

Aus dem  
CharitéCentrum für Audiologie / Phoniatrie, Augen- und HNO-Heilkunde  
Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde  
Direktorin: PD Dr. med. Minoo Lenarz

## **Habilitationsschrift**

# **Immunreaktionen gegen HPV-positive und -negative Kopf-Hals-Tumore und ihre Stammzellen**

**zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Hals-Nasen-Ohrenheilkunde**

**vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin**

**von**

**Dr. med. Andreas Eberhard Albers  
geboren am 4.12.1971 in Bremen**

Eingereicht: März 2013

Dekanin: Prof. Dr. med. Annette Grüters-Kieslich

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Jochen Werner

2. Gutachter: Prof. Dr. med Andreas Dietz

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen .....</b>	<b>4</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>5</b>
1.1 Ätiologie von Kopf-Hals-Tumoren .....	5
1.2 HPV-assoziierte KH-PECA .....	7
1.2.1 Humane Papillomviren .....	8
1.2.2 Infektion mit HPV .....	10
1.2.3 Natürliche Immunantwort auf HPV und Immunevasion .....	11
1.3 Immuntherapie von KH-PECA .....	14
1.3.1 T-Zell-basierte Immuntherapie .....	15
1.3.1.1 Aktueller Stand therapeutischer HPV-Impfungen .....	15
1.3.1.2 Zukünftige Entwicklungen therapeutischer HPV-Vakzine .....	16
1.3.2 Rolle von p53 in der Ätiologie von KH-PECA und seine Bedeutung für die Immuntherapie .....	17
1.3.2.1 P53 als Quelle für Tumorantigene .....	17
1.4 Tumorstammzellen .....	18
1.4.1 Definition von TSZ .....	19
1.4.2 TSZ und Immuntherapie .....	23
1.5 Fragestellung .....	25
<b>2. Eigene Forschung .....</b>	<b>26</b>
2.1 Immunogenität und Immunsuppression von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals- Bereichs .....	26
Publikation 1: Immune responses to p53 in patients with cancer: enrichment in tetramer <sup>+</sup> p53 peptide-specific T cells and regulatory T cells .....	26
Publikation 2: Spontaneous apoptosis of tumor-specific tetramer <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T lymphocytes in the peripheral circulation of patients with head and neck cancer .....	38
2.2 Immunogenität von HPV-assoziierten Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals- Bereichs .....	48
Publikation 3: Antitumor activity of human papillomavirus type 16 E7-specific T cells against virally infected squamous cell carcinoma of the head and neck .....	48
2.3 Charakterisierung von Tumorstammzellen .....	59
Publikation 4: Evidence for epithelial-mesenchymal transition in cancer stem cells of head and neck squamous cell carcinoma .....	59

Publikation 5: ALDH1-positive cancer stem-like cells are enriched in nodal metastases of oropharyngeal squamous cell carcinoma independent of HPV status .....	74
2.4 <i>Immunantworten gegen Tumorstammzellen</i> .....	83
Publikation 6: Susceptibility to cytotoxic T cell lysis of cancer stem cells derived from cervical and head and neck tumor cell lines.....	83
<b>3. Diskussion .....</b>	<b>96</b>
<b>4. Zusammenfassung.....</b>	<b>104</b>
<b>5. Literaturangaben .....</b>	<b>106</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>115</b>
1. <i>Abbildungsverzeichnis</i> .....	115
2. <i>Tabellenverzeichnis</i> .....	115
<b>Danksagung.....</b>	<b>116</b>

## Abkürzungen

AA	Alloantigen
ALDH1	Aldehyddehydrogenase-1
CD	Cluster of differentiation
CTL	Cytotoxic T-cell; deutsch: Zytotoxische T-Zelle (ZTL)
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
HLA	Human leucocyte antigen; deutsch: humanes Leukozytenantigen
HPV	Humanes Papillomvirus
HR	Hochrisiko
IARC	International Agency for Research on Cancer
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IF	Interferon
KH-PECA	Squamous cell cancer of the head and neck; deutsch: Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich
MHC	Major-histo-compatibility-complex; deutsch: Haupthistokompatibilitätskomplex
TAP	transport associated with antigen processing
TA	Tumorantigen
TCR	T-Zellrezeptor
TIL	Tumor-infiltrierende Lymphozyten
TP	Tumor protein
Wt	Wildtyp
WHO	World Health Organization

## **1. Einleitung**

Sechs Prozent aller Krebserkrankungen werden durch Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich (KH-PECA) hervorgerufen (1, 2). Pro Jahr treten weltweit ca. 650.000 neue Fälle auf, von denen etwa die Hälfte der Erkrankten daran verstirbt (3). Während Frühstadien effektiv behandelt werden, können weniger als 40% der Patienten in lokal fortgeschrittenen und metastasierten Stadien geheilt werden. Etwa zwei Drittel der Patienten weisen bei Erstvorstellung bereits ein fortgeschrittenes Stadium auf. Fernmetastasen werden in 10% der Fälle bei Erstvorstellung gefunden. Die 5-Jahres-Überlebensrate aller Stadien beträgt etwa 60%. Trotz signifikanter Fortschritte in der Chirurgie und bei adjuvanten Therapien, wie der Strahlentherapie und der Chemotherapie, hat sich das Langzeitüberleben von Patienten in fortgeschrittenen Stadien in den letzten 30 Jahren nicht signifikant verbessert (4-6). Ob die kürzlich in die Therapie eingeführten Antikörpertherapien die in sie gesetzten Erwartungen langfristig erfüllen werden, bleibt abzuwarten. Aufgrund der Entwicklung von Fernmetastasen und dem Auftreten von therapieresistenten lokalen und regionalen Metastasen weisen KH-PECA eine hohe Mortalität auf.

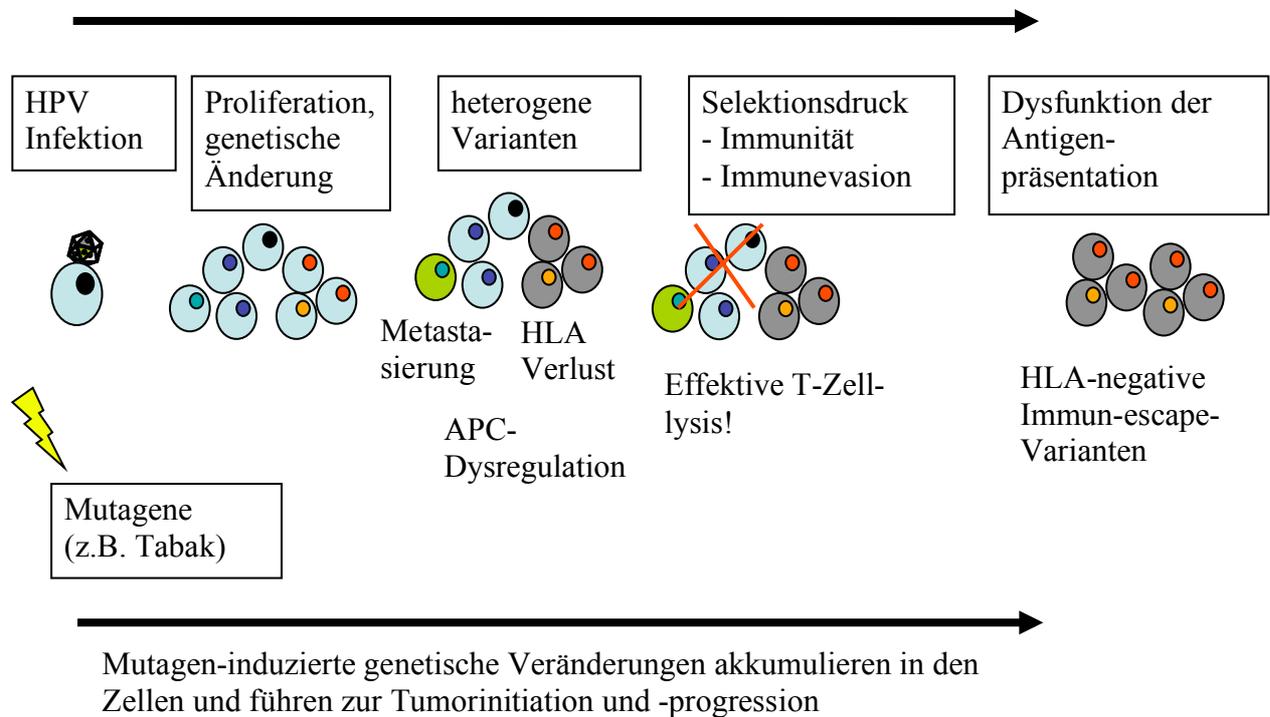
Ein besseres Verständnis der den Tumoren zugrunde liegenden Tumorbiologie einschließlich der therapeutisch nur schwer beherrschbaren Rezidive und Metastasen ist fundamental für die Entwicklung von effektiveren neuen Therapien, einschließlich alternativer Therapien wie der T-Zell-basierten Immuntherapie.

### **1.1 Ätiologie von Kopf-Hals-Tumoren**

Zwei unterschiedliche Hauptursachen für KH-PECA sind bekannt. Eine Ursache für die Entwicklung von KH-PECA ist die spontane Anreicherung von multiplen genetischen Veränderungen, die durch eine genetische Prädisposition und chronische Entzündung moduliert und durch Umwelteinflüsse und soziale Gewohnheiten wie Tabak- und Alkoholkonsum begünstigt werden. Die zweite Hauptursache ist eine Infektion von Plattenepithelzellen mit onkogenen Humanen Papillomaviren (HPV) im Zusammenwirken mit derzeit noch nicht eindeutig identifizierten Kofaktoren.

Demzufolge können zwei Hauptätiologien definiert werden: Zum einen Tumore, die durch toxische Substanzen und zum anderen Tumore, die durch die Aktivität von viralen Onkogenen hervorgerufen werden. Beide Ätiologien sind durch einen mehrschrittigen Prozess charakterisiert, der in genetischen Änderungen oder der vermehrten Expression von zwei großen Gengruppen mündet: Onkogene und Tumorsuppressorgene (Abbildung 1).

Persistenz von HPV, zusammen mit genetischen Veränderungen führt im Laufe der Zeit zur Tumorinitiation und -progression



### Abbildung 1: Unterschiedliche Hauptätiologien von KH-PECA

APC: Antigenpräsentierende Zelle. Modifiziert nach „T-cell Tumor Interaction Directs the Development of Immunotherapies in Head and Neck Cancer“ (7).

Diese stellen somit einen unentbehrlichen Bestandteil der Karzinogenese dar und sind deshalb auch Ziel von therapeutischen Ansätzen (siehe unten). Wichtige Vertreter sind das Produkt des Tumorsuppressorgens p53 (TP53), welches in noxeninduzierten Tumoren häufig mutiert ist und akkumuliert (8-10), sowie p16 und pRB, die in HPV-assoziierten Tumoren überexprimiert werden. Weitere Veränderungen in der genetischen Sequenz oder der Genexpression wurden in Genen gefunden, die wichtig für Immunantworten oder deren Modulation sind. Wichtige Vertreter sind der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC-Komplex) und sogenannte kostimulatorische Moleküle wie CD54/ICAM-1. Diese Beobachtung ist wichtig, da sie zeigt, dass der Immunerkennung von Tumoren eine Bedeutung zuzumessen ist und dass sie vermutlich eine Triebfeder hinter der Selektion von immunresistenten Varianten ist.

## 1.2 HPV-assoziierte KH-PECA

HPV-assoziierte KH-PECA definieren eine bestimmte Subgruppe von KH-PECA, die, aufgrund mit ihrer Ätiologie verbundenen eindeutig definierten Zielstrukturen, spezifisch mit präventiven und therapeutischen Maßnahmen bekämpft werden könnten. Aus diesem Grund sind diese Tumore in den letzten Jahren in den Fokus der KH-PECA-Forschung gerückt.

Mehr als 100 Subtypen des HPV sind bisher bekannt, von denen ca. 16 onkogenes Potenzial besitzen. Von diesen spielt HPV16 in der Ätiologie von KH-PECA, insbesondere bei Tumoren des Oropharynx, mit Abstand die bedeutendste Rolle (11-15). Bezogen auf alle anatomischen Regionen des Kopf-Hals-Bereichs wurden HPV-Infektionen in 20% bis 30% und bezogen auf den Oropharynx in 50% der Fälle nachgewiesen. Die Angaben weisen eine gewisse Bandbreite auf, da für den Nachweis bisher Verfahren unterschiedlicher Sensitivität und z.T. Proben aus Gewebekbanken unterschiedlichen Alters verwendet wurden. Dabei stellt die HPV-Infektion aufgrund ihres häufigen und weltweiten Vorkommens eine Pandemie dar, die als solche nicht ausreichend wahrgenommen wird (16). Durch die derzeit laufenden Bemühungen, die Epidemiologie von HPV-assoziierten KH-PECA in unterschiedlichen Bevölkerungsgruppen, geografischen Regionen und Kulturen genau zu erfassen, sind zukünftig belastbarere Daten zu erwarten. Für Larynxkarzinome ist die Rolle von HPV weniger eindeutig geklärt, die verfügbaren Informationen über die Prävalenz von Hochrisiko-HPV (HR-HPV) variieren, und Multizenterstudien stehen noch aus (17, 18).

Die Infektion mit HR-HPV wurde als Risikofaktor für die Entwicklung von Plattenepithelkarzinomen im HNO-Bereich identifiziert. Patienten mit nachweisbaren Anti-HPV-Antikörpern haben ein 2-fach erhöhtes Risiko, ein KH-PECA, und ein 10-fach erhöhtes Risiko, ein Tonsillenkarzinom zu entwickeln (19-21). Andere Risikofaktoren für HPV-positive Oropharynxkarzinome sind vergleichbar mit denen des Zervixkarzinoms. Unter anderem sind dies sexuelle Promiskuität und frühe sexuelle Kontakte (22, 23). Aus diesem Grund werden von manchen Autoren HPV-assoziierte Kopf-Hals-Tumore als sexuell übertragbare Erkrankung angesehen (24). Dies wird insbesondere im Kontext einer sinkenden Inzidenz von tabakinduzierten Hypopharynx- und Larynxkarzinomen in den entwickelten Ländern interessant, in denen im Gegenzug die Inzidenz des Tonsillenkarzinoms ansteigt. Für HPV-assoziierte Tonsillenkarzinome wurde eine geringere Exposition mit anderen karzinogenen Risikofaktoren nachgewiesen (25). Die niedrigere Rate von karzinogenen Risikofaktoren und p53-Mutationen und eine jüngere Patientenpopulation (26, 27) lassen derzeit noch unbekanntere Einflussfaktoren vermuten, welche eine Virusinfektion und Persistenz, Propagation und Zelltransformation sowie die spätere Immunevasion von HPV-

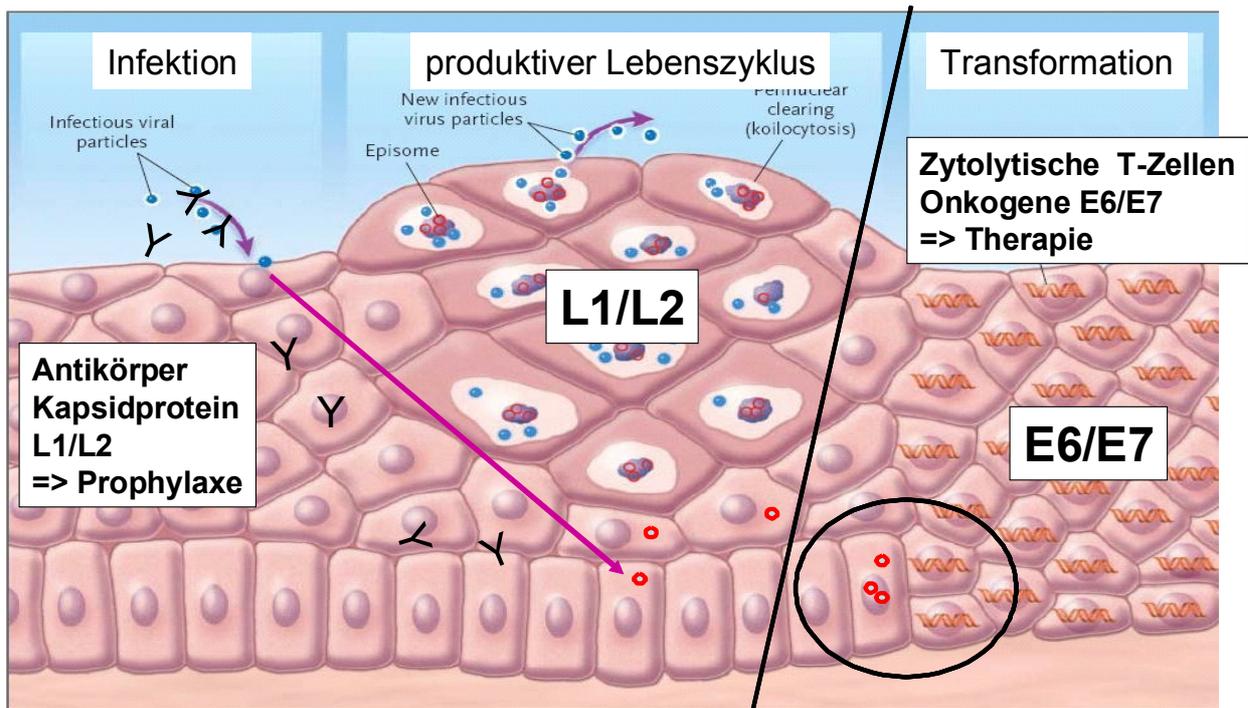
assoziierten KH-PECA begünstigen (12, 14, 28-30). Diese Tumore weisen zudem eine höhere Expression von p16, einem Marker für die onkogene Aktivität von HR-HPV, auf (31).

Bleibt die erfolgreiche Ausheilung der HPV-Infektion aus, besteht ein dauerhafter Einfluss der viralen Onkogene (HPV-E6, HPV-E7 u.a.) auf die Zellen. Persistent infizierte Personen können klinisch und histologisch nachweisbare Präkanzerosen entwickeln, die sich zu invasiven Karzinomen weiterentwickeln können. Die Expression von HPV-Onkogenen ist vital für das Tumorzellüberleben. Deshalb stellen sie geeignete Zielstrukturen für therapeutische Ansätze, wie sie z.B. für Antitumorvakzine erforderlich sind, dar. Als grundlegende Voraussetzung für Antitumorvakzine gegen HPV-induzierte KH-PECA wurde von mir und meinen Kollegen, der Nachweis von HPV-Tumorepitop-spezifischen T-Zellen am Pittsburgh Cancer Institute der Universität Pittsburgh erbracht (29). Derzeit werden Screening-Programme für HR-HPV im Hals-Nasen-Ohrenbereich (HNO-Bereich) noch nicht routinemäßig durchgeführt. Es gibt jedoch immer mehr Hinweise darauf, dass zur Behandlung HPV-assoziiierter Tumore aufgrund ihres spezifischen klinischen Verhaltens andere Therapiestrategien erfolgreicher sein könnten, als sie derzeit pauschal für KH-PECA beider Ätiologien durchgeführt werden. Bei HPV-assoziierten Tumoren werden seltener Rezidive und Zweittumore sowie ein besseres Ansprechen auf die Therapie, verknüpft mit einem längeren Überleben, beobachtet (32, 33). Im Vergleich zu noxeninduzierten Tumoren weisen sie einen geringeren Differenzierungsgrad auf. Häufig sind diese Tumore zum Zeitpunkt der Diagnose relativ klein, jedoch bereits lokal metastasiert. Insgesamt ist die Prognose HPV-assoziiierter Tumore trotzdem günstiger als die HPV-negativer (31, 32). Dies gilt sowohl für das Gesamtüberleben als auch für das krankheitsspezifische Überleben (34, 35). Die zugrunde liegenden Ursachen hierfür sind derzeit noch unklar.

### **1.2.1 Humane Papillomviren**

Papillomviren sind kleine Viren mit einem 55 nm großen, nicht umhüllten Kapsid, das aus dem Hauptkapsidprotein L1 und einem kleineren L2-Protein besteht. Sie infizieren kutane und mucosale epitheliale Gewebe. Mehr als 200 Typen sind bis jetzt bekannt, von denen etwa 40 die anogenitale und orale Mucosa infizieren können. Die mucosalen Typen werden weiter unterteilt in die LR-HPV-Typen (z.B. HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81), die meist benigne Kondylome, orale Papillome, aber seltener auch potenziell tödliche Erkrankungen wie z.B. die rezidivierende respiratorische Papillomatose hervorrufen, und die HR- -Typen (HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66), die im HNO-Bereich die höchste Assoziation mit Tonsillenkarzinomen haben und im gynäkologischen Bereich mit

zervikalen intraepithelialen Neoplasien und invasiven Zervixkarzinomen (3) sowie vaginalen, vulvären, analen und penilen Dysplasien assoziiert sind. 90% der anogenitalen Kondylome und annähernd 100% der respiratorischen Papillomatosen werden durch HPV6 und 11 hervorgerufen. HPV16 ist in HPV-assoziierten Neoplasien im HNO-Bereich der dominante Typ und wurde in 90% der Fälle nachgewiesen (36). Aufgrund ihres kausalen Zusammenhangs mit Karzinomen wurden die HR-HPV-Typen 16 und 18 (zusammen mit weiteren) von der International Agency for Research on Cancer (IARC), einer Institution der WHO, als Karzinogene für den Menschen klassifiziert (37). Der Lebenszyklus der Papillomviren hängt vom Differenzierungsprogramm der Epithelien ab. HPV infizieren ausschließlich undifferenzierte Keratinozyten-Stammzellen des Epithels, die sie durch mikroskopische Verletzungen erreichen (Abbildung 2). Virusgenome persistieren in den basalen Zellen und zeigen in dieser Phase eine eingeschränkte Genexpression. Die Expression von Virusgenen ist zunächst auf geringe Konzentrationen von E2, E6 und E7 reduziert, die für die Etablierung der Infektion nötig sind. Hohe Mengen an viralen Proteinen, insbesondere der Strukturproteine des Kapsids werden erst in den ausdifferenzierten Schichten des Epithels produziert. Ausgereifte infektiöse Viruspartikel bilden sich in den ausdifferenzierenden Zellen der oberen Epithelschichten und werden passiv mit dem Abschilfern von Epithelien freigesetzt. Das Papillomvirusgenom enthält die genetische Information für mindestens 7 früh (engl.: early, E) im Infektionszyklus exprimierte funktionale Proteine und zwei spät exprimierte (engl.: late, L) Strukturproteine. Die frühen Proteine E1 bis E5 werden für die Regulation der viralen Replikation und Transkription benötigt. E6 und E7 dagegen sind virale Onkogene, die mit den zellulären Tumorsuppressor-Genprodukten p53 und pRb (Retinoblastoma) interagieren und dadurch die Apoptose der Zellen unterbinden und den Übertritt in den Zellzyklus einleiten (38). Da diese viralen Proteine Tumorzell-spezifisch sind und in allen Tumorzellen exprimiert werden, sind sie potenzielle Zielantigene für therapeutische Impfstoffe. Das Protein L1 bildet Pentamere, die sich als Capsomere mit dem Protein L2 zusammenlagern und das Viruskapsid aufbauen. Hierin wird die virale DNA verpackt und als infektiöses Partikel freigesetzt. Das L1-Protein und die daraus gebildeten Virosomen-Partikel sind hoch immunogen und die Grundlage des prophylaktischen Impfstoffs.



**Abbildung 2: Intraepithelialer Lebenszyklus des HPV**

Eine bis auf die Basalzellschicht des Epitheliums reichende Mikroläsion ermöglicht eine Infektion der Basalzellen. Die Vermehrung von HPV erfolgt in differenzierten, z.T. absterbenden, d.h. in äußeren Epithelschichten, in denen auch die Synthese von viralem Protein (E6/E7) stattfindet. Durch diesen intraepithelialen Lebenszyklus und durch weitere lokale immunsuppressive Wirkungen des HPV (Abschalten von Langerhans-Zellen) ist die Interaktion von HPV mit dem Immunsystem nur minimal. Dies zeigt sich auch dadurch, dass in nur 60% der Infizierten Antikörper gebildet werden. Die Induktion von spezifischen Antikörpern, die primär eine Infektion verhindern, ist im Rahmen einer präventiven Vakzinierung möglich (links). Die Induktion von HPV-spezifischen T-Zellvakzinen (rechts) befindet sich im experimentellen Stadium. Abbildung modifiziert nach Goodman et al 2003 „Case records of the Massachusetts General Hospital. Weekly clinicopathological exercises. Case 32-2003. A 37-year-old woman with atypical squamous cells on a Papanicolaou smear“ (39).

### 1.2.2 Infektion mit HPV

Während der Hauptinfektionsweg für anogenitale HPV die sexuelle Aktivität ist (40), wird der Infektionsweg für oropharyngeale Infektionen noch diskutiert. Der Ablauf einer HPV-Infektion und der Lebenszyklus von HPV sind in Abbildung 2 dargestellt.

Die Epidemiologie der HPV-Infektion wurde bisher vor allem für die anogenitale Region untersucht. HPV-Infektionen zeichnen sich durch eine sehr hohe Ansteckungsrate und lange Persistenz aus. Daraus folgt eine hohe Durchseuchungsrate vor allem in der jungen Bevölkerung. Für den gynäkologischen Bereich liegen hierfür detaillierte Angaben vor (41). Vergleichbare Zahlen sind auch für den HNO-Bereich zu erwarten, jedoch besteht hier noch Forschungsbedarf.

Läsionen der Cervix uteri, die HR-HPV-Typen oder multiple HPV-Typen enthalten, regredieren langsamer als diejenigen mit LR-Typen (42). Der Durchschnittszeitraum für eine Progression einer Läsion, die mit HR-HPV infiziert ist, ist ausgesprochen lang: von 67 Monaten für ASC-US (engl.: atypical squamous cells of undetermined significance) zu LSIL (engl.: low-grade intraepithelial lesion, niedriggradige intraepitheliale Läsion) oder 73,3 Monaten von LSIL zu HSIL (engl.: high-grade intraepithelial lesion, hochgradige intraepitheliale Läsion). Durch die langsamen Progressionsraten ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass ein Zervixkarzinom-Früherkennungsprogramm wie der „Krebsvorsorgeabstrich“ nach Papanicolaou (sog. PAP-Abstrich) prinzipiell effektiv ist. Tatsächlich hat dieses Krebspräventionsprogramm die Inzidenz von Zervixkarzinomen um ca. 80% vermindert. Die vergleichbaren Abläufe im Kopf-Hals-Bereich sind weniger gut untersucht und zurzeit noch weitgehend unbekannt, da es noch keine etablierten HPV-Screening-Programme gibt.

### **1.2.3 Natürliche Immunantwort auf HPV und Immunevasion**

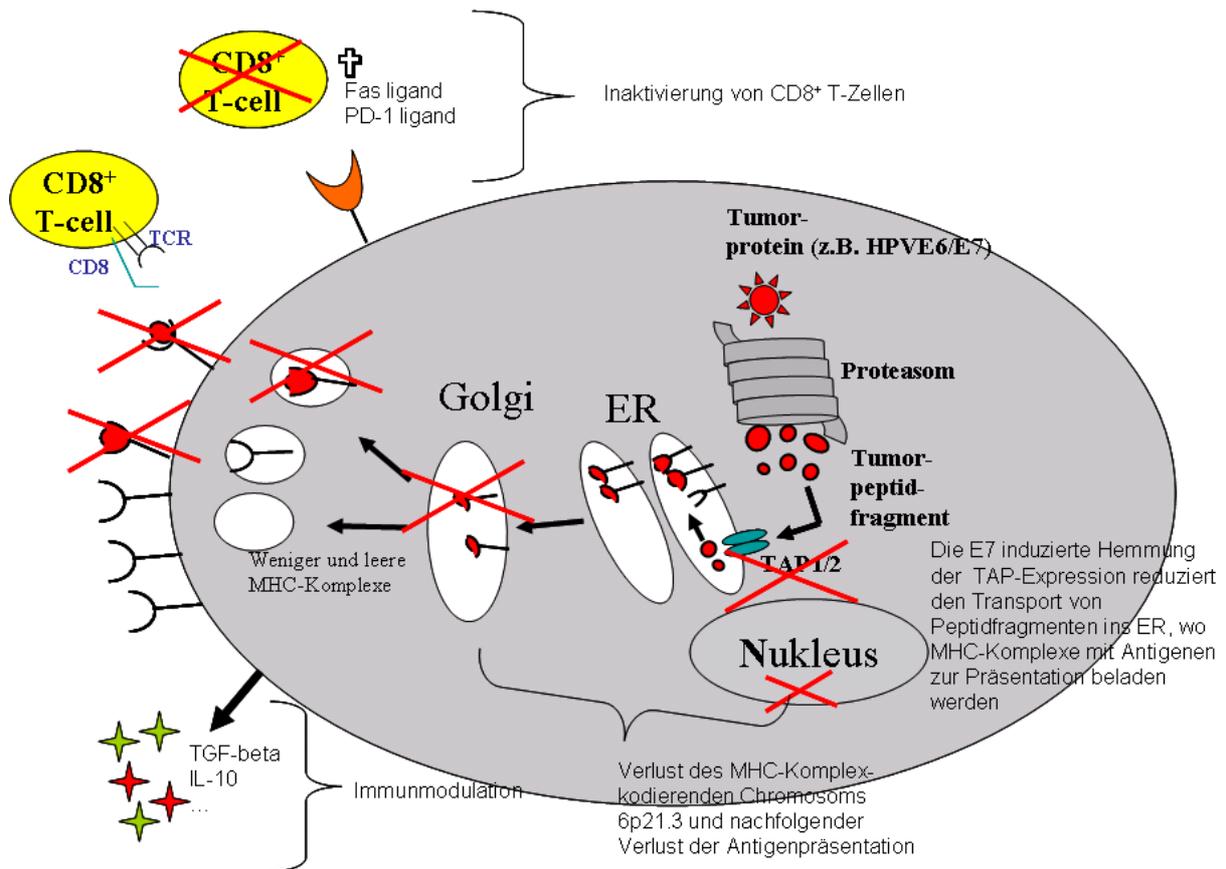
Die Bedeutung der körpereigenen Immunabwehr bei der Ausheilung von HPV-Infektionen wird bei Patienten mit supprimiertem Immunsystem deutlich (Abbildung 3). Bei Transplantatempfängern mit iatrogenen Immunsuppression treten HPV-induzierte Dysplasien und Karzinome deutlich häufiger auf (43). Ähnliches wird auch bei HIV-infizierten Patienten beobachtet. Demzufolge spielen intakte CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten eine wichtige Rolle bei der Abwehr von HPV-Infektionen (44). Außerdem ist in spontan regredierenden Papillomen die Zahl infiltrierender T-Lymphozyten signifikant höher als bei persistierenden Infektionen (45). HPV-Kapsid-spezifische Antikörper sind im Mittel 18 Monate nach einer Infektion nachweisbar, etwa die Hälfte der Infizierten bleibt jedoch seronegativ. Die Antikörpertiter sind generell sehr niedrig. Oft ist die Serokonversion mit persistentem Infektionsverlauf assoziiert (46). In einer über 7000 Frauen umfassenden Studie wurde kein statistisch signifikanter Schutz vor Reinfektionen mit dem gleichen HPV-Typ beobachtet, wenn seropositive mit seronegativen Frauen verglichen wurden (47). Offenbar ist die natürliche Seropositivität im Menschen nicht sicher protektiv.

HPV-Infektionen werden von immunkompetenten Personen hauptsächlich über die zelluläre Immunantwort ausgeheilt. Im Blut gesunder Personen wurden signifikant häufiger spezifische CD4<sup>+</sup> Gedächtniszellen nachgewiesen, die gegen die HPV16-Proteine E2 und E6 gerichtet sind, als bei Erkrankten (48). Die Präsenz einer T-Zellreaktion gegen E6 korreliert mit der Clearance der Infektion und ist somit ein Schutz vor Persistenz der Infektion (49). Dagegen findet man E7- oder L1-spezifische CD4<sup>+</sup> Gedächtniszellen in Gesunden und Kranken gleichermaßen (50). HPV16-spezifische zytotoxische CD8<sup>+</sup> Lymphozyten werden auch im Blut von Zervixkarzinompatientinnen nachgewiesen (51). Allerdings lassen sich Prognosen bezüglich des Krankheitsverlaufes anhand von natürlichen T- oder B-Zellantworten nur schwer treffen.

Da die mediane Persistenz von HPV-Infektionen und induzierten Dysplasien 8 bis 18 Monate beträgt (52), muss das Virus sehr wirkungsvolle Mechanismen entwickelt haben, um der Eliminierung durch das adaptive Immunsystem zu entgehen.

Für diesen Immunevasion genannten Mechanismus gibt es mehrere Erklärungen:

- 1) HPV-Infektionen verlaufen streng intraepithelial ohne Virämie (Abbildung 2).
- 2) Das infizierte Epithel ist nur im dermalen Bereich durchblutet und der Infektionsherd für das adaptive Immunsystem kaum zugänglich.
- 3) Die Freisetzung erfolgt passiv nach natürlicher Apoptose der Epithelzelle, wodurch unphysiologischer Zelltod, Entzündungsreaktionen und Gefahrensignale für das Immunsystem vermieden werden.
- 4) Die Antigen-präsentierenden Langerhanszellen in Epithelien werden im Gegensatz zu den myeloiden dendritischen Zellen des Blutgefäßsystems durch die Aufnahme von HP-Viruspartikeln nicht aktiviert (53).
- 5) Interferonausschüttungen werden durch HR-HPV Onkoproteine E6 und E7 unterdrückt (54, 55).
- 6) Die Antigenprozessierung und -präsentation wird durch Interaktion des viralen Onkoproteins E7 mit TAP-1 (engl.: transport associated with antigen processing) gehemmt (29, 56) (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Mechanismen der Immunevasion, induziert durch eine HPV-Infektion**

(Abkürzungen: MHC: Major histocompatibility complex, ER: endoplasmatisches Retikulum, TAP: transport associated protein) Modifiziert nach "Prophylactic and therapeutic vaccines against human papilloma virus" (41).

Die immunologischen Abwehrmechanismen im Rahmen der prophylaktischen HPV-Impfung sind hauptsächlich Virus-neutralisierende Antikörper, also humorale Immunantworten. Zelluläre Immunantworten steuern einerseits als CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen die Aktivierung von B-Zellen und damit die Antikörperproduktion, andererseits unterstützen sie die Aktivierung und Proliferation von zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die Virus-infizierte Epithelzellen lysieren können und die eine Bedeutung bei therapeutischen Strategien haben.

### **1.3 Immuntherapie von KH-PECA**

Um eine wissenschaftliche Grundlage für immuntherapeutische Ansätze zu schaffen, ist die Untersuchung von Interaktionen zwischen Tumoren und dem Immunsystem Gegenstand vieler Studien. Es konnte gezeigt werden, dass eine natürlich induzierte T-Zellantwort gegen Tumorzellen existiert und dass diese T-Zellen Tumorzellen erkennen und abtöten können.

Naturgemäß werden viele Fälle, in denen eine solche Reaktion erfolgreich vorgekommen sein könnte, unentdeckt bleiben, da in diesen Fällen nie ein klinisch sichtbarer Tumor gewachsen ist. Diejenigen Fälle, die klinisch auffällig werden, zeigen eine andere Konstellation. Auf der einen Seite kann eine natürliche Immunantwort gegen den Tumor nachgewiesen werden, auf der anderen Seite werden immunsuppressive Einflüsse des Tumors auf das Immunsystem beobachtet. Eine Tumorprogression ist deshalb immer mit einer selektiven funktionellen Einschränkung von Zellen des Immunsystems verbunden.

Die Identifizierung und Charakterisierung einer Anzahl von humanen Tumorantigenen (TA) mit möglicher Anwendbarkeit bei Immuntherapien und für ein Immunmonitoring (57), verbunden mit hohen Erwartungen aus erfolgreichen In-vitro-Experimenten und Tierversuchen, hat zu einer schnellen Umsetzung experimenteller Ergebnisse in klinische Studien geführt. Auf diese Weise wurde eine große Anzahl von Patienten mit unterschiedlichen Typen von malignen Neoplasien in Studien zur Testung von T-Zell-basierten Immuntherapien eingeschlossen. In vielen dieser Studien wurden bei den Patienten erfolgreich TA-spezifische T-Zellantworten induziert und im Verlauf nachgewiesen. Unglücklicherweise korrelierten diese Ergebnisse jedoch nicht mit einem klinischen Ansprechen der Tumore (58). Wirklich auf eine Immuntherapie zurückzuführende klinische Erfolge sind bisher noch die Ausnahme. Diese Diskrepanz hat zu Untersuchungen geführt, die zum Ziel haben, eine Erklärung dafür zu finden, warum vorhandene und im Rahmen von Immuntherapien erfolgreich vermehrte TA-spezifische T-Zellen nicht ausreichend antitumoral wirksam waren, um das Tumorwachstum zu kontrollieren. Es konnten unterschiedliche lokale und systemische Ursachen für die mangelnde zytotoxische Funktion der T-Zellen aufgedeckt werden (59, 60).

Derzeit wird davon ausgegangen, dass für eine erfolgreiche Entwicklung von Strategien zur Prävention oder Umkehrung von negativen tumorinduzierten Effekten auf das Immunsystem folgende Untersuchungen wichtig sind: a) Quantifizierung und Charakterisierung von natürlich auftretenden Immunzellen, die für antitumorale Therapien verwendet werden könnten, und b) die Untersuchung von direkten und indirekten Mechanismen, die für die Dysfunktion und den Tod von Immunzellen bei KH-PECA verantwortlich sind (61, 62).

Solche Studien haben zu einem besseren Verständnis der Interaktion des Immunsystems mit KH-PECA geführt. Es bleibt zu hoffen, dass Erkenntnisse über sogenannte Tumore-immunescape-Mechanismen dazu führen, dass durch eine Modulation des Immunsystems eine effektive Antitumor-T-Zellantwort induziert werden kann.

Zukünftig ist zu erwarten, dass bei adjuvanten Therapien die Tumörätiologie berücksichtigt wird und dass diese gemäß der Tumorgenese optimiert werden. Bei der Behandlung immunogener Tumore könnte zukünftig die Induktion oder Verstärkung der Funktion von spezifischen zytotoxischen T-Zellen (ZTL) eine Rolle in der primären Therapie oder als Teil einer adjuvanten Therapiestrategie spielen. Ob dies auch zur besseren Prognose von Patienten mit HPV-assoziierten KH-PECA gegenüber solchen mit noxeninduzierten Karzinomen beiträgt, ist zurzeit noch unklar (32, 63).

### **1.3.1 T-Zell-basierte Immuntherapie**

Die zelluläre Immunantwort beruht auf unterschiedlichen Zelltypen. Hierzu gehören insbesondere natürliche Killerzellen und ZTL. Beide Zelltypen sind in der Lage, virusinfizierte oder virustransformierte Zellen zu erkennen. Derzeit wird davon ausgegangen, dass ZTL, aufgrund ihrer speziellen Fähigkeit, Peptidantigene von viralen oder mutierten Genprodukten zu erkennen, die wichtigste Verteidigung des Körpers gegen Tumorzellen und virusinfizierte Zellen sind. Ziel therapeutischer Impfungen ist es daher, ZTL zu aktivieren und in ihrer Anzahl zu vermehren, woraus eine effektive Antitumorantwort resultiert.

#### **1.3.1.1 Aktueller Stand therapeutischer HPV-Impfungen**

Therapeutische Impfungen richten sich gegen Antigene in der infizierten Zelle. Im Fall von HPV-induzierten Neoplasien zielen die meisten Impfstrategien auf die viralen Onkogene E6 und E7 ab, da eine permanente Expression dieser Proteine für die Tumorzellen lebensnotwendig ist (28). Unterschiedliche therapeutische Impfstrategien wurden in den letzten 15 Jahren im Rahmen von klinischen Studien untersucht. Die Hauptangriffspunkte waren hierbei das E2-, E5-, E6- und/oder das E7-Protein (64). Diese Impfstoffe haben das gemeinsame Ziel, die zelluläre Immunantwort gegen Zellen zu aktivieren, die HPV-Proteine prozessieren und an der Zelloberfläche präsentieren (Abbildung 3).

Bei neueren Impfstudien lässt sich ein Wechsel in der Wahl der für die Impfungen verwendeten Antigene feststellen. Initial wurde vor allem das HPV-E7-Protein als ideales Zielantigen angesehen. Kürzlich hat sich jedoch gezeigt, dass die größeren HPV-E2 und -E6-

Proteine immunogener sind und damit die effektiveren Ziele für eine Impfung darstellen (49, 65, 66). Neue immunologische Erkenntnisse, wie die Entdeckung und Charakterisierung von immunsuppressiven regulatorischen T-Zellen (67, 68), haben die immuntherapeutischen Strategien beeinflusst (59, 69-71). Aufgrund der systemischen tumorinduzierten (72-74) und der immunsupprimierten Tumormikroumgebung (59) wird den Impfungen eine lokale Behandlung mit topischen immunstimulatorischen Substanzen und proinflammatorischen Immunmediatoren wie z.B. Interferon (IF) in der Hoffnung hinzugefügt, um eine bessere lokale Stimulation der systemischen Immunantwort zu bewirken (55).

### **1.3.1.2 Zukünftige Entwicklungen therapeutischer HPV-Vakzine**

Die laufenden Bemühungen, therapeutische HPV-Vakzine zu entwickeln und zu testen, werden unser Wissen im Bereich der Tumormimmuntherapie vorantreiben. Die Verwendung von HPV-induzierten Erkrankungen für sogenannte „proof of concept“-Studien hat den Vorteil, dass definierte Antigene, die natürliche und induzierte Immunantwort sowie Mechanismen der Immunevasion untersucht werden können. Es bleibt abzuwarten, ob die bedeutenden Fortschritte auf dem Gebiet der prophylaktischen HPV-Impfungen mit Gardasil und Cervarix zur Vorbeugung des Zervixkarzinoms, das durch die gleichen HPV-Subtypen verursacht wird wie HPV-assoziiertes KH-PECA, auch bei dieser prophylaktische Wirkung zeigen. Auch wenn dies der Fall wäre, sollte dieser Umstand nicht dahin gehend fehlleiten, dass therapeutische Impfstrategien obsolet wären. Heute bestehende persistierende Infektionen können in den nächsten Jahrzehnten zu Krebsfällen führen. Aufgrund der großen Anzahl infizierter Personen sind trotz prophylaktischer Immunisierung Durchbruchinfektionen zu erwarten. Die Heterogenität und Vielzahl der Dysplasien induzierenden HPV wird noch nicht vollständig durch die prophylaktische Impfung abgedeckt, da prophylaktische Impfstoffe aktuell nur für zwei von derzeit ca. 16 HR-HPV-Typen zur Verfügung stehen. Hinzu kommt eine Vielzahl von LR-HPV, von denen auch nur zwei Typen bisher impfpräventabel sind. Für Patienten in Ländern ohne die nötigen finanziellen und logistischen Ressourcen für die prophylaktische Impfung hätte die therapeutische Impfung einen immensen Stellenwert.

Idealerweise wären zukünftige Vakzine, für einen optimalen Schutz vor Infektion und Karzinom, eine Kombination aus therapeutischer und prophylaktischer Impfung. Positive Konsequenzen dieser Strategien wären eine geringere Inzidenz progredienter Läsionen, weniger invasive Eingriffe und ein selteneres Auftreten von Rezidiven.

### **1.3.2 Rolle von p53 in der Ätiologie von KH-PECA und seine Bedeutung für die Immuntherapie**

Immuntherapeutische Ansätze mit p53 als Zielmolekül sind ein derzeit intensiv beforschter wissenschaftlicher Bereich. P53 wurde ursprünglich als Transformationsantigen in chemisch induzierten Sarkomen und anderen transformierten Mauszellen identifiziert (75). Die nachfolgende Klassifikation von p53 als Tumorsuppressorgenprodukt, welches in humanen Tumoren häufig verändert ist, machte es zu einem attraktiven Kandidaten für die Entwicklung von Antitumorvakzinen (76).

#### **1.3.2.1 P53 als Quelle für Tumorantigene**

Molekulare Veränderungen von Zellen, die zu einem Funktionsverlust von p53 führen (9, 10), charakterisieren die meisten spontan auftretenden bösartigen humanen Tumore (76, 77). Das TP53-Tumorsuppressorgen auf Chromosom 17p13.1 kodiert das p53 Protein, das eine Schlüsselfunktion für viele zelluläre Vorgänge einnimmt. Die wichtigsten sind die Regulation des Zellzyklus und des Glukosemetabolismus in Tumorzellen, DNA-Reparatur, Apoptose und Seneszenz. Auch bei KH-PCEA findet man Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 als häufigste genetische Veränderung (8). Das mutierte, in aller Regel inaktivierte Genprodukt von p53 stellt einen möglichen Angriffspunkt für antitumorale Vakzinierungsversuche dar (78, 79). Mutationen des p53 führen in vielen Fällen zu einer Anreicherung des veränderten Proteins in der Zelle. Hierdurch kommt es zu einer verstärkten Präsentation von p53-Peptidfragmenten auf MHC-Klasse-I- und -II-Molekülen an der Zelloberfläche (78, 79). Diese können von T-Lymphozyten erkannt werden, wodurch eine MHC-Klasse-I-restringierte Immunantwort von T-Zellen gegenüber p53-Peptiden eingeleitet wird. Bei den präsentierten p53-Peptiden kann es sich sowohl um solche mit mutierter als auch mit nichtmutierter, sog. Wildtypsequenz handeln. Eine Immuntherapie auf der Basis mutierter p53-Peptide würde eine individuelle Untersuchung und Berücksichtigung der im jeweiligen Patienten vorliegenden p53-Mutation erfordern und wäre somit patientenspezifisch und arbeitsintensiv.

Alternativ kann anstelle mutierter p53-Peptide der Einsatz von Wildtyp-(Wt)-p53-Peptiden für Tumorstoffe sinnvoll sein: Da es sich bei p53-Mutationen in der Regel um Punktmutationen handelt, weisen die übrigen Abschnitte des aberranten p53-Proteins Wt-Eigenschaften auf. Diese nichtmutierten Wt-p53-Abschnitte wären bei allen Patienten identisch und könnten somit als Quelle für TA dienen. Da p53 in normalen Zellen nicht exprimiert ist, ist eine unselektive Autoreaktivität unwahrscheinlich. Aus dem gleichen Grund besteht auch keine Toleranz, da die natürliche Expression von p53 so gering ist, dass p53-

spezifische T-Zellen bei der Ausbildung des Immunsystems der negativen Selektion im Thymus nicht zum Opfer gefallen sind. Deshalb hätten auch Wt-p53-Vakzine ein breites und spezifisches Anwendungsspektrum gegen eine Vielzahl von bösartigen Tumoren. Dieser Umstand macht die besondere Attraktivität dieses TAs aus.

Im Rahmen der p53-Überexpression stehen ebenfalls Wt-p53-Peptide für die Generierung einer T-Zell-Immunantwort zur Verfügung (78-81). Voraussetzung für eine MHC-Klasse-I- und -II-restringierte Antigenerkennung durch T-Zellen ist die Identifikation derjenigen Wt-p53-Sequenzen, die eine Bindung mit diesen Molekülen eingehen. Eine Anzahl solcher p53-Peptidfragmente ist bekannt und wurde von uns und anderen auf ihre Immunogenität getestet (59, 60, 82-90). Die Induktion einer Anti-p53-T-Zell-Immunantwort erfordert die Kooperation mit antigenpräsentierenden Zellen. Hierzu eignen sich in besonderer Weise sog. „dendritische Zellen“. Sie können wegen ihrer Expression von MHC-Molekülen und der Expression von kostimulatorischen Molekülen in besonderer Weise die Antigenpräsentation und somit T-Zell-Stimulation fördern (91). Tumorassoziierte Peptide können direkt an MHC-Klasse-I-Moleküle dendritischer Zellen gekoppelt werden und so Epitope der T-Zell-Abwehr präsentieren (92). Im Mausmodell gelang uns und anderen hierdurch bereits die effektive Immunisierung mit Wt-p53-Peptid, d. h., es konnte eine zytotoxische T-Zell-Antwort gegen verschiedene p53-überexprimierende Sarkome induziert werden (93-96).

#### **1.4 Tumorstammzellen**

Die Charakterisierung der Tumorstammzell- (TSZ-) subpopulation inklusive ihres natürlichen Verhaltens, der Rolle bei der Metastasierung und bei Rezidiven sowie die Erforschung ihres Verhaltens gegenüber Therapie ist seit einiger Zeit in den Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen gerückt. Die wichtigsten TSZ-Marker wurden kürzlich von uns in einem Übersichtsartikel zusammengefasst (97). Einen kurzen Überblick hierzu gibt Tabelle 1. Die Entwicklung der TSZ-Theorie (98) führte dazu, dass aktuelle therapeutische Konzepte hinterfragt werden, und löste eine Suche nach Therapeutika aus, die TSZ gezielt abtöten können und so in Kombination mit anderen Therapien klinische Synergien zeigen.

**Tabelle 1: Wichtige Marker von Tumorstammzellen**

<b>TSZ-marker</b>	<b>Vorkommen</b>	<b>Physiologische Rolle</b>	<b>Referenz</b>
CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>-</sup> (ALDH1 <sup>+</sup> )	KH-PECA, diverse Karzinome	CD44: An der Zelloberfläche exprimiertes Glykoprotein. Beeinflusst Zell-Zellinteraktionen, Zell-Matrix-Interaktion sowie Migration und Adhäsion von Zellen.	(99)
ALDH1 <sup>+</sup>	KH-PECA, Brustkrebs	ALDH1: Mitglied der ubiquitär auftretenden zytosolischen Aldehyddehydrogenase-(ALDH-) Familie. ALDH sind in Entgiftungsprozesse involviert. ALDH1 kann Retinol in Retinolsäure umwandeln. Retinolsäure beeinflusst Proliferation, Differenzierung und Überleben von Zellen.	(99, 100)
Snail	KH-PECA u.a.	Während der EMT hochreguliert. Beeinflusst die COX-2-abhängige E-Cadherin-Expression.	(100)
Twist	KH-PECA u.a.	Beeinflusst als Transkriptionsfaktor die EMT während der Metastasierung unterschiedlicher Karzinome. Regulierung von Genen, die wichtig für Differenzierung, Adhäsion und Proliferation von Zellen sind.	(101)

Modifiziert nach „Stem cells in head and squamous cell carcinoma“ (97) und „Biology and relevance of stem cells in squamous head and neck cancer: latest insights and review of literature“ (102).

#### **1.4.1 Definition von TSZ**

TSZ werden gleichzeitig als Ergebnis der Onkogenese und als Beginn der Bildung von Tumoren und Metastasen angesehen. Gemäß des TSZ-Modells wird davon ausgegangen, dass die phänotypische und zelluläre Vielfalt eines Tumors einer hierarchischen Organisation, mit TSZ an erster Stelle, unterliegt (103, 104). Demzufolge könnte theoretisch eine einzige TSZ den Tumor, aus dem sie stammt, komplett regenerieren. Transplantationsstudien haben gezeigt, dass hierzu, in Abhängigkeit des verwendeten Markers, 20 bis 10<sup>7</sup> Zellen nötig sind (99, 103, 105). Das Konzept für das TSZ-Modell wurde in Analogie zu dem der Blutbildung

entwickelt, bei dem sich das Blut aus einem Pool von hämatopoetischen Stammzellen regeneriert (106).

Eine wichtige Bestätigung für das TSZ-Modell war die Beobachtung, dass ein selektives Abtöten von TSZ das Tumorwachstum stoppen kann (107). Wichtige Eigenschaften der TSZ sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

**Tabelle 2: Eigenschaften von TSZ**

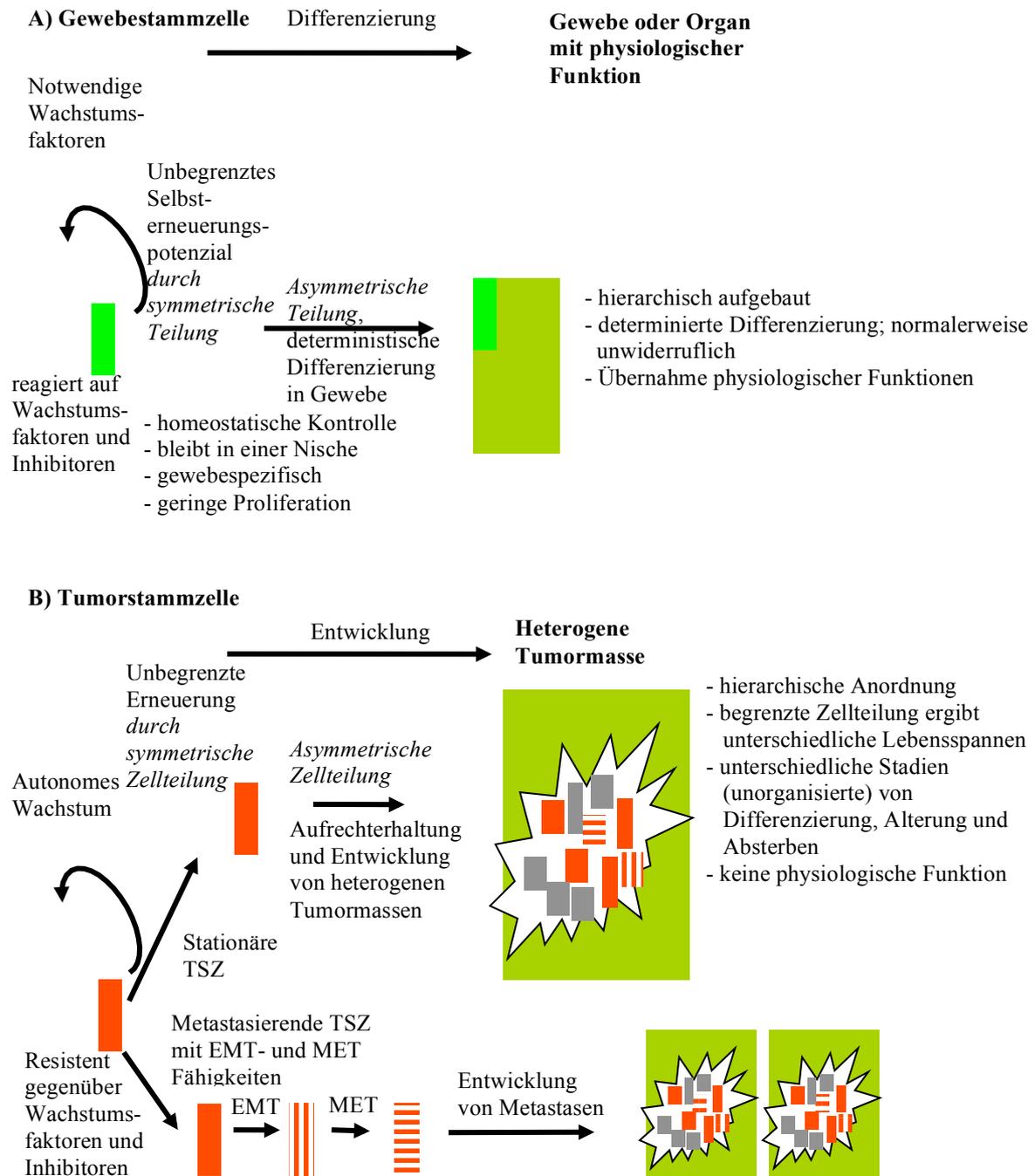
TSZ initiieren bösartige Tumore und fördern neoplastische Proliferation (108).
TSZ können sich durch symmetrische Zellteilungen vervielfältigen (109).
Nach Transplantation in einen geeigneten Wirt regenerieren TSZ den heterogenen Tumorphänotyp des Originaltumors durch asymmetrische Zellteilungen (109).
TSZ sind langsam proliferierende Zellen und demzufolge relativ resistent gegenüber Bestrahlung und Chemotherapie (110).
TSZ exprimieren andere Biomarker als die Haupttumorzellpopulation. Diese können dazu verwendet werden, sie zu definieren und zu isolieren (111).

Modifiziert nach „Stem cells in head and squamous cell carcinoma“ (97) und „Biology and relevance of stem cells in squamous head and neck cancer: latest insights and review of literature“ (102).

Gemäß der TST-Hypothese besteht der Tumor aus wenigstens zwei Subpopulationen: einer kleineren TSZ-Population und der Haupttumorzellpopulation. Die Haupttumorzellpopulation besteht aus Zellen, die aus den TSZ hervorgegangen sind, jedoch nicht mehr die Fähigkeit zur kompletten Selbstregeneration besitzen. Im Gegensatz hierzu stellen die TSZ die kleinere Subpopulation von Tumorzellen mit Selbsterneuerungspotenzial, welches durch symmetrische Zellteilung realisiert wird. Tumorspezifische Mutationen werden hierbei weitergegeben (Abbildung 4). TSZ sind weitgehend autonom gegenüber Einflüssen durch Wachstumsfaktoren und reagieren deshalb weniger auf externe Regulation, was auch ihre therapeutische Beeinflussung einschränkt. Durch asymmetrische (nicht deterministische) Zellteilungen bilden sich differenzierte, die Haupttumormasse bildende Tumorzellen. Somit entstehen heterogene Tumore, die keine physiologische Funktion mehr besitzen.

Einige Eigenschaften der TSZ ähneln denen von normalen Gewebestammzellen (112). Normale Gewebestammzellen haben auch die Eigenschaft, undifferenziert und wiederholt teilungsfähig zu sein. Das Spektrum reicht von der omnipotenten befruchteten Eizelle, aus der ein Organismus hervorgehen kann, bis zu pluripotenten ortsständigen Stammzellen, die z.B.

bestimmte Gewebe oder Organe regenerieren können. Durch ihr Selbsterneuerungspotenzial im Rahmen symmetrischer Teilungen entstehen identische Tochterzellen. Diese Teilung benötigt im Gegensatz zu TSZ Wachstumsfaktoren und ist somit einer externen Regulation unterworfen. Gewebestammzellen besitzen auch die Eigenschaft, durch asymmetrische deterministische Teilungen differenzierte Tochterzellen zu entwickeln, die in ihrer Gesamtheit Gewebe oder Organe mit komplexen physiologischen Funktionen bilden. Diese unterliegen der komplexen physiologischen Regulation des Organismus. Tumore haben sich dieser Regulation weitgehend entzogen.



**Abbildung 4: Vergleich der Eigenschaften von Gewebestammzellen (A) mit Tumorstammzellen (B)**

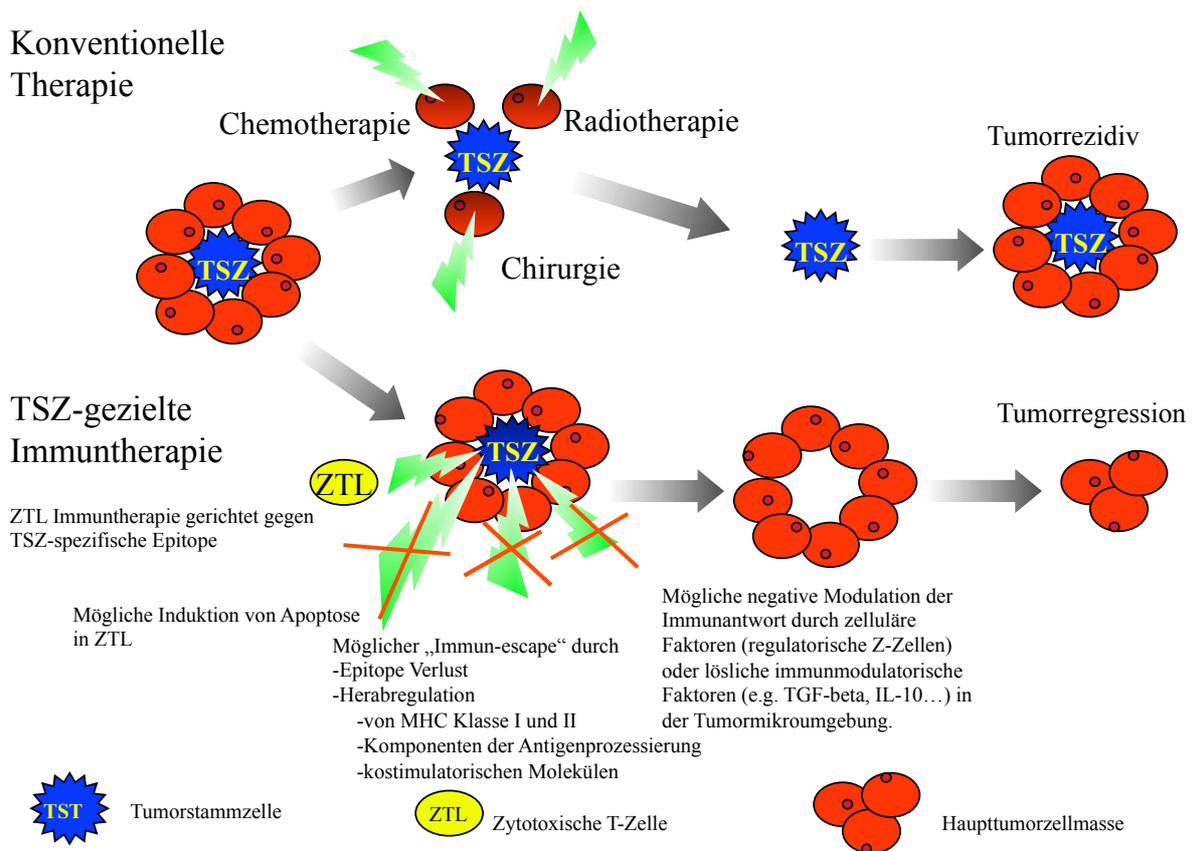
*Modifiziert nach „Stem cells in head and squamous cell carcinoma“ (97) und „Biology and relevance of stem cells in squamous head and neck cancer: latest insights and review of literature“ (102).*

### **1.4.2 TSZ und Immuntherapie**

Aufgrund ihrer spezifischen Eigenschaften besteht ein großes Interesse daran, gezielte Therapien gegen TSZ zu entwickeln. Nach der Elimination von TSZ wäre der Tumor seines Regenerationspools beraubt. Eine Regression des Tumors wäre die Folge. Diese Vorstellungen werden durch Beobachtungen im Tiermodell unterstützt. Während eine Transplantation von TSZ zu nachhaltigem Tumorwachstum führte, war nach einer Transplantation von Nicht-TSZ kein nachhaltiges Tumorwachstum zu beobachten.

Die Entwicklung gezielter TSZ-Therapien muss drei Hürden überwinden: die im Vergleich zur Haupttumorpopulation relativ höhere Chemo- und Radioresistenz sowie bei der Immuntherapie Immun-escape-Mechanismen.

Da Radio- und Chemotherapien im Hinblick auf maximalen Effekt und noch tolerable toxische Effekte weitgehend ausgereizt erscheinen, würde die erfolgreiche Entwicklung von Antitumor-T-Zell-Vakzinen eine attraktive Alternative bzw. Ergänzung gängiger Therapien darstellen (Abbildung 5). Der Erfolg solcher Ansätze ist abhängig von der Verfügbarkeit geeigneter Zielstrukturen auf den Tumorstammzellen sowie einer erfolgreichen Modulation des Immunsystems, um eine durch den Tumor ausgelöste Immunsuppression umzukehren.



**Abbildung 5: Vergleich der Effekte einer fehlgeschlagenen konventionellen Therapie mit dem Ergebnis einer hypothetischen TSZ-gerichteten Immuntherapie**

*Derzeit angewendete konventionelle Therapien haben ihren größten Effekt bei der Haupttumormasse, die weniger therapieresistent ist als TSZ. Dies führt initial zu einer deutlichen Verkleinerung der Tumormasse, doch vielfach wächst der Tumor aus residuellen TSZ nach. Diesen Effekt könnte eine Immuntherapie, die gezielt TSZ abtötet, durchbrechen. Der Verlust der TSZ, aus dem sich der Tumor regeneriert, würde zur Regression des Tumors führen. Modifiziert nach „T-cell Tumor Interaction Directs the Development of Immunotherapies in Head and Neck Cancer“ (7).*

## **1.5 Fragestellung**

Im Zuge der vorgestellten Arbeit wurden folgende Fragestellungen verfolgt, um eine Grundlage für zielgerichtete immunologische Therapien von KH-PECA zu legen:

- Wird durch Selbst- und HPV-Antigene, präsentiert an der Zelloberfläche von KH-PECA, eine gegen den Tumor wirksame T-Zellantwort hervorgerufen?
- Existieren in KH-PECA Zellpopulationen mit TSZ-Eigenschaften, und welche Eigenschaften haben diese Zellen?
- Ist eine T-Zellantwort gerichtet gegen TSZ in Lymphozytenpopulationen nachweisbar, die von KH-PECA-Patienten isoliert wurden?

## 2. Eigene Forschung

Im Folgenden werden meine eigenen publizierten oder im Druck befindlichen wissenschaftlichen Arbeiten thematisch geordnet dargestellt. Der Inhalt jedes Manuskripts wurde auf Deutsch zusammengefasst und in einen Gesamtzusammenhang gestellt. Die Publikationen sind vollständig im Abschnitt „Originalarbeiten“ zu finden.

### 2.1 Immunogenität und Immunsuppression von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs

#### **Publikation 1: Immune responses to p53 in patients with cancer: enrichment in tetramer<sup>+</sup> p53 peptide-specific T cells and regulatory T cells at tumor sites**

Andreas E. Albers, Robert L. Ferris, Grace G. Kim, Kazuaki Chikamatsu, Albert B. DeLeo and Theresa L. Whiteside

Cancer Immunology Immunotherapy 2005

Ausgangspunkt der Untersuchungen war, ob in Patienten mit KH-PEKA eine natürliche TA-spezifische Immunantwort vorliegt und ob es gleichzeitig einen Anhalt für eine Immunsuppression durch den Tumor gibt. Diese würde erklären, warum trotz vorhandener Antitumorimmunantwort der Tumor im Patienten verbleibt.

Hierzu wurde zum einen die Häufigkeit von natürlich in der peripheren Zirkulation und im Tumor von KH-PECA-Patienten vorkommenden wt-p53<sub>264-272</sub>- oder wt-p53<sub>149-157</sub>-TA-spezifischen T-Zellen und zum anderen die Häufigkeit von regulatorischen T-Zellen im Tumor dieser Patienten untersucht. Die Anzahl von CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> TA-spezifischen T-Zellen war signifikant höher in tumorinfiltrierenden T-Zellen (TIL) als in autologen peripheren Blutmonozyten. Gleichzeitig war auch der Anteil von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen in TIL erhöht. Die Subtypisierung der TIL ergab eine Anreicherung von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> und CTLA-4<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen. Funktionell zeigten regulatorische T-Zellen im Vergleich zu autologen und von Kontrollpatienten stammenden peripheren Blutmonozyten nach Ex-vivo-Stimulation eine nur geringe IF- $\gamma$ -Produktion.

Anti-wt-p53-TA-spezifische T-Zellen und regulatorische T-Zellen reichern sich in KH-PECA-Patienten im Tumor an. Interessanterweise reagierten diese Zellen relativ gering auf Aktivierung. Unsere folgenden Untersuchungen über die Wirkung von regulatorischen T-Zellen in Patienten mit KH-PECA unterstützen die Erkenntnisse (70).

Diese Beobachtung erlaubt die Hypothese, dass eine Ansammlung von regulatorischen T-Zellen im Tumor und der peripheren Zirkulation eine negative Wirkung auf die Funktion der TA-spezifischen Effektor-T-Zellen ausübt.

**Publikation 2: Spontaneous apoptosis of tumor-specific tetramer<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in the peripheral circulation of patients with head and neck cancer**

Andreas E. Albers, Carsten Schaefer, Carmen Visus, William Gooding, Albert B. DeLeo and Theresa L. Whiteside

Head & Neck 2009

Im nächsten Schritt wurde eine weitere Charakterisierung der TA-spezifischen T-Zellen angestrebt. Ziel war es, zu untersuchen, ob ein direkter immunsuppressiver Effekt mediiert durch Tumorzellen nachweisbar ist. Ein Immun-escape-Mechanismus des Tumors könnte sein, Apoptose bei zirkulierenden T-Zellen zu induzieren. Um einen einzig gegen TA-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen gerichteten Effekt zu messen, wurde die Apoptoserate von peripher zirkulierenden wt-p53<sub>264-272</sub><sup>-</sup> und wt-p53<sub>149-157</sub>-TA-spezifischen T-Zellen von Patienten mit KH-PECA mit der von virusepitopspezifischen T-Zellen der gleichen Patienten verglichen.

Es konnte demonstriert werden, dass ein signifikant höherer Anteil von bei der Spezifitäten von TA-spezifischen T-Zellen in Apoptose geht als Virusepitop-spezifische T-Zellen des selben Patienten. Die präferenzielle Apoptose von TA-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen weist erstmals TA-spezifische immunsuppressive Effekte nach, die zur Immunevasion von KH-PECA beitragen und den bei diesen Patienten beobachteten erhöhten Lymphozytenumsatz erklären könnten.

## **2.2 Immunogenität von HPV-assoziierten Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs**

### **Publikation 3: Antitumor activity of human papillomavirus type 16 E7-specific T cells against virally infected squamous cell carcinoma of the head and neck**

Andreas E. Albers, Koji Abe, Jennifer Hunt, Jun Wang, Andres Lopez-Albaitero, Carsten Schaefer, William Gooding, Theresa L. Whiteside, Soldano Ferrone, Albert DeLeo and Robert L. Ferris

Cancer Research 2005

HPV-assoziierte KH-PECA erscheinen geeignet, um T-Zellvakzine gegen HPV als Zielstruktur zu entwickeln. Deshalb sollte erstmals untersucht werden, ob in Patienten mit HPV-assoziierten KH-PECA Anti-HPV-T-Zellen vorkommen, welche im Rahmen einer Impfung vermehrt werden könnten. HPV-kodierte onkogene Proteine wie E7 sind vielversprechende tumorspezifische Antigene und obligatorisch für das Tumorwachstum. Ein weiteres Ziel der Studie war die phänotypische und funktionelle Untersuchung dieser Zellen. Gleichzeitig sollte untersucht werden, ob die Tumorzellen Anzeichen von Immun-escape zeigen. Konkret wurde die Häufigkeit von HPV16-E7<sub>11-20</sub>- und -E7<sub>86-93</sub>-TA-spezifischen T-Zellen bestimmt. Zeitgleich wurde bei diesen Zellen untersucht, ob sie Merkmale von terminal differenzierten Effektorzellen aufweisen. Eine solche T-Zellpopulation wäre essenziell, um Tumorzellen zu lysieren. Dies wurde in vitro getestet. Erst nach Behandlung der Tumorzellen mit IFN- $\gamma$  wurden die Tumorzellen erkannt. Dies löste die weitere Untersuchung der Tumorzellen nach den zugrunde liegenden Mechanismen aus. Im Folgenden konnte eine verminderte Expression von Komponenten der MHC-Klasse-I-Antigenprozessierung nachgewiesen werden, welche durch IFN- $\gamma$  regulierbar war. Immunhistochemische Untersuchungen an Tumorgewebe konnten ebenfalls eine Herabregulierung dieser Proteine nachweisen. Die Ergebnisse geben zum einen Hinweise auf die potenziellen Möglichkeiten von T-Zellvakzinen mit HPV als Antigenquelle, zum anderen wird klar, dass die Immunogenität der Tumorzellen für die Wirksamkeit von Vakzinen verbessert werden muss.

## 2.3 Charakterisierung von Tumorstammzellen

### **Publikation 4: Evidence for epithelial-mesenchymal transition in cancer stem cells of head and neck squamous cell carcinoma**

Chao Chen, Yan Wei, Michael Hummel, Thomas K. Hoffmann, Manfred Gross, Andreas M. Kaufmann und Andreas E. Albers

PLoS ONE 2011

Die Identifikation und Charakterisierung von TSZ in KH-PECA gewährt Einsichten in die möglichen Gründe für die schlechte Prognose dieser Erkrankung. TSZ sind eine kleine Subpopulation der Tumorzellen, die für Tumorwachstum, Therapieresistenz und Metastasierung verantwortlich gemacht wird. Als Voraussetzung für eine erfolgreiche Absiedelung von Tochtergeschwülsten gilt die Fähigkeit zur epithelial-mesenchymalen Transition (EMT). Die grundlegende Fähigkeit von TSZ zur EMT, isoliert aus diversen KH-PECA-Zelllinien wurde im Rahmen der Studie untersucht. Hierzu wurden TSZ funktionell und phänotypisch im Hinblick auf EMT- und TSZ-Eigenschaften untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sich TSZ von KH-PECA mit Hilfe eines dreidimensionalen Zellkultursystems (sog. Spheroidmodell) vermehren und anreichern lassen. Alle untersuchten Zelllinien bildeten selbsterneuernde Spheroide, die seriell passagiert werden konnten. Die ALDH1-Expression war in Spheroide gegenüber den parentalen Monolayerzellen erhöht. Die ALDH1-positiven Zellen zeigten eine erhöhte Fähigkeit zur Koloniebildung. Im Matrigel-Invasionsassay zeigten Spheroidzellen eine erhöhte Invasivität bei gleichzeitig erhöhter Expression von sog. „Stemness-related genes“ wie Sox2, Nanog und Oct3/4. Twist, ein wichtiger EMT-Marker, war konstant in Spheroide aller getesteten Zelllinien erhöht, Snail, ebenso ein EMT-Marker, in einigen. Die Zellzyklusanalyse von Spheroidzellen ergab, verglichen mit den parentalen Zelllinien, einen größeren Anteil von Zellen in der G0-Phase. Diese verringerte Proliferationsaktivität mag zu der beobachteten Resistenz gegenüber Chemo- und Strahlenbehandlung beitragen. Weiterhin zeigten Spheroidzellen eine erhöhte Expression von  $\alpha$ -smooth muscle actin und Vimentin, also Proteinen, die wichtig für die Zellmotilität sind. Zusätzlich zeigten diese Zellen eine verminderte E-Cadherin-Expression als Ausdruck einer verringerten Adhäsion.

**Publikation 5: ALDH1-positive cancer stem-like cells are enriched in nodal metastases of oropharyngeal squamous cell carcinoma independent of HPV status**

Xu Qian, Steffen Wagner, Chenming Ma, Jens P. Klussmann, Michael Hummel, Andreas M. Kaufmann und Andreas E. Albers

Oncology Reports, 2013

Aufbauend auf den aus Publikation 4 gewonnenen Erkenntnissen wurde angenommen, dass die Häufigkeit von TSZ mit dem Grad der Invasion und Metastasierung, möglicherweise auch mit der Tumorätiologie, korrelieren könnte.

Diese Zusammenhänge wurden an 40 Primärtumor-Metastasenpaaren untersucht. Hierzu wurden die vorliegenden HPV-Genotypen, die ALDH1- und p16-Expression analysiert. Es konnte eine signifikante Korrelation zwischen ALDH1-Positivität und niedrigerer Differenzierung des Primärtumors und einem höheren Metastasierungsgrad nachgewiesen werden. Im Vergleich zum Primärtumor war der Anteil von ALDH1-positiven Zellen in Metastasen erhöht. Während in HR-HPV-DNA<sup>+</sup>/p16<sup>+</sup>-Primärtumoren signifikant weniger ALDH1-positive Zellen als in HPV-negativen Tumoren gefunden wurden, konnte dieser Unterschied in Metastasen nicht nachgewiesen werden. Tumore mit starker ALDH1-Expression zeigen ein aggressiveres klinisches Verhalten, charakterisiert durch eine niedrigere Differenzierung des Tumorgewebes und einen höheren Metastasierungsgrad. Diese Daten implizieren, dass eine Subpopulation in KH-PECA im ALDH1-positiven Zellpool mit der Fähigkeit enthalten ist, die metastatische Kaskade zu komplettieren und sich nachfolgend in den Metastasen unabhängig von der ursprünglichen Tumorätiologie anzureichern.

## 2.4 Immunantworten gegen Tumorstammzellen

### **Publikation 6: Susceptibility to cytotoxic T cell lysis of cancer stem cells derived from cervical and head and neck tumor cell lines**

Tian Liao, Andreas M. Kaufmann, Xu Qian, Voramon Sangvatanakul, Chao Chen, Tina Kube, Guoyou Zhang und Andreas E. Albers

Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 2013

Im Rahmen der folgenden Studie wurden nun die Forschungsbereiche „T-Zellantworten gegen Tumorzellen“ und „TSZ“ miteinander verbunden, um zu untersuchen, inwieweit TSZ aus epithelialen Karzinomen (KH-PECA und Zervixkarzinomen) durch eine zytotoxische T-Zellantwort abgetötet werden können.

Hierzu wurde die Empfindlichkeit von aus Zelllinien subkultivierten TSZ gegenüber immunologischer Erkennung und Lyse durch alloantigen- (AA) spezifische CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen (ZTL) untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Spheroidzellen eine erhöhte Expression von ALDH1, CD54/ICAM-1 und Stammzell- und Vorläuferzellmarkern aufwiesen. Die MHC-I-Expression war bei einer von drei getesteten Zelllinien gegenüber der parentalen Zelllinie herabreguliert. Durch eine Stimulation mit IF- $\gamma$  konnte die Expression von MHC-I und ICAM-1, letzteres ist ein wichtiges Molekül für die immunologische Kostimulation von T-Zellen, heraufreguliert werden. TSZ zeigten sich gegenüber Lyse mit AA-spezifischen CD8<sup>+</sup> ZTL weniger empfindlich als die parentalen Zelllinien. Eine Vorbehandlung mit IF- $\gamma$  führte jedoch zu überproportionaler Lyse von TSZ. Eine Untersuchung der ALDH-exprimierenden Subpopulation in Spheroïden zeigte, dass die stark ALDH-exprimierende Subpopulation empfindlicher gegenüber ZTL-mediierter Lyse war als die niedrig ALDH-exprimierende Subpopulation.

### 3. Diskussion

Die Mortalität durch KH-PECA sistiert trotz Fortschritten im Bereich der chirurgischen Techniken und der adjuvanten Therapiemodalitäten auf hohem Niveau. Meist limitiert das Auftreten von lokalen und therapieresistenten Rezidiven und Metastasen die Prognose des Patienten. Da die erfolgreiche Entwicklung wirksamer KH-PECA-Vorsorgeprogramme bisher noch aussteht, liegen bei Diagnosestellung häufig bereits fortgeschrittene Tumorstadien vor. Einzig wirksam, um die Inzidenz von tabakinduzierten KH-PECA zu reduzieren, waren bisher Antiraucherkampagnen, die zu einer Reduktion des Tabakkonsums führten und so die Inzidenz von KH-PECA senkten. Um den in der Inzidenz deutlich steigenden HPV-induzierten KH-PECA vorzubeugen, wäre ein Einsatz der zur Prävention genitaler HPV-assoziiertes Neoplasien eingesetzten präventiven HPV-Impfung denkbar. Eine Wirksamkeit wäre noch zu beweisen, ist aber als sehr wahrscheinlich anzusehen. Ein flächendeckender Einsatz der Impfung, um einen individuellen Schutz sowie eine Herdenimmunität von nichtgeimpften bzw. von möglichen Impfversagern hervorzurufen, wäre für eine gute Wirksamkeit entscheidend. Bisher wird die Impfung in Deutschland weitgehend jungen Frauen verabreicht, nur 0,1% der Impfstoffe gehen an Männer. Da eine Latenz von Jahren bis Jahrzehnten zwischen der HPV-Infektion und der Entwicklung von KH-PECA zu erwarten ist, ist ein Effekt der präventiven HPV-Impfung auf KH-PECA aktuell noch nicht absehbar. Aus diesen Gründen ist es von großer Bedeutung und Aktualität, ein besseres Verständnis über die Biologie von KH-PECA zu gewinnen, um effektive alternative oder ergänzende Behandlungsmöglichkeiten zu entwickeln. Ein attraktiver Kandidat für eine solche Behandlungsmodalität ist die Krebs-Immuntherapie (7).

Im Rahmen meiner Forschungstätigkeit wurde deshalb zunächst grundlegend untersucht, ob eine erhöhte Frequenz von p53-Wildtyppepitop-spezifischen T-Zellen in KH-PECA-Patienten in der peripheren Zirkulation und in der Tumormikroumgebung besteht, die als Ausdruck einer natürlichen Immunantwort gegenüber KH-PECA gewertet werden kann (59, 82, 84) (83). Diese natürliche Immunantwort könnte durch Immuntherapien verstärkt und moduliert werden, so dass sie gegen KH-PECA wirksam wird. Die Attraktivität von p53-abgeleiteten Wildtyppeptiden für die Verwendung für Immuntherapien liegt in der Tatsache begründet, dass sich die TA von der p53-Wildtypsequenz ableiten und somit für alle Patienten mit dem gleichen HLA-Typ identisch sind. Sie sind also unabhängig von individuellen tumorspezifischen Mutationen. Da p53 in vielen unterschiedlichen Tumorentitäten überexprimiert wird, wäre im Erfolgsfall eine Wildtyp-p53-basierte Immuntherapie breit anwendbar.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bereits eine natürliche T-Zellantwort gegen p53-abgeleitete Wildtypepitope, die durch eine Immuntherapie in ihrer Effektivität verstärkt werden könnte, besteht (59, 82-84). Im Mausmodell konnten wir dies schon demonstrieren (93). Eine erhöhte Frequenz von tumorepitopspezifischen T-Zellen fand sich sowohl in der peripheren Zirkulation der Patienten als auch in der Tumormikroumgebung (59). Somit könnten diese T-Zellen im gesamten Körper Tumorzellen bekämpfen. Neben einer starken Anreicherung von tumorepitopspezifischen T-Zellen in der Tumormikroumgebung wurde zugleich eine Ansammlung von suppressiven regulatorischen T-Zellen gefunden, welche wir im Folgenden näher charakterisieren konnten (70). Die Erkenntnis über die Anwesenheit solcher Zellpopulationen löste weitere Untersuchungen mit der Fragestellung aus, unter welchen Umständen Tumorwachstum stattfindet. Die meisten Fälle, bei denen das Immunsystem erfolgreich den Tumor bekämpft hat, bleiben naturgemäß verborgen und stehen somit für wissenschaftliche Untersuchungen nicht zur Verfügung. Bei Patienten mit einem klinisch nachweisbaren Tumor wird eine andere Konstellation angetroffen. Auf der einen Seite werden antitumorale Immuneffekte gefunden, auf der anderen Seite ist es möglich durch das Tumorgewebe ausgelöste immunsuppressive Effekte nachzuweisen. Eine Progression der Tumorerkrankung ist demzufolge mit einer nachhaltigen Beeinträchtigung des Immunsystems verbunden. Für die Entwicklung von Immuntherapien ist es deshalb von großem Interesse, ob diese Effekte eher generell und unspezifisch das gesamte Immunsystem betreffen oder ob sie sich spezifisch gegen bestimmte Zellpopulationen des Immunsystems richten. Unsere und andere Arbeitsgruppen hatten eine generelle Erhöhung der Apoptoserate von T-Zellen bei KH-PECA-Patienten bereits nachgewiesen (70, 113-115). Es lag deshalb nahe, zu differenzieren, ob hiervon alle T-Zellpopulationen gleichmäßig oder ob bestimmte, insbesondere TA-spezifische T-Zellpopulationen besonders betroffen sind. Die Ergebnisse aus den darauf folgenden Untersuchungen zeigten, dass eine Suppression TA-spezifischer T-Zellen nachweisbar ist. Die Zellpopulation der p53-Wildtyp-TA-spezifischen T-Zellen zeigte im Vergleich zur Gesamtpopulation der T-Zellen sowie im Vergleich zu viruspitopspezifischen T-Zellen eine stark erhöhte Apoptoserate (60, 83).

Im Folgenden galt es zu untersuchen, ob bei Patienten mit HPV-assoziierten KH-PECA eine natürliche T-Zellantwort gegenüber HPV-spezifischen Epitopen besteht. HPV-abgeleitete Antigene sind hochspezifisch für Tumorzellen, und es ist zu erwarten, dass sie als virale Fremdantigene im Vergleich zu den oben beschriebenen p53-Wildtypepitopen immunogener sind. Letztere Hypothese hat sich insoweit bestätigt, als sich bei jedem der untersuchten Patienten mit HPV-assoziiertem KH-PECA eine erhöhte Frequenz gegen die untersuchten

HPV16-Epitope E7<sub>11-20</sub> und E7<sub>86-93</sub> zeigte (29). Trotz des Vorhandenseins dieser Zellen konnte es zu Tumorwachstum kommen. Wir konnten jedoch zeigen, dass die HPV-spezifischen T-Zellen, nach Inkubation mit exogenem E7-Protein oder nach IF- $\gamma$ -Behandlung, Tumorzellen der natürlich HPV-transformierten KH-PECA-Zelllinie SCC90 erkennen konnten. Daraufhin verglichen wir die Expression von Antigen-Prozessierungs-Maschinerie-Komponenten mit und ohne Vorbehandlung mit IF- $\gamma$  und fanden heraus, dass die Expression wichtiger Komponenten für die Antigenprozessierung und -präsentation durch IF- $\gamma$  heraufreguliert wurde. Die Validität dieser Ergebnisse in situ konnte durch vergleichende immunhistochemische Untersuchungen an einer Anzahl von primären KH-PECA und angrenzendem gesunden Gewebe bestätigt werden. Andere Arbeitsgruppen konnten ähnliche Mechanismen für andere Tumorentitäten nachweisen (116-118). Unsere Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung einer Heraufregulierung der Expression wichtiger Komponenten für die Antigenprozessierung und -präsentation in Tumorzellen durch Immunadjuvantien, um die Immunogenität der Tumorzellen und damit die Wirksamkeit zukünftiger T-Zellimmuntherapien zu erhöhen. Diese Ergebnisse beschreiben gleichzeitig einen weiteren Immun-escape-Mechanismus von KH-PECA.

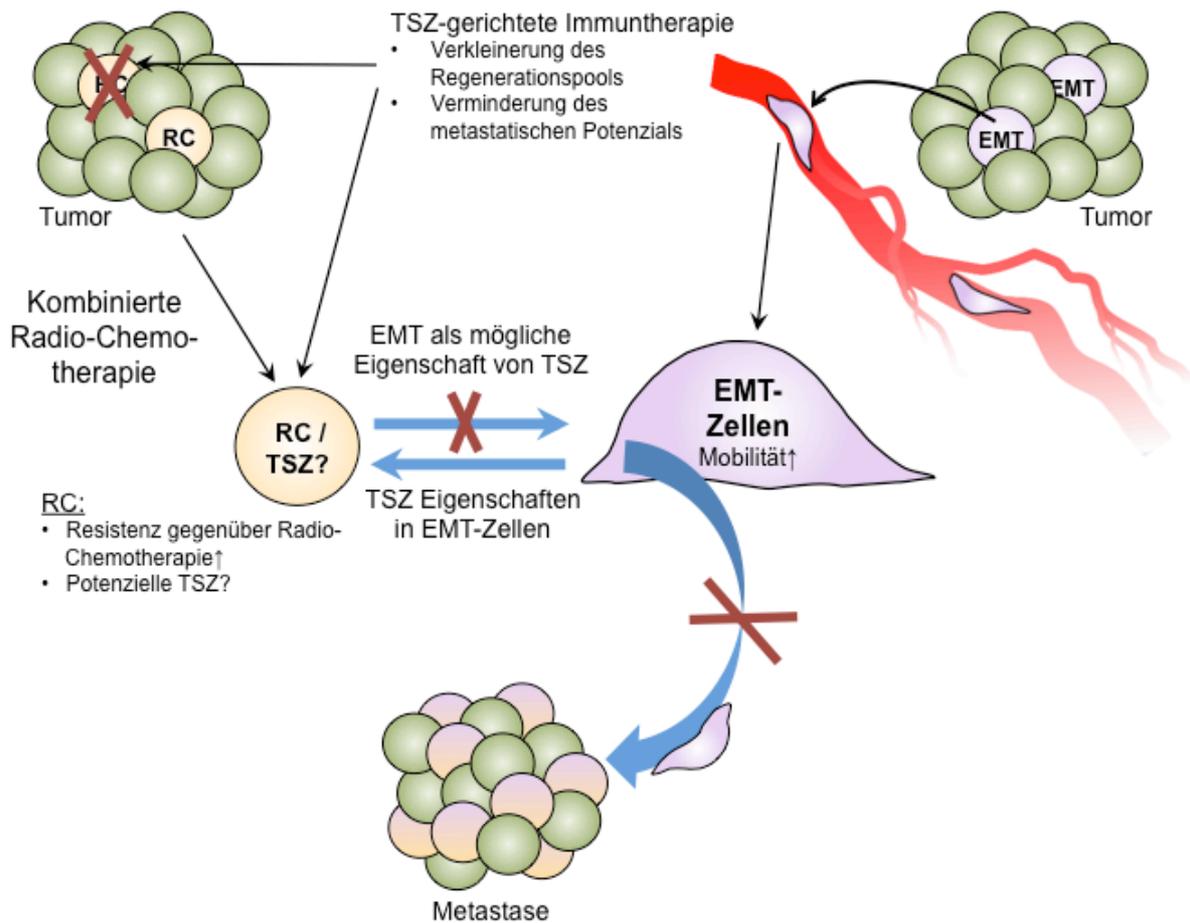
Andere Mechanismen einer Immundysfunktion, wie eine defekte Effektor-T-Zell-Antwort und –Funktion, könnten zusätzlich zur Tumorprogression beitragen. Zur weiteren Charakterisierung dieser Dysfunktion haben wir die entsprechenden T-Zellsubpopulationen per Durchflusszytometrie subtypisiert (29, 70).

Ein disproportional hohes Niveau von terminal differenzierten/lytischen (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>) TA-spezifischen T-Zellen fand sich unter den zirkulierenden HPV16-E7<sub>11-20</sub>-Tetramer- (Kurzform für: Tetramerische Peptid-MHC-Klasse-I Komplex) positiven T-Zellen (29). Diese Population zeichnete sich weiter durch eine starke Anreicherung von CD107a<sup>+</sup> Zellen, indikativ für einen terminal differenzierten lytischen und degranulierten Status, aus. Diese Zellen könnten demzufolge Ausdruck einer missglückten antiviralen Immunantwort auf die HPV-positiven KH-PECA sein. Eine Progression der Tumore könnte also durch eine inkomplette Aktivierung oder suboptimale Zielerkennung der TA-spezifischen T-Zellen möglich werden. Andererseits könnte das Vorhandensein von E7-spezifischen Gedächtnis-T-Zellen (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>) nach erfolgreicher Aktivierung und Vermehrung durch eine Immuntherapie zur Eliminierung von Tumorzellen führen. Eine weitere Voraussetzung wäre die Stimulation einer adäquaten Präsentation von TA auf der Tumorzelloberfläche, z.B. durch geeignete, der Antitumorvakzine koapplizierte Immunmodulatoren.

Tumore bestehen aus einer heterogenen Zellpopulation mit unterschiedlichen Eigenschaften

und Fähigkeiten. Gemäß der Tumorstammzellhypothese sind TSZ mehr als andere Zellen in der Lage, Tumorwachstum und -regeneration zu fördern sowie Metastasen abzusiedeln. TSZ wird weiterhin eine Resistenz gegenüber Strahlen- und Chemotherapie zugeschrieben. Andererseits gibt es erste Hinweise darauf, dass eine erfolgreiche selektive Abtötung von TSZ zu der Eliminierung des Regenerationspools des Tumors führt und so weiteres Wachstum stoppen bzw. eine Tumorregression einleiten kann (107). Aufgrund der potenziellen therapeutischen Bedeutsamkeit dieser Tumorzellpopulation haben wir TSZ aus KH-PECA isoliert und ihre Eigenschaften und Immunogenität untersucht.

Um TSZ näher zu untersuchen, haben wir zunächst ein dreidimensionales Zellkultivierungssystem, das für Brustkrebs (sog. Mammosphere) und Tumoren des Nervensystems (sog. Neurospheres) bereits etabliert ist, auf KH-PECA übertragen (119). Mit Hilfe dieser Zellkultivierungsmethode können KH-PECA-Zellen mit Stammzeleigenschaften angereichert werden. Um diese dreidimensionalen Zellkulturen (Spheroide) zu erzeugen, werden Zellen unter besonders niedrigen Adhäsionsbedingungen kultiviert. Zellen, die unter diesen Bedingungen überleben, bilden dreidimensionale Zellkluster. Aus diesen Spheroidkulturen können TSZ isoliert und auf ihre Expression von Stammzellmarkern und embryonalen Transkriptionsfaktoren (sog. „stemness-related genes“) hin untersucht werden, um die Stammzeleigenschaften dieser Zellen zu charakterisieren und zu verifizieren. So konnten wir nachweisen, dass diese Zellen eine erhöhte Expression von embryonalen Transkriptionsfaktoren und dem mittlerweile auch für viele andere Tumore etablierten TSZ-Marker, dem Enzym Aldehyddehydrogenase-1 (ALDH1), aufweisen (119-121). ALDH1-positive Durchflusszytometrie-sortierte Zellen zeigten nach Aussaat in sehr geringer Konzentration und unter besonders niedrigen Adhäsionsbedingungen eine wesentlich höhere Neigung, Spheroide zu bilden, als die parentalen Zellen. Die Analyse von TSZ-Markern in Spheroiden ergab eine inhomogene Verteilung, so dass wir schlussfolgern können, dass Spheroide aus einer heterogenen Zellpopulation aufgebaut sind (119). Diese Erkenntnis löste tiefer gehende Untersuchungen zur Charakterisierung dieser Subpopulationen aus. Dabei konnten wir eine Zellpopulation mit erhöhter EMT-Markerexpression nachweisen. Dies zeigt, dass in Spheroidkulturen nicht nur Zellen mit Stammzeleigenschaften, sondern auch mit aktiviertem EMT-Programm vorkommen, und weist auf die enge Beziehung zwischen TSZ und Zellen mit aktiviertem EMT-Programm hin. Möglicherweise gehen die letzteren sogar aus TSZ hervor, oder EMT ist eine Eigenschaft von TSZ (Abbildung 6).



**Abbildung 6: Modell der Wirkungsweise einer TSZ-gerichteten Immuntherapie unter Berücksichtigung der TSZ- und EMT-Hypothese**

*Therapeutische Angriffspunkte sind durch Kreuze markiert. Eine konventionelle radiochemotherapeutische Behandlung reduziert die Haupttumormasse im Idealfall komplett, sie kann jedoch resistente Zellen (CR) zurücklassen, welche TSZ sein können. Mit oder ohne Behandlung können einige Tumorzellen durch Verlust von epithelialen Markern (E-Cadherin) und Adhäsion und Ausprägung von mesenchymalen Markern (Vimentin) einen mobilen Phänotyp annehmen (EMT) und in ein Blutgefäß eindringen, um sich an anderer Stelle anzusiedeln. TSZ- und EMT-Phänotypen sind miteinander verbunden: TSZ sind nicht nur resistenter gegenüber Chemotherapie, sondern auch invasiver und metastatischer als Nicht-TSZ. Letztere Prozesse setzen EMT voraus. Umgekehrt haben Tumorzellen mit der Fähigkeit zu EMT häufig einen TSZ-Phänotyp, charakterisiert durch eine erhöhte Expression von TSZ-Markern, Chemoresistenz und Selbsterneuerungspotenzial. Eine Schnittmenge zwischen Zellen mit EMT- und TSZ-Phänotyp ist deshalb plausibel, und es besteht sogar die Möglichkeit, dass sie die gleiche Zellpopulation repräsentieren.*

In unseren Untersuchungen zeigten Spheroidzellen, als Ausdruck geringer

Zellteilungsaktivität, im Vergleich zu der jeweiligen parentalen Zelllinie einen geringeren Anteil von Ki-67-positiven Zellen. Zusätzlich konnten funktionelle Untersuchungen eine erhöhte In-vitro-Fähigkeit zur Migration und Invasion nachweisen. Dieser Umstand könnte sich in vivo als erhöhte Fähigkeit zur Metastasierung ausdrücken. Phänotypische Untersuchungen stützten unsere Beobachtungen, da wir einerseits bei diesen Zellen eine erhöhte Expression von Proteinen, die wichtig für die zelluläre Migration sind, und andererseits eine verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen nachweisen konnten. Unter adhärenen Kultivierungsbedingungen war dieser Phänotyp voll reversibel, und die resultierende Zellkultur war von der parentalen Zelllinie, von der die Subkultivierungsversuche ausgegangen waren, nicht zu unterscheiden. Somit konnten wir in Sphroiden zusätzlich zu der TSZ-Population eine Subpopulation mit hohem migratorischen Potenzial und mesenchyalem Myofibroblasten-Phänotyp nachweisen.

Um nun eine potenzielle Bedeutung von ALDH1<sup>+</sup> TSZ bei der Metastasierung von KH-PECA in vivo zu untersuchen, haben wir klinische und histologische Charakteristika von metastasierten Oropharynxkarzinomen in Bezug zu der ALDH1-Expression des Tumorgewebes gesetzt (121). Karzinome des Oropharynx sind eine durch ihre anatomische Lokalisation definierte Untergruppe von KH-PECA, die in etwa zur Hälfte HPV-assoziiert sind. Dies war auch für die von uns untersuchten Tumorproben der Fall, so dass eine weitere Aufschlüsselung der Ergebnisse gemäß der Tumorätiologie möglich war. Wir konnten für alle Proben nachweisen, dass ein höherer Anteil von ALDH1<sup>+</sup> Zellen im Gewebe mit niedrigerer Tumordifferenzierung und einem höheren Metastasierungsgrad (N-Status entsprechend der TNM-Klassifikation für KH-PECA) assoziiert ist. Dies zeigt, dass eine erhöhte Frequenz von TSZ mit einer Tumorprogression und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen verknüpft ist. TSZ spielen hierbei möglicherweise eine entscheidende Rolle. EMT wird als eine Voraussetzung für die erfolgreiche Absiedelung von Metastasen durch den Primärtumor angesehen. Um die Rolle von ALDH1<sup>+</sup> TSZ für die Progression von KH-PECA besser zu verstehen, haben wir ihre Häufigkeit in Primärtumoren und korrespondierenden Metastasen verglichen. Als Erstes wurden alle untersuchten Fälle zusammen betrachtet. Hierbei konnten wir zunächst keine erhöhte Häufigkeit von ALDH1<sup>+</sup> TSZ in Metastasen nachweisen. Nach Einteilung der prozentualen ALDH1-Gewebeexpression in Grad 0-3 wurden jedoch Unterschiede zwischen Primärtumor und Metastasen deutlich. Während niedrigere ALDH1-Grade in HPV<sup>+</sup> Tumoren nachgewiesen wurden, fanden sich höhere Grade in HPV<sup>-</sup> Tumoren. In Metastasen konnten solche Unterschiede nicht nachgewiesen werden. Es überwogen insgesamt höhere ALDH1-Grade in Metastasen, welche zudem mit höheren N-Stadien

korrelierten. Die Beobachtung, dass die Anzahl von TSZ in Metastasen generell höher ist als in Primärtumoren, könnte Ausdruck der aktiven Rolle von TSZ bei der Metastasierung sein und die Tatsache reflektieren, dass die Absiedelung von Metastasen einen mobilen zellulären Phänotyp erfordert. Dieser mobile Phänotyp könnte durch die Fähigkeit von TSZ zur EMT entstehen. Offen bleibt, ob die Erhöhung der TSZ-Zahl in Metastasen transient oder permanent ist.

Mit Blick auf die Ätiologie von KH-PECA und insbesondere von Oropharynx-Karzinomen wurde der HPV-Status von allen in die Studie eingeschlossenen Tumoren untersucht. Eine Anzahl von Studien belegt das bessere Überleben von Patienten mit HPV-assoziierten KH-PECA, obwohl diese Tumore niedriger differenziert und häufiger bei Erstdiagnose metastasiert sind (33, 122). Diese kontraintuitiven Beobachtungen legen biologische Besonderheiten dieser Tumore nahe. In den von uns untersuchten Karzinomen konnten wir eine Korrelation von höherer ALDH1-Gewebeexpression und negativem HPV-Status für Primärtumore, nicht aber für Metastasen nachweisen. Da die Anwesenheit von ALDH1<sup>+</sup> TSZ eine Rolle bei der Tumorprogression und Therapieresistenz spielt, könnte die niedrigere Zahl dieser Zellen einen ersten Hinweis auf die bessere Prognose von HPV<sup>+</sup> Tumoren geben. Ohne Zweifel werden jedoch zellbiologische Prozesse eine größere Rolle spielen als rein quantitative Unterschiede, so dass die Frage aufgeworfen wird, welche biologischen Phänomene der früheren Metastasierung zugrunde liegen und welche Rolle HPV dabei spielt. Aufgrund der zentralen Rolle von TSZ bei der Progression und Metastasierung sowie der Resistenz gegenüber Strahlen- und Chemotherapie würde eine Therapie, die diese Zellen gezielt abtöten kann, eine Metastasierung verhindern und letztlich zu einer Regression des Tumors führen (107). Eine Möglichkeit hierfür wäre es, eine ZTL-Antwort gegen TSZ zu stimulieren. Eine wichtige Voraussetzung hierfür ist, dass ZTL auf MHC präsentierte tumorspezifische TSZ-Antigene als Ziel erkennen und durch kostimulatorische Signale adäquat aktiviert werden. Wir konnten für Spheroidzellen der Zelllinie CaSki zeigen, dass sie resistenter gegenüber MHC-Klasse-I-restringierter AA-spezifischer T-Zelllyse sind als die parentale Monolayerzelllinie. Der Vorteil, AA-spezifische T-Zellantworten gegen TSZ zu untersuchen liegt darin, dass hierfür kein tumorspezifisches Antigen notwendig ist. Vielmehr kann die generelle Empfindlichkeit von TSZ gegenüber der T-Zelllyse und die Möglichkeiten ihrer Modulation untersucht werden. Im Rahmen der T-Zellstimulation interagiert MHC-I auf der Oberfläche der antigenpräsentierenden Zellen mit dem passenden T-Zellrezeptor und induziert CD8<sup>+</sup> ZTL, die in der Lage sind, ihre Zielzellen zu lysieren. Ist MHC-I jedoch herabreguliert, wie wir es für CaSki-Spheroidzellen nachweisen konnten, ist dieser Vorgang

weniger effektiv. Die TSZ sind resistenter gegenüber einer Lyse. Bei einer anderen Zelllinie war die Sensitivität der Spheroidzellen und parentalen Tumorzellen gegenüber AA-spezifischer T-Zellyse identisch. Bei dieser Zelllinie wurde interessanterweise die gleiche Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen und CD54/ICAM-1 gefunden, die im Übrigen auch absolut betrachtet deutlich höher war als bei CaSki. Dies zeigt, dass für eine gute Erkennung und erfolgreiche Abtötung eine gewisse Mindestexpression dieser Moleküle erforderlich ist, aber auch, dass es keine generelle Erklärung für die Tumorresistenz ist. Eine Vorbehandlung mit IF- $\gamma$  kann jedoch, wie unsere Versuche zeigen, die Immunogenität und entsprechend auch die Sensitivität der Spheroidzellen im Vergleich zu den parentalen Tumorzellen gegenüber ZTL-Lyse überproportional steigern. Dieser Umstand könnte auf die bisher nicht erklärte höhere Induzierbarkeit von MHC-Klasse-I-Molekülen und CD54/ICAM-1 an der Oberfläche der Spheroidzellen zurückgeführt werden. In jedem Fall wird deutlich, welche Relevanz eine erfolgreiche Immunmodulation der Tumorzellen für die ZTL-Lyse besitzt.

Mit dem von uns vorgestellten experimentellen System der AA-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort gegen Tumorzellen können Substanzen getestet und optimiert werden, durch die TSZ immunogener und somit empfindlich gegenüber einer T-Zellyse werden. Der Vorteil dieses System liegt darin, dass hierzu eine Verfügbarkeit von TSZ-spezifischen Antigenen nicht erforderlich ist. Das ist insofern von Bedeutung, als aktuell noch kein optimales KH-PECA-Stammzellantigen oder universelles TSZ-Antigen zum Einsatz in Antitumorvakzinen zur Verfügung steht. Der klinische Nutzen eines solchen optimierten Vakzineadjuvans könnte, zusammen mit geeigneten TSZ-Antigenen, im Rahmen von immuntherapeutischen Studien gegen TSZ untersucht werden und so zukünftig zur erfolgreichen immunologischen Behandlung von KH-PECA beitragen.

#### 4. Zusammenfassung

Die tumorantigen- (TA) spezifische Immuntherapie könnte eine wichtige ergänzende, schonende und effektive Behandlungsalternative gegen Tumore generell und speziell von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich (KH-PECA) darstellen. Als Grundlage für zielgerichtete Immuntherapien von KH-PECA, untersuchte ich, ob a) durch Selbst- und HPV-Antigene, eine antitumorale T-Zellantwort hervorgerufen wird, b) ob im Tumor Zellen mit Tumorstammzell- (TSZ) Eigenschaften vorkommen und c) ob eine gegen TSZ gerichtete T-Zellantwort nachweisbar ist. Die Mehrheit humaner Karzinome, einschließlich der KH-PECA, zeigt eine p53-Überexpression. Für letztere konnten wir eine natürliche anti-Wildtyp-p53-TA-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort mit signifikanter Anreicherung in der Tumormikroumgebung nachweisen. Zugleich zeigten immunsuppressive regulatorische T-Zellen in tumorinfiltrierenden Lymphozyten eine signifikante Anreicherung. Ihre Präsenz trägt wahrscheinlich zu der geringen Antitumorreaktivität der TA-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in situ bei. Hinzu kommen weitere vom Tumor stammende Faktoren, die zu der Dysfunktion von Effektor-T-Zellen beitragen und zu der von uns nachgewiesenen stark erhöhten Apoptoserate von anti-Wildtyp-p53-TA-spezifischen T-Zellen führt. Diese könnte Ausdruck des bei Tumorpatienten beobachteten hohen Lymphozytenumsatzes sein. Immunsuppressive Mechanismen könnten besonders relevant für Wildtyp-p53-TA sein, da es sich hierbei um Selbstantigene handelt, für die ein gewisses natürliches Toleranzniveau zu erwarten ist. Neben p53-TA stellen bei Humanem Papillomavirus- (HPV) assoziierten KH-PECA von diesem Virus stammende antigene Proteine Ziele für Antitumorvakzine dar. Die Häufigkeit und Reaktivität von HPV16-E7<sub>11-20</sub> und -E7<sub>86-93</sub>-spezifischen T-Zellen bei Patienten mit HPV<sup>+</sup> und -negativen KH-PECA wurde bestimmt. Bei allen Patienten mit HPV16<sup>+</sup> Tumoren war die Frequenz von T-Zellen dieser beiden Spezifitäten signifikant erhöht, und sie zeigten einen terminal differenzierten degranulierten Phänotyp. Trotz Expression des entsprechenden HLA-Klasse-I-Allels konnten TA-spezifische zytotoxische T-Zellen (ZTL) eine natürlich HPV16-transformierte KH-PECA-Zelllinie erst nach Vorbehandlung mit Interferon- (IF)  $\gamma$  lysieren. Weitere Untersuchungen an der Zelllinie zeigten geringe oder keine Expression für die Antigenprozessierung und -präsentation (APP) wichtige Komponenten, die jedoch durch IF- $\gamma$  oder Transfektion von APP-Komponenten rekonstituiert werden konnte. Analog hierzu zeigten immunhistochemische Untersuchungen an HPV<sup>+</sup> KH-PECA eine herabregulierte Expression von APP-Komponenten und HLA. Antitumorvakzine zur Behandlung von HPV<sup>+</sup> KH-PECA müssen also eine effektive T-Zellantwort und Expression von APP-Komponenten stimulieren um Tumorimmun-escape entgegenzuwirken. Das Ausbleiben klinischer Erfolge

durch Immuntherapien warf die Frage auf, ob sich die stimulierte T-Zellantwort gegen die richtige Zellpopulation des heterogenen Tumors richtet. Initiation, Wachstum, Rezidivierung und Metastasierung von KH-PECA werden TSZ zugeschrieben, die durch ihre Aldehyddehydrogenase-1- (ALDH1) Expression identifiziert werden können. Alle getesteten KH-PECA-Linien bildeten Spheroiden und Kolonien mit erhöhter ALDH1-Expression, die sich selbst erneuern und serienpassagiert werden konnten. Weiterhin konnten wir eine signifikante Erhöhung von embryonalen Transkriptionsfaktoren und von EMT-Markern bei gleichzeitiger Verminderung von Adhäsionsmolekülen nachweisen. Funktionell, mit diesem mobilen Phänotyp übereinstimmend, zeigten diese Zellen Zeichen von EMT und eine erhöhte Invasivität. Um die Bedeutung der ALDH1-Expression *in vivo* zu untersuchen, haben wir 40 Primärtumor-Metastasenpaare, die zur Hälfte HPV<sup>+</sup> waren, analysiert und die Daten mit klinischen Parametern korreliert. Die ALDH1-Expression war in Metastasen unabhängig vom HPV-Status signifikant erhöht. In HPV<sup>+</sup> Primärtumoren fanden sich signifikant weniger ALDH1<sup>+</sup> Zellen. Tumore mit erhöhter ALDH1-Expression waren durch einen aggressiveren Tumorphänotyp mit höherem Metastasierungsgrad und geringerer Differenzierung charakterisiert. Die Ergebnisse suggerieren unabhängig von der Ätiologie und dem ALDH1-Anteil das Vorhandensein einer ALDH1<sup>+</sup> Tumorzellsubpopulation, die die metastatische Kaskade zu komplettieren kann. Vorbereitend auf klinische Studien haben wir die Empfindlichkeit von TSZ gegenüber alloantigen- (AA) spezifischer CD8<sup>+</sup> ZTL-Lyse untersucht. Die MHC-I-Expression war bei TSZ in einer von drei getesteten Zelllinien herabreguliert. Durch eine Stimulation mit IF- $\gamma$  konnte die Expression von MHC-I und CD54 heraufreguliert werden. TSZ zeigten sich gegenüber Lyse mit AA-spezifischen CD8<sup>+</sup> ZTL resistenter als die parentalen Zelllinien. Eine Behandlung mit IF- $\gamma$  führte jedoch zu überproportionaler Lyse von TSZ. Die Untersuchung der ALDH<sup>+</sup> Population zeigte, dass stark ALDH<sup>+</sup> Zellen empfindlicher gegenüber ZTL-Lyse waren als die niedrig ALDH<sup>+</sup> Population. Hieraus wird deutlich, dass es eine natürliche Immunantwort gegen TA von KH-PECA gibt, die jedoch unterschiedliche Ausprägungen von Immun-escape vor ZTL zeigen. Dies erklärt u.a. das bisherige Ausbleiben durchschlagender Therapieerfolge durch T-Zell-Immuntherapie. Eine Ursache mag sein, dass diese Therapien auf die falsche Tumorzellpopulation abzielten. Wir konnten demonstrieren, dass den TSZ und der EMT bedeutsam für die Unterhaltung, das Wachstum und die Metastasierung von KH-PECA sind, und sie nach Vorbehandlung mit IF- $\gamma$  durch ZTL abgetötet werden können. Bei der Entwicklung zukünftiger ZTL-basierter Antitumorvakzine sollte eine Berücksichtigung dieser Erkenntnisse zu höherer Wirksamkeit führen.

## 5. Literaturangaben

1. Mashberg A. Head and neck cancer. *N Engl J Med.* 1993 Jun 17;328(24):1783; author reply 4. PubMed PMID: 8497290.
2. Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Hong WK. Head and neck cancer. *N Engl J Med.* 1993 Jan 21;328(3):184-94. PubMed PMID: 8417385.
3. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005 Mar-Apr;55(2):74-108. PubMed PMID: 15761078.
4. Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin.* 2001 Jan-Feb;51(1):15-36. PubMed PMID: 11577478.
5. Jones AS, Morar P, Phillips DE, Field JK, Husband D, Helliwell TR. Second primary tumors in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer.* 1995 Mar 15;75(6):1343-53. PubMed PMID: 7882285.
6. Leemans CR, Tiwari R, Nauta JJ, van der Waal I, Snow GB. Recurrence at the primary site in head and neck cancer and the significance of neck lymph node metastases as a prognostic factor. *Cancer.* 1994 Jan 1;73(1):187-90. PubMed PMID: 8275423.
7. Albers AE, Strauss L, Liao T, Hoffmann TK, Kaufmann AM. T cell-tumor interaction directs the development of immunotherapies in head and neck cancer. *Clinical & developmental immunology.* 2010;2010:236378. PubMed PMID: 21234340. Pubmed Central PMCID: 3017942.
8. Balz V, Scheckenbach K, Gotte K, Bockmuhl U, Petersen I, Bier H. Is the p53 inactivation frequency in squamous cell carcinomas of the head and neck underestimated? Analysis of p53 exons 2-11 and human papillomavirus 16/18 E6 transcripts in 123 unselected tumor specimens. *Cancer Res.* 2003 Mar 15;63(6):1188-91. PubMed PMID: 12649174. Epub 2003/03/22. eng.
9. Hollstein M, Shomer B, Greenblatt M, Soussi T, Hovig E, Montesano R, et al. Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated compilation. *Nucleic Acids Res.* 1996 Jan 1;24(1):141-6. PubMed PMID: 8594564. Pubmed Central PMCID: 145616. Epub 1996/01/01. eng.
10. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science.* 1991 Jul 5;253(5015):49-53. PubMed PMID: 1905840. Epub 1991/07/05. eng.
11. Syrjanen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol.* 2005 Mar;32 Suppl 1:S59-66. PubMed PMID: 15753013.
12. Gillison ML, Shah KV. Human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma: mounting evidence for an etiologic role for human papillomavirus in a subset of head and neck cancers. *Curr Opin Oncol.* 2001 May;13(3):183-8. PubMed PMID: 11307062.
13. Gillison ML, Lowy DR. A causal role for human papillomavirus in head and neck cancer. *Lancet.* 2004 May 8;363(9420):1488-9. PubMed PMID: 15135592.
14. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2000 May 3;92(9):709-20. PubMed PMID: 10793107.
15. Klusmann JP, Preuss SF, Speel EJ. [Human papillomavirus and cancer of the oropharynx. Molecular interaction and clinical implications]. *HNO.* 2009 Feb;57(2):113-22. PubMed PMID: 19194683. Humane Papillomviren und Oropharynxkarzinome. Molekulare Interaktion und klinische Auswirkung.
16. Hepburn HM, Kaufmann AM. [Nobel price for vaccination against cervical cancer: current data and guidelines]. *Internist (Berl).* 2009 May;50(5):617-26. PubMed PMID: 19384543. Epub 2009/04/23. Nobelpreis für die Impfung gegen Zervixkrebs: Aktuelle Daten- und Leitlinienlage. ger.

17. Smith EM, Summersgill KF, Allen J, Hoffman HT, McCulloch T, Turek LP, et al. Human papillomavirus and risk of laryngeal cancer. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2000 Nov;109(11):1069-76. PubMed PMID: 11090000.
18. Hobbs CG, Sterne JA, Bailey M, Heyderman RS, Birchall MA, Thomas SJ. Human papillomavirus and head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Otolaryngol*. 2006 Aug;31(4):259-66. PubMed PMID: 16911640.
19. Mork J, Lie AK, Glatte E, Hallmans G, Jellum E, Koskela P, et al. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 2001 Apr 12;344(15):1125-31. PubMed PMID: 11297703.
20. Schwartz SM, Daling JR, Doody DR, Wipf GC, Carter JJ, Madeleine MM, et al. Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst*. 1998 Nov 4;90(21):1626-36. PubMed PMID: 9811312.
21. Zumbach K, Kissel'jov F, Sacharova O, Shaichaev G, Semjonova L, Pavlova L, et al. Antibodies against oncoproteins E6 and E7 of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical-carcinoma patients from Russia. *Int J Cancer*. 2000 Feb 1;85(3):313-8. PubMed PMID: 10652419.
22. Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Klussmann JP, Lee JH, Wang D, et al. Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int J Cancer*. 2004 Feb 20;108(5):766-72. PubMed PMID: 14696105.
23. Kreimer AR, Alberg AJ, Daniel R, Gravitt PE, Viscidi R, Garrett ES, et al. Oral human papillomavirus infection in adults is associated with sexual behavior and HIV serostatus. *J Infect Dis*. 2004 Feb 15;189(4):686-98. PubMed PMID: 14767823.
24. Gillison ML, Koch WM, Shah KV. Human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma: are some head and neck cancers a sexually transmitted disease? *Curr Opin Oncol*. 1999 May;11(3):191-9. PubMed PMID: 10328594.
25. Fakhry C, Gillison ML. Clinical implications of human papillomavirus in head and neck cancers. *J Clin Oncol*. 2006 Jun 10;24(17):2606-11. PubMed PMID: 16763272.
26. Cruz IB, Snijders PJ, Steenbergen RD, Meijer CJ, Snow GB, Walboomers JM, et al. Age-dependence of human papillomavirus DNA presence in oral squamous cell carcinomas. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1996 Jan;32B(1):55-62. PubMed PMID: 8729620.
27. Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Hoffman HT, Wang DH, Haugen TH, et al. Human papillomavirus in oral exfoliated cells and risk of head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2004 Mar 17;96(6):449-55. PubMed PMID: 15026470.
28. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. 2002 May;2(5):342-50. PubMed PMID: 12044010.
29. Albers A, Abe K, Hunt J, Wang J, Lopez-Albaitero A, Schaefer C, et al. Antitumor activity of human papillomavirus type 16 E7-specific T cells against virally infected squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res*. 2005 Dec 1;65(23):11146-55. PubMed PMID: 16322265.
30. Hoffmann TK, Arsov C, Schirlau K, Bas M, Friebe-Hoffmann U, Klussmann JP, et al. T cells specific for HPV16 E7 epitopes in patients with squamous cell carcinoma of the oropharynx. *Int J Cancer*. 2006 Apr 15;118(8):1984-91. PubMed PMID: 16284959.
31. Ritchie JM, Smith EM, Summersgill KF, Hoffman HT, Wang D, Klussmann JP, et al. Human papillomavirus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx. *Int J Cancer*. 2003 Apr 10;104(3):336-44. PubMed PMID: 12569557.
32. Licitra L, Perrone F, Bossi P, Suardi S, Mariani L, Artusi R, et al. High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2006 Dec 20;24(36):5630-6. PubMed PMID: 17179101.

33. Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, et al. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst.* 2008 Feb 20;100(4):261-9. PubMed PMID: 18270337.
34. Hafkamp HC, Manni JJ, Speel EJ. Role of human papillomavirus in the development of head and neck squamous cell carcinomas. *Acta Otolaryngol.* 2004 May;124(4):520-6. PubMed PMID: 15224887.
35. Pintos J, Franco EL, Black MJ, Bergeron J, Arella M. Human papillomavirus and prognoses of patients with cancers of the upper aerodigestive tract. *Cancer.* 1999 May 1;85(9):1903-9. PubMed PMID: 10223228.
36. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005 Feb;14(2):467-75. PubMed PMID: 15734974.
37. Cogliano V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, et al. Carcinogenicity of human papillomaviruses. *Lancet Oncol.* 2005 Apr;6(4):204. PubMed PMID: 15830458.
38. zur Hausen H. Cervical carcinoma and human papillomavirus: on the road to preventing a major human cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2001 Feb 21;93(4):252-3. PubMed PMID: 11181763.
39. Goodman A, Wilbur DC. Case records of the Massachusetts General Hospital. Weekly clinicopathological exercises. Case 32-2003. A 37-year-old woman with atypical squamous cells on a Papanicolaou smear. *N Engl J Med.* 2003 Oct 16;349(16):1555-64. PubMed PMID: 14561799. Epub 2003/10/17. eng.
40. Schiffman M, Kjaer SK. Chapter 2: Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003 (31):14-9. PubMed PMID: 12807940.
41. Albers AE, Hoffmann TK, Klussmann JP, Kaufmann AM. [Prophylactic and therapeutic vaccines against human papilloma virus]. *HNO.* 2010 Aug;58(8):778-90. PubMed PMID: 20544168. Epub 2010/06/15. Prophylaktische und therapeutische Vakzinen gegen humane Papillomviren. ger.
42. Schlecht NF, Platt RW, Duarte-Franco E, Costa MC, Sobrinho JP, Prado JC, et al. Human papillomavirus infection and time to progression and regression of cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* 2003 Sep 3;95(17):1336-43. PubMed PMID: 12953088.
43. Sillman FH, Sentovich S, Shaffer D. Ano-genital neoplasia in renal transplant patients. *Ann Transplant.* 1997;2(4):59-66. PubMed PMID: 9869880.
44. Ferenczy A, Coutlee F, Franco E, Hankins C. Human papillomavirus and HIV coinfection and the risk of neoplasias of the lower genital tract: a review of recent developments. *CMAJ.* 2003 Sep 2;169(5):431-4. PubMed PMID: 12952805. Pubmed Central PMCID: 183297.
45. Coleman N, Birley HD, Renton AM, Hanna NF, Ryait BK, Byrne M, et al. Immunological events in regressing genital warts. *Am J Clin Pathol.* 1994 Dec;102(6):768-74. PubMed PMID: 7801889.
46. Carter JJ, Koutsky LA, Hughes JP, Lee SK, Kuypers J, Kiviat N, et al. Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. *J Infect Dis.* 2000 Jun;181(6):1911-9. PubMed PMID: 10837170.
47. Viscidi RP, Schiffman M, Hildesheim A, Herrero R, Castle PE, Bratti MC, et al. Seroreactivity to human papillomavirus (HPV) types 16, 18, or 31 and risk of subsequent HPV infection: results from a population-based study in Costa Rica. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004 Feb;13(2):324-7. PubMed PMID: 14973086.

48. de Jong A, van Poelgeest MI, van der Hulst JM, Drijfhout JW, Fleuren GJ, Melief CJ, et al. Human papillomavirus type 16-positive cervical cancer is associated with impaired CD4+ T-cell immunity against early antigens E2 and E6. *Cancer Res.* 2004 Aug 1;64(15):5449-55. PubMed PMID: 15289354.
49. Welters MJ, de Jong A, van den Eeden SJ, van der Hulst JM, Kwappenberg KM, Hassane S, et al. Frequent display of human papillomavirus type 16 E6-specific memory t-Helper cells in the healthy population as witness of previous viral encounter. *Cancer Res.* 2003 Feb 1;63(3):636-41. PubMed PMID: 12566307.
50. van Poelgeest MI, Nijhuis ER, Kwappenberg KM, Hamming IE, Wouter Drijfhout J, Fleuren GJ, et al. Distinct regulation and impact of type 1 T-cell immunity against HPV16 L1, E2 and E6 antigens during HPV16-induced cervical infection and neoplasia. *Int J Cancer.* 2006 Feb 1;118(3):675-83. PubMed PMID: 16108057.
51. Valdespino V, Gorodezky C, Ortiz V, Kaufmann AM, Roman-Basaure E, Vazquez A, et al. HPV16-specific cytotoxic T lymphocyte responses are detected in all HPV16-positive cervical cancer patients. *Gynecol Oncol.* 2005 Jan;96(1):92-102. PubMed PMID: 15589586.
52. Schneider A, Koutsky LA. Natural history and epidemiological features of genital HPV infection. *IARC Sci Publ.* 1992 (119):25-52. PubMed PMID: 1330914.
53. Castle PE, Solomon D, Schiffman M, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 infections and 2-year absolute risk of cervical precancer in women with equivocal or mild cytologic abnormalities. *J Natl Cancer Inst.* 2005 Jul 20;97(14):1066-71. PubMed PMID: 16030304.
54. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003 Feb 6;348(6):518-27. PubMed PMID: 12571259.
55. Stanley MA. Imiquimod and the imidazoquinolones: mechanism of action and therapeutic potential. *Clin Exp Dermatol.* 2002 Oct;27(7):571-7. PubMed PMID: 12464152. Epub 2002/12/05. eng.
56. Vambutas A, DeVoti J, Pinn W, Steinberg BM, Bonagura VR. Interaction of human papillomavirus type 11 E7 protein with TAP-1 results in the reduction of ATP-dependent peptide transport. *Clin Immunol.* 2001 Oct;101(1):94-9. PubMed PMID: 11580231.
57. Novellino L, Castelli C, Parmiani G. A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update. *Cancer Immunol Immunother.* 2005 Mar;54(3):187-207. PubMed PMID: 15309328. Epub 2004/08/17. eng.
58. Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med.* 2004 Sep;10(9):909-15. PubMed PMID: 15340416. Pubmed Central PMCID: 1435696. Epub 2004/09/02. eng.
59. Albers AE, Ferris RL, Kim GG, Chikamatsu K, DeLeo AB, Whiteside TL. Immune responses to p53 in patients with cancer: enrichment in tetramer+ p53 peptide-specific T cells and regulatory T cells at tumor sites. *Cancer Immunol Immunother.* 2005 Nov;54(11):1072-81. PubMed PMID: 15959774. Epub 2005/06/17. eng.
60. Albers AE, Schaefer C, Visus C, Gooding W, DeLeo AB, Whiteside TL. Spontaneous apoptosis of tumor-specific tetramer+ CD8+ T lymphocytes in the peripheral circulation of patients with head and neck cancer. *Head Neck.* 2009 Jun;31(6):773-81. PubMed PMID: 19296526. Epub 2009/03/20. eng.
61. Seliger B, Cabrera T, Garrido F, Ferrone S. HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells. *Semin Cancer Biol.* 2002 Feb;12(1):3-13. PubMed PMID: 11926409. Epub 2002/04/03. eng.

62. Whiteside TL. Tumor-induced death of immune cells: its mechanisms and consequences. *Semin Cancer Biol.* 2002 Feb;12(1):43-50. PubMed PMID: 11926411. Epub 2002/04/03. eng.
63. Reimers N, Kasper HU, Weissenborn SJ, Stutzer H, Preuss SF, Hoffmann TK, et al. Combined analysis of HPV-DNA, p16 and EGFR expression to predict prognosis in oropharyngeal cancer. *Int J Cancer.* 2007 Apr 15;120(8):1731-8. PubMed PMID: 17236202.
64. Brinkman JA, Hughes SH, Stone P, Caffrey AS, Muderspach LI, Roman LD, et al. Therapeutic vaccination for HPV induced cervical cancers. *Dis Markers.* 2007;23(4):337-52. PubMed PMID: 17627067. Epub 2007/07/14. eng.
65. de Jong A, van der Burg SH, Kwappenberg KM, van der Hulst JM, Franken KL, Geluk A, et al. Frequent detection of human papillomavirus 16 E2-specific T-helper immunity in healthy subjects. *Cancer Res.* 2002 Jan 15;62(2):472-9. PubMed PMID: 11809698. Epub 2002/01/26. eng.
66. Garcia-Hernandez E, Gonzalez-Sanchez JL, Andrade-Manzano A, Contreras ML, Padilla S, Guzman CC, et al. Regression of papilloma high-grade lesions (CIN 2 and CIN 3) is stimulated by therapeutic vaccination with MVA E2 recombinant vaccine. *Cancer Gene Ther.* 2006 Jun;13(6):592-7. PubMed PMID: 16456551. Epub 2006/02/04. eng.
67. Strauss L, Bergmann C, Gooding W, Johnson JT, Whiteside TL. The frequency and suppressor function of CD4+CD25highFoxp3+ T cells in the circulation of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res.* 2007 Nov 1;13(21):6301-11. PubMed PMID: 17975141. Epub 2007/11/03. eng.
68. Bergmann C, Strauss L, Wang Y, Szczepanski MJ, Lang S, Johnson JT, et al. T regulatory type 1 cells in squamous cell carcinoma of the head and neck: mechanisms of suppression and expansion in advanced disease. *Clin Cancer Res.* 2008 Jun 15;14(12):3706-15. PubMed PMID: 18559587. Epub 2008/06/19. eng.
69. Molling JW, de Gruijl TD, Glim J, Moreno M, Rozendaal L, Meijer CJ, et al. CD4(+)CD25hi regulatory T-cell frequency correlates with persistence of human papillomavirus type 16 and T helper cell responses in patients with cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer.* 2007 Oct 15;121(8):1749-55. PubMed PMID: 17582606. Epub 2007/06/22. eng.
70. Schaefer C, Kim GG, Albers A, Hoermann K, Myers EN, Whiteside TL. Characteristics of CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral circulation of patients with head and neck cancer. *Br J Cancer.* 2005 Mar 14;92(5):913-20. PubMed PMID: 15714205. Pubmed Central PMCID: 2361917. Epub 2005/02/17. eng.
71. Bergmann C, Strauss L, Zeidler R, Lang S, Whiteside TL. Expansion of human T regulatory type 1 cells in the microenvironment of cyclooxygenase 2 overexpressing head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2007 Sep 15;67(18):8865-73. PubMed PMID: 17875728. Epub 2007/09/19. eng.
72. Bergmann C, Strauss L, Wieckowski E, Czystowska M, Albers A, Wang Y, et al. Tumor-derived microvesicles in sera of patients with head and neck cancer and their role in tumor progression. *Head Neck.* 2009 Mar;31(3):371-80. PubMed PMID: 19073006. Pubmed Central PMCID: 2647573. Epub 2008/12/17. eng.
73. Kuss I, Hathaway B, Ferris RL, Gooding W, Whiteside TL. Decreased absolute counts of T lymphocyte subsets and their relation to disease in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res.* 2004 Jun 1;10(11):3755-62. PubMed PMID: 15173082. Epub 2004/06/03. eng.
74. Kuss I, Hathaway B, Ferris RL, Gooding W, Whiteside TL. Imbalance in absolute counts of T lymphocyte subsets in patients with head and neck cancer and its relation to

- disease. *Adv Otorhinolaryngol.* 2005;62:161-72. PubMed PMID: 15608426. Epub 2004/12/21. eng.
75. DeLeo AB, Jay G, Appella E, Dubois GC, Law LW, Old LJ. Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979 May;76(5):2420-4. PubMed PMID: 221923. Pubmed Central PMCID: 383613. Epub 1979/05/01. eng.
  76. Harris CC. Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J Natl Cancer Inst.* 1996 Oct 16;88(20):1442-55. PubMed PMID: 8841019. Epub 1996/10/16. eng.
  77. Raybaud-Diogene H, Tetu B, Morency R, Fortin A, Monteil RA. p53 overexpression in head and neck squamous cell carcinoma: review of the literature. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1996 May;32B(3):143-9. PubMed PMID: 8762869. Epub 1996/05/01. eng.
  78. DeLeo AB. p53-based immunotherapy of cancer. *Crit Rev Immunol.* 1998;18(1-2):29-35. PubMed PMID: 9419445. Epub 1998/01/07. eng.
  79. Offringa R, Vierboom MP, van der Burg SH, Erdile L, Melief CJ. p53: a potential target antigen for immunotherapy of cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 2000 Jun;910:223-33; discussion 33-6. PubMed PMID: 10911916. Epub 2000/07/27. eng.
  80. Soussi T. The humoral response to the tumor-suppressor gene-product p53 in human cancer: implications for diagnosis and therapy. *Immunol Today.* 1996 Aug;17(8):354-6. PubMed PMID: 8783493. Epub 1996/08/01. eng.
  81. Parmiani G. Tumor immunity as autoimmunity: tumor antigens include normal self proteins which stimulate anergic peripheral T cells. *Immunol Today.* 1993 Nov;14(11):536-8. PubMed PMID: 8274196. Epub 1993/11/01. eng.
  82. Chikamatsu K, Albers A, Stanson J, Kwok WW, Appella E, Whiteside TL, et al. P53(110-124)-specific human CD4+ T-helper cells enhance in vitro generation and antitumor function of tumor-reactive CD8+ T cells. *Cancer Res.* 2003 Jul 1;63(13):3675-81. PubMed PMID: 12839958. Epub 2003/07/04. eng.
  83. Albers AE, Visus C, Tsukishiro T, Ferris RL, Gooding W, Whiteside TL, et al. Alterations in the T-cell receptor variable beta gene-restricted profile of CD8+ T lymphocytes in the peripheral circulation of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res.* 2006 Apr 15;12(8):2394-403. PubMed PMID: 16638844. Epub 2006/04/28. eng.
  84. Ito D, Albers A, Zhao YX, Visus C, Appella E, Whiteside TL, et al. The wild-type sequence (wt) p53(25-35) peptide induces HLA-DR7 and HLA-DR11-restricted CD4+ Th cells capable of enhancing the ex vivo expansion and function of anti-wt p53(264-272) peptide CD8+ T cells. *J Immunol.* 2006 Nov 15;177(10):6795-803. PubMed PMID: 17082593. Epub 2006/11/04. eng.
  85. Hoffmann TK, Nakano K, Elder EM, Dworacki G, Finkelstein SD, Appella E, et al. Generation of T cells specific for the wild-type sequence p53(264-272) peptide in cancer patients: implications for immunoselection of epitope loss variants. *J Immunol.* 2000 Nov 15;165(10):5938-44. PubMed PMID: 11067956. Epub 2000/11/09. eng.
  86. Theobald M, Biggs J, Dittmer D, Levine AJ, Sherman LA. Targeting p53 as a general tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Dec 19;92(26):11993-7. PubMed PMID: 8618830. Pubmed Central PMCID: 40282. Epub 1995/12/19. eng.
  87. Zeh HJ, 3rd, Leder GH, Lotze MT, Salter RD, Tector M, Stuber G, et al. Flow-cytometric determination of peptide-class I complex formation. Identification of p53 peptides that bind to HLA-A2. *Hum Immunol.* 1994 Feb;39(2):79-86. PubMed PMID: 8175386. Epub 1994/02/01. eng.
  88. Houbiers JG, Nijman HW, van der Burg SH, Drijfhout JW, Kenemans P, van de Velde CJ, et al. In vitro induction of human cytotoxic T lymphocyte responses against peptides

- of mutant and wild-type p53. *Eur J Immunol*. 1993 Sep;23(9):2072-7. PubMed PMID: 8370389. Epub 1993/09/01. eng.
89. Chikamatsu K, Nakano K, Storkus WJ, Appella E, Lotze MT, Whiteside TL, et al. Generation of anti-p53 cytotoxic T lymphocytes from human peripheral blood using autologous dendritic cells. *Clin Cancer Res*. 1999 Jun;5(6):1281-8. PubMed PMID: 10389910. Epub 1999/07/02. eng.
  90. Ropke M, Hald J, Guldberg P, Zeuthen J, Norgaard L, Fugger L, et al. Spontaneous human squamous cell carcinomas are killed by a human cytotoxic T lymphocyte clone recognizing a wild-type p53-derived peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Dec 10;93(25):14704-7. PubMed PMID: 8962118. Pubmed Central PMCID: 26199. Epub 1996/12/10. eng.
  91. Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol*. 1991;9:271-96. PubMed PMID: 1910679. Epub 1991/01/01. eng.
  92. Gilboa E, Nair SK, Lysterly HK. Immunotherapy of cancer with dendritic-cell-based vaccines. *Cancer Immunol Immunother*. 1998 Apr;46(2):82-7. PubMed PMID: 9558003. Epub 1998/04/29. eng.
  93. Cicinnati VR, Dworacki G, Albers A, Beckebaum S, Tuting T, Kaczmarek E, et al. Impact of p53-based immunization on primary chemically-induced tumors. *Int J Cancer*. 2005 Mar 1;113(6):961-70. PubMed PMID: 15514940. Epub 2004/10/30. eng.
  94. Mayordomo JI, Zorina T, Storkus WJ, Zitvogel L, Celluzzi C, Falo LD, et al. Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity. *Nat Med*. 1995 Dec;1(12):1297-302. PubMed PMID: 7489412. Epub 1995/12/01. eng.
  95. Mayordomo JI, Zorina T, Storkus WJ, Zitvogel L, Garcia-Prats MD, DeLeo AB, et al. Bone marrow-derived dendritic cells serve as potent adjuvants for peptide-based antitumor vaccines. *Stem Cells*. 1997;15(2):94-103. PubMed PMID: 9090785. Epub 1997/01/01. eng.
  96. Mayordomo JI, Loftus DJ, Sakamoto H, De Cesare CM, Appasamy PM, Lotze MT, et al. Therapy of murine tumors with p53 wild-type and mutant sequence peptide-based vaccines. *J Exp Med*. 1996 Apr 1;183(4):1357-65. PubMed PMID: 8666894. Pubmed Central PMCID: 2192493. Epub 1996/04/01. eng.
  97. Albers AE, Chen C, Koberle B, Qian X, Klussmann JP, Wollenberg B, et al. Stem cells in squamous head and neck cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2012 Mar;81(3):224-40. PubMed PMID: 21511490. Epub 2011/04/23. eng.
  98. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001 Nov 1;414(6859):105-11. PubMed PMID: 11689955. Epub 2001/11/02. eng.
  99. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell stem cell*. 2007 Nov;1(5):555-67. PubMed PMID: 18371393. Pubmed Central PMCID: 2423808. eng.
  100. Chen YC, Chen YW, Hsu HS, Tseng LM, Huang PI, Lu KH, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009 Jul 31;385(3):307-13. PubMed PMID: 19450560. eng.
  101. Vered M, Dayan D, Yahalom R, Dobriyan A, Barshack I, Bello IO, et al. Cancer-associated fibroblasts and epithelial-mesenchymal transition in metastatic oral tongue squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2010 Sep 1;127(6):1356-62. PubMed PMID: 20340130. eng.
  102. Oker N, Kaufmann AM, Albers AE. [Biology and relevance of stem cells in squamous head and neck cancer: latest insights and review of literature]. *Laryngo- rhino- otologie*.

- 2012 May;91(5):326-32; quiz 33-4. PubMed PMID: 22517584. Biologie und Bedeutung von Tumorstammzellen in der HNO: Neueste Erkenntnisse und Zusammenfassung der aktuellen Literatur.
103. Dalerba P, Cho RW, Clarke MF. Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med.* 2007;58:267-84. PubMed PMID: 17002552. Epub 2006/09/28. eng.
  104. Kennedy JA, Barabe F, Poepl AG, Wang JC, Dick JE. Comment on "Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells". *Science.* 2007 Dec 14;318(5857):1722; author reply PubMed PMID: 18079385. Epub 2007/12/15. eng.
  105. Clay MR, Tabor M, Owen JH, Carey TE, Bradford CR, Wolf GT, et al. Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase. *Head Neck.* 2010 Sep;32(9):1195-201. PubMed PMID: 20073073. Pubmed Central PMCID: 2991066. Epub 2010/01/15. eng.
  106. Dick JE. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood.* 2008 Dec 15;112(13):4793-807. PubMed PMID: 19064739. Epub 2008/12/10. eng.
  107. Schatton T, Frank NY, Frank MH. Identification and targeting of cancer stem cells. *Bioessays.* 2009 Oct;31(10):1038-49. PubMed PMID: 19708024. Pubmed Central PMCID: 2887758.
  108. Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF. The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007;23:675-99. PubMed PMID: 17645413. Epub 2007/07/25. eng.
  109. Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature.* 2006 Jun 29;441(7097):1068-74. PubMed PMID: 16810241. Epub 2006/07/01. eng.
  110. Cortes-Dericks L, Carboni GL, Schmid RA, Karoubi G. Putative cancer stem cells in malignant pleural mesothelioma show resistance to cisplatin and pemetrexed. *Int J Oncol.* 2010 Aug;37(2):437-44. PubMed PMID: 20596671. Epub 2010/07/03. eng.
  111. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer.* 2008 Oct;8(10):755-68. PubMed PMID: 18784658. Epub 2008/09/12. eng.
  112. Wei Y, Li Y, Chen C, Stoelzel K, Kaufmann AM, Albers AE. Human skeletal muscle-derived stem cells retain stem cell properties after expansion in myosphere culture. *Exp Cell Res.* 2011 Apr 15;317(7):1016-27. PubMed PMID: 21277299. Epub 2011/02/01. eng.
  113. Tsukishiro T, Donnenberg AD, Whiteside TL. Rapid turnover of the CD8(+)CD28(-) T-cell subset of effector cells in the circulation of patients with head and neck cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2003 Oct;52(10):599-607. PubMed PMID: 12827303.
  114. Reichert TE, Strauss L, Wagner EM, Gooding W, Whiteside TL. Signaling abnormalities, apoptosis, and reduced proliferation of circulating and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with oral carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2002 Oct;8(10):3137-45. PubMed PMID: 12374681.
  115. Hoffmann TK, Dworacki G, Tsukihito T, Meidenbauer N, Gooding W, Johnson JT, et al. Spontaneous apoptosis of circulating T lymphocytes in patients with head and neck cancer and its clinical importance. *Clin Cancer Res.* 2002 Aug;8(8):2553-62. PubMed PMID: 12171883.
  116. Seliger B, Ritz U, Abele R, Bock M, Tampe R, Sutter G, et al. Immune escape of melanoma: first evidence of structural alterations in two distinct components of the MHC class I antigen processing pathway. *Cancer Res.* 2001 Dec 15;61(24):8647-50. PubMed PMID: 11751378.
  117. Seliger B, Atkins D, Bock M, Ritz U, Ferrone S, Huber C, et al. Characterization of human lymphocyte antigen class I antigen-processing machinery defects in renal cell carcinoma lesions with special emphasis on transporter-associated with antigen-

- processing down-regulation. *Clin Cancer Res.* 2003 May;9(5):1721-7. PubMed PMID: 12738726.
118. Seliger B, Bock M, Ritz U, Huber C. High frequency of a non-functional TAP1/LMP2 promoter polymorphism in human tumors. *Int J Oncol.* 2002 Feb;20(2):349-53. PubMed PMID: 11788900.
  119. Chen C, Wei Y, Hummel M, Hoffmann TK, Gross M, Kaufmann AM, et al. Evidence for epithelial-mesenchymal transition in cancer stem cells of head and neck squamous cell carcinoma. *PloS one.* 2011;6(1):e16466. PubMed PMID: 21304586. Pubmed Central PMCID: 3029362.
  120. Liao T, Kaufmann AM, Qian X, Sangvatanakul V, Chen C, Kube T, et al. Susceptibility to cytotoxic T cell lysis of cancer stem cells derived from cervical and head and neck tumor cell lines. *Journal of cancer research and clinical oncology.* 2013 Jan;139(1):159-70. PubMed PMID: 23001491.
  121. Qian X, Wagner S, Ma C, Klussmann JP, Hummel M, Kaufmann AM, et al. ALDH1-positive cancer stem-like cells are enriched in nodal metastases of oropharyngeal squamous cell carcinoma independent of HPV status. *Oncology Reports* 2013;00(0-00):0000. Epub 2013.
  122. Chen AM, Zahra T, Daly ME, Farwell DG, Luu Q, Gandour-Edwards R, et al. Definitive radiation therapy without chemotherapy for human papillomavirus-positive head and neck cancer. *Head Neck.* 2013 Jan 17. PubMed PMID: 23335285.

## **Anhang**

### **1. Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Unterschiedliche Hauptätiologien von KH-PECA .....	6
Abbildung 2: Intraepithelialer Lebenszyklus des HPV .....	10
Abbildung 3: Mechanismen der Immunevasion, induziert durch eine HPV-Infektion .....	13
Abbildung 4: Vergleich der Eigenschaften von Gewebestammzellen (A) mit Tumorstammzellen (B) .....	22
Abbildung 5: Vergleich der Effekte einer fehlgeschlagenen konventionellen Therapie mit dem Ergebnis einer hypothetischen TSZ-gerichteten Immuntherapie.....	24
Abbildung 6: Modell der Wirkungsweise einer TSZ-gerichteten Immuntherapie unter Berücksichtigung der TSZ- und EMT-Hypothese .....	100

### **2. Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Wichtige Marker von Tumorstammzellen .....	19
Tabelle 2: Eigenschaften von TSZ .....	20

## **Danksagung**

Frau PD Dr. Minoo Lenarz danke ich ganz herzlich dafür, dass sie mir als Direktorin der Hals-Nasen-Ohrenklinik am Campus Benjamin Franklin, die Möglichkeit gegeben hat, meine Habilitationsarbeit in Ihrer Abteilung abzuschließen und für die Unterstützung dabei.

Herrn PD Dr. Andreas Kaufmann danke ich für die vielen fruchtbaren Diskussionen, die fortwährende Unterstützung, Ermunterung im richtigen Moment und den Spaß, den wir bei der Arbeit haben!

Ich danke allen meinen bisherigen Mentoren - Tomislav (Mischa) Dorbic, Prof. Dr. Burkhard Wittig, Prof. Dr. Michael T. Lotze, Prof. Dr. Albert B. DeLeo, Prof. Dr. Theresa Whiteside Prof. Dr. Robert L. Ferris, Prof. Dr. Barbara Wollenberg, Prof. Dr. Hans Scherer, Prof. Dr. Manfred Gross, Dr. Hade Vuyk, Prof. Gilbert Nolst-Trenité, Dr. Dirk-Jan Menger, Prof. Dr. Sergije Jovanovic, PD Dr. Minoo Lenarz und PD Dr. Andreas M. Kaufmann - die mich auf meinem bisherigen wissenschaftlichen und zum Teil auch klinischen Werdegang begleitet haben, für den vorgelebten Enthusiasmus für Wissenschaft und den Ansporn immer die beste Therapie für unser Patienten zu finden.

Meinen Kollegen und Doktoranden danke ich für die gute und produktive Zusammenarbeit und das entgegengebrachte Vertrauen.

Mein Dank gilt allen Patienten für die vertrauensvolle Überlassung von Materialien und Informationen, ohne die unsere Forschung nicht möglich gewesen wäre.

Meiner Familie danke ich für Unterstützung, Geduld und Ablenkung im richtigen Augenblick!

## Erklärung

### § 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, 10.3.2013

.....

Datum

.....

Unterschrift