

Aus der Klinik für Gynäkologie
und der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Charakterisierung der zellulären und humoralen Immunantwort
bei RRP Patienten nach prophylaktischer HPV-Impfung mit
Gardasil®

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Tanja Vanessa Wittchen,
(geb. Fromm)

aus Berlin

Datum der Promotion: 26.02.2016

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	HUMANE PAPILLOMVIREN	1
1.1.1	<i>Virologie</i>	1
1.1.2	<i>Epidemiologie</i>	2
1.1.3	<i>Ätiopathogenese</i>	2
1.1.4	<i>HPV-assoziierte Erkrankungen</i>	4
1.2	KÖRPEREIGENE IMMUNABWEHR	4
1.2.1	<i>Grundlagen der Immunabwehr</i>	4
1.2.2	<i>Erworbenes Immunsystem</i>	5
1.3	LARYNX-PAPILLOMATOSE	6
1.3.1	<i>Epidemiologie</i>	6
1.3.2	<i>Ätiopathogenese</i>	7
1.3.3	<i>Verlauf und klinisches Bild</i>	8
1.3.4	<i>Behandlungsmethoden und ihre Limitation</i>	9
1.4	HPV-VAKZINE	10
1.4.1	<i>Prophylaktische HPV-Impfung mit Gardasil®</i>	10
2	FRAGESTELLUNG	12
3	MATERIAL UND METHODEN	13
3.1	STUDIENDESIGN UND PATIENTENKOLLEKTIV	13
3.2	EX-VIVO-ASSAY ZUR BESTIMMUNG CD4 SPEZIFISCHER T-HELPERZELLEN	15
3.2.1	<i>Materialgewinnung</i>	16
3.2.2	<i>Antigenstimulation und Zellkultur</i>	16
3.2.3	<i>Lyse und Fixierung</i>	18
3.2.4	<i>Intrazelluläre FACS-Färbung</i>	18
3.2.5	<i>Durchflusszytometrie</i>	19
3.2.6	<i>Durchflusszytometrische Auswertung</i>	21
3.3	SEROLOGISCHER MULTIPLEX-ASSAY ZUR BESTIMMUNG HPV-SPEZIFISCHER ANTIKÖRPER	22
3.4	HPV-GENOTYPISIERUNG	24
3.5	ERFASSUNG KLINISCHER DATEN MITTELS DERKAY SCORE	24
3.6	STATISTISCHE AUSWERTUNG	25
4	ERGEBNISSE	28
4.1	BESTIMMUNG DER GRENZWERTE UND AUSSCHLUSS VON PROBANDEN IM EX-VIVO-ASSAY	28
4.2	QUERSCHNITTSTUDIE	28
4.2.1	<i>Charakterisierung des Probandenkollektivs</i>	28
4.2.2	<i>Nachweis HPV-spezifischer T-Helferzellfrequenzen für Interleukin-2 positive T-Helferzellen</i>	29
4.2.3	<i>Nachweis HPV-spezifischer T-Helferzellfrequenzen für Interferon-γ positive T-Helferzellen</i>	33
4.2.4	<i>Nachweis HPV-spezifischer Antikörpertiter abhängig vom Krankheitsstatus</i>	36
4.2.5	<i>Sonderbeobachtung: Vergleich der E6/E7 Expression in Abhängigkeit vom Krankheitsstatus</i>	39
4.3	LONGITUDINALSTUDIE	41
4.3.1	<i>Beobachtung von Einzelfällen im Zeitraum der Impfung mit Gardasil®</i>	41
4.3.2	<i>Bestimmung der individuellen T-Zellfrequenzen</i>	42
4.3.3	<i>Bestimmung der AK-Titer</i>	44
4.3.4	<i>Fallbeschreibung 1</i>	45
4.3.5	<i>Fallbeschreibung 2</i>	53
4.3.6	<i>Fallbeschreibung 3</i>	60
4.3.7	<i>Fallbeschreibung 4</i>	69
5	DISKUSSION	75

5.1	ZELLULÄRE IMMUNITÄT ABHÄNGIG VOM KRANKHEITS- BZW. IMPFSTATUS MIT GARDASIL®	75
5.2	NACHWEIS HPV-SPEZIFISCHER IL-2 ODER IFN- γ PRODUZIERENDER T-HELPERZELLEN.....	76
5.3	BETRACHTUNG DER HUMORALEN IMMUNITÄT IM VERGLEICH ZUR ZELLULÄREN IMMUNITÄT.....	79
5.4	INDUKTION VON T-ZELLEN GEGEN E6 UND E7 PROTEINE NACH L1-IMPfung	81
5.5	EINORDNUNG DER EINZELFÄLLE IN DAS GESAMTBILD.....	83
5.5.1	<i>Positiver Verlauf nach der Impfung mit Gardasil® in Fall 1.....</i>	<i>83</i>
5.5.2	<i>Nachbeobachtungszeitraum über zwei Jahre nach der Impfung in Fall 2.....</i>	<i>85</i>
5.5.3	<i>Komplette Remission der Erkrankung in Fall 3.....</i>	<i>86</i>
5.5.4	<i>Ausbleibende Wirkung der Impfung bei der adulten Larynxpapillomatose in Fall 4</i>	<i>88</i>
5.6	KLINISCHE RELEVANZ DER STUDIE.....	89
5.7	LIMITATION DER METHODIK	90
6	ZUSAMMENFASSUNG	93
7	LITERATURVERZEICHNIS	96
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	100
9	TABELLENVERZEICHNIS	100
10	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	101
	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	102
	LEBENS LAUF.....	103
	DANKSAGUNG	105

Charakterisierung der zellulären und humoralen Immunantwort bei RRP Patienten nach prophylaktischer HPV-Impfung mit Gardasil®

Wittchen, Tanja Vanessa

Die rezidivierende respiratorische Larynxpapillomatose (RRP) gehört zu den häufigsten benignen Erkrankungen des Larynx. Sie wird je nach Alter bei Erstdiagnose in eine juvenile und eine adulte Form gegliedert. In über 90% wird sie durch die Low-Risk-HPV-Typen 6 und 11 hervorgerufen. Behandelt wird die Erkrankung vor allem durch chirurgische Herdsanierung mittels Laser. Bisher gibt es keine adäquaten Therapiemöglichkeiten, die nach erfolgtem Eingriff ein erneutes Auftreten einer Papillomatose verhindern können.

Ziel der Arbeit war die Charakterisierung der serologischen und zellulären Immunität bei RRP Patienten im Zeitraum der Immunisierung mit dem prophylaktischen HPV-Impfstoff Gardasil®.

In diesem Rahmen erfolgte die Einteilung in eine Querschnitt- und Longitudinalstudie. In der Querschnittstudie wurden drei Probandengruppen mit unterschiedlichem Krankheits- bzw. Impfstatus (RRP Patienten, mit Gardasil® gegen HPV geimpfte RRP Patienten und gesunde nicht-geimpfte Probanden) untersucht und ihr Immunstatus (T-Zellfrequenzen, Antikörpertiter) verglichen. In der Longitudinalstudie wurde der Krankheitsverlauf von vier Patienten aus der Querschnittstudie, die nach chirurgischer Herdsanierung mit Gardasil® geimpft worden waren, untersucht. Von allen Probanden wurde peripher venöses Blut gewonnen. Die einzelnen Blutproben wurden anhand der Expression von CD4, CD154, IFN- γ sowie IL-2 mittels Durchflusszytometrie auf HPV-spezifische T-Zellen untersucht. Die Stimulation erfolgte mit HPV 6, 11, 16 und 18 L1 und E6/E7 spezifischen Peptidpools. Zusätzlich wurden die Antikörpertiter im Serum bestimmt. Der Krankheitsverlauf wurde mittels Derkay Score beurteilt.

Im Vergleich bildeten die gesunden Probanden die höchsten HPV-spezifischen T-Zellfrequenzen aus, gefolgt von den geimpften RRP Patienten und den ungeimpften RRP Patienten. Gesunde Probanden hatten deutlich höhere Frequenzen an HPV E6/E7 spezifischen T-Zellen als die an RRP Erkrankten.

Im Verlauf der Longitudinalstudie zeigten die untersuchten Probanden eine deutliche Besserung der klinischen Symptomatik, die sich vor allem durch verminderte Proliferation der Papillome sowie durch größere Intervalle zwischen den Eingriffen auszeichnete. Mit diesem Bild korrelierten die ansteigenden T-Zellzahlen sowie die höheren Titer virusspezifischer Antikörper im Serum. Auch die T-Zellfrequenzen gegen E6/E7 waren nach vollständiger Impfung erhöht nachweisbar.

Die Ergebnisse führen zu der Annahme, dass bei erkrankten Patienten eine Dysregulation der T-Zellen und der Antikörperinduktion vorliegt. Der prophylaktische HPV-Impfstoff Gardasil® induziert die Bildung HPV-L1- und -wahrscheinlich indirekt- E6/E7-spezifischer T-Zellen und Antikörper in höherem Maße als die natürliche Infektion bei den RRP Patienten. Möglicherweise ließe sich die Infektion weiterer Gewebeareale bzw. eine Reinfektion nach chirurgischer Intervention durch hohe Antikörpertiter verhindern. Der Nachweis hoher Frequenzen an L1-spezifischen CD4+ T-Zellen bei Geimpften unterstützt diese Annahme.

Characterisation of serological and cell-mediated immunity in RRP patients after immunisation with the prophylactic HPV vaccine Gardasil®

Wittchen, Tanja Vanessa

Recurrent respiratory papillomatosis (RRP) is one of the most frequent benign diseases of the larynx.

Depending on the age of the patient when RRP is first diagnosed the disease is categorized into a juvenile and an adult form. RRP is caused by low-risk HPV types 6 and 11 in >90% of the cases. Surgical ablation is standard treatment, but so far no satisfactory post-surgery therapies that prevent the recurrence of RRP have been established.

The objective of this thesis was a characterisation of serological and cell-mediated immunity in RRP patients during the period of immunisation with the prophylactic vaccine Gardasil®. We performed a cross-sectional- and a longitudinal study.

In the cross-sectional study three groups of individuals were monitored. The groups consisted of RRP patients, RRP patients vaccinated with Gardasil® and healthy non-vaccinated persons. We tested and compared their immunological status (T-cell frequencies, antibody titre).

In the longitudinal study the development of the disease was monitored in 4 patients who had post-surgery vaccination with Gardasil®. Peripheral blood was taken from all test persons. The samples were analysed by flow cytometry to detect HPV specific T-cells using the expression of CD4, CD154, IFN- γ as well as IL-2. For stimulation HPV 6, 11, 16, and 18 L1 and E6/E7 specific peptid pools were used. Additionally, serological antibody titres were determined. Derkay Score was used to assess the course of the disease.

In comparison the healthy individuals developed the highest HPV-specific T-cell frequencies, followed by the vaccinated RRP patients and non-vaccinated RRP patients. Healthy persons showed considerably higher frequencies of HPV E6/E7-specific T-cells than RRP patients.

Patients who were followed in the longitudinal study showed a clear improvement of their clinical symptoms. Proliferation of papillomas was reduced considerably and the intervals between surgical interventions became longer. This effect corresponded with the increased number of HPV-specific T-cells and the higher titre of virus specific antibodies. An increase in E6/E7 specific T-cells could clearly be found following vaccination.

From these findings we conclude that RRP patients suffer from dysregulation of T-cells and a lack of antibody.

Gardasil®, a prophylactic HPV vaccine induces the development of HPV L1- and - probably indirectly - E6/E7-specific T-cells and antibodies in RRP patients to a greater extent than natural infection.

Further infection of tissue or re-infection after surgical intervention might be prevented by higher antibody titers. Evidence of higher frequencies of L1- and E6/E7-specific CD4+ T-cells in vaccinated patients supports this assumption.

1 Einleitung

1.1 Humane Papillomviren

1.1.1 Virologie

Humane Papillomviren sind kleine hüllenlose DNA-Viren aus der Familie der Papillomaviridae. Sie bestehen aus einem 55 nm großen ikosaedrischen Kapsid, welches sich aus dem Hauptkapsidproteinen L1 (late protein 1) und einem weiteren, kleineren L2-Protein (late protein 2) im Verhältnis 30:1 zusammensetzt. Das L1-Kapsidprotein bestimmt den Aufbau des Kapsids und ist verantwortlich für die Immunogenität der HPV-Typen [1, 2]. Das Kapsid enthält die Virus-DNA, welche eine doppelsträngige, geschlossene zirkuläre Struktur aufweist. Das Virus Genom besteht aus etwa 7900 Basenpaaren und enthält den Code für mindestens 7 E-Proteine (early proteins), welche früh im Replikationszyklus des Virus gebildet werden und welche eine regulatorische Funktion bei der Virusvermehrung haben. E1-E5 sind Proteine, die für die Replikation und Transkription des Virus benötigt werden. Die wichtigsten Proteine stellen in diesem Zusammenhang die viralen Onkogene E6 und E7 dar. E6 bindet an das Tumorsuppressorgen p53. E7 bindet an ein weiteres Tumorsuppressorgen, das pRb (Retinoblastoma) und stimuliert ein präkanzeröses Zellwachstum. Gemeinsam verhindern sie die Apoptose einer Zelle und leiten den Übertritt in den Zellzyklus ein. Die später gebildeten L-Proteine (late proteins) stellen Strukturproteine dar. L1 und L2 bauen das Viruskapsid auf, worin die virale DNA verpackt und dann als infektiöses Partikel freigesetzt wird. Das L1 Protein bildet auf Grund seiner hohen Immunogenität die Basis für prophylaktische Impfstoffe [2-4].

Es sind mittlerweile mehr als 130 verschiedene HPV-Typen bekannt, von denen etwa 92 charakterisiert werden können und etwa 40 Typen die orale und anogenitale Mukosa infizieren können [2-4]. Auf Grund ihrer klinischen Bedeutung werden die HPV-Typen in zwei große unterschiedliche Gruppen unterteilt. Die High-Risk (HR)-HPV-Typen (HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66) gelten als die Erreger hochgradiger Dysplasien und Karzinome wogegen die Low-Risk (LR)-HPV-Typen (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81 und weitere) für die Entstehung von Genitalwarzen und Papillomen sowie niedriggradigen Dysplasien verantwortlich zu machen sind. Zusätzlich existieren weitere HPV-Typen, die bisher noch nicht sicher einer der beiden Gruppen zugeteilt werden können [1-4]. An manchen Stellen wird auch von einer dritten Gruppe gesprochen, den vermeintlichen HR-HPV-Typen (HPV 26, 53, 66) [5].

1.1.2 Epidemiologie

HPV-Infektionen gehören weltweit zu den häufigsten sexuell übertragenen Erkrankungen [1]. Eine Studie zeigt, dass bereits 2 Jahre nach Aufnahme der sexuellen Aktivität 33% der Frauen mit HPV infiziert sind. Die Durchseuchungsrate mit HPV liegt in Deutschland bei jungen Frauen (Alter 20-30 Jahre) bei 40 bis 50% [6-9]. Ein Großteil, etwa 80-90%, der mittels PCR nachweisbaren HPV-Infektionen verlaufen subklinisch und heilen spontan aus. Nur in den restlichen Fällen persistieren die Viren und es kommt zu einem tatsächlichen Ausbruch der Erkrankung mit den Symptomen der HPV-Infektion bis hin zu maligner Entartung [1, 8, 10]. Die HPV Prävalenz unter älteren Frauen wird für Europa auf 8-15% geschätzt und weltweit auf 2-44% je nach Studienlage [8, 9].

Bei Männern liegt die Prävalenz der HPV-Erkrankung in verschiedenen Studien bei 3,5% bis 45% für die LR-Typen und bei 2,3% bis 34% für die HR-Typen. Sowohl bei Männern als auch bei Frauen ist HPV 16 der am häufigsten nachweisbare Typ [1]. Nach etwa 2-3 Jahren ist bei ca. 90% der Infizierten die Infektion nicht mehr durch die bisher gängigen sensitiven Tests nachweisbar [2].

Etwa 15% der Durchschnittsbevölkerung sind aktuell mit HPV infiziert. Etwa 60% weisen serologische Anzeichen einer durchgemachten aber ausgeheilten Infektion auf, wobei die Lebenszeitprävalenz insgesamt bei etwa 75-80% liegt [2, 11].

Mehrere epidemiologische Studien zeigen, dass Menschen mit einem Immundefizit höhere Erkrankungsraten und eine schnellere Progression der Erkrankung aufweisen als immunkompetente Patienten [10]. Dies trifft unter anderem für Patienten mit einer Immunsuppression im Rahmen einer Transplantation zu, sowie für HIV positive Patienten, bei denen die CD4+ T-Lymphozyten verringert sind. Diese T-Lymphozyten haben auch bei der Abwehr von HPV-Infektionen eine wichtige Funktion [2].

1.1.3 Ätiopathogenese

Humane Papillomviren infizieren ausschließlich Epithelzellen der Haut und Schleimhäute und werden über direkten Hautkontakt übertragen. Sie sind wirtsspezifisch und können somit nur beim Menschen gefunden werden. Sie können ein sehr unterschiedliches Erscheinungsbild einer Erkrankung hervorrufen. Der Sexualkontakt stellt den häufigsten Übertragungsweg anogenitaler HPV-Infektionen dar. Die durch LR-HPV ausgelösten Condylomata acuminata beispielsweise, enthalten an ihrer Oberfläche ausreichend infektiöse Partikel, um eine Ausbreitung des Infekts innerhalb des erkrankten Gewebes zu bewirken. Durch Abschilferung infektiöser Partikel kann

bei sexuellem Kontakt eine Übertragung der Infektion auf den Partner erfolgen (in 70% der Fälle). Da HPV resistent gegen Austrocknung sind, können Infektionen wahrscheinlich auch über kontaminierte Oberflächen vorkommen [1].

Kommt es zu einer Infektion mit dem Virus, persistiert dieses zunächst auch bei immunkompetenten Personen. Man spricht von einem transienten Verlauf über 4-20 Monate, bevor es zu einer Aktivierung des Immunsystems und damit zu einer Abwehrreaktion kommt. HR-HPV-Typen persistieren länger als die LR-Typen [1, 10]. Die Vermutung liegt nahe, dass das menschliche Immunsystem das Virus nicht erkennt oder das Virus das Immunsystem deaktiviert bzw. es umgeht [10].

Folgende Faktoren sind für die Entstehung der Erkrankung von Bedeutung: Die Viren persistieren, sie reproduzieren sich und sie verändern und beeinflussen das zelluläre Wachstum, wodurch sich die Papillome bilden. Dies führt zur Ausbreitung der Infektion [12]. Die Fähigkeit der Viren über einen langen Zeitraum zu persistieren, ohne vom menschlichen Immunsystem bekämpft zu werden, kann durch die Tatsache erklärt werden, dass der Vermehrungszyklus des Virus eng an die Differenzierung des menschlichen Plattenepithels gekoppelt ist [10, 13]. Über kleinste Verletzungen in der Haut dringen Papillomviren ein und infizieren die epitheliale Basalzelle, wo es zur Bildung der frühen viralen Proteine (E1, E2) kommt, welche als Replikationsfaktoren wirken. Diese sind verantwortlich für die Vermehrung der viralen DNA auf zunächst einige 100 Kopien. Die virusinfizierte Zelle wandert im Epithelverband an die Oberfläche, wo die Bildung der viralen Onkoproteine einschließlich E6 und E7 stark zunimmt. Durch die Bindung von E7 an das Retinoblastom (Rb) werden die HPV-infizierten Zellen unabhängig von ihrem Zellzyklus und ihrer Ausdifferenzierung zur DNA-Replikation gezwungen. Normalerweise führt eine solche, nicht der Replikationsphase entsprechende DNA-Replikation, zur Apoptose der Zelle. Im Falle der HPV-Infektion wird die Apoptose durch Bindung von E6 an das Tumorsuppressorgen p53 verhindert. Erst eine über Jahre andauernde Expression von E6/E7 führt zur Krebsentstehung. Die Dysregulation dieser Zielproteine über diesen Zeitraum führt zu schweren Dysplasien. Dieser Mechanismus gilt vor allem für die HR-HPV-Typen, die im Gegensatz zu anderen HPV-Typen zur malignen Entartung der Zelle führen. Die E6/E7-Proteine der Low-Risk-HPV-Typen binden weniger stark an die Tumorsuppressorgene und wirken somit weniger onkogen [1, 13]. Auch der späte Teil des Replikationszyklus des Virus ist eng an die Differenzierung der Epithelzelle gekoppelt. Die infizierte Zelle differenziert sich und wandert an die Oberfläche. Es kommt zur Bildung der späten Proteine L1 und L2 (siehe 1.1.1) und die virale DNA vermehrt sich auf eine hohe Anzahl

von Kopien [10, 14], die sich in der obersten Epithelschicht versammeln und nach außen abgegeben werden, wo sie umliegende Zellen infizieren [10, 13].

1.1.4 HPV-assoziierte Erkrankungen

HPV-assoziierte Erkrankungen haben eine hohe Relevanz für mehrere klinische Fachdisziplinen. In der Gynäkologie, aber auch in der Proktologie, Urologie und Dermatologie spielen sie eine wichtige Rolle. Die Zuordnung zu den verschiedenen HPV-Typen spielt dabei eine wesentliche Rolle. Zu den am häufigsten durch HR-HPV-Typen ausgelösten Erkrankungen gehört das Zervixkarzinom, welches in nahezu 100% der Fälle durch HPV verursacht wird. Das auslösende Virus ist in etwa 50-60% der Fälle HPV 16 und in weiteren 10-20% HPV 18 [1, 2, 13]. Weitere Karzinome im Genitalbereich, so das Vulvar- oder Vaginalkarzinom bei der Frau und das Peniskarzinom beim Mann, werden ebenfalls zum Teil durch HPV verursacht. Auch das Analkanalkarzinom ist in etwa 88% der weltweit 27.000 Fälle auf eine virale Genese durch eine HPV-Infektion zurückzuführen [13]. Im HNO-Bereich werden etwa 20-30% der Plattenepithelkarzinome durch HR-HPV-Typen ausgelöst, in über 90% der Fälle durch HPV 16 [2, 15, 16].

Die LR-HPV-Typen, in über 90% der Fälle HPV 6 und 11, sind vor allem für die Entstehung von Condylomata acuminata (Feigwarzen) an Vulva, Penis und Anus verantwortlich. Dies sind die häufigsten gutartigen Tumore des äußeren Genitaltraktes. In 30% der Fälle sollen spontane Remissionen vorkommen. Neben diesen benignen Tumoren zählen auch niedriggradig intraepitheliale Neoplasien zu den durch LR-HPV ausgelösten Erkrankungen, die eine geringe Tendenz zu maligner Entartung besitzen [1, 2, 17, 18].

Die rezidivierende Larynxpapillomatose wird ebenfalls durch LR-HPV-Typen ausgelöst. Diese benigne Läsion des Kehlkopfes stellt die Grundlage dieser Arbeit dar und wird daher genauer beschrieben.

1.2 Körpereigene Immunabwehr

1.2.1 Grundlagen der Immunabwehr

Zum Schutz vor Krankheiten bzw. dem Eindringen von Bakterien, Viren oder Pilzen dienen dem menschlichen Körper die Haut und die Schleimhaut als mechanische Barrieren und das angeborene sowie das erworbene Immunsystem, welche nur zusammen ein optimales Abwehrsystem darstellen.

Das angeborene Immunsystem erkennt unspezifische Oberflächenmerkmale anderer Organismen ohne Vorsensibilisierung als fremd und ermöglicht bei Bedarf eine schnelle Abwehrreaktion. Es wird kein immunologisches Gedächtnis ausgebildet, sodass dieses Teilsystem der Immunabwehr nicht ausreicht, einen fremden Organismus auf Dauer zu bekämpfen.

Das erworbene Immunsystem ist komplexer aufgebaut. Es arbeitet mit Effektorzellen, B- und T-Lymphozyten, die sich durch ihre Funktion, wie auch durch ihre Oberflächenmerkmale voneinander unterscheiden. Die Abwehrreaktion setzt langsamer ein als beim angeborenen System, ist dafür aber in der Lage ein immunologisches Gedächtnis auszubilden. Dadurch kann bei einer erneuten Infektion durch den bereits bekannten Erreger eine gezielte, schnelle Abwehrreaktion stattfinden.

1.2.2 Erworbenes Immunsystem

1.2.2.1 Zelluläre Abwehr durch T-Lymphozyten

Bei den naiven, undifferenzierten T-Lymphozyten wird auf Grund ihrer Funktion und ihrer unterschiedlichen Oberflächenmerkmale zwischen CD4+ T-Zellen (CD = Cluster of Differentiation) und den CD8+ T-Zellen unterschieden. Mit Hilfe der T-Zellrezeptoren (TCR) auf ihrer Oberfläche können T-Zellen Antigene erkennen, die ihnen von antigenpräsentierenden Zellen (APC) präsentiert werden. CD4+ T-Zellen erkennen Antigene, die über MHC-II Moleküle präsentiert werden, CD8+ T-Zellen erkennen Antigene, welche über MHC-I präsentiert werden [19, 20]. Die Interaktionen zwischen der APC und den zu diesem Zeitpunkt noch naiven T-Zellen sind sehr komplex. Zur vollständigen Aktivierung und anschließenden Proliferation der T-Effektorzelle werden weitere spezifische Ligand-Rezeptor-Interaktionen benötigt. Hier spielt CD28 eine Rolle, welches als potentes Kostimulanz zur Aktivierung von T-Zellen dient [21]. Nach Aktivierung werden die CD4+ Zellen zu T-Helferzellen oder regulatorischen T-Zellen, die CD8+ Zellen entwickeln sich zu zytotoxischen T-Zellen.

Da sich diese Arbeit mit den Aufgaben der CD4+ T-Helferzellen beschäftigt, wird auf die CD8+ zytotoxischen T-Zellen an dieser Stelle nicht weiter eingegangen.

Von den aktivierten T-Zellen wird auf deren Oberfläche CD154 (CD40 Ligand) exprimiert, welches das stärkste Kostimulanz der B-Zellaktivierung darstellt und diese bei ihrer Differenzierung zur Plasmazelle unterstützt [22]. Zudem werden von den T-Zellen in Folge ihrer Aktivierung diverse Zytokine und Proteine, die als Botenstoffe dienen, gebildet. Je nach produzierten Botenstoffen, werden T-Helferzellen in TH1- und TH2-Zellen unterschieden. TH1-

Zellen produzieren Interferon- γ (IFN- γ) und Interleukin-2 (IL-2) [20]. IFN- γ unterstützt die Antigenpräsentation von Makrophagen und aktiviert natürliche Killerzellen (NK). IL-2 regt die T-Zell-Proliferation an und sorgt so für eine Verstärkung der Abwehr. Sowohl IFN- γ als auch IL-2 können als Marker für die virusspezifische T-Zellaktivierung angesehen werden [19].

1.2.2.2 Humorale Abwehr durch B-Lymphozyten

B-Lymphozyten werden im Knochenmark gebildet und wandern über das Blut und die Lymphe in den Lymphknoten, wo sie als naive B-Zellen verbleiben. Werden B-Zellen durch Begegnung mit ihrem Antigen aktiviert, differenzieren sie zu Plasmazellen, welche dann sowohl Gedächtniszellen als auch Antigen produzierende Zellen ausbilden. B-Zellen besitzen einen B-Zell-Rezeptor (BCR), der spezifisch Antigene erkennt. Trifft eine naive B-Zelle auf ein passendes Antigen, phagozytiert sie dieses, zerlegt es und präsentiert es über MHC-II-Protein den CD4+ T-Helferzellen. Erkennt eine TH2-Zelle das so präsentierte Antigen, geht es über den MHC-II-Rezeptor mit der B-Zelle eine Bindung ein. Diese Bindung wird zusätzlich über eine Rezeptor-Ligand-Interaktion (CD40 und CD40-Ligand) verstärkt. Die durch diese Bindung aktivierte CD4+ T-Helferzelle produziert als Zeichen ihrer eigenen Aktivierung Zytokine (z.B. IFN- γ , IL-2), diese stimulieren ihrerseits die B-Zelle sich weiter zu teilen und zur Plasmazelle zu differenzieren. Die Plasmazelle nimmt die Antikörperproduktion auf und die von ihr gebildeten Gedächtniszellen ermöglichen bei erneutem Kontakt mit dem Antigen eine schnellere Antikörperantwort mit höheren AK-Titern und stärkerer Affinität zum entsprechenden Antigen [19, 20].

1.3 Larynxpapillomatose

1.3.1 Epidemiologie

Die Larynxpapillomatose wird erstmals 1871 beschrieben und ist die häufigste gutartige Tumorerkrankung des Larynx, bei der es jedoch auch zu maligner Entartung kommen kann. Die Zahlen variieren hier je nach Studie von unter 1% bis zu 7% der Erkrankungen [3, 23]. Ihr Anteil an allen laryngealen Tumoren liegt bei Erwachsenen bei etwa 10%. Insgesamt wird für diese Erkrankung ein Anteil an allen gutartigen Tumoren des Larynx von 84% bis 87% beschrieben [3, 17]. Verursacher der rezidivierenden Larynxpapillomatose sind HPV. Es hat sich gezeigt, dass annähernd 100% der Papillomatosen positiv für einen der beiden Low-Risk-HPV-Typen 6 oder 11 sind [2]. In wenigen Fällen wird auch eine Assoziation mit den High-Risk-HPV-Typen 16 und 18 beschrieben. Mehrere Studien haben gezeigt, dass eine Infektion mit dem HPV-Subtyp 11 bzw. eine Doppelinfektion mit den HPV-Typen 6 und 11 mit einem

aggressiveren Verlauf der Erkrankung assoziiert ist. Eine Infektion, die ausschließlich durch HPV 6 ausgelöst wird, ist mit einem weniger aggressiven Verlauf assoziiert [2, 23]. Bei insgesamt 25% aller gesunden Kinder und Erwachsenen ist eine HPV-DNA nachweisbar, die Erkrankung ist aber trotz der hohen Durchseuchungsrate relativ selten. In den USA wird eine Inzidenz von 4,3 Erkrankten auf 100.000 unter Kindern und 1,8 auf 100.000 bei Erwachsenen angegeben [17, 23].

Die rezidivierende Larynxpapillomatose hat zwei Häufigkeitsgipfel und wird daher je nach Alter bei Erstdiagnose in zwei Formen unterteilt: die juvenile Larynxpapillomatose (JLP) und die adulte Larynxpapillomatose (ALP). Bei der JLP handelt es sich um eine Erkrankung mit einer weltweit jährlichen Inzidenz von 2 auf 100.000 [1]. Sie ist definiert durch das Auftreten der Erkrankung vor dem 12. Lebensjahr und manifestiert sich meist zwischen dem 2. und 4. Lebensjahr. Sie zeichnet sich durch einen aggressiveren Verlauf aus als die spätere Form.

Der Gipfel der Erstmanifestation der ALP liegt zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr.

Das Verhältnis von männlichen zu weiblichen Erkrankten weist bei der JLP ein Verhältnis von 2:1 auf, wogegen der Anteil der männlichen Erkrankten bei der ALP mit einem Anteil von 4:1 deutlich höher ist als der der Frauen [3, 17, 24].

Die orale HPV-Infektion kommt bei Frauen seltener vor als die Infektion im Bereich der Zervix, umgekehrt konnte aber festgestellt werden, dass Frauen, bei denen eine zervikale HPV-Infektion nachgewiesen werden konnte, sehr viel häufiger auch von einem laryngealen Befall mit HPV betroffen waren [25]. Hier liegt möglicherweise eine Dysfunktion in der Abwehr vor.

1.3.2 Ätiopathogenese

Der genaue Übertragungsmechanismus für die rezidivierende laryngeale Papillomatose ist noch nicht endgültig geklärt. Für die JLP gilt die HPV-Infektion des mütterlichen Genitaltrakts mit Vorhandensein von Genitalwarzen als wichtigster Risikofaktor. Eine vertikale Übertragung der Viren von der Mutter auf das Kind während der Geburt gilt in diesem Zusammenhang als wahrscheinlichster Infektionsmechanismus [1]. Das höchste Risiko haben Kinder deren Mütter im dritten Schwangerschaftstrimenon an HPV leiden [26]. Die Infektion im Mutterleib noch während der Schwangerschaft wird ebenfalls für möglich gehalten. Bei der ALP ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich um eine postpartale Infektion im Erwachsenenalter handelt, welche auf oralen Sexualverkehr zurückgeführt wird. Eine weitere Möglichkeit der Infektion sieht man in der vertikalen Übertragung während der Geburt und darin, dass der Ausbruch der Erkrankung

dann erst auf Grund externer Einflüsse oder auf Grund des Zusammenbruchs des Immunsystems zu einem späteren Zeitpunkt stattfindet [2, 27, 28].

1.3.3 Verlauf und klinisches Bild

Der Verlauf der rezidivierenden Larynxpapillomatose ist schwer vorherzusehen. In den meisten Fällen kommt es zu keiner endgültigen Ausheilung oder Remission, allerdings werden Fälle von Spontanremissionen beschrieben, die unter anderem auf eine Änderung des Hormonhaushaltes oder des Immunstatus des Patienten zurückgeführt werden. Auch Fälle, in denen es nach einer einmaligen operativen Herdsanierung zu keinen weiteren Rezidiven gekommen ist, sind bekannt. Andererseits existieren ebenso diverse Berichte über Fälle, in denen es zu einer malignen Entartung der Läsionen gekommen ist [4, 28].

Um die Schwere der Erkrankung einzuschätzen, werden verschiedene Indikatoren herangezogen. Das sind das Alter bei Erstdiagnose, die Dauer der Erkrankung, die anatomische Ausbreitung der Papillome, die Häufigkeit chirurgischer Eingriffe sowie die Größe der Intervalle zwischen diesen Eingriffen. Die Höhe der Viruslast gibt bei einer Infektion mit HPV 6 oder HPV 11 keinen Rückschluss auf die Schwere der Erkrankung [29]. Als eine weitere Einteilung der Erkrankung gilt die Aggressivität. Als aggressiv werden Verläufe bezeichnet, bei denen die Patienten insgesamt mehr als 10 operativen Eingriffen oder mindestens vier Eingriffen in einem Jahr unterzogen werden [8].

Für die LP sind die immer wiederkehrenden Warzen (Papillome) im oberen Aerodigestivtrakt, vornehmlich im Bereich des Larynx, charakteristisch. Dieses klinische Erscheinungsbild äußert sich durch Heiserkeit und eine Veränderung der Stimme. Weitere Symptome sind: Stridor, Schluckbeschwerden und in schlimmen Fällen Luftnot. Diese Symptome treten häufig erst in einem fortgeschrittenen Erkrankungsstadium auf, wenn der Tumor eine bestimmte Größe erreicht hat und die Stimmlippen mit betroffen sind. Im Kindesalter können die Symptome als Asthma oder Krupp fehlgedeutet werden. Extralaryngeale Manifestationen findet man bei etwa 16% der erwachsenen Patienten und 30% der erkrankten Kinder. In seltenen Fällen kommt es zu einer Mitbeteiligung des Lungenparenchyms. Diese Ausbreitung ist mit einer schlechten Prognose der Erkrankung assoziiert [17, 28, 29].

In der Antikörperantwort gegen HPV 6 und 16 konnte im Vergleich weder bei der JLP noch bei der ALP ein Unterschied zwischen Patienten und gesunden Kontrollprobanden festgestellt werden [24]. Erhöhte Antikörpertiter konnten bei Patienten gefunden werden, die an einer HPV 11 positiven Erkrankung litten [24, 29]. Zudem war bei weiblichen Erkrankten häufiger ein

höherer HPV 11 AK-Titer zu finden als bei den weiblichen Kontrollen bzw. den männlichen Patienten [24].

1.3.4 Behandlungsmethoden und ihre Limitation

Das Ziel jeder Behandlung durch den Arzt ist es, den Luftweg zu sichern, die bestmögliche Qualität der Stimme zu erreichen und zu erhalten sowie eine Remission der Erkrankung zu ermöglichen und dabei Morbidität und Komplikationen zu minimieren [3, 4, 30].

Es gibt mittlerweile verschiedene Behandlungsansätze, wobei sich zwei große Säulen definieren lassen. Die am weitesten verbreitete Säule stellt die chirurgische Intervention dar. Die weitere Säule besteht aus der adjuvanten medikamentösen Behandlung [4, 17].

1.3.4.1 Chirurgische Therapieverfahren

Die Intervention mittels Stützlaryngoskopie in Vollnarkose gilt als Basis der chirurgischen Behandlung [4, 17]. HPV-DNA befindet sich auch in makroskopisch gesunder Schleimhaut. Eine radikale Sanierung birgt die Gefahr von Verletzungen und somit von Narben- und Stenosenbildung, andererseits ist eine vollständige Entfernung der Papillome in Hinsicht auf das Rezidivrisiko erwünscht [17, 31].

Zur Abtragung der Papillome hat sich der CO₂-Laser seit 1970 gegen die Anwendung der kalten und scharfen chirurgischen Instrumente durchgesetzt. Durch die fokussierte Abtragung mittels Laser wird die Verletzungsgefahr und somit die Narbenbildung verringert. Zeitgleich kann eine Blutstillung gewährleistet und eine Verschleppung infizierten Gewebes minimiert werden. Die Nachteile des CO₂-Lasers liegen in der längeren Operationszeit, den höheren Kosten und den aufwändigeren Sicherheitsmaßnahmen [4, 17, 31]. Der CO₂-Laser erreicht seine Grenzen bei der Behandlung der unteren Abschnitte der Atemwege [32]. Für diese Behandlungen wurden weitere Laser (KTP-Laser, Nd:Yag-Laser, Argonplasmakoagulation) entwickelt [17, 32, 33]. Als Alternative zum Laser kommt der Mikrodebrider zum Einsatz. Mit diesem werden die Papillome nicht koaguliert, sondern abgesaugt. Die erfolgreiche Anwendung dieser Methode konnte in mehreren Studien bestätigt werden [4, 17, 34].

Jeder Eingriff birgt verschiedene Risiken und geht mit einer Einschränkung der Lebensqualität einher. Diese ist gerade für Kinder auf Grund der meist hohen Frequenz der Eingriffe und der damit verbundenen Krankenhausaufenthalte sehr groß. Häufige Risiken während der Eingriffe sind die Narbenbildung, Verengung der Luftwege und Beeinträchtigung der Schleimhäute. Zu den häufigsten Komplikationen gehören die Trachealstenose, die Perforation, Blutungen und bei

CO₂-Lasierung der Tubusbrand [4]. Dazu kommen die Narkoserisiken, die mit steigender Anzahl mehr werden.

1.3.4.2 Adjuvante Therapiemöglichkeiten

In 10% der Fälle wird nach einem chirurgischen Eingriff eine adjuvante Therapie notwendig. Dies ist der Fall, wenn es sich um einen besonders aggressiven Verlauf handelt [3, 4].

In den häufigsten Fällen kommt die Gabe von Interferon-alpha (IFN- α) zum Einsatz, wodurch die virale Proteinsynthese gehemmt wird. Interferone besitzen eine antivirale, antiproliferative und immunmodulatorische Wirkung [17]. Nach der Gabe von IFN- α beschreiben mehrere Autoren eine Remissionsrate von 30-50%. Nach Absetzen der Therapie kommt es jedoch regelhaft zu Rezidiven. Zudem wird die Gabe von IFN- α in mehreren Studien mit diversen Nebenwirkungen in Zusammenhang gebracht [17, 30].

Als Alternative wird das Virustatikum Cidofovir für die adjuvante Therapie eingesetzt. In mehrere Studien wird im Off-Label-Use gezeigt, dass der Einsatz von Cidofovir (Vistide[®]) bei Patienten mit LP das Papillomwachstum reduziert und somit größere OP-freie Intervalle ermöglicht [12, 17, 35, 36] hat. Cidofovir wird als Cytosinanalogen in das Virusgenom eingebaut und blockiert für die Zeit seiner Anwendung die DNA-Replikation und somit die Virusreplikation. Nach Absetzen steigt die Replikation aber wieder auf die ursprüngliche Rate an [12]. Ein andauernd positiver Effekt konnte nur in geringen Fällen bei Erwachsenen festgestellt werden [36, 37]. Die hohe Rezidivrate nach Absetzten macht den häufigen Einsatz in hohen Dosen notwendig, wodurch sich in vielen Fällen langfristig massive Nebenwirkungen (Nephrotoxizität, karzinogener Effekt) einstellen [12, 17, 38].

Weitere adjuvante Therapieansätze wurden bei LP-Patienten untersucht, durch deren Anwendung in einem kleinen Rahmen positive Ergebnisse erzielt werden konnten. Dazu gehören Indol-3-carbinol (I3C), Virustatika (Ribaverin, Aciclovir) sowie der Einsatz einer photodynamischen Therapie (PDT) [4, 39, 40].

1.4 HPV-Vakzine

1.4.1 Prophylaktische HPV-Impfung mit Gardasil[®]

Bei Gardasil[®] und Cervarix[®] handelt es sich um die beiden derzeit verfügbaren prophylaktischen HPV-Impfstoffe. Gardasil[®] ist ein quadrivalenter, rekombinanter, nicht infektiöser HPV-Impfstoff, der gegen die HPV-Typen 6, 11, 16 und 18 gerichtet ist. Er wird von Sanofi Pasteur MSD vermarktet. Bei Cervarix[®] handelt es sich um einen bivalenten Impfstoff der britischen

Firma GlaxoSmithKline, der sich gegen die HPV-Typen 16 und 18 richtet, auf den in dieser Arbeit nicht weiter eingegangen wird [41, 42].

Virus-like particles (VLP), bestehend aus dem Hauptkapsidprotein L1 der vier HPV-Typen, bilden die immunogenen Komponenten des Impfstoffes Gardasil®. VLP werden mittels rekombinanter DNA-Technologie in Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae* CANADE 3C-5 (Stamm 1985)) hergestellt. Sie enthalten keine Virus-DNA, sind also weder in der Lage eine Infektion auszulösen, noch sich zu vermehren. Als Adjuvanz wird amorphes Aluminiumhydroxyphosphatsulfat verwendet. Der Impfstoff wird intramuskulär injiziert [43].

Die Grundimmunisierung mit Gardasil® besteht aus drei Impfeinzeldosen, die zum Zeitpunkt Null, sowie nach zwei und nach sechs Monaten verabreicht werden. Zugelassen wurde der Impfstoff zur Prävention von Dysplasien der Zervix, der Vulva, des Zervixkarzinoms sowie von *condylomata acuminata*. Die Zulassung beruhte auf dem Nachweis der Wirksamkeit bei 16-26 jährigen Frauen. In weiteren Studien wurde die Wirksamkeit und Zulassung für 9-15 jährige Jungen und Mädchen getestet und bestätigt [43].

Mittlerweile wurde die protektive Wirkung auch für Männer geprüft und bestätigt, so dass eine Zulassung des Impfstoffes für Männer zwischen 16 und 26 Jahren erfolgte [44-47].

In placebokontrollierten Studien konnte bei Patienten die vorher HPV-negativ waren ein fast 100% Schutz vor einer Infektion mit HPV 6, 11, 16 und 18 erreicht werden. Bei Patienten, die vor der Immunisierung bereits durch einen der Impfstoff-HPV-Typen infiziert worden waren, konnte bisher kein sicherer Schutz durch die Impfung gezeigt werden [43].

Bei der Bestimmung der Antikörpertiter konnte bei bisher HPV-negativen Patienten eine annähernd 100% IgG-Serokonversion gezeigt werden. Die AK-Titer nach Impfung waren weitaus höher als die nach durchgemachter natürlicher Infektion und konnten zuverlässig einer erneuten Infektion vorbeugen [8]. Bei seropositiven Patienten, die zum Zeitpunkt der Untersuchung aber eine negative HPV-PCR aufwiesen, also eine HPV-Infektion durchgemacht hatten aber nicht akut erkrankt waren, konnte ein Anstieg der AK-Titer durch die Impfung beobachtet werden. Die Antikörpertiter waren deutlich höher als in der Placebogruppe [43].

Prophylaktische HPV-Impfstoffe wurden entwickelt und in diversen Studien bestätigt [48, 49]. Mögliche therapeutische HPV-Vakzine richten sich gegen die Onkoproteine E6 und E7, da deren Expression für das Überleben der Virus-infizierten Zellen notwendig ist. Bisher konnte der gewünschte Erfolg mit therapeutischen Impfstoffen jedoch nicht erreicht werden [2, 50].

2 Fragestellung

Da im Vergleich zu gesunden Personen betroffene Patienten offenbar eine HPV-Infektion nicht kontrollieren und ausheilen können, wird in dieser Arbeit die Immunantwort bei LP Patienten charakterisiert.

Es soll geklärt werden inwieweit eine serologische und zelluläre Immunität vorliegt und ob diese durch HPV-Impfung induziert werden kann.

Die bestimmte Immunantwort soll mit den klinischen Beobachtungen des Krankheitsverlaufs korreliert werden.

Liegt bei erkrankten Patienten eine Dysfunktion des Immunsystems im Sinne einer Dysregulation bestimmter T-Zellpopulationen, vor allem der CD4+ T-Zellen vor? Kann man davon ausgehen, dass bei Patienten, bei denen die HPV-Infektion zu einer Manifestation der Erkrankung führt, eine generell schlechtere T-Zellaktivierung vorliegt als bei gesunden Menschen, die das Virus bekämpfen können? Kommt es bei betroffenen Patienten zu einer verringerten Bildung spezifischer Antikörper, die eine Serokonversion nach erster Infektion verhindert und somit eine spezifische Toleranz gegenüber HPV besteht?

Es stellt sich weiterhin die Frage, ob eine prophylaktische Impfung nach ablativer Operation bei LP, trotz vorheriger Infektion mit dem Virus, zu einer Bildung erhöhter Titer virusneutralisierender Antikörper führen kann und ob die Aktivierbarkeit der T-Zellen durch die Impfung erhöht wird, so dass eine Reinfektion mit dem Virus bzw. eine Ausbreitung der Erkrankung in tiefer gelegene Gebiete eingedämmt oder sogar verhindert werden kann.

3 Material und Methoden

3.1 Studiendesign und Patientenkollektiv

Zur Bearbeitung der Fragestellung wurde eine nicht-randomisierte, nicht-verblindete Studie an freiwilligen Probanden entwickelt. Diese wurde in zwei Beobachtungsabschnitte unterteilt: eine Querschnittsstudie und eine Longitudinalstudie. Insgesamt wurden 32 Patienten eingeschlossen, die in drei Gruppen eingeteilt wurden.

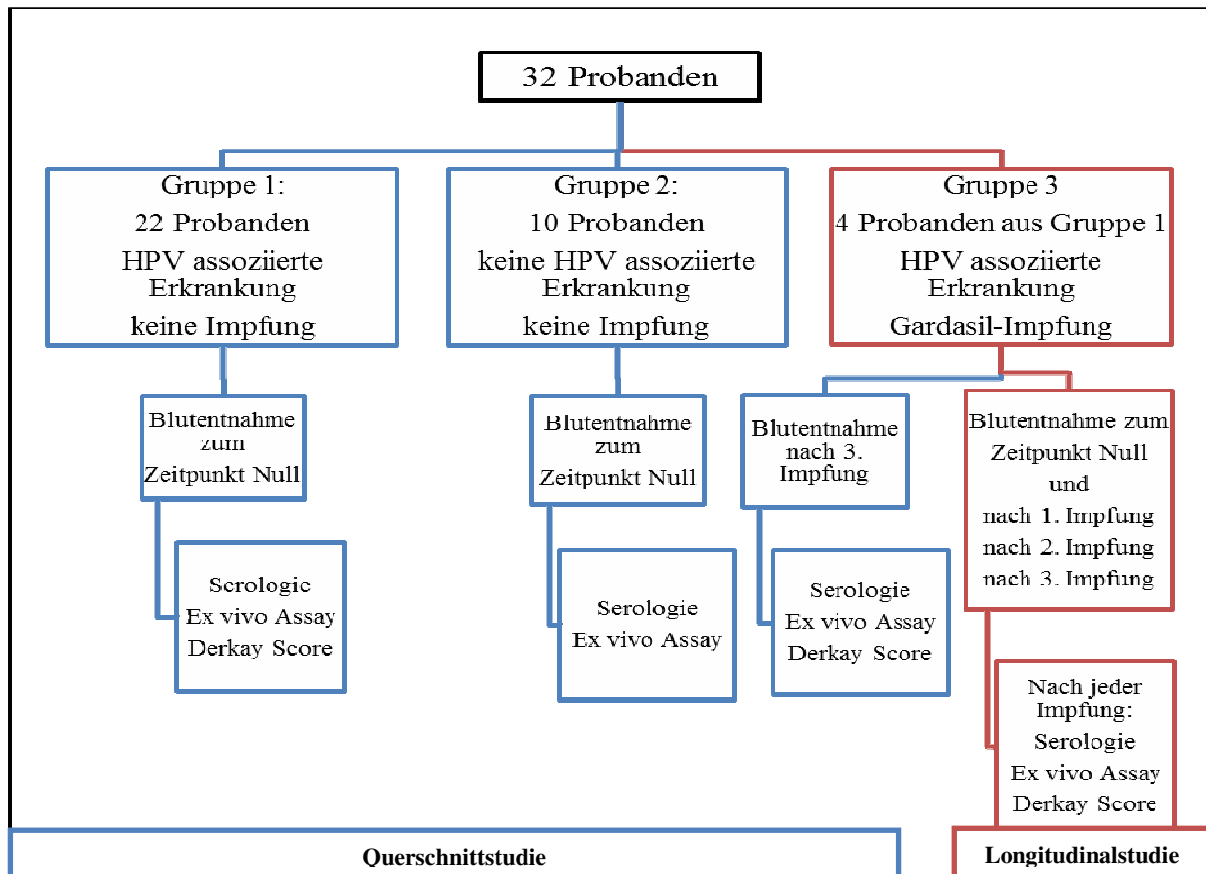


Abbildung 1: Schematischer Ablauf der Studie

Die erste Gruppe umfasste 22 akut an einer HPV-assoziierten Larynxpapillomatose erkrankte Probanden. Die zweite Gruppe wurde von einem aus 10 Probanden bestehenden gesunden Kontrollkollektiv gebildet. In die dritte Gruppe wurden 4 Patienten eingeschlossen, die trotz HPV-assoziiierter Larynxpapillomatose nach chirurgischer Herdsanierung eine komplette Immunisierung mit dem Impfstoff Gardasil® im Off-Label-Use erhielten. In Gruppe 3 wurden ausschließlich die Daten nach vollständiger Impfung in die Auswertung einbezogen. Dieselben Probanden waren vor Impfung Teil der Gruppe 1. Aus diesem Grund gab es in der

Querschnittstudie im Vergleich der drei Gruppen insgesamt 36 Fälle, aber nur 32 Probanden, die beobachtet wurden.

Im Rahmen der Longitudinalstudie wurde der Verlauf der Erkrankung in Zusammenhang mit dem gesamten Impfverlauf untersucht. Den Patienten wurde zum Zeitpunkt Null, also vor der ersten Impfung, und vier bis sechs Wochen nach jeder Impfung Blut abgenommen, welches mit den gleichen Verfahren wie in der Querschnittsstudie analysiert wurde. Bei minderjährigen Probanden war durch das Ethikvotum eine Probengewinnung nur im Zuge der routinemäßig durchgeführten Blutentnahmen erlaubt, so dass diese auf Grund der Untersuchungszeitpunkte und Operationszeitpunkte von dem vorgegebenen Zeitraum geringfügig abweichen konnten.

Zu den Einschlusskriterien des gesamten Probandenkollektivs gehörte das Einverständnis der Patienten bzw. der Erziehungsberechtigten und die Zugehörigkeit zu einer der drei definierten Gruppen. Weiterhin durften die Probanden in der Vergangenheit nicht mit einem prophylaktischen HPV-Impfstoff vakziniert worden sein. Die Patienten mussten bereit sein Blut zu spenden. Die Blutentnahme wurde entweder im Zuge der für die stationäre Aufnahme routinemäßig vorgesehenen Blutuntersuchungen oder während der Aufklärung über das Studiendesign durchgeführt. Nach Abnahme wurden die Proben anonymisiert.

Die Rekrutierung sowie die Aufklärung der Probanden der Gruppe 1 erfolgten jeweils mittels direkter Ansprache durch den behandelnden Arzt.

Die Probanden für die Gruppe 2 waren willkürlich ausgewählte, klinisch gesunde Personen. Voraussetzung für diese Gruppe war außerdem, dass die Teilnehmer anamnestisch keine HPV-assoziierte Erkrankung durchgemacht hatten und volljährig waren. Die Probanden dieser Gruppe blieben absolut anonym, sodass bis auf Krankheitsstatus und Geschlecht keine weiteren Daten erhoben wurden.

Für die Einteilung in Gruppe 3 war eine weitere Voraussetzung, dass die Patienten einer vollständigen Impfung mit dem prophylaktischen HPV-Impfstoff Gardasil[®] zustimmten.

Die Studie ist vom Ethik-Komitee der Charité-Universitätsmedizin Berlin mittels eines Ethikvotums bestätigt worden (EA4/035/08).

3.2 Ex-vivo-assay zur Bestimmung CD4 spezifischer T-Helferzellen

Tabelle 1: Materialien

Name	Klon	Firma
Zellkulturröhrchen mit Schraubverschluss (1ml)		Greiner bio-one, Frickenhausen
Vacutainer		Becton Dickinson
SEB		Sigma
HPV 6L1		peptides and elephants
HPV 11L1		peptides and elephants
HPV 16 L1		peptides and elephants
HPV 18 L1		peptides and elephants
HPV 16/18 E6/E7		peptides and elephants
HPV 6 E6/E7		peptides and elephants
anti CD 28	28.2	peptides and elephants
Brefeldin A		Sigma
EDTA		Serva
FACS Lysing Solution		Becton Dickinson
PBS Dulbecco w/o Ca ²⁺ ; w/o Mg ²⁺		Biochrom AG
Formalin		Merck
FACS Perm		Becton Dickinson
APC CD40L	5C8	Miltenyi
PerCP CD4	SK3	Becton Dickinson
FITC INF- γ	B27	Becton Dickinson
PE IL-2	MQ1-17H12	Becton Dickinson
Beriglobin		CSL Behring
RPMI		gibco by life technologies
DMSO		Merck
BSA		biomol
Natriumazid		Merck

Das für die Versuche verwendete assay basiert auf einem von Frentsch et al. [22] publizierten Protokoll, welches von Dr. AK Ramseger an die HPV-spezifischen Fragestellungen unserer Arbeitsgruppe angepasst wurde. Das im Folgenden beschriebene Protokoll wurde von ihr im Rahmen ihrer Dissertation etabliert [51]. Tabelle 1 stellt die verwendeten Materialien dar. In Abbildung 2 wird der Ablauf des assays schematisch dargestellt. Die Grundlage dieses assays stellt die aktivierungsspezifische Expression des Oberflächenmoleküls CD154 auf aktivierten CD4⁺ T-Zellen dar. Dieses wird für einige Stunden nach der Stimulation durch ein spezifisches Antigen von den CD4⁺ T-Zellen exprimiert. Für die in dieser Arbeit durchgeführte ex-vivo-Stimulation wurde ein L1-Peptidpool des jeweiligen HPV-Subtyps verwendet. Nach der Fixierung folgte das Anfärben der für das Stimulationsantigen spezifischen CD4⁺ T-Zellen mittels farbstoffkonjugierter Anti-human-CD154-Antikörper. Diese konnten so durch eine durchflusszytometrische Messung (fluoreszenz-activated cell sorting, FACS) dargestellt werden [22].

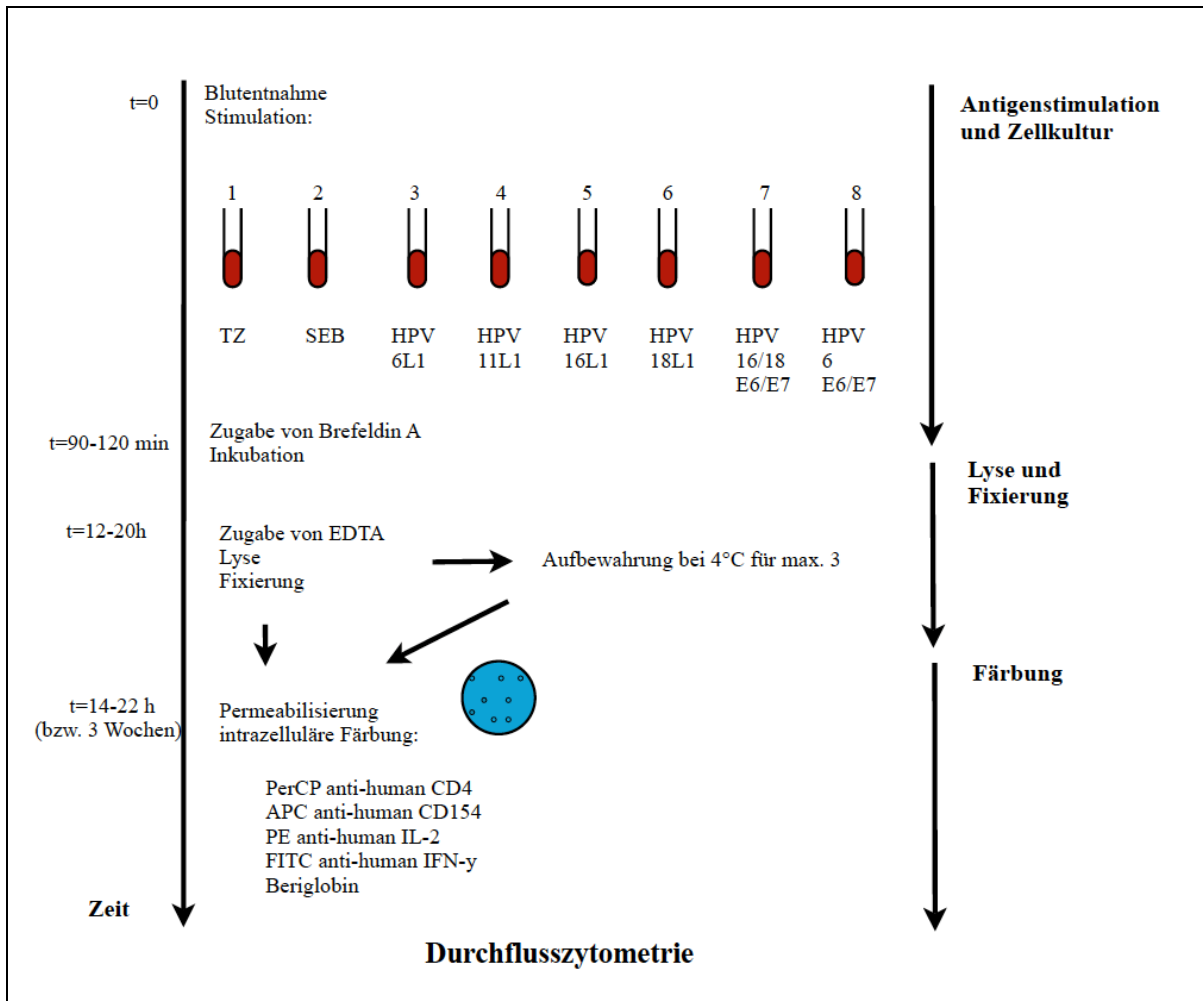


Abbildung 2: Ablauf des ex-vivo-assays (Vorlage aus [51]):

t =Zeit, TZ= Negativkontrolle, SEB = engl. *staphylococcal enterotoxin B*, HPV = *Humanes Papillomvirus*, LI = engl. *late protein 1*, E6/E7 = engl. *early protein 6/7*, EDTA = engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*, PerCP = *Peridinin-Chlorophyll-Protein*, APC = *Allophycocyanin*, PE = *Phycoerythrin*, FITC = *Fluoresceinisothiocyanat*, IL-2 = *Interleukin 2*, IFN- γ = *Interferon- γ*

3.2.1 Materialgewinnung

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde Vollblut analysiert, welches mit Hilfe des BD-Vacutainer-Systems peripher-venös bei jedem Probanden entnommen wurde. Dieses wurde mit Lithium-Heparin antikoagulierte und durfte bis zur weiteren Aufarbeitung maximal 24 Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt werden. Von den entnommenen Proben wurde bei jedem Probanden bei der Aufarbeitung ein Teil in Form von PBL und Plasma für weiterführende Fragestellungen im Rahmen dieses Projektes sowie Serumproben für die Messung spezifischer Antikörper kryokonserviert.

3.2.2 Antigenstimulation und Zellkultur

Die Grundlage der Untersuchungen bildete der Nachweis von IL-2 und IFN- γ produzierenden HPV 6, 11, 16 oder 18 spezifischen CD4+ T-Zellen. Zu diesem Zweck wurde ein L1-Peptidpool

des jeweiligen HPV-Subtyps verwendet. Die Antigene bestanden aus verschiedenen 30mer Peptiden, die mit einem Überlappungsversatz um 12 Aminosäuren die gesamte Sequenz des jeweiligen kompletten Wildtyp L1-Proteins repräsentierten. Der Peptidpool für HPV 6 L1 bestand aus insgesamt 28 Einzelpeptiden, der für HPV 11 L1 aus 31 Einzelpeptiden, der für HPV 16 L1 aus 29 Einzelpeptiden und der für HPV 18 L1 aus 31 Einzelpeptiden.

Bei jeder Untersuchungsreihe wurden außerdem kombinierte Peptidpools von HPV 16/18 E6/E7 Proteinen, sowie Peptidpools von HPV 6 E6/E7 Proteinen verwendet, um zwei weitere Ansätze anzulegen, die die Immunität durch natürliche Infektion kontrollierten, da sie nicht im prophylaktischen Impfstoff enthalten sind. Die Peptidpools für HPV 6 E6/E7 Mix und HPV 16/18 E6/E7 Mix setzten sich zusammen aus je 5 Einzelpeptiden für HPV 6 E6 und HPV 16/18 E6 und je 8 Einzelpeptiden für HPV 6 E7 und HPV 16/18 E7. Die Zusammensetzung des HPV 16/18 E6/E7 Mix bestand aus je zwei gleichen Teilen HPV 16/18 E6/E7.

Der Ablauf der Antigenstimulation erfolgte immer unter sterilen Arbeitsbedingungen. Es wurden für jeden Probanden insgesamt acht Ansätze vorbereitet. Für jeden Ansatz wurde 1 ml Vollblut in ein Zellkulturröhrchen (Volumen 10ml, Greiner bio-one, Frickenhausen) transferiert. Jedem dieser Ansätze wurde anschließend zur allgemeinen T-Zell-Kostimulation 1µg/ml Anti-humanes CD28 (BD, Klon 28.2, Stockkonzentration 1 mg/ml) zugeführt. Das erste Kulturröhrchen diente als Negativkontrolle und wurde nach Zugabe von Anti-CD28 verschlossen. Allen weiteren Kulturröhrchen einer jeden Versuchsreihe wurden je 10 µg/ml des jeweiligen L1-Peptidgesamt pools in einer Arbeitskonzentration von 1 mg/ml in PBS von HPV 6, 11, 16 oder 18 (Anteil einzelner Peptide im Peptidgesamt pool siehe oben) sowie den E6/E7 Peptidpools von HPV 6 und HPV 16/18 zugeführt. Auch diese Ansätze wurden nach dem Zuführen des Peptidpools verschlossen. Erst anschließend erfolgte separat die Stimulation des Ansatzes für die Positivkontrolle mit 10 µg/ml Staphylokokken Enterotoxin B (SEB, Sigma, Arbeitskonzentration 1 mg/ml in PBS). Auch dieser Ansatz wurde anschließend verschlossen. Die Deckel der Kulturröhrchen wurden jeweils nur angedreht. So konnte bei der auf die Antigenstimulation folgenden Inkubation, der bei Lagerung im Inkubator schräg stehenden Proben bei 37°C, 5% CO₂ und 92% Luftfeuchtigkeit, ein Gasaustausch stattfinden, sodass der Bicarbonatpuffer mit dem CO₂ den richtigen ph-Wert einstellen konnte.

Nach 90-120 Minuten wurde jedem Ansatz 10 µg/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. Durch diesen Schritt wurde die weitere

Sekretion von IFN- γ und IL-2 unterbunden und somit in den Zellen angereichert. Anschließend wurde die Inkubation für insgesamt 12-20 Stunden protokollkonform fortgesetzt.

3.2.3 Lyse und Fixierung

Nach mindestens 12 bis maximal 20 Stunden wurde die Stimulation beendet. Jeder der acht Ansätze wurde am Ende der Stimulation für 10 Minuten mit 20 μ l EDTA 100 mMol (Ethyldiamintetraessigsäure, pH 7) versetzt, um so die eventuell am Kulturröhrchen haftenden Makrophagen abzulösen. Im nächsten Arbeitsschritt erfolgte die Lyse der im Vollblut enthaltenen Erythrozyten durch Zugabe von 9 ml BD FACS Lysing Solution verdünnt mit Aqua dest. im Verhältnis 1:10 für weitere 10 Minuten. Dabei wurden die Kulturröhrchen mindestens zweimal auf den Kopf gedreht, um eine komplette Lyse zu gewährleisten. Anschließend wurde der Überstand bei 373g (entspricht hier 1400rpm, Multifuge 1S-R der Firma Heraeus) 10 Minuten lang abzentrifugiert und abgossen. Die Zellpellets wurden in je 2 ml PBS resuspendiert und aufgenommen. Es folgte erneut die Zentrifugation für 10 Minuten bei gleicher Umdrehungszahl. Der Überstand wurde abgossen und die Zellpellets durch die Zugabe von 500 μ l Formalin (2% in PBS) für 17 Minuten fixiert. Diese Zeit musste unbedingt eingehalten werden. Anschließend wurden die Pellets in FACS-Puffer (PBS mit 1% (w/v) bovinem Albumin Fraktion V (BSA, Biomol, Hamburg) und 0,1% (w/v) Natriumazid) resuspendiert. Die so aufgearbeiteten und fixierten Zellen konnten nun entweder sofort gefärbt oder in je 1ml FACS-Puffer resuspendiert für maximal 3 Wochen bei 4°C in Dunkelheit aufbewahrt werden.

3.2.4 Intrazelluläre FACS-Färbung

Bei sämtlichen bis zu diesem Punkt aufgearbeiteten Proben wurde eine Standardfärbung durchgeführt. Diese enthielt Antikörper gegen CD4, CD154, IFN- γ und IL-2 und zum Blocken das Immunglobulin Beriglobin.

Für die intrazelluläre Färbung wurden die Zellen zunächst mit 500 μ l BD FACS-Permeabilisierungspuffer (1:10 verdünnt mit Aqua dest.) permeabilisiert. In weiteren Schritten erfolgte das Auswaschen, erneutes Zentrifugieren (10 min, 1400 rpm) und anschließendes Resuspendieren der Zellpellets in FACS-Puffer. Danach wurden die Zellen in FACS-Röhrchen übertragen und wiederum zehn Minuten bei gleicher Drehzahl zentrifugiert. Der Überstand wurde abgossen.

Der Farbe-Mix (50 μ l) setzte sich zusammen aus anti-human CD4 (Klon SK3), konjugiert mit Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP), verdünnt mit FACS-Puffer im Verhältnis 1:10, anti-

human-CD154 (Klon 5C8), konjugiert mit Allophycocyanin (APC), verdünnt mit FACS-Puffer im Verhältnis 1:5, sowie anti-human IL-2 (Klon MQ1-17H12) konjugiert mit Phycoerythrin (PE) und anti-human IFN- γ (Klon B27), konjugiert mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC), jeweils in einer Verdünnung von 1:100 mit FACS-Puffer. Zusätzlich wurde Beriglobin (1 mg/ml in PBS, ZLB Behring) in einer Verdünnung von 1:50 mit FACS-Puffer beigefügt. Das verwendete anti-human CD154 stammte von der Firma Miltenyi, sämtliche anderen verwendeten Antikörper stammten von der Firma Becton Dickinson (BD).

Die Einwirkzeit des Färbe-Mix betrug bei Raumtemperatur 30 Minuten im Dunkeln. Durch die vorherige Permeabilisierung der Zellen konnten die konjugierten Antikörper intrazellulär binden. Danach wurde der Überstand mit 1 ml FACS-Puffer ausgewaschen und die Pellets entweder in 250 μ l FACS-Puffer aufgenommen und sofort mit Hilfe der Durchflusszytometrie gemessen, oder die Färbung maximal eine Nacht bei 4°C aufbewahrt. Alternativ wurden die Pellets in je 100 μ l Formalin (v/v, 1% in PBS) resuspendiert und für maximal eine Woche bei 4°C aufbewahrt und anschließend gemessen.

3.2.5 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von fluoreszenzmarkierten Partikeln. Das Prinzip der technischen Durchführung wird in Abbildung 3 und Abbildung 4 dargestellt. Diese Methode basiert auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Die mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörper binden an Oberflächenmoleküle oder intrazelluläre Peptide und Proteine und markieren diese spezifisch.

Während der Messung passieren die einzelnen Zellen nacheinander in einer so genannten Flusszelle einen fokussierten Laserstrahl. Sowohl das Streulicht als auch das Fluoreszenzsignal wird durch Photozellen detektiert. Anhand der unterschiedlichen Streuung des Lichts und des durch den Farbstoff emittierten Lichts können die Zellen voneinander unterschieden werden. Die Darstellung der Messung erfolgt in der Form von so genannten „Dot plots“ (vgl. Abbildung 5). Je nach Gerätetyp und dem Einsatz mehrerer Laser und verschiedener Farbstoffe lassen sich unterschiedlich viele Parameter gleichzeitig analysieren [52, 53].

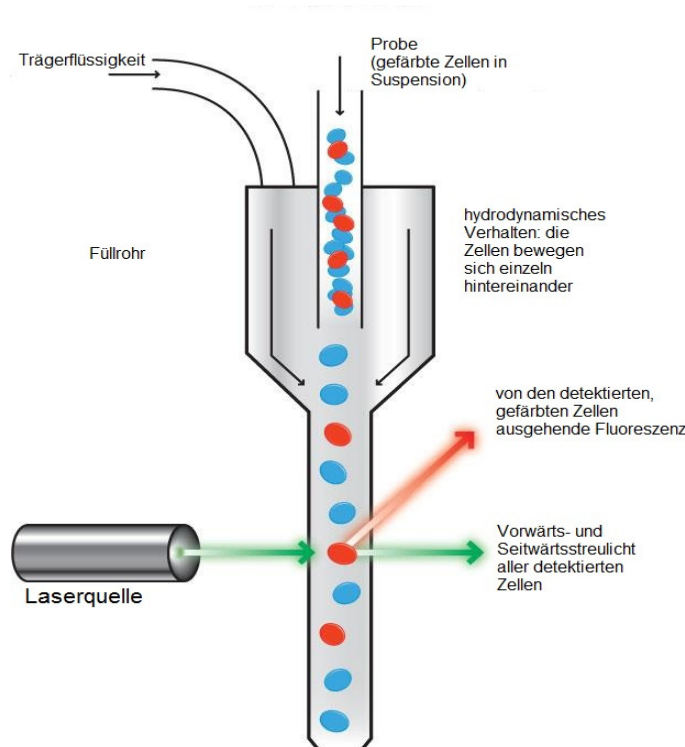


Abbildung 3: Prinzip der Durchflusszytometrie (Abbildung aus [54])

Das Vorwärtsstreulicht (FSC, forward light scatter) und das Seitwärtsstreulicht (SSC, side scatter) geben Auskunft über die Größe und über die Granularität der Zelle (vgl. Abbildung 4). Anhand dieser Eigenschaften erfolgt die Einteilung der Lymphozyten in der Menge aller gemessenen Zellen.

Die Helligkeit der den Laserstrahl passierenden Zelle gibt indirekt Aufschluss über die Menge des Substrats. Durch die Detektion der Fluoreszenzsignale konnten die spezifisch markierten CD4+ T-Zellen erkannt werden und ihre Substanzklassifizierung anhand der Interleukinproduktion erfolgen. In jedem Ansatz sollten möglichst 200000 CD4+ T-Zellen gemessen werden. Dies war jedoch auf Grund zum Teil geringer Zellzahlen in den Ansätzen nicht immer möglich.

Als Synonym für die Durchflusszytometrie wird auch der Begriff FACS verwendet [52]. Das für diese Versuche verwendete Gerät war ein FACS Calibur der Firma BD, welches in der Lage ist, vier verschiedene Fluoreszenzen gleichzeitig zu detektieren.

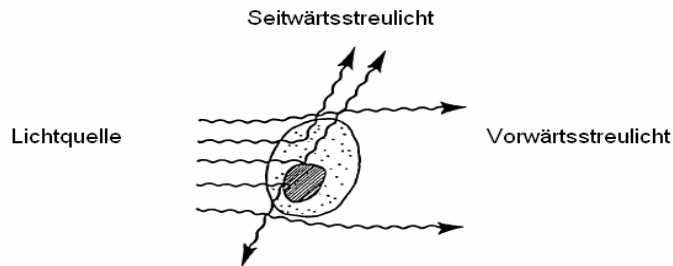


Abbildung 4: Bildung des Seitwärts- (SSC) und Vorwärtsstreulichtes (FSC) (Abbildung aus [55])

3.2.6 Durchflusszytometrische Auswertung

Für die Auswertung der durchflusszytometrischen Messung wurde die CellQuest Pro Software der Firma BD verwendet. Die Darstellung der gemessenen Zellen erfolgt in der Form von „Dot plots“, einer Grafik, in der jeder Punkt einem gemessenen Ereignis entspricht. Mit Hilfe des „Gating“ ist es möglich, eine bestimmte Gruppe von Zellen anhand ihrer Eigenschaften auszuwählen und weiter zu unterteilen sowie die gemessenen Ereignisse zu zählen [53].

Anhand der SSC- und FSC- Eigenschaften können die Lymphozyten, welche die für unsere Messung wichtigen Zellen darstellen, unter allen Leukozyten identifiziert und bestimmt werden. Interessant für diese Studie waren jene Lymphozyten, die sowohl für CD4 und CD154 (Aktivierungsmarker) als auch für IL-2 bzw. IFN- γ positiv waren. Um diese Lymphozyten herauszufiltern, wurde um die als CD4 positiv erkannten Zellen eine Markierung gelegt (vgl. Abbildung 5, Bild eins und zwei). Diese so gefilterten (gategeten) Lymphozyten wurden anschließend in weitere „Dot plots“ übertragen, in denen sie auf das Vorhandensein von CD154, IL-2 und IFN- γ untersucht wurden. Dies geschah für jeden zu untersuchenden Ansatz separat. Die entstandenen „Dot plots“ wurden jeweils in vier Quadranten unterteilt, welche sich von ihrer Einstellung an der Negativkontrolle (TZ) orientierten. Auf der y-Achse wurde die Signalstärke für CD154 aufgetragen, auf der x-Achse die jeweilige Intensität der gemessenen Interleukine bzw. Interferone. Die ausschlaggebende Zellpopulation befand sich im oberen rechten Quadranten. Hier waren die doppelt positiven Zellen dargestellt, CD4+ Lymphozyten, die sowohl spezifisch auf das stimulierende Antigen durch CD154 Expression reagiert und zusätzlich auch IL-2 bzw. IFN- γ produziert haben (vgl. Abbildung 5, Bild drei und vier).

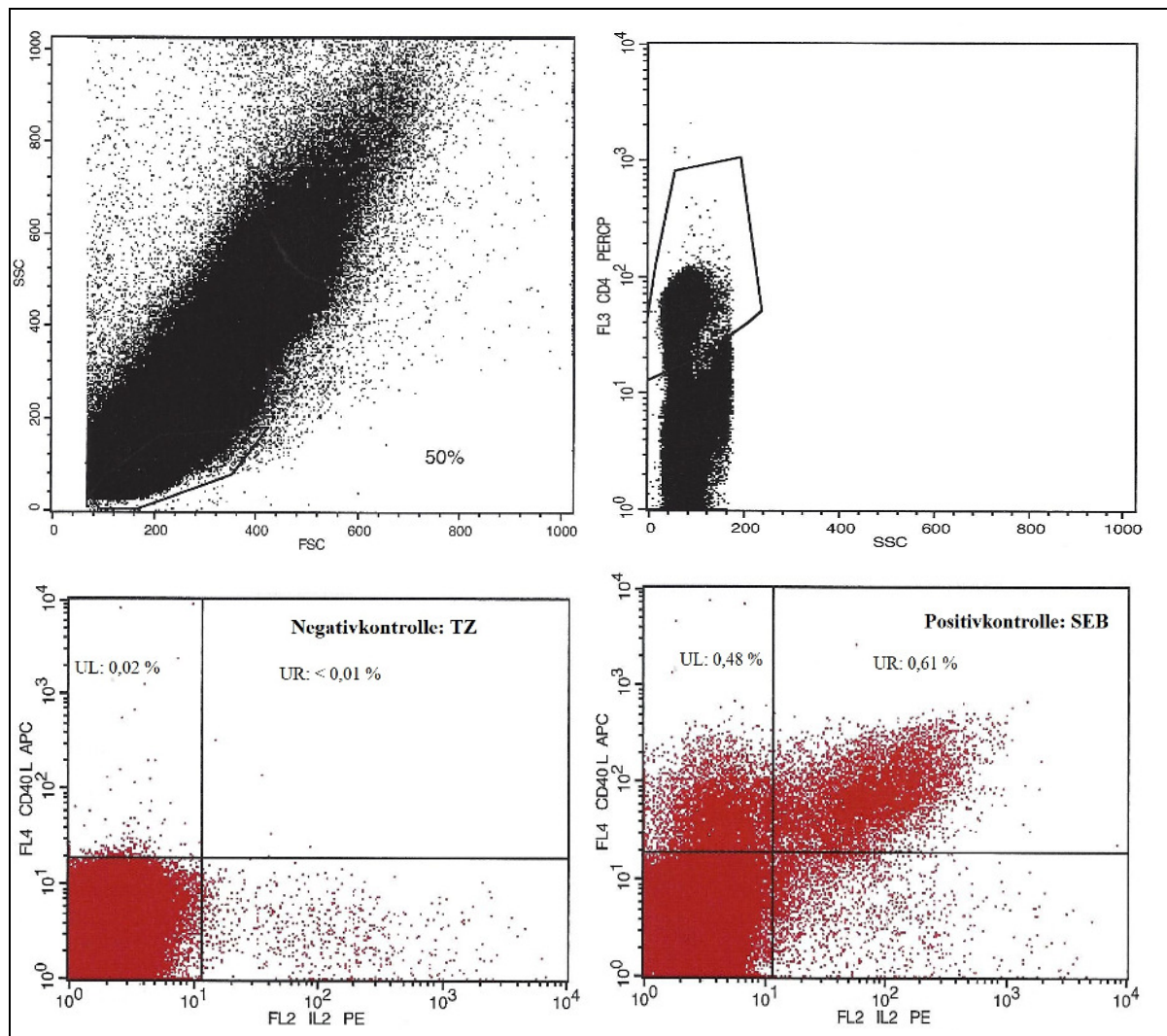


Abbildung 5: FACS Dot plot-Darstellung zur Gatingstrategie

Die gezeigten Bilder werden von der CellQuest Pro Software der Firma BD im Zug der Auswertung erstellt. In den oberen beiden Bildern der Abbildung ist gezeigt wie die CD4+-Lymphozyten an Hand ihrer SSC und FSC Eigenschaften dargestellt und ausgewählt wurden. In der Darstellung befinden sich zur Übersicht nur 50% der gezählten Zellen. In die Berechnung wurden 100% der Zellen einbezogen. In den unteren beiden Bildern sind die Interleukin-2 positiven T-Helferzellen eines Probanden als Beispiel an Hand der Negativ- sowie Positivkontrolle dargestellt. Im oberen linken (UL) und oberen rechten Quadranten (UR) ist die Gesamtmenge aller CD40L+ Lymphozyten gezeigt. Die Zellen im oberen rechten Quadranten (UR) sind zusätzlich positiv für IL-2. PERCP: Peridinin-Chlorophyll-Protein APC: Allophycocyanin, PE: Phycoerythrin.

3.3 Serologischer Multiplex-assay zur Bestimmung HPV-spezifischer Antikörper

Die Bestimmung der HPV-spezifischen Antikörpertiter erfolgte durch die Arbeitsgruppe von Herrn Dr. M. Pawlita vom deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg. Durchgeführt wurde der serologische Multiplex-assay an kryokonserviertem, Heparin-antikoaguliertem Plasma oder Serum der insgesamt 32 Probanden dieser Studie. Bei den vier Fällen, die im Verlauf der Untersuchung mit Gardasil® geimpft wurden, wurde zu jedem

Untersuchungszeitpunkt eine Serumprobe kryokonserviert und ebenfalls untersucht, sodass die Antikörpertiter im Verlauf der Impfung dargestellt werden konnten.

Der assay basiert auf einer von Waterboer et al. 2005 entwickelten [56] Methode zur Bestimmung von Antikörperaktivitäten gegen verschiedene HPV-Antigene. Zunächst wurden die Seren der Probanden mit einem Puffer inkubiert, der die Antikörper, welche gegen eine Glutathion-s-Transferase gerichtet waren, blockiert. Diese preinkubierten Patientenserum wurden anschließend mit einem Mix von Luminex Beads, welche wiederum über die Glutathion-S-Transferase mit den verschiedenen HPV-Antigenen verbunden waren, inkubiert. Die danach mit dem spezifischen HPV-Antigen verbundenen Patientenserum-Antikörper wurden in einem weiteren Schritt mit sekundären, biotinylierten Antikörpern und Streptavidin-R-Phycoerytrin markiert. Mittels eines speziellen Durchflusszytometers, dem Luminex Analyzer (Luminex 200, Millipore), wurde die Fluoreszenz der Beads gemessen, was als median fluorescence intensity (MFI) dargestellt wurde und ein Maß für die Höhe der Antikörpertiter darstellte. Dieser Multiplex-assay wurde in der Entwicklung auf eine Gruppe von 30 Jungfrauen aus Indien angewendet. Bei den so gewonnenen Ergebnissen wurden zu den Mittelwerten für HPV 11 L1 die 5fache Standardabweichung sowie zu den Mittelwerten für HPV 6 und 16 L1 die 3fache Standardabweichung hinzu addiert. Auf diese Weise wurde ein Referenzbereich definiert, ab dessen Überschreitung von einem serologisch HPV-positiven Ergebnis gesprochen werden konnte. Der Grenzwert der Positivität für HPV 18 L1 wurde willkürlich auf 200 MFI festgelegt. Für die Festlegung der Grenzwerte für die E-Proteine wurde eine vorangegangene Studie mit einbezogen [56, 57].

Für die vorliegende Studie wurde die Reaktivität gegen L1- sowie E6 und E7 spezifische Antikörper gegen HPV 6, 11, 16 und 18 untersucht.

Tabelle 2 zeigt die jeweiligen Grenzwerte der Positivität für alle einbezogenen HPV-Antigene die sich durch die beschriebene Methode bestimmen ließen.

Tabelle 2: Definition der Grenzwerte der Positivität der verwendeten einzelnen HPV-Antigene

Antigen	Grenzwert der Positivität in MFI
HPV 6 L1	1907
HPV 11 L1	504
HPV 16 L1	327
HPV 18 L1	200
HPV 6 E6	500
HPV 11 E6	260
HPV 16 E6	484
HPV 18 E6	243
HPV 6 E7	364
HPV 11 E7	200
HPV 16 E7	548
HPV 18 E7	789

3.4 HPV-Genotypisierung

Die HPV-Typisierung der in die Studie eingeschlossenen Probanden wurde im Rahmen der Routineuntersuchungen in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Kaufmann im Labor für Gynäkologische Tummorimmunologie in der Charité - Campus Benjamin Franklin mittels Luminex-basierter Multiplex Genotyping (MPG) nach Schmitt et al. 2008 durchgeführt [5].

3.5 Erfassung klinischer Daten mittels Derkay Score

Um trotz der Variabilität der LP (vgl. Kapitel 1.3) eine standardisierte Einteilung des klinischen Erscheinungsbildes der Erkrankung vornehmen zu können, wurde von Derkay et al. im Jahr 2004 der „Derkay Score“ entwickelt, ein System zur besseren Beurteilung des klinischen Erscheinungsbildes [58]. Die Grundlage dieses Systems bildete eine Beobachtung von 17 Patienten des „Children´s Hospital of the King´s Daughter“ in den USA über 3 Jahre hinweg [58, 59].

Der Derkay Score setzt sich aus zwei Teilen zusammen und die Einschätzung erfolgt an Hand eines Punktesystems. Je mehr Punkte gezählt werden, desto schlechter ist die Bewertung im Score. Der erste Abschnitt enthält mehrere Parameter, welche eine Einschätzung der Funktionalität des betroffenen Organs ermöglichen. Beschrieben wird die Funktionalität durch das Punktesystems. Zu den funktionellen Gesichtspunkten gehören die Qualität der Stimme (normal, pathologisch, abwesend), die Dringlichkeit der chirurgischen Intervention (elektiv, dringend, akut), und das Vorhandensein von Stridor (abwesend, aktiv vorhanden, noch gering vorhanden). Der maximal zu erreichende Punktwert, welcher den schlechtesten Fall beschreibt, beträgt 11. Der zweite Teil beinhaltet ebenfalls ein Punktesystem, mit Hilfe dessen die

anatomische Ausbreitung der Papillome beschrieben wird. Dieser Teil stützt sich auf die Unterteilung des Aerodigestivtraktes in 25 Unterbezirke der rechten und linken Seite sowie das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit von papillomatösen Strukturen in diesen Bereichen. Die Darstellung erfolgt hier nach einem Punktesystem von 0 bis 3, wobei „0“ bedeutet, dass keine papillomatöse Struktur nachweisbar ist, Wert 1 beschreibt das Vorhandensein einer oberflächlichen Läsion, 2 steht für den Nachweis einer erhabenen Struktur und 3 beschreibt das Vorhandensein einer großen Menge an Papillomen. Der höchste und damit schlechteste zu erreichende Punktwert ist hier 75. Die Auswertung des Punktesystems besagt, dass Patienten pro Anstieg um einen Punkt eine Verkürzung des behandlungsfreien Intervalls von 4 Tagen zu befürchten haben. Bei Patienten, die einen Gesamtpunktwert von unter 20 Punkten aufweisen, muss ein operativer Eingriff im Durchschnitt 120 Tage später erfolgen als bei Patienten, die darüber liegen [58]

Mit Hilfe dieser Einteilung ist es möglich sowohl den klinischen Verlauf der Erkrankung und das Ansprechen auf die angewendeten Therapien optimal darstellen und beurteilen zu können als auch eine Vergleichbarkeit der Fälle zu erzielen um damit eine effektivere Kommunikation zwischen behandelnden Ärzteteams zu ermöglichen.

3.6 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der mit dem Durchflusszytometer erhobenen TZ-Frequenzdaten sowie der mittels Multiplex-assay erhobenen AK-Titer und der mittels Derkay Score sowie Auswertung der Patientenakten erhobenen klinischen Daten der Probanden wurde die Software SPSS 19.0 für Windows sowie Microsoft[®] Excel 2002 (10.6871.6870) SP3 für Windows verwendet.

Die Analyseergebnisse wurden manuell in unterschiedliche Excel Tabellen eingefügt und mit Hilfe von Excel-Zellen-Funktionen in einer zentralen Tabelle als Datenbasis zusammengeführt, die für alle weiteren Aufbereitungen herangezogen wurde. Sie diente als Quelle für den Import der Daten in SPSS sowie zur Generierung aller Excel Diagramme. Die erzeugten Diagramme basieren auf Standard-Diagrammen, die Excel in der benutzten Version zur Verfügung stellt.

Für die Analyse der T-Zelldaten erfolgte zunächst die Prüfung auf Normalverteilung für alle T-Zellfrequenzen aller gemessenen HPV-Typen. Die Anwendung des Kolmogorov-Smirnov-Tests ergab für fast alle Datensätze keine Normalverteilung. Für die Einheitlichkeit der Auswertungsergebnisse und die bessere Vergleichbarkeit der Daten wurde daher für alle Datensätze, auch für die wenigen, die normal verteilt waren, nichtparametrische Tests für die

statistische Auswertung angewendet. Insgesamt handelt es sich auf Grund der Seltenheit der Erkrankung um einen sehr kleinen Datensatz. Da die Erkrankung individuell unterschiedlich verläuft und Patienten jeglichen Alters eingeschlossen wurden, zeigt der Datensatz ein großes Konfidenzintervall.

Um die Unterschiede der verschiedenen T-Zellantworten in den drei Studiengruppen zu untersuchen, sollte ein Vergleich der Mittelwerte durchgeführt und auf die Höhe ihres Unterschiedes geprüft werden. Mittels des Levene-Tests wurde auf die Gleichheit der Varianzen in allen Gruppen getestet. Es ergab sich für fast alle Datensätze keine Varianzhomogenität. Ob quantitative Unterschiede zwischen den Gruppen bestanden, wurde demnach mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests bei unabhängigen Stichproben untersucht. Dieser Test ergab zunächst, dass keine Gleichheit zwischen den getesteten Variablen bestand, so dass im Zuge von Post-Hoc-Mehrfachvergleichen die Unterschiede genauer untersucht wurden. Hier wurden zur Testung die alten Dialogfelder verwendet. Auf Grund der niedrigen Fallzahlen konnte dadurch die exakte Signifikanz berechnet werden. Zusätzlich wurde, obwohl es sich nicht um normalverteilte Datensätze handelte, eine univariate Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt, deren Verwendung mittels Kruskal-Wallis-Test geprüft und bestätigt wurde. Es wurden Post-Hoc-Mehrfachvergleiche durchgeführt, um ebenfalls zu prüfen, welche Gruppen sich in den Mittelwerten signifikant voneinander unterschieden und welche nach Bonferroni korrigiert wurden, um eine Kumulation von alpha-Fehlern auszuschließen. Sowohl die Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests als auch die der ANOVA werden in der Arbeit angegeben. Aufgrund der ungleichen Gruppengröße wurde der Stichprobenumfang als harmonisches Mittel berechnet. Die Studiengruppe bzw. der Krankheitsstatus der Probanden wurde bei den Tests als Faktor angegeben, während die T-Zellergebnisse für die verschiedenen Antigene (IL-2, IFN- γ) als Variable galten. Durchgeführt wurden die Analysen für drei Signifikanzniveaus $\alpha = 0,05$, $\alpha = 0,01$ und $\alpha = 0,001$. Dargestellt wurden die Ergebnisse in Form von Boxplots mittels explorativer Datenanalyse sowie in tabellarischer Form.

Mit der Auswertung der serologischen Daten wurde analog dazu verfahren. Hier galt ebenfalls der Krankheitsstatus als Faktor. Die Ergebnisse der Antikörpertiterbestimmung gegen die verschiedenen HPV-Antigene wurden als die Variablen eingesetzt.

Die Boxplotdiagramme stellen die Gesamtheit der Daten aller Probanden der jeweiligen Studiengruppe in einem Querschnitt zu einem bestimmten Zeitpunkt dar. Eine Box stellt jeweils den Bereich dar, in dem 50% aller Werte der jeweiligen Gruppe liegen, der Bereich entspricht

dem Interquartilsabstand (IQR). Der schwarze Strich in der Box beschreibt den Median. Die Whiskers geben den Bereich des maximal 1,5 fachen IQRs an, diese Werte werden noch nicht als Ausreißer bezeichnet. Mit Punkten dargestellte Werte werden als milde Ausreißer beschrieben, ihr Wert liegt zwischen dem 1,5 und dem 3 fachen IQR, größere Ausreißer ab einem 3-fachen IQR sind durch Sternchen gekennzeichnet.

Zum Schluss wurde im zweiten Teil der Arbeit vor Betrachtung der Einzelfälle ein Vergleich der T-Zellfrequenzen sowie der AK-Titer der gesamten Gruppe vor und nach der Impfung durchgeführt. Um hier die Unterschiede in der quantitativen Ausprägung der T-Zellfrequenzen festzustellen wurde ein Wilcoxon Test für verbundene Stichproben angewendet. Als Testpaare der Variablen wurden hier jeweils die Ergebnisse der ex vivo gemessenen CD4+/IL-2+ bzw. CD4+ /IFN- γ + T-Helferzellfrequenzen und analog dazu die Ergebnisse der mittels Multiplex-assay gemessenen AK-Titer bestimmt. Die statistische Aussagekraft ist auf Grund der geringen Fallzahlen jedoch etwas eingeschränkt. Zur Darstellung des individuellen Verlaufs der Probanden über den Zeitraum der Impfung wurden ausschließlich die in Excel bereit gestellten Diagrammfunktionen verwendet.

Die Diagramme in den Fallbeschreibungen zeigen jeweils den Verlauf der gemessenen Parameter über drei Jahre. Die verschiedenfarbigen Linien beschreiben den jeweiligen Verlauf eines HPV-Typs, die Rubrikenachse der linken Seite zeigt die Höhe der gemessenen T-Zellfrequenzen bzw. Antikörpertiter. Die Rubrikenachse der rechten Seite zeigt die Höhe der gemessenen T-Zellfrequenzen gegen SEB, die gestrichelte grüne Linie zeigt deren Verlauf. Die roten Punkte markieren die Zeitpunkte der Impfungen.

4 Ergebnisse

4.1 Bestimmung der Grenzwerte und Ausschluss von Probanden im ex-vivo-assay

Bei jedem Patienten wurden aus der abgenommenen Blutprobe für jeden der untersuchten HPV-Typen drei Werte bestimmt. Der erste gemessene Wert gibt den Anteil der unspezifisch aktivierten T-Zellen an der Gesamtmenge der CD4+T-Lymphozyten an (CD4+/CD154+T-Zellen). Die beiden weiteren gemessenen Werte beschreiben den Anteil der doppelt positiven T-Zellen, die als Zeichen einer spezifischen Aktivierung zusätzlich zur CD4+/CD154+ Positivität noch IL-2 bzw. IFN- γ produzierten. In den folgenden Abschnitten werden nur die T-Zellfrequenzen der für diese Arbeit immunologisch relevanten, spezifisch aktivierten doppelt positiven T-Zellen berücksichtigt und dargestellt.

Zur Darstellung und Einordnung wurden alle gemessenen Werte sowohl mit einer Negativ- als auch mit einer Positivkontrolle verglichen. Die Negativkontrolle für die experimentellen Untersuchungen wurde nicht mit dem spezifischen Antigen stimuliert, es wurden also nur die spontan aktivierten T-Zellen gemessen. Die Messung erfolgte, um etwaige Verunreinigungen oder Fehler auszuschließen. Nicht aktivierte T-Zellen durften in dem assay keine Reaktion bzw. nur eine geringe Hintergrundaktivität zeigen. Der Anteil der „doppelt positiven“ Zellen an den Gesamtlymphozyten durfte in dieser Kontrollmessung maximal 0,05% betragen, um in die Auswertung mit eingeschlossen zu werden. Das war ein empirisch festgelegter Cutoff aus früheren Studien [51]. Als Positivkontrolle wurde eine Probe mit SEB stimuliert, um bei ihrer positiven Reaktion zu zeigen, dass eine Immunkompetenz gegeben war. In der Positivkontrolle musste der Anteil der spezifisch aktivierten T-Zellen mindestens 0,2% betragen, um als positiv zu gelten. Das war ein in der Studie festgelegter Cutoff. Insgesamt erfüllten die Messreihen von 32 Probanden diese Kriterien und wurden in die Studie eingeschlossen.

4.2 Querschnittstudie

4.2.1 Charakterisierung des Probandenkollektivs

In die Untersuchungen der Querschnittstudie wurden insgesamt 32 Probanden eingeschlossen, die in drei verschiedene Gruppen unterteilt wurden, so dass auf Grund der Einteilung der vier Impfprobanden in zwei Gruppen (vor und nach Impfung) insgesamt 36 Fälle beobachtet wurden (vgl. Kapitel 3.1).

In den drei Gruppen waren jeweils die Hälfte der Probanden weiblich bzw. männlich. Das Alter spielte nur in Bezug auf die Erstmanifestation eine Rolle und war für die Einteilung in JLP oder ALP wichtig. Die Einteilung in JLP und ALP wurde nur in Gruppe 1 und 3 vorgenommen, wobei in Gruppe 1 bei insgesamt 14 Probanden ALP und bei acht Probanden JLP festgestellt wurde. In Gruppe 3 litten drei Probanden an JLP und eine Probandin an ALP.

Bei der Betrachtung der krankheitsspezifischen Parameter werden in der folgenden Charakterisierung nur die Gruppen der erkrankten Probanden dargestellt. Für die gesunde Kontrollgruppe (Gruppe 2) gibt es auf Grund des Fehlens der Erkrankung weder eine HPV-Typisierung, noch eine Beschreibung der Form oder der Schwere der Erkrankung.

In der Gruppe der erkrankten Probanden (Gruppe 1) konnte für 15 von 22 Patienten der HPV-Typ aus dem gewonnenen Papillommaterial bestimmt werden. Zehn Patienten waren HPV 6, vier HPV 11 und ein Patient war HPV 6, 11 und 16 positiv. Aus diesen 22 Probanden wurden die vier Probanden ausgewählt, die Gruppe 3 bildeten. In dieser Gruppe war ein Proband HPV 6, 11 und 16 positiv, zwei waren HPV 11 und einer HPV 6 positiv.

Die mittleren Werte im Derkey Score unterschieden sich in den Gruppen 1 und 3 stark voneinander. In Gruppe 1 lag der Mittelwert der 22 einbezogenen Probanden bei 12,36 Punkten, in Gruppe 3 bei 36 Punkten vor der Impfung und bei nur noch 6,75 Punkten nach ihrer Impfung.

4.2.2 Nachweis HPV-spezifischer T-Helferzellfrequenzen für Interleukin-2 positive T-Helferzellen

In Abbildung 6 ist eine Übersicht der zellulären Immunität der drei verschiedenen Studiengruppen gezeigt. Für alle einbezogenen Werte gilt, dass die Mittelwerte der Negativkontrollen durchgängig kleiner als 0,05% und die Positivkontrollen größer als 0,2% sind. Die Daten liegen also innerhalb der Grenzwerte und erfüllen die Einschlusskriterien. Die Werte der Negativkontrolle liegen in allen drei Gruppen auf demselben Niveau.

Bei der Betrachtung der Boxplots ist gut zu sehen, dass sich Gruppe 3 deutlich von den beiden anderen Gruppen abhebt. Die Probanden dieser Gruppe weisen für alle vier dargestellten HPV-Typen durchgängig eine höhere T-Zellfrequenz auf als die Probanden der anderen beiden Studiengruppen. Dieser Unterschied ist für alle vier HPV-Typen für $p < 0,01$ signifikant. Betrachtet man Gruppe 1 und 2 im Vergleich, wird deutlich, dass sich beide Gruppen in der Höhe Ihrer T-Zellfrequenzen gegen die vier betrachteten HPV-Typen nicht signifikant voneinander unterscheiden.

Vor der Gardasil®-Impfung bestand nur eine geringe T-Zellimmunität gegen L1-Antigene, allerdings wurde sie nach Impfung in Gruppe 3 deutlich induziert.

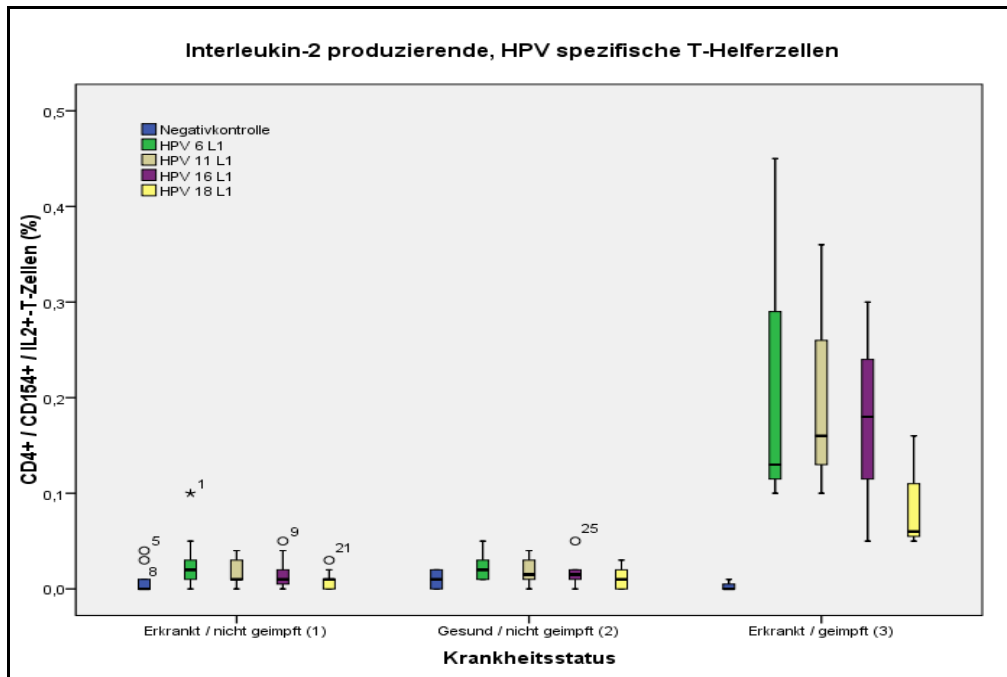


Abbildung 6: Vergleich IL-2 produzierender, spezifischer T-Helferzellen gegen HPV 6, 11, 16 und 18 L1-Antigen abhängig vom Erkrankungs- bzw. Impfstatus der Probanden

Dargestellt sind in Form der Boxplots die prozentualen Anteile der HPV-L1-Antigen spezifischen doppelt positiven (CD4+/CD154+ /IL-2+) T-Helferzellen an der Gesamtmenge der CD4+ T-Helferzellen gegen die Antigene der vier verschiedenen HPV-Typen 6, 11, 16 und 18(x-Achse). Zusätzlich sind zur Einordnung der Höhe der Frequenzen die Werte der Negativkontrolle (aktivierte, aber nicht spezifisch stimulierte T-Zellen (TZ IL-2)) dargestellt. Die Y-Achse gibt die jeweilige Probandengruppe (1-3) an. Die Daten der Gruppe 3 stammen nur von vier Patienten wovon ein Patient an ALP und drei Patienten an JLP litten.

Tabelle 3 zeigt die in Abbildung 6 dargestellten Ergebnisse genau. Hier sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichung der prozentualen Anteile der HPV-L1-Antigen-spezifischen doppelt positiven (CD4+/CD154+/IL-2+) T-Helferzellen an der Gesamtmenge der CD4+ T-Helferzellen für die oben beschriebenen drei Studiengruppen dargestellt. Zusätzlich wird die Gesamtmenge der CD4+ Zellen gegen einen Antigen-Mix aus HPV 16/18 E6/E7 bzw. HPV 6 E6/E7 an der Gesamtmenge der CD4+ T-Zellen dargestellt. Ebenso gezeigt sind der Mittelwert und die Standardabweichung der Negativ- sowie der Positivkontrolle. In zusätzlichen Spalten ist der p-Wert aufgeführt, welcher die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Gruppen zeigt.

Tabelle 3: Vergleich CD4+ HPV-spezifischer IL-2 produzierender T-Helferzellen abhängig vom Studienkollektiv

	Krankheitsstatus						
	erkrankt / nicht geimpft (1)	Signifikanzen		erkrankt / geimpft (3)	Signifikanzen		gesund / nicht geimpft (2)
	Mittelwert	p-Wert in der ANOVA	exakte Signifikanz: p-Wert nach Kruskal-Wallis	Mittelwert	p-Wert in der ANOVA	exakte Signifikanz: p-Wert nach Kruskal-Wallis	Mittelwert
	Standardabweichung			Standardabweichung			Standardabweichung
Negativkontrolle	0,007	n.s.	n.s.	0,003	n.s.	n.s.	0,009
	0,011			0,006			0,009
Positivkontrolle SEB	8,176	n.s.	n.s.	15,540	n.s.	n.s.	10,256
	6,383			3,266			5,096
HPV 6 L1	0,021	***	***	0,227	***	**	0,023
	0,024			0,194			0,014
HPV 11 L1	0,016	***	***	0,207	***	**	0,019
	0,012			0,136			0,013
HPV 16 L1	0,014	***	***	0,177	***	**	0,017
	0,014			0,125			0,013
HPV 18 L1	0,009	***	***	0,090	***	**	0,011
	0,008			0,061			0,010
HPV 16/18 E6/E7	0,006	n.s.	n.s.	0,013	n.s.	n.s.	0,008
	0,006			0,006			0,008
HPV 6 E6/E7	0,007	n.s.	**	0,083	n.s.	n.s.	0,365
	0,010			0,031			0,483
Vergleich Gruppe 1 zu 2	*						
	*						

p-Wert: n.s. nicht signifikant; * signifikant für $p < 0,05$; ** signifikant für $p < 0,01$; *** signifikant für $p < 0,001$. Die *p*-Werte zwischen den Spalten geben jeweils das Ergebnis des Vergleichs der beiden benachbarten Spalten an. Diese Signifikanz ist sowohl für die Berechnung der ANOVA als auch des Kruskal-Wallis-Tests angegeben. Die beiden untersten Zeilen geben das Ergebnis des Vergleichs von Gruppe 1 und 2 für HPV 6 E6/E7 an, wobei die obere Zeile den *p*-Wert für die ANOVA angibt und die untere für den Kruskal-Wallis-Test. Wenn keine Zeile unterhalb der jeweiligen Werte angegeben ist, sind die Unterschiede zwischen Gruppe 1 und 2 nicht signifikant.

Im Vergleich der 3 Studiengruppen zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Werten der Negativ- sowie der Positivkontrolle. Die Gruppen sind daher als vergleichbar zu werten. Betrachtet man dagegen die Ergebnisse der T-Zellfrequenzen gegen die L1-Antigene der vier HPV-Typen, lassen sich wie bereits in Abbildung 6 dargestellt signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen feststellen. Die Probanden der Gruppe 3 bilden für alle vier HPV-Typen eine höhere T-Zellfrequenz als die Vergleichsgruppen aus.

Besonders deutlich wird dieser Unterschied bei der Betrachtung der T-Zellfrequenzen gegen HPV 6. Hier erreichen die Probanden der Gruppe 3 mit einem Mittelwert von 0,227% die höchsten Werte, gefolgt von Gruppe 2 mit einem Mittelwert von 0,023% und Gruppe 1 mit einem Mittelwert von 0,021%. Bei der Ausprägung der T-Zellfrequenzen gegen die vier HPV-Typen ist der Unterschied von Gruppe 3 zu beiden anderen Gruppen für $p < 0,001$ hochsignifikant. Der Unterschied zwischen Gruppe 1 und 2 stellt sich als nicht signifikant dar. Eine gering höhere T-Zellfrequenz lässt sich auch in der Positivkontrolle erkennen.

Bezogen auf die Höhe der jeweils gemessenen Werte lässt sich eine Rangfolge definieren. Die höchsten T-Zellfrequenzen bilden durchgängig die Probanden der Gruppe 3, danach folgen die Probanden der Gruppe 2 und an letzter Stelle stehen die Probanden der Gruppe 1. Auch wenn der Unterschied zwischen den Gruppen 1 und 2 nicht signifikant ist, zeigt sich durchgehend, dass die an einer Larynxpapillomatose erkrankten ungeimpften Probanden (Gruppe 1) die niedrigsten T-Zellfrequenzen gegen L1 sowie gegen die E6/E7 Antigene aufweisen. Mit Hilfe der Varianzanalyse wurde gezeigt, dass die Streuung innerhalb jeder Gruppe gering ist und der Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen groß, so dass wir davon ausgehen können, dass sich trotz einer kleinen Studiengruppe die Mittelwertunterschiede zwischen den Gruppen nicht zufällig ergeben, sondern von einem Unterschied in der Grundgesamtheit herrühren. Die Reihenfolge der quantitativen Ausprägung der T-Zellantwort gegen L1 innerhalb der jeweiligen Gruppe ist in allen drei Gruppen jeweils identisch, die höchste T-Zellfrequenzen werden gegen HPV 6 gebildet, dann folgen HPV 11, HPV 16 und dann HPV 18.

Betrachtet man die T-Zellfrequenzen gegen die E6/E7 Proteine, zeigt sich eine andere Verteilung der Werte. Für E6/E7 Proteine der HPV-Typen 16 und 18 zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Studiengruppen. Die T-Zellfrequenzen gegen die E6/E7 Proteine des LR-HPV-Typ 6 sind in Gruppe 2 mit einem Mittelwert von 0,365% am höchsten. Der Unterschied zwischen Gruppe 2 und 1 ist für $p < 0,05$ signifikant, der zwischen Gruppe 1 und 3 für $p < 0,01$. Zwischen Gruppe 2 und Gruppe 3 findet sich kein signifikanter Unterschied. Auf dieses spezielle Ergebnis soll in Kapitel 4.2.5 genauer eingegangen werden.

Die Standardabweichung aller gemessenen Werte liegt in allen Fällen abgesehen von den Werten der Positivkontrolle unter 0,2% und ist somit sehr gering.

4.2.3 Nachweis HPV-spezifischer T-Helferzellfrequenzen für Interferon- γ positive T-Helferzellen

Abbildung 7 zeigt eine Übersicht über die IFN- γ produzierenden spezifischen T-Zellen. Es ist gut erkennbar, dass die geimpften Probanden der Gruppe 3 höhere T-Zellfrequenzen der Interferon- γ produzierenden T-Zellen gegen die vier HPV-Typen bilden als die beiden Vergleichsgruppen 1 und 2. Dieser Unterschied ist für $p < 0,001$ signifikant.

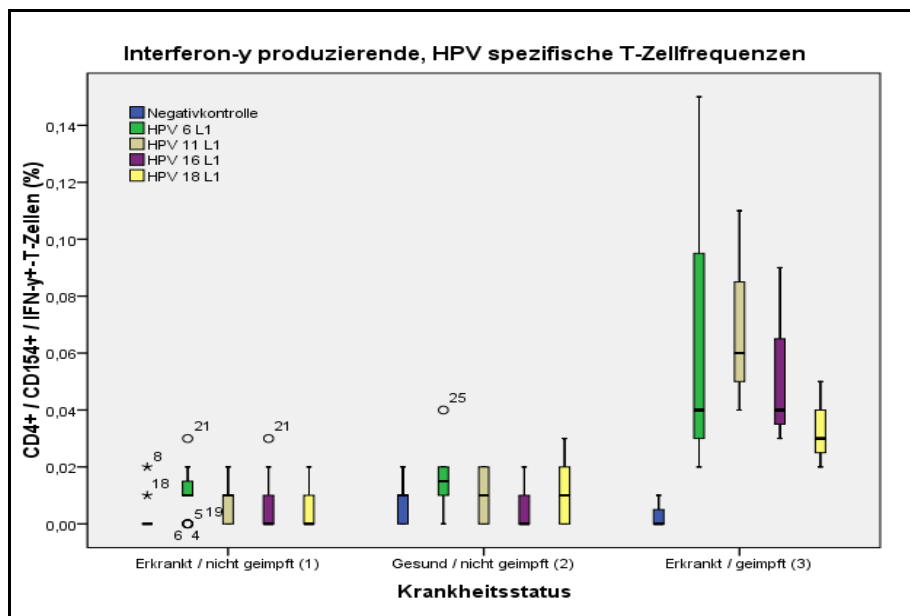


Abbildung 7: Vergleich IFN- γ produzierender, spezifischer T-Helferzellen gegen HPV 6, 11, 16 und 18 L1 Antigen abhängig vom Erkrankungs- bzw. Impfstatus der Probanden

Dargestellt sind die prozentualen Anteile der HPV-L1-Antigen spezifischen doppelt positiven ($CD4+/CD154+/IFN-\gamma+$) T-Helferzellen an der Gesamtmenge der $CD4+$ T-Helferzellen gegen die Antigene der vier verschiedenen HPV-Typen 6, 11, 16 und 18 (x-Achse). Zum Vergleich sind die Negativkontrollen mit dargestellt. Die Y-Achse gibt den Krankheitsstatus der jeweiligen Probandengruppe (1-3) an. Erfasst wurden die Werte parallel zu den oben beschriebenen IL-2 produzierenden Zellen.

Die T-Zellfrequenzen, welche in Gruppe 1 und 2 gebildet werden, unterscheiden sich kaum voneinander. Die prozentualen Anteile der IFN- γ produzierenden $CD4+$ T-Zellen, die gegen die L1-Antigene der vier HPV-Typen gerichtet sind, lagen in diesen beiden Gruppen bis auf 3 Ausnahmen unter 0,02%.

In Tabelle 4 sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichung der prozentualen Anteile der HPV-Antigen spezifischen doppelt positiven ($CD4+/CD154+/IFN-\gamma+$) T-Helferzellen an der Gesamtmenge der $CD4+$ T-Helferzellen für die bereits beschriebenen drei Studiengruppen dargestellt. Ebenso werden die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Negativ- sowie der Positivkontrolle aufgezeigt.

Tabelle 4: Vergleich CD4+ HPV-spezifischer IFN- γ produzierender T-Helferzellen abhängig vom Studienkollektiv

	Krankheitsstatus						
	erkrankt / nicht geimpft (1)	Signifikanzen		erkrankt / geimpft (3)	Signifikanzen		gesund / nicht geimpft (2)
	Mittelwert	p-Wert in der ANOVA	exakte Signifikanz: p-Wert nach Kruskal-Wallis	Mittelwert	p-Wert in der ANOVA	exakte Signifikanz: p-Wert nach Kruskal-Wallis	Mittelwert
Standardabweichung	Standardabweichung			Standardabweichung			
Negativkontrolle	0,002	n.s.	n.s.	0,003	n.s.	n.s.	0,009
	0,005			0,006			0,007
Vergleich Gruppe 1 zu 2	*						
	**						
Positivkontrolle SEB	4,197	n.s.	n.s.	6,430	n.s.	*	3,794
	3,541			0,282			1,950
HPV 6 L1	0,010	***	**	0,070	***	n.s.	0,016
	0,008			0,070			0,011
HPV 11 L1	0,007	***	***	0,070	***	**	0,010
	0,007			0,036			0,008
HPV 16 L1	0,005	***	***	0,053	***	**	0,006
	0,008			0,032			0,008
HPV 18 L1	0,004	***	***	0,033	***	*	0,010
	0,006			0,015			0,011
HPV 16/18 E6/E7	0,002	n.s.	n.s.	0,007	n.s.	n.s.	0,003
	0,004			0,006			0,008
HPV 6 E6/E7	0,002	n.s.	**	0,027	n.s.	n.s.	0,165
	0,006			0,012			0,247
Vergleich Gruppe 1 zu 2	**						

p-Wert: n.s., nicht signifikant; * signifikant für $p < 0,05$; ** signifikant für $p < 0,01$; *** signifikant für $p < 0,001$. Die *p*-Werte zwischen den Spalten geben jeweils das Ergebnis des Vergleichs der beiden benachbarten Spalten an. Die beiden untersten Zeilen geben das Ergebnis des Vergleichs von Gruppe 1 zu 2 für HPV 6 E6/E7 an, wobei die obere Zeile den *p*-Wert für die ANOVA angibt und die untere für den Kruskal-Wallis-Test. Diese sollen in Kapitel 4.2.5 genauer betrachtet werden. Wenn keine Zeile unterhalb der jeweiligen Werte angegeben ist, sind die Unterschiede zwischen Gruppe 1 und 2 nicht signifikant.

In Tabelle 4 lässt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Studiengruppen 1 und 2 in den Messwerten der Negativkontrolle erkennen. Im Vergleich der Gruppe 3 mit den Gruppen 1 und 2 zeigt sich bei der Betrachtung der Negativ- sowie Positivkontrolle kein signifikanter Unterschied.

Gegen die vier gemessenen HPV-Typen weist Gruppe 3 (mittlere Spalte der Tabelle) signifikant höhere T-Zellfrequenzen als beide Vergleichsgruppen auf. Anders als bei den Ergebnissen der in Kapitel 4.2.2 dargestellten IL-2 produzierenden T-Zellen, zeigt sich hier ein kleiner Unterschied

zwischen den beiden angewendeten statistischen Tests. Für HPV 6 zeigt die Berechnung durch den Kruskal-Wallis Test zwischen Gruppe 3 und 2 keinen signifikanten Unterschied. Die exakte Signifikanz liegt hier bei $p = 0,059$ und somit nur gering über der Signifikanzgrenze. In der ANOVA ergibt die Berechnung einen für $p < 0,001$ signifikanten Unterschied.

In der Rangfolge der höchsten T-Zellfrequenzen steht wieder die aktiv immunisierte Gruppe 3 an erster Stelle, gefolgt von Gruppe 2 und Gruppe 1. In Gruppe 3 sind die T-Zellfrequenzen gegen HPV 6 und HPV 11 L1-Antigen mit 0,07% am höchsten, danach folgen in absteigender Reihenfolge die T-Zellfrequenzen gegen die L1-Antigene von HPV 16 und dann HPV 18. In Gruppe 2 werden ebenso wie bei den IL-2 positiven CD4+ Zellen die zweithöchsten Frequenzen nachgewiesen. Mit einem Mittelwert von 0,016% sind die Frequenzen gegen HPV 6 an erster Stelle, danach folgen jeweils mit 0,01% HPV 11 und HPV 18, und die niedrigsten T-Zellfrequenzen werden gegen HPV 16 mit 0,006% gebildet. Auch in Gruppe 1 steht HPV 6 mit einem Mittelwert von 0,1% an höchster Stelle, danach folgen HPV 11, HPV 16 und HPV 18. Mit Hilfe der Varianzanalyse kann auch hier gezeigt werden, dass nur eine geringe Streuung innerhalb jeder Gruppe vorliegt, aber eine große Streuung zwischen den Gruppen herrscht, so dass wir von einem nicht zufälligen Unterschied der Mittelwerte ausgehen und annehmen, dass diese Unterschiede von einem Unterschied in der Grundgesamtheit stammen.

Die CD4+ T-Helferzellen, welche zusätzlich IFN- γ produzieren und spezifisch gegen HPV 18 gerichtet sind, können in Gruppe 1 und 2 nur als gering positiv bezeichnet werden. Anders stellt es sich in Gruppe 3 dar, hier liegen die T-Zellfrequenzen gegen HPV 18 mit 0,033% deutlich im positiven Bereich oberhalb von 0,003% (Wert der Negativkontrolle).

Insgesamt sind die Werte aller CD4+ T-Helferzellen, die zudem IFN- γ produzieren, sehr viel geringer ausgeprägt als die Werte der CD4+ T-Zellen die IL-2 positiv sind.

In der Betrachtung der T-Zellfrequenzen der IFN- γ produzierenden Zellen gegen die HPV 6 E6/E7 Proteine fällt ein für $p < 0,01$ signifikanter Unterschied zwischen Gruppe 1 und 3 und zwischen Gruppe 1 und 2 auf. Die T-Zellfrequenzen gegen HPV 6 E6/E7 sind in der Gruppe der Gesunden höher als in der Gruppe der Geimpften. Dieser Unterschied ist nicht signifikant. Dies entspricht von der Tendenz den Ergebnissen, die bei der Untersuchung der IL-2 produzierenden Zellen gewonnen wurden. Auffällig erscheint, dass die Werte der HPV 6 E6/E7 und der HPV 16/18 E6/E7 reaktiven T-Helferzellen in Gruppe 1 im Bereich der Negativkontrolle liegen. Ebenso liegen die Werte der HPV 16/18 E6/E7 T-Zellen der Gruppen 2 und 3 auf Höhe der

Negativkontrolle. Allerdings liegen die Werte gegen HPV 6 E6/E7 in Gruppe 2 und 3 deutlich höher. Dieser Unterschied wird in Kapitel 5.4 diskutiert.

4.2.4 Nachweis HPV-spezifischer Antikörpertiter abhängig vom Krankheitsstatus

Es erfolgte eine Bestimmung der L1- sowie der E6- und der E7- spezifischen Antikörpertiter der vier untersuchten HPV-Typen in den drei definierten Studiengruppen.

In Gruppe 1 erfolgte die Bestimmung bei insgesamt 18 von 22 Patienten vor HPV-Impfung. Es konnten in insgesamt neun von 22 Fällen HPV-L1-spezifische Antikörper gegen HPV 6, in insgesamt 10 von 22 Fällen L1-spezifische AK gegen HPV 11, in insgesamt acht Fällen L1-spezifische AK gegen HPV 16 und in sechs Fällen L1-spezifische AK gegen HPV 18 nachgewiesen werden. Dabei wurden in insgesamt neun der 22 Fälle AK gegen mehrere HPV-Typen bestimmt. Ebenso konnten in neun Fällen sowohl AK gegen die in den Läsionen nachgewiesenen HPV-Typen detektiert werden, als auch gegen nicht in den Läsionen vorhandene HPV-Typen. In zwei Fällen wurden nur AK gegen HPV-Typen gemessen, die nicht in der Läsion vorhanden waren. In sechs Fällen konnten trotz Nachweis von HPV in der Läsion keine AK-Titer, die die Positivitätsgrenze erreichten, nachgewiesen werden.

In 11 Fällen fand eine Serokonversion statt, ohne dass der entsprechende HPV-Typ in der Läsion nachgewiesen wurde, also handelte es sich um eine Serokonversion ohne Infektion. In neun Fällen fand eine reine Serokonversion statt. Die nachgewiesenen HPV-Typen in der Läsion entsprachen in diesen Fällen den gemessenen AK-Titern. In sieben Fällen kam es trotz nachweisbarem HPV-Typ in der Läsion zu keiner Serokonversion. Das heißt, dass nicht alle sicher erkrankten Probanden auch messbare Antikörper produzierten.

In Gruppe 2 erfolgte die Bestimmung der AK-Titer einmalig bei insgesamt sieben von 10 Patienten, von denen bei 3 Patienten HPV-spezifische AK nachgewiesen werden konnten. Es wurden bei einem der Probanden HPV 6, 11, 16 und 18 L1- spezifische Antikörper nachgewiesen und bei 2 weiteren Probanden Antikörper gegen HPV 11 L1 und HPV 18 L1. In diesen wenigen Fällen kam es also im Verlauf auch ohne nachweisbare Infektion zu einer Serokonversion. Dies wird in Kapitel 5.3 diskutiert.

In Gruppe 3 konnte in allen vier Fällen die Bestimmung der Antikörper im Verlauf der Impfung durchgeführt werden. In allen vier Fällen waren vor Impfung AK-Titer gegen den jeweiligen HPV-Typ und damit eine Serokonversion nachweisbar. Ebenso bildeten diese 4 Probanden auch

AK gegen andere untersuchte HPV-Typen aus. Nach Impfung kam es zu einem Anstieg der AK-Titer gegen alle vier Impfstoff-HPV-Typen und somit zu einer durchgehenden Serokonversion.

HPV 6 E6-spezifische Antikörper wurden bei einem Probanden der Gruppe 2, sowie bei einem der Gruppe 3 nach Impfung nachgewiesen, zudem wurden HPV 11 E7-spezifische AK bei einer weiteren Probandin der Gruppe 3 nach Impfung nachgewiesen.

Die Boxplotdarstellung in Abbildung 8 zeigt, dass die geimpften Probanden im Vergleich höhere Antikörpertiter ausbilden. Diese 4 Probanden bildeten aber schon vor Impfung AK-Titer aus. Es zeigt sich allerdings, dass drei Probanden der Gruppe 1 höhere AK-Titer produzieren als die anderen Probanden, wodurch der Mittelwert in dieser Gruppe nach oben verschoben wird. Fall 1 und Fall 3, die hier als Ausreißer definiert werden, sind außerdem Probanden der Gruppe 3 nach abgeschlossener Impfung. In Fall 1 waren bereits vor Impfung sehr hohe HPV 11 L1-spezifischer AK-Titer und in Fall 3 waren sehr hohe HPV 6 L1- sowie HPV 11 L1- spezifische AK-Titer nachweisbar. Eine genauere Betrachtung erfolgt in Kapitel 4.3.4.

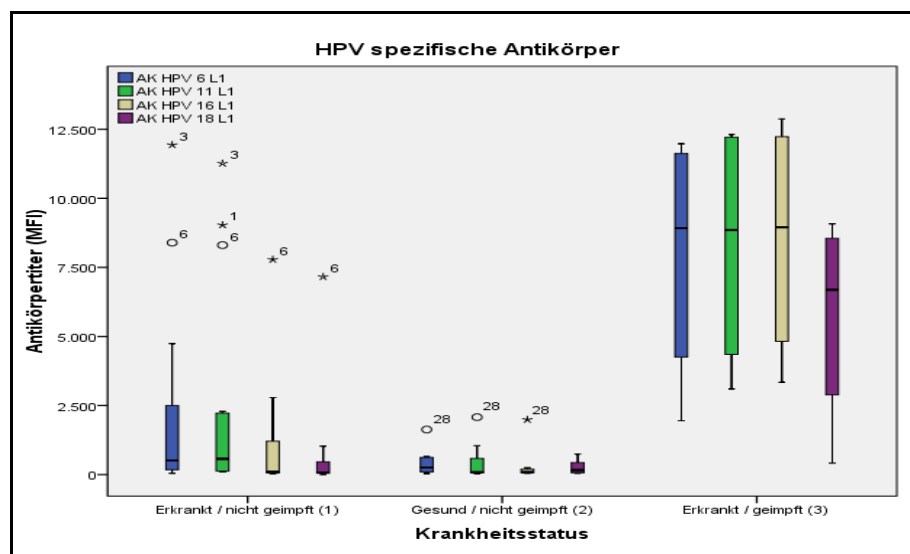


Abbildung 8: Vergleich HPV-spezifischer Antikörper abhängig vom Krankheitsstatus

Dargestellt sind die Titer der HPV 6, 11, 16 und 18 L1-spezifischen Antikörper in median fluorescence intensity (MFI) (x-Achse). Die Y-Achse gibt den Krankheitsstatus der jeweiligen Probandengruppe (1-3) an. Die Einteilung der Gruppen ist dieselbe wie in den bisherigen Darstellungen.

Vergleichbar mit den Ergebnissen der TZ-Messung (vgl. Kapitel 4.2.2 und 4.2.3) zeigen sich in Gruppe 3 nach abgeschlossener Impfung deutlich höhere Werte als in den beiden anderen Gruppen. Daraus folgt die Vermutung, dass die HPV-Impfung auch bei erkrankten Probanden L1-spezifische Antikörper induziert.

Analog zu den in Kapitel 4.2.2 und 4.2.3 beschriebenen T-Zelldaten zeigt Tabelle 5 die Mittelwerte sowie die Standardabweichung der aufgeführten L1- sowie E6- und E7-HPV-Antigen spezifischen Antikörpertiter der drei Studiengruppen.

Tabelle 5: Vergleich HPV-spezifischer Antikörpertiter abhängig vom Krankheitsstatus

	Krankheitsstatus						
	erkrankt / nicht geimpft (1)	Signifikanzen		erkrankt / geimpft (3)	Signifikanzen		gesund / nicht geimpft (2)
	Mittelwert	p-Wert in der ANOVA	exakte Signifikanz: p-Wert nach Kruskal-Wallis	Mittelwert	p-Wert in der ANOVA	exakte Signifikanz: p-Wert nach Kruskal-Wallis	Mittelwert
	Standardabweichung			Standardabweichung			Standardabweichung
AK HPV 6 L1	2115	**	*	7940	**	**	481
	3284			4660			564
AK HPV 11 L1	2206	**	**	8279	**	**	500
	3495			4650			784
*							
AK HPV 16 L1	991	***	**	8529	***	**	379
	1883			4475			713
AK HPV 18 L1	620	***	**	5718	***	*	278
	1657			3867			298
AK HPV 6 E6	15	n.s.	n.s.	47	n.s.	n.s.	14
	16			74			23
AK HPV 11 E6	107	n.s.	n.s.	147	n.s.	n.s.	63
	256			219			98
AK HPV 16 E6	11	n.s.	n.s.	4	n.s.	n.s.	17
	13			7			27
AK HPV 18 E6	26	n.s.	n.s.	16	n.s.	n.s.	48
	42			30			40
AK HPV 6 E7	20	n.s.	n.s.	1	n.s.	n.s.	9
	76			0			14
AK HPV 11 E7	51	n.s.	n.s.	25	n.s.	n.s.	3
	142			47			4
AK HPV 16 E7	89	n.s.	n.s.	90	n.s.	n.s.	9
	191			148			12
AK HPV 18 E7	5	n.s.	n.s.	1	n.s.	n.s.	10
	16			0			16

Gezeigt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichung der HPV 6, 11, 16 und 18 L1 und E6/E7-Antigen-spezifischen Antikörpertiter in MFI. Der p-Wert gibt die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Gruppen an: n.s. nicht signifikant; *, signifikant für $p < 0,05$; **, signifikant für $p < 0,01$; ***, signifikant für $p < 0,001$.

Im Vergleich der L1-spezifischen Antikörper unterscheiden sich alle drei Gruppen deutlich voneinander. Die Werte der gesunden Probanden aus Gruppe 2 sind am niedrigsten. Sie sind alle

unterhalb des Grenzwertes für Positivität. Somit weisen diese Probanden keine messbaren Antikörper gegen HPV auf. Die Probanden, die die Erkrankung zeigen und daher mit einem HPV-Virus in Kontakt waren, bilden HPV-spezifische Antikörper aus, die im Mittel deutlich oberhalb des Referenzbereichs für Positivität liegen. Hier kommt es zu einer Serokonversion. Bei einzelner Betrachtung zeigen nicht alle Probanden erhöhte AK-Titer. Die höchsten L1-spezifischen Antikörpertiter weisen die mit Gardasil® immunisierten Probanden der Gruppe 3 auf. Die Probanden der ersten Gruppe nehmen eine Zwischenstellung ein.

Die Probanden, die eine Impfung erhalten haben, zeigen signifikant höhere HPV-L1-spezifische Antikörpertiter. Mit einem durchschnittlichen Titer von 7940 MFI für HPV 6 L1 und 8972 MFI für HPV 11 L1, stellt sich der Unterschied in der Höhe der Antikörpertiter im Vergleich von Gruppe 3 mit den beiden anderen Studiengruppen für $p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$ als statistisch signifikant dar. Für HPV 16 L1 mit 8529 MFI in Gruppe 3 im Vergleich zu 991 MFI (Gruppe 1) bzw. 379 MFI (Gruppe 2) stellt sich der Unterschied der beiden letztgenannten Gruppen zur geimpften Kontrollgruppe für $p < 0,01$ bzw. $p < 0,001$ als hochsignifikant dar. Das gilt ebenso für HPV 18 L1 mit 5718 MFI in Gruppe 3 im Vergleich zu 620 MFI in Gruppe 1 und 287 MFI in Gruppe 2.

Die HPV E6/7 spezifischen Antikörpertiter erreichen in unseren Messungen nicht die Grenze ab der sie als positiv gewertet werden können. Es ergeben sich hier weder signifikante Unterschiede zwischen den drei Studiengruppen noch kann eine eindeutige Rangfolge gebildet werden. Lediglich die Antikörpertiter gegen HPV 6 E6 sind nach der Impfung gering geboostet (vgl. Tabelle 5). Dieses im Vergleich hohe Ergebnis liegt vor allem an den hohen Werten eines einzelnen Patienten in Gruppe 3, der den Mittelwert der Gruppe anhebt. In den anderen Fällen kommt es durch die Impfung zu keiner Boosterung der AK-Titer. Diese Boosterung bleibt auch bei den gegen HPV 6 E7 gerichteten AK aus.

4.2.5 Sonderbeobachtung: Vergleich der E6/E7 Expression in Abhängigkeit vom Krankheitsstatus

Abbildung 9 zeigt den Vergleich der T-Zellfrequenzen gegen HPV 16/18 E6/E7 (Peptidpool E1, E6/E7 Mix) sowie gegen HPV 6 E6/E7 (Peptidpool E2, E6/E7 Mix) für die drei Studiengruppen. Diese Messungen sollten Informationen über eventuell bereits durchgemachte Infektionen mit High-Risk- bzw. Low-Risk – HPV geben, da die E6 und E7 Proteine nicht in dem eingesetzten prophylaktischen Impfstoff Gardasil® enthalten sind. Dabei ist nicht eindeutig zu unterscheiden, ob die Frequenzen gegen E6 oder E7 gebildet werden, da sie in einem E6/E7 Mix untersucht

wurden. In Gruppe 1 konnten auf Grund von Materialverfügbarkeit für 16 von 22 Patienten Messungen durchgeführt werden, es fehlen die Ausgangswerte der vier Patienten, die im Nachgang geimpft wurden. Für diese Patienten stehen erst Werte ab der ersten Impfung zur Verfügung. In der Gruppe 2 konnte die Messung für sechs von insgesamt 10 Probanden durchgeführt werden. In der Gruppe 3 konnten für drei von vier Probanden Daten als Werte nach der Impfung erhoben werden. In den anderen Fällen stand nicht genügend Material zur Verfügung.

In Abbildung 9 ist deutlich erkennbar, dass sich die T-Zellfrequenzen der Interleukin-2 produzierenden T-Helferzellen gegen HPV 16/18 E6/E7 (Peptidpool E1) in den drei Gruppen nur gering unterscheiden und insgesamt sehr niedrig sind. Sie liegen in Gruppe 1 bei 0,006%, in Gruppe 2 bei 0,008% und in Gruppe 3 bei 0,013%.

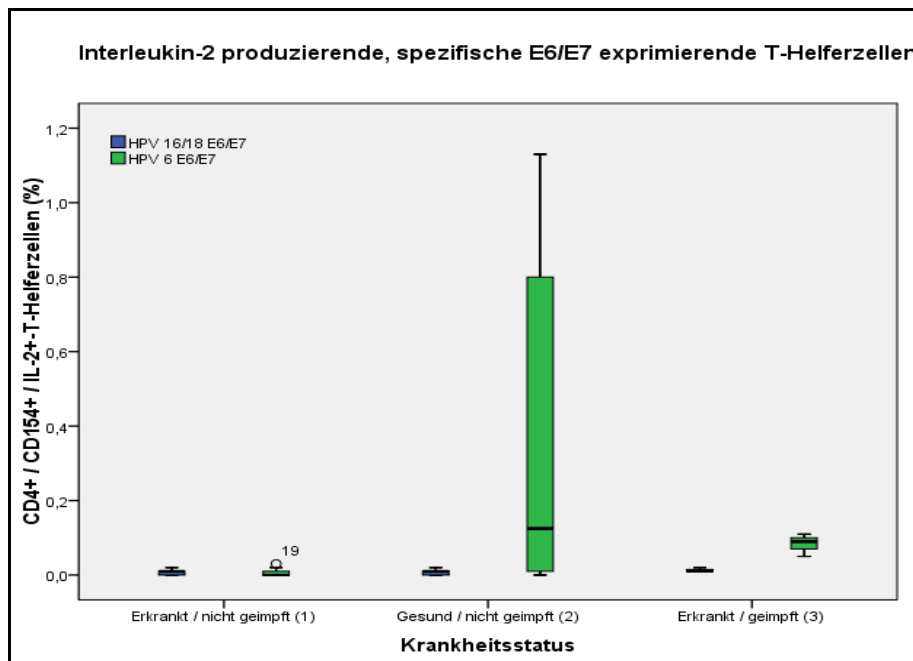


Abbildung 9: Vergleich IL-2 produzierender, spezifischer T-Helferzellen gegen einen Mix aus E6/E7-Protein von HPV 16/18 sowie HPV6 zwischen der Gruppe der erkrankten und gesunden Probanden

Die Whisker-Boxplots stellen den prozentualen Anteil der HPV 16/18 E6/E7 (E1) und der HPV6 E6/E7 (E2) spezifischen IL-2 produzierenden T-Helferzellen an der Gesamtmenge der der CD4+ T-Helferzellen dar (x-Achse). Die Y-Achse gibt den Krankheitsstatus/Impfstatus der jeweiligen Probandengruppe (1-3) an. Die Einteilung der Gruppen entspricht der bisher verwendeten Einteilung.

Für die HPV 6 E6/E7 (Peptidpool 2) spezifischen IL-2 positiven T-Zellfrequenzen lässt sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Gruppen erkennen. Die Frequenzen der erkrankten Probanden (Gruppe 1) liegen im Mittel bei 0,007% bei geringer Varianz. Die Frequenzen der gesunden Probanden (Gruppe 2) liegen dagegen bei 0,365%, allerdings bei großer Varianz mit Werten zwischen Null und 1,1%. Der Median liegt hier bei etwa 0,2%. Die Werte sind für

$p < 0,05$ signifikant höher als in Gruppe 1. Vergleicht man damit die geimpften Probanden (Gruppe 3) nehmen diese mit 0,083% eine Zwischenposition ein. In dieser Gruppe beruht die Messung auf nur drei geimpften Probanden. Die Varianz ist in dieser Gruppe sehr gering. In Gruppe 3 sind die Werte für $p < 0,001$ signifikant höher als in Gruppe 1. Weiterhin liegt der Wert der T-Zellfrequenzen in Gruppe 3 gegen HPV 6 E6/E7 mit 0,08% ca. 10fach über den Werten der Gruppe 1, aber ca. 4,5fach unter denen der gesunden Probanden (Gruppe 2). Die Probanden der gesunden Kontrollgruppe bilden somit die höchsten TZ-Frequenzen aus, danach folgen Probanden aus Gruppe 3 und zuletzt Probanden aus Gruppe 1.

Die Frequenzen der Interferon- γ produzierenden gegen E6/E7 gerichteten T-Helferzellen zeigen ein vergleichbares Verhältnis zwischen den drei Gruppen. Die Interferon- γ spezifischen T-Zellfrequenzen gegen HPV 16/18 E6/E7 sind hier sehr klein. Sie liegen in Gruppe 1 bei 0,002%, in Gruppe 2 bei 0,003% und in Gruppe 3 bei 0,007%. Damit besteht zwischen den drei Gruppen kein signifikanter Unterschied.

Andererseits lässt sich für die HPV 6 E6/E7 spezifischen Interferon- γ positiven T-Zellfrequenzen ein deutlicher Unterschied zwischen den Gruppen erkennen. Die T-Zellfrequenzen gegen HPV 6 E6/E7 sind in diesem Fall mit 0,165% in Gruppe 2 am höchsten, gefolgt von Gruppe 3 mit 0,027%. Dieser Unterschied ist aber nicht signifikant. Ein für $p < 0,001$ signifikanter Unterschied besteht aber zwischen Gruppe 3 und Gruppe 1, welche mit 0,002% an letzter Stelle steht. Zwischen Gruppe 2 und Gruppe 1 stellt sich der Unterschied für $p < 0,01$ als signifikant dar. Der Wert der T-Zellfrequenzen gegen HPV 6 E6/E7 liegt in Gruppe 3 um das ca. 13fache über den Werten der Gruppe 1, aber um das ca. 6fache unter denen der gesunden Probanden (Gruppe 2).

4.3 Longitudinalstudie

4.3.1 Beobachtung von Einzelfällen im Zeitraum der Impfung mit Gardasil®

In diesem Abschnitt der Arbeit wird, wie bereits in Kapitel 3.1 beschrieben, der klinische Verlauf von vier einzelnen Patienten betrachtet, die alle unter einer ausgeprägten Form der Larynxpapillomatose leiden. Diese Patienten ließen sich impfen und wurden bereits in der Querschnittsstudie als Vergleichsgruppe 3 mit in die Auswertungen einbezogen. In diesem Abschnitt werden die einzelnen Verläufe genauer betrachtet und die individuelle Reaktion auf die Impfung untersucht. Bei den Probanden handelt es sich um zwei Kinder, die bei Beginn der Untersuchung 5 und 9 Jahre alt waren, sowie um zwei erwachsene Patienten die bei Beginn der Untersuchung 33 und 61 Jahre alt waren. In drei von diesen vier Fällen handelt es sich um das

Bild einer juvenilen LP, im vierten um das der adulten Form. In allen vier Fällen wurde auf Grund der Schwere der Symptomatik und des bisher ausbleibenden Erfolges verschiedener Therapieoptionen eine Immunisierung mit der HPV-Vakzine Gardasil® in Absprache mit dem Patienten, bzw. bei Minderjährigkeit in Absprache mit den Erziehungsberechtigten, beschlossen. Verabreicht wurde der Impfstoff bei den Kindern jeweils zum Zeitpunkt einer Operation. Aus diesem Grund konnte der von Sanofi Pasteur MSD vorgeschriebene Abstand von zwei und sechs Monaten zwischen den Impfungen nicht exakt eingehalten werden. Bei den beiden erwachsenen Patienten hingegen erfolgte die Impfung in den vorgegebenen Abständen. In allen Fällen wurde die volle Immunisierung durchgeführt und gut vertragen. In einem Fall erfolgte außerdem eine vierte Impfung.

Als Endzeitpunkt der Beobachtung wurde der 31. Dezember 2012 festgesetzt.

Zur Kontrolle des Verlaufs im Zusammenhang mit der Impfung wurden jeweils vier Punkte herangezogen, um die Veränderung der Klinik und die Immunantwort auf den Impfstoff zu beschreiben. Hierbei handelt es sich um: Veränderung der OP-Intervalle, Bewertung und Verlauf des Derkey Scores, Verlauf der Antikörperantwort und Verlauf der T-Zellantwort.

Es folgt zunächst eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse und dann die einzelne Beschreibung aller 4 Fälle.

4.3.2 Bestimmung der individuellen T-Zellfrequenzen

Die Bestimmung der T-Zellfrequenzen mittels ex-vivo-assay erfolgte aus peripher venösem Blut (siehe Kapitel: 3.2.1 Materialgewinnung). Zum Erhalt eines Ausgangswertes wurde jedem Patienten vor der ersten Impfung eine Blutprobe entnommen. Anschließend erfolgte, um den Verlauf der T-Zellantworten genau charakterisieren zu können, bei jedem Patienten zum Zeitpunkt der operativen Eingriffe eine erneute Blutentnahme. Bei den Erwachsenen wurde zusätzlich vier bis sechs Wochen nach jeder Impfung unabhängig von den Operationsterminen Blut zur Kontrolle entnommen. Da laut Ethikvotum EA4/035/08 bei den Kindern nur im Rahmen einer medizinisch indizierten Blutentnahme zusätzlich Blut abgenommen werden durfte und die Impfungen nur während der OP durchgeführt wurden, war es nicht möglich, die Zeitabstände bei allen vier Probanden identisch zu bestimmen. Außerdem ist das Studienkollektiv dieser Gruppe mit vier Patienten sehr klein, so dass hier jeder Patient als eigener Fall betrachtet werden soll.

Die individuellen Verläufe der T-Zellantworten gegen die unterschiedlichen HPV-Typen im Impfverlauf werden für jeden Patienten separat beschrieben. Dabei ist zu beachten, dass es sich bei den einzelnen Messungen jeweils um Einzelassays handelt, so dass Schwankungen bzw. Abweichungen von der generellen Tendenz zu erwarten sind. Untersucht wird die allgemeine Tendenz der T-Zellfrequenzen im Verlauf. In den jeweiligen Grafiken der einzelnen Fallbeschreibungen erfolgt die Darstellung der T-Zellantworten gegen die unterschiedlichen HPV-Typen im gesamten Beobachtungszeitraum. Gezeigt werden sowohl die IL-2 exprimierenden T-Helferzellen als auch die IFN- γ positiven T-Helferzellen.

Abbildung 10 zeigt als Zusammenfassung den Vergleich der IL-2+ T-Helferzellantwort der vier in diesem Abschnitt der Studie betrachteten Fälle vor und nach der Impfung mit Gardasil®.

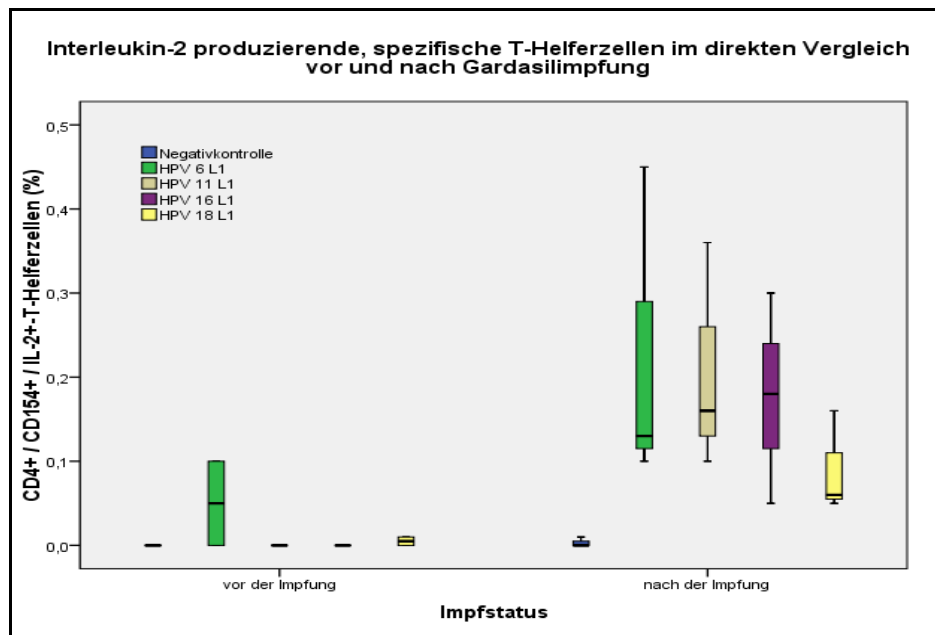


Abbildung 10: Darstellung der prozentualen Anteile der HPV 6, 11, 16 und 18 L1 spezifischen IL2 produzierenden T-Helferzellen an der Gesamtmenge der CD4+ T-Helferzellen im direkten Vergleich

Gezeigt wird das Gesamtbild der in der Longitudinalstudie dargestellten Fälle vor und nach Impfung. Die Gruppe nach der Impfung entspricht der Gruppe 3 der Querschnittsstudie. Die gleichen Probanden sind hier als Vergleichsgruppe vor der Impfung dargestellt.

Vor der Impfung sind nur gegen HPV 6 spezifische T-Zellen nachweisbar. Dieser HPV-Typ entspricht in zwei von 4 Fällen dem HPV-Typ der Dysplasien. Es sind keine spezifischen T-Zellen gegen HPV 11 vor der Impfung darstellbar, obwohl in den Läsionen aller vier Fälle HPV 11 nachweisbar war. Die Patienten waren also nicht in der Lage vor Impfung TZ gegen HPV 11 zu bilden. Nach der vollständigen Impfung hingegen sind die L1-spezifischen T-Zellen gegen alle vier dargestellten HPV-Typen stark angestiegen und in hohem Maße nachweisbar. Zur Kontrolle ist als blauer Balken die Negativkontrolle mit dargestellt, welche sich nach Impfung

im Vergleich zu vor der Impfung nicht verändert. Auf Grund der unterschiedlichen Abnahmezeitpunkte zwischen den Impfungen können keine für die Gruppe als Ganzes keine Zwischenwerte nachvollzogen werden.

Die Ausprägung der IFN- γ + T-Helferzellantwort verläuft qualitativ analog zu der oben dargestellten IL-2+ T-Helferzellantwort, quantitativ aber auf einem sehr viel niedrigeren Niveau.

4.3.3 Bestimmung der AK-Titer

Analog zu den Messungen im Rahmen der Querschnittsstudie erfolgte auch in diesem Abschnitt der Arbeit parallel zu den T-Zellmessungen eine Bestimmung der HPV-Antigen-spezifischen AK-Titer im Impfverlauf. Die Bestimmung der AK-Titer erfolgte nach der selben Methode wie in Kapitel 3.3 beschriebenen wurde.

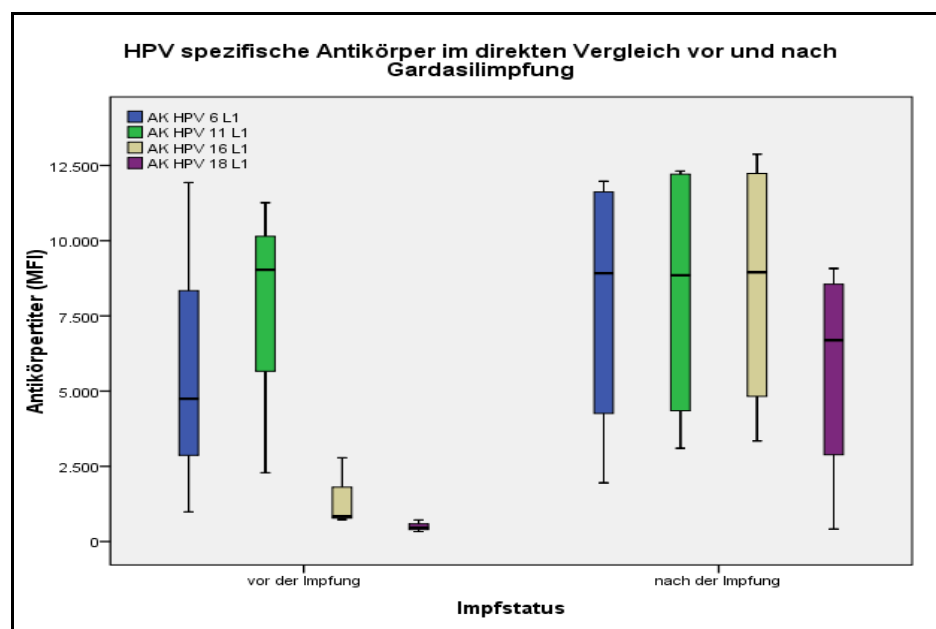


Abbildung 11: Direkter Vergleich HPV-spezifischer Antikörpertiter gegen HPV6, 11, 16 und 18 L1 in den betrachteten Fällen vor und nach ihrer Impfung mit Gardasil®

In dieser Abbildung sind die Titer der HPV 6, 11, 16 und 18 L1-spezifischen Antikörper in median fluorescence intensity (MFI) dargestellt und anhand ihres Impfstatus eingeteilt. Dargestellt ist das Gesamtbild der in der Longitudinalstudie dargestellten Fälle vor und nach Impfung. Die Einteilung der Gruppen entspricht der in Abbildung 10.

In Abbildung 11 wird deutlich, dass anders als im Vergleich zu den T-Zell-daten, schon vor der Impfung AK-Titer gegen HPV 6, 11 und 16 nachgewiesen werden können, dies ist bei 3 von 4 Probanden der Fall. Es zeigt sich hier kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den vier HPV-Typen. In dieser Gruppe sind alle Probanden HPV 11 positiv, einer davon zusätzlich HPV 6 positiv und einer zusätzlich HPV 6 und 16 positiv. HPV 18 L1-spezifische AK-Titer konnten ebenfalls bei diesen drei Probanden, allerdings in sehr geringem Maß, vor der Impfung

nachgewiesen werden. Bei der vierten Probandin gab es zu diesem Zeitpunkt keine Messung. Nach vollständiger HPV-Impfung finden sich HPV 6 und 11 spezifische Antikörpertiter in einem relativ gleichen Messbereich wieder, gefolgt von HPV 16 und 18. Es kommt also bei den erkrankten Probanden zu einem geringen Boost der bestehenden L1- spezifischen AK-Titer gegen die Low-Risk Typen HPV 6 und 11 und zu einer hohen Induktion der AK-Titer gegen die High-Risk Typen HPV 16 und 18.

4.3.4 Fallbeschreibung 1

Der heute 36-jährige Patient erhielt im Säuglingsalter die Erstdiagnose einer juvenilen Larynxpapillomatose. Immunhistologisch konnte zu dem damaligen Zeitpunkt eine Infektion mit den HPV-Typen 6 und 11 nachgewiesen werden. Die Ausbreitung der Papillome beschränkte sich zunächst auf die vordere Kommissur der Stimmlippen, die Stimmlippenabhänge, die zervikale Trachea und den subglottischen Bereich. Im Verlauf der Erkrankung entwickelte der Patient zusätzlich zu diesen laryngealen Papillomen bronchopulmonale Papillome. Die Krankheit zeigte mit dieser extralaryngealen Manifestation der juvenilen Papillomatose einen besonders aggressiven Verlauf. Der Patient musste sich häufig operativen Eingriffen unterziehen. Die Intervalle zwischen den Eingriffen beliefen sich auf 3-4 Monate. Die OP-Indikation wurde bei Zunahme der Atembeschwerden mit Luftnot und einer Verschlechterung der Stimmqualität gestellt. Die chirurgischen Eingriffe erfolgten mit dem CO₂-Laser in totaler Anästhesie mit Jet-Ventilation. Eine Behandlung mit Cidofovir erbrachte zunächst einen Rückgang der Beschwerden, welche aber nach Absetzen des Medikamentes wieder zunahmen. Im Jahr 2007 wurde bei dem damals 32-jährigen Patienten bei einer Computertomographie des Thorax, die aufgrund von anhaltendem Husten veranlasst wurde, eine tumorsuspekte Raumforderung pulmonal rechts beschrieben. In weiteren Untersuchungen wurde hier 02/2008 ein nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom des rechten Lungenoberlappens diagnostiziert. Im Zuge der Behandlung des Bronchialkarzinoms erhielt der Patient eine Chemotherapie mit einer Kombination aus Cisplatin und Gemcitabine. Aufgrund der Befundprogredienz wurde diese Therapie auf eine Kombination aus Cetuximab und Paclitaxel umgestellt, es zeigte sich jedoch kein eindeutiger Rückgang des Befundes. Im Jahr 2010 wurde bei dem Patienten die Immunisierung mit dem HPV-Impfstoff Gardasil® ausführlich diskutiert und beschlossen. Die erste Gabe erfolgte im Januar 2010. Die zweite Impfdosis erhielt der Patient genau zwei Monate später, die dritte Dosis weitere 6 Monate nach der zweiten Dosis. Alle Impfungen wurden vom Patienten gut vertragen, es traten keine Nebenwirkungen auf. Nach der ursprünglichen Chemotherapie, welche zur Behandlung des Bronchialkarzinoms eingesetzt wurde, und der

anschließenden kompletten Immunisierung mit Gardasil® stellte sich bei dem Patienten eine geringe Verlängerung der operationsfreien Intervalle von anfänglichen 3-4 Monaten auf nun 5 Monate ein. Anfang des Jahres 2012 entschlossen wir uns daher gemeinsam mit dem Patienten und den behandelnden HNO-Ärzten zu einer weiteren Gabe einer Impfdosis im Sinne einer Boosterung.

Zum heutigen Zeitpunkt zeigt sich der klinische Befund des Patienten regredient und stabil. Die Größe und die Ausbreitung der papillomatösen Strukturen sind im Vergleich zum Beginn der Behandlung stark zurückgegangen. Subjektiv beschreibt der Patient heute eine insgesamt leicht verbesserte Stimmqualität und deutlich weniger Luftnot.

Bei diesem Patienten wurden bisher auf Grund der Larynxpapillomatose 42 operative Eingriffe vorgenommen. Diese Eingriffe erfolgen zum Ende des Beobachtungszeitraumes jeweils geplant im Abstand von etwa 6 Monaten.

4.3.4.1 Individuelle T-Zellantworten im Impfverlauf in Fall 1

Zur Bestimmung der T-Zellfrequenzen wurden bei diesem Patienten insgesamt acht Messreihen durchgeführt. Vor Gabe der ersten Impfdosis erfolgten zwei Messungen. Beide können als Nullwerte bzw. Ausgangswerte angesehen werden. Das Ergebnis der Probe nach der ersten Impfung ist auf Grund eines technischen Problems verloren gegangen. Die weiteren Messungen fanden sechs Monate nach der zweiten und zwei Monate nach der dritten Impfung statt. Die vierte Impfdosis wurde ein Jahr nach Verabreichung der dritten Dosis gegeben. In der Zwischenzeit fand keine weitere Kontrolle statt. Zum Zeitpunkt der vierten Impfung wurde erneut Blut abgenommen. Dieser Wert gilt als Kontrollwert zur Beschreibung der T-Zellfrequenzen ein Jahr nach vollständiger Immunisierung. Die Gabe der vierten Dosis wurde 2 Monate später kontrolliert. Von den insgesamt acht Messreihen konnte eine Messung nicht in die statistischen Auswertungen mit einbezogen werden. Hier lag die Positivkontrolle unter dem als positiv zu wertenden Bereich. Es konnte später festgestellt werden, dass in diesem Fall die verwendeten Antikörper defekt waren.

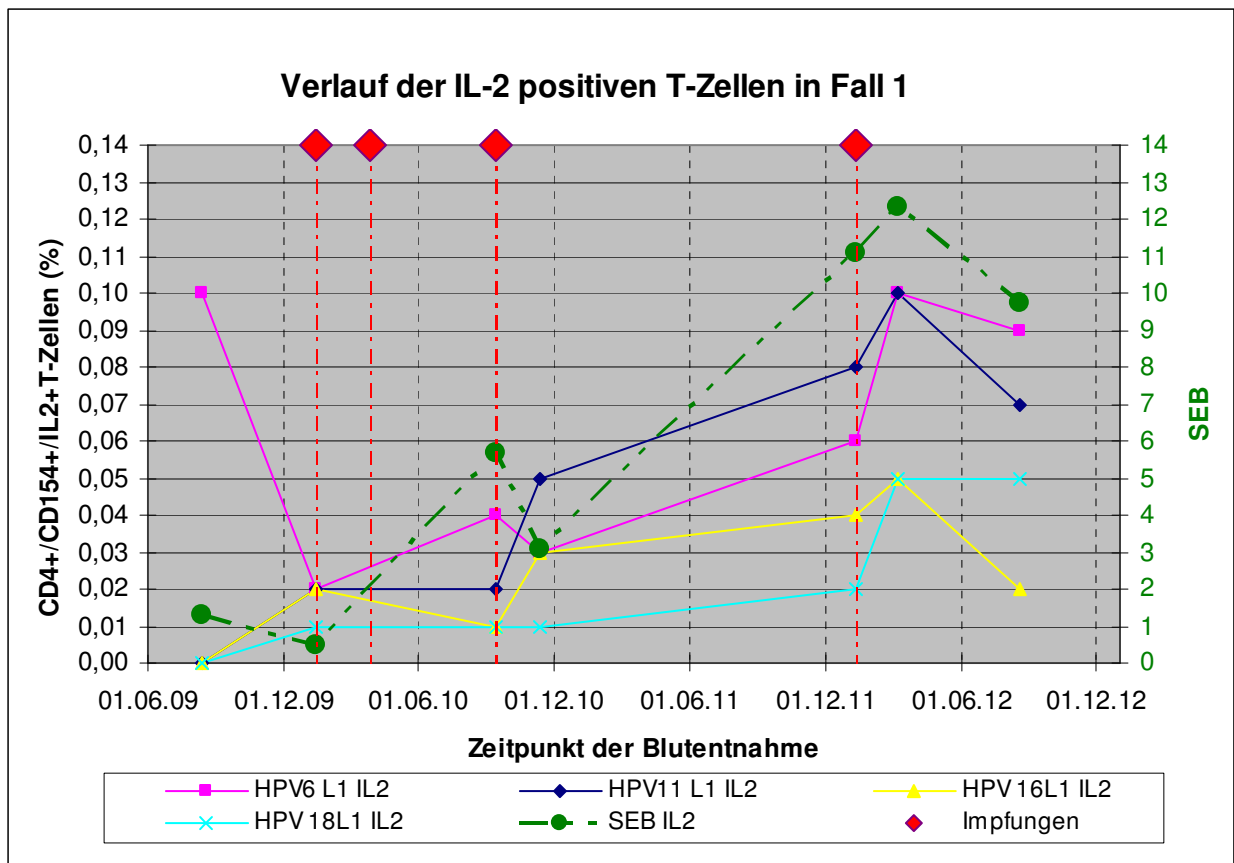


Abbildung 12: Verlauf der IL-2 positiven T-Zellen in Fall 1

Gezeigt wird der prozentuale Anteil der IL-2 produzierenden, spezifischen T-Helferzellen gegen HPV 6, 11, 16 und 18 sowie der Verlauf IL-2 produzierender Zellen gegen SEB an der Gesamtmenge der CD4+ T-Zellen in Fall 1 über den Zeitraum der Impfung mit Gardasil®.

Aus Abbildung 12 und Abbildung 13 wird ersichtlich, dass die T-Zellfrequenzen gegen die untersuchten HPV-Typen insgesamt über den gesamten Zeitraum der Impfung ansteigen. In diesem Fall sind die Werte von IFN- γ produzierenden Zellen mit denen der Interleukin-2 produzierenden Zellen vergleichbar, mit dem Unterschied, dass der prozentuale Anteil der IL-2 produzierenden Zellen insgesamt auf einem höheren Niveau zu finden ist. Die höchsten Frequenzen werden gegen HPV 6 gebildet. Diese Frequenzen liegen vor der Impfung bei 0,1% und fallen im Verlauf der Impfung deutlich auf 0,03% ab. Nach der vierten Impfung steigt die Frequenz wieder auf etwa den Ausgangswert an. Die Frequenzen gegen die HPV-Typen 11, 16 und 18 liegen vor der Impfung zwischen 0 und 0,02% und steigen alle im Verlauf deutlich an. Den höchsten Wert erreichen alle TZ-Frequenzen nach der vierten Impfung. Hier liegen die Werte gegen HPV 16 und 18 bei 0,05% und die gegen HPV 6 und 11 bei 0,1%.

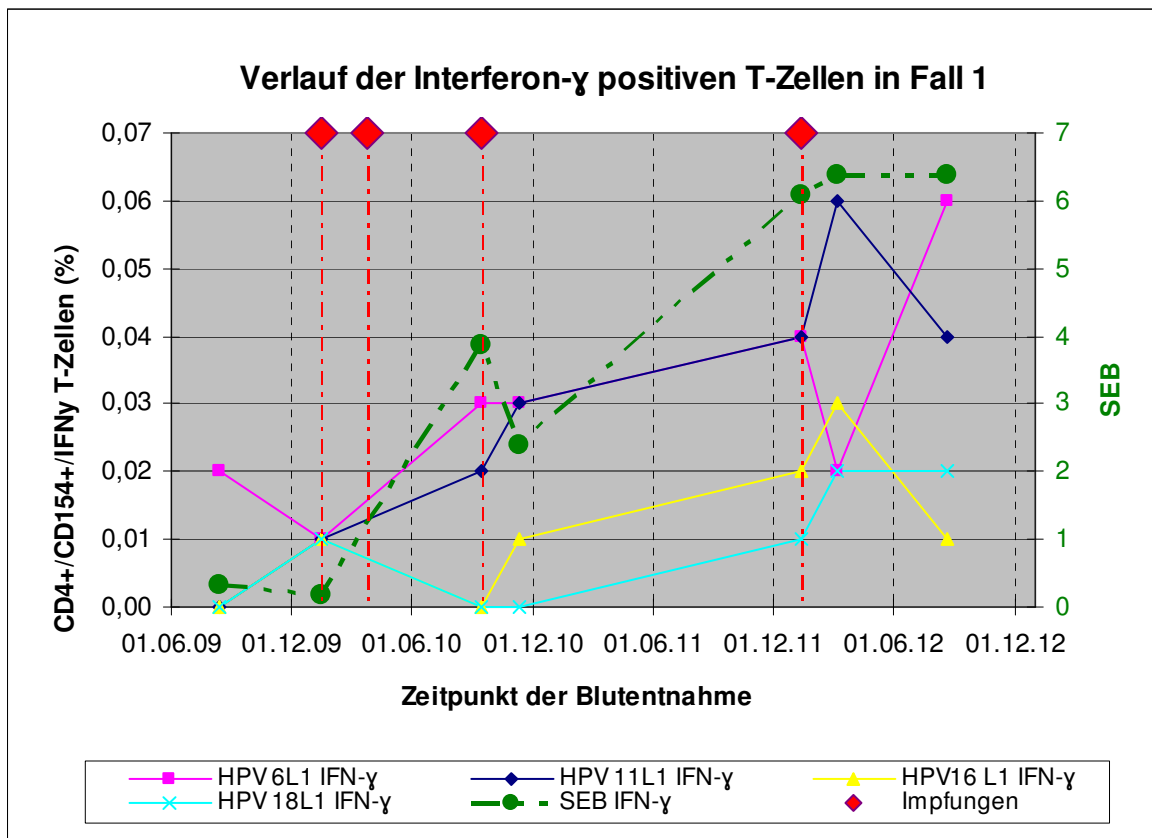


Abbildung 13: Verlauf der IFN- γ – positiven T-Zellfrequenzen in Fall 1

Gezeigt wird der prozentuale Anteil der IFN- γ produzierenden, spezifischen T-Helferzellen gegen HPV 6, 11, 16 und 18 sowie der Verlauf IFN- γ produzierender Zellen gegen SEB gemessen an der Gesamtmenge der CD4+ T-Zellen in Fall 1 im Zeitraum der Impfung mit Gardasil®.

Die Frequenzen der IFN- γ produzierenden T-Zellen gegen HPV 6 enden auf demselben Niveau, auf dem sie vor der Impfung begonnen haben. Zwischendurch ist bei den IFN- γ -positiven Zellen ein Anstieg um den Faktor 2 zu verzeichnen. Am Ende fallen die T-Zellfrequenzen aber auf das Ausgangsniveau zurück. Die Frequenzen für HPV 11 IFN- γ + Zellen steigen kontinuierlich bis zum Schluss auf ein Niveau an, das um den Faktor 6 höher liegt als der Ausgangswert. Im Verlauf der Frequenzen gegen HPV 16 steigen diese zunächst an und fallen nach Gabe der ersten sowie nach Gabe der zweiten Dosis noch mal ab, um nach der dritten Impfung dann kontinuierlich anzusteigen. Hier ist insgesamt ein Anstieg um den Faktor 3 zu sehen. Für HPV 18 ist der Verlauf der T-Zellfrequenzen mit dem von HPV 16 vergleichbar, diese steigen aber nur um den Faktor 2 an.

Der Verlauf verhält sich parallel zum Verlauf der IL-2 positiven Zellen.

Die T-Zellfrequenzen gegen SEB steigen sowohl bei den IL-2 als auch bei den IFN- γ produzierenden Zellen vergleichbar an.

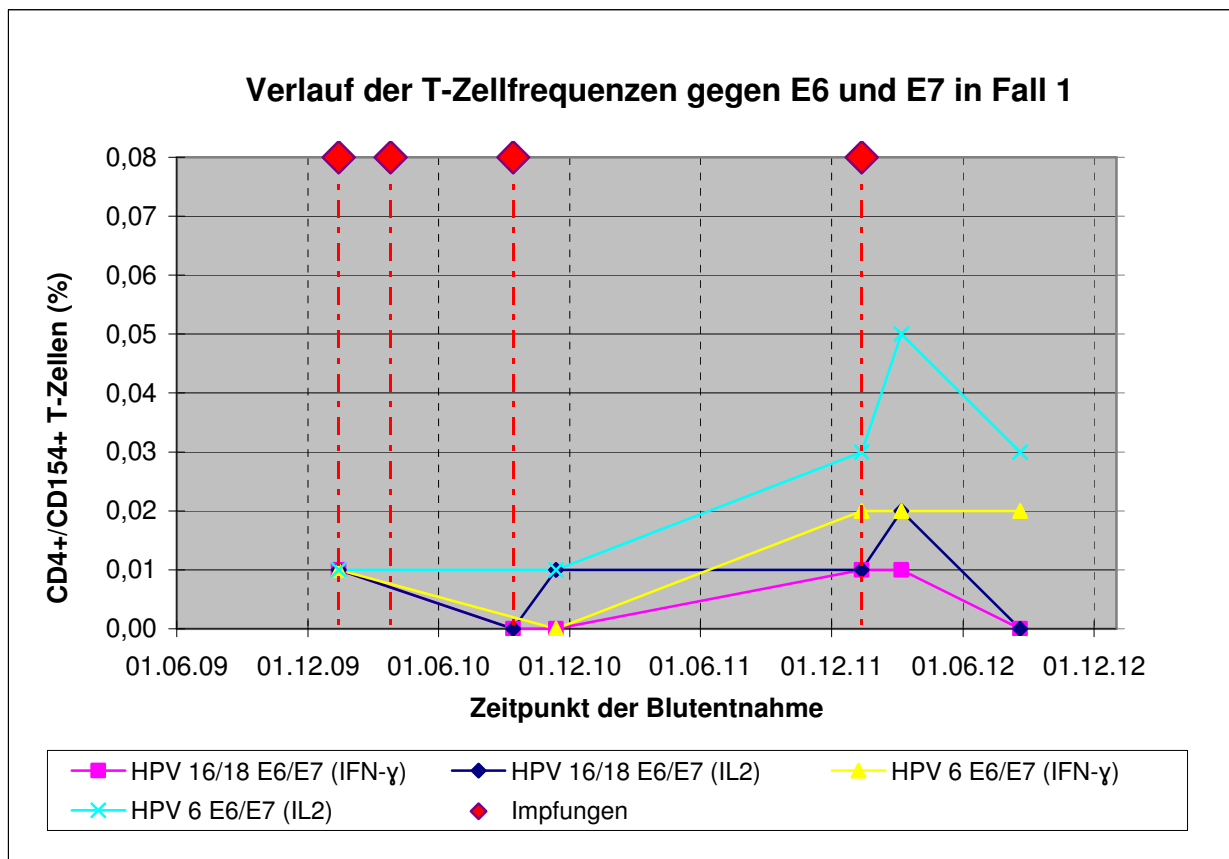


Abbildung 14: Verlauf der T-Zellfrequenzen gegen HPV6 E6/E7 und HPV16/18 E6/E7 in Fall 1

Gezeigt wird der prozentuale Anteil der T-Zellfrequenzen gegen HPV 6 E6/E7 und HPV 16/18 E6/E7 an der Gesamtmenge der CD4+ T-Zellen in Fall 1 über den Zeitraum der Impfung mit Gardasil®.

In Abbildung 14 sind die Ergebnisse der T-Zellfrequenzen gegen die HPV 6 und HPV 16/18 E6 und E7 Proteine dargestellt. Im Verlauf fällt auf, dass die Frequenz der CD4+ T-Zellen gegen E6 und E7 ansteigt. Der Anteil der IL-2 sowie IFN- γ produzierenden Zellen gegen HPV 6 E6/E7 sowie HPV 16/18 E6/E7 gemessen an der Gesamtmenge der CD4+Zellen liegt vor der Impfung bei 0,01%. Nach der letzten Impfung steigt der Anteil der IL-2-positiven Zellen gegen HPV 16/18 E6/E7 auf 0,02% an und fällt bis zur Kontrolle 6 Monate nach der letzten Impfung wieder auf 0,01% ab. Der Anteil der IFN- γ positiven Zellen schwankt ebenfalls im Verlauf und liegt nach der Impfung wieder bei 0,01%. Der Anteil der IL-2+ Zellen gegen HPV 6 E6/E7 liegt nach der Impfung bei 0,05% und fällt bis zur Kontrolle auf 0,03% ab. Der Anteil der IFN- γ produzierenden Zellen gegen HPV 6 E6/E7 liegt nach der Impfung bei 0,02%. Es kommt im Verlauf zu einem Anstieg der CD4+ T-Gedächtniszellen, welche vor allem gegen die HPV 6 E6 und E7 Proteine gerichtet sind. Da E6/E7 nicht im Impfstoff enthalten sind, muss es sich um eine indirekte Stimulation der Immunantwort gegen diese Antigene handeln, die auch einen „therapeutischen“ Effekt erklären könnte.

4.3.4.2 Spezifische Antikörpertiter im Impfverlauf in Fall 1

Bei sieben der insgesamt acht Blutentnahmen wurde Serum zur Bestimmung der Antikörpertiter untersucht. Die Ausgangswerte wurden unmittelbar vor der ersten Impfung, weitere folgende Werte analog zu den T-Zelldaten bestimmt. Sie werden in Abbildung 15 dargestellt.

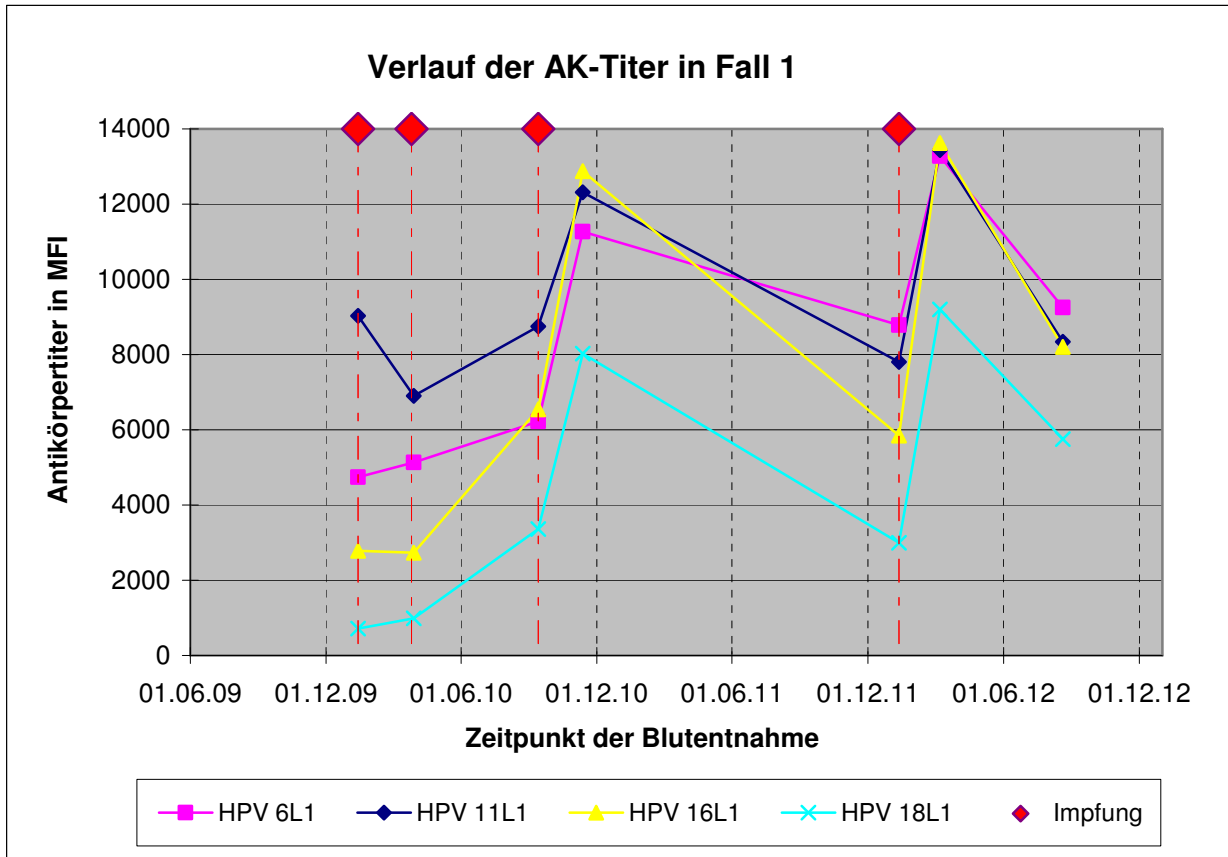


Abbildung 15: Verlauf der HPV-L1-spezifischen Antikörpertiter gegen die Antigene von HPV6, 11, 16 und 18 über den Zeitraum der Impfung in Fall 1

Gezeigt werden die HPV 6, 11, 16 und 18 spezifischen Antikörpertiter in median fluorescence intensity (MFI) über den zeitlichen Verlauf der Gardasil®-Impfungen. Die roten Rechtecke markieren die Impfzeitpunkte, die farbigen Linien zeigen jeweils den Verlauf der Antikörpertiter gegen einen der vier HPV-Typen.

Die Werte lagen mit Antikörpertitern von 4744 MFI für HPV 6, 9033 MFI für HPV 11, 2786 für HPV 16 und 717 für HPV 18 bereits vor der ersten Impfung oberhalb der Positivitätsgrenze. Nach Erhalt der ersten sowie der zweiten Dosis kommt es jeweils zu einem Anstieg der Antikörpertiter. Nach Erhalt der dritten Dosis kommt es zu einem starken Anstieg der AK-Antwort, der fast zu einer Verdopplung des Wertes führt. Während der nächsten 1,5 Jahre fallen die Titer wieder stark ab, in etwa auf das Niveau vor der zweiten Impfung.

Nach Gabe der vierten Dosis des Impfstoffes steigen die Titer auf das höchste gemessene Niveau an, es liegt für HPV 6 mit 13278 MFI ca. dreifach höher als der Ausgangswert, für HPV 11 mit

13442 MFI ca. 1,5fach höher, für HPV 16 mit 13622 MFI ca. fünffach höher und für HPV 18 mit 9199 MFI ca. 13fach höher als das Ausgangsniveau. Bis zur letzten Messung, 7,5 Monate nach Gabe der vierten Impfdosis, fallen die Titer erneut um etwa 4000 MFI ab. Das entspricht einem Abfall um 30,12% für HPV 6, um 29,75% für HPV 11, um 29,36% für HPV 16 und um 43,48% für HPV 18. Diese Werte liegen auf der Höhe der Titer zwischen Impfung drei und vier. Das wiederum heißt, dass diese letzten gemessenen Werte nach der vierten Impfung für HPV 6 um das 2,8 fache, für HPV 11 um das 1,5 fache, für HPV16 um das 4,9 fache und für HPV 18 um das 12,8 fache höher als die Ausgangswerte vor Impfung sind. Ob und in wieweit sich im weiteren Verlauf die Titer änderten kann an dieser Stelle nicht beurteilt werden.

4.3.4.3 Klinische Entwicklung in Fall 1

Zur Beschreibung des klinischen Verlaufs der Erkrankung während des Impfzeitraumes wurde der Derkay Score herangezogen. Insgesamt hat im Verlauf der Impfung eine deutliche Reduktion der gesamten Punktwerte im Score stattgefunden (Abbildung 16).

Die operativen Eingriffe erfolgten in den meisten Fällen ungeplant aufgrund der Dringlichkeit.

Vor den Eingriffen gab der Patient zum Teil starke Luftnot an, klagte über massive Heiserkeit und wies einen inspiratorischen Stridor auf. Er hatte zu dieser Zeit einen funktionellen Derkay Score von sechs von 11 möglichen Punkten und somit eine hohe Einschränkung der Funktionalität. Im Verlauf der Behandlung kam es zu einer deutlichen Besserung der klinischen Symptomatik, was sowohl an Hand des Derkay Scores, der am Ende nur noch zwei Punkte aufwies, als auch durch die Aussage des Patienten bestätigt wurde. Die anatomische Ausbreitung der Papillome war im Verlauf der Impfung ebenfalls stark zurückgegangen. Zu Beginn waren von den zum Teil großen papillomatösen Wucherungen beide Stimmlippen, die vordere und die hintere Kommissur, der subglottische Bereich bis in die Trachea reichend, sowie auch ein Abschnitt der rechten Bronchien betroffen. Der Derkay Score für die anatomische Ausbreitung belief sich anfänglich auf einen Wert von 36 Punkten und fiel während der Therapie mit Gardasil[®] ab, am Ende der Behandlung lag der Wert bei 4 Punkten. Der gesamte Punktwert beider Bereiche veränderte sich von anfänglichen 37 Punkten auf letztendlich sechs Punkte, das entspricht einer Besserung von 83,79%.

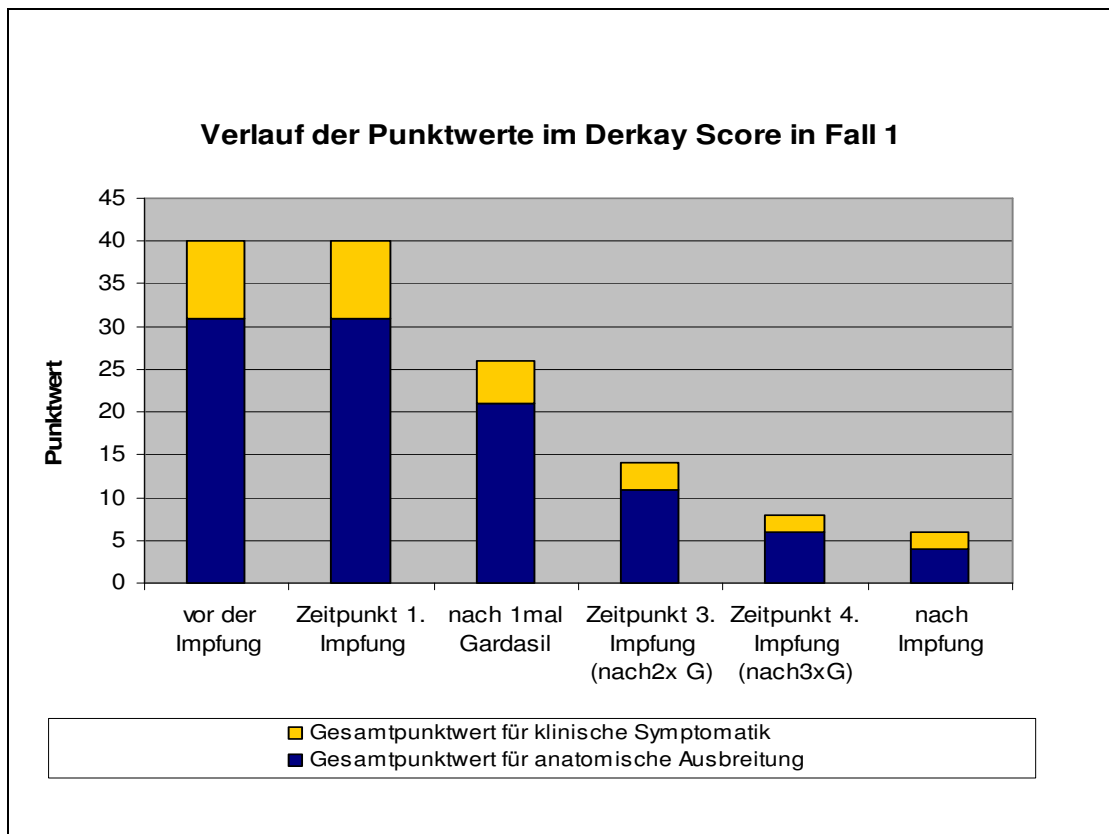


Abbildung 16: Verlauf des Punktwertes im Derkay Score im Zeitraum der Impfung in Fall 1

Dargestellt wird der klinische Verlauf des Patienten im gesamten Zeitraum der Impfung mittels Derkay Score. Der blaue Bereich stellt die Höhe des Punktwertes dar, der die anatomische Ausbreitung der Erkrankung beschreibt. Der gelbe Bereich beschreibt das Ausmaß der funktionellen Beeinträchtigung. Je größer der Bereich ist, desto größer ist die Einschränkung. Zusammen ergibt sich der Gesamtwert des Scores.

Zwischen der ersten Untersuchung und der ersten Impfung lagen fünf Monate. In dieser Zeit blieb eine Besserung aus. Die zweite Untersuchung fand parallel zur ersten Impfung, die dritte Untersuchung 2,5 Monate nach der ersten Impfung statt. In der dritten Untersuchung zeigte sich ein Rückgang der Punktzahl von 40 auf insgesamt 26 Punkte. Weitere fünf Monate später hatte sich der Wert erneut halbiert. Der Abstand zur nächsten Untersuchung betrug 16 Monate. Die letzte Kontrolle fand 2 Monate nach der vierten Impfung statt.

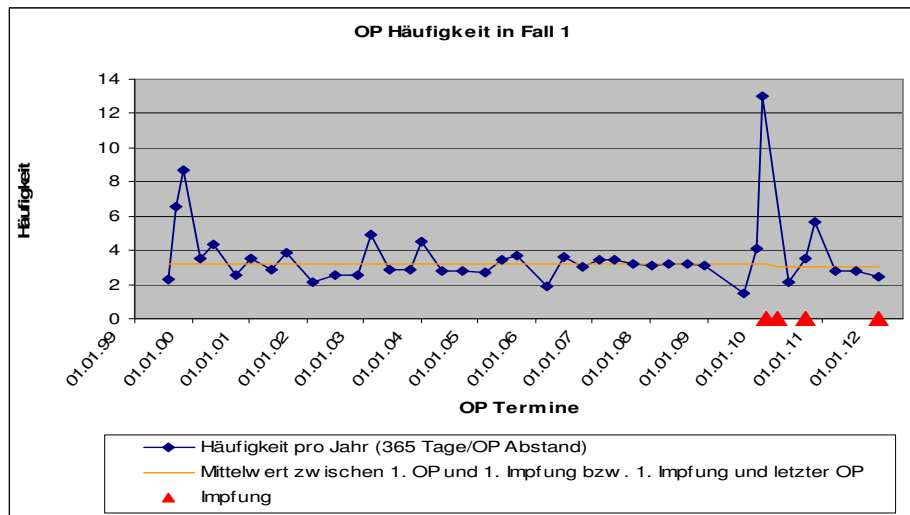


Abbildung 17: Häufigkeiten der Operationen pro Jahr seit Diagnosestellung in Fall 1

Die blaue Linie gibt die Häufigkeit der Operationen pro Jahr an. Die orange Linie gibt den Mittelwert über die Jahre an. Die roten Pfeile markieren die jeweiligen Impfzeitpunkte. Die Linie, welche den Mittelwert beschreibt, sinkt nach Beginn der Impfung ab.

Zu Beginn der Behandlung waren pro Jahr drei bis fünf Operationen notwendig. Der Verlauf ist in Abbildung 17 graphisch dargestellt. Zum Ende der Beobachtungsreihe ist eine chirurgische Therapie nur noch halbjährlich erforderlich.

4.3.5 Fallbeschreibung 2

Im Alter von 15 Monaten zeigte sich bei der heute 12-jährigen Patientin das erste Mal eine anhaltende Heiserkeit und ein gelegentlicher Stridor beim Schreien. Laryngoskopisch konnten zu diesem Zeitpunkt papillomatöse Strukturen im Bereich der rechten hinteren Stimmlippe nachgewiesen werden, welche nachfolgend in Narkose laserchirurgisch abgetragen wurden. Histopathologisch wurde in dem abgetragenen Gewebe eine Infektion mit HPV 11 nachgewiesen. Es wurde eine juvenile Larynxpapillomatose diagnostiziert. Die zweite Operation erfolgte aufgrund neuer Papillomwucherungen 8 Monate später. Im Verlauf der Erkrankung verkürzten sich die operationsfreien Intervalle auf 3 und anschließend auf 2 Monate. Im Alter von 3 Jahren waren die Eingriffe alle 3 bis 4 Wochen notwendig. Im Jahr 2004 kam es bei der zu diesem Zeitpunkt vier Jahre alten Patientin zu einem akuten Ereignis mit Luftnot, wonach sie 24 Stunden ins künstliche Koma versetzt wurde. Im selben Jahr wurde bei ihr der Therapieversuch mit der intraoperativen Injektion von Cidofovir (Vistide®) in die Schleimhaut begonnen, der allerdings zu keiner wesentlichen Verbesserung des laryngealen Befundes führte. Die Häufigkeit der notwendigen chirurgischen Interventionen blieb ebenfalls gleich. Im Alter von 7 Jahren konnte bei dem Mädchen das erste Mal ein größerer Abstand von 8 Wochen zwischen zwei Operationen gemessen werden. Im Juni 2009 wurde mit den Eltern der Patientin der individuelle

Therapieversuch mit Gardasil® besprochen und beschlossen. Sie erhielt vier Monate nach Gabe der ersten Impfdosis die zweite Dosis und weitere fünf Monate später die dritte Dosis. Die Impfung wurde gut vertragen. Bereits nach der zweiten Impfung ließ sich eine Verlängerung der OP-Intervalle von acht auf neun Wochen verzeichnen, zwischenzeitlich sogar auf 11 Wochen. Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden bei der Patientin 81 operative Eingriffe vorgenommen. Eine Kontrolle des Befundes erfolgt zum Ende des Beobachtungszeitraumes geplant alle drei Monate.

Nach eigener Aussage und nach Aussage der Familie geht es der Patientin seit der Impfung klinisch besser. Die Stimmqualität hat sich deutlich verbessert und auch die Menge und Größe der papillomatösen Wucherungen, die pro Eingriff abgetragen werden müssen, haben nach Aussage der behandelnden Ärzte abgenommen.

Serologisch zeigte sich im Verlauf eine gute Immunantwort auf die Impfung. Seit Gabe der dritten Dosis war eine Zunahme der CD4+ T-Zellen zu verzeichnen und der Körper bildete eine eindeutige Antikörperantwort gegen HPV aus.

4.3.5.1 Individuelle T-Zellantworten im Impfverlauf in Fall 2

Bei dieser Patientin wurden insgesamt acht Messreihen durchgeführt. Eine Nullwertbestimmung der T-Zellfrequenzen sowie eine Bestimmung direkt nach der ersten Impfung konnten nicht durchgeführt werden, da die geringe Menge an Material für eine komplette Untersuchungsreihe mit Bestimmung der Negativ- sowie Positivkontrolle nicht ausreichte. Die ersten Werte der T-Zellfrequenzen konnten zum Zeitpunkt der zweiten Impfung bestimmt werden. Diese Werte bilden die ersten dargestellten Werte in Abbildung 18 und zeigen den Wert nach der ersten Impfung. Nach Gabe der zweiten Impfdosis konnte bei dem Mädchen kein Blut entnommen werden. Weitere Messungen wurden somit erst nach der dritten Impfung durchgeführt. Im weiteren Verlauf erfolgte wenn möglich bei jedem operativen Eingriff, etwa alle zwei Monate, eine Blutentnahme, was eine genaue Darstellung des Verlaufs nach der Impfung ermöglichte.

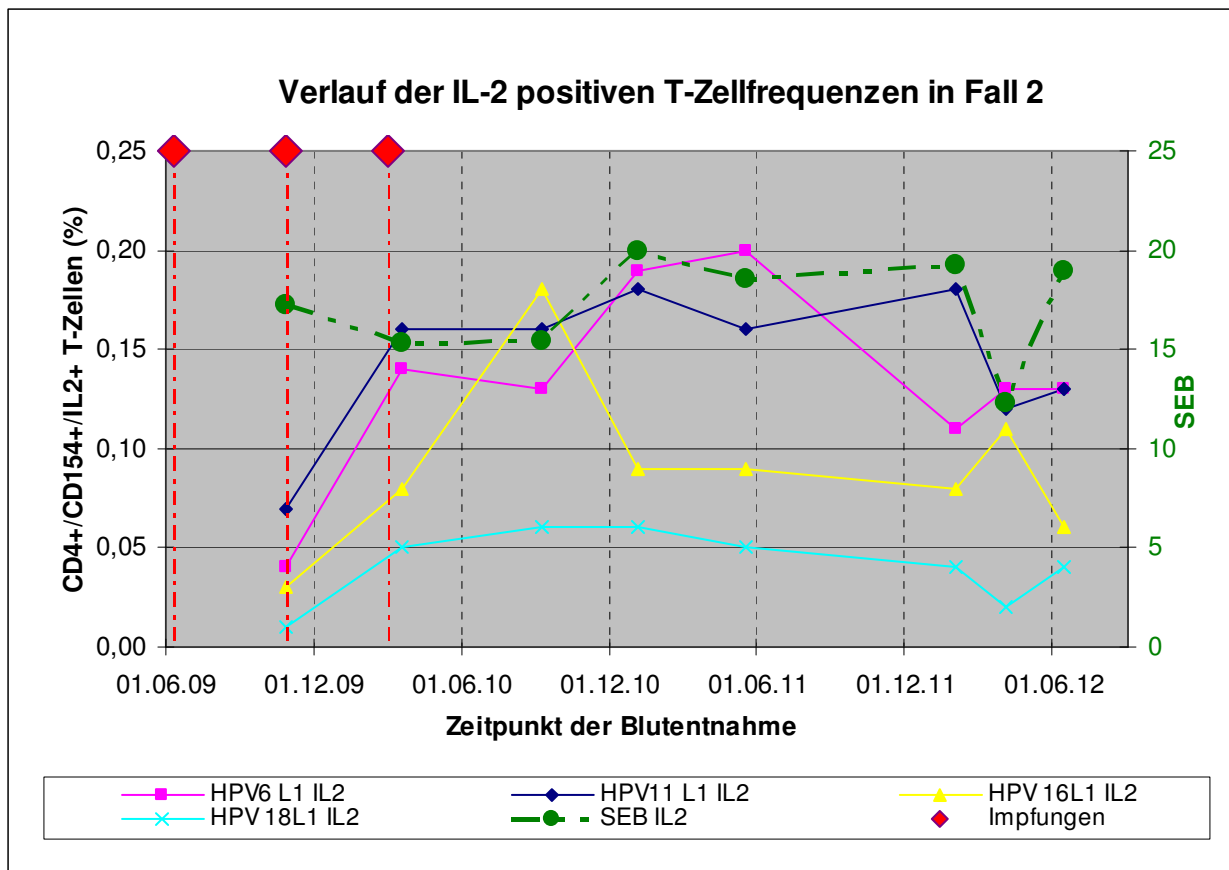


Abbildung 18: Verlauf der IL-2 positiven T-Zellfrequenzen in Fall 2

Gezeigt wird der prozentuale Anteil der IL-2 produzierenden, spezifischen T-Helferzellen gegen HPV 6, 11, 16 und 18 sowie der Verlauf IL-2 produzierender Zellen gegen SEB gemessen an der Gesamtmenge der CD4+ T-Zellen in Fall 2 im Zeitraum der Impfung mit Gardasil® sowie in den Nachkontrollen über insgesamt 4 Jahre.

Aus Abbildung 18 und Abbildung 19 wird ersichtlich, dass die T-Zellfrequenzen der IL-2 produzierenden Zellen der vier HPV-Typen noch eindeutiger ansteigen als die der IFN- γ produzierenden Zellen. Nur die spezifischen T-Zellfrequenzen gegen HPV 16 fallen 10 Monate nach Gabe der letzten Impfdosis deutlich ab, befinden sich aber auf einem höheren Niveau als der Ausgangswert. Bei den T-Zellfrequenzen gegen die drei HPV-Typen 6, 11 und 18 ist lediglich ein geringer Abfall zum Ende der Beobachtungsreihe zu verzeichnen. Von Beginn bis zum Ende der Untersuchung steigen die IL-2-spezifischen T-Zellfrequenzen insgesamt um den Faktor sechs bzw. neun für die Low-Risk-Typen und um den Faktor drei für die High-Risk-Typen an. Die Frequenzen gegen HPV 6 und 11 enden auf derselben Höhe. Die Patientin ist mit dem HPV-Typ 11 infiziert.

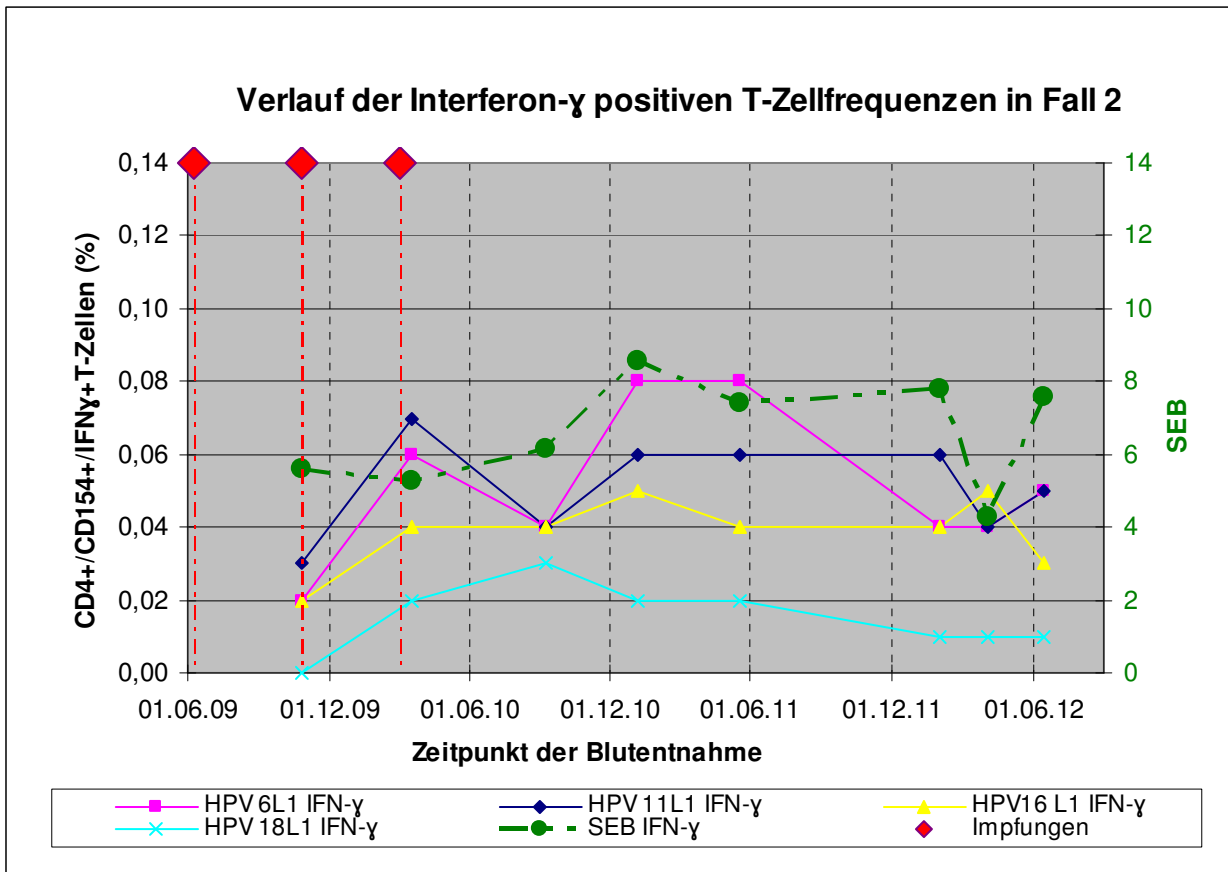


Abbildung 19: Verlauf der IFN- γ positiven T-Zellfrequenzen in Fall 2

Gezeigt wird der prozentuale Anteil der IFN- γ produzierenden, spezifischen T-Helferzellen gegen HPV 6, 11, 16 und 18 sowie der Verlauf IFN- γ produzierender Zellen gegen SEB gemessen an der Gesamtmenge der CD4+ T-Zellen in Fall 2 im Zeitraum der Impfung mit Gardasil[®] sowie in den Nachkontrollen über insgesamt vier Jahre.

Die Frequenzen der IFN- γ produzierenden T-Zellen gegen die HPV-Typen 6 und 11 zeigen einen sehr ähnlichen Verlauf. Beide steigen zwischen der zweiten und der dritten Impfung um den Faktor drei an. Der Wert fällt einmalig nach drei Monaten und steigt anschließend unterschiedlich stark an. Die Frequenzen gegen HPV 6 steigen im Verlauf der Untersuchung, gemessen am Ausgangswert, um den Faktor vier und die Frequenzen gegen HPV 11 um den Faktor drei an. Auf diesem Niveau bleiben sie etwa ein Jahr und fallen nach der letzten durchgeführten Messung erneut gering ab. Der zuletzt erreichte Wert liegt immer noch um den Faktor zwei bzw. drei höher als der Ausgangswert. Die T-Zellfrequenzen gegen die HPV-Typen 16 und 18 steigen zwischen der zweiten und der dritten Impfung um den Faktor zwei an. Am Ende der Beobachtungsreihe liegen sie um je 0,01% höher als der Ausgangswert.

In beiden Abbildungen ist zu sehen, dass die Frequenzen gegen SEB auf annähernd demselben Niveau verbleiben.

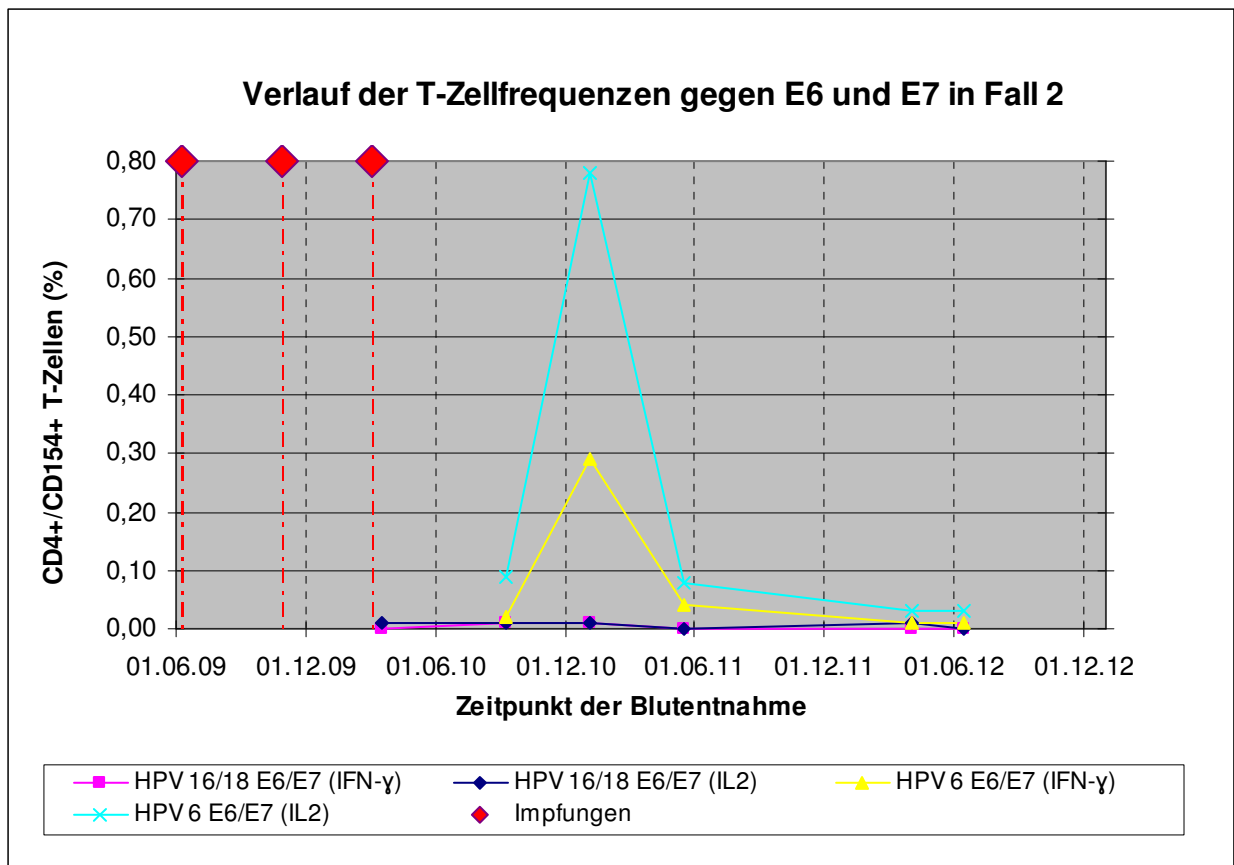


Abbildung 20: Verlauf der T-Zellfrequenzen gegen HPV6 E6/E7 und HPV16/18 E6/E7 in Fall 2

Gezeigt wird der prozentuale Anteil der HPV 6 und HPV16/18 E6/E7 spezifischen T-Helferzellen gemessen an der Gesamtmenge der CD4+ T-Zellen in Fall 2. Die Darstellung beginnt nach der dritten Impfung und verläuft über zwei Jahre.

Etwa neun Monate nach der letzten Impfung kommt es zu einem steilen Anstieg der spezifischen CD4+ T-Zellen gegen HPV6 E6/E7 (Abbildung 20). Der Anteil der IL-2+ TZ gegen HPV 6 E6/E7 an der Gesamtmenge der CD4+ T-Zellen beträgt zu diesem Zeitpunkt etwa 0,78%. Der Anteil der IFN- γ positiven gegen HPV 6 E6/E7 gerichteten Zellen beträgt 0,29%. Im weiteren Verlauf fallen diese Frequenzen wieder ab und liegen gut zwei Jahre nach der dritten Impfung bei 0,01% (IFN- γ) bzw. 0,03% (IL-2). Die T-Zellfrequenzen gegen HPV 16/18 E6/E7 zeigen keinen Anstieg nach der Impfung und bleiben stetig bei 0 bzw. 0,01%.

4.3.5.2 Spezifische Antikörpertiter im Impfverlauf in Fall 2

Bei sieben der insgesamt acht Blutentnahmen wurde Serum zur Bestimmung der Antikörpertiter untersucht. Einen Wert vor der ersten Impfung gibt es nicht. Der Ausgangswert wurde am Tag der zweiten Impfung erfasst. Weitere Werte wurden ein halbes Jahr nach Gabe der dritten Impfdosis sowie darauf folgend zu den Zeitpunkten weiterer Operationen, parallel zur Bestimmung der T-Zellfrequenzen gemessen.

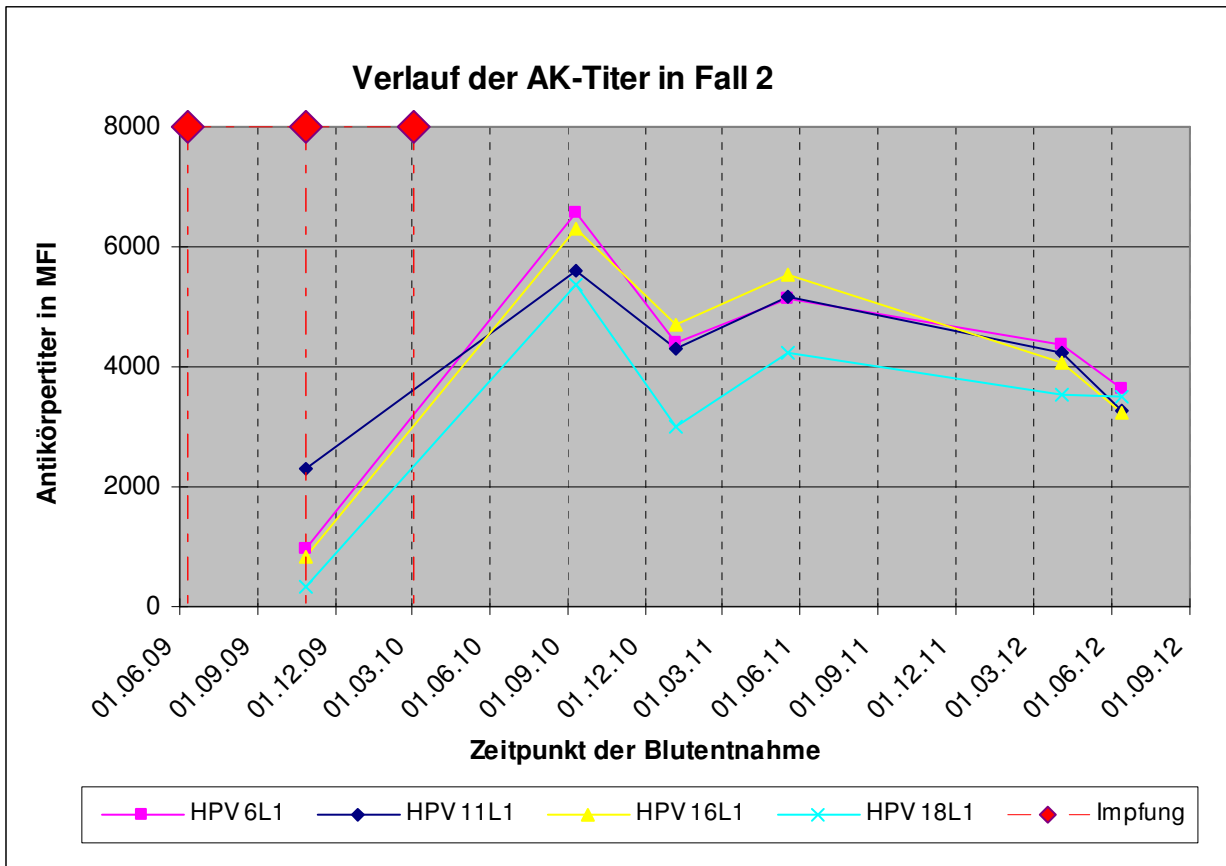


Abbildung 21: Verlauf der HPV-L1-spezifischen Antikörpertiter gegen die Antigene von HPV 6, 11, 16 und 18 über den Zeitraum der Impfung in Fall 2

Gezeigt werden die Titer der HPV 6, 11, 16 und 18 spezifischen Antikörpertiter in median fluorescence intensity (MFI) über den Verlauf der Gardasil®-Impfungen sowie im Zeitraum von weiteren zwei Jahren danach.

Zum Zeitpunkt der zweiten Impfung wurde der Ausgangswert für die Bestimmung der AK-Titer ermittelt (vgl. Abbildung 21). Die Antikörpertiter liegen mit 983 MFI für HPV 6, 2288 MFI für HPV 11, 833 für HPV 16 und 330 für HPV 18 oberhalb der Positivitätsgrenze. Im weiteren Verlauf steigen die Titer an, ihr höchstes Niveau erreichen sie 6 Monate nach Gabe der dritten Impfdosis. Der Titer liegt für HPV 6 mit 6566 MFI ca. 7fach höher als der Ausgangswert, für HPV 11 mit 5599 MFI ca. 2,5fach höher als der Ausgangswert, für HPV 16 mit 6309 MFI ca. 8fach und für HPV 18 mit 5354 MFI ca. 16fach höher als der Ausgangswert. Im Verlauf der nächsten zwei Jahre sanken die Titer wieder ab. Die Werte liegen zum Ende der Beobachtungsreihe mit 3645 MFI für HPV 6, 3283 MFI für HPV 11, 3246 MFI für HPV 16 und 3499 MFI für HPV 18 auf einem 2fach höheren Niveau als zu Beginn der Messung.

4.3.5.3 Klinische Entwicklung in Fall 2

Die klinische Entwicklung dieser Patientin ist durchgehend positiv. Da die Abnahme der Punkte im Score sehr gleichmäßig verläuft und bereits vor der Impfung mit Gardasil® zu erkennen ist,

könnte die Verbesserung der Klinik auch auf eine natürliche Remission der Erkrankung zurück zu führen sein (Abbildung 22).

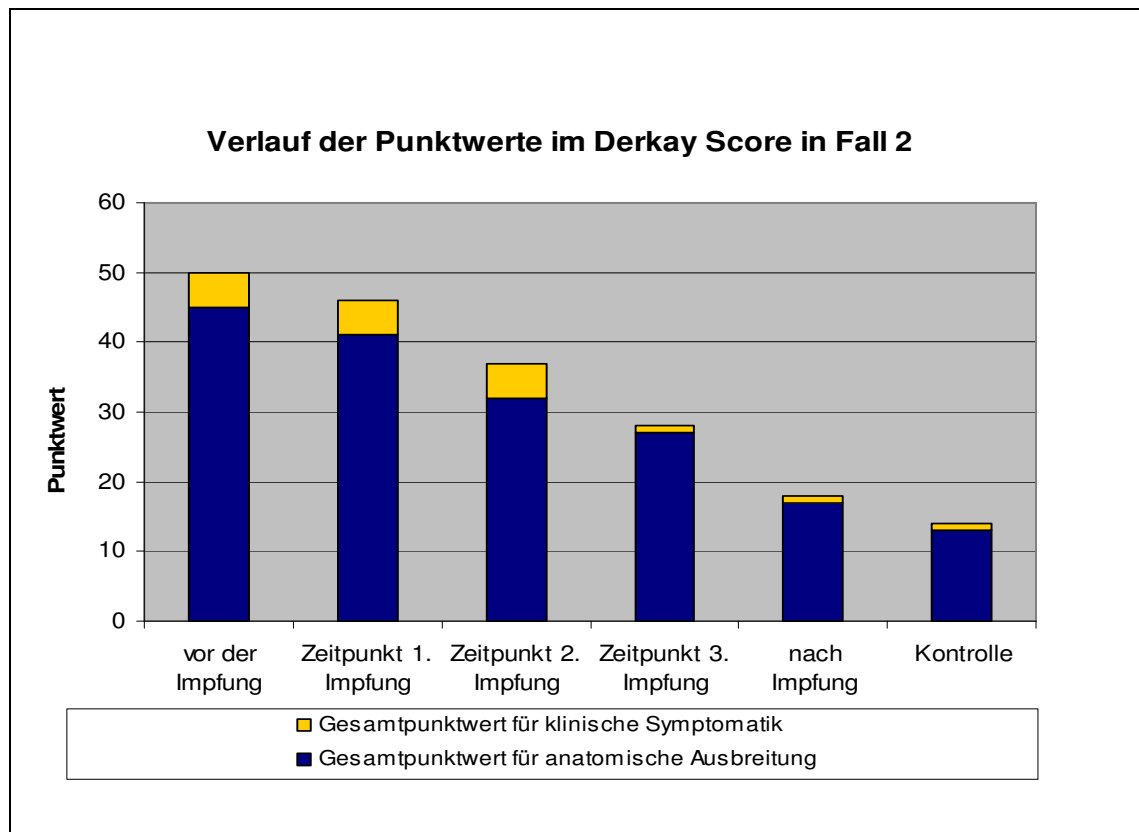


Abbildung 22: Verlauf der Punktwerte im Derkay Score im Zeitraum der der Impfung in Fall 2

Dargestellt wird der Verlauf der Klinik dieser Patientin anhand der Punktwerte im Derkay Score. Je größer der farbige Bereich ist, desto schwerer ist die Einschränkung des Organs. Zusammen stellen beide Bereiche den Gesamtpunktwert des Scores dar.

Zunächst wurde die Beeinträchtigung der Funktionalität der betroffenen Organe betrachtet. Bei dieser Patientin war die Stimme zu Beginn der Behandlung durch eine starke Heiserkeit eingeschränkt, welche heute nur noch minimal auffällt. Zudem litt die Patientin zum Teil unter massiver Luftnot bis hin zu Atemstillstand. Seit dem Zeitpunkt der Behandlung mit Gardasil® müssen die operativen Eingriffe nicht mehr notfallmäßig durchgeführt werden, sondern können alle 3 Monate geplant stattfinden. Es kam seither zu keiner akuten Luftnot mehr. Der Wert im funktionellen Score sank von fünf auf einen Punkt.

Anfänglich waren blumenkohllartig erhobene papillomatöse Strukturen sowohl im Bereich des Larynx und der aryepiglottischen Falte als auch auf den Stimmlippen bis in den subglottischen Bereich zu finden. Bis in die Trachea reichten die Papillome nicht. Es fanden sich extralaryngeale Manifestationen der Erkrankung am Gaumen und im Pharynx, sowie ein geringer Teil im Ösophagus. Nach der Behandlung mit Gardasil® fanden sich leichte

Ausbildungen von Papillomen nur noch auf einem kleinen Bereich der rechten sowie der linken Stimmlippe und im relativ schlecht mit dem CO₂-Laser erreichbaren subglottischen Bereich. Zusätzlich fanden sich Papillome noch im Bereich des Gaumens und im Pharynx. Insgesamt erreichte die Patientin im anatomischen Score zu Beginn der Behandlung auf Grund der massiven Ausbreitung der Tumore 45 Punkte. Dieser Punktwert sank über den Zeitraum der Behandlung auf 13 Punkte ab. Der Gesamtwert reduzierte sich im Derkey Score von anfänglichen 50 Punkten auf zum Schluss 14 Punkte, wie Abbildung 22 zeigt. Dies entspricht einer Verbesserung des Zustandes um 72%.

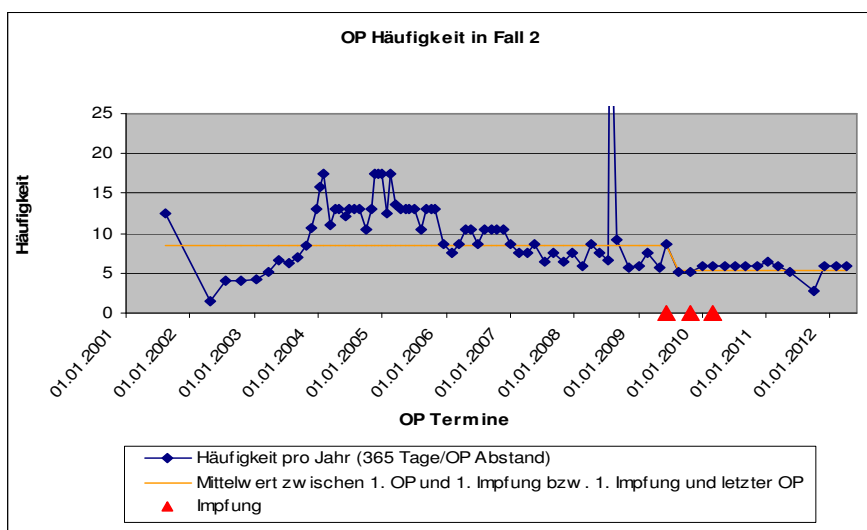


Abbildung 23: Häufigkeiten der Operationen pro Jahr seit Diagnosestellung in Fall 2

Die blaue Linie gibt die Häufigkeit der Operationen in den einzelnen Jahren an. Die orangefarbene Linie gibt den Mittelwert über die Jahre an. Die roten Pfeile markieren die jeweiligen Impfzeitpunkte. Es ist zu sehen, dass der Mittelwert der Operationshäufigkeiten nach der ersten Impfung deutlich abnimmt. Die orange Linie hat eine Stufe in ihrem Verlauf und bleibt seit der ersten Impfung auf einem konstant niedrigeren Niveau als vor der Impfung.

Die Häufigkeit der notwendigen operativen Eingriffe ging, wie in Abbildung 23 gezeigt wird, seit dem Jahr 2004 kontinuierlich zurück. Geimpft wurde die Patientin erst im Jahr 2009, so dass in diesem Fall eine natürliche Remission in Betracht gezogen werden muss. Zu Beginn stellte die akute Luftnot die Operationsindikation dar. Beachtet werden muss, dass seit Gabe der zweiten Impfdosis die Eingriffe elektiv nach einem festen Schema stattfanden. Zu diesem Zeitpunkt wurden nur noch kleine Mengen an Papillomen abgetragen, eine funktionelle Einschränkung bestand nicht mehr.

4.3.6 Fallbeschreibung 3

Im April 2007 wurde der damals zwei Jahre alte Patient das erste Mal mit anhaltender Heiserkeit in der Klinik vorgestellt. Der Verdacht einer Larynxpapillomatose wurde gestellt und mittels

Mikrolaryngoskopie makroskopisch bestätigt. Endolaryngeal zeigte sich folgender Befund: Die vordere Kommissur, die Glottis sowie beide Stimmlippen waren von flottierendem, zum Teil verlegendem papillomatösem Gewebe überwuchert. Histopathologisch konnte in dem entfernten Gewebe eine Infektion mit HPV 11 nachgewiesen werden. Die Wiedervorstellung des Patienten erfolgte zunächst alle drei Monate mit Atemnot, verstärktem inspiratorischem Stridor und zunehmender Heiserkeit. Operative Eingriffe wurden stets mit CO₂-Laser in Jet-Ventilation durchgeführt. Auf Grund massiver Papillomwucherungen waren die Stimmlippen nicht mehr zu erkennen und die Glottis wurde erheblich eingeengt, dadurch wurden häufig Eingriffe notwendig. Ein Jahr nach Diagnosestellung verkürzte sich der Abstand zwischen den notwendigen Operationen auf acht Wochen und anschließend auf vier bzw. nur noch drei Wochen. Nach Abtragung der Papillome erfolgte stets die Identifizierung des Stimmlippen- und Taschenfaltengewebes zur Modellierung ‚neuer Stimmlippen‘. Ende 2008 kam es bei dem damals knapp vierjährigen Patienten zu einer Asystolie während eines Eingriffs mit massivem Sauerstoffsättigungsabfall im Blut. Operative Eingriffe stellten sich daher als sehr schwierig dar. Teilweise musste von der Laserchirurgie auf die konventionelle Abtragung mit kalten Instrumenten umgestiegen werden, um anders als bei der Laserung die Jetventilation fortführen zu können.

Im weiteren Verlauf waren wegen des massiven Papillomwachstums die Eingriffe weiterhin alle drei Wochen notwendig, wobei die Menge der Papillome weiterhin die Beatmung des Patienten erschwerte. Im September 2009 wurde den Eltern erstmalig die Möglichkeit der Impfung mit Gardasil[®] angeboten, was zunächst von der Mutter abgelehnt wurde. Nachdem weiterhin keine Besserung der Klinik zu sehen war, entschied sich die Mutter nach Rücksprache mit den behandelnden Ärzten im März 2010 doch für die Impfung des Jungen. Die Gabe der zweiten Impfdosis erfolgte in diesem Fall bereits drei Wochen nach erstmaliger Impfung, zum Zeitpunkt des nächsten Eingriffs. Die Verabreichung der dritten und letzten Impfung erfolgte erst weitere acht Monate später, aber noch innerhalb eines Jahres, so dass die Gabe den Impfeempfehlungen (siehe Kapitel 1.4.1) entsprach.

Nach Gabe der ersten Dosis zeigten sich zum Zeitpunkt des nächsten Eingriffs (4 Wochen später) bereits ein klinisch geringer ausgeprägter Befund sowie ein deutlich besserer Stimmlippenhalt. Papillome waren aber weiterhin in großer Menge zu finden. Zunächst mussten die Kontrollen weiterhin im Abstand von drei Wochen durchgeführt werden. Es war eine deutliche Verbesserung des Befundes gegenüber der Kontrolle vom November 2010 zu verzeichnen, so dass trotz weiterhin bestehendem Papillomwachstum eine Verlängerung des Kontroll- und OP-

Intervalls auf acht Wochen beschlossen wurde. Zu diesem Zeitpunkt war es möglich, den Endolarynx operativ ganz von Papillomen zu befreien. Ebenso waren die Stimmlippen frei, glatt und von regelrechter Morphologie. Bei der Kontrolle im Januar 2011 war eine erneute Verbesserung der klinischen Befunde zu verzeichnen, die Papillome begrenzten sich auf das vordere Drittel der Stimmlippen und den subglottischen Abhang sowie die vordere Kommissur. Eine Verlängerung des Operationsintervalls auf drei Monate wurde zu diesem Zeitpunkt festgelegt. Die letzte Kontrolle erfolgte im August 2011, dabei wurden keine operationswürdigen papillomatösen Veränderungen nachgewiesen, so dass seitdem keine Operationen mehr notwendig waren.

4.3.6.1 Individuelle T-Zellantworten im Impfverlauf in Fall 3

Im Verlauf der Studie wurden bei diesem Patienten insgesamt zwölf Blutentnahmen durchgeführt, davon konnten sieben Messreihen in die Analyse des Verlaufs der T-Zellfrequenzen über den Zeitraum der Impfung einbezogen werden. Bei drei Blutabnahmen war zu wenig Material vorhanden, um das ex-vivo-assay mit mindestens 3 Ansätzen inklusive Positiv- und Negativkontrolle durchführen zu können. In zwei weiteren Fällen wurde die erlaubte Liegedauer zwischen der Entnahme des Blutes bis zum Zeitpunkt der Verarbeitung überschritten, so dass es zu einem Untergang der T-Zellen kam.

Zwei Versuchsreihen wurden einen und zwei Monate vor der Gabe der ersten Impfdosis analysiert, diese beschreiben die Ausgangswerte. Anschließend fanden zu folgenden Zeitpunkten Messungen statt: vier Wochen nach der ersten Impfung, 19 sowie 23 Wochen nach Gabe der zweiten Impfdosis, zum Zeitpunkt der dritten Impfung sowie 18 Wochen nach Gabe der dritten Impfdosis. Nach jeder Impfung fand demzufolge mindestens eine Kontrolle statt, nach der zweiten Impfung waren es drei Kontrollen.

Wie oben beschrieben konnten nicht durchgehend alle T-Zellfrequenzen gegen alle 4 HPV-Typen bestimmt werden, daher lässt sich hier nur von einer zu verzeichnenden Tendenz sprechen. Um diese Tendenz zu zeigen, werden dennoch die Verläufe aller T-Zellfrequenzen als durchgehende Linie dargestellt. Aus Abbildung 24 und Abbildung 25 wird ersichtlich, dass die T-Zellfrequenzen gegen die untersuchten HPV-Typen über den Impfverlauf eine ansteigende Tendenz aufweisen. Die Werte der IFN- γ produzierenden Zellen sind mit denen der IL-2 produzierenden Zellen vergleichbar, wobei der prozentuale Anteil der IL-2 produzierenden Zellen auf einem um den Faktor drei höheren Niveau zu finden ist. Dieser Unterschied ist vergleichbar mit den anderen Fällen.

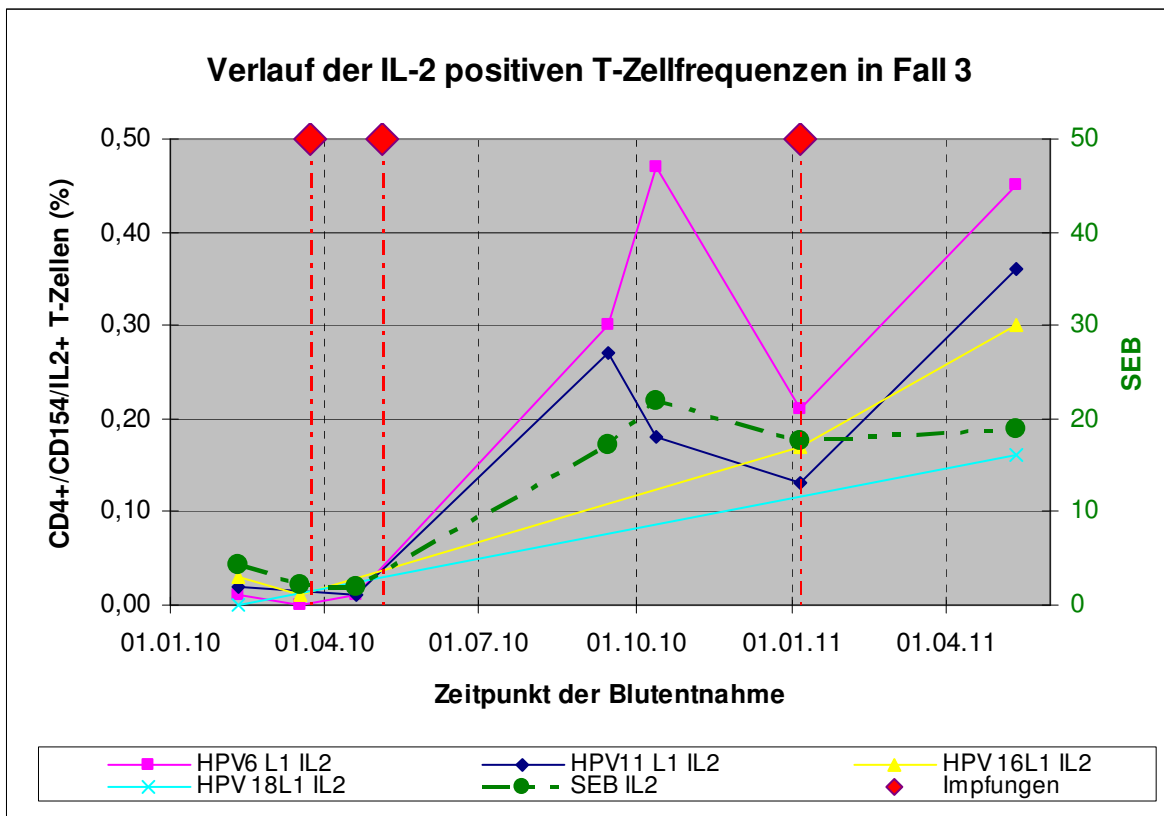


Abbildung 24: Verlauf der IL-2 positiven T-Zellfrequenzen in Fall 3

Gezeigt wird der prozentuale Anteil der IL-2 produzierenden, spezifischen T-Helferzellen gegen HPV 6, 11, 16 und 18 sowie der Verlauf IL-2 produzierender Zellen gegen SEB gemessen an der Gesamtmenge der CD4+ T-Zellen in Fall 3 im Zeitraum der Impfung mit Gardasil®.

Die T-Zellfrequenzen der IL-2 produzierenden Zellen gegen HPV 6 gemessen an der Gesamtmenge der CD4+ Zellen steigen nach der zweiten Impfung das erste Mal eindeutig von einem Ausgangswert von 0,01% auf 0,47% an. Zum Zeitpunkt der dritten Impfung kommt es mit 0,21% zu einem Abfall auf die Hälfte des vorangegangenen Wertes. Dieser zwischenzeitliche Abfall ist bei den anderen Fällen ebenfalls zu beobachten. Nach der letzten Impfung ist erneut ein eindeutiger Anstieg der T-Zellfrequenzen gegen HPV 6 auf 0,45% zu sehen. Eine sehr ähnliche Entwicklung lässt sich für die T-Zellfrequenzen gegen HPV 11 feststellen. Hier laufen und enden die Frequenzen lediglich auf einem um den Faktor 1,25 geringeren Niveau. Die T-Zellfrequenzen gegen HPV 16 und 18 konnten nur am Anfang und Ende der Behandlung untersucht werden. Hier steigen die IL-2 produzierenden T-Zellfrequenzen vom Ausgangswert bis zum Zeitpunkt nach der dritten Impfung um den Faktor 10 für HPV 16 von 0,03% auf 0,3% und um den Faktor 16 für HPV 18 von 0% auf 0,16% an.

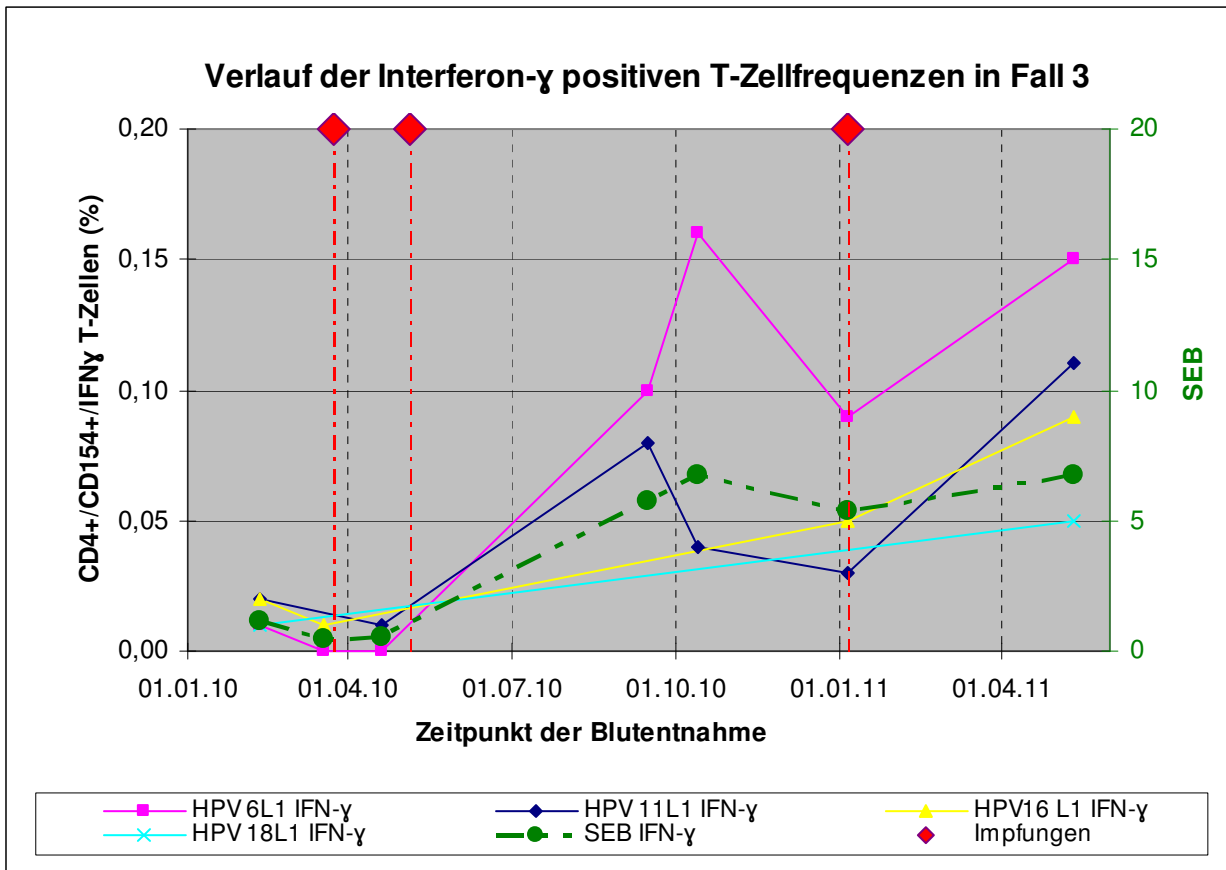


Abbildung 25: Verlauf der IFN-γ positiven T-Zellfrequenzen in Fall 3

Gezeigt wird der prozentuale Anteil der IL-2 produzierenden, spezifischen T-Helferzellen gegen HPV 6, 11, 16 und 18 sowie der Verlauf IFN-γ produzierender Zellen gegen SEB gemessen an der Gesamtmenge der CD4+ T-Zellen in Fall 3 im Zeitraum der Impfung mit Gardasil®.

Der Ausgangswert der IFN-γ produzierenden T-Zellfrequenzen gegen HPV 6 und 11 gemessen an der Gesamtmenge der CD4+ Zellen befindet sich bei 0,02%. Zwischen der zweiten und dritten Impfung steigen die IFN-γ produzierenden Zellen gegen HPV 6 zunächst auf 0,16% und gegen HPV 11 auf 0,08 % an. Danach kommt es bis zum Zeitpunkt der dritten Impfung zu einem Abfall der T-Zellfrequenzen gegen HPV 6 auf 0,09% und gegen HPV 11 auf 0,04%. Zwischen der dritten Impfung und der letzten Kontrolle sechs Monate später steigen beide Werte wieder adäquat an. Die T-Zellen gegen HPV 6 liegen zu diesem Zeitpunkt mit 0,16% um das 7,5 fache höher als der Ausgangswert. Die IFN-γ produzierenden Zellen gegen HPV 11 liegen mit 0,11% um das 5,5fache höher als der Ausgangswert. Die Frequenzen der IFN-γ produzierenden T-Zellen gegen HPV 16 steigen vom Ausgangswert bis zum Zeitpunkt der Kontrolle nach der dritten Impfung um den Faktor 4,5 von 0,02% auf 0,09% und gegen HPV 18 um den Faktor 5 von 0,01% auf 0,05% an.

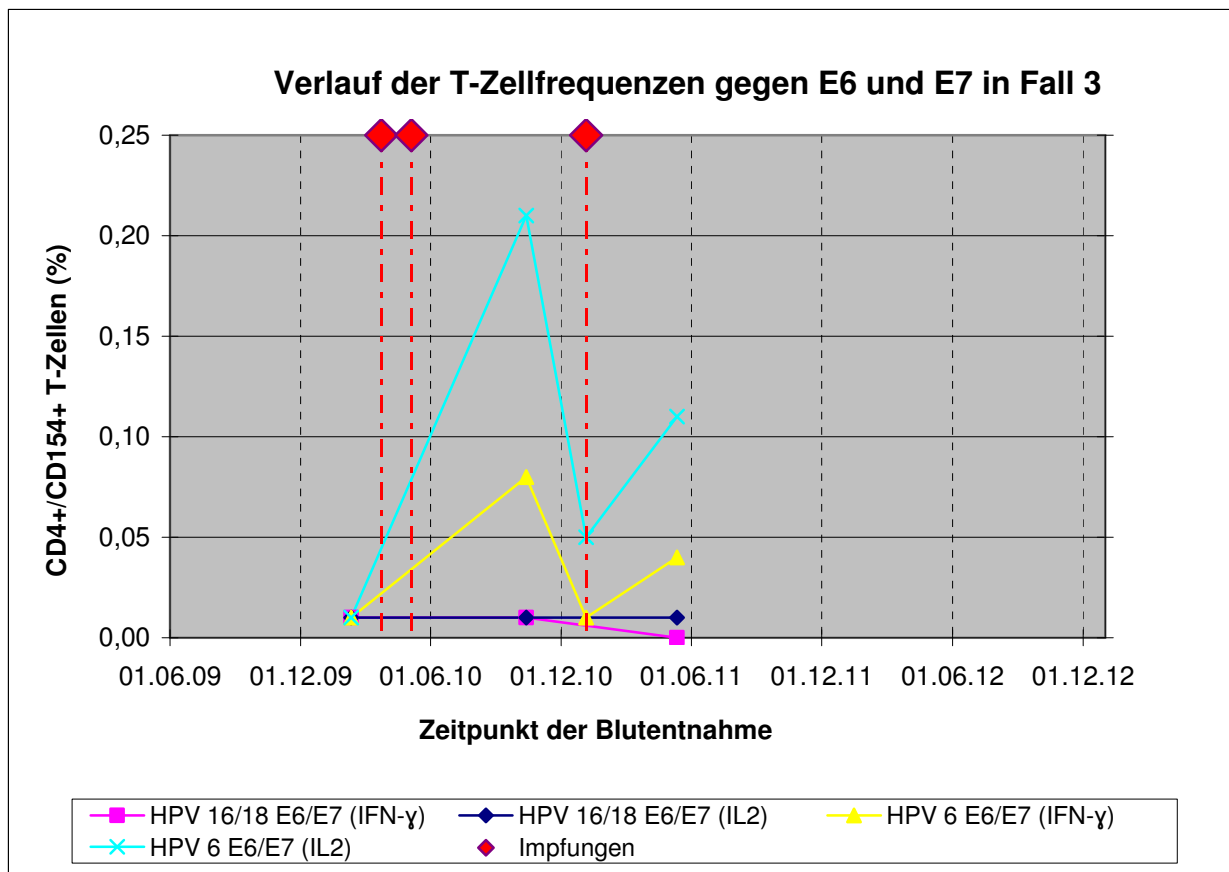


Abbildung 26: Verlauf der T-Zellfrequenzen gegen HPV6 E6/E7 und HPV16/18 E6/E7 in Fall 3

Gezeigt wird der prozentuale Anteil der HPV 6 und HPV16/18 E6/E7 spezifischen T-Helferzellen gemessen an der Gesamtmenge aller CD4+ T-Zellen in Fall 3 im Zeitraum der Impfung mit Gardasil® über einen Zeitraum von 1,5 Jahren. Die roten Vierecke markieren die Impfzeitpunkte.

In Abbildung 26 sieht man, dass die prozentualen Anteile der T-Zellfrequenzen gegen die HPV 6 und HPV 16/18 E6 und E7 Proteine vor der Impfung bei 0,01% liegen. Nach der zweiten Impfung bilden die IL-2+, gegen HPV 6 E6/E7 gerichteten T-Zellen mit 0,21% die höchsten Frequenzen. Die IFN-γ+, gegen HPV 6 E6/E7 gerichteten T-Zellen folgen mit 0,08%. Bis zur nächsten Impfung fallen die Werte der IL-2+, gegen HPV 6 E6/E7 gerichteten Zellen auf 0,05% und die Werte der IFN-γ+, gegen HPV 6 E6/E7 gerichteten Zellen auf 0,01% ab. Nach der letzten Impfung steigen die Werte wieder an. Der Anteil der spezifischen CD4+ T-Zellen gegen HPV 6 E6/E7 an der Gesamtmenge der CD4+ T-Zellen beträgt nach der letzten Impfung 0,11% für IL-2+ Zellen und 0,04% für IFN-γ+ Zellen. Die T-Zellfrequenzen gegen HPV 16/18 E6/E7 bleiben konstant bei 0,01%. In diesem Fall kommt es im Verlauf zu einem Anstieg der Frequenzen der CD4+ T-Gedächtniszellen, welche gegen die HPV 6 E6/E7 Proteine gerichtet sind.

Die letzte Untersuchung der T-Zellfrequenzen erfolgte im Mai 2011, vier Monate nach Gabe der letzten Impfung. Seitdem fanden im weiteren Verlauf keine Blutentnahmen und Messungen mehr statt, da keine weiteren Eingriffe mehr durchgeführt werden mussten. Der Patient war papillom- und symptomfrei.

4.3.6.2 Spezifische Antikörpertiter im Impfverlauf in Fall 3

Aus insgesamt fünf Blutentnahmen wurde Serum zur Bestimmung der Antikörpertiter gewonnen. Ein Monat vor der Gabe der ersten Impfdosis wurde der Ausgangswert bestimmt. Zu diesem Zeitpunkt lag der Wert der Antikörper für HPV 6 bei 11933 MFI, der für HPV 11 bei 11262 MFI, der für HPV 16 bei 730 MFI und der für HPV 18 bei 460 MFI. Weitere AK-Bestimmungen fanden vier und fünf Monate nach Gabe der zweiten Impfdosis, zum Zeitpunkt der dritten Impfung sowie weitere fünf Monate danach statt. Abbildung 27 zeigt den Verlauf der L1-Antikörpertiter gegen die vier untersuchten HPV-Typen.

Zwischen der Bestimmung des Nullwertes unmittelbar vor der ersten Impfung und der Messung vier Monate später fallen die Titer gegen HPV 6 und HPV 11 gering ab. Im Unterschied dazu steigen die Titer gegen HPV 16 und 18 stark an. Die Titer gegen alle vier HPV-Typen treffen sich auf einem ähnlich hohen Niveau. Dieses liegt für die Titer gegen HPV 6 bei 9533 MFI und damit um das 1,25fache und gegen HPV 11 bei 10539 MFI und damit um das 1,06fache unter dem Ausgangswert. Für HPV 16 liegt das erreichte Niveau mit 8035 MFI um das 11fache und für HPV 18 mit 6620 MFI um das 14 fache höher als der Ausgangswert. Nach einem zwischenzeitlichen Abfall kommt es nach der dritten Impfung zu einem erneuten Anstieg der Antikörpertiter gegen alle vier HPV-Typen. Zu diesem Zeitpunkt erreichen die Antikörper ihr höchstes Niveau. Die Werte liegen zum Ende der Beobachtungsreihe mit 11976 MFI für HPV 6 und 12101 für HPV 11 wenige Punkte über dem Ausgangswert und für HPV 16 mit 11591 MFI liegen die Werte knapp 16fach höher und für HPV 18 mit 9074 knapp 20fach höher als der Ausgangswert.

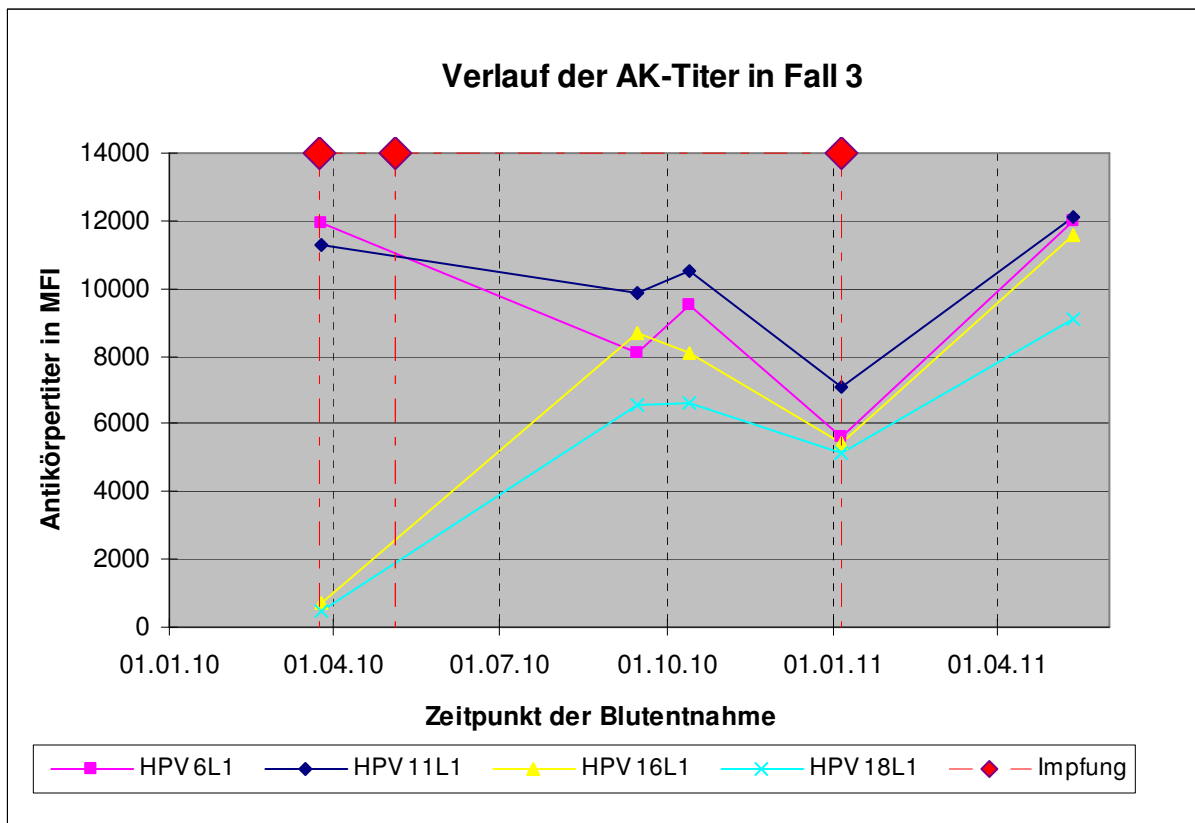


Abbildung 27: Verlauf der HPV-L1-spezifischen Antikörpertiter im Zeitraum der Impfung in Fall 3

Dargestellt wird die Höhe der spezifisch gegen HPV 6, 11, 16 und 18 gerichteten Antikörpertiter in median fluorescence intensity (MFI) über den zeitlichen Verlauf der Gardasil®-Impfungen in Fall 3. Begonnen wurden die Messungen zum Zeitpunkt der ersten Impfung.

4.3.6.3 Klinische Entwicklung in Fall 3

Betrachtet man die funktionelle Einschränkung der betroffenen Organe, ist eine eindeutig positive Entwicklung mit Reduktion der Punktwerte im Verlauf zu verzeichnen (vgl. Abbildung 28). Der Patient hatte anfänglich im funktionellen Derkay Score volle Punktzahl, was auf eine maximale Einschränkung der Funktionalität der Organe hinweist (vgl. Kapitel 4.3.6). Nach der ersten Impfung verbesserte sich der Zustand und die Punkte reduzierten sich von 10 auf 6. Nach der dritten Impfung wies der Patient keine funktionellen Einschränkungen mehr auf. Der Patient wurde weiterhin regelmäßig zu Operationen einbestellt. Die Indikation war aber nicht mehr die Luftnot sondern das Beseitigen der papillomatösen Strukturen.

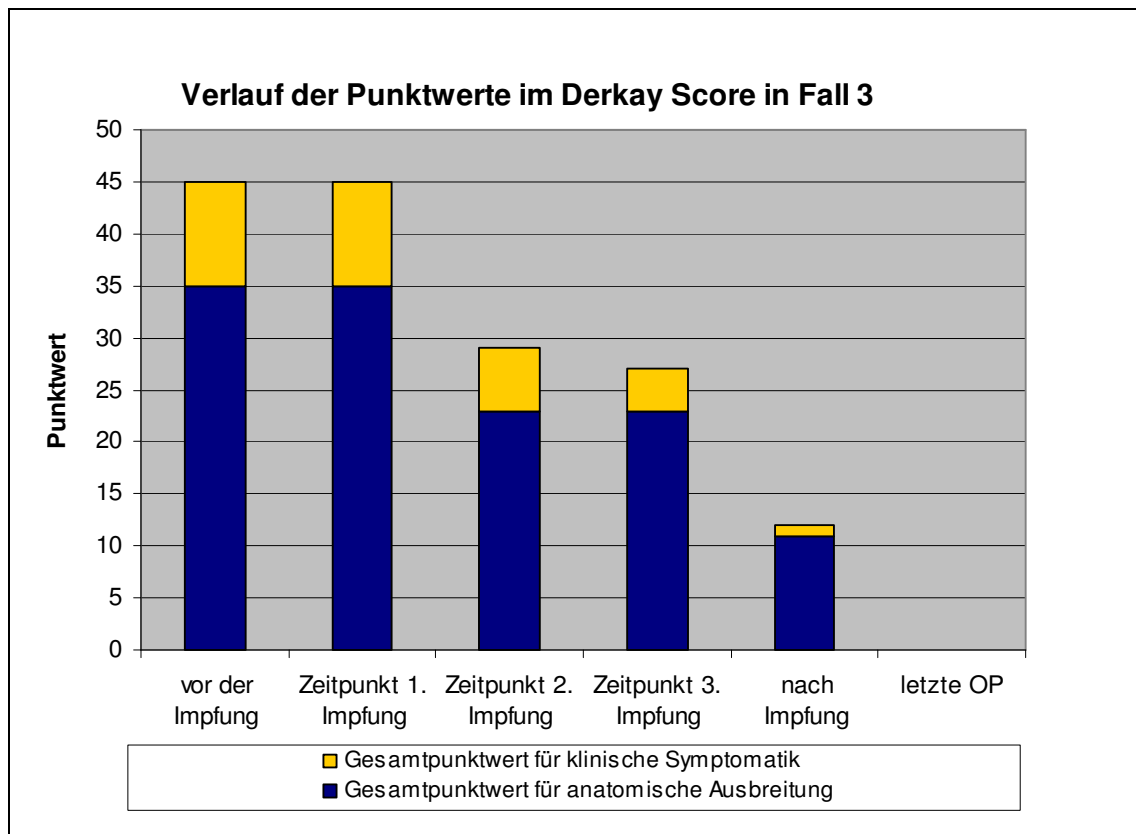


Abbildung 28: Verlauf der Punktwerte im Derkay Score im Zeitraum der Impfung in Fall 3

Dargestellt wird der Verlauf der Klinik dieses Patienten an Hand des Punktwertes im Derkay Score. Je größer der farbige Bereich ist, desto schwerer ist die Einschränkung des Organs. Zusammen stellen beide Bereiche den Gesamtpunktwert des Scores dar. Zum Zeitpunkt der letzten Operation war kein papillomatöses Gewebe mehr nachweisbar.

Die anatomische Ausbreitung war ebenfalls stark zurückgegangen. Der Derkay Score fiel in diesem Bereich im Verlauf von anfänglichen 35 Punkten zum Ende der Behandlung auf 0 Punkte ab. Der Patient wies keine Papillome mehr im Bereich der Trachea oder distal von dieser auf. In den Abschnitten von Larynx, Stimmlippen, der aryepiglottischen Falte und der Arytenoidregion waren zu Beginn der Behandlung massive papillomatöse Wucherungen zu sehen. Am Ende der Behandlung mit Gardasil® waren hier so gut wie keine Papillome mehr nachweisbar. Insgesamt verringerte sich der gesamte Punktwert im Score von 45 Punkten vor der Impfung auf 0 Punkte nach der letzten Impfung. Dies entspricht einer Verbesserung des klinischen Erscheinungsbildes um 100%.

rechten Stimmlippe. In diesem Jahr begann nach ausführlicher Aufklärung und Rücksprache mit der Patientin im Juni die Immunisierung mit Gardasil®. Die Gabe der zweiten Impfdosis erfolgte nach zwei Monaten, die Gabe der dritten Dosis nach weiteren vier Monaten, so dass die volle Immunisierung innerhalb eines halben Jahres durchgeführt wurde. Die Patientin zeigte keinerlei Nebenwirkungen auf die Impfung. Im Mai 2010 erfolgte die letzte Abtragung und Lösung von Synechien an der rechten Stimmlippe. Nach der Immunisierung stellte sich die Patientin regelmäßig zur Befundkontrolle vor, allerdings lehnte sie weitere Gespräche im Rahmen der Studie ab, so dass zu diesem Zeitpunkt die Untersuchungen beendet werden mussten. Im Bereich des Larynx konnten zum Schluss keine Papillome mehr nachgewiesen werden. Serologisch zeigte sich bei dieser Patientin dennoch keine Verbesserung der Immunantwort auf die Impfung. Antikörper gegen HPV 6 und 11, vor allem aber gegen HPV 16 und 18 waren bei dieser Patientin von Beginn an nachzuweisen. Die Titer veränderten sich nach der Immunisierung mit Gardasil® nicht wesentlich.

4.3.7.1 Individuelle T-Zellantwort im Impfverlauf in Fall 4

Insgesamt wurden bei dieser Patientin vier Blutentnahmen durchgeführt. Die erste Abnahme fand einen Tag vor der ersten Impfung statt und markiert somit den Ausgangswert. Weitere Blutentnahmen fanden jeweils zum Zeitpunkt der nächsten Impfung statt. Die letzte Kontrolle erfolgte fünf Monate nach der dritten und somit letzten Impfung.

Bei dieser Patientin befand sich die T-Zellantwort der Positivkontrolle zu jeder Messung auf einem außergewöhnlich niedrigen Niveau, die Werte waren, gemessen an den in Kapitel 4.1 beschriebenen Einschlusskriterien, nicht als positiv anzusehen. Auf Grund dieser Tatsache waren die T-Zellfrequenzen aller anderen Messungen der HPV-spezifischen T-Zellen so niedrig, dass sie in diesem Zusammenhang als nicht auswertbar angesehen wurden. Somit wird hier nur der Verlauf der IL-2 positiven T-Zellfrequenzen dargestellt wurde (vgl. Abbildung 30). Eine Aussage über den tatsächlichen Verlauf der T-Zellfrequenzen über den Zeitraum der Impfung ist nicht möglich.

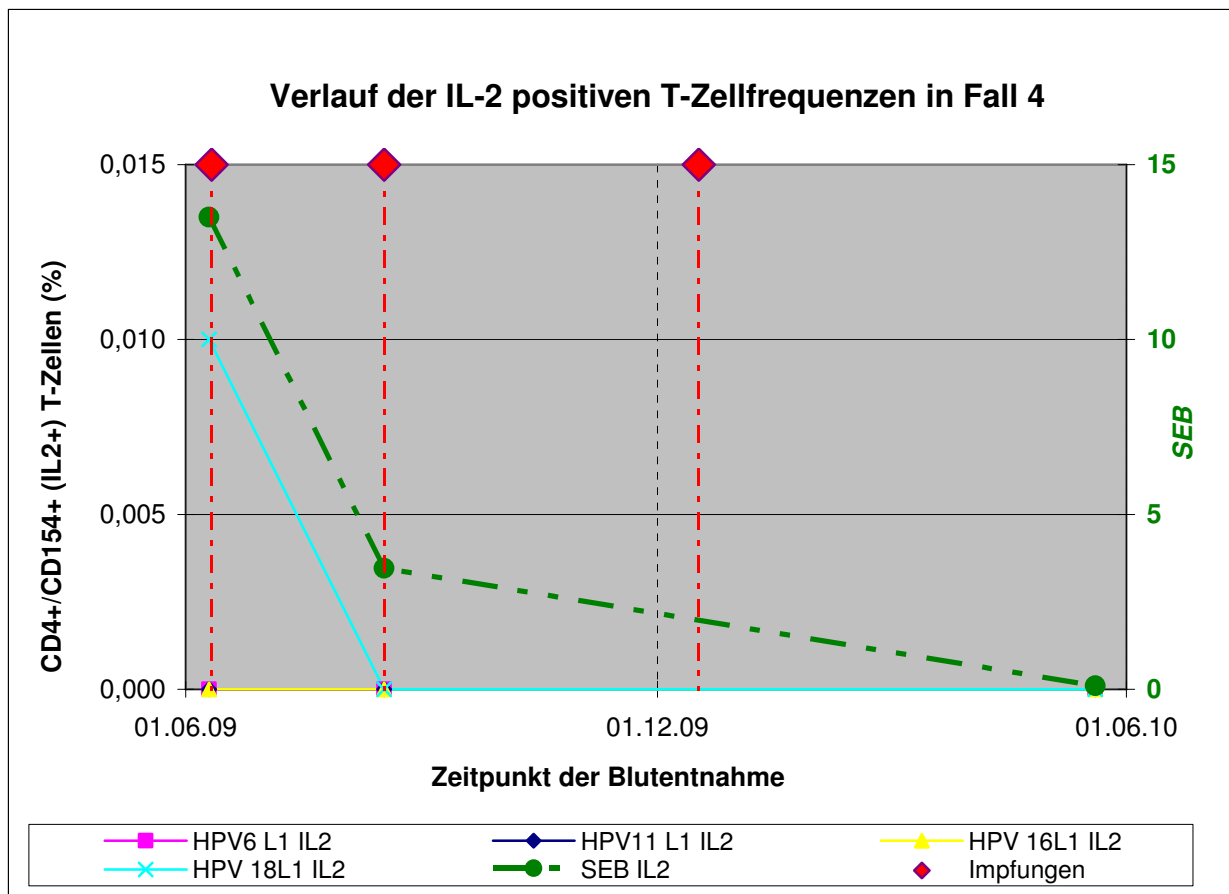


Abbildung 30: Verlauf der IL-2- positiven T-Zellfrequenzen in Fall 4

Gezeigt werden die prozentualen Anteile der HPV 6, 11, 16 und 18 L1 spezifischen IL-2 produzierenden T-Helferzellen gemessen an der Gesamtmenge der CD4+ T-Zellen. Dargestellt ist der Verlauf im Zeitraum der Impfung gemessen über ein Jahr.

1.1.1.1 Spezifische Antikörpertiter im Impfverlauf in Fall 4

Über den Verlauf der AK-Titer kann ebenfalls keine verwertbare Aussage getroffen werden. Nur zwei von vier Serumproben waren auswertbar (Abbildung 31). Die Messungen fanden vor Verabreichung der dritten Impfdosis sowie nach dieser statt.

Lediglich der AK-Titer gegen HPV 16 L1 steigt von 2313 MFI auf das 1,4fach mit 3342 MFI an. Der Wert für HPV 6 L1 reduziert sich von 2983 MFI vor der dritten Impfung auf etwa die Hälfte auf 1950 MFI nach der dritten Impfung. Die L1-spezifischen AK gegen HPV 11 fielen von 3506 MFI sehr gering auf 3102 MFI ab. Die L1-spezifischen AK-Titer gegen HPV 18 blieben im Verlauf fast gleich. Sie lagen vor der dritten Impfung bei 429 MFI und nach der dritten Impfung bei 415 MFI.

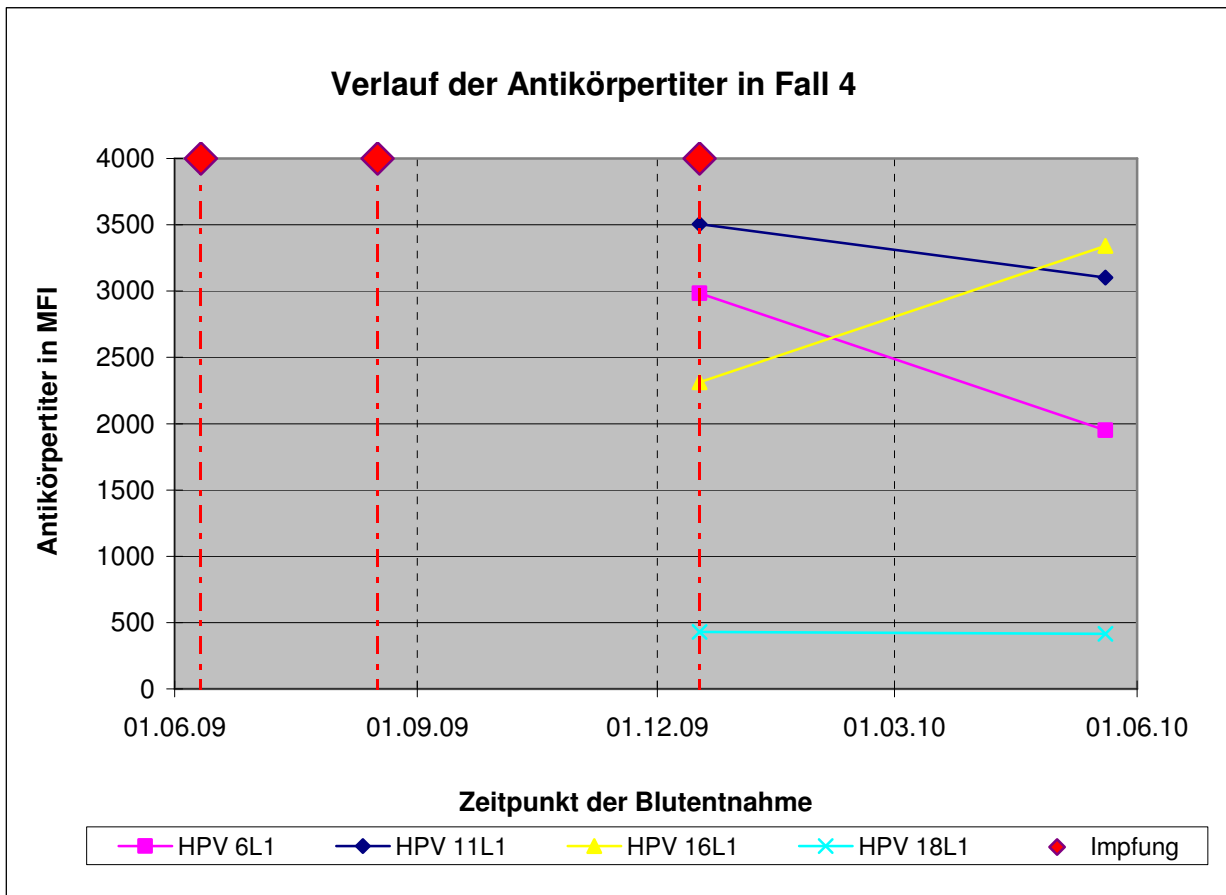


Abbildung 31: Verlauf der HPV-L1-spezifischen Antikörpertiter im Zeitraum der Impfung in Fall 4

Gezeigt werden die Titer der HPV 6, 11, 16 und 18 spezifischen Antikörpertiter in median fluorescence intensity (MFI) über den zeitlichen Verlauf der Gardasil®-Impfungen in Fall 4. Die roten Rechtecke markieren die Impfzeitpunkte, die farbigen Linien zeigen jeweils den Verlauf der Antikörpertiter gegen einen der vier HPV-Typen. Messungen konnten in diesem Fall erst ab dem Zeitpunkt der dritten und letzten Impfung durchgeführt werden.

4.3.7.2 Klinische Entwicklung in Fall 4

Abbildung 32 zeigt den klinischen Verlauf an Hand des Derkay Scores. Im funktionellen Bereich trat eine geringe Verbesserung ein. Der Wert sank von 2 Punkten vor Beginn der Impfung auf einen Punkt zum Ende der Behandlung ab und blieb stabil auf diesem Niveau. Die zuvor heisere Patientin zeigte am Ende eine annähernd normale Stimme. Die Eingriffe erfolgten stets geplant. Notfallmäßige Eingriffe waren nicht nötig.

Im Bereich der anatomischen Ausbreitung der Papillome sank der Wert nach der ersten sowie der zweiten Impfung von insgesamt 7 Punkten auf einen Punkt ab. Nach der dritten Impfung nahm die Menge der Papillome wieder zu und der Punktwert stieg erneut auf 4 Punkte an.

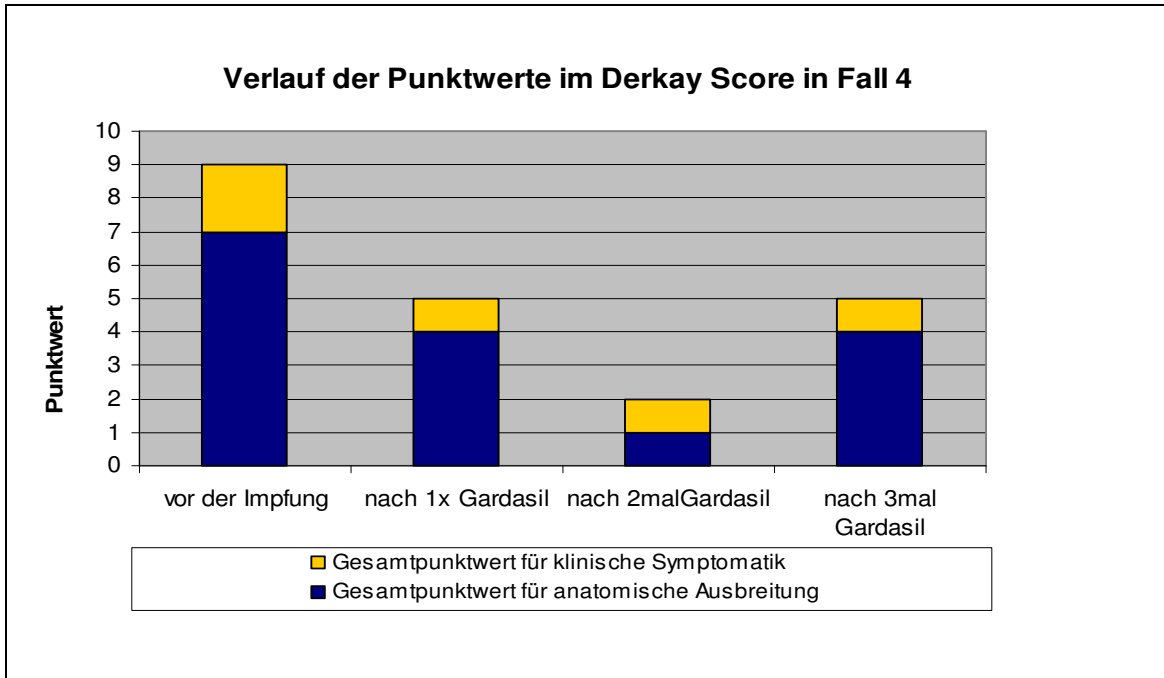


Abbildung 32: Verlauf der Punktwerte im Derkey Score im Zeitraum der Impfung in Fall 4

Dargestellt ist der Verlauf der Klinik dieser Patientin an Hand des Punktwertes im Derkey Score. Je größer der farbige Bereich ist, desto schwerer ist die Einschränkung des Organs. Zusammen stellen der gelbe und der blaue Bereich den Gesamtpunktwert des Scores dar. In diesem Fall ist die Einteilung in dem Diagramm anders als in den vorherigen Fällen, da diese Patientin insgesamt einen viel niedrigeren Wert aufwies.

Es zeigt sich trotz Impfung keine eindeutige klinische Verbesserung. Von insgesamt 9 Punkten zum Zeitpunkt der ersten verringerte sich der Gesamtwert auf 5 Punkte nach der letzten Impfung.

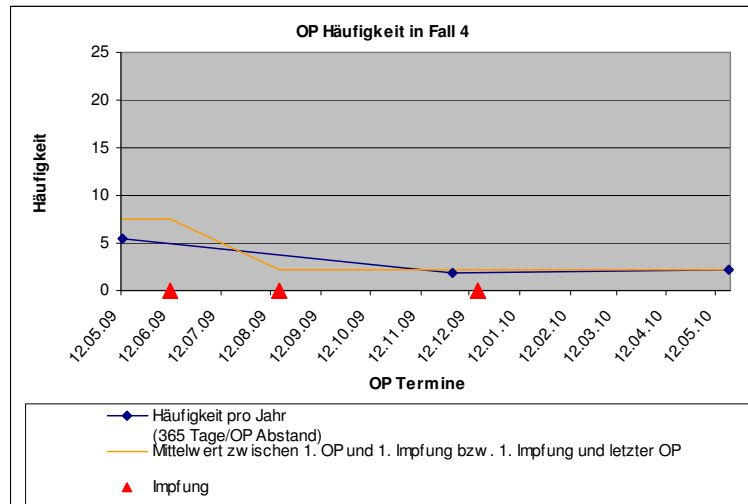


Abbildung 33: Häufigkeiten der Operationen pro Jahr seit Diagnosestellung in Fall 4

Gezeigt wird die Veränderung der Häufigkeiten der notwendigen Operationen pro Jahr. Die blaue Linie gibt die Häufigkeit der Operationen pro Jahr an. Die orangefarbene Linie gibt den Mittelwert über die Jahre an. Die roten Pfeile markieren die Impfzeitpunkte.

Die Anzahl der notwendigen Operationen verringerte sich im Verlauf. Die Impfung wurde im Jahr 2009 durchgeführt. In diesem Jahr waren insgesamt drei Eingriffe notwendig. Ein Jahr später war nur noch eine Operation notwendig. Der Beobachtungszeitraum beschränkt sich auf zwei Jahre. Über den weiteren Verlauf kann keine Aussage getroffen werden.

5 Diskussion

5.1 Zelluläre Immunität abhängig vom Krankheits- bzw. Impfstatus mit Gardasil®

Zunächst erfolgte die Definition von drei Studiengruppen mit jeweils unterschiedlichem Erkrankungsstatus bzw. Impfstatus. Es erfolgte die Rekrutierung einer Gruppe mit unauffälligen Personen, einer Gruppe mit RRP Patienten und einer kleinen Gruppe Probanden, die an einer LP erkrankt waren und sich auf Grund von Misserfolg bisheriger Therapieoptionen trotz der Erkrankung im symptom- und papillomfreien Intervall nach chirurgischer Herdsanierung mit einem prophylaktischen HPV- Impfstoff immunisieren lassen wollten. Die drei Gruppen waren unterschiedlich groß. Durch die Bildung der drei Studiengruppen gelang es, im Rahmen der Querschnittsstudie eine Aussage über die HPV-spezifische Immunität bei erkrankten und gesunden Probanden zu machen sowie eine Aussage über die Wirkung des Impfstoffes und die Immunität nach einer Gardasil®-Impfung bei bereits erkrankten Personen zu treffen. Die Probanden der drei Gruppen hatten messbare HPV-L1-spezifischen T-Zellfrequenzen, die alle in ihrer Ausprägung deutlich oberhalb der Negativkontrolle lagen und somit als positiv zu werten waren.

Die gemessenen HPV-spezifischen T-Zellen, die vor allem gegen die Low-Risk-HPV-Typen gebildet wurden, sind bei den gesunden Probanden auf eine frühere, natürliche Infektion mit einem der Virustypen zurückzuführen. Dies erschließt sich aus der Tatsache, dass diese Patienten zum einen nicht geimpft wurden und deshalb die T-Zellantwort nicht von der Impfung stammen konnte und zum anderen daraus, dass T-Zellen auch gegen E6- und E7-Proteine gebildet wurden, die früh im Replikationszyklus des Virus gebildet werden [9] und in den Impfstoffen nicht enthalten sind [41]. Umgekehrt bildet ein Körper, der bisher naiv gegenüber HPV ist, keine HPV-spezifischen T-Zellen aus. Die Tatsache, dass keiner der Probanden dieser Gruppe Anzeichen einer HPV-assoziierten Erkrankung aufwies, lässt den Rückschluss zu, dass das Immunsystem der jeweiligen Probanden kompetent genug war, die Viren zu bekämpfen und die Infektion offenbar nicht zum Ausbruch einer Erkrankung geführt hat.

Wie wir auf Grund der klinisch nachgewiesenen Erkrankung, die offensichtlich eine Infektion mit dem Virus als Ursache hatte, erwartet hatten, konnten auch in den beiden anderen Probandengruppen 1 und 3 HPV-spezifische T-Zellen nachgewiesen werden. Auffällig war, dass die Gruppe der Erkrankten durchgängig niedrigere HPV-spezifische T-Zellfrequenzen als die Gruppe der gesunden Probanden und sehr viel niedrigere Frequenzen als die Gruppe der nach

Herdsanierung geimpften Probanden aufwies. In Zusammenhang mit der Tatsache, dass bei allen erkrankten Probanden definitiv eine Infektion stattgefunden hatte, weist diese Tatsache darauf hin, dass Patienten, die an einer HPV-assoziierten Erkrankung leiden, offensichtlich eine Dysregulation oder Dysfunktion der CD4+ T-Zellen aufweisen bzw. bei erkrankten Menschen eine generell schlechtere T-Zellaktivierung vorliegt als bei gesunden Personen. Sie sind somit nicht in der Lage, über die spezifische Immunabwehr das Virus zu bekämpfen. Dennoch kann dies nicht die einzige Erklärung dafür sein, dass diese Patienten erkranken, da der hier dargestellte Unterschied, wie in Kapitel 4.2.2 und 4.2.3 beschrieben, nicht signifikant ist.

In der Gruppe der geimpften RRP Patienten waren die T-Zellfrequenzen durchgehend signifikant höher als in den ungeimpften Gruppen. Die Gruppe der geimpften RRP Patienten war kleiner als die beiden Vergleichsgruppen, außerdem konnte nicht bei allen Probanden in der dritten Gruppe zu gleichen Zeitpunkten Blut abgenommen werden. Aus diesen Gründen können die einzelnen Werte der Patienten nicht mit den Mittelwerten der anderen Gruppen verglichen werden. In Kapitel 5.5 wird daher der Verlauf jedes einzelnen Patienten gesondert betrachtet. Um die Wirksamkeit der Impfung und damit eine mögliche Therapieoption bei LP sicher bewerten zu können, sollte diese Studie in größerem Maße wiederholt und weitergeführt werden.

5.2 Nachweis HPV-spezifischer IL-2 oder IFN- γ produzierender T-Helferzellen

Mit Hilfe des ex-vivo-assays konnten auf der Basis von CD-154-Expression HPV-Antigen-spezifische T-Helferzellen in Vollblutproben gemessen werden. Dieser direkte Nachweis HPV-L1-spezifischer T-Zellen wurde von Frentsch et.al. entwickelt und von AK Ramseger an die HPV-spezifischen Fragestellungen unserer Arbeitsgruppe angepasst, so dass auch HPV-L1-spezifische T-Zellen im Blut von Probanden, die eine Immunisierung mit Gardasil[®] erhalten hatten, nachgewiesen werden konnten. Mit diesem Verfahren war es möglich die T-Zellfrequenzen im Blut aller unserer Probanden zu detektieren [22, 51].

In den drei in dieser Arbeit dargestellten Patientengruppen zeigte sich eine gleiche Abstufung der Höhe der Frequenz HPV-L1-spezifischer T-Zellen an der Gesamtmenge der CD4+ T-Zellen, die zusätzlich IL-2 produzierten. Die höheren T-Zellfrequenzen wurden gegen die Low-Risk-HPV-Typen gemessen, wobei der Anteil gegen HPV 6 den Anteil gegen HPV 11 überragte. Unter den High-Risk-Typen war der Anteil gegen HPV 16 größer als der gegen HPV 18. Im Vergleich der Gruppen zeigten die Probanden der Gruppe 2 etwas höhere L1-spezifische T-Helferzellfrequenzen als die Probanden der Gruppe 1. Der Unterschied war nicht signifikant,

was daran liegen könnte, dass die Gesunden bereits HPV 6 exponiert waren (sexuell aktiv) ohne eine Erkrankung entwickelt, aber trotzdem T-Zellen gebildet zu haben. Das würde bedeuten, dass auch gesunde Menschen anti-L1 spezifische TZ haben könnten, da Gesunde auch spezifische TZ gegen E6/E7 bilden (vgl. Kapitel 4.2.5)[60]. Das bestätigt die Annahme, dass Patienten, bei denen die HPV-Infektion zu einer Manifestation der Erkrankung führt, eine generell schlechtere T-Zellaktivierung aufweisen. Ein hoch signifikanter Unterschied ließ sich von Gruppe 1 und 2 zu Gruppe 3 darstellen. In Gruppe 3 zeigten die Probanden einen sehr viel höheren Anteil an L1-spezifischen Zellen gegen alle HPV-Typen (vgl. Kapitel 4.2.2) als die Probanden der beiden anderen Gruppen.

Zum Vergleich dieser Ergebnisse werden zwei weiteren Arbeiten aus unserer Arbeitsgruppe herangezogen, die sich ebenfalls mit der Bestimmung spezifischer T-Zellen im Zusammenhang mit der prophylaktischen HPV-Impfung mit Gardasil[®] beschäftigt haben. In beiden Arbeiten wurden die T-Zellfrequenzen im Verlauf einer Impfung mit Gardasil[®] an gesunden Probanden gemessen [51, 61]. Zur Bestimmung wurde das gleiche ex-vivo-assay angewendet, daher sind die Ergebnisse gut vergleichbar. Mit diesen Daten kann außerdem eine Einschätzung der Größenordnung der hier gewonnen Daten getroffen werden. Zum Vergleich mit den Gruppen 1 und 2 werden die Werte vor der Impfung aus den anderen beiden Studien herangezogen. Für die Einordnung der Gruppe 3 werden zum Vergleich die Werte gesunder Probanden nach kompletter Immunisierung mit Gardasil[®] aus den anderen beiden Studien betrachtet.

Der hier erbrachte Nachweis L1-spezifischer CD4+ IL-2 produzierender T-Helferzellen bei RRP-Patienten kann durch die Ergebnisse der beiden Vergleichsarbeiten bestätigt werden [51, 61]. So zeigten die Probanden der jeweiligen Vergleichsgruppen beider Vergleichsarbeiten ebenfalls eine höhere T-Zellantwort gegen die Low-Risk Typen als gegen die High-Risk Typen. Insgesamt lag der Anteil der L1-spezifischen T-Helferzellen der Positiv- sowie der Negativkontrolle in der vorliegenden Arbeit bei gesunden Probanden im Durchschnitt um das fünffache höher als bei gesunden Probandinnen der Vergleichsarbeiten. Bei nicht geimpften RRP Patienten dieser Studie lag der Anteil im Durchschnitt um das dreifache höher als bei den gesunden Probandinnen der Vergleichsarbeiten. Dieser beschriebene Unterschied trifft nicht nur für die Negativ- sowie Positivkontrolle sondern auch für die Werte der jeweiligen HPV-spezifischen T-Helferzellen im Vergleich dieser Studie mit beiden Vergleichsarbeiten zu.

Die insgesamt höheren Werte der T-Zellfrequenzen in der vorliegenden Arbeit könnten zum einen darauf zurück zu führen sein, dass es sich um verschiedene Untersucher handelte, die die

gleiche Methodik angewendet haben, zum anderen aber handelte es sich hier bei der Gruppe der Erkrankten sowie bei der Gruppe der Geimpften je um ein Kollektiv, das nachweislich mit HPV infiziert war. Das traf für die Gruppen der Vergleichsarbeiten nicht zu. Die Probanden der vorliegenden Studie konnten also bereits eine Immunantwort generiert haben. Natürliche Infektionen führen zumindest zu einer geringen T-Zellimmunität, was eine Erklärung für die höheren Werte darstellen könnte. Bei der Gruppe der gesunden Probanden handelte es sich um Personen (Frauen und Männer), die alle zum Zeitpunkt der Blutabnahme bereits sexuell aktiv waren. Sexuelle Aktivität stellt den häufigsten Übertragungsweg für HPV dar [2], so dass die Wahrscheinlichkeit, dass sie bereits mit dem Virus Kontakt hatten bei einer Durchseuchungsrate von 40-50% in der Bevölkerung relativ hoch ist [2, 6-8].

Der Unterschied zwischen Negativkontrolle und HPV-spezifischen T-Zellen ist bei den Probanden in dieser Arbeit deutlicher als in den Vergleichsarbeiten.

Die spezifischen T-Zellfrequenzen, die nach einer kompletten Immunisierung mit Gardasil® gemessen wurden, zeigen in dieser Studie einen signifikanten Unterschied zwischen Gruppe 3 und den beiden ungeimpften Vergleichsgruppen. Auch im Vergleich zu den geimpften Probandinnen der beiden anderen Studien zeigt sich bei den geimpften RRP Patienten dieser Studie ein deutlich höherer Anteil an L1-spezifischen T-Helferzellen, als bei den gesunden und vollständig geimpften Probanden der anderen Studiengruppen. Während in beiden Vergleichsarbeiten für alle HPV-Typen Anteile der L1-spezifischen und IL-2 produzierenden T-Zellen von unter 0,1% gemessen wurden, sind in dieser Studie der Anteil für dreifach geimpfte Probanden mit im Mittel 0,227% bzw. 0,207% für die HPV-Typen 6 und 11, sowie 0,177% und 0,09% für die Typen 16 und 18 um das drei- bis sechsfache höher als in den beiden Vergleichsarbeiten.

Dieser Unterschied könnte sich erneut durch die verschiedenen Untersucher erklären lassen, was in der Folge bedeuten würde, dass eine Impfung mit Gardasil® sowohl bei bereits mit HPV infizierten Personen als auch bei gesunden Personen zu einem vergleichbaren Anstieg der L1-spezifischen IL-2 positiven T-Zellen führen würde. Die Impfung hätte dann bei beiden Gruppen eine vergleichbar gute Wirkung.

Lässt sich dieser Unterschied nicht durch die unterschiedlichen Untersucher erklären, wäre eine weitere Möglichkeit, dass eine natürlich durchgemachte Infektion zu einer natürlichen T-Zellimmunität führt, die dann durch eine Impfung geboostet wird, was den hohen Anstieg und die insgesamt hohen T-Zellfrequenzen bei den RRP Patienten erklären könnte.

In dieser Arbeit wurde zusätzlich der Anteil L1-spezifischer CD4+ IFN- γ sezernierender T-Helferzellen bestimmt und somit die TH1-Antwort beschrieben. Die Ergebnisse dieser Messung lassen sich mit denen der IL-2 produzierenden T-Zellen vergleichen, fallen aber insgesamt niedriger aus. In den Vergleichsarbeiten lassen sich bei nicht geimpften Probanden außer für HPV 6 keine spezifischen TH1-Zellen nachweisen. Der Vergleich der geimpften RRP Patienten mit den Gruppen der dreifach geimpften gesunden Probanden aus den Vergleichsarbeiten zeigt, dass die Frequenzen der IFN- γ produzierenden T-Helferzellen bei RRP Patienten fast doppelt so groß sind wie die bei gesunden geimpften Probanden. Also auch im Falle der TH1-Antwort kommt es in den Untersuchungsergebnissen aller Arbeiten zu einem erheblichen Anstieg der T-Zellantwort nach der Impfung.

In Relation zu den in Kapitel 4.3 beschriebenen Verläufen von Einzelfällen weisen diese Ergebnisse sowohl in Hinsicht auf den klinischen Verlauf als auch auf die immunologische Entwicklung deutlich darauf hin, dass eine Impfung auch bei erkrankten Personen einen positiven Verlauf der Erkrankung fördern kann.

Zum anderen zeigt dieser Vergleich, dass auch nicht geimpfte RRP Patienten eine T-Zellantwort aufweisen, die aber offensichtlich nicht ausreicht, um die HPV-Infektion zu bekämpfen. Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass im Fall einer HPV-assoziierten Erkrankung zumindest teilweise eine Dysfunktion der T-Zellen bzw. eine schlechte T-Zellaktivierung vorliegt.

5.3 Betrachtung der humoralen Immunität im Vergleich zur zellulären Immunität

In bisherigen Studien konnte nachgewiesen werden, dass Patienten die an der adulten Form der LP leiden keine effizienten AK-Titer gegen HPV ausbilden können. Zudem wurde gezeigt, dass das Vorhandensein der Erkrankung nicht mit dem Vorhandensein bzw. der Höhe von natürlichen AK-Titern korreliert [2, 24]. Die nachgewiesene Infektion mit dem Virus führt in einigen, aber nicht in allen Fällen zu einer Serokonversion. Da in vielen Fällen die Serokonversion mit einem persistierenden Verlauf assoziiert ist, und die Patienten in etwa der Hälfte der Fälle trotz Infektion seronegativ bleiben, könnte das bedeuten, dass die vorhandenen natürlichen AK bei den betroffenen Patienten keine protektive Wirkung haben und somit die Erkrankung nicht verhindern oder das Virus bekämpfen können [2]. Auch in der vorliegenden Arbeit kam es in sieben Fällen trotz Nachweis von HPV in den Läsionen und klinischem Erkrankungsbild zu keiner nachweisbaren Serokonversion.

Impfzulassungsstudien zeigen, dass eine prophylaktische Impfung mit einem HPV-Impfstoff zur Induktion hoher AK-Titer und somit zu einer Serokonversion führt, die erfolgreich jahrelang eine Erkrankung durch HPV verhindert [62-64]. Das könnte bedeuten, dass die fehlende Serokonversion eine Ursache für immer wieder kehrende Infektionen ist. Vielleicht können hohe durch Vakzinierung erlangte virusspezifische AK-Titer vor einer Reinfektion schützen. Generell konnte ein Anstieg der Serum-AK-Titer durch die Impfung mit Gardasil® bereits durch die Zulassungsstudien des Impfstoffes nachgewiesen werden und würde somit den Erwartungen entsprechen. Bei 76% der ursprünglich geimpften Frauen waren nach drei Jahren noch signifikant höhere AK-Titer messbar [65]. In Phase-III Studien konnte für fünf Jahre nach der Impfung noch ein 100% Schutz vor einer Erkrankung gezeigt werden [66]. Ein direkter Anstieg von AK-Titern durch eine Impfung mit Gardasil® wurde bisher bei an LP erkrankten Probanden noch nicht gezeigt. Allerdings konnte in anderen Arbeiten ein Abnahme der Rezidive bei postoperativ geimpften Patienten mit einer zervikalen oder analen HPV-assoziierten intraepithelialen Neoplasie gezeigt werden [67, 68]. Die Impfung könnte demnach auch bei bereits an einer RRP erkrankten Personen zu einer Ausbildung oder einem Anstieg (Boosterung) funktionstüchtiger spezifischer AK führen.

Der Vergleich zwischen den drei Studiengruppen der Querschnittsstudie zeigt, dass es bei neun von insgesamt 18 erkrankten Probanden, bei denen die Bestimmung der AK-Titer durchgeführt werden konnte, zu einer Serokonversion kam. Das heißt die Hälfte der Fälle blieb mit unserer Messmethode seronegativ. In Gruppe 1 gab es sowohl seropositive als auch seronegative Probanden, die sich aber in der Ausprägung ihrer Erkrankung nicht voneinander unterschieden. Die Frequenzen der HPV-L1-spezifischen CD4+ T-Helferzellen sind in Gruppe 1 niedriger als in den beiden anderen Gruppen. In der Gruppe der gesunden Probanden gab es bei drei von sieben untersuchten Probanden serologische Anzeichen einer durchgemachten Infektion im Sinne einer Serokonversion.

Die Probanden, die im Verlauf geimpft worden waren, gehörten zu jenen, bei denen es bereits durch die Infektion zu einer Serokonversion gekommen war und die einen persistierenden Verlauf aufwiesen. Hier waren bereits vor der Impfung erhöhte AK-Titer nachweisbar, während nur sehr geringe T-Zellfrequenzen zu sehen waren (wie in Gruppe 1). Bei drei dieser vier geimpften Probanden kam es nach der Impfung zu einem starken Anstieg der L1-spezifischen AK-Titer gegen die Low-Risk-HPV-Typen 6 und 11 mit für $p < 0,01$ signifikant höheren Messwerten als in den beiden ungeimpften Gruppen. Für die L1-spezifischen AK-Titer gegen die beiden High-Risk-Typen 16 und 18 war dieser Unterschied sogar für $p < 0,001$ hochsignifikant.

Ebenso stiegen die Frequenzen der HPV-spezifischen T-Zellen bei den Probanden der Gruppe 3 nach Impfung im Vergleich zu beiden anderen Gruppen für $p < 0,001$ hochsignifikant an. Zusätzlich fand eine eindeutige klinische Verbesserung statt. Das lässt vermuten, dass sich der Anstieg der L1-spezifischen AK-Titer positiv auf den Krankheitsverlauf auswirken könnte. In dem Fall, in dem es zu keinem signifikanten Anstieg der Antikörpertiter bzw. der T-Zellfrequenzen kam, handelte es sich um einen Fall der adulten LP. In diesem Fall zeigte sich auch keine andauernde klinische Verbesserung.

Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass Patienten, bei denen eine HPV-Infektion zu einer Manifestation der Erkrankung führt, im Vergleich zu Gesunden eine schlechtere T-Zellaktivierung sowie eine verringerte Bildung spezifischer AK aufweisen.

Ein Vergleich der humoralen mit der zellulären Antwort aller drei Studiengruppen zeigt, dass ein hoher Antikörpertiter nicht zwangsläufig mit einer hohen T-Zellfrequenz einhergeht oder umgekehrt. Gezeigt wird aber auch, dass sich sowohl die humorale als auch die zelluläre Antwort nach der Impfung im Vergleich zu vor der Impfung signifikant verbessert.

5.4 Induktion von T-Zellen gegen E6 und E7 Proteine nach L1-Impfung

Die E6 und E7 Proteine, welche früh im Replikationszyklus einer HPV-infizierten Zelle produziert werden, sind Onkoproteine und spielen eine wesentliche Rolle im Vermehrungszyklus des HP-Virus. Im Zusammenspiel verhindern die viralen Onkogene E6 und E7 die Apoptose der infizierten Zelle und ermöglichen es damit dem Virus zu persistieren und sich zu vermehren. In diversen Kopf-Hals-Tumoren [69] und anderen HPV-assoziierten Tumoren konnte eine Expression nachgewiesen werden [2, 70, 71]. Im Umkehrschluss müsste man also davon ausgehen, dass das Immunsystem bei Patienten, bei denen es zum Ausbruch einer HPV-assoziierten Erkrankung kommt, unter anderem nicht in der Lage ist, eine ausreichende Abwehr gegen die E6- und E7-Proteine zu bilden, bzw. diese möglicherweise gar nicht zu erkennen. In anderen Studien wurde bestätigt, dass im Blut gesunder Personen signifikant häufiger spezifische CD4+ Gedächtniszellen gegen HPV 16 E6 Proteine zu finden sind als im Blut erkrankter Personen. E7- oder L1-spezifische CD4+ Gedächtniszellen werden dagegen gleich häufig gefunden [2].

In diese Ergebnisse lassen sich auch die Resultate der vorliegenden Arbeit einordnen. In Kapitel 4.2.5 werden die HPV-spezifischen T-Zellfrequenzen gegen E6 und E7 für HPV 6 und HPV 16 und 18 dargestellt und ein Unterschied zwischen den drei Probandengruppen wird beschrieben. Wir können an dieser Stelle leider nicht eindeutig unterscheiden, ob die T-Zellen gegen beide E-

Proteine gebildet werden oder nur gegen eines der beiden, da sie in einem E6/E7-Mix getestet wurden. Die höchsten T-Zellfrequenzen gegen E6 und E7 Proteine werden von den Probanden der Gruppe 2 (gesunde Probanden) gebildet. Diese bilden nicht nur höhere Frequenzen CD4+ Gedächtniszellen gegen HPV 16 und 18 E6/E7, sondern auch gegen HPV 6 E6/E7 aus. Bei sechs von 10 Probanden dieser Gruppe wurde die HPV E6/E7 spezifische T-Zellantwort bestimmt. Bei allen war eine Antwort gegen E6 und E7 sowohl für HPV 6 als auch für HPV 16 und 18 nachzuweisen. Im Gegensatz dazu war bei erkrankten Personen die spezifische T-Zellantwort gegen E6/E7 sehr viel geringer. Dies zeigt also, dass Gesunde im Vergleich zu Erkrankten eher eine Immunantwort gegen diese Onkoproteine generieren. Das könnte einer der Gründe dafür sein, warum manche Menschen gegen HPV immunkompetent sind und andere nicht. Wenn man im Vergleich dazu, wie unter 4.2.2 und 4.2.3 beschrieben, die L1-spezifischen T-Helferzellfrequenzen zwischen den beiden Gruppen vergleicht, ist nur ein geringer Unterschied zwischen kranken und gesunden Probanden zu erkennen. Der Unterschied zeigt, dass gesunde Menschen höhere T-Zellfrequenzen bilden können als die an einer LP erkrankten Patienten. Er ist aber nicht so eindeutig wie für die E6/E7 spezifischen CD4+ Gedächtniszellen. Das spricht dafür, dass gerade die Reaktion gegen E6 und E7 eine große Rolle bei der Abwehr von HPV spielt.

Zwei der drei in dieser Studie untersuchten Gruppen schlossen Probanden ein, die an einer LP erkrankt waren. Unterschieden haben sich diese beiden Gruppen an Hand des Impfstatus mit Gardasil[®]. Der Vergleich der E6 und E7 spezifischen Antwort zwischen den beiden RRP Gruppen (geimpft und ungeimpft) ergab zwar auf Grund der begrenzten Größe der Studiengruppe keinen signifikanten Unterschied, aber dennoch zeigten die geimpften Probanden eine höhere spezifische Antwort gegen die E6/E7 Proteine als die erkrankten Personen ohne Impfung.

Die T-Zellantwort der geimpften Probanden lag allerdings immer noch unter den Werten der gesunden Probanden. Wenn man weiterhin beachtet, dass der Impfstoff Gardasil[®] keine E6 und E7 spezifischen Antigene beinhaltet, sondern nur L1-VLPs, und daher eigentlich keine T-Zellen gegen E6 und E7 Proteine induzieren kann, kann man annehmen, dass die Impfung mit einem L1-Antigen bei Erkrankten zur Bildung von T-Zellen gegen das L1-Antigen führen und eine lokale Inflammation induzieren könnte. Dadurch könnte eine lokale Toleranz durchbrochen und die T-Zellantwort auch gegen E6 und E7 generiert werden. Diese T-Zellen gegen E6 und E7 könnten dann die RLP kontrollieren, weil sie die basalen Target Zellen anhand der Onkoproteinantigene erkennen können. Diese Reaktion kann die klinisch und experimentell

nachgewiesene Wirksamkeit der Impfung auch bei Erkrankten erklären. Das bedeutet, dass gerade bei HPV-geimpften Erkrankten ein Wachstum erneuter Papillome verhindert werden könnte. Hinweise, die für diese Theorie sprechen, gibt es durch die hier untersuchten geimpften RRP Patienten, bei denen es nach Impfung zu keinem oder nur sehr geringem erneuten Papillomwachstum kam.

Besonders auffällig ist dieses Ergebnis bei den beiden Kindern der Gruppe 3. Bei ihnen kommt es durchgehend nach Impfung zu einem Anstieg der T-Zellfrequenzen gegen HPV 6 E6/E7. Die Frequenzen gegen HPV 16/18 E6/E7 bleiben durchgehend auf ihrem Niveau ohne Erhöhung im Verlauf. Das legt die Vermutung nahe, dass es sich um einen sekundären Effekt nach Immunisierung handelt, der nicht direkt durch die Impfung ausgelöst wurde, da der Anstieg sonst die Frequenzen aller Impfstoff-HPV-Typen betreffen müsste. Die Werte der T-Zellfrequenzen gegen HPV 16/18 E6/E7 können auf Grund des gleich bleibenden Niveaus im Verlauf als Kontrolle gewertet werden. Im Vergleich zu diesen Werten steigen die Frequenzen gegen HPV 6 E6/E7 durchgehend an, was die Spezifität des Effekts für HPV 6 E6/E7 unterstreicht. Der Mittelwert dieser Ergebnisse ist für $p < 0,01$ signifikant höher als der Mittelwert in der Gruppe der nicht geimpften erkrankten Personen, was den eben beschriebenen Effekt bestätigt. Eine Immunantwort gegen E6 und E7 ist nach natürlicher Infektion bei den an einer Larynxpapillomatose erkrankten Personen nur sehr gering vorhanden.

Diese eben beschriebene These muss der Limitation unterworfen werden, dass in Gruppe 3 nur vier Probanden eingeschlossen wurden. Zudem waren zwei der vier Probanden Kinder, bei denen nicht immer zu jedem Zeitpunkt Blut abgenommen werden konnte.

Um eine statistisch eindeutige Aussage treffen zu können, reichen die hier verwendeten Fallzahlen nicht aus. Die vorliegende Studie sollte aber die Basis weiterer Untersuchungen sein.

Die Antikörpertiter gegen E6 und E7 zeigen insgesamt keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen. In einer anderen Vergleichsstudie [72] konnte jedoch ein deutlich erhöhter Antikörpertiter gegen E6 und E7 unter erkrankten Probanden im Vergleich zu gesunden nachgewiesen werden.

5.5 Einordnung der Einzelfälle in das Gesamtbild

5.5.1 Positiver Verlauf nach der Impfung mit Gardasil[®] in Fall 1

Im Fall des 36-jährigen Patienten zeigte sich seit dem Zeitpunkt der Impfung eine eindeutig positive Entwicklung des Krankheitsverlaufes. Der Derkay Score hilft dabei diese Entwicklung

in Zahlen zu fassen und statistisch darzustellen, um sie mit denen anderer Patienten vergleichbar zu machen. Ein Vergleich der Werte im Derkay Score vor der Impfung mit denen nach der Impfung zeigte eine Reduktion der Punkte auf etwa ein Sechstel des Ausgangswertes. Der Abstand zwischen den in den Derkay Score einbezogenen Untersuchungen betrug vor der Impfung fünf Monate, in dieser Zeit kam es zu keiner Verbesserung. Bei der dritten Untersuchung zweieinhalb Monate nach der ersten Impfung, zeigte sich eine deutliche Verbesserung, obwohl der Abstand der Untersuchung um die Hälfte kürzer war. Diese positive Entwicklung wurde vor allem von dem Patienten selbst beschrieben. Vor der Impfung litt der Patient Jahre lang an einer schweren Form der Erkrankung, sein Zustand änderte sich trotz verschiedener Therapieversuche nie nennenswert, so dass wir annehmen dürfen, dass diese aktuelle Verbesserung auf die Impfung zurückzuführen ist. Es ist zu beachten, dass der Patient auf Grund eines Bronchialkarzinoms eine Chemotherapie erhalten hatte. Diese könnte Einfluss auf den Krankheitsverlauf genommen haben. Die letzte Chemotherapie lag zum Zeitpunkt der Impfung zwei Jahre zurück. Außerdem muss eine natürliche Remission in Betracht gezogen werden, die dann aber bei allen drei an einer JLP leidenden Personen stattgefunden haben müsste.

Die klinische Entwicklung deckt sich mit den Ergebnissen der Analyse der T-Zellfrequenzen. Der Anteil der IL-2+ L1-spezifischen T-Helferzellen steigt im Impfverlauf sowohl für den Low-Risk-HPV-Typ 11 sowie für beide High-Risk-HPV-Typen 16 und 18 an. Die Ausnahme bildet HPV 6. Hier sinkt der Wert nach einem zwischenzeitlichen Anstieg wieder auf den Ausgangswert zurück. Der Anteil der IFN- γ positiven L1-spezifischen T-Helferzellen, welcher die TH1-Zellen beschreibt, zeigt im Verlauf der Impfung einen Anstieg gegen beide gemessenen Low-Risk-HPV-Typen und beide gemessenen High-Risk-HPV-Typen. Die Werte vor und nach der Impfung lassen sich in die Gesamtheit der in der Querschnittstudie untersuchten Gruppen einordnen.

Auffällig sind die höheren Werte der Positivkontrolle am Ende der Immunisierung, welche für eine generell höhere Aktivierbarkeit des Immunsystems am Ende der Beobachtungsreihe sprechen könnten. Dieser Anstieg könnte ein Effekt der Adjuvantien des Impfstoffes sein, der zu einer generell besseren Aktivierbarkeit der T-Zellen geführt hat. Zum anderen könnten die höheren Werte aber auch für eine Rekonvaleszenz und eine Erholung des Immunsystems nach Chemotherapie, welche allerdings zwei Jahre zuvor beendet wurde, sprechen.

Bei diesem Patienten ist vor Beginn der Impfung kaum eine T-Zellantwort gegen E6 und E7 zu messen. Das bedeutet, trotz der Expression von E6 und E7 gibt es keine Immunantwort gegen diese Antigene, sondern eine Toleranz. Vergleicht man diesen Wert mit der durchschnittlichen Produktion von CD4+ T-Zellen gegen diese Proteine in der gesunden Kontrollgruppe (vgl. Kapitel 4.2.5), stellt man fest, dass immunkompetente Personen, die das Virus abwehren können, eine sehr viel höhere T-Zellantwort in diesem Bereich aufweisen. Dieser Wert ist allerdings vorsichtig zu bewerten, da die Vergleichsgruppe durch ihre Größe eine höhere Varianz aufweist. Auffällig ist dennoch, dass es im Verlauf der Impfung zu einem Anstieg der T-Zellantwort gegen E6 und E7 kommt. Dieser Anstieg könnte, wie bereits in Kapitel 5.4 diskutiert wurde, ebenfalls für eine Induktion der E6- und E7-Antwort durch L1-Vakzine sprechen.

Der Verlauf der AK-Titer zeigt, dass es vor allem nach Gabe der dritten Impfdosis bzw. in diesem Fall dann nach der vierten Impfdosis zu einem sprunghaften Anstieg der AK-Titer kam. Dies entspricht auch Beobachtungen, die im Rahmen anderer Studien gemacht wurden, in denen ebenfalls gezeigt werden konnte, dass die AK-Titer vor allem nach Gabe der dritten Impfdosis einen massiven Anstieg erfahren [51]. Ein Anstieg der E6/E7 spezifischen Antikörpertiter konnte nicht gezeigt werden.

5.5.2 Nachbeobachtungszeitraum über zwei Jahre nach der Impfung in Fall 2

Eine Betrachtung der klinischen Symptomatik bei der zum Untersuchungszeitpunkt 12 Jahre alten Patientin zeigt seit dem Zeitpunkt der Impfung einen positiven Verlauf. Im Derkay Score reduziert sich die Anzahl der Punkte auf ein Drittel des Ausgangswertes. Verglichen mit den in Fall 1 dargestellten Daten zeigt sich in diesem Fall eine vergleichbar positive Entwicklung. Die mittels Derkay Score errechnete Verbesserung deckt sich mit den Aussagen der Patientin und denen ihrer Angehörigen. Auch hier ist zu bedenken, dass die Verbesserung auf eine natürliche Remission der Erkrankung zurückzuführen sein könnte. Allerdings erscheint das sehr unwahrscheinlich, da auch diese Patientin lange Jahre vor Impfung an einer schweren Form der LP litt und die deutlichen Verbesserungen des Zustandes zeitlich exakt parallel zur Impfung verliefen. Die Verbesserung der klinischen Symptomatik korreliert auch in diesem Fall mit den Ergebnissen der in dieser Studie durchgeführten Analyse der T-Zellantworten im Impfverlauf.

Im Fall dieser Patientin konnten Daten über den Zeitraum der Impfung und zwei Jahre danach erhoben werden. In der Auswertung der T-Zellfrequenzen zeigte sich ein genereller Anstieg der CD4+ T-Zellen im Zeitraum der Impfung, wie es auch in Fall 1 zu beobachten war. Dieser Anstieg war sowohl unter den IL-2 produzierenden Gedächtniszellen als auch unter den IFN- γ

produzierenden TH1-Zellen zu verzeichnen. Während die AK vor allem nach der dritten Impfung stark anstiegen und sich auf diesem Niveau hielten, zeigte sich bei den T-Zellen der stärkste Anstieg zwischen der zweiten und der dritten Impfung. Ein halbes Jahr nach der Impfung kam es allgemein wieder zu einem geringen Abfall der T-Zellfrequenzen, die dann jedoch im Vergleich zum Ausgangswert vor der Impfung auf einem höheren Niveau verblieben.

Obwohl hier nur ein einzelner Fall beschrieben ist, deckt sich der Verlauf mit der von S.K. Pacher in ihrer Dissertation beschriebenen Beobachtung des T-Zellverlaufs bei gesunden geimpften Probandinnen [61]. Die hohen T-Zellfrequenzen und Antikörpertiter nach der Impfung mit Gardasil® könnten in Zusammenhang mit dem positiven Verlauf bei dieser Patientin ein Zeichen dafür sein, dass sich durch die Impfung auch bei erkrankten Personen eine Reinfektion mit den bereits vorhandenen HPV-Typen bzw. eine Neuinfektion mit anderen im Impfstoff enthaltenen HPV-Typen verhindern ließe.

Bei Betrachtung des Verlaufs der Werte für die Positivkontrolle zeigte sich, dass dieser durchgehend auf einem relativ gleichen Niveau blieb und auch am Anfang durch die Impfung nicht stark induziert wurde. Die Immunkompetenz war bei dieser Patientin gegeben. Parallel stiegen aber die Frequenzen der spezifischen T-Zellen gegen HPV 6, 11, 16 und 18 an, was auf eine Induktion der spezifischen Immunkompetenz schließen lässt, die in diesem Zusammenhang sehr wahrscheinlich durch die Impfung hervorgerufen wurde.

5.5.3 Komplette Remission der Erkrankung in Fall 3

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung war dieser Patient zwei Jahre alt. Auf Grund der Schwere des Verlaufs waren viele chirurgische Eingriffe notwendig, die aber nie zu einer lang andauernden Besserung der Klinik führten. Auf Wunsch der Eltern wurde das Kind mit Gardasil® immunisiert. Ebenso wie in den beiden oben beschriebenen Fällen zeigte sich auch hier eine schlagartig positive Änderung des Verlaufes. Die Beschwerden besserten sich vom Zeitpunkt der Impfung an. Bis zur ersten Kontrolle nach der dritten Impfung verringerte sich der Wert des Derkay Scores auf ein Viertel des Ausgangswertes. Die dritte Impfung wurde Ende 2010 vorgenommen, ein halbes Jahr später fanden sich keine operationswürdigen papillomatösen Strukturen mehr. Obwohl auch in diesem Fall die Verbesserung auf eine natürliche Remission zurückzuführen sein könnte, spricht der Rückgang der Symptome für einen Zusammenhang mit der Impfung, da die Verbesserung in engem zeitlichem Zusammenhang mit dem Beginn der Immunisierung und der Zeit danach zu beobachten war.

Der Anstieg der T-Zellfrequenzen gegen die HPV-Typen während der Impfung lag in diesem Fall zwischen dem 1,25 bis 16 fachen des Ausgangswertes. Hier handelte es sich um einen Anstieg von einer vor Impfung mittels ex-vivo-assay fast nicht messbaren Antwort auf eine eindeutig positive CD4+ T-Zellantwort (vgl. Kapitel 4.3.6.1). Dieser Anstieg fand sich bei allen L1-spezifischen T-Zellen gegen alle vier gemessenen HPV-Typen, wobei sich die Frequenzen gegen die HPV-Typen 6 und 11, welche in diesem Fall die Auslöser der LP waren, stärker positiv entwickelten als die gegen HPV 16 und 18. Leider konnte ein weiterer Verlauf im Sinne einer Nachbeobachtung mit Messung der T-Zellfrequenzen bei diesem Patienten nicht durchgeführt werden, da das Ethikvotum bei Kindern eine Blutabnahme außerhalb einer medizinisch indizierten Blutabnahme nicht erlaubt.

Einen etwas anderen Verlauf zeigten die Antikörpertiter. Hier waren bereits vor der Impfung sehr hohe Antikörpertiter gegen die beiden HPV-Typen 6 und 11, mit denen der Junge infiziert war, zu messen. Hohe Antikörpertiter ließen sich bereits in einer vorherigen Studie bei an HPV erkrankten Patienten nachweisen [72]. Bei diesem Jungen stiegen die Antikörpertiter im Verlauf der Impfung nicht an, sondern es waren zwischendurch sogar teilweise niedrigere Titer nachweisbar. Die Titer gegen HPV 16 und 18 dagegen stiegen stark an. Im Zusammenhang könnte das dafür sprechen, dass die vom Jungen natürlich gebildeten AK nicht voll funktionsfähig waren, bzw. dass nicht allein die Höhe der Antikörpertiter für die Verbesserung und die Bekämpfung der Erkrankung verantwortlich ist, sondern vor allem die T-Zellen eine wesentliche Rolle spielen.

Der Anstieg der T-Zellfrequenzen gegen SEB im Verlauf lässt auf eine generelle Steigerung der Immunkompetenz schließen. Diese Steigerung könnte auf die Gabe weiterer Impfungen, welche in diesem Alter im Rahmen der allgemeinen Vorsorgeuntersuchungen bei Kindern verabreicht werden, und die in den Impfstoffen enthaltenen Adjuvantien oder auf eine andere Art von Infektion zurückzuführen sein. Im Rahmen dieser generellen Steigerung der Immunkompetenz kommt es auch zu einer gesteigerten Kompetenz gegenüber HPV, die durch die Vakzinierung induziert wird. Auch die Impfung mit Gardasil® und den darin enthaltenen Adjuvantien könnte für die Steigerung verantwortlich sein.

In Gesprächen mit der Mutter des Jungen stellte sich nach Ende der Behandlung heraus, dass die geistigen Fähigkeiten des Kindes weniger weit entwickelt waren, als es für Kinder seines Alters üblich ist. Die behandelnden Ärzte führten diese Fakten auf die häufigen durch die Operationen

notwendigen Narkosen und den hypoxischen Narkosezwischenfall während einer OP zurück. Es stellt sich die Frage, wie man solche schweren Beeinträchtigungen verhindern könnte.

5.5.4 Ausbleibende Wirkung der Impfung bei der adulten Larynxpapillomatose in Fall 4

Die klinische Verbesserung im Fall der 63-jährigen Patientin blieb letztendlich leider aus. Zunächst zeigte sich ein Rückgang der Punktwerte im Derkay Score und eine Verbesserung der Symptome. Diese Verbesserung hielt aber nicht bis zum Ende der Impfung an. Die Ausbreitung der Papillome nahm wieder zu. Auf Grund der fehlenden Bereitschaft der Patientin sich weiter kontrollieren zu lassen, können wir an dieser Stelle keine Angaben zum Zeitraum nach der Impfung machen, die Information darüber geliefert hätten, ob der Ausgangswert wieder erreicht wurde oder das Ausmaß trotz wiederkehrender Papillome zumindest noch niedriger gewesen wäre als vor der Impfung.

Im Unterschied zu den zuvor beschriebenen Fällen war der ursprüngliche Krankheitsverlauf bei dieser Patientin weniger aggressiv. Diese Patientin war an ALP erkrankt, während die anderen geimpften Probanden an JLP erkrankt waren.

Bei dieser Patientin lagen alle im ex-vivo-assay nachweisbaren L1-spezifischen T-Zellfrequenzen gegen die gemessenen HPV-Typen im Bereich der Negativkontrolle. Ein Nachweis der E6- und E7-spezifischen Zellen hatte nur in einer Versuchsreihe stattgefunden, die insgesamt aber nicht zu werten war, da die Werte der Positivkontrolle den Bereich, der in den Einschlusskriterien vorgegeben wurde, nicht erreichte. Und auch hier waren die Frequenzen der E6/E7-spezifischen T-Zellen so niedrig, dass sie als negativ gewertet werden mussten. Da die gemessenen Werte der Negativ- bzw. Positivkontrolle bei dieser Patientin unter der Grenze der in den Einschlusskriterien angegebenen Werte lag und die Proben gemeinsam mit anderen Probandenproben vorbereitet und analysiert wurden, bei denen es keine Auffälligkeiten gab, ist ein technischer Fehler, der sich durch die gesamten Messreihen zieht, auszuschließen. Es zeigten sich auch nach Ende der Impfung keine erhöhten Antikörpertiter gegen die L1-Antigene der vier HPV-Typen.

Möglicherweise hat das vergleichsweise hohe Alter der Patientin einen Einfluss auf die Wirksamkeit der Impfung. Es ist möglich, dass die HPV-L1-Vakzine bei älteren Patienten weniger gut in der Lage sind eine generelle Erhöhung der Immunkompetenz zu bewirken als bei jüngeren, da im Alter die Immunkompetenz allgemein erniedrigt ist. Eine weitere Möglichkeit

wäre, dass die Impfung bei Patienten mit ALP eine andere Wirkung aufweist. Es könnte sich bei dieser Patientin aber auch um eine einfache Impfversagerin gehandelt haben.

5.6 Klinische Relevanz der Studie

Humane Papillomviren wurden als Verursacher diverser Erkrankungen verifiziert. Hierzu gehören, neben der Larynxpapillomatose, die genitalen durch LR-HPV-Typen verursachten Kondylome sowie das durch HR-HPV-Typen verursachte Zervixkarzinom, Vulvakarzinom sowie das Analkarzinom. Unter den extragenitalen Erkrankungen zählt vor allem das durch HPV 16 ausgelöste Oropharynxkarzinom zu den HPV-assoziierten Erkrankungen [13]. Diese Erkrankungen wären nach aktueller Studienlage durch eine prophylaktische Impfung vermeidbar [2, 73]. Dies zeigt die Bedeutung einer prophylaktischen HPV-Impfung zur Verhütung HPV-assoziiierter Erkrankungen.

Empfohlen ist die Impfung mit Gardasil[®] oder Cervarix[®] laut STIKO für alle Mädchen im Alter von 12-17 Jahre, auf Grund der hohen anhaltenden Antikörpertiter bei jüngeren Impfungen wird eine Impfung mittlerweile bereits ab 9 Jahren empfohlen. Laut Leitlinien wird der Impfung allerdings eine rein prophylaktische Wirkung zugeschrieben [1, 3, 6].

Die bisher erste Wahl in der Behandlung der Larynxpapillomatose ist nach wie vor die chirurgische Herdsanierung, bei der alle makroskopisch sichtbaren Papillome so gut wie möglich abgetragen werden (vgl. Kapitel 1.3.4.1).

Vergleichbar mit diesem Therapieverfahren sind die Konisation bei hochgradiger Dysplasie des Gebärmutterhalses sowie chirurgische Abtragungen von condylomata accuminata im Genitalbereich. Es gibt Studien in diesem Bereich, die durch die Impfung mit Gardasil[®] oder Cervarix[®] einen Schutz vor Wiedererkrankung nach chirurgischer Therapie beschreiben. So wird für Patienten, die auf Grund einer durch HPV ausgelösten Dysplasie des Gebärmutterhalses eine Konisation erhalten hatten und die zuvor mit Gardasil[®] immunisiert worden waren, eine 65% geringere Wiedererkrankungsrate in nur 1,4 Jahren Beobachtungszeitraum beschrieben [49]. Ähnliche Beobachtungen wurden in weiteren Fällen nach der operativen Therapie intraepithelialer Neoplasien des Zervixbereiches bzw. des Analkanals gemacht. Hier traten bei postoperativ geimpften Patienten im Vergleich zu nicht-geimpften Patienten signifikant weniger Rezidive in den folgenden zwei Jahren auf [67, 68, 73].

Die Impfung mit Gardasil[®] nach chirurgischer Intervention stellt bisher ein Novum im Bereich der eigentlich prophylaktischen HPV-Impfstoffe dar, insbesondere im Bereich der Behandlung

der LP. Das eben beschriebene Ergebnis aus dem Fachbereich der Gynäkologie lässt die Vermutung zu, dass eine postoperative bzw. perioperative Impfung auch bei Patienten mit einer LP zum Erfolg führen könnte. Auch die hier in dieser Studie in den individuellen Fällen dargestellten Ergebnisse zeigen, dass es nach Impfung zu einem signifikanten Rückgang des Papillomwachstums sowie zu einer deutlichen klinischen Verbesserung kommt. Der Nutzen einer Impfung sollte auch hier bei erkrankten Patienten nach Herdsanierung in Betracht gezogen werden.

5.7 Limitation der Methodik

Zum direkten Nachweis HPV-L1-spezifischer T-Zellen wurde der von Frentsch et al. 2005 publizierte [22] und von Ramseger, AK. 2009 weiterentwickelte ex-vivo-assay [51] herangezogen. Zur Anwendung kam dieser assay im Rahmen einer nicht-interventionellen Querschnittstudie sowie im Rahmen einer darauf aufbauenden longitudinalen Fallstudie. Im Folgenden sollen die Einschränkungen der Studie und ihrer Methodik dargestellt und diskutiert werden, um die Ergebnisse korrekt beurteilen zu können.

Eine Randomisierung oder Verblindung der Studien und ihrer Teilnehmer erfolgte im Vorfeld nicht, da der Versuchsaufbau dieser Arbeit beides in dem hier möglichen Rahmen ausschließt. Ebenso wenig erfolgte aus ethischen Gründen ein Einsatz einer Placebokontrollgruppe. Es fand ein Vergleich zwischen drei Gruppen statt, in denen sich die Teilnehmer in ihrem Krankheitsstatus bzw. Impfstatus unterschieden. Das Vorhandensein klinischer Symptome zählte zu den Einschlusskriterien der Gruppe der erkrankten Probanden, die zusätzliche Impfung zu den Einschlusskriterien in die Gruppe drei und das Fehlen einer HPV-Infektion bzw. der klinischen Symptome zu den Einschlusskriterien in die Gruppe der gesunden Probanden. Auf Grund dieser Voraussetzungen ist die Verblindung bzw. Randomisierung der Probanden nicht möglich.

Sie wäre nur möglich gewesen im Rahmen einer interventionellen Studie mit der Definition einer Placebokontrollgruppe. Das Ethikvotum ließ aber keine interventionelle Studie in diesem Rahmen zu.

Trotz fehlender Randomisierung ist der Anteil der männlichen bzw. weiblichen Probanden in allen drei Gruppen gleich groß, so dass Unterschiede auf Grund der Verteilung der Geschlechter ausgeschlossen werden können. Auf Grund der fehlenden Randomisierung in den Gruppen ist das Durchschnittsalter unterschiedlich. Es können Unterschiede in den Messwerten, die auf Grund des Altersunterschiedes entstanden sein könnten, nicht ausgeschlossen werden. Je nach Alter ist allein auf Grund der sexuellen Aktivität, welches der häufigste Übertragungsweg ist, die

Wahrscheinlichkeit einer HPV-Exposition und damit einer möglichen Infektion, unterschiedlich hoch. Zudem sind in die drei Gruppen unterschiedlich viele Probanden eingeschlossen worden, so dass ein deutlicher Unterschied in der Gruppengröße bestand: Gruppe 1 mit 22 Probanden, Gruppe 2 mit 10 Probanden und Gruppe 3 mit vier Probanden.

In die Gruppe der gesunden Probanden wurden nur Teilnehmer eingeschlossen, die nicht von einer HPV-assoziierten Erkrankung betroffen waren. Diese Abwesenheit von Erkrankung wurde aber nur definiert durch das Fehlen von Krankheitssymptomen und die entsprechend leeren Anamnesen, bezogen auf dieses Krankheitsbild. Es wurden keine Abstriche durchgeführt oder DNA-Tests, die ein Fehlen der Infektion beweisen würden, daher kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass die Probanden aktuell oder in der Vergangenheit Kontakt mit dem Virus hatten. Selbst ein negativer DNA Test würde nicht endgültig ausschließen, dass eine überwundene Infektion stattgefunden hat, die eventuell zu einer immunologischen Gedächtnisantwort geführt haben könnte [11]. Man kann davon ausgehen, dass die T-Zellfrequenzen die in dieser Gruppe gemessen wurden, aufgrund eines immunologischen Gedächtnisses gebildet wurden.

Zu den Ein- und Ausschlusskriterien wurden im Rahmen dieser Gruppe nur die in Kapitel 3.1 aufgeführten Kriterien herangezogen. Fragen zur allgemeinen Bewertung ihres Risikoprofils mussten von den Patienten nicht beantwortet werden, daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass weitere Faktoren wie wechselnde Geschlechtspartner, Suchtverhalten oder Umwelteinflüsse eventuell einen Einfluss auf das immunologische Verhalten der Patienten gehabt haben könnten.

Im Rahmen der Longitudinalstudie wurden vier Probanden in den Fallstudien genauer betrachtet. Der Verlauf dieser vier Probanden wurde über den Zeitraum einer kompletten Impfung mit Gardasil® beobachtet. Von den in die Studie aufgenommenen zum Zeitpunkt der 1. Impfung noch sehr jungen Kindern konnte nicht immer ausreichend Blut und zum Teil gar kein Blut abgenommen werden, so dass hier die Aussagekraft über den Verlauf auf Grund fehlender Werte eingeschränkt ist. Da sich nur diese vier Probanden zu einer Impfung entschieden hatten und diese auch bis zum Schluss durchführen ließen, konnten die anderen erkrankten Probanden nicht in die Longitudinalstudie integriert werden.

Eine weitere Studie, die eine größere Anzahl von Probanden über den gesamten Impfverlauf einschließt, sollte folgen. Diese Studie sollte mehrfache Messungen der HPV-L1-spezifischen T-Zellen im Abstand von mehreren Monaten vor dem Beginn der Impfung enthalten um zu zeigen, dass die Änderung der T-Zellantworten nicht auf eine natürliche Änderung der Immunantwort,

sondern tatsächlich auf die Impfung zurückzuführen ist. Weiterhin sollte eine kontinuierliche Messung über den gesamten Impfzeitraum mit einer Nachbeobachtungszeit stattfinden, um weitere Informationen über die Ausbildung des immunologischen Gedächtnisses zu erhalten.

Die rezidivierende Larynxpapillomatose ist eine grundsätzlich gutartige, aber relativ seltene Erkrankung [1, 2, 17]. Aus diesem Grund sind auch die Fallzahlen, die für die Untersuchungen dieser Studie zur Verfügung standen, relativ gering, was eine aussagekräftige statistische Auswertung der mit diesem Erkrankungsbild in Zusammenhang stehenden Werte und Symptome in dem hier möglichen Rahmen einschränkt. Trotz der Seltenheit der Erkrankung und der Homogenität der gemessenen Werte innerhalb der Gruppen lassen sich die ermittelten Werte für dieses Kollektiv als repräsentativ beschreiben.

Insgesamt konnten wir in den vorliegenden Fällen einen Unterschied in der zellulären und humoralen Immunantwort zwischen RRP Patienten, geimpften RRP Patienten und gesunden Probanden darstellen. Weiterhin zeigen die vorliegenden Fallbeispiele, dass die Impfung der bereits an einer LP erkrankten Patienten zu einem Rückgang der Erkrankung führen kann.

6 Zusammenfassung

Die Larynxpapillomatose wird in über 90% der Fälle durch HPV 6 und 11 ausgelöst und gehört zu den häufigsten benignen Erkrankungen des Larynx. Sie lässt sich mit zwei Häufigkeitsgipfeln in eine juvenile und eine adulte Form gliedern [2, 17, 74].

In der Immunabwehr des Körpers spielen CD4+-T-Zellen eine wichtige Rolle [19, 20, 22]. Bei Patienten die an einer HPV-assoziierten Erkrankung leiden ist der Körper nicht in der Lage das Virus adäquat zu bekämpfen. Eine angemessene Therapiemöglichkeit, die nach chirurgischer Herdsanierung ein erneutes Auftreten von Papillomen verhindern könnte, ist nicht bekannt.

Die prophylaktische Impfung mit der quadrivalenten Vakzine Gardasil® beugt laut der aktuellen Studienlage einer Infektion mit HPV für 5 Jahre vor [66]. Die Impfung induziert bei gesunden Probanden Impfantigen-spezifische Antikörper sowie Impfantigen-spezifische CD4+ T-Helferzellen [51, 61]. Verschiedene Studien zeigen, dass der Impfstoff anscheinend bei Patienten die aufgrund von hochgradigen intraepithelialen Neoplasien des Analkanals und der Cervix operativ versorgt wurden, Rezidiven vorbeugt [49, 67, 68].

In der vorliegenden Arbeit wurden die Probanden dreier Studiengruppen verglichen hinsichtlich ihrer Fähigkeit HPV 6, 11, 16 und 18 L1-spezifische T-Zellen sowie HPV 6 und HPV 16 und 18 E6/E7-spezifische T-Zellen sowie HPV-spezifische AK zu produzieren. Es wurden insgesamt 32 Patienten in drei Studiengruppen unterschiedlichen Alters und Geschlechts mittels ex-vivo-assay auf die quantitative Ausprägung der HPV-Antigen-spezifischen T-Zellantwort sowie mittels serologischem Multiplex-assay auf die Höhe der HPV-spezifischen Antikörpertiter untersucht. Eine Gruppe schloss gesunde Probanden ein, eine Gruppe an einer LP erkrankte Probanden und eine Gruppe Probanden die postoperativ nach einer Herdsanierung bei LP mit dem quadrivalenten HPV-Impfstoff Gardasil® immunisiert worden waren. Die Probanden der letzten Gruppe wurden zusätzlich in Einzelfalldarstellungen im Rahmen einer Longitudinalstudie über den gesamten Zeitraum der Impfung beobachtet.

Der ex vivo erfolgte Nachweis der CD4+ T-Helferzellen zeigt in den drei Gruppen eine quantitativ unterschiedliche Ausprägung. Ein für $p < 0,001$ hochsignifikanter Unterschied bezüglich der HPV-spezifischen CD4+ T-Helferzellfrequenzen kann zwischen der Gruppe der geimpften und beiden ungeimpften Gruppen gezeigt werden. Die beiden letztgenannten unterscheiden sich nur gering voneinander. Auffällig ist eine für $p < 0,05$ signifikant höhere

Ausprägung der HPV 6 E6/E7 spezifischen T-Helferzellen in der Gruppe der gesunden Probanden.

Bei Betrachtung der HPV-spezifischen Antikörpertiter konnte in allen drei Gruppen bei einigen Probanden eine Serokonversion nachgewiesen werden. Bei den Probanden nach Impfung waren signifikant höhere L1-spezifische Antikörpertiter nachweisbar. Ein signifikanter Unterschied bei der Ausprägung der E6 und E7 spezifischen AK-Titer konnte nicht gezeigt werden.

Die im Rahmen der Querschnittstudie betrachteten Einzelfälle zeigten alle einen Anstieg der Interleukin-2 bzw. Interferon- γ produzierenden CD4+ T-Helferzellen über den Verlauf der Impfung mit Gardasil[®] sowie einen Anstieg der Antikörpertiter. Dieser Anstieg war aber in keinem der Fälle signifikant. Den deutlichsten Anstieg zeigten die AK-Titer gegen die High-Risk-Typen HPV 16 und 18, die nicht als Verursacher der Erkrankung nachgewiesen worden waren. Bei drei von vier Probanden war nach der Impfung ein deutlicher Rückgang der OP-Häufigkeiten sowie eine enorme Verbesserung der klinischen Symptomatik, dargestellt mit Hilfe des Derkay Scores, bis hin zur Symptomfreiheit, zu verzeichnen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten HPV-L1-spezifische IL-2+ sowie IFN- γ + T-Helferzellen bei gesunden, an einer LP erkrankten sowie erkrankten Probanden nach postoperativer HPV-Impfung nachgewiesen werden. Es wurden signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen festgestellt. Nach einer Impfung waren höhere T-Zellfrequenzen nachweisbar wie es schon in vorangegangenen Studien an gesunden geimpften Probandinnen gezeigt wurde. Ein deutlicher Unterschied zwischen kranken und gesunden Probanden zeigte sich aber nicht, was vermuten lässt, dass nicht alleine die T-Zellen für eine funktionierende Virusabwehr ausreichend sind. Eine ähnliche Entwicklung zeigte die Messung der Antikörpertiter. Im Rahmen dieser Studie konnte jedoch gezeigt werden, dass eine postoperative Impfung bei Patienten mit einer LP analog zu den Behandlungsversuchen bei Patienten mit einer intraepithelialen Neoplasie der Zervix oder des Analkanals zu einer geringeren Anzahl an Rezidiven führt.

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse sollten der T-Zellnachweis sowie der AK-Titer Nachweis mit größeren Fallzahlen wiederholt werden und es sollte eine gezielte Darstellung der spezifischen T-Zellfrequenzen gegen E6/E7 bei gesunden, kranken und geimpften Probanden im Vergleich erfolgen. Der große Unterschied in der Ausprägung der t-Zellantwort spielt möglicherweise eine große Rolle bei der Fähigkeit Viren abzuwehren. Zudem scheint die Impfung in diesem Bereich eine Induktion hervorzurufen.

Sollten die Ergebnisse dieser Arbeit in weiteren Studien bestätigt werden, wäre die Impfung mit einem HPV-Impfstoff als eine adjuvante Therapiemöglichkeit bei betroffenen Patienten in Betracht zu ziehen.

7 Literaturverzeichnis

1. *Impfprävention HPV-assoziiertes Neoplasien. S3 Leitlinie der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie (AG HPV-Management-Forum)*http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/082-002_S3_Impfpraevention_HPV-assoziiertes_Neoplasien_06-2008_06-2013.pdf.
2. Albers, A.E., et al., [*Prophylactic and therapeutic vaccines against human papilloma virus*]. HNO, 2010. 58(8): p. 778-90.
3. Aaltonen, L.M., H. Rihkanen, and A. Vaheri, *Human papillomavirus in larynx*. Laryngoscope, 2002. 112(4): p. 700-7.
4. Stamataki, S., et al., *Juvenile recurrent respiratory papillomatosis: still a mystery disease with difficult management*. Head Neck, 2007. 29(2): p. 155-62.
5. Schmitt, M., et al., *Homogeneous amplification of genital human alpha papillomaviruses by PCR using novel broad-spectrum GP5+ and GP6+ primers*. J Clin Microbiol, 2008. 46(3): p. 1050-9.
6. Delere, Y., et al., *Human Papillomavirus prevalence and probable first effects of vaccination in 20 to 25 year-old women in Germany: a population-based cross-sectional study via home-based self-sampling*. BMC Infect Dis, 2014. 14: p. 87.
7. Remschmidt, C., et al., *Risk factors for cervical human papillomavirus infection and high-grade intraepithelial lesion in women aged 20 to 31 years in Germany*. Int J Gynecol Cancer, 2013. 23(3): p. 519-26.
8. Kube, T. and A. Kaufmann, *Prävention und Früherkennung HPV-assoziiertes Malignome*. Onkologie heute, 2012: p. 36-40.
9. Steben, M. and E. Duarte-Franco, *Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology*. Gynecol Oncol, 2007. 107(2 Suppl 1): p. S2-5.
10. O'Brien, P.M. and M. Saveria Campo, *Evasion of host immunity directed by papillomavirus-encoded proteins*. Virus Res, 2002. 88(1-2): p. 103-17.
11. *S3-Leitlinie zur Prävention HPV-assoziiertes Neoplasien*. Available from: http://www.hpv-impfleitlinie.de/leitlinie_02.html.
12. Lee, J.H. and R.J. Smith, *Recurrent respiratory papillomatosis: pathogenesis to treatment*. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg, 2005. 13(6): p. 354-9.
13. Stern, P.L., et al., *Therapy of human papillomavirus-related disease*. Vaccine, 2012. 30 Suppl 5: p. F71-82.
14. Fang, L., et al., *Induction of productive human papillomavirus type 11 life cycle in epithelial cells grown in organotypic raft cultures*. Virology, 2006. 347(1): p. 28-35.
15. Kreimer, A.R., et al., *Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2005. 14(2): p. 467-75.
16. Smith, E.M., et al., *Human papillomavirus seropositivity and risks of head and neck cancer*. Int J Cancer, 2007. 120(4): p. 825-32.
17. Andratschke, M., C. Betz, and A. Leunig, [*Laryngeal papillomatosis: etiology, diagnostics and therapy*]. HNO, 2008. 56(12): p. 1190-6.
18. Forster, G., et al., [*Juvenile laryngeal papillomatosis--immunisation with the polyvalent vaccine gardasil*]. Laryngorhinootologie, 2008. 87(11): p. 796-9.
19. Huppelsberg, J., Walter, K., *Kurzlehrbuch Physiologie*. Vol. 2. 2005, Stuttgart: Thieme. 30-37.
20. Stanley, M., L. Gissmann, and D. Nardelli-Haeffliger, *Immunobiology of human papillomavirus infection and vaccination - implications for second generation vaccines*. Vaccine, 2008. 26 Suppl 10: p. K62-7.
21. Linsley, P.S. and J.A. Ledbetter, *The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen*. Annu Rev Immunol, 1993. 11: p. 191-212.
22. Frensch, M., et al., *Direct access to CD4+ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression*. Nat Med, 2005. 11(10): p. 1118-24.
23. Larson, D.A. and C.S. Derkay, *Epidemiology of recurrent respiratory papillomatosis*. APMIS, 2010. 118(6-7): p. 450-4.
24. Aaltonen, L.M., et al., *Poor antibody response against human papillomavirus in adult-onset laryngeal papillomatosis*. J Med Microbiol, 2001. 50(5): p. 468-71.

25. Albers, A.E. and A.M. Kaufmann, *Therapeutic human papillomavirus vaccination*. Public Health Genomics, 2009. 12(5-6): p. 331-42.
26. Lee, S.M., et al., *Risk of Vertical Transmission of Human Papillomavirus throughout Pregnancy: A Prospective Study*. PLoS One, 2013. 8(6): p. e66368.
27. Chadha, N.K., et al., *The quality of life and health utility burden of recurrent respiratory papillomatosis in children*. Otolaryngol Head Neck Surg, 2010. 143(5): p. 685-90.
28. Boltezar, I.H., et al., *Adjuvant therapy for laryngeal papillomatosis*. Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat, 2011. 20(3): p. 175-80.
29. Maloney, E.M., et al., *Longitudinal measures of human papillomavirus 6 and 11 viral loads and antibody response in children with recurrent respiratory papillomatosis*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2006. 132(7): p. 711-5.
30. Walther, E.K. and C. Herberhold, *[Treatment of laryngotracheal papillomatosis with combined use of laser surgery and intralesional administration of alpha-interferon (Roferon)]*. Laryngorhinotologie, 1993. 72(10): p. 485-91.
31. Dedo, H.H. and K.C. Yu, *CO(2) laser treatment in 244 patients with respiratory papillomas*. Laryngoscope, 2001. 111(9): p. 1639-44.
32. Bergler, W., et al., *[The treatment of juvenile laryngeal papillomatosis with argon plasma coagulation]*. Dtsch Med Wochenschr, 1997. 122(34-35): p. 1033-6.
33. Janda, P., et al., *Preliminary report of endolaryngeal and endotracheal laser surgery of juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis by Nd:YAG laser and a new fiber guidance instrument*. Otolaryngol Head Neck Surg, 2004. 131(1): p. 44-9.
34. Pasquale, K., et al., *Microdebrider versus CO2 laser removal of recurrent respiratory papillomas: a prospective analysis*. Laryngoscope, 2003. 113(1): p. 139-43.
35. Naiman, A.N., et al., *Intralesional cidofovir and surgical excision for laryngeal papillomatosis*. Laryngoscope, 2003. 113(12): p. 2174-81.
36. Pudszuhn, A., et al., *Intralesional Cidofovir application in recurrent laryngeal papillomatosis*. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2007. 264(1): p. 63-70.
37. Neumann, K., et al., *[Intralesional cidofovir injections for recurrent laryngeal papillomatosis: first results]*. Laryngorhinotologie, 2003. 82(10): p. 700-6.
38. Naiman, A.N., et al., *Intermediate-term and long-term results after treatment by cidofovir and excision in juvenile laryngeal papillomatosis*. Ann Otol Rhinol Laryngol, 2006. 115(9): p. 667-72.
39. Zeitels, S.M., et al., *Local injection of bevacizumab (Avastin) and angiolytic KTP laser treatment of recurrent respiratory papillomatosis of the vocal folds: a prospective study*. Ann Otol Rhinol Laryngol, 2011. 120(10): p. 627-34.
40. Rosen, C.A. and P.C. Bryson, *Indole-3-carbinol for recurrent respiratory papillomatosis: long-term results*. J Voice, 2004. 18(2): p. 248-53.
41. Fachinformation Gardasil <http://www.medicines.org.uk/EMC/medicine/19016/SPC/GARDASIL/>.
42. Fachinformation Cervarix <http://www.medicines.org.uk/emc/medicine/20204/SPC/cervarix/>.
43. European Medicine Agency: Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels: Gardasil [http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR - Product Information/human/000703/WC500021142.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000703/WC500021142.pdf).
44. Giuliano, A.R., et al., *Efficacy of quadrivalent HPV vaccine against HPV Infection and disease in males*. N Engl J Med, 2011. 364(5): p. 401-11.
45. Palefsky, J.M., et al., *HPV vaccine against anal HPV infection and anal intraepithelial neoplasia*. N Engl J Med, 2011. 365(17): p. 1576-85.
46. Goldstone, S.E., et al., *Quadrivalent HPV vaccine efficacy against disease related to vaccine and non-vaccine HPV types in males*. Vaccine, 2013. 31(37): p. 3849-55.
47. Petrosky, E., et al., *Use of 9-Valent Human Papillomavirus (HPV) Vaccine: Updated HPV Vaccination Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2015. 64(11): p. 300-4.
48. Paavonen, 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. 301-14.

49. Joura, E.A., 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. 1693-702.
50. Lin, K., et al., *Therapeutic HPV DNA vaccines*. Immunologic Research, 2010. 47(1-3): p. 86-112.
51. Ramseger, A., *Messung zellulärer Immunantworten im Rahmen der prophylaktischen Impfung gegen Humane Papillomviren*, in *Klinik für Gynäkologie mit Schwerpunkt gynäkologischer Onkologie 2009*, Charité - Universitätsmedizin Berlin: Berlin.
52. antikoerper-online.de. *Durchflusszytometrie (FACS): Messprinzip & Aufbau*. Available from: <http://www.antikoerper-online.de/resources/17/607/Durchflusszytometrie+FACS+Messprinzip++Aufbau/>.
53. Maria Zeilinger, U.D.D.m.W.H. *Durchflusszytometrie - eine Einführung*. 2006; Available from: http://www.med4you.at/laborbefunde/techniken/durchflusszytometrie/lbef_durchflusszytometrie.htm.
54. *Introduction to flow cytometry A guide to flow cytometry. How does it work? What is it used for?* <http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=11446>.
55. BD Biosciences *Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide* http://www.stemcell.umn.edu/prod/groups/med/@pub/@med/documents/asset/med_80691.pdf.
56. Waterboer, T., et al., *Multiplex human papillomavirus serology based on in situ-purified glutathione s-transferase fusion proteins*. Clin Chem, 2005. 51(10): p. 1845-53.
57. Kreimer, A.R., et al., *Evaluation of human papillomavirus antibodies and risk of subsequent head and neck cancer*. J Clin Oncol, 2013. 31(21): p. 2708-15.
58. Derkay, C.S., et al., *Analysis of a staging assessment system for prediction of surgical interval in recurrent respiratory papillomatosis*. Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 2004. 68(12): p. 1493-8.
59. Hester, R.P., et al., *Reliability of a staging assessment system for recurrent respiratory papillomatosis*. Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 2003. 67(5): p. 505-9.
60. Welters, M.J., et al., *Frequent display of human papillomavirus type 16 E6-specific memory T-Helper cells in the healthy population as witness of previous viral encounter*. Cancer Res, 2003. 63(3): p. 636-41.
61. Pacher, S.K., *Direkter longitudinaler Vergleich von T-Helfer-Zell Antworten auf prophylaktische HPV-Impfstoffe über einen Zeitraum von 12 Monaten*, in *Klinik für Gynäkologie mit Schwerpunkt gynäkologischer Onkologie 2011*, Charité-Universitätsmedizin Berlin: Berlin.
62. *Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent high-grade cervical lesions*. N Engl J Med, 2007. 356(19): p. 1915-27.
63. Dillner, J., et al., *Four year efficacy of prophylactic human papillomavirus quadrivalent vaccine against low grade cervical, vulvar, and vaginal intraepithelial neoplasia and anogenital warts: randomised controlled trial*. BMJ, 2010. 341: p. c3493.
64. Garland, S.M., et al., *Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases*. N Engl J Med, 2007. 356(19): p. 1928-43.
65. Haupt, R.M. and H.L. Sings, *The efficacy and safety of the quadrivalent human papillomavirus 6/11/16/18 vaccine gardasil*. J Adolesc Health, 2011. 49(5): p. 467-75.
66. Villa, L.L., 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. 1459-66.
67. Kang, W.D., H.S. Choi, and S.M. Kim, *Is vaccination with quadrivalent HPV vaccine after loop electrosurgical excision procedure effective in preventing recurrence in patients with high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN2-3)?* Gynecol Oncol, 2013. 130(2): p. 264-8.
68. Swedish, K.A., S.H. Factor, and S.E. Goldstone, *Prevention of recurrent high-grade anal neoplasia with quadrivalent human papillomavirus vaccination of men who have sex with men: a nonconcurrent cohort study*. Clin Infect Dis, 2012. 54(7): p. 891-8.
69. Albers, A., et al., *Antitumor activity of human papillomavirus type 16 E7-specific T cells against virally infected squamous cell carcinoma of the head and neck*. Cancer Res, 2005. 65(23): p. 11146-55.
70. D'Souza, G., et al., *Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer*. N Engl J Med, 2007. 356(19): p. 1944-56.

71. Einstein, M.H., et al., *Clinician's guide to human papillomavirus immunology: knowns and unknowns*. Lancet Infect Dis, 2009. 9(6): p. 347-56.
72. Rosales, R., M. Lopez-Contreras, and R.R. Cortes, *Antibodies against human papillomavirus (HPV) type 16 and 18 E2, E6 and E7 proteins in sera: correlation with presence of papillomavirus DNA*. J Med Virol, 2001. 65(4): p. 736-44.
73. Erickson, B.K., E.E. Landers, and W.K. Huh, *Update on vaccination clinical trials for HPV-related disease*. Clin Ther, 2014. 36(1): p. 8-16.
74. Bonagura, V.R., et al., *Recurrent respiratory papillomatosis: a complex defect in immune responsiveness to human papillomavirus-6 and -11*. APMIS, 2010. 118(6-7): p. 455-70.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Ablauf der Studie.....	13
Abbildung 2: Ablauf des ex-vivo-assays (Vorlage aus [51]):.....	16
Abbildung 3: Prinzip der Durchflusszytometrie (Abbildung aus [54]).....	20
Abbildung 4: Bildung des Seitwärts- (SSC) und Vorwärtsstreulichtes (FSC) (Abbildung aus [55])	21
Abbildung 5: FACS Dot plot-Darstellung zur Gatingstrategie	22
Abbildung 6: Vergleich IL-2 produzierender, spezifischer T-Helferzellen gegen HPV 6, 11, 16 und 18 L1- Antigen abhängig vom Erkrankungs- bzw. Impfstatus der Probanden.....	30
Abbildung 7: Vergleich IFN- γ produzierender, spezifischer T-Helferzellen gegen HPV 6, 11, 16 und 18 L1 Antigen abhängig vom Erkrankungs- bzw. Impfstatus der Probanden.....	33
Abbildung 8: Vergleich HPV-spezifischer Antikörper abhängig vom Krankheitsstatus.....	37
Abbildung 9: Vergleich IL-2 produzierender, spezifischer T-Helferzellen gegen einen Mix aus E6/E7-Protein von HPV 16/18 sowie HPV6 zwischen der Gruppe der erkrankten und gesunden Probanden	40
Abbildung 10: Darstellung der prozentualen Anteile der HPV 6, 11, 16 und 18 L1 spezifischen IL2 produzierenden T-Helferzellen an der Gesamtmenge der CD4+ T-Helferzellen im direkten Vergleich	43
Abbildung 11: Direkter Vergleich HPV-spezifischer Antikörpertiter gegen HPV6, 11, 16 und 18 L1 in den betrachteten Fällen vor und nach ihrer Impfung mit Gardasil®	44
Abbildung 12: Verlauf der IL-2 positiven T-Zellen in Fall 1.....	47
Abbildung 13: Verlauf der IFN- γ – positiven T-Zellfrequenzen in Fall 1	48
Abbildung 14: Verlauf der T-Zellfrequenzen gegen HPV6 E6/E7 und HPV16/18 E6/E7 in Fall 1.....	49
Abbildung 15: Verlauf der HPV-L1-spezifischen Antikörpertiter gegen die Antigene von HPV6, 11, 16 und 18 über den Zeitraum der Impfung in Fall 1	50
Abbildung 16: Verlauf des Punktwertes im Derkey Score im Zeitraum der Impfung in Fall 1.....	52
Abbildung 17: Häufigkeiten der Operationen pro Jahr seit Diagnosestellung in Fall 1	53
Abbildung 18: Verlauf der IL-2 positiven T-Zellfrequenzen in Fall 2.....	55
Abbildung 19: Verlauf der IFN- γ positiven T-Zellfrequenzen in Fall 2	56
Abbildung 20: Verlauf der T-Zellfrequenzen gegen HPV6 E6/E7 und HPV16/18 E6/E7 in Fall 2.....	57
Abbildung 21: Verlauf der HPV-L1-spezifischen Antikörpertiter gegen die Antigene von HPV 6, 11, 16 und 18 über den Zeitraum der Impfung in Fall 2	58
Abbildung 22: Verlauf der Punktwerte im Derkey Score im Zeitraum der der Impfung in Fall 2	59
Abbildung 23: Häufigkeiten der Operationen pro Jahr seit Diagnosestellung in Fall 2	60
Abbildung 24: Verlauf der IL-2 positiven T-Zellfrequenzen in Fall 3.....	63
Abbildung 25: Verlauf der IFN- γ positiven T-Zellfrequenzen in Fall 3	64
Abbildung 26: Verlauf der T-Zellfrequenzen gegen HPV6 E6/E7 und HPV16/18 E6/E7 in Fall 3.....	65
Abbildung 27: Verlauf der HPV-L1-spezifischen Antikörpertiter im Zeitraum der Impfung in Fall 3.....	67
Abbildung 28: Verlauf der Punktwerte im Derkey Score im Zeitraum der Impfung in Fall 3.....	68
Abbildung 29: Häufigkeiten der Operationen pro Jahr seit Diagnosestellung in Fall 3	69
Abbildung 30: Verlauf der IL-2- positiven T-Zellfrequenzen in Fall 4.....	71
Abbildung 31: Verlauf der HPV-L1-spezifischen Antikörpertiter im Zeitraum der Impfung in Fall 4.....	72
Abbildung 32: Verlauf der Punktwerte im Derkey Score im Zeitraum der Impfung in Fall 4.....	73
Abbildung 33: Häufigkeiten der Operationen pro Jahr seit Diagnosestellung in Fall 4	73

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Materialien	15
Tabelle 2: Definition der Grenzwerte der Positivität der verwendeten einzelnen HPV-Antigene	24
Tabelle 3: Vergleich CD4+ HPV-spezifischer IL-2 produzierender T-Helferzellen abhängig vom Studienkollektiv	31
Tabelle 4: Vergleich CD4+ HPV-spezifischer IFN- γ produzierender T-Helferzellen abhängig vom Studienkollektiv	34
Tabelle 5: Vergleich HPV-spezifischer Antikörpertiter abhängig vom Krankheitsstatus.....	38

10 Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
AK	Antikörper
ALP	adulte Larynxpapillomatose
ANOVA	engl. analysis of variance
APC	Allophycocyanin
Aqua dest.	lat. aqua destillata
BD	Becton Dickinson
BSA	bovines Serumalbumin (BSA)
CD	engl. cluster of differentiation
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
E-Proteine	engl. early proteins
FACS	engl. fluorescence-activated cell sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	engl. forward scatter
g	Beschleunigung
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HNO	Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde
HPV	Humane Papillom Viren
HR	High-Risk
I3C	Indol-3-Carbinol
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
JLP	juvenile Larynxpapillomatose
L1	engl. late protein 1
LP	Larynxpapillomatose
LR	Low-Risk
MFI	engl. median fluorescence intensity
MHC I/II	engl. major histocompatibility complex I/II
MPG	Multiplex Genotyping
p	Wahrscheinlichkeit
p53	Tumorsuppressorgen mit Molekulargewicht von 53kD
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBS	engl. phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDT	photodynamische Therapie
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
Rb	Retinoblastom
RPMI	Zellkulturmedium
SEB	Staphylococcus Enterotoxin B
SPSS	Statistik und Analyse Software
SSC	engl. side scatter
TCR	T-Zellrezeptoren
TH1/TH2	T-Helferzellen
TZ	T-Zellen
Vgl.	vergleiche
VLP	Virus-like-particles

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Tanja Vanessa Wittchen, geb. Fromm, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Charakterisierung der zellulären und humoralen Immunantwort bei RRP Patienten nach prophylaktischer HPV-Impfung mit Gardasil“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

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

Danksagung

Ich danke Herrn Privatdozent Dr. Andreas Kaufmann. Er gab mir die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren. Er unterstützte stets meine Arbeit und war bei offenen Fragen und Problemen jederzeit ein kompetenter und geduldiger Ansprechpartner.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Andreas Albers für die Zusammenarbeit und die Bereitstellung des Themas.

Ein besonderer Dank geht an Frau Martina Seipel, die mich in die Techniken und Methoden der Laborarbeit und vor allem in die Bedienung des FACS Gerätes eingearbeitet hat.

In diesem Zusammenhang möchte ich auch Frau Tina Kube ganz herzlich danken. Von ihr erhielt ich stets Unterstützung bei meiner Arbeit während der gesamten Zeit im Labor. Bei jedem Problem wusste sie einen Rat und hatte stets ein offenes Ohr. Ohne sie wäre der Forschungsalltag um einiges schwieriger gewesen.

Ich danke der gesamten Arbeitsgruppe für die freundliche und kollegiale Zusammenarbeit während der gesamten Zeit.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Dr. Tim Waterboer und Herrn Dr. M. Pawlita vom DKFZ-Heidelberg für die Durchführung der serologischen Messungen.

Weiterhin danke ich Herrn Cornelius Remschmidt für die unkomplizierte und schnelle Unterstützung bei Fragen zu meinen statistischen Auswertungen.

Meinen Probanden und Probandinnen danke ich für die Teilnahme an der Studie und die zahlreichen Probenspenden. Den behandelnden Ärzten danke ich für die kompetente und freundliche Zusammenarbeit.

Zum Schluss bedanke ich mich bei meinen Eltern Frau Gabriele Fromm und Herrn Gerhard Fromm für die jahrelange Unterstützung schon während meines Studiums der Humanmedizin und für das stete Vertrauen in meine Fähigkeiten. Meinem Vater danke ich besonders für die verlässliche, unermüdliche und kompetente Hilfe bei Arbeiten mit Excel, SPSS und Word, mit denen ich hin und wieder auf Kriegsfuß stand. Meiner Mutter danke ich vor allem für ihre ständige Unterstützung, für das Korrekturlesen und für die Hilfe bei Übersetzungen ins Englische. Ich danke meiner Großmutter Frau Gertrude Brandl für die vielen aufmunternden Worte. Bei meiner Familie Herrn Markus Wittchen und Julia Wittchen möchte ich mich für die Unterstützung und Ermutigung während der Zeit bis zum erfolgreichen Abschluss meiner Arbeit bedanken. Besonders danke ich meinem Ehemann für seine Zeit und seine ausdauernde Unterstützung und Hilfe.