

Miriam Reuschenbach  
Dr. med.

## **Charakterisierung der humoralen Immunantwort gegen p16<sup>INK4a</sup>, p53, HPV16 E6 und HPV16 E7 bei Zervixkarzinompatientinnen**

Geboren am 24.02.1980 in Frankfurt am Main  
Staatsexamen am 16.05.2007 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Pathologie  
Doktorvater: Prof. Dr. med. Magnus von Knebel Doeberitz

Die Untersuchung der spontanen Immunantwort gegen vom Tumor exprimierte Antigene ist ein wichtiger Bestandteil der Entwicklung neuer diagnostischer, prognostischer und vor allem therapeutischer Verfahren in der Behandlung von Krebspatienten. Es gibt zahlreiche Tumorantigene, gegen die eine spontane zelluläre und humorale Immunantwort bei Patienten gefunden wurde und gegen die heute in Impfstudien versucht wird, eine tumorzerstörende Immunantwort zu induzieren oder zu verstärken, wie z. B. MUC1, NY-ESO-1 und Her2/*neu*.

Infolge der Unterbrechung eines zellulären Regelkreises durch das von karzinogenen humanen Papillomviren (HR-HPV) kodierte Onkoprotein E7 kommt es zur unkontrollierten Expression des körpereigenen Proteins p16<sup>INK4a</sup> in invasiven Zervixkarzinomen und hochgradigen zervikalen Dysplasien sowie anderen HR-HPV induzierten Karzinomen.

In seiner physiologischen Funktion wird p16<sup>INK4a</sup> im Rahmen von Seneszenzvorgängen exprimiert und führt zur Apoptose der Zelle. Daher ist in gesundem Gewebe p16<sup>INK4a</sup> kaum nachweisbar. Dieses Expressionsmuster macht p16<sup>INK4a</sup> zu einem interessanten Kandidaten für immuntherapeutische Ansätze beim Zervixkarzinom. Eine spontane adaptive zelluläre Immunantwort gegen p16<sup>INK4a</sup> konnte bei Zervixkarzinompatientinnen bereits gefunden werden.

Erstes Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob es eine spontane humorale Immunantwort gegen p16<sup>INK4a</sup> gibt und ob es eine Assoziation mit einer HPV-bedingten p16<sup>INK4a</sup>-Überexpression gibt. Zweites Ziel war die Bestimmung von Antikörpern gegen HPV16 E6 und HPV16 E7 als bekannte Antigene beim Zervixkarzinom sowie gegen p53 als ein gut charakterisiertes intrazelluläres Autoantigen.

Insgesamt wurden 919 Seren untersucht. Darunter waren 433 konsekutive Seren von Zervixkarzinompatientinnen, Patienten mit HPV16-induzierten oropharyngealen Karzinomen, Patienten mit kolorektalen Karzinomen und Patienten mit systemischen Autoimmunerkrankungen sowie 486 Seren einer Zervixkarzinom-Fall-Kontroll-Serie. Für die initiale Identifizierung von p16<sup>INK4a</sup>-Autoantikörpern in einem Teil der Seren wurden rekombinante p16<sup>INK4a</sup>-Konstrukte (His-p16<sup>INK4a</sup> und GST-p16<sup>INK4a</sup>) generiert und als Antigen im Western Blot verwendet. Anschließend wurde ein Peptid-ELISA als Hochdurchsatzverfahren entwickelt und alle 919 Seren untersucht sowie die reagierenden Epitope und Antikörperklassen eingegrenzt. In einem Bead basierten Multiplex-Assay wurden in allen 919 Seren Antikörper gegen HPV16 E6 und HPV16 E7 sowie p16<sup>INK4a</sup> und p53 gemessen.

p16<sup>INK4a</sup>-Autoantikörper wurden in allen untersuchten Kollektiven bei 2 % bis 8 % aller Seren ohne eine Assoziation mit einer bestimmten Krankheitsentität gefunden;

insbesondere konnte kein Zusammenhang einer humoralen Immunantwort gegen p16<sup>INK4a</sup> mit einer HPV-induzierten p16<sup>INK4a</sup>-Überexpression bei Zervixkarzinompatientinnen gefunden werden (Odds-Ratio (OR) = 1,1 (95 %CI = 0,5 - 2,5); „Area under the Curve“ (AUC) der Receiver-Operator-Characteristic-Analyse = 0,5 (95 %CI = 0,4 - 0,5)).

Für Antikörper gegen die viralen Onkoproteine E6 und E7 wurde eine Assoziation mit einem HPV-induzierten Karzinom gefunden (OR = 27,8 (95 %CI = 11,1 - 69,7) für E6 und 5,7 (95 %CI = 2,9 - 11,1) für E7). Außerdem wurde eine inverse Korrelation des Vorkommens von HPV16 E6-Antikörpern mit p53-Antikörpern gefunden, die am ausgeprägtesten in den Seren der Patienten mit HPV16-induzierten Kopf-Hals-Tumoren war (OR = 15,6 (95 %CI = 1,3 - 182,1)). Auch für p53-Autoantikörper ergab sich kein Unterschied in der Zervixkarzinom-Fall-Kontroll-Serie (OR = 0,6 (95 %CI = 0,3 - 1,2)). Es konnte eine leichte Korrelation des Vorkommens von p16<sup>INK4a</sup>-Autoantikörpern mit Autoantikörpern gegen p53 gefunden werden (OR = 4,3 (95 %CI = 2,0 - 9,3)).

Die Assoziation von Antikörpern gegen HPV-Onkoproteine mit HPV-assoziierten Tumoren bestätigt frühere Daten. Der Einsatz der HPV-Serologie als Krankheitsverlaufparameter sollte in weiteren Studien analysiert werden.

Obwohl keine Korrelation einer humoralen Immunantwort gegen p16<sup>INK4a</sup> mit einer HPV-induzierten Tumorerkrankung gefunden wurde, kann aus den Ergebnissen gefolgert werden, dass es keine vollkommene Immuntoleranz gegenüber p16<sup>INK4a</sup> gibt und dass keine klinischen Anhaltspunkte einer Autoimmunreaktion bei Individuen mit p16<sup>INK4a</sup>-Autoantikörpern gefunden werden können. Damit geben die Ergebnisse dieser Arbeit vielversprechende Hinweise darauf, dass p16<sup>INK4a</sup> ein interessantes Zielantigen für eine aktive Immunisierung von Zervixkarzinompatientinnen sein könnte.