

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

DISSERTATION

Messung zellulärer Immunantworten im Rahmen der  
prophylaktischen Impfung gegen Humane Papillomviren

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anne Katrin Ramseger

aus Münster

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. A. Kaufmann  
2. Prof. Dr. med. C. Scheibenbogen  
3. Prof. Dr. rer. nat. L. Gissmann

Datum der Promotion: 03.09.2010

# Inhalt

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>HPV-Infektion.....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Virologie .....	1
1.1.2	Epidemiologie.....	2
1.1.3	Ätiopathogenese .....	3
1.1.4	HPV-assoziierte Erkrankungen.....	5
1.1.4.1	Cervikale intraepitheliale Neoplasie und invasives Zervixkarzinom .....	5
1.1.4.2	Condylomata acuminata .....	6
<b>1.2</b>	<b>Prophylaktische HPV-Impfstoffe .....</b>	<b>7</b>
1.2.1	Gardasil® .....	7
1.2.2	Cervarix® .....	9
<b>1.3</b>	<b>Gardasil®-induzierte protektive Immunität .....</b>	<b>10</b>
1.3.1	Humorale Immunität.....	10
1.3.2	Zelluläre Immunität und deren Bedeutung.....	12
<b>1.4</b>	<b>Fragestellung.....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>METHODEN.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1</b>	<b>Gardasil®-Studie .....</b>	<b>17</b>
2.1.1	Ablauf der Querschnittsstudie .....	17
2.1.2	Ablauf der integrierten Longitudinalstudie.....	19
<b>2.2</b>	<b>Ex vivo Assay zur Bestimmung spezifischer T-Helfer-Zellen .....</b>	<b>19</b>
2.2.1	Etablierung des Assays.....	19
2.2.1.1	Hintergrund .....	19
2.2.1.2	Auswahl des Probenmaterials .....	20
2.2.1.2.1	Kryokonservierte periphere Blutlymphozyten .....	20
2.2.1.2.2	Frisch aufgearbeitete periphere Blutlymphozyten .....	21
2.2.1.2.3	Vollblut .....	22
2.2.1.3	Verwendete Stimulationsantigene .....	22
2.2.1.4	Brefeldin A .....	25
2.2.1.5	Versuchskinetik und Stimulationsdauer .....	26
2.2.1.6	Auswahl der Färbung.....	27
2.2.1.7	Bestätigung des Assays mittels Interobservervarianz .....	28
2.2.2	Ablauf des etablierten Assays und verwendete Materialien .....	30
2.2.2.1	Probengewinnung .....	30
2.2.2.2	Antigenstimulation und Zellkultur.....	30
2.2.2.3	Lyse und Fixierung.....	31
2.2.2.4	Färbung.....	32
2.2.2.5	Durchflusszytometrische Messung .....	33
2.2.2.6	Durchflusszytometrische Auswertung.....	33
<b>2.3</b>	<b>Serologischer Multiplex-Assay zur Bestimmung spezifischer Antikörper .....</b>	<b>34</b>
<b>2.4</b>	<b>Fragebogen.....</b>	<b>34</b>
<b>2.5</b>	<b>Statistische Auswertung .....</b>	<b>36</b>

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>39</b>
<b>3.1</b>	<b>Ergebnisse der Gardasil®-Querschnittsstudie</b> .....	<b>39</b>
3.1.1	Charakterisierung des Studienkollektivs .....	39
3.1.1.1	Altersstruktur .....	39
3.1.1.2	Immunologische Auffälligkeiten .....	39
3.1.1.3	Sexualleben .....	39
3.1.1.4	Gynäkologische Anamnese .....	41
3.1.1.5	Zeitpunkt der Blutentnahme .....	42
3.1.1.6	Beobachtete Nebenwirkungen der Gardasil®-Impfung .....	42
3.1.2	Ergebnisse des ex vivo Assays .....	43
3.1.2.1	Nachweis Vakzin-spezifischer T-Helfer-Zellen abhängig vom Impfstatus .....	43
3.1.2.2	Nachweis Vakzin-spezifischer T-Helfer-Zellen abhängig vom HPV-Typ .....	50
3.1.3	Ergebnisse der Multiplex-Serologie .....	52
3.1.3.1	Nachweis Vakzin-spezifischer Antikörper abhängig vom Impfstatus .....	52
3.1.3.2	Nachweis Vakzin-spezifischer Antikörper abhängig vom HPV-Typ .....	55
3.1.4	Korrelation Gardasil®-induzierter zellulärer und humoraler Immunität .....	56
3.1.5	Sonderbeobachtungen bei Probandinnen mit auffälligem HPV-Status .....	58
<b>3.2</b>	<b>Ergebnisse der integrierten Longitudinalstudie</b> .....	<b>63</b>
3.2.1	Studienkollektiv der Longitudinalstudie .....	63
3.2.2	Vakzin-spezifische T-Helfer-Zellen im Impfverlauf .....	63
3.2.3	Vakzin-spezifische Antikörper im Impfverlauf .....	68
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>71</b>
4.1	Direkter Nachweis Gardasil®-induzierter spezifischer T-Helfer-Zellen und Einschätzung von deren Größenordnung .....	71
4.2	Gardasil®-induzierte zelluläre Immunität abhängig vom Impfstatus .....	73
4.3	Gardasil®-induzierte zelluläre Immunität abhängig vom HPV-Typ .....	75
4.4	Vergleich humoraler und zellulärer Immunität .....	79
4.5	Übereinstimmung von Querschnitts- und Longitudinalstudie .....	81
4.6	Limitationen der Methodik .....	83
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>87</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>90</b>
<b>7</b>	<b>ABKÜRZUNGEN</b> .....	<b>96</b>
<b>8</b>	<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>98</b>
<b>9</b>	<b>ERKLÄRUNG</b> .....	<b>99</b>
	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>100</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 HPV-Infektion

### 1.1.1 Virologie

Papillomviren (PV) sind eine Gruppe kleiner, epitheliotroper Viren, die beim Menschen und zahlreichen anderen Wirbeltieren weit verbreitet sind (1).

Sie sind membranlos und bestehen aus einem 55 nm messenden, ikosaedrischen Kapsid, welches sich aus 72 pentameren Kapsomeren zusammensetzt. Die Kapsomere werden von den beiden Strukturproteinen late protein 1 (L1) und late protein 2 (L2) gebildet. L1 und L2 liegen hierbei in einem Verhältnis von 30:1 vor (1).

Das Kapsid enthält das Virusgenom. Im Falle der Papillomviren handelt es sich hierbei um ein kovalent geschlossenes, zirkuläres, doppelsträngiges DNA-Genom, welches ca. 8000 Basenpaare beinhaltet. Das Erbgut des Virus kann in drei Bereiche unterteilt werden: Eine Region kodiert für die frühzeitig im Replikationszyklus gebildeten regulatorischen Proteine, sogenannte „early proteins“ (E-Proteine), eine zweite Region für die oben beschriebenen, spät synthetisierten Strukturproteine L1 und L2. Als dritter Bereich kommt eine nichtkodierende Region (NCR) hinzu, die Kontrollfunktionen bei Transkription und Replikation übernimmt (1;2).

Papillomviren sind wirtsspezifisch, weswegen in der Humanmedizin nur Humane Papillomviren (HPV) von Bedeutung sind (1;3).

Auf Grund von Unterschieden in bestimmten Regionen ihrer DNA-Sequenz sind heute über 130 verschiedene HPV-Typen bekannt (4;5). Über 40 von ihnen können Infektionen des Anogenitaltraktes verursachen (6). Bezüglich ihrer Onkogenität unterscheidet man sogenannte Low-Risk-HPV-Typen, die zu niedriggradigen Dysplasien und anogenitalen Condylomata acuminata führen können, von den High-Risk-HPV-Typen, welche für die Entstehung von hochgradigen Dysplasien und Zervixkarzinomen verantwortlich sind. Zur Low-Risk-Gruppe werden heute die elf HPV-Typen 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 sowie 81 gezählt. Die High-Risk-Gruppe beinhaltet die 13 Vertreter HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 und 66. Für weitere HPV-Typen lässt sich das onkogene Risiko und damit ihre Gruppenzugehörigkeit noch nicht genau einschätzen oder belegen (3;7).

Humane Papillomviren befallen ausschließlich Epithelien der Haut und der Schleimhäute (1;8). Daraus ergibt sich ihre Relevanz für mehrere klinische Disziplinen. Neben der Begründung gynäkologischer Krankheitsbilder spielen sie auch in der Dermatologie, Urologie, Proktologie und der Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde eine wichtige Rolle. In dieser Arbeit soll jedoch der Schwerpunkt auf der gynäkologisch relevanten genitalen HPV-Infektion liegen.

### **1.1.2 Epidemiologie**

HPV-Infektionen gehören weltweit zu den häufigsten sexuell übertragbaren Infektionskrankheiten (9). Ihre Prävalenz in der weiblichen Bevölkerung variiert international zwischen 2% und 44% (6). Wie aus dieser breiten Spannweite bereits ersichtlich, fällt eine genaue Eingrenzung der Prävalenz schwer, da sie abhängig von Alter der Studienpopulation, Sensitivität des DNA-Nachweises sowie soziokultureller Herkunft stark schwankt (9;10). So ergibt eine deutsche Studie an über 8000 Frauen mit einem Alter von 30 Jahren und älter eine Gesamt-HPV-Prävalenz von 5% (High-Risk-Typen 4,3%) (11). Dem gegenüberstellen lässt sich eine US-amerikanische Studie, die bei einer untersuchten Population von über 3000 18- bis 25-jährigen jungen Frauen eine HPV-Prävalenz von 26,9% (High-Risk-Typen 20%) ermittelte (12). Als genereller Anhaltspunkt kann gelten, dass mehr als die Hälfte aller sexuell aktiven Frauen in ihrem Leben zumindest eine Infektion mit mindestens einem HPV-Typ erleiden wird (6).

Dem sollte hinzugefügt werden, dass die meisten HPV-Infektionen transient verlaufen und nach ca. 4 bis 20 Monaten spontan ausheilen (13). Eine kürzlich veröffentlichte Nachbeobachtungsstudie an 147 HPV-infizierten US-amerikanischen Studentinnen zeigte, dass nur bei 16% drei bis zwölf Jahre später eine persistierende Infektion nachgewiesen werden konnte (14).

Betrachtet man die Prävalenz typspezifischer HPV-Infektionen, dominiert HPV 16, das bis zu ein Viertel aller genitalen Infektionen mit Humanen Papillomviren verursacht. Weitere häufig nachgewiesene Typen sind HPV 18, 31 und 45, welche anteilig von 3% bis 10% für Infektionen verantwortlich sind (7;11).

Da die meisten Infektionen mit Humanen Papillomviren schon relativ kurz nach Aufnahme sexueller Aktivität auftreten, weisen HPV-Infektionen einen Altersgipfel im jungen Erwachsenenalter (25 Jahre und jünger) auf. Mit zunehmendem Alter fällt die HPV-

Prävalenz zunächst stark ab, um dann – zumindest gemäß einiger Studien – einen zweiten Anstieg perimenopausal zu verzeichnen, welcher sich evtl. auf eine Reaktivierung einer latenten Infektion oder einen späteren Partnerwechsel zurückführen lässt (6;8;13).

### **1.1.3 Ätiopathogenese**

Die Übertragung von Humanen Papillomviren erfolgt über direkten Hautkontakt, wobei sexuelle Kontakte den Hauptinfektionsweg anogenitaler HPV-Typen darstellen. Seltener ist jedoch auch eine Transmission über kontaminierte Gegenstände sowie perinatal von der infizierten Mutter auf das Neugeborene beschrieben (8;9).

Studien zeigen, dass sich bereits innerhalb von zwei Jahren nach Aufnahme sexueller Kontakte rund ein Drittel aller Frauen mit Humanen Papillomviren infiziert (8). Eine dänische Studie an 100 Jungfrauen kam zu dem Ergebnis, dass bei Teilnehmerinnen, die im Studienverlauf sexuelle Kontakte aufnahmen, nach vier Jahren zu 35% HPV-DNA nachweisbar war, während bei keiner der Probandinnen, die weiterhin abstinent lebten, ein positives Testergebnis zu verzeichnen war (15).

Das Risiko eine HPV-Infektion zu erleiden korreliert stark mit der Anzahl der Sexualpartner. In mehreren Studien wurde die steigende Anzahl der Sexualpartner als Hauptrisikofaktor determiniert (15;16;17;18). Hinzu kommt, dass auch die zunehmende Zahl der Sexualpartner des eigenen Partners entscheidend zum Risiko sich mit HPV zu infizieren beiträgt (16). Für weitere mögliche Risikofaktoren wie z. B. Nikotinabusus, orale Kontrazeption, Kondomverzicht oder Erkrankung an anderen sexuell übertragbaren Infektionen ist die Studienlage teilweise widersprüchlich und es konnten zumindest keine starken Assoziationen über mehrere Studien hinweg nachgewiesen werden (6;13).

Nach Übertragung des Virus über oben beschriebene Wege erfolgt zunächst eine Infektion der Zellen des Stratum basale des Epithels der Haut oder der Schleimhäute. Der weitere HPV-Replikationszyklus verläuft eng gekoppelt an den Differenzierungsgrad des Epithels. Nach Integration der Virus-DNA ins Wirtszellgenom werden zunächst die frühen HPV-Proteine exprimiert, begonnen mit den Replikationsfaktoren E1 und E2, mit deren Hilfe das Virusgenom auf einige hundert Kopien pro Zelle vermehrt wird. Da die sich teilenden Zellen des Stratum basale ein physiologisches Reservoir für suprabasale Zellschichten darstellen und diese kontinuierlich regenerieren, steigt das sich vermeh-

rende Virus mit den sich differenzierenden Zellen weiter ins Stratum spinosum und granulosum auf. Hier erfolgt jetzt auch die vermehrte Expression der Virus-Onkogene E6 und E7. E7 inaktiviert wichtige Regulatoren im Wirtszellzyklus, v. a. das Tumorsuppressorprotein Rb, und induziert so die vermehrte Replikation der Wirtszell-DNA. E6 unterstützt diesen Vorgang, indem es der Apoptose der Wirtszelle, hauptsächlich durch Inaktivierung des zellulären Tumorsuppressors p53, entgegenwirkt. In den oberen Zelllagen werden schließlich auch die Strukturproteine L1 und L2 gebildet und komplette, infektiöse Viruspartikel letztendlich mit dem Absterben der Keratinozyten im Stratum corneum freigesetzt (1;2;8;19).

Wie bereits erwähnt, ist das Immunsystem meist in der Lage die beschriebene Infektion erfolgreich zu eliminieren. Dies erfolgt in erster Linie mittels spezifischer CD4<sup>+</sup> T-lymphozytär vermittelter zytotoxischer Immunreaktion gegen die Virusproteine E2 und E6. Später kommt es zur Bildung spezifischer Antikörper (AK) gegen das Hauptstrukturprotein L1 (4). Diese Ausbildung einer humoralen Immunität ist allerdings nach einer natürlichen HPV-Infektion nur in sehr geringem Maße ausgeprägt, oft ist keine Seroconversion nachweisbar (20).

In 10% bis 20% der Fälle gelingt es dem Virus jedoch sich langfristig im Körper zu etablieren (4;14). Die daraus resultierende persistierende Infektion hat mehrere Ursachen. Bedingt durch den natürlichen Regenerationszyklus des Epithels gelangen auch kontinuierlich infektiöse Viruspartikel aus dem „Reservoir“ Basalzellschicht an die Oberfläche der Epithelien. Die Infektion regeneriert sich so ständig von Neuem (1). Da Papillomviren jedoch strikt epitheliotrop sind und auch im Verlauf der Infektion keine Virämie erfolgt, fällt dem Immunsystem die Erkennung schwer. Hinzu kommt, dass die professionell antigenpräsentierenden Zellen (APC) des Plattenepithels, die sogenannten Langerhans-Zellen, in Gegenwart von HPV nicht aktiviert werden und somit auch die adaptive zelluläre Immunität nur erschwert initialisiert wird. Zuletzt sei noch erwähnt, dass die HPV-Onkoproteine E6 und E7 auch inhibierend auf die Synthese und die Signaltransduktionswege der potenten antiviralen Interferone  $\alpha$  und  $\beta$  wirken und so dem Virus die Unterdrückung der Immunantwort ermöglichen (4).

Die persistierende Infektion ist Hauptursache für die im Folgenden beschriebenen HPV-assoziierten Erkrankungen (8;9;21;22).



## **1.1.4 HPV-assoziierte Erkrankungen**

### **1.1.4.1 Cervikale intraepitheliale Neoplasie und invasives Zervixkarzinom**

In Deutschland erkranken jährlich etwa 6200 Frauen an einem invasiven Karzinom der Zervix uteri (23). Bei den Krebserkrankungen der Frau steht das Zervixkarzinom damit bundesweit an elfter Stelle, weltweit stellt es aber sogar das zweithäufigste Malignom der weiblichen Bevölkerung dar (6;23). Im Jahr 2006 verstarben in Deutschland 1492 Frauen an den Folgen eines Zervixkarzinoms (24).

Invasive Karzinome der Zervix uteri weisen einen ersten Erkrankungsgipfel in der Altersgruppe der 35- bis 54-Jährigen sowie einen zweiten Altersgipfel etwa ab dem 65. Lebensjahr auf (23). Ihre Vorstufen, die sogenannten Cervikalen Intraepithelialen Neoplasien (CIN), zeigen sich bereits früher im Leben der Frau, meist zwischen dem 25. und 35. Lebensjahr (25).

Die Ätiologie und Pathogenese des Zervixkarzinoms und seiner Vorstufen sind in weiten Teilen erforscht. Hauptursache der Malignomentstehung ist die persistierende Infektion des Epithels der Transformationszone der Zervix uteri mit Humanen Papillomviren der High-Risk-Gruppe (26). In mehr als 95% aller Karzinome ist HPV-DNA nachweisbar. Auf Grund ihrer Häufigkeit muss man die Virus-Typen HPV 16, welches in 50% bis 60% der Fälle gefunden wird, sowie HPV 18, das für 10% bis 20% der Karzinome ursächlich ist, besonders hervorheben. Generell können aber alle High-Risk-Typen zur Krebsentstehung führen (7).

Der Übergang von der persistierenden HPV-Infektion zur malignen Transformation der Keratinozyten ist ein multifaktorielles Geschehen und noch nicht abschließend geklärt. Im Rahmen der Jahre andauernden Infektion kommt es auf Grund einer Deregulation zu einer Überexpression von E6 und E7. Die oben beschriebenen Mechanismen der gesteigerten Zellproliferation durch Rb-Inhibition sowie der verhinderten Apoptose-Induktion durch p53-Inaktivierung fallen so stärker ins Gewicht. Zudem verursachen E6 und E7 im Rahmen der persistierenden Infektion eine genetische Instabilität der Wirtszelle. In Kooperation führen die beiden Virus-Onkoproteine zu Veränderungen des Zentrosoms, einer für den Zellzyklus und die Chromosomenverteilung wichtigen Zellorganelle. Hierdurch werden mitotische Defekte und eine mögliche Aneuploidie des Wirtszellgenoms begründet (27).

Transformierte Keratinozyten führen in ihrem Gewebsverband zu präkanzerösen Veränderungen. Je nachdem welche Schichten des Zervixepithels bereits von Atypien und Differenzierungsstörungen betroffen sind, spricht man von der Cervikalen Intraepithelialen Neoplasie I, II oder III. Die CIN I ist als leichte Dysplasie auf das basale Drittel begrenzt, während die mittelschwere CIN II auch das mittlere Drittel befällt. Die CIN III, die sowohl die schwere Dysplasie als auch das Carcinoma in situ der Zervix beschreibt, ist auf das gesamte Epithel von basal bis apikal ausgebreitet, jedoch ist die Basalmembran, im Gegensatz zum invasiven Karzinom, intakt. Allen drei Vorläuferläsionen ist gemein, dass sie nicht metastasieren und spontan regressionsfähig sind (28).

Für ein bis zwei Drittel der Patientinnen mit höhergradigen Dysplasien ist unbehandelt ein Fortschreiten zum invasiven, metastasierenden Zervixkarzinom beschrieben (6).

Diese vergleichbar langsame Karzinogenese über verschiedene Vorstufen macht sich die Sekundärprävention zu Nutze. Im Rahmen des gesetzlichen Krebsfrüherkennungsprogramms hat jede Frau ab dem 20. Lebensjahr Anspruch auf eine jährliche Abstrichuntersuchung von Portiooberfläche und Zervixkanal (8;29). Zytologische Auffälligkeiten werden so detektiert und können ggf. genauer nachuntersucht werden (29). Mit Einführung dieses Screenings wurden Inzidenz und Mortalität des Zervixkarzinoms um bis zu 75% gesenkt (30). Es bleibt aber anzumerken, dass Screeninguntersuchungen, im Gegensatz zur unten beschriebenen Primärprävention durch Impfung, nicht kausal die Krebsentstehung verhindern können, sondern nur bereits entstandene Vorläuferläsionen aufdecken (8).

#### **1.1.4.2 Condylomata acuminata**

Condylomata acuminata sind gutartige Tumoren des äußeren Genitales, die ca. 1% der sexuell aktiven Bevölkerung betreffen. Sie werden häufig schon bei sehr jungen Patientinnen diagnostiziert, die meisten Erkrankungen treten zwischen dem 20. und 24. Lebensjahr auf (9).

Genauso wie das maligne Karzinom der Zervix sind auch die benignen Condylome auf eine persistierende HPV-Infektion zurückzuführen (13). Es handelt sich hierbei allerdings meistens um eine Infektion mit den HPV-Typen der Low-Risk-Gruppe, in erster Linie HPV 6 und HPV 11, die in bis zu 90% aller Condylome gefunden werden (22).

Auf Grund von Unterschieden in der Pathogenese von High-Risk- und Low-Risk-HPV-Infektion können Condylomata acuminata nicht entarten. Dies liegt in erster Linie an der verschiedenen Funktionsweise der viralen Onkogene. So bindet das E6 des Low-Risk-Virus weniger effizient an p53 und führt nicht zu einer vollständigen Degradierung. Auch die Inaktivierung von Rb durch das Low-Risk-E7 verläuft nur inkomplett, eine Destabilisierung gelingt nicht. Des Weiteren induzieren die Onkogene keine Instabilität des Genoms, weswegen es ausschließlich zur Proliferation, nicht aber zur malignen Transformation kommt (27).

Obwohl anogenitale Condylome als harmlos anzusehen sind, werden sie von den Patientinnen häufig als psychosozial sehr belastend empfunden (9).

## **1.2 Prophylaktische HPV-Impfstoffe**

### **1.2.1 Gardasil®**

Zusätzlich zu der bereits seit über 30 Jahren etablierten Sekundärprävention durch zytologische Kontrollen wurde vor ca. zweieinhalb Jahren mit Einführung der prophylaktischen Vakzine Gardasil® als Primärprävention ein zweites Standbein in der Vorbeugung HPV-induzierter Erkrankungen geschaffen. Gardasil® wurde im September 2006 als erster prophylaktischer Impfstoff zur Verhinderung von HPV-Infektionen für die Mitgliedsländer der Europäischen Union (EU) zugelassen und ist seitdem auch auf dem deutschen Arzneimittelmarkt erhältlich (31).

Die hauptimmunogene Komponente des Totimpfstoffes stellen hochgereinigte sogenannte „virus-like particles“ (VLP) dar, die aus dem HPV-Kapsidprotein L1 aufgebaut sind. VLP entsprechen einem leeren, genomlosen Viruskapsid und können deswegen weder humane Zellen infizieren noch replizieren. Sie werden mittels rekombinanter DNA-Technologie in Hefezellen des Stammes *Saccharomyces cerevisiae* hergestellt. Eine Einzeldosis Gardasil® von 0,5 ml enthält jeweils 20 µg VLP der HPV-Typen 6 und 18 sowie jeweils 40 µg VLP von HPV 11 und 16. Gardasil® wird auf Grund dieses Erregerspektrums als quadrivalente Vakzine angesehen. Zur Verstärkung der Immunogenität sind die VLP der vier HPV-Typen an 225 µg Aluminiumhydroxyphosphatsulfat als Adjuvans adsorbiert (32).

Der Wirkmechanismus von Gardasil® beruht auf der Induktion neutralisierender Serum-AK, die im Falle einer Übertragung von HPV 6, 11, 16 oder 18 eine Infektion der Epi-

thelzellen durch Bindung an das Viruskapsid verhindern (4;8). Eine genauere Beschreibung dieser Vakzin-induzierten humoralen Immunität folgt im nächsten Kapitel (vgl. Kap. 1.3.1).

Die Wirksamkeit von Gardasil® wurde in vier placebokontrollierten, doppelblinden, randomisierten klinischen Studien der Phase II und III an insgesamt über 20000 16- bis 26-jährigen jungen Frauen bewertet. Endpunkte der Studien waren persistierende Infektionen mit HPV 6, 11, 16 und 18, Impfstofftyp-assoziierte intraepitheliale Neoplasien von Zervix, Vagina (VAIN) und Vulva (VIN) sowie genitale Condylome. Aus ethischen Gründen wurde auf den Studienendpunkt invasives Zervixkarzinom verzichtet. Bei Analyse der vollständig vakzinierten Probandinnen, die zu Beginn seronegativ und DNA-negativ für die Impfstofftypen waren, konnte bewiesen werden, dass sämtliche Vakzintyp-assoziierten Läsionen ausschließlich in den Placebogruppen auftraten und vom Impfstoff mit 100%iger Effektivität verhindert werden konnten (33;34;35;36).

Nach Einschluss aller Probandinnen unabhängig vom ursprünglichen HPV-Status zeigte der Impfstoff bei der Vermeidung Vakzintyp-assoziiierter Läsionen in einem Beobachtungszeitraum von drei Jahren noch eine Wirksamkeit von über 40% (34;35;36).

Auf Grund dieser Daten und der im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Häufigkeitsverteilung der einzelnen HPV-Typen als Krankheitsauslöser (vgl. Kap. 1.1.4) kann man davon ausgehen, dass bei prophylaktischer Impfung ca. 90% der Condylomata acuminata und 70% aller Zervixkarzinome verhindert werden können (8).

Daten zur Dauer des Impfschutzes ergeben sich aus Nachbeobachtungen der oben genannten Effektivitätsstudien. Derzeit kann für einen Impfschutz mit 100%iger Effektivität eine Dauer von mindestens fünf Jahren angegeben werden (37). Für einen längeren Zeitraum und ggf. nötige Wiederauffrischungsimpfungen liegen bisher noch keine Ergebnisse vor (8).

In zwölf placebokontrollierten klinischen Studien wurden Sicherheit und Verträglichkeit von Gardasil® und seinen Vorläufern analysiert. Insgesamt traten Nebenwirkungen häufiger in den Verumgruppen als in den Placebogruppen auf (38). Bei den häufigsten unerwünschten Arzneimittelwirkungen (UAW) handelte es sich um lokale Beschwerden wie Schmerzen, Schwellung und Rötung an der Injektionsstelle, die bei über 10% aller Probandinnen zu beobachten waren. Als häufige systemische Nebenwirkungen sind

Fieber, Kopfschmerz und Übelkeit zu nennen. Schwerwiegendere UAW wie z. B. Bronchospasmus, Anaphylaxie oder autoimmunologische Phänomene traten nur in sehr seltenen Einzelfällen auf (8;32). Eine Bewertung der möglichen Assoziation mit der Impfung sowie eine Abschätzung der Häufigkeit kann erst in folgenden Phase IV-Studien erfolgen (8).

Auf Grund der überzeugenden Daten zu Effektivität und Sicherheit der Impfung empfiehlt die Ständige Impfkommission (STIKO) am Robert-Koch-Institut (RKI) seit März 2007 die dreimalige Vakzinierung aller Mädchen im Alter von 12 bis 17 Jahren. Der Impfstoff Gardasil® sollte hierbei zu den Zeitpunkten 0, 2 und 6 Monate appliziert werden, wobei die dritte Dosis möglichst vor Aufnahme erster sexueller Kontakte verabreicht werden sollte, um eine 100%ige Effektivität des Impfschutzes zu erreichen (39).

Für ältere Frauen existiert keine generelle Impfempfehlung. Abhängig vom Sexualverhalten und HPV-Status können sie aber ebenfalls von der Impfung profitieren (39). Wie bereits erwähnt, sind ca. drei Jahre nach Aufnahme des Sexuallebens etwa ein Drittel der Patientinnen HPV-positiv, d. h. zwei Drittel erreichen durch Impfung auch zu diesem Zeitpunkt noch einen kompletten Schutz vor Infektionen mit den Vakzin-Typen. Des Weiteren können selbst Patientinnen, die z. B. an Infektionen mit drei der vier Impfstoff-Typen leiden, durch prophylaktische Impfung einen Schutz vor Läsionen des verbleibenden HPV-Typs erlangen (40).

### **1.2.2 Cervarix®**

Der Vollständigkeit halber soll darauf hingewiesen werden, dass seit September 2007 mit dem Präparat Cervarix® ein zweiter prophylaktischer HPV-Impfstoff in den EU-Staaten zugelassen ist (41).

Cervarix® ist eine bivalente Vakzine, die jeweils 20 µg VLP der beiden karzinogenen HPV-Typen 16 und 18 enthält und somit ausschließlich der Prophylaxe von intraepithelialen Neoplasien und Karzinomen, nicht aber der Prävention von Condylomen dient (8). Als weiterer Unterschied zu Gardasil® ist das zusätzliche Adjuvans AS04, ein Bestandteil bakterieller Zellwand, zu nennen, durch welches höhere AK-Titer generiert werden können (42).

Im Rahmen dieser Arbeit wird auf die Vakzine Cervarix<sup>®</sup> nicht weiter im Detail eingegangen werden, da sämtliche experimentellen Ergebnisse an Material von Gardasil<sup>®</sup>-geimpften Probandinnen erzielt wurden.

### **1.3 Gardasil<sup>®</sup>-induzierte protektive Immunität**

#### **1.3.1 Humorale Immunität**

Wie im vorangegangenen Kapitel bereits erwähnt, beruht der Schutz prophylaktischer HPV-Impfstoffe auf der Initialisierung einer körpereigenen Anti-L1-Antikörper-Produktion (4;8). Nach intramuskulärer Injektion werden die VLP der Vakzine von zirkulierenden dendritischen Zellen phagozytiert und nach Migration in die regionären Lymphknoten dort naiven CD4-positiven T-Lymphozyten mittels ihres MHC II präsentiert (4;43). Die T-Zellen (TZ) werden aktiviert und haben die Möglichkeit sich zu T-Helfer-Zellen vom Typ 1 (T<sub>H</sub>1) und 2 (T<sub>H</sub>2) zu differenzieren. Nach Interaktion von T<sub>H</sub>2-Zellen mit B-Lymphozyten, die ebenfalls schon mit den VLP der Vakzine Kontakt hatten, werden letztere befähigt sich zu Antikörper produzierenden Plasmazellen umzuwandeln (43). Von den Plasmazellen synthetisierte Anti-L1-Antikörper zirkulieren dann einerseits im Blut, andererseits werden sie auch direkt ins Vaginalsekret sezerniert. Zusätzlich gelangen sie durch Transsudation direkt ins basale Epithel (44).

In mehreren Studien wurden Titer der beschriebenen AK bestimmt, um die Immunogenität der Vakzine Gardasil<sup>®</sup> zu bewerten. Es wurden sowohl junge Frauen im Alter von 16 bis 23 Jahren als auch Mädchen und Jungen von 9 bis 15 Jahren rekrutiert (34;37;45;46).

Bei allen Probanden zeigte sich einen Monat nach der dritten Impfung eine Serokonversionsrate von über 99% für alle vier HPV-Typen (34;45;46). Die nachgewiesenen AK-Titer lagen im Bereich von mehr als das Hundertfache über denen, die nach einer natürlichen Infektion mit einem der vier HPV-Typen gemessen wurden (34;45).

Betrachtet man die AK-Titer im Verlauf, lässt sich zunächst nach erster und zweiter Impfung ein starker Anstieg verzeichnen. Bereits vor der letzten Immunisierung beginnen die erlangten Titer zu fallen. Dies wird durch die dritte Impfung jedoch abgefangen, um schließlich ein Maximum zum Zeitpunkt sieben Monate zu erreichen. Für HPV 6, 11 und 16 bleibt eine Seropositivität von mindestens 94% über mehr als 36 Monate bestehen, während der Anti-HPV 18-Titer bereits innerhalb der ersten 24 Monate stark abfällt

und sich schließlich nicht mehr signifikant von dem einer natürlichen HPV 18-Infektion unterscheidet. Zusätzlich sollte erwähnt werden, dass in den Verumgruppen trotz fallender Anti-HPV 18-Titer keine HPV 18-Infektionen oder durch diesen Typ verursachte Läsionen nachgewiesen wurden (45).

Nach heutigem Kenntnisstand kann für Gardasil® bisher keine protektive Mindest-Antikörperkonzentration festgelegt werden, bei deren Unterschreiten eine Wiederauffrischung sinnvoll wäre (8).

Auf Grund der exzellenten Immunogenität der Vakzine stellte sich des Weiteren die Frage, ob die detektierten AK rein typspezifisch sind oder ob sie möglicherweise mit weiteren HPV-Typen als den vier im Impfstoff enthaltenen Typen kreuzreagieren. Normalerweise sind AK-Populationen auf Grund der strukturellen Komplexität des Antigens mit mehreren immunogenen Epitopen heterogen, weswegen einzelne Subpopulationen auch mit strukturverwandten anderen Antigenen Bindungen eingehen (4). Die L1-Proteine der Humanen Papillomviren zeichnen sich als Antigene durch einen hohen Grad an Homologie aus. So sind sich z. B. die Aminosäuresequenzen der L1-Proteine von HPV 18 und 45 sowie von HPV 16 und 31 sehr ähnlich (47). Trotzdem lassen sich nach natürlichen Infektionen nur Infektionstyp-spezifische AK nachweisen, was möglicherweise auf die ohnehin eher schwache natürliche Immunogenität der Humanen Papillomviren zurückzuführen ist (4). Im Gegensatz dazu wurde nach prophylaktischer HPV-Impfung, welche mit weit höheren AK-Titern einhergeht, eine Kreuzreaktivität gegen die nicht in Gardasil® enthaltenen karzinogenen HPV-Typen 31, 45, 52 und 58 gezeigt (47). In klinischen Studien konnte jedoch für Gardasil® nur bezüglich der Verhinderung von HPV 31-assoziierten CIN eine statistisch signifikante Wirksamkeit von 55,6% gezeigt werden. Für die anderen drei genannten HPV-Typen ergibt sich aus der Kreuzreaktivität keine (HPV 45) oder keine signifikante (HPV 52 und 58) Kreuzprotektion (32). Für das Schwesterpräparat Cervarix® ist sowohl eine Kreuzreaktivität als auch eine Kreuzprotektion vor Infektionen mit den mit HPV 16 bzw. 18 phylogenetisch nahe verwandten HPV-Typen 31 bzw. 45 bewiesen. Harper et al. 2006 konnten eine Effektivität der Vakzine von 94% bezüglich der Verhinderung von HPV 45-Infektionen sowie eine Wirksamkeit von immerhin 54% gegen Infektionen mit HPV 31 zeigen (48;49).

### 1.3.2 Zelluläre Immunität und deren Bedeutung

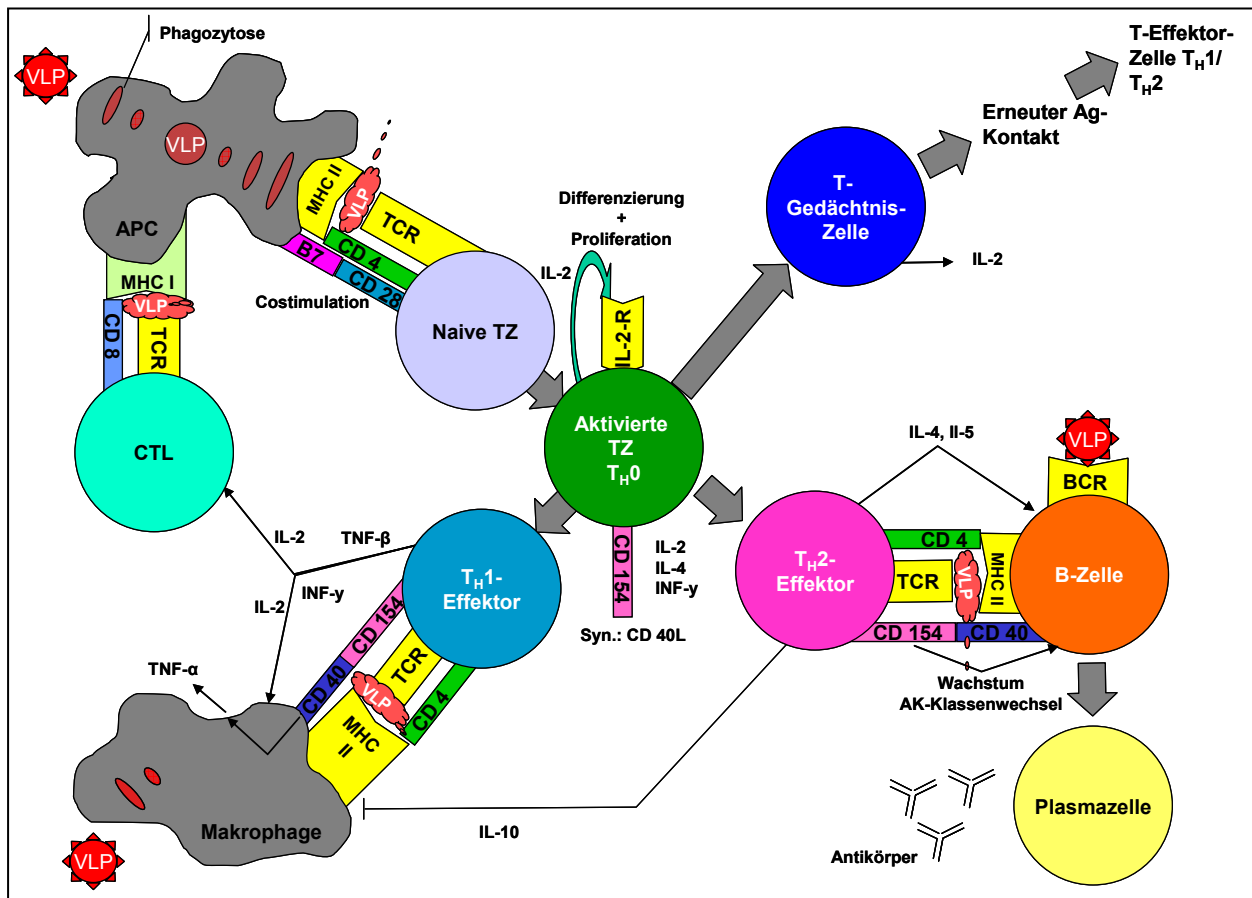
Die bisherigen Erkenntnisse bezüglich der Pharmakodynamik prophylaktischer HPV-Impfstoffe konzentrieren sich auf die Vermittlung einer humoralen Immunität durch neutralisierende AK. Damit ist aber nur ein bedeutsamer Bereich des immunologischen Wirkmechanismus abgedeckt, da sowohl bei natürlichen Virusinfektionen als auch bei prophylaktischen Impfungen zellulär vermittelte Immunreaktionen von großer Relevanz sind (4;43;50;51).

Die wichtigsten Vermittler zellulärer Immunität stellen die T-Lymphozyten dar. Abbildung 1 gibt einen Überblick über die wichtigsten immunologischen Abläufe im T-Zell-System. Je nach Ausstattung mit verschiedenen Oberflächenmarkern werden T-Lymphozyten in CD4-positive und CD8-positive TZ unterteilt. Zytotoxische CD8<sup>+</sup> TZ können durch Antigen-Präsentation über MHC I von jeder kernhaltigen Körperzelle aktiviert werden und schließlich virusinfizierte oder entartete Zellen direkt lysieren. Detaillierter soll an dieser Stelle nicht darauf eingegangen werden, da im Rahmen dieser Arbeit der Fokus auf der Darstellung CD4<sup>+</sup> TZ liegt. Letztere werden, wie bereits im vorhergehenden Kapitel erwähnt, durch Interaktion mit den APC aktiviert. Hierfür bedarf es einer Bindung des Komplexes MHC II plus prozessiertes Antigen seitens der APC an den T-Zellrezeptor (TCR) und das CD4 auf Seite der TZ. Zusätzlich ist eine Kostimulation über das Oberflächenmolekül CD28 der TZ notwendig. Aktivierte CD4<sup>+</sup> TZ exprimieren bereits wenige Stunden nach Stimulation das Molekül CD154, auch CD40 Ligand genannt. Es handelt sich hierbei um ein Glykoprotein aus der Tumornekrosefaktor-Familie, welches als Aktivierungsmarker der Antigen-spezifischen TZ gelten kann (52). Des Weiteren regen TZ ihre eigene Differenzierung und Proliferation durch autokrine Sekretion von Interleukin-2 (IL-2) an (43).

Aktivierte TZ können nun auf verschiedene Art und Weise in Abwehrvorgänge eingreifen (vgl. Abbildung 1). Bei Differenzierung zur T-Helfer-Zelle vom Typ 1 (T<sub>H</sub>1) erfolgt in erster Linie eine Aktivierung von Makrophagen. Auf Rezeptorebene findet die Interaktion zwischen Makrophage und TZ zum einen, wie oben beschrieben, über den Komplex MHC II und TCR / CD4 statt. Zum anderen bindet die T<sub>H</sub>1-Zelle mit CD154 an das von Makrophagen exprimierte CD40. Zusätzlich sezernieren T<sub>H</sub>1-Zellen lösliche Zytokine, v.a. Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), Tumornekrosefaktor- $\beta$  (TNF- $\beta$ ) und IL-2, mit deren Hilfe



wiederum auch zytotoxische CD8<sup>+</sup> TZ-vermittelte Abwehrvorgänge initialisiert werden können (43;50).



**Abbildung 1: T-Lymphozyten als Vermittler zellulärer Immunität.** Überblick über wichtige immunologische Abläufe im T-Zell-System. VLP = *engl.* virus-like particle, APC = *engl.* antigen-presenting cell, MHC = *engl.* major histocompatibility complex, TZ = T-Zelle, TCR = *engl.* T cell receptor, CTL = *engl.* cytotoxic T lymphocyte, T<sub>H</sub>0/1/2 = T-Helfer-Zelle vom Typ 0/1/2, BCR = *engl.* B cell receptor, AK = Antikörper, Ag = Antigen, INF-γ = Interferon-γ, TNF-α/β = Tumornekrosefaktor-α/β, IL-2, -4, -5, -10 = Interleukin-2, -4, -5, -10, IL-2-R = Interleukin-2-Rezeptor.

Aus einer möglichen Entwicklung der aktivierten TZ zur T<sub>H</sub>2-Zelle resultiert mittels B-Zellaktivierung, wie im letzten Kapitel schon beschrieben, eine Verbindung zum humoralen Immunsystem. Die Zellen treten hierbei über die gleichen Rezeptoren in Kontakt, es wird aber im Gegensatz zur T<sub>H</sub>1-Antwort v. a. Interleukin-4 (IL-4) und Interleukin-5 (IL-5) sezerniert (43).

Neben diesen beiden Möglichkeiten als Effektorzellen direkt in Abwehrvorgänge einzugreifen, können aktivierte TZ aber auch als langlebige T-Gedächtniszellen für eine jahrelang anhaltende zelluläre Immunität sorgen (vgl. Abbildung 1). Gedächtniszellen sezernieren hauptsächlich IL-2. Sie können sich nach erneutem Antigenkontakt sehr schnell in die jeweiligen Effektorzellen umwandeln und so schneller und effektiver als

naive TZ Abwehrvorgänge gegen das dem Immunsystem schon bekannte Antigen einleiten. Zusammen mit B-Gedächtniszellen können T-Gedächtniszellen so nach Impfungen oder ausgeheilten natürlichen Infektionen für einen wirksamen Schutz vor dem entsprechenden Erreger sorgen, obwohl AK und Effektorzellen bereits nicht mehr vorhanden sind (43;51).

Wie weiter oben bereits erwähnt, erfolgt auch die Eliminierung einer natürlichen HPV-Infektion in erster Linie durch eine spezifische zelluläre Immunantwort. CD4-vermittelt werden zytotoxische CD8<sup>+</sup> TZ aktiviert, die virusinfizierte Zellen direkt lysieren können (4). Damit im Einklang steht auch die Erkenntnis, dass HIV-positive Patientinnen mit einer verminderten Anzahl CD4<sup>+</sup> TZ häufiger an HPV-assoziierten Neoplasien erkranken als immunkompetente Frauen (53).

Im Gegensatz dazu ist die Bedeutung des zellulären Immunsystems in Bezug auf die prophylaktische HPV-Impfung noch weitgehend unklar. Die Zulassungsstudien begrenzten sich auf Wirksamkeit, Sicherheit und humorale Immunogenität, VLP-spezifische TZ wurden bisher nicht bestimmt. Es gibt aber einige Anhaltspunkte, die die Relevanz CD4-vermittelter Immunreaktionen nahelegen. Mittels Lymphozytenproliferation konnten in einer Studie, die noch mit einem ausschließlich monovalenten HPV 16-Impfstoff arbeitete, indirekt L1-spezifische Reaktionen von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten gezeigt werden. Aus der Zytokinexpression im Zellkulturüberstand ließ sich sowohl auf eine T<sub>H</sub>1- als auch auf eine T<sub>H</sub>2-Antwort schließen (54). Eine Nachfolgestudie zeigte später mit gleicher Methodik, dass eine HPV 16-Vakzine auch spezifische T-Zellreaktionen auf andere HPV-Typen, v. a. HPV 31, induzieren kann (55).

Auch bezüglich der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, welches auf langlebigen T- und B-Zellen beruht, gibt es für den Impfstoff Gardasil<sup>®</sup> aktuell erste Ergebnisse. Nachdem geimpfte Probandinnen 60 Monate lang nachbeobachtet wurden, erhielten sie erneut eine einmalige Booster-Impfung mit Gardasil<sup>®</sup>. Innerhalb der 60 Monate zuvor waren die AK-Titer, wie im letzten Kapitel beschrieben, zunächst abgesunken, erreichten allerdings nach 24 Monaten ein relativ stabiles Plateau. Durch die erneute HPV-Impfung zum Zeitpunkt 60 Monate jedoch stiegen die AK-Konzentrationen für alle vier HPV-Typen sogar über jene, die einen Monat nach Komplettierung des normalen Impfzyklus gemessen wurden, stark an. Dies lässt vermuten, dass Impfstoff-

spezifische Gedächtniszellen ausgebildet wurden, die durch die Reexposition zum Antigen eine starke anamnestiche Immunantwort auslösten (56).

## 1.4 Fragestellung

HPV-Infektionen gehören weltweit zu den häufigsten sexuell übertragbaren Erkrankungen und führen durch die mögliche Induktion einer Karzinogenese, v. a. im Bereich der Zervix uteri, zu einer ernsthaften Vitalbedrohung. Mit Einführung einer prophylaktischen Impfung gegen die HPV-Typen 6, 11, 16 und 18 besteht die Möglichkeit, Prävalenz und Inzidenz HPV-assoziiierter Erkrankungen drastisch zu reduzieren. Viele Krebstodesfälle können somit als vermeidbar angesehen werden. Die prophylaktische Vakzine Gardasil® hat sich durch Effizienz, günstiges Nebenwirkungsprofil und starke humorale Immunogenität bewährt und wird gemäß STIKO-Empfehlung im klinischen Alltag seit mehr als zwei Jahren eingesetzt.

Gardasil®-induzierte AK-Titer fallen einige Monate nach Abschluss des Impfzyklus ab, in erster Linie betroffen ist der Anti-HPV 18-Titer. Für die langfristige Wirksamkeit einer Impfung bedarf es der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, dessen wichtigste Träger langlebige B- und T-Gedächtniszellen sind. Mit Hilfe von spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen kann bei erneutem Antigenkontakt auch Jahre nach Impfung noch eine effiziente Immunantwort zur Verhinderung einer Infektion ausgelöst werden. Auch für Gardasil® wurde gezeigt, dass durch eine Booster-Immunsierung fünf Jahre nach der letzten Impfung die AK-Konzentrationen sogar über das Ausgangslevel hinaus angehoben werden konnten, was das Vorhandensein einer spezifischen zellulären Immunität nahelegt.

Bisher erfolgte jedoch kein direkter Nachweis Gardasil®-induzierter spezifischer TZ. Hauptziel dieser Arbeit soll es deshalb sein, mit Hilfe eines im folgenden Kapitel näher beschriebenen ex vivo Assays die Frage zu beantworten, ob für die Impfstofftypen HPV 6, 11, 16 und 18 spezifische CD4<sup>+</sup> TZ im Blut geimpfter Probandinnen nachgewiesen werden können. Diese Zellen sollen an Hand ihrer Zytokinproduktion weiter differenziert werden.

Im Falle eines gelungenen generellen Nachweises von Impfstoff-spezifischen CD4<sup>+</sup> TZ werden im Rahmen dieses Projektes folgende weitere offene Fragen bearbeitet: Zunächst soll die Größenordnung der TZ-Immunität näher quantifiziert werden, um die

Immunogenität der noch jungen Vakzine besser einschätzen zu können. Des Weiteren soll beantwortet werden, welche Unterschiede zwischen den für die verschiedenen vier HPV-Typen spezifischen TZ-Reaktionen bestehen. Hier kann auch auf mögliche Unterschiede zwischen den Vertretern der Low-Risk-Gruppe und den karzinogenen High-Risk-Viren eingegangen werden.

Das Impfschema für Gardasil<sup>®</sup> mit drei Impfungen zu den Zeitpunkten 0, 2 und 6 Monate wurde an Hand des Verlaufes der AK-Titer festgelegt. Durch Rekrutierung von Probandinnen mit verschiedenem Impfstatus wird in dieser Arbeit ein besonderes Augenmerk auf den Verlauf der CD4<sup>+</sup> TZ-Reaktion während des Impfzyklus gelegt, um zu beurteilen, ob sich das Impfschema auch aus zellulärer Sicht als sinnvoll bestätigen lässt.

Schließlich soll durch parallele serologische Bestimmung spezifischer Anti-HPV L1-Antikörper die Frage nach einer möglichen Korrelation humoraler und zellulärer Immunantwort beantwortet werden, womit ein Bezug zu den bereits vorliegenden Forschungsergebnissen bezüglich Gardasil<sup>®</sup>-induzierter humoraler Immunität hergestellt werden kann.

Gerade bei neuartigen Präparaten wie den prophylaktischen HPV-Impfstoffen mit noch wenig Langzeiterfahrung erlangt der Nachweis zellulärer Immunität eine besondere klinische Relevanz, um in Zukunft Fragen nach Dauer und Intensität des Impfschutzes sowie möglichen Wiederauffrischungsimpfungen besser beantworten zu können.

## **2 Methoden**

### **2.1 Gardasil®-Studie**

#### **2.1.1 Ablauf der Querschnittsstudie**

Zur Bearbeitung der in Kapitel 1.4 dargelegten Fragestellung wurde eine nicht-interventionelle Querschnittsstudie an freiwilligen Probandinnen mit verschiedenem Gardasil®-Impfstatus entwickelt.

Zu den Einschlusskriterien der Studie zählten weibliches Geschlecht sowie Zugehörigkeit zu einer der vier vorher definierten Studiengruppen. Zu den Gruppen gehörten eine Kontrollgruppe, deren Mitglieder bisher keine prophylaktische HPV-Impfung erhalten haben durften, sowie drei nach dem Impfstatus differenzierte Impfgruppen, deren Teilnehmerinnen die Voraussetzung einer erfolgten einmaligen, zweimaligen oder dreimaligen Gardasil®-Impfung erfüllen mussten. Des Weiteren galt in den drei letztgenannten Gruppen die Bedingung, dass zwischen zuletzt stattgefundener Gardasil®-Impfung und Zeitpunkt der Blutentnahme mindestens drei bis vier Wochen vergangen sein mussten, um der Ausbildung einer möglichen zellulären Gedächtnisimmunität genügend Zeit zu geben (43).

Generelle Ausschlusskriterien waren Minderjährigkeit, Schwangerschaft oder Stillzeit, bekannte nicht HPV-assoziierte Infektionskrankheiten sowie psychiatrische Erkrankungen.

Die Studie ist vom Ethik-Komitee der Charité - Universitätsmedizin Berlin mittels eines Ethikvotums bestätigt worden (EA 04/036/07).

Die Rekrutierung der Probandinnen erfolgte über die Veröffentlichung eines elektronischen Aufrufes am Schwarzen Brett des Charité-Intranets sowie über Probandinnenaufrufe in Form von E-Mails, die an die E-Mailverteiler der Studenten der Human- und Zahnmedizin der Charité - Universitätsmedizin Berlin sowie an die E-Mailverteiler der Studenten der Veterinärmedizin und Pharmazie der Freien Universität Berlin versandt wurden.

Insgesamt wurden 63 Probandinnen in die Gardasil®-Querschnittsstudie eingeschlossen (vgl. Abbildung 2). 16 nicht HPV-geimpfte Probandinnen wurden für die Kontrollgruppe rekrutiert. Jeweils 15 Frauen mit einfacher und zweifacher Gardasil®-Impfung

konnten den weiteren Gruppen zugewiesen werden. Die letzte Gruppe bildeten 17 Probandinnen mit abgeschlossener dreimaliger HPV-Immunsierung durch Gardasil®. Alle Probandinnen erklärten nach ausführlicher schriftlicher und mündlicher Aufklärung schriftlich ihr Einverständnis mit der Studienteilnahme.

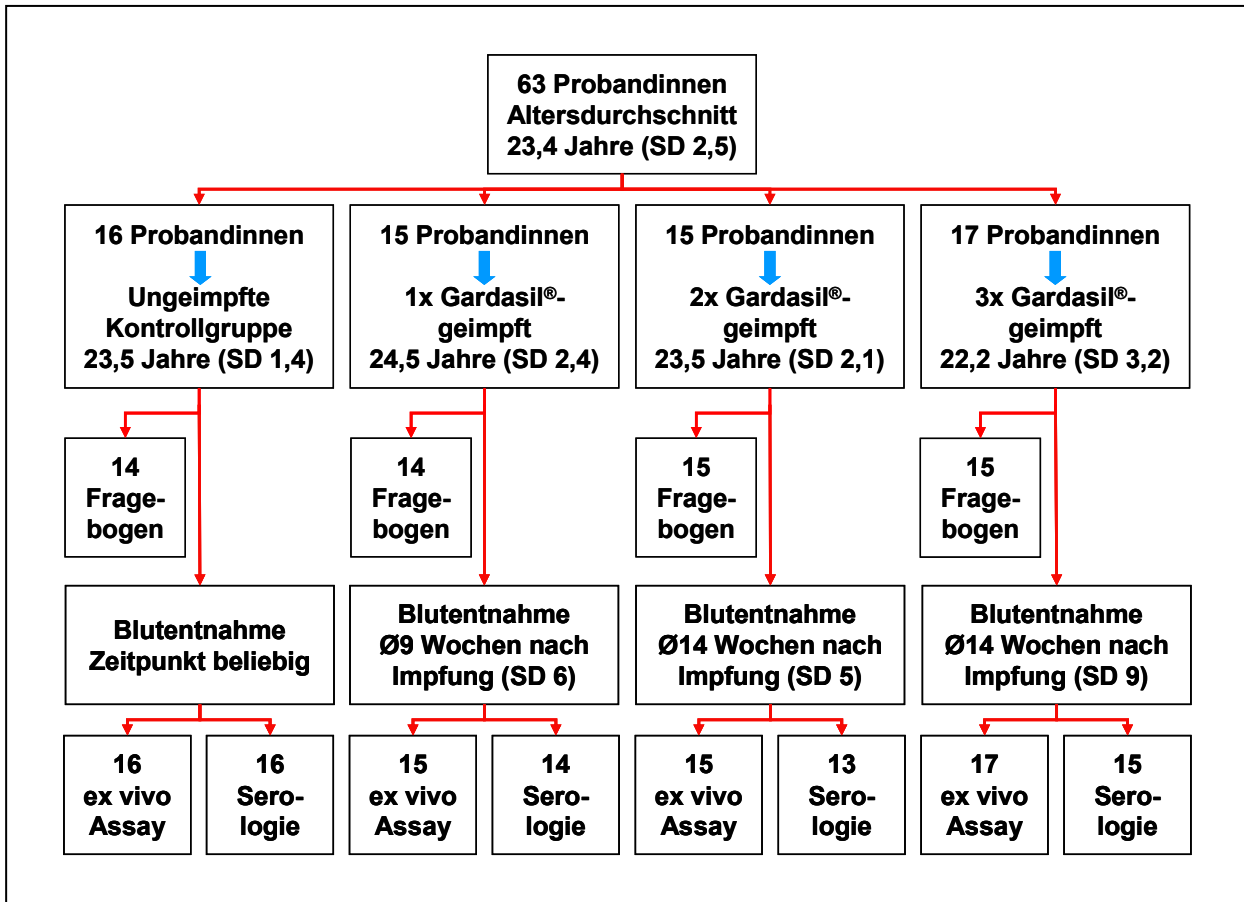


Abbildung 2: Ablauf der Gardasil®-Querschnittsstudie. SD = engl. standard deviation.

Nach peripher-venöser Blutentnahme wurde mit dem Material aller 63 Studienteilnehmerinnen jeweils ein im Folgenden näher beschriebener Assay zur ex vivo Darstellung Impfstoff-spezifischer T-Helfer-Zellen durchgeführt (vgl. Kap. 2.2). Parallel erfolgte eine serologische Messung HPV L1-spezifischer AK (vgl. Kap. 2.3). Bei einer einfach geimpften Probandin sowie bei jeweils zwei Probandinnen mit zweifacher und dreifacher Impfung konnte keine Messung der AK-Titer erfolgen, da keine Serumproben zur Verfügung standen. Zur Charakterisierung des Studienkollektivs diente schließlich eine Befragung der Probandinnen mit Hilfe eines postalisch versendeten Fragebogens (vgl. Kap. 2.4). Insgesamt 58 der 63 Probandinnen (92%) nahmen an der Befragung teil.

## **2.1.2 Ablauf der integrierten Longitudinalstudie**

Parallel zur oben beschriebenen Querschnittsstudie wurde eine Longitudinalstudie in den Studienablauf integriert. Diese sollte der Bestätigung der aus der Querschnittsstudie gewonnenen Daten dienen.

Die Rekrutierung eines passenden Kollektivs für die Longitudinalstudie erfolgte mittels persönlicher Anfrage bei den 15 Probandinnen mit einfacher Gardasil®-Impfung der Querschnittsstudie. Um teilnehmen zu können, galt die Voraussetzung, für die Komplettierung des Impfzyklus sowie für jeweils eine weitere Blutentnahme nach der zweiten und dritten Impfung bereit zu sein. Die oben genannten generellen Ausschlusskriterien wie Schwangerschaft etc. mussten während des gesamten Verlaufs weiterhin Bestand haben. Insgesamt erfüllten 11 der 15 Frauen die Kriterien und konnten in die Longitudinalstudie übernommen werden.

Nachdem die Charakterisierung der Gardasil®-spezifischen TZ nach erster Impfung bereits im Rahmen der Querschnittsstudie erfolgt war, wurde bei allen elf teilnehmenden Probandinnen der Longitudinalstudie jeweils eine zusätzliche Blutentnahme mindestens drei bis vier Wochen nach der zweiten und dritten Gardasil®-Impfung angeschlossen. Analog zur Querschnittsstudie wurden in dem gewonnenen Vollblut HPV L1-spezifische T-Helfer-Zellen mit Hilfe der im Folgenden beschriebenen Methode ex vivo dargestellt (vgl. Kap. 2.2). Zudem erfolgte auch in der Verlaufsstudie eine Bestimmung der Impfstoff-spezifischen AK aus Serumproben der Probandinnen (vgl. Kap 2.3).

Es gelang somit den Verlauf der Vakzin-spezifischen T-Helfer-Zell- sowie AK-Antwort bei elf Probandinnen während des gesamten Impfzyklus mit drei Gardasil®-Impfungen darzustellen.

## **2.2 Ex vivo Assay zur Bestimmung spezifischer T-Helfer-Zellen**

### **2.2.1 Etablierung des Assays**

#### **2.2.1.1 Hintergrund**

Für den ex vivo Nachweis Impfstoff-spezifischer CD4-positiver T-Zellen im Blut Gardasil®-geimpfter Probandinnen wurde, basierend auf einer von Frentsch et al. im Jahr 2005 publizierten Methode, nach mehrstufiger Weiterentwicklung und Anpassung an die Fragestellung ein ex vivo Assay etabliert, der im Folgenden beschrieben wird. Immu-

nologisch macht sich der Assay die aktivierungsspezifische Expression des Oberflächenmoleküls CD154 zu Nutze (vgl. Kap. 1.3.2). Es wird für wenige Stunden nach Stimulation durch ein relevantes Antigen, im Falle dieser Arbeit nach ex vivo Stimulation mit den immunogenen Bestandteilen des Impfantigens, von CD4<sup>+</sup> TZ exprimiert. Nach Stabilisierung und Anfärbung mittels Farbstoff-konjugierter anti-human CD154-Antikörper können die auf diese Weise detektierten Stimulationsantigen-spezifischen CD4<sup>+</sup> TZ sensitiv und spezifisch durch eine durchflusszytometrische Messung (fluorescence-activated cell sorting, FACS) dargestellt werden (52).

## **2.2.1.2 Auswahl des Probenmaterials**

### **2.2.1.2.1 Kryokonservierte periphere Blutlymphozyten**

Um optimale Resultate in der eigentlichen Studie zu erzielen, wurde zunächst verschiedenen aufgearbeitetes Probenmaterial getestet. Es folgt zuerst eine kurze Darstellung der Ergebnisse, die an kryokonservierten peripheren Blutlymphozyten (PBL) erzielt wurden.

Die verwendeten PBL wurden nach peripher-venöser Blutentnahme über einen Ficoll-Hypaque-Dichtegradienten aufgearbeitet und bei -80 bis -160°C aufbewahrt. Nach Auftauen und Resuspension in Kulturmedium, welches aus RPMI-1640+GlutaMAX (GIBCO, Karlsruhe), versetzt mit 10% fetalem Kälberserum (FCS von Biochrom, Berlin) und 1% Penicillin-Streptomycin (Biochrom), bestand, wurde im Rahmen der Vorversuche getestet, ob spezifische CD4<sup>+</sup> TZ für die beiden HPV-Antigene 16 L1 und 18 L1 sowie für das Kontrollantigen Tetanustoxoid (TT) nachweisbar waren. Insgesamt wurden 16 Versuche an Tetanus-immunisierten Spenderinnen und Spendern durchgeführt. Davon waren in neun Fällen TT-spezifische CD4<sup>+</sup> TZ im Bereich von 0,33% bis maximal 2,87% nachweisbar. Neun Stimulationen konnten mit PBL von zweifach oder dreifach HPV-geimpften Spenderinnen durchgeführt werden. Nur in einem Fall ergab sich dabei eine mit 0,05% (HPV 16 L1) bzw. 0,04% (HPV 18 L1) spezifischen CD4<sup>+</sup> TZ ausreichend starke Reaktion auf beide getesteten HPV-Antigene, die vergleichbar ausgeprägt war wie parallel erzielte Ergebnisse an nicht kryokonservierten PBL oder Vollblut (vgl. Kap. 2.2.1.2.2 und 2.2.1.2.3) und sich auch in einem weiteren Versuch reproduzieren ließ. Die restlichen Versuche zeigten entweder keine oder nur sehr schwache spezifische TZ-Reaktionen (Ergebnisse nicht gezeigt), die zudem mit erneuten Stimulationen bei gleichem Spender nicht reproduzierbar und auch nicht mit Ergebnissen an nicht kryokonserviertem Material vergleichbar waren.



Neben den ernüchternden Ergebnissen hatte man zudem bei allen Versuchen mit kryokonserviertem Material mit durchschnittlich 0,63% einen sehr hohen Hintergrund der Negativkontrolle zu verzeichnen. Des Weiteren mussten sehr viele Zellen eingesetzt werden (mindestens 2 Millionen pro Antigen), da auf Grund der niedrigen Viabilität nach Einfrieren und Auftauen sowie durchgeführter Zellkultur nur so garantiert werden konnte, dass 200000 CD4<sup>+</sup> TZ durchflusszytometrisch einlesbar waren. Auch Variationen des Stimulationszeitpunktes nach dem Auftauen (Direktstimulation vs. Stimulation nach zwölfstündiger Ruhephase der Zellen) brachten keinen entscheidenden Vorteil (Ergebnisse nicht gezeigt). Schließlich wurde noch getestet, ob die Verwendung anderer Kulturmedien einen Einfluss hatte. Jedoch führten auch die Reduktion des FCS-Anteils im ursprünglichen Medium auf 5%, der Ersatz von FCS durch 10% Humanalbumin (Baxter, Unterschleißheim) sowie der Gebrauch eines gänzlich anderen Mediums wie AIM-V (GIBCO), versetzt mit 1% Penicillin-Streptomycin, nicht zu erfolgreicheren Endresultaten (Ergebnisse nicht gezeigt).

Auf Grund der dargelegten Ergebnisse wurde entschieden, für dieses Projekt keine kryokonservierten PBL zu verwenden.

#### **2.2.1.2.2 Frisch aufgearbeitete periphere Blutlymphozyten**

Als weitere Option bezüglich des einzusetzenden Probenmaterials kam die Stimulation von frisch aufgearbeiteten, nicht kryokonservierten PBL in Betracht. Die PBL wurden hierfür wie oben beschrieben aufbereitet und schließlich direkt in Kulturmedium (RPMI + 10% FCS + 1% Penicillin-Streptomycin) resuspendiert.

In zehn von zwölf Versuchen unter der Verwendung von frischen PBL ließen sich konstant TT-spezifische CD4<sup>+</sup> TZ im Bereich von 0,21% bis 0,6% nachweisen. Von fünf Experimenten an zwei- oder dreifach HPV-geimpften Probandinnen fielen immerhin zwei positiv für spezifische TZ-Reaktionen auf die HPV-Antigene 16 (0,06%) und 18 L1 (0,04%) aus. Das Hintergrundsignal der Negativkontrolle war mit durchschnittlich 0,18% geringer ausgeprägt als bei den Versuchen mit kryokonserviertem Material.

Insgesamt konnten die Ergebnisse positiver als die unter Verwendung von kryokonserviertem Material erzielten Resultate interpretiert werden. Wegen der noch nicht überzeugenden Ergebnisse der TZ-Reaktion auf die HPV-Antigene wurde aber entschieden, zunächst Vollblut als Probenmaterial zu testen.

### **2.2.1.2.3 Vollblut**

Der Einsatz des Probenmaterials in Form von Vollblut wurde in insgesamt 14 Ansätzen getestet. Hierzu wurde peripher-venöses Blut direkt nach Entnahme verwendet. Bei 13 von 14 Probandinnen konnten spezifische TZ im Bereich von 0,12% bis 0,78% für die Positivkontrolle TT dargestellt werden. Es wurde die Verwendung von Vollblut von neun zwei- und dreifach HPV-geimpften Probandinnen analysiert. Sieben Spenderinnen zeigten HPV 16 und 18 L1-spezifische TZ-Reaktionen mit einer Intensität von 0,02% bis maximal 0,23%.

Neben den relativ konstanten Resultaten brachte die Verwendung von frischem Vollblut weitere Vorteile mit sich. So reagierte die Negativkontrolle mit durchschnittlich 0,1% deutlich weniger positiv als bei den mit kryokonservierten oder frischen PBL durchgeführten Versuchen. Zudem ergaben sich keine Probleme mit der Anzahl eingesetzter Zellen, da in 1 ml Vollblut pro Ansatz ausnahmslos genügend Zellen vorhanden waren und verlustreiche sowie zeitaufwändige Prozeduren wie PBL-Aufarbeitung und Kryokonservierung entfielen. Schließlich sei noch erwähnt, dass sich die darzustellenden T-Lymphozyten im Vollblut, im Gegensatz zu künstlich hergestellten Kulturmedien, in ihrer physiologischen Umgebung befinden, was die Aussagekraft des Testes erhöhen mag.

Auf Grund der beschriebenen überzeugenden Resultate wurde die ausschließliche Verwendung von Vollblut für das gesamte Projekt festgelegt.

### **2.2.1.3 Verwendete Stimulationsantigene**

Um Vakzin-spezifische CD4<sup>+</sup> TZ im Blut Gardasil<sup>®</sup>-geimpfter Probandinnen darstellen zu können, müssen diese ex vivo durch exakt das gleiche Antigen stimuliert werden, durch welches sie sich auch nach erfolgter Impfung von der naiven TZ zur spezifischen TZ differenziert haben. Das HPV-Kapsidprotein L1 stellt die hauptimmunogene Komponente des Impfstoffs Gardasil<sup>®</sup> dar (vgl. Kap. 1.2.1). Zur ex vivo Stimulation wurden dementsprechend synthetisch hergestellte Peptidpools verwendet, die jeweils die gesamte Antigen-Sequenz der L1-Proteine von HPV 6 (NCBI GeneID 1489370, UniProt Accession Nr. P69899), 11 (NCBI GeneID nicht eingetragen, UniProt Accession Nr. P04012), 16 (NCBI GeneID 1489082, UniProt Accession Nr. P03101) oder 18 (NCBI GeneID 1489090, UniProt Accession Nr. P06794) enthielten. Reaktionen gegen mögliche Verunreinigungen durch Hefepoteine konnten so ausgeschlossen werden. Die L1-

Peptidpools für HPV 6 setzten sich aus 28, für HPV 16 aus 29 und für HPV 11 und 18 aus jeweils 31 langen Einzelpeptiden (peptides&elephants, Nuthetal) zusammen, die alle jeweils aus einer Sequenz von 30 Aminosäuren (30mer Peptide) bestanden und eine 12mer Sequenzüberlappung aufwiesen. Die Einzelpeptide (EP) wurden alle mit einer jeweiligen Endkonzentration von 50 mg/ml in Dimethylsulfoxid (DMSO von Sigma, Taufkirchen) gelöst. Für die Peptidpools wurden schließlich von jedem gelösten EP des jeweiligen HPV-Typs 10 µl in einen Gesamtpool überführt und dieser auf 500 µl mit DMSO aufgefüllt. Die Gesamtpools wiesen so je nach HPV-Typ eine Konzentration von 28 (HPV 6), 29 (HPV 16) oder 31 mg/ml (HPV 11 und 18) auf. Aus diesen konnten dann durch Weiterverdünnen in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS von Biochrom) Stimulationsansätze hergestellt werden, die die gesamte HPV L1-Antigensequenz in einer Gesamtkonzentration von 1 mg/ml enthielten. Zur Bestimmung der optimalen Peptidmenge für die ex vivo Stimulation wurde für HPV 16 L1 eine Peptidtitration am Material eines konstant HPV 16 L1-positiven Spenders durchgeführt (vgl. Tabelle 1).

**Tabelle 1: Festlegung der optimalen Peptidmenge für die ex vivo Stimulation**

Peptidmenge (µg/ml)	Anteil HPV 16 L1-spezifischer TZ (%) <sup>a</sup>	MW (± SD) <sup>b</sup>	Anteil HPV 16 L1-spezifischer INF-γ <sup>+</sup> TZ (%) <sup>a</sup>	MW (± SD) <sup>b</sup>	Anteil HPV 16 L1-spezifischer TNF-α <sup>+</sup> TZ (%) <sup>a</sup>	MW (± SD) <sup>b</sup>
30	2,19	2,86 (± 0,7)	0,55	0,73 (± 0,16)	1,9	2,41 (± 0,53)
30	3,59		0,87		2,95	
30	2,8		0,76		2,38	
10	2,37	2,63 (± 0,25)	0,61	0,61 (± 0,01)	1,77	2 (± 0,2)
10	2,87		0,61		2,12	
10	2,64		0,62		2,1	
3	0,85	1,14 (± 0,26)	0,33	0,3 (± 0,02)	0,7	0,88 (± 0,16)
3	1,22		0,29		0,95	
3	1,36		0,29		0,99	
1	0,24	0,5 (± 0,25)	0,08	0,1 (± 0,02)	0,17	0,34 (± 0,17)
1	0,74		0,11		0,5	
1	0,51		0,1		0,34	
0,3	0,16	0,15 (± 0,02)	0,02	0,01 (± 0,01)	0,07	0,07 (± 0,01)
0,3	0,17		0,02		0,08	
0,3	0,13		0		0,06	

HPV = Humanes Papillomvirus, L1 = *engl.* late protein 1, INF-γ = Interferon-γ, TNF-α = Tumornekrosefaktor-α

<sup>a</sup> Gezeigt sind die prozentualen Anteile HPV 16 L1-spezifischer T-Zellen (TZ) abhängig von der zur ex vivo Stimulation eingesetzten Peptidmenge.

<sup>b</sup> Pro Titrationsstufe sind die Mittelwerte (MW) aus drei unabhängigen Stimulationen mit Standardabweichung (SD) angegeben.

Zur Stimulation von jeweils 1 ml Volumen des Spendermaterials wurden Peptidmengen von 30, 10, 3, 1 und 0,3 µg verwendet. Dies entsprach bei einer Arbeitskonzentration von 1 mg/ml jeweils einem Volumen von 30, 10, 3, 1 und 0,3 µl. Zur besseren Aussagekraft wurden mit jeder der verschiedenen Peptidmengen jeweils drei Testansätze stimuliert. Es zeigte sich, dass die Intensität der nachweisbaren spezifischen TZ-Reaktion mit steigender Peptidmenge anstieg. Hierbei war der Anstieg zwischen der Stimulation mit 3 µg und 10 µg am stärksten ausgeprägt, die nachweisbare HPV 16 L1-spezifische TZ-Reaktion verdoppelte sich in diesem Titrationsschritt. Die Stimulation mit 30 µg des Gesamtpeptids erbrachte im Vergleich zur Stimulation mit 10 µg dagegen nur noch einen Anstieg der spezifischen TZ-Anteile von 9% bis maximal 20%. Auf Grund der vergleichbaren Ergebnisse wurde entschieden, für die ex vivo Stimulation von jeweils 1 ml Vollblut jeweils 10 µg des jeweiligen HPV L1-Stimulationsansatzes zu verwenden.

Um differenzieren zu können, ob die Induktion spezifischer CD4<sup>+</sup> TZ wirklich durch die prophylaktische Impfung und nicht durch eine natürliche HPV-Infektion zu Stande kam, erfolgte als Kontrolle eine Stimulation mit Peptidpools der in der Vakzine nicht enthaltenen Proteine E6 und E7. Primär wurden auch hier die 30mer Einzelpeptide der E-Proteine zu einem Peptidpool zusammengeführt, wobei der Pool für HPV 16 (NCBI GeneID 1489078, UniProt Accession Nr. P03126) und 18 E6 (NCBI GeneID 1489088, UniProt Accession Nr. P06463) jeweils neun EP enthielt. Die Peptidpools der E7-Proteine setzten sich aus fünf (HPV 16, NCBI GeneID 1489079, UniProt Accession Nr. P03129) bzw. sechs (HPV 18, NCBI GeneID 1489089, UniProt Accession Nr. P06788) EP zusammen. Für HPV 6 und 11 waren keine E6- und E7-Einzelpeptide vorhanden. Analog dem oben beschriebenen Verfahren wurden auch für die HPV 16 und 18 „early proteins“ Stimulationsansätze mit einer Gesamtpeptidkonzentration von 1 mg/ml in PBS hergestellt. Um die Ergebnisse von E6- und E7-Einzelpoolstimulationen mit kombinierten E6- und E7-Peptidpools vergleichen zu können, wurde ein weiterer Versuch durchgeführt. Hierbei konnte ebenfalls mit Dreifachwerten zur Erhöhung der Aussagekraft gearbeitet werden. Es wurde eine Stimulation von Testansätzen mit jeweils 10 µg, entsprechend 10 µl, der zwei verschiedenen HPV 16 E-Peptidpools verglichen mit einer Stimulation kombinierter Testansätze mit 10 µl eines Mixes, der die zwei vorhandenen Peptidpools in gleichen Mengen enthielt. Da die Ergebnisse vergleichbar waren (vgl. Tabelle 2), wurden weitere Stimulationen im Folgenden ausschließlich mit dem Mix der E-Peptidpools als „Infektionsmarker“ durchgeführt.

**Tabelle 2: Vergleich von E6- und E7-Einzelpoolstimulationen mit kombiniertem E6 und E7**

HPV 16-Antigen	Anteil Antigen-spezifischer TZ (%) <sup>a</sup>	MW (± SD) <sup>b</sup>	Anteil Antigen-spezifischer INF-γ <sup>+</sup> TZ (%) <sup>a</sup>	MW (± SD) <sup>b</sup>	Anteil Antigen-spezifischer TNF-α <sup>+</sup> TZ (%) <sup>a</sup>	MW (± SD) <sup>b</sup>
E6 einzeln	0,06	0,06 (± 0,01)	0,01	0,01 (± 0)	0,04	0,04 (± 0,01)
E6 einzeln	0,06		0,01		0,04	
E6 einzeln	0,07		0,01		0,03	
E7 einzeln	0,1	0,12 (± 0,02)	0,01	0,02 (± 0,01)	0,05	0,06 (± 0,02)
E7 einzeln	0,11		0,02		0,05	
E7 einzeln	0,14		0,02		0,08	
E6 + E7 kombiniert	0,11	0,1 (± 0,01)	0,01	0,02 (± 0,01)	0,08	0,08 (± 0,01)
E6 + E7 kombiniert	0,11		0,03		0,09	
E6 + E7 kombiniert	0,09		0,01		0,07	

HPV = Humanes Papillomvirus, E6 / E7 = *engl.* early protein 6 / 7, INF-γ = Interferon-γ, TNF-α = Tumornekrosefaktor-α

<sup>a</sup> Gezeigt sind die prozentualen Anteile HPV 16 E6- und E7-spezifischer T-Zellen (TZ) bei jeweils einzelner oder kombinierter ex vivo Stimulation.

<sup>b</sup> Pro Antigen sind die Mittelwerte (MW) aus drei unabhängigen Stimulationen mit Standardabweichung (SD) angegeben.

Als Positivkontrollen kamen das Enterotoxin B des Bakteriums *Staphylococcus aureus* (SEB), TT und das Matrix-Protein des Influenzavirus (IMP) in Betracht. SEB wurde als genereller Viabilitätsindikator der Zellkultur analog dem von Frentsch et al. 2005 beschriebenen Assay beibehalten. Da spezifische TZ-Reaktionen auf IMP in den Vorversuchen bedeutend seltener zu verzeichnen und solche auf TT nahezu bei allen Probanden nachweisbar waren, wurde die Stimulation mit TT als zweite Positivkontrolle festgelegt. Diese Ergebnisse deckten sich auch mit den vom RKI veröffentlichten Impfraten für Tetanus und Influenza. So haben 98% aller Kinder bis zur Einschulung in Deutschland zumindest die Grundimmunisierung gegen Tetanus erhalten, wohingegen die bundesweite Durchimpfung gegen Influenza nur bei ca. 23% liegt (57;58).

#### 2.2.1.4 Brefeldin A

Nach erfolgter Stimulation exprimieren T-Helfer-Zellen CD154, zudem produzieren sie Zytokine, insbesondere IL-2 (vgl. Kap. 1.3.2). Um CD154 und die Zytokine im weiteren Verlauf noch sicher detektieren zu können, müssen ihr Abbau und ihre Sekretion in der Zwischenzeit verhindert werden (52). Physiologischer Weise wird z. B. CD154 nach Bindung an das Molekül CD40 der APC herunterreguliert (59). Experimentell kann dies nun auf verschiedene Art und Weise verhindert werden. Häufig kommt der Sekretionsinhibitor Brefeldin A zum Einsatz, ein Metabolit des Pilzes *Eupenicillium brefeldia-*

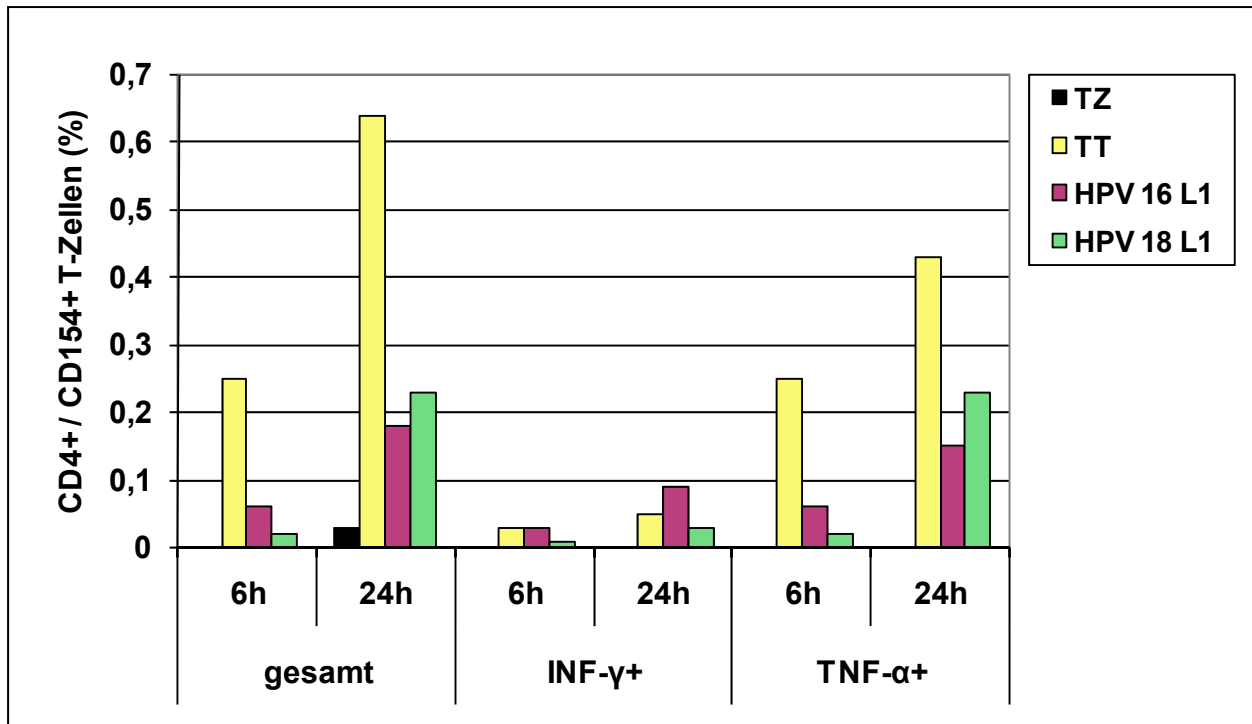
num, der spezifisch und reversibel den Proteintransport vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) in den Golgi-Apparat hemmt und somit zu sezernierende Proteine intrazellulär akkumuliert (60). An Stelle von Brefeldin A wird auch auf die Ionophore Monensin zurückgegriffen. Durch Eingriff in den Elektrolythaushalt der Zelle beeinflusst Monensin in verschiedener Art und Weise Prozesse des Golgi-Apparats und verlangsamt den intrazellulären Proteintransport (61). So beschreiben z. B. Chattopadhyay et al. 2006 bei einem ebenfalls CD154-basierten Assay zum Nachweis von CD4<sup>+</sup> TZ das Gelingen ausschließlich unter der Verwendung von Monensin (62).

Um die primär geplante Verwendung von Brefeldin abzusichern, wurden fünf Assays unter Verwendung der Monensin-haltigen GolgiStop-Reagenz von Becton Dickinson (BD, Heidelberg) durchgeführt. Mit Ausnahme eines Einzelwertes konnten weder für TT noch bei einer HPV-geimpften Spenderin für HPV 16 und 18 L1 spezifische CD4<sup>+</sup> TZ nachgewiesen werden. Im direkten Vergleich mit Brefeldin A war ausnahmslos ein schlechteres Abschneiden zu verzeichnen. Auch auf die Super-Positivkontrolle SEB reagierten unter Einfluss von Monensin weniger TZ. So wurden beim gleichen Spender unter Brefeldin Anteile von über 25% auf SEB reagierende TZ gemessen, wohingegen unter Monensin nur um 1% der Zellen spezifische Reaktionen auf SEB zeigten.

Auf weitere Versuche mit Monensin wurde daher verzichtet und die Verwendung von Brefeldin A für sämtliche weitere Versuche als Standard festgelegt.

#### **2.2.1.5 Versuchskinetik und Stimulationsdauer**

Frentsch et al. 2005 beschreiben in ihrer Zellkultur ein Plateau der Antigen-induzierten CD154-Expression nach ca. sechsstündiger Stimulationsdauer. Um dies für die beschriebene Fragestellung zu überprüfen und die bestmögliche Stimulationsdauer zu bestimmen, wurden drei Versuchskinetiken durchgeführt. Es zeigte sich, dass bei längerer Stimulationsdauer das Hintergrundsignal der Negativkontrolle nur geringfügig anstieg, während die spezifische TZ-Antwort ab 12-stündiger bis hin zu 24-stündiger Stimulation intensiver ausgeprägt war (vgl. Abbildung 3).



**Abbildung 3: Vergleich der Frequenz Antigen-spezifischer T-Helfer-Zellen nach 6 h und 24 h Stimulationszeit.** Gezeigt sind die prozentualen Anteile spezifischer T-Helfer-Zellen an der Gesamtmenge aller CD4-positiven T-Zellen nach 6- und 24-stündiger ex vivo Stimulation von Vollblut des gleichen Spenders mit Tetanustoxoid (TT) sowie HPV 16 oder 18 L1. Der nur geringfügige Anstieg der Negativkontrolle (TZ) ist in schwarz dargestellt. Es sind sowohl die Gesamtmenge aller spezifischen T-Helfer-Zellen als auch die Anteile solcher mit zusätzlicher Produktion von Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) oder Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) abgebildet. HPV = Humanes Papillomvirus, L1 = *engl.* late protein 1

Die Stimulationsdauer wurde deshalb auf 12 bis 24 Stunden festgelegt, wobei die meisten Stimulationen nach ca. 18 Stunden beendet wurden.

### 2.2.1.6 Auswahl der Färbung

Die Darstellung spezifischer T-Helfer-Zellen erfordert die Anfärbung von CD4, um diese von zytotoxischen CD8<sup>+</sup> TZ abzugrenzen, sowie die Anfärbung von CD154 als Spezifitätsmarker. Antigen-spezifische CD4<sup>+</sup> TZ werden differenziert durch das Spektrum verschiedener Zytokine, die von ihnen im Laufe des Antigen-induzierten Aktivierungsprozesses produziert werden. IL-2 kann als genereller T-Helfer-Zellmarker dienen und beschreibt zudem die Subgruppe der CD4<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen, da diese schnell nach Aktivierung in erster Linie IL-2 exprimieren. Des Weiteren belegt der vermehrte Nachweis von INF- $\gamma$  und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) eine verstärkte T<sub>H</sub>1-Antwort, wohingegen die Darstellung IL-4- oder Interleukin-10 (IL-10)-positiver TZ für eine vermehrte T<sub>H</sub>2-Antwort spricht (vgl. Kap. 1.3.2).

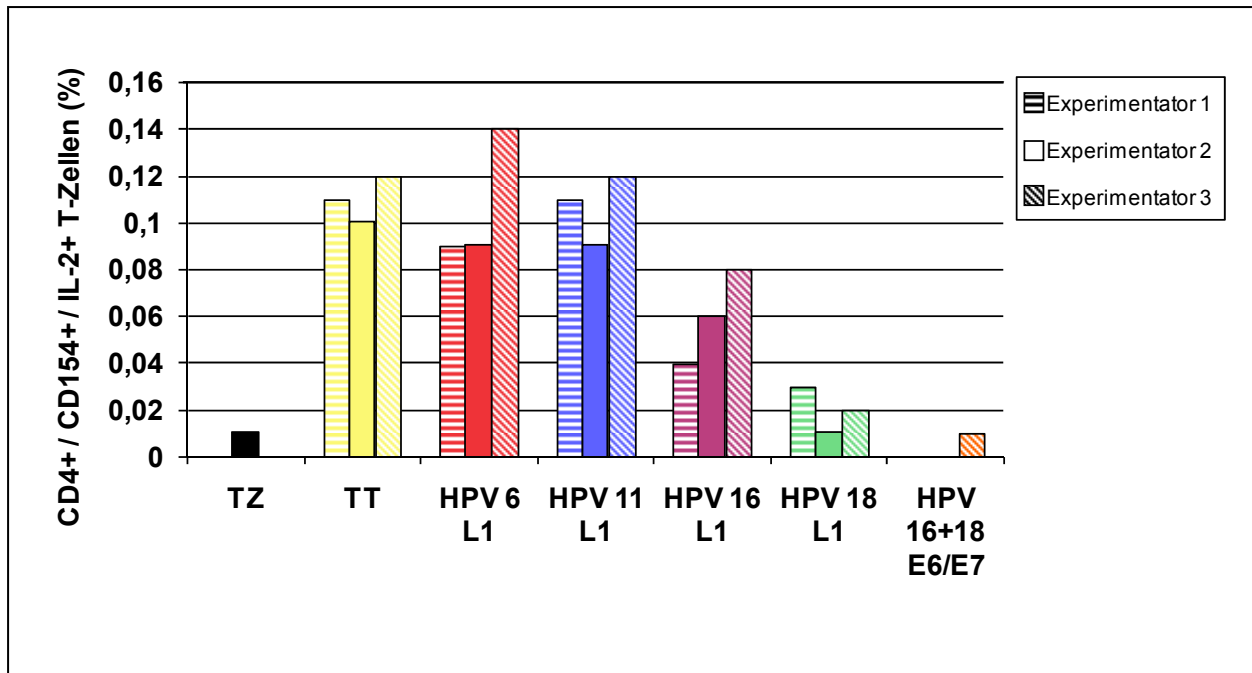
In Versuchen mit SEB- und TT-stimuliertem Spendermaterial wurden sowohl eine CD4 / CD154 / INF- $\gamma$  / TNF- $\alpha$ -Färbung als auch eine CD4 / CD154 / INF- $\gamma$  / IL-2-Färbung etabliert. Die jeweilige optimale Verdünnung der Farbstoff-konjugierten AK wurde durch Titration festgelegt (vgl. Kap. 2.2.2.4). Beide Färbungen lieferten konstante und quantitativ vergleichbare Ergebnisse. Die Etablierung einer Färbung unter Berücksichtigung von IL-4 und IL-10 wurde nach ersten Ergebnissen zunächst nicht weiter verfolgt, da die gemessenen spezifischen TZ-Antworten sich kaum von den Werten der Negativkontrolle abhoben. Da im Rahmen dieser Arbeit der primäre Schwerpunkt auf dem generellen Nachweis Gardasil<sup>®</sup>-spezifischer CD4<sup>+</sup> TZ liegt, wurde entschieden, eine möglichst aussagekräftige Färbung zu verwenden und auf die Differenzierung der T<sub>H2</sub>-Antwort zu verzichten.

Auf Grund der besonderen Relevanz der Interleukin-2 sezernierenden T-Gedächtniszellen für die Vermittlung zellulärer Immunität wurde entschieden, in der Gardasil<sup>®</sup>-Studie mit der CD4 / CD154 / INF- $\gamma$  / IL-2-Färbung zu arbeiten. Mittels INF- $\gamma$  kann zudem zumindest die T<sub>H1</sub>-Antwort charakterisiert werden. Die Beschreibung der Vakzin-spezifischen T<sub>H2</sub>-Antwort wurde auf mögliche Folgeprojekte verschoben.

#### **2.2.1.7 Bestätigung des Assays mittels Interobservervarianz**

Nach abgeschlossener Etablierung sollte der Assay im Rahmen einer Interobservervarianz final bestätigt werden. Hierzu wurde einer dreifach Gardasil<sup>®</sup>-geimpften Spenderin einmalig peripher-venöses Blut entnommen. Drei unabhängige Experimentatorinnen führten anschließend mit dem gewonnenen Vollblut jeweils eine ex vivo Stimulation durch, der Ablauf des hierbei angewandten Assays richtete sich exakt nach dem im folgenden Kapitel 2.2.2 beschriebenen Versuchsprotokoll. Es wurden ausschließlich die gleichen Materialien verwendet und in allen drei Fällen wurde eine Gesamtstimulationsdauer von genau 21 h eingehalten. Abbildung 4 zeigt die Ergebnisse der drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuche im Vergleich.





**Abbildung 4: Der etablierte CD154-basierte ex vivo Assay führt zu konstant reproduzierbaren Ergebnissen.** Gezeigt sind die prozentualen Anteile Antigen-spezifischer Interleukin-2 (IL-2) produzierender T-Helfer-Zellen an der Gesamtmenge aller CD4-positiven T-Zellen. Die Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Versuchen mit Vollblut der gleichen Probandin aus der gleichen Blutentnahme durch drei unabhängige Experimentatorinnen erzielt. TZ = Negativkontrolle, TT = Tetanustoxoid, HPV = Humanes Papillomvirus, L1 = *engl.* late protein 1, E6 / E7 = *engl.* early protein 6 / 7

Wie aus der Abbildung zu entnehmen ist, führten alle drei Stimulationen von der Tendenz her zum gleichen Ergebnis. Lediglich in der quantitativen Ausprägung der spezifischen TZ-Antwort waren Unterschiede von absolut maximal 0,05 Prozentpunkten (PP) spezifischer IL-2<sup>+</sup> TZ zu verzeichnen. Die nicht stimulierte Negativkontrolle sowie die E6/E7-„Infektionskontrolle“ lagen bei allen drei Stimulationen im Bereich zwischen 0 und 0,01% (Standardabweichung (SD) 0,01%). Die Ergebnisse der TT-Positivkontrolle sind mit 0,11%, 0,1% und 0,12% (SD 0,01%) ebenfalls als sehr vergleichbar anzusehen. Für HPV 6 L1 ist mit 0,14% spezifischen IL-2<sup>+</sup> TZ im dritten Versuch ein Ausreißer zu verzeichnen, die Werte der ersten beiden Versuche sind jedoch übereinstimmend. Für HPV 11 und 18 L1 führten die drei durchgeführten Experimente zu nur geringfügig unterschiedlichen Ergebnissen (SD 0,02% bzw. 0,01%). Lediglich die HPV 16 L1-spezifischen TZ unterscheiden sich jeweils um 0,02 PP zwischen den drei Versuchen (SD 0,02%). Aus den Ergebnissen aller spezifischen T-Helfer-Zellen unabhängig von der Zytokinproduktion sowie den Resultaten der INF- $\gamma$ -Färbung ließen sich ebenfalls die gleichen Tendenzen der drei unabhängigen Versuche ablesen (nicht gezeigt).

Da die Varianz zwischen den drei durchgeführten Experimenten geringer ist als der mittlere Unterschied der TZ-Antwort zwischen den Studiengruppen (vgl. Kap. 3.1.2.1),

kann man davon ausgehen, dass die erzielten Studienergebnisse nicht auf Schwankungen der verwendeten Methode zurückzuführen sind.

## **2.2.2 Ablauf des etablierten Assays und verwendete Materialien**

### **2.2.2.1 Probengewinnung**

Die Gewinnung des zu analysierenden Vollblutes erfolgte durch peripher-venöse Entnahme von ca. 50 ml Blut unter Verwendung des Vacutainer-Systems von BD. Das entnommene Blut wurde in den vom Hersteller bereits mit Lithium-Heparin präparierten Vacutainer-Röhrchen direkt antikoaguliert. Das Blut wurde maximal 24 h bei Raumtemperatur bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt, dieser Zeitrahmen wurde aber nur in den wenigsten Fällen genutzt.

### **2.2.2.2 Antigenstimulation und Zellkultur**

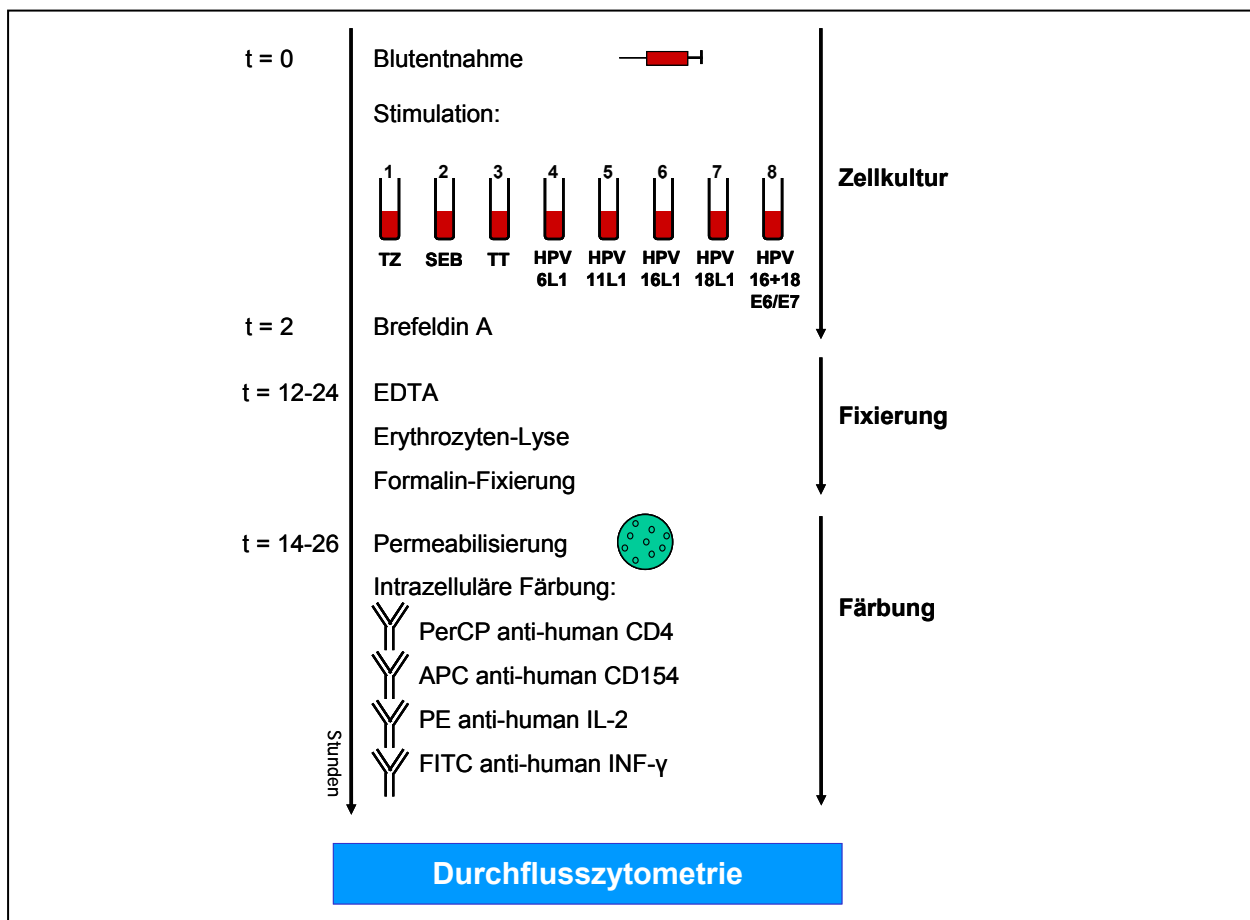
Unter sterilen Arbeitsbedingungen wurde jeweils 1 ml Vollblut auf acht Zellkulturröhrchen (Greiner bio-one, Frickenhausen) verteilt. Der Rest der gewonnenen Blutprobe wurde in Form von PBL aufgearbeitet und für weitere Projekte kryokonserviert. Zusätzlich wurde von jeder Probe 1 ml Plasma zur späteren AK-Bestimmung kryokonserviert (vgl. Kap. 2.3).

Alle acht Ansätze wurden mit jeweils 1 µg/ml anti-human CD28 (BD, Klon CD28.2) versetzt. Bei einer Arbeitskonzentration von 1 mg/ml entsprach dies einem Volumen von 1 µl. Wie in Kapitel 1.3.2 beschrieben, wird durch Bindung des T-zellulären CD28 eine Kostimulation der T-Helfer-Zellen erreicht.

Der erste Ansatz fungierte als TZ-Negativkontrolle, hier wurden zunächst keine weiteren Reagenzien hinzugegeben. Ansatz 3 wurde als Positivkontrolle mit ca. 100 µg/ml TT (Chiron Behring, Marburg) stimuliert. Bei einer vom Hersteller angegebenen Arbeitskonzentration von 4100 Lf/ml entsprach dies einem Volumen von 12 µl. Die Ansätze 4 bis 7 erhielten 10 µg/ml des jeweiligen L1-Peptidpools von HPV 6, 11, 16 oder 18 (vgl. Abbildung 5). Bei einer Arbeitskonzentration des oben beschriebenen Stimulationsansatzes von 1 mg/ml entsprach dies einem Volumen von jeweils 10 µl. Ansatz 8 wurde als „Infektionskontrolle“ mit 10 µl des oben beschriebenen Mixes der E6/E7-Peptidpools von HPV 16 und 18 stimuliert (vgl. Kap. 2.2.1.3). Nach Verschluss der anderen Kulturröhrchen wurde Ansatz 2 separat mit 10 µg/ml SEB (Sigma), entsprechend 10 µl bei ei-

ner Arbeitskonzentration von 1 mg/ml, stimuliert, um eine Kontamination der anderen sieben Ansätze zu vermeiden.

Anschließend wurde die Zellkultur bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 92% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach 90 bis 120 Minuten erfolgte die Zugabe von jeweils 10 µg/ml Brefeldin A (Sigma), welches vorher gemäß Herstellerangaben in Ethanol oder DMSO gelöst und mit RPMI-Kulturmedium auf eine Konzentration von 1 mg/ml verdünnt worden war. Danach wurde die Inkubation für weitere 10 bis 22 Stunden fortgeführt (vgl. Abbildung 5).



**Abbildung 5: Ablauf des ex vivo Assays zum CD154-basierten Nachweis Antigen-spezifischer T-Helfer-Zellen.** t = Zeit in Stunden, TZ = Negativkontrolle, SEB = *engl.* staphylococcal enterotoxin B, TT = Tetanustoxoid, HPV = Humanes Papillomvirus, L1 = *engl.* late protein 1, E6 / E7 = *engl.* early protein 6/7, EDTA = *engl.* ethylenediaminetetraacetic acid, PerCP = Peridinin-Chlorophyll-Protein, APC = Allophycocyanin, PE = Phycoerythrin, FITC = Fluoresceinisothiocyanat, IL-2 = Interleukin-2, INF-γ = Interferon-γ

### 2.2.2.3 Lyse und Fixierung

Nach einer Gesamtdauer von 12 bis 24 Stunden wurde die Stimulation beendet. Durch Zugabe von Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA 2 mMol, pH 7, 10 Minuten Einwirkzeit) wurde die Ablösung von Makrophagen von der Wand der Kulturröhrchen angestrebt. Anschließend wurden die im Vollblut enthaltenen Erythrozyten unter Verwen-

dung von jeweils 9 ml BD FACS Lysing Solution (mit Aqua dest. im Verhältnis von 1:10 verdünnt) für zehn Minuten lysiert. Nach weiteren zehn Minuten Abzentrifugation (1400 rpm) des Lysepuffer-Überstandes wurden die Zellpellets mit jeweils 2 ml PBS gewaschen und schließlich erneut mit 1400 rpm für zehn Minuten zentrifugiert (vgl. Abbildung 5).

Die verbleibenden Zellpellets wurden mit jeweils 500 µl Formalin (2% in PBS, Einwirkzeit 17 Minuten) fixiert (vgl. Abbildung 5). Zum Auswaschen, wie für alle im weiteren Ablauf folgenden Waschschrte, wurden jeweils 2 ml FACS-Puffer (PBS mit 1% (w/v) bovinem Albumin Fraktion V (BSA, biomol, Hamburg) und 0,1% (w/v) Natriumazid) verwendet und die Ansätze wiederum für zehn Minuten zentrifugiert (1400 rpm). Resuspendiert in FACS-Puffer konnten die fixierten Zellen bis zu drei Wochen bei 4°C aufbewahrt werden.

#### **2.2.2.4 Färbung**

Im weiteren Verlauf wurden die Zellen durch Zugabe von jeweils 500 µl BD FACS Permeabilisierungspuffer (1:10 verdünnt mit A. dest.) für zehn Minuten permeabilisiert, um sie einer intrazellulären FACS-Färbung zugänglich zu machen. Nach Auswaschen, Abzentrifugation (1400 rpm, 10 Minuten), Resuspension in 400 µl FACS-Puffer und Überführung in FACS Röhrchen (BD Falcon) schloss sich die Färbung mittels Farbstoff-konjugierter AK (BD) an. Die Färbe-Mischung bestand aus anti-human CD4 (Klon SK3), konjugiert mit Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP), und anti-human CD154 (Klon TRAP1), konjugiert mit Allophycocyanin (APC), jeweils verdünnt mit FACS-Puffer im Verhältnis 1:5, sowie anti-human IL-2 (Klon MQ1-17H12), konjugiert mit Phycoerythrin (PE), und anti-human INF- $\gamma$  (Klon B27), konjugiert mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC), jeweils 1:100 verdünnt mit FACS-Puffer (vgl. Abbildung 5). Zusätzlich beinhaltete sie Beriglobin (1mg/ml in PBS, ZLB Behring) in 1:50 Verdünnung mit FACS-Puffer. Jeder Ansatz wurde zentrifugiert (1400 rpm, 10 Minuten) und die Zellpellets mit jeweils 50 µl der AK-Mischung gefärbt. Nach 30-minütiger Einwirkzeit im Dunkeln wurden nicht gebundene AK durch Zugabe von 200 µl FACS-Puffer ausgewaschen und zehn Minuten abzentrifugiert (1400 rpm). Die Zellen wurden schließlich in 250 µl FACS-Puffer resuspendiert und konnten einer durchflusszytometrischen Messung zugänglich gemacht werden.

### **2.2.2.5 Durchflusszytometrische Messung**

Die durchflusszytometrische Messung wurde an einem FACS Calibur-Gerät (BD) durchgeführt. Die Methode bedient sich des Prinzips, dass in Einzelzellsuspension an einem Laserstrahl vorbeigeleitete Zellen je nach ihrer Beschaffenheit optische Signale der Laserquelle in verschiedener Art und Weise streuen, was mittels der Photomultiplikatoren des FACS-Gerätes gemessen werden kann. Zusätzlich werden die an die AK gekoppelten fluoreszierenden Farbstoffe (vgl. Kap. 2.2.2.4) durch Laserstrahlen angeregt und emittieren Licht verschiedener Wellenlänge. Durch Fluoreszenz in verschiedenen Farben können so die von den Farbstoff-konjugierten AK erkannten Strukturen indirekt detektiert werden (43).

Die verschiedenen in den Proben enthaltenen Lymphozyten wurden gemäß ihrer Vorwärtsstreuung (FSC) ihrer Größe und gemäß ihrer Seitwärtsstreuung (SSC) ihrer Granularität entsprechend, wie bei jeder standardgemäßen Durchflusszytometrie, dargestellt. Eine definierte Region R1 wurde um die Gesamtmenge der Lymphozyten gelegt. Die Abgrenzung der CD4-positiven T-Helfer-Zellen sowie deren Subdifferenzierung gemäß Antigen-Spezifität und Zytokin-Produktion wurden durch die fluoreszierenden Farbstoff-konjugierten AK erreicht. Von jedem der acht Ansätze einer Probandin sollten möglichst jeweils 200000 CD4-positive T-Lymphozyten eingelesen werden. Dies hatte zur Folge, dass im Schnitt pro Probe über zwei Millionen Gesamtzellen eingelesen werden mussten.

### **2.2.2.6 Durchflusszytometrische Auswertung**

Die Auswertung der eingelesenen Proben erfolgte mittels der Software CellQuest Pro (BD). Die Abgrenzung der für diese Fragestellung interessanten Zellen wurde durch das Definieren bestimmter Regionen (R) und Quadranten in den Dot plots erreicht. Wie bereits erwähnt, enthielt R1 die Gesamtmenge aller Lymphozyten. R2 wurde ausschließlich um die Teilmenge der AK-markierten CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten gelegt. Die in R1 und R2 „gegateten“ Zellen konnten in einem Dot plot durch das Setzen von vier Quadranten gemäß ihrer Spezifität und Zytokin-Produktion ausgewertet werden. Die y-Achse beinhaltete hierbei die prozentuale Menge der CD4<sup>+</sup> / CD154<sup>+</sup> TZ, wohingegen die x-Achse den prozentualen Anteil der Zytokin produzierenden CD4<sup>+</sup> TZ (INF- $\gamma$  bzw. IL-2) beschrieb. Die Quadranten wurden so an die jeweilige Negativkontrolle angepasst, dass die beiden oberen Quadranten 0% bis maximal 0,02% der CD4<sup>+</sup> TZ enthielten. Darauf-

hin konnten die Positivkontrollen und die HPV-Ansätze nacheinander mit Hilfe der angepassten Quadranten analysiert werden. Aus der Summe der in den beiden oberen Quadranten befindlichen TZ ergab sich somit der prozentuale Gesamtanteil Stimulationsantigen-spezifischer CD154<sup>+</sup> / CD4<sup>+</sup> TZ. Der obere rechte Quadrant alleine beinhaltete sogenannte doppelt-positive CD4<sup>+</sup> TZ, d. h. Antigen-spezifische T-Helfer-Zellen, die zudem INF- $\gamma$  bzw. IL-2 produzierten (vgl. Abbildung 6 in Kap. 3.1.2.1).

### **2.3 Serologischer Multiplex-Assay zur Bestimmung spezifischer Antikörper**

Die Bestimmung HPV-spezifischer AK erfolgte durch die mit uns kooperierende Arbeitsgruppe von Dr. M. Pawlita am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg. Hierzu wurde kryokonserviertes, Heparin-antikoaguliertes Plasma von insgesamt 58 der 63 Probandinnen nach Heidelberg versendet (vgl. Kap. 2.1 und 2.2.2.1). Mit einer von Waterboer et al. 2005 entwickelten Methode konnten sowohl L1- als auch E6- und E7- spezifische AK für HPV 6, 11, 16 und 18 bestimmt werden. Die verwendete Multiplex-HPV-Serologie basierte auf der Inkubation des jeweiligen Probandinnen-Serums mit einem Mix von Luminex-Beads, die über Glutathion-S-Transferase mit dem jeweiligen HPV-Antigen verbunden waren. Nach Bindung der HPV-Antigen-spezifischen Serum-AK der Probandin wurden diese wiederum durch sekundäre, biotinylierte AK und Streptavidin-R-Phycoerythrin markiert. Mit Hilfe eines speziellen Durchflusszytometers, dem Luminex Analyzer, konnte die Fluoreszenz der Beads gemessen und somit die AK-Titer als median fluorescence intensity (MFI) dargestellt werden. Um einen gültigen Referenzbereich zu definieren, bei dessen Überschreitung von einem serologisch HPV-positiven Ergebnis gesprochen werden konnte, wurde der beschriebene Multiplex-Assay auf ein Kollektiv von 25 Jungfrauen angewendet. Zu den jeweiligen Mittelwerten für die einzelnen HPV-Antigene dieser Proben wurde jeweils die dreifache Standardabweichung addiert. Für die L1-Antigene von HPV 6, 16 und 18 ließ sich so ein Grenzwert der Positivität von 100 MFI definieren, für HPV 11 belief sich dieser auf 119 MFI. Die Anti-E6- und Anti-E7-Titer aller vier HPV-Typen waren ab der Überschreitung von 50 MFI als positiv zu werten (63).

### **2.4 Fragebogen**

Zur Charakterisierung und Überprüfung der Homogenität des Studienkollektivs diente eine Befragung der teilnehmenden Probandinnen mittels eines anamnestischen Frage-

bogens. Dieser war in vier Abschnitte gegliedert und bestand aus Einfachauswahlfragen im Multiple-Choice-Format. Einzige Ausnahme war eine Frage zu Nebenwirkungen der Gardasil®-Impfung, die eine Mehrfachauswahl der gegebenen Antworten erlaubte.

Abschnitt 1 beinhaltete Fragen nach vorhandenen Allergien, einer bekannten Immunsuppression und bestehendem Nikotin-Abusus, um eine mögliche immunologische Beeinträchtigung einzelner Probandinnen zu erkennen. So könnten unter dem Einfluss allergischer Reaktionen zu viele aktivierte TZ, deren Anzahl nicht ausschließlich durch die Impfung erklärbar wäre, gemessen werden (43). Im Falle eines zellulären Immundefektes hingegen wäre die Probandin ggf. gar nicht in der Lage eine HPV-spezifische TZ-Immunität auszubilden (43;53). Da chronische Nikotin-Exposition sich ebenfalls immunsuppressiv auf den Organismus auswirkt und möglicherweise eine Anergie der T-Lymphozyten auszulösen vermag, wurde auch das Rauchverhalten der Probandinnen mit in den Fragebogen aufgenommen (64).

In Abschnitt 2 wurde nach aufgetretenen unerwünschten Arzneimittelwirkungen der HPV-Impfung gefragt. Hierbei wurde die Art der UAW sowie das zeitliche Auftreten im Impfzyklus erfasst. Zur Bearbeitung der Fragestellung dieser Arbeit ist dieser Abschnitt im engeren Sinne nicht relevant. Da aber, trotz überzeugender Daten zur Sicherheit und Verträglichkeit in allen klinischen Studien (vgl. Kap. 1.2.1), mögliche Gardasil®-Nebenwirkungen aktuell immer wieder, auch in populärwissenschaftlichen Medien, diskutiert werden, wurde dieser Abschnitt beibehalten, um einen kurzen deskriptiven Überblick über im Studienkollektiv aufgetretene UAW geben zu können (65). Für Probandinnen der Kontrollgruppe entfiel die Beantwortung.

In Abschnitt 3 sollten Angaben zum Sexualleben gemacht werden. Es wurde nach dem aktuellen Sexualverhalten, der Anzahl der bisherigen Sexualpartner, dem Alter des ersten Sexualkontakts sowie der Verwendung von Kondomen gefragt. Da die steigende Anzahl verschiedener Sexualpartner als Hauptrisikofaktor einer möglichen HPV-Infektion determiniert wurde, kam dieser Frage eine besondere Relevanz zu (vgl. Kap. 1.1.3). Andere Studien zu den prophylaktischen HPV-Impfstoffen schlossen Frauen mit mehr als vier bzw. fünf Sexualpartnern von der Teilnahme aus (33;34;35;36).

Abschnitt 4 umfasste Fragen zum gynäkologischen Status der Probandinnen. Dies beinhaltete Fragen nach der regelmäßigen Teilnahme an gynäkologischen Vorsorgeunter-

suchungen, auffälligen Pap-Abstrichen in der Anamnese, bekannten ausgeheilten oder persistierenden HPV-Infektionen, dem Auftreten von Condylomata acuminata sowie der Diagnose anderer sexuell übertragbarer Krankheiten.

Auf Grund der zum Teil sehr intimen Fragen wurde der Fragebogen postalisch versandt und konnte von den Teilnehmerinnen anonymisiert in einem beigelegten frankierten Umschlag zurückgesendet werden, der sich mittels der gleichen Nummerierung dem TZ-Ergebnis zuordnen ließ.

## **2.5 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der durchflusszytometrisch erhobenen TZ-Daten sowie der gemessenen AK-Titer und der durch den Fragebogen ermittelten Gruppencharakteristika erfolgte mit Hilfe der Software SPSS 15.0 sowie 17.0 für Windows.

Um mögliche Unterschiede zwischen den gemessenen TZ-Antworten der vier Studiengruppen der Querschnittsstudie feststellen zu können, wurde eine einfaktorielle, univariate Varianzanalyse durchgeführt (ANOVA). Hierbei wurden Post-Hoc-Mehrfachvergleiche im Rahmen eines Tukey-B-Tests angewandt. Als abhängige Variablen wurden die TZ-Ergebnisse für die verschiedenen Antigene in den verschiedenen Färbungen (CD154 gesamt, INF- $\gamma$ , IL-2) definiert, während die Studiengruppe als Faktor galt. Die Analysen wurden für die Signifikanzniveaus  $\alpha = 0,05$ ,  $\alpha = 0,01$  und  $\alpha = 0,001$  durchgeführt. Zuvor war mittels eines Kruskal-Wallis-Tests die Gültigkeit der ANOVA für den Datensatz geprüft worden. Die beschriebene Varianzanalyse wurde zusätzlich nochmals mit der Summe der Ergebnisse der vier HPV L1-Antigene jeweils in INF- $\gamma$ - und IL-2-Färbung als abhängige Variable durchlaufen.

Mit den serologischen Daten wurde analog verfahren. Als Faktor wurde auch in diesem Fall die Gruppe definiert, während die abhängigen Variablen die Ergebnisse der AK-Titer für die verschiedenen HPV-Antigene darstellten. Auch hier wurde eine weitere Analyse mit den addierten Ergebnissen der AK-Titer für die vier L1-Antigene durchgeführt.

Bei der Auswertung des Fragebogens wurden die zwei bis vier Antwortmöglichkeiten der einzelnen Fragen mit Ziffern von 1 bis maximal 4 kodiert. Anschließend wurde auch in diesem Fall die oben beschriebene einfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt, wobei die Studiengruppe den Faktor darstellte und die Ergebnisse der einzelnen Fragebogen-



Parameter die abhängigen Variablen bildeten. Als weitere wichtige Gruppencharakteristika konnten so auch das Alter der Probandinnen sowie der vergangene Zeitraum zwischen der letzten Impfung und der Blutentnahme analysiert werden.

Um Unterschiede zwischen den Ergebnissen der einzelnen Antigene unabhängig von der Studiengruppe feststellen zu können, wurde sowohl für die TZ- als auch für die AK-Daten zusätzlich eine einfaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung berechnet und hieran T-Tests für gepaarte Stichproben mit anschließender Bonferroni-Korrektur angeschlossen. Um die statistische Power zu erhöhen, wurden die Daten aller geimpften Probandinnen zusammen analysiert, die ungeimpfte Kontrollgruppe wurde nicht berücksichtigt. Für die TZ-Daten ergab sich so eine eingeschlossene Probandinnenzahl von  $n = 47$ , für die AK-Titer von  $n = 42$ . Für die Varianzanalyse mit Messwiederholung wurden jeweils die vier HPV L1-Antigene als Innersubjektvariablen definiert. Im Falle einer Verletzung der Sphärizität konnte die Greenhouse-Geisser-Korrektur angewendet werden. Bei signifikantem Ausgang der Varianzanalyse wurden oben genannte T-Tests angeschlossen, um herauszufinden zwischen welchen Antigenen signifikante Unterschiede bestehen. Als abhängige Variablen 1 und 2 wurden hierfür jeweils die Ergebnisse zweier verschiedener HPV-Antigene definiert. Abschließend erfolgte eine Bonferroni-Korrektur durch Multiplikation der p-Werte mit dem Faktor 6. Die beschriebenen T-Tests wurden für ein Konfidenzintervall von 95%, 99% und 99,9% berechnet. Um Unterschiede zwischen den Ergebnissen der zwei Low-Risk-HPV-Typen mit den beiden High-Risk-Typen darstellen zu können, wurde ein weiterer T-Test durchgeführt, der als Variablen einerseits die Summe der TZ-Antwort für HPV 6 und 11 L1 und andererseits die Summe der Ergebnisse für HPV 16 und 18 L1 enthielt.

Um die Frage nach einer Korrelation von TZ-Antwort und AK-Antwort auf den Impfstoff zu beantworten, wurde schließlich die Berechnung bivariater Korrelationen angestrebt. Auch dies geschah zur Erhöhung der statistischen Power zusammen für alle geimpften Probandinnen ( $n = 42$ ), mit deren Material beide Assays durchlaufen worden waren, unabhängig von der jeweiligen Studiengruppe. Für das TZ- und das AK-Ergebnis des jeweils gleichen HPV-Antigens wurde ein Pearson-Korrelationskoeffizient mit zweiseitiger Signifikanz berechnet. Dies erfolgte nur für die Ergebnisse der IL-2-Färbung, da die mit der INF- $\gamma$ -Färbung dargestellten  $T_H1$ -Zellen immunologisch mit dem humoralen Immunsystem weniger in Verbindung stehen (vgl. Abbildung 1 in Kap. 1.3.2).

Zur Darstellung von Unterschieden zwischen den drei Zeitpunkten im Impfzyklus konnte für die Auswertung der TZ- und AK-Ergebnisse der Longitudinalstudie erneut eine ein-faktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung mit darauffolgenden T-Tests für gepaarte Stichproben genutzt werden. Als Innersubjektvariablen der Varianzanalyse wurden jeweils die Ergebnisse eines Antigens zu den drei verschiedenen Zeitpunkten im Impfzyklus definiert. Bei Verletzung der Sphärizität wurde erneut nach Greenhouse-Geisser korrigiert. Nach signifikantem Resultat der Varianzanalyse, womit die Nullhypothese der Mittelwertgleichheit über die drei Messzeitpunkte verworfen werden konnte, wurde mittels T-Tests ermittelt zwischen welchen Zeitpunkten signifikante Unterschiede bestanden. Abhängige Variablen 1 und 2 waren hierbei jeweils die Ergebnisse für ein Antigen an zwei verschiedenen Zeitpunkten. Auf eine zusätzliche Bonferroni-Korrektur konnte bei signifikantem Ausgang der vorangegangenen Varianzanalyse verzichtet werden, da nur drei paarweise Vergleiche im Rahmen der T-Tests durchgeführt wurden (sogenannte Abschlusstestprozedur).

Die Überprüfung auf mögliche signifikante Unterschiede in der TZ- und AK-Reaktion auf die vier verschiedenen in der Vakzine enthaltenen HPV-Typen im Rahmen der Longitudinalstudie erfolgte analog dem bereits in der Querschnittsstudie eingesetzten statistischen Verfahren, d. h. durch eine Varianzanalyse mit Messwiederholung und anschließenden T-Tests mit Bonferroni-Korrektur. Im Unterschied zur Querschnittsstudie mussten hier allerdings die Ergebnisse der einzelnen drei Zeitpunkte einzeln ausgewertet werden ( $n = 11$ ), da eine Zusammenfassung der jeweils gleichen elf Probandinnen zu drei verschiedenen Messzeitpunkten auf Grund der Abhängigkeit keinen Sinn ergäben hätte.

Abschließend sei noch erwähnt, dass auf Ebene der TZ sämtliche statistischen Berechnungen ausschließlich innerhalb der gleichen Zytokin-Anfärbung durchgeführt wurden.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Ergebnisse der Gardasil<sup>®</sup>-Querschnittsstudie**

#### **3.1.1 Charakterisierung des Studienkollektivs**

##### **3.1.1.1 Altersstruktur**

Das Durchschnittsalter des aus 63 Probandinnen bestehenden Gesamtkollektivs belief sich auf 23,4 Jahre (SD 2,5), wobei die jüngste Probandin 18 und die älteste Probandin 29 Jahre alt war. Die Altersverteilung innerhalb der vier Studiengruppen gestaltete sich folgendermaßen (vgl. Abbildung 2 in Kap. 2.1.1): Die ungeimpfte Kontrollgruppe wies ein Durchschnittsalter von 23,5 (SD 1,4), die Gruppe mit einmaliger Gardasil<sup>®</sup>-Impfung eines von 24,5 Jahren (SD 2,4) auf. Die bereits zweimal geimpften Teilnehmerinnen der dritten Gruppe waren im Durchschnitt 23,5 (SD 2,1), die Probandinnen der letzten Gruppe mit abgeschlossenem Impfzyklus 22,2 Jahre alt (SD 3,2). Der Altersunterschied zwischen den einmal und den dreimal geimpften Studienteilnehmerinnen ist für  $p < 0,05$  als signifikant anzusehen. Abgesehen davon existierten das Alter betreffend für  $p < 0,05$  keine weiteren signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

##### **3.1.1.2 Immunologische Auffälligkeiten**

Die Auswertung der Fragebögen ergab für  $p < 0,05$  keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Gruppen bezüglich des Anteils an Allergikerinnen und Raucherinnen unter den Probandinnen (vgl. Tabelle 3). Keine der 63 an der Studie teilnehmenden Frauen litt an einer bekannten Immunsuppression.

##### **3.1.1.3 Sexualeben**

Hinsichtlich des aktuellen Sexualverhaltens (fester Partner vs. wechselnde Partner vs. nicht aktiv) waren für  $p < 0,05$  keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen. Allerdings gaben die Probandinnen der Kontrollgruppe im Durchschnitt eine für  $p < 0,05$  signifikant geringere Anzahl bisheriger Sexualpartner an als die Probandinnen der einfach geimpften Gruppe. Die anderen Studiengruppen unterschieden sich bezüglich der Anzahl der Sexualpartner für  $p < 0,05$  jedoch nicht signifikant.

**Tabelle 3: Probandinnencharakteristika der vier Studiengruppen**

	ungeimpft n = 14 <sup>a</sup>	1x Gardasil®- geimpft n = 14 <sup>a</sup>	2x Gardasil®- geimpft n = 15 <sup>a</sup>	3x Gardasil®- geimpft n = 15 <sup>a</sup>
Allergikerinnen	6 42,9%	9 64,3%	6 40,0%	4 26,7%
Raucherinnen	2 14,3%	2 14,3%	1 6,7%	3 20,0%
<b>Sexualverhalten</b>				
1 fester Sexualpartner	8 57,1%	11 78,6%	10 66,7%	11 73,3%
Wechselnde Sexualpartner	1 7,1%	2 14,3%	2 13,3%	0 0%
Momentan nicht sexuell aktiv	5 35,7%	1 7,1%	3 20,0%	4 26,7%
<b>Zahl bisheriger Sexualpartner</b>				
0	4 28,6%	1 7,1%	0 0%	2 13,3%
1 – 5	8 57,1%	5 35,7%	10 66,7%	10 66,7%
> 5	2 14,3%	8 57,1%	5 33,3%	3 20,0%
<b>Alter beim 1. sexuellen Kontakt</b>				
< 14 Jahre	0 0%	0 0%	1 6,7%	0 0%
14 – 18 Jahre	5 35,7%	12 85,7%	11 73,3%	9 60%
> 18 Jahre	5 35,7%	1 7,1%	3 20%	4 26,7%
Jungfrauen	4 28,6%	1 7,1%	0 0%	2 13,3%
<b>Pap-Abstriche</b>				
Nicht regelmäßig durchgeführt	4 28,6%	1 7,1%	0 0%	0 0%
Regelmäßig Pap I oder II	9 64,3%	11 78,6%	14 93,3%	14 93,3%
≥ 1 auffälliger Pap-Abstrich (> Pap II)	1 7,1%	2 14,3%	1 6,7%	1 6,7%
Bekannte HPV-Infektion	0 0%	2 14,3%	1 6,7%	1 6,7%
Condylomata acuminata in der Anamnese	0 0%	2 14,3%	0 0%	0 0%
Andere STD in der Anamnese	0 0%	0 0%	0 0%	1 6,7%

n = Anzahl der Probandinnen einer Gruppe, die an der Befragung teilnahmen, Pap-Abstrich = zytologischer Zervix-Abstrich mit Test nach Papanicolaou, HPV = Humanes Papillomvirus, STD = engl. sexually transmitted diseases

<sup>a</sup> Gezeigt sind jeweils die absolute Zahl sowie der prozentuale Anteil der Probandinnen einer Gruppe, die das jeweilige Charakteristikum als zutreffend im Fragebogen angaben.

In Anbetracht des Alters, in dem der erste sexuelle Kontakt stattfand, unterschied sich die Kontrollgruppe erneut für  $p < 0,05$  signifikant von den Gruppen mit einmal und zweimal geimpften Probandinnen. Die ungeimpften Teilnehmerinnen gaben häufiger ein Alter des ersten Sexualkontakts von über 18 Jahren an, zudem befanden sich mehr Probandinnen in dieser Gruppe, die bisher noch gar nicht sexuell aktiv gewesen waren. Insgesamt sieben der an der Studie teilnehmenden Frauen gaben an Jungfrau zu sein. Vier von ihnen waren Mitglieder der Kontrollgruppe, eine stammte aus der Gruppe mit einer Gardasil®-Impfung und zwei aus der Gruppe mit bereits drei Impfungen (vgl. Tabelle 3). Zwischen den anderen Gruppen waren hinsichtlich des Alters beim ersten Sexualkontakt keine signifikanten Unterschiede für  $p < 0,05$  zu verzeichnen. In Bezug auf die Verwendung von Kondomen existierten für  $p < 0,05$  keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Studiengruppen (nicht gezeigt).

#### **3.1.1.4 Gynäkologische Anamnese**

Sämtliche Charakteristika, die den gynäkologischen Status der Probandinnen beschrieben, zeigten in ihrer Ausprägung keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. So waren bei der regelmäßigen Teilnahme an gynäkologischen Vorsorgeuntersuchungen, dem Auftreten auffälliger Pap-Abstriche sowie der Diagnose von HPV-Infektionen, Condylomen oder anderen sexuell übertragbaren Erkrankungen (STD) keine signifikanten Unterschiede für  $p < 0,05$  zu verzeichnen. Zwei einfach geimpfte Probandinnen sowie jeweils eine Probandin der beiden Gruppen mit Mehrfach-Impfung gaben an, bereits an einer HPV-Infektion gelitten zu haben. Die Probandin mit zweifacher Gardasil®-Impfung konnte die Erkrankung als HPV 18-Infektion näher beschreiben. Eine der beiden Frauen aus der Gruppe mit bisher einmaliger Impfung gab an, an einer Low-Risk-Infektion erkrankt gewesen zu sein, die sich in Form von Condylomen klinisch äußerte. Eine weitere Probandin dieser Gruppe berichtete, an anogenitalen Condylomen gelitten zu haben. Eine einzelne dreifach geimpfte Probandin des gesamten Kollektivs gab mit einer Chlamydien-Infektion eine andere STD an (vgl. Tabelle 3).

Zusätzlich zur anamnestischen Befragung mittels des Fragebogens konnten an Hand von serologischen Auffälligkeiten auf eine mögliche frühere HPV-Infektion einzelner Probandinnen Rückschlüsse gezogen werden, da positive HPV E6- oder E7-Titer nicht durch die prophylaktische Impfung erklärbar sind. Insgesamt neun Probandinnen wiesen E6- / E7-Titer auf, die den definierten Referenzbereich von 50 MFI überschritten

und so einen Hinweis auf eine mögliche HPV-Infektion gaben. Drei auffällige Ergebnisse wurden unter den dreifach geimpften Probandinnen, zwei bei Mitgliedern der Gruppe mit zweimaliger Gardasil<sup>®</sup>-Impfung gezählt. In der Kontrollgruppe wiesen vier Studienteilnehmerinnen auffällige E6- / E7-Titer auf. Insgesamt aber wurde die Homogenität der vier Studiengruppen auch bezüglich dieses Parameters bestätigt: Die für alle vier Gruppen berechneten Mittelwerte der Anti-E-Titer lagen für alle vier HPV-Typen unterhalb von 50 MFI, zudem war für  $p < 0,05$  zwischen keiner der Gruppen ein signifikanter Unterschied bezüglich der E6- / E7-Titer nachweisbar (vgl. Kap. 3.1.3.1).

#### **3.1.1.5 Zeitpunkt der Blutentnahme**

Abgesehen von den beschriebenen Probandinnencharakteristika wurde zudem analysiert, ob die Unterschiede des Zeitraums zwischen der letzten Immunisierung und der Blutentnahme für die Studie als signifikant anzusehen sind, um einen weiteren möglichen heterogenen Faktor der Gruppen auszuschließen. Die Kontrollgruppe wurde hierbei nicht berücksichtigt, da der Zeitpunkt der Blutentnahme bei den ungeimpften Probandinnen beliebig gewählt werden konnte. Bei den einfach geimpften Probandinnen erfolgte die Blutentnahme im Schnitt neun Wochen nach der Impfung (SD 6), wohingegen bei den Teilnehmerinnen mit zweifacher und dreifacher Impfung erst durchschnittlich 14 Wochen nach der letzten Vakzinierung (SD 5 bzw. 9) Blut entnommen wurde (vgl. Abbildung 2 in Kap. 2.1.1). Dieser Unterschied von fünf Wochen ist für  $p < 0,05$  nicht signifikant.

#### **3.1.1.6 Beobachtete Nebenwirkungen der Gardasil<sup>®</sup>-Impfung**

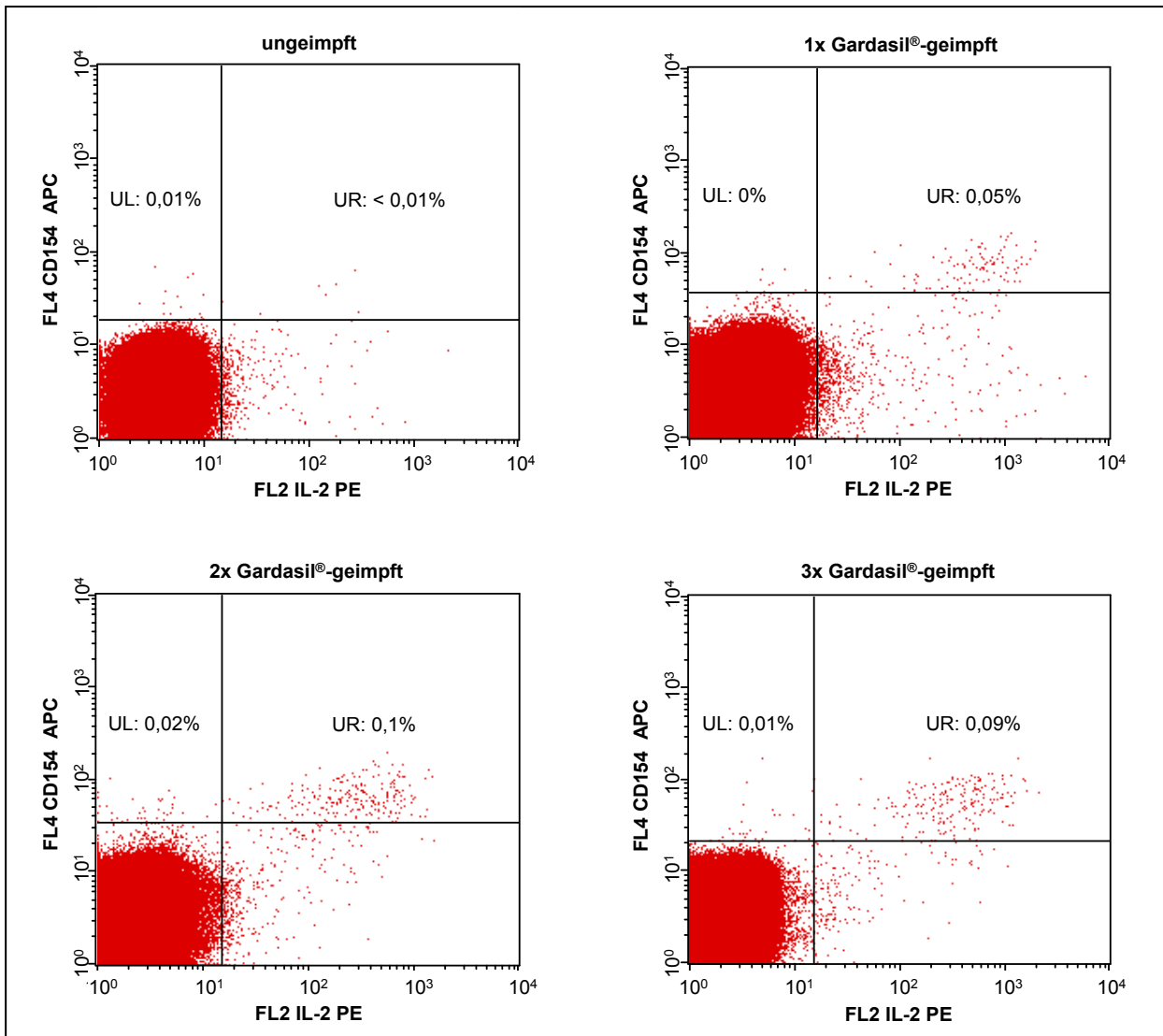
Wie in Kapitel 2.4 bereits erwähnt, soll eine kurze rein deskriptive Aufzählung der im Studienkollektiv aufgetretenen und von den Probandinnen auf die Gardasil<sup>®</sup>-Impfung bezogenen UAW folgen. Insgesamt 14 von 44 geimpften Probandinnen, die den Fragebogen ausgefüllt zurückgeschickt hatten, gaben das Auftreten von Nebenwirkungen im Zusammenhang mit der HPV-Impfung an. In zwölf Fällen handelte es sich um lokale Reaktionen wie an der Einstichstelle auftretende Schmerzen, Schwellung oder Rötung. Hierbei war kein gehäuftes Auftreten zu einem bestimmten Zeitpunkt im Impfzyklus feststellbar. Von den anderen beiden Probandinnen klagte eine über Schwindel nach der zweiten HPV-Immunisierung, die zweite beschrieb das Auftreten einer subklavikulären Lymphknotenschwellung nach der ersten Gardasil<sup>®</sup>-Vakzinierung.

### 3.1.2 Ergebnisse des ex vivo Assays

#### 3.1.2.1 Nachweis Vakzin-spezifischer T-Helfer-Zellen abhängig vom Impfstatus

Mit der beschriebenen Methodik gelang es, nach ex vivo Stimulation mit den entsprechenden Impfantigenen bei 46 von 47 einmal, zweimal oder dreimal Gardasil®-geimpften Probandinnen HPV L1-spezifische T-Helfer-Zellen im Blut nachzuweisen. Eine einfach geimpfte Studienteilnehmerin zeigte keine messbare L1-spezifische TZ-Reaktion. Bei Durchführung des gleichen Assays mit Vollblut nicht HPV-geimpfter Probandinnen der Kontrollgruppe hingegen ließen sich, mit Ausnahme von drei leicht HPV L1-positiven Probandinnen (Frequenz spezifischer TZ  $\leq 0,04\%$ ), keine L1-spezifischen CD4<sup>+</sup> TZ messen. Alle 63 Probandinnen zeigten nach Stimulation mit den Kontrollantigenen SEB und TT positive TZ-Reaktionen.

Abbildung 6 zeigt beispielhaft die Dot plot-Darstellung HPV 6 L1-spezifischer T-Helfer-Zellen nach durchflusszytometrischer Messung von ex vivo stimuliertem Vollblut repräsentativer Studienteilnehmerinnen aller vier Gruppen in CD4 / CD154 / IL-2-Färbung. Während die ungeimpfte Probandin der Kontrollgruppe mit einem Gesamtanteil HPV 6 L1-spezifischer TZ von 0,01% im Bereich der Negativkontrolle (nicht gezeigt) lag, ließen sich im Blut der einmal geimpften Studienteilnehmerin bereits 0,05% der CD4<sup>+</sup> TZ als HPV 6 L1-spezifisch abgrenzen. Im Gegensatz zur ungeimpften Probandin produzierten diese spezifischen T-Helfer-Zellen zudem IL-2. Bei den ausgewählten Blutspenderinnen mit zwei- und dreifacher Impfung war mit einem Anteil von 0,12% bzw. 0,1% eine noch stärker ausgeprägte HPV 6 L1-spezifische TZ-Antwort messbar. Auch hier produzierten die meisten spezifischen Zellen IL-2. Betrachtet man die CD4 / CD154 / INF- $\gamma$ -Färbung der gleichen Proben (nicht gezeigt), fällt eine ähnliche Verteilung der TZ-Antwort abhängig vom Impfstatus, aber eine quantitativ geringere Ausprägung der spezifischen INF- $\gamma$ <sup>+</sup> TZ auf. Bei den vier beschriebenen Probandinnen belief sich diese für HPV 6 L1 auf 0% (ungeimpft), 0,02% (1x geimpft), 0,07% (2x geimpft) bzw. 0,04% (3x geimpft). Die durchflusszytometrische Darstellung der für die anderen drei HPV-Typen spezifischen CD4<sup>+</sup> TZ gestaltete sich analog der abgebildeten HPV 6-spezifischen Zellen und unterschied sich lediglich in der Quantität (vgl. Kap. 3.1.2.2).



**Abbildung 6: Mittels Durchflusszytometrie gelingt der erstmalige Nachweis Gardasil®-induzierter HPV L1-spezifischer T-Helfer-Zellen.** Gezeigt sind HPV 6 L1-spezifische Interleukin-2 (IL-2)-positive T-Helfer-Zellen repräsentativer Probandinnen verschiedenen Impfstatus in FACS Dot plot-Darstellung. Oberer linker (UL) und oberer rechter (UR) Quadrant gemeinsam enthalten die Gesamtmenge aller spezifischen T-Helfer-Zellen. Zellen im UR-Quadrant weisen zudem eine Produktion von IL-2 auf. APC = Allophycocyanin, PE = Phycoerythrin.

In Tabelle 4 sind die Mittelwerte der für das jeweils aufgeführte Antigen spezifischen IL-2<sup>+</sup> TZ-Antwort aller vier Studiengruppen aufgeführt. Die Werte spiegeln den Anteil der spezifischen Interleukin-2 produzierenden T-Helfer-Zellen an der Gesamtmenge aller CD4<sup>+</sup> TZ wider. Zusätzlich ist dargestellt, ob signifikante Unterschiede in der quantitativen Ausprägung der spezifischen TZ zwischen den einzelnen Gruppen bestehen. Die Mittelwerte der spezifischen IL-2<sup>+</sup> TZ der nicht stimulierten Negativkontrollen liegen im Bereich zwischen 0,001% und 0,004% und unterscheiden sich für  $p < 0,05$  nicht signifikant zwischen den vier Gruppen. Auch die Ergebnisse der Positivkontrollen TT und SEB (nicht gezeigt) sind für  $p < 0,05$  nicht signifikant unterschiedlich. In allen vier Grup-



pen ließen sich deutlich mehr als 0,1% TT-spezifische TZ darstellen. Die nach Stimulation mit den E6- und E7-Antigenen gemessenen spezifischen TZ, die Rückschlüsse auf eine natürliche Infektion zulassen, liegen mit 0% bis 0,003% eindeutig im Bereich der Negativkontrolle und unterscheiden sich des Weiteren für  $p < 0,05$  nicht signifikant zwischen den vier Gruppen.

**Tabelle 4: Anstieg Vakzin-spezifischer T-Helfer-Zellen abhängig vom Impfstatus**

Antigen	Ungeimpft Mittelwert ( $\pm$ SD) <sup>a</sup>	p-Wert <sup>b</sup>	1x Gardasil®-geimpft Mittelwert ( $\pm$ SD) <sup>a</sup>	p-Wert <sup>b</sup>	2x Gardasil®-geimpft Mittelwert ( $\pm$ SD) <sup>a</sup>	p-Wert <sup>b</sup>	3x Gardasil®-geimpft Mittelwert ( $\pm$ SD) <sup>a</sup>	0x vs. 2x / 3x geimpft p-Wert <sup>b</sup>	1x vs. 3x geimpft p-Wert <sup>b</sup>
Negativkontrolle	0,002 ( $\pm$ 0,004)	n. s.	0,001 ( $\pm$ 0,003)	n. s.	0,004 ( $\pm$ 0,005)	n. s.	0,001 ( $\pm$ 0,003)	n. s.	n. s.
Positivkontrolle TT	0,125 ( $\pm$ 0,135)	n. s.	0,118 ( $\pm$ 0,093)	n. s.	0,147 ( $\pm$ 0,082)	n. s.	0,205 ( $\pm$ 0,201)	n. s.	n. s.
HPV 6 L1	0,008 ( $\pm$ 0,006)	*	0,035 ( $\pm$ 0,018)	**	0,079 ( $\pm$ 0,058)	n. s.	0,064 ( $\pm$ 0,025)	***	*
HPV 11 L1	0,004 ( $\pm$ 0,005)	n. s.	0,031 ( $\pm$ 0,022)	**	0,08 ( $\pm$ 0,058)	n. s.	0,067 ( $\pm$ 0,037)	***	*
HPV 16 L1	0,002 ( $\pm$ 0,004)	*	0,024 ( $\pm$ 0,018)	*	0,046 ( $\pm$ 0,034)	n. s.	0,048 ( $\pm$ 0,024)	***	*
HPV 18 L1	0,001 ( $\pm$ 0,003)	n. s.	0,014 ( $\pm$ 0,009)	**	0,035 ( $\pm$ 0,025)	n. s.	0,029 ( $\pm$ 0,018)	***	*
HPV 16 und 18 E6 / E7	0 ( $\pm$ 0)	n. s.	0,001 ( $\pm$ 0,003)	n. s.	0,003 ( $\pm$ 0,005)	n. s.	0,002 ( $\pm$ 0,004)	n. s.	n. s.

TT = Tetanustoxoid, HPV = Humanes Papillomvirus, L1 = *engl.* late protein 1, E6 / E7 = *engl.* early protein 6 / 7

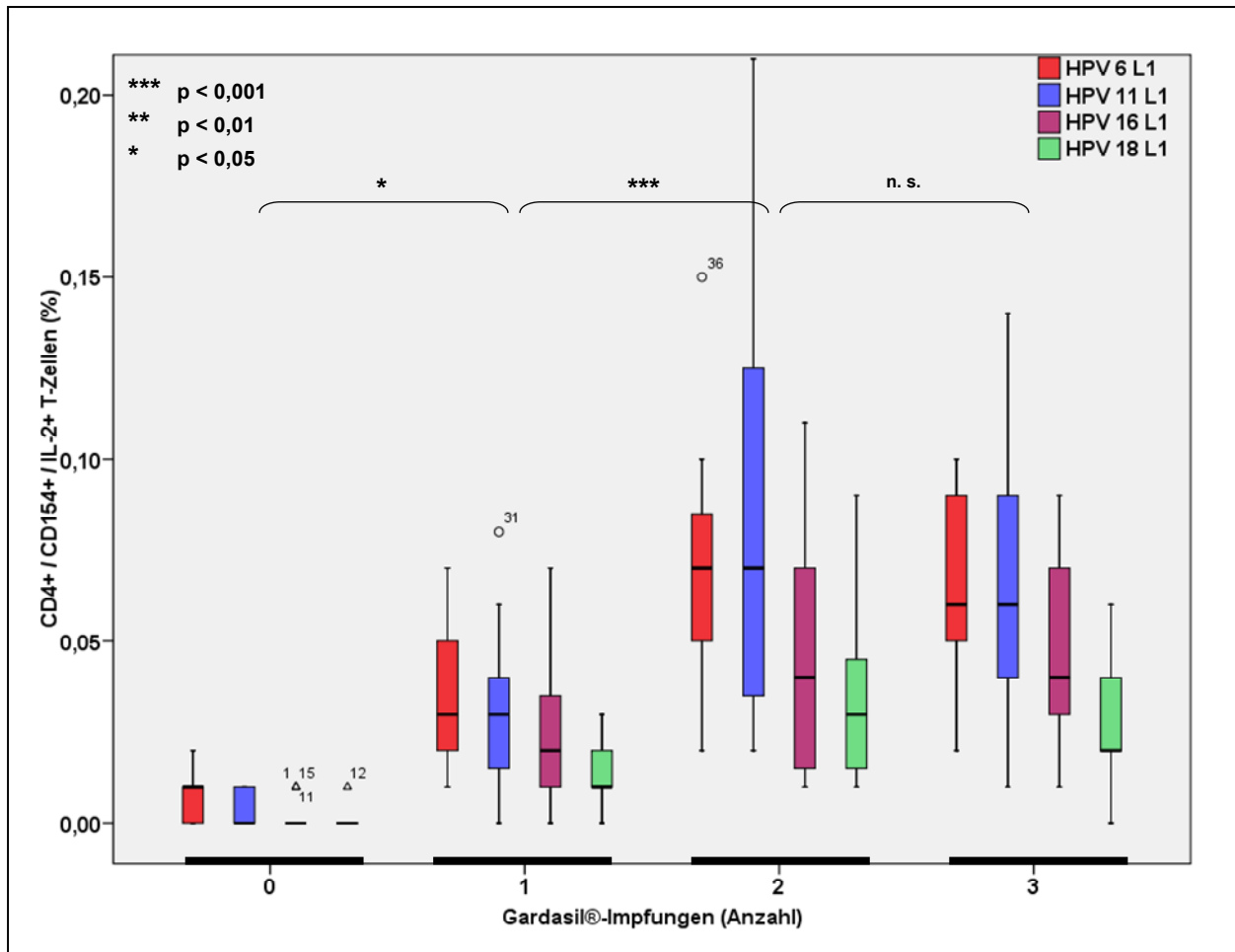
<sup>a</sup> Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen (SD) der prozentualen Anteile Antigen-spezifischer Interleukin-2 (IL-2)-positiver T-Helfer-Zellen an der Gesamtmenge aller CD4-positiven T-Zellen für die vier nach dem Impfstatus differenzierten Studiengruppen.

<sup>b</sup> Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Gruppen ist durch p-Werte dargestellt: n. s. = nicht signifikant, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Die nun folgenden Ergebnisse für die vier im Impfstoff enthaltenen Antigene HPV 6, 11, 16 und 18 L1 sind zusätzlich zur beschriebenen Tabelle 4 auch graphisch in Abbildung 7 dargestellt. Betrachtet man zunächst die Kontrollgruppe, fällt auf, dass die Ergebnisse der Stimulationen mit den L1-Antigenen der karzinogenen Typen HPV 16 und 18 unterhalb oder im Bereich der Negativkontrolle (nicht in der Abbildung gezeigt) liegen. Auch die HPV 11 L1-spezifische TZ-Antwort hebt sich nur gering ab. Lediglich für HPV 6 L1 ist mit 0,008% der CD4<sup>+</sup> TZ eine gering ausgeprägte spezifische IL-2<sup>+</sup> TZ-Reaktion in der ungeimpften Kontrollgruppe abgrenzbar. Bei den einfach geimpften Probandinnen lassen sich mit Mittelwerten der TZ-Frequenz von 0,035% bzw. 0,024% für  $p < 0,05$

signifikant mehr HPV 6 und 16 L1-spezifische TZ darstellen als in der Kontrollgruppe. Auch nach Stimulation mit HPV 11 und 18 L1 ist bei den Mitgliedern der einfach geimpften Gruppe mit 0,031% bzw. 0,014% ein weit größerer Anteil spezifischer TZ zu verzeichnen als bei ungeimpften Frauen, der Unterschied ist jedoch für  $p < 0,05$  statistisch nicht signifikant. Fasst man die Ergebnisse der vier HPV L1-Antigene zusammen, wie in Abbildung 7 geschehen, kann man insgesamt einen für  $p < 0,05$  signifikanten Anstieg der Vakzin-spezifischen T-Helfer-Zellen nach der ersten erfolgten Gardasil®-Impfung festhalten. Im Blut der Probandinnen mit bereits zwei Impfungen ließ sich wiederum eine z. T. mehr als doppelt so hohe Anzahl L1-spezifischer TZ messen. Für HPV 6 und 11 lag diese im Bereich von 0,08% aller  $CD4^+$  TZ, was für  $p < 0,01$  einem hochsignifikanten Unterschied im Vergleich zur einfach geimpften Gruppe entspricht. Bezüglich der High-Risk-Typen wurden 0,046% bzw. 0,035% HPV 16 bzw. 18 L1-spezifische Zellen gemessen. Im Falle von HPV 16 war dies für  $p < 0,05$  als signifikant mehr anzusehen als bei nur einfach geimpften Probandinnen, im Falle von HPV 18 war der Unterschied sogar hochsignifikant ( $p < 0,01$ ). Insgesamt erzeugte die zweite Impfung einen für  $p < 0,001$  hochsignifikanten Anstieg der spezifischen  $IL-2^+$  TZ-Antwort. Die Ergebnisse der dreifach geimpften Studienteilnehmerinnen dagegen unterscheiden sich für  $p < 0,05$  nicht signifikant von denen der zweifach geimpften Gruppe. Mit Mittelwerten von 0,064%, 0,067%, 0,048% und 0,029% spezifischen TZ für HPV 6, 11, 16 und 18 L1 sind sie zum Teil sogar quantitativ etwas geringer ausgeprägt als die der Probandinnen mit nur zwei Impfungen.

Vergleicht man die Ergebnisse mehrfach geimpfter (2x bzw. 3x) mit denen ungeimpfter Probandinnen, lässt sich für alle vier HPV-Typen ein für  $p < 0,001$  hochsignifikanter Anstieg der L1-spezifischen  $IL-2^+$  TZ festhalten. Dreifach geimpfte Studienteilnehmerinnen wiesen im Vergleich zu denen mit nur einmaliger Gardasil®-Impfung für  $p < 0,05$  signifikant ebenfalls mehr der beschriebenen spezifische Zellen auf.



**Abbildung 7: Anstieg Vakzin-spezifischer T-Helfer-Zellen abhängig vom Impfstatus.** Gezeigt sind die prozentualen Anteile HPV 6, 11, 16 und 18 L1-spezifischer Interleukin-2 (IL-2)-positiver T-Helfer-Zellen an der Gesamtmenge aller CD4-positiven T-Zellen differenziert nach der Anzahl erhaltener Gardasil®-Impfungen. Die Box beschreibt 50% aller Ergebnisse der jeweiligen Gruppe und enthält den Median. Der Bereich des maximal 1,5-fachen Interquartilsabstandes (IQR) wird durch die Whiskers gekennzeichnet. Milde Ausreißer bis zu einem dreifachen IQR sind als Kreise, extreme Ausreißer oberhalb des dreifachen IQR als Dreiecke dargestellt. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Gruppen verschiedenen Impfstatus ist durch p-Werte angegeben: n. s. = nicht signifikant, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001. HPV = Humanes Papillomvirus, L1 = *engl.* late protein 1

Analog zu Tabelle 4 beschreibt Tabelle 5 die Ergebnisse der Messung HPV L1-spezifischer  $\text{INF-}\gamma^+$  T-Helfer-Zellen. Auch hier ergeben sich zwischen den vier Gruppen für p < 0,05 keine signifikanten Unterschiede der spezifischen TZ-Antwort auf die Negativ- und Positivkontrollen. Der Anteil Interferon- $\gamma$  produzierender TT-spezifischer TZ ist etwa halb so hoch wie der oben beschriebene Anteil TT-spezifischer IL-2<sup>+</sup> TZ. Die gemessenen E6- / E7-spezifischen  $\text{INF-}\gamma^+$  TZ liegen mit Werten von 0% bis 0,001% genau im Größenbereich der nicht stimulierten Negativkontrolle und sind zwischen den Gruppen für p < 0,05 nicht signifikant unterschiedlich.

**Tabelle 5: Anstieg Vakzin-spezifischer T<sub>H</sub>1-Zellen abhängig vom Impfstatus**

Antigen	Ungeimpft Mittelwert (± SD) <sup>a</sup>	p-Wert <sup>b</sup>	1x Gardasil®-geimpft Mittelwert (± SD) <sup>a</sup>	p-Wert <sup>b</sup>	2x Gardasil®-geimpft Mittelwert (± SD) <sup>a</sup>	p-Wert <sup>b</sup>	3x Gardasil®-geimpft Mittelwert (± SD) <sup>a</sup>	0x vs. 2x / 3x geimpft p-Wert <sup>b</sup>	1x vs. 3x geimpft p-Wert <sup>b</sup>
Negativkontrolle	0,001 (± 0,003)	n. s.	0 (± 0)	n. s.	0,001 (± 0,003)	n. s.	0,001 (± 0,003)	n. s.	n. s.
Positivkontrolle TT	0,054 (± 0,054)	n. s.	0,058 (± 0,04)	n. s.	0,062 (± 0,043)	n. s.	0,101 (± 0,098)	n. s.	n. s.
HPV 6 L1	0,004 (± 0,005)	*	0,021 (± 0,013)	*	0,042 (± 0,034)	n. s.	0,034 (± 0,017)	***	n. s.
HPV 11 L1	0 (± 0)	n. s.	0,013 (± 0,012)	**	0,043 (± 0,034)	n. s.	0,038 (± 0,023)	***	**
HPV 16 L1	0 (± 0)	*	0,013 (± 0,014)	n. s.	0,025 (± 0,019)	n. s.	0,024 (± 0,015)	***	n. s.
HPV 18 L1	0 (± 0)	n. s.	0,005 (± 0,006)	***	0,019 (± 0,017)	n. s.	0,014 (± 0,01)	***	*
HPV 16 und 18 E6 / E7	0 (± 0)	n. s.	0,001 (± 0,003)	n. s.	0,001 (± 0,004)	n. s.	0,001 (± 0,002)	n. s.	n. s.

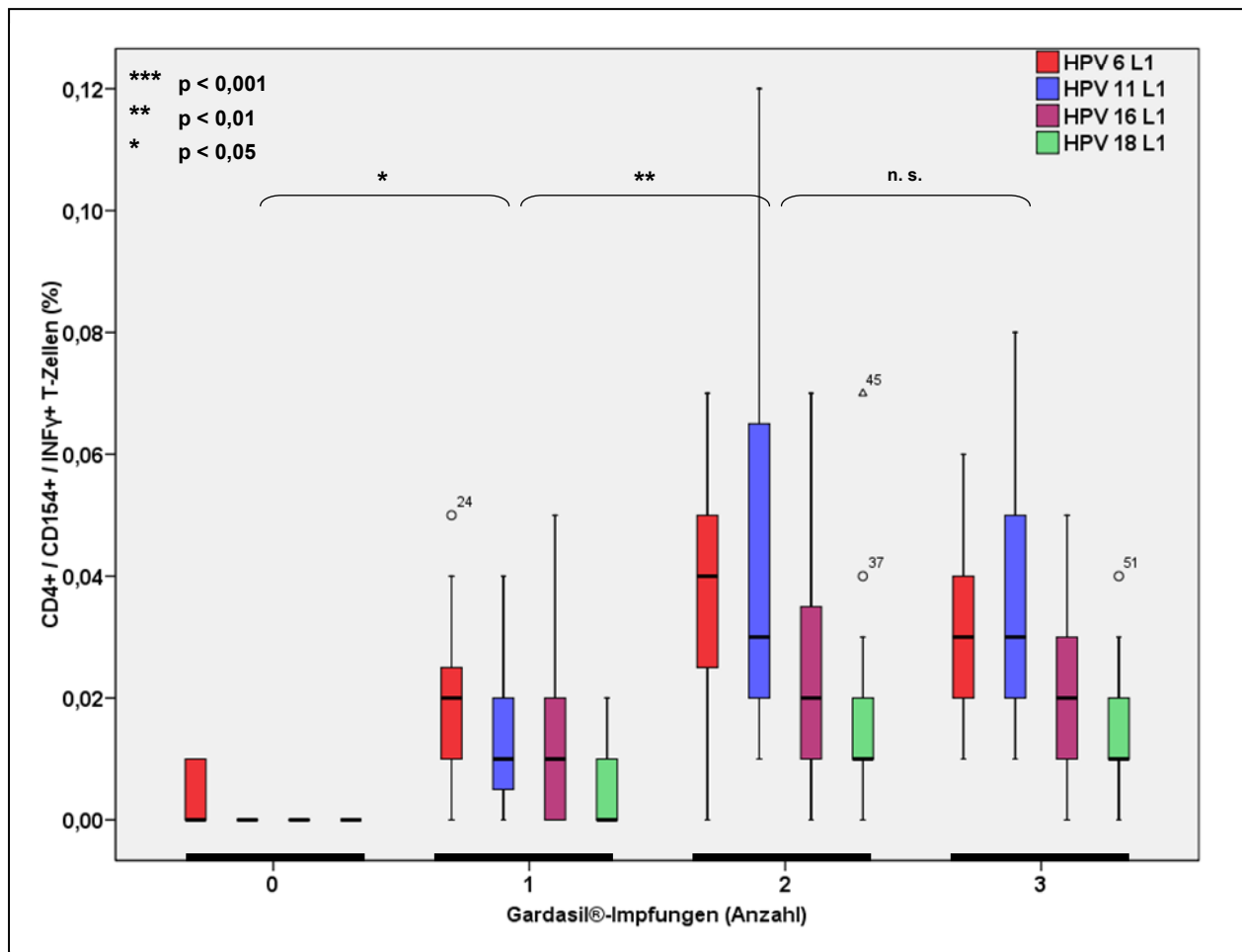
TT = Tetanustoxoid, HPV = Humanes Papillomvirus, L1 = *engl.* late protein 1, E6 / E7 = *engl.* early protein 6 / 7

<sup>a</sup> Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen (SD) der prozentualen Anteile Antigen-spezifischer Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ )-positiver T-Helfer-Zellen an der Gesamtmenge aller CD4-positiven T-Zellen für die vier nach dem Impfstatus differenzierten Studiengruppen.

<sup>b</sup> Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Gruppen ist durch p-Werte dargestellt: n. s. = nicht signifikant, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001.

Die Ergebnisse der HPV L1-spezifischen TZ sind auch für die INF- $\gamma$ -Färbung graphisch in Abbildung 8 dargestellt. Mit Ausnahme der bereits beschriebenen leicht positiven Antwort HPV 6 L1-spezifischer Zellen konnten in der Kontrollgruppe auch keine Interferon- $\gamma$  produzierenden HPV L1-spezifischen TZ gemessen werden. Bei den Probandinnen mit einer Impfung konnten für alle HPV-Typen spezifische INF- $\gamma$ <sup>+</sup> TZ nachgewiesen werden, mit prozentualen Anteilen von 0,005% (HPV 18) bis 0,021% (HPV 6) aller CD4<sup>+</sup> TZ betragen diese aber nur ca. ein bis zwei Drittel der oben beschriebenen spezifischen IL-2<sup>+</sup> TZ. Der Anstieg der TZ-Antwort war auch hier für HPV 6 und 16 für p < 0,05 als signifikant anzusehen, für HPV 11 und 18 ließ sich noch kein signifikanter Unterschied festhalten. In Summe betrachtet stieg die HPV L1-spezifische INF- $\gamma$ <sup>+</sup> Gesamt-TZ-Antwort durch einmalige Gardasil®-Impfung für p < 0,05 signifikant an. Bei den Probandinnen mit zweifacher Immunisierung konnte bereits ein doppelt bis mehr als dreimal so großer Anteil spezifischer Interferon- $\gamma$  produzierender Zellen gemessen werden. Insgesamt war dieser Anstieg der Vakzin-spezifischen TZ-Antwort für p < 0,01 als hochsigni-

fikant anzusehen, die Ausprägung der  $\text{INF-}\gamma^+$  TZ blieb aber quantitativ auch hier nur etwa halb so intensiv wie die der oben beschriebenen  $\text{IL-2}^+$  TZ. Auch auf Ebene der  $\text{INF-}\gamma^+$  TZ führte die Komplettierung des Impfzyklus mit der dritten Impfung, analog zur  $\text{IL-2}^+$  TZ-Antwort, zu keinem signifikanten Anstieg der HPV L1-spezifischen  $\text{INF-}\gamma^+$  TZ im Vergleich zu Probandinnen, die bisher nur zwei Impfungen erhalten hatten.



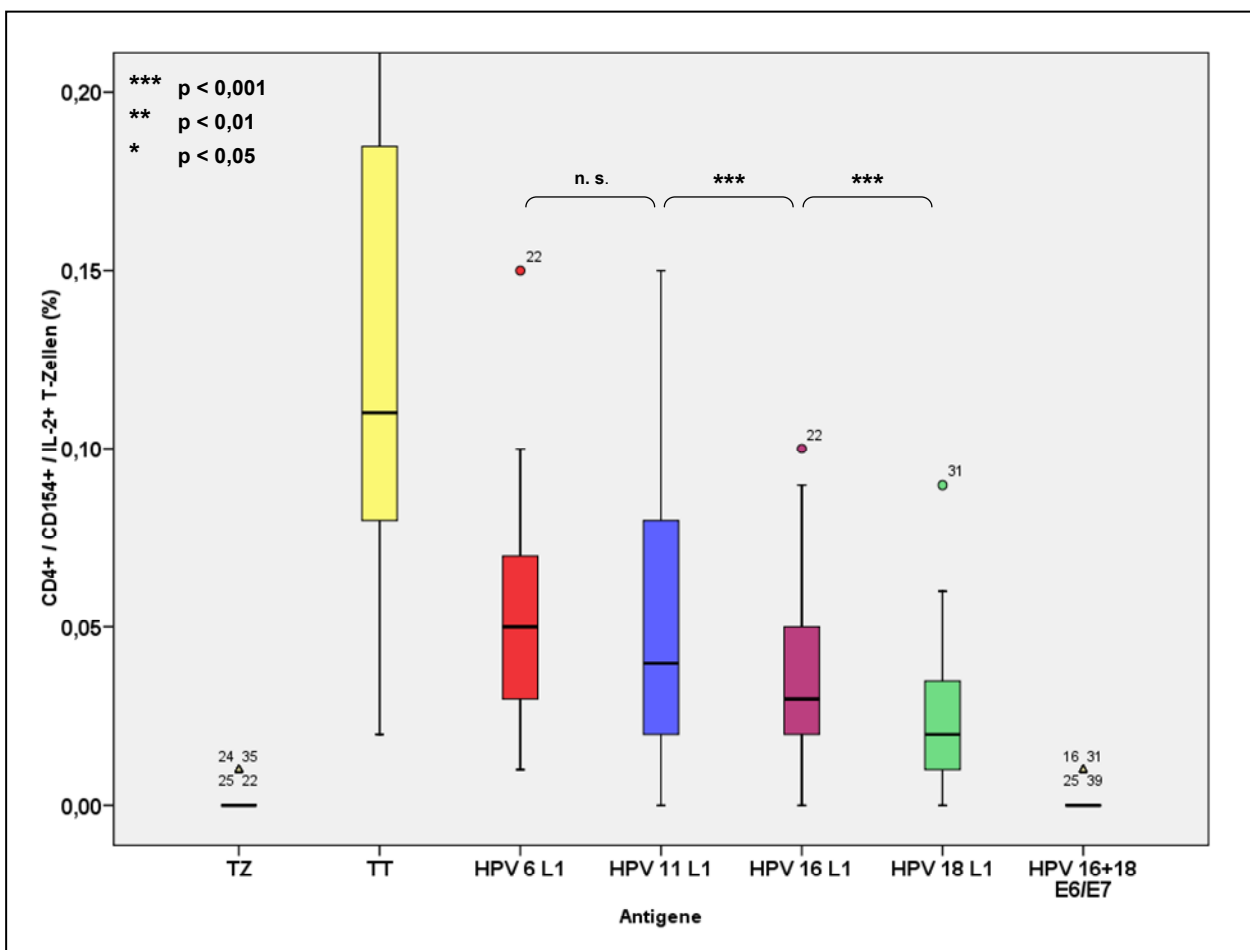
**Abbildung 8: Anstieg Vakzin-spezifischer  $T_H1$ -Zellen abhängig vom Impfstatus.** Gezeigt sind die prozentualen Anteile HPV 6, 11, 16 und 18 L1-spezifischer Interferon- $\gamma$  ( $\text{INF-}\gamma$ )-positiver T-Helfer-Zellen an der Gesamtmenge aller  $\text{CD4}^+$ -positiven T-Zellen differenziert nach der Anzahl erhaltener Gardasil®-Impfungen. Die Box beschreibt 50% aller Ergebnisse der jeweiligen Gruppe und enthält den Median. Der Bereich des maximal 1,5-fachen Interquartilsabstandes (IQR) wird durch die Whiskers gekennzeichnet. Milde Ausreißer bis zu einem dreifachen IQR sind als Kreise, extreme Ausreißer oberhalb des dreifachen IQR als Dreiecke dargestellt. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Gruppen verschiedenen Impfstatus ist durch p-Werte angegeben: n. s. = nicht signifikant, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . HPV = Humanes Papillomvirus, L1 = *engl.* late protein 1

Nicht tabellarisch oder graphisch dargestellt sind die Gesamtanteile HPV L1-spezifischer T-Helfer-Zellen ( $\text{CD4}^+ / \text{CD154}^+$ ) unabhängig der Zytokinproduktion, da sie sich kaum, wie auch schon aus Abbildung 6 ersichtlich, von den Anteilen  $\text{CD4}^+ / \text{CD154}^+ / \text{IL-2}^+$  TZ unterscheiden. Um jedoch einen generellen Überblick über die Größenordnung Gardasil®-induzierter zellulärer Immunität zu geben, sei erwähnt, dass sich der mittlere

Gesamtanteil L1-spezifischer T-Helfer-Zellen für alle mehrfach geimpften Probandinnen (zwei- oder dreifach vakziniert) für die Low-Risk-HPV-Typen auf 0,088% (SD 0,053), für HPV 16 auf 0,058% (SD 0,032) sowie für HPV 18 auf 0,043% (SD 0,027) belief.

### 3.1.2.2 Nachweis Vakzin-spezifischer T-Helfer-Zellen abhängig vom HPV-Typ

Aus den in Kapitel 3.1.2.1 präsentierten Resultaten der HPV L1-spezifischen TZ abhängig vom Impfstatus geht bereits hervor, dass die für die vier verschiedenen HPV-Typen spezifische TZ-Antwort quantitativ nicht gleichermaßen ausgeprägt ist. Abbildung 9 zeigt die Ergebnisse der Antigen-spezifischen IL-2<sup>+</sup> TZ aller 47 geimpften Probandinnen unabhängig vom Impfstatus und stellt deren Unterschiede abhängig vom HPV-Typ dar.



**Abbildung 9: Die Ausprägung der Vakzin-spezifischen T-Zell-Antwort unterscheidet sich abhängig vom HPV-Typ.** Gezeigt sind die prozentualen Anteile spezifischer Interleukin-2 (IL-2)-positiver T-Helfer-Zellen an der Gesamtmenge aller CD4-positiven T-Zellen für HPV 6, 11, 16 und 18 L1 sowie für die nicht stimulierte TZ-Negativkontrolle (TZ), die Positivkontrolle Tetanustoxoid (TT) und die Infektionskontrolle HPV 16 und 18 E6 / E7. Die Abbildung bezieht sich auf alle geimpften Probandinnen ohne Differenzierung nach der Anzahl erhaltener Impfdosen. Die Box beschreibt 50% aller Ergebnisse und enthält den Median. Der Bereich des maximal 1,5-fachen Interquartilsabstandes (IQR) wird durch die Whiskers gekennzeichnet. Milde Ausreißer bis zu einem dreifachen IQR sind als Kreise, extreme Ausreißer oberhalb des dreifachen IQR als Dreiecke dargestellt. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den HPV-Antigenen ist durch p-Werte angegeben: n. s. = nicht signifikant, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001. HPV = Humanes Papillomvirus, L1 = *engl.* late protein 1, E6 / E7 = early protein 6 / 7

Wie aus dem letzten Kapitel bereits hervorgeht, liegt der gemessene Anteil spezifischer Zellen der TZ-Negativkontrolle und der E6- / E7-„Infektionskontrolle“ im Bereich von 0%, die spezifische Reaktion auf die Positivkontrolle TT ist sehr stark ausgeprägt.

Die gemessenen Anteile spezifischer TZ nach Stimulation mit den L1-Antigenen der beiden Low-Risk-Typen HPV 6 und 11 unterscheiden sich für  $p < 0,05$  nicht signifikant. Wie aus Tabelle 6 hervorgeht, liegen ihre aus den Ergebnissen aller geimpften Probandinnen berechneten Mittelwerte bei 0,06%. Für den weit verbreiteten Vertreter der High-Risk-Gruppe HPV 16 wird durch die Impfung mit einem Mittelwert von insgesamt 0,04% ein geringerer Anteil L1-spezifischer TZ gebildet. Verglichen mit den beiden jeweiligen Vertretern der Low-Risk-Gruppe ist dies für  $p < 0,001$  als hochsignifikant weniger anzusehen. Für den zweiten im Impfstoff enthaltenen karzinogenen HPV-Typ HPV 18 konnten wiederum mit einem mittleren Anteil von nur 0,026% weniger L1-spezifische IL-2<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen nachgewiesen werden. Sowohl im Vergleich zu den beiden jeweiligen Low-Risk-HPV-Typen als auch im Vergleich zu HPV 16 entspricht dies einer für  $p < 0,001$  hochsignifikant geringeren Ausbildung HPV 18 L1-spezifischer TZ. Nach Addition der jeweiligen TZ-Ergebnisse der beiden Low- und High-Risk-Vertreter lässt sich insgesamt für die Low-Risk-HPV-Typen eine für  $p < 0,001$  hochsignifikant stärker ausgeprägte spezifische TZ-Antwort festhalten als für die karzinogenen High-Risk-Typen (nicht gezeigt).

**Tabelle 6: Die Ausprägung der Vakzin-spezifischen T-Zell-Antwort unterscheidet sich abhängig vom HPV-Typ.**

		MW <sup>a</sup>	(± SD) <sup>a</sup>	Low-Risk-HPV		High-Risk-HPV	
				HPV 6 L1 <sup>b</sup>	HPV 11 L1 <sup>b</sup>	HPV 16 L1 <sup>b</sup>	HPV 18 L1 <sup>b</sup>
Low-Risk-HPV	HPV 6 L1 <sup>b</sup>	0,06	(0,041)				
	HPV 11 L1 <sup>b</sup>	0,06	(0,045)	n. s.			
High-Risk-HPV	HPV 16 L1 <sup>b</sup>	0,04	(0,028)	***	***		
	HPV 18 L1 <sup>b</sup>	0,026	(0,02)	***	***	***	

HPV = Humanes Papillomvirus, L1 = *engl.* late protein 1

<sup>a</sup> Gezeigt sind Mittelwerte (MW) mit Standardabweichungen (SD) der L1-spezifischen Interleukin-2 (IL-2)-positiven T-Helfer-Zell-Anteile an der Gesamtmenge aller CD4-positiven T-Zellen differenziert nach dem HPV-Typ. Die Werte beziehen sich auf alle 47 geimpften Probandinnen unabhängig von der Anzahl erhaltener Impfdosen.

<sup>b</sup> Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den HPV L1-Antigenen ist durch p-Werte dargestellt: n. s. = nicht signifikant, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Bei Analyse der HPV L1-spezifischen Interferon- $\gamma$  produzierenden Zellen (nicht gezeigt) ergeben sich bezüglich der quantitativen Ausprägung abhängig vom HPV-Typ die glei-

chen Unterschiede: Die Anteile HPV 6 und 11 L1-spezifischer TZ zeigen für  $p < 0,05$  keine signifikanten Unterschiede, während die HPV 16 L1-spezifische  $\text{INF-}\gamma^+$  TZ-Antwort im jeweiligen Vergleich zu beiden Low-Risk-Typen für  $p < 0,001$  hochsignifikant geringer ausgeprägt ist. HPV 18 L1-spezifische  $\text{INF-}\gamma^+$  TZ lassen sich ebenfalls im Vergleich zu HPV 6, HPV 11 und HPV 16 in für  $p < 0,001$  hochsignifikant geringerem Maße nachweisen.

### **3.1.3 Ergebnisse der Multiplex-Serologie**

#### **3.1.3.1 Nachweis Vakzin-spezifischer Antikörper abhängig vom Impfstatus**

Bei 42 der 47 einfach, zweifach oder dreifach geimpften Probandinnen sowie bei allen 16 Mitgliedern der Kontrollgruppe erfolgte eine Bestimmung L1- sowie zusätzlich E6- und E7-spezifischer AK für die vier im Impfstoff enthaltenen HPV-Typen. In 41 von 42 Fällen ließen sich HPV L1-spezifische AK und damit eine Serokonversion bei den geimpften Probandinnen nachweisen. Bei einer einfach geimpften Probandin gelang dies nicht, wobei es sich hierbei nicht um die oben beschriebene Studienteilnehmerin handelte, bei der keine L1-spezifischen TZ nachweisbar waren (vgl. Kap. 3.1.2.1). Zudem hatten sieben einfach geimpfte Probandinnen keine messbaren Anti-HPV 18 L1-Antikörper ausgebildet, wohl aber solche gegen die anderen drei HPV-Typen. In der Kontrollgruppe wiesen sieben Probandinnen positive Anti-L1-Titer für einen oder maximal zwei HPV-Typen auf. Diese waren jedoch quantitativ um ein Vielfaches geringer ausgeprägt als solche der geimpften Studienteilnehmerinnen. In allen sieben Fällen war HPV 6 beteiligt.

Tabelle 7 zeigt analog zu den in Kapitel 3.1.2.1 beschriebenen TZ-Ergebnissen die Mittelwerte der für das jeweils aufgeführte HPV-Antigen spezifischen AK-Titer aller vier Studiengruppen. Wie in Kapitel 3.1.1.4 bereits erwähnt, befinden sich die Titer der Anti-E-Antikörper, deren Antigene nicht in der Vakzine enthalten sind, allesamt im Referenzbereich von maximal 50 MFI und unterscheiden sich für  $p < 0,05$  zwischen den Gruppen nicht signifikant.



**Tabelle 7: Anstieg Vakzin-spezifischer Antikörper abhängig vom Impfstatus**

Antigen	Ungeimpft	p-Wert <sup>b</sup>	1x Gardasil®-geimpft	p-Wert <sup>b</sup>	2x Gardasil®-geimpft	p-Wert <sup>b</sup>	3x Gardasil®-geimpft	0x vs. 2x geimpft	0x vs. 3x geimpft	1x vs. 3x geimpft
	Mittelwert (± SD) <sup>a</sup>		Mittelwert (± SD) <sup>a</sup>		Mittelwert (± SD) <sup>a</sup>		Mittelwert (± SD) <sup>a</sup>	p-Wert <sup>b</sup>	p-Wert <sup>b</sup>	p-Wert <sup>b</sup>
HPV 6 L1	113 (± 138)	**	3069 (± 4212)	n. s.	4597 (± 1955)	n. s.	5801 (± 1940)	***	***	*
HPV 11 L1	51 (± 60)	*	2381 (± 3102)	n. s.	3565 (± 1806)	*	5954 (± 2605)	***	***	***
HPV 16 L1	60 (± 118)	n. s.	3139 (± 5695)	n. s.	4646 (± 3233)	n. s.	7727 (± 3479)	**	***	**
HPV 18 L1	28 (± 80)	n. s.	1185 (± 2250)	n. s.	1138 (± 574)	**	2975 (± 1861)	n. s.	***	**
HPV 6 E6	5 (± 4)	n. s.	7 (± 5)	n. s.	7 (± 5)	n. s.	10 (± 9)	n. s.	n. s.	n. s.
HPV 6 E7	1 (± 1)	n. s.	1 (± 4)	n. s.	3 (± 5)	n. s.	2 (± 2)	n. s.	n. s.	n. s.
HPV 11 E6	19 (± 33)	n. s.	12 (± 8)	n. s.	18 (± 21)	n. s.	27 (± 31)	n. s.	n. s.	n. s.
HPV 11 E7	3 (± 2)	n. s.	1 (± 2)	n. s.	2 (± 4)	n. s.	1 (± 5)	n. s.	n. s.	n. s.
HPV 16 E6	10 (± 4)	n. s.	9 (± 4)	n. s.	29 (± 51)	n. s.	21 (± 28)	n. s.	n. s.	n. s.
HPV 16 E7	26 (± 52)	n. s.	2 (± 5)	n. s.	3 (± 2)	n. s.	7 (± 14)	n. s.	n. s.	n. s.
HPV 18 E6	45 (± 156)	n. s.	5 (± 4)	n. s.	6 (± 4)	n. s.	6 (± 4)	n. s.	n. s.	n. s.
HPV 18 E7	-1 (± 4)	n. s.	-3 (± 2)	n. s.	1 (± 10)	n. s.	0 (± 13)	n. s.	n. s.	n. s.

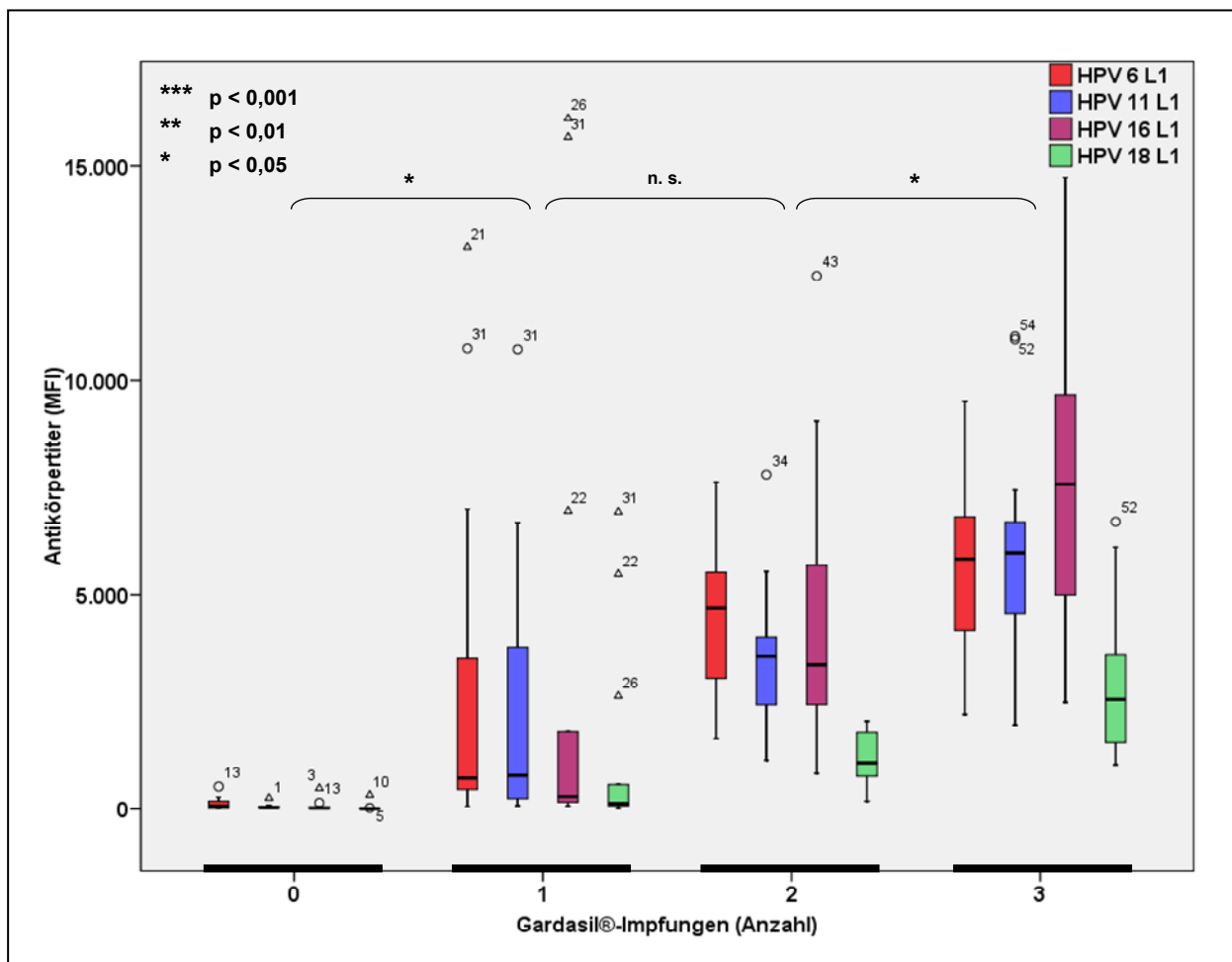
HPV = Humanes Papillomvirus, L1 = *engl.* late protein 1, E6 / E7 = *engl.* early protein 6 / 7

<sup>a</sup> Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen (SD) der HPV-Antigen-spezifischen Antikörpertiter in median fluorescence intensity (MFI) für die vier nach dem Impfstatus differenzierten Studiengruppen.

<sup>b</sup> Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Gruppen ist durch p-Werte dargestellt: n. s. = nicht signifikant, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001.

Die für die vier HPV L1-Antigene spezifischen AK-Titer sind zusätzlich in Abbildung 10 graphisch dargestellt. Betrachtet man die ungeimpfte Kontrollgruppe, fällt lediglich für HPV 6 ein leicht erhöhter L1-spezifischer AK-Titer auf. Die anderen drei HPV-Typen liegen mit Werten unterhalb von 100 bzw. 119 MFI im Referenzbereich. Der Nachweis HPV 6 L1-spezifischer AK deckt sich mit der für die Kontrollgruppe geringfügig erhöhten HPV 6 L1-spezifischen TZ-Antwort, die sowohl in IL-2- als auch in INF-γ-Färbung darstellbar war (vgl. Kap. 3.1.2.1). Nach einer Gardasil®-Impfung lassen sich für alle vier

HPV-Typen L1-spezifische AK messen. Für HPV 6 mit einem durchschnittlichen Titer von 3069 MFI stellt sich dieser Anstieg im Vergleich zur Kontrollgruppe für  $p < 0,01$  als hochsignifikant dar, der durchschnittliche Anti-HPV 11-Titer von 2381 MFI unterscheidet sich für  $p < 0,05$  signifikant von den Titern der ungeimpften Probandinnen. Die High-Risk-Typen HPV 16 und 18 erreichen spezifische AK-Titer von 3139 und 1185 MFI, dies ist für  $p < 0,05$  jedoch im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht als signifikant anzusehen. Fasst man die vier AK-Titer zusammen, kann man gemäß Abbildung 10 insgesamt festhalten, dass die erste Gardasil®-Vakzinierung einen für  $p < 0,05$  signifikanten Anstieg der HPV L1-spezifischen AK-Antwort erzeugt. Gleiches konnte man auch für die HPV L1-spezifischen TZ bei Vergleich von ungeimpften und einfach geimpften Probandinnen zeigen (vgl. Kap. 3.1.2.1).



**Abbildung 10: Anstieg Vakzin-spezifischer Antikörper abhängig vom Impfstatus.** Gezeigt sind die Titer HPV 6, 11, 16 und 18 L1-spezifischer Antikörper in median fluorescence intensity (MFI) differenziert nach der Anzahl erhaltener Gardasil®-Impfungen. Die Box beschreibt 50% aller Ergebnisse der jeweiligen Gruppe und enthält den Median. Der Bereich des maximal 1,5-fachen Interquartilsabstandes (IQR) wird durch die Whiskers gekennzeichnet. Milde Ausreißer bis zu einem dreifachen IQR sind als Kreise, extreme Ausreißer oberhalb des dreifachen IQR als Dreiecke dargestellt. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Gruppen verschiedenen Impfstatus ist durch p-Werte angegeben: n. s. = nicht signifikant, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . HPV = Humanes Papillomvirus, L1 = engl. late protein 1

Für die Studienteilnehmerinnen mit zweimaliger Impfung ließen sich mit L1-spezifischen AK-Titern von 4597, 3565 und 4646 MFI für die HPV-Typen 6, 11 und 16 im Vergleich zu den Mitgliedern der einfach geimpften Gruppe höhere Titer messen, der Unterschied ist jedoch für  $p < 0,05$  nicht signifikant. Der Anti-HPV 18 L1-Titer entsprach sogar mit 1138 MFI in etwa dem der einfach geimpften Gruppe. Dementsprechend führte die zweite Gardasil®-Impfung insgesamt zu keinem signifikanten Anstieg der Vakzin-spezifischen AK, wohl aber zu einem hochsignifikanten Anstieg der HPV L1-spezifischen CD4<sup>+</sup> TZ (vgl. Kap. 3.1.2.1). Die Probandinnen mit abgeschlossenem Impfzyklus wiesen nach der dritten Impfung L1-spezifische AK-Titer in Höhe von knapp 6000 MFI für HPV 6 und 11 auf. Bezüglich HPV 16 war ein L1-spezifischer AK-Titer von 7727 und für HPV 18 von 2975 MFI messbar. Insgesamt bedeutete dies einen für  $p < 0,05$  signifikanten Anstieg der HPV L1-spezifischen AK durch die dritte HPV-Impfung. Dies steht im Gegensatz zu den Vakzin-spezifischen TZ, die, wie in Kapitel 3.1.2.1 beschrieben, durch die dritte Immunisierung keinen weiteren Anstieg erfahren.

### 3.1.3.2 Nachweis Vakzin-spezifischer Antikörper abhängig vom HPV-Typ

Auch aus den in Kapitel 3.1.3.1 beschriebenen Ergebnissen geht bereits hervor, dass die prophylaktische Impfung nicht für jeden der vier HPV-Typen zu einer quantitativ gleichen Ausbildung L1-spezifischer AK führt. Tabelle 8 zeigt deswegen die Mittelwerte der HPV 6-, 11-, 16- und 18-spezifischen AK-Titer aller 42 geimpften Probandinnen, mit deren Blut der serologische Nachweis durchgeführt wurde, und stellt die Unterschiede zwischen den HPV-Typen unabhängig vom Impfstatus dar. Die ungeimpfte Kontrollgruppe wurde hierbei nicht berücksichtigt.

**Tabelle 8: Die Ausprägung der Vakzin-spezifischen Antikörper-Antwort unterscheidet sich abhängig vom HPV-Typ.**

		MW <sup>a</sup>	(± SD) <sup>a</sup>	Low-Risk-HPV		High-Risk-HPV	
				HPV 6 L1 <sup>b</sup>	HPV 11 L1 <sup>b</sup>	HPV 16 L1 <sup>b</sup>	HPV 18 L1 <sup>b</sup>
Low-Risk-HPV	HPV 6 L1 <sup>b</sup>	4518	(± 3058)				
	HPV 11 L1 <sup>b</sup>	4024	(± 2945)	n. s.			
High-Risk-HPV	HPV 16 L1 <sup>b</sup>	5244	(± 4622)	n. s.	n. s.		
	HPV 18 L1 <sup>b</sup>	1810	(± 1912)	***	***	***	

HPV = Humanes Papillomvirus, L1 = *engl.* late protein 1

<sup>a</sup> Gezeigt sind Mittelwerte (MW) mit Standardabweichungen (SD) der L1-spezifischen Antikörpertiter in median fluorescence intensity (MFI) differenziert nach dem HPV-Typ. Die Werte beziehen sich auf 42 geimpfte Probandinnen unabhängig von der Anzahl erhaltener Impfdosen.

<sup>b</sup> Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den HPV L1-Antigenen ist durch p-Werte dargestellt: n. s. = nicht signifikant, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

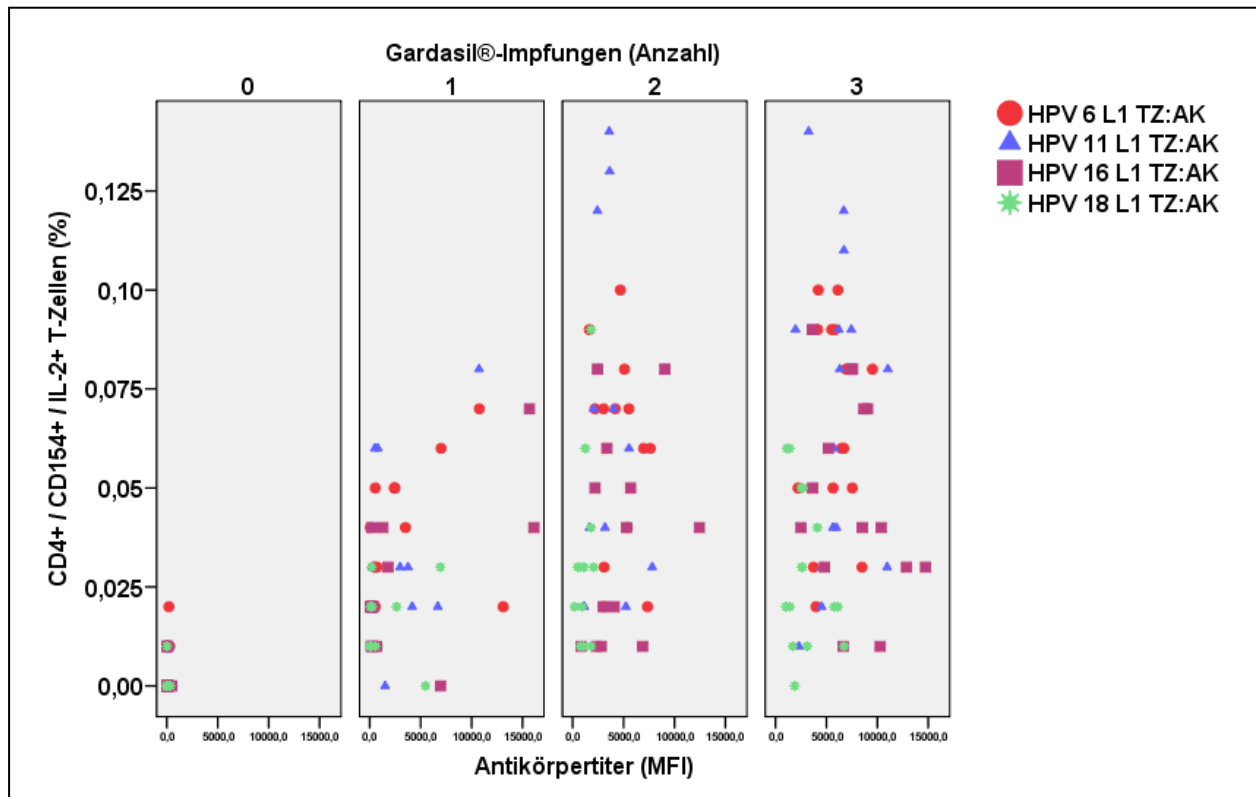
Die Mittelwerte der AK-Titer für die beiden Low-Risk-Vertreter sind quantitativ vergleichbar ausgeprägt und unterscheiden sich auch für  $p < 0,05$  nicht signifikant voneinander. Dies entspricht den Anteilen HPV 6- und 11-spezifischer TZ, die sich ebenfalls nicht signifikant unterscheiden (vgl. Kap. 3.1.2.2). Für HPV 16 L1 sind insgesamt etwa 16% bzw. 30% mehr spezifische AK nachweisbar als für die beiden Low-Risk-Vertreter. Dieser Unterschied ist jedoch für  $p < 0,05$  nicht signifikant. Im Gegensatz dazu waren für HPV 16 hochsignifikant weniger spezifische TZ messbar als für HPV 6 und 11 (vgl. Kap. 3.1.2.2). Anti-HPV 18 L1-Antikörper werden mit einem Titer von 1810 MFI mit Abstand am wenigsten ausgebildet und unterscheiden sich in ihrer quantitativen Ausprägung dementsprechend für  $p < 0,001$  jeweils hochsignifikant von den drei anderen HPV-Typen. Entsprechendes ließ sich bereits bei Analyse der TZ-Ergebnisse für den Anteil HPV 18 L1-spezifischer TZ feststellen (vgl. Kap. 3.1.2.2).

### **3.1.4 Korrelation Gardasil<sup>®</sup>-induzierter zellulärer und humoraler Immunität**

Aus den vorangehenden Kapiteln gehen bereits Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Gardasil<sup>®</sup>-induzierten T-zellulären und humoralen Immunantwort hervor. So führt die erste Impfung zu einem signifikanten Anstieg HPV L1-spezifischer T-Helfer-Zellen und AK. Während auf Ebene des humoralen Immunsystems die spezifischen AK-Titer mit der zweiten Vakzinierung nur gering steigen und dann erst durch die dritte Impfung einen entscheidenden, signifikanten Anstieg erfahren, werden auf Ebene der CD4<sup>+</sup> TZ maximale Anteile spezifischer Zellen schon nach der zweiten Impfung erreicht. Die Komplettierung des Impfzyklus bringt keinen weiteren signifikanten Anstieg HPV L1-spezifischer TZ mit sich. Bei differenzierter Betrachtung der einzelnen HPV-Typen fällt auf, dass die im Impfstoff enthaltenen VLP von HPV 16 die meisten spezifischen AK induzieren. HPV 16 L1-spezifische TZ hingegen sind im Blut geimpfter Probandinnen hochsignifikant weniger nachweisbar als spezifische Zellen für HPV 6 und 11 L1. Die Immunantwort auf HPV 18 unterscheidet sich sowohl durch den niedrigsten AK-Titer als auch durch den niedrigsten Anteil spezifischer T-Helfer-Zellen hochsignifikant von der auf die drei anderen HPV-Typen.

Es bleibt nun zu überprüfen, inwiefern die Vakzin-spezifische humorale und T-zelluläre Immunantwort zusammenhängen und die Frage zu beantworten, ob hohe Frequenzen spezifischer T-Helfer-Zellen auch mit hohen AK-Titern einhergehen. Abbildung 11 zeigt graphisch die Korrelation von L1-spezifischem TZ-Anteil (IL-2<sup>+</sup>) und AK-Titer für jede

einzelne Studienteilnehmerin, mit deren Blut TZ-Assay und serologischer Assay durchgeführt wurden. Hierbei wurden 58 Probandinnen berücksichtigt, deren Ergebnisse differenziert nach den Studiengruppen dargestellt sind.



**Abbildung 11: Vakzin-induzierte HPV L1-spezifische T-Helfer-Zellen und Antikörper (AK) korrelieren nicht miteinander.** Gezeigt ist die Korrelation late protein 1 (L1)-spezifischer Interleukin-2 (IL-2)-positiver T-Helfer-Zellanteile (%) und L1-spezifischer Antikörpertiter (median fluorescence intensity) für 58 Probandinnen differenziert nach Impfstatus und HPV-Typ. TZ = T-Zelle, HPV = Humanes Papillomvirus

Aus dem Streudiagramm ist keine eindeutig charakteristische Anordnung der für die einzelnen Probandinnen in Zusammenhang gebrachten TZ- und AK-Ergebnisse ersichtlich. Dies lässt vermuten, dass zwischen den Anteilen HPV L1-spezifischer T-Helfer-Zellen und den jeweiligen L1-spezifischen AK-Titern keine oder zumindest keine hochsignifikanten Korrelationen bestehen.

Um dies zu überprüfen, wurde die Korrelation des IL-2<sup>+</sup> TZ-Anteils und des spezifischen AK-Titers jeweils für die vier HPV L1-Antigene nach Pearson berechnet. Dies erfolgte, im Gegensatz zur graphischen Darstellung in Abbildung 11, unabhängig von der jeweiligen Studiengruppe für die Mittelwerte aller 42 geimpften Probandinnen, mit deren Blut beide Assays durchlaufen wurden (vgl. auch Kap. 2.5). Die Kontrollgruppe wurde nicht berücksichtigt. Wie Tabelle 9 zu entnehmen ist, konnte lediglich für die HPV 16 L1-spezifischen CD4<sup>+</sup> TZ und AK mit einem Korrelationskoeffizienten nach Pearson von 0,310

eine für  $p < 0,05$  signifikante Korrelation ermittelt werden. Für die anderen drei HPV L1-Antigene wurde mit Koeffizienten zwischen 0,038 und 0,251 keine für  $p < 0,05$  signifikante Korrelation festgestellt.

**Tabelle 9: Vakzin-induzierte HPV L1-spezifische T-Helfer-Zellen und Antikörper korrelieren nicht miteinander.** Gezeigt ist die Korrelation nach Pearson des HPV L1-spezifischen Interleukin-2 (IL-2)-positiven T-Helfer-Zell-Anteils und des HPV L1-spezifischen Antikörpertiters.

Antigen	Koeffizient der TZ-AK-Korrelation <sup>a</sup>	p-Wert <sup>b</sup>
HPV 6 L1	0,251	n. s.
HPV 11 L1	0,236	n. s.
HPV 16 L1	0,310	*
HPV 18 L1	0,038	n. s.

HPV = Humanes Papillomvirus, L1 = *engl.* late protein 1

<sup>a</sup> Dargestellt sind die Korrelationskoeffizienten für die Mittelwerte der T-Zell (TZ)- und Antikörper (AK)-Ergebnisse 42 geimpfter Probandinnen unabhängig von der Anzahl erhaltener Impfdosen.

<sup>b</sup> Die Signifikanz der Korrelation ist durch p-Werte dargestellt: n. s. = nicht signifikant, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 3.1.5 Sonderbeobachtungen bei Probandinnen mit auffälligem HPV-Status

Als Zusatzinformation zur eigentlichen Fragestellung soll in diesem Kapitel eine anekdotische Beschreibung der Ergebnisse einzelner Probandinnen erfolgen, bei denen Verdacht auf eine natürliche HPV-Infektion bestand. Der Verdacht begründete sich hierbei auf einen positiven serologischen Anti-E-Titer, auf den Nachweis E6- / E7-spezifischer TZ für die HPV-Typen 16 und 18 oder auf eine auffällige HPV-Anamnese, die mittels Fragebogen erhoben wurde. Bei den ungeimpften Probandinnen der Kontrollgruppe war zudem ein positiver Anti-L1-Titer als Hinweis auf einen HPV-Kontakt anzusehen.

Tabelle 10 fasst sämtliche Probandinnen zusammen, bei denen mindestens einer der genannten Parameter Verdacht auf eine HPV-Infektion erweckte. Dem jeweils auffälligen Charakteristikum wurden die weiteren Ergebnisse der Probandin zugeordnet und überprüft, ob diese den Verdacht erhärten konnten.

**Tabelle 10: Ein serologisch oder anamnestisch positiver HPV-Status korreliert nur in wenigen Fällen mit einem überdurchschnittlich hohen Anteil spezifischer T-Helfer-Zellen.**

Impfstatus der Probandin	Verdächtiger HPV-Typ	Serologie (MFI) <sup>b</sup>			CD4 <sup>+</sup> / CD154 <sup>+</sup> TZ (gesamt, INF- $\gamma$ <sup>+</sup> und IL-2 <sup>+</sup> in %) <sup>c</sup>		Anamnese <sup>a</sup>
		Anti-E6-Titer <sup>a</sup>	Anti-E7-Titer <sup>a</sup>	Anti-L1-Titer <sup>a</sup>	16 / 18E-Antwort, wenn HPV 16 / 18 auffällig <sup>a</sup>	L1-Antwort <sup>a</sup>	
3x Gardasil®	11	79 ↑ <sup>d</sup>	-13	3247	-	0,15 ↑ 0,08 ↑ 0,14 ↑	unauffällig
3x Gardasil®	unbekannt	unauffällig	unauffällig	unauffällig	unauffällig	unauffällig	ausgeheilte HPV-Infektion, Typ unbekannt
3x Gardasil®	11	112 ↑	-1	2300	-	0,02 0,01 0,01	Jungfrau
3x Gardasil®	16	122 ↑	0	8522 ↑	0 0 0	0,06 0,02 0,04	Jungfrau
2x Gardasil®	16	196 ↑	9	6864 ↑	0,01 0 0,01	0,03 0,01 0,01	unauffällig
2x Gardasil®	18	4	0	1243	0,02 ↑ 0,01 ↑ 0,01 ↑	0,11 ↑ 0,07 ↑ 0,09 ↑	ausgeheilte HPV 18-Infektion
2x Gardasil®	11	87 ↑	-9	5227 ↑	-	0,03 0,01 0,02	unauffällig
1x Gardasil®	unbekannt	unauffällig	unauffällig	unauffällig	unauffällig	unauffällig	Condylome
1x Gardasil®	Low-Risk	unauffällig	unauffällig	unauffällig	unauffällig	unauffällig	Condylome Low-Risk-Infektion
1x Gardasil®	unbekannt	unauffällig	unauffällig	unauffällig	unauffällig	unauffällig	ausgeheilte HPV-Infektion, Typ unbekannt
ungeimpft	6	5	2	198 ↑	-	0,04 ↑ 0,01 ↑ 0,02 ↑	einmalig Pap III
	11	7	4	259 ↑	-	0,02 ↑ 0 0,01	
ungeimpft	6	3	0	104 ↑	-	0,01 0 0,01	keine Vorsorge
	16	11	3	481 ↑	0,01 0 0	0,01 0 0	

ungeimpft	6	14	3	<b>186</b> ↑	-	<b>0,03</b> ↑ <b>0,01</b> ↑ 0,01	Jungfrau
ungeimpft	6	2	0	<b>179</b> ↑	-	0 0 0	Jungfrau
ungeimpft	6	4	0	<b>106</b> ↑	-	0,02 0,01 0,01	unauffällig
	18	<b>629</b> ↑	-1	<b>329</b> ↑	0,01 0 0	0,01 0 0	
ungeimpft	16	16	<b>159</b> ↑	12	0,01 0 0	0,01 0 0,01	keine Angabe
ungeimpft	6	2	-1	<b>522</b> ↑	-	0,01 0 0	keine Angabe
	16	9	10	<b>145</b> ↑	0,01 0 0	0,01 0 0	
ungeimpft	16	6	<b>92</b> ↑	17	0,01 0 0	0,01 0 0	Jungfrau
ungeimpft	6	3	0	<b>281</b> ↑	-	0,02 0 0,01	unauffällig
ungeimpft	11	<b>139</b> ↑	9	57	-	<b>0,03</b> ↑ 0 0	unauffällig
	16	22	<b>132</b> ↑	34	<b>0,04</b> ↑ 0 0	<b>0,03</b> ↑ 0 0	

HPV = Humanes Papillomvirus, L1 = *engl.* late protein 1, E6 / E7 = *engl.* early protein 6 / 7

<sup>a</sup> Gezeigt sind die Ergebnisse von 20 Probandinnen, die durch erhöhte serologische Anti-E-Titer, durch erhöhte Anti-L1-Titer (nur Kontrollgruppe), durch den Nachweis HPV 16 und 18 E6- / E7-spezifischer T-Helfer-Zellen oder durch eine positive HPV-Anamnese im Fragebogen auffällig geworden waren.

<sup>b</sup> Antikörpertiter sind in median fluorescence intensity (MFI) angegeben.

<sup>c</sup> T-Zell-Ergebnisse sind in prozentualen Anteilen am Gesamtanteil aller CD4-positiven T-Zellen (TZ) angegeben. Die erste Zahl bezieht sich hierbei jeweils auf alle spezifischen T-Helfer-Zellen (CD4<sup>+</sup>/CD154<sup>+</sup>), die zweite nur auf solche mit Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ )- und die letzte nur auf Zellen mit Interleukin-2 (IL-2)-Produktion.

<sup>d</sup> Werte, die den Referenzbereich überschreiten (Anti-E-Titer, Anti-L1-Titer der Kontrollgruppe) oder die über dem Gruppendurchschnitt liegen (Anti-L1-Titer der Impfgruppen, T-Zell-Ergebnisse) sind fett gedruckt und durch das Symbol ↑ gekennzeichnet.

Von den dreifach geimpften Probandinnen fielen drei durch erhöhte Anti-E6-Titer für HPV 11 oder 16 sowie eine durch die anamnestische Angabe einer ausgeheilten HPV-Infektion unbekanntes Typs auf. Eine der Anti-HPV 11 E6-positiven Probandinnen wies zudem im Vergleich zu ihrer Gruppe überdurchschnittlich viele HPV 11 L1-spezifische CD4<sup>+</sup> TZ auf. Bei der Probandin mit erhöhtem Anti-E6-Titer für HPV 16 war auch



für das Antigen HPV 16 L1 ein überdurchschnittlich hoher AK-Titer messbar. Alle anderen Ergebnisse dieser vier Frauen lagen im Referenzbereich bzw. in einem Bereich, der mit dem Durchschnitt der Studiengruppe vergleichbar war. Im Falle der Probandin, die eine bekannte HPV-Infektion im Fragebogen angab, ist darauf hinzuweisen, dass die Infektion nicht zwingend durch einen in der Vakzine enthaltenen HPV-Typ verursacht sein musste. Zwei der vier beschriebenen dreifach geimpften Probandinnen mit Hinweisen auf eine mögliche HPV-Infektion gaben an, bisher noch keinen sexuellen Kontakt gehabt zu haben.

Bei drei Mitgliedern der Gruppe mit zweifacher Gardasil®-Impfung waren Hinweise auf eine HPV-Infektion ersichtlich. Eine Probandin fiel durch einen erhöhten Anti-HPV 16 E6-Titer auf. Dieser korrelierte mit einem überdurchschnittlich hohen AK-Titer für das L1-Antigen des gleichen HPV-Typs. Diese Konstellation war auch bei einer zweiten Probandin zu beobachten, allerdings handelte es sich in diesem Fall um HPV 11 als möglichen Infektionsauslöser. Die dritte auffällige Probandin dieser Gruppe gab eine ausgeheilte HPV 18-Infektion im Fragebogen an. Sie wies mit insgesamt 0,11% einen für ihre Gruppe überdurchschnittlichen Anteil HPV 18 L1-spezifischer TZ auf. Insgesamt 0,07% INF- $\gamma^+$  und 0,09% IL-2<sup>+</sup> HPV 18 L1-spezifische Zellen konnten in ihrem Blut nachgewiesen werden, was die Mittelwerte der zweifach geimpften Gruppe für HPV 18 L1-spezifische TZ um das 3,7- bzw. 2,6-fache übersteigt (vgl. Kap. 3.1.2.1). Zudem war bei ihr mit insgesamt 0,02% (IL-2<sup>+</sup> 0,01%, INF- $\gamma^+$  0,01%) auch eine geringe Anzahl E6- / E7-spezifischer TZ messbar.

Von den einfach geimpften Studienteilnehmerinnen berichteten zwei Frauen, bereits an Condylomen gelitten zu haben, eine der beiden hatte im Rahmen der Erkrankung auch die Diagnose einer Low-Risk-Infektion erhalten. Eine dritte Probandin gab anamnestisch eine ausgeheilte HPV-Infektion unbekanntes Typs an. Sämtliche serologischen Daten sowie die TZ-Ergebnisse dieser drei Probandinnen lagen im Referenzbereich bzw. waren mit dem Gruppendurchschnitt vergleichbar. Hier sei aber erneut darauf hingewiesen, dass die im Fragebogen angegebenen Erkrankungen nicht zwingend Impftyp-assoziiert sein mussten.

In der Kontrollgruppe bestanden bei zehn Probandinnen Auffälligkeiten bezüglich einer möglichen früheren oder bestehenden HPV-Infektion. Diese ungleich höhere Zahl im Vergleich zu den anderen drei Studiengruppen erklärt sich durch das Auffinden von sie-

ben ungeimpften Probandinnen, die Anti-HPV L1-Titer oberhalb des Referenzbereichs von 100 (HPV 6, 16, 18) bzw. 119 MFI (HPV 11) aufwiesen. Da in den anderen drei Gruppen bei den Teilnehmerinnen ohnehin hoch positive Anti-L1-Titer auf Grund der Impfung gemessen wurden, konnten diese nicht mehr als mögliche Anhaltspunkte für eine natürliche Infektion dienen. Dies hätte nur an Hand von hier nicht zur Verfügung stehenden Präimmun-Seren der gleichen Probandinnen erfolgen können. Im Falle der sieben genannten Frauen handelte es sich ausnahmslos um den Anti-L1-Titer für HPV 6. Vier von ihnen wiesen jedoch zusätzlich erhöhte AK-Titer für einen zweiten HPV-Typ auf. In nur zwei Fällen korrelierte die beschriebene erhöhte Zahl an Anti-L1-Antikörpern mit weiteren Auffälligkeiten. So wies eine Probandin mit Anti-L1-Titern von 198 und 259 MFI für HPV 6 und 11 auch im Vergleich zum Gruppendurchschnitt erhöhte Frequenzen spezifischer T-Helfer-Zellen für diese beiden HPV-Typen auf. Zudem berichtete sie, einmalig durch einen zytologischen Abstrich der Kategorie Pap III auffällig geworden zu sein. Bei einer weiteren Probandin, welche im Fragebogen angab, bisher nicht sexuell aktiv gewesen zu sein, war ein erhöhter Anti-HPV 6 L1-Titer mit erhöhten Frequenzen HPV 6 L1-spezifischer CD4<sup>+</sup> TZ assoziiert.

Vier Probandinnen der Kontrollgruppe fielen durch erhöhte Anti-E-Titer auf. In einem Fall war ein gegenüber dem Gruppendurchschnitt 14-fach erhöhter Anti-HPV 18 E6-Titer von 629 MFI begleitet von einem ebenfalls erhöhten Anti-L1-Titer des gleichen Virustyps. Bei einer zweiten Probandin waren für HPV 11 sowohl vermehrt E6-spezifische AK als auch im Vergleich zur Gruppe überdurchschnittlich viele L1-spezifische TZ nachweisbar. Zudem wies bei dieser Studienteilnehmerin ein erhöhter Anti-HPV 16 E7-Titer auf eine mögliche Infektion mit diesem HPV-Typ hin. Dies wurde durch einen Anteil von HPV 16 und 18 E6- / E7-spezifischen TZ von 0,04% sowie durch einen HPV 16 L1-spezifischen TZ-Anteil von 0,03% bekräftigt. Die weiteren beiden Probandinnen wiesen zwar erhöhte Anti-HPV 16 E7-Titer auf, weitere Auffälligkeiten waren jedoch nicht zu verzeichnen. Abschließend ist zu erwähnen, dass von den zehn in diesem Abschnitt beschriebenen Studienteilnehmerinnen drei die Angabe machten, bisher noch keinen sexuellen Kontakt gehabt zu haben.

Insgesamt lässt sich zusammenfassen, dass sich bei 9 von 20 Probandinnen, bei denen durch mindestens einen der beschriebenen Parameter Verdacht auf eine natürliche HPV-Infektion bestand, dieser Verdacht durch weitere auffällige Ergebnisse erhärten

ließ. In fünf Fällen drückte sich dies auch in überdurchschnittlich hohen Anteilen HPV E6- / E7- oder L1-spezifischer T-Helfer-Zellen aus.

## **3.2 Ergebnisse der integrierten Longitudinalstudie**

### **3.2.1 Studienkollektiv der Longitudinalstudie**

Die elf Probandinnen, die in die Verlaufsbeobachtung eingeschlossen wurden, wiesen ein Durchschnittsalter von 24 Jahren (SD 2,3) auf.

Die erste Blutentnahme erfolgte noch im Rahmen der Querschnittsstudie im Schnitt neun Wochen (SD 6) nach der ersten Gardasil®-Impfung. Zwischen zweiter Impfung und der darauffolgenden Blutentnahme lagen durchschnittlich sechs Wochen (SD 3). Die letzte Blutentnahme wurde im Durchschnitt fünf Wochen (SD 2) nach der dritten Impfung durchgeführt. Die genannten Unterschiede bezüglich des Zeitintervalls zwischen Impfung und Blutentnahme sind für  $p < 0,05$  statistisch nicht signifikant.

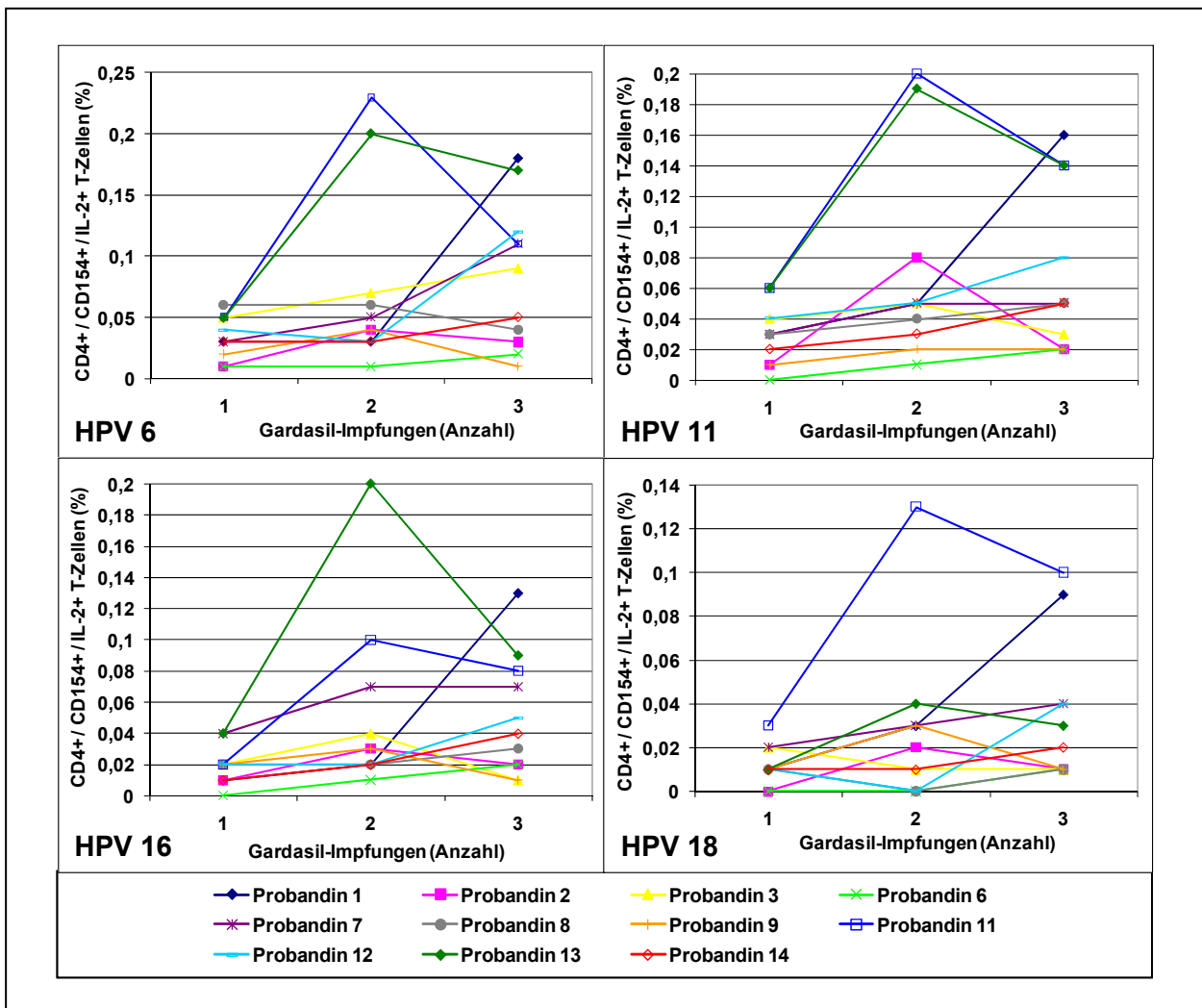
Auf eine weitere Analyse des Kollektivs der Verlaufsstudie bezüglich immunologischer Auffälligkeiten, gynäkologischer Anamnese oder des Sexuallebens wurde verzichtet, da alle elf Probandinnen bereits Mitglieder der einfach geimpften Gruppe der Querschnittsstudie waren und eine differenzierte Beschreibung der Charakteristika der Querschnittsstudiengruppen bereits erfolgte (vgl. Kap. 3.1.1). Es bleibt jedoch auf mögliche geringfügige Unterschiede hinzuweisen, da nur 11 der 15 Probandinnen der ursprünglichen einfach geimpften Gruppe der Querschnittsstudie in die Verlaufsbeobachtung übernommen werden konnten.

### **3.2.2 Vakzin-spezifische T-Helfer-Zellen im Impfverlauf**

Im Rahmen der Longitudinalstudie konnten bei zehn von elf Teilnehmerinnen nach allen drei Impfungen HPV L1-spezifische TZ mit Frequenzen oberhalb derer der Negativkontrolle im Vollblut ex vivo nachgewiesen werden. Lediglich bei einer Probandin war erst nach der dritten Gardasil®-Immunisierung eine Darstellung HPV L1-spezifischer TZ möglich.

Abbildung 12 zeigt die Verläufe der L1-spezifischen IL-2<sup>+</sup> T-Helfer-Zellantwort aller elf Probandinnen während des Impfzyklus mit insgesamt drei Gardasil®-Immunisierungen. Bereits nach der ersten Impfung sind L1-spezifische TZ, für HPV 6 und 11 in höherem, für HPV 16 und 18 in niedrigerem Maße, nachweisbar. Diese erfahren durch die zweite

Immunisierung bei fast allen Probandinnen einen weiteren Anstieg. Die letzte Impfung hingegen führt zu einem individuell stark unterschiedlichen Verlauf der TZ-Antwort. So reagieren einige Probandinnen mit einem weiteren Anstieg, während bei anderen eine geringere HPV L1-spezifische T-Helfer-Zellzahl gemessen wird als nach der zweiten Dosis Gardasil®. Des Weiteren ist der Abbildung zu entnehmen, dass sich die Vakzinspezifische TZ-Antwort zwar individuell sowohl quantitativ als auch qualitativ unterscheidet, bezüglich der vier verschiedenen HPV-Typen weisen die einzelnen Probandinnen jedoch qualitativ gleichförmige Verläufe der TZ-Reaktion auf.



**Abbildung 12:** Individueller Verlauf der HPV L1-spezifischen Interleukin (IL-2)-positiven T-Helfer-Zellantwort während des Impfzyklus bei elf verschiedenen Probandinnen. HPV = Humanes Papillomvirus, L1 = engl. late protein 1

Tabelle 11 zeigt die Mittelwerte der für das jeweilige Antigen spezifischen IL-2<sup>+</sup> TZ-Antwort nach allen drei Impfungen. Die Darstellung erfolgte analog der Ergebnis-Tabellen der Querschnittsstudie. Die Mittelwerte der spezifischen IL-2<sup>+</sup> TZ der nicht stimulierten Negativkontrollen liegen im Bereich zwischen 0% und 0,001% und unterscheiden sich

für  $p < 0,05$  nicht signifikant zwischen den drei Zeitpunkten im Impfverlauf. Alle Probandinnen reagierten auf die Positivkontrolle SEB, wobei sich die Ergebnisse (nicht gezeigt) für  $p < 0,05$  nicht signifikant zwischen den drei Messungen unterscheiden. Auf eine Stimulation mit der zweiten Positivkontrolle TT wurde im Rahmen der Longitudinalstudie verzichtet. Die nach Stimulation mit den E6- und E7-Antigenen gemessenen spezifischen TZ liegen mit 0% bis 0,003% im Bereich der Negativkontrolle und steigen zudem für  $p < 0,05$  nicht signifikant im Impfverlauf an.

**Tabelle 11: Anstieg Vakzin-spezifischer T-Helfer-Zellen im Impfverlauf**

Antigen	1x Gardasil®-geimpft Mittelwert (± SD) <sup>a</sup>	p-Wert <sup>b</sup>	2x Gardasil®-geimpft Mittelwert (± SD) <sup>a</sup>	p-Wert <sup>b</sup>	3x Gardasil®-geimpft Mittelwert (± SD) <sup>a</sup>	1x vs. 3x geimpft p-Wert <sup>b</sup>
Negativkontrolle	0,001 (± 0,003)	n. s.	0 (± 0)	n. s.	0,001 (± 0,003)	n. s.
HPV 6 L1	0,035 (± 0,017)	n. s.	0,072 (± 0,073)	n. s.	0,085 (± 0,059)	*
HPV 11 L1	0,03 (± 0,019)	*	0,07 (± 0,064)	n. s.	0,069 (± 0,053)	*
HPV 16 L1	0,019 (± 0,012)	n. s.	0,051 (± 0,056)	n. s.	0,05 (± 0,038)	n. s.
HPV 18 L1	0,012 (± 0,009)	n. s.	0,027 (± 0,037)	n. s.	0,034 (± 0,033)	n. s.
HPV 16 und 18 E6 / E7	0,001 (± 0,003)	n. s.	0,001 (± 0,003)	n. s.	0,003 (± 0,005)	n. s.

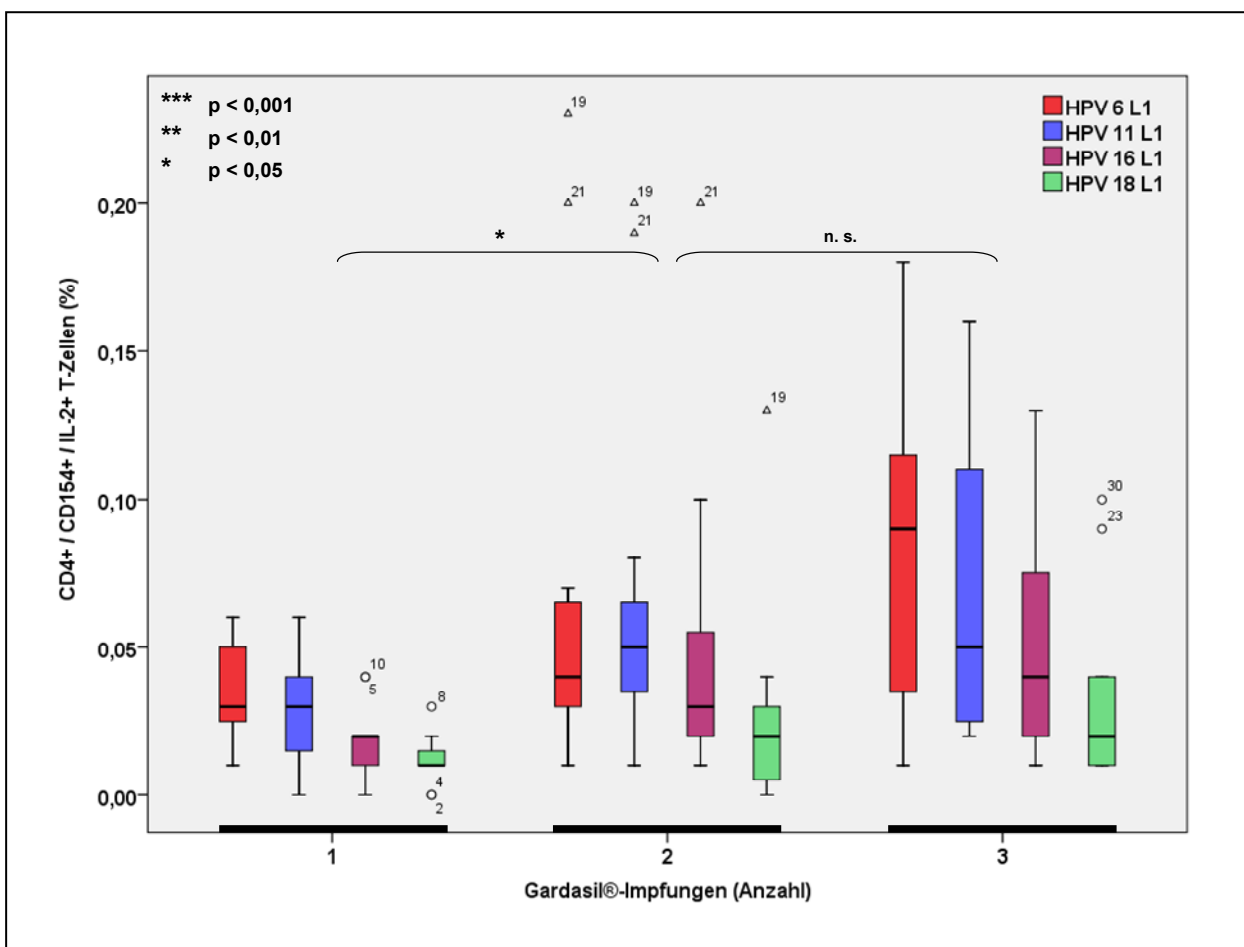
HPV = Humanes Papillomvirus, L1 = *engl.* late protein 1, E6 / E7 = *engl.* early protein 6 / 7

<sup>a</sup> Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen (SD) der prozentualen Anteile Antigen-spezifischer Interleukin-2 (IL-2)-positiver T-Helfer-Zellen an der Gesamtmenge aller CD4-positiven T-Zellen für drei verschiedene Zeitpunkte im Impfzyklus.

<sup>b</sup> Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Zeitpunkten ist durch p-Werte dargestellt: n. s. = nicht signifikant, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Die Ergebnisse für die vier Vakzin-Antigene HPV 6, 11, 16 und 18 L1 sind zusätzlich auch graphisch in Abbildung 13 dargestellt. Nach erster Impfung – die dazugehörigen Messungen fanden noch im Rahmen der Querschnittsstudie statt – ließen sich L1-spezifische TZ-Frequenzen zwischen minimal 0,012% für HPV 18 und maximal 0,035% für HPV 6 messen. Die zweite Impfung führte zu mehr als einer Verdopplung der spezifischen TZ-Anteile auf 0,072% für HPV 6, 0,07% für HPV 11, 0,051% für HPV 16 und 0,027% für HPV 18 L1. Der genannte Anstieg ist jedoch nur für HPV 11 L1 für  $p < 0,05$  als statistisch signifikant anzusehen. Fasst man die genannten Ergebnisse der vier HPV L1-Antigene zusammen, zeigt sich insgesamt ein für  $p < 0,05$  signifikanter Anstieg der

Vakzin-spezifischen T-Helfer-Zellen durch die Gabe einer zweiten Dosis des HPV-Impfstoffes (vgl. Abbildung 13). Die dritte und letzte Impfung hingegen führte auch im Rahmen dieser Verlaufsbeobachtung mit 0,069% HPV 11 und 0,05% HPV 16 L1-spezifischer TZ zu keiner bzw. mit 0,085% HPV 6 und 0,034% HPV 18 L1-spezifischer TZ nur zu einer geringfügigen Erhöhung der Vakzin-spezifischen TZ-Frequenz. Es lässt sich festhalten, dass sich die TZ-Antwort nach zweiter und dritter Impfung nicht signifikant voneinander unterscheidet. Vergleicht man die Ergebnisse dreifach geimpfter mit denen einfach geimpfter Probandinnen, zeigt sich für die Low-Risk-HPV-Typen ein für  $p < 0,05$  signifikanter Anstieg der L1-spezifischen IL-2<sup>+</sup> TZ, für die High-Risk-Typen ist der Unterschied zwischen erster und dritter Impfung knapp als nicht signifikant zu bezeichnen.



**Abbildung 13: Anstieg Vakzin-spezifischer T-Helfer-Zellen im Impfverlauf.** Gezeigt sind die prozentualen Anteile HPV 6, 11, 16 und 18 L1-spezifischer Interleukin-2 (IL-2)-positiver T-Helfer-Zellen an der Gesamtmenge aller CD4-positiven T-Zellen für drei verschiedene Zeitpunkte im Impfzyklus. Die Box beschreibt 50% aller Ergebnisse der jeweiligen Gruppe und enthält den Median. Der Bereich des maximal 1,5-fachen Interquartilsabstandes (IQR) wird durch die Whiskers gekennzeichnet. Milde Ausreißer bis zu einem dreifachen IQR sind als Kreise, extreme Ausreißer oberhalb des dreifachen IQR als Dreiecke dargestellt. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Zeitpunkten ist durch p-Werte angegeben: n. s. = nicht signifikant, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . HPV = Humanes Papillomvirus, L1 = engl. late protein 1

Der Verlauf der Vakzin-spezifischen INF- $\gamma^+$  T<sub>H</sub>1-Antwort (nicht gezeigt) verhielt sich qualitativ analog der beschriebenen IL-2<sup>+</sup> TZ-Antwort. Nach erster HPV-Impfung waren L1-spezifische T<sub>H</sub>1-Frequenzen zwischen 0,003% (HPV 18) und 0,02% (HPV 6) zu messen, die durch die zweite Immunisierung einen signifikanten Anstieg auf 0,039% für HPV 11 und 0,015% für HPV 18 erfuhren. Auch für HPV 6 und 16 war mit T<sub>H</sub>1-Anteilen von 0,042% bzw. 0,03% ein Anstieg zu verzeichnen, dieser war jedoch statistisch nicht signifikant. Eine Messung der L1-spezifischen INF- $\gamma^+$  TZ nach der dritten Gabe des Impfstoffes führte wiederum zu keinem signifikant unterschiedlichen Ergebnis.

Nach Darstellung des Verlaufs der TZ-Antwort bei elf Probandinnen über den gesamten Impfzyklus hinweg soll auch im Rahmen der Longitudinalstudie noch auf die Ausprägung der L1-spezifischen TZ-Reaktion abhängig vom jeweiligen HPV-Typ eingegangen werden. Tabelle 12 zeigt exemplarisch die Unterschiede der IL-2<sup>+</sup> L1-spezifischen TZ-Frequenzen nach komplett abgeschlossenem Impfzyklus, d. h. nach Erhalt dreier Dosen Gardasil<sup>®</sup>.

**Tabelle 12: Unterschiedliche Ausprägung der Vakzin-spezifischen T-Zell-Antwort abhängig vom HPV-Typ nach dreimaliger Gardasil<sup>®</sup>-Impfung**

		MW <sup>a</sup>	(± SD) <sup>a</sup>	Low-Risk-HPV		High-Risk-HPV	
				HPV 6 L1 <sup>b</sup>	HPV 11 L1 <sup>b</sup>	HPV 16 L1 <sup>b</sup>	HPV 18 L1 <sup>b</sup>
Low-Risk-HPV	HPV 6 L1 <sup>b</sup>	0,085	(0,059)				
	HPV 11 L1 <sup>b</sup>	0,069	(0,053)	n. s.			
High-Risk-HPV	HPV 16 L1 <sup>b</sup>	0,05	(0,039)	*	n. s.		
	HPV 18 L1 <sup>b</sup>	0,034	(0,033)	*	*	n. s.	

HPV = Humanes Papillomvirus, L1 = *engl.* late protein 1

<sup>a</sup> Gezeigt sind Mittelwerte (MW) mit Standardabweichungen (SD) der L1-spezifischen Interleukin-2 (IL-2)-positiven T-Helfer-Zell-Anteile an der Gesamtmenge aller CD4-positiven T-Zellen differenziert nach dem HPV-Typ. Die Werte beziehen sich ausschließlich auf die Messung der TZ-Frequenzen bei den elf Probandinnen der Longitudinalstudie nach Abschluss des Impfzyklus, d. h. nach Erhalt von jeweils drei Dosen Gardasil<sup>®</sup>.

<sup>b</sup> Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den HPV L1-Antigenen ist durch p-Werte dargestellt: n. s. = nicht signifikant, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001.

Die beiden Low-Risk-Typen HPV 6 und 11 weisen mit 0,085% bzw. 0,069% L1-spezifischen TZ die höchsten Anteile auf und unterscheiden sich statistisch nicht signifikant voneinander. Für den häufigen High-Risk-Vertreter HPV 16 wird mit 0,05% eine geringere L1-spezifische TZ-Frequenz gemessen, die sich von HPV 6 für p < 0,05, jedoch nicht von HPV 11, signifikant unterscheidet. Der zweite in der Vakzine enthaltene High-Risk-Typ HPV 18 zeigt mit 0,034% L1-spezifischen TZ wiederum die quantitativ am ge-

ringsten ausgeprägte TZ-Antwort und unterscheidet sich damit auch für  $p < 0,05$  signifikant von den beiden Low-Risk-Vertretern. Der Unterschied zwischen den beiden karzinogenen HPV-Typen ist in diesem Fall nicht als signifikant zu bezeichnen.

Die Ergebnisse zu den anderen beiden Zeitpunkten im Impfzyklus (nicht gezeigt) zeigen ebenfalls eine stärkere Ausprägung der TZ-Antwort nach Stimulation mit den Low-Risk-Antigenen und bestätigen erneut die am schwächsten ausgeprägte TZ-Reaktion nach Stimulation mit HPV 18 L1. Ein gleiches Bild zeigt sich auch bei Messung der INF- $\gamma^+$  T<sub>H</sub>1-Zellen (nicht gezeigt).

### **3.2.3 Vakzin-spezifische Antikörper im Impfverlauf**

Auch innerhalb der Longitudinalstudie erfolgte parallel zur TZ-Messung eine Bestimmung der Vakzin-spezifischen AK-Titer nach jeder der drei Impfungen des Impfzyklus. In diesem Fall wurden jedoch für die Messung nach der ersten Impfung nicht die Daten der Querschnittsstudie übernommen, sondern die im Rahmen der Querschnittsstudie gewonnenen Serumproben zusammen mit den nach zweiter und dritter Impfung gesammelten Verlaufsproben einer weiteren unabhängigen Messung zugeführt. Messtechnisch bedingt lieferte diese um den Faktor 1,4 höhere AK-Titer, was es bei der weiteren Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen gilt. Bei einer Probandin war nach der ersten Impfung keine Serumprobe vorhanden und HPV-Antigen-spezifische AK-Titer wurden somit erst ab der zweiten Impfung bestimmt. Bei allen anderen Probandinnen erfolgten die Messungen lückenlos über den gesamten Impfzyklus hinweg.

Im Rahmen der Longitudinalstudie ließen sich bei allen Probandinnen zu jedem Zeitpunkt im Impfzyklus HPV L1-spezifische AK bestimmen. Lediglich drei Studienteilnehmerinnen wiesen nach der ersten Impfung noch keine positiven Anti-HPV 18 L1-Titer auf, wohl aber nach der zweiten und dritten Immunisierung.

Tabelle 13 zeigt analog zu den in Kapitel 3.2.2 beschriebenen TZ-Ergebnissen die Mittelwerte der für das jeweils aufgeführte HPV-Antigen spezifischen AK-Titer nach allen Impfungen. Auf eine Darstellung der ebenfalls gemessenen Anti-E6- und -E7-Antikörper wurde verzichtet, diese überschritten jedoch in keinem Fall den Referenzbereich von maximal 50 MFI.



**Tabelle 13: Anstieg Vakzin-spezifischer Antikörper im Impfverlauf**

Antigen	1x Gardasil®-geimpft Mittelwert (± SD) <sup>a</sup>	p-Wert <sup>b</sup>	2x Gardasil®-geimpft Mittelwert (± SD) <sup>a</sup>	p-Wert <sup>b</sup>	3x Gardasil®-geimpft Mittelwert (± SD) <sup>a</sup>	1x vs. 3x geimpft p-Wert <sup>b</sup>
HPV 6 L1	2543 (± 2913)	***	8400 (± 3033)	n. s.	8730 (± 3301)	**
HPV 11 L1	1705 (± 1863)	**	6875 (± 2642)	n. s.	7837 (± 3904)	**
HPV 16 L1	1738 (± 3370)	**	9349 (± 3281)	n. s.	11383 (± 5322)	**
HPV 18 L1	921 (± 2380)	n. s.	3332 (± 2196)	*	4947 (± 3407)	*

HPV = Humanes Papillomvirus, L1 = *engl.* late protein 1

<sup>a</sup> Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichungen (SD) der HPV-Antigen-spezifischen Antikörpertiter in median fluorescence intensity (MFI) für drei verschiedene Zeitpunkte im Impfzyklus.

<sup>b</sup> Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Zeitpunkten ist durch p-Werte dargestellt: n. s. = nicht signifikant, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Nach einer Gardasil®-Impfung wurden für HPV 6 L1 ein spezifischer AK-Titer von 2543 MFI, für HPV 11 und 16 L1 spezifische Titer von ca. 1700 MFI und für HPV 18 L1 spezifische AK in Höhe von 921 MFI gemessen. Die zweite Impfdosis führte für die HPV-Typen 6, 11 und 16 zu einem für  $p < 0,001$  bzw.  $p < 0,01$  hochsignifikanten Anstieg der L1-spezifischen AK auf mehr als das Drei- bis Fünffache im Vergleich zur ersten Impfung. Auch für HPV 18 L1 wurde im Vergleich zum Zustand nach der ersten Immunisierung mit 3332 MFI ein mehr als dreimal so hoher AK-Titer gemessen, dieser Anstieg ist jedoch für  $p < 0,05$  nicht statistisch signifikant. Durch die dritte Dosis Gardasil® wurde eine weitere Steigerung der L1-spezifischen AK-Titer erzielt. Für HPV 6 konnten nach Abschluss des Impfzyklus Werte von 8730 MFI, für HPV 11 7837 MFI und für HPV 16 11383 MFI gemessen werden. Die Unterschiede im Vergleich zur Messung nach Erhalt von nur zwei Dosen des Impfstoffes sind jedoch in diesem Studienkollektiv nicht signifikant. Für HPV 18 ließ sich aber mit einem AK-Titer von 4947 ein für  $p < 0,05$  signifikanter Anstieg im Vergleich zur zweiten Impfung verzeichnen.

Abschließend soll noch ein kurzer Blick auf die unterschiedliche Ausprägung der Anti-L1-Titer abhängig vom HPV-Typ erfolgen. Analog zu den TZ-Daten in Tabelle 12 zeigt Tabelle 14 exemplarisch die Unterschiede der L1-spezifischen AK-Titer nach komplett abgeschlossenem Impfzyklus, d. h. nach Erhalt dreier Dosen Gardasil®.

**Tabelle 14: Unterschiedliche Ausprägung der Vakzin-spezifischen Antikörper-Antwort abhängig vom HPV-Typ nach dreimaliger Gardasil®-Impfung**

		MW <sup>a</sup>	(± SD) <sup>a</sup>	Low-Risk-HPV		High-Risk-HPV	
				HPV 6 L1 <sup>b</sup>	HPV 11 L1 <sup>b</sup>	HPV 16 L1 <sup>b</sup>	HPV 18 L1 <sup>b</sup>
Low-Risk-HPV	HPV 6 L1 <sup>b</sup>	8730	(3301)				
	HPV 11 L1 <sup>b</sup>	7837	(3904)	n. s.			
High-Risk-HPV	HPV 16 L1 <sup>b</sup>	11383	(5322)	n. s.	*		
	HPV 18 L1 <sup>b</sup>	4947	(3407)	***	***	***	

HPV = Humanes Papillomvirus, L1 = *engl.* late protein 1

<sup>a</sup> Gezeigt sind Mittelwerte (MW) mit Standardabweichungen (SD) der L1-spezifischen Antikörpertiter in median fluorescence intensity (MFI) differenziert nach dem HPV-Typ. Die Werte beziehen sich ausschließlich auf die Messung der Antikörper bei den elf Probandinnen der Longitudinalstudie nach Abschluss des Impfzyklus, d. h. nach Erhalt von jeweils drei Dosen Gardasil®.

<sup>b</sup> Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den HPV L1-Antigenen ist durch p-Werte dargestellt: n. s. = nicht signifikant, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Wie bereits in der Querschnittsstudie gesehen, wurden gegen die VLP des High-Risk-Typs HPV 16 die meisten AK ausgebildet. Die etwas niedrigeren Anti-HPV 6 L1- und Anti-HPV 11 L1-Titer unterscheiden sich nicht signifikant voneinander und nur die Anti-HPV 11-Antikörper unterscheiden sich in ihrer Ausprägung für  $p < 0,05$  signifikant von HPV 16. Gegen die VLP des High-Risk-HPV 18 wurden wiederum am wenigsten L1-spezifische AK ausgebildet, was im Vergleich zu allen anderen drei HPV-Typen für  $p < 0,001$  als hochsignifikant unterschiedlich anzusehen ist.

## 4 Diskussion

### 4.1 Direkter Nachweis Gardasil®-induzierter spezifischer T-Helfer-Zellen und Einschätzung von deren Größenordnung

Mit dem beschriebenen ex vivo Assay gelang es auf der Basis der Expression von CD154 verlässlich Antigen-spezifische T-Helfer-Zellen in Vollblutproben zu detektieren. Erstmals erfolgte der direkte Nachweis HPV L1-spezifischer T-Zellen im Blut von Probandinnen, die durch die prophylaktische Vakzine Gardasil® eine aktive Immunisierung gegen Humane Papillomviren erhalten hatten.

Der Nachweis Gardasil®-induzierter spezifischer CD4<sup>+</sup> TZ konnte sowohl in einer Querschnittsstudie an Material von Probandinnen verschiedenen Impfstatus als auch in einer integrierten Longitudinalstudie durch Follow-up von primär einfach geimpften Studienteilnehmerinnen erbracht werden. Das untersuchte Studienkollektiv sowie die vier analysierten Subgruppen der Querschnittsstudie zeichneten sich durch Homogenität bezüglich des Alters, der immunologischen Gegebenheiten, des Sexualverhaltens und des gynäkologischen Status aus.

Der Anteil aller L1-spezifischen T-Helfer-Zellen belief sich für mehrfach geimpfte Probandinnen auf durchschnittlich 0,09% bezüglich der Low-Risk-Typen sowie auf etwa 0,06% für HPV 16 und 0,04% für HPV 18 (vgl. Kap. 3.1.2.1). Dies bedeutet, dass maximal 9 von 10000 CD4<sup>+</sup> TZ HPV L1-spezifisch sind. Die Vakzin-spezifischen T-Helfer-Zellen konnten mittels ihrer Zytokinproduktion weiter differenziert werden. Der größte Anteil gemessener spezifischer CD4<sup>+</sup> TZ wies zusätzlich eine Sekretion von IL-2 auf. Hierdurch werden generell aktivierte T-Helfer-Zellen und im besonderen Maße stark Interleukin-2 produzierende T-Gedächtniszellen beschrieben. Durch die Anfärbung von INF- $\gamma$  konnte zusätzlich die kleinere Population spezifischer T<sub>H</sub>1-Zellen erfasst werden. Weniger als die Hälfte aller spezifischen Zellen zeichnete sich durch INF- $\gamma$ -Produktion aus. Auf die Darstellung Interleukin-4 produzierender T<sub>H</sub>2-Zellen wurde auf Grund niedriger Frequenzen bisher verzichtet.

Der direkte Nachweis spezifischer TZ stellt ein Novum im Bereich der prophylaktischen HPV-Impfstoffe dar, ein Vergleich mit Ergebnissen anderer TZ-Studien aus dem gleichen thematischen Gebiet fällt daher schwer. Die Größenordnung der Gardasil®-induzierten TZ-Antwort lässt sich jedoch unter Einbezug von ähnlichen Untersuchungen aus

dem Bereich der prophylaktischen Impfung gegen das Hepatitis B-Virus (HBV) besser einschätzen und als realistisch bestätigen. So ergeben verschiedene Studien Anteile von Interleukin-2 produzierenden HBsAg-spezifischen T-Helfer-Zellen von ca. 0,05% bis 0,09% an der Gesamtmenge aller CD4<sup>+</sup> TZ. Auch im Blut HBV-geimpfter Probanden fallen die Anteile INF- $\gamma$ <sup>+</sup> TZ mit Werten von um die 0,02% bis maximal 0,07% (in einer Studie) geringer aus (66;67;68).

Mit dem gelungenen direkten Nachweis HPV L1-spezifischer CD4<sup>+</sup> TZ werden Studien, die zu ersten Erkenntnissen auf dem Gebiet HPV L1-induzierter zellulärer Immunität führten, bestätigt. So kann der indirekte Nachweis L1-spezifischer Reaktionen von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten durch Lymphozytenproliferation hiermit ex vivo nachvollzogen werden. Wie bereits in Kapitel 1.3.2 erwähnt, konnten durch Messung von Zytokinexpression im Zellkulturüberstand im selben Experiment Rückschlüsse auf eine L1-spezifische T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Antwort gezogen werden (54). Mittels des Nachweises INF- $\gamma$ <sup>+</sup> T-Helfer-Zellen wurde im Rahmen dieser Arbeit auch die T<sub>H</sub>1-Antwort ex vivo direkt verifiziert. Als Konsequenz bleibt es jedoch dringend erforderlich, durch Etablierung einer adäquaten IL-4-Färbung auch die Vakzin-spezifische T<sub>H</sub>2-Antwort zu charakterisieren. Mit der beschriebenen Methodik war es allerdings bisher nicht möglich konstant suffiziente T<sub>H</sub>2-Frequenzen zu messen. Sollte es nicht gelingen, durch eine Anpassung des Assays die beschriebenen T<sub>H</sub>2-Zellen darzustellen, bleibt zu überlegen, ob die VLP der Vakzine möglicherweise keine ausgeprägte T<sub>H</sub>2-Antwort generieren. Dies erscheint plausibel, da Viren und so auch VLP in erster Linie T<sub>H</sub>1-Antworten des Immunsystems provozieren (43).

Fünf Jahre nach Komplettierung des Gardasil<sup>®</sup>-Impfzyklus können die AK-Titer durch einen erneuten Boost einen starken Wiederanstieg erfahren (56). Die These, dass dies auf Vakzin-spezifische B- und T-Gedächtniszellen zurückzuführen ist, wird durch den erstmals erbrachten Nachweis Impfstoff-spezifischer TZ stark bekräftigt. HPV-Vakzin-spezifische B-Gedächtniszellen wurden bereits gezeigt (42). Um diese These auf TZ-Ebene jedoch endgültig zu sichern, ist es dringend erforderlich, mit der beschriebenen Methode Blut von Probandinnen zu analysieren, deren dritte Gardasil<sup>®</sup>-Vakzinierung bereits mehrere Jahre zurückliegt. Nur so kann sichergestellt werden, dass es sich bei den gemessenen Interleukin-2 produzierenden CD4<sup>+</sup> TZ in erster Linie um Gedächtniszellen handelt. Wegen des in dieser Arbeit vorherrschenden Zeitintervalls von nur wenigen

Wochen zwischen letzter Impfung und Blutentnahme kann mit den vorliegenden Ergebnissen keine genaue Aussage bezüglich des Anteils von Effektor- und Gedächtniszellen getroffen werden. Auf Grund der vorrangigen und schnellen IL-2-Produktion der T-Gedächtniszellen ist ihr Anteil an den gemessenen TZ-Frequenzen aber mit hoher Wahrscheinlichkeit als sehr groß einzuschätzen.

#### **4.2 Gardasil®-induzierte zelluläre Immunität abhängig vom Impfstatus**

Durch Rekrutierung einer vergleichbaren Anzahl von Probandinnen mit jeweils verschiedenem HPV-Impfstatus im Rahmen der Querschnittsstudie sowie Weiterverfolgung von zu Studienbeginn erst einfach geimpften Teilnehmerinnen als bestätigende Longitudinalstudie lässt sich eine verlässliche Aussage bezüglich der Vakzin-spezifischen TZ-Antwort im Impfverlauf machen. Ungeimpfte Probandinnen der Kontrollgruppe wiesen, mit Ausnahme eines kleinen Anteils HPV 6 L1-spezifischer TZ, TZ-Antworten auf, die in ihrer Ausprägung vergleichbar mit der nicht stimulierten Negativkontrolle waren. Der geringe Anteil HPV 6-spezifischer Zellen ist am ehesten auf stattgefundene natürliche HPV 6-Infektionen bei Mitgliedern dieser Gruppe zurückzuführen. Dies steht sowohl mit den ebenfalls leicht positiven Ergebnissen der HPV 6-Serologie in dieser Gruppe als auch mit dem epidemiologischen Altersgipfel von Low-Risk-HPV-Infektionen im Einklang. So treten die meisten durch diese HPV-Typen ausgelösten Erkrankungen bereits zwischen dem 20. und 24. Lebensjahr auf, die auslösende Infektion wird dann häufig bereits vor dem 20. Lebensjahr erworben (9). Der Altersdurchschnitt der Kontrollgruppe lag bei 23,5 Jahren.

Einfach geimpfte Probandinnen wiesen signifikant mehr HPV L1-spezifische TZ im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Mit der zweiten Impfung war dann ein weiterer entscheidender, hochsignifikanter Anstieg der Vakzin-spezifischen TZ-Antwort zu verzeichnen. Die Komplettierung des Impfzyklus durch die dritte Applikation von Gardasil® erbrachte hingegen keine weitere Erhöhung des Anteils HPV L1-spezifischer CD4<sup>+</sup> TZ. In der Querschnittsstudie fiel die Gruppe der Probandinnen mit dreifacher Impfung sogar durch leicht niedrigere Werte als die zweifach geimpfte Gruppe auf, die Unterschiede waren jedoch insgesamt nicht statistisch signifikant. Der beschriebene Verlauf gilt gleichermaßen für IL-2<sup>+</sup> und INF-γ<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen.

Die TZ-Antwort nach Kontakt des Immunsystems mit einem (Impf-)Antigen läuft in verschiedenen Phasen ab. So beginnen die TZ nach Aktivierung (vgl. Kap. 1.3.2) massiv zu expandieren (Expansionsphase). Aktivierte Effektorzellen sterben jedoch nach Tagen bis wenigen Wochen wieder ab (Retraktionsphase). Auf Basis der bis zu mehreren Jahren lebenden T-Gedächtniszellen bildet sich dann in der folgenden Konsolidationsphase aber ein relativ stabiles Plateau der TZ-Antwort aus (43). Um zu umgehen, dass die beschriebene biologische Dynamik der TZ-Reaktion die Ergebnisse beeinflusst, wurde darauf geachtet, dass die Blutentnahmen jeweils mindestens drei bis vier Wochen nach der letzten Impfung erfolgten und so die gemessenen TZ-Frequenzen nicht auf die hauptsächlich Effektoren-getragene Expansionsphase zurückzuführen waren. Ausserdem kann ausgeschlossen werden, dass der Anstieg der spezifischen CD4<sup>+</sup> TZ nach erster und zweiter Impfung sowie die fehlende Zunahme der TZ-Frequenz nach dritter Impfung durch eine Messung in jeweils verschiedenen Phasen der CD4<sup>+</sup> TZ und somit nicht durch die Impfung zu begründen war, da es keinen statistisch signifikanten Unterschied bezüglich des Zeitpunktes der Blutentnahme zwischen den vier Studiengruppen gab (vgl. Kap. 3.1.1.5.).

Das Gardasil<sup>®</sup>-Impfschema mit drei Impfungen zu den Zeitpunkten 0, 2 und 6 Monate wurde nach eingehender Analyse des Verlaufs der AK-Titer festgelegt, welche durch die dritte Impfung noch einen entscheidenden Anstieg erfahren (45). Diese Orientierung erscheint sinnvoll, da die finale HPV-protective Wirkung der Vakzine auf neutralisierende AK zurückzuführen ist (4;8). Trotzdem bietet die Tatsache, dass die dritte Impfung von keinem weiteren Anstieg der HPV L1-spezifischen TZ-Antwort gefolgt wird, einen interessanten und ggf. auch ökonomisch relevanten Anhaltspunkt für weitere Forschung. Es wird diskutiert, dass die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses in Form von langlebigen T- und B-Lymphozyten für die Langzeitwirkung prophylaktischer HPV-Impfstoffe verantwortlich sein könnte, indem durch Kontakt mit dem Virus sofort eine hocheffektive zelluläre und humorale Effektorantwort ausgelöst werden würde. Allerdings ist es fraglich, ob diese in der Lage wäre, Neuinfektionen abzufangen, da solche als primär lokale Infektionen des Epithels an anderer Stelle stattfinden und zudem unklar ist, ob das Virus ohne immunogenes Adjuvans eine derart starke memory-vermittelte Effektorantwort auszulösen vermag. Trotzdem kann diskutiert werden, ob evtl. die Grundimmunisierung mit nur zwei Dosen Gardasil<sup>®</sup>, trotz Abfalls der AK-Titer, bereits einen ausreichenden langjährigen Schutz vor HPV-Infektionen vermit-

teln könnte. Erste vielversprechende Anhaltspunkte sind mit der bereits mehrfach erwähnten Studie von Olsson et al. 2007 sowie mit dem im Rahmen dieser Arbeit erfolgten Nachweis Vakzin-spezifischer Interleukin-2 produzierender TZ bereits gegeben. An dieser Stelle muss erneut auf die Bedeutung hingewiesen werden, analog zu dem von Olsson et al. 2007 nach fünf Jahren gezeigten Wiederanstieg der AK-Titer durch erneuten Antigenkontakt, auch die dafür mutmaßlich verantwortlichen T-Gedächtniszellen ex vivo fünf Jahr nach letzter Impfung darzustellen (56). Ähnliche Diskussionen werden auch bezüglich der bereits erwähnten HBV-Impfung geführt. Es konnte gezeigt werden, dass mehr als zehn Jahre nach der letzten Impfung, bei AK-Titern von nur noch weniger als 10 IU/L, HBsAg-spezifische Gedächtniszellen persistieren und möglicherweise einen effektiven Schutz vor einer Hepatitis B-Infektion bieten (69). Auf Grund der hohen HBV-Durchseuchung gerade in ärmeren Regionen Asiens erlangt dies global Relevanz, da evtl. mit der alleinigen Grundimmunisierung ohne wiederholte teure Booster-Immunisierungen ein zumindest langjähriger Schutz vor Hepatitis B gewährleistet werden könnte. Aus sozialmedizinischer Sicht ist die Situation für HPV-Infektionen ähnlich zu bewerten. Die meisten malignen HPV-assoziierten Erkrankungen und damit verbundene Todesfälle werden in den Entwicklungsländern gezählt (6). Hier ist man aber weit davon entfernt, sich eine prophylaktische Impfung mit momentanen Kosten von über 150 € pro Einmaldosis leisten zu können. Eine Kostenreduktion von einem Drittel wäre zumindest ein erster Schritt, die prophylaktische HPV-Impfung auch Frauen außerhalb industrialisierter Länder zugänglich zu machen. Es sei jedoch betont, dass eine finale Bewertung der Notwendigkeit der dreimaligen Applikation von Gardasil® nur in großen klinischen Studien, die die Wirksamkeit in Bezug auf Verhinderung von intraepithelialen Neoplasien des Genitales bei zweifach und dreifach geimpften Probandinnen vergleichend über einen langen Zeitraum hinweg überprüfen, erfolgen kann.

#### **4.3 Gardasil®-induzierte zelluläre Immunität abhängig vom HPV-Typ**

Der quadrivalente Impfstoff Gardasil® enthält VLP der beiden Low-Risk-HPV-Typen 6 und 11 sowie der beiden karzinogenen HPV-Typen 16 und 18. Unabhängig vom Impfstatus konnte gezeigt werden, dass sich die Darstellung L1-spezifischer CD4<sup>+</sup> TZ abhängig vom HPV-Typ z. T. quantitativ stark unterscheidet. So können für HPV 6 und 11 hochsignifikant mehr spezifische T-Helfer-Zellen gemessen werden als für HPV 16 und 18. Auch innerhalb der High-Risk-Gruppe sind weitere Unterschiede zu verzeichnen. Für HPV 18 lassen sich mit Abstand am wenigsten L1-spezifische CD4<sup>+</sup> TZ nachwei-

sen, dieser Unterschied ist im Vergleich zu allen anderen drei HPV-Typen als hochsignifikant zu bezeichnen. Zusammengefasst lässt sich für die Low-Risk-Vertreter eine quantitativ hochsignifikant stärker ausgeprägte spezifische TZ-Antwort festhalten als für die krebsauslösenden High-Risk-HPV-Typen. Diese Unterschiede wurden sowohl für IL-2<sup>+</sup> als auch für INF- $\gamma$ <sup>+</sup> TZ beobachtet.

Die insgesamt nur schwach ausgeprägte TZ-Antwort auf HPV 18 steht im Einklang mit dem bereits in den Studien zur Immunogenität des Impfstoffes innerhalb der ersten Monate nach letzter Impfung beobachteten Abfall des für HPV 18 L1 spezifischen AK-Titers. Im Gegensatz dazu waren allerdings für HPV 16, für das im Rahmen dieser Arbeit zumindest entscheidend weniger L1-spezifische TZ nachgewiesen wurden als für die Low-Risk-Vertreter, in allen Immunogenitätsstudien immer die höchsten AK-Titer zu verzeichnen und auch kein Abfall im Verlauf zu beobachten, der über den von HPV 6 und 11 hinausgegangen wäre (34;37;45;46).

Bei der Interpretation dieser Ergebnisse sollte zunächst ein Augenmerk auf die unterschiedliche Dosierung der verschiedenen in Gardasil<sup>®</sup> enthaltenen VLP gelegt werden. So enthält die Vakzine jeweils 20  $\mu$ g VLP der HPV-Typen 6 und 18, die VLP der weiteren beiden Virustypen 11 und 16 hingegen sind in doppelter Dosierung von 40  $\mu$ g enthalten (32). Hieraus könnten sich Unterschiede in der Immunogenität, sowohl auf zellulärer als auch auf humoraler Ebene, ergeben. Die erzielten Ergebnisse lassen sich allerdings hiermit nicht in Einklang bringen. Zwar weist der schwach immunogene HPV-Typ 18 nur eine Dosis von 20  $\mu$ g VLP auf, für das ebenfalls niedrig dosierte HPV 6 L1 ließen sich aber die höchsten spezifischen TZ-Anteile messen und das auf zellulärer Ebene ebenfalls schwach immunogene HPV 16 wiederum ist mit 40  $\mu$ g VLP in der Vakzine hoch dosiert enthalten.

Eine mögliche Erklärung für das unterschiedliche Ausmaß zellulärer Immunität lässt sich aus der unterschiedlichen Altersverteilung von Low- und High-Risk-Erkrankungen ableiten. Wie bereits erwähnt, treten Condylomata acuminata bevorzugt bereits zwischen dem 20. und 24. Lebensjahr auf, Low-Risk-Infektionen werden also in erster Linie in diesem Alter und bereits in den Jahren davor erworben (9). CIN zeigen sich dagegen meist erst zwischen dem 25. und 35. Lebensjahr, es ist demnach möglich, dass die ursächliche High-Risk-Infektion epidemiologisch etwas später auftritt (25). Einschränkend sei jedoch erwähnt, dass auch die Möglichkeit besteht, dass die Pathogenese von der



Infektion zur klinischen Manifestation bei den High-Risk-Typen mehr Zeit benötigt. Auf Grund des mit einem Altersdurchschnitt von 23,4 Jahren recht jungen Studienkollektivs könnte man nun schlussfolgern, dass mehrere Probandinnen bereits eine Infektion mit HPV 6 oder 11 erworben hatten und die prophylaktische HPV-Impfung in diesen Fällen schon einen Boost der bereits vorhandenen natürlichen Immunität darstellt, was sich in einer quantitativ stärker ausgeprägten spezifischen TZ-Antwort äußert. Ein Hinweis, der diese These untermauert, ist die in der ungeimpften Kontrollgruppe gemessene HPV 6 L1-spezifische TZ-Antwort (vgl. Kap. 3.1.2.1). Des Weiteren fiel der Verdacht bei 20 HPV-auffälligen Probandinnen in zwölf Fällen auf Low-Risk-Typen als Verursacher möglicher Infektionen. Dem ist jedoch entgegenzuhalten, dass bei den 20 Probandinnen, die auf Grund auffälliger Serologie oder einschlägiger Angaben im Fragebogen Anhaltspunkte boten, möglicherweise bereits eine natürliche HPV-Infektion erworben zu haben, nur in fünf Fällen auch überdurchschnittlich hohe Anteile HPV L1-spezifischer TZ zu messen waren, die auf einen möglichen Boost einer bereits ausgeprägten natürlichen Immunität hinweisen könnten (vgl. Kap. 3.1.5). Allerdings ist zu erwähnen, dass im Rahmen dieser Studie bei den 20 beschriebenen Probandinnen nur auf den Verdacht einer möglichen HPV-Infektion zurückgegriffen werden konnte, was die Aussagekraft einschränkt. Um also die These zu bestätigen oder zu verwerfen, ob die sehr hohen Anteile L1-spezifischer TZ für die Low-Risk-Typen mit einem Boost einer bereits bestehenden natürlichen Immunität zu erklären sind, sollte vergleichend Blut einer größeren Anzahl von geimpften Frauen analysiert werden, bei denen eine frühere oder bestehende HPV-Infektion mit einem Vakzin-Typ sicher diagnostiziert wurde.

Eine weitere mögliche Begründung der höheren gemessenen Low-Risk-Typ-spezifischen TZ-Frequenzen ergibt sich aus der nahen strukturellen Verwandtschaft der HPV-Typen 6 und 11. Eine Gegenüberstellung der Aminosäuresequenzen der HPV 6 und 11 L1-Proteine mit Hilfe der Datenbank des European Molecular Biology Network (EMBLnet) ergab eine Homologie von 92,2%, nur 39 der 501 Aminosäuren der beiden L1-Proteine unterscheiden sich. Dieser hohe Grad an Übereinstimmung findet sich auch in verschiedenen Literaturquellen (70;71). Auf Grund der weitgehend identischen L1-Antigene kann man von einer gewissen Kreuzreaktivität der beiden genannten HPV-Typen ausgehen, d. h. HPV 6 VLP-induzierte CD4<sup>+</sup> TZ sind evtl. auch HPV 11 L1-spezifisch und umgekehrt. Misst man also nach Stimulation mit z. B. HPV 6 L1 den Anteil spezifischer TZ, werden möglicherweise auch durch HPV 11 VLP induzierte TZ erfasst.

Stellt man nach Stimulation HPV 11 L1-spezifische TZ dar, werden zusätzlich die durch HPV 6 VLP aktivierten TZ gemessen, wodurch sich die hohen spezifischen TZ-Frequenzen dieser HPV-Typen erklären ließen.

Auf der Suche nach einer Erklärung für das schlechte Abschneiden der High-Risk-Typen, v. a. HPV 18, auf Ebene der zellulären Immunantwort, lohnt es auch einen Blick auf den zweiten prophylaktischen HPV-Impfstoff zu werfen. Für die bivalente Vakzine Cervarix<sup>®</sup>, die nur die karzinogenen HPV-Typen 16 und 18 abdeckt, sind zumindest auf humoraler Ebene generell höhere L1-spezifische AK-Titer gemessen worden (42). Es muss allerdings hinzugefügt werden, dass diese auf Grund unterschiedlicher Maßsysteme mit gemessenen AK-Titern nach Gardasil<sup>®</sup>-Impfung nicht eins zu eins vergleichbar sind. Cervarix<sup>®</sup>-induzierte AK-Level fallen auch einen Monat nach der letzten Impfung nur geringfügig ab und erreichen nach 18 Monaten ein Plateau, das in Nachbeobachtungen bis zu 76 Monate nach der letzten Impfung immer noch Bestand hat. Dies gilt gleichermaßen für HPV 16 und 18 (72). Als Konsequenz ergibt es sich zwingend, auch für Cervarix<sup>®</sup> mit der dargestellten Methodik HPV L1-spezifische TZ direkt nachzuweisen und zu überprüfen, ob das bessere Abschneiden auf humoraler Seite auch mit einer stärker ausgeprägten HPV 16 und 18 L1-spezifischen TZ-Antwort zusammenhängt. Sollte es bewiesen werden, dass Gardasil<sup>®</sup> in Bezug auf HPV 16 und 18 sowohl humoral als auch zellulär eine schwächere Immunogenität aufweist, ist als mögliche Erklärung an eine immunologische Interferenz der VLP der vier HPV-Typen untereinander zu denken. Es ist bereits gezeigt, dass bei gleichzeitiger Applikation von Gardasil<sup>®</sup> zusammen mit der rekombinanten HBV-Vakzine Recombivax HB<sup>®</sup> im Schnitt 33% geringere Anti-HBs-Titer erzielt werden als bei alleiniger Impfung gegen Hepatitis B (73). TZ-Daten existieren hierzu nicht. Aus dieser Erkenntnis kann man die Frage formulieren, ob die Bestandteile Gardasil<sup>®</sup>, welche in diesem Fall für die erniedrigten Anti-HBs-Titer verantwortlich sind, evtl. auch die adäquate Ausbildung HPV 18 L1-spezifischer TZ und AK behindern.

Ob die relativ gesehen schwächere Immunogenität der Vakzine Gardasil<sup>®</sup>, für HPV 18 sowohl auf humoraler als auch auf zellulärer Ebene, für HPV 16 zumindest auf Ebene der T-Zellen, auch mit einer verminderten langfristigen Einbuße an Wirksamkeit des Schutzes vor High-Risk-Infektionen korreliert, während der Schutz vor Low-Risk-Viren bestehen bleibt, ist bisher unklar. Die verminderte Anzahl von IL-2<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> TZ gibt nur ei-

nen möglichen Hinweis. Die dargelegten Ergebnisse sollten deswegen auf jeden Fall Ansatz zu weiterer Diskussion und Forschung sein – schließlich wurde Gardasil® nicht zuletzt vom Hersteller als „Impfung gegen Krebs“ auf den Markt gebracht (74). Es sei aber darauf hingewiesen, dass unabhängig von humoralen und zellulären immunologischen Entwicklungen die Wirksamkeit der Vakzine in der Verhinderung von präkanzerösen Läsionen des Genitales für inzwischen fünf Jahre belegt ist (37;45). Für Aussagen über diesen Zeitraum hinaus müssen weitere Nachbeobachtungen der klinischen Studien folgen.

Eine weitere Aufgabe, die sich aus den Ergebnissen der Gardasil®-induzierten spezifischen TZ abhängig vom HPV-Typ ergibt, ist der mögliche direkte Nachweis kreuzreaktiver T-Helfer-Zellen. Für das humorale Immunsystem ist bereits gezeigt, dass eine Kreuzreaktivität der AK gegen HPV 31, 45, 52 und 58 besteht (47). Zudem wurde indirekt durch Lymphozytenproliferation bewiesen, dass eine monovalente Vakzine aus HPV 16 VLP auch spezifische TZ-Reaktionen gegen HPV 31 induziert (55). Sollte es gelingen, ex vivo direkt L1-spezifische CD4<sup>+</sup> TZ für HPV 31, 45 und andere strukturell verwandte HPV-Typen nachzuweisen, drängt sich die Frage auf, ob z. B. das mit HPV 18 strukturell ähnliche HPV 45 vergleichbar geringe spezifische TZ-Antworten induziert, während verwandte Virus-Typen von HPV 6 und 11 besser abschneiden. In weiteren Schritten könnte man schließlich zudem vergleichen, ob Cervarix® möglicherweise in der Lage ist, mehr kreuzreaktive CD4<sup>+</sup> TZ für die HPV-Typen 31 und v. a. 45 auszubilden als Gardasil®. Dies wiederum stünde im Einklang mit der für Cervarix®, nicht aber für Gardasil®, nachgewiesenen Kreuzprotektion gegen HPV 45-assoziierte Läsionen (vgl. Kap. 1.3.1).

#### **4.4 Vergleich humoraler und zellulärer Immunität**

Die mit der vorgestellten Multiplex-Serologie im Studienkollektiv der Querschnittsstudie gemessenen HPV L1-spezifischen AK-Titer entsprechen den Ergebnissen der bekannten Studien, die die Überprüfung der humoralen Immunogenität Gardasil® zum Ziel hatten (34;37;45;46). Wie bereits erwähnt, fiel die ungeimpfte Kontrollgruppe durch einen leicht positiven HPV 6 L1-Titer auf, was analog auch für die TZ-Ergebnisse festgehalten werden konnte (vgl. Kap. 3.1.2.1). Durch die erste Impfung wurde, mit einer einzigen Ausnahme, bei allen Probandinnen eine Serokonversion erzielt. Nach der zweiten Vakzinierung erfuhren die AK-Titer einen weiteren, jedoch nicht signifikant aus-

geprägten Anstieg. Erst bei dreifach geimpften Frauen waren schließlich Titer zu verzeichnen, die, je nach HPV-Typ, eine quantitative Verdopplung bis Verdreifachung gegenüber einfach geimpften Studienteilnehmerinnen darstellen. Dies ist als entscheidender Unterschied zur zellulären Immunantwort zu unterstreichen und konnte so auch durch parallele Bestimmung von spezifischen AK und TZ am gleichen Studienkollektiv bestätigt werden.

Bei differenzierter Betrachtung der einzelnen HPV-Typen kann man unabhängig vom Impfstatus die höchsten AK-Titer für den High-Risk-Typ HPV 16 festhalten. Dann erst folgen mit etwas geringer ausgeprägten spezifischen Titern HPV 6 und 11. Wie bereits erwähnt, war dies bei den gleichen Probandinnen für die spezifischen TZ in umgekehrter Reihenfolge beobachtet worden (vgl. Kap. 3.1.2.2). Im Gegensatz dazu wurden für HPV 18 sowohl die niedrigsten AK-Titer als auch die niedrigsten Anteile spezifischer T-Helfer-Zellen bei den Probandinnen dieser Studie unabhängig von der Zahl bereits erhaltener Impfungen gemessen.

In den Kapiteln 4.2 und 4.3 sind bereits erste Vergleiche der im Rahmen dieser Arbeit erzielten TZ-Ergebnisse mit in der Literatur bereits bekannten Resultaten der Gardasil®-induzierten humoralen Immunität angestellt und Konsequenzen, die sich daraus für die weitere Forschung auf TZ-Ebene ergeben, aufgezeigt worden. Durch den analogen Nachweis von Vakzin-spezifischen TZ und AK am gleichen Probandinnenkollektiv, was in der vorliegenden Studie zum ersten Mal erfolgte, werden diese Schlussfolgerungen in ihrer Gültigkeit und Relevanz bestätigt.

Berechnungen einer möglichen Korrelation von Gardasil®-induzierten IL-2<sup>+</sup> TZ und AK brachten insgesamt kein positives Ergebnis. Dies bedeutet, dass hohe Anteile L1-spezifischer T-Helfer-Zellen nicht zwingend auch mit hohen L1-spezifischen AK-Titern einhergehen und umgekehrt. Jedoch sollte dies nach einer gelungenen Messung IL-4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>2-Zellen erneut überprüft werden, da diese durch Aktivierung der B-Zellen direkter in die Initialisierung der spezifischen AK-Synthese eingreifen und daher auf dieser Ebene eine Korrelation zellulärer und humoraler Immunität eher zu erwarten ist als für die Gesamtmenge der IL-2<sup>+</sup> TZ (vgl. Kap. 1.3).

## 4.5 Übereinstimmung von Querschnitts- und Longitudinalstudie

Um die im Rahmen der Querschnittsstudie an vier unabhängigen Gruppen verschiedenen Impfstatus erhobenen Daten zu überprüfen, wurde zusätzlich eine Verlaufsstudie mit Messungen der Vakzin-spezifischen TZ und AK jeweils nach erster, zweiter und dritter HPV-Impfung bei den gleichen elf Probandinnen durchgeführt.

Bezüglich der quantitativen Ausprägung sowohl der HPV L1-spezifischen IL-2<sup>+</sup> TZ- als auch der L1-spezifischen INF- $\gamma$ <sup>+</sup> T<sub>H</sub>1-Antwort zeigten sich beide Studien weitestgehend übereinstimmend. So wichen die Mittelwerte der Gruppen gleichen Impfstatus von Querschnitts- und Longitudinalstudie auf Ebene der IL-2<sup>+</sup> TZ um maximal 25% und auf Ebene der INF- $\gamma$ <sup>+</sup> T<sub>H</sub>1 um maximal 40% voneinander ab (vgl. Kap. 3.1.2.1 und 3.2.2).

Die L1-spezifische AK-Antwort des Studienkollektivs der Longitudinalstudie wies im Vergleich zur Querschnittsstudie eine quantitativ stärkere Ausprägung auf. Berücksichtigt man jedoch, dass die AK-Messung für die Verlaufsstudie messtechnisch bedingt generell 1,4-fach höhere AK-Titer generierte, weichen die mit diesem Faktor korrigierten Mittelwerte der Gruppen gleichen Impfstatus nur noch um maximal 30%, in einer Ausnahme um 50%, voneinander ab (vgl. Kap. 3.1.3.1 und 3.2.3).

Des Weiteren konnte unabhängig vom Studienaufbau in beiden Untersuchungen ein Anstieg der HPV L1-spezifischen TZ-Anteile nach der zweiten Impfung bzw. im Vergleich zur einfach geimpften Gruppe gefunden werden. Weder nach Erhalt der dritten Dosis Gardasil<sup>®</sup> im Verlauf noch zwischen den Querschnittsstudienprobandinnen mit zwei und drei Immunisierungen zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede der TZ-Antwort. Allerdings war es im Rahmen der Longitudinalstudie zusätzlich möglich, eine differenzierte Analyse des individuellen Verlaufs der Vakzin-spezifischen TZ-Reaktion vorzunehmen. Hierbei ließ sich erkennen, dass die TZ nach der dritten Impfung meist nicht auf dem gleichen Niveau stagnierten, sondern individuell entweder weiter anstiegen oder im Vergleich zum Zustand nach der zweiten Impfung abfielen (vgl. Kap. 3.1.2.1 und 3.2.2).

Der Verlauf der Vakzin-spezifischen AK wich in der Longitudinalstudie leicht von den in der Querschnittsstudie erhobenen Daten ab (vgl. Kap. 3.1.3.1 und 3.2.3). So zeigten die Verlaufsstudienprobandinnen insgesamt durch die zweite Impfung bereits einen hochsignifikanten AK-Anstieg, die dritte Impfung brachte hingegen keinen weiteren signifi-

kanten Zugewinn an L1-spezifischen AK. Dies gleicht eher dem Verlauf der TZ-Antwort von Querschnitts- sowie Longitudinalstudie als dem Verlauf der serologischen Ergebnisse der Querschnittsstudie. In dieser war erst durch die dritte Impfung ein entscheidender, signifikanter Anstieg der HPV L1-spezifischen AK-Titer zu verzeichnen. Es sei in diesem Rahmen aber auf die geringere Fallzahl der Longitudinalstudie und somit auf eine möglicherweise höhere Aussagekraft der im Rahmen der Querschnittsstudie erhobenen Daten hinzuweisen. Zusätzlich decken sich die serologischen Ergebnisse der Querschnittsstudie mit den in der Literatur beschriebenen Verläufen Vakzin-spezifischer AK-Titer nach Impfung mit Gardasil® (vgl. Kap. 4.4).

Des Weiteren erbrachte die Longitudinalstudie den interessanten Nachweis, dass eine Probandin, die als einfach geimpfte Teilnehmerin der Querschnittsstudie noch keine L1-spezifischen TZ aufwies, diese aber nach der dritten Impfung entwickelte (vgl. Kap. 3.1.2.1 und 3.2.2). Auch bei Probandinnen, denen eine Dosis Gardasil® nicht zur Ausbildung relevanter Anti-HPV 18 L1-AK-Titer ausreichte, konnten bereits nach der zweiten Impfung positive HPV 18 L1-spezifische AK-Titer gemessen werden (vgl. Kap. 3.1.3.1 und 3.2.3).

Ebenso wie in der Querschnittsstudie konnte auch im Rahmen der Verlaufsbeobachtung festgehalten werden, dass die L1-spezifische TZ-Antwort auf die VLP der beiden Low-Risk-HPV-Typen signifikant stärker ausgeprägt ist als die HPV 16 und 18 L1-spezifische T-Helfer-Zell-Reaktion. Unabhängig vom Studiendesign und vom Impfstatus schnitt der High-Risk-Vertreter HPV 18 in beiden Untersuchungen am schlechtesten ab (vgl. Kap. 3.1.2.2 und 3.2.2).

Die Ausprägung der humoralen Immunantwort abhängig vom HPV-Typ stimmte bei Querschnitts- und Longitudinalstudie ebenfalls überein (vgl. Kap. 3.1.3.2 und 3.2.3). So wurden die höchsten spezifischen AK-Titer – im Gegensatz zur TZ-Antwort – für den High-Risk-Vertreter HPV 16 gemessen, die Anti-HPV 6 und 11 L1-Titer lagen etwas darunter. HPV 18 zeigte sowohl in der Querschnitts- als auch in der Longitudinalstudie und sowohl auf zellulärer Ebene als auch auf humoraler Ebene die schwächste Immunogenität.

Insgesamt konnten die Ergebnisse der Querschnittsstudie auch im Rahmen der Verlaufsbeobachtung von elf gleichen Probandinnen über den gesamten Impfzyklus hinweg

sowohl bezüglich der quantitativen Ausprägung der Vakzin-spezifischen TZ-Antwort als auch bezüglich des Verhaltens der TZ-Frequenzen abhängig von Impfstatus und HPV-Typ bestätigt werden. Einbußen der Signifikanz der bei der statistischen Auswertung der Longitudinalstudie erhobenen Unterschiede sind im Vergleich zur Querschnittsstudie in erster Linie mit der um ca. ein Drittel reduzierten Probandinnenzahl pro Gruppe zu erklären.

#### **4.6 Limitationen der Methodik**

Zum erstmaligen direkten Nachweis HPV L1-spezifischer TZ nach prophylaktischer HPV-Impfung mit Gardasil<sup>®</sup> wurde der von Frentsch et al. 2005 publizierte auf CD154 basierende ex vivo Assay in einem mehrstufigen Prozess weiterentwickelt und an die Fragestellung angepasst. Schließlich gelang es, einen validen Assay zu etablieren, der es ermöglicht, nach ex vivo Stimulation verlässlich Antigen-spezifische T-Helfer-Zellen in Vollblutproben darzustellen. Eine Analyse von kryokonservierten PBL führte nicht zu vergleichbaren Ergebnissen und kann daher nicht empfohlen werden (vgl. Kap. 2.2.1.2.1). Der Assay kam im Rahmen einer nicht-interventionellen Querschnittsstudie sowie einer integrierten Longitudinalstudie zum Einsatz.

Es erfolgte keine Randomisierung und Verblindung der Studien. Eine Randomisierung wäre jedoch auch nur im Rahmen einer interventionellen Studie möglich gewesen, in der alle Probandinnen drei Injektionen gemäß des Gardasil<sup>®</sup>-Impfschemas erhalten hätten. Eine Kontrollgruppe wäre durch dreimalige Placebo-Applikation, die einfach geimpfte Gruppe durch einmalige Gabe von Gardasil<sup>®</sup> und zweimalige Placebo-Injektion entstanden. Für die Gruppe mit zweifacher Impfung hätte man Probandinnen zweimal Verum und einmal Placebo und für die letzte Gruppe dreimal Gardasil<sup>®</sup> applizieren müssen. Da das bestehende Ethikvotum jedoch keine interventionelle Studie erlaubte, bestand die Möglichkeit einer Randomisierung nicht und es konnte nur mit Blut von bereits auf Eigeninitiative geimpften Spenderinnen gearbeitet werden. Diese mussten gemäß ihres Impfstatus auf die Gruppen verteilt werden bis diese alle eine gleiche Anzahl von ca. 15 Probandinnen aufwiesen. Trotz fehlender Randomisierung wiesen die vier Gruppen in der Post hoc-Analyse bezüglich des Alters, des immunologischen und gynäkologischen Status sowie des Sexualverhaltens kaum signifikante Unterschiede auf (vgl. Kap. 3.1.1).

Der verwendete Fragebogen erbrachte Informationen zum in Bezug auf HPV-Infektionen riskanten Sexualverhalten sowie zu einer auffälligen gynäkologischen HPV-Anamnese. Die betroffenen Frauen wurden jedoch nicht von der Studie ausgeschlossen. Andere Studien machten eine Zahl von mehr als vier oder fünf Sexualpartnern sowie auffällige Pap-Abstriche in der Anamnese zum Ausschlusskriterium (33;34;35;36). Wie bereits erwähnt, stellt die steigende Anzahl der Sexualpartner einen Hauptrisikofaktor dar, eine HPV-Infektion zu erwerben (vgl. Kap. 1.1.3). Auf Grund dessen besteht die Möglichkeit, dass die Anteile HPV L1-spezifischer TZ bei Probandinnen mit vielen verschiedenen Sexualpartnern oder auffälligen Pap-Abstrichen wegen ihrer höheren Wahrscheinlichkeit, bereits eine HPV-Infektion durchlitten zu haben, nicht ausschließlich auf die prophylaktische Impfung zurückzuführen sind. Diese mögliche Verzerrung der Ergebnisse wird aber aus folgenden Gründen auf ein Minimum reduziert: Zum einen sind die infektionsauslösenden Viren nur sehr schwach immunogen und auch bei Probandinnen mit einer möglichen HPV-Infektion ließen sich nur in den wenigsten Fällen überdurchschnittlich hohe Anteile spezifischer TZ nachweisen, die auf einen Boost einer bestehenden Immunität durch die Impfung hindeuten würden (vgl. Kap. 3.1.5). Zum anderen kann man insgesamt von einer homogenen Verteilung der auffälligen Probandinnen auf die vier Studiengruppen sprechen. Hierbei muss lediglich einschränkend darauf hingewiesen werden, dass die Probandinnen der Kontrollgruppe eine signifikant geringere Anzahl bisheriger Sexualpartner als die einfach geimpften Studienteilnehmerinnen angaben (vgl. Kap. 3.1.1).

Zusätzlich zu den genannten Ausschlusskriterien wurden in den meisten anderen Studien zu prophylaktischen HPV-Impfstoffen zu Beginn und im Verlauf Abstriche von Zervix und äußerem Genitale der Probandinnen genommen, um diese auf das Vorhandensein von HPV-DNA zu untersuchen. Des Weiteren wurde serologisch auf HPV getestet. Die spätere Analyse der Ergebnisse konnte dann einmal innerhalb der „According-to-protocol“ (ATP)-Population ohne HPV-positive Probandinnen und zusätzlich unter Einschluss aller Probandinnen innerhalb der „Intention-to-treat“ (ITT)-Population durchgeführt werden (35;36). Im Gegensatz dazu wurden die 63 teilnehmenden Probandinnen im Rahmen dieser Studie ausschließlich serologisch auf eine HPV-Infektion untersucht und per Fragebogen nach einer möglichen bekannten Infektion befragt. Eine Abstrichentnahme mit Nachweis von HPV-DNA erfolgte nicht. Zudem wurden die TZ-Ergebnisse auch nicht unter Ausschluß der serologisch oder anamnestisch auffälligen Pro-



bandinnen analysiert. Wie im vorangehenden Absatz beschrieben, ist dadurch eine Verzerrung der Ergebnisse möglich, da nicht auszuschließen ist, dass bei infizierten Probandinnen eine bereits bestehende Immunität durch die Impfung geboostet wurde oder die TZ-Antwort generell auf die natürliche Infektion zurückzuführen ist. Hier kann jedoch erneut darauf hingewiesen werden, dass bei den serologisch oder anamnestisch HPV-positiven Probandinnen nur in 5 von 20 Fällen eindeutig überdurchschnittliche Anteile L1-spezifischer TZ gemessen wurden und die betreffenden Frauen nicht signifikant gehäuft in einer Gruppe anzutreffen waren. Des Weiteren sei noch hinzugefügt, dass auch ein negativer DNA-Test keine überwundene Infektion, die möglicherweise zur Ausbildung einer immunologischen Gedächtnisantwort geführt hat, ausschließt (8). Will man also die Wahrscheinlichkeit, dass die HPV L1-spezifischen T-Helfer-Zellen ausschließlich durch den Impfstoff induziert sind, auf ein Maximum erhöhen, wäre es angebracht, die gesamte Studie an einem Kollektiv jungfräulicher Probandinnen durchzuführen, da die nicht sexuelle Übertragung von HPV als selten anzusehen ist (9). Um das Restrisiko einer nicht sexuell übertragenen HPV-Infektion zu minimieren, müsste man zur weiteren Absicherung zudem in Abstrichen und serologisch auf HPV testen und positive Probandinnen von der Teilnahme ausschließen. 5 der 20 HPV-auffälligen Probandinnen der vorliegenden Studie hatten im Fragebogen angegeben, bisher nicht sexuell aktiv gewesen zu sein. Trotz Verzicht auf ein HPV-DNA-Screening und Einschluss aller Probandinnen unabhängig von deren HPV-Status und Sexualverhalten ist eine grobe Verzerrung der Ergebnisse durch den Einfluss möglicher HPV-Infektionen unwahrscheinlich, da durch die HPV-Serologie, durch eine auffällige E6- / E7-spezifische TZ-Antwort und durch die Abfrage im Fragebogen auffällige Probandinnen erkannt werden konnten und diese nicht signifikant gehäuft in einer bestimmten Studiengruppe zu finden waren. In diesem Zusammenhang muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass zum einen für HPV 6 und 11 auf Grund fehlender Stimulationspeptide keine E6- / E7-spezifischen CD4<sup>+</sup> TZ bestimmt werden konnten und zum anderen nur für 58 von 63 Studienteilnehmerinnen serologische Ergebnisse vorlagen sowie fünf andere Probandinnen den Fragebogen nicht beantworteten.

Im Rahmen der Longitudinalstudie wurden 11 von 15 Probandinnen mit primär einfacher Gardasil<sup>®</sup>-Impfung im weiteren Verlauf des Impfzyklus begleitet und ihr Blut nach zweiter und dritter Impfung ebenfalls auf HPV L1-spezifische CD4<sup>+</sup> TZ untersucht. Als Einschränkung der Aussagekraft ist hierbei die fehlende Analyse des Probandinnen-

blutes vor der allerersten Impfung zu verzeichnen. Da sich die Longitudinalstudie erst aus der Querschnittsstudie heraus entwickelte, war dies im Nachhinein nicht mehr möglich. Hierzu hätte man die ungeimpfte Kontrollgruppe als Ausgangskollektiv verwenden müssen, diese Studienteilnehmerinnen hatten aber z. T. nie die Absicht sich überhaupt impfen zu lassen. Die bereits einfach geimpften Probandinnen hingegen waren natürlich am Abschluss des gesamten Impfzyklus interessiert und eigneten sich somit für eine Verlaufsbeobachtung. In erster Linie diente die Longitudinalstudie dazu, die TZ-Daten der Querschnittsstudie als verlässlich zu bestätigen. Trotzdem sollte dringend eine Studie über den gesamten Impfverlauf der individuellen Studienteilnehmerinnen folgen. Diese sollte sowohl die Messung HPV L1-spezifischer CD4<sup>+</sup> TZ vor der ersten Impfung als auch zusätzliche Nachbeobachtungen über einen längeren Zeitraum nach der letzten Impfung beinhalten, um weitere Informationen über die Ausbildung eines spezifischen immunologischen Gedächtnisses zu erhalten.

Abschließend sei noch erwähnt, dass sowohl die beschriebene Querschnittsstudie mit insgesamt 63 Probandinnen und Gruppen à 16, 15, 15 und 17 Mitgliedern als auch die integrierte Longitudinalstudie mit elf Teilnehmerinnen relativ gesehen nur kleine Fallzahlen aufweisen. Allerdings sind die verhältnismäßig kleinen Gruppen trotzdem als sehr vergleichbar anzusehen, da der Abgleich der wichtigsten Gruppencharakteristika in der Post hoc-Analyse ein sehr homogenes Bild erbrachte (vgl. Kap. 3.1.1). Dennoch sollte der hiermit im Rahmen der Grundlagenforschung erstmals erbrachte direkte Nachweis HPV L1-spezifischer T-Helfer-Zellen nach prophylaktischer Impfung mit Gardasil® unbedingt in einem größeren Kollektiv bestätigt werden.

## 5 Zusammenfassung

HPV-assoziierte benigne und maligne Neoplasien stellen weltweit ein häufiges Gesundheitsproblem dar. Ungefähr 70% aller invasiven Zervixkarzinome werden initial durch eine Infektion mit den High-Risk-HPV-Typen 16 und 18 verursacht und ca. 90% aller anogenitalen Condylome durch HPV 6 und 11 ausgelöst (7;22). Die prophylaktische Impfung mit der virus-like particle-basierten, quadrivalenten Vakzine Gardasil® verhindert bei vorher HPV-naiven Frauen sicher eine Infektion mit den genannten vier HPV-Typen über mindestens fünf Jahre (36;37). Auf humoraler Ebene konnte im Rahmen der Zulassungsstudien eine starke Immunogenität belegt werden. Gardasil®-induzierte Antikörpertiter erlangen ein Vielfaches der im Vergleich zu nach natürlichen Infektionen gemessenen Antikörperkonzentrationen, fallen jedoch einige Monate nach Abschluss des Impfzyklus ab (37). Bisher erfolgte kein direkter Nachweis HPV-Vakzinspezifischer T-Zellen. Impfantigen-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen spielen jedoch eine wichtige Rolle für die B-Zellaktivierung sowie den Antikörperklassenwechsel und stellen in Form von T-Gedächtniszellen eine wichtige Komponente anamnestischer Immunantworten dar, die mit großer Wahrscheinlichkeit für die Langzeitwirkung eines Impfstoffes mitverantwortlich sind.

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, eine verlässliche Methode zur ex vivo Darstellung HPV-Antigen-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Vollblutproben zu entwickeln. Für eine Querschnittsstudie wurden 63 Probandinnen verschiedenen Impfstatus rekrutiert. Die Probandinnen der einfach geimpften Gruppe wurden zudem als integrierte Longitudinalstudie über den gesamten weiteren Impfzyklus verfolgt. Mittels eines Fragebogens konnte gezeigt werden, dass die Probandinnen der verschiedenen Studiengruppen bezüglich des Alters, immunologischer Auffälligkeiten, gynäkologischer Anamnese und des Sexualverhaltens eine hohe Homogenität aufwiesen. Die Vollblutproben der Probandinnen wurden mit HPV L1-Peptidpools der jeweils vier in der Vakzine enthaltenen HPV-Typen sowie weiteren Kontrollantigenen über 12 bis 24 Stunden ex vivo stimuliert. Nach entsprechender Aufbereitung konnten Antigen-spezifische T-Helfer-Zellen mittels einer intrazellulären CD4 / CD154 / IL-2 / INF- $\gamma$ -Färbung identifiziert und durchflusszytometrisch dargestellt werden. Parallel erfolgte mit Hilfe eines serologischen Multiplex-Assays eine Messung HPV L1-spezifischer Antikörper in Plasmaproben des gleichen Kollektivs.

Der ex vivo Nachweis von HPV L1-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen gelang bei den geimpften Probandinnen der Querschnittsstudie. Einfach geimpfte Studienteilnehmerinnen zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant mehr spezifische T-Zellen, die zweite Impfung führte sogar zu einem hochsignifikanten Anstieg der HPV L1-spezifischen T-Zellantwort. Probandinnen mit zwei und drei Gardasil<sup>®</sup>-Impfungen zeigten hingegen in der quantitativen Ausprägung der Vakzin-spezifischen T-Zellantwort keinen signifikanten Unterschied.

Unabhängig vom Impfstatus ließen sich für die Low-Risk-HPV-Typen 6 und 11 hochsignifikant mehr L1-spezifische T-Zellen nachweisen als für HPV 16 und 18. Die virus-like particles des High-Risk-Vertreters HPV 18 induzierten mit Abstand am wenigsten L1-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Seitens der Antikörper konnte bei den geimpften Probandinnen der Studie eine Seroconversion gezeigt werden. Im Gegensatz zum Verlauf der zellulären Immunantwort zeigten die HPV L1-spezifischen Antikörper einen Anstieg über den gesamten Impfverlauf. Bei Probandinnen, die bereits drei Dosen der Vakzine erhalten hatten, ließen sich signifikant mehr HPV L1-spezifische Antikörper messen als bei nur zweifach geimpften Studienteilnehmerinnen.

Die virus-like particles des häufigen High-Risk-Vertreters HPV 16 induzierten unabhängig vom Impfstatus am meisten L1-spezifische Antikörper, die Antikörperantwort auf HPV 6 und 11 war aber nur geringfügig schwächer ausgeprägt. Wie bereits auf Ebene der T-Zellen schnitt HPV 18 mit einem hochsignifikant niedrigeren L1-spezifischen Antikörpertiter am schlechtesten ab.

HPV L1-spezifische IL-2<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen und Antikörper zeigten keine direkte Korrelation.

Die Longitudinalstudie bestätigte die beschriebenen Ergebnisse. Auch im Rahmen des Follow-ups der elf Studienteilnehmerinnen zeigte sich, dass durch die dritte Gardasil<sup>®</sup>-Impfung insgesamt kein signifikanter Anstieg der spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen erfolgt. Des Weiteren konnte erneut belegt werden, dass die Low-Risk-spezifische T-Zellantwort im Vergleich zur HPV 16- und vor allem HPV 18-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort stärker ausgeprägt ist.

Im Rahmen dieser Arbeit gelang erstmals der direkte Nachweis HPV L1-spezifischer IL-2<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen sowie INF- $\gamma$ <sup>+</sup> T<sub>H</sub>1-Zellen nach prophylaktischer HPV-Impfung. Die Größenordnung ließ sich im Vergleich zu zellulären Immunantworten auf andere Impfstoffe als realistisch einschätzen. Trotzdem die dritte Impfung im Gardasil<sup>®</sup>-Impfschema auf zellulärer Ebene keinen Vorteil erbrachte, kann ohne weitere Forschung nach der momentanen Datenlage hinsichtlich humoraler Immunantwort und Effektivität in Verhinderung von HPV-assoziierten Läsionen nicht auf diese verzichtet werden. Die stärkere zelluläre Immunogenität der Low-Risk-HPV-Typen 6 und 11 kann durch einen möglichen Boost einer bereits früher im Leben erworbenen Low-Risk-Infektion oder aber durch eine Kreuzreaktivität der beiden HPV-Typen untereinander erklärt werden. Das schlechte Abschneiden von HPV 18 sowohl auf zellulärer als auch auf humoraler Ebene sollte Anlass geben, die Vakzine im weiteren Verlauf auf ihre Wirksamkeit gegen HPV 18-Infektionen zu reevaluieren.

Auf Grund der insgesamt kleinen Fallzahlen der durchgeführten Studien sollte ein T-Zell-Monitoring an einem größeren Kollektiv erfolgen. Um den Nachweis von T-Gedächtniszellen abzusichern, ist es zudem nötig, IL-2<sup>+</sup> HPV L1-spezifische T-Zellen mehrere Jahre nach der letzten erhaltenen Impfdosis darzustellen. Zusätzlich zur bereits erbrachten Charakterisierung der INF- $\gamma$ <sup>+</sup> T<sub>H</sub>1-Antwort sollte eine IL-4-Färbung zur Charakterisierung der Vakzin-spezifischen T<sub>H</sub>2-Antwort etabliert werden. Des Weiteren ist es nun möglich, mit der etablierten Methode auch HPV L1-spezifische T-Zellen nach Impfung mit der zweiten HPV-Vakzine Cervarix<sup>®</sup> vergleichend darzustellen. Ein weiteres mögliches Forschungsziel auf diesem Gebiet könnte die Detektion von kreuzreaktiven T-Zellen sein, um die prophylaktischen HPV-Impfstoffe in ihrem gesamten Wirkungsspektrum besser einschätzen zu können.

## 6 Literaturverzeichnis

- 1 Modrow S, Falke D, Truyen U. Molekulare Virologie. 2. Aufl. Heidelberg / Berlin, Deutschland: Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 2003.
- 2 Steger G, Pfister H. Papillomaviren und Polyomaviren. In: Doerr HW, Gerlich WH, Hrsg. Medizinische Virologie. 1. Aufl. Stuttgart, Deutschland: Georg Thieme Verlag, 2002:352-62.
- 3 Cogliano V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F. Carcinogenicity of human papillomaviruses. *Lancet Oncol* 2005;6(4):204.
- 4 Stanley M. Immunobiology of HPV and HPV vaccines. *Gynecol Oncol* 2008;109(2):15-21.
- 5 de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004;324(1):17-27.
- 6 Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol* 2005;32(1):16-24.
- 7 Munoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003;348(6):518-27.
- 8 Pathirana D, Hillemanns P, Petry KU, et al. Impfprävention HPV-assoziierter Neoplasien. S3-Leitlinie der Arbeitsgruppe HPV-Management-Forum der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e. V. *Chemother J* 2008;17:120-71.
- 9 Gross G, Ikenberg H, Petry KU, et al. Condylomata acuminata und andere HPV-assozierte Krankheitsbilder von Genitale, Anus und Harnröhre. Leitlinie der Deutschen STD-Gesellschaft in Zusammenarbeit mit der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft und der Paul-Ehrlich-Gesellschaft. *J Dtsch Dermatol Ges* 2008;6(2):153-62.
- 10 de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2007;7(7):453-9.
- 11 Klug SJ, Hukelmann M, Hollwitz B, et al. Prevalence of human papillomavirus types in women screened by cytology in Germany. *J Med Virol* 2007;79(5):616-25.
- 12 Manhart LE, Holmes KK, Koutsky LA, et al. Human papillomavirus infection among sexually active young women in the United States: Implications for developing a vaccination strategy. *Sex Transm Dis* 2006;33(8):502-8.
- 13 Trottier H, Franco EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine* 2006;24(1):1-15.

- 
- 14 Sycuro LK, Xi LF, Hughes JP, et al. Persistence of genital human papillomavirus infection in a long-term follow-up study of female university students. *J Infect Dis* 2008;198(7):971-8.
  - 15 Kjaer SK, Chackerian B, van den Brule AJ, et al. High-risk human papillomavirus is sexually transmitted: Evidence from a follow-up study of virgins starting sexual activity (intercourse). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10(2):101-6.
  - 16 Burk RD, Ho GY, Beardsley L, Lempa M, Peters M, Bierman R. Sexual behavior and partner characteristics are the predominant risk factors for genital human papillomavirus infection in young women. *J Infect Dis* 1996;174(4):679-89.
  - 17 Tarkowski TA, Koumans EH, Sawyer M, et al. Epidemiology of human papillomavirus infection and abnormal cytologic test results in an urban adolescent population. *J Infect Dis* 2004;189(1):46-50.
  - 18 Nielsen A, Kjaer SK, Munk C, Iftner T. Type-specific HPV infection and multiple HPV types: prevalence and risk factor profile in nearly 12,000 younger and older Danish women. *Sex Transm Dis* 2008;35(3):276-82.
  - 19 Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004;68(2):362-72.
  - 20 Dillner J. The serological response to papillomaviruses. *Semin Cancer Biol* 1999;9(6):423-30.
  - 21 Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J, et al. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *JAMA* 2001;286(24):3106-14.
  - 22 Aubin F, Pr etet JL, Jacquard AC, et al. Human papillomavirus genotype distribution in external acuminata condylomata: A large French national study (EDiTH IV). *Clin Infect Dis* 2008;47(5):610-5.
  - 23 Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V., Hrsg. Krebs in Deutschland 2003 – 2004. Häufigkeiten und Trends. 6. Aufl. Berlin, Deutschland: Gesundheitsberichterstattung des Bundes, 2008.
  - 24 Statistisches Bundesamt, Hrsg. Todesursachen in Deutschland 2006. Fachserie 12 / Reihe 4. Wiesbaden, Deutschland: Statistisches Bundesamt, 2007.
  - 25 Oettling G, Kreienberg R. Cervix uteri. In: Kaufmann M, Costa SD, Scharl A, Hrsg. Die Gynäkologie. 2. Aufl. Heidelberg, Deutschland: Springer Medizin Verlag, 2006:329-53.
  - 26 IARC Working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Human papillomaviruses. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 1995;64:1-378.

- 
- 27 Münger K, Baldwin A, Edwards KM, et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* 2004;78(21):11451-60.
  - 28 Richart RM. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia. *Clin Obstet Gynecol* 1968;10:748-84.
  - 29 Interdisziplinäre S2k-Leitlinie für die Prävention, Diagnostik und Therapie der HPV-Infektion und präinvasiver Läsionen des weiblichen Genitale. AWMF-Register Nr. 015/027. Berlin, Deutschland: AG Infektiologie und Infektimmunologie der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e. V., 2008. (Zugriff 24. August 2008 auf [http://www.dggg.de/\\_download/unprotected/g\\_02\\_04\\_04\\_hpv\\_infektion\\_praeinvasiver\\_laesionen.pdf](http://www.dggg.de/_download/unprotected/g_02_04_04_hpv_infektion_praeinvasiver_laesionen.pdf))
  - 30 Becker N. Epidemiological aspects of cancer screening in Germany. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003;129(12):691-702.
  - 31 EPARs for authorised medicinal products for human use. Product Overview Gardasil®. London, Great Britain: European Medicines Agency, 2008. (Zugriff 26. August 2008 auf <http://www.emea.europa.eu/humandocs/Humans/EPAR/gardasil/gardasil.htm>)
  - 32 sanofi pasteur MSD, Hrsg. Fachinformation Gardasil®. Berlin, Deutschland: Rote Liste Service GmbH, 2009.
  - 33 Koutsky LA, Ault KA, Wheeler CM, et al. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N Engl J Med* 2002;347(21):1645-51.
  - 34 Villa LL, Costa RLR, Petta CA, et al. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *Lancet Oncol* 2005;6(5):271-8.
  - 35 Garland SM, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, et al. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases. *N Engl J Med* 2007;356(19):1928-43.
  - 36 The FUTURE II study group. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent high-grade cervical lesions. *N Engl J Med* 2007;356(19):1915-27.
  - 37 Villa LL, Costa RLR, Petta CA, et al. High sustained efficacy of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus types 6/11/16/18 L1 virus-like particle vaccine through 5 years of follow-up. *Br J Cancer* 2006;95(11):1459-66.
  - 38 EPARs for authorised medicinal products for human use. European Public Assessment Report Gardasil®. Scientific discussion. London, Great Britain: European Medicines Agency, 2006. (Zugriff 27. August 2008 auf <http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/gardasil/070306en6.pdf>)



- 
- 39 Die Ständige Impfkommission (STIKO) am Robert Koch-Institut. Impfung gegen humane Papillomaviren (HPV) für Mädchen von 12 bis 17 Jahren - Empfehlung und Begründung. *Epidemiologisches Bulletin* 2007;12:97-103.
  - 40 The FUTURE II study group. Prophylactic efficacy of a quadrivalent human papillomavirus (HPV) vaccine in women with virological evidence of HPV infection. *J Infect Dis* 2007;196(10):1438-46.
  - 41 EPARs for authorised medicinal products for human use. Product Overview Cervarix®. London, Great Britain: European Medicines Agency, 2008. (Zugriff am 29. August 2008 auf <http://www.emea.europa.eu/humandocs/Humans/EPAR/cervarix/cervarix.htm>)
  - 42 Giannini SL, Hanon E, Moris P, et al. Enhanced humoral and memory B cellular immunity using HPV16/18 L1 VLP vaccine formulated with the MPL/aluminium salt combination (AS04) compared to aluminium salt only. *Vaccine* 2006;24(33-34):5937-49.
  - 43 Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. *Immunobiology*. 6. Aufl. New York, USA: Garland Science Publishing, 2005.
  - 44 Schwarz TF, Spaczynski M, Schneider A, et al. Immunogenicity and tolerability of an HPV-16/18 AS04-adjuvanted prophylactic cervical cancer vaccine in women aged 15 – 55 years. *Vaccine* 2009;27(4):581-7.
  - 45 Villa LL, Ault KA, Giuliano AR, et al. Immunologic responses following administration of a vaccine targeting human papillomavirus types 6, 11, 16 and 18. *Vaccine* 2006;24(27-28):5571-83.
  - 46 Block SL, Nolan T, Sattler C, et al. Comparison of the immunogenicity and reactogenicity of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in male and female adolescents and young adult women. *Pediatrics* 2006;118(5):2135-45.
  - 47 Smith JF, Brownlow M, Brown M, et al. Antibodies from women immunized with Gardasil® cross-neutralize HPV 45 pseudovirions. *Hum Vaccin* 2007;3(4):109-16.
  - 48 Harper DM, Franco EL, Wheeler CM, et al. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. *Lancet* 2006;367(9518):1247-55.
  - 49 Paavonen J, Jenkins D, Bosch FX, et al. Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like-particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 2007;369(9580):2161-70.
  - 50 Glastetter E, Kaufmann AM. Humorale und zelluläre Immunantwort im Rahmen der HPV-Impfung. *Hautarzt* 2007;58(6):493-500.

- 
- 51 Banatvala J, van Damme P, Oehen S. Lifelong protection against hepatitis B: the role of vaccine immunogenicity in immune memory. *Vaccine* 2001;19(7-8):877-85.
  - 52 Frentsch M, Arbach O, Kirchhoff D, et al. Direct access to CD4<sup>+</sup> T cells specific for defined antigens according to CD154 expression. *Nat med* 2005;11(10):1118-24.
  - 53 Ferenczy A, Coutlée F, Franco E, Hankins C. Human papillomavirus and HIV co-infection and the risk of neoplasias of the lower genital tract: a review of recent developments. *CMAJ* 2003;169(5):431-434.
  - 54 Pinto LA, Edwards J, Castle PE, et al. Cellular immune responses to human papillomavirus (HPV)-16 L1 in healthy volunteers immunized with recombinant HPV-16 L1 virus-like particles. *J Infect Dis* 2003;188(2):327-38.
  - 55 Pinto LA, Viscidi R, Harro CD, et al. Cellular immune responses to HPV-18, -31, and -53 in healthy volunteers immunized with recombinant HPV-16 L1 virus-like particles. *Virology* 2006;353(2):451-62.
  - 56 Olsson SE, Villa LL, Costa RLR, et al. Induction of immune memory following administration of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus (HPV) types 6/11/16/18 L1 virus-like particle (VLP) vaccine. *Vaccine* 2007;25(26):4931-9.
  - 57 Poethko-Müller C, Kuhnert R, Schlaud M. Durchimpfung und Determinanten des Impfstatus in Deutschland. Ergebnisse des Kinder- und Jugendgesundheits-surveys (KiGGS). *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung – Gesundheitsschutz* 2007;50:851–862.
  - 58 Die Abteilung für Infektionsepidemiologie des Robert-Koch-Instituts. Influenza-Schutzimpfung: Impfstatus der erwachsenen Bevölkerung Deutschlands. *Epidemiologisches Bulletin* 2004;14:113-117.
  - 59 Yellin MJ, Sippel K, Inghirami G, et al. CD40 molecules induce down-modulation and endocytosis of T cell surface T cell-B cell activating molecule/CD40-L. Potential role in regulating helper effector function. *J Immunol* 1994;152(2):598-608.
  - 60 Fujiwara T, Oda K, Yokota S, Takatsuki A, Ikehara Y. Brefeldin A causes disassembly of the golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1988;263(43):18545-52.
  - 61 Mollenhauer HH, Morré DJ, Rowe LD. Alteration of intracellular traffic by monensin; mechanism, specificity and relationship to toxicity. *Biochim Biophys Acta* 1990;1031(2):225-46.
  - 62 Chattopadhyay PK, Yu J, Roederer M. Live-cell assay to detect antigen-specific CD4<sup>+</sup> T-cell responses by CD154 expression. *Nat Protoc* 2006;1(1):1-6.
  - 63 Waterboer T, Sehr P, Michael KM, et al. Multiplex human papillomavirus serology based on in situ-purified glutathione S-transferase fusion proteins. *Clin Chem* 2005;51(10):1845-53.

- 
- 64 Sopori ML, Kozak W. Immunomodulatory effects of cigarette smoke. *J Neuroimmunol* 1998;83(1-2):148-56.
- 65 Berndt C. Ungeklärte Todesfälle. Nach der Impfung verstorben. *Süddeutsche Zeitung* vom 30.01.2008;64(25):18.
- 66 De Rosa SC, Lu FX, Yu J, et al. Vaccination in humans generates broad T cell cytokine responses. *J Immunol* 2004;173(9):5372-80.
- 67 Litjens NHR, Huisman M, Baan CC, van Druningen CJ, Betjes MGH. Hepatitis B vaccine-specific CD4<sup>+</sup> T cells can be detected and characterised at the single cell level: Limited usefulness of dendritic cells as signal enhancers. *J Immunol Methods* 2008;330(1-2):1-11.
- 68 Litjens NHR, Huisman M, Hijdra D, Lambrecht BMN, Stittelaar KJ, Betjes MGH. IL-2 producing memory CD4<sup>+</sup> T lymphocytes are closely associated with the generation of IgG-secreting plasma cells. *J Immunol* 2008;181(5):3665-73.
- 69 Wang RX, Boland GJ, van Hattum J, de Gast GC. Long term persistence of T cell memory to HBsAg after hepatitis B vaccination. *World J Gastroenterol* 2004;10(2):260-3.
- 70 Dartmann K, Schwarz E, Gissmann L, zur Hausen H. The nucleotide sequence and genome organization of human papilloma virus type 11. *Virology* 1986;151(1):124-30.
- 71 Christensen ND, Kirnbauer R, Schiller JT, et al. Human papillomavirus types 6 and 11 have antigenically distinct strongly immunogenic conformationally dependent neutralizing epitopes. *Virology* 1994;205(1):329-35.
- 72 Schwarz TF. AS04-adjuvanted human papillomavirus-16/18 vaccination: recent advances in cervical cancer prevention. *Expert Rev Vaccines* 2008;7(10):1465-73.
- 73 Wheeler CM, Bautista OM, Tomassini JE, Nelson M, Sattler CA, Barr E. Safety and immunogenicity of co-administered quadrivalent human papillomavirus (HPV)-6/11/16/18 L1 virus-like particle (VLP) and hepatitis B (HBV) vaccines. *Vaccine* 2008;26(5):686-96.
- 74 Berufsverband der Frauenärzte e. V. und sanofi pasteur MSD, Hrsg. Wir reden über alles und haben uns entschieden: Impfung gegen Krebs! Infoblatt für die deutschen Frauenarztpraxen. ohne Ort: ohne Verlag, ohne Datum.

## 7 Abkürzungen

Ag	Antigen
AK	Antikörper
ANOVA	<i>engl.</i> analysis of variance
APC	<i>engl.</i> antigen-presenting cell
APC	Allophycocyanin
Aqua dest.	<i>lat.</i> aqua destillata
ATP	<i>engl.</i> according to protocol
BCR	<i>engl.</i> B cell receptor
BD	Becton Dickinson
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>engl.</i> cluster of differentiation
CIN	Cervikale intraepitheliale Neoplasie
CTL	<i>engl.</i> cytotoxic T lymphocyte
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>engl.</i> deoxyribonucleic acid
E1/2/6/7	<i>engl.</i> early protein 1/2/6/7
EDTA	<i>engl.</i> ethylenediaminetetraacetic acid
EMBnet	<i>engl.</i> European Molecular Biology Network
EP	Einzelpeptid
E-Proteine	<i>engl.</i> early proteins
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EU	Europäische Union
FACS	<i>engl.</i> fluorescence-activated cell sorting
FCS	<i>engl.</i> fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>engl.</i> forward scatter
HBsAg	<i>engl.</i> hepatitis B surface antigen
HBV	Hepatitis B-Virus
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPV	Humanes Papillomvirus
IL-2, -4, -5, -10	Interleukin-2, -4, -5, -10
IL-2-R	Interleukin-2-Rezeptor
IMP	Influenza Matrix Protein
INF- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IQR	Interquartilsabstand
ITT	<i>engl.</i> intention to treat
L1/2	<i>engl.</i> late protein 1/2
MFI	<i>engl.</i> median fluorescence intensity

MHC I/II	<i>engl.</i> major histocompatibility complex I/II
n. s.	Nicht signifikant
NCBI	<i>engl.</i> National Center for Biotechnology Information
NCR	<i>engl.</i> noncoding region
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
p53	Tumorsuppressorgen mit Molekulargewicht von 53 kD
Pap-Abstrich	Zytologischer Zervix-Abstrich mit Test nach Papanicolaou
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PBS	<i>engl.</i> phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PP	Prozentpunkte
PV	Papillomvirus
R	Region (FACS)
Rb	Tumorsuppressorgen, welches primär in Retinoblastomen nachgewiesen wurde
RKI	Robert-Koch-Institut
SD	<i>engl.</i> standard deviation
SEB	<i>engl.</i> staphylococcal enterotoxin B
SSC	<i>engl.</i> side scatter
STD	<i>engl.</i> sexually transmitted diseases
STIKO	Ständige Impfkommission
TCR	<i>engl.</i> T cell receptor
T <sub>H</sub> 0/1/2	T-Helfer-Zelle vom Typ 0/1/2
TNF $\alpha/\beta$	Tumornekrosefaktor $\alpha/\beta$
TT	Tetanustoxoid
TZ	T-Zelle
UAW	Unerwünschte Arzneimittelwirkung
UL	<i>engl.</i> upper left
UniProt	<i>engl.</i> Universal Protein Resource
UR	<i>engl.</i> upper right
VAIN	Vaginale intraepitheliale Neoplasie
VIN	Vulväre intraepitheliale Neoplasie
VLP	<i>engl.</i> virus-like particle
w/v	<i>engl.</i> weight/volume

## **8 Lebenslauf**

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

## 9 Erklärung

„Ich, Anne Katrin Ramseger, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Messung zellulärer Immunantworten im Rahmen der prophylaktischen Impfung gegen Humane Papillomviren selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum 27.05.2010

Unterschrift Katrin Ramseger

## Danksagung

Ich danke in erster Linie Herrn Privatdozent Dr. Andreas Kaufmann. Er gab mir die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren und unterstützte meine gesamte Arbeit vom ersten bis zum letzten Tag durch seine kompetente, stets freundliche und unkomplizierte Betreuung. Ich habe von ihm zu jeder offenen Frage immer eine schnelle und hilfreiche Antwort erhalten.

Ein ganz herzliches Dankeschön verdient Frau Martina Seipel. Durch sie erhielt ich eine perfekte Einarbeitung in alle benötigten technischen Methoden. Bei jedem im Laboralltag auftretenden Problem stand sie mir hilfreich zur Seite. Ohne sie wäre mein Start in die wissenschaftliche Forschung um ein Vielfaches schwieriger gewesen.

Frau Dr. Esther Glastetter danke ich für die sehr gute ergebnisreiche sowie freundschaftliche Zusammenarbeit während unserer gesamten gemeinsamen Zeit.

Ich danke Frau Ursula Kastner für die Aufarbeitung von zahlreichen Blutproben und für die stets unterstützenden Worte.

Herrn Professor Dr. Peter Martus danke ich für die hilfreiche und unkomplizierte Unterstützung bei meiner statistischen Auswertung, Herrn Dr. Tim Waterboer und Herrn Dr. Michael Pawlita vom DKFZ Heidelberg für die verlässliche und schnelle Durchführung der serologischen Messungen.

Allen meinen Probandinnen möchte ich für die zahlreichen Blutspenden danken.

Ich danke Herrn David Glantz dafür, dass ich ihn stets mit einem hilfreichen Rat und aufmunternden Worten an meiner Seite wusste.

Abschließend möchte ich noch meinen Eltern Frau Ursula und Herrn Professor Dr. Jörg Ramseger danken, die mir meine medizinische und wissenschaftliche Ausbildung ermöglichten, sowie meiner Großmutter Frau Hertha Flick für den stets optimistischen Glauben in meine Fähigkeiten.