

후두편평세포암종에서 Human papillomavirus의 검출과 주조직적합복합체(Major Histocompatibility Complex: MHC) Class I 발현양상

중앙대학교 의과대학 이비인후과학교실

오병권 · 황찬승 · 홍영호 · 김 훈 · 김춘길

고려대학교 의과대학 이비인후과학교실

민 현 기

= Abstract =

Detection of Human Papillomavirus and Expression of MHC Class I in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma

Byung Kwon Oh, M.D., Chan Seung Hwang, M.D.,
Young Ho Hong, M.D., Hoon Kim, M.D., Chun Gil Kim, M.D.

*Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery,
College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul, Korea*

Hun Ki Min, M.D.

*Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery,
College of Medicine, Korea University, Seoul, Korea*

The development of preneoplastic and neoplastic squamous cell proliferations of body sites such as the skin, female lower genital tract, and larynx is strongly associated with specific types of human papillomaviruses (HPV). Antitumor CD⁸⁺ T cells recognize peptide antigens presented on the surface of tumor cells by major histocompatibility complex (MHC) class I molecules. The MHC class I molecule is a heterodimer composed of an integral membrane glycoprotein designated the alpha chain and a noncovalently associated, soluble protein called beta-2-microglobulin(β -2-m). Loss of β -2-m generally eliminates antigen recognition by antitumor CD⁸⁺ T cells.

We evaluated the expression of β -2-m as a potential means of tumor escape from immune recognition and the presence of HPV DNA as a cause of laryngeal squamous cell carcinomas (SCCs).

Laryngeal SCCs (n=39) were analyzed for MHC class I expression by immunohistochemistry and for presence of HPV by in situ hybridization technique.

The results were as follows :

- 1) HPV DNA was detected in 10 (25.64%) out of 39 cases in laryngeal squamous cell carcinomas.
- 2) MHC class I down-regulation (heterogenous and negative expression) in HPV positive lesions was higher than HPV negative lesions.
- 3) The expression of MHC class I was related to cellular differentiation regardless of T-stage and nodal involvement.

In conclusion, HPV was thought to be the etiological factor of SCC of larynx, and we found that the down-regulation of MHC class I was a common phenomenon in laryngeal SCC and may provide a way for tumor cells to escape from immune surveillance.

Key Words : Human papillomavirus, MHC class I, beta-2-microglobulin, Laryngeal carcinoma

I. 서 론

암의 발생은 여러 인자들이 작용하고 또한 여러 단계를 거쳐서 일어나며, 최근 분자생물학의 발전으로 암조직에서 바이러스를 검출함으로써 발암 인자중 바이러스의 역할이 강조되고 있으나, 정확한 발생기전은 아직 명확하게 밝혀져 있지 않다.

HPV는 피부, 여성의 하부 생식로, 식도와 같은 인체 부위에서 발암전, 또는 종양성 편평세포 증식을 일으키며, 후두에서는 유년기 유두종증 및 성인 유두종증을 일으키는 것으로 알려져 있고, 최근 들어 HPV type 16, 18은 자궁경부암 뿐만 아니라 후두암의 발생과도 연관이 있음이 밝혀졌다^{2,12)}.

암발생에 대한 면역 반응의 역할은 의인성으로 면역이 억제된 여성이나 HIV 감염으로 인해 면역이 억제된 여성에게서 HPV와 연관된 자궁경부 병변이 증가하는 것으로써 알 수 있다¹¹⁾.

저자들은 후두편평세포암종의 원인 인자로서 HPV의 역할을 규명하고, 암종 발생기전의 하나로 생각되는 면역감시체계의 상실을 예측할 수 있는 MHC class I 발현감소와 고위험군의 HPV감염 및 병소의 임상병리학적 소견과의 연관성을 알아보하고자 하였다.

II. 대상 및 방법

1. 대 상

중앙대학교 의과대학 이비인후과학교실과 고려

대학교 의과대학 이비인후-두경부외과학교실 교실에서 조직검사로 진단된 후두편평세포암종 39례(성문상부암종 26례, 성문암종 13례)를 대상으로 하였으며, 정상대조군으로는 성대결절 10례를 대상으로 하였다. 대상례의 조직표본 재료는 적출된 조직의 hematoxylin-eosin 염색표본을 검토하여 종양이 많이 포함되고 파라핀 포매조직의 보관상태가 양호한 부위를 선택하였다.

2. 방 법

1) HPV DNA hybridization

(1) 함수화 (rehydration)

파라핀에 포매된 조직을 4-5 μ m 두께로 절편하여 L-lysine으로 처리된 슬라이드에 붙인 후 하룻밤 오븐에 두어 조직을 잘 부착시켰다. 조직을 xylene으로 탈파라핀화 시킨 후 100%에서 70%까지의 에탄올에서 순차적으로 함수과정을 거친 다음 증류수로 씻어내고 공기중에 건조시켰다.

(2) 변성화(denaturation)

Pepsin/HCL 용액에 37 $^{\circ}$ C로 10분간 담가서 tissue digestion 시킨 후 증류수로 씻어내고 공기중에 건조시켰다. HPV type 16, 18 각각의 FITC-labelled HPV probe를 한방울 (15 μ l) 떨어뜨린 후 coverslip으로 덮고 90 $^{\circ}$ C heating block plate에 slide를 6분간 놓아서 probe와 target DNA를 denaturation 시켰다.

(3) 보합반응(hybridization)

Humidified chamber에서 37 $^{\circ}$ C로 60분간 incubation

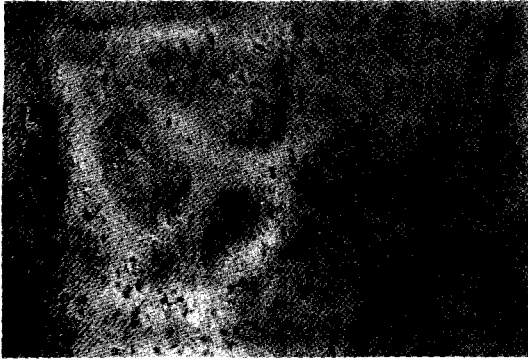


Fig. 1. Immunohistochemical staining for MHC class I in laryngeal squamous cell carcinoma. Positive reaction of dark-red color is identified in cell membranes and cytoplasm of (more than 75%) cancer cells (ABC method, x200).

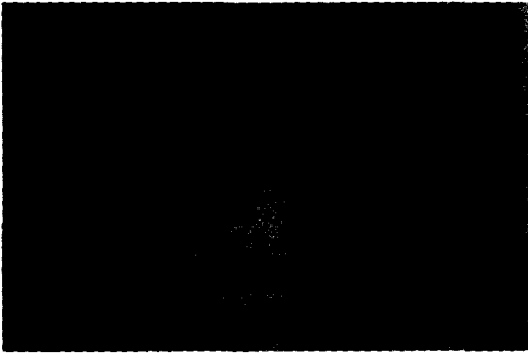


Fig. 2 Immunohistochemical staining for MHC class I shows heterogenous expression in cell membranes and cytoplasm of (25~75%) cancer cells (ABC method, x200).

하여 probe를 target DNA에 hybridization 시켰다. stringent wash 후 T1 buffer(0.1% Triton X-100을 함유한 0.05M Tris buffer)에 1시간 정도 담귀 놓아 자연적으로 coverslip이 떨어지게 하였다.

(4) 검출(detection)

비특이적 반응을 제거하기 위하여 T3 buffer (20% normal rabbit serum을 함유한 T2 buffer)에 10분간 담가 놓은 후, T2 buffer(3% bovine serum albumin을 함유한 T1 buffer)로 100배 희석한 anti-FITC/AP 시약으로 30분간 반응시켰다. 검출제로

는 biotin과 avidin 사이의 강한 결합력을 이용하여 complementary target과 결합한 biotinylated probe를 검출할 목적으로 avidin-alkaline phosphatase를 사용하였다. T1 buffer로 세척한 후 alkaline phosphatase buffer에 5분간 반응시켰다. 발색제로 사용한 NBT/BCIP(nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate)와 내재성 alkaline phosphatase를 억제하기 위하여 추가한 levamisol(1ul/ml)의 혼합용액을 alkaline phosphatase buffer로 50배 희석하여 만든 용액에 1시간 반응시킨 후 T1 buffer로 세척하였다. 대조염색으로 ethyl green을 사용하였으며 광학현미경하에 관찰하였다.

2) MHC class I 발현

(1) 면역조직화학적 염색

파라핀으로 포매한 조직을 4μm 두께의 조직절편을 만들어 90℃ 오븐에서 30분간 처리하여 silanized slides에 부착시키고 xylene으로 탈파라핀화시킨 후 알코올 처리후 증류수로 함수시켰다. 내재성 과산화수소의 활성을 억제시키기 위해 30% 과산화수소와 메탄올이 1 : 9의 비율로 혼합된 용액 (Autoblocker)에 10분간 처리하여 Tris buffered saline (0.05 M, pH 7.6) 으로 10분간 2회 세척하였다. 비특이적 항원-항체 반응을 억제하기 위하여 정상 염소 혈청으로 60분간 반응시켰다. 일차항체로는 rabbit anti-beta-2-microglobulin (ZYMED사) 을 1 : 60으로 희석하여 실온에서 하룻밤 반응시키고, Tris buffered saline으로 5분간 3회 세척한 후, biotin결합 2차항체를 실온에서 10분간 반응시킨 후 streptavidin-horseradish peroxidase를 10분간 반응시켰다. AEC chromogen용액을 이용한 발색과정을 거쳐 Meyer's Hematoxylin으로 대조염색하고 광학현미경으로 관찰하였다.

(2) 면역조직화학적 염색의 평가

암세포중 beta-2-microglobulin에 양성반응을 보이는 암세포의 %를 측정하여, MHC class I 발현 병소를 크게 3군으로 분류하였다. 암세포의 75% 이상이 염색된 경우는 양성(Fig. 1), 25-75%로 염색된 경우는 불균질(heterogenous, Fig. 2), 25% 미만으로 염색된 경우는 음성(Fig. 3)으로 하였다.

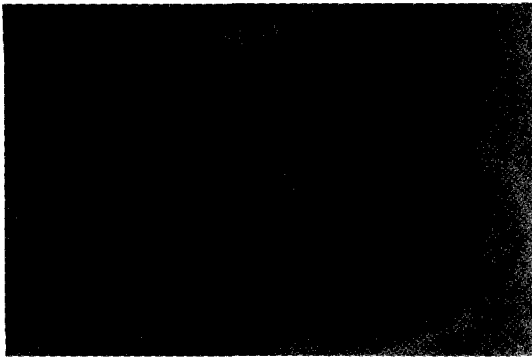


Fig. 3. Immunohistochemical staining for MHC class I shows negative expression in cell membranes and cytoplasm of (less than 25%) cancer cells (ABC method, x200).

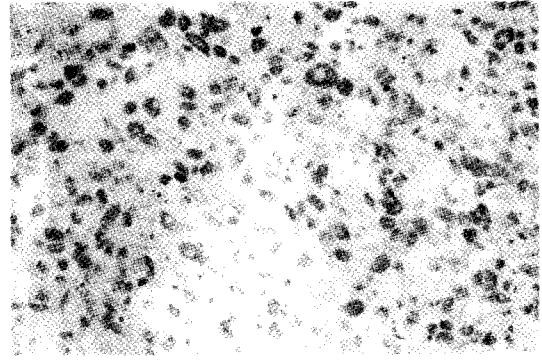


Fig. 4. Laryngeal squamous cell carcinoma. Hybridization signal for HPV type 18 probe is identified in the infected nuclei. Positive reaction reveals dark-blue color in the nuclei (ISH with FITC-labelled probe, x400).

Table 1. Prevalence and subtype of HPV in laryngeal squamous cell carcinoma

Lx SCC	No of HPV positive cases (%)		Total(%)
	16	18	
Supraglottic (N=26)	3(11.53)	5(19.23)	8(30.76)
Glottic (N=13)	- (0)	2(15.38)	2(15.38)
Total (N=39)	3 (7.69)	7(17.95)	10(25.64)

Lx SCC : laryngeal squamous cell carcinoma

3) 통계적 분석

MHC class I 발현 양상과 HPV 감염, 원발병소의 병기, 림프절 전이 및 세포분화도와의 연관성은 Fisher's exact test를 이용하였다.

III. 결 과

1. 후두편평세포암종에서 HPV 감염률

성문상부암종에서는 HPV type 16, 18이 각각 3례(11.53%), 5례(19.23%)로 총 8례(30.76%)에서 검출되었으며, 성문암종에서는 HPV type 18이 2례(15.38%)에서 검출되었다(Fig. 4, Table 1).

2. HPV 감염과 MHC class I 발현과의 연관성

HPV가 검출된 10례중 MHC class I의 양성 발현율은 10%, 감소된(불균질, 음성) 발현율은 90%

이었고, HPV가 검출되지 않은 29례 중에서는 각각 34.48%, 65.52%로 HPV가 검출된 조직에서 MHC class I 발현율이 낮게 나타났으나 통계학적 유의성은 없었다(Table 2).

3. T-병기와 MHC class I 발현과의 연관성

MHC class I 양성 발현율은 T1 50%, T2 28.57%, T3 20%, T4 40% 이었고, 감소된(불균질, 음성) 발현율은 T1 50%, T2 71.43%, T3 80%, T4 60%로 원발병소 T-병기의 진행도와 MHC class I 발현과는 상관관계가 없었다(Table 3).

4. 림프절 전이와 MHC class I 발현과의 연관성

림프절 전이가 없었던 26례중 MHC class I 양성 발현율은 23.08%이었고, 감소된(불균질, 음성) 발현율은 76.92%이었다. 림프절 전이가 있었던 13례

Table 2. Correlation between expression of MHC class I antigen and HPV infection

MHC class I	No of cases (%)		Total(%)
	HPV status		
	HPV 16/18	HPV (-)	
Positive	1(10)	10(34.48)	11(28.20)
Heterogenous	2(20)	5(17.24)	7(17.95)
Negative	7(70)	14(48.28)	21(53.85)
Total	10(100)	29 (100)	39 (100)

(p>0.05)

Table 3. Correlation between expression of MHC class I antigen and T-stage

MHC class I	No of cases (%)				Total(%)
	T-stage				
	T1	T2	T3	T4	
Positive	1 (50)	2(28.57)	4(20)	4 (40)	11(28.20)
Heterogenous	0 (0)	1(14.29)	3(15)	3 (30)	7(17.95)
Negative	1 (50)	4(57.14)	13(65)	3 (30)	21(53.85)
Total	2(100)	7 (100)	20(100)	10(100)	39 (100)

(p>0.05)

Table 4. Correlation between expression of MHC class I antigen and nodal stage

MHC class I	No of cases (%)		Total (%)
	Nodal stage		
	N 0	N 1-3	
Positive	6(23.08)	5(38.46)	11(28.20)
Heterogenous	4(15.38)	3(23.08)	7(17.95)
Negative	16(61.54)	5(38.46)	21(53.85)
Total	26 (100)	13 (100)	39 (100)

(p>0.05)

중 MHC class I 양성 발현율은 38.46%이었고, 감소된(불균질, 음성) 발현율은 61.54%로 림프절 전이와 MHC class I 발현과는 연관성이 없었다 (Table 4).

5. 세포분화도와 MHC class I 발현과의 연관성
세포분화도는 분화도가 좋은 예가 11례, 중등도

24례, 분화도가 나쁜 예가 4례 이었으며, MHC class I 양성 발현율은 분화도가 좋은 경우 36.36%, 중등도인 경우 29.17%, 나쁜 경우 0% 이었고, 감소된(불균질, 음성) 발현율은 분화도가 좋은 경우 63.64%, 중등도인 경우 70.83%, 나쁜 경우 100%로 세포분화도가 나쁠수록 MHC class I 발현이 낮게 나타났으나 통계학적 유의성은 없었다(Table 5).

Table 5. Correlation between expression of MHC class I antigen and cellular differentiation

MHC class I	No of cases (%)			Total(%)
	cellular differentiation			
	WD	MD	PD	
Positive	4(36.36)	7(29.17)	0 (0)	11(28.20)
Heterogenous	1 (9.09)	5(20.83)	1 (25)	7(17.95)
Negative	6(54.55)	12 (50)	3 (75)	21(53.85)
Total	11 (100)	24 (100)	4(100)	39 (100)

WD : well differentiated, MD : moderately differentiated, PD : poorly differentiated (p>0.05)

IV. 고 찰

HPV는 70여 아종이 알려져 있으며 HPV 16형과 18형은 주로 악성종양 조직에서 발견되며 악성종양과 관련이 있는 것으로 밝혀져 있다⁵⁾. HPV에 감염된 상피조직의 각화세포는 불멸화(immortalization)되고 비정상적인 증식을 하게 된다¹⁸⁾. 그러나 동물실험의 연구결과 이러한 불멸화와 비정상적인 증식 자체가 암증을 유발하지는 않는 것으로 밝혀져서, 고위험군의 HPV 감염 이외의 추가적인 과정들이 암증의 발생에 관여하는 것으로 알려져 있다. 이러한 과정들로는 전구암 유전자의 활성화, 암억제 유전자의 불활성화, 세포 지놈(genome)에 HPV의 통합(integration), 면역감시체계의 부진 등이 포함된다. HPV 16형과 18형의 E6 oncoprotein이 암억제 유전자 산물인 p53 단백질과 결합하여 그 결과 p53 단백질이 분해되어 종양이 유발되며¹⁰⁾, HPV에 감염된 세포에서 MHC class I 항원 분자의 발현이 억제됨으로써 세포독성 T 림프구가 바이러스 종양 항원을 인지할 수 없게 되어 세포면역 방어기전으로부터 벗어나 숙주에서 증식, 성장하여 종양이 유발된다고 보고하고 있다^{3,16)}.

종양은 다양한 생물학적 또는 생화학적 변화로 여러 세포표면분자의 발현변화를 동반하게 되는데, 이러한 세포표면분자발현의 다양한 변화는 종양세포간의 상호관계 및 종양세포의 조직 침윤성, 전이 능력과 연관성이 있어 종양의 진행 및 예후에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다¹⁹⁾.

사람의 주조직적합항원(major histocompatibility

complex, MHC)인 HLA(human leukocyte antigen)에서 class I 항원은 2개의 폴리펩티드쇄로 구성되며, 고도의 다양성을 지닌 당단백(중쇄, 분자량 40-50 kd)과 비당화 단백질인 beta-2-microglobulin(경쇄, 분자량 12 kd)이 비공유결합을 이루고 있는 단백질로서 그 유전자는 각각 6번, 15번 염색체에 존재한다. 중쇄의 세포의 친수부위는 3개 영역으로 구성되어 있으며, 이중 $\alpha 3$ 영역과 beta-2-microglobulin은 면역글로불린의 불변 부위와 유사한 구조 및 아미노산 배열을 가지고 있고, 이들의 상호작용은 세포내에서 만들어진 중쇄가 세포표면으로 발현되는데 중요한 역할을 하며¹⁴⁾, calnexin 이라는 분자가 이러한 과정을 증대하는 것으로 알려져 있다⁸⁾. MHC class I 분자는 핵을 가진 모든 세포표면에 존재하며, 세포에 따라 양적인 차이가 있어 림프계 세포표면에 제일 많은 양이 표현되고, 간, 폐, 뇌 등에는 적은 양이 표현되며⁴⁾, 이식거부 반응시 체액성(alloantibody) 및 세포성(alloreactive cytotoxic T lymphocyte) 면역반응의 표적으로 알려져 있다. 또한 바이러스에 감염되거나 화학적으로 변형된 세포 혹은 종양세포를 T세포가 인지하는데 제한인자(restricting elements)로 작용하여 면역반응에 중요한 역할을 하고 있어, 임상적으로 장기이식시 공여자 선택, 질병과의 연관성 및 병인성 연구에 이용되고 있으며, 종양세포에서 종양 전이와는 서로 반비례관계로 발현되기도 한다⁹⁾. 대부분의 HLA class I 항원은 세포표면에 존재하는 물질이지만 혈청 속에도 소량의 용해성 HLA class I 항원이 있는 것으로 밝혀졌고, 최근에는 HLA class I 항원

및 beta-2-microglobulin의 공통항원기에 대한 단 세포군항체들이 만들어짐에 따라 효소면역측정법 (ELISA)을 이용한 예민하고 특이성이 높은 측정법이 개발되어 정상인의 혈청에 일정량의 용해성 HLA class I 항원(sHLA-I)이 존재하며, 골수이식 후 이식편대숙주거부반응시에 혈중내 농도가 증가한다는 것이 밝혀져 있다¹⁷⁾.

HLA class II 분자는 항원전달 기능을 가진 일부 세포와 대식세포, B 림프구 등과 같이 제한된 세포에서만 발현되는데 외부에서 들어온 항원분자는 세포내에서 처리되어 HLA class II와 결합되어 CD⁴ T 림프구에 의해 인지되게 되며, 이렇게 활성화된 T 림프구는 B 림프구, 세포독성 T 림프구, 자연 살 세포(natural killer cell), 대식세포를 활성화시킨다. 따라서 종양세포에서의 MHC class II 발현은 세포면역 반응의 시작을 도와 종양세포와의 상호작용에 관여하는 것으로 알려져 있다. 종양세포에서 HLA class II 분자의 발현은 IFN- γ 와 같은 싸이토카인에 의해 조절되며, IFN- γ 는 종양세포에 직접적으로 작용하여 성장을 억제하므로 IFN- γ 에 대한 종양세포의 반응 정도는 종양세포가 숙주면역계와 상호작용 하거나 종양의 진행능력을 결정하는 주요 지표가 되고, 종양의 악성도에 따라 IFN- γ 에 의한 HLA class II 분자의 발현양상이 다르게 나타나는 것으로 알려져 있다⁶⁾.

인체의 암종중 대장암, 버키트 림프종, 폐암, 유방암, 악성 흑색종, 자궁경부암에서 MHC class I의 발현이 감소되는 것으로 알려져 있다¹⁾. 하지만 이러한 MHC class I의 발현감소가 종양의 형성에 어떤 역할을 하는지는 아직 명확하지 않다.

본 실험결과에 의하면 후두편평세포암종에서 HPV 감염은 총 39례중 10례(25.64%)에서 관찰되어 HPV가 후두편평세포암종의 유발에 하나의 원인인자임을 알 수 있었고, 이러한 결과는 Takeshi¹³⁾의 26.8%, Vassilis¹⁵⁾의 17.5%와 비슷한 결과를 얻었다. MHC class I 발현감소는 후두편평세포암종의 71.8%에서 관찰되어 폐암에서의 75.7%⁷⁾, 자궁경부암에서의 77%³⁾로 보고되는 다른 암종에서의 발현감소와 비슷한 감소율을 보임을 알 수 있었다. HPV가 검출된 조직의 90%에서 MHC class I의 발현감소가 있었고, 검출되지 않은 조직에서는

65.52%에서 발현감소를 보여 HPV 감염시 MHC class I 발현양상이 더 낮았으나 통계학적으로 서로 상관관계가 없었으며, 이는 다른 저자들의 연구에서도 보고되고 있다^{3,16)}. MHC class I 발현감소는 종양의 성장이나 침습성의 지표로 제시되어 왔지만⁹⁾, 본 연구결과에서 MHC class I 발현감소는 원발병소의 T-병기, 림프절 전이와는 연관성이 없었으나, 세포분화도가 나쁠수록 MHC class I의 발현이 더 낮은 결과를 얻었다.

V. 결 론

후두편평세포암종 39례를 대상으로 in situ hybridization법으로 HPV의 감염을 확인하고, MHC class I 항원에 대한 면역조직화학적 염색을 시행한 후 HPV의 감염과 암종 발생기전의 하나로 생각되는 면역 감시체계의 상실과의 연관성을 분석하고, MHC class I의 발현 양상과 종양의 T-병기, 림프절 전이, 세포분화도를 비교 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 1) HPV type 16, 18의 감염은 39례중 10례(25.64%)에서 관찰되었다.
- 2) HPV가 검출된 조직에서 MHC class I의 발현양상이 낮게 나타났으나 통계학적 유의성은 없었다.
- 3) MHC class I의 발현은 T-병기나 림프절 전이와는 상관관계가 없었고, 세포분화도가 나쁠수록 발현양상이 낮게 나타났으나 통계학적 유의성은 없었다.

이상의 결과로 HPV 감염은 후두편평세포암종의 유발에 하나의 원인인자로서 작용하고, MHC class I의 발현감소는 다른 인체 암에서와 마찬가지로 후두편평세포암종에서도 흔히 나타나는 현상이며 암세포가 면역감시체계로부터 벗어나 증식하는 기전의 하나로 생각된다. 감소된 발현양상이 종양의 생물학적 특징이나 여러 종양측 인자와 관계가 없는 것으로 나타났지만, 세포분화도가 나쁠수록 MHC class I 발현양상이 낮게 나타남으로써 MHC class I 발현감소가 종양의 성장이나 침습성의 지표가 될 수 있을 것으로 생각한다. 향후 MHC class I의 발현이 감소되는 기전을 규명함으로써 인체에 발생

하는 여러 암종의 발암기전을 이해하는 데 도움을 줄 것으로 생각한다.

References

1. Andersson ML, Stam NJ, Klein G, Ploegh HL, Masucci MG : *Aberrant expression of HLA class I antigens in Burkitt Lymphomas cells. Int J Cancer. 1991; 47: 544-549*
2. Anwar K, Nakakuki K, Imai H, Naiki H, Inuzuka M : *Over-expression of p53 protein in human laryngeal carcinoma. Int J Cancer. 1993; 53: 1-5*
3. Cromme FV, Meijer CJLM, Snijders PJF et al : *Analysis of MHC class I and II expression in relation to presence of HPV genotypes in premalignant and malignant cervical lesions. Br J Cancer. 1993; 67: 1372-1380*
4. Daar A, Fuggle S, Fabre J, Ting A, Morris P : *The detailed distribution of HLA-A, B, C antigens in normal human organs. Transplantation. 1984; 38: 287-293*
5. Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H : *A papilloma virus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. Proc Natl Acad Sci U S A. 1983; 80: 3812-3815*
6. Gastl G, Marth C, Leiter E et al : *Effects of human recombinant alpha 2 arg-interferon and gamma-interferon on human breast cancer cell lines : dissociation of antiproliferative activity and induction of HLA-DR antigen expression. Cancer Res. 1985; 45(7): 2957-2961*
7. Korkolopoulou P, Kaklamanis L, Pezzella F, Harris AL, Gatter KC : *Loss of antigen-presenting molecules (MHC class I and TAP-1. in lung cancer. Br J Cancer. 1996; 73(2): 148-153*
8. Ortman B, Androlewicz MJ, Cresswell P : *MHC class I/ β 2-microglobulin complexes associate with TAP transporters before peptide binding. Nature. 1994; 368: 864-867*
9. Pfizenmaier K, Bartsch H, Scheurich P et al : *Differential γ -interferon response of human colon carcinoma cells : inhibition of proliferation and modulation of immunogenicity as independent effects of γ -interferon on tumor cell growth. Cancer Res. 1985; 45: 3503-3509*
10. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM : *The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes degradation of p53. Cell. 1990; 63: 1129-1136*
11. Shafer A, Friedman W, Mielke M, Schwartlander B, Koch MA : *The increased frequency of cervical dysplasia-neoplasia in women infected with human immunodeficiency virus is related to the degree of immunosuppression. Am J Obstet Gynecol. 1991; 164: 593-599*
12. Shidara K, Suzuki T, Hara F, Nakajima T : *Lack of synergistic association between human papillomavirus and Ras gene point mutation in laryngeal carcinomas. Laryngoscope. 1994; 104: 1008-1012*
13. Takeshi S, Kouichi S, Futoshi H, Takashi N : *High frequency of p53 abnormality in laryngeal cancers of heavy smokers and its relation to human papillomavirus infection. Jpn J Cancer Res. 1994; 85(11): 1087-1093*
14. Townsend A, Elliot T, Cerundolo V, Foster L, Barber B, Tse A : *Assembly of MHC class I molecules analysed in vitro. Cell. 1990; 62: 285-295*
15. Vassilis G, George R, Andreas K, alexandra G, Calypso B, Christos K : *Expression of p53 protein in laryngeal squamous cell carcinoma and dysplasia : possible correlation with human papillomavirus infection and clinicopathological findings. Virchows Archiv.*

- 1994; 425(5): 481-489
16. Viac J, Soler C, Chardonnet Y, Euvrard S, Schmitt D : *Expression of immune associated surface antigens of keratinocytes in human papillomavirus-derived lesions. Immunobiology. 1993; 188: 392-402*
 17. Westhoff U, Doxiadis I, Beelen DW, Schaefer UW, Grosse-Wiled H : *Soluble HLA class I concentrations and GVHD after allogeneic marrow transplantation. Transplantation. 1989; 48(5): 891-893*
 18. Woodworth CD, Waggoner S, Barnes W, Stoler MH, Dipaolo JA : *Human cervical and foreskin epithelial cells immortalized by human papillomavirus DNAs exhibit dysplastic differentiation in vitro. Cancer Res. 1990; 50: 3709-3715*
 19. Zouboulis CC, Shroder K, Garbe C, Krasagakis K, Kruger S, Orfanos CE : *Cytostatic and cytotoxic effects on recombinant tumor necrosis factor- α on sensitive human melanoma cells in vitro may result in selection of cells with enhanced markers of malignancy. J Invest Dermatol. 1990; 95(6): 223-230*