

Ulrich Reidel
Dr. med.

Detektion der humoralen Immunantwort bei persistierenden Virusinfektionen mittels neu entwickelter Enzyme-linked Immunosorbent Assays am Beispiel des Humanen Papillomvirus und des Borna Disease Virus

Geboren am 06.10.1977 in Saarbrücken
Staatsexamen am 29.11.2004 an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Promotionsfach: Deutsches Krebsforschungszentrum
Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. H. zur Hausen

Die Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle und des Pharynx (HNSCC) stellen ein weltweit wachsendes Gesundheitsproblem dar. Es mehren sich die Hinweise, dass eine bestimmte Untergruppe der HNSCC mit Humanen Papillomviren (HPV) assoziiert sein könnte, wobei die beim Zervixkarzinom (CxCa) dominierenden HPV-Typen 16 und 18 am häufigsten sind. In CxCa-Tumorzellen werden die HPV-Onkoproteine E6 und E7 konsistent exprimiert und Antikörper gegen E6 und E7 von HPV16 und 18 sind stark mit Gebärmutterhalskrebs assoziiert, weshalb sie dort als Tumormarker gelten. In der vorliegenden Arbeit wurde nun erstmalig in einer großen multizentrischen Fall-Kontroll-Studie die HPV16 und 18 E6 und E7- Antikörperprävalenzen in Patienten mit HNSCC untersucht. HNSCC-Patienten wiesen signifikant höhere E6- und/ oder E7-Seroprävalenzen gegen die häufigen Hoch-Risiko-HPV-Typen 16 und 18 auf als gesunde Kontrollen ($p < 0,0001$). Vor allem in Oropharynxkarzinomen war dieser Befund gut mit dem HPV-DNA-Status der Tumorbiopsien korreliert. Beim Oropharynxkarzinom wurde mit fortschreitendem AJCC-Tumorstadium (0-II auf III-IV) ein statistisch signifikanter Anstieg der HPV-16 E6/E7-Seropositivität beobachtet ($p = 0,005$). Erstmals wurden hier Antikörper gegen HPV18 E6/E7-Antigene in HNSCC nachgewiesen. Antikörper waren sehr viel häufiger gegen HPV16 als gegen HPV18 gerichtet, E6- waren häufiger als E7-Antikörper. Nach neueren Untersuchungen gelten E6-Antikörper als Marker für die biologische Aktivität des Virus im Tumor und damit seine ätiologische Relevanz. Es ist bekannt, dass die Untergruppe von HPV-assoziierten Oropharynxkarzinomen strahlensensibler und daher prognostisch günstiger ist als das herkömmliche nicht-HPV-assoziierte Oropharynxkarzinom. Somit könnten Antikörper gegen HPV16 und 18 E6 und E7 als therapeutisch und prognostisch relevanter Marker beim Oropharynxkarzinom dienen.

Der Nachweis von Antikörpern gegen Borna Disease Virus (BDV)-Antigene in psychiatrischen Patienten legte 1985 die Frage nahe, ob das BDV, der Erreger der Bornaschen Krankheit, einer Enzephalomyelitis der Pferde, auch den Menschen infizieren kann und ob eine Korrelation zwischen dem Auftreten psychiatrischer Erkrankungen und einer Infektion mit dem Borna Disease Virus besteht. Bis heute fehlt ein validierter einfacher objektiver Gold-Standard-Test, der es ermöglichen könnte, große epidemiologische Studien durchzuführen. Ziel dieses Abschnittes war es, ELISA für humane Antikörper gegen M, N, P und X-Protein von BDV zu entwickeln und zu validieren. Alle 4 BDV-Proteine konnten erfolgreich exprimiert und als Antigene im GST-capture-ELISA mit Seren von

experimentell infizierten Tieren validiert werden. Mittels dieser ELISA konnte nachgewiesen werden, dass Menschen Antikörper haben können, die mit den vier untersuchten BDV-Antigenen reagieren. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass das Immunsystem dieser Menschen tatsächlich BDV oder einem antigenetisch nahe verwandten Agens exponiert war. Ob beim Menschen auch Infektionen auftreten können und ob diese Infektionen mit bestimmten Krankheiten assoziiert sind, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht beantwortet werden.

Der nicht-melanozytäre Hautkrebs (NMSC) ist mit 30% der häufigste maligne Tumor beim Menschen mit geringer Mortalität, aber hoher Morbidität. Es mehren sich die Hinweise, dass neben UV-Strahlung und Immunsuppression auch die persistierende HPV-Infektion ein wichtiger Risikofaktor für NMSC sein könnte, wobei die bei Patienten mit der seltenen autosomal-rezessiven Erbkrankheit Epidermodysplasia verruciformis (EV) dominierenden HPV-Typen 5, 8 und 38 auch bei NMSC in Immunkompetenten zu dominieren scheinen. Die Serologie mit L1-Kapsidantigenen kutaneotroper HPV-Typen lieferte bisher interessante, aber widersprüchliche Ergebnisse. Bei dem Nachweis von HPV L1-Antikörpern wurden meist VLP (virusähnliche Partikel) verwendet. Die Produktion und Aufreinigung der VLP ist jedoch sehr aufwendig und wenig ertragreich. Der GST-capture-ELISA könnte hier eine einfache, effektive und ertragreiche Alternative darstellen, um größere epidemiologische Fall-Kontrollstudien durchführen zu können, die die Frage der Assoziation von HPV mit NMSC klären könnten. Ziel dieses Abschnittes war es, ELISA für humane Antikörper gegen L1-Protein der kutaneotropen HPV-Typen 1, 3, 5, 8, 10, 32, 38 und 57 zu entwickeln und zu validieren. Alle 8 L1-Proteine konnten erfolgreich exprimiert und mit als Antigene im GST-capture-ELISA mit Daten eines VLP-ELISA validiert werden. Seren aus einer Spinaliom-(SCC)-Fall-Kontroll-Studie aus Rom (Italien) wurden auf L1-Antikörper gegen die kutaneotropen HPV-Typen 1, 3, 5, 8, 10, 32, 38 und 57 untersucht. Die Patienten wiesen insgesamt signifikant höhere Seroprävalenzen auf als die Kontrollgruppe ($p= 0,026$). Für die L1-Antigene der EV-Gruppe (HPV5, 8 und 38) war dieser Unterschied knapp signifikant ($p= 0,046$), wie auch für jedes L1-Einzelantigen aus der EV-Gruppe. Auch hinsichtlich des Merkmals „multiple Seropositivität“, d.h. Reaktivität mit mindestens drei verschiedenen HPV-Typen, war der Unterschied zwischen Fall- und Kontrollgruppe signifikant ($p= 0,011$). Ob die persistierende Infektion mit kutaneotropen HPV-Typen mit SCC oder weiteren Krankheiten assoziiert ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht beantwortet werden. Dies bleibt zukünftigen, groß angelegten, epidemiologischen Studien überlassen. Die hier entwickelte ELISA-Methodik stellt eine praktikable Alternative zu den aufwendigen VLP-ELISA für eine parallele Untersuchung vieler HPV-Typen und großer Serenzahlen bei epidemiologischen Fragestellungen dar. In Verbindung mit Luminex-Technologie hat sie bereits Eingang in mehrere serologische Fall-Kontroll-Studien gefunden.