anzahl der vorangegangenen Impfungen, die verstrichene Zeit seit der ersten Impfung sowie der HPV-Typ im Primärtumor sind. Der Zusammenhang dieser Prädiktoren wird durch den Schätzwert β im Vergleich zur Referenzgruppe angegeben. Bei positivem Wert (z.B. erfolgter erster Impfung) steigt der Modelltiter um den errechneten β -Wert. Negative β -Werte bedeuten eine Abnahme des Titers mit zunehmendem Wert des Prädiktors. Als Referenzgruppe dienen die Probandinnen vor erster Impfung, beziehungsweise die Probandinnen mit dem Nachweis eines HPV-Typs im Primärtumor, der nicht den Typen 16, 18 oder 31 entsprach.

In allen von uns errechneten Modellen besteht eine signifikante Varianz der individualspezifischen Effekte sowie eine Restvarianz zwischen den Zeitpunkten (Tabelle 14 und folgende). Diese beschreiben wie stark unsere Modelle von den tatsächlich gemessenen Daten abweichen und somit nicht von unserem Modell erklärt werden können. Da unsere Modelle eine Sonderform der Regression auf Basis der erfolgten Messungen darstellt, war eine signifikante Restvarianz zu erwarten und stellt kein negatives Qualitätsmerkmal der Modelle dar.

Einfluss von Impfung und HPV-Typ im Primärtumor auf die Antikörpertiter gegen HPV-16

Für den **L1-Antikörper** des HPV-16 sind die Impfungen die Prädiktoren mit dem höchsten Einfluss. Für die erste Impfung konnte ein Effekt (β) von 2097,6 (SE 199,2 $P < 0,001$), für die zweite Impfung ein β von 2864,6 (SE 223 $P < 0,001$) und die dritte Impfung ein β von 2708,8 (SE 209,8 $P < 0,001$) errechnet werden. Dies bedeutet, dass alle drei Impfungen, vor allem aber die zweite, einen starken Effekt auf den L1-Titeranstieg haben.

Für die Zugehörigkeit einer Probandin zur Gruppe „HPV-16, 18 oder 31 im Primärtumor“ ergab sich ein β von -88,2 (SE 374,4 $P = 0,815$), bei diesen Probandinnen stiegen die Titer also höher als bei den Probandinnen der Referenzgruppe. Bei Probandinnen, bei denen der HPV-Typ im Primärtumor nicht bekannt ist, stellte sich β mit -50,1 (SE 389,1 $P = 0,898$) dar, der L1-Antikörpertiter war, im Vergleich zu dem der Referenzgruppe, leicht verringert. Dieser mit 0 festgesetzte Referenzwert für die β -Werte ist der Einfluss der Zugehörigkeit der Patientin zur Gruppe „anderer HPV-Typ nachgewiesen“.

Für die **E6- und E7-Antikörper** des HPV-16 konnte kein positiver β -Wert der Impfungen nachgewiesen werden. Der Nachweis von HPV-16, 18 oder 31 im Primärtumor schlug sich in einem positiven β -Wert nieder (E6: $\beta=178,7$ SE 206,9 P=0,393; E7: $\beta=236,6$ SE 301,9 P=0,438). Dies bedeutet, dass die L1-Antikörpertiter dieser Frauen stärker stiegen als die Titer der Probandinnen der Referenzgruppe „anderer HPV-Typ nachgewiesen“. Im Gegensatz dazu zeigte sich kein positiver Effekt auf die Titer der Gruppe, in denen der HPV-Typ im Primärtumor unbekannt war (E6: $\beta=-40,8$ SE 214,2 P=0,850; E7: $\beta=-212,2$ SE 312,7 P=0,501). Eine Signifikanz dieser Werte konnte nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 13: Effekte auf die L1-, E6- und E7-Antikörpertiter von HPV-16

n Probandinnen = 53		HPV-16, L1			HPV-16, E6			HPV-16, E7		
Parameter	Messungen (n)	Schätzung (β)	Standardfehler	P	Schätzung (β)	Standardfehler	P	Schätzung (β)	Standardfehler	P
Konstanter Term ^b		480,8	342,7	0,167	249,7	187,3	0,190	358,9	273,5	0,196
3. Impfung	39	2708,8	209,8	<0,001	-53,1	79,4	0,504	6	120,1	0,960
2. Impfung	32	2864,6	223	<0,001	-44,9	81,2	0,581	-51,5	123,2	0,676
1. Impfung	98	2097,6	199,2	<0,001	-62,1	72	0,389	-112,5	109,3	0,304
Referenz ^c	114	0 ^a	0		0 ^a	0		0 ^a	0	
HPV-16, 18 oder 31 im Primärtumor (n=25)	135	-88,2	374,4	0,815	178,7	206,9	0,393	236,6	301,9	0,438
HPV-Typ im Primärtumor unbekannt (n=7)	96	-50,1	389,1	0,898	-40,8	214,2	0,850	-212,2	312,7	0,501
Referenz (n=21) ^d	52	0 ^a	0		0 ^a	0		0 ^a	0	
Zeitpunkt BE	283	-0,2	0,3	0,493	0	0,1	0,648	-0,1	0,1	0,466

a. Dieser Parameter wurde auf den Wert null gesetzt, da er redundant ist.

b. Modelltiter ohne zutreffende Prädiktoren (vor Impfung, zum Zeitpunkt 0 und Nachweis eines HPV-Typs im Primärtumor, der nicht den Typen 16, 18 oder 31 entspricht).

c. Als Referenzgruppe dienen Probandinnen vor der ersten Impfung.

d. Als Referenzgruppe dienen Probandinnen, bei denen der Nachweis eines HPV-Typs im Primärtumor, der nicht den Typen 16, 18 oder 31 entspricht, erfolgte.

Tabelle 14: Restvarianz zwischen Mess- und Modellwerten für HPV-16

Parameter	HPV-16, L1			HPV-16, E6			HPV-16, E7		
	Schätzung (β)	Standardfehler	P	Schätzung (β)	Standardfehler	P	Schätzung (β)	Standardfehler	P
Residuum ^a	931928,0	86993,6	<0,001	113030,7	10925,4	<0,001	261684,1	24909,4	<0,001
Konstanter Term [Subjekt = id] ^b	Varianz 606863,2	161016,3	<0,001	217765,0	55478,3	<0,001	459119,1	111034,4	<0,001

a. Restvarianz zwischen den Zeitpunkten: beschreibt die Summe der MFI-Einheiten, die das Modell von den tatsächlich gemessenen Daten abweicht.

b. Restvarianz zwischen den Individuen: beschreibt die Summe der MFI-Einheiten, die das Modell von den tatsächlich gemessenen Daten abweicht.

Die folgende Abbildung stellt die Titerverläufe dar. Jede Linie symbolisiert den Titerverlauf einer Probandin, hier den HPV-16 L1-Antigentiter. Die gestrichelten Linien repräsentieren die Probandinnen der Kontrollgruppe, die durchgezogenen Linien die geimpften Probandinnen. Der Zeitpunkt der ersten Blutentnahme nach erster erfolgter Impfung liegt auf X=0, folglich endet die Linie der Kontrollgruppenprobandinnen zu diesem Zeitpunkt. Die beiden senkrechten Markierungen (X=92 und X=188) repräsentieren den Median des Zeitpunkts, an dem die zweite beziehungsweise dritte Impfung erfolgte.

Die drei dicker gezeichneten Linien stellen die durch die gemischten linearen Modelle vorhergesagten Daten dar. Die schwarze Linie steht für das Modell 1, bei dem nicht zwischen den verschiedenen HPV-Typen im Primärtumor unterschieden wurde. Die beiden anderen dick gezeichneten Linien stehen für das Modell 2. Rot symbolisiert die Gruppe „HPV-16, 18 oder 31 im Primärtumor“, gelb die Gruppe „HPV-Typ im Primärtumor unbekannt“.

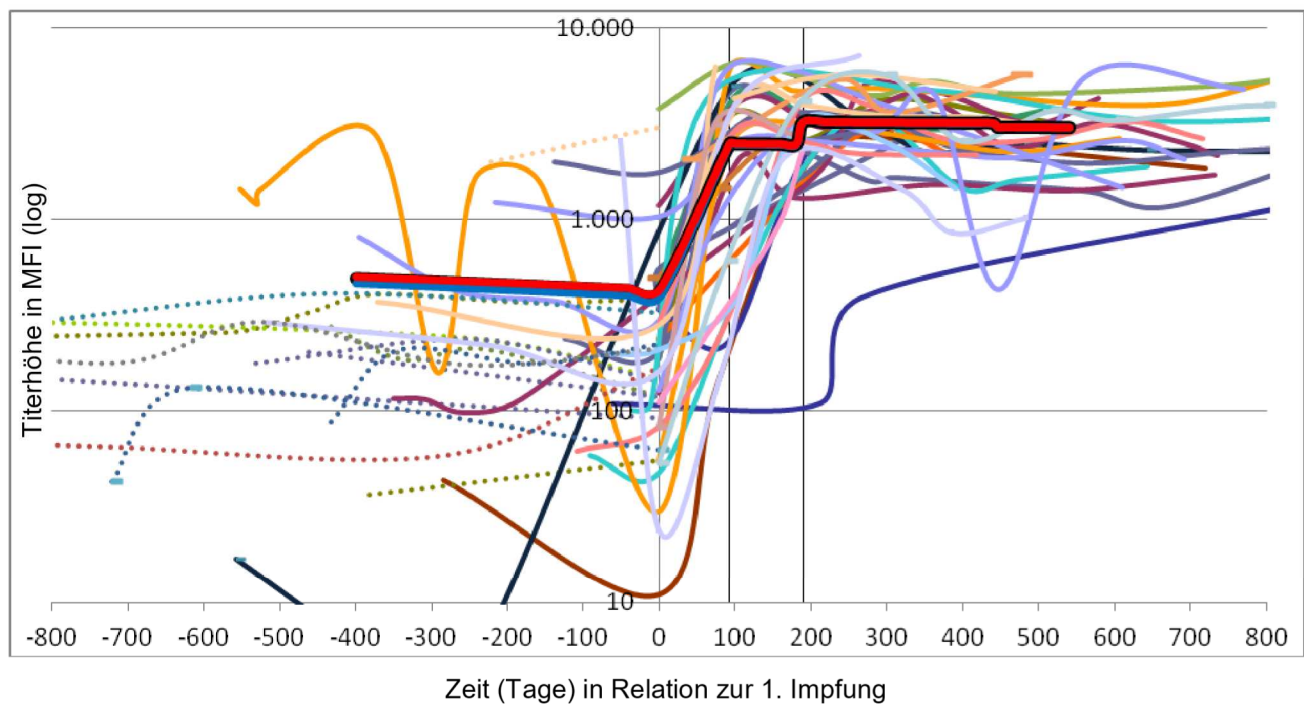


Abbildung 5: Titerverlauf HPV-16, L1

Gruppen		Modellwerte	
.....	Kontrollgruppe	—	Modell 1, gesamt
—	Geimpfte Probandinnen	—	HPV-16,18 oder 31 im Primär-TU
		—	HPV-Typ im Primär-TU unbekannt

Einfluss von Impfung und HPV-Typ im Primärtumor auf die Antikörpertiter gegen HPV-18

Für die Titer des HPV-18 konnte nachgewiesen werden, dass die Impfungen den größten Einfluss auf die Titerentwicklung haben (Tabelle 15). Die Titer der Antikörper gegen das **L1-Antigen** stiegen durch die zweite Impfung am stärksten ($\beta=1468,4$ SE 142 $P<0,001$), darauf folgte die dritte Impfung ($\beta=1211,9$ SE 134,1 $P<0,001$). Durch die erste Impfung war ein geringerer Titeranstieg zu beobachten ($\beta=763,3$ SE 126,7 $P<0,001$).

Sowohl durch die Zugehörigkeit einer Probandin zur Gruppe „HPV-16, 18 oder 31 im Primärtumor“ als auch durch die Zugehörigkeit zur Gruppe „unbekannter HPV-Typ im Primärtumor“ bewirkten im Modell niedrigere Titerwerte für das HPV-18 L1-Antigen im Vergleich zur Gruppe „anderer HPV-Typ im Primärtumor“ ($\beta=-421,5$ SE 245,9 $P=0,092$; $\beta=-325,4$ SE 255,6 $P=0,208$).

Für die **E6 / E7 Antigene** stiegen die Titer weniger stark, aber der Effekt der Impfungen 2 und 3 war nachweisbar signifikant ($P < 0,02$).

Tabelle 15: Effekte auf die L1-, E6- und E7-Antikörpertiter von HPV-18

n Probandinnen = 53		HPV-18, L1			HPV-18, E6			HPV-18, E7		
Parameter	Messungen (n)	Schätzung (β)	Standardfehler	P	Schätzung (β)	Standardfehler	P	Schätzung (β)	Standardfehler	P
Konstanter Term ^b		444,5	224,8	0,053	54,3	35,0	0,129	51,7	43,3	0,239
3. Impfung	39	1211,9	134,1	<0,001	105,3	21,5	<0,001	91,4	20,7	<0,001
2. Impfung	32	1468,4	142,0	<0,001	63,5	22,9	0,006	49,9	21,4	0,020
1. Impfung	98	763,3	126,7	<0,001	9,5	20,4	0,642	3,1	19,0	0,872
Referenz ^c	114	0 ^a	0,0		0 ^a	0,0		0 ^a	0,0	
HPV-16, 18 oder 31 im Primärtumor (n=25)	135	-421,5	245,9	0,092	39,5	38,3	0,309	51,2	47,7	0,290
HPV-Typ im Primärtumor unbekannt (n=7)	96	-325,4	255,6	0,208	50,7	39,8	0,210	44,3	49,4	0,375
Referenz (n=21) ^d	52	0 ^a	0,0		0 ^a	0,0		0 ^a	0,0	
Zeitpunkt BE	283	0,0	0,2	0,896	0,1	0,0	0,041	0,0	0,0	0,106

a. Dieser Parameter wurde auf den Wert null gesetzt, da er redundant ist.

b. Modelltiter ohne zutreffende Prädiktoren (vor Impfung, zum Zeitpunkt 0 und Nachweis eines HPV-Typs im Primärtumor, der nicht den Typen 16, 18 oder 31 entspricht).

c. Als Referenzgruppe dienen Probandinnen vor der ersten Impfung.

d. Als Referenzgruppe dienen Probandinnen, bei denen der Nachweis eines HPV-Typs im Primärtumor, der nicht den Typen 16, 18 oder 31 entspricht, erfolgte.

Tabelle 16: Restvarianz zwischen Mess- und Modellwerten HPV-18

Parameter		HPV-18, L1			HPV-18, E6			HPV-18, E7		
		Schätzung (β)	Standardfehler	P	Schätzung (β)	Standardfehler	P	Schätzung (β)	Standardfehler	P
Residuum ^a		374495,1	34521,7	<0,001	9800,8	939,7	<0,001	8032,7	772,8	<0,001
Konstanter Term [Subjekt = id] ^b	Varianz	266798,0	64488,4	<0,001	6335,6	1915,5	0,001	11154,5	2917,3	<0,001

a. Restvarianz zwischen den Zeitpunkten: beschreibt die Summe der MFI-Einheiten, die das Modell von den tatsächlich gemessenen Daten abweicht.

b. Restvarianz zwischen den Individuen: beschreibt die Summe der MFI-Einheiten, die das Modell von den tatsächlich gemessenen Daten abweicht.

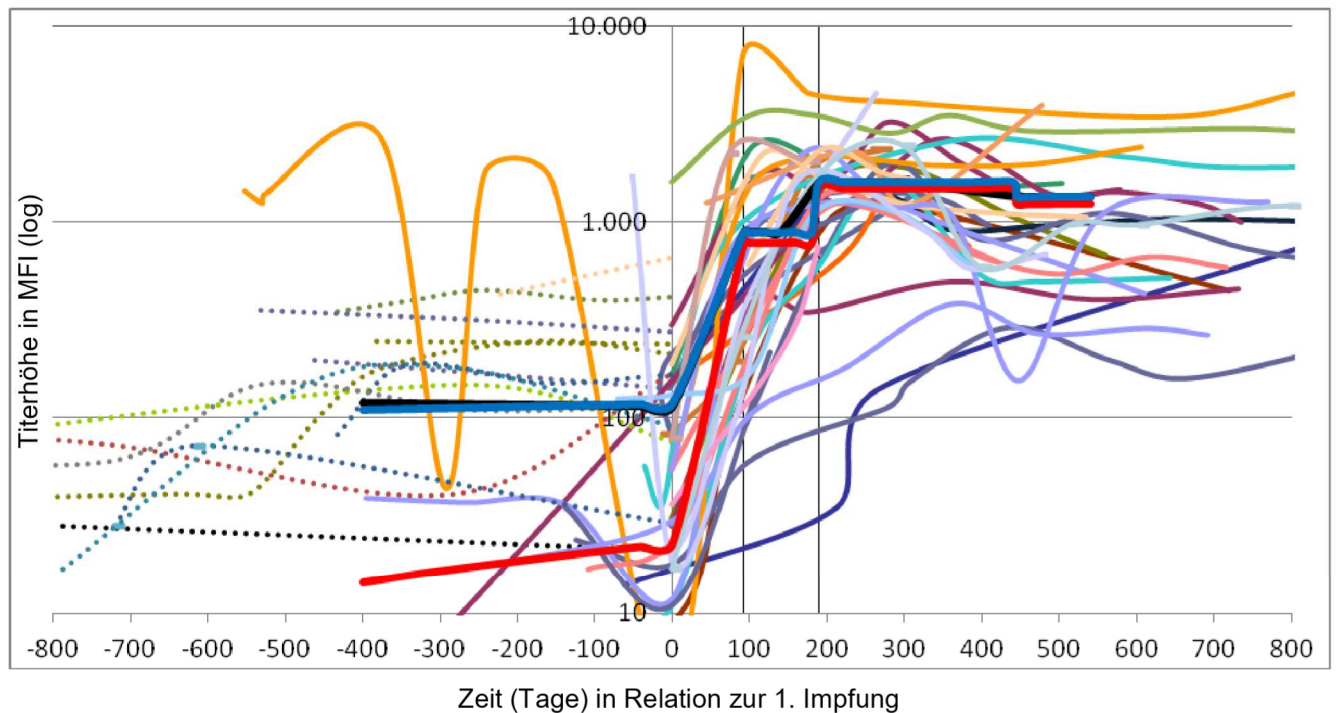


Abbildung 6: Titerverlauf HPV-18, L1

Gruppen		Modellwerte	
.....	Kontrollgruppe	—	Modell 1, gesamt
—	Geimpfte Probandinnen	—	HPV-16,18 oder 31 im Primär-TU
		—	HPV-Typ im Primär-TU unbekannt

Einfluss von Impfung und HPV-Typ im Primärtumor auf die Antikörpertiter gegen HPV-31

Auch bei HPV-31 zeigte sich für das **L1-Antigen** die zweite Impfung als stärkster Einflussfaktor für den Titeranstieg ($\beta=2027,4$ SE 202,9 $P<0,001$), gefolgt von der dritten ($\beta=1789,9$ SE 193,2 $P<0,001$) und ersten Impfung ($\beta=1524,5$ SE 180,9 $P<0,001$).

Die Zugehörigkeit einer Probandin zur Gruppe „HPV-16, 18 oder 31 im Primärtumor“ senkte die Titerwerte im Modell für das HPV-18 L1-Antigen im Vergleich zur Gruppe „anderer HPV-Typ im Primärtumor“ ($\beta=-172,1$ SE 375,5 $P=0,649$), gleiches gilt für die Zugehörigkeit zur Gruppe „unbekannter HPV-Typ im Primärtumor“ ($\beta=-279,5$ SE 390 $P=0,477$).

Für die **E6-Antikörper** konnte ein leichter, jedoch signifikanter Anstieg der Titer durch die zweite und dritte Impfung nachgewiesen werden ($\beta=48,2$ SE 24,2 $P<0,048$; $\beta=$

108,3 SE 23,9 P<0,001). Für die erste Impfung, sowie für die **E7-Antikörper** war dies nicht möglich.

Tabelle 17: Effekte auf die L1-, E6- und E7-Antikörpertiter von HPV-31

n Probandinnen = 53		HPV-31, L1			HPV-31, E6			HPV-31, E7		
Parameter	Messungen (n)	Schätzung (β)	Standardfehler	P	Schätzung (β)	Standardfehler	P	Schätzung (β)	Standardfehler	P
Konstanter Term ^b		567,3	342,5	0,103	187,4	69,3	0,009	76,2	83,0	0,362
3. Impfung	39	1789,9	193,2	<0,001	108,3	23,9	<0,001	16,7	64,9	0,798
2. Impfung	32	2027,4	202,9	<0,001	48,2	24,2	0,048	-1,6	73,1	0,983
1. Impfung	98	1524,5	180,9	<0,001	6,2	21,5	0,773	-42,6	66,0	0,519
Referenz ^c	114	0 ^a	0,0		0 ^a	0,0		0 ^a	0,0	
HPV-16, 18 oder 31 im Primärtumor (n=25)	135	-172,1	375,5	0,649	-67,9	76,7	0,380	82,9	89,2	0,357
HPV-Typ im Primärtumor unbekannt (n=7)	96	-279,5	390,0	0,477	-79,6	79,2	0,319	15,1	92,9	0,871
Referenz (n=21) ^d	52	0 ^a	0,0		0 ^a	0,0		0 ^a	0,0	
Zeitpunkt BE	283	-0,2	0,2	0,496	0,0	0,0	0,296	0,0	0,1	0,678

a. Dieser Parameter wurde auf den Wert null gesetzt, da er redundant ist.

b. Modelltiter ohne zutreffende Prädiktoren (vor Impfung, zum Zeitpunkt 0 und Nachweis eines HPV-Typs im Primärtumor, der nicht den Typen 16, 18 oder 31 entspricht).

c. Als Referenzgruppe dienen Probandinnen vor der ersten Impfung.

d. Als Referenzgruppe dienen Probandinnen, bei denen der Nachweis eines HPV-Typs im Primärtumor, der nicht den Typen 16, 18 oder 31 entspricht, erfolgte.

Tabelle 18: Restvarianz zwischen Mess- und Modellwerten für HPV-31

Parameter		HPV-31, L1			HPV-31, E6			HPV-31, E7		
		Schätzung (β)	Standardfehler	P	Schätzung (β)	Standardfehler	P	Schätzung (β)	Standardfehler	P
Residuum ^a		752152,5	69675,3	<0,001	9809,7	919,7	<0,001	111798,7	10149,1	<0,001
Konstanter Term [Subjekt = id] ^b	Varianz	643845,0	153573,5	<0,001	31153,0	6620,8	<0,001	24589,3	8112,2	0,002

a. Restvarianz zwischen den Zeitpunkten: beschreibt die Summe der MFI-Einheiten, die das Modell von den tatsächlich gemessenen Daten abweicht.

b. Restvarianz zwischen den Individuen: beschreibt die Summe der MFI-Einheiten, die das Modell von den tatsächlich gemessenen Daten abweicht.

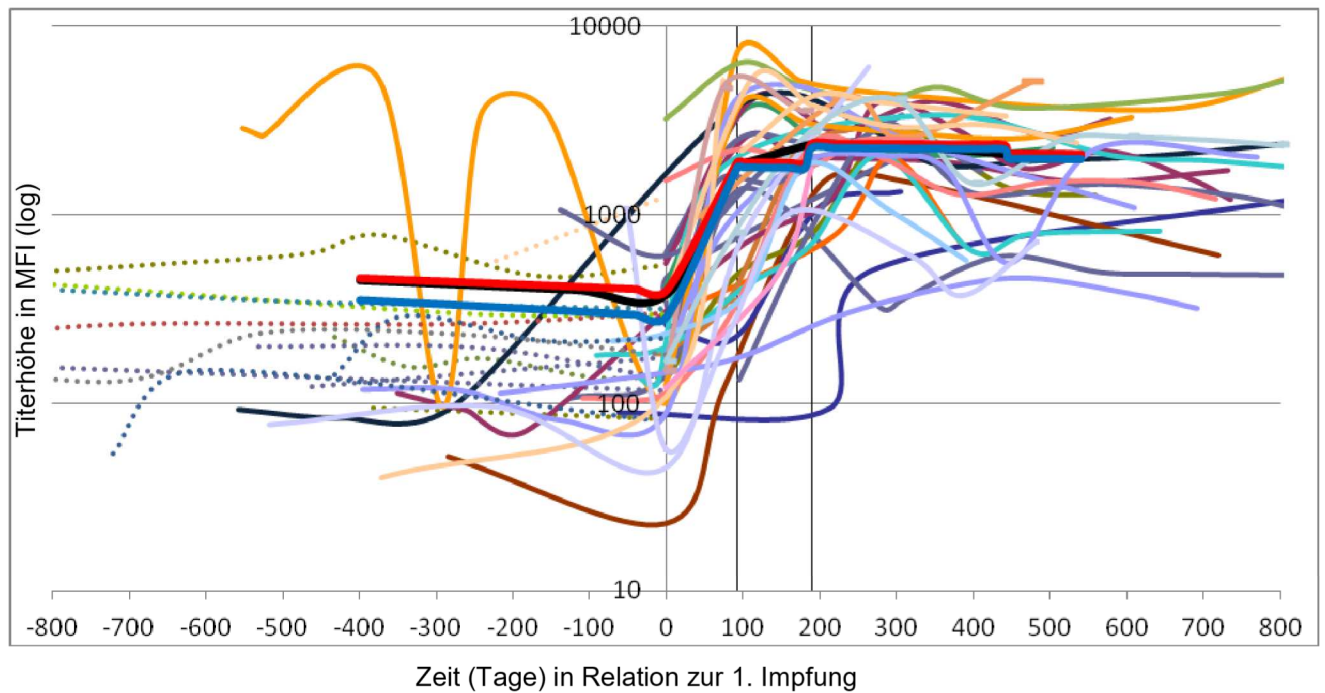


Abbildung 7: Titerverlauf HPV-31, L1

Gruppen		Modellwerte	
.....	Kontrollgruppe	—	Modell 1, gesamt
—	Geimpfte Probandinnen	—	HPV-16,18 oder 31 im Primär-TU
		—	HPV-Typ im Primär-TU unbekannt

Einfluss von Impfung und HPV-Typ im Primärtumor auf die Antikörpertiter gegen HPV-45

Für das **L1-Antigen** des HPV-Typs 45 konnte die zweite Impfung als wichtigster Einflussfaktor nachgewiesen werden ($\beta=1526,4$ SE 157,3 $P<0,001$), darauf folgt die dritte Impfung ($\beta=1314$ SE 151,2 $P<0,001$). Für die erste Impfung konnte ein geringerer Einfluss von $\beta=1041,6$ nachgewiesen werden (SE 139,9 $P<0,001$).

Der Nachweis von HPV-16, 18 oder 31 im Primärtumor hatte einen negativen Effekt auf die Stärke der Impfreaktion ($\beta=-652,6$ SE 320,9 $P<0,047$), ebenso, wenn auch weniger stark, kein vorhandener Nachweis im Vergleich zum Nachweis von anderen HPV-Typen ($\beta=-531$ SE 333 $P=0,117$).

Für die **E7- und E6-Antikörper** des HPV-45 konnten der dritten als auch die zweiten Impfung ein zwar nur leichter, dennoch signifikanter Anstieg zugerechnet werden.

Den im Primärtumor nachgewiesenen HPV-Typen konnte kein signifikanter Einfluss auf die Antikörpertiterhöhe der Modelle zugesprochen werden. Der Zeitpunkt hatte einen geringen Einfluss auf diese Titer ($\beta=0,1$ SE 0 P<0,01).

Tabelle 19: Effekte auf die L1-, E6- und E7-Antikörpertiter von HPV-45

n Probandinnen = 53		HPV-45, L1			HPV-45, E6			HPV-45, E7		
Parameter	Messungen (n)	Schätzung (β)	Standardfehler	P	Schätzung (β)	Standardfehler	P	Schätzung (β)	Standardfehler	P
Konstanter Term ^b		731,6	291,8	0,015	73,1	28,2	0,013	40,2	33,9	0,242
3. Impfung	39	1314,0	151,2	<0,001	96,0	16,1	<0,001	115,2	20,1	<0,001
2. Impfung	32	1526,4	157,3	<0,001	56,1	17,0	0,001	65,1	21,2	0,002
1. Impfung	98	1041,6	139,9	<0,001	10,0	15,1	0,508	12,3	18,9	0,518
Referenz ^c	114	0 ^a	0,0		0 ^a	0,0		0 ^a	0,0	
HPV-16, 18 oder 31 im Primärtumor (n=25)	135	-652,6	320,9	0,047	-14,4	30,9	0,643	43,5	37,1	0,248
HPV-Typ im Primärtumor unbekannt (n=7)	96	-531,0	333,0	0,117	-11,6	32,1	0,720	27,0	38,6	0,488
Referenz (n=21) ^d	52	0 ^a	0,0		0 ^a	0,0		0 ^a	0,0	
Zeitpunkt BE	283	0,0	0,2	0,816	0,1	0,0	0,004	0,1	0,0	0,019

a. Dieser Parameter wurde auf den Wert null gesetzt, da er redundant ist.

b. Modelltiter ohne zutreffende Prädiktoren (vor Impfung, zum Zeitpunkt 0 und Nachweis eines HPV-Typs im Primärtumor, der nicht den Typen 16, 18 oder 31 entspricht).

c. Als Referenzgruppe dienen Probandinnen vor der ersten Impfung.

d. Als Referenzgruppe dienen Probandinnen, bei denen der Nachweis eines HPV-Typs im Primärtumor, der nicht den Typen 16, 18 oder 31 entspricht, erfolgte.

Tabelle 20: Restvarianz zwischen Mess- und Modellwerten für HPV-45

Parameter	HPV-45, L1			HPV-45, E6			HPV-45, E7		
	Schätzung (β)	Standardfehler	P	Schätzung (β)	Standardfehler	P	Schätzung (β)	Standardfehler	P
Residuum ^a	441513,5	41004,9	<0,001	5277,4	497,4	<0,001	8339,7	785,3	<0,001
Konstanter Term [Subjekt = id] ^b	Varianz 490236,0	112766,1	<0,001	4323,7	1139,1	<0,001	6120,9	1648,2	<0,001

a. Restvarianz zwischen den Zeitpunkten: beschreibt die Summe der MFI-Einheiten, die das Modell von den tatsächlich gemessenen Daten abweicht.

b. Restvarianz zwischen den Individuen: beschreibt die Summe der MFI-Einheiten, die das Modell von den tatsächlich gemessenen Daten abweicht.

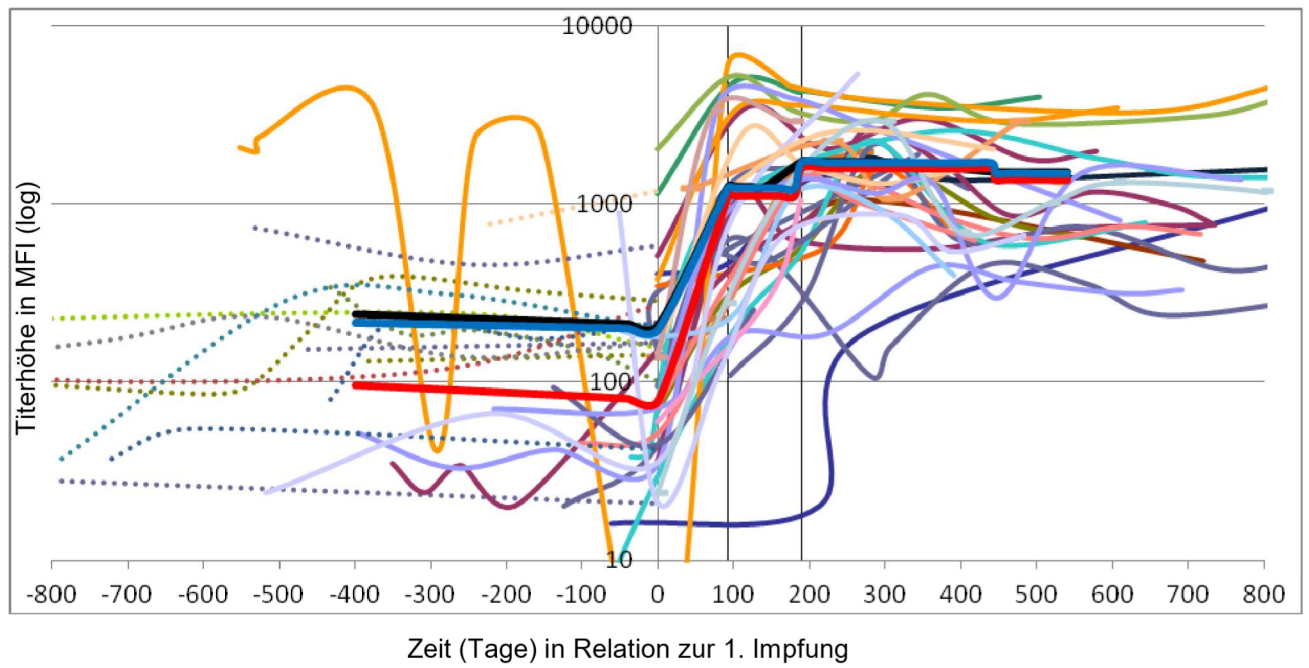


Abbildung 8: Titerverlauf HPV-45, L1

Gruppen		Modellwerte	
·····	Kontrollgruppe	—	Modell 1, gesamt
—	Geimpfte Probandinnen	—	HPV-16,18 oder 31 im Primär-TU
		—	HPV-Typ im Primär-TU unbekannt

Einfluss von Impfung und HPV-Typ im Primärtumor auf die Antikörpertiter gegen HPV-6

Für die **L1-Antikörper** des HPV-Typen 6 stellte sich die zweite Impfung als stärkster Prädiktor dar ($\beta=3631,1$ SE 258,5 $P<0,001$). Aber auch der Einfluss der ersten und dritten Impfung war signifikant ($\beta=2547,6$ SE 230,4 $P<0,001$ bzw. $\beta=3022,8$ SE 246,2 $P<0,001$).

Der vorangegangene Nachweis der HPV-Typen 16, 18 oder 31 oder anderer HPV-Typen senkte den L1-Titer nur leicht, dieser Effekt ließ sich nicht als signifikant nachweisen.

Für die **E6- und E7-Antikörper** konnte ein schwacher, aber signifikanter Effekt der zweiten und dritten Impfung nachgewiesen werden.

Tabelle 21: Effekte auf die L1-, E6- und E7-Antikörpertiter von HPV-6

n Probandinnen = 53		HPV-6, L1			HPV-6, E6			HPV-6, E7		
Parameter	Messungen (n)	Schätzung (β)	Standardfehler	P	Schätzung (β)	Standardfehler	P	Schätzung (β)	Standardfehler	P
Konstanter Term ^b		620,8	437,1	0,162	36,2	18,6	0,060	38,7	29,5	0,197
3. Impfung	39	3022,8	246,2	<0,001	74,2	14,4	<0,001	99,8	17,5	<0,001
2. Impfung	32	3631,1	258,5	<0,001	40,7	16,1	0,012	55,1	18,6	0,003
1. Impfung	98	2547,6	230,4	<0,001	2,9	14,5	0,840	9,5	16,6	0,566
Referenz ^c	114	0 ^a	0,0		0 ^a	0,0		0 ^a	0,0	
HPV-16, 18 oder 31 im Primärtumor (n=25)	135	-32,7	479,3	0,946	28,7	20,0	0,162	32,3	32,3	0,323
HPV-Typ im Primärtumor unbekannt (n=7)	96	-146,8	497,7	0,769	25,8	20,9	0,226	43,5	33,5	0,203
Referenz (n=21) ^d	52	0 ^a	0,0		0 ^a	0,0		0 ^a	0,0	
Zeitpunkt BE	283	0,3	0,3	0,353	0,0	0,0	0,696	0,1	0,0	0,020

a. Dieser Parameter wurde auf den Wert null gesetzt, da er redundant ist.

b. Modelltiter ohne zutreffende Prädiktoren (vor Impfung, zum Zeitpunkt 0 und Nachweis eines HPV-Typs im Primärtumor, der nicht den Typen 16, 18 oder 31 entspricht).

c. Als Referenzgruppe dienen Probandinnen vor der ersten Impfung.

d. Als Referenzgruppe dienen Probandinnen, bei denen der Nachweis eines HPV-Typs im Primärtumor, der nicht den Typen 16, 18 oder 31 entspricht, erfolgte.

Tabelle 22: Restvarianz zwischen Mess- und Modellwerten für HPV-6

Parameter	HPV-6, L1			HPV-6, E6			HPV-6, E7		
	Schätzung (β)	Standardfehler	p	Schätzung (β)	Standardfehler	p	Schätzung (β)	Standardfehler	p
Residuum ^a	1220112,2	114017,4	<0,001	5376,8	515,4	<0,001	6396,4	618,3	<0,001
Konstanter Term [Subjekt = id] ^b	Varianz 1049827,9	262221,6	<0,001	1285,8	559,7	0,022	4599,8	1399,4	0,001

a. Restvarianz zwischen den Zeitpunkten: beschreibt die Summe der MFI-Einheiten, die das Modell von den tatsächlich gemessenen Daten abweicht.

b. Restvarianz zwischen den Individuen: beschreibt die Summe der MFI-Einheiten, die das Modell von den tatsächlich gemessenen Daten abweicht.

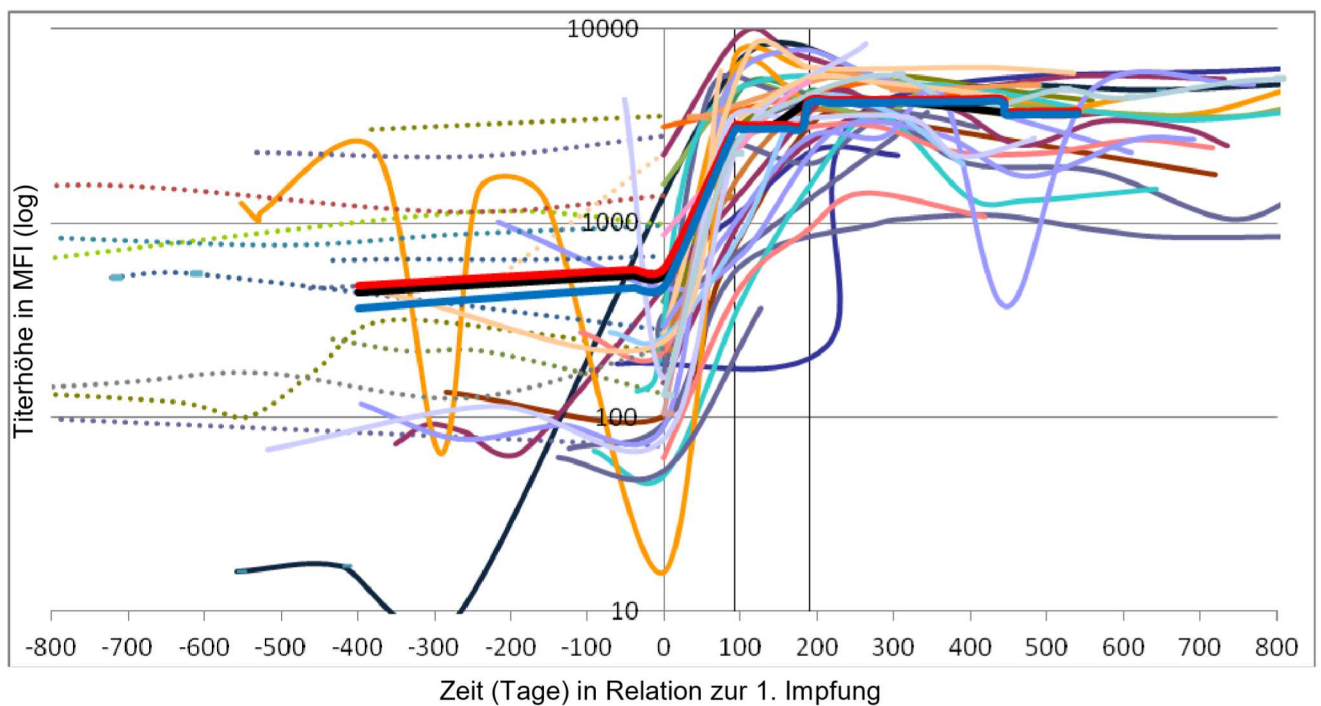


Abbildung 9: Titerverlauf HPV-6, L1

Gruppen		Modellwerte	
.....	Kontrollgruppe	—	Modell 1, gesamt
—	Geimpfte Probandinnen	—	HPV-16,18 oder 31 im Primär-TU
		—	HPV-Typ im Primär-TU unbekannt

Einfluss von Impfung und HPV-Typ im Primärtumor auf die Antikörpertiter gegen HPV-11

Die zweite Impfung hatte auch auf den HPV-11 **L1-Antikörper** den größten Einfluss ($\beta=4299,2$ SE 288,4 $P<0,001$), gefolgt von Impfung 3 und 1 ($\beta=3607,7$ SE 273,2 $P<0,001$ bzw. $\beta=2950,9$ SE 257,3 $P<0,001$). Der Nachweis der verschiedenen HPV-Typen in den oben beschriebenen Gruppen konnte nicht zur Verbesserung der Modelle beitragen.

Für die **E6- und E7-Antikörper** waren die zweite und die dritte Impfung ein signifikanter Prädiktor für einen leichten Titeranstieg. Die in den Primärtumoren nachgewiesenen HPV-Typen konnten die Modelle nicht verbessern.

Tabelle 23: Effekte auf die L1-, E6- und E7-Antikörpertiter von HPV-11

n Probandinnen = 53		HPV-11, L1			HPV-11, E6			HPV-11, E7		
Parameter	Messungen (n)	Schätzung (β)	Standardfehler	P	Schätzung (β)	Standardfehler	P	Schätzung (β)	Standardfehler	P
Konstanter Term ^b		446,2	465,3	0,342	72,0	34,7	0,045	39,1	23,3	0,100
3. Impfung	39	3607,7	273,2	<0,001	126,9	22,7	<0,001	78,5	15,3	<0,001
2. Impfung	32	4299,2	288,4	<0,001	69,3	24,4	0,005	53,1	16,5	0,001
1. Impfung	98	2950,9	257,3	<0,001	7,6	21,9	0,727	9,3	14,8	0,530
Referenz ^c	114	0 ^a	0,0		0 ^a	0,0		0 ^a	0,0	
HPV-16, 18 oder 31 im Primärtumor (n=25)	135	-27,5	509,4	0,957	35,8	37,7	0,349	18,2	25,3	0,475
HPV-Typ im Primärtumor unbekannt (n=7)	96	24,5	529,3	0,963	39,5	39,2	0,321	18,6	26,3	0,483
Referenz (n=21) ^d	52	0 ^a	0,0		0 ^a	0,0		0 ^a	0,0	
Zeitpunkt BE	283	0,2	0,3	0,564	0,0	0,0	0,098	0,1	0,0	0,002

a. Dieser Parameter wurde auf den Wert null gesetzt, da er redundant ist.

b. Modelltiter ohne zutreffende Prädiktoren (vor Impfung, zum Zeitpunkt 0 und Nachweis eines HPV-Typs im Primärtumor, der nicht den Typen 16, 18 oder 31 entspricht).

c. Als Referenzgruppe dienen Probandinnen vor der ersten Impfung.

d. Als Referenzgruppe dienen Probandinnen, bei denen der Nachweis eines HPV-Typs im Primärtumor, der nicht den Typen 16, 18 oder 31 entspricht, erfolgte.

Tabelle 24: Restvarianz zwischen Mess- und Modellwerten für HPV-11

Parameter	HPV-11, L1			HPV-11, E6			HPV-11, E7			
	Schätzung (β)	Standardfehler	P	Schätzung (β)	Standardfehler	P	Schätzung (β)	Standardfehler	P	
Residuum ^a	1537488,9	143169,8	<0,001	11454,7	1107,6	0,000	5252,6	494,1	0,000	
Konstanter Term [Subjekt = id] ^b	Varianz	1157130,2	292340,7	<0,001	5817,6	1956,0	0,003	2599,3	776,4	0,001

a. Restvarianz zwischen den Zeitpunkten: beschreibt die Summe der MFI-Einheiten, die das Modell von den tatsächlich gemessenen Daten abweicht.

b. Restvarianz zwischen den Individuen: beschreibt die Summe der MFI-Einheiten, die das Modell von den tatsächlich gemessenen Daten abweicht.

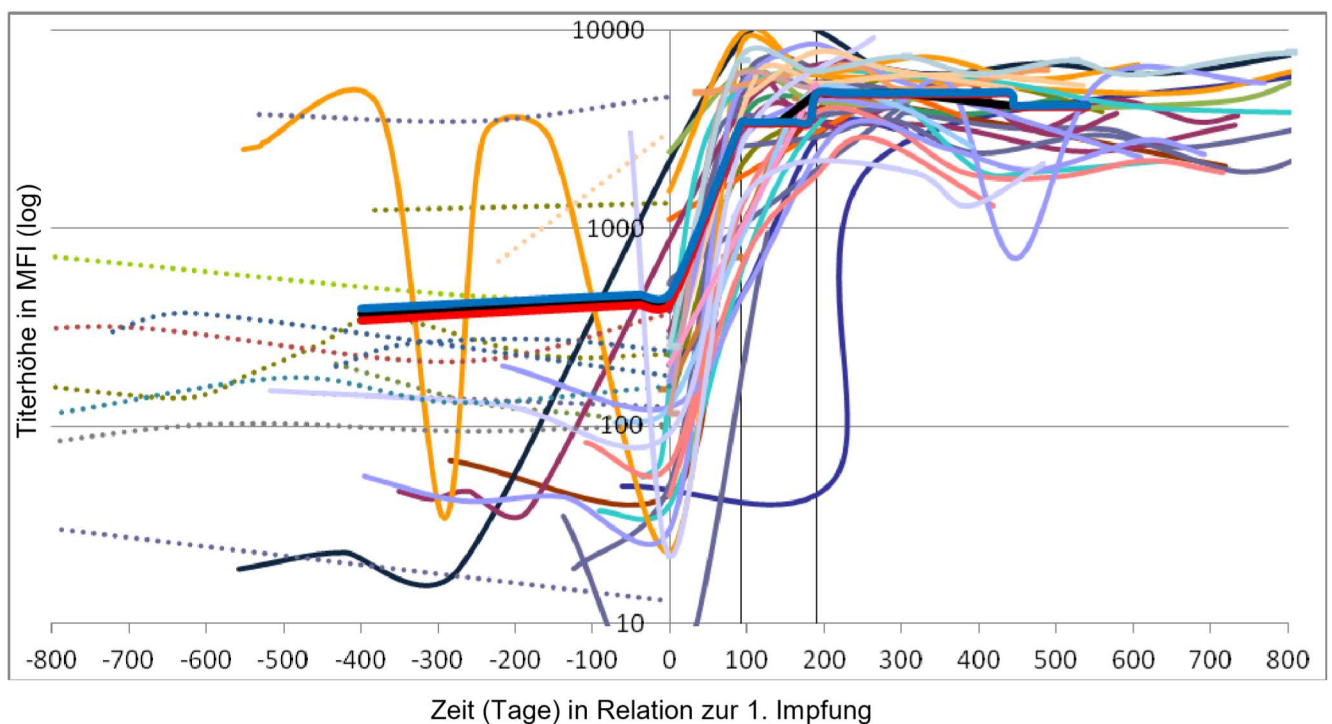


Abbildung 10: Titerverlauf HPV-11, L1

Gruppen		Modellwerte	
.....	Kontrollgruppe	—	Modell 1, gesamt
—	Geimpfte Probandinnen	—	HPV-16,18 oder 31 im Primär-TU
		—	HPV-Typ im Primär-TU unbekannt

Auffällige Titerentwicklungen

Die Entwicklung sämtlicher HPV-AK-Titer einer Patientin (ID# 25) sticht durch starke Schwankungen ins Auge. Die der Impfgruppe zugehörige Probandin zeigt bei den ersten Blutentnahmen für alle AK-Typen hohe Titer. Bei den Blutentnahmen 5 und 8 ließen sich nur sehr geringe Titer nachweisen, diese lagen bis zu 2 Logstufen unter den vorangegangenen Blutentnahmen. Sowohl zwischen den Blutentnahmen 5 und 8 als auch nach der achten Blutentnahme waren die Titer wieder auf hohem Niveau nachweisbar.

4. Diskussion

In dieser Promotionsarbeit wird erstmalig der signifikante Anstieg der HPV-L1-Antikörpertiter durch Impfung bei Frauen post-Trachelektomie nachgewiesen. Eine Besonderheit der vorliegenden Arbeit ist, dass die Titer direkt gemessen wurden, während fast alle vergleichbaren Studien zur Immunogenität der HPV-Impfung die Verringerung des Dysplasierisikos als dichotomen Endpunkt wählten. Dies war in unserer Studie nicht möglich, da ein vorangegangenes Zervixkarzinom Teil der Einschlusskriterien war. Der von uns gewählte kontinuierliche Endparameter ist der Anstieg der Antikörpertiter selbst. Dieser ermöglicht im Vergleich zu binären Endpunkten eine weitaus feinere Differenzierung der Immunantwort.

Ein weiteres Novum ist die Verwendung dieser Daten zur Erstellung gemischter linearer Modelle (siehe S. 30, *Statistische Auswertung* und S. 61, *Vorteile der gemischten linearen Modelle*). Mit diesen ist die Bewertung vieler unterschiedlicher Einflussfaktoren möglich, ebenso die Berücksichtigung sowohl unabhängiger als auch abhängiger Faktoren. So haben wir für jeden HPV-Typ und jeden Antikörper eigene Prädiktoren errechnet, um antikörperspezifische Modelle zu erhalten. Diese gemischten linearen Modelle ermöglichen die Modellbildung unter Berücksichtigung der inter-individuellen Unterschiede zwischen den Probandinnen bei mehreren, longitudinal verteilten Messzeitpunkten (68-70)

Einfluss der Impfungen auf die Titerentwicklung

Die HPV-Impfung führt zu einem starken Anstieg der Antikörpertiter, (72, 73) bisher wurde jedoch nicht untersucht, welche Effekte die Impfung auf die Immunantwort bei Patientinnen mit vorangegangener Trachelektomie hat und wie sich die Antikörpertiter bei diesen Patientinnen entwickeln.

Untersuchungen zur Immunogenität der Impfung nach Konisation von Patientinnen mit einer CIN 2 und 3 zeigten eine Effektivität zur Verhinderung des Wiederauftretens einer intraepithelialen Neoplasie. Jedoch wurden hier nicht die Antikörpertiter gemessen, sondern der Erfolg der Impfung wurde am verminderten Wiederauftreten der Erkrankung festgemacht (74).

Unser Ziel war es, die Effekte der quadrivalenten HPV-Impfung auf die Antikörpertiter bei trachelektomierten Patientinnen zu zeigen. Da die Trachelektomie ein Verfahren mit

begrenzten Patientenzahlen und maligner Erkrankung ist, kann als Messgröße nicht das Wiederauftreten der Erkrankung gewählt werden, sondern die Antikörpertiter wurden als Endparameter gemessen. Durch die statistische Auswertung mittels gemischter linearer Modelle (siehe S. 30, *Statistische Auswertung*) konnten aus den Titerentwicklungen der Probandinnen Modelle entwickelt werden, die Vorhersagen über die Effekte der Impfungen auf die Immunität bei den Patientinnen gegen die verschiedenen HPV-Typen und -Antigene zulassen.

Die von uns gemessenen Antikörpertiter stiegen in der Impfgruppe nach erfolgter Impfung stark an. Die mit den gemischten linearen Modellen errechneten Effekte der Impfungen sind sehr hoch. Für die L1-Antikörper konnte der Effekt der Impfung bei sämtlichen geimpften HPV-Typen auf hohem Niveau nachgewiesen werden. Dieser war bei einem β (Effekt, im Vergleich zur Referenzgruppe) zwischen 763 und 4299 deutlich signifikant. Diese Effekte bedingten eine Steigerung der Antikörpertiter um bis zu über einer Logstufe obwohl durch die vorangegangene Antigenexposition durch den Tumor ein erhöhter Grundwert messbar war.

Bereits seit einigen Jahren ist eine Kreuzprotektivität zwischen den HPV-Typen 16 und 31 sowie den Typen 18 und 45 bekannt (75, 76). Entsprechend dieser beschriebenen Kreuzprotektivität konnten wir zeigen, dass auch die nicht im Impfstoff enthaltenen HPV-31 und -45-Antigene die entsprechenden Antikörper ansteigen ließen. Dieser, durch die Impfung bedingte Effekt, war bei einem β zwischen 1041 und 2027 signifikant. Durch die von uns zur serologischen Analyse verwendete GST-Luminex-Technologie können wir jedoch nicht unterscheiden, ob es sich bei den gemessenen Antikörpern um spezifische oder kreuzreaktive Antikörper handelt.

Vorangegangene Untersuchungen zur Titerentwicklung nach Impfung mit einem anderen, bivalenten HPV-L1-VLP-Impfstoff mit gleichen Adjuvanzen, beschreiben eine Steigerung der Titer von der ersten zur zweiten und von der zweiten zur dritten Impfung (77). Obwohl ein anderer Impfstoff verwendet wurde, liegt die Vermutung nahe, ähnliche Steigerungen auch bei unseren Probandinnen beobachten zu können. Allerdings zeigte sich, dass die Titer unserer Probandinnen zwar durch die erste und zweite Impfung stark stiegen, der Effekt der dritten Impfung fiel jedoch geringer aus. Die absoluten Antikörpertiter entsprechen jedoch der maximalen Impfantwort. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Probandinnen oben zitierter Studie keine anormale Zytologie zeigten und auch keine HPV-DNA in ihren Zervixabstrichen nachgewiesen werden konnte. Diese Kriterien waren auf unsere Probandinnen nicht anwendbar. Da sie eine vorange-

gangene HPV-Infektion durchlebt hatten, kann von einem höheren Ausgangswert der HPV-Titer ausgegangen werden. Dieser erklärt den geringeren relativen Anstieg der Antikörpertiter durch die Impfungen selbst. Da die absoluten Titermesswerte in MFI nur bedingt vergleichbar sind, bedeutet der schwächerer Effekt nicht, dass die Impfungen weniger wirksam wären, lediglich ihr Effekt ist durch die bereits vor der ersten Impfung höheren Antikörpertiter kleiner. Der geringere Effekt der dritten Impfung erklärt sich durch die bereits zuvor höheren Titerwerte, welche die verbleibende Differenz zur maximalen Impfantwort verringern.

Der quadrivalente Impfstoff gegen HPV besteht aus VLPs aus den L1-Antigenen des Virus. Die E6- und E7-Antigene sind nicht im Impfstoff enthalten (64), somit kann eine direkte Stimulation der Immunogenität gegen diese Antigene ausgeschlossen werden. Trotzdem konnte bei den HPV-Typen 18, 45, 6 und 11 ein positiver Effekt durch die Impfung auf die E6- und E7-Antikörpertiter nachgewiesen werden. Für HPV Typ 31 konnte die Titersteigerung lediglich für den E6-Antikörper nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den Effekten der Impfung auf die L1-Antikörper waren hier sowohl die Effekt auf die Titer als auch die Steigerung der Titer nur gering. Signifikanz konnte nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung für den Anstieg dieser Antikörpertiter ist der erfolgte Durchbruch einer Toleranz. Dieser konnte bereits bei Patienten mit Larynxpapillomatose gezeigt werden. Hier entwickelten die Patienten nach Impfung neben den L1-spezifischen T-Zellen, bei fortgesetztem Antigenkontakt, auch die E6- und E7-spezifischen T-Zellen (persönliche Mitteilung durch PD Dr. Andreas Kaufmann, 14.08.2014). Obwohl nach einer Trachelektomie von einer Sanierung - und damit einem Ende des Antigenkontakts ausgegangen wird - konnten wir einen Anstieg der E6- und E7-Antikörpertiter bei den HPV-Typen 18, 45, 6 und 11 sowie einen Anstieg des E6-Antikörpertiters des HPV Typ 31 beobachten. Ob diesem Anstieg der gleiche Mechanismus wie der Aktivierung des Immunsystems mit Durchbrechen der Toleranz und Ausweitung der Immunantwort bei oben beschriebenen Larynxpapillompatienten Zu Grunde liegt, sollte Gegenstand zukünftiger Forschung werden.

Positiver Einfluss von HPV-16, -18 oder -31 positiven Primärtumoren auf die Titerentwicklung der HPV-16, -18, -31 und -45 E6- und E7-Antikörper

Der zweite von uns verwendete Prädiktor ist der HPV-Typ im Primärtumor. Die HPV-Impfung enthält L1-VLPs, aber keine E6- oder E7-Antigene. Deshalb gingen wir von einem ausschließlichen Effekt der Impfung auf die L1-Titer mit isoliertem Anstieg der L1-Antikörper aus. Unser Modell zeigte jedoch auch für die E6- und E7-Antikörper einen positiven Trend für die Gruppe von Probandinnen, bei denen HPV-16, -18 oder -31 im Primärtumor nachgewiesen wurde. Sichtbar war dieser Trend, der konsistent war, für die Titer der HPV-Typen 16, 18, 31 und 45. Die Signifikanz des Trends konnte nicht nachgewiesen werden. Immunologisch kann vermutet werden, dass die bei diesen Probandinnen vorangegangene Infektion mit demselben HPV-Typ auch eine Reaktion auf die E6- und E7-Antigene ausgelöst hatte. Ein Antigeneintrag mit Stimulation des Immunsystems der Probandinnen, wie er im Rahmen der Konisation und Trachelektomie geschehen sein könnte, könnte ebenfalls die Reaktion der Antikörper gegen E6 und E7 erklären. Ob durch die leicht erhöhten E6- und E7-Titer ein erhöhter Schutz vor Reinfektion besteht, ist unklar und konnte von uns nicht untersucht werden, jedoch sollte dieser Trend Anlass für weitere Untersuchungen sein.

Negativer Einfluss von HPV-16, -18 oder -31 positiven Primärtumoren auf die Titerentwicklung der HPV-16, -18, -31 und -45 L1-Antikörper

Der Nachweis der HPV-Typen 16, 18 oder 31 beeinflusste den Effekt der Impfungen leicht negativ. Da die absoluten Titerwerte jedoch hinter denen der Referenzgruppe kaum zurückblieben, muss nicht von einem verringertem Schutz durch die Impfung ausgegangen werden. Diese Beobachtung konnte als Trend beobachtet werden, statistische Signifikanz war lediglich für HPV Typ 45 nachweisbar. Wir haben uns entschieden, unsere Beobachtungen trotzdem zu beschreiben, da wir sie mit plausiblen Hypothesen untermauern können. Dass die L1-Antikörper der Frauen, die mit den gleichen HPV-Typen bereits vor Entstehen des Primärtumors infiziert waren, im Vergleich zu den Frauen, bei denen diese Typen nicht nachgewiesen werden konnten, zurückbleiben, scheint nachvollziehbar und wurde so bereits für einen HPV-16-Impfstoff beschrieben (78). Während erstere Gruppe durch ihren Tumor bereits Kontakt zu entsprechendem

Antigen hatte, war dies bei der zweiten Gruppe nicht der Fall. So kann die verminderte Steigerung der Titer bei Probandinnen, bei denen HPV Typ 16, 18 oder 31 im Primärtumor nachgewiesen wurde, in Relation zur Steigerung der Titer bei Probandinnen der zweiten Gruppe erklärt werden.

Positiver Einfluss von HPV-16, -18 oder -31 negativen Primärtumoren auf die Titerentwicklung der HPV-16, -18, -31 und -45 L1-Antikörper

Passend zu vorangegangenen Beobachtungen verstärkte der vorangegangene Nachweis eines anderen HPV-Typs (nicht 16, 18 oder 31) den, in Relation zur Zugehörigkeit zu den Gruppen „kein HPV nachweisbar“ und „ HPV-16, -18 oder -31 nachweisbar“, positiven Effekt der Impfung. Nachweisbar war dieser Trend bei den L1-Antikörpern der HPV-Typen 16, 18, 31 und 45. Zwar war er nicht signifikant nachweisbar, fügt sich jedoch plausibel zu vorhergehend beschriebenen Beobachtungen. Im Primärtumor dieser Probandinnen war das L1-Antigen der HPV-Typen 16, 18 und 31 nicht vorhanden, deshalb kann von einem niedrigeren Ausgangswert für die Titer dieser HPV-Typen ausgegangen werden. So kann die erhöhte Steigerung dieser Titer, in Relation zur Steigerung der Titer bei Probandinnen, bei denen HPV Typ 16, 18 oder 31 im Primärtumor nachgewiesen wurde, erklärt werden. Dass dieser Effekt sowohl bei für die HPV-16, -18, -31 und -45 L1-Antikörper nachweisbar war, erklärt sich durch die bereits beschriebene Kreuzprotektivität von HPV-16 mit HPV-31 und die Kreuzprotektivität von HPV-18 mit HPV-45 (71).

Einfluss des Blutabnahmezeitpunkts auf die L1-Titerhöhe

Aus vorangegangenen Untersuchungen ist bekannt, dass die Antikörpertiter gegen die L1-Antigene des HPV bei geimpften Patientinnen mit der Zeit sinken. Beschrieben wurde eine Abnahme der Titer ab dem siebten Monat nach der ersten Impfung, um nach 24 Monaten ein Plateau zu erreichen. Stabile Antikörpertiter konnten noch 4 Jahre nach Impfung gemessen werden. Zu diesem Zeitpunkt konnte durch Anregen der Immunantwort durch erneute Antigenexposition ein starker Antikörperanstieg erreicht werden. Die Autoren vermuten die Bildung von Memory-B-Zellen, die bei Antigenexposition eine schnelle Antikörperbildung ermöglichen (79).

Um den Faktor Zeit in unser Modell aufzunehmen, wählten wir den Prädiktor „Zeit seit Erstimpfung“.

Auch in dem von uns untersuchten Kollektiv konnte ein Trend zu sinkenden HPV-16, -18 und-31-L1-Antikörpertitern gezeigt werden. Für die Antikörpertiter der HPV-Typen 6 und 11 war dieser Trend nicht sichtbar. Das Abnehmen der Antikörpertiter entsprach den Erwartungen. Inwiefern diese Abnahme die Protektivität der Impfung beeinträchtigt, ist zu diesem Zeitpunkt unklar. Obwohl die intramuskuläre Injektion von HPV-L1-Antigen bei oben genannter Untersuchung eine stabile Immunantwort induzierte, ist dieses Ergebnis nicht sicher auf eine erneute, natürliche, mukosale Antigenexposition übertragbar (79).

Um das Immungedächtnis zu prüfen, wäre ein ex vivo Nachweis CD4-positiver T-Zellen, wie er von Frentsch et al. publiziert (80) und in unserem Haus weiterentwickelt wurde (81), möglich. Dieser ex vivo Assay misst die aktivierungsspezifische Expression des Oberflächenmoleküls CD 154. Dieses wird durch CD4-positive T-Zellen nach Stimulation durch ein relevantes Antigen exprimiert und kann nach Anfärbung in einem durchflusszytometrischen Verfahren gemessen werden. Diese Messung bleibt zukünftigen Untersuchungen vorbehalten.

Limitationen der Methodik

Bei der von uns verwendete Luminex-Technologie zur Erhebung der Antikörpertiter im Patientinnenplasma handelt es sich um die Glutathion-s-Transferase (GST) -Luminex-Technologie. Diese war zum Zeitpunkt der Probengewinnung das Mittel der Wahl. Durch die GST-Technologie wird die immunologische Gesamtimmunität gegen ein Antigen gemessen, also die Antigenbindung aller vorhandenen Antikörper. Eine differenziertere Analyse hinsichtlich funktioneller Antikörper ist nicht möglich. Auch ist heute eine Schwäche in der Differenzierung zwischen den L1-Antikörpern der HPV-16 und -31 bekannt. Aus diesem Grund kann nur schwer zwischen einer Kreuzprotektivität des im Impfstoff enthaltenen HPV-16-L1-Antigens mit dem nicht enthaltenen HPV-31-L1-Antigen und L1-Fragmenten, die bei der Fertigung des Impfstoffs anfallen, aber nicht protektiv sind, da sie sich gegen Epitope im Inneren des Kapsidproteins richten, unterschieden werden (82). Die heute verwendete pseudovirion-based neutralisation assay-

Luminex-Technologie (PBNA) misst lediglich die neutralisierenden Antikörper und differenziert auch deutlich besser zwischen den L1-Antikörpern des HPV-16 und -31. Die GST-Technologie kann sowohl Plasma- als auch Serum analysieren, die PBNA-Technologie ist auf die Analyse von Serumproben beschränkt (83). Da die PBNA-Technologie zum Zeitpunkt der Probengewinnung noch nicht verfügbar war und zeitgleich periphere Blutlymphozyten gewonnen werden sollten, wurde aus den gewonnenen Proben lediglich Plasma, jedoch kein Serum gewonnen. Dies macht eine nachträgliche Analyse mittels PBNA und damit die Quantifizierung der neutralisierenden Antikörper unmöglich.

Die Studie erfolgte unter unvollständiger Verblindung und ohne Randomisierung. Eine Randomisierung wäre nur in einer interventionellen Studie möglich gewesen, die Probanden wären hierzu in eine Placebo- und eine Interventionsgruppe aufgeteilt worden. Während die Interventionsgruppe gemäß dem Gardasil Impfschema drei Injektionen des Impfstoffs erhalten hätte, wären den Probandinnen der Placebogruppe lediglich Placeboinjektionen appliziert worden. Eine derartige Interventionsstudie war unter dem bestehenden Ethikvotum nicht zulässig. Ein weiterer Grund, warum keine Randomisierung durchgeführt wurde, ist die Finanzierung des Impfstoffs. Diese wurde, bei fehlender Impfempfehlung der STIKO für die beobachtete Patientengruppe, nur in Ausnahmefällen und nach gesondertem Antrag von den Krankenkassen übernommen. Da die Impfungen folglich von den Probandinnen selbst bezahlt wurden, war eine Randomisierung nicht möglich. Dies bedingt das Risiko, durch die den Patientinnen überlassene Entscheidung, eine kostenpflichtige Impfung in Anspruch zu nehmen, einen sozioökonomischen Confounder geschaffen zu haben. Die Verblindung der Studie war nur teilweise gegeben, so konnte die Impfung selbst auf Patientenseite durch die Finanzierung, auf Arztseite aus organisatorischen Gründen nicht erfolgen. Die Bestimmung der serologischen Impftiter durch das DKFZ und die Bestimmung der HPV-Typen im Primärtumor erfolgte verblindet. Die statistische Auswertung erfolgte ohne Verblindung.

Obwohl keine Randomisierung erfolgt war, zeigten sich zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Altersverteilung, das FIGO-Stadium des Karzinoms zum Zeitpunkt der Diagnose oder den histologischen Typ des Karzinoms (vgl. S.33). Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die beiden Gruppen trotz der fehlenden Randomisierung gut vergleichbar sind.

Vorteile der gemischten linearen Modelle

Die Modelle für die Effekte auf die Entwicklung der Titer nach Impfung wurden mit gemischten linearen Modellen (mixed linear models) erstellt. Diese ermöglichen die Unterschiede zwischen den Probandinnen bei mehreren, longitudinal verteilten Messzeitpunkten, also abhängige und unabhängige Daten, parallel zu berücksichtigen. Eine klassische Regression wäre hierfür nicht geeignet. Sie erlauben auch für jeden HPV-Typ und jeden Antikörper eigene Prädiktoren zu errechnen, um antikörperspezifische Ergebnisse zu erhalten (68-70).

Ein großer Vorteil dieser statistischen Methode ist es, dass die Effektgröße für die gewählten Prädiktoren veranschaulicht wird, wie dies auch mit einer Regression möglich ist. Über diese Effektgröße können die Werte der Prädiktoren für den Erfolg der Impfung verglichen werden. In unserer Studie wurden die Prädiktoren „vorangegangene Impfungen“, „HPV-Typ im Primärtumor“ und „Zeitpunkt“ gewählt. Das Modell kann aber auch um beliebig viele Prädiktoren erweitert werden, so ist die Messung der Effektgröße anderer Prädiktoren in anderen Kollektiven möglich. Denkbar wären beispielsweise die Prädiktoren „Geschlecht“, „HIV-Status“ oder „Altersgruppe“. Dies stellt einen großen Vorteil gegenüber der meist verwendeten Messgröße in lediglich zwei Kategorien „L1-AK-positiv“ und „L1-AK-negativ“ dar. Der Vorteil gegenüber einer einfachen Regression ist, dass sowohl abhängige als auch unabhängige Daten in die Erstellung des Modells mit einbezogen werden können. Die abhängigen Daten sind in unserem Fall die verschiedenen Probandinnen. Die an longitudinal verteilten Zeitpunkten gewonnenen Proben entsprechen den abhängigen Variablen.

Auffällige Titerentwicklungen

Bei der der Impfgruppe zugehörigen Probandin #25 fallen starke Schwankungen der gemessenen HPV-AK-Titer aller Typen ins Auge. Bei den ersten Blutentnahmen waren hohe Titer nachweisbar, bei den Blutentnahmen 5 und 8 konnten jedoch nur sehr geringe Titer nachgewiesen werden. Zwischen diesen beiden Blutentnahmen, aber auch nach der achten Blutentnahme, waren die nachgewiesenen Titer wieder auf dem Niveau, das nach den ersten Blutentnahmen zu erwarten gewesen wäre.

Um diese Schwankungen zu erklären, wurde ein zeitlicher Zusammenhang zu Operationsdatum und Impfterminen gesucht. Auch die Möglichkeiten einer Probenverwechslung und anderer organisatorischer Fehlerquellen wurden geprüft.

Die beiden Blutentnahmezeitpunkte stehen in keinem Zusammenhang mit Impfterminen, beide erfolgten vor der ersten Impfung. Auch die Operation erfolgte bereits vor der ersten Blutentnahme dieser Patientin. Die uns schlüssig erscheinende Erklärung ist eine lange, ungekühlte Lagerung der Blutproben vor der Plasmagewinnung. Die erste auffällige Probe wurde vor einem Wochenende abgenommen, die zweite am Tag vor den Weihnachtsfeiertagen. Dies legt sowohl eine verlängerte Versandzeit durch die Hauspost, als auch einen längeren Zeitraum bis zur Prozessierung der Proben durch die Labormitarbeiter nahe.

5. Fazit

Mit der radikalen vaginalen Trachelektomie besteht eine Operationsmethode, mit der sowohl die Fertilität, als auch Teile der Zervix der Patientinnen erhalten bleiben. Hieraus ergibt sich die Frage, ob die so behandelten Patientinnen von der Impfung gegen die HR-HPV Typen profitieren können. Unser Ziel war es, die Effekte der HPV-Impfung bei Applikation post-Trachelektomie zu quantifizieren und die Möglichkeiten zur Stimulation einer Immunreaktion, bis hin zum Durchbruch der Toleranz gegenüber den HPV-Antigenen nachzuweisen.

Dies erreichten wir durch die Bestimmung der Antikörpertiter in mehreren Blutentnahmen vor und nach Impfung sowie bei einer nicht geimpften Kontrollgruppe. Da die abhängigen und unabhängigen Daten bei verschiedenen Probandinnen und mehreren, longitudinal verteilten Messzeitpunkten in einer klassischen Regression nicht berücksichtigt werden können, griffen wir auf gemischte lineare Modelle zurück. Daher entwickelten wir „Random Intercept Modelle“ für die Effekte auf die Entwicklung der Titer nach Impfung.

Bisher war die Immunogenität der HPV-Impfung lediglich für seronegative Patientinnen oder Patientinnen mit einer CIN gezeigt worden. Impfstudien speziell für Patientinnen, bei denen ein invasives Karzinom diagnostiziert wurde, wurden noch nicht publiziert.

Sowohl bei der rein deskriptiven Betrachtung der L1-Antikörpertiter post-Impfung als auch bei der Betrachtung der Effekte der Impfungen in den Random Intercept Modellen

konnten wir zeigen, dass die geimpften Probandinnen durch die Impfung zuverlässig hohe L1-Antikörpertiter gegen die HPV-Typen 6,11,16 und 18 entwickelten. Die Probandinnen der Kontrollgruppe zeigten diese Steigerung der Antikörpertiter nicht.

Abgesehen von den Titern gegen die in der Impfung enthaltenen Antigene stiegen auch die Titer der gegen die L1-Antigene der HPV-Typen 31 und 45. Für diese ist eine Kreuzprotektivität vorbeschrieben.

Zusätzlich zu den L1-Antikörpern, die gegen die im Impfstoff enthaltenen Antigene gerichtet sind, stiegen in unserer Impfpopulation auch die Antikörpertiter gegen die E6- und E7-Antigene der HPV-Typen 18, 45, 6 und 11 sowie der E6-Antigene des HPV Typ 31. Dieser Anstieg ist nach momentaner Studienlage nur eingeschränkt erklärbar. Eine mögliche Aktivierung des Immunsystems, Durchbrechen der Toleranz und Ausweitung der Immunantwort, sollte Gegenstand zukünftiger Forschung werden.

Die erfolgreiche Stimulation der Immunantwort in unserem trachelektomierten Patientenkollektiv, sichtbar durch die steigenden L1-Antikörpertiter, zeigt, dass die HPV-Impfung bei Patientinnen nach Therapie durch Trachelektomie unter Erhaltung der Fertilität immunogen ist. Da die Therapie durch Trachelektomie keine vollständige Entfernung der Zervix beinhaltet, kann die Impfung somit zum Schutz vor erneuter HPV-Infektion mit nachfolgenden CIN beitragen.

6. Abkürzungsverzeichnis

AGO	Arbeitsgruppe gynäkologische Onkologie e. V.
AIS	Adenocarcinoma in situ
CIN	Cervikale intraepitheliale Neoplasie
DALY	Disability adjusted life year, <i>deutsch: behinderungsbereinigtes Lebensjahr</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid, <i>deutsch: Desoxiribonukleinsäure</i>
E6AP	E6-associated-protein
FCS	Fetal Calf Serum, <i>deutsch: fetales Kälberserum</i>
FIGO	Fédération internationale des gynécologues et obstétriciens, <i>deutsch: internationale Vereinigung für Gynäkologie und Geburtshilfe</i>
GST	Glutathion-s-Transferase
HPV	Humanes Papillomavirus
HR-HPV	High-Risk-humanes Papillomavirus
HSIL	High Grade Intraepithelial Lesion, <i>deutsch: hochgradige intraepitheliale Läsion</i>
IL2	Interleukin 2
LCR	Long control region, <i>deutsch: lange Kontrollregion</i>
LR-HPV	Low-Risk-humanes Papillomavirus
MFI	Mean Fluorescence Intensity, <i>deutsch: mittlere Fluoreszenzintensität</i>
MHC	Major Histocompatibility Complex, <i>deutsch: Haupthistokompatibilitätskomplex</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
NACT	neoadjuvante Chemotherapie
ORI	Origin of replication, <i>deutsch: Replikationsursprung</i>
PBNA	pseudovirion based assay <i>deutsch: Pseudovirionen basierte Analyse</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PYLL	Potential years of life lost, <i>deutsch: potentiell verlorene Lebensjahre</i>
RAT	Radikale abdominale Trachelektomie
Rb	Retinoblastom-Tumorsuppressorprotein
RH	Radikale Hysterektomie
rpm	Rounds per minute, <i>deutsch: Umdrehungen pro Minute</i>
RVT	Radikale vaginale Trachelektomie

STIKO	Ständige Impfkommission (des Robert Koch Instituts)
TE-Puffer	Tris-EDTA Puffer
T _H 1-Zelle	T-Helferzelle Typ 1
T _H 2	T-Helferzelle Typ 2
TMAC	Tetramethylammoniumchlorid
TNF β	Tumornekrosefaktor β
VLP	Virus-like-particle
WHO	World Health Organisation, <i>deutsch: Weltgesundheitsorganisation</i>
YLD	Years lived with disability, <i>deutsch: mit Behinderung gelebte Lebensjahre</i>

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: PAP-Abstriche und CIN in der Münchner Nomenklatur III (18)	5
Tabelle 2: Klassifikation des Zervixkarzinoms (12, 24)	7
Tabelle 3: Indikationen der RVT (25, 35)	10
Tabelle 4: Verwendete Labormaterialien und –geräte	23
Tabelle 5: Blutentnahmen pro Patientin	25
Tabelle 6: Altersverteilung im Patientinnenkollektiv	33
Tabelle 7: HPV-Typ im Primärtumor	35
Tabelle 8: Tumorstadium nach FIGO	35
Tabelle 9: Histologischer Typ der Karzinome	35
Tabelle 10: Rezidive und HSIL	35
Tabelle 11: Mediane der L1-, E6- und E7-Antikörper vor und nach Impfung	36
Tabelle 12: Wilcoxon-Tests der Titer vor bzw. nach Impfung	37
Tabelle 13: Effekte auf die L1-, E6- und E7-Antikörpertiter von HPV-16	40
Tabelle 14: Restvarianz zwischen Mess- und Modellwerten für HPV-16	41
Tabelle 15: Effekte auf die L1-, E6- und E7-Antikörpertiter von HPV-18	43
Tabelle 16: Restvarianz zwischen Mess- und Modellwerten HPV-18	43
Tabelle 17: Effekte auf die L1-, E6- und E7-Antikörpertiter von HPV-31	45
Tabelle 18: Restvarianz zwischen Mess- und Modellwerten für HPV-31	45
Tabelle 19: Effekte auf die L1-, E6- und E7-Antikörpertiter von HPV-45	47
Tabelle 20: Restvarianz zwischen Mess- und Modellwerten für HPV-45	47
Tabelle 21: Effekte auf die L1-, E6- und E7-Antikörpertiter von HPV-6	49
Tabelle 22: Restvarianz zwischen Mess- und Modellwerten für HPV-6	50
Tabelle 23: Effekte auf die L1-, E6- und E7-Antikörpertiter von HPV-11	51
Tabelle 24: Restvarianz zwischen Mess- und Modellwerten für HPV-11	52

8. Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: HPV in der elektronenmikroskopischen Aufnahme (5)	1
Abbildung 2: Anatomie der radikalen vaginalen Trachelektomie (37)	11
Abbildung 3: Übersicht über Ein- und Ausschluss der Patientinnen	21
Abbildung 4: A) Darstellung der gemessenen Antikörpertiter per Boxplot	38
B) Erklärung der Boxplotdarstellung	
Abbildung 5: Titerverlauf HPV-16, L1	42
Abbildung 6: Titerverlauf HPV-18, L1	44
Abbildung 7: Titerverlauf HPV-31, L1	46
Abbildung 8: Titerverlauf HPV-45, L1	48
Abbildung 9: Titerverlauf HPV-6, L1	50
Abbildung 10: Titerverlauf HPV-11, L1	52

9. Literaturverzeichnis

1. Shope RE. A transmissible tumor-like condition in rabbits. *J Exp Med.* 1932;56(6):793-802.
2. Shope RE. Immunization of rabbits to infectious papillomatosis. *J Exp Med.* 1937;65(2):219-31.
3. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(5):342-50.
4. Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzl H. *Molekulare Virologie.* Heidelberg: Spektrum; 2010. Papillomaviren; p. 499-519.
5. National Institutes of Health, Laboratory of Tumor Virus Biology (unknown photographer). Papilloma Virus (HPV) EM. # AV-8610-3067: NCI-Visuals Online; 1986.
6. Zollner U, Schwarz TF. Erkrankungen durch humane Papillomviren. *Dtsch med Wochenschr.* 2011;136(20):1067-72.
7. Bruni L, Barrionuevo-Rosas L, Serrano B, Brotons M, Albero G, Cosano R, et al. Human Papillomavirus and Related Diseases in the World. ICO Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre); Summary Report 2014-08-22. [Data Accessed].
8. Arbyn M, Castellsagué X, de Sanjosé S, Bruni L, Saraiya M, Bray F, et al. Worldwide burden of cervical cancer in 2008. *Ann Oncol.* 2011;22(12):2675-86.
9. Krebs in Deutschland 2009/2010. 9.ed. Berlin: Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg); 2013.
10. Murray CJ, Vos T, Lozano R, Naghavi M, Flaxman AD, Michaud C, et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet.* 2012;380(9859):2197-223.
11. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999;189(1):12-9.
12. Beckmann MW, Friese K, Gissmann L, Wojciski M. 2+1-IDA-Leitlinie: Prävention, Diagnostik und Therapie der HPV-Infektion und präinvasiver Läsionen des weiblichen Genitale. *AWMF;* 2001;(015/027).
13. Varma S, Lathrop E, Haddad LB. Pediatric Condyloma Acuminata. *Journal of pediatric and adolescent gynecology.* 2013;26(6):e121-e2.
14. Kjellberg L, Hallmans G, Ahren AM, Johansson R, Bergman F, Wadell G, et al. Smoking, diet, pregnancy and oral contraceptive use as risk factors for cervical intra-epithelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection. *Br J Cancer.* 2000;82(7):1332-8.
15. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003;348(6):518-27.
16. Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia. *Microbiol Mol Bio Rev.* 2004;68(2):362-72.
17. Horn LC, Klostermann K. Präkanzerosen der Cervix uteri. *Pathologe.* 2011;32(2):242-54.
18. Griesser H, Marquardt K, Jordan B, Kühn W, Neis K, Neumann H, et al. Gynäkologische Zytodiagnostik der Zervix: Münchner Nomenklatur III. *Frauenarzt.* 2013(11):1042-8.
19. Peto J, Gilham C, Fletcher O, Matthews FE. The cervical cancer epidemic that screening has prevented in the UK. *Lancet.* 2004;364(9430):249-56.
20. Gustafsson L, Adami HO. Natural history of cervical neoplasia: consistent results obtained by an identification technique. *Br J Cancer.* 1989;60(1):132-41.

21. McCredie MR, Sharples KJ, Paul C, Baranyai J, Medley G, Jones RW, et al. Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: a retrospective cohort study. *Lancet Oncol.* 2008;9(5):425-34.
22. Zaino RJ. Symposium Part I: Adenocarcinoma In Situ, Glandular Dysplasia, and Early Invasive Adenocarcinoma of the Uterine Cervix. *Int J Gynecol Pathol.* 2002;21(4):314-26.
23. Munger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol.* 2004;78(21):11451-60.
24. Horn LC, Schierle K, Schmidt D, Ulrich U, Liebmann A, Wittekind C. Aktuelle TNM/FIGO-Stadieneinteilung für das Zervix- und Endometriumkarzinom sowie maligne Müller-Mischtumoren. *Pathologe.* 2011;32(3):239-43.
25. Horn LC, Mallmann P, Kimmig R, König K. 2k-Leitlinie: Diagnostik und Therapie des Zervixkarzinoms. *AWMF;* 1999;(032/033).
26. Salicru SR, de la Torre JF, Gil-Moreno A. The surgical management of early-stage cervical cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2013;25(4):312-9.
27. Kesic V. Management of cervical cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2006;32(8):832-7.
28. Baskett TF. Hysterectomy: evolution and trends. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2005;19(3):295-305.
29. Holland CM, Shafi MI. Radical hysterectomy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2005;19(3):387-401.
30. Sonoda Y, Abu-Rustum NR. Schauta radical vaginal hysterectomy. *Gynecol Oncol.* 2007;104(2 Suppl 1):20-4.
31. Piver MS, Rutledge F, Smith JP. Five classes of extended hysterectomy for women with cervical cancer. *Obstet Gynecol.* 1974;44(2):265-72.
32. Aburel E. Chirurgica gynecologica. Colpohysterectomia largita subfundica. Bucharest: Editura Medicala; 1981. 714-721
33. Dargent D, Mathevet P. Schauta's vaginal hysterectomy combined with laparoscopic lymphadenectomy. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol.* 1995;9(4):691-705.
34. Dargent D, Martin X, Sacchetoni A, Mathevet P. Laparoscopic vaginal radical trachelectomy. *Cancer.* 2000;88(8):1877-82.
35. Hertel H, Köhler C, Hillemanns P, Possover M, Grund D, Michels W, et al. Fertilitatserhaltung bei Frauen mit fruhem Zervixkarzinom. *Onkologe.* 2006;12(9):895-900.
36. Lanowska M, Mangler M, Speiser D, Bockholdt C, Schneider A, Köhler C, et al. Radical Vaginal Trachelectomy After Laparoscopic Staging and Neoadjuvant Chemotherapy in Women With Early-Stage Cervical Cancer Over 2 cm: Oncologic, Fertility, and Neonatal Outcome in a Series of 20 Patients. *Int J Gynecol Cancer.* 2014;24(3):586-93.
37. Speiser D, Köhler C, Schneider A, Mangler M. Radical vaginal trachelectomy: a fertility-preserving procedure in early cervical cancer in young women. *Dtsch Arztebl Int.* 2013;110(17):289-95.
38. Reade CJ, Eiriksson LR, Covens A. Surgery for early stage cervical cancer: how radical should it be? *Gynecol Oncol.* 2013;131(1):222-30.
39. Malur S, Krause N, Köhler C, Schneider A. Sentinel lymph node detection in patients with cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2001;80(2):254-7.
40. van de Lande J, Torrenga B, Raijmakers PG, Hoekstra OS, van Baal MW, Brolmann HA, et al. Sentinel lymph node detection in early stage uterine cervix carcinoma: a systematic review. *Gynecol Oncol.* 2007;106(3):604-13.
41. Hertel H, Köhler C, Grund D, Hillemanns P, Possover M, Michels W, et al. Radical vaginal trachelectomy (RVT) combined with laparoscopic pelvic lymphadenectomy: Prospective multicenter study of 100 patients with early cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2006;103(2):506-11.

42. Mehlhorn G, Lanowska M, Thiel F, Köhler C, Beckmann MW. Organerhaltende operative Methoden im Bereich der Cervix uteri. *Geburtsh Frauenheilk.* 2008;68:R121-R44.
43. Speiser D, Mangler M, Kohler C, Hasenbein K, Hertel H, Chiantera V, et al. Fertility Outcome After Radical Vaginal Trachelectomy: A Prospective Study of 212 Patients. *Int J Gynecol Cancer.* 2011.
44. Mangler M, Speiser D, Nguyen Bich D, Cremer M, Koehler C, Schneider A, et al. Neonatal outcome in infants of patients with radical vaginal trachelectomy. *J Perinat Med.* 2012;40(5):503.
45. Karimi-Zarchi M, Mousavi A, Gilani MM, Barooti E, Miratashi-Yazdi A, Dehghani A. Conservative treatment in early cervical cancer. *Int J Biomed Sci.* 2013;9(3):123-8.
46. Abu-Rustum NR, Sonoda Y, Black D, Levine DA, Chi DS, Barakat RR. Fertility-sparing radical abdominal trachelectomy for cervical carcinoma: technique and review of the literature. *Gynecol Oncol.* 2006;103(3):807-13.
47. Plante M. Evolution in fertility-preserving options for early-stage cervical cancer: radical trachelectomy, simple trachelectomy, neoadjuvant chemotherapy. *Int J Gynecol Cancer.* 2013;23(6):982-9.
48. Schneider V. Gynäkologische Krebsvorsorge in Deutschland. *Pathologe.* 2012;33(4):286-92.
49. Dillner J, Rebolj M, Birembaut P, Petry KU, Szarewski A, Munk C, et al. Long term predictive values of cytology and human papillomavirus testing in cervical cancer screening: joint European cohort study. *BMJ.* 2008;337:a1754.
50. Arbyn M, Ronco G, Anttila A, Meijer CJ, Poljak M, Ogilvie G, et al. Evidence regarding human papillomavirus testing in secondary prevention of cervical cancer. *Vaccine.* 2012;30 Suppl 5:F88-99.
51. Sroczynski G, Schnell-Inderst P, Mühlberger N, Lang K, Aidelsburger P, Wasem J, et al. Cost-effectiveness of primary HPV screening for cervical cancer in Germany-a decision analysis. *Eur J Cancer.* 2011;47(11):1633-46.
52. Albers AE, Hoffmann TK, Klusmann JP, Kaufmann AM. Prophylaktische und therapeutische Vakzinen gegen humane Papillomviren. *HNO.* 2010;58(8):778-90.
53. The FUTURE II Study Group. Quadrivalent Vaccine against Human Papillomavirus to Prevent High-Grade Cervical Lesions. *New Engl J Med.* 2007;356(19):1915-27.
54. Seedat J, Marcus U. Empfehlungen der Ständigen Impfkommission (STIKO) am Robert Koch-Institut [Stand: August 2013]. Berlin: Epidemiologisches Bulletin Nr.34 (14). 2013.
55. Monsonego J, Cortes J, Greppe C, Hampl M, Joura E, Singer A. Benefits of vaccinating young adult women with a prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16 and 18) vaccine. *Vaccine.* 2010;28(51):8065-72.
56. Giannini SL, Hanon E, Moris P, Van Mechelen M, Morel S, Dessy F, et al. Enhanced humoral and memory B cellular immunity using HPV16/18 L1 VLP vaccine formulated with the MPL/aluminium salt combination (AS04) compared to aluminium salt only. *Vaccine.* 2006;24(33-34):5937-49.
57. Einstein MH, Baron M, Levin MJ, Chatterjee A, Edwards RP, Zepp F, et al. Comparison of the immunogenicity and safety of Cervarix and Gardasil human papillomavirus (HPV) cervical cancer vaccines in healthy women aged 18-45 years. *Hum Vaccin.* 2009;5(10):705-19.
58. Block SL, Nolan T, Sattler C, Barr E, Giacoletti KE, Marchant CD, et al. Comparison of the immunogenicity and reactogenicity of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in male and female adolescents and young adult women. *Pediatrics.* 2006;118(5):2135-45.
59. Murphy K. *Janeway's immunobiology.* 8. ed. London: Garland Science; 2012.
60. Stanley M. Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. *Clin Microbiol Rev.* 2012;25(2):215-22.

61. Schneider A, Dürst M, Kaufmann AM. HPV-Infektion und Zervixkarzinom - Epidemiologie, Nachweis und Immunologie. *Zentralbl Gynakol.* 2001;123(04):179-85.
62. Glastetter E, Kaufmann AM. Humoral and cellular immune response in HPV vaccination. *Hautarzt.* 2007;58(6):493-4, 6-500.
63. Stanley M. Immunobiology of HPV and HPV vaccines. *Gynecol Oncol.* 2008;109(2 Suppl):S15-21.
64. Sanofi Pasteur MSD. Fachinformation Gardasil. Rote Liste GmbH [abgerufen am 27.08.2014]. [http://www.impfservice.de/fileadmin/user_upload/pdfs/Fachinformationen/FI-Gardasil_06-2014_v2_RLFI-5466.pdf]. Juni 2014.
65. Waterboer T, Sehr P, Michael KM, Franceschi S, Nieland JD, Joos TO, et al. Multiplex Human Papillomavirus Serology Based on In Situ-Purified Glutathione S-Transferase Fusion Proteins. *Clin Chem.* 2005;51(10):1845-53.
66. Schmitt M, Bravo IG, Snijders PJF, Gissmann L, Pawlita M, Waterboer T. Bead-Based Multiplex Genotyping of Human Papillomaviruses. *J Clin Microbiol.* 2006;44(2):504-12.
67. Schmitt M, Dondog B, Waterboer T, Pawlita M. Homogeneous amplification of genital human alpha papillomaviruses by PCR using novel broad-spectrum GP5+ and GP6+ primers. *J Clin Microbiol.* 2008;46(3):1050-9.
68. Verbeke G, Molenberghs G. Linear mixed models for longitudinal data. Springer; 2009.
69. Grittner U, Bloomfield K. Mathematical Approaches to Analysing Area-Level Effects on Health. In: Stock C, Ellaway A, editors. *Neighbourhood Structure and Health Promotion*: Springer US; 2013. p. 177-200.
70. Fitzmaurice GM, Laird NM, James HW. Linear mixed effects model. In: Wiley, editor. *Applied Longitudinal Analysis*. Boston, MA2011. p. 189–240.
71. Stanley M, Lowy DR, Frazer I. Prophylactic HPV vaccines: underlying mechanisms. *Vaccine.* 2006;24 Suppl 3:S3/106-13.
72. Villa LL, Ault KA, Giuliano AR, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, et al. Immunologic responses following administration of a vaccine targeting human papillomavirus Types 6, 11, 16, and 18. *Vaccine.* 2006;24(27-28):5571-83.
73. Garland SM. The Australian Experience With the Human Papillomavirus Vaccine. *Clin Ther.* 2014;36(1):17-23.
74. Kang WD, Choi HS, Kim SM. Is vaccination with quadrivalent HPV vaccine after loop electrosurgical excision procedure effective in preventing recurrence in patients with high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN2-3)? *Gynecol Oncol.* 2013;130(2):264-8.
75. Combita AL, Touzé A, Bousarghin L, Christensen ND, Coursaget P. Identification of two cross-neutralizing linear epitopes within the L1 major capsid protein of human papillomaviruses. *J Virol.* 2002;76(13):6480-6.
76. Fleury MJ, Touzé A, Alvarez E, Carpentier G, Clavel C, Vautherot JF, et al. Identification of type-specific and cross-reactive neutralizing conformational epitopes on the major capsid protein of human papillomavirus type 31. *Arch Virol.* 2006;151(8):1511-23.
77. Fife KH, Wheeler CM, Koutsky LA, Barr E, Brown DR, Schiff MA, et al. Dose-ranging studies of the safety and immunogenicity of human papillomavirus Type 11 and Type 16 virus-like particle candidate vaccines in young healthy women. *Vaccine.* 2004;22(21-22):2943-52.
78. Poland GA, Jacobson RM, Koutsky LA, Tamms GM, Railkar R, Smith JF, et al. Immunogenicity and reactogenicity of a novel vaccine for human papillomavirus 16: a 2-year randomized controlled clinical trial. *Mayo Clin Proc.* 2005;80(5):601-10.
79. Olsson SE, Villa LL, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, Malm C, et al. Induction of immune memory following administration of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus (HPV) types 6/11/16/18 L1 virus-like particle (VLP) vaccine. *Vaccine.* 2007;25(26):4931-9.

80. Frentsch M, Arbach O, Kirchhoff D, Moewes B, Worm M, Rothe M, et al. Direct access to CD4+ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression. *Nat Med.* 2005;11(10):1118-24.
81. Ramseger AK. Messung zellulärer Immunantworten im Rahmen der prophylaktischen Impfung gegen Humane Papillomviren. Berlin: Universitätsmedizin Berlin, Institut für gynäkologische Tumorimmunologie; 2010.
82. Robbins HA, Li Y, Porras C, Pawlita M, Ghosh A, Rodriguez AC, et al. Glutathione S-transferase L1 multiplex serology as a measure of cumulative infection with human papillomavirus. *BMC Infect Dis.* 2014;14:120.
83. Sehr P, Rubio I, Seitz H, Putzker K, Ribeiro-Müller L, Pawlita M, et al. High-throughput pseudovirion-based neutralization assay for analysis of natural and vaccine-induced antibodies against human papillomaviruses. *PLoS One.* 2013;8(10):e75677.

10. LEBENSLAUF

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

11. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Florian Peter, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Immunogenität der quadrivalenten HPV-Impfung und Effekte auf HPV-spezifische Antikörpertiter bei trachelektomierten Patientinnen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

12. Danksagung

„Die Danksagung ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten“