

Aus der Klinik für Gynäkologie und gynäkologische Onkologie der
Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Direkter longitudinaler Vergleich von T-Helfer-Zell Antworten auf
prophylaktische HPV-Impfstoffe über einen Zeitraum von 12 Monaten

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

Vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sina Kristin Pacher

aus Bad Pyrmont

Gutachter/in: 1. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. A. Kaufmann
2. Priv.-Doz. Dr. med. G. Cichon
3. Priv.-Doz. Dr. I. Zehbe

Datum der Promotion: 08.04.2011

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 EINLEITUNG	1
1.1 <i>HUMANES PAPILLOMVIRUS</i>	1
1.1.1 Virologie	1
1.1.2 HPV assoziierte Erkrankungen	2
1.1.2.1 <i>Durch High-Risk HPV Typen verursachte Erkrankungen</i>	2
1.1.2.2 <i>Durch Low-Risk HPV-Typen verursachte Erkrankungen</i>	4
1.1.3 Epidemiologie	5
1.1.4 Infektionsmechanismus	6
1.2 <i>IMMUNABWEHR</i>	8
1.2.1 Grundlagen	8
1.2.2 Erworbenes Immunsystem	8
1.2.2.1 <i>T-Lymphozyten</i>	9
1.2.2.2 <i>B-Lymphozyten</i>	11
1.2.3 Umgehung des Immunsystems durch HPV	12
1.3 <i>PROPHYLAKTISCHE IMPFSTOFFE</i>	13
1.3.1 Zusammensetzungen	13
1.3.2 Vergleich der Adjuvanzen	14
1.3.3 Studienlage zur Immunogenität und Effektivität	15
1.3.3.1 <i>Klinische Effektivität</i>	16
1.3.3.2 <i>Immunogenität</i>	18
1.3.3.3 <i>Kreuzprotektion und -immunogenität gegen verwandte HPV-Typen</i>	19
1.4 <i>FRAGESTELLUNGEN</i>	20
2 METHODEN	21
2.1 <i>STUDIENDESIGN</i>	21
2.2 <i>EX-VIVO-T-ZELL-ASSAY</i>	23
2.2.1 Materialgewinnung	24
2.2.2 Antigenstimulation und Zellkultur	24
2.2.3 Lyse und Fixierung	25
2.2.4 Färbung	26
2.2.5 Durchflusszytometrische Messung	27
2.2.6 Auswertung der Messdaten	28
2.3 <i>FRAGEBOGEN</i>	29
2.4 <i>STATISTISCHE AUSWERTUNG</i>	30

3	ERGEBNISSE	32
3.1	<i>CHARAKTERISIERUNG DES STUDIENKOLLEKTIVS.....</i>	32
3.1.1	Altersstruktur	32
3.1.2	Immunologische Beeinträchtigungen	32
3.1.3	Sexualleben.....	32
3.1.4	Gynäkologische Anamnese	32
3.1.5	Zeitpunkt der Blutentnahmen	33
3.2	<i>ERGEBNISSE DES EX-VIVO-T-ZELL-ASSAYS.....</i>	35
3.2.1	Definition der Grenzwerte /Ausschluss von Probandinnen.....	35
3.2.2	Auswertung der T-Zell-Frequenzen für Gardasil.....	36
3.2.2.1	Übersicht	36
3.2.2.2	Interleukin-2.....	37
3.2.2.3	Interferon- γ	40
3.2.2.4	Interleukin-4.....	42
3.2.3	Auswertung der T-Zell-Frequenzen für Cervarix.....	43
3.2.3.1	Übersicht	43
3.2.3.2	Interleukin-2.....	44
3.2.3.3	Interferon- γ	47
3.2.3.4	Interleukin-4.....	49
3.2.4	Vergleich der T-Zell-Frequenzen (Gardasil vs. Cervarix).....	50
3.2.4.1	Negativ- und Positivkontrolle	50
3.2.4.2	Interleukin-2.....	52
3.2.4.3	Interferon- γ	55
3.2.4.4	Interleukin-4.....	58
3.2.5	Individuelle T-Zell-Antworten im Impfverlauf	59
3.2.6	Rate an Probandinnen mit nicht-nachweisbaren HPV-spezifischen T-Zellen nach Abschluss des Impfzyklus.....	62
3.2.7	Sonderbetrachtungen bei Probandinnen mit Hinweisen auf eine mögliche frühere HPV-Exposition	63
4	DISKUSSION	67
4.1	<i>ALLGEMEINE PUNKTE</i>	67
4.2	<i>INDUKTION VON T-ZELLEN GEGEN HIGH-RISK HPV-TYPEN.....</i>	70
4.3	<i>INDUKTION VON T-ZELLEN GEGEN LOW-RISK HPV-TYPEN.....</i>	73
4.4	<i>INDUKTION VON T-ZELLEN GEGEN VERWANDTE HIGH-RISK HPV-TYPEN.....</i>	77
4.5	<i>SPEZIFISCHER NACHWEIS VON IL-4+ TH₂ -ZELLEN</i>	79
4.6	<i>LIMITATIONEN DER METHODIK.....</i>	80

5	ZUSAMMENFASSUNG	83
6	LITERATURVERZEICHNIS	85
7	ABKÜRZUNGEN	93
8	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	96
9	LEBENS LAUF	97
10	ERKLÄRUNG	98
11	DANKSAGUNG	100

1 Einleitung

1.1 *Humanes Papillomvirus*

1.1.1 Virologie

Beim humanen Papillomvirus (HPV) handelt es sich um ein hüllloses Virus aus der Familie der Papillomaviridae.

Das Virus besitzt ein 55 nm messendes, ikosaedrisches Kapsid, das sich aus 72 Kapsomeren zusammensetzt, die wiederum von zwei Strukturproteinen, L1 und L2, gebildet werden. L1 macht dabei bei Weitem den Hauptbestandteil des Kapsids aus. Im Inneren des Kapsids liegt ein ca 8 kb messendes, kovalent geschlossenes, zirkuläres ds-DNA-Genom, das zwei kodierende Abschnitte und eine lange Kontrollregion (long control region = LCR) enthält. Auf dem ersten Abschnitt liegen die offenen Leserahmen (open reading frames = ORF's) für die früh im Vermehrungszyklus gebildeten regulatorischen Proteine E1-E8 (E=early), die mit dem Wirtsgenom interagieren, um die Produktion von neuer viraler DNA sicher zu stellen. Im zweiten Abschnitt liegen die ORF's für die Kapsid-bildenden Strukturproteine L1 und L2 (L=late), die nur nach erfolgter viraler Replikation aktiviert werden [1]. Die Kontrollregion beinhaltet für die Replikation notwendige regulatorische Motive, Promotorregionen und Bindungsstellen für Regulatorproteine der Transkription [2].

Zur Zeit sind über 130 verschiedene Genotypen bekannt, die anhand des am besten konservierten L1 ORF's weiter in Genera, Spezies, Typen und Subtypen unterteilt werden können [3, 4].

HPV ist streng humanpathogen und infiziert ausschließlich Keratinozyten. Es können demnach kutane von mukosalen HPV-Typen unterschieden werden. In der vorliegenden Arbeit liegt der Schwerpunkt auf den mukosalen HPV Typen, weshalb die kutanen Typen an dieser Stelle nur erwähnt bleiben sollen. Verschiedene HPV-Typen können weiterhin nach ihrem Potential, die jeweilige Wirtszelle maligne entarten zu lassen, in sog. High-Risk-Typen (hohes Entartungsrisiko) und Low-Risk-Typen (geringes Entartungsrisiko) unterschieden werden. [5, 6] (s. Kap. 1.1.2).

Bis heute sind elf mukosale Low-Risk Typen (HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81) und 13 mukosale High-Risk-Typen (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66) charakterisiert. Für fünf weitere Typen (HPV 26, 53, 68, 73 und 82) ist eine Zugehörigkeit in die Gruppe der High-Risk Typen wahrscheinlich [5, 7].

1.1.2 HPV-assoziierte Erkrankungen

Die meisten HPV-Infektionen verlaufen subklinisch (s. Kap. 1.1.3) und können nur durch HPV-DNA-Nachweis diagnostiziert werden [8].

1.1.2.1 Durch High-Risk HPV Typen verursachte Erkrankungen

Eine persistierende Infektion mit einem oder mehreren High-Risk HPV-Typen kann über verschiedene Krebsvorstufen (Dysplasien) zu malignen Tumoren des Genitaltraktes, wie z.B. Zervix-, Vulva-, Vaginal-, Penis-, und Analkarzinomen führen. Außerdem sind mukosale High-Risk Typen Ursache eines Teils der Oropharynxkarzinome (Zungen-, Larynx-, Tonsillenkarzinom), vor allem bei Patienten, die keine klassischen Risikofaktoren wie Alkohol- oder Nikotinabusus aufweisen [9]. Es wird geschätzt, dass insgesamt 5,2% aller Neoplasien weltweit mit HPV assoziiert sind [10].

Aufgrund seiner Häufigkeit ist das Zervixkarzinom besonders hervorzuheben:

Beim Zervixkarzinom (ZxCa) handelt es sich um eine maligne Entartung der Zellen der Zervix uteri. Es werden zwei Hauptarten des ZxCa, mit unterschiedlichem histologischen Ursprung, unterschieden: Beim Plattenepithelkarzinom entarten Plattenepithelzellen der Zervix uteri (ca. 80% der invasiven ZxCas), beim Adenokarzinom liegt der Ursprung der Entartung in den Drüsenzellen oder dem Zylinderepithel des Endozervikalkanals (ca. 11% der invasiven ZxCas) [11], seltener sind neuroendokrine und klarzellige Karzinome. Das Plattenepithelkarzinom manifestiert sich meist in der Transformationszone der Portio vaginalis, das Adenokarzinom findet sich eher im Zervixkanal [12]. Weltweit erkranken jährlich etwa 500.000 Frauen an einem ZxCa und 290.000 sterben daran [10], wobei die meisten Fälle in der sog. Dritten Welt auftreten (ca. 80%) und dort regionsabhängig z.T. die häufigste Krebsart bei Frauen darstellen [13, 14].

In Deutschland sinkt die Anzahl der Fälle in den letzten Jahren kontinuierlich (s. Abb.1), trotzdem gab es 2006 noch 5.470 Neuerkrankungen und 1.492 Todesfälle.

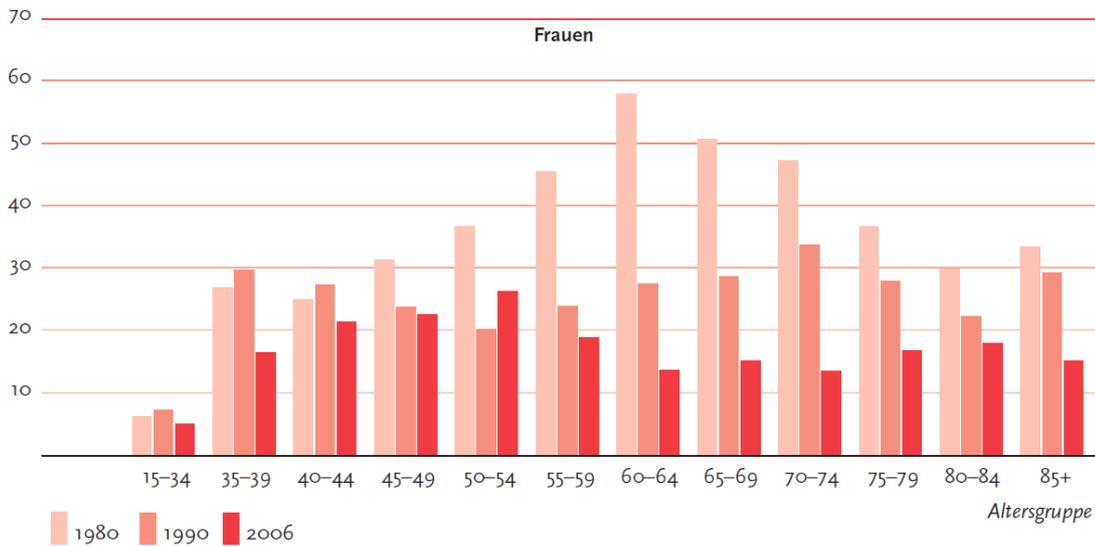


Abb. 1: bösartige Erkrankungen der Ektozervix: Altersspezifische Erkrankungsrate in Deutschland für 1980, 1990 und 2006 (Abb. aus [11])

Damit steht das ZxCa zurzeit in Deutschland an dreizehnter Stelle der Krebstodesfälle bei Frauen (s. Abb. 2). Die höchsten Erkrankungsrate liegen zwischen dem 40. und 59. Lebensjahr, wobei das mittlere Erkrankungsalter am in situ Karzinom 36 Jahre, am invasiven Karzinom 52 Jahre beträgt [11].

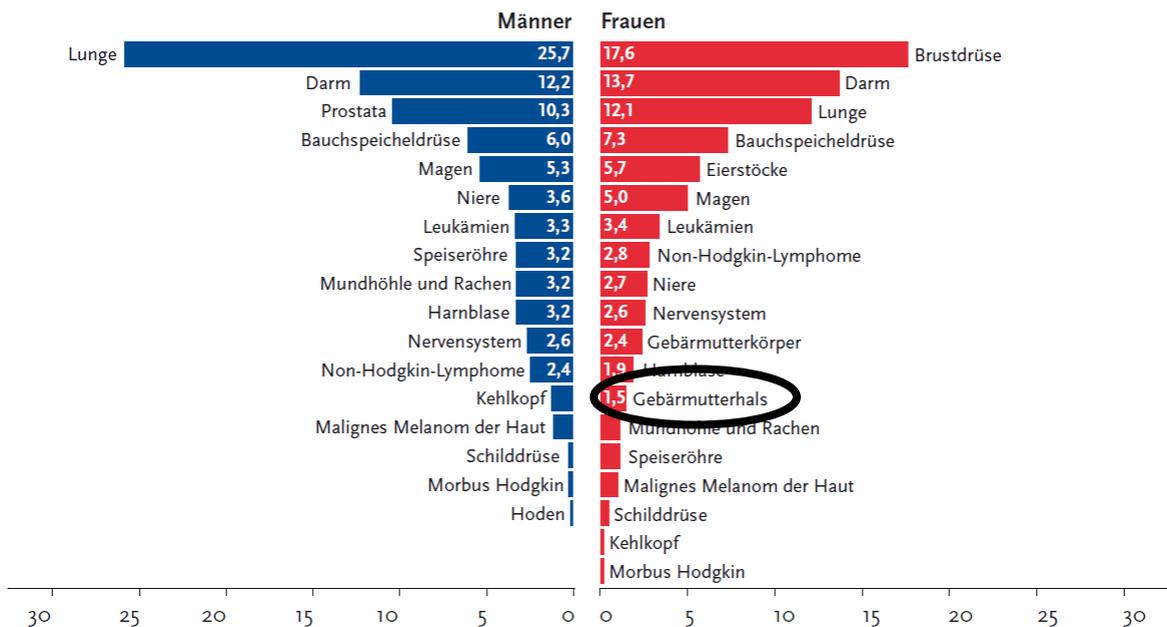


Abb. 2: Prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2006 (Abb. aus [11])

Hauptursache für die Entstehung des Zervixkarzinoms ist eine persistierende Infektion mit High-Risk HPV-Typen (Typenprävalenz s. Kap. 1.1.3) [15]. Da HPV überwiegend sexuell übertragen wird, gilt die Anzahl der Sexualpartner als Hauptrisikofaktor für HPV Infektionen. Daneben gibt es noch weitere Faktoren, z.B. das Alter bei Kohabitarche, Multiparität, sozioökonomischer Status (seltenerer Teilnahme am Krebsfrüherkennungs-Screening) [16, 17], Ernährung [18, 19] und Immunsuppression [20-22]. Eventuell spielen auch Faktoren wie Rauchen [23, 24], orale Kontrazeptiva [25, 26] und die genetische Ausstattung mit HLA-Allelen eine Rolle [27, 28].

Therapeutisch kommen je nach Tumorstadium eine Konisation, (erweiterte) Hysterektomie, Chemotherapie und Radiatio zum Einsatz. Zurzeit beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate von an ZxCa erkrankten Frauen in Deutschland ca. 63 – 71% [11].

1.1.2.2 Durch Low-Risk HPV-Typen verursachte Erkrankungen

Low-Risk HPV-Typen sind in erster Linie verantwortlich für Condylomata acuminata (Feigwarzen) an Vulva, Penis und Anus, wobei HPV 6 und/oder 11 in 94% aller HPV-positiven Condylomata acuminata zu finden sind und somit als Hauptursache dieser Erkrankung gelten [29, 30]. Etwa 1% aller sexuell aktiven Frauen und Männer zwischen dem 15. und 45. Lebensjahr leiden an Condylomata acuminata, der Altersgipfel liegt zwischen dem 20. und 24. Lebensjahr [31]. In den meisten Fällen kommt es zur Spontanremission, einigen Patienten bleibt jedoch eine langwierige Behandlung mit topischen Medikamenten, sowie destruktiven Verfahren (Kryotherapie, Elektrochirurgie, Exzision) nicht erspart. Die Rezidivrate ist mit 20-70% innerhalb von sechs Monaten als hoch anzusehen [31]. In sehr seltenen Fällen kann es auf dem Boden von Condylomata acuminata zur Entstehung des infiltrativ und destruktiv wachsenden Buschke-Löwenstein-Tumors kommen, der häufig in ein malignes Plattenepithelkarzinom übergeht [5, 32]. Meist ist daher eine radikale chirurgische Resektion dieses Tumors erforderlich [32].

Low-Risk Typen verursachen neben Condylomata acuminata auch niedriggradige intra-epitheliale Neoplasien im Bereich von Zervix (CIN), Vulva (VIN), Vagina (VAIN), Anus (AIN) und Penis (PIN), die nur ein geringes Entartungsrisiko haben,

jedoch nicht zu unterschätzende psychologische Probleme, sowie große gesundheitsökonomische Folgen nach sich ziehen.

Desweiteren sind HPV 6 und 11 die Hauptauslöser der Larynxpapillomatose. Es existieren eine juvenile und eine adulte Form, bei denen das Virus entweder peripartal von Mutter zu Kind oder durch oralen Sexualverkehr zwischen Geschlechtspartnern übertragen wird. Im Extremfall können sich bildende Papillome die Luftwege verlegen und dadurch für den Patienten lebensbedrohlich werden. Derzeit existiert keine medikamentöse Therapie, die chirurgische Abtragung ist das Mittel der Wahl [33]. In einigen Fällen wurde eine Progredienz bis hin zum Plattenepithelkarzinom beobachtet, insbesondere bei Infektionen mit HPV 11 [5, 33].

1.1.3 Epidemiologie

Weltweit gehören HPV-Infektionen zu den häufigsten sexuell übertragenen Infektionen. Die Prävalenz hängt sehr vom Alter der jeweiligen Studienpopulation ab und variiert zwischen 2% und 44% [34]. Die Infektionsraten steigen nach dem ersten Geschlechtsverkehr stark an und sind im Kollektiv der ≤ 25 -jährigen Frauen am höchsten. Dies wird mit hoher sexueller Aktivität, häufigen Partnerwechseln sowie einer noch nicht komplett abgeschlossenen Transformation der Zervix in der Adoleszenz, die mit einer erhöhten Vulnerabilität einhergeht, begründet. Danach sinken die Infektionsraten leicht, um im Anschluss einen zweiten, wenn auch nicht so starken, Gipfel bei den >50 -jährigen Frauen zu erreichen (s. Abb. 3). Möglicherweise ist dieser durch Reaktivierung einer latenten Infektion oder Partnerwechseln im höheren Lebensalter zu erklären. Insgesamt wird geschätzt, dass über 75% aller Frauen im Laufe ihres Lebens eine Infektion mit mindestens einem HPV-Typ erleiden [35].

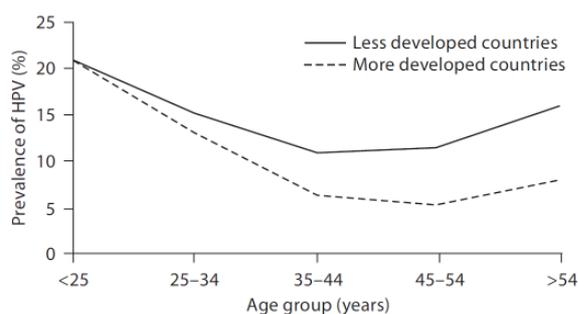


Abb. 3: Altersspezifische Prävalenz von HPV bei Frauen in unterschiedlich entwickelten Ländern (Abb. aus [36]).

HPV-Infektionen der Zervix uteri verlaufen in 80% der Fälle transient und werden unabhängig vom zugrunde liegenden HPV-Typ im Schnitt innerhalb von 4 bis 20 Monaten vom Immunsystem eliminiert [37-40]. In 20% der Fälle persistiert die Infektion und verursacht zervikale intraepitheliale Neoplasien (cervical intraepithelial lesions = CIN), die spontan oder durch entsprechende Therapie ausheilen. Etwa 1% aller zervikalen HPV-Infektionen führen letztendlich zum Karzinom [41].

In bis zu 99,7% der ZxCas lässt sich HPV-DNA nachweisen [42], wobei HPV 16 (52-58%) und 18 (13-22%) auf allen Kontinenten mit zusammengenommen etwa 70% den größten Anteil ausmachen [6, 43, 44]. Gefolgt werden sie von den High-Risk-Typen 33, 45, 31, 58, 52 und 35.

Erwähnenswert ist, dass HPV 18 in Adenokarzinomen eine weit höhere Prävalenz hat als in Plattenepithelkarzinomen (37% vs. 13%) und dadurch der am häufigsten nachweisbare HPV Typ in Adenokarzinomen der Zervix ist [44].

1.1.4 Infektionsmechanismus

HPV wird überwiegend sexuell übertragen. Durch Mikroverletzungen des Epithelverbandes dringt das Virus in tiefe Epithelschichten ein und infiziert die Zellen der Basalzellschicht, wo das komplette Virus in die Zelle aufgenommen wird und das ringförmige Virusgenom anschließend in den Zellkern gelangt. Um neue Viren zu bilden, macht sich das Virus von nun an den Synthesepapparat der Wirtszelle zunutze.

Der Lebenszyklus des Virus in nicht-malignen Läsionen ist streng reguliert und eng an die Differenzierung des Epithels gekoppelt: Zu Beginn werden die frühen Proteine E1 und E2 gebildet, die als Replikationsfaktoren fungieren und bewirken, dass das HPV-Genom in der Wirtszelle auf initial einige hundert Kopien vermehrt wird. Die infizierten Wirtszellen wandern dabei im Epithelverband nach apikal und geben das Virus an die in der Basalzellschicht verbleibenden Tochterzellen weiter. Es entwickelt sich auf diese Weise ein Virusreservoir, durch das die Infektion am Leben gehalten wird. Um die Anzahl der Virusgenome noch zu steigern, verlängert HPV im Laufe der Zelldifferenzierung die Lebensspanne der Wirtszelle durch gezieltes Ausschalten von Tumorsuppressoren, insbesondere von p53 und pRB. Es kommen dabei die (potentiell) onkogenen Proteine E6 und E7 zum Einsatz.

E7 bildet einen Komplex mit pRB. Dadurch wird der von pRB gebundene Transkriptionsfaktor E2F freigesetzt, der seinerseits eine Reihe von Genen für Proteine der DNA-Synthese aktiviert, was wiederum zu einer vermehrten Transkription des Virusgenoms und einer starken Proliferation der Wirtszelle führt. Diese synthetisiert daraufhin als Schutz vor unkontrolliertem Wachstum vermehrt p53, dessen Aufgabe es ist, einen Zellzyklus-Arrest bzw. die Apoptose der Zelle herbeizuführen. Dieser Tumorsupressor wird jedoch durch E6 ausgeschaltet, indem er ubiquitiniert und damit für den intrazellulären Abbau markiert wird, bevor er seinen schützenden Effekt auf die Zelle entfalten kann [45].

Ist die Wirtszelle vollständig ausdifferenziert und in die höchsten Epithellagen gelangt, beginnt die späte Transkriptionsphase, in der die Kapsidproteine L1 und L2 produziert werden [46]. Es folgt das Virus Assembly und die passive Abgabe der neu entstandenen Viren in den vaginalen Mucos durch die natürliche Abschilferung der infizierten Zellen. Das klinische Korrelat der beschriebenen Infektion sind Condylomata acuminata oder niedriggradige intraepitheliale Neoplasien, die bei Sexualkontakt zu einer hohen Übertragungsrate des Virus führen.

Der oben beschriebene Lebenszyklus von HPV kann in dieser Form sowohl von High-Risk-, als auch von Low-Risk-Typen durchlaufen werden. Der Unterschied zwischen beiden besteht darin, dass High-Risk-Typen ihr Genom mit zunehmender Dauer der Infektion in das der Wirtszelle integrieren können und dadurch ein kanzerogenes Potential entfalten. Allgemein wird eine persistierende Infektion mit High-Risk-Typen, zusammen mit der Unfähigkeit des Wirtes, den Virus zeitnah zu eliminieren, für diesen kritischsten Schritt in der Tumorgenese verantwortlich gemacht [47]. Der Lebenszyklus des Virus entwickelt sich durch die Integration des Genoms dahingehend, dass die Produktion der Kapsidproteine eingestellt und konstitutiv E6 und E7 exprimiert werden [46]. Das E7 der High-Risk HPV-Typen ist in der Lage, während der Mitose mit den Centrosomen zu interagieren und auf diese Weise chromosomale Abberationen zu verursachen. Eine in gesunden Zellen stattfindende Kontrolle der korrekten DNA-Verteilung unterbleibt in HPV-infizierten Zellen aufgrund des E6 induzierten intrazellulären Abbaus des Tumorsupressors p53. Die genannten Mechanismen führen zur Entstehung von Mutationen, die eine notwendige Voraussetzung für die

Tumorprogression, invasives Wachstum und Metastasierung zu sein scheinen [41]. Die Malignität von ZxCa-Zellen geht dabei direkt mit dem Expressionsniveau von E6 und E7 einher [48]. Klinisch kommt es im beschriebenen Fall zum Carcinoma in situ bzw. zum invasiven Zervixkarzinom. Da nur noch E6 und E7 exprimiert werden und eine Produktion vollständiger Viren unterbleibt, sind Frauen mit ZxCa im allgemeinen nicht mehr infektiös.

1.2 Immunabwehr

1.2.1 Grundlagen

Der menschliche Organismus hat eine Reihe von Abwehrmechanismen entwickelt, um eindringende fremde Organismen wie Bakterien oder Viren unschädlich zu machen und zu eliminieren.

Neben primären mechanischen und chemischen Barrieren (Epithelien der Haut, Lysozym in der Tränenflüssigkeit) verfügt er über ein angeborenes und ein erworbenes Immunsystem. Beide erfüllen spezifische Aufgaben und sind nur im Zusammenspiel optimal effektiv.

Das angeborene Immunsystem hat zelluläre (Makrophagen, neutrophile Granulozyten und natürliche Killerzellen) sowie lösliche Bestandteile (Komplementsystem, Interferone) und reagiert auf bestimmte unspezifische Oberflächenmuster, wie z.B. Lipopolysaccharid in der Bakterienwand. Es braucht deshalb nicht vorsensibilisiert werden, was wiederum eine sehr schnelle Reaktion auf eindringende Erreger ermöglicht. Dieser Vorteil wird damit erkauft, dass es nicht zu einem immunologischen Gedächtnis kommt und die entstehende Immunantwort oft nicht ausreicht um den eindringenden Keim auf Dauer zu eliminieren.

In einem solchen Fall wird zusätzlich das erworbene Immunsystem aktiviert. Dieses braucht aufgrund seiner Komplexität zwar länger um eine Antwort zu erzeugen, diese ist dann jedoch hochspezifisch und an die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses gekoppelt, das im Falle einer Re-Infektion eine sehr schnelle Abwehr des bereits bekannten Erregers ermöglicht.

1.2.2 Erworbenes Immunsystem

Die „Key-Player“ des erworbenen Immunsystems sind B- und T-Lymphozyten.

1.2.2.1 T-Lymphozyten

Es existieren zwei Populationen von naiven T-Lymphozyten, die sich u.a. dadurch unterscheiden, dass sie das Oberflächenmerkmal CD4 bzw. CD8 tragen (CD = Cluster of Differentiation). Beide exprimieren den T-Zell-Rezeptor (TCR), der darauf spezialisiert ist, lineare Epitope von etwa 7-10 Aminosäuren Länge zu erkennen. Da Proteine natürlicherweise in Tertiärstruktur bzw. Quartärstruktur vorliegen, ist eine Antigen-präsentierende Zelle (APC) oder eine Körperzelle nötig, die das Antigen für die T-Zelle prozessiert und ihr über das MHC I (Körperzellen für CD8+ T-Zellen) bzw. MHC II Protein (APCs für CD4+ T-Zellen) in der passenden linearen Form am TCR präsentiert (Signal 1) [49]. Die T-Zelle bindet mit dem TCR und CD4 bzw. CD8 an den jeweiligen MHC/Antigen (Ag)-Komplex [50]. Zusätzlich muss die Bindung durch Interaktion zwischen konstitutiv auf T-Zellen exprimiertem CD28 und auf der Oberfläche der APC befindlichem B7 kostimuliert werden (Signal 2) [51]. Als weiteres sind für die T-Zell-Aktivierung von der APC produzierte Zytokine nötig (Signal 3), die entsprechend dem an z.B. Toll-like-Rezeptoren (TLR) der APC gebundenen Antigen ausgeschüttet werden. Verläuft die Aktivierung erfolgreich, differenzieren sich CD4+ T-Zellen zu T-Helfer-Zellen (TH-Zellen) und CD8+ Zellen zu zytotoxische T-Zellen (CT-Zellen). Da der Schwerpunkt der Arbeit auf der Messung von TH-Zellen liegt, wird auf CT-Zellen im Folgenden nicht näher eingegangen.

TH-Zellen haben zentrale Aufgaben, sowohl in der humoralen als auch in der zellvermittelten Immunantwort. Infolge der Aktivierung exprimiert die TH-Zelle nach einigen Stunden CD 154 (entspricht CD 40L) auf ihrer Oberfläche, das das stärkste Costimulanz der B-Zell Aktivierung darstellt (s. Kap. 1.2.2.2) und allgemein als T-Zell Aktivierungsmarker gilt [52]. Zudem sezerniert die TH-Zelle eine Reihe von Zytokinen, die zum einen eine autokrine Wirkung haben (Interleukin-2), d.h. die T-Zelle selbst zur Differenzierung und Proliferation anregen, zum anderen weitere Zellen aktivieren und regulieren. Anhand dieses Zytokinmusters lassen sich verschiedene CD4+ TH-Zell Populationen unterscheiden, z.B TH₁ und TH₂-Zellen.

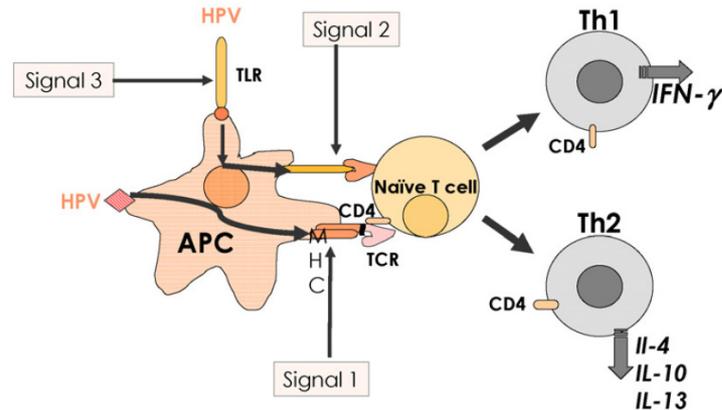


Abb. 4: Priming von naiven CD4⁺-T-Zellen und Initiierung einer CD4-Helfer-Zell Antwort (Abb. aus [50]).

Erklärung siehe Text. HPV = humanes Papillomvirus, TLR = Toll-like-Receptor, APC = antigen presenting cell, MHC = major histocompatibility complex, Th_{1/2} = T-helper-1/2-cell, IL = Interleukine, IFN- γ = Interferon- γ , CD = cluster of differentiation

TH₁-Zellen sezernieren u.a. Interferon- γ (IFN- γ), Interleukin-2 (IL-2) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), wodurch Makrophagen, CT-Zellen und natürliche Killerzellen optimale Aktivierungs- und Wachstumsbedingungen erhalten und intrazelluläre Erreger, z.B. Viren, bekämpfen können [50]. Desweiteren werden aktivierte B-Zellen durch TH₁-Zellen dazu angeregt, sich zu Plasmazellen auszudifferenzieren und opsonierende Antikörper (z.B. Klasse IgG1 und 3) zu sezernieren. Die infizierten Zellen werden durch diese Antikörper für das Komplementsystem markiert, welches die betroffenen Zellen anschließend lysiert.

TH₂-Zellen sezernieren u.a. IL-4 und IL-10 und führen ebenfalls zur Differenzierung von aktivierten B-Zellen zu Plasmazellen. Diese sezernieren in der Folge neutralisierende Antikörper, die eine Agglutination des entsprechenden Antigens bewirken, welches so inaktiviert und anschließend von anderen Immunzellen phagozytiert wird. Die TH₂-Antwort ist besonders bei der Abwehr extrazellulärer Erreger und Antigene, wie Bakterien und Toxinen, von Bedeutung (vgl. Abb. 4) [50].

Die beiden möglichen T-Zell-Antworten sind nicht völlig getrennt voneinander zu betrachten, es besteht vielmehr eine Balance zwischen beiden, die sich im Falle einer Infektion jeweils den biologischen Anforderungen anpasst (intra- vs. extrazellulärer Erreger). Es existiert demnach bei jeder Immunabwehr anteilig sowohl eine Th₁-, als auch Th₂-Antwort.

1.2.2.2 B-Lymphozyten

B-Zellen sind in der Lage zu Plasmazellen auszudifferenzieren und in dieser Form (neutralisierende und zytotoxische) Antikörper zu produzieren. Sie stellen somit den humoralen Teil der adaptiven Immunabwehr dar. Auf der B-Zell-Oberfläche befindet sich der B-Zell-Rezeptor (BCR), der Antigene in ihrer natürlichen Form (Tertiärstruktur, Quartärstruktur) erkennt. Nur wenige Antigene können B-Zellen jedoch unmittelbar so stark aktivieren, dass sich diese zu Plasmazellen ausdifferenzieren. Im Normalfall wird die B-Zelle durch Antigenkontakt lediglich geprimt und präsentiert das Antigen im Anschluss über MHC II einer TH₁ oder TH₂-Zelle, die mit ihrem TCR und CD4 an den MHCII-Ag-Komplex bindet. Zusätzlich festigen beide Zellen die so entstandene Bindung über Rezeptor-Ligand Interaktion (CD40 ↔ CD40L). Die B-Zelle erfährt nun von der aktivierten TH-Zelle in Form von Zytokinen (IL-2, IL-4 u.a., s. Kap. 1.2.2.1) Hilfe bei der Ausdifferenzierung zur Plasmazelle bzw. B-Gedächtniszelle (vgl. Abb. 5) [50].

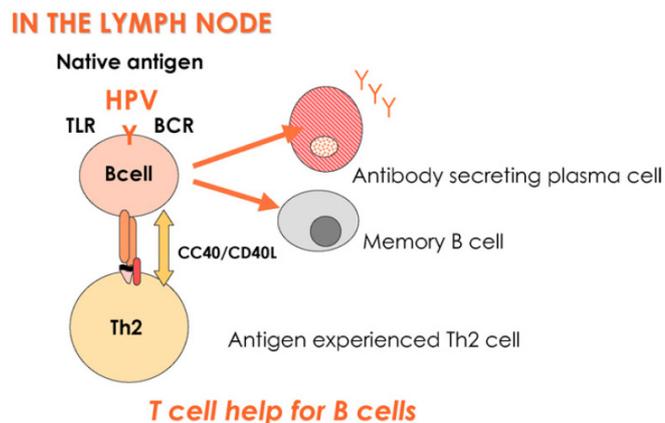


Abb. 5: TH-Zell-Unterstützung (in diesem Fall TH₂) für vorgeprimte B-Zellen im Lymphknoten (Abb. aus [50]).

Erklärung siehe Text. HPV = humanes Papillomvirus, TLR = Toll-like-Receptor, BCR = B-Cell-Receptor, Th₂ = T-helper-2-cell, CD = cluster of differentiation

In den meisten bisher durchgeführten HPV-Impfstudien lag der Untersuchungsfokus, neben der klinisch messbaren Effektivität, auf dem Nachweis und der Quantifizierung der humoralen Immunantwort in Form von Antigen-spezifischen neutralisierenden Antikörpern (s. Kap. 1.3.2). Die Beobachtung jedoch, dass z.B. Condylomata acuminata häufig bei HIV-infizierten, d.h. CD4⁺-TH-Zell defizienten, oder iatrogen immunsupprimierten Personen

auftreten, könnte ein Hinweis auf eine besondere Bedeutung des zellulären Immunsystems bei der Kontrolle von HPV-Infektionen sein [8].

1.2.3 Umgehung des Immunsystems durch HPV

Die Tatsache, dass es dem Immunsystem häufig erst nach längerer Zeit gelingt, eine HPV-Infektion unter Kontrolle zu bringen und eine durchgemachte HPV-Infektion nicht in allen Fällen vor Re-Infektionen schützt [53], deutet darauf hin, dass HPV Strategien entwickelt hat, um eine Immunantwort des menschlichen Körpers zu verzögern und diese in vielen Fällen ineffektiv gegen erneute Infektionen zu machen.

Zu diesen Strategien gehört, dass HPV ausschließlich Keratinozyten infiziert (s. Kap. 1.1.4.), während des gesamten Lebenszyklus auf das Epithel beschränkt bleibt und es dadurch nicht zu einer Virämie kommt. Auf diese Weise gibt das Virus weder dem angeborenen noch dem adaptiven Immunsystem die Chance, mit den entscheidenden Antigenen in Kontakt zu kommen: Das angeborene Immunsystem wird normalerweise durch proinflammatorische Zytokine, wie sie beispielsweise bei der Zelllyse entstehen, aktiviert. Da HPV zu keinem Zeitpunkt während des Replikationszyklus zur Zerstörung der Wirtszelle führt, werden auch keine Zytokine ausgeschüttet, die APCs anlocken würden. Als Folge der fehlenden Antigenpräsentation in den Lymphknoten und der fehlenden Virämie wird auch das adaptive Immunsystem kaum aktiviert, was zu einer insuffizienten humoralen wie auch zellvermittelten Immunantwort führt. Eine Antikörperproduktion gegen die Kapsidproteine wird zusätzlich dadurch eingeschränkt, dass diese erst sehr spät im Replikationszyklus gebildet werden, wobei sich die Wirtszelle bereits weit apikal im Epithelverband, mit nochmals geringerer Dichte an APCs, befindet. Die genannten Mechanismen führen zu einer lang andauernden Viruspersistenz im Epithel und damit einhergehend zur potentiellen Infektion anderer Individuen.

Eine intramuskulär verabreichte prophylaktische HPV-Impfung kann die beschriebenen immunevasiven Strategien von HPV umgehen und so zu einer schnelleren und effektiveren Immunantwort führen als eine natürliche Infektion (s. folgende Kapitel).

1.3 Prophylaktische Impfstoffe

Zur Eindämmung der HPV-Infektionen und der damit verbundenen Erkrankungen wurde in den letzten Jahrzehnten intensiv an der Entwicklung prophylaktischer und therapeutischer HPV-Impfstoffe gearbeitet. In der vorliegenden Arbeit kann auf die therapeutischen Impfstoffe nicht näher eingegangen werden, es gibt auf diesem Gebiet jedoch vielversprechende Forschungsergebnisse, die die Entwicklung solcher Impfstoffe mittelfristig möglich erscheinen lassen [50]. Zurzeit sind zwei prophylaktische HPV-Spaltimpfstoffe (Gardasil und Cervarix) auf dem Markt. Sie enthalten als immunogene Komponente hochaufgereinigte, aus dem HPV-Kapsidprotein L1 aufgebaute, sogenannte „virus-like particles“ (VLP), die dem leeren, genomlosen Viruskapsid entsprechen und dadurch nicht in der Lage sind, humane Zellen tatsächlich zu infizieren oder zu transformieren. Beide Impfstoffe werden intramuskulär appliziert, wodurch sie schnell von APCs aufgenommen, über das Blut in die entsprechenden drainierenden Lymphknoten gelangen und dort die Immunreaktion in Gang setzen können. Auf diesem Wege führt die Impfung gegen HPV zu einer quantitativ stärkeren Immunantwort als die natürliche Infektion (vgl. Kap. 1.3.3.2).

1.3.1 Zusammensetzungen

Gardasil wurde vom US-amerikanischen Pharmaunternehmen Merck entwickelt. Seit September 2006 ist es in Europa zugelassen und wird hierzulande durch Sanofi Pasteur MSD vertrieben. Es handelt sich um einen tetravalenten Impfstoff gegen HPV 6, 11, 16 und 18, der Aluminiumhydroxyphosphatsulfat als Adjuvanz enthält. Die enthaltenen VLPs werden in Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae* Canade 3C-5, Stamm 1895) mittels rekombinanter DNA-Technologie hergestellt. Um den vollen Impfschutz zu gewährleisten, ist die Verabreichung von drei Einzeldosen (Tag 0, Monat 2, Monat 6) erforderlich (vgl. Tab.1).

Tab. 1: Vergleich der prophylaktischen HPV-Impfstoffe [54, 55]

	Gardasil	Cervarix
Zulassung	Oktober 2006	Oktober 2007
Hersteller	Sanofi Pasteur/ Merck	GlaxoSmithKline
VLP Typen	6/11/16/18	16/18
Dosis des L1 Proteins	20/40/40/20 µg	20/20 µg
produziert in	Hefezellen [<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , CANADE 3C-5 (Stamm 1895)]	Insektenzellen, [Hi-5 Rix4446-Zellen aus <i>Trichoplusia ni</i>]
Adjuvanz	225 µg amorphes Aluminiumhydroxyphosphatsulfat	AS04 (500 µg Aluminium-hydroxid 50 µg 3-deacyliertes Monophosphoryllipid A)
Dosierung	0,5 ml pro Dosis i.m.	0,5 ml pro Dosis i.m.
Impfschema	Monat 0-2-6	Monat 0-1-6

VLP = engl. virus-like-particle, AS04 = engl. Adjuvant System 04, i.m. = intramuscular

Cervarix ist ein Produkt des britischen Pharmaunternehmens GlaxoSmithKline. Es ist ein bivalenter Impfstoff gegen HPV 16 und 18 und seit September 2007 in Europa zugelassen. Die enthaltenen L1 VLPs werden durch rekombinante DNA-Technologie unter Verwendung eines Baculovirus-Expressionssystems in Hi-5 Rix4446-Zellen aus *Trichoplusia ni* hergestellt. Es sind drei Einzeldosen zu verabreichen (Tag 0, Monat 1, Monat 6), um einen wirksamen Impfschutz aufzubauen. Cervarix ist mit dem AS04-System adjuvantiert, welches aus Aluminiumhydroxid und 3-O-desacyl-4'-monophosphoryl-lipid A (MPL) besteht. MPL ist ein neuartiges Adjuvanz, das starke immunstimulierende und modulierende Eigenschaften hat (s. Kap. 1.3.2).

1.3.2 Vergleich der Adjuvanzen

Gardasil enthält Aluminiumsalze, welche die am häufigsten verwendeten Impfstoff-Adjuvanzen beim Menschen darstellen. Der genaue Wirkmechanismus dieser Adjuvanzen ist noch ungeklärt. Die Injektion von Aluminiumsalzen führt jedoch bekanntermaßen zu einer lokalen Entzündungsreaktion, die immunkompetente Zellen anlockt und aus der Antikörper-produzierende Plasmazellen hervorgehen [56]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Aluminiumhydroxid die Caspase 1 aktiviert und in Kombination mit einem Stimulus über Toll-like-Rezeptoren (TLR) die Sekretion von IL-18 und IL-1 β durch dendritische Zellen induziert [57]. IL-1 β ist bekannt dafür, TH₂ Zellen zu aktivieren und damit die Immunantwort in Richtung

einer humoralen Antwort zu lenken [58]. IL-18 ist prinzipiell in der Lage, sowohl TH₂-Zellen als auch, in Verbindung mit IL-12, TH₁-Zellen zu unterstützen. Da IL-12 in einer Impfsituation nicht sezerniert wird, überwiegt die TH₂ Aktivierung des IL-18 und es wirkt damit kostimulatorisch mit IL-1 β [59].

Das in Cervarix enthaltene AS04 ist ein neuartiges Adjuvanz, welches eine Kombination aus Aluminiumsalz (Aluminiumhydroxid) und 3-O-desacyl-4'-monophosphoryl-lipid A (MPL), einem detoxifizierten Derivat des Lipopolysaccharids von Salmonella minnesota, Stamm R595, darstellt [60, 61].

Bisher ist es in zwei zugelassenen Impfstoffen enthalten: Cervarix (HPV 16 und 18) und Fendrix (Hepatitis B Virus), ein AS04 adjuvantierter Impfstoff gegen das Herpes Simplex II Virus befindet sich zurzeit in klinischer Erprobung [62].

MPL ist ein Agonist des TLR-4 [63-65] und stimuliert APCs dazu, proinflammatorische Zytokine, wie etwa TNF- α oder IL-6 zu sezernieren [66]. Diese Zytokine wiederum stimulieren die adaptive Immunreaktion indem sie zum einen die Reifung von APCs unterstützen und zum anderen die Aktivität von regulatorischen T-Zellen hemmen [67]. MPL fördert außerdem die IFN- γ -Sekretion seitens TH-Zellen und lenkt dadurch die Immunantwort in die Richtung einer TH₁-Antwort [61], die die in Kap. 1.2.2.1 beschriebenen Effekte, darunter auch einen Antikörper-Klassenswitch in Richtung opsonierender, d.h. zytotoxischer Antikörper, hat.

Eine Impfung mit AS04-adjuvantiertem Impfstoff führt zu 1,6 bis 8,5-fach höheren Antikörper-Titern als die Impfung mit einem Aluminiumsalz-adjuvanzierten Impfstoff. Zudem kommt es zu einer 2,2 – 5,2-fach stärkeren B-Gedächtniszell-Antwort, die als essentiell für eine lang andauernde Immunität gilt [68].

1.3.3 Studienlage zur Immunogenität und Effektivität

Den Weg zur Herstellung der HPV-Impfstoffe bereitete Nobelpreisträger Harald zur Hausen, der Anfang der 1980er Jahre erstmals HPV 16 und 18 aus ZxCa-Gewebe isolierte. Seitdem wurde intensiv daran gearbeitet, den natürlichen Verlauf einer HPV-Infektion zu verstehen, HPV-Nachweise für das Screening auf ZxCa zu nutzen und prophylaktische Impfstoffe zur Vermeidung einer Infektion zu entwickeln.

Nachdem erste Studien mit einem monovalenten Impfstoff gegen HPV 16 im Jahr 2002 vielversprechende Ergebnisse erbrachten (100% Effektivität gegen persistierende HPV 16 Infektionen, 99,7% Serokonversionsrate) [69], folgten groß angelegte Phase II und III Studien mit den Kandidatimpfstoffen Gardasil und Cervarix.

1.3.3.1 Klinische Effektivität

Das Ziel beider auf dem Markt befindlicher HPV-Impfstoffe ist es, die Entstehung des ZxCa zu verhindern.

Wie in Kap. 1.1.4. beschrieben, ist eine persistierende Infektion mit HPV die Voraussetzung für die Entwicklung des ZxCa. Im Verlauf von Jahren bis Jahrzehnten werden mehrere obligate Vorläuferläsionen (CIN 2/3, CIS (Carcinoma in situ)) durchlaufen, bis es schließlich zum invasiven Karzinom kommt. Da es unmöglich ist, ein Karzinom ohne vorangehende CIN-Läsion zu entwickeln und es ethisch nicht vertretbar wäre, der Bevölkerung ein potentiell wirksames Medikament über mehrere Jahrzehnte vorzuenthalten, wurden, statt des ZxCa, CIN und CIS in den Studien als Endpunkte definiert. Je nach Studie kommt die Untersuchung der Effektivität gegen persistierende HPV-Infektionen, als Ursache aller Vorläuferläsionen, hinzu.

Die Beurteilung der Effektivität eines Impfstoffes hängt entscheidend von der jeweils betrachteten Studienpopulation ab. Die Ein- und Ausschlusskriterien differieren leicht zwischen den einzelnen Studien, ebenso die Definition der analysierten Subgruppen. Eingeschlossen wurden in allen Zulassungsstudien nur gesunde, nicht-schwangere Frauen im Alter von 15-26 (Gardasil) bzw. 15-25 (Cervarix) Jahren, die bisher ≤ 4 (Gardasil) bzw. ≤ 6 (Cervarix) Sexualpartner hatten. Neben den Zulassungsstudien wurden bis dato weitere Phase III Studien durchgeführt, die Aussagen zum Immunobridging (s. Kap. 1.3.3.2), der Effektivität gegen VIN und VaIN-Läsionen und der Impfstoff-Effektivität bei älteren Frauen ermöglichen. Zudem sind mittlerweile auch Daten bezüglich der Langzeit-Effektivität erhältlich (s.u.).

Bei den Subanalysen sind zwei Gruppen von besonderer Relevanz: according-to-protocol (ATP) und intention-to-treat (ITT). Die ATP-Gruppe gibt hierbei den Anteil der Frauen wieder, bei denen die Impfung optimal verläuft (alle drei Impfdosen

erhalten, keine groben Protokollverletzungen), die ITT-Gruppe (mindestens eine Impfdosis erhalten) ist repräsentativer für die allgemeine Bevölkerung, bei der es erfahrungsgemäß häufiger zu Unregelmäßigkeiten im Impfzyklus kommt. In einigen Studien wird zudem eine HPV-naive Subgruppe betrachtet, die das Kollektiv der Frauen repräsentiert, die noch keinen sexuellen Kontakt hatten, d.h. die eigentliche Zielgruppe der Impfung darstellen.

Für Gardasil konnte in der Zusammenfassung von vier Phase II und III Studien [70-73] mit insgesamt 20.500 Probandinnen bereits nach 36 Monaten Nachbeobachtungszeit eine Effektivität von 99% gegen CIN2/3 und Adenokarzinoma in situ (AIS) in der ATP-Gruppe bzw. 44% in der ITT-Gruppe gezeigt werden [74]. Zudem ergab sich für die Gruppe der HPV-naiven Frauen, die mind. eine Impfdosis erhalten hatten, eine Effektivität von 98%. Weitere Studien belegen die hohe Wirksamkeit über einen Zeitraum von bis zu 60 Monaten [72, 75]. Bei Frauen im Alter von 25-45 Jahren konnte eine Effektivität von 91% (ATP) gegen persistierende HPV-Infektionen, CIN und externe genitale Läsionen gezeigt werden, was dafür spricht, dass auch ältere Frauen von einer Impfung profitieren [76]. Selbst bei Betrachtung einer Subpopulation von Frauen, die zum Zeitpunkt der Impfung mit 1-3 der im Impfstoff enthaltenen HPV-Typen infiziert waren, zeigte sich, dass ein wirksamer Schutz gegen die jeweils nicht vorhandenen HPV-Typen zustande kommt [77]. In Hinblick auf die Effektivität gegen vulväre und vaginale intraepitheliale Neoplasien (VIN 2/3, VaIN 2/3) konnte in einer zusammenfassenden Analyse von drei Studien mit insgesamt 18.000 Probandinnen [70, 73, 75] eine Effektivität von 100% (ATP) bzw. 49% (ITT) gezeigt werden [78]. Diese Daten führten bereits zu einer Indikationserweiterung von Gardasil.

Cervarix erreicht im Vergleich zu Gardasil mindestens ebenso gute Ergebnisse. Die bisher größte Studie mit 18.500 Probandinnen (PATRICIA) belegt über einen Studienzeitraum von durchschnittlich 39 Monaten eine Effektivität von 98% (ATP) bzw. 90% (total vaccinated cohort = TVC, entspricht ITT) gegen CIN2/3 Läsionen [79, 80]. In einer Langzeit-Follow-up Analyse wurde an einem Kollektiv von 700 Frauen nach 6,4 Jahren ein 100% iger Schutz vor persistierenden Infektionen (ATP) und CIN 2+ Läsionen (TVC) mit HPV 16/18 nachgewiesen [81].

Aufgrund der sehr überzeugenden Studienergebnisse bezüglich der klinischen Effektivität hat die ständige Impfkommission des Robert-Koch-Instituts (STIKO) eine Impfung gegen HPV 16/18 für Mädchen zwischen dem 12. und 17. Lebensjahr in Deutschland empfohlen. Die Impfung mit 3 Einzeldosen sollte dabei möglichst vor dem ersten Geschlechtsverkehr abgeschlossen sein [82].

1.3.3.2 Immunogenität

Es wird davon ausgegangen, dass der Schutz prophylaktischer HPV-Impfstoffe auf der Bildung körpereigener Antikörper gegen das HPV L1 Protein beruht, die dann nicht nur im Blut zirkulieren, sondern auch ins Vaginalsekret abgegeben werden, wo sie ankommende Viren direkt neutralisieren können.

Zum jetzigen Zeitpunkt sind für HPV noch keine Antikörpertiter bestimmt worden, die ein Korrelat zur klinischen Protektion darstellen, so dass der minimale AK-Titer, der einen wirksamen Schutz vor Infektionen mit HPV darstellt, im Menschen noch unbekannt ist. Daher zeigt der AK-Titer nur an, ob eine Immunreaktion stattgefunden hat, macht aber keine Aussage über die Effektivität der Impfung. Selbst der Vergleich mit den Titern, die durch eine natürliche Infektion erzeugt werden, ist nicht verlässlich, da diese keinen vollen Schutz vor Reinfektionen bieten und somit nicht als protektiv angenommen werden können [34, 83]. Um die Effektivität der HPV-Impfstoffe beurteilen zu können, kann daher zurzeit ausschließlich die klinische Effektivität herangezogen werden (s. Kap. 1.3.3.1).

In mehreren Studien wurden, im jeweiligen „In-House-System“ des Herstellers, die Titer der geimpften Probandinnen mit den Titern der Probandinnen verglichen, die eine natürliche Infektion durchgemacht hatten. Es zeigte sich in allen Studien eine Serokonversionsrate von nahezu 100% für alle im jeweiligen Impfstoff enthaltenen HPV-Typen. Die Titer erreichten einen Monat nach der dritten Impfung (Monat 7) ihren Höhepunkt und waren zu diesem Zeitpunkt bis zu 1000-fach höher als die durch natürliche Infektionen entstandenen Titer der Vergleichsgruppen [72, 84]. Bei beiden Impfstoffen stellte sich nach ca. 18 - 24 Monaten ein stabiles Plateau ein. Nach 60 (Gardasil) bzw. 74 (Cervarix) Monaten lagen die Titer gegen HPV 16 bei beiden Impfstoffen weit über denen der Vergleichsgruppe. Cervarix zeigte gegen HPV 18 ebenfalls lang andauernde hohe Titer [81]. Der durch Gardasil induzierte Titer gegen HPV 18 näherte sich jedoch im Verlauf sehr stark dem

durch natürliche Infektion erzielten Titer an [72], bei ca. 35% der Probandinnen war nach 60 Monaten im verwendeten Messsystem kein Antikörper-Titer gegen HPV 18 mehr nachweisbar [85].

Einstein et al. waren 2009 die ersten, die die beiden Impfstoffe bezüglich ihrer Immunogenität direkt miteinander verglichen. Dabei wurden alle Proben in zwei Messsystemen analysiert: Im VLP-ELISA, der alle Antikörper anzeigt, die an intakte VLPs binden können, und im Pseudovirion-Based Neutralisation Assay (PBNA), das nur diejenigen AK nachweist, die tatsächlich neutralisierend sind, d.h. an zur Vermeidung einer Infektion relevante Epitope binden. Es zeigten sich je nach untersuchter Subgruppe (stratifiziert nach Alter: 18-26, 27-35, 36-45 Jahre) in Monat 7, d.h. zum Zeitpunkt der maximalen Titer, im PBNA für HPV 16 ein um 2,3 - 4,8-fach und für HPV 18 um 6,8 - 9,1-fach höherer Titer in Cervarix-geimpften Frauen gegenüber denen in Gardasil-geimpften Frauen [86].

Zusätzliche Studien zeigten, dass Gardasil sowohl bei Kindern (10-15 Jahre), als auch bei älteren Frauen (25-45 Jahre) hoch immunogen wirkt, wobei die Serokonversionsraten und maximal erreichten AK-Titer umso höher ausfielen, je jünger die Probanden waren [76, 87]. Diese sog. Bridging-Studien machen die Übertragung der an jungen Frauen ermittelten Daten auf die primäre Zielgruppe der Impfung (Mädchen vor dem ersten Geschlechtsverkehr) möglich.

Olsson et al. konnten nachweisen, dass ein erneuter Antigenkontakt auch lange Zeit nach erfolgter HPV-Impfung zu einer klassischen Sekundärantwort führt, die innerhalb kurzer Zeit bei vielen Probandinnen zu Antikörper-Titern oberhalb der maximal nach Impfung erreichten Titer führt [85]. Es konnte dadurch nachgewiesen werden, dass die Impfung zu einer langandauernden B-Gedächtniszell-Antwort führt.

1.3.3.3 Kreuzprotektion und –immunogenität gegen verwandte HPV-Typen

Beide Impfstoffe sind in der Lage auch protektiv vor CIN-Läsionen zu schützen, die durch nahe verwandte HPV-Typen verursacht werden. Die aktuelle Studienlage zeigt, dass Gardasil einen signifikanten Schutz vor HPV 31 induzierten CIN 2+ Läsionen bietet (Wirksamkeit: 56%). Für andere HPV-Typen gibt es ebenfalls einen Trend zur partiellen Protektion, die Teststärke der Studien

reichte jedoch bisher nicht aus, um diesen Trend statistisch belegen zu können [88]. Für Cervarix konnte eine hohe Wirksamkeit gegen CIN 2+ Läsionen, die durch HPV 31, 33, 45 und 58 verursacht werden, nachgewiesen werden. Dabei besteht insbesondere gegen HPV 31 und 45, die am nächsten mit HPV 16 bzw. 18 verwandten HPV-Typen, ein fast annähernd vergleichbarer Schutz zu den eigentlichen Impftypen (92% für HPV 31 bzw. 100% für HPV 45) [80].

In der bisher einzigen direkten immunologischen Vergleichsstudie beider Impfstoffe wurden die HPV-spezifischen AK verglichen. In Monat 7 zeigen beide Impfstoff-Gruppen im VLP-ELISA ähnlich hohe Titer. Für HPV 45 sind diese bei beiden Impfstoffen äquivalent, für HPV 31 erreicht Cervarix etwa 1,4-fach höhere Titer. Im PBNA, der biologisch relevante AK nachweist, sind für Cervarix ca. 2,7-fach höhere Titer an neutralisierenden AK gegen HPV 31 und ca. 1,5-fach höhere Titer gegen HPV 45 messbar [89].

Die Titer für HPV 31 und 45 liegen bei beiden Impfstoffen, insbesondere bei Messung im PBNA, weit unterhalb derer gegen die eigentlichen Impftypen HPV 16 und 18. Es fällt deshalb schwer, die sehr überzeugende klinische Effektivität gegen verwandte HPV-Typen allein mit den L1-Antikörpern zu erklären. Möglicherweise kommt der zellulären Komponente der Immunantwort eine entscheidende Rolle zu.

1.4 Fragestellungen

Seit 2006 bzw. 2007 sind in Europa die beiden prophylaktischen HPV-Impfstoffe Gardasil (HPV 6/11/16/18) und Cervarix (HPV16/18) auf dem Markt. In groß angelegten Studien konnte für beide Impfstoffe eine hohe Immunogenität auf B-Zell-Ebene sowie Effektivität gegen CIN-Läsionen, die durch im jeweiligen Impfstoff enthaltene HPV-Typen verursacht werden, belegt werden. Für einige verwandte HPV-Typen wurde zudem ein unterschiedliches hohes Maß an Kreuzprotektion nachgewiesen.

Bisher liegen nur sehr wenige Daten über spezifische T-Zellen vor, die durch HPV-Impfstoffe induziert werden. Unter Verwendung eines Ex-Vivo T-Zell-Assays, das in der Lage ist, antigen-spezifische T-Zellen in Vollblut, d.h. in physiologischer Umgebung, nachzuweisen und zu quantifizieren, sollen in der vorliegenden Arbeit

erstmalig beide Impfstoffe in Hinblick auf ihr T-Zell-induzierendes Potential direkt miteinander verglichen werden. Dafür sollen

1) die nach Impfung maximal erreichten antigen-spezifischen T-Zell-Frequenzen gegen die HPV-Typen 6, 11, 16 und 18 für beide Impfstoffe ermittelt werden. Die erreichten Frequenzen sollen in einem ersten Schritt für jeden Impfstoff separat analysiert werden, um Unterschiede zwischen der High-Risk bzw. Low-Risk Antwort zu quantifizieren. Der zweite Schritt soll dann einen direkter Vergleich beider Impfstoffe bezüglich der T-Zell-Antwort gegen alle vier untersuchten HPV-Typen umfassen.

2) die erreichten T-Zell-Frequenzen der zu den Impfstoff-HPV-Typen 16 und 18 verwandten HPV 31 und 45 gemessen werden. Diese sollen zum Zeitpunkt der höchsten Immunantwort (Monat 7) und am Studienende (Monat 12) bestimmt werden, in Relation zu den Frequenzen von HPV 16 und 18 gesetzt und schließlich zwischen beiden Impfstoff-Gruppen verglichen werden.

3) durch ein longitudinales Studiendesign, von Beginn bis sechs Monate nach Beendigung des Impfzyklus, die zelluläre Immunantwort der Probandinnen über einen längeren Zeitraum verfolgt werden, um so Aufschlüsse über den individuellen zeitlichen Verlauf der Immunantwort während und nach Durchlaufen des Impfzyklus zu gewinnen (Memory/Gedächtnisantwort). In diesem Zusammenhang sollen mögliche Fälle aufgedeckt werden, in denen es zu keiner messbaren T-Zell-Antwort gegen die im jeweiligen Impfstoff enthaltenen HPV-Typen kommt.

2 Methoden

2.1 Studiendesign

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine nicht-randomisierte, nicht-verblindete longitudinale Vergleichsstudie, in die ausschließlich gesunde, volljährige Probandinnen eingeschlossen wurden.

Als Einschlusskriterien galten weibliches Geschlecht und Volljährigkeit. Als Ausschlusskriterien galten Minderjährigkeit, Schwangerschaft und Stillzeit, sowie die akute Erkrankung an Condylomata acuminata. Außerdem durften die

Probandinnen zum Zeitpunkt der ersten Blutabnahme (BE) noch mit keinem der beiden prophylaktischen HPV-Impfstoffe geimpft worden sein.

Die Studie wurden am 02.10.2009 von der Ethikkommission der Charité - Universitätsmedizin Berlin per Ethikvotum genehmigt (EA4/036/07). Dabei wurde festgelegt, dass es sich um eine reine Beobachtungsstudie handeln müsse, wodurch jegliche Interventionen, wie beispielsweise HPV-Tests oder Pap-Abstriche ausgeschlossen wurden. Desweiteren musste jeder Probandin frei stehen mit welchem Impfstoff sie sich impfen lassen möchte, es durfte diesbezüglich kein Einfluss genommen und der jeweilige Impfstoff nicht zur Verfügung gestellt werden. Durch die Bedingungen der Ethikkommission war die Randomisierung der Probandinnen nicht möglich.

Die Rekrutierung der Teilnehmerinnen erfolgte zum einen über einen Aufruf im Charité-Intranet, zum anderen über das Verschicken von E-Mails über die Studentenverteiler der Humanmedizin (Charité-Universitätsmedizin Berlin) und Veterinärmedizin (freie Universität Berlin). Auf diese Weise konnten 33 Frauen für die Studienteilnahme gewonnen werden. Durch die Kooperation mit Frau Dr. Perlitz, niedergelassene Gynäkologin in Haldensleben, Sachsen-Anhalt, nahmen fünf weitere Probandinnen an der Studie teil.

Vor der ersten BE erfolgte eine Aufklärung über den Ablauf, die Risiken und die Möglichkeit des Abbruchs der Studie. Diese wurde von allen Probandinnen schriftlich bestätigt. Bei den fünf Probandinnen aus Haldensleben übernahm Frau Dr. Perlitz die Rekrutierung und Aufklärung sowie alle nötigen Blutentnahmen.

Jeder Probandin wurde im Verlauf der Studie fünf Mal peripher-venös Blut abgenommen und mittels eines bereits etablierten Ex-Vivo-Assays auf HPV-spezifische T-Zellen untersucht (s. Kap. 2.2). Zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme (BE) waren die Probandinnen ungeimpft. Im darauf folgenden Impfzyklus erhielten alle Probandinnen die drei nötigen Impfungen entsprechend des jeweilig empfohlenen Impfschemas (Cervarix: Monat 0-1-6, Gardasil: Monat 0-2-6) bei ihrem niedergelassenen Gynäkologen. Die Gruppen unterschieden sich dadurch in Hinblick auf den Zeitpunkt der zweiten Impfung: Cervarix-Probandinnen erhielten diese vier Wochen, Gardasil-Probandinnen acht Wochen nach der ersten Impfung. Unabhängig davon wurde versucht, allen

Probandinnen ca. vier Wochen nach der ersten, zweiten und dritten Impfung Blut für die T-Zell Messung abzunehmen. Die BEs fanden (in Ausnahmefällen) frühestens nach zwei Wochen statt, im Mittel nach ca. fünf bis sechs Wochen. Abschließend erfolgte eine letzte BE ca. sechs Monate nach der dritten Impfung.

Insgesamt führten vier Probandinnen die Studie nicht zu Ende: In der Gardasil-Gruppe beendete eine Frau, in der Cervarix-Gruppe beendeten zwei Frauen die Studie aus persönlichen Gründen vorzeitig. Eine weitere initial mit Cervarix geimpfte Frau wechselte aufgrund starker Nebenwirkungen nach der ersten Impfung den Impfstoff und wurde wegen der nicht mehr gegebenen Vergleichbarkeit zum Rest des Kollektivs aus der Studie ausgeschlossen.

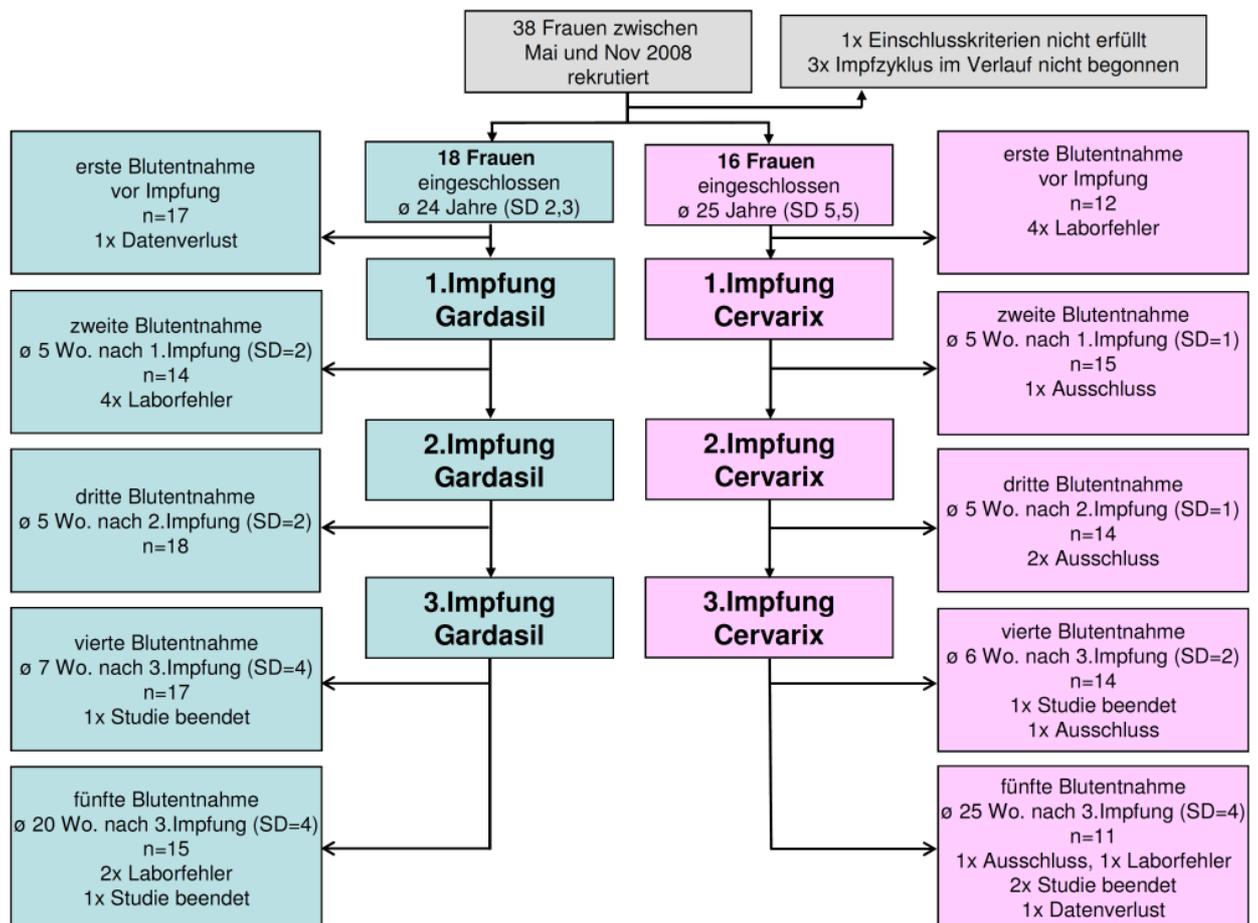


Abb. 6: Studiendesign der longitudinalen Vergleichsstudie.

Dargestellt sind der zeitliche Ablauf der Studie und die Gründe des Ausschlusses von Messreihen. Komplettausfälle von Probandinnen durch Studienabbruch oder –ausschluss sind in allen folgenden Blutentnahmen kumulativ angegeben. SD = engl. standard deviation

2.2 Ex-Vivo-T-Zell-Assay

Das verwendete Assay basiert auf der Publikation von Frensch et al. [52] und wurde von AK Ramseger auf HPV spezifische Fragestellungen angepasst. Das im Folgenden beschriebene Protokoll wurde von ihr etabliert [90].

2.2.1 Materialgewinnung

Das zu analysierende Vollblut wurde durch peripher-venöse Blutabnahme mit Hilfe des BD Vacutainer Systems gewonnen. Die mit Lithium-Heparin antikoagulierten Proben wurden bis zur Verarbeitung maximal 24 Stunden bei Raumtemperatur gelagert. Die Blutproben der fünf Probandinnen aus Haldensleben wurden jeweils per Express-Versand über Nacht verschickt und am Folgetag im Berliner Labor weiterverarbeitet. Einmalig wurden von jeder Probandin B-Zell-Linien angelegt, sowie bei jeder Blutentnahme ein Teil des Materials in Form von PBL und Plasma für Folgeprojekte kryokonserviert.

2.2.2 Antigenstimulation und Zellkultur

Bei jeder Blutentnahme wurden die Blutproben auf das Vorhandensein von IL-2, IFN- γ und IL-4-produzierenden, HPV 6, 11, 16 oder 18-spezifischen T-Zellen hin untersucht. Hierzu wurde ein L1-Peptidpool des jeweils zu untersuchenden HPV-Typs verwendet, der sich aus verschiedenen 30-meren zusammensetzte, welche jeweils überlappende Enden aufwiesen und so den T-Zellen alle theoretisch möglichen linearen Epitope zur Erkennung anbot. Der Peptidpool repräsentierte den kompletten Wildtyp des jeweiligen L1-Proteins.

Zusätzlich zu dieser „Basis-Analyse“ erfolgten je nach Zeitpunkt der BE im Impfzyklus weitere Untersuchungen: Im Verlauf der Studie wurden bei jeder Probandin einmalig zwei weitere Ansätze angelegt, die Aufschluss über eventuell bereits durchgemachte Infektionen mit High-Risk- bzw. Low-Risk-HPV geben sollten. Diesen beiden Ansätzen wurden die Peptidpools von HPV 16/18 E6/E7 bzw. HPV 6 E6/E7 hinzugefügt, also früh im HPV-Vermehrungszyklus gebildete Proteine, die nicht in den beiden prophylaktischen Impfstoffen enthalten sind. Eine positive T-Zell-Antwort auf diese HPV-Proteine musste demnach in jedem Fall durch eine natürliche Infektion zustande gekommen sein und konnte nicht als Folge der Impfung interpretiert werden. Desweiteren wurde ab der vierten BE, d.h. nach der dritten Impfung, die Kreuzimmunität gegen verwandte High-Risk-Typen

durch zusätzliche Ansätze mit HPV 31 und 45 L1 Peptidpools untersucht, wobei IL-2 und IFN- γ , nicht jedoch IL-4 spezifische T-Zellen detektiert wurden.

Der Ablauf der Antigenstimulation gestaltete sich unabhängig von der Anzahl der Ansätze stets gleich: Unter sterilen Arbeitsbedingungen wurde je 1 ml Vollblut in die entsprechende Anzahl Zellkulturröhrchen (Greiner bio-one, Frickenhausen) überführt. Anschließend wurde jedem Ansatz 1 $\mu\text{g/ml}$ anti-human CD28 (BD, Klon CD28.2) zugesetzt. Bei einer Arbeitskonzentration von 1 mg/ml entspricht dies einem Volumen von 1 μl . Das erste Kulturröhrchen diente als Negativkontrolle und wurde nach Zugabe von CD 28 verschlossen. Die folgenden Kulturröhrchen wurden mit je 10 $\mu\text{g/ml}$ des jeweiligen L1-Peptidpools von HPV 6, 11, 16, 18, 31 oder 45 oder E6/E7 Peptidpools von HPV 6 bzw. 16/18 versetzt, was bei einer Arbeitskonzentration von 1 mg/ml einem Volumen von jeweils 10 μl entspricht. Nachdem alle erwähnten Ansätze mit dem jeweiligen Peptidpool versetzt und verschlossen waren, wurde die Positivkontrolle separat mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Staphylokokken Enterotoxin B (SEB, Sigma), entsprechend 10 μl bei einer Arbeitskonzentration von 1 mg/ml stimuliert.

Nach Abschluss der Antigenstimulation wurden die Ansätze bei 37°C, 5% CO₂ und 92% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach 90-120 Minuten wurde jedem Ansatz 10 $\mu\text{g/ml}$ Brefeldin A (Sigma) zugesetzt, das vorher gemäß Herstellerangaben in Ethanol oder DMSO gelöst und mit RPMI Kulturmedium auf eine Konzentration von 1 mg/ml verdünnt worden war. Die Inkubation wurde nach diesem Arbeitsschritt fortgeführt.

2.2.3 Lyse und Fixierung

Nach 12 bis 24 Stunden wurde die Stimulation beendet. Um eventuell am Kulturröhrchen haftende Makrophagen zu lösen, wurden die Ansätze für 10 Minuten mit Ethylendiamintetraessigsäure (2 mM EDTA, pH7) versetzt. Anschließend wurden die im Vollblut vorhandenen Erythrozyten zehn Minuten lang mit 9 ml BD FACS Lysing Solution (mit Aqua dest. im Verhältnis von 1:10 verdünnt) lysiert und der Überstand dann zehn Minuten bei 1400 rpm abzentrifugiert. Die Zellpellets wurden mit je 2 ml PBS gewaschen und erneut zehn Minuten bei 1400 rpm zentrifugiert.

Im Folgenden wurden die Zellpellets durch Zugabe von 500 μ l Formalin (2% in PBS, Einwirkzeit 17 Minuten) und anschließendem Auswaschen mit FACS-Puffer (PBS mit 1% (w/v) bovinem Albumin Fraktion V (BSA, Biomol, Hamburg) und 0,1% (w/v) Natriumazid) fixiert. Die so aufgearbeiteten Zellen konnten maximal drei Wochen bei 4 °C aufbewahrt werden.

2.2.4 Färbung

Die bei allen Blutentnahmen durchgeführte Standardfärbung enthielt Antikörper gegen CD4, CD154, IFN- γ und IL-2 (oder IL-4).

Für die intrazelluläre Färbung wurden die Zellen zunächst mit 500 μ l BD FACS Permeabilisierungspuffer (1:10 verdünnt mit A. dest.) für zehn Minuten permeabilisiert. Nach Auswaschen, Zentrifugieren (10 min, 1400 rpm) und Resuspendieren in FACS-Puffer wurden die Zellen in FACS Röhrchen (BD Falcon) überführt und erneut zehn Minuten zentrifugiert (1400 rpm).

Im Folgenden wurde jeder Ansatz mit je 50 μ l Färbe-Mix versetzt. Dieser bestand aus anti-human CD4 (Klon SK3) konjugiert mit Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP), verdünnt mit FACS-Puffer im Verhältnis 1:5, anti-human CD154 (Klon 5C8), konjugiert mit Allophycocyanin (APC) 1:10 verdünnt, sowie anti-human IL-2 (Klon MQ1-17H12) bzw. anti-human IL-4 (8D4-8), konjugiert mit Phycoerythrin (PE), und anti-human IFN- γ (Klon B27), konjugiert mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC), jeweils 1:100 verdünnt mit FACS-Puffer. Desweiteren war dem Färbe-Mix zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen Beriglobin (1mg/ml in PBS, ZLB Behring) in 1:50 Verdünnung mit FACS-Puffer zugefügt. Mit Ausnahme des Antikörpers gegen CD154, der von der Firma Miltenyi hergestellt wird, stammten alle verwendeten Antikörper von BD.

Den konjugierten Antikörpern wurden 30 Minuten Einwirkzeit im Dunkeln gegeben um intrazellulär zu binden. Nicht gebundene Antikörper wurden nach 30 Minuten ausgewaschen, die Zellen nochmals zentrifugiert und schließlich in 100 μ l Formalin (1% in PBS) resuspendiert. So gefärbte Ansätze konnten maximal eine Woche bei 4 °C aufbewahrt werden.

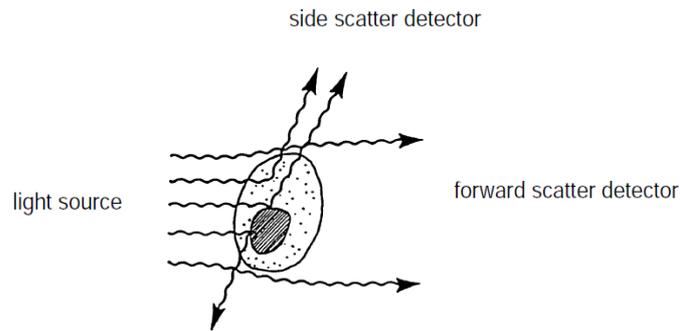


Abb. 8: Entstehung des Vorwärts- und Seitwärtsstrelichts (Abb. aus [93]).

Alle in dieser Studie durchgeführten durchflusszytometrischen Messungen wurden an einem FACS Calibur Gerät von BD durchgeführt. Das Gerät ist in der Lage vier Fluoreszenzen zu erkennen. Mit Hilfe der FCS- und SSC-Eigenschaften konnten die Lymphozyten in der Menge aller gemessenen Zellen erkannt werden. Die Filterung der CD4⁺ T-Zellen sowie deren Subklassifizierung anhand der Interleukinproduktion wurden durch Messung der Fluoreszenzsignale erreicht (s. Kap. 2.2.6). Es wurde versucht, in jedem Ansatz möglichst 200.000 CD4⁺ T-Zellen zu messen, diese Zahl wurde jedoch häufig aufgrund zu geringer Zellzahlen in den Färbeansätzen unterschritten.

2.2.6 Auswertung der Messdaten

Die Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen erfolgte mit Hilfe der CellQuest Pro Software von BD. Die gemessenen Eigenschaften der Zellen werden vom Programm als Dot Plots für die Analysen bereitgestellt. Durch das sog. „Gating“ können bestimmte Gruppen von Zellen je nach deren Eigenschaften subgruppiert und quantifiziert werden.

Für die Studie interessant waren diejenigen Lymphozyten, die sowohl positiv für CD4 und CD154 (Aktivierungsmarker), als auch für IL-2, IL-4 bzw. IFN- γ waren.

Das Herausfiltern der relevanten Zellen erfolgte in mehreren Schritten: Wie bereits erwähnt, konnten durch Auftragen des SSC gegen das FSC die Lymphozyten unter allen anderen Leukozyten identifiziert werden (kleine, nicht granulierte Zellen). Anschließend wurde ein Gate um alle durch den Antikörper als CD4⁺ erkannten Lymphozyten gelegt, die danach in einem separaten Dot Plot auf das

Vorhandensein von CD154, IL-2, IL-4 und IFN- γ untersucht wurden. Der Dot Plot wurde dafür in vier Quadranten unterteilt. Auf der y-Achse war die Signalintensität für CD154, auf der x-Achse die Intensität für jeweils eines der drei gemessenen Interleukine aufgetragen. Die Quadranten wurden jeweils an der Negativkontrolle ausgerichtet.

Im oberen rechten Quadranten fand man schließlich die relevanten CD4+ Lymphozyten, die spezifisch auf das stimulierende Antigen reagiert haben (CD154+) und zusätzlich entweder IL-2, IL-4 oder IFN- γ produzieren („doppelt positive Zellen“).

2.3 Fragebogen

Jede Probandin wurde zu Beginn der Studie gebeten, einen Fragebogen bezüglich HPV-relevanter Punkte schriftlich zu beantworten. Dabei wurde darauf hingewiesen, dass als zu intim empfundene Fragen nicht beantwortet werden brauchen. Der Fragebogen teilte sich in drei Abschnitte, die jeweils aus 3 - 5 Fragen im Multiple-Choice Format bestanden.

Im ersten Abschnitt wurde durch das Fragen nach Allergien, Immunsuppression (krankheits- oder iatrogen-bedingt) und Nikotingewohnheiten versucht, eine mögliche Verfälschung der T-Zell-Frequenzen zu erfassen. So würden Allergien beispielsweise zu unspezifisch erhöhten T-Zell-Zahlen, Immunsuppression oder Nikotin Missbrauch zu erniedrigten T-Zell-Zahlen führen [94].

Der zweite Abschnitt sollte der Abschätzung des Risikos der Probandinnen für einen Kontakt mit HPV dienen. Es wurde gefragt, ob zurzeit eine feste Beziehung besteht, in welchem Alter der erste sexuelle Kontakt stattfand, wie viele Sexualpartner es bisher gab ($0, \leq 5, > 5$) und ob regelmäßig Kondome verwendet werden. Insbesondere die Anzahl der Sexualpartner gilt dabei als Indikator für das Risiko, eine HPV Infektion zu erleiden [95, 96].

Im dritten Abschnitt wurden die Probandinnen gefragt, ob sie sich regelmäßigen gynäkologischen Kontrollen unterziehen, sie schon einmal einen auffälligen Pap-Abstrich gehabt haben (inkl. Pap-Kategorie und eventuell nötiger Therapie), jemals eine HPV Infektion per HPV-Test diagnostiziert wurde, sie unter Condylomata acuminata leiden/ litten und ob jemals eine andere sexuell übertragbare Krankheit festgestellt wurde. Eine positive HPV Anamnese könnte zu

einer Sekundärantwort des Immunsystems, bedingt durch Aktivierung bereits vorhandener T-Gedächtniszellen, führen, und auf diese Weise in kurzer Zeit hohe T-Zell Frequenzen erzeugen.

Die im Fragebogen gemachten Angaben führten im Allgemeinen nicht zum Ausschluss von Probandinnen. Einzige Ausnahme bildete eine initial rekrutierte Probandin, die akut an Condylomata acuminata litt, da durch fehlende HPV-Testung (s. Kap. 2.1), einzig diese Angabe Hinweise auf eine aktuell vorliegende HPV-Infektion erbrachte, die die T-Zell-Ergebnisse somit hätte verfälschen können.

2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der durch die Probandinnen ausgefüllten Fragebögen und der durch Anwendung des Ex-Vivo-Assays erhobenen T-Zell-Daten erfolgte mittels der Software PASW Statistics 18.0 für Windows (SPSS Inc., Chicago, USA).

Um die durch den Fragebogen erhobenen Daten bezüglich der Charakteristika beider Gruppen zu analysieren, wurden die Antwortmöglichkeiten des Fragebogens mit Ziffern von 1 bis 4 verschlüsselt und anschließend in einer einfaktoriellen ANOVA zwischen den Gruppen auf ihre Vergleichbarkeit geprüft. Der Faktor war dabei die Gruppe, die abhängige Variable der jeweilige im Fragebogen abgefragte Parameter. Analog hierzu wurden auch das Alter der Probandinnen und die Zeiträume zwischen Impfung und jeweils folgender Blutentnahme untersucht.

Vor Analyse der T-Zell-Daten erfolgte eine Prüfung auf Normalverteilung, die nach Anwendung des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf alle gemessenen HPV-Typen zu allen Zeitpunkten für die meisten Datensätze keine Normalverteilung ergab. Obwohl durchaus auch normalverteilte Datensätze vorhanden waren, wurden aus Gründen der Einheitlichkeit und besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse, nichtparametrische Tests für die statistische Auswertung verwendet.

Um Unterschiede in der quantitativen Ausprägung der T-Zell-Antwort zwischen den verschiedenen Blutabnahme-Zeitpunkten zu ermitteln, wurde in jeder Gruppe der Wilcoxon Test für verbundene Stichproben angewandt. Die Testpaare bestanden dabei aus den Messwerten der vier (bzw. sechs) zu analysierenden

HPV-Typen zu zwei verschiedenen Zeitpunkten. Da bei der geringen Anzahl an Studienteilnehmerinnen initial nicht unbedingt signifikante Ergebnisse zwischen den einzelnen Impfzeitpunkten zu erwarten waren, wurde zusätzlich versucht, die statistische Power in Bezug auf den Impferfolg zu erhöhen, indem alle von einem einzelnen HPV-Typ während des Impfzyklus erreichten Werte (BE 2, 3 und 4) gemittelt und dann mit dem Nullwert verglichen wurden. Diese Werte sind in den Übersichten des Kapitels 3 mit aufgeführt. Um den Langzeit-Impferfolg beurteilen zu können, wurde der Nullwert vor Impfung mit dem Wert in Monat 12 verglichen. Alle erhobenen p-Werte wurden am Ende der Analyse mit dem Faktor 4 bzw. 6 (BE 4 und 5, da HPV 31 und 45 zusätzlich in die Analyse mit einfließen) korrigiert um eine Kumulation von α -Fehlern auszuschließen (Bonferroni-Korrektur). Es ergab sich damit für p ein Grenzwert von $<0,013$ (BE 1, 2, 3) bzw. $<0,008$ (BE 4, 5) ab dem die Ergebnisse als statistisch signifikant zu werten sind. Da die ebenfalls berechneten Unterschiede in der Negativ- und Positiv-Kontrolle für die Studie von untergeordneter Bedeutung waren, wurden diese nicht nach Bonferroni korrigiert.

Für den Vergleich beider Impfstoffe untereinander wurde der Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben verwendet, wobei die Gruppenvariable die Impfstoff-Gruppe (Gardasil vs. Cervarix) und die Testvariablen die entsprechend zu vergleichenden Einzeldatensätze darstellten. Auch nach diesem Test wurden alle p-Werte nach Bonferroni korrigiert.

Der Vergleich beider Gruppen in Hinblick auf bereits durchgemachte Infektionen wurde ebenfalls durch einen Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben erbracht. Da die Messungen aus logistischen Gründen nicht bei allen Probandinnen bei der gleichen BE stattfanden, wurden die Werte für jeden HPV-Typ über alle BEs gemittelt und anschließend mit denen der anderen Impfstoffgruppe verglichen.

Alle genannten Analysen wurden für alle drei gemessenen Interleukine durchlaufen (IL-2, IFN- γ , IL-4). Das Konfidenzintervall beträgt für alle Tests 95%.

Hinweis: Da es sich um eine Studie mit geringen Fallzahlen handelt, in der eventuell vorhandene Unterschiede durch strikte statistische Tests verdeckt werden könnten, werden in Kapitel 3 p-Werte von $\leq 0,05$ als statistisch signifikant

gewertet. Nach Bonferroni-Korrektur muss der p-Wert $\leq 0,013$ (BE 1,2,3) bzw. $\leq 0,008$ (BE 4,5) liegen, um als statistisch signifikant zu gelten. Sowohl die unkorrigierten, als auch die nach Bonferroni korrigierten p-Werte sind aus den jeweiligen Ergebnistabellen ersichtlich und decken sich zu weiten Teilen.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des Studienkollektivs

3.1.1 Altersstruktur

Das Durchschnittsalter aller 34 an der Studie teilnehmenden Frauen betrug 24 Jahre, wobei die jüngste Probandin 19, die älteste 39 Jahre alt war. Während die Probandinnen der Gardasil-Gruppe bei einer Standardabweichung von 2,3 Jahren im Durchschnitt 23,6 Jahre alt waren, betrug das Alter der Probandinnen der Cervarix Gruppe bei einer Standardabweichung von 5,5 Jahren durchschnittlich 24,6 Jahre. Der Altersunterschied zwischen beiden Gruppen ist für $p < 0,05$ als nicht signifikant anzusehen.

3.1.2 Immunologische Beeinträchtigungen

Es wurden für $p < 0,05$ keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen bezüglich Allergien oder Nikotinabusus festgestellt. Eine Frau in der Cervarix-Gruppe und keine Frau in der Gardasil-Gruppe nahmen regelmäßig immunsupprimierende Medikamente ein (vgl. Tab.2). Der Unterschied ist statistisch nicht signifikant.

3.1.3 Sexualleben

Bezüglich des Beziehungsstatus, der Anzahl der bisherigen Sexualpartner, des Alters beim ersten Geschlechtsverkehr und der Verwendung von Kondomen unterscheiden sich die beiden Gruppen ebenfalls nicht signifikant. In der Gardasil-Gruppe hatten zwei Probandinnen am Studienbeginn noch keinen Sexualkontakt, in der Cervarix-Gruppe traf dies für eine Probandin zu.

3.1.4 Gynäkologische Anamnese

Die Auswertung der Fragebögen ergab zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede in Hinblick auf die regelmäßige Teilnahme an

gynäkologischen Vorsorgeuntersuchungen. Zwei Frauen in der Gardasil-Gruppe und eine Frau in der Cervarix-Gruppe hatten bisher einmalig einen auffälligen PAP-Abstrich, der in allen drei Fällen als IIID klassifiziert wurde. Eine weitere Frau in der Cervarix-Gruppe hatte bereits mehrfach auffällige Abstriche, die ebenfalls jeweils als IIID eingestuft wurden. Die Unterschiede zwischen den Gruppen sind statistisch nicht signifikant.

In der Gardasil-Gruppe befand sich eine Frau, die in der Vorgeschichte Condylomata acuminata und einen positiven HPV-Test (genaue Typenanalyse nicht bekannt) angab. Dies führte ebenfalls nicht zu signifikanten Unterschieden zwischen den Gruppen.

In beiden Gruppen gab jeweils eine Frau an, einmal an einer anderen sexuell übertragbaren Infektionskrankheit erkrankt zu sein. Die Probandin der Cervarix-Gruppe hatte diese Infektion am Studienbeginn bereits überwunden, die Probandin der Gardasil-Gruppe litt zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme an einer HSV-2 Infektion.

3.1.5 Zeitpunkt der Blutentnahmen

Um einen Nullwert zu erhalten, wurde die erste Blutentnahme (BE) bei allen Probandinnen vor der ersten Impfung durchgeführt (vgl. Kap. 2.1). Nach der ersten und zweiten Impfung erfolgten die BE's in beiden Gruppen jeweils fünf Wochen später (SD 1-2, s. Abb. 7). Nach der dritten Impfung wurde den Probandinnen der Gardasil-Gruppe acht Wochen (SD 4), den Probandinnen der Cervarix-Gruppe sechs Wochen (SD 2) post Vaccination Blut entnommen. Für alle Zeitintervalle zwischen Impfung und jeweils nachfolgender BE besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Die letzte BE erfolgte im Durchschnitt in der Gardasil-Gruppe 20 Wochen (SD 4), in der Cervarix-Gruppe 25 Wochen (SD 4) nach der dritten Impfung, wobei dieser Zeitunterschied als statistisch signifikant anzusehen ist.

Tab. 2: Probanden-Charakteristika nach selbstbeantwortetem Fragebogen.

	Gardasil n=18	Cervarix n=16
Allergien	7 (39%)	7 (44%)
Immunsuppression	0 (0%)	1 (6%)
Nikotinabusus		
ja	3 (17%)	3 (19%)
ehemals	3 (17%)	1 (6%)
nein	12 (67%)	12 (75%)
Sexualverhalten		
einen festen Sexualpartner	10 (56%)	12 (75%)
wechselnde Sexualpartner	1 (6%)	0 (0%)
zurzeit nicht sexuell aktiv	7 (39%)	4 (25%)
Anzahl Sexualpartner		
Jungfrauen	2 (11%)	1 (6%)
≤ 5	11 (61%)	12 (75%)
> 5	5 (28%)	3 (19%)
Alter beim 1. Geschlechtsverkehr		
Jungfrauen	2 (7%)	1 (6%)
< 14 Jahre	1 (6%)	0 (0%)
14 - 18 Jahre	13 (72%)	11 (69%)
> 18 Jahre	2 (11%)	4 (25%)
Verwendung von Kondomen		
immer	5 (31%)	5 (33%)
gelegentlich	5 (31%)	4 (27%)
nie	6 (38%)	6 (40%)
regelmäßige gyn. Vorsorge	17 (94%)	16 (100%)
auffälliger Pap-Abstrich		
keine regelmäßigen Abstriche	1 (6%)	1 (6%)
unauffällig	15 (83%)	13 (81%)
ja, einmalig	2 (11%)	1 (6%)
ja, wiederholt	0 (0%)	1 (6%)
gesicherte HPV-Infektion		
nein	17 (94%)	16 (100%)
ja, früher	1 (6%)	0 (0%)
ja, zurzeit	0 (0%)	0 (0%)
Condylomata acuminata		
nein	17 (94%)	16 (100%)
ja, früher	1 (6%)	0 (0%)
ja, zurzeit	0 (0%)	0 (0%)
andere STD in der Anamnese	1 (6%)	1 (6%)

HPV = humanes Papillomvirus, STD = sexually transmitted disease, gyn. = gynäkologisch

3.2 Ergebnisse des Ex-Vivo-T-Zell-Assays

3.2.1 Definition der Grenzwerte /Ausschluss von Probandinnen

Für jeden jeweils gemessenen HPV-Typ wurden bei jeder BE drei Werte erhoben, zum einen der Anteil der CD4+/CD154+ T-Zellen, d.h. der Anteil an insgesamt aktivierten T-Zellen an der Gesamtmenge der CD4+ Lymphozyten und zum anderen der Anteil an CD4+/CD154+ T-Zellen, die als Zeichen einer spezifischen Aktivierung zusätzlich IL-2 bzw. IFN- γ produzierten („doppelt positive Zellen“). In der vorliegenden Arbeit werden aus Gründen der Übersichtlichkeit nur die Frequenzen der (biologisch relevanten) spezifisch aktivierten Zellen vorgestellt, d.h. T-Zellen die neben CD154 auch ein Zytokin exprimieren. Aufgrund der zeitlichen Distanz zur Impfung entsprechen diese Zellen hauptsächlich aktivierten Memory T-Zellen.

In der Negativkontrolle durfte der Anteil an spezifisch aktivierten Zellen, d.h. entweder CD4+/CD154+/IL-2+ oder CD4+/CD154+/IFN- γ +, maximal 0,04% aller CD4+ T-Zellen betragen, damit die jeweilige Messreihe in der Statistik berücksichtigt werden konnte. Die SEB-Kontrolle wurde als positiv gewertet, wenn mind. 0,05% spezifisch aktivierte Zellen nachweisbar waren.

Eine zu Beginn der Studie an Condylomata acuminata erkrankte Frau wurde aufgrund der dadurch faktisch nachgewiesenen HPV-Infektion komplett aus der Studie ausgeschlossen (vgl. Kap. 2.3). Daneben kam es in der Gardasil-Gruppe aus folgenden Gründen zum Ausschluss einzelner Messreihen: In insgesamt sechs Fällen wurden die Kriterien der Positivkontrolle nicht erfüllt, wobei in vier davon der Einsatz eines falschen Antikörpers zu nicht nachweisbaren doppelt positiven T-Zellen in der Positivkontrolle führte (jeweils BE 2). In einem weiteren Fall lag keine Positiv-Kontrolle zum Vergleich vor und im letzten Fall wurden die nötigen 0,05% spezifisch aktivierter T-Zellen nicht erreicht (beide BE 5). Unabhängig von den genannten Kriterien konnten die Daten einer Probandin zum Zeitpunkt 1 nicht mit einfließen, da sie durch IT-Probleme komplett verloren gingen. Eine letzte Probandin beendete die Studie nach BE 3 vorzeitig.

In der Cervarix-Gruppe erreichten drei Probandinnen zum Zeitpunkt 1 und eine weitere zum Zeitpunkt 5 nicht die nötigen 0,05% in der Positivkontrolle. Eine initial mit Cervarix geimpfte Frau wechselte aufgrund starker Nebenwirkungen nach der

ersten Impfung den Impfstoff und wurde wegen der nicht mehr gegebenen Vergleichbarkeit zum Rest des Kollektivs nach der zweiten BE aus der Studie ausgeschlossen. Zwei weitere Probandinnen beendeten die Studie nach der dritten bzw. vierten BE vorzeitig. Eine dieser beiden (Studienende nach dritter BE) zeigte in der ersten BE zwar noch tolerable, in der zweiten und dritten BE jedoch wesentlich zu hohe Werte in der Negativ-Kontrolle, woraufhin die beiden zugehörigen Messreihen nicht in die Statistik mit einfließen. Der Datensatz einer Probandin zum Zeitpunkt 5 ging aufgrund von IT-Problemen verloren.

3.2.2 Auswertung der T-Zell-Frequenzen für Gardasil

3.2.2.1 Übersicht

Abbildung 8 vermittelt durch eine Boxplot-Darstellung einen ersten Überblick über die durch Gardasil induzierte zelluläre Immunität zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Impfzyklus. Dabei ist der Anteil an CD4+ TH-Zellen dargestellt, der spezifisch gegen das jeweils aufgeführte Antigen gebildet wird (CD4+/ CD154+/ IL-2+ T-Zellen).

Die an dieser Stelle nicht gezeigten Mittelwerte der Negativkontrollen lagen zu allen gemessenen Zeitpunkten und für alle untersuchten Interleukine (IL-2, IFN- γ , IL-4) konstant bei < 0,01%. In der Positiv-Kontrolle zeigten sich unerwarteterweise steigende Werte zwischen den einzelnen BEs, die zwischen BE 3 und BE 4 sogar zu einem statistisch signifikanten Anstieg führten, jedoch zwischen BE 4 und BE 5 wieder so stark abfielen, dass zwischen BE 1 und BE 5, d.h. zwischen Beginn und Ende der Studie, kein signifikanter Unterschied nachweisbar war (vgl. Tab. 3).

Bei Betrachtung der Boxplot-Darstellung (Abb. 8) ist zu erkennen, dass bereits ab der ersten Impfung ein Anstieg der T-Zell-Frequenzen gegen alle vier relevanten HPV-Typen zu verzeichnen ist. Die Frequenzen steigern sich mit jeder Impfung um in Monat 7 ihre Maximalwerte zu erreichen. Zu diesem Zeitpunkt ist bei allen Probanden eine messbare T-Zell-Antwort gegen alle Vakzin-Typen zu messen. Zwischen Monat 7 und Monat 12 fallen die Frequenzen ab, liegen aber im Vergleich zum Nullwert für alle untersuchten HPV-Typen auf einem höheren Niveau. Gardasil induzierte durchschnittlich mehr T-Zellen gegen die beiden Low-Risk-Typen, insbesondere gegen HPV 6. Gegen HPV 18 werden in der Gardasil-Gruppe insgesamt die niedrigsten Frequenzen erreicht. Nach 12 Monaten ist bei

vier Probandinnen der Gardasil-Gruppe keine mit dem verwendeten Assay messbare T-Zell-Antwort mehr nachweisbar (vgl. Kap. 3.2.5).

Neben den IL-2-produzierenden T-Zellen konnten auch IFN- γ - und IL-4-produzierende, spezifisch gegen die im Impfstoff enthaltenen HPV-Typen gerichtete, T-Zellen gemessen werden. Auf deren graphische Darstellung wurde an dieser Stelle jedoch verzichtet, da eine genaue Beschreibung aller erhobenen Daten der Gardasil-Gruppe in den folgenden Kapiteln stattfindet.

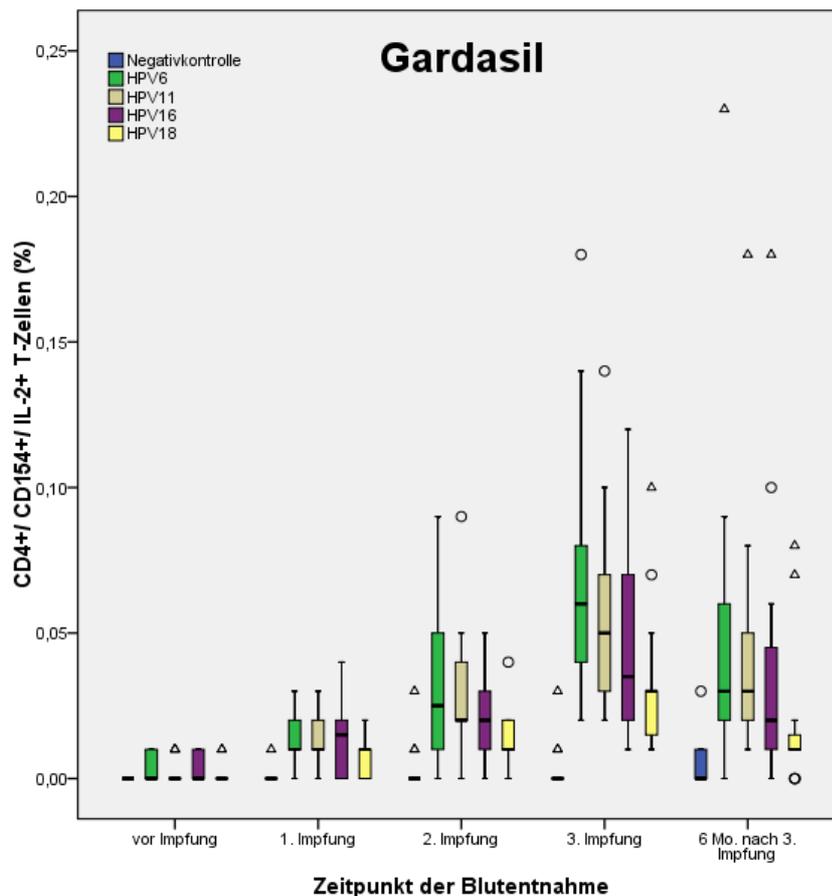


Abb. 9: Anstieg IL-2 produzierender, spezifischer T-Helfer-Zellen gegen HPV 6,11, 16 oder 18 in der Gardasil-Gruppe abhängig vom Impfstatus der Probandinnen.

Gezeigt sind die prozentualen Anteile HPV 6, 11, 16 und 18 L1-spezifischer IL-2-positiver TH-Zellen an der Gesamtmenge aller CD4+ T-Zellen. Die Box beschreibt den Bereich, in dem 50% aller Ergebnisse der jeweiligen Gruppe liegen und entspricht dem Interquartilsabstand (IQR). Die schwarze Markierung innerhalb der Box zeigt den Median, die Whiskers den Bereich des maximal 1,5-fachen IQR's an. Kreise kennzeichnen milde Ausreißer bis zu einem dreifachen IQR, Dreiecke extreme Ausreißer oberhalb des dreifachen IQR. HPV = humanes Papillomvirus, IL-2 = Interleukin-2

3.2.2.2 Interleukin-2

In Tabelle 3 sind die Mittelwerte der für das jeweils aufgeführte Antigen spezifischen CD4+/ CD154+/ IL-2+ T-Zell-Antwort für alle fünf BE-Zeitpunkte aufgeführt, wobei die Werte in % den Anteil der spezifischen CD4+/ CD154+/ IL-2+ T-Zellen an der Gesamtmenge aller CD4+ T-Zellen widerspiegeln. Desweiteren ist dargestellt, ob signifikante Unterschiede in der quantitativen Ausprägung der spezifischen T-Zell-Antwort zwischen den einzelnen BE-Zeitpunkten bestehen.

In den IL-2 Färbungen zeigten sich bis Monat 7 für alle untersuchten HPV-Typen steigende T-Zell-Frequenzen. Dieses Maximum war quantitativ für die Low-Risk-Typen höher als für die High-Risk-Typen (HPV6>11>16>18). Insbesondere HPV 6 erreichte mit 0,071% hohe Werte, wohingegen HPV 18 mit 0,031% deutlich weniger T-Zellen induzierte. Mittelt man die direkt nach den jeweiligen Impfungen erhobenen Werte (BE 2, 3 und 4) und vergleicht sie mit dem Nullwert, wird für alle gemessenen HPV-Typen ein hochsignifikanter Unterschied (jeweils $p < 0,001$) erzielt. Sechs Monate nach der letzten Impfung sinken die Werte für alle HPV Typen, insbesondere aber für HPV 18 (dort signifikant) ab. Vergleicht man die Werte nach 12 Monaten mit den Ausgangswerten vor Impfung, zeigt sich aber trotzdem für alle Typen eine hochsignifikant höhere Frequenz an spezifisch stimulierten T-Zellen nach erfolgter Impfung mit Gardasil ($p = 0,001 - 0,003$)

Bezüglich der nahe verwandten HPV-Typen 31 und 45 lässt sich erkennen, dass spezifisch aktivierte CD4+/ CD154+/ IL-2+ T-Zellen gegen beide Typen gebildet werden, ohne dass deren Antigene im Impfstoff enthalten sind. Gegen HPV 31 werden sowohl in Monat 7 (0,028%) als auch in Monat 12 (0,023%) im Vergleich zum nächstverwandten HPV 16 etwa 60% der T-Zellen gebildet. HPV 45 erreicht in Monat 7 mit einer Frequenz von 0,025% fast identische Werte wie HPV 31 und liegt mit seiner T-Zell-Antwort bei etwa 80% derer, die gegen seinen nächstverwandten Typ HPV 18 induziert wird. Die T-Zell-Frequenz gegen HPV 18 fällt im Verlauf stärker ab, so dass in Monat 12 mit 0,021% gegen HPV 45 etwa 1,2-fach mehr T-Zellen vorliegen als gegen HPV 18 mit 0,018%.

Tab. 3: Anstieg IL-2-produzierender, spezifischer T-Helfer-Zellen gegen HPV 6,11, 16, 18, 31 und 45 in der Gardasil-Gruppe abhängig vom untersuchten HPV-Typ.

Antigen (Gardasil, IL2)	BE 1 Mittelwert (+/-SD)	BE 2 Mittelwert (+/-SD)	BE 3 Mittelwert (+/-SD)	BE 4 Mittelwert (+/-SD)	BE 5 Mittelwert (+/-SD)	BE 2+3+4 /3 Mittelwert	BE 1 vs. BE 2+3+4	BE1 vs. BE 5
T-Zell-Kontrolle	0 (± 0,000)	0,001 (± 0,003)	0,003 (± 0,008)	0,003 (± 0,008)	0,005 (± 0,008)	0,003 (± 0,005)		
	n.s. (0,317)		n.s. (0,180)				* (0,042)	* (0,034)
		n.s. (0,414)		n.s. (0,257)				
SEB-Kontrolle	3,07 (± 2,42)	3,47 (± 2,10)	3,61 (± 2,08)	6,85 (± 4,56)	3,50 (± 3,35)	4,58 (± 2,35)		
	n.s. (0,300)		* (0,017)				* (0,002)	n.s.(0,433)
		n.s. (0,593)		* (0,002)				
HPV 6 L1	0,004 (± 0,005)	0,015 (± 0,009)	0,031 (± 0,024)	0,071 (± 0,042)	0,049 (± 0,056)	0,039 (± 0,018)		
	** (0,004)		** (0,006)				** (0,000)	** (0,003)
		n.s. (0,065)		n.s. (0,064)				
HPV 11 L1	0,002 (± 0,004)	0,014 (± 0,008)	0,028 (± 0,020)	0,058 (± 0,033)	0,042 (± 0,043)	0,034 (± 0,014)		
	** (0,001)		* (0,016)				** (0,000)	** (0,001)
		* (0,016)		n.s. (0,053)				
HPV 16 L1	0,004 (± 0,005)	0,014 (± 0,013)	0,020 (± 0,013)	0,049 (± 0,035)	0,038 (± 0,047)	0,029 (± 0,017)		
	** (0,009)		* (0,045)				** (0,000)	** (0,002)
		n.s. (0,178)		n.s. (0,147)				
HPV 18 L1	0,001 (± 0,003)	0,007 (± 0,007)	0,013 (± 0,010)	0,031 (± 0,024)	0,018 (± 0,024)	0,017 (± 0,012)		
	* (0,021)		** (0,001)				** (0,000)	** (0,003)
		* (0,046)		** (0,003)				
HPV 31 L1	n.d.	n.d.	n.d.	0,028 (± 0,023)	0,023 (± 0,023)			
	entfällt		entfällt					
		entfällt		* (0,046)				
HPV 45 L1	n.d.	n.d.	n.d.	0,025 (± 0,022)	0,021 (± 0,023)			
	entfällt		entfällt					
		entfällt		n.s. (0,156)				

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der prozentualen Anteile Antigen spezifischer IL-2 produzierender TH-Zellen an der Gesamtmenge aller CD4+ T-Zellen für alle untersuchten HPV-Typen einschließlich Negativ- und Positivkontrolle. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den BE-Zeitpunkten ist durch p-Werte dargestellt: n.s. = nicht signifikant, * = unkorrigiert signifikant, ** = signifikant nach Bonferroni-Korrektur. HPV = Humanes Papillomvirus, L1 = engl. late protein 1, IL-2 = Interleukin-2, BE = Blutentnahme, SD = engl. standard deviation, SEB = Staphylokokkus Enterotoxin B, n.d. = nicht durchgeführt

3.2.2.3 Interferon- γ

Die in Tabelle 4 dargestellten Ergebnisse des zweiten untersuchten Interleukins IFN- γ waren qualitativ mit denen des IL-2 vergleichbar: Die gemittelten Werte der Messungen direkt nach Impfung (BE 2, 3, 4) zeigten für alle HPV-Typen hochsignifikante Unterschiede im Vergleich zum Nullwert ($p = 0,000$ bis $0,003$). Sechs Monate nach der letzten Impfung war der Unterschied für HPV 6, 11 und 16 statistisch immer noch hochsignifikant ($p < 0,001 - 0,002$). Für HPV 18 ließ sich eine Tendenz in dieselbe Richtung zeigen, der p-Wert lag mit $0,066$ jedoch knapp außerhalb des Konfidenzintervalls von 95%. Die maximal erreichten Werte liegen für IFN- γ quantitativ unter denen für IL-2, es lassen sich jedoch wiederum die höchsten Werte für HPV 6 ($0,039\%$) und die niedrigsten Werte für HPV 18 ($0,016\%$) messen. HPV 11 und HPV 16 liegen mit Werten von $0,029\%$ bzw. $0,026\%$ zwischen den beiden genannten.

In Monat 7 erreichen HPV 31 und HPV 45 mit Werten von $0,019\%$ bzw. $0,012\%$ etwa 70% - 75% der Werte ihrer verwandten Typen HPV 16 und 18. In Monat 12 liegen die T-Zell Frequenzen gegen HPV 31 bei ca. 68% derer gegen HPV 16, diejenigen gegen HPV 45 übersteigen die gegen HPV 18, wie bereits für IL-2 gezeigt, um das 1,3-fache ($0,009\%$ vs. $0,007\%$).

Tab. 4: Anstieg IFN- γ -produzierender, spezifischer T-Helfer-Zellen gegen HPV 6,11, 16, 18, 31 und 45 in der Gardasil-Gruppe abhängig vom untersuchten HPV-Typ.

Antigen (Gardasil, INF γ)	BE 1 Mittelwert (+/-SD)	BE 2 Mittelwert (+/-SD)	BE 3 Mittelwert (+/-SD)	BE 4 Mittelwert (+/-SD)	BE 5 Mittelwert (+/-SD)	BE 2+3+4 /3 Mittelwert	BE 1 vs. BE 2+3+4	BE 1 vs. BE 5
T-Zell-Kontrolle	0 ($\pm 0,000$)	0,001 ($\pm 0,011$)	0 ($\pm 0,000$)					
	n.s. (1,000)		n.s. (1,000)				n.s. (1,000)	n.s.(0,180)
	n.s. (1,000)		n.s. (0,109)					
SEB-Kontrolle	1,01 ($\pm 0,74$)	1,07 ($\pm 0,72$)	1,19 ($\pm 0,78$)	2,83 ($\pm 2,59$)	1,73 ($\pm 1,58$)	1,64 ($\pm 1,13$)		
	n.s. (0,551)		* (0,004)				* (0,006)	* (0,016)
	n.s. (0,245)		n.s. (0,056)					
HPV 6 L1	0,001 ($\pm 0,002$)	0,006 ($\pm 0,005$)	0,013 ($\pm 0,010$)	0,039 ($\pm 0,032$)	0,025 ($\pm 0,027$)	0,019 ($\pm 0,013$)		
	** (0,005)		** (0,004)				** (0,000)	** (0,002)
	* (0,023)		* (0,011)					
HPV 11 L1	0 ($\pm 0,000$)	0,007 ($\pm 0,006$)	0,010 ($\pm 0,007$)	0,029 ($\pm 0,024$)	0,020 ($\pm 0,021$)	0,015 ($\pm 0,009$)		
	** (0,004)		* (0,016)				** (0,000)	** (0,001)
	n.s. (0,271)		n.s. (0,064)					
HPV 16 L1	0,001 ($\pm 0,002$)	0,006 ($\pm 0,007$)	0,008 ($\pm 0,008$)	0,026 ($\pm 0,028$)	0,019 ($\pm 0,023$)	0,014 ($\pm 0,015$)		
	* (0,014)		* (0,032)				** (0,001)	** (0,002)
	n.s. (0,453)		n.s. (0,100)					
HPV 18 L1	0 ($\pm 0,000$)	0,001 ($\pm 0,004$)	0,004 ($\pm 0,006$)	0,016 ($\pm 0,019$)	0,007 ($\pm 0,016$)	0,007 ($\pm 0,008$)		
	n.s. (0,157)		* (0,019)				** (0,003)	n.s.(0,066)
	n.s. (0,096)		** (0,006)					
HPV 31 L1	n.d.	n.d.	n.d.	0,019 ($\pm 0,022$)	0,013 ($\pm 0,016$)			
	entfällt		entfällt					
	entfällt		* (0,036)					
HPV 45 L1	n.d.	n.d.	n.d.	0,012 ($\pm 0,019$)	0,009 ($\pm 0,011$)			
	entfällt		entfällt					
	entfällt		n.s. (0,202)					

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der prozentualen Anteile Antigen-spezifischer IFN- γ produzierender TH-Zellen an der Gesamtmenge aller CD4+ T-Zellen für alle untersuchten HPV-Typen einschließlich Negativ- und Positivkontrolle. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den BE-Zeitpunkten ist durch p-Werte dargestellt: n.s. = nicht signifikant, * = unkorrigiert signifikant, ** = signifikant nach Bonferroni-Korrektur, HPV = Humanes Papillomvirus, L1 = engl. late protein 1, IFN- γ = Interferon- γ , BE = Blutentnahme, SD = engl. standard deviation, SEB = Staphylokokkus Enterotoxin B, n.d. = nicht durchgeführt

3.2.2.4 Interleukin-4

Wie aus Tabelle 5 ersichtlich wird, zeigten sich in der IL-4 Färbung im Vergleich zu der IL-2 und IFN- γ Färbung weniger überzeugende Ergebnisse. Die Frequenzen der IL-4+ T-Zellen sind zu jedem Zeitpunkt gering und nur knapp über der Sensitivitätsgrenze des Ex-Vivo-Assays. Zwar sind die gemittelten Werte nach Impfung (BE 2, 3, 4) im Vergleich zum Nullwert für HPV 6, 11 und 18 statistisch signifikant und für HPV 16 mit $p = 0,066$ auch als tendenziell signifikant anzusehen, der Effekt hebt sich jedoch 6 Monate nach der letzten Impfung für alle HPV Typen komplett auf, so dass kein Unterschied zwischen BE 1 und BE 5 nachweisbar ist. Da durch Voruntersuchungen ein solches Ergebnis zu erwarten war, wurde auf eine Testung gegen HPV 31 und 45 in dieser Färbung verzichtet.

Tab. 5: Anstieg IL-4-produzierender, spezifischer T-Helfer-Zellen gegen HPV 6, 11, 16 und 18 in der Gardasil-Gruppe abhängig vom untersuchten HPV-Typ.

Antigen (Gardasil, IL4)	BE 1 Mittelwert (+/-SD)	BE 2 Mittelwert (+/-SD)	BE 3 Mittelwert (+/-SD)	BE 4 Mittelwert (+/-SD)	BE 5 Mittelwert (+/-SD)	BE 2+3+4 /3 Mittelwert	BE 1 vs. BE 2+3+4	BE1 vs. BE 5
T-Zell-Kontrolle	0 ($\pm 0,000$)	0 ($\pm 0,000$)	0,001 ($\pm 0,002$)	0,001 ($\pm 0,003$)	0,002 ($\pm 0,004$)	0,001 ($\pm 0,002$)		
	n.s. (1,000)		n.s. (0,564)				n.s. (0,317)	n.s.(1,000)
	n.s. (0,317)		n.s. (0,564)					
HPV 6 L1	0,000 ($\pm 0,000$)	0,004 ($\pm 0,005$)	0,007 ($\pm 0,008$)	0,021 ($\pm 0,027$)	0,005 ($\pm 0,011$)	0,011 ($\pm 0,014$)		
	n.s. (0,157)		n.s. (0,059)				* (0,017)	n.s.(1,000)
	n.s. (0,248)		* (0,040)					
HPV 11 L1	0 ($\pm 0,000$)	0,004 ($\pm 0,007$)	0,009 ($\pm 0,010$)	0,015 ($\pm 0,018$)	0,005 ($\pm 0,011$)	0,010 ($\pm 0,010$)		
	n.s. (0,102)		n.s. (0,320)				* (0,018)	n.s.(1,000)
	n.s. (0,054)		n.s. (0,078)					
HPV 16 L1	0,000 ($\pm 0,000$)	0,003 ($\pm 0,006$)	0,004 ($\pm 0,005$)	0,014 ($\pm 0,022$)	0,004 ($\pm 0,011$)	0,008 ($\pm 0,012$)		
	n.s. (0,102)		* (0,036)				n.s. (0,066)	n.s.(1,000)
	n.s. (0,655)		n.s. (0,075)					
HPV 18 L1	0 ($\pm 0,000$)	0,001 ($\pm 0,003$)	0,002 ($\pm 0,004$)	0,006 ($\pm 0,008$)	0,003 ($\pm 0,007$)	0,003 ($\pm 0,004$)		
	n.s. (0,317)		n.s. (0,160)				* (0,046)	n.s.(1,000)
	n.s. (0,317)		n.s. (0,059)					

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der prozentualen Anteile Antigen-spezifischer IL-4 produzierender TH-Zellen an der Gesamtmenge aller CD4+ T-Zellen für alle untersuchten HPV-Typen einschließlich der Negativkontrolle. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den BE-Zeitpunkten ist durch p-Werte dargestellt: n.s. = nicht signifikant, * = unkorrigiert signifikant, ** = signifikant nach Bonferroni-Korrektur. HPV = Humanes Papillomvirus, L1 = engl. late protein 1, IL-4 = Interleukin-4, BE = Blutentnahme, SD = engl. standard deviation

3.2.3 Auswertung der T-Zell-Frequenzen für Cervarix

3.2.3.1 Übersicht

Zur ersten Übersicht der in der Cervarix-Gruppe erzielten Ergebnisse, zeigt Abbildung 10 in einer Boxplot-Darstellung die induzierte zelluläre Immunität gegen HPV 6, 11, 16 und 18 zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Impfzyklus. Dargestellt ist dabei der Anteil an CD4+ TH-Zellen, der spezifisch gegen das jeweils aufgeführte Antigen gebildet wird (CD4+/ CD154+/ IL-2+ T-Zellen).

In der Cervarix-Gruppe lagen die, an dieser Stelle nicht gezeigten, Mittelwerte der Negativkontrollen zu allen gemessenen Zeitpunkten und für alle untersuchten Interleukine (IL-2, IFN- γ , IL-4) konstant bei < 0,01%. Analog zum Trend in der Gardasil-Gruppe kam es auch bei den mit Cervarix geimpften Probandinnen im Verlauf des Impfzyklus zu einem stetigen Anstieg der T-Zell-Frequenzen in der SEB-Kontrolle. Diese waren in Monat 7 signifikant höher als vor Beginn der Impfungen, fielen jedoch im weiteren Verlauf wieder ab, so dass sie sich in Monat 12 nicht mehr signifikant von denen vor Beginn der Impfungen unterschieden (vgl. Tab 6).

Wie aus Abbildung 10 ersichtlich, kommt es bei Cervarix-geimpften Probandinnen bereits nach der ersten Impfung zu einem Anstieg der T-Zell-Frequenzen gegen HPV 6, 11, 16 und 18, obwohl keine VLPs von HPV 6 und 11 im Impfstoff enthalten sind. Die Frequenzen steigern sich nach jeder folgenden Impfung, so dass die Maximalwerte für alle vier untersuchten HPV-Typen in Monat 7 erreicht werden. Die zelluläre Immunantwort gegen High-Risk-Typen ist dabei höher als die gegen Low-Risk-Typen, wobei insbesondere gegen HPV 16 eine starke T-Zell-Antwort induziert wird. Die T-Zell-Frequenzen gegen die beiden Low-Risk-Typen 6 und 11 sind zwar schwächer ausgeprägt als diejenigen gegen HPV 16 und 18, bewegen sich aber insgesamt auf einem relativ hohen Niveau, was dazu führt, dass gegen HPV 11 nur leicht niedrigere T-Zell-Raten als gegen HPV 18 erreicht werden. Gegen HPV 6 wird in der Cervarix-Gruppe mit Abstand die schwächste T-Zell-Antwort ausgebildet. In der Cervarix-Gruppe kam es bei einer Probandin, sowohl in Monat 7 als auch in Monat 12, zu keiner messbaren T-Zell-Antwort gegen mehrere HPV-Typen (s. Kap. 3.2.5).

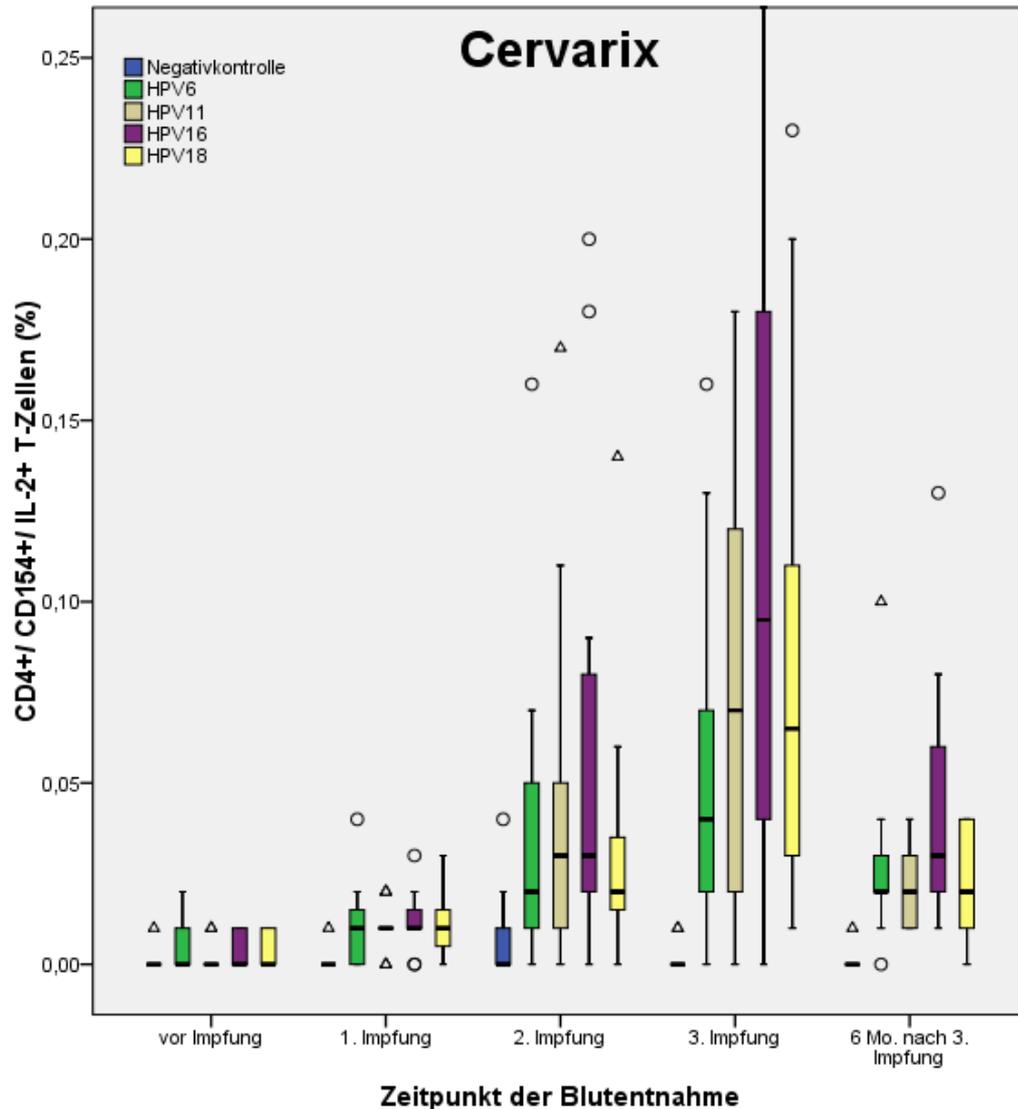


Abb. 10: Anstieg IL-2-produzierender, spezifischer T-Helfer-Zellen gegen HPV 6,11, 16 oder 18 in der Cervarix-Gruppe abhängig vom Impfstatus der Probandinnen.

Gezeigt sind die prozentualen Anteile HPV 6, 11, 16 und 18 L1-spezifischer IL-2-positiver TH-Zellen an der Gesamtmenge aller CD4+ T-Zellen. Die Box beschreibt den Bereich, in dem 50 % aller Ergebnisse der jeweiligen Gruppe liegen und entspricht dem Interquartilsabstand (IQR). Die schwarze Markierung innerhalb der Box zeigt den Median, die Whiskers den Bereich des maximal 1,5-fachen IQR's an. Kreise kennzeichnen milde Ausreißer bis zu einem dreifachen IQR, Dreiecke extreme Ausreißer oberhalb des dreifachen IQR. Aus graphischen Gründen wurde der obere Whisker bei HPV 16 nach dritter Impfung nicht vollständig dargestellt (Wert: 0,37, keine Ausreißer oberhalb dieses Wertes). HPV = humanes Papillomvirus, IL-2 = Interleukin-2

3.2.3.2 Interleukin-2

Die maximalen Frequenzen an CD4+/ CD154+/ IL-2+ T-Zellen wurden direkt nach der dritten Impfung erreicht. Tabelle 6 zeigt, dass die höchste Antwort bei den High-Risk-Typen mit 0,126% gegen HPV 16 gemessen wurde und HPV 18 mit Werten von 0,081% deutlich niedriger lag. Überraschenderweise waren auch

T-Zellen gegen Low-Risk-Typen, und dort insbesondere gegen HPV 11, messbar. Mit Werten von 0,075% lag die T-Zell-Antwort gegen diesen HPV-Typ zahlenmäßig nur leicht unterhalb derer gegen HPV 18, wohingegen die Antwort gegen HPV 6 mit 0,054% am geringsten von allen gemessenen HPV-Typen ausgeprägt war (HPV 16 >18> 11> 6). Die gemittelten Werte von BE 2+3+4 zeigen für alle Typen signifikant höhere Werte als zum Zeitpunkt vor Beginn des Impfzyklus. Bis Monat 12 fallen die Frequenzen der spezifischen T-Zellen gegen HPV 11, 16 und 18 signifikant ab (vgl. BE4 und BE5), HPV 6 ist der einzige HPV-Typ, gegen den die Frequenzen nicht signifikant fallen. In Monat zwölf ergibt sich dadurch die höchste T-Zell Antwort für HPV 16 > 6 > 11=18, wobei alle Antworten im Vergleich zur Höhe vor der ersten Impfung als hochsignifikant höher anzusehen sind ($p = 0,003$ bis $0,005$).

In Monat 7 ließen sich für HPV 31 und 45 mit jeweils ca. 0,070%, Frequenzen in Höhe von 53% bzw. 83% derjenigen gegen HPV 16 bzw. 18 messen. Die T-Zell-Zahlen fallen im Folgenden für HPV 16 und HPV 31 etwa im gleichen Umfang ab, wodurch das Verhältnis in Monat 12 dem aus Monat 7 entspricht. Die Frequenzen gegen HPV 18 sinken im Vergleich zu denen gegen HPV 45 im Verlauf stärker ab, so dass in Monat 12 um 2,2-fach höhere T-Zell Zahlen gegen HPV 45 im Vergleich zu denen gegen HPV 18 messbar sind.

Tab. 6: Anstieg IL-2-produzierender, spezifischer T-Helfer-Zellen gegen HPV 6,11, 16, 18, 31 und 45 in der Cervarix-Gruppe abhängig vom untersuchten HPV-Typ.

Antigen (Cervarix, IL2)	BE 1 Mittelwert (+/-SD)	BE 2 Mittelwert (+/-SD)	BE 3 Mittelwert (+/-SD)	BE 4 Mittelwert (+/-SD)	BE 5 Mittelwert (+/-SD)	BE 2+3+4 /3 Mittelwert	BE 1 vs. BE 2+3+4	BE1 vs. BE 5
T-Zell-Kontrolle	0,001 (± 0,003)	0,001 (± 0,003)	0,006 (± 0,012)	0,001 (± 0,004)	0,001 (± 0,003)	0,003 (± 0,005)		
	n.s. (0,317)		n.s. (0,059)				n.s. (0,066)	n.s.(0,317)
	* (0,039)		n.s. (1,000)					
SEB-Kontrolle	4,42 (± 3,50)	5,28 (± 4,00)	7,97 (± 5,43)	8,49 (± 5,57)	4,23 (± 3,08)	7,04 (± 3,96)		
	n.s. (0,091)		n.s. (0,730)				* (0,033)	n.s.(0,594)
	n.s. (0,245)		* (0,013)					
HPV 6 L1	0,005 (± 0,007)	0,011 (± 0,011)	0,036 (± 0,041)	0,054 (± 0,047)	0,028 (± 0,026)	0,032 (± 0,028)		
	* (0,047)		n.s. (0,088)				** (0,008)	** (0,005)
	* (0,016)		n.s. (0,139)					
HPV 11 L1	0,002 (± 0,004)	0,010 (± 0,007)	0,042 (± 0,046)	0,075 (± 0,055)	0,022 (± 0,012)	0,040 (± 0,030)		
	** (0,006)		* (0,032)				** (0,003)	** (0,003)
	** (0,003)		* (0,016)					
HPV 16 L1	0,004 (± 0,005)	0,012 (± 0,008)	0,056 (± 0,063)	0,126 (± 0,117)	0,046 (± 0,036)	0,061 (± 0,054)		
	* (0,013)		** (0,008)				** (0,008)	** (0,005)
	** (0,010)		* (0,023)					
HPV 18 L1	0,003 (± 0,005)	0,011 (± 0,009)	0,033 (± 0,037)	0,081 (± 0,070)	0,022 (± 0,015)	0,042 (± 0,037)		
	* (0,014)		** (0,010)				** (0,005)	** (0,004)
	* (0,016)		* (0,009)					
HPV 31 L1	n.d.	n.d.	n.d.	0,069 (± 0,049)	0,023 (± 0,016)			
	entfällt		entfällt					
	entfällt		* (0,018)					
HPV 45 L1	n.d.	n.d.	n.d.	0,068 (± 0,064)	0,049 (± 0,085)			
	entfällt		entfällt					
	entfällt		n.s. (0,161)					

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der prozentualen Anteile Antigen-spezifischer IL2-produzierender TH-Zellen an der Gesamtmenge aller CD4-positiven T-Zellen für alle untersuchten HPV-Typen einschließlich Negativ- und Positivkontrolle. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den BE-Zeitpunkten ist durch p-Werte dargestellt: n.s. = nicht signifikant, * = unkorrigiert signifikant, ** = signifikant nach Bonferroni-Korrektur, HPV = Humanes Papillomvirus, L1 = engl. late protein 1, SD = engl. standard deviation, IL-2 = Interleukin-2, BE = Blutentnahme, n.d. = nicht durchgeführt

3.2.3.3 Interferon- γ

Wie aus Tabelle 7 ersichtlich, zeigen sich in der IFN- γ Färbung qualitativ ähnliche Ergebnisse wie in der IL-2 Färbung: Die höchsten T-Zell-Frequenzen lassen sich für HPV 16 (0,048%), gefolgt von HPV 18 (0,030%) und schließlich den Low-Risk-Typen HPV 11 (0,029%) und HPV 6 (0,023%) nachweisen. Für alle vier Typen sind die Unterschiede zwischen dem Nullwert (BE1) und den gemittelten Werten, die während des Impfzyklus erhoben wurden (BE 2+3+4), statistisch signifikant. Diese bleiben auch 6 Monate nach der letzten Impfung mit Werten von 0,006% (HPV 18) bis 0,014% (HPV 16) signifikant oberhalb derer zu Beginn der Studie.

Die T-Zell-Antwort gegen HPV 31 erreicht sowohl in Monat 7, als auch in Monat 12 etwa 60% der Frequenzen derer gegen HPV 16. Gegen HPV 45 werden im Durchschnitt geringere T-Zell-Zahlen erzielt als gegen HPV 31, diese erreichen jedoch in Monat 7 bereits 80% der T-Zell-Frequenzen derer gegen den nahe verwandten Typ HPV 45 und gleichen sich diesen in Monat 12 sogar vollständig an.

Tab. 7: Anstieg IFN- γ -produzierender, spezifischer T-Helfer-Zellen gegen HPV 6,11, 16, 18, 31 oder 45 in der Cervarix-Gruppe abhängig vom untersuchten HPV-Typ.

Antigen (Cervarix, INF γ)	BE 1 Mittelwert (+/-SD)	BE 2 Mittelwert (+/-SD)	BE 3 Mittelwert (+/-SD)	BE 4 Mittelwert (+/-SD)	BE 5 Mittelwert (+/-SD)	BE 2+3+4 /3 Mittelwert	BE 1 vs. BE 2+3+4	BE 1 vs. BE 5
T-Zell-Kontrolle	0,000 (\pm 0,000)	0,000 (\pm 0,000)	0,001 (\pm 0,003)	0,000 (\pm 0,000)	0,001 (\pm 0,003)	0,000 (\pm 0,001)		
	n.s. (1,000)		n.s. (0,317)				n.s. (0,317)	n.s.(0,317)
		n.s. (0,317)		n.s. (0,317)				
SEB-Kontrolle	1,54 (\pm 1,77)	1,83 (\pm 1,60)	2,82 (\pm 2,12)	3,33 (\pm 2,48)	1,86 (\pm 1,49)	2,58 (\pm 1,64)		
	n.s. (0,075)		n.s. (0,379)				* (0,021)	n.s.(0,155)
		n.s. (0,140)		* (0,026)				
HPV 6 L1	0,003 (\pm 0,005)	0,001 (\pm 0,004)	0,017 (\pm 0,025)	0,023 (\pm 0,019)	0,007 (\pm 0,006)	0,013 (\pm 0,014)		
	n.s. (1,000)		n.s. (0,244)				* (0,016)	** (0,011)
		* (0,019)		* (0,017)				
HPV 11 L1	0,000 (\pm 0,000)	0,001 (\pm 0,004)	0,014 (\pm 0,022)	0,029 (\pm 0,022)	0,007 (\pm 0,006)	0,014 (\pm 0,013)		
	n.s. (0,157)		* (0,017)				** (0,007)	** (0,011)
		* (0,039)		* (0,012)				
HPV 16 L1	0,000 (\pm 0,000)	0,003 (\pm 0,005)	0,024 (\pm 0,031)	0,048 (\pm 0,042)	0,014 (\pm 0,011)	0,024 (\pm 0,022)		
	* (0,046)		** (0,009)				** (0,007)	* (0,023)
		* (0,017)		* (0,021)				
HPV 18 L1	0,001 (\pm 0,003)	0,001 (\pm 0,004)	0,011 (\pm 0,011)	0,030 (\pm 0,024)	0,006 (\pm 0,008)	0,014 (\pm 0,013)		
	n.s. (0,317)		** (0,007)				** (0,005)	* (0,038)
		** (0,008)		* (0,014)				
HPV 31 L1	n.d.	n.d.	n.d.	0,030 (\pm 0,022)	0,008 (\pm 0,006)			
	entfällt		entfällt					
		entfällt		* (0,016)				
HPV 45 L1	n.d.	n.d.	n.d.	0,024 (\pm 0,026)	0,006 (\pm 0,009)			
	entfällt		entfällt					
		entfällt		* (0,027)				

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der prozentualen Anteile Antigen-spezifischer IFN- γ produzierender TH-Zellen an der Gesamtmenge aller CD4-positiven T-Zellen für alle untersuchten HPV-Typen einschließlich Negativ- und Positivkontrolle. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den BE-Zeitpunkten ist durch p-Werte dargestellt: n.s. = nicht signifikant, * = unkorrigiert signifikant, ** = signifikant nach Bonferroni-Korrektur, HPV = Humanes Papillomvirus, L1 = engl. late protein 1, SD = engl. standard deviation, IFN- γ = Interferon- γ , BE = Blutentnahme, n.d. = nicht durchgeführt

3.2.3.4 Interleukin-4

Bezüglich der maximal erreichten T-Zell-Zahlen in der IL-4 Färbung lässt sich aus Tabelle 8 ablesen, dass diese deutlich unter denen der IL-2 und IFN- γ Färbung liegen: HPV 16 erreicht auch hier die höchsten T-Zell-Frequenzen (0,017%), wohingegen die anderen drei Typen mit Antworten um 0,010% alle weit unterhalb derer gegen HPV 16 liegen. Trotz der quantitativ geringen Zahlen lässt sich in den gemittelten Werten der BE's 2, 3 und 4 im Vergleich zum Nullwert für alle gemessenen HPV-Typen ein signifikanter Unterschied zeigen. Sechs Monate nach der dritten Impfung sinken die T-Zell Zahlen jedoch für alle Typen soweit ab, dass sie sich nicht mehr signifikant von denen vor Impfung unterscheiden. Analog zur Gardasil-Gruppe wurde auch in der Cervarix-Gruppe auf eine Untersuchung der Typen 31 und 45 in der IL-4 Färbung verzichtet.

Tab. 8: Anstieg IL-4-produzierender, spezifischer T-Helfer-Zellen gegen HPV 6,11, 16 oder 18 in der Cervarix-Gruppe abhängig vom untersuchten HPV-Typ.

Antigen (Cervarix, IL4)	BE 1 Mittelwert (+/-SD)	BE 2 Mittelwert (+/-SD)	BE 3 Mittelwert (+/-SD)	BE 4 Mittelwert (+/-SD)	BE 5 Mittelwert (+/-SD)	BE 2+3+4 /3 Mittelwert	BE 1 vs. BE 2+3+4	BE1 vs. BE 5
T-Zell-Kontrolle	0,002 (± 0,004)	0,001 (± 0,004)	0,003 (± 0,006)	0,001 (± 0,003)	0,003 (± 0,006)	0,002 (± 0,003)		
	n.s. (0,564)		n.s. (0,257)				n.s. (0,679)	n.s.(0,180)
	n.s. (0,317)			n.s. (0,317)				
HPV 6 L1	0,000 (± 0,000)	0,001 (± 0,004)	0,011 (± 0,018)	0,009 (± 0,011)	0,003 (± 0,005)	0,007 (± 0,008)		
	n.s. (0,157)		n.s. (0,777)				** (0,005)	n.s.(0,705)
	* (0,020)			n.s. (1,000)				
HPV 11 L1	0,000 (± 0,000)	0,001 (± 0,003)	0,011 (± 0,018)	0,010 (± 0,011)	0,003 (± 0,005)	0,007 (± 0,008)		
	n.s. (0,317)		n.s. (0,625)				** (0,007)	n.s.(0,705)
	** (0,010)			n.s. (0,157)				
HPV 16 L1	0,001 (± 0,003)	0,001 (± 0,004)	0,014 (± 0,019)	0,017 (± 0,021)	0,003 (± 0,001)	0,010 (± 0,010)		
	n.s. (0,317)		n.s. (0,604)				** (0,007)	n.s.(0,655)
	** (0,011)			* (0,024)				
HPV 18 L1	0,000 (± 0,000)	0,001 (± 0,004)	0,012 (± 0,014)	0,010 (± 0,010)	0,001 (± 0,003)	0,007 (± 0,006)		
	n.s. (0,157)		n.s. (0,619)				** (0,007)	n.s.(0,317)
	* (0,022)			n.s. (0,063)				

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der prozentualen Anteile Antigen-spezifischer IL-4-produzierender TH-Zellen an der Gesamtmenge aller CD4-positiven T-Zellen für alle untersuchten HPV-Typen einschließlich Negativ- und Positivkontrolle. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den BE-Zeitpunkten ist durch p-Werte dargestellt: n.s. = nicht signifikant, * = unkorrigiert signifikant, ** = signifikant nach Bonferroni-Korrektur, HPV = Humanes Papillomvirus, L1 = engl. late protein 1, SD = engl. standard deviation, IL-4 = Interleukin-4, BE = Blutentnahme

3.2.4 Vergleich der T-Zell-Frequenzen (Gardasil vs. Cervarix)

3.2.4.1 Negativ- und Positivkontrolle

Aus Tabelle 9 ist zu entnehmen, dass sich die T-Zell-Frequenzen zu Beginn der Studie, d.h. vor prophylaktischer HPV-Impfung, sowohl in der Negativ- als auch in der Positivkontrolle nicht signifikant zwischen den beiden untersuchten Gruppen unterschieden. Die erreichten Werte in der Negativ-Kontrolle lagen bei fast allen Probandinnen bei <0,001%. Einzige Ausnahme bildet eine Probandin der Cervarix-Gruppe, die mit einem Wert von 0,01% minimal positiv war. In der

Positiv-Kontrolle (SEB) zeigte sich während des Impfzyklus ein Anstieg der gemessenen T-Zellen, der in der Cervarix-Gruppe insgesamt etwas ausgeprägter und in der dritten BE statistisch signifikant höher war. Dem Maximum in der Positiv-Antwort zum Zeitpunkt der vierten BE folgte ein zwischen beiden Gruppen nicht signifikant unterschiedlicher Abfall der T-Zell-Frequenzen, so dass sich die Werte in Monat 12 wieder denen vor Impfung angleichen. Die gemessenen CD4+/CD154+/ IL-2+ T-Zellen gegen HPV 6, 11, 16 und 18 lagen zu Beginn der Studie im Mittel in beiden Gruppen jeweils < 0,01% und lagen damit im Bereich der Negativ-Kontrolle. In beiden Gruppen waren zu diesem Zeitpunkt max. sechs Probandinnen leicht positiv für einen oder mehrere HPV-Typen (Frequenzen $\leq 0,02\%$), die meisten von ihnen für HPV 6 oder 16. Weder für die Kontrollen, noch für die gemessenen HPV-Typen ergab sich vor Impfung ein statistisch signifikanter Unterschied der Memory T-Zell-Frequenzen zwischen beiden Gruppen (vgl. Tab. 9-11).

Tab. 9: Vergleich beider Impfstoffe hinsichtlich der erzielten CD4+/ CD154+/ IL-2+ T-Zell-Frequenzen in der Negativ- und Positiv-Kontrolle abhängig vom Impfstatus der Probandinnen.

IL-2		BE 1 Mittelwert (\pm SD)	BE 2 Mittelwert (\pm SD)	BE 3 Mittelwert (\pm SD)	BE 4 Mittelwert (\pm SD)	BE 5 Mittelwert (\pm SD)	BE 2+3+4 Mittelwert (\pm SD)
Negativ - Kontrolle	Gardasil	0 (\pm 0,000)	0,001 (\pm 0,003)	0,003 (\pm 0,008)	0,003 (\pm 0,008)	0,005 (\pm 0,008)	0,003 (\pm 0,005)
	Cervarix	0,001 (\pm 0,003)	0,001 (\pm 0,003)	0,006 (\pm 0,012)	0,001 (\pm 0,004)	0,001 (\pm 0,003)	0,003 (\pm 0,005)
	Signifikanz	n.s. (0,711)	n.s. (0,983)	n.s. (0,357)	n.s. (0,822)	n.s. (0,180)	n.s. (0,630)
Positiv - Kontrolle (SEB)	Gardasil	3,07 (\pm 2,42)	3,47 (\pm 2,10)	3,61 (\pm 2,08)	6,85 (\pm 4,56)	3,50 (\pm 3,35)	4,58 (\pm 2,35)
	Cervarix	4,42 (\pm 3,50)	5,28 (\pm 4,00)	7,97 (\pm 5,43)	8,49 (\pm 5,57)	4,23 (\pm 3,08)	7,04 (\pm 3,96)
	Signifikanz	n.s. (0,347)	n.s. (0,270)	* (0,016)	n.s. (0,377)	n.s. (0,443)	n.s. (0,067)

Dargestellt sind die Unterschiede zwischen beiden Impfstoffen, spezifische IL-2 - produzierende TH-Zellen in der Negativ- und Positivkontrolle zu induzieren. Die Signifikanz ist durch p-Werte dargestellt: n.s. = nicht signifikant, * = unkorrigiert signifikant für $p < 0,05$. SD = engl. standard deviation, IL-2 = Interleukin-2, BE = Blutentnahme, SEB = Staphylokokken Enterotoxin B

3.2.4.2 Interleukin-2

Bezüglich der untersuchten High-Risk-Typen 16 und 18 zeigte sich ein deutlicher quantitativer Unterschied in der T-Zell-Antwort zwischen beiden Gruppen. Für HPV 16 lässt sich bereits nach der zweiten Impfung (BE3) ein höherer Mittelwert bei Cervarix-geimpften (0,056%) im Vergleich zu den Gardasil-geimpften (0,020%) Probandinnen erkennen, der nach der dritten Impfung nochmals deutlicher hervortritt: Bei Werten von 0,126% ist die durch Cervarix induzierte T-Zell-Antwort etwa 2,7-fach höher als die durch Gardasil induzierte (0,049%). Der entsprechende p-Wert von 0,077 weist dabei den statistischen Trend zu höheren Werten in der Cervarix-Gruppe nach. Betrachtet man die gegen HPV 18 erzielten Frequenzen, fällt auf, dass Cervarix analog zu den Ergebnissen für HPV 16 bereits nach der zweiten Impfung (BE3) deutlich höhere T-Zell-Raten induziert als Gardasil. Zu diesem Zeitpunkt ist der Unterschied zwischen beiden bei Werten von 0,033% bzw. 0,013% bereits statistisch signifikant. Ein signifikanter Unterschied lässt sich auch direkt nach der dritten Impfung (BE4) feststellen, wo Cervarix mit maximalen Frequenzen von 0,081% aller CD4+ T-Zellen ca. 2,8-fach mehr

T-Zellen induziert als Gardasil mit 0,031%. Nach Erreichen der Maximalwerte in Monat 7 fallen die Frequenzen für HPV 16 und 18 in der Cervarix-Gruppe relativ zu denen der Gardasil-Gruppe stärker ab, wodurch in Monat 12 zwischen beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede mehr feststellbar sind (s. Tabelle 10).

Tab. 10: Vergleich beider Impfstoffe hinsichtlich der erzielten CD4+/ CD154+/ IL-2+ T-Zell-Frequenzen gegen HPV 16 und HPV 18 abhängig vom Impfstatus der Probandinnen.

IL-2		BE 1 Mittelwert (± SD)	BE 2 Mittelwert (± SD)	BE 3 Mittelwert (± SD)	BE 4 Mittelwert (± SD)	BE 5 Mittelwert (± SD)	BE 2+3+4 Mittelwert (± SD)
HPV 16 L1	Gardasil	0,004 (± 0,005)	0,014 (± 0,013)	0,020 (± 0,013)	0,049 (± 0,035)	0,038 (± 0,047)	0,029 (± 0,017)
	Cervarix	0,004 (± 0,005)	0,012 (± 0,008)	0,056 (± 0,063)	0,126 (± 0,117)	0,046 (± 0,036)	0,061 (± 0,054)
	Signifikanz	n.s. (0,777)	n.s. (0,847)	n.s. (0,120)	n.s. (0,077)	n.s. (0,217)	n.s. (0,126)
HPV 18 L1	Gardasil	0,001 (± 0,003)	0,007 (± 0,007)	0,013 (± 0,010)	0,031 (± 0,024)	0,018 (± 0,024)	0,017 (± 0,012)
	Cervarix	0,003 (± 0,005)	0,011 (± 0,009)	0,033 (± 0,037)	0,081 (± 0,070)	0,022 (± 0,015)	0,042 (± 0,037)
	Signifikanz	n.s. (0,347)	n.s. (0,331)	* (0,035)	* (0,028)	n.s. (0,237)	* (0,013)

Dargestellt sind die Unterschiede zwischen beiden Impfstoffen, spezifische IL-2 - produzierende TH-Zellen gegen HPV 16 bzw. HPV 18 zu induzieren. Die Signifikanz ist durch p-Werte dargestellt: n.s. = nicht signifikant, * = unkorrigiert signifikant für $p < 0,05$, ** = signifikant nach Bonferroni-Korrektur für $p < 0,013$ (BE 1, 2, 3) bzw. 0,008 (BE 4, 5), HPV = humanes Papillomvirus, SD = engl. standard deviation, IL-2 = Interleukin-2, BE = Blutentnahme, L1 = engl. late protein 1

In Kapitel 3.2.3 wurde bereits erwähnt, dass es überraschenderweise in der Cervarix-Gruppe zu einem Anstieg der T-Zell-Frequenzen gegen die Low-Risk-Typen HPV 6 und 11 kam. Im Impfverlauf zeigen sich für HPV 6 nach der ersten und zweiten Impfung noch in beiden Impfgruppen vergleichbare Frequenzen der CD4+/ CD154+/ IL-2+ T-Zellen. Nach der dritten Impfung, d.h. zum Zeitpunkt der maximal zu erwartenden Immunogenität, erreicht Gardasil mit Frequenzen von 0,071% im Vergleich zu den durch Cervarix induzierten 0,054% ca. 1,3-fach höhere T-Zell-Raten gegen HPV 6. Bis Monat 12 fallen die Zahlen in der Cervarix-Gruppe im Verhältnis stärker ab, so dass zu diesem Zeitpunkt etwa 1,8-fach so hohe T-Zell-Frequenzen nachweisbar sind. Nach statistischer Analyse ergibt sich zu keinem der gemessenen Zeitpunkte ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Für HPV 11 wird im Vergleich zu HPV 6 in Monat 12 ein ähnliches Verhältnis auf leicht niedrigerem quantitativen Niveau erreicht: Gardasil induziert mit 0,042%

spezifischen T-Zellen etwa 1,9-fach mehr als Cervarix mit 0,022%. Erwähnenswert scheint es, dass Cervarix nach der zweiten und dritten Impfung initial um ca. 1,4-fach höhere Werte als Gardasil erreicht (Cervarix 0,075%, Gardasil 0,055%), bevor sie in Monat 12 auf die oben erwähnten Werte abfallen und dann unterhalb derer von Gardasil liegen. Wie bei HPV 6 ist zu keinem gemessenen Zeitpunkt ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen zu finden (s. Tabelle 11).

Tab. 11: Vergleich beider Impfstoffe hinsichtlich der erzielten CD4+/ CD154+/ IL-2+ T-Zell-Frequenzen gegen HPV 6 und HPV 11 abhängig vom Impfstatus der Probandinnen.

IL-2		BE 1 Mittelwert (± SD)	BE 2 Mittelwert (± SD)	BE 3 Mittelwert (± SD)	BE 4 Mittelwert (± SD)	BE 5 Mittelwert (± SD)	BE 2+3+4 Mittelwert (± SD)
HPV 6 L1	Gardasil	0,004 (± 0,005)	0,015 (± 0,009)	0,031 (± 0,024)	0,071 (± 0,042)	0,049 (± 0,056)	0,039 (± 0,018)
	Cervarix	0,005 (± 0,007)	0,011 (± 0,011)	0,036 (± 0,041)	0,054 (± 0,047)	0,028 (± 0,026)	0,032 (± 0,028)
	Signifikanz	n.s. (0,679)	n.s. (0,172)	n.s. (0,896)	n.s. (0,154)	n.s. (0,330)	n.s. (0,166)
HPV 11 L1	Gardasil	0,002 (± 0,004)	0,014 (± 0,008)	0,028 (± 0,020)	0,058 (± 0,033)	0,042 (± 0,043)	0,034 (± 0,014)
	Cervarix	0,002 (± 0,004)	0,010 (± 0,007)	0,042 (± 0,046)	0,075 (± 0,055)	0,022 (± 0,012)	0,040 (± 0,030)
	Signifikanz	n.s. (0,777)	n.s. (0,172)	n.s. (0,625)	n.s. (0,423)	n.s. (0,148)	n.s. (0,735)

Dargestellt sind die Unterschiede zwischen beiden Impfstoffen, spezifische IL-2 - produzierende TH-Zellen gegen HPV 6 bzw. HPV 11 zu induzieren. Die Signifikanz ist durch p-Werte dargestellt: n.s. = nicht signifikant, * = unkorrigiert signifikant für $p < 0,05$, ** = signifikant nach Bonferroni-Korrektur für $p < 0,013$ (BE 1, 2, 3) bzw. 0,008 (BE 4, 5). HPV = humanes Pailomvirus, SD = engl. standard deviation, IL-2 = Interleukin-2, BE = Blutentnahme, L1 = engl. late protein 1

Vergleicht man beide Gruppen in Hinblick auf ihr Potential CD4+/CD154+/IL-2+ T-Zellen gegen die verwandten HPV Typen 31 und 45 zu induzieren, erkennt man analog zu den High-Risk Typen 16 und 18 in Monat 7 für beide Typen jeweils 2,5 bis 2,7-fach höhere Werte in der Cervarix-Gruppe, die auch statistisch signifikant sind. Quantitativ bewegen sich beide Typen mit Frequenzen um 0,070% (Cervarix) bzw. 0,025% (Gardasil) ungefähr im Bereich der jeweiligen Antwort gegen HPV 18 zum selben Zeitpunkt. Sechs Monate nach der letzten Impfung fallen die Werte in

der Cervarix-Gruppe für HPV 31 stark ab und liegen dann etwa gleichauf mit denen der Gardasil-Gruppe. Für HPV 45 bleiben sie in Monat 12 mit 0,049% ca. 2,7-fach oberhalb der durch Gardasil erreichten (0,018%) und zudem sogar weit oberhalb des durch Cervarix erreichten Wertes gegen das im Impfstoff enthaltene HPV 18. Statistisch unterscheiden sich die T-Zell-Antworten für HPV 45 nicht signifikant zwischen beiden Impfgruppen (s. Tabelle 12).

Tab. 12: Vergleich beider Impfstoffe hinsichtlich der erzielten CD4+/ CD154+/ IL-2+ T-Zell-Frequenzen gegen HPV 31 und HPV 45 abhängig vom Impfstatus der Probandinnen.

IL-2		BE 1 Mittelwert (± SD)	BE 2 Mittelwert (± SD)	BE 3 Mittelwert (± SD)	BE 4 Mittelwert (± SD)	BE 5 Mittelwert (± SD)	BE 2+3+4 Mittelwert (± SD)
HPV 31 L1	Gardasil	n.d.	n.d.	n.d.	0,028 (± 0,023)	0,023 (± 0,023)	
	Cervarix	n.d.	n.d.	n.d.	0,069 (± 0,049)	0,023 (± 0,016)	
	Signifikanz	entfällt	entfällt	entfällt	* (0,043)	n.s. (0,574)	
HPV 45 L1	Gardasil	n.d.	n.d.	n.d.	0,025 (± 0,022)	0,021 (± 0,023)	
	Cervarix	n.d.	n.d.	n.d.	0,068 (± 0,064)	0,049 (± 0,085)	
	Signifikanz	entfällt	entfällt	entfällt	* (0,048)	n.s. (0,281)	

Dargestellt sind die Unterschiede zwischen beiden Impfstoffen, spezifische IL-2 - produzierende TH-Zellen gegen HPV 31 bzw. HPV 45 zu induzieren. Die Signifikanz ist durch p-Werte dargestellt: n.s. = nicht signifikant, * = unkorrigiert signifikant für $p < 0,05$, ** = signifikant nach Bonferroni-Korrektur für $p < 0,008$. HPV = humanes Papillomvirus, SD = engl. standard deviation, IL-2 = Interleukin-2, BE = Blutentnahme, L1 = engl. late protein 1, n.d. = nicht durchgeführt

3.2.4.3 Interferon- γ

Tabelle 13 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der IFN- γ Färbung. Bis auf wenige Unterschiede entsprechen die gezeigten Ergebnisse denen der IL-2 Färbung auf geringerem quantitativem Niveau. In der Gardasil-Gruppe werden in Monat 7 gegen den Low-Risk-Typ HPV 6 höhere T-Zell-Frequenzen erreicht als in der Gardasil-Gruppe (statistisch nicht signifikant). Die Werte für HPV 11 sind identisch. Sechs Monate nach der dritten Impfung sinken die Frequenzen in beiden Gruppen ab, erreichen aber in der Gardasil-Gruppe ca. 3,6-fach (HPV 6)

bzw. ca. 2,9-fach (HPV 11) höhere Zahlen als in der Cervarix-Gruppe, wobei diese Unterschiede in Monat 12 für HPV 6 statistisch signifikant und für HPV 11 mit einem p-Wert von $p=0,054$ nahezu signifikant sind.

Tab. 13: Vergleich beider Impfstoffe hinsichtlich der erzielten CD4+/ CD154+/ IFN- γ + T-Zell-Frequenzen gegen HPV 6 und HPV 11 abhängig vom Impfstatus der Probandinnen.

INF- γ		BE 1 Mittelwert (\pm SD)	BE 2 Mittelwert (\pm SD)	BE 3 Mittelwert (\pm SD)	BE 4 Mittelwert (\pm SD)	BE 5 Mittelwert (\pm SD)	BE 2+3+4 Mittelwert (\pm SD)
HPV 6 L1	Gardasil	0,001 (\pm 0,002)	0,006 (\pm 0,005)	0,013 (\pm 0,010)	0,039 (\pm 0,032)	0,025 (\pm 0,027)	0,019 (\pm 0,013)
	Cervarix	0,003 (\pm 0,005)	0,001 (\pm 0,004)	0,017 (\pm 0,025)	0,023 (\pm 0,019)	0,007 (\pm 0,006)	0,013 (\pm 0,014)
	Signifikanz	n.s. (0,394)	* (0,046)	n.s. (0,779)	n.s. (0,120)	* (0,032)	n.s. (0,100)
HPV 11 L1	Gardasil	0 (\pm 0,000)	0,007 (\pm 0,006)	0,010 (\pm 0,007)	0,029 (\pm 0,024)	0,020 (\pm 0,021)	0,015 (\pm 0,009)
	Cervarix	0,000 (\pm 0,000)	0,001 (\pm 0,004)	0,014 (\pm 0,022)	0,029 (\pm 0,022)	0,007 (\pm 0,006)	0,014 (\pm 0,013)
	Signifikanz	n.s. (1,000)	* (0,016)	n.s. (0,597)	n.s. (0,918)	n.s. (0,054)	n.s. (0,605)

Dargestellt sind die Unterschiede zwischen beiden Impfstoffen, spezifische IFN- γ -produzierende TH-Zellen gegen HPV 6 bzw. HPV 11 zu induzieren. Die Signifikanz ist durch p-Werte dargestellt: n.s. = nicht signifikant, * = unkorrigiert signifikant für $p < 0,05$, ** = signifikant nach Bonferroni-Korrektur für $p < 0,013$ (BE 1, 2, 3) bzw. 0,008 (BE 4, 5), HPV = humanes Papillomvirus, SD = engl. standard deviation, IFN- γ = Interferon- γ , BE = Blutentnahme, L1 = engl. late protein 1

Bezüglich der High-Risk Typen kann man aus den Tabellen 14 und 15 ersehen, dass es in Monat 7 einen eindeutigen Trend für höhere Werte in der Cervarix Gruppe gibt. Diese liegen mit Frequenzen von 0,024% – 0,048% für alle gemessenen HR-Typen (HPV 16, 18, 31 und 45) ca. doppelt so hoch wie in der Gardasil-Gruppe. Mit p-Werten von $p < 0,1$ erreichen diese für HPV 16, 18 und 31 nahezu statistische Signifikanz, für HPV 45 liegt der p-Wert mit 0,137 deutlich im nicht-signifikanten Bereich. In Monat 12 pendeln sich die T-Zell-Frequenzen gegen alle High-Risk-Typen in beiden Gruppen auf einem Niveau um ca. 0,01% ein und sind zu diesem Zeitpunkt nicht mehr signifikant unterschiedlich.

Tab. 14: Vergleich beider Impfstoffe hinsichtlich der erzielten CD4+/ CD154+/ IFN γ + T-Zell-Frequenzen gegen HPV 16 und HPV 18 abhängig vom Impfstatus der Probandinnen.

INF- γ		BE 1 Mittelwert (\pm SD)	BE 2 Mittelwert (\pm SD)	BE 3 Mittelwert (\pm SD)	BE 4 Mittelwert (\pm SD)	BE 5 Mittelwert (\pm SD)	BE 2+3+4 Mittelwert (\pm SD)
HPV 16 L1	Gardasil	0,001 (\pm 0,002)	0,006 (\pm 0,007)	0,008 (\pm 0,008)	0,026 (\pm 0,028)	0,019 (\pm 0,023)	0,014 (\pm 0,015)
	Cervarix	0,000 (\pm 0,000)	0,003 (\pm 0,005)	0,024 (\pm 0,031)	0,048 (\pm 0,042)	0,014 (\pm 0,011)	0,024 (\pm 0,022)
	Signifikanz	n.s. (0,811)	n.s. (0,331)	n.s. (0,257)	n.s. (0,120)	n.s. (1,000)	n.s. (0,325)
HPV 18 L1	Gardasil	0 (\pm 0,000)	0,001 (\pm 0,004)	0,004 (\pm 0,006)	0,016 (\pm 0,019)	0,007 (\pm 0,016)	0,007 (\pm 0,008)
	Cervarix	0,001 (\pm 0,003)	0,001 (\pm 0,004)	0,011 (\pm 0,011)	0,030 (\pm 0,024)	0,006 (\pm 0,008)	0,014 (\pm 0,013)
	Signifikanz	n.s. (0,711)	n.s. (0,983)	n.s. (0,079)	n.s. (0,077)	n.s. (0,507)	n.s. (0,062)

Tab. 15: Vergleich beider Impfstoffe hinsichtlich der erzielten CD4+/ CD154+/ IFN- γ + T-Zell-Frequenzen gegen HPV 31 und HPV 45 abhängig vom Impfstatus der Probandinnen.

INF- γ		BE 1 Mittelwert (\pm SD)	BE 2 Mittelwert (\pm SD)	BE 3 Mittelwert (\pm SD)	BE 4 Mittelwert (\pm SD)	BE 5 Mittelwert (\pm SD)	BE 2+3+4 Mittelwert (\pm SD)
HPV 31 L1	Gardasil	n.d.	n.d.	n.d.	0,019 (\pm 0,022)	0,013 (\pm 0,016)	
	Cervarix	n.d.	n.d.	n.d.	0,030 (\pm 0,022)	0,008 (\pm 0,006)	
	Signifikanz	entfällt	entfällt	entfällt	n.s. (0,128)	n.s. (0,919)	
HPV 45 L1	Gardasil	n.d.	n.d.	n.d.	0,012 (\pm 0,019)	0,009 (\pm 0,011)	
	Cervarix	n.d.	n.d.	n.d.	0,024 (\pm 0,026)	0,006 (\pm 0,009)	
	Signifikanz	entfällt	entfällt	entfällt	n.s. (0,141)	n.s. (0,443)	

Dargestellt sind die Unterschiede zwischen beiden Impfstoffen, spezifische IFN- γ -produzierender TH-Zellen gegen HPV 16, 18, 31 bzw. 45 zu induzieren. Die Signifikanz ist durch p-Werte dargestellt: n.s. = nicht signifikant, * = unkorrigiert signifikant für $p < 0,05$, ** = signifikant nach Bonferroni-Korrektur für $p < 0,008$. HPV = humanes Papillomvirus, SD = engl. standard deviation, IFN- γ = Interferon- γ , BE = Blutentnahme, L1 = engl. late protein 1, n.d. = nicht durchgeführt

3.2.4.4 Interleukin-4

Wie aus den Tabellen 16 und 17 ersichtlich, lassen sich in der IL-4 Färbung analog zur IL-2 und IFN- γ Färbung in Monat 7 für die Low-Risk-Typen 6 und 11 höhere T-Zell-Frequenzen in der Gardasil-Gruppe, für die High-Risk-Typen 16 und 18 höhere Frequenzen in der Cervarix-Gruppe erkennen. Diese sind quantitativ insgesamt weit unter denen der anderen Interleukine anzusehen und unterscheiden sich trotz der genannten Unterschiede nicht signifikant. Die Werte fallen sechs Monate nach der letzten Impfung für alle genannten HPV-Typen in beiden Gruppen auf Frequenzen $<0,01\%$ ab und liegen damit im Bereich der Negativkontrolle. Da das verwendete Ex-Vivo-Assay nicht sensitiv genug ist, um T-Zellfrequenzen unter $0,01\%$ zu detektieren, konnte in der vorliegenden Studie kein anhaltender, durch die Impfung induzierter, Effekt auf die Produktion von CD4+/ CD154+/ IL-4+ T-Zellen nachgewiesen werden.

Tab. 16: Vergleich beider Impfstoffe hinsichtlich der erzielten CD4+/ CD154+/ IL-4+ T-Zell-Frequenzen gegen HPV 6 und HPV 11 abhängig vom Impfstatus der Probandinnen.

IL-4		BE 1 Mittelwert (\pm SD)	BE 2 Mittelwert (\pm SD)	BE 3 Mittelwert (\pm SD)	BE 4 Mittelwert (\pm SD)	BE 5 Mittelwert (\pm SD)	BE 2+3+4 Mittelwert (\pm SD)
HPV 6 L1	Gardasil	0,000 (\pm 0,000)	0,004 (\pm 0,005)	0,007 (\pm 0,008)	0,021 (\pm 0,027)	0,005 (\pm 0,011)	0,011 (\pm 0,014)
	Cervarix	0,000 (\pm 0,000)	0,001 (\pm 0,004)	0,011 (\pm 0,018)	0,009 (\pm 0,011)	0,003 (\pm 0,005)	0,007 (\pm 0,008)
	Signifikanz	n.s. (1,000)	n.s. (0,274)	n.s. (0,808)	n.s. (0,170)	n.s. (0,978)	n.s. (0,274)
HPV 11 L1	Gardasil	0 (\pm 0,000)	0,004 (\pm 0,007)	0,009 (\pm 0,010)	0,015 (\pm 0,018)	0,005 (\pm 0,011)	0,010 (\pm 0,010)
	Cervarix	0,000 (\pm 0,000)	0,001 (\pm 0,003)	0,011 (\pm 0,018)	0,010 (\pm 0,011)	0,003 (\pm 0,005)	0,007 (\pm 0,008)
	Signifikanz	n.s. (1,000)	n.s. (0,274)	n.s. (0,837)	n.s. (0,531)	n.s. (0,978)	n.s. (0,325)

Dargestellt sind die Unterschiede zwischen beiden Impfstoffen, spezifische IL-4 - produzierende TH-Zellen gegen HPV 6 bzw. HPV 11 zu induzieren. Die Signifikanz ist durch p-Werte dargestellt: n.s. = nicht signifikant, * = unkorrigiert signifikant für $p < 0,05$, ** = signifikant nach Bonferroni-Korrektur für $p < 0,013$. HPV = humanes Papillomvirus, SD = engl. standard deviation, IL-4 = Interleukin-4, BE = Blutentnahme, L1 = engl. late protein 1

Tab. 17: Vergleich beider Impfstoffe hinsichtlich der erzielten CD4+/ CD154+/ IL-4+ T-Zell-Frequenzen gegen HPV 16 und HPV 18 abhängig vom Impfstatus der Probandinnen.

IL-4		BE 1 Mittelwert (± SD)	BE 2 Mittelwert (± SD)	BE 3 Mittelwert (± SD)	BE 4 Mittelwert (± SD)	BE 5 Mittelwert (± SD)	BE 2+3+4 Mittelwert (± SD)
HPV 16 L1	Gardasil	0,000 (± 0,000)	0,003 (± 0,006)	0,004 (± 0,005)	0,014 (± 0,022)	0,004 (± 0,011)	0,008 (± 0,012)
	Cervarix	0,001 (± 0,003)	0,001 (± 0,004)	0,014 (± 0,019)	0,017 (± 0,021)	0,003 (± 0,001)	0,010 (± 0,010)
	Signifikanz	n.s. (0,792)	n.s. (0,650)	n.s. (0,064)	n.s. (0,449)	n.s. (0,849)	n.s. (0,215)
HPV 18 L1	Gardasil	0 (± 0,000)	0,001 (± 0,003)	0,002 (± 0,004)	0,006 (± 0,008)	0,003 (± 0,007)	0,003 (± 0,004)
	Cervarix	0,000 (± 0,000)	0,001 (± 0,004)	0,012 (± 0,014)	0,010 (± 0,010)	0,001 (± 0,003)	0,007 (± 0,006)
	Signifikanz	n.s. (1,000)	n.s. (0,821)	* (0,020)	n.s. (0,249)	n.s. (0,849)	* (0,033)

Dargestellt sind die Unterschiede zwischen beiden Impfstoffen, spezifische IL-4 - produzierende TH-Zellen gegen HPV 16 bzw. HPV 18 zu induzieren. Die Signifikanz ist durch p-Werte dargestellt: n.s. = nicht signifikant, * = unkorrigiert signifikant für $p < 0,05$, ** = signifikant nach Bonferroni-Korrektur für $p < 0,013$. HPV = humanes Papillomvirus, SD = engl. standard deviation, IL-4 = Interleukin-4, BE = Blutentnahme, L1 = engl. late protein 1

3.2.5 Individuelle T-Zell-Antworten im Impfverlauf

An dieser Stelle sollen die individuellen Verläufe der T-Zell-Antworten gegen die unterschiedlichen HPV-Typen über den kompletten Studienzeitraum analysiert werden. Es werden die IL-2 exprimierenden TH-Zellen dargestellt. Bei den IFN- γ positiven TH-Zellen sind die Verläufe vergleichbar (nicht gezeigt).

Wie aus Abb. 11 ersichtlich, steigen die T-Zell-Frequenzen gegen alle untersuchten HPV-Typen sowohl in der Cervarix als auch in der Gardasil-Gruppe bei den meisten Probandinnen bis Monat 7 kontinuierlich an. Nach Abschluss der drei Impfungen fallen sie auf ein Niveau ab, das zumeist oberhalb dessen zu Beginn der Studie liegt.

Bei den Low-Risk HPV-Typen sind sehr vergleichbare Verläufe zwischen Gardasil und Cervarix-Geimpften zu beobachten. Dagegen sind bei den High-Risk HPV-Typen 16 und 18 mit Cervarix deutlich höhere T-Zell-Frequenzen bei individuellen Probandinnen zu verzeichnen.

Interessanterweise sieht man auch bei der SEB-Kontrolle der Cervarix-Gruppe deutlich höhere T-Zell-Frequenzen, was auf die generelle Aktivierung des Immunsystems durch das Adjuvanz AS04 zurückzuführen sein könnte. Sie sind nicht durch die vorhandenen HPV-spezifischen T-Zellen zu erklären, da sie um das 10- bis 100-fache höher ausfallen als die Frequenzen der HPV-spezifischen T-Zellen. Nach dem Impfzyklus fällt diese Gesamtaktivierbarkeit wieder auf ein vergleichbares Maß mit der Gardasil-Gruppe ab.

Im Rahmen des generellen Trends fallen zwischen den einzelnen Probandinnen, unabhängig vom untersuchten HPV-Typ, stark variierende Immunantworten auf. Dies erklärt auch die bereits beschriebenen relativ hohen Standardabweichungen der Mittelwerte. Die quantitative Immunantwort gegen die verschiedenen HPV Typen korreliert bei den individuellen Probandinnen, d.h. Probandinnen mit generell hohen T-Zell-Antworten gegen einen HPV-Typ, haben diese in der Regel auch gegen die anderen drei untersuchten Typen.

Interessanterweise gibt es durchaus Probandinnen, bei denen sich im Ex-Vivo-Assay keine T-Zell-Frequenzen nachweisen lassen. Dies ist zu variablen Zeitpunkten bei verschiedenen Probandinnen zu beobachten (vgl. Abb. 11). Kapitel 3.2.6. beschreibt diese Probandinnen näher.

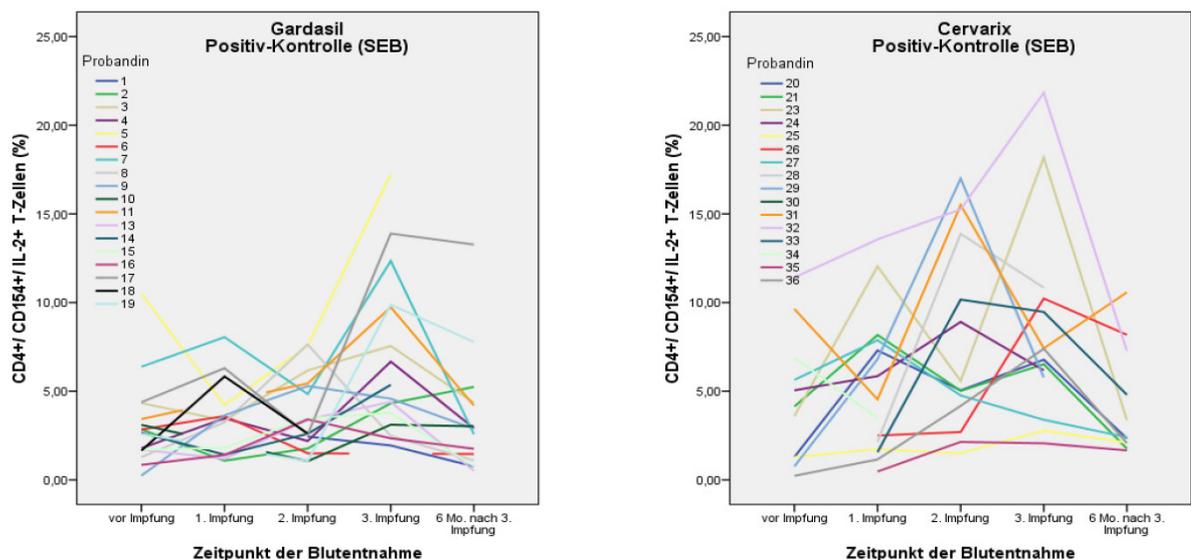


Abb 11, Fortsetzung S. 61

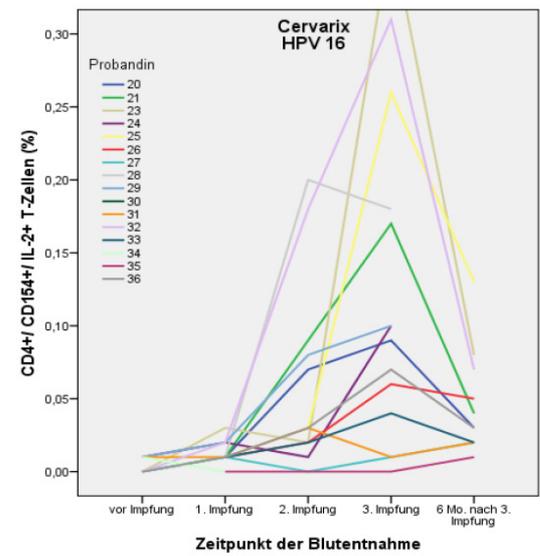
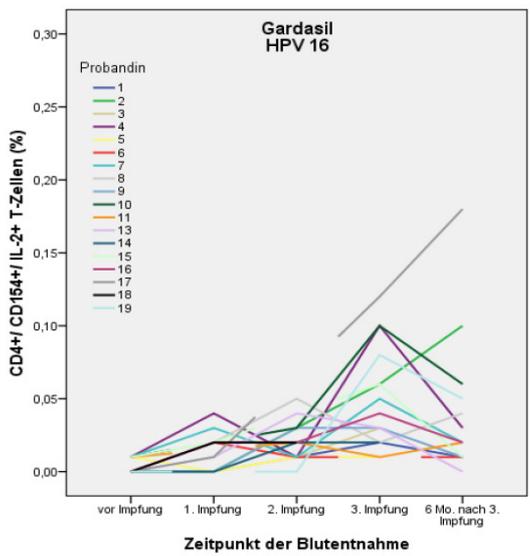
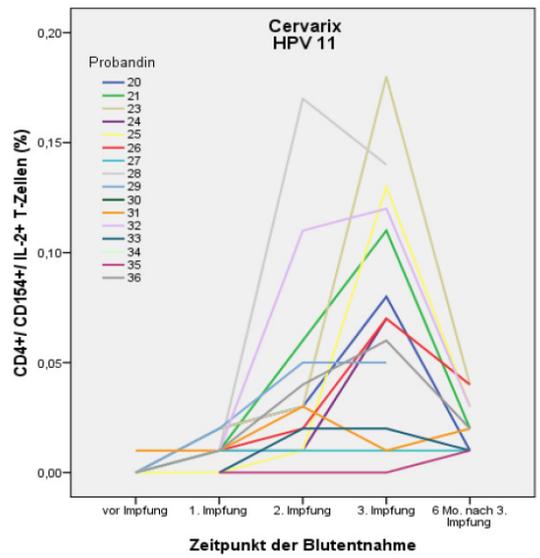
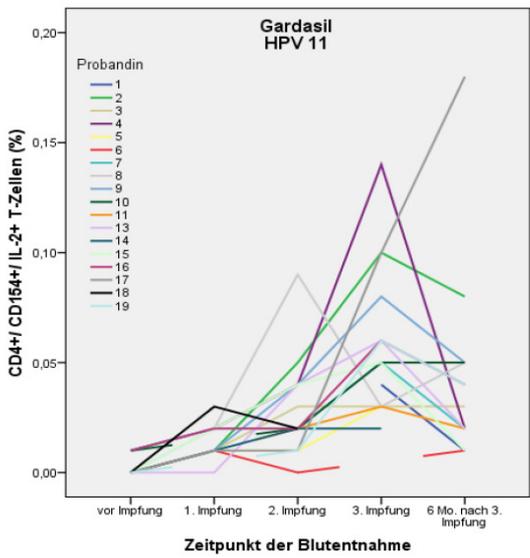
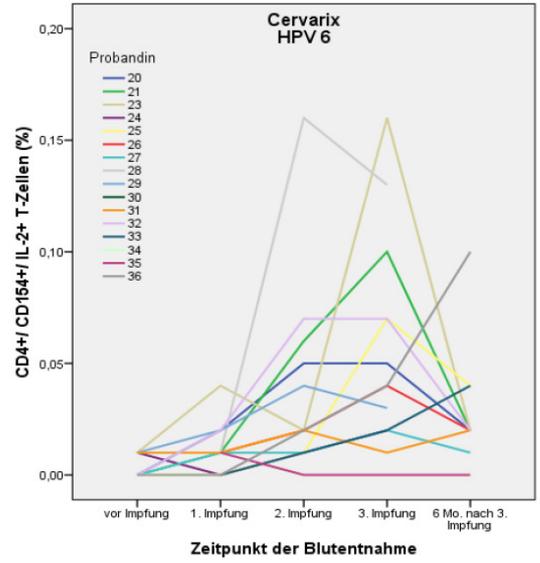
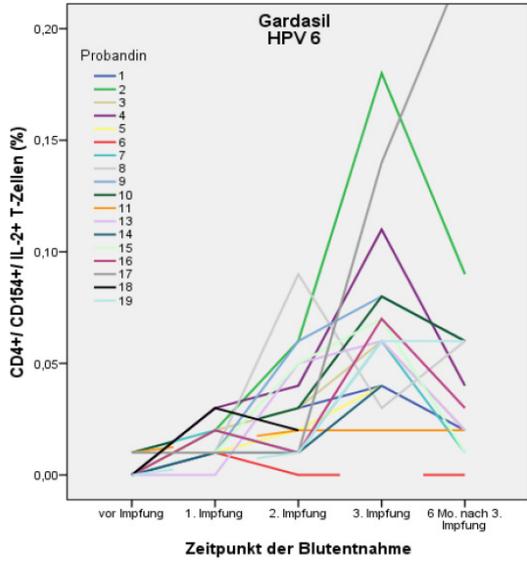


Abb 11, Fortsetzung S. 62

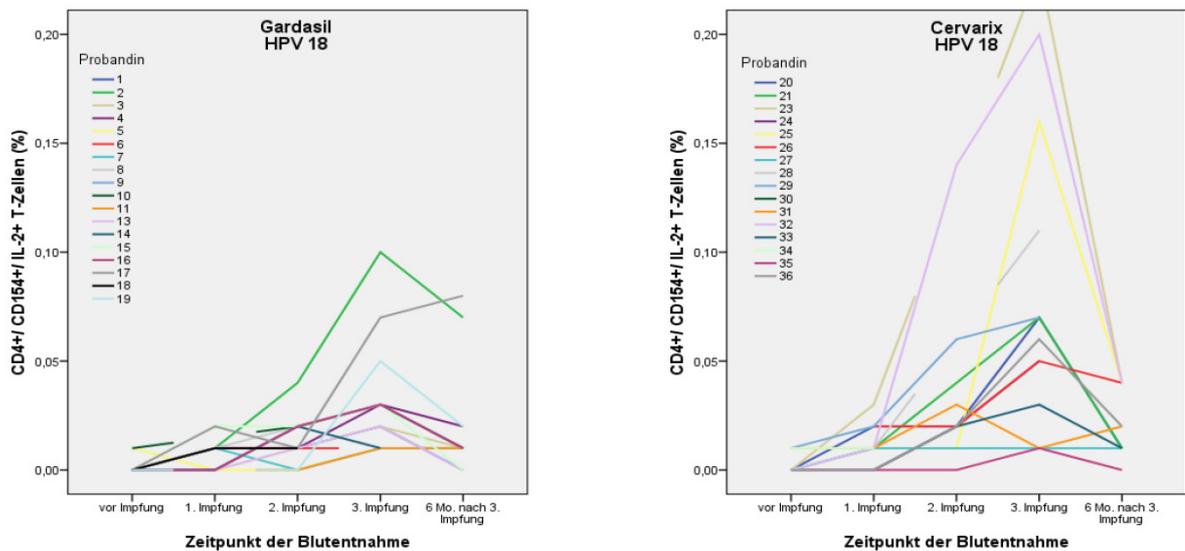


Abb. 11: Individuelle Verläufe der T-Zell-Antworten gegen die Positivkontrolle SEB, die Low-Risk HPV-Typen 6 und 11, sowie die High-Risk HPV-Typen 16 und 18 bis jeweils Monat 12 nach erster Impfung.

3.2.6 Rate an Probandinnen mit nicht-nachweisbaren HPV-spezifischen T-Zellen nach Abschluss des Impfzyklus

Die bisher in Kapitel 3.2 dargestellten Ergebnisse zeigen eine starke T-Zell-Antwort für alle HPV-Typen in beiden Impfstoffgruppen. Die z.T. recht hohen Standardabweichungen zeigen jedoch, dass die individuell erreichten T-Zell-Frequenzen stark variieren können. Es scheint daher sinnvoll, nach Abschluss des kompletten Impfzyklus die generierten Daten auf Probandinnen zu analysieren, die keine messbare zelluläre Immunantwort generiert haben. Tabelle 18 gibt die Anzahl der Frauen wieder, bei denen in Monat 7 bzw. Monat 12 in der durchflusszytometrischen Messung keine spezifisch aktivierten T-Zellen nachweisbar waren ($CD4+/CD154+/IL-2+$ T-Zellen $<0,01\%$). In der Gardasil-Gruppe hatten alle Frauen in Monat 7 für alle im Impfstoff enthaltenen HPV-Typen eine positive T-Zell-Antwort von mind. $0,01\%$ $CD4+/CD154+/IL-2+$ T-Zellen. Sechs Monate nach der letzten Impfung haben alle Probandinnen weiterhin nachweisbare T-Zellen gegen HPV 11 im Blut, eine Probandin zeigt jedoch keine T-Zellen mehr gegen HPV 6. Im Blut einer weiteren Frau lassen sich weder T-Zellen gegen HPV 16, noch gegen HPV 18 nachweisen, für zwei weitere Frauen gilt dies nur für T-Zellen gegen HPV 18. In der Gardasil-Gruppe haben damit

insgesamt vier Probandinnen gegen einen oder mehrere im Impfstoff enthaltene HPV-Typen keine im hier verwendeten Ex-Vivo-Assay nachweisbaren T-Zellen im Blut.

In der Cervarix-Gruppe hat eine Probandin bereits in Monat 7 keine messbare T-Zell-Antwort gegen HPV 6, 11 und 16 generiert. Dieselbe Frau zeigt in Monat 12 zwar für HPV 11 und 16 minimal positive Antworten (CD4+/ CD154+/ IL-2+ T-Zellen jeweils 0,01%), fällt allerdings mit den T-Zellen gegen HPV 18 unter die Nachweisgrenze und kann weiterhin keine messbare Antwort gegen HPV 6 generieren. Abgesehen von dieser Probandin induziert Cervarix in allen anderen teilnehmenden Frauen eine nachweisbare T-Zell-Antwort bis in Monat 12.

IL-2	Gardasil		Cervarix	
	Monat 7	Monat 12	Monat 7	Monat 12
HPV 6	0	1	1	1
HPV 11	0	0	1	0
HPV 16	0	1	1	0
HPV 18	0	3	0	1

Tab. 18: Anzahl der Probandinnen mit nicht nachweisbaren spez. T-Zellen gegen die aufgeführten HPV-Typen im Ex-Vivo-Assay (CD4+/ CD154+/ IL-2+ T-Zellen <0,01%)

3.2.7 Sonderbetrachtungen bei Probandinnen mit Hinweisen auf eine mögliche frühere HPV-Exposition

Da eine frühere HPV-Infektion die quantitative T-Zell-Antwort nach Impfung möglicherweise in Richtung einer höheren Antwort beeinflussen könnte, wurde versucht, anhand der vorliegenden T-Zell-Daten und Fragebögen ein Anhalt für früher stattgehabte Infektionen mit High- oder Low-Risk HPV-Typen zu erhalten.

Dazu wurden 3 Kriterien herangezogen:

- 1) L1-spezifische T-Zell-Antworten vor Impfung (BE1)
- 2) T-Zell-Antworten gegen frühe E6/E7 Antigene
- 3) Angaben im Fragebogen

Zu 1) Definiert man alle Probandinnen als initial positiv, die in der ersten BE (vor Impfung) $\geq 0,1\%$ doppelt positive HPV-spezifische T-Zellen gegen den jeweils betrachteten HPV-Typ hatten, ergibt sich die folgende Anzahl an Frauen mit einer potentiellen früheren Exposition: In der Gardasil-Gruppe waren sechs Frauen für HPV 6, vier für HPV 11, wiederum sechs für HPV 16 und zwei für HPV 18 positiv. In der Cervarix-Gruppe galt dies bei fünf Frauen für HPV 6, bei zwei für HPV 11, bei sechs für HPV 16 und bei vier Frauen für HPV 18. Da einige Probandinnen für mehrere HPV-Typen positiv waren und nicht von allen Frauen Daten vor Impfung vorlagen (vgl. Abb. 6, S. 23), ergab sich eine absolute Zahl von 8 (von 17) L1-positiven Frauen in der Gardasil und 6 (von 12) L1-positiven Frauen in der Cervarix-Gruppe.

Zu 2) Die bei allen Probandinnen (zu verschiedenen Zeitpunkten) durchgeführte Testung gegen die frühen HPV-Proteine E6 und E7 ergaben in der Gardasil-Gruppe für den Low-Risk-Typ HPV 6 CD154+/ CD4+/ IL-2+ T-Zell-Werte zwischen $<0,001\%$ und $0,080\%$ mit einem Mittelwert von $0,006\%$. Für die High-Risk-Typen HPV 16/18 wurden Frequenzen zwischen $<0,001\%$ und $0,030\%$ mit einem Mittelwert von $0,005\%$ gemessen. In der Cervarix-Gruppe lagen die Werte für HPV 6 zwischen $<0,001\%$ und $0,020\%$ (Mittelwert $0,005\%$) und für HPV 16/18 zwischen $<0,001\%$ und $0,010\%$ (Mittelwert $0,002\%$). In der IFN- γ Färbung lagen die Frequenzen quantitativ unterhalb derer der IL-2 Färbung, unterschieden sich jedoch qualitativ nicht von ihnen. Insgesamt liegen die Frequenzen bei der Großzahl der Probandinnen eindeutig im Bereich der Negativkontrollen. Statistisch ließ sich weder für HPV 6 E6/E7 noch für HPV 16/18 E6/E7 ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen nachweisen (s. Tab. 19).

Definiert man wiederum eine Frequenz von $\geq 0,01\%$ doppelt positiven E6/E7-spezifischen T-Zellen als positiv, ergeben sich bei vier Frauen der Gardasil- und drei Frauen der Cervarix-Gruppe Hinweise für eine Exposition gegenüber dem Low-Risk-Typ HPV 6. Bei vier Frauen der Gardasil-Gruppe und bei sechs Frauen der Cervarix-Gruppe ergaben sich Hinweise auf eine frühere Exposition gegenüber HPV 16/18 (Tab. 19). Da wiederum einige Frauen sowohl für die Low-Risk, als auch die High-Risk E-Proteine positiv waren ergab sich eine absolute Zahl von 6 (von 18) positiven Frauen in der Gardasil-Gruppe und 8 (von 16) positiven Frauen in der Cervarix-Gruppe.

Tab. 19: Durchschnittliche T-Zell-Frequenzen gegen frühe HPV Proteine E6/ E7 von HPV 6 oder HPV 16/ 18 und Anzahl positiv getesteter Probandinnen.

		IL-2 Mittelwert (± SD)	INF-γ Mittelwert (± SD)	Anzahl positiver Frauen CD4+/ CD154+/ IL2+ ≥ 0,01%
HPV 6 E6/E7	Gardasil	0,005 (± 0,009)	0,002 (± 0,006)	4 (2x 0.01, 1x 0.02, 1x0.03)
	Cervarix	0,002 (± 0,004)	0,000 (± 0,000)	3 (jeweils 0.01)
	Signifikanz	n.s. (0,626)	n.s. (0,545)	
HPV 16/18 E6/E7	Gardasil	0,006 (± 0,019)	0,002 (± 0,010)	4 3x 0.01, 1x 0.08)
	Cervarix	0,005 (± 0,007)	0,002 (± 0,004)	6 4x 0.01, 2x 0.02)
	Signifikanz	n.s. (0,465)	n.s. (0,581)	

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der prozentualen Anteile Antigen-spezifischer IL-2 - produzierender TH-Zellen an der Gesamtmenge aller CD4-positiven T-Zellen für die untersuchten frühen HPV-Proteine E6/ E7. Zudem ist die Anzahl positiv getesteter Probandinnen, inkl. der Höhe der gemessenen Antworten abgebildet. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Impfgruppen ist durch p-Werte dargestellt: n.s. = nicht signifikant, HPV = Humanes Papillomvirus, E6/ E7 = engl. early protein 6 bzw. 7, SD = engl. standard deviation, IL-2 = Interleukin-2, INF-γ = Interferon-γ

Zu 3) Im Fragebogen gaben zwei Probandinnen der Gardasil-Gruppe an, bisher einmalig einen auffälligen PAP-Abstrich gehabt zu haben, wobei eine der beiden Frauen bereits einen positiven HPV-Test hatte (HPV-Typ unbekannt) und früher an Condylomata acuminata litt. In der Cervarix-Gruppe hatte eine Probandin einmalig, eine weitere Probandin wiederholt auffällige PAP-Abstriche. Da bei keiner der betroffenen Frauen der verursachende HPV-Typ bekannt ist, wurde eine Exposition sowohl gegenüber Low-Risk, als auch High-Risk HPV-Typen angenommen.

In der zusammenfassenden Analyse wurden alle Probandinnen einer Impfgruppe, die vor Beginn des Impfzyklus spezifische T-Zellen gegen die getesteten L1-Proteine der untersuchten HPV-Typen aufwiesen (doppelt positive T-Zellen $\geq 0,01\%$), positive Antworten in der Testung auf frühe HPV-Proteine E6/E7 zeigten (doppelt positive T-Zellen $\geq 0,01\%$) oder im Fragebogen angaben, bereits positive PAP-Abstriche oder Condylomata acuminata gehabt zu haben, denjenigen Frauen gegenübergestellt, die keines dieser Kriterien erfüllten. In der Gardasil-Gruppe wurden dadurch 13 Frauen mit Hinweisen auf eine mögliche Exposition mit Low-Risk-HPV, fünf Frauen ohne diese Hinweise gegenübergestellt. Für die High-Risk-Typen bestand bei zehn Frauen ein Verdacht auf eine frühere Infektion, bei acht

bestand dieser nicht. Die Cervarix-Gruppe bot sieben Frauen mit und neun Frauen ohne Hinweise auf eine bereits durchgemachte Low-Risk HPV-Infektion. Bei elf Frauen bestand der Verdacht einer früheren Infektion mit High-Risk-HPV, in fünf Fällen ergab sich darauf kein Hinweis. Durch fehlende oder ausgeschlossene Messreihen zum Zeitpunkt 4 bzw. 5 (s. Kap. 3.2.1) konnten nicht alle aufgezählten Probandinnen in die Analyse mit einfließen. Bei der geringen Zahl an Probandinnen wurde zudem auf eine statistische Analyse der Daten verzichtet. Die Ergebnisse der Analyse sind in Tabelle 20 dargestellt.

Tab. 20: Gegenüberstellung der T-Zell-Antwort von Probandinnen mit Hinweisen auf eine frühere HPV-Exposition und Probandinnen ohne solche Hinweise.

IL-2	Gardasil		Hinweise für HPV-Exposition	keine Hinweise für HPV-Exposition	IL-2	Cervarix		Hinweise für HPV-Exposition	keine Hinweise für HPV-Exposition
Monat 7	Low-Risk HPV Mittelwert (± SD)	HPV 6	0,074 (0,047)	0,056 (0,017)	Monat 7	Low-Risk HPV Mittelwert (± SD)	HPV 6	0,016 (0,060)	0,062 (0,036)
		HPV 11	0,054 (0,026)	0,052 (0,023)			HPV 11	0,030 (0,067)	0,088 (0,043)
	High-Risk HPV Mittelwert (± SD)	HPV 16	0,049 (0,036)	0,049 (0,036)		High-Risk HPV Mittelwert (± SD)	HPV 16	0,106 (0,108)	0,095 (0,134)
		HPV 18	0,023 (0,010)	0,040 (0,031)			HPV 18	0,071 (0,066)	0,060 (0,082)
		HPV 31	0,019 (0,007)	0,038 (0,031)			HPV 31	0,058 (0,047)	0,070 (0,052)
		HPV 45	0,019 (0,012)	0,033 (0,029)			HPV 45	0,064 (0,073)	0,060 (0,051)
	Monat 12	Low-Risk HPV Mittelwert (± SD)	HPV 6	0,050 (0,066)		0,060 (0,027)	Monat 12	Low-Risk HPV Mittelwert (± SD)	HPV 6
HPV 11			0,046 (0,049)	0,040 (0,018)	HPV 11	0,020 (0,014)			0,023 (0,011)
High-Risk HPV Mittelwert (± SD)		HPV 16	0,026 (0,017)	0,050 (0,067)	High-Risk HPV Mittelwert (± SD)	HPV 16		0,047 (0,042)	0,043 (0,026)
		HPV 18	0,010 (0,005)	0,020 (0,034)		HPV 18		0,024 (0,016)	0,018 (0,015)
		HPV 31	0,020 (0,011)	0,010 (0,033)		HPV 31		0,026 (0,016)	0,018 (0,017)
		HPV 45	0,016 (0,023)	0,020 (0,025)		HPV 45		0,069 (0,104)	0,015 (0,013)

Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen der erreichten CD4+/ CD154+/ IL-2+ T-Zell-Frequenzen in % für beide Subgruppen (mit bzw. ohne Hinweise) innerhalb der Standard-Impfgruppen (Gardasil vs. Cervarix). In der Gardasil-Gruppe hatten 12 Probandinnen Hinweise auf eine frühere Infektion mit Low-Risk-Typen und acht auf eine Infektion mit High-Risk-Typen. In der Cervarix-Gruppe bestanden bei 8 Frauen Hinweise auf eine Low-Risk-Infektion, bei 11 auf eine High-Risk-Infektion. HPV = humanes Papillomvirus, IL-2 = Interleukin-2, SD = engl. standard deviation

In der Zusammenschau lässt sich kein eindeutiger Trend für höhere T-Zell-Frequenzen in den Gruppen der möglicherweise exponierten Probandinnen

erkennen: In der Gardasil-Gruppe erreichen die wahrscheinlich HPV-naiven Probandinnen eher höhere Werte gegen die High-Risk-Typen, wohingegen der Unterschied gegen die Low-Risk-Typen (bei hohen Standardabweichungen) zwischen beiden Gruppen minimal scheint. In der Cervarix-Gruppe erreichen die HPV-naiven Probandinnen deutlich höhere Werte gegen die Low-Risk-Typen als die potentiell exponierten, der Unterschied bei den verschiedenen High-Risk-Typen ist gering und uneinheitlich. Eine Ausnahme bildet hier HPV 45 in Monat 12, bei dem die exponierten Frauen im Mittel 4,6-fach höhere Werte erreichen als die nicht exponierten (0,069% vs. 0,015%). Die Standardabweichung ist mit 0,104% jedoch sehr hoch, was eine Verzerrung der Mittelwerte durch einzelne Ausreißer wahrscheinlich macht.

4 Diskussion

4.1 Allgemeine Punkte

HPV-Impfstoffe unterscheiden sich hauptsächlich im HPV-Spektrum und der Adjuvantierung. Ziel dieser immunologischen Studie war es darzustellen, wie sich die Gedächtnis T-Zell-Antwort im Verlauf der Impfung entwickelt und ob es diesbezüglich Unterschiede zwischen den beiden Impfstoffen gibt. Die klinische Effektivität gegen die Impfstoff HPV-Typen ist bisher vergleichbar, jedoch zeigt Cervarix eine breitere Kreuzprotektion [80] und höhere anhaltende Antikörpertiter.

Die vorliegende Studie basiert methodisch auf einer durch AK Ramseger 2009 an Gardasil-geimpften Probandinnen durchgeführten Querschnittstudie, in der es erstmals gelang, eine HPV-spezifische T-Zell-Antwort bei prophylaktisch mit Gardasil geimpften Frauen zu zeigen [90]. Mit Hilfe der innovativen durchflusszytometrischen Methodik, gelang es, auf Basis der Expression des T-Zell-Aktivierungsmarkers CD 154, spezifisch gegen HPV gerichtete CD4+-TH-Zellen im Vollblut von prophylaktisch mit einem der beiden auf dem Markt erhältlichen HPV- Impfstoffen geimpften Probandinnen zu detektieren. In der aktuellen Studie wurden beide Impfstoffe, Gardasil und Cervarix, untersucht und der Beobachtungszeitraum auf bis zu sechs Monate nach der letzten Impfung erweitert, wodurch es erstmalig möglich war, einen direkten Vergleich in Hinblick auf das T-Zell-induzierende Potential beider Impfstoffe und den Langzeiteffekt der

Impfung anzustellen. Das longitudinale Studiendesign erlaubte zudem eine Beurteilung der individuellen T-Zell-Antwort der Probandinnen im Impfverlauf.

Die beiden untersuchten Studiengruppen unterschieden sich in Hinblick auf Alter, immunologische Beeinträchtigungen, Sexualleben und gynäkologische Anamnese statistisch nicht voneinander. Auch die Intervalle zwischen Impfungen und jeweils folgender BE waren für beide Gruppen größtenteils gleich. Einzige Ausnahme bildet hier die letzte BE (sechs Monate nach der dritten Impfung), wo in der Cervarix-Gruppe ein signifikant längeres Intervall zwischen Impfung und BE verging als in der Gardasil-Gruppe, was unter Umständen zu niedrigeren T-Zell-Werten in der Cervarix-Gruppe geführt haben könnte.

Durch das verwendete Ex-Vivo-Assay wurden spezifisch gegen das L1 Protein des jeweils untersuchten HPV-Typs gerichtete, sog. „doppelt positive“ T-Zellen, per Durchflusszytometrie detektiert, d.h. nur T-Zellen, die mindestens zwei Aktivierungsparameter erfüllten, wurden als positiv gewertet. Alle in Kap. 3.2 dargestellten Ergebnisse bilden CD 154+ T-Zellen ab, die zusätzlich entweder für IL-2, IFN- γ oder IL-4 positiv sind, wobei IL-2 und IFN- γ typischerweise von TH₁ Zellen, IL-4 typischerweise von TH₂ Zellen produziert werden. Durch die Untersuchung der genannten Interleukine konnten Informationen über beide T-Zell-Populationen gewonnen werden.

Bei der Planung der Studie war der biologische Hintergrund der T-Zell-Antwort zu berücksichtigen. Nach Kontakt mit einem (Impf-) Antigen läuft diese in drei Phasen ab. In der initialen Expansionsphase proliferieren aktivierte T-Zellen in großem Umfang, wobei diese aktivierten Effektorzellen in der sog. Retraktionsphase nach wenigen Tagen bis Wochen wieder absterben. Im Anschluss daran bildet sich in der Konsolidierungsphase auf Grundlage von langlebigen T-Gedächtniszellen ein relativ stabiles Plateau [97]. Um eine Verzerrung der Ergebnisse durch Analyse der T-Zellen in unterschiedlichen Phasen der Immunantwort zu umgehen, wurden die Blutentnahmen (in Ausnahmefällen) frühestens zwei Wochen, im Durchschnitt erst fünf Wochen nach Impfung durchgeführt.

Bezüglich der Kontrollen ist anzumerken, dass es sowohl in der Negativ-, als auch in der Positivkontrolle über den Impfzyklus zu Anstiegen der Frequenzen aktivierter T-Zellen kam. In der Negativ-Kontrolle fielen diese Anstiege zwar

statistisch ins Gewicht, insgesamt lagen die Werte aber zu allen Zeitpunkten im Durchschnitt bei max. 0,006% und damit unterhalb des vor der Studie definierten Cut-Off-Wertes von 0,01%. Eine Erklärung für den Anstieg könnte eine durch die Impfung induzierte allgemeine Aktivierung des Immunsystems sein, die dazu führt, dass quantitativ mehr aktivierte bzw. aktivierbare T-Zellen im Blut zu finden sind und damit in der Negativkontrolle auffallen können. Diese aktivierbaren T-Zellen werden bei Kontakt mit dem Superantigen SEB (= Positiv-Kontrolle) dazu angeregt, u.a. IL-2 und IFN- γ zu produzieren, was sich im Ex-Vivo-Assay in Monat 7 als Steigerung der aktivierten Zellen bis auf das Doppelte des Ausgangswertes darstellt. Betrachtet man die zur Erhöhung der statistischen Power über den Impfzyklus gemittelten Werte (BE 2+3+4) zeigt sich in der Cervarix-Gruppe ein Trend für höhere SEB-Antworten ($p=0.067$), was auf das Adjuvanz AS04 zurückführbar sein könnte, welches ein stärkerer Immunaktivator ist als das in Gardasil enthaltene Aluminiumhydroxid. In beiden Gruppen fällt die T-Zell-Antwort gegen SEB bis Monat 12 so weit ab, dass sich statistisch kein Unterschied mehr zum Ausgangswert feststellen lässt. Diese Tatsache untermauert die Theorie einer kurzfristigen Impfstoff-induzierten Immunaktivierung, die sich nach Abschluss des Impfzyklus zeitnah wieder normalisiert. Interessanterweise ist dieser Effekt bei Impfung mit Cervarix höher als bei solcher mit Gardasil, was auf das starke Adjuvans zurückgeführt werden könnte.

Betrachtet man die im Laufe des Impfzyklus erreichten T-Zell-Frequenzen, erkennt man in beiden Gruppen für HPV 6, 11, 16 und 18 bereits nach der ersten Impfung einen signifikanten Anstieg der T-Zell-Zahlen, der sich auch nach der zweiten und dritten Impfung fortsetzt. Die höchsten Frequenzen werden für alle HPV-Typen in beiden Gruppen direkt nach der dritten Impfung erreicht. Mittelt man die während des Impfzyklus erzielten T-Zell-Werte (BE 2+3+4), zeigen diese in beiden Gruppen einen hochsignifikanten Anstieg gegenüber dem Nullwert, wobei die Signifikanzen in der Cervarix-Gruppe trotz deutlich höherer Frequenzen aufgrund hoher Standardabweichungen etwas niedriger als in der Gardasil-Gruppe ausfallen (Gardasil $p < 0,001$, Cervarix $p \leq 0,008$). Nach Erreichen der maximalen T-Zell-Antworten fallen diese in beiden Gruppen für alle untersuchten HPV-Typen bis Monat 12 wieder ab. Sie befinden sich aber selbst dann noch auf einem Niveau, das für alle HPV-Typen signifikant höher ist, als zu Beginn der Studie und damit

auf eine langfristige zelluläre Immunität in Form von Gedächtnis T-Zellen nach Abschluss des Impfzyklus hindeutet.

Um Hinweise auf ein mögliches Nicht-Ansprechen auf die Impfung zu erlangen, wurden die Daten in Monat 7 und 12 daraufhin überprüft, ob es Probandinnen in den beiden Gruppen gab, die keine nachweisbaren T-Zell-Frequenzen hatten. In der Gardasil-Gruppe traf dies in Monat 7 für keine, in Monat 12 jedoch für vier Frauen zu (vgl. Tab. 18). Eine Probandin der Cervarix-Gruppe hatte sowohl in Monat 7 als auch in Monat 12 gegen unterschiedliche HPV-Typen keine nachweisbaren T-Zellen im Blut. Keine der insgesamt fünf Probandinnen gab im Fragebogen eine Beeinträchtigung des Immunsystems (Rauchen, med. Immunsuppression) oder eine Auffälligkeit in der gynäkologischen Anamnese (auffälliger PAP-Abstrich, positiver HPV-Test, Condylomata acuminata, andere STD's) an, wodurch sich durch die vorliegenden Informationen kein Hinweis auf eine mögliche Ursache der schwachen T-Zell-Antwort ergibt.

4.2 Induktion von T-Zellen gegen High-Risk HPV-Typen

In der Gardasil-Gruppe waren die T-Zell-Antworten gegen High-Risk-Typen quantitativ niedriger als die gegen die Low-Risk-Typen. Die erreichten Werte zwischen den High-Risk-Typen unterschieden sich noch einmal darin, dass gegen HPV 16 eine um ca. 1,6-fach stärkere Antwort erzeugt wurde als gegen HPV 18. Dies bestätigt die bisher veröffentlichten Immunogenitätsstudien, in denen ebenfalls höhere AK-Titer für HPV 16 gemessen werden konnten. In Hinblick auf die quantitative Immunantwort gegen HPV 16 korreliert die in der vorliegenden Studie gezeigte T-Zell Antwort allerdings nicht mit denen in bereits veröffentlichten Studien ermittelten AK-Titer: Gardasil induzierte dort sowohl in Monat 7 als auch in Monat 60 die bei Weitem höchste B-Zell-Immunantwort gegen HPV 16 mit jeweils annähernd 6-fach höheren Titern als gegen die beiden Low-Risk-Typen 6 und 11 [72]. Die in der vorliegenden Studie gemessene T-Zell-Antwort gegen HPV 16 lag hingegen sowohl in Monat 7 als auch in Monat 12 nur bei etwa 90% derer gegen HPV 11 und bei etwa 70% derer gegen HPV 6. Es scheinen demnach geringe T-Zell-Frequenzen gegen HPV 16 ausreichend zu sein um eine vergleichsweise hohe B-Zell-Antwort zu induzieren.

In Monat 12 fallen die durch Gardasil induzierten Immunantworten gegen HPV 6, 11 und 16 auf etwa 70-75% des Maximalwertes ab, diejenige gegen HPV 18 hingegen fällt als einzige hochsignifikant auf ca. 58% ab. Diese Beobachtung wird abermals durch die erwähnten Immunogenitätsstudien bestätigt, die bei Gardasil-geimpften Probandinnen für HPV 18 im Verlauf einen Abfall der AK-Titer auf etwa das Niveau einer natürlichen Infektion zeigen, wohingegen z.B. gegen HPV 16 auch lange nach der Impfung ein um ein Vielfaches höherer Titer als nach natürlicher Infektion nachweisbar ist [98].

Cervarix induziert T-Zellen sowohl gegen High-Risk, als auch gegen Low-Risk-Typen, wobei die Reaktion auf High-Risk-Typen stärker ausgeprägt ist. Eine T-Zell-Antwort gegen Low-Risk-Typen war im Vorfeld nicht erwartet worden, da die L1 Antigene von HPV 6 und 11 nicht in dem bivalenten Impfstoff Cervarix enthalten sind. Die vergleichsweise starke Reaktion auf High-Risk-Typen war in Anbetracht des bivalenten Impfstoffprofils jedoch zu erwarten. Die quantitativ höhere Antwort gegen HPV 16 im Vergleich zu HPV 18 (0,126% vs. 0,081%) deckt sich mit den Ergebnissen der bisher veröffentlichten Studien, in denen der HPV 18 AK-Titer ebenfalls unter dem gegen HPV 16 lag [81]. Sechs Monate nach der Impfung sinkt die Frequenz an HPV 16 spezifischen T-Zellen etwa auf die Hälfte, die gegen HPV 18 spezifischen auf etwa ein Viertel des in Monat 7 erreichten Wertes ab. Auch diese Beobachtung deckt sich mit den bereits veröffentlichten Studien, in denen der HPV 18 Titer im Vergleich zum HPV 16 Titer im Verlauf stärker absinkt [81].

Vergleicht man beide Impfstoffe, fällt in der Cervarix-Gruppe eine deutlich höhere Rate an CD4+/ CD154+/ IL-2+ T-Zellen gegen High-Risk-Typen auf. Durch Cervarix werden mit maximal 0,126% spezifisch gegen HPV 16 gebildeter CD4+ T-Zellen im Vergleich zu Gardasil mit nur 0,049% spezifischen T-Zellen um 2,6-fach höherer Frequenzen erzielt. Der entsprechende p-Wert von 0,077 in Monat 7 ist formal als nicht signifikant zu werten, er beschreibt jedoch einen Trend in Richtung höherer maximaler T-Zell-Frequenzen bei Cervarix-geimpften Frauen. Das fehlende Erreichen des Signifikanzniveaus ist höchstwahrscheinlich mit der kleinen Probandenanzahl der vorliegenden Studie und der grossen Standardabweichung zu begründen. Es scheint daher sinnvoll, die vorliegenden

Ergebnisse in Studien mit größerer Fallzahl zu überprüfen um aufgezeigte statistische Trends zu bestätigen oder zu verwerfen.

Die T-Zell-Antwort gegen HPV 18 ist für IL-2-produzierende T-Zellen selbst bei der geringen Probandenanzahl der vorliegenden Studie über den Impfzyklus gesehen in der Cervarix-Gruppe statistisch signifikant höher ($p= 0,013$) als in der Gardasil-Gruppe. Die durchschnittlich erreichte T-Zell-Frequenz in Monat 7 ist dabei in Cervarix-geimpften, analog zu den erreichten Frequenzen gegen HPV 16, um das 2,6-fache höher als in Gardasil-geimpften Frauen. Derselbe Trend lässt sich für IFN- γ nahezu ($p= 0,062$) und für IL-4 ebenfalls statistisch signifikant zeigen ($p= 0,033$).

Die erzielten Ergebnisse korrelieren mit denen durch Einstein et al. publizierten Daten bezüglich der durch prophylaktische HPV-Vakzine induzierten B-Zell-Antwort. In der genannten Studie wurden die erreichten AK-Titer erstmalig im gleichen Messsystem miteinander verglichen. Dabei konnten in Monat 7 bis zu 3,7-fach (HPV 16) bzw. 7,3 -fach (HPV 18) höhere AK-Titer und bis zu 2,7-fach höhere B-Gedächtniszell-Antworten für beide HPV-Typen bei denen mit Cervarix-geimpften Probandinnen nachgewiesen werden.

Eine mögliche Erklärung für die höheren T-Zell-Frequenzen in der Cervarix-Gruppe könnte das im Impfstoff enthaltene neuartige Adjuvanz AS04 sein. Wie in Kap. 1.3.1.1 beschrieben, lenkt das im AS04 enthaltene MPL die Immunantwort in die Richtung einer TH₁-Antwort [61], die typischerweise aus IL-2- und IFN- γ -produzierenden TH-Zellen besteht, was die im Ex-Vivo-Assay gemessenen hohen Frequenzen von Zellen mit Expression mindestens eines dieser beiden Zytokine erklären könnte. Da aus anderen Studien bereits bekannt ist, dass AS04 bis zu 8,5-fach höhere AK-Titer und bis zu 5,2-fach stärkere B-Gedächtniszell-Antworten induziert als Aluminiumsalz-adjuvanzierte Impfstoffe [68], scheint es nicht überraschend, dass sich neben der hohen B-Zell-Antwort auch eine starke T-Zell-Antwort nachweisen lässt (s.o.).

Der in der vorliegenden Studie in der Cervarix-Gruppe beobachtete stärkere Abfall der T-Zell-Frequenzen ab Monat 7 führte in Monat 12 dazu, dass zwischen beiden Impfgruppen für keinen der untersuchten HPV-Typen ein signifikanter Unterschied in der Ausprägung der Gedächtnis T-Zell-Antwort nachzuweisen war. Wie bereits

erwähnt, läuft die T-Zell-Antwort in drei Phasen ab, die von einer Expansions- über eine Retraktions- bis hin zur Konsolidierungsphase verläuft, die in der Regel wenige Wochen nach Kontakt mit dem jeweiligen (Impf-) Antigen erreicht wird. Die BEs in Monat 7 fanden im Durchschnitt ca. 6-8 Wochen, diejenige in Monat 12 durchschnittlich 20-25 Wochen nach der dritten Impfung statt. Man könnte daher vermuten, dass die Messung in Monat 7 trotz des absichtlich recht großen Zeitintervalls zwischen Impfung und BE noch einige der initial nach der dritten Impfung gebildeten T-Effektorzellen mit erfasste (Retraktionsphase) und erst ab Monat 12 die eigentlichen T-Gedächtniszellen nachgewiesen wurden (Konsolidierungsphase). Im Monat 12 stellt sich bei beiden Impfstoffen ein für alle Antigene ungefähr vergleichbares Plateau in der Frequenz der T-Gedächtniszellen ein. Dieses liegt bei ca. 0,02% -0,05%, was relativ hoch und auch vier Jahre nach Impfung zwischen beiden Impfstoffen quantitativ vergleichbar ist [99]. Daher scheint es möglich, dass die T-Gedächtniszell-Antwort unabhängig von der Stärke der initialen Antwort für jedes Antigen nur marginal differiert. Ob es im Falle einer Re-Exposition mit dem entsprechenden Antigen trotz der äquivalenten T-Gedächtniszell-Frequenzen zwischen den beiden Impfgruppen zu einem, der initial höheren zellulären Antwort entsprechenden, stärkeren Anstieg der T-Zell-Raten bei Cervarix-geimpften Probandinnen kommt, wurde bisher nicht untersucht und bleibt spekulativ. Ebenso ist es möglich, dass weitere hier nicht untersuchte T-Zell-Subklassen, wie regulatorische T-Zellen oder TH₁₇ - Zellen in unterschiedlichem Ausmaß vorhanden sind.

4.3 Induktion von T-Zellen gegen Low-Risk HPV-Typen

Innerhalb der Gardasil-Gruppe lagen die gegen die beiden Low-Risk-Typen 6 und 11 erreichten T-Zell-Werte mit Frequenzen von 0,071% (HPV 6) bzw. 0,058% (HPV 11) deutlich über denen gegen die High-Risk-Typen. Die tendenziell stärkere Antwort auf Low-Risk-Typen nach Impfung mit dem quadrivalenten Impfstoff Gardasil ist bereits in der Studie von AK Ramseger beschrieben [90] und könnte mit einer im Vergleich zu High-Risk-Typen höheren Prävalenz von Infektionen mit Low-Risk-Typen im Jugend- und jungen Erwachsenenalter zusammenhängen. Diese durchgemachten Infektionen führen zu einer natürlichen T-Zell-Immunität, die im Rahmen einer Sekundärantwort durch die Impfung geboostert werden könnte. Es kann nicht beurteilt werden, wie viel häufiger Frauen in ihrem Leben

mit Low-Risk Typen in Kontakt kommen, ohne dass es jemals zu einer detektierbaren Infektion kommt. Das häufige Vorkommen von Condylomata acuminata im jungen Erwachsenenalter und die Häufung von CIN-Läsionen bzw. ZxCa im späteren Erwachsenenalter deuten jedoch darauf hin, dass junge Frauen eher mit Low-Risk-Typen konfrontiert werden und daher bereits früher im Leben ein immunologisches Gedächtnis gegen diese Typen ausbilden können. Bei dem hier vorliegenden relativ jungen Studienkollektiv (ø 24 Jahre) könnte dies den stärkeren Anstieg der T-Zell-Antwort gegen Low-Risk-Typen nach Impfung erklären. Kritisch muss man jedoch anmerken, dass CIN-Läsionen und Karzinome eine längere Latenz bis zur klinischen Auffälligkeit haben als Condylomata acuminata [30, 100] und die entsprechenden Infektionen mit High-Risk-Typen daher prinzipiell im gleichen Alter wie die Low-Risk-Infektionen erworben werden könnten. In diesem Fall müsste das immunologische Gedächtnis durchschnittlich für alle HPV-Typen gleichermaßen ausgebildet sein.

In der Cervarix-Gruppe kam es während des Impfzyklus überraschenderweise ebenfalls zu deutlichen Anstiegen der T-Zell-Frequenzen gegen Low-Risk-Typen. Die maximal erreichten Werte waren innerhalb der Gruppe in Monat 7 für HPV 11 (0,075%) höher als für HPV 6 (0,054%), bewegten sich aber für beide Typen annähernd im Bereich, der gegen HPV 18 erreicht wurde (0,081%). Da Cervarix weder VLPs von HPV 6 noch von HPV 11 enthält, stellt sich die Frage, ob die an dieser Stelle gemessenen doppelt positiven T-Zellen tatsächlich spezifisch für HPV 6 bzw. 11 sind. Möglicherweise ist eine Kreuzreaktion zwischen verschiedenen nahe verwandten HPV-Typen ursächlich für die T-Zell-Antworten gegen nicht im Impfstoff enthaltene HPV-Typen. Wie der Datenbank des European Molecular Biology Network (EMBN) zu entnehmen ist, gibt es im HPV-L1-Protein hoch konservierte Regionen, die sich zwischen den einzelnen HPV-Typen nur wenig unterscheiden: zwischen den High-Risk Typen 16 und 18 und den Low-Risk Typen 6 und 11 besteht beispielsweise eine 61-86% -ige Homologie der L1-Aminosäuresequenzen, wobei insbesondere HPV 16 mit Homologien von 86% bzw. 68% viele Gemeinsamkeiten mit HPV 6 und 11 aufweist (s. Tab. 21).

Tab. 21: Prozentuale Übereinstimmung der L1-Aminosäuresequenzen unterschiedlicher HPV-Typen.

HPV	6	11	16	31	18	45
6	100	92	86	68	63	64
11		100	68	69	61	63
16			100	83	65	64
31				100	65	64
18					100	86
45						100

Die hohe Rate an L1-Homologien zwischen verschiedenen HPV-Typen rührt daher, dass die entsprechenden Proteinabschnitte als strukturgebende Bereiche (β -Faltblatt, α -Helix) die L1 Tertiärstruktur stabilisieren. Dadurch besteht ein konservierender Selektionsdruck auf die Sequenz. Dagegen unterliegen andere Bereiche, wie z.B. die oberflächlichen Bindungsstellen neutralisierender Antikörper (konformationelle Epitope) einem diversifizierenden Selektionsdruck durch das Immunsystem.

Eine effektive Immunabwehr kann daher eine zelluläre und humorale Komponente entweder gegen die konservierten, oder für jeden HPV-Typ hochvariablen konformationellen Epitope entwickeln.

Um mögliche Mechanismen der Entstehung von Kreuzreaktivitäten zu verstehen, muss man sich die Präsentation der konservierten und variablen Epitope am MHC II-Rezeptor der APC vorstellen. MHC II ist genetisch hoch polymorph. Die Bindung von antigenen Peptiden ist am MHC II ausserdem relativ unspezifisch, d.h. auch kleinere Abweichungen in der eigentlich passenden oder idealen Aminosäuresequenz des Peptids werden toleriert. Der MHC II-Peptidkomplex kann also ähnliche homologe Peptide aus den Antigenen verschiedener HPV Typen präsentieren. Diese leichte „Unschärfe“, gepaart mit der hohen Homologie konservierter Epitope unterschiedlicher HPV-Typen, bewirkt, dass diese Epitope annähernd gleich gut vom MHC II-Rezeptor präsentiert und dadurch auch vergleichbar effizient von spezifischen TH-Zellen erkannt werden können. So kann es theoretisch nach Impfung mit Cervarix und entsprechender Induktion von spezifischen T-Zellen gegen High-Risk HPV-Typen auch zum Erkennen von verwandten High-Risk oder gar von Low-Risk Antigenen kommen. Dies kann ab

der zweiten Impfung bzw. bei realem Kontakt mit Low-Risk-HPV eine klonale Expansion der ursprünglich gegen das konservierte Epitop der High-Risk-Typen gebildeten T-Zellen bewirken. Eine Kreuzreaktion würde auf diese Weise nicht nur zwischen im Impfstoff vorhandenen High-Risk mit verwandten High-Risk HPV-Typen auftreten (vgl. Kap. 4.4), sondern auch zwischen Low-Risk HPV-Typen zustande kommen.

Der Vergleich beider Impfstoffe bezüglich der T-Zell-Antwort gegen Low-Risk-Typen zeigt in Monat 12 für beide Low-Risk-Typen doppelt so hohe Frequenzen in der Gardasil-Gruppe, was mit einer Aktivierung von T-Zellen gegen sowohl konservierte als auch variable Epitope zu erklären wäre. Zu untersuchen wäre dann allerdings, warum Cervarix generell recht hohe und in Monat 7 sogar 1,3-fach höhere T-Zell-Frequenzen gegen HPV 11 erreicht. Durch die in diesem Fall recht hohe Standardabweichung wäre es möglich, dass die Immunantwort bei einigen Frauen der Cervarix-Gruppe durch vormalige Infektionen mit Low-Risk-Typen geboostert wurden und es auf diese Weise zu Ausreißern nach oben kommt, die die Mittelwerte verzerren. Gegen diese Erklärung spricht, dass eine Analyse aller potentiell mit HPV in Kontakt gekommenen Probandinnen keine signifikant höheren T-Zell-Antworten im Vergleich zu denjenigen Probandinnen, die keine Hinweise auf einen vormaligen HPV Kontakt hatten, erreichten. Ein anderes Argument für die hohen Frequenzen gegen Low-Risk-Typen ist, dass Cervarix in Monat 7 gegen beide High-Risk-Typen im Vergleich zu Gardasil 2,6-fach höhere T-Zell-Frequenzen induziert, unter denen auch ein großer Pool an T-Zellen zu vermuten ist, die gegen HPV 6 und 11 kreuzreagieren und auf diese Weise zu einer verhältnismäßig hohen Anzahl an messbaren T-Zellen führen. Da das hier verwendete Ex-Vivo-Assay das gesamte L1 Protein des jeweils zu untersuchenden HPV-Typs zur Stimulation der T-Zellen verwendet, können die einzelnen T-Zell-Populationen (konserviertes vs. konformationelles Epitop) nicht voneinander abgegrenzt werden.

Analog zur möglichen Kreuzreaktivität zwischen High-Risk- und Low-Risk-Typen innerhalb der Cervarix-Gruppe könnten auch die hohen Frequenzen der T-Zellen gegen Low-Risk-Typen in der Gardasil-Gruppe (s.o.) erklärt werden. Die L1-Sequenzhomologie zwischen den Typen 6 und 11 beträgt 92%. Dadurch könnten initial gegen HPV 6 gerichtete T-Zellen in der Lage sein, homologe

L1-Aminosäuresequenzen des HPV 11 L1-Proteins zu erkennen und darauf spezifisch zu reagieren. Gleiches gilt für HPV 11 spezifische T-Zellen, die gegen HPV 6 kreuzreagieren.

Über die biologische Bedeutung der kreuzreaktiven T-Zellen kann bis jetzt nur spekuliert werden. Theoretisch müssten bei einer mit Cervarix-geimpften Frau durch die erfolgte Impfung gegen HPV 16 und 18, kreuzreaktive T-Zellen gegen verwandte HPV-Typen vorhanden sein, die das konservierte Epitop erkennen. Im Falle einer Exposition mit beispielsweise HPV 6 dürften diese Zellen jedoch keine Impfstoff-induzierte Memory-B-Zelle gegen HPV 6 finden (im Impfstoff ist kein konformationelles HPV 6 Epitop enthalten) und es dürfte initial nicht zu einer HPV 6 spezifischen Antikörper-Antwort kommen. Möglicherweise führt jedoch die bereits vorhandene T-Zell-Immunität zu einer Beschleunigung der B-Zell-Aktivierung- und Differenzierung, so dass neutralisierende Antikörper schneller gebildet werden und schützen können. Zur weiteren Einschätzung der biologischen Wirkung kreuzreaktiver T-Zellen wird eine Epitop-spezifische Stimulation in einem weiterentwickelten Assay notwendig sein.

Eine Einschätzung ob es tatsächlich zu einer Kreuzreaktivität zwischen verwandten HPV-Typen kommt und ob die so gebildeten kreuzreagierenden T-Zellen das Immunsystem äquivalent zu direkt gebildeten HPV-typspezifischen T-Zellen unterstützen wäre in Bezug auf die Interpretation der durch den jeweiligen Impfstoff induzierten T-Zell-Frequenzen von großer Bedeutung.

4.4 Induktion von T-Zellen gegen verwandte High-Risk HPV-Typen

Zur Einschätzung einer möglichen Kreuzreaktivität innerhalb der Gruppe der High-Risk-Typen wurden in beiden Impfgruppen in Monat 7 und 12 zusätzliche Testungen auf HPV 31 und 45-spezifische T-Zellen durchgeführt. In beiden Gruppen waren die Frequenzen gegen HPV 16 1,8-fach höher als diejenigen gegen HPV 31. Die erreichten T-Zell-Werte gegen HPV 18 überstiegen diejenigen gegen HPV 45 jeweils um das 1,3-fache. Im direkten Vergleich beider Impfstoffe zeigte sich analog zu den Ergebnissen der High-Risk-Typen 16 und 18 in der Cervarix-Gruppe für HPV 31 und 45 um 2,5- bzw. 2,7-fach höhere maximale T-Zell-Frequenzen als in der Gardasil-Gruppe, die mit p-Werten von $p=0,028$ bzw. $p=0,048$ beide statistisch signifikant waren. In Monat 12 fielen die T-Zell-Werte der

Cervarix-Gruppe im Verhältnis zu denen der Gardasil-Gruppe stärker ab, so dass zu diesem Zeitpunkt kein signifikanter Unterschied mehr zwischen beiden Gruppen nachweisbar war.

Als ursächlich für die relativ starke T-Zell-Antwort auf verwandte High-Risk-Typen liegt es nahe, eine Kreuzreaktivität zwischen den verwandten HPV Typen anzunehmen. Dies kann mit dem gleichen Mechanismus wie bei der T-Zell-Antwort gegen Low-Risk-Typen in der Cervarix-Gruppe erklärt werden. Wie aus Tab. 20 ersichtlich, weisen sowohl HPV 16/ 31 als auch 18/ 45 eine jeweils ca. 85% ige Sequenzhomologie des L1-Proteins auf. In Kap. 4.3. wurde bereits eine Theorie zu möglichen Mechanismen hinter der Kreuzreaktivität formuliert. Die Tatsache, dass Cervarix in Monat 12 unerwarteterweise eine doppelt so hohe T-Zell-Antwort gegen HPV 45 im Vergleich zum eng verwandten und im Impfstoff enthaltenen HPV 18 zeigt, lässt sich nicht mit einer einfachen Kreuzreaktivität zwischen diesen beiden Typen erklären. Man könnte bei Vorliegen einer hohen Sequenzhomologie zu weiteren HPV-Typen von einer additiven Kreuzreaktivität ausgehen, die die gegen HPV 45 erreichten T-Zell-Frequenzen erhöht. Tabelle 20 zeigt jedoch, dass HPV 45 mit Ausnahme einer sehr hohen Homologie von 86% zu HPV 18 nur durchschnittlich ausgeprägte Homologien zu anderen HPV-Typen zeigt (ca. 65% zu HPV 6,11, 16 und 31). Die hohen Frequenzen gegen HPV 45 lassen sich durch die angewandte Methodik nicht zufriedenstellend erklären. Untersuchungen auf Basis von relevanten Einzelepitopen werden zur weiteren Klärung notwendig sein.

Mit jeweils ca. 2,7-fach höheren T-Zell-Frequenzen gegen HPV 31 und 45 für Cervarix im Vergleich zu Gardasil scheinen die Ergebnisse der vorliegenden Studie mit den bisher veröffentlichten serologischen Daten der Vergleichsstudie von Einstein et. al. vergleichbar zu sein [89]. Im PBNA konnten dort ebenfalls 2,7-fach höhere Titer gegen HPV 31 und ca. 1,5-fach höhere Titer gegen HPV 45 nachgewiesen werden. Zusammen mit der höheren klinischen Effektivität bezüglich der Kreuzprotektion von Cervarix im Vergleich zu Gardasil (s. Kap. 1.3.2.3.), scheinen die in der vorliegenden Studie ermittelten höheren T-Zell-Frequenzen in Zusammenhang mit den in der Vergleichsstudie von Einstein et al. [86] gezeigten höheren AK-Titern und höheren B-Gedächtniszell-Antworten zu stehen, so dass sich auf immunologischer und klinischer Ebene eine

Überlegenheit von Cervarix bezüglich der Kreuzreaktivität gegen verwandte High-Risk-Typen vermuten lässt.

4.5 Spezifischer Nachweis von IL-4+ TH₂-Zellen

In der vorliegenden Studie konnten erstmalig CD4+/ CD154+/IL-4+ T-Zellen im Blut von prophylaktisch mit HPV-Vaccinen geimpften Frauen gemessen werden. Es lässt sich festhalten, dass die Frequenzen mit Maximalwerten von 0,021% gegen Low-Risk-Typen (HPV 6, Gardasil) und 0,017% für High-Risk-Typen (HPV 16, Cervarix) im Vergleich zu den anderen untersuchten Interleukinen als eher gering einzuschätzen sind. Zwar kommt es in beiden Impfgruppen für fast alle HPV Typen im Impfverlauf zu einem z.T. hochsignifikanten Anstieg der T-Zell-Frequenzen (Ausnahme: HPV 16 Gardasil mit $p=0,066$), diese liegen aber zu den meisten Zeitpunkten im Bereich der Negativkontrolle, wodurch sie durch das verwendete Assay noch unzureichend genau abgebildet werden, d.h. die Sensitivität der Nachweismethode für dieses Zytokin nicht ausreicht.

Betrachtet man die während des Impfzyklus erhobenen Werte (BE 2+3+4) und mittelt diese, lassen sich zwischen beiden Impfstoffen für HPV 6, 11 und 16 in Bezug auf deren Potential, CD4+/ CD154+/ IL-4+ T-Zellen zu induzieren, keine signifikanten Unterschiede feststellen. HPV 18 erreicht in der Cervarix-Gruppe in Monat 7 signifikant höhere T-Zell-Frequenzen ($p=0,033$), die sich jedoch in Monat 12 bereits denen der Gardasil-Gruppe angleichen. Die biologische Bedeutung dieser Beobachtung ist unklar, man könnte jedoch mutmaßen, dass hohe Frequenzen an, während des Impfzyklus gebildeten, TH₂-Zellen initial zu einer starken B-Zell Aktivierung und Differenzierung sowie Gedächtnis-B-Zell-Induktion führen, die wiederum für hohe und lang anhaltende AK-Titer verantwortlich sein könnten, wie sie für Cervarix in mehreren Studien nachgewiesen wurden [81, 86].

Da das eingesetzte Ex-Vivo-Assay sehr verlässliche Ergebnisse für IL-2+ und IFN- γ + T-Zell-Messungen liefert, scheinen die in der IL-4 Färbung ermittelten niedrigen T-Zell-Frequenzen tatsächlich auf eine verhältnismäßig geringe Anzahl von TH₂-Zellen zurückzuführen sein. Mit dem Hintergrund des TH₁-Zell-induzierenden Adjuvanz in Cervarix wäre die hauptsächliche Bildung von TH₁-Zellen, d.h. IL-2 und IFN- γ produzierend, in dieser Impfstoffgruppe gut zu erklären. Man würde dann im Umkehrschluss allerdings in der Gardasil-Gruppe im Verhältnis mehr TH₂-

Zellen erwarten, was für den Aluminiumsalz-adjuvanzierten Impfstoff typisch wäre. Für keinen der in dieser Studie untersuchten HPV-Typen war ein solcher Trend nachweisbar. Gegen HPV 18 erreichte Cervarix sogar signifikant höhere IL-4+ T-Zell-Frequenzen als Gardasil.

Um eine noch validere Aussage bezüglich der TH₂-Antwort nach prophylaktischer Immunisierung mit HPV-Impfstoffen machen zu können, wäre die Etablierung eines noch sensitiveren Assays, unter Umständen mit der Messung mehrere TH₂-spezifischer Marker, notwendig.

4.6 Limitationen der Methodik

Verschiedene Limitationen begrenzen die Aussagekraft der Studie. Sie werden an dieser Stelle diskutiert, um die beschriebenen Ergebnisse korrekt einordnen zu können.

In der vorliegenden Studie war, bedingt durch eine geringe Anzahl an Studienmitarbeitern und den Auflagen des zuständigen Ethikkomitees, eine Verblindung der Untersucher und Probandinnen nicht umsetzbar. Da es sich durch den Beschluss des Ethikkomitees lediglich um eine Beobachtungsstudie handeln durfte, in der den Probandinnen die freie Impfstoffwahl zustand, ergab sich des Weiteren keine Möglichkeit zur Randomisierung. Im Vorfeld der Studie wurde deshalb nach Frauen gesucht, die sich dazu entschlossen hatten, sich in absehbarer Zeit von ihrem niedergelassenen Gynäkologen entweder mit Gardasil oder mit Cervarix impfen zu lassen. Die 38 Frauen, die dieses Kriterium erfüllten, wurden je nach ihrer eigenen Impfstoffwahl auf eine der beiden Gruppen verteilt. Obwohl es sich um nicht-randomisierte und relativ kleine Gruppen von Probandinnen handelte, waren diese in der post-hoc Analyse bezüglich des Alters, des immunologischen und gynäkologischen Status sowie des Sexualverhaltens nicht signifikant unterschiedlich (vgl. Kap.3.1).

Die im Fragebogen gemachten Angaben, inkl. Anzahl der bisherigen Sexualpartner, führten mit Ausnahme der akuten Erkrankung an Condylomata acuminata nicht zum Ausschluss von Probandinnen, wodurch die Kollektive beider Gruppen zwar als repräsentativ für die allgemeine Bevölkerung, jedoch nicht vergleichbar mit der eigentlichen Zielgruppe der Impfung (HPV-naive Mädchen/Frauen) anzusehen sind.

In vielen Studien, die sich mit der Immunantwort nach HPV-Impfung beschäftigen, wurden die teilnehmenden Probandinnen durch zervikale Abstriche und serologische Tests zu Beginn und im Verlauf der Studie auf vorhandene oder bereits überwundene HPV-Infektionen getestet, um die serologisch und HPV-DNA negativen Probandinnen, als eigentliche Zielgruppe der Impfung, separat analysieren zu können. Diese Untersuchungen fanden in der vorliegenden Studie nicht statt. Eine mögliche HPV-Infektion konnte lediglich anhand der T-Zell-Messungen, insbesondere der gegen die frühen HPV-Proteine E6 und E7, sowie der Auswertung der Fragebögen erfolgen. Durch mögliche ausgeheilte Infektionen mit einem oder mehreren HPV-Typen könnten die in dieser Studie ermittelten T-Zell-Werte aufgrund einer Boosterung bereits vorhandener T-Zell-Immunität in Richtung höherer Frequenzen verzerrt werden. Minimiert wird diese Wahrscheinlichkeit dadurch, dass in einer nachträglichen Analyse aller potentiell bereits mit HPV in Kontakt gekommener Probandinnen im Vergleich zu denen ohne Hinweise auf einen solchen Kontakt keine Unterschiede hinsichtlich der erreichten T-Zell-Frequenzen ermittelt werden konnte (s. Kap. 3.2.7). Die Studie war darauf ausgelegt, die erzielten T-Zell-Antworten beider Impfstoffe miteinander zu vergleichen. Neben der Homogenität bezüglich der Angaben im Fragebogen, ergab auch die Analyse der T-Zell-Antworten gegen frühe HPV-Proteine und die Analyse der T-Zell-Antwort gegen HPV 6, 11, 16 und 18 vor Impfung zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede, wodurch eine Verzerrung der Ergebnisse zwischen beiden Impfstoffgruppen durch vorbestehende HPV-Exposition unwahrscheinlich ist. Allerdings waren bei etwa $\frac{2}{3}$ der Probandinnen Hinweise auf eine frühere Exposition festzustellen.

Das eingesetzte Ex-Vivo-Assay zur Bestimmung spezifisch gegen HPV gerichteter T-Zellen im Vollblut, basiert auf einer von Frentsch et al. 2005 publizierten Methodik, die von AK Ramseger 2009 an die HPV-spezifische Fragestellung angepasst wurde [90]. Im verwendeten Assay wurde für jeden HPV-Typ ein entsprechender Peptidpool aus sich überlappenden 30-meren verwendet, die die vollständige Wildtypsequenz des L1 Antigens des jeweiligen HPV-Typs repräsentierten. In beiden Impfstoffen sind keine Einzelpeptide, sondern VLPs enthalten. Aktuelle Versuche, die beide Substrate direkt miteinander vergleichen, zeigen bisher jedoch ähnlich gute T-Zell-Ergebnisse mit nur leicht höheren

Frequenzen bei Verwendung von VLPs (T. Kube, persönliche Mitteilung). Der Einsatz von Peptidpools scheint daher eine legitime Alternative zu VLPs zu sein, um HPV-spezifische T-Zellen zu aktivieren.

Es wurde versucht, methodische Limitationen der Studie aufzuzeigen und auszugleichen. Diese Schwächen (keine Randomisierung, geringe Probandinnenzahl, größtenteils sexuell aktive Probandinnen, keine Zervikalabstriche) wurden durch post-hoc Analysen der erhobenen Daten jedoch weitestgehend überprüft und es wurden keine signifikanten Verschiebungen festgestellt. Die erhobenen T-Zell-Daten korrelieren gut mit den bisher veröffentlichten B-Zell-Daten und Analysen klinischer Effektivität, wobei zur Einschätzung der biologischen Bedeutung insbesondere der kreuzreaktiven T-Zellen in Zukunft größer angelegte Studien mit sensitiveren Assays nötig sein werden.

Trotz der Limitationen der Methodik war es möglich, verlässliche Daten über die durch HPV-Impfstoffe induzierten T-Zell-Frequenzen zu erheben. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass beide Impfstoffe hohe T-Zell-Frequenzen induzieren. Unmittelbar nach Abschluss des Impfzyklus zeigen Gardasil-geimpfte Frauen höhere Frequenzen gegen die Low-Risk-Typen 6 und 11, Cervarix-geimpfte Frauen höhere Frequenzen gegen die High-Risk Typen 16 und 18. Sechs Monate nach der dritten Impfung fallen die Frequenzen bei beiden Impfstoffen für alle untersuchten HPV-Typen jedoch auf ein vergleichbares, anhaltendes und relativ hohes Niveau ab. Es lässt sich weiterhin für beide Impfstoffe eine Kreuzreaktivität gegen die nahe verwandten HPV-Typen 31 und 45 nachweisen, die analog zu der stärkeren Antwort gegen HPV 16 und 18 in Cervarix-geimpften Frauen quantitativ höher liegt. Obwohl sich eine Parallele zu der durch Cervarix induzierten höheren klinischen Kreuzprotektion erkennen lässt, sind die Mechanismen der Kreuzreaktion und deren biologische Bedeutung bislang noch ungeklärt.

5 Zusammenfassung

HPV-Infektionen gehören zu den häufigsten sexuell übertragenen Infektionen und sind Auslöser von ca. 70% aller Zervixkarzinome (HPV 16 oder 18) und ca. 90% aller Condylomata acuminata (HPV 6 oder 11). Die STIKO empfiehlt aus diesem Grund die Impfung mit prophylaktischen HPV-Impfstoffen für Mädchen zwischen 12 und 17 Jahren. Zur Zeit stehen dafür der quadrivalente Impfstoff Gardasil (HPV 6/11/16/18) und der bivalente Impfstoff Cervarix (HPV 16/18) zur Verfügung, wobei beide in klinischen Studien durch eine sehr hohe Effektivität gegen HPV-assoziierte Läsionen überzeugt haben. Bezüglich der Immunogenität konnten, insbesondere gegen HPV 18, höhere Antikörpertiter in Cervarix-geimpften im Vergleich zu Gardasil-geimpften Frauen ermittelt werden.

Die vorliegende Arbeit vergleicht mit Hilfe eines Ex-Vivo-T-Zell-Assays beide Impfstoffe hinsichtlich ihres Potentials HPV-spezifische T-Zellen zu induzieren. In der longitudinalen Studie an 34 Frauen über einen Zeitraum von 12 Monaten konnten vor Impfung in beiden Gruppen vergleichbar minimale Frequenzen an HPV-spezifischen T-Zellen gegen die untersuchten HPV-Typen 6, 11, 16 und 18 nachgewiesen werden. Nach der ersten Impfung kam es bereits zu z.T. signifikanten Anstiegen der T-Zell-Frequenzen für die verschiedenen HPV-Typen. Beide Impfstoffe erzielten die höchsten T-Zell-Frequenzen in Monat 7. Die durch Gardasil induzierte spezifische T-Zell-Antwort war gegen Low-Risk-Typen wesentlich stärker ausgeprägt als diejenige gegen die High-Risk-Typen (HPV 6>11>16>18). In der Cervarix-Gruppe lassen sich unerwarteterweise spezifische T-Zellen sowohl gegen High-Risk, als auch gegen Low-Risk-Typen messen. Die Antwort gegen die im Impfstoff enthaltenen High-Risk-Typen ist dabei höher als diejenige gegen die Low-Risk-Typen (HPV 16>18>11>6). Sechs Monate nach der dritten Impfung waren für alle vier untersuchten HPV-Typen in beiden Impfstoff-Gruppen hochsignifikant höhere T-Zell-Frequenzen als vor der Impfung messbar. Im Vergleich beider Impfstoffe erreichte Gardasil gegen die Low-Risk Typen HPV 6 und 11 in Monat 12 ca 1,8 bzw. 1,9-fach höhere T-Zell-Antworten (statistisch nicht signifikant). Bezüglich der Antwort gegen High-Risk-Typen erreichte Cervarix zwar in Monat 7 sowohl für HPV 16, als auch für HPV 18 ca. 2,6-fach höhere Frequenzen als Gardasil (für HPV 16 statistisch nicht signifikant, für HPV 18

jedoch signifikant). In Monat 12 bestand diesbezüglich zwischen beiden Impfstoffen kein deutlicher Unterschied mehr.

Beide Impfstoffe induzierten kreuzreaktive T-Zellen gegen die High-Risk-Typen HPV 31 und 45. In Monat 7 ergaben sich in der Cervarix-Gruppe analog zu der stärkeren Antwort gegen HPV 16 und 18 um ca. 2,6-fach höhere Frequenzen gegen HPV 31 und 45. In Monat 12 glichen sich diese für HPV 31 zwischen beiden Gruppen an, für HPV 45 blieben jedoch in der Cervarix-Gruppe um 2,3-fach höhere Frequenzen bestehen (statistisch nicht signifikant).

Die Kreuzreaktivität gegen HPV 31 und 45 lässt sich mit der hohen Homologie der L1-Aminosäuresequenz zwischen den unterschiedlichen HPV-Typen erklären. Inwieweit die so gebildeten T-Zellen jedoch biologisch relevant sind, lässt sich mit der verwendeten Methodik nicht klären. Die höhere Frequenz an kreuzreaktiven T-Zellen in der Cervarix-Gruppe korreliert aber mit der bereits nachgewiesenen stärkeren klinischen Kreuzprotektion gegen verwandte HPV-Typen. Weitere Studien unter Einsatz von relevanten Einzelepitopen könnten in Zukunft Aufschluss über die biologische Bedeutung insbesondere dieser kreuzreaktiven T-Zellen erbringen.

Als Fazit hat die vorliegende Arbeit die durch beide HPV-Impfstoffe ausgelöste zelluläre TH-Gedächtniszell-Immunität durch differenzierte Messung der T-Zell-Antworten charakterisiert. Kurzfristige Unterschiede, möglicherweise bedingt durch das neuartige Adjuvanz in Cervarix, wurden beobachtet. Mittelfristig wurden jedoch anhaltende, hohe und vergleichbar starke Gedächtnis-T-Zell-Antworten gegen alle gemessenen Antigene bei beiden Impfstoffen nachgewiesen.

6 Literaturverzeichnis

1. Kayser F.H., Böttger E.C., Zinkernagel R.M. *Taschenlehrbuch medizinische Mikrobiologie*. 11. Auflage. Stuttgart: Thieme Verlag, 2005.
2. *HPV genome organization*. Research and Advanced Studies Center of the National Polytechnic Institute of Mexico, 2009. [Zugriff am 18.03.2010 unter <http://www.cinvestav.mx/genetica/MyFiles/Papillomavirus/PAPgeno.htm>]
3. de Villiers E.M., Fauquet C., Broker T.R., Bernard H.U., zur Hausen H. *Classification of papillomaviruses*. *Virology* 2004; **324**(1): p. 17-27.
4. Stanley M. *Immunobiology of HPV and HPV vaccines*. *Gynecol Oncol* 2008; **109**(2 Suppl): p. S15-21.
5. Cogliano V., Baan R., Straif K., et al. *Carcinogenicity of human papillomaviruses*. *Lancet Oncol* 2005; **6**(4): p. 204.
6. Munoz N., Bosch F. X., de Sanjose S., et al. *Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer*. *N Engl J Med* 2003; **348**(6): p. 518-527.
7. Munoz N., Castellsague X., de Gonzalez A. B., Gissmann L. *Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer*. *Vaccine* 2006; **24 Suppl 3**: p. S3/1-10.
8. *Prävention, Diagnostik und Therapie der HPV-Infektion und präinvasiver Läsionen des weiblichen Genitale, AWMF-Leitlinien-Register Nr. 015/027*. AWMF, 2008. Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG), Arbeitsgemeinschaft Infektiologie und Infektimmunologie (AGII), Berufsverband der Frauenärzte e.V. (BVF), Deutsche Gesellschaft für Pathologie e.V., Deutsche Gesellschaft für Urologie e.V., Deutsche Krebsgesellschaft e.V., Deutsche STD-Gesellschaft e.V., Frauenselbsthilfe nach Krebs e.V. . [Zugriff am 18.03.2010 unter <http://leitlinien.net/>]
9. Gillison M. L., Koch W. M., Capone R. B., et al. *Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers*. *J Natl Cancer Inst* 2000; **92**(9): p. 709-720.
10. Parkin D. M. *The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002*. *Int J Cancer* 2006; **118**(12): p. 3030-3044.
11. Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. Hrsg. *Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends. 7. Ausgabe*. Berlin, Deutschland. 2010.
12. Schwartz S.M. *Increased incidence of adenocarcinoma of the cervix in young women in the United States*. *Am J Epidemiol* 1986; **124**(6): p. 1045-1047.

13. Parkin D. M., Bray F., Ferlay J., Pisani P. *Estimating the world cancer burden: Globocan 2000*. Int J Cancer 2001; **94**(2): p. 153-156.
14. Parkin D. M., Bray F. I., Devesa S. S. *Cancer burden in the year 2000. The global picture*. Eur J Cancer 2001; **37 Suppl 8**: p. S4-66.
15. Schlecht N. F., Kulaga S., Robitaille J., et al. *Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia*. JAMA 2001; **286**(24): p. 3106-3114.
16. Brinton L. A., Hamman R. F., Huggins G. R., et al. *Sexual and reproductive risk factors for invasive squamous cell cervical cancer*. J Natl Cancer Inst 1987; **79**(1): p. 23-30.
17. West D. W., Schuman K. L., Lyon J. L., Robison L. M., Allred R. *Differences in risk estimations from a hospital and a population-based case-control study*. Int J Epidemiol 1984; **13**(2): p. 235-239.
18. Potischman N., Brinton L. A. *Nutrition and cervical neoplasia*. Cancer Causes Control 1996; **7**(1): p. 113-126.
19. Schneider A., Shah K. *The role of vitamins in the etiology of cervical neoplasia: an epidemiological review*. Arch Gynecol Obstet 1989; **246**(1): p. 1-13.
20. Ho G. Y., Burk R. D., Fleming I., Klein R. S. *Risk of genital human papillomavirus infection in women with human immunodeficiency virus-induced immunosuppression*. Int J Cancer 1994; **56**(6): p. 788-792.
21. Matas A. J., Simmons R. L., Kjellstrand C. M., Buselmeier T. J., Najarian J. S. *Increased incidence of malignancy during chronic renal failure*. Lancet 1975; **1**(7912): p. 883-886.
22. Hoover R. *Effects of drugs - immunosuppression* HH. Hyatt. Origins of Human Cancer. 1. Auflage. Cold Spring Harbor Laboratory, 1977.
23. McCann M. F., Irwin D. E., Walton L. A., Hulka B. S., Morton J. L., Axelrad C. M. *Nicotine and cotinine in the cervical mucus of smokers, passive smokers, and nonsmokers*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1992; **1**(2): p. 125-129.
24. Szarewski A., Jarvis M. J., Sasieni P., et al. *Effect of smoking cessation on cervical lesion size*. Lancet 1996; **347**(9006): p. 941-943.
25. Madeleine M. M., Daling J. R., Schwartz S. M., et al. *Human papillomavirus and long-term oral contraceptive use increase the risk of adenocarcinoma in situ of the cervix*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2001; **10**(3): p. 171-177.
26. International Agency for Research on Cancer. *Hormonal Contraception and Post-menopausal Hormonal Therapy*. Aus: Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 72. Lyon, Frankreich. 1999. [Zugriff am 18.03.2010 unter <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol72/index.php>]

27. Apple R. J., Erlich H. A., Klitz W., Manos M. M., Becker T. M., Wheeler C. M. *HLA DR-DQ associations with cervical carcinoma show papillomavirus-type specificity*. Nat Genet 1994; **6**(2): p. 157-162.
28. Helland A., Borresen A. L., Kaern J., Ronningen K. S., Thorsby E. *HLA antigens and cervical carcinoma*. Nature 1992; **356**(6364): p. 23.
29. Aguilera-Barrantes I., Magro C., Nuovo G. J. *Verruca vulgaris of the vulva in children and adults: a nonvenereal type of vulvar wart*. Am J Surg Pathol 2007; **31**(4): p. 529-535.
30. Garland S. M., Steben M., Sings H. L., et al. *Natural history of genital warts: analysis of the placebo arm of 2 randomized phase III trials of a quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) vaccine*. J Infect Dis 2009; **199**(6): p. 805-814.
31. *Condylomata acuminata und andere HPV-assoziierte Krankheitsbilder von Genitale, Anus und Harnröhre, AWMF-Leitlinien-Register Nr. 059/001*. AWMF, 2006. Leitlinien der Deutschen STD-Gesellschaft in Zusammenarbeit mit der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft und der Paul-Ehrlich-Gesellschaft. [Zugriff am 18.03.2010 unter <http://leitlinien.net/>]
32. Dolanc R., Kocher T., Langer I., Marti W. R., Pierer G., Harder F. [*Malignant transformation of perianal Buschke-Lowenstein tumor. Extensive abdominoperineal rectum excision and reconstruction with transpelvic myocutaneous rectus abdominis muscle flap*]. Chirurg 2002; **73**(4): p. 370-374.
33. Andratschke M., Betz C., Leunig A. [*Laryngeal papillomatosis: etiology, diagnostics and therapy*]. HNO 2008; **56**(12): p. 1190-1196.
34. Baseman J. G., Koutsky L. A. *The epidemiology of human papillomavirus infections*. J Clin Virol 2005; **32 Suppl 1**: p. S16-24.
35. Koutsky L. *Epidemiology of genital human papillomavirus infection*. Am J Med 1997; **102**(5A): p. 3-8.
36. de Sanjose S., Diaz M., Castellsague 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): p. 453-459.
37. Ho G. Y., Bierman R., Beardsley L., Chang C. J., Burk R. D. *Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women*. N Engl J Med 1998; **338**(7): p. 423-428.
38. Richardson H., Kelsall G., Tellier P., et al. *The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2003; **12**(6): p. 485-490.
39. Trottier H., Franco E. L. *The epidemiology of genital human papillomavirus infection*. Vaccine 2006; **24 Suppl 1**: p. S1-15.

40. Woodman C. B., Collins S., Winter H., *et al.* *Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study.* Lancet 2001; **357**(9271): p. 1831-1836.
41. Kaufmann A. M., Backsch C., Schneider A., Durst M. *HPV induced cervical carcinogenesis: molecular basis and vaccine development.* Zentralbl Gynakol 2002; **124**(11): p. 511-524.
42. Walboomers J. M., Jacobs M. V., Manos M. M., *et al.* *Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide.* J Pathol 1999; **189**(1): p. 12-19.
43. Munoz N., Bosch F. X., Castellsague X., *et al.* *Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective.* Int J Cancer 2004; **111**(2): p. 278-285.
44. Smith J. S., Lindsay L., Hoots B., *et al.* *Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update.* Int J Cancer 2007; **121**(3): p. 621-632.
45. Jayshree R. S., Sreenivas A., Tessy M., Krishna S. *Cell intrinsic & extrinsic factors in cervical carcinogenesis.* Indian J Med Res 2009; **130**(3): p. 286-295.
46. Hiller T, Iftner T. *The human papillomavirus.* Prendiville W, Davies P. HPV Handbook. London: Taylor & Francis, 2004.
47. Garnett T. O., Duerksen-Hughes P. J. *Modulation of apoptosis by human papillomavirus (HPV) oncoproteins.* Arch Virol 2006; **151**(12): p. 2321-2335.
48. von Knebel Doeberitz M., Rittmuller C., zur Hausen H., Durst M. *Inhibition of tumorigenicity of cervical cancer cells in nude mice by HPV E6-E7 anti-sense RNA.* Int J Cancer 1992; **51**(5): p. 831-834.
49. Deetjen P, Speckmann E.J., Hescheler J. *Physiologie.* 4. Auflage. München: Urban & Fischer, 2005.
50. Stanley M., Gissmann L., Nardelli-Haeffliger D. *Immunobiology of human papillomavirus infection and vaccination - implications for second generation vaccines.* Vaccine 2008; **26 Suppl 10**: p. K62-67.
51. Linsley P. S., Clark E. A., Ledbetter J. A. *T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1.* Proc Natl Acad Sci U S A 1990; **87**(13): p. 5031-5035.
52. Frentsch M., Arbach O., Kirchhoff D., *et al.* *Direct access to CD4+ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression.* Nat Med 2005; **11**(10): p. 1118-1124.
53. Viscidi R. P., Schiffman M., Hildesheim A., *et al.* *Seroreactivity to human papillomavirus (HPV) types 16, 18, or 31 and risk of subsequent HPV infection: results from a population-based study in Costa Rica.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2004; **13**(2): p. 324-327.

54. *European Public Assessment Report (EPAR) for authorised medicinal products for human use - Cervarix*. European Medicines Agency, 2009. [Zugriff am 18.03.2010 unter <http://www.ema.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/cervarix/emea-combined-h721de.pdf>]
55. *European Public Assessment Report (EPAR) for authorised medicinal products for human use - Gardasil*. European Medicines Agency, 2010. [Zugriff am 18.03.2010 unter <http://www.ema.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/gardasil/emea-combined-h703de.pdf>]
56. White R. G., Coons A. H., Connolly J. M. *Studies on antibody production. III. The alum granuloma*. J Exp Med 1955; **102**(1): p. 73-82.
57. Li H., Nookala S., Re F. *Aluminum hydroxide adjuvants activate caspase-1 and induce IL-1beta and IL-18 release*. J Immunol 2007; **178**(8): p. 5271-5276.
58. Huber M., Beuscher H. U., Rohwer P., Kurrle R., Rollinghoff M., Lohoff M. *Costimulation via TCR and IL-1 receptor reveals a novel IL-1alpha-mediated autocrine pathway of Th2 cell proliferation*. J Immunol 1998; **160**(9): p. 4242-4247.
59. Xu D., Trajkovic V., Hunter D., et al. *IL-18 induces the differentiation of Th1 or Th2 cells depending upon cytokine milieu and genetic background*. Eur J Immunol 2000; **30**(11): p. 3147-3156.
60. Baldrige J. R., McGowan P., Evans J. T., et al. *Taking a Toll on human disease: Toll-like receptor 4 agonists as vaccine adjuvants and monotherapeutic agents*. Expert Opin Biol Ther 2004; **4**(7): p. 1129-1138.
61. Casella C. R., Mitchell T. C. *Putting endotoxin to work for us: monophosphoryl lipid A as a safe and effective vaccine adjuvant*. Cell Mol Life Sci 2008; **65**(20): p. 3231-3240.
62. *Herpevac Trial for Women*. National Institute of Allergy and Infectious Diseases, 2009. [Zugriff am 18.03.2010 unter <http://www3.niaid.nih.gov/topics/genitalHerpes/research/herpevac/default.htm>]
63. Evans J. T., Cluff C. W., Johnson D. A., Lacy M. J., Persing D. H., Baldrige J. R. *Enhancement of antigen-specific immunity via the TLR4 ligands MPL adjuvant and Ribi.529*. Expert Rev Vaccines 2003; **2**(2): p. 219-229.
64. Martin M., Michalek S. M., Katz J. *Role of innate immune factors in the adjuvant activity of monophosphoryl lipid A*. Infect Immun 2003; **71**(5): p. 2498-2507.
65. Tiberio L., Fletcher L., Eldridge J. H., Duncan D. D. *Host factors impacting the innate response in humans to the candidate adjuvants RC529 and monophosphoryl lipid A*. Vaccine 2004; **22**(11-12): p. 1515-1523.
66. Iwasaki A., Medzhitov R. *Toll-like receptor control of the adaptive immune responses*. Nat Immunol 2004; **5**(10): p. 987-995.
67. Pasare C., Medzhitov R. *Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells*. Science 2003; **299**(5609): p. 1033-1036.

68. Giannini S. L., 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): p. 5937-5949.
69. Koutsky L. A., Ault K. A., Wheeler C. M., *et al.* *A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine.* *N Engl J Med* 2002; **347**(21): p. 1645-1651.
70. Garland S. M., Hernandez-Avila M., Wheeler C. M., *et al.* *Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases.* *N Engl J Med* 2007; **356**(19): p. 1928-1943.
71. Mao C., Koutsky L. A., Ault K. A., *et al.* *Efficacy of human papillomavirus-16 vaccine to prevent cervical intraepithelial neoplasia: a randomized controlled trial.* *Obstet Gynecol* 2006; **107**(1): p. 18-27.
72. Villa L. L., Costa R. L., Petta C. A., *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): p. 1459-1466.
73. Group Future II Study. *Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent high-grade cervical lesions.* *N Engl J Med* 2007; **356**(19): p. 1915-1927.
74. Ault K. A., Future I. I. Study Group. *Effect of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like-particle vaccine on risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2, grade 3, and adenocarcinoma in situ: a combined analysis of four randomised clinical trials.* *Lancet* 2007; **369**(9576): p. 1861-1868.
75. Villa L. L., Costa R. L., Petta C. A., *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): p. 271-278.
76. Munoz N., Manalastas R., Jr., Pitisuttithum P., *et al.* *Safety, immunogenicity, and efficacy of quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, 18) recombinant vaccine in women aged 24-45 years: a randomised, double-blind trial.* *Lancet* 2009; **373**(9679): p. 1949-1957.
77. Group Future II Study. *Prophylactic efficacy of a quadrivalent human papillomavirus (HPV) vaccine in women with virological evidence of HPV infection.* *J Infect Dis* 2007; **196**(10): p. 1438-1446.
78. Joura E. A., Leodolter S., Hernandez-Avila M., *et al.* *Efficacy of a quadrivalent prophylactic human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like-particle vaccine against high-grade vulval and vaginal lesions: a combined analysis of three randomised clinical trials.* *Lancet* 2007; **369**(9574): p. 1693-1702.
79. Paavonen J., Jenkins D., Bosch F. X., *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): p. 2161-2170.
80. Paavonen J., Naud P., Salmeron J., *et al.* *Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): final analysis of a double-blind, randomised study in young women.* Lancet 2009; **374**(9686): p. 301-314.
 81. GlaxoSmithKline Vaccine H. P. V. Study Group, Romanowski B., de Borja P. C., *et al.* *Sustained efficacy and immunogenicity of the human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine: analysis of a randomised placebo-controlled trial up to 6.4 years.* Lancet 2009; **374**(9706): p. 1975-1985.
 82. Robert Koch Institut. *Mitteilung der Ständigen Impfkommission (STIKO) am Robert Koch-Institut: Impfung gegen humane Papillomaviren (HPV) für Mädchen von 12 bis 17 Jahren – Empfehlung und Begründung.* 2007; **12**: p. 97-103.
 83. de Jong A., van Poelgeest M. I., van der Hulst J. M., *et al.* *Human papillomavirus type 16-positive cervical cancer is associated with impaired CD4+ T-cell immunity against early antigens E2 and E6.* Cancer Res 2004; **64**(15): p. 5449-5455.
 84. Harper D. M., Franco E. L., Wheeler C., *et al.* *Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial.* Lancet 2004; **364**(9447): p. 1757-1765.
 85. Olsson S. E., Villa L. L., Costa R. L., *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): p. 4931-4939.
 86. Einstein M. H., Baron M., Levin M. J., *et al.* *Comparison of the immunogenicity and safety of Cervarix() and Gardasil((R)) human papillomavirus (HPV) cervical cancer vaccines in healthy women aged 18-45 years.* Hum Vaccin 2009; **5**(10): p. 705-719.
 87. Block S. L., 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): p. 2135-2145.
 88. MSD Sanofi Pasteur. *Gardasil Fachinformation.* 2009.
 89. *A phase IIIb, observer-blind, randomized, multicenter study with two parallel groups to compare the immunogenicity of GlaxoSmithKline Biologicals' HPV-16/18 L1/AS04 vaccine versus Merck's Gardasil® [Quadrivalent Human Papillomavirus (Types 6, 11, 16, 18) Recombinant Vaccine Merck & Co., Inc.] vaccine when administered intramuscularly according to a 3-dose schedule in healthy adult females 18-45 years of age.* Clinical Study Register GSK, 2010. [Zugriff am 28.06.2010 unter <http://www.gsk-clinicalstudyregister.com/files/pdf/20187.pdf>]

90. Ramseger AK. *Messung zellulärer Immunantworten im Rahmen der prophylaktischen Impfung gegen Humane Papillomviren*. Dissertation, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Klinik für Gynäkologie mit Schwerpunkt gynäkologischer Onkologie, 2009.
91. *Introduction to flow cytometry*. Abcam®, 2010. A guide to flow cytometry. How does it work? What is it used for? [Zugriff am 19.03.2010 unter <http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=11446>]
92. *Durchflusszytometrie (FACS): Messprinzip & Aufbau*. Antikörper-online.de. [Zugriff am 18.03.2010 unter <http://www.antikoerper-online.de/resources/17/607/Durchflusszytometrie+FACS+Messprinzip++Aufbau/>]
93. *Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide*. BD Biosciences, 2000. [Zugriff am 19.03.2010 unter http://www.umt.edu/cehs/BD_Learning_Guide.pdf]
94. Sopori M. L., Kozak W. *Immunomodulatory effects of cigarette smoke*. J Neuroimmunol 1998; **83**(1-2): p. 148-156.
95. Burk R. D., Ho G. Y., 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): p. 679-689.
96. Nielsen A., Kjaer S. K., 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): p. 276-282.
97. Janeway CA Travers, P Walport, M Shlomchik, M. *Immunobiologie*. 5. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2002.
98. Olsson S. E., Kjaer S. K., Sigurdsson K., et al. *Evaluation of quadrivalent HPV 6/11/16/18 vaccine efficacy against cervical and anogenital disease in subjects with serological evidence of prior vaccine type HPV infection*. Hum Vaccin 2009; **5**(10).
99. Hepburn H.M. et al. *Ex vivo monitoring of cellular memory responses in young women immunized with either Gardasil® or Cervarix™ four years prior to enrolment*. 25th international Papillomavirus Conference, Malmö/ Schweden. 2009.
100. Moscicki A. B., Schiffman M., Kjaer S., Villa L. L. *Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer*. Vaccine 2006; **24 Suppl 3**: p. S3/42-51.

7 Abkürzungen

A. dest.	destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
AIN	anale intraepitheliale Neoplasie
AIS	Adenokarzinom in situ
AK	Antikörper
ANOVA	<i>engl.</i> analysis of variance
APC	Allophycocyanin
APC	<i>engl.</i> antigen presenting cell
AS04	neuartiges Adjuvanz, das sich aus einem Aluminiumsalz und Monophosphoryl-Lipid A zusammensetzt
ATP	<i>engl.</i> According-to-protocol
BCR	<i>engl.</i> B-Cell-Receptor
BD	Becton Dickinson
BE	Blutentnahme
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
Ca	Karzinom
CD	<i>engl.</i> cluster of differentiation
CIN	cervikale intraepitheliale Neoplasie
CIS	Carcinoma in situ
CT-Zellen	zytotoxische T-Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>engl.</i> deoxyribonucleic acid
E1 – E8	<i>engl.</i> early protein 1-8
E2F	Transkriptionsfaktor, der im Normalfall durch das RB-Protein gebunden wird
EDTA	<i>engl.</i> ethylenediaminetetraacetic acid
EMBnet	<i>engl.</i> European Molecular Biology Network

FACS	<i>engl.</i> fluorescence-activated cell sorting
FCS	<i>engl.</i> fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>engl.</i> forward scatter
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HPV	humanes Papillomvirus
IL	Interleukin
IFN	Interferon
IQR	Interquartilsabstand
ITT	<i>engl.</i> intention-to-treat
Kap.	Kapitel
L1/ 2	<i>engl.</i> late protein 1/ 2
LCR	<i>engl.</i> long control region
MHC I/II	<i>engl.</i> major histocompatibility complex I/II
MPL	Monophosphoryl-Lipid A (Bestandteil des Adjuvanz AS04)
MSD	Sharp & Dohme (Europa) bzw. Merck & Co., Inc. (USA und Kanada)
n. s.	nicht signifikant
ORF	<i>engl.</i> open reading frame
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
P53	Tumorsuppressorgen mit Molekulargewicht von 53 kD
Pap-Abstrich	Zytologischer Zervix-Abstrich mit Test nach Papanicolaou
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBNA	Pseudovirion Based Neutralization Assay
PBS	<i>engl.</i> phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PIN	penile intraepitheliale Neoplasie
pRB	Tumorsuppressorgen, erstmalig in Retinoblastomen nachgewiesen
Rpm	<i>engl.</i> rounds per minute

RPMI	Zellkulturmedium, basiert auf einer Lösung von Glukose, Salzen, Aminosäuren und Vitaminen
s.	siehe
s.o.	siehe oben
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 disease
STIKO	ständige Impfkommission
TCR	<i>engl.</i> T-Cell-Receptor
TH-Zellen	T-Helfer-Zellen
TLR	<i>engl.</i> Toll-like Receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TVC	<i>engl.</i> total-vaccinated-cohort
u.a.	unter anderem
VAIN	vaginale intraepitheliale Neoplasie
Vgl.	vergleiche
VIN	vulväre intraepitheliale Neoplasie
VLP	<i>engl.</i> Virus-like Particles
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
ZxCa	Zervixkarzinom

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

ABB. 1: BÖSARTIGE ERKRANKUNGEN DER EKTOZERVIX: ALTERSSPEZIFISCHE ERKRANKUNGSRATEN IN DEUTSCHLAND FÜR 1980, 1990 UND 2006	3
ABB. 2: PROZENTUALER ANTEIL AUSGEWÄHLTER TUMORLOKALISATIONEN AN ALLEN KREBSSTERBEFÄLLEN IN DEUTSCHLAND 2006	3
ABB. 3: ALTERSSPEZIFISCHE PRÄVALENZ VON HPV BEI FRAUEN IN UNTERSCHIEDLICH ENTWICKELTEN LÄNDERN	5
ABB. 4: PRIMING VON NAIVEN CD4+- T-ZELLEN UND INITIATION EINER CD4-HELPER-ZELL ANTWORT.	10
ABB. 5: TH-ZELL-UNTERSTÜTZUNG (IN DIESEM FALL TH ₂) FÜR VORGEPRIMTE B-ZELLEN IM LYMPHKNOTEN	11
ABB. 6: STUDIENDESIGN DER LONGITUDINALEN VERGLEICHSTUDIE.....	23
ABB. 7: PRINZIP DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE.....	27
ABB. 8: ENTSTEHUNG DES VORWÄRTS- UND SEITWÄRTSSTREULICHTS.....	28
ABB. 9: ANSTIEG IL-2 PRODUZIERENDER, SPEZIFISCHER T-HELPER-ZELLEN GEGEN HPV 6,11, 16 ODER 18 IN DER GARDASIL-GRUPPE ABHÄNGIG VOM IMPFSTATUS DER PROBANDINNEN.	37
ABB.10: ANSTIEG IL-2-PRODUZIERENDER, SPEZIFISCHER T-HELPER-ZELLEN GEGEN HPV 6,11, 16 ODER 18 IN DER CERVARIX-GRUPPE ABHÄNGIG VOM IMPFSTATUS DER PROBANDINNEN.	44
ABB.11: INDIVIDUELLE VERLÄUFE DER T-ZELL-ANTWORTEN GEGEN DIE POSITIVKONTROLLE SEB, DIE LOW-RISK HPV-TYPEN 6 UND 11, SOWIE DIE HIGH-RISK HPV-TYPEN 16 UND 18 BIS JEWEILS MONAT 12 NACH ERSTER IMPFUNG.....	62
TAB. 1: VERGLEICH DER PROPHYLAKTISCHEN HPV-IMPfstOFFE.....	14
TAB. 2: PROBANDEN-CHARAKTERISTIKA NACH SELBSTBEANTWORTETEM FRAGEBOGEN.....	34
TAB. 3: ANSTIEG IL-2-PRODUZIERENDER, SPEZIFISCHER T-HELPER-ZELLEN GEGEN HPV 6,11, 16, 18, 31 UND 45 IN DER GARDASIL-GRUPPE ABHÄNGIG VOM UNTERSUCHTEN HPV-TYP.....	39
TAB. 4: ANSTIEG IFN- γ -PRODUZIERENDER, SPEZIFISCHER T-HELPER-ZELLEN GEGEN HPV 6,11, 16, 18, 31 UND 45 IN DER GARDASIL-GRUPPE ABHÄNGIG VOM UNTERSUCHTEN HPV-TYP.....	41
TAB. 5: ANSTIEG IL-4-PRODUZIERENDER, SPEZIFISCHER T-HELPER-ZELLEN GEGEN HPV 6, 11, 16 UND 18 IN DER GARDASIL-GRUPPE ABHÄNGIG VOM UNTERSUCHTEN HPV-TYP.	42
TAB. 6: ANSTIEG IL-2-PRODUZIERENDER, SPEZIFISCHER T-HELPER-ZELLEN GEGEN HPV 6,11, 16, 18, 31 UND 45 IN DER CERVARIX-GRUPPE ABHÄNGIG VOM UNTERSUCHTEN HPV-TYP.....	46
TAB. 7: ANSTIEG IFN- γ -PRODUZIERENDER, SPEZIFISCHER T-HELPER-ZELLEN GEGEN HPV 6,11, 16, 18, 31 ODER 45 IN DER CERVARIX-GRUPPE ABHÄNGIG VOM UNTERSUCHTEN HPV-TYP.	48
TAB. 8: ANSTIEG IL-4-PRODUZIERENDER, SPEZIFISCHER T-HELPER-ZELLEN GEGEN HPV 6,11, 16 ODER 18 IN DER CERVARIX-GRUPPE ABHÄNGIG VOM UNTERSUCHTEN HPV-TYP.	50
TAB. 9: VERGLEICH BEIDER IMPfstOFFE HINSICHTLICH DER ERZIELTEN CD4+/ CD154+/ IL-2+ T-ZELL-FREQUENZEN IN DER NEGATIV- UND POSITIV-KONTROLLE ABHÄNGIG VOM IMPFSTATUS DER PROBANDINNEN.....	51

TAB. 10: VERGLEICH BEIDER IMPFSTOFFE HINSICHTLICH DER ERZIELTEN CD4+/ CD154+/ IL-2+ T-ZELL-FREQUENZEN GEGEN HPV 16 UND HPV 18 ABHÄNGIG VOM IMPFSTATUS DER PROBANDINNEN.	53
TAB. 11: VERGLEICH BEIDER IMPFSTOFFE HINSICHTLICH DER ERZIELTEN CD4+/ CD154+/ IL-2+ T-ZELL-FREQUENZEN GEGEN HPV 6 UND HPV 11 ABHÄNGIG VOM IMPFSTATUS DER PROBANDINNEN.	54
TAB. 12: VERGLEICH BEIDER IMPFSTOFFE HINSICHTLICH DER ERZIELTEN CD4+/ CD154+/ IL-2+ T-ZELL-FREQUENZEN GEGEN HPV 31 UND HPV 45 ABHÄNGIG VOM IMPFSTATUS DER PROBANDINNEN.	55
TAB. 13: VERGLEICH BEIDER IMPFSTOFFE HINSICHTLICH DER ERZIELTEN CD4+/ CD154+/ IFN- γ + T-ZELL-FREQUENZEN GEGEN HPV 6 UND HPV 11 ABHÄNGIG VOM IMPFSTATUS DER PROBANDINNEN.	56
TAB. 14: VERGLEICH BEIDER IMPFSTOFFE HINSICHTLICH DER ERZIELTEN CD4+/ CD154+/ IFN- γ + T-ZELL-FREQUENZEN GEGEN HPV 16 UND HPV 18 ABHÄNGIG VOM IMPFSTATUS DER PROBANDINNEN.	57
TAB. 15: VERGLEICH BEIDER IMPFSTOFFE HINSICHTLICH DER ERZIELTEN CD4+/ CD154+/ IFN- γ + T-ZELL-FREQUENZEN GEGEN HPV 31 UND HPV 45 ABHÄNGIG VOM IMPFSTATUS DER PROBANDINNEN.	57
TAB. 16: :VERGLEICH BEIDER IMPFSTOFFE HINSICHTLICH DER ERZIELTEN CD4+/ CD154+/ IL-4+ T-ZELL-FREQUENZEN GEGEN HPV 6 UND HPV 11 ABHÄNGIG VOM IMPFSTATUS DER PROBANDINNEN.	58
TAB. 17: VERGLEICH BEIDER IMPFSTOFFE HINSICHTLICH DER ERZIELTEN CD4+/ CD154+/ IL-4+ T-ZELL-FREQUENZEN GEGEN HPV 16 UND HPV 18 ABHÄNGIG VOM IMPFSTATUS DER PROBANDINNEN.	59
TAB. 18: ANZAHL DER PROBANDINNEN MIT NICHT NACHWEISBAREN SPEZ. T-ZELLEN GEGEN DIE AUFGEFÜHRTEN HPV-TYPEN IM EX-VIVO-ASSAY (CD4+/ CD154+/ IL-2+ T-ZELLEN <0,01%)	63
TAB. 19: DURCHSCHNITTLICHE T-ZELL-FREQUENZEN GEGEN FRÜHE HPV PROTEINE E6/ E7 VON HPV 6 ODER HPV 16/ 18 UND ANZAHL POSITIV GETESTETER PROBANDINNEN.	65
TAB. 20: GEGENÜBERSTELLUNG DER T-ZELL-ANTWORT VON PROBANDINNEN MIT HINWEISEN AUF EINE FRÜHERE HPV-EXPOSITION UND PROBANDINNEN OHNE SOLCHE HINWEISE.	66
TAB. 21: PROZENTUALE ÜBEREINSTIMMUNG DER L1-AMINOSÄURESEQUENZEN UNTERSCHIEDLICHER HPV-TYPEN.....	75

9 Erklärung

„Ich, Sina Kristin Pacher, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Direkter longitudinaler Vergleich von T-Helfer-Zell Antworten auf prophylaktische HPV Impfstoffe über einen Zeitraum von 12 Monaten“ 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

Unterschrift

10 Lebenslauf

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

11 Danksagung

Allen voran möchte ich Herrn Dr. rer. nat. Andreas Kaufmann für die Überlassung des Themas und die große Unterstützung in den letzten 2 1/2 Jahren danken. Ohne seine stets kompetente, freundliche und geduldige Begleitung sowie sein Vertrauen in meine Fähigkeiten wäre der erfolgreiche Abschluss dieser Dissertation nicht möglich gewesen.

Viele weitere Menschen haben mich seit Beginn der Studie unterstützt und verdienen ein großes Dankeschön: Am wichtigsten ist dabei sicherlich Frau Hannah Emily Rosenthal, die mit mir den Weg vorbei an kleinen Laborkatastrophen, Terminstress, Organisationsproblemen und emotionalen Berg- und Talfahrten (inkl. erster Kongress-Erfahrungen) gemeistert hat und dabei immer für einen Spaß zu haben war. Ganz herzlich danke ich weiterhin Frau Ursula Kastner für die Einarbeitung in die Techniken der Zellkultur sowie wichtige seelische Unterstützung in schwierigen Zeiten. Frau Anne Katrin Ramseger danke ich für die gute Einführung in die Methodik, Frau Dr. Heike Perlitz und ihrem Praxisteam für die gute Zusammenarbeit während der Studie. Herrn Stephan Lucke danke ich für die praktische Unterstützung bei der Laborarbeit und dafür, mir ein sehr guter und wichtiger Freund zu sein. Dank gebührt ebenso meinem Freund Robert Teichmann für Hilfestellungen bei der Formatierung der Dissertation, die wesentlich zu einer übersichtlichen Darstellung der Sachverhalte beitrug. Ein ganz großes Dankeschön auch an alle meine Probandinnen, ohne die die ganze Arbeit natürlich nicht zustande gekommen wäre.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern und meinen drei Geschwistern danken, die mich bisher in allen Phasen meines Lebens großartig unterstützt haben. Ich bin unendlich dankbar, glücklich und stolz, euch als Familie zu haben!