
Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
- Direktor: Prof. Dr. med. W. Jonat -
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian–Albrechts-Universität zu Kiel

**“DIE ROLLE ANTIMIKROBIELLER PEPTIDE IM WEIBLICHEN GENITALTRAKT
UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG HPV-ASSOZIIERTER LÄSIONEN”**

Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

WIEBKE ERHART

aus Düsseldorf

Kiel 2011

1. **Berichterstatter:** Herr Priv.-Doz. Dr. Meinhold-Heerlein
2. **Berichterstatter:** Herr Prof. Dr. Fickenscher
3. **Berichterstatter:** Herr Prof. Dr. Schröder
- Tag der mündlichen Prüfung:** 02.02.2012
- Zum Druck genehmigt, Kiel, den** 02.02.2012

gez.: Herr Prof. Dr. Dr. Cascorbi
(Ausschussvorsitzender)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Äußeres Genitale und Vagina	1
1.2	Humane Papillomaviren (HPV)	2
1.3	Klinik der genitalen HPV-Infektionen	4
1.3.1	Kondylome	5
1.3.2	Zervixkarzinom	6
1.4	Antimikrobielle Peptide	6
1.4.1	Defensine	6
1.4.2	Psoriasin (S100A7)	9
1.4.3	RNase7	9
1.4.4	Cathelicidine	9
1.5	Antimikrobielle Peptide im weiblichen Urogenitaltrakt	10
1.6	Fragestellung	11
2	Material und Methoden	12
2.1	Gewebeproben	12
2.2	Aufbereitung der Gewebeproben	13
2.2.1	mRNA-Isolierung aus Gewebeproben	13
2.2.2	Quantifizierung der mRNA	14
2.2.3	Reverse Transkription: Umschreiben von mRNA in cDNA	14
2.3	Quantifizierung der Gen-Expression mittels "real-time polymerase chain reaction" (real-time PCR)	15
2.3.1	Prinzip der real-time PCR	15
2.3.2	Schmelzkurven	16
2.3.3	Verwendete Primer	17
2.3.4	Real-time PCR Ansatz und Durchführung	18
2.3.5	Absolute Quantifizierung der antimikrobiellen Peptide	19
2.4	Generierung externer Standards	19

2.4.1	RT-PCR	19
2.4.2	Aufreinigung durch Gelelektrophorese	20
2.4.3	Klonierung und Transfektion	21
2.4.4	Kolonie-PCR und Anlegen einer Masterplatte	21
2.4.5	Plasmidisolierung und Sequenzierung der Insert-tragenden Plasmide	21
2.4.6	Linearisierung des Vektors	22
2.4.7	Messung der DNA-Konzentration	22
2.4.8	Erstellung der Standardkurven	22
2.5	Immunhistochemie	23
2.5.1	Anfertigung von Kryostat-Schnitten	23
2.5.2	Prinzip der immunhistochemischen Färbung	23
2.5.3	Protokoll der Immunfärbungen	23
2.6	Statistische Analysen	25
3	Ergebnisse	26
3.1	Genexpression der α -Defensine	26
3.2	Genexpression der β -Defensine	27
3.2.1	Genexpression von hBD-1	27
3.2.2	Genexpression von hBD-2	29
3.2.3	Genexpression von hBD-3	31
3.3	Genexpression von Psoriasin	33
3.4	Genexpression von RNase7	35
3.5	Genexpression von LL-37	37
3.6	Ergebnisse der morphologischen Untersuchungen	38
3.6.1	Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung zum Vergleich der Epithelstruktur	38
3.6.2	Immunhistochemische Färbungen	39
4	Diskussion.....	41
4.1	Methodik	41
4.2	Patientenkollektiv	42

4.3	Expression der α -Defensine	43
4.4	Expression der β -Defensine	44
4.4.1	hBD-1	44
4.4.2	hBD-2 und hBD-3	45
4.5	Expression von Psoriasin	46
4.6	Expression von RNase 7	47
4.7	Expression von LL-37	48
4.8	Unterscheidet sich die Regulation antimikrobieller Peptide bei viralen und bakteriellen Infektionen?	48
4.9	Welche Rolle spielen antimikrobielle Peptide bei genitalen HPV-Infektionen?	49
4.10	Ausblick	50
5	Zusammenfassung	51
6	Literaturverzeichnis	53
7	Anhang	66
7.1	Chemikalien	66
7.2	Geräte	67
7.3	Kits	67
7.4	Enzyme	68
7.5	Nukleotide	68
7.6	Gele	68
7.7	Verbrauchsmaterialien	68
7.8	Puffer und Lösungen	69
7.9	Antikörper	69
8	Danksagung	70
9	Lebenslauf	71

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Genom von HPV-Typ 16.....	3
Abbildung 2: Anogenitale <i>Condylomata acuminata</i> in ausgeprägter Form.....	5
Abbildung 3: Primärstruktur des HD5 und hBD-1.....	7
Abbildung 4: Standardverdünnungsreihe von hBD-3.....	16
Abbildung 5: Schmelzkurve von hBD-3.....	17
Abbildung 6: Genexpression von hBD-1.....	27
Abbildung 7: Genexpression von hBD-2.....	29
Abbildung 8: Genexpression von hBD-3.....	31
Abbildung 9: Genexpression von Psoriasin.....	33
Abbildung 10: Genexpression von RNase7.....	35
Abbildung 11: HE-Färbung von gesundem Gewebe und von einem Kondylom.....	38
Abbildung 12: Immunhistochemische Färbungen für hBD-2, Psoriasin, RNase7 und LL-37.....	40

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Gewebe	12
Tabelle 2: Ergebnisse der virologischen Untersuchung der Kondylom-Patientinnen.....	13
Tabelle 3: Verwendete Primer	17
Tabelle 4: Ansatz für die real-time PCR.....	18
Tabelle 5: Amplifikationsprotokoll real-time PCR	18
Tabelle 6: Ansatz für die RT-PCR	20
Tabelle 7: Amplifikationsprotokoll für die RT-PCR	20
Tabelle 8: Primärantikörper für den Proteinnachweis	24
Tabelle 9: Pufferlösung für Primärantikörper	24
Tabelle 10: Sekundärantikörper für den Proteinnachweis.....	24
Tabelle 11: Genexpression der HNP 1-3.....	26
Tabelle 12: Genexpression von HD5.....	26
Tabelle 13: Genexpression von HD6.....	26
Tabelle 14: Genexpression von LL-37	37
Tabelle 15: Chemikalien.....	66
Tabelle 16: Geräte.....	67
Tabelle 17: Kits	67
Tabelle 18: Enzyme.....	68
Tabelle 19: Nukleotide.....	68
Tabelle 20: Gele	68
Tabelle 21: Verbrauchsmaterialien	68
Tabelle 22: Puffer und Lösungen.....	69
Tabelle 23: Antikörper	69

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AMP	antimikrobielle Peptide
<i>Aqua dest.</i>	<i>Aqua destillata</i>
Bp	Basenpaare
cDNA	engl. „copied desoxyribonucleic acid“
CT-Wert	engl. „cycle threshold“
DAB	3,3'-Di-Amino-Benzidin
DNA	engl. „desoxyribonucleic acid“
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
hBD	humanes β -Defensin
HD	Humanes Defensin
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HNP	humanes neutrophiles Peptid
HPV	humanes Papillomavirus
HRP	engl. „horseradish peroxidase“
IFN- γ	Interferon-Gamma
IL-1 β	Interleukin-1 β
<i>L. crispatus, jensenii, gasseri</i>	<i>Lactobacillus crispatus, jensenii, gasseri</i>
mRNA	engl. „messenger Ribonucleic acid“
MW	Mittelwert
PAMP	engl. „pathogen-associated molecular patterns“
PCR	engl. „polymerase chain reaction“
PRR	engl. „pattern recognition receptors“
RNA	engl. „ribonucleic acid“
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	engl. „reverse transcription polymerase chain reaction“
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SOC	engl. „super optimal catabolite repression“
T _m	Schmelztemperatur
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
Upm	Umdrehungen pro Minute
URR	engl. „upstream regulatory region“

Vorbemerkung

Teile dieser Arbeit wurden in folgender Fachzeitschrift veröffentlicht:

Erhart, W., Alkasi, Ö., Brunke, G., Wegener, F., Maass, N., Arnold, N., Arlt, A., Meinhold-Heerlein, I. Induction of human β -defensins and psoriasin in vulvovaginal Human Papillomavirus (HPV)-associated lesions. *J Infect Dis.* in press.

1 Einleitung

Infektionen des Genitaltraktes mit Humanen Papillomaviren (HPV) gehören weltweit zu den häufigsten sexuell übertragbaren Infektionskrankheiten. Bei 75 % der Gesamtbevölkerung sind serologische oder virale Marker einer durchgemachten oder akuten HPV-Infektion zu finden (Koutsky 1997).

Bezüglich ihrer Assoziation mit verschiedenen Erkrankungen werden High-Risk- und Low-Risk-HPV-Typen unterschieden. Während Infektionen mit High-Risk-HPV-Typen für die Entstehung des Zervixkarzinoms ursächlich sind, führt eine Infektion mit einem Low-Risk-HPV-Typ im Genitalbereich zur Bildung von *Condylomata acuminata* (Feigwarzen).

Harald zur Hausen formulierte im Jahr 1976 die Hypothese, dass verschiedene Typen des Humanen Papillomavirus mit der Entwicklung des Zervixkarzinoms assoziiert sind (zur Hausen 1976). Zunächst mit Skepsis konfrontiert, gelang es zur Hausen und seinen Mitarbeitern 1983 und 1984 den Zusammenhang zwischen Infektionen mit HPV 16 bzw. HPV 18 und dem Zervixkarzinom zu beweisen (Durst, *et al.* 1983; Boshart, *et al.* 1984). Für seine Arbeit wurde Harald zur Hausen 2008 mit dem Nobelpreis für Medizin geehrt.

1.1 Äußeres Genitale und Vagina

Das äußere Genitale (Vulva) und die Vagina sind mit Plattenepithel ausgekleidet. Dieses stellt die erste Schutzbarriere dar, die pathogene Keime am Eindringen in den Körper hindert. Das Epithel ist mehrschichtig, in der Vagina ist es unverhornt, am äußeren Genitale teils unverhornt, teils verhornt. Das unverhornte Plattenepithel besteht aus *Stratum basale*, *Stratum parabasale*, *Stratum intermedium* und *Stratum superficiale*. Ist es verhornt, wird das Epithel von *Stratum basale*, *Stratum spinosum*, *Stratum granulosum* und *Stratum corneum* gebildet, wobei die Verhornung der Zellen im *Stratum granulosum* beginnt und das *Stratum corneum* aus bereits abgestorbenen Hornzellen besteht. Das Plattenepithel enthält ein dichtes Netz aus Zytokeratinfilamenten, das die Zellen untereinander über Desmosomen und die Basalzellen an der Basallamina über Hemidesmosomen verankert und so dem Schutz gegen mechanische Beanspruchung dient. Des Weiteren wirkt das Epithel als Diffusionsbarriere durch polare Lipide in den Zellzwischenräumen (Lipidverschluss) und zahlreiche Tight Junctions im oberen Drittel des Epithels.

Ein weiterer Schutzmechanismus gegen die Invasion pathogener Krankheitserreger ist der niedrige pH-Wert im weiblichen Genitaltrakt. Die Epithelzellen selbst haben die Fähigkeit Milchsäure zu produzieren (Preti and Higgins 1975). Des Weiteren findet sich in der Vagina eine Vielzahl anaerober und aerober Mikroorganismen, die zur Aufrechterhaltung des sauren Milieus beiträgt. Die wichtigste Rolle spielen hierbei Laktobazillen, die sogenannten

Döderlein-Stäbchen (Keimzahl 10^5 - 10^8), die in der gesunden Vagina die vorherrschenden Mikroorganismen sind. Bei diesen handelt es sich um Gram-positive, mikroaerophile, nicht-sporenbildende Stäbchen, von denen ca. zehn Arten beim Menschen vorkommen. Sie lösen das Glykogen, das die Zellen des Plattenepithels mit zunehmender Differenzierung bilden, aus abgeschilferten Epithelzellen und bilden daraus Milchsäure. So wird ein pH-Wert von 4-5 erzeugt, der dem Schutz vor pathogenen Mikroorganismen dient. Außerdem haben die Laktobazillen die Fähigkeit am Epithel zu haften und hindern auf diese Weise pathogene Keime am Eindringen in den Organismus (Boris, *et al.* 1998). Des Weiteren produzieren einige Typen der Döderlein-Stäbchen (*Lactobacillus crispatus* (*L. crispatus*), *L. jensenii*, *L. gasseri*) Wasserstoffperoxid (H_2O_2), das durch seine bakterizide Wirkung die Resistenz gegen Krankheitserreger noch verstärkt (Yamamoto, *et al.* 2009). Bei Störungen des Milieus kommt es zu Infektionen und Reaktionen des Immunsystems (Fredricks, *et al.* 2005).

Auch Papillomaviren befallen Epithelzellen von Haut und Schleimhäuten. Ein wichtiger Bestandteil der Immunantwort von Epithelien ist die Bildung antimikrobieller Peptide (AMP), von denen einige ständig auf einem Basisniveau freigesetzt werden, andere durch verschiedene Faktoren wie Zytokine oder bakterielle Bestandteile induzierbar sind. Wird die epitheliale Barriere durchbrochen, ist die Erkennung der pathogenen Mikroorganismen der erste Schritt in der Initiierung einer schnellen Immunantwort und Verhinderung einer systemischen Infektion. Dieses erfolgt durch „pattern recognition receptors“ (PRR) die durch charakteristische Teile der Microbiota, sogenannte „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMP), aktiviert werden. Die PRR-PAMP Interaktion führt u.a. zur vermehrten Transkription and Sekretion proinflammatorischer Zytokine und AMP. Die Rolle der AMP im Rahmen viraler Infektionen ist bisher kaum charakterisiert, scheint aber in ähnlicher Weise abzulaufen und für die Immunantwort der Epithelien wichtig zu sein (Klotmann, *et al.* 2006).

1.2 Humane Papillomaviren (HPV)

Humane Papillomaviren sind unbehüllte DNA-Viren aus der Familie der *Papovaviridae*. Sie bestehen aus einem Kapsid und doppelsträngiger ringförmiger DNA (7800-7900 Basenpaare (Bp)). Momentan sind über 100 klassifizierbare HPV-Typen identifiziert, von denen etwa 40 zu Infektionen im Genitalbereich führen. Bezüglich ihrer Assoziation mit verschiedenen Erkrankungen werden High-Risk- (u.a. 16, 18, 31, 33, 45) und Low-Risk-HPV-Typen (u.a. 6, 11, 42, 44, 51) unterschieden (Schiffman and Castle 2003).

Papillomaviren befallen nur Epithelzellen der Haut und Schleimhäute. Im Genitalbereich kommt es meist beim Geschlechtsverkehr zur Übertragung, wobei geringste Läsionen als Eintrittspforte für das Virus ausreichend sind und zur Besiedelung der Basalschicht des Plattenepithels führen. Die Zellen des *Stratum basale* teilen sich kontinuierlich und ersetzen so die Zellen, die in den oberen Epithelschichten absterben und sich vom Epithel ablösen.

Sämtliche Tochterzellen der infizierten Basalzellen enthalten das HPV-Genom, so breitet sich die Infektion über das gesamte Epithel aus (Egawa 2003). Der Infektionszyklus der Papillomaviren ist auf die Differenzierung der Wirtszellen angewiesen, reife Viruspartikel findet man nur in vollständig differenzierten Epithelzellen (Bedell, *et al.* 1991).

Das HPV-Genom enthält Gene, die in „early genes“ (E) und „late genes“ (L) eingeteilt werden und eine nicht-kodierende regulatorische Region, die als „upstream regulatory region“ (URR) bezeichnet wird.

Die Organisation des HPV-Genoms ist für Typ 16 in Abbildung (Abb.) 1 dargestellt:

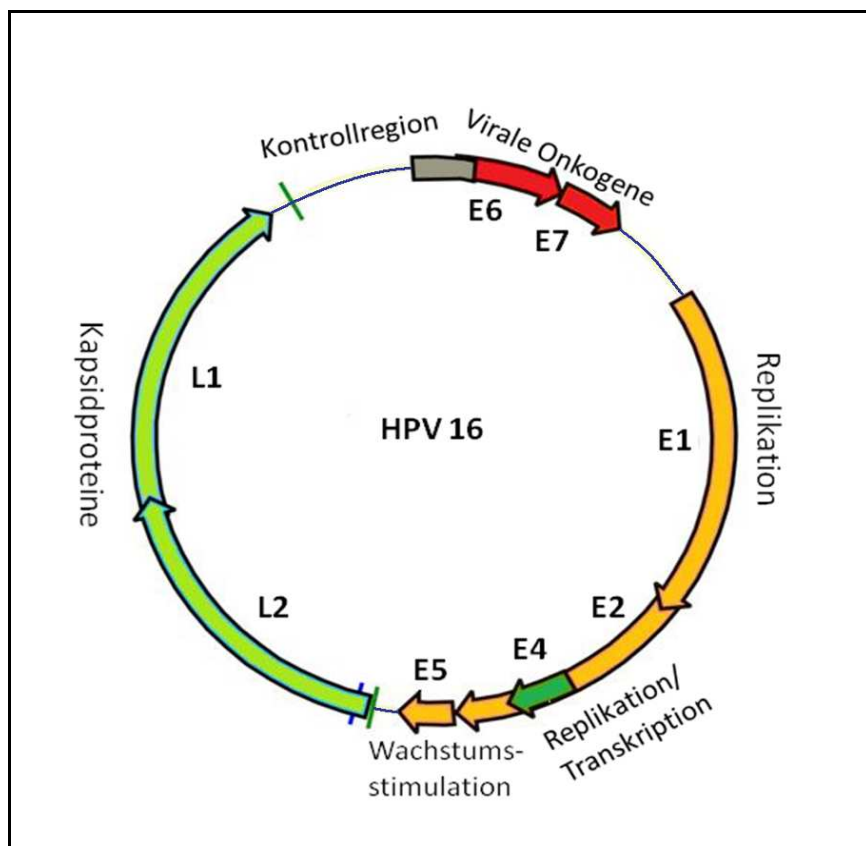


Abbildung 1: Genom von HPV-Typ 16

Die URR ist für die Virusexpression von Bedeutung, da sie die Transkription viraler Gene und somit die Produktion der viralen Proteine reguliert. Die frühen Gene kodieren für die Proteine E1, E2, E4, E5, E6 und E7. Die Proteine E1 und E2 sind für die virale DNA-Replikation und Transkription verantwortlich, u. a. auch für die Regulierung der Transkription von E6 und E7. Das Protein E4 interagiert mit dem Zytoskelett und kann so zum Kollaps der Wirtszelle und zur Freisetzung der Viruspartikel führen. E5 wirkt wachstumsstimulierend und verstärkt die Wirkungen von E6 und E7. Die Proteine E6 und E7 interagieren mit Proteinen, die wichtig für den Zellzyklus sind. Diese Interaktionen führen dazu, dass die HPV-infizierten Epithelzellen auch mit zunehmender Differenzierung mitotisch aktiv bleiben und es zur

Proliferation und Transformation der Wirtszellen kommt. Die „late genes“ kodieren für die viralen Kapsidproteine L1 und L2 (Milde-Langosch, *et al.* 1999).

In gutartigen Läsionen liegt die HPV-DNA meist in zirkulärer, extrachromosomaler Form vor (Wentzensen, *et al.* 2002). Zunächst werden im *Stratum basale* die viralen Proteine E1 und E2 exprimiert, die miteinander einen Komplex bilden und die Replikation und Transkription der viralen DNA kontrollieren. Außerdem wird von ihnen in dieser Phase die Transkription anderer „early genes“ wie E6 und E7 unterdrückt. (Cripe, *et al.* 1987; Mohr, *et al.* 1990). Stattdessen kommt es zur Transkription der „late genes“, L1 und L2, die jedoch erst mit zunehmender Differenzierung der Wirtszelle gebildet werden. Die Viruspartikel liegen somit erst in den oberen Epithelschichten in kompletter Form vor (Severson, *et al.* 2001).

Bei malignen Entartungen hingegen, ist das virale Genom oft in das Zellgenom integriert, kann aber zusätzlich auch in extrachromosomaler Form vorliegen (Wentzensen, *et al.* 2002). Durch die Integration kommt es zum Funktionsverlust von E1 und E2, die für die Regulation der Transkription, auch von E6 und E7, verantwortlich sind. Diese Proteine werden nun vermehrt gebildet, L1 und L2 hingegen nur noch in geringen Mengen (von Knebel Doeberitz, *et al.* 1988; Jeon and Lambert 1995; Severson, *et al.* 2001). E6 und E7 spielen bei der viralen Replikation und neoplastischen Transformation der Wirtszelle eine wichtige Rolle, in High-Risk-HPV-Typen gelten sie als Onkoproteine. E6 bindet an den Tumorsuppressorfaktor p53, E7 bindet an das Retinoblastom (Rb)-Protein und andere Proteine des Zellzyklus. Dieses führt dazu, dass die Epithelzellen nicht wie im gesunden Epithel mit zunehmender Differenzierung die Fähigkeit verlieren, sich zu teilen. Es kommt zur Transformation und ungehinderten Teilung der Zellen und zur Etablierung des Tumors (Rolfe, *et al.* 1995; Dyson, *et al.* 1989; Madkan, *et al.* 2007).

1.3 Klinik der genitalen HPV-Infektionen

HPV-Infektionen gehören zu den häufigsten diagnostizierten sexuell übertragbaren Krankheiten. 75-80 % der Bevölkerung machen im Laufe des Lebens eine HPV-Infektion durch, etwa 10-20 % der sexuell aktiven Erwachsenen weisen eine akute Infektion auf. Dabei ist die Prävalenz einer HPV-Infektion stark altersabhängig. Das höchste Risiko haben sexuell aktive Frauen unter 25 Jahren, bei ihnen liegt die Prävalenz einer HPV-Infektion bei 20-40 %. Ab dem 35. Lebensjahr nimmt die Prävalenz wieder stark ab. Dabei sind Infektionen bei jungen Frauen eher transient und durchschnittlich nach 8-18 Monaten nicht mehr nachweisbar. Mit dem Alter steigt die Persistenz. Die persistierende Infektion mit einem High-Risk-HPV-Typ ist eine Voraussetzung für die Entwicklung von Krebsvorstufen und Karzinomen (Koutsky 1997; Trottier and Franco 2006).

Risikofaktoren einer genitalen HPV-Infektion sind vor allem Parameter der sexuellen Aktivität wie die Zahl der Sexualpartner während des Lebens oder der sexuelle Kontakt mit Männern,

die durch häufig wechselnde Sexualpartner und ungeschützten Geschlechtsverkehr ein hohes Risiko für eine HPV-Infektion haben. Auch Rauchen, Schwangerschaft und der Gebrauch oraler Kontrazeptiva ohne gleichzeitigen Kondomschutz gelten als Prädiktoren einer genitalen HPV-Infektion (Beral 1974; Burk, *et al.* 1996; Schiffman 1992; zur Hausen 1977). Low-Risk-HPV-Typen verursachen im Genitalbereich *Condylomata acuminata*, High-Risk-HPV-Typen sind Ursache des Zervixkarzinoms. Neben dem Zervixkarzinom sind HPV-Infektionen auch Ursache eines Teils anderer anogenitaler Karzinome (Vulva-, Vagina-, Penis- und Analkarzinom) und einiger Atemwegskarzinome (Oropharynx- und Larynxkarzinom) (Frisch, *et al.* 1997; Maden, *et al.* 1993).

1.3.1 Kondylome

Condylomata acuminata, die sogenannten Feigwarzen, sind die klassischen Genitalwarzen. Bei den 15- bis 50-Jährigen wird eine Prävalenz der Kondylome von 1-2 % angenommen (Koutsky 1997). Die HPV-Typen 6 und 11 sind in über 90 % Ursache der *Condylomata acuminata* (Gross, *et al.* 1985). Abb. 2 zeigt anogenitale Kondylome in ausgeprägter Form:

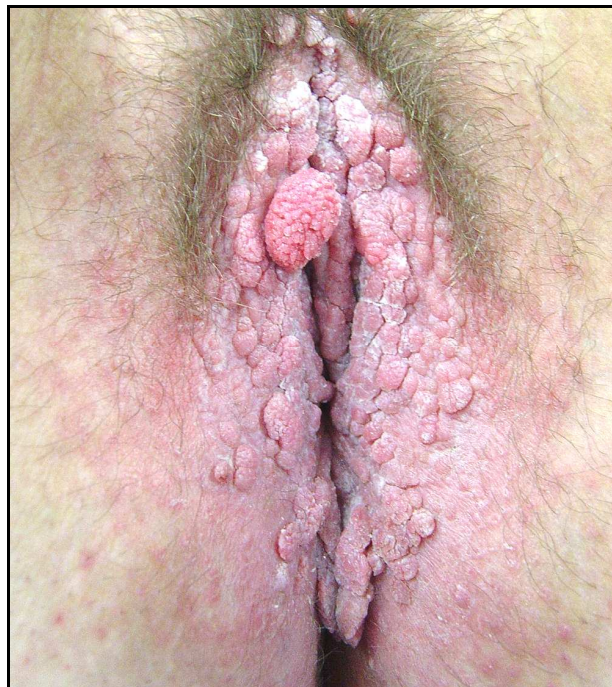


Abbildung 2: Anogenitale *Condylomata acuminata* in ausgeprägter Form

(mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. Andreas Clad, Universität Freiburg und PD Dr. Andreas Kaufmann, Charité Berlin)

Es handelt sich bei den Kondylomen um gutartige Läsionen, die eine spontane Remissionsrate von 10-30 % aufweisen. *Condylomata acuminata* imponieren zunächst als kleine weißliche bis rosafarbene papulöse Hautveränderungen, die konfluieren und zu blumenkohlartigen Gebilden führen können. Des Weiteren können auch einzelne spitz über

die Umgebung herausragende fingerförmige Gebilde oder auch flache, selten pigmentierte Papeln und Plaques auftreten. Histologisch erkennt man eine Verbreiterung von Stratum corneum (Hyperkeratose) sowie der gesamten Epidermis (Akanthose) und eine Betonung der bindegewebigen Papillen, die in das Epithel hineinreichen (Papillomatose) (Gross 2001).

Die häufigste Lokalisation der *Condylomata acuminata* ist bei der Frau die Vulva, wo sich etwa zwei Drittel der Warzen finden. In der Vagina, perineal und perianal werden die Kondylome ebenfalls häufig beobachtet (Chuang, *et al.* 1984).

1.3.2 Zervixkarzinom

Das Zervixkarzinom ist weltweit das zweithäufigste Karzinom der Frau. Im Jahr 2000 lagen die Inzidenz bei 470.000 und die Zahl der Todesfälle bei 230.000 pro Jahr weltweit. Fast 80 % der Fälle treten in Entwicklungsländern auf. In der EU lagen 2004 die Inzidenz bei 31.000, die Zahl der Todesfälle bei 14.000 pro Jahr. Das mittlere Lebensalter der Patientinnen mit invasivem Zervixkarzinom liegt bei 45-55 Jahren (Parkin, *et al.* 2001; Arbyn, *et al.* 2007).

Eine persistierende Infektion mit einem High-Risk-HPV-Typ gilt als notwendige, wenn auch allein nicht ausreichende Ursache für die Entstehung eines Zervixkarzinoms. Die DNA von High-Risk-HPV-Typen lässt sich in annähernd 100 % aller Zervixkarzinome nachweisen, wobei man in 50-60 % der Fälle HPV 16 und in 10-12 % HPV 18 findet (Walboomers, *et al.* 1999). Zwischen dem Erlangen einer Infektion und eventueller maligner Entartung liegt eine relativ lange Zeitspanne, die dafür spricht, dass Kofaktoren wie genetische Veränderungen oder immunologische Faktoren für eine solche Entwicklung notwendig sind. Dieses können auf der einen Seite Veränderungen der Wirtszelle, wie die Aktivierung bestimmter Onkogene oder der Verlust von Tumorsuppressorgenen, auf der anderen Seite Veränderungen des Virus, wie die Integration des viralen Genoms ins Zellgenom, sein (Munger 2002).

1.4 Antimikrobielle Peptide

Antimikrobielle Peptide (AMP) sind ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunität. Sie sind evolutionär alt und dienen dem Schutz vor Infektionen in Pflanzen, Insekten und auch Menschen. Diese „körpereigenen Antibiotika“ haben direkte antimikrobielle Effekte, indem sie Membranen von Mikroorganismen zerstören. Außerdem aktivieren sie Abwehrzellen und modulieren so die Immunantwort des Organismus. Wichtige Familien der AMP sind die Defensine und die Cathelicidine (Boman 2003).

1.4.1 Defensine

Defensine sind AMP, die im menschlichen Körper von neutrophilen Granulozyten und Epithelzellen gebildet werden. Es handelt sich bei den Defensinen um kleine kationische

Peptide aus 30-42 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 3,5-4,5 kDa. Sie besitzen eine β -Faltblatt-Konformation und enthalten 6-8 Cysteinreste, die intermolekular drei Disulfidbrücken ausbilden (Bevins, *et al.* 1999). Anhand der Anordnung der Disulfidbrücken wird die Defensinfamilie weiter in α - (Disulfidbrücken zwischen C1-C6, C2-C4 und C3-C5) und β -Defensine (C1-C5, C2-C4 und C3-C6) unterteilt (Tang und Selsted 1993). Bisher sind beim Menschen sechs α -Defensine und sechs β -Defensine beschrieben worden. Zur Gruppe der α -Defensine werden die humanen neutrophilen Peptide (HNP) 1-4, die von neutrophilen Granulozyten gebildet werden, sowie die von Epithelzellen exprimierte humane Defensine HD5 und HD6 gezählt. Bei den humanen β -Defensinen sind bisher hBD-1 bis -6 beschrieben und charakterisiert worden.

Exemplarisch sind in Abb. 3 das α -Defensin HD5 und das β -Defensin hBD-1 dargestellt:

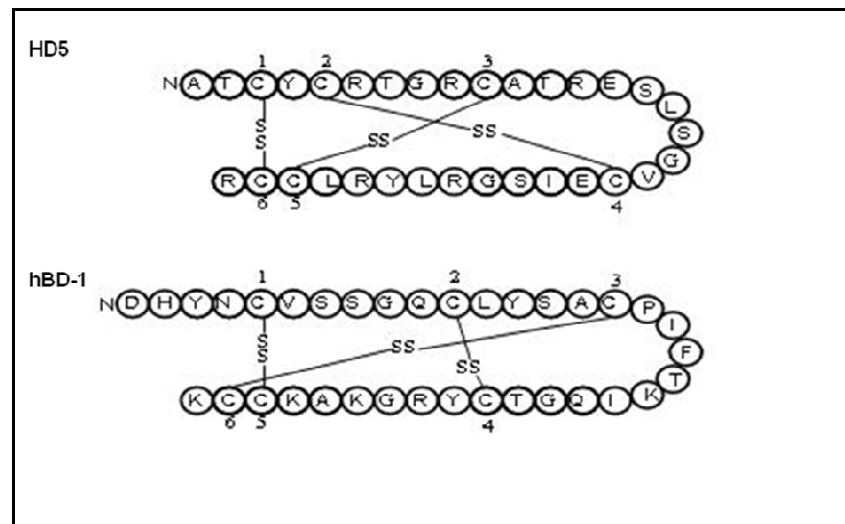


Abbildung 3: Primärstruktur des HD5 und hBD-1

Primärstruktur des HD5 und hBD-1 mit Darstellung der intramolekularen Disulfidbrücken (SS) bei α - und β -Defensinen (Otte, *et al.* 2003).

In-vitro-Studien haben gezeigt, dass Defensine sowohl Gram-positive und Gram-negative Bakterien als auch Mykobakterien, Pilze, Parasiten und einige behüllte Viren abtöten können. Durch ihre positive Ladung haben sie eine hohe Affinität zu den anionischen Phospholipiden in den Membranen von Mikroorganismen. Infolgedessen kommt es zur Porenbildung, die zur Abtötung des Keimes führt (Fujii, *et al.* 1993). Weitere beschriebene Wirkungen der Defensine sind die Zerstörung des mikrobiellen Energiemetabolismus und die Interaktion und Behinderung anderer wichtiger Stoffwechselwege (Bevins, *et al.* 1999). Des Weiteren haben Defensine eine indirekte antimikrobielle Wirkung, da sie chemotaktisch auf Zellen des Immunsystems wirken (Yang, *et al.* 2000; Yang, *et al.* 1999).

Zudem ist bekannt, dass einige Defensine wie die HNPs und das hBD-1 konstant exprimiert werden (Fang, *et al.* 2003; Zhao, *et al.* 1996). Die Expression von hBD-2, -3 und -4 sowie HD5 und HD6 wird hingegen durch proinflammatorische Zytokine oder Bakterien induziert

(Harder, *et al.* 1997; O'Neil, *et al.* 2000; Ogushi, *et al.* 2001; Singh, *et al.* 1998; Wehkamp, *et al.* 2002).

1.4.1.1 α -Defensine

Die Cysteinreste der α -Defensine bilden drei Disulfidbrücken zwischen C1-C6, C2-C4 und C3-C5 (Selsted and Harwig 1989). Die α -Defensine werden auf dem kurzen Arm des Chromosoms 8 (8p23) kodiert (Liu, *et al.* 1998; Sparkes, *et al.* 1989).

Im Jahr 1985 wurden die ersten menschlichen α -Defensine, die humanen neutrophilen Peptide (HNP) 1-4, aus neutrophilen Granulozyten isoliert. Die Peptide werden in den Granula dieser Leukozyten gespeichert und entweder zur Zerstörung von Mikroorganismen in den Extrazellulärraum freigesetzt oder zum Verdau von phagozytiertem Material in die Phagosomen eingebracht (Ganz, *et al.* 1985). Jones und Bevins beschrieben 1992 mit HD5 das erste von Epithelzellen sezernierte Defensin, welches in den Paneth-Zellen des Dünndarms gebildet wird (Jones and Bevins 1992). Ein Jahr später wurde ebenfalls aus den Paneth-Zellen HD6 isoliert (Jones and Bevins 1993).

1.4.1.2 β -Defensine

Wie die α -Defensine enthalten auch die menschlichen β -Defensine drei Disulfidbrücken im Muster C1-C5, C2-C4 und C3-C6 (Tang and Selsted 1993). Die β -Defensine hBD-1 bis -6 sind wie die α -Defensine auf 8p23 kodiert. Außerdem wurden andere Orte im menschlichen Genom (6p12, 20q11.1 und 20p13) beschrieben, die möglicherweise für weitere β -Defensine kodieren (Schutte, *et al.* 2002).

Das erste menschliche β -Defensin (hBD-1) wurde aus dem Blut von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz isoliert (Bensch, *et al.* 1995). Analysen zur mRNA-Expression zeigten bald darauf, dass hBD-1 in verschiedenen Geweben wie dem Gastrointestinaltrakt, dem Respirationstrakt, dem Urogenitaltrakt und der Haut exprimiert wird. HBD-1 gilt als nicht induzierbar durch inflammatorische Stimuli (Zhao *et al.* 1996).

Zwei Jahre später gelang es, hBD-2 aus der Epidermis von Psoriatikern zu gewinnen (Harder, Bartels *et al.* 1997). HBD-2 konnte in der Haut, im Respirationstrakt, im Urogenitaltrakt und im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen werden. Von gesunden Epithelien wird dieses Peptid nur in geringen Mengen freigesetzt, im entzündeten Gewebe allerdings in deutlich höheren Konzentrationen exprimiert (Harder, *et al.* 2000; O'Neil, *et al.* 1999).

Auch das hBD-3 wurde aus der Haut von Psoriatikern isoliert. Seine Bildung konnte in den Epithelien von Haut, Respirationstrakt, Urogenitaltrakt, dem Gastrointestinaltrakt und den Tonsillen nachgewiesen werden. Wie hBD-2 ist auch hBD-3 durch verschiedene Stimuli wie z. B. proinflammatorische Zytokine (Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α)) und bakterielle Bestandteile induzierbar (Harder, *et al.* 1997; Harder, *et al.* 2001).

Weitere β -Defensine, hBD-4, -5 und -6, wurden 2001 und 2002 beschrieben (Garcia, *et al.* 2001; Yamaguchi, *et al.* 2002). Diese Erstbeschreibungen basierten lediglich auf Genanalysen und nicht auf dem direkten Nachweis der Peptide.

1.4.2 Psoriasin (S100A7)

Ein weiteres antimikrobielles Peptid ist das Psoriasin (S100A7), ein kleines Calcium-bindendes Protein (11,5 kDa) aus der S-100-Familie, das 1991 entdeckt wurde (Madsen, *et al.* 1991). Kodiert wird Psoriasin auf Chromosom 1q21 (Ridinger, *et al.* 1998).

Die S-100-Familie ist an einer Vielzahl von Signalwegen in der Zelle beteiligt und beeinflusst Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose. Des Weiteren wirkt Psoriasin chemotaktisch auf Immunzellen und besitzt antibakterielle Eigenschaften unter anderem gegen *Escherichia coli* (*E. coli*). Bakterielle Bestandteile und das Zytokin Interleukin-1 β (IL-1 β) konnten als starke Induktoren von Psoriasin identifiziert werden (Glaser, *et al.* 2005).

In gesundem Gewebe wird Psoriasin nur gering exprimiert. Das Vorkommen dieses Peptides wurde in der Haut, im Gastrointestinaltrakt und der weiblichen Brust nachgewiesen (Hosaka, *et al.* 2008; Wolf, *et al.* 2009). Eine gesteigerte Expression findet sich zum einen bei Psoriasis, bei Wundheilung und Infektionen der Haut, zum anderen bei einigen Karzinomen, z.B. von Mamma, Blase und Haut, (Broome, *et al.* 2003; Carlsson, *et al.* 2005).

1.4.3 RNase7

Bei der RNase7 handelt es sich um eine antimikrobiell wirksame Ribonuklease aus der RNase A-Familie, die 2002 von Harder und Schröder aus Zellen des *Stratum corneums* der Epidermis isoliert wurde. Alle Mitglieder dieser Familie sind sekretorische Proteine mit einem hydrophoben Signalpeptid, das nach der Sekretion abgespalten wird. Die reifen Peptide haben eine Molekülmasse zwischen 12 und 16 kDa.

Zusätzlich zur Ribonukleaseaktivität besitzt die RNase7 als kationisches Peptid ein weites Spektrum antimikrobieller Aktivität gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien sowie gegen Hefen. Sie wird in verschiedenen epithelialen Geweben exprimiert, u.a. in der Haut, im Atemtrakt und im Urogenitaltrakt. RNase7 wird in diesen Geweben kontinuierlich exprimiert. Inflammatorische Zytokine sowie Oberflächenproteine von Bakterien können die Expression von RNase7 induzieren (Harder and Schroder 2002).

1.4.4 Cathelicidine

Eine andere Gruppe antimikrobieller Peptide sind die Cathelicidine. Sie bestehen aus einer konservierten Region am N-Terminus und einer weniger stark konservierten antimikrobiellen Region am C-Terminus (der Cathelin-Domäne) (Zanetti, *et al.* 1995). Im Menschen wird nur ein Genprodukt hergestellt. Das reife humane Cathelicidin wird als LL-37 bezeichnet. Es ist kationisch, besteht aus 37 Aminosäuren (18 kDa) und trägt am N-Terminus zwei

Leucinreste. Das Peptid entsteht durch extrazelluläre Proteolyse des menschlichen kationischen antimikrobiellen Proteins (hCAP18) (De Smet and Contreras 2005).

LL-37 wurde zuerst im Knochenmark gefunden, außerdem wird es von Leukozyten und Epithelzellen des Gastrointestinal-, Urogenitaltraktes und der Haut gebildet. Das menschliche Cathelicidin ist ein kationisches Peptid, das die anionische mikrobielle Zellmembran durch elektrostatische Interaktion zerstört und so den Keim abtötet. LL-37 hat ein breites Spektrum gegen pathogene Keime, es tötet Gram-positive und Gram-negative Bakterien, Pilze und einige Viren ab (Agerberth, *et al.* 1995; Zanetti, *et al.* 1995).

Außerdem wirkt LL-37 chemotaktisch auf Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems (neutrophile Granulozyten, Mastzellen, Monozyten und T-Lymphozyten) (De, *et al.* 2000; Niyonsaba, *et al.* 2002). Die stimulierten Mastzellen sind in der Lage, selbst das humane Cathelicidin zu produzieren (Di Nardo, *et al.* 2003). Zudem wirkt LL-37 durch Modulierung der Chemokin- und Zytokinproduktion durch Makrophagen und der Histaminfreisetzung aus Mastzellen als Mediator bei Inflammation (Huang, *et al.* 2006).

Des Weiteren wurde beobachtet, dass LL-37 Zellproliferation und Reepithelialisierung beeinflusst und so zur Wundheilung beiträgt (Heilborn, *et al.* 2003). Zudem führt das Peptid zur Freisetzung der HNP aus neutrophilen Granulozyten (Zheng, *et al.* 2007).

LL-37 ist in hohen Konzentrationen zytotoxisch, *in vivo* wirkt es allerdings synergistisch mit anderen Proteinen (Defensinen, Lactoferrin und Lysozym), so dass bereits niedrige Konzentrationen des Peptides eine antimikrobielle Aktivität erreichen und die zytotoxischen Effekte ausbleiben (Singh, *et al.* 2000).

1.5 Antimikrobielle Peptide im weiblichen Urogenitaltrakt

Im weiblichen Genitaltrakt wurde das Vorkommen der α -Defensine HNP 1-3 und HD5 beschrieben. Die HNP 1-3 konnten im Vaginalsekret nachgewiesen werden (Valore, *et al.* 2002). Von Levinson *et al.* (2009) wurde eine gesteigerte Bildung dieser Peptide bei vaginalen Infektionen mit *Neisseria gonorrhoeae* gezeigt. Quayle *et al.* beschrieben 1998 die Expression von HD5 im weiblichen Reproduktionstrakt und fanden eine kontinuierliche basale Expression dieses α -Defensins. Außerdem konnten sie eine Induktion von HD5 in Epithelzellen des weiblichen Genitaltraktes durch proinflammatorische Zytokine, TNF- α und bakterielle Bestandteile nachweisen (Quayle, *et al.* 1998).

Auch die β -Defensine hBD-1, -2 und -3 konnten im weiblichen Urogenitaltrakt bestimmt werden (Valore, *et al.* 1998; De Smet and Contreras 2005; Harder, *et al.* 1997; Harder, *et al.* 2001). Die Expression von hBD-2 ist im Urogenitaltrakt durch Gram-negative und Gram-positive Bakterien, Pilze und *Candida albicans* induzierbar (Pivarcsi, *et al.* 2005). Levinson *et al.* (2009) beschrieben für hBD-2 und hBD-3 eine gesteigerte Produktion im weiblichen Urogenitaltrakt bei Infektionen mit *Chlamydia trachomatis* und *Neisseria gonorrhoeae*.

Auch die Expression von RNase7 ist im Epithel des weiblichen Urogenitaltraktes geschildert worden, jedoch nicht das Verhalten dieses Peptides bei Infektionen (Harder und Schröder, 2002). Über die Expression von Psoriasin im weiblichen Genitaltrakt ist noch nichts bekannt. Das antimikrobielle Peptid LL-37 wurde im Epithel des weiblichen Genitaltraktes in geringen Mengen nachgewiesen (Zanetti, *et al.* 1995). Außerdem wurde das Vorkommen dieses Peptides von Valore *et al.* im Vaginalsekret beschrieben (2002). Eine gesteigerte Bildung von LL-37 im weiblichen Genitaltrakt ist bei Infektionen mit *Candida albicans* und *Chlamydia trachomatis* gezeigt worden (Levinson, *et al.* 2009).

Auch in Bezug auf ihr Verhalten bei genitalen Infektionen mit HPV sind einige dieser antimikrobiellen Peptide bereits untersucht worden. HBD-2 und hBD-3 wurden im Gewebe von Patientinnen mit *Condylomata acuminata* mittels Immunhistochemie nachgewiesen (Meyer-Hoffert, *et al.* 2008), ebenso LL-37 (Conner, *et al.* 2002).

1.6 Fragestellung

Bisher ist wenig über die Funktion antimikrobieller Peptide bei genitalen Virusinfektionen bekannt. In dieser Arbeit sollen daher erste grundlegende Untersuchungen zur Bedeutung von Defensinen bei genitalen HPV-Infektionen durchgeführt werden. Insbesondere soll die Bildung der α - und β -Defensine, sowie die Expression weiterer antimikrobieller Peptide, der RNase7, des Psoriasin und des Cathelicidins LL-37 auf mRNA- und Proteinebene bei Patientinnen mit gesunder Genitalschleimhaut und Patientinnen mit *Condylomata acuminata* (HPV-Infektion) untersucht werden. Bei den infizierten Patientinnen sollen die Untersuchungen jeweils an einer Gewebeprobe aus einem Areal gesunder Schleimhaut und einer aus einem Areal mit Kondylomen durchgeführt werden.

Folgende Fragen sollen insbesondere diskutiert werden:

1. Wie verhält sich die Expression verschiedener antimikrobieller Peptide auf mRNA- und Proteinebene bei Infektionen mit HPV?
2. Gibt es bei HPV-infizierten Patientinnen Unterschiede im Expressionsmuster zwischen klinisch unauffälligen Schleimhautbereichen und Schleimhautregionen mit Kondylomen?
3. Unterscheidet sich die Regulation der Peptide bei HPV-Infektionen von der bei bakteriellen Infektionen?

2 Material und Methoden

Die verwendeten Nukleotide, Enzyme, Chemikalien, Materialien und Geräte sind im Anhang aufgeführt, ebenso die Zusammensetzungen von Lösungen und Gelen.

2.1 Gewebeproben

Die Gewebeproben wurden im Rahmen operativer Eingriffe in der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, gewonnen. Alle Patientinnen wurden über den Zweck der Entnahme aufgeklärt und gaben schriftlich ihre Zustimmung. Die Probenentnahme und Gewebeuntersuchung wurde von der Ethikkommission der Universität Kiel genehmigt (Code AZ.: D 420/07).

Bei 35 Patientinnen wurden Gewebeproben im Rahmen einer Kondylom-Laserung entnommen. Es wurden sowohl Areale mit Feigwarzen als auch klinisch gesunde Bereiche biopsiert. Die Gewebeproben nicht-HPV-infizierter Schleimhaut wurden bei 25 Patientinnen entnommen, die sich anderen Eingriffen, meist an Uterus oder Ovarien, unterziehen mussten. Alle biopsierten Patientinnen waren prämenopausal. Die Patientinnen der Kontrollgruppe, bei denen die gesunden Schleimhautproben entnommen wurden, hatten keine bekannten malignen oder infektiösen Erkrankungen. Das Alter der Patientinnen mit *Condylomata acuminata* betrug im Mittel 26 Jahre, das der gesunden Kontrollgruppe 39 Jahre (Tabelle (Tab.) 1).

Tabelle 1: Verwendete Gewebe (MW: Mittelwert)

	gesundes Gewebe	Kondylom-Patientinnen
Anzahl	25	35
Alter	30–49 Jahre	19–44 Jahre
MW Alter	39 Jahre	26 Jahre

Vor der Entnahme der Gewebeproben wurde zum HPV-Nachweis eine PCR durchgeführt (Innogenetics, Gent, Belgium), um auf der einen Seite eine okkulte HPV-Infektion bei den Patientinnen der Kontrollgruppe ausschließen zu können und um des Weiteren zu bestätigen, dass die Patientinnen mit *Condylomata acuminata* mit HPV infiziert waren. Zu diesem Zweck wurden vaginale Abstriche vom hinteren Teil des *Introitus vaginae*, wo die Feigwarzen häufig gefunden werden, entnommen (Gross 2001). Nur HPV-negative Patientinnen wurden in die Kontrollgruppe eingeschlossen. Die Untersuchung der HPV-Abstriche der Patientinnen mit *Condylomata acuminata* wies in der Mehrzahl der Fälle eine Low-Risk-HPV-Infektion nach (11 Patientinnen), 5 Patientinnen waren sowohl mit einem

Low-Risk- als auch mit einem High-Risk-HPV-Typ infiziert, bei weiteren 5 Patientinnen konnte nur eine High-risk-HPV-Infektion nachgewiesen werden (Tab. 2).

Tabelle 2: Ergebnisse der virologischen Untersuchung der Kondylom-Patientinnen (n = 21)

Low-Risk-HPV-Infektion	11 Patientinnen
Low-Risk- und High-Risk-HPV-Infektion	5 Patientinnen
High-Risk-HPV-Infektion	5 Patientinnen

Die Gewebeproben wurden sofort nach der Entnahme für den Transport ins Labor in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und in diesem bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Für immunhistochemische Untersuchungen wurden Proben von Gewebe der Kontrollgruppe und verändertem Gewebe der HPV-infizierten Patientinnen in Einbettmedium („Tissue-Tek“, Miles Scientific) bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren und hier bis zur Anfertigung von Gefrierschnitten gelagert.

2.2 Aufbereitung der Gewebeproben

2.2.1 mRNA-Isolierung aus Gewebeproben

Die mRNA-Isolierung erfolgte mit dem „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen) in modifizierter Form nach Angaben des Herstellers. Die mRNA wird hierbei über ein System aus Wasch- und Trennsäulen unter Einsatz verschiedener Pufferlösungen und mehrerer Zentrifugations-schritte isoliert. Zum Zentrifugieren wurde eine Standard-Mikro-Zentrifuge („Biofuge“, Hereus) verwendet. Alle Arbeitsschritte zur Zellaufbereitung und mRNA-Isolierung wurden mit RNase-freien Materialien und Lösungen durchgeführt und fanden bei Raumtemperatur (RT) statt.

Zunächst wurden die Proben in 600 μl SDS-haltigem Lysis-Puffer (Qiagen) plus 3 % β -Mercaptoethanol unter Verwendung des Ultraturax (Janke und Kunkel) für 1 min bei 2.000 Upm homogenisiert und lysiert. Im Anschluss an die Ultraturaxbehandlung wurden die Proben auf eine QIA-Shredder-Säule (Qiagen) gegeben. Die Säule wurde für 3 min bei 13.000 Upm zentrifugiert und trennte so ungelöstes Material von gelösten Bestandteilen der Proben. Um die Nukleinsäuren zu fällen, wurde dem Filtrat ein Volumenäquivalent 70 %-iges Ethanol zugegeben. Im Anschluss an die Alkoholfällung wurde das gesamte Lysat (max. 1.200 μl) auf die RNeasy-Mini-Säule (Qiagen) gegeben, die selektiv RNA mit einer Länge über 200 Basen absorbiert, und anschließend bei 13.000 Upm für 15 s zentrifugiert, um ausreichend lange mRNA zu isolieren.

Um störende Proteine und Salze zu entfernen, wurden 350 μl RW1-Puffer (Qiagen) auf die Säule pipettiert und für 15 s bei 13.000 Upm zentrifugiert. Eventuell vorhandene Rest-DNA

auf der Membran wurde mittels Desoxyribonuklease I (Qiagen) verdaut. Dafür wurden 80 µl der gepufferten Enzymlösung (0,3 Units/µl) auf die Membran gegeben und für 15 min bei RT inkubiert.

Zur DNase-Entfernung wurden zwei weitere Waschschrte mit jeweils 350 µl RW1-Puffer (Qiagen) durchgeführt. Im Anschluss wurden die Säulen zweimal mit 500 µl alkoholhaltigem RPE-Puffer (Qiagen) gewaschen und für 15s bei 13.000 Upm für zentrifugiert.

Nach dem Aufreinigen der Probe wurde die RNA von der Membran in der Säule gelöst. Dafür wurden 50 µl RNase-freies-Wasser (Qiagen) direkt auf die Säule gegeben und 10 min bei RT inkubiert und anschließend bei 10.000 Upm für 1 min zentrifugiert. Das Eluat enthielt nun die gelöste mRNA, welche anschließend quantifiziert wurde (siehe 2.2.2).

2.2.2 Quantifizierung der mRNA

Die Quantifizierung und Überprüfung der Reinheit der mRNA erfolgte photometrisch mit einem Biophotometer (Eppendorf) bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge. Das Extinktionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei 260 nm, das von Proteinen bei 280 nm, so dass sich aus dem Quotienten der Extinktionsmaxima bei 260 nm und 280 nm die Verunreinigung der mRNA mit Proteinen ermitteln lässt. Nur Proben mit geringer Proteinkonzentration (Quotient zwischen 1,5 und 2,1) wurden in „copied DNA“ (cDNA) umgeschrieben. Für die Quantifizierung der mRNA wurde berücksichtigt, dass eine 260 nm-Extinktion = 1 einer mRNA-Konzentration von 41,2 µg/ml entspricht. Bei einer Verdünnung der mRNA-Lösung mit *Aqua destillata* (*Aqua dest.*) im Verhältnis 1:20 erfolgte die Bestimmung der mRNA-Konzentration wie folgt:

$$\text{Konzentration mRNA } (\mu\text{g/ml}) = \text{Extinktion}_{260 \text{ nm}} \cdot 41,2 \cdot 20$$

Die mRNA wurde nach der Isolierung bei -80 °C gelagert.

2.2.3 Reverse Transkription: Umschreiben von mRNA in cDNA

Bei der reversen Transkription wird durch die Reverse Transkriptase aus dem Moloney Murine Leukemia Virus mRNA in komplementäre cDNA umgeschrieben. Für die Reaktion wurde das „You Prime First Strand Beads Kit“ (Amersham) nach Angaben des Herstellers verwendet. Je Probe wurden 2 µg mRNA unter Zugabe von 1 µg Oligo-dT-Primern (Promega) bei 37 °C innerhalb einer Stunde in cDNA umgeschrieben. Die Oligo-dT-Primer sind komplementär zu der poly-A-Sequenz der mRNA. So wurde sichergestellt, dass nur mRNA umgeschrieben wurde. Anschließend wurden die Proben mit RNase-freiem Wasser auf 100 µl aufgefüllt, so dass die cDNA-Konzentration 20 ng/µl entsprach. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

2.3 Quantifizierung der Gen-Expression mittels “real-time polymerase chain reaction” (real-time PCR)

2.3.1 Prinzip der real-time PCR

Die Quantifizierung der cDNA erfolgte mittels real-time PCR mit dem Light Cycler (Roche Molecular Biochemicals) nach Angaben des Herstellers.

Bei der real-time PCR handelt es sich um eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der Polymerasen-Kettenreaktion beruht und zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung bietet. Die Quantifizierung der spezifischen DNA-Sequenzen wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen während des PCR-Zyklus durchgeführt. Zu diesem Zweck wird ein spezieller Farbstoff, „SYBR Green I“ (Roche), eingesetzt, der nur dann fluoresziert, wenn er an doppelsträngige DNA gebunden ist. Die Fluoreszenz des Farbstoffes wird zu den Zeitpunkten des PCR-Zyklus gemessen, bei denen die gesuchten DNA-Sequenzen (Templates) doppelsträngig vorliegen. Dieses ist am Ende der Amplifikation bei 72 °C der Fall. Die Fluoreszenz dieser Farbstoffe steigt proportional mit der Zielsequenzmenge an. Auf diese Weise ist mittels der Software des Herstellers Roche in Echtzeit („real-time“) eine direkte Quantifizierung der Templates möglich. Im Gegensatz zur herkömmlichen PCR ist eine anschließende gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente nicht mehr nötig. Die Daten sind sofort verfügbar und das Kontaminationsrisiko ist gering.

Während der ersten Zyklen der Amplifikationsphase einer PCR ist die Anzahl der Ziel DNA-Sequenzen (Templates) begrenzt und die Wahrscheinlichkeit, dass sich Templates, Primer und Polymerase treffen gering. In der dritten Phase (den letzten Zyklen) hingegen steigt die Menge der Reaktionsprodukte (Templates, Pyrophosphat, Monophosphatnucleotide) derart an, dass sie sich selber hemmen und es häufiger zur Hybridisierung von Produktfragmenten kommt. Außerdem werden die Substrate verbraucht und die Polymerasen und Nukleotide durch die Hitze langsam zerstört. Ein exponentieller Anstieg der Templates findet sich daher nur in der mittleren Phase (Abb. 4), so dass diese zur Quantifizierung genutzt werden kann. Um immer am Anfang der exponentiellen Phase messen zu können, wird der sog. CT-Wert (engl. „cycle threshold“ (Schwellenwert Zyklus)) verwendet, der den Zyklus beschreibt, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Umso niedriger der CT-Wert bei der jeweiligen Messung ist, umso höher ist die Ausgangskonzentration der gesuchten DNA-Sequenz. In einem Graphen, auf dem die Fluoreszenz der Zyklenzahl gegenübergestellt ist, kann dieser Punkt als Wendepunkt des Graphen (engl. „crossing point“) mathematisch bestimmt werden. Abb. 3 zeigt exemplarisch die Standardverdünnungsreihe von hBD-3:

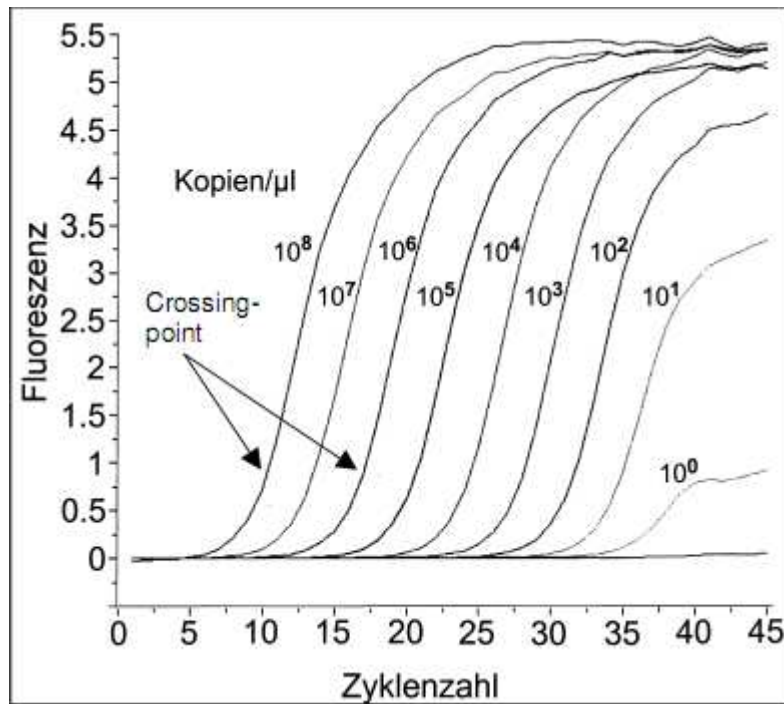


Abbildung 4: Standardverdünnungsreihe von hBD-3

In der Abbildung ist die Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zyklenzahl dargestellt. Die einzelnen Graphen entsprechen den Verdünnungsstufen der Standardverdünnungsreihe von 10^8 - 10^0 Kopien/ μ l. Eingezeichnet ist beispielhaft der „crossing point“ für die Verdünnungsstufen von 10^8 und 10^6 .

Die Quantifizierung der gesuchten DNA-Sequenzen erfolgte mithilfe einer Standardverdünnungsreihe durch den Vergleich der „crossing points“ einer Messreihe mit den „crossing points“ einer Standardverdünnungsreihe.

2.3.2 Schmelzkurven

Am Ende eines real-time PCR-Laufes (45 Zyklen) werden Schmelzkurven erstellt, mit deren Hilfe eine Differenzierung zwischen dem spezifischen Produkt und eventuell entstandenen Primerdimeren möglich ist. So kann kontrolliert werden, ob nur die spezifische Gensequenz amplifiziert wurde. Dazu werden die Proben auf $65\text{ }^\circ\text{C}$ für 15 s abgekühlt und dann langsam um $0,2\text{ }^\circ\text{C}$ pro s auf $95\text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt, um die DNA-Doppelstränge voneinander zu trennen. Währenddessen wird kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen.

Durch das Anfertigen von Schmelzkurven lässt sich eine optimale Messtemperatur für die Fluoreszenzmessung bei einer PCR festlegen. Dabei wird die Messtemperatur so gewählt, dass sie oberhalb der Schmelzpunkte der unspezifischen Nebenprodukte und unterhalb des Schmelzpunktes der Templates liegt. So wird sichergestellt, dass nur die Konzentration der gesuchten Templates und nicht die der Nebenprodukte gemessen wird. Vor der eigentlichen Messreihe wird die Messtemperatur durch Vorläufe anhand der Schmelzkurven bestimmt. In Abb. 5 ist beispielhaft die Schmelzkurve von hBD-3 dargestellt. Der Messpunkt für die Fluoreszenzmessung von hBD-3 wurde hier bei $87\text{ }^\circ\text{C}$ festgelegt.

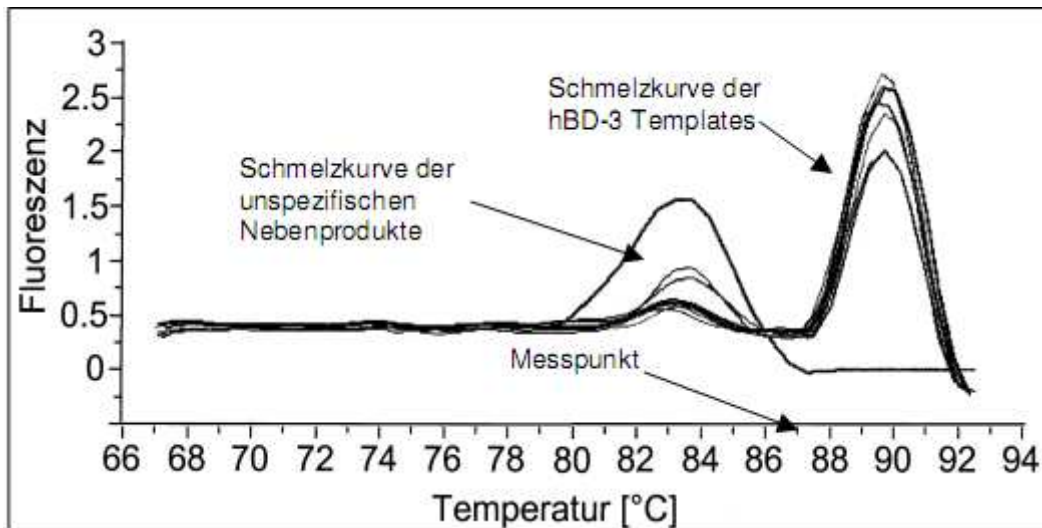


Abbildung 5: Schmelzkurve von hBD-3

Die Schmelzkurve dient der Unterscheidung der mit SYBR Green I (Roche) markierten PCR-Produkte von Primerdimeren, die eine geringere Schmelztemperatur aufweisen.

2.3.3 Verwendete Primer

Für alle PCRs wurden auf Grundlage der veröffentlichten mRNA-Sequenzen spezifische Intron-überspannende Primer ausgewählt, deren Sequenzen und Produktlängen in Tab. 3 dargestellt sind. Die Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma ARK bezogen. Dabei wurde die Primer3 Software verwendet (Rozen und Skaletzky, zu finden über http://www.genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html).

Tabelle 3: Verwendete Primer (Tm = Schmelztemperatur in °C; Bp = Basenpaare)

Primer	Genbank-Nr.:	Orientierung	Sequenz	Bp	Tm
HNP 1-3	NM 004084	sense antisense	GCA GCG GAC ATC CCA GAA GT AAG GAA ATT GAG CAG AAG GTA CAG GA	266	60
HD5	NM 021010	sense antisense	GCC ATC CCT GCT GCC ATT C AGA TTT CAC ACC CCG GAG A	241	60
HD6	NM 001926	sense antisense	CCT CAC CAT CCT CAC TGC TGT TC CCA TGA CAG TGC AGG TCC CAT A	266	60
hBD-1	NM 005218	sense antisense	TTG TCT GAG ATG GCC TCA GGT GGT AAC ATA CTT CAA AAG CAA TTT TCC TTT AT	253	57
hBD-2	AF 448141	sense antisense	ATC AGC CAT GAG GGT CTT GT GAG ACC ACA GGT GCC AAT TT	173	58
hBD-3	NM 018661	sense antisense	AGC CTA GCA GCT ATG AGG ATC CTT CGG CAG CAT TTT CGG CCA	206	60
Psoriasisin	NM 002969.2	sense antisense	AGA CGT GAT GAC AAG ATT GAC TGT CCT TTT TCT CAA AGA CGT C	127	58
RNase 7	HSA 131212	sense antisense	GGA GTC ACA GCA CGA AGA CCA CAT GGC TGA GTT GCA TGC TTG A	235	60
LL-37	NM 004345	sense antisense	GCC AAA GCC TGT GAG CTT C ACC CAG CAG GGC AAA TCT C	190	57

2.3.4 Real-time PCR Ansatz und Durchführung

Ein 10 µl PCR-Ansatz im Fluoreszenz-Thermo Cycler enthielt:

Tabelle 4: Ansatz für die real-time PCR

Komponente	Konzentration	Menge
cDNA der Probe	20ng	1 µl
MgCl ₂ (Roche)	4 mM	1,2 µl
sense Primer	0,5 µM	0,5µl
antisense Primer	0,5 µM	0,5µl
Light Cycler Fast Start DNA SYBR Green I Mix (Roche) (enthält Farbstoff und Taq Polymerase)	1 x	1 µl
<i>aqua dest.</i>		5,8 µl

Die PCR im Fluoreszenz-Thermo Cycler wurde mit folgenden Parametern durchgeführt:

Tabelle 5: Amplifikationsprotokoll real-time PCR

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Initiale Denaturierung	94°C	10 min
2. Denaturierung	95°C	10 sec
3. Bindung der Primer	Annealingtemperatur	5 sec
4. Amplifikation	72°C	15 sec
5. Fluoreszenzmessung	Durch Vorversuche anhand der Schmelzkurven ermittelt	wenige msec
6. Schmelzkurve	Proben werden auf 65°C abgekühlt und dann um 0,2°C / sec auf 95°C erhitzt (siehe Abb. 5)	
Die Schritte 2-5 wurden 45 x wiederholt (45 Zyklen)		

Die SYBR Green I (Roche)-Fluoreszenz wurde nach Abschluss der Amplifikationsphase am Ende eines jeden Zyklus gemessen, um die Zunahme der Templates pro Zyklus zu ermitteln. Die Messtemperatur für die Fluoreszenzmessung wurde aus den Schmelzkurven für jedes Template spezifisch ermittelt. Die Annealingtemperatur ist die Temperatur, bei der die Primer an die DNA binden und liegt etwa 3-5 °C unter der Primer-Schmelztemperatur (T_m °C), die näherungsweise folgendermaßen berechnet wird:

$$T_m \text{ °C} = 4 \text{ °C} \times (\Sigma G + \Sigma C) + 2 \text{ °C} \times (\Sigma A + \Sigma T)$$

$$\text{Annealingtemperatur °C} = T_m \text{ °C} - 5 \text{ °C}$$

(T_m °C = Schmelztemperatur, G = Guanin, C = Cytosin, A = Adenin und T = Thymin)

2.3.5 Absolute Quantifizierung der antimikrobiellen Peptide

Voraussetzung für die absolute Quantifizierung über externe Standards ist, dass der Standard die Sequenz der gesuchten Ziel-DNA in exakt bekannter Konzentration enthält. Um die Transkriptmenge der verschiedenen antimikrobiellen Peptide exakt zu bestimmen wurden externe Standardkurven für jedes Zielgen erstellt.

Zur Generierung eines Standards wurden Target-cDNA-Fragmente in einen Plasmid-Vektor kloniert, in *E. coli* amplifiziert, aufgereinigt und quantifiziert. Anschließend wurde die Zahl der Kopien in der Stammlösung berechnet und Verdünnungsreihen von 10^8 - 10^0 Kopien/ μ l angesetzt. Jeder Ansatz zeigte eine messbare Fluoreszenz ab einer, von seiner Ausgangskonzentration abhängigen, Zyklenzahl. Aus diesen Daten wurden Standardkurven erstellt. Die Werte aus 7–8 Standardkurven wurden gemittelt und so ergab sich eine charakteristische Standardkurve für jedes Peptid, welche die exakte Quantifizierung der Zielsequenz und den direkten Vergleich von Konzentrationen unterschiedlicher Zielsequenzen ermöglichte. Die Erstellung der Standardkurven und die Bestimmung der Kopienzahl in den Proben erfolgten mit Hilfe der Software Excel (Microsoft).

2.4 Generierung externer Standards

Die im Folgenden beschriebene Konstruktion der Standards wurde von Frau Dipl.-Biologin Gabriele Brunke im Rezeptor- und Hormonlabor durchgeführt. Die Standards wurden freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

2.4.1 RT-PCR

Zuerst wurde durch eine RT-PCR (engl. „reverse transcription polymerase chain reaction“) der für das antimikrobielle Peptid kodierende Genabschnitt vervielfältigt. Die RT-PCR wurde in einem 50 μ l Ansatz mit einem Thermocycler (Gene Amp 2400, Perkin) durchgeführt und hierbei die Taq DNA-Polymerase (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die verwendeten Primer sind identisch mit denen, die für die real-time PCR verwendet wurden (siehe Tab. 3).

Ein 50 μ l Ansatz enthielt die in Tab. 6 aufgeführten Komponenten und erfolgte unter den PCR-Bedingungen aus Tab. 7:

Tabelle 6: Ansatz für die RT-PCR

Komponente	Konzentration	Menge (50 µl)
PCR-Puffer 10x	20 mM Tris-HCL mit 50 mM KCl	5 µl
Magnesiumchlorid	1,5 mM	1,5 µl
dNTP	Je 0,2 mM	4 µl
DNA-Polymerase	1,5 U	0,5 µl
sense Primer	0,25 µM	1,25 µl
antisense Primer	0,25 µM	1,25 µl
cDNA	20 ng/µl	5 µl
<i>aqua dest.</i>		31,5 µl

Tabelle 7: Amplifikationsprotokoll für die RT-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	Kolonie-PCR
1. Initiale Denaturierung	93 °C	5 min	10 min
2. Denaturierung	93 °C	45 sec	10 min
3. Bindung der Primer	Annealingtemperatur	45 sec	10 min
4. Amplifikation	72 °C	1 min	10 min
5. Finale Amplifikation	72 °C	10 min	10 min
Die Schritte wurden 20 mal wiederholt.			

2.4.2 Aufreinigung durch Gelelektrophorese

Zur Aufreinigung und Identifizierung des gesuchten PCR-Produktes wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Dafür wurden 45 µl der PCR-Produkte mit 5 µl Probenpuffer auf einem 1,7 %-igen Agarosegel (Ultrapur, Invitrogen) aufgetragen. Nach elektrophoretischer Auftrennung über 1 h bei 100 V wurde das Gel für 5 min in einer 0,01 %-igen Ethidiumbromidlösung gefärbt. Nach Auswertung der fluoreszierenden produktspezifischen Banden unter UV-Licht und deren Ausschneiden wurde die cDNA mit dem Qiaex II Kit (Qiagen) aus dem Gel isoliert. Zu je 100 mg dieser Gelstücke wurden 300 µl einer Suspension zugegeben, welche DNA-bindende Silicat-Gel-Partikel enthielt. Es folgte die Inkubation des Gemisches für 10 min bei 50 °C. Anschließend wurden die mit der cDNA besetzten Silicat-Gel-Partikel abzentrifugiert, gewaschen und getrocknet. Danach erfolgte die Elution der cDNA mit 20 µl 10 mM Tris-HCl (pH 8). Die DNA-Konzentration wurde photometrisch, wie in Kapitel (Kap.) 2.2.2 erläutert, bestimmt.

2.4.3 Klonierung und Transfektion

Für jedes Peptid erfolgte die direkte Insertion der PCR-Produkte in den „pCR-Blunt II-Topo Vektor“ (Plasmid, 3519 Bp, Invitrogen) mit Hilfe des „Zero Blunt Topo Cloning Kit“ (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers. Dazu wurden 0,5 µl einer Salzlösung mit 0,5 µl des Vektors sowie 2 µl des entsprechenden PCR-Produktes 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für die anschließende Transfektion des Vektors in kompetente *E. coli*-Zellen (Top 10 *E. coli*, Invitrogen) wurden 50 µl der *E. coli*-Suspension mit 2 µl des Ansatzes aus der Klonierungsreaktion gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Transfektion für 30 s bei 42 °C, welche durch Abkühlen auf Eis über 2 min gestoppt wurde. Die Ansätze wurden dann in 250 µl 37 °C-warmes LB-Medium (SOC-Medium ultrapur, Invitrogen) überführt und anschließend auf LB-Agarplatten (Ø 10 cm) bei 37 °C über Nacht kultiviert. Die Agarplatten waren mit dem Antibiotikum Kanamycin (50 µg/ml) versetzt. Durch die erfolgreiche Transfektion des Vektors wurde die Kanamycin-Resistenz der *E. coli*-Bakterien aktiviert und so die Insert-tragenden Klone selektiert.

2.4.4 Kolonie-PCR und Anlegen einer Masterplatte

Eine Kolonie-PCR der selektionierten Klone in einem 30 µl PCR-Ansatz (siehe Tab. 6) diente dem Nachweis der gelungenen Insertion der Peptid-DNA in den Vektor sowie der Transfektion des Vektors in die *E. coli*-Zellen. Dazu wurde von den auf Kanamycin gewachsenen Kolonien mit Hilfe einer Pipettenspitze eine einzelne Kolonie aufgenommen. Mit der Pipettenspitze wurde dann eine mit einem Nummernraster versehene Kanamycin-Agarplatte (Masterplatte) sowie ein PCR-Röhrchen beimpft. Anschließend wurde nach dem oben genannten PCR-Protokoll (Tab. 6) mit einer auf 10 min verlängerten initialen Denaturierungsphase die sog. Kolonie-PCR in einem 30 µl PCR-Ansatz durchgeführt. Das 10-minütige Erhitzen auf 95 °C reichte aus, um die *E. coli*-Zellen zu lysieren und die Plasmid-DNA freizusetzen. Die verwendeten Primer („puc A“ und „puc B“, Invitrogen) flankieren die Insert-Region des Plasmids und produzieren ca. 600 Bp-große Amplifikate.

Ein Volumen von 9 µl der PCR-Produkte wurde mit 1 µl Auftragspuffer über eine Stunde bei 100 V in einem 1,5 %-igen Agarosegel (Agarose Ultrapur, Invitrogen) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Masterplatte wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nur die plasmidtragenden Kolonien wurden für die anschließende Plasmidisolierung in optimiertem LB-Medium (SOC-Medium ultrapur, Invitrogen) angezogen und während der exponentiellen Wachstumsphase geerntet.

2.4.5 Plasmidisolierung und Sequenzierung der Insert-tragenden Plasmide

Die Plasmidisolierung aus den geernteten Plasmid-haltigen Klonen wurde mit dem Miniprep-Kit (Qiagen) nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden die Klone zunächst

lysiert und dann auf die Säulen des Kits gebracht, welche Silicat-Gel-Membranen enthalten, an denen die Plasmid-DNA selektiv bindet und so von den übrigen Nukleinsäuren unter Waschungen getrennt, gereinigt und anschließend mit *Aqua dest.* eluiert werden kann. In Zusammenarbeit mit dem Forschungslabor Dr. J. Harder, Dermatologische Klinik des Universitätsklinikums Schleswig Holstein, Campus Kiel, wurden die isolierten Plasmide in einem DNA-Sequenzierer (ALF Express, Pharmacia) zur Kontrolle sequenziert.

2.4.6 Linearisierung des Vektors

Da die Insert-tragende Plasmid-DNA als Standard benutzt werden sollte, wurde sie durch einen Restriktionsenzymverdau mit Hind III (Boehringer) linearisiert. Danach erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung der linearisierten Plasmide in einem 1,7 %-igen Agarosegel über 1 h bei 100 V mit anschließender Isolation und Aufreinigung der DNA mit Qiaex II (Qiagen) wie in Kap. 2.4.2 beschrieben.

2.4.7 Messung der DNA-Konzentration

Nach der photometrischen Messung (Eppendorf-Photometer) der plasmidischen DNA-Konzentration bei 260 nm in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ wurde die Kopienzahl der DNA-Moleküle in Kopien/ μl mit folgender Formel errechnet:

$$\text{Kopienzahl}/\mu\text{l} = \frac{X \text{ [g}/\mu\text{l}]}{Y \times 666 \text{ [g/mol]}} \times 6,023 \times 10^{23} \text{ [Kopienzahl/mol]}$$

- X: gemessene Konzentration der Plasmid-DNA in $\text{g}/\mu\text{l}$
- Y: Bp des Plasmides plus Bp des eingebauten DNA-Fragmentes
- durchschnittliches Molekulargewicht eines Bp: 666 g/mol
- Avogadro-Konstante: $6,023 \times 10^{23}$ [Kopienzahl/mol]

2.4.8 Erstellung der Standardkurven

Die so ermittelte Kopienzahl diente der Erstellung von Standardverdünnungsreihen für PCR-Ansätze mit definierten Ausgangskonzentrationen von 10^8 – 10^0 der entsprechenden DNA-Abschnitte. Jeder Ansatz zeigte eine messbare Fluoreszenz ab einer für seine Ausgangskonzentration charakteristischen Zyklenzahl. Aus diesen Daten wurden ca. 7–8 Standardkurven mit jeweils drei Replikaten pro Verdünnung erstellt. Aus diesen einzelnen Kurven wurden spezifische Standardkurven für jedes Template durch Mittelwertbildung berechnet.

2.5 Immunhistochemie

Während durch die Messung mittels real-time PCR die Gen-Expression der Peptide anhand der vorhandenen mRNA ermittelt wurde, konnten durch immunhistochemische Färbungen die Proteine direkt nachgewiesen und ihre Lokalisation im Gewebe bestimmt werden. Es wurden immunhistochemische Färbungen mit der Labelled-Streptavidin-Biotin-Methode für den Nachweis von hBD-2, LL-37, Psoriasin und RNase7 durchgeführt.

2.5.1 Anfertigung von Kryostat-Schnitten

Die Proben wurden wie in Kap. 2.1.1 beschrieben entnommen und in Einbettmedium („Tissue-Tek“, Miles Scientific) bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte an einem Microtom (Microm) für Kryoschnitte bei einer Arbeitstemperatur von -20 °C . Es wurden $5\text{ }\mu\text{m}$ dicke Schnitte der Biopsien angefertigt, die auf Objektträger („superFrost Plus“, Menzel) gebracht und an der Luft getrocknet wurden. Die Lagerung der fertigen Kryoschnitte erfolgte bei -20 °C .

2.5.2 Prinzip der immunhistochemischen Färbung

Die Peptide werden bei dieser Färbemethode mittels eines indirekten Antigennachweises sichtbar gemacht. In einem ersten Schritt wird ein spezifischer Antikörper (sog. Primärantikörper) auf die zu untersuchenden Kryoschnitte gegeben. Anschließend wird ein Antikörper aufgetragen, der sich gegen das Fc-Fragment des ersten Antikörpers richtet (sog. Sekundärantikörper) und kovalent mit Biotin markiert ist. Nach der Inkubation mit dem biotinylierten sekundären Antikörper wird dem Ansatz ein Streptavidin/Enzym-Komplex zugegeben. Streptavidin (aus *Streptomyces avidinii*) besitzt eine hohe Affinität für Biotin und hat vier Bindungsstellen für dieses Molekül. Daher bindet der Streptavidin/Enzym-Komplex an das Biotin des sekundären Antikörpers. Der Komplex enthält als Enzym Meerrettichperoxidase (engl. „horseradish peroxidase“ (HRP)), die das Chromogen 3,3'-Di-Amino-Benzidin (DAB) zu einem braunen Farbstoff umsetzt. Auf diese Weise entstehen an den Stellen, an denen die primären Antikörper an das Protein gebunden haben, lichtmikroskopisch sichtbare Braunfärbungen. Anschließend wird das umliegende Gewebe mit Hämatoxylin gegengefärbt. Um eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers auszuschließen, wurde für jedes Präparat eine Kontrollfärbung ohne Primärantikörper vorgenommen.

2.5.3 Protokoll der Immunfärbungen

Die bei -20 °C konservierten Gefrierschnitte wurden für ca. 2 h bei RT lichtgeschützt getrocknet und anschließend für 5 min in Formalin fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-Puffer erfolgte die Blockierung der endogenen Peroxidasen (z.B. in Erythrozyten,

Granulozyten und Muskelgewebe vorkommend) durch 10-minütiges Inkubieren mit 3 % Wasserstoffperoxid in Methanol (9 ml Methanol + 1 ml 30 %-iges H₂O₂). Nach dreimaligem Waschen mit TBS-Puffer erfolgte zur Minderung von unspezifischen Bindungsreaktionen des primären Antikörpers an freien Gewebsantigenen eine 20-minütige Inkubation mit einem verdünnten Serum („Normalserum“ Dako, Verdünnungen 1:5 bis 1:20) von der Tierspezies stammend, in der der sekundäre Antikörper hergestellt worden war. Nach einmaligem Waschen mit TBS-Puffer wurden die Gefrierschnitte für 16 h bei +4 °C in einer feuchten Kammer mit dem jeweiligen Primärantikörper (siehe Tab. 8) inkubiert. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne Primärantikörper. Folgende Primärantikörper wurden verwendet:

Tabelle 8: Primärantikörper für den Proteinnachweis

Antikörper	Art des Antikörpers	Hersteller
hBD-2	Rabbit-anti-human	Santa Cruz Biotechnology
RNase 7	Goat-anti-human	Arbeitsgruppe Prof. Schröder
Psoriasisin	Mouse-anti-human	Santa Cruz Biotechnology
LL-37	Goat-anti-human	Santa Cruz Biotechnology

Der Inkubationsansatz enthielt folgende Komponenten:

Tabelle 9: Pufferlösung für Primärantikörper

Komponente	Volumen
50 % Antikörper-Diluent	500 µl
5 % Blockserum „Normalserum“	50 µl
Primärer Antikörper 1:500 Verdünnung	2 µl
TBS	448 µl (450 µl bei Kontrollfärbung)

Nach 16 h wurden die Präparate nach mehreren TBS-Waschungen mit den biotinylierten sekundären Antikörpern verdünnt mit TBS-Puffer (1:500) für 60 min inkubiert (Tab. 10):

Tabelle 10: Sekundärantikörper für den Proteinnachweis

Antikörper	Art des Antikörpers	Hersteller
E 0353 (für hBD-2)	Pig-anti-rabbit, Biotin-gekoppelt	Dako
E 0354 (für Psoriasisin)	Rabbit-anti-mouse, Biotin-gekoppelt	Dako
E 0466 (für RNase 7)	Rabbit-anti-goat, Biotin-gekoppelt	Dako
E 0466 (für LL-37)	Rabbit-anti-goat, Biotin-gekoppelt	Dako

Daraufhin wurden die Präparate erneut mehrmals mit TBS-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit dem „StreptABComplex/HRP“ der Firma Dako. Der Komplex wurde in 5 ml TBS-Puffer unter Zugabe von 45 µl Streptavidin (Komponente A des Kits) und 45 µl HRD (Komponente B) angesetzt und 30 min bei 4 °C vorinkubiert. Anschließend erfolgte nach TBS-Waschungen das Aufbringen der chromogenen Substratlösung DAB (Dako, Verdünnung: 20 µl/ml TBS-Puffer) für zwei bis fünf Minuten unter lichtmikroskopischer Kontrolle bis eine erkennbare Braunfärbung erreicht war. Die Farbreaktion wurde durch Waschen mit TBS-Puffer gestoppt (DAKO, „Handbuch immunhistochemische Färbemethoden II“). Die Präparate wurden mit *Aqua dest.* und Leitungswasser gespült. Zur sichtbaren Darstellung des umliegenden Gewebes wurde eine Gegenfärbung mit 10 %-igem Hämatoxylin (Merck) für 10 min durchgeführt. Eine 10-minütige Spülung mit Leitungswasser diente dem Bläuen der Zellkerne. Die Konservierung der Präparate erfolgte durch Eindecken in dem wässrigen Medium „Aquatex“ (Merck). Die Photodokumentation wurde am Lichtmikroskop („Axioplan“, Zeiss) mit einer Digitalkamera durchgeführt.

2.6 Statistische Analysen

Der Kolmogorov-Smirnov-Test wurde durchgeführt und ergab, dass die Ergebnisse der Untersuchungen der Genexpression nicht normal verteilt waren, weswegen nicht-parametrische Tests für die statistische Auswertung herangezogen wurden. Um die Anzahl der Transkripte der gesunden Patientinnen mit denen der HPV-infizierten Patientinnen zu vergleichen, wurde der Mann-Whitney-Test genutzt. Mittels Wilcoxon-Test wurden die Expressionslevel der verschiedenen biopsierten Areale der Kondylom-Patientinnen, klinisch gesundes Gewebe und Gewebe mit *Condylomata acuminata*, verglichen. Es wurde stets zweiseitig getestet und ein Signifikanzniveau von 5% zugrunde gelegt. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte mittels Box-Whisker-Plots, welche den Median (fett gedruckte Linie), die zwei Quartile (Box), milde (Kreise) und extreme Ausreißer (Sterne) entsprechend der Standarddefinition zeigen.

Die statistischen Berechnungen und die Erstellung der Diagramme wurden mit PASW 18 (SPSS Inc. an IBM Company, Chicago, IL) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Genexpression der α -Defensine

Die untersuchten α -Defensine, die HNP 1-3, HD5 und HD6, waren durch die real-time PCR (siehe Kap. 2.3) nur in geringen Konzentrationen nachweisbar. Für keines der Peptide zeigten sich nennenswerte Unterschiede zwischen der Expression der mRNA in gesundem und HPV-infiziertem Gewebe. Die höchste Kopienzahl ließ sich für HNP 1-3 im Gewebe mit Kondylomen nachweisen (43 Transkripte). HD5 war mit einer maximalen Kopienzahl von 860 auf sehr niedrigem Niveau im gesunden Gewebe der Kondylom-Patientinnen nachweisbar und zeigte keine signifikanten Schwankungen in den verschiedenen untersuchten Arealen. HD6 war ebenfalls kaum nachweisbar und zeigte eine leicht erhöhte Expression im Gewebe mit Feigwarzen (156 Transkripte), jedoch ohne statistische Signifikanz. Kopienzahlen und Standardfehler (SEM) sind in Tab. 11, 12 und 13 aufgeführt:

Tabelle 11: Genexpression der HNP 1-3

Gewebeprobe	HNP 1-3 (Transkripte in 20 ng mRNA)	SEM
gesunde Schleimhaut (n = 20) Nicht-infizierte Patientinnen	32	12
unauffällige Schleimhaut (n = 21) HPV-infizierte Patientinnen	19	11
veränderte Schleimhaut (n = 21) HPV-infizierte Patientinnen	43	22

Tabelle 12: Genexpression von HD5

Gewebeprobe	HD5 (Transkripte in 20 ng mRNA)	SEM
gesunde Schleimhaut (n = 20) Nicht-infizierte Patientinnen	860	525
unauffällige Schleimhaut (n = 21) HPV-infizierte Patientinnen	847	476
veränderte Schleimhaut (n = 21) HPV-infizierte Patientinnen	756	314

Tabelle 13: Genexpression von HD6

Gewebeprobe	HD6 (Transkripte in 20 ng mRNA)	SEM
gesunde Schleimhaut (n = 20) Nicht-infizierte Patientinnen	83	67
unauffällige Schleimhaut (n = 21) HPV-infizierte Patientinnen	64	33
veränderte Schleimhaut (n = 21) HPV-infizierte Patientinnen	156	87

3.2 Genexpression der β -Defensine

3.2.1 Genexpression von hBD-1

Die basale Genexpression des hBD-1 war mit einer Kopienzahl von 37.330 (SEM 53.928) pro 20 ng mRNA höher als die der anderen analysierten β -Defensine im gesunden Gewebe. Die mRNA-Expression des Peptides war ähnlich in den klinisch unauffälligen Schleimhautbereichen der Kondylom-Patientinnen (27.844 Transkripte, SEM 40.248, $p=0,97$). Ein starker Anstieg der Genexpression konnte im Gewebe mit *Condylomata acuminata* verzeichnet werden. Hier wurde eine Kopienzahl von 57.885 (SEM 60.182) ermittelt, was einer Verdopplung der Transkripte im Vergleich zum klinisch unauffälligen Gewebe von nicht-infizierten und HPV-infizierten Patientinnen entsprach. Dieser Anstieg war statistisch signifikant ($p=0,016$ und $p=0,027$). Die Expression von hBD-1 ist in Abb. 6 dargestellt:

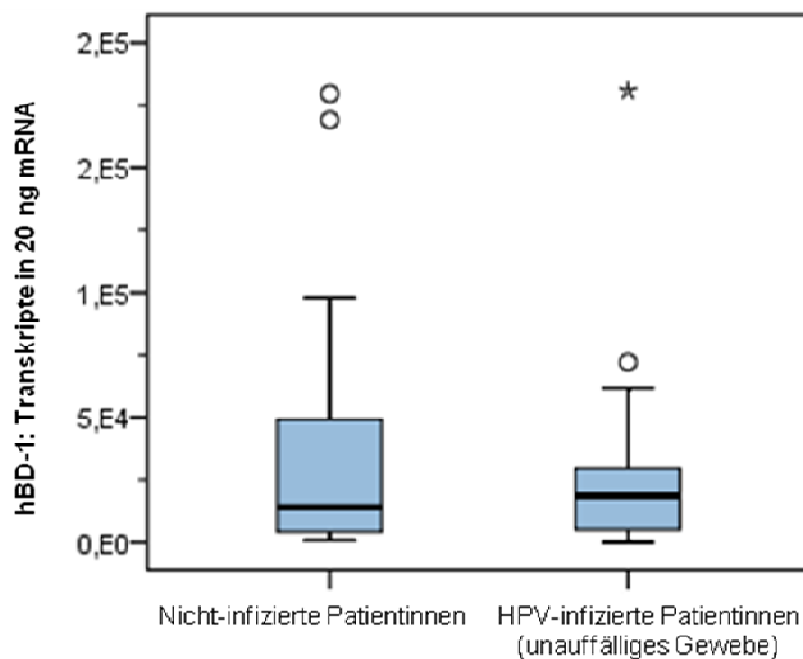


Abbildung 6A: Genexpression von hBD-1

Die hBD-1-Expression war im gesunden Gewebe ($n=20$) und im unauffälligen Gewebe der Kondylom-Patientinnen ($n=21$) ähnlich ($p=0,97$). Der Box-Whisker-Plot zeigt den Median (fett gedruckte Linie), die zwei Quartile (Box), milde (Kreise) und extreme Ausreißer (Sterne).

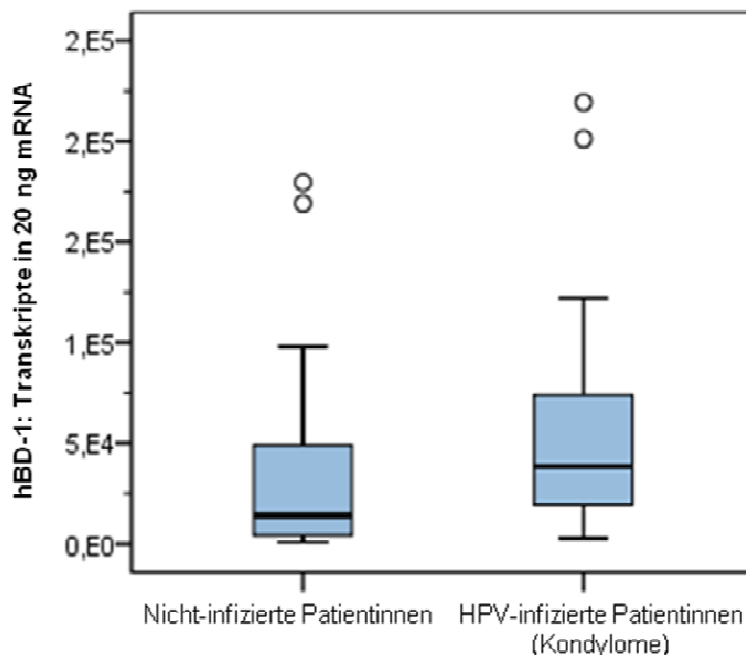


Abbildung 6B: Genexpression von hBD-1

Die hBD-1-Expression zeigte im Gewebe mit Kondylomen (n=21) einen signifikanten Anstieg ($p=0,016$) im Vergleich zur Expression im gesunden Gewebe (n=20). Der Box-Whisker-Plot zeigt den Median (fett gedruckte Linie), die zwei Quartile (Box), milde (Kreise) und extreme Ausreißer (Sterne).

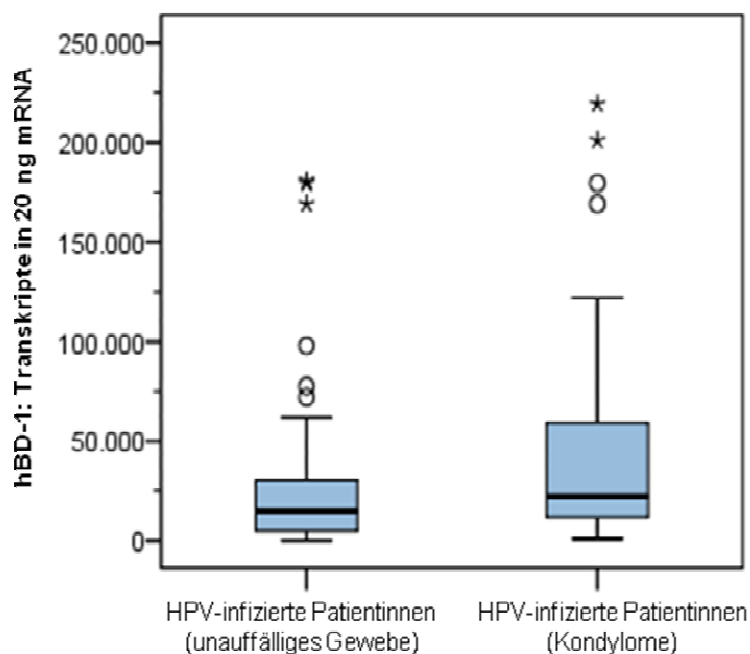


Abbildung 6C: Genexpression von hBD-1

Die hBD-1-Expression zeigte im Gewebe mit Kondylomen (n=21) einen signifikanten Anstieg ($p=0,027$) im Vergleich zur Expression im unauffälligen HPV-infizierten Gewebe (n=21). Der Box-Whisker-Plot zeigt den Median (fett gedruckte Linie), die zwei Quartile (Box), milde (Kreise) und extreme Ausreißer (Sterne).

3.2.2 Genexpression von hBD-2

Die Genexpression des β -Defensins hBD-2 unterschied sich deutlich von der des hBD-1. Im gesunden Gewebe der Kontrollgruppe lag die Expression bei 13.251 Kopien (SEM 19.889) und somit unter der des hBD-1. Der Anstieg der Expression in den HPV-infizierten Gewebeproben war für dieses Defensin hingegen höher. In den klinisch gesunden Arealen der Kondylom-Patientinnen fand sich mit 30.241 Kopien (SEM 39.874, $p=0,16$) eine Verdopplung, im biopsierten Gewebe mit Feigwarzen mit 572.602 Transkripten (SEM 1.143.628) ein 44-facher Anstieg im Vergleich zur hBD-2-Expression in gesunder Schleimhaut, was dem höchsten gemessenen relativen Anstieg aller untersuchten Peptide entsprach. Der Vergleich der mRNA-Expression in Gewebeproben von *Condylomata acuminata* mit klinisch unauffälligem Gewebe von HPV-infizierten und nicht-infizierten Patientinnen war statistisch signifikant ($p=0,001$ und $p<0,001$). Die Expression von hBD-2 stellt Abb. 7 dar:

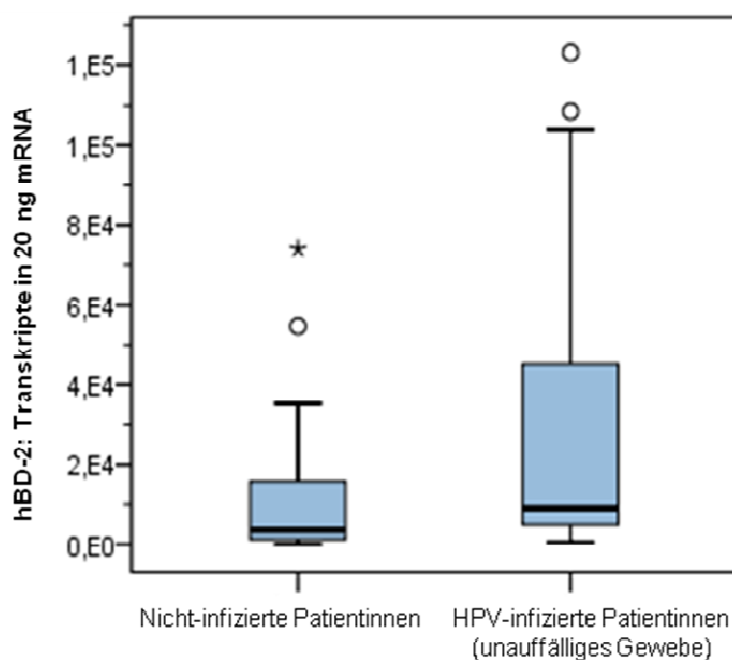


Abbildung 7A: Genexpression von hBD-2

Die hBD-2-Expression war im unauffälligen Gewebe der Kondylom-Patientinnen ($n=21$) doppelt so hoch wie die Expression im gesunden Gewebe ($n=20$) ($p=0,16$). Der Box-Whisker-Plot zeigt den Median (fett gedruckte Linie), die zwei Quartile (Box), milde (Kreise) und extreme Ausreißer (Sterne). Zur übersichtlicheren Darstellung ist nur ein Ausschnitt aufgeführt, der nicht alle Ausreißer zeigt.

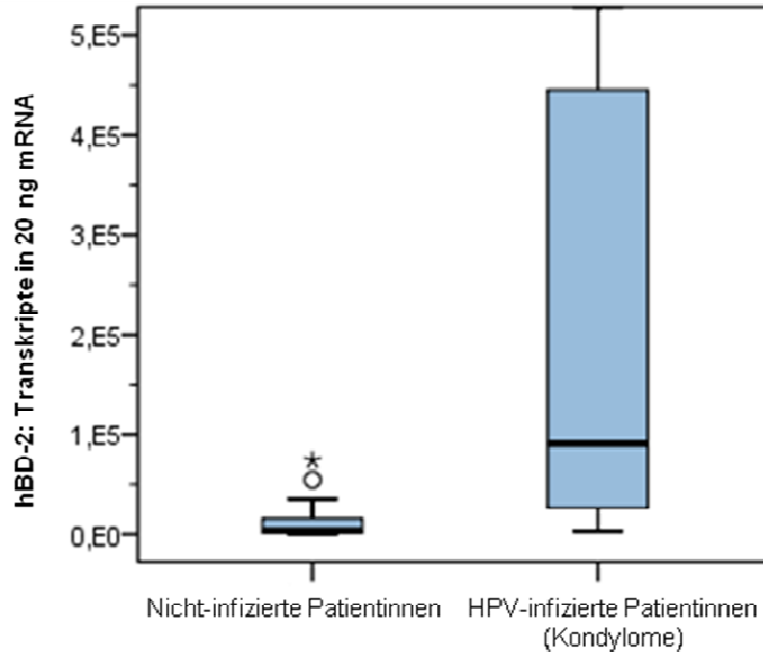


Abbildung 7B: Genexpression von hBD-2

Die hBD-2-Expression zeigte im Gewebe mit Kondylomen ($n=21$) einen signifikanten Anstieg ($p<0,001$) im Vergleich zur Expression im gesunden Gewebe ($n=20$). Der Box-Whisker-Plot zeigt den Median (fett gedruckte Linie), die zwei Quartile (Box), milde (Kreise) und extreme Ausreißer (Sterne). Zur übersichtlicheren Darstellung ist nur ein Ausschnitt aufgeführt, der nicht alle Ausreißer zeigt.

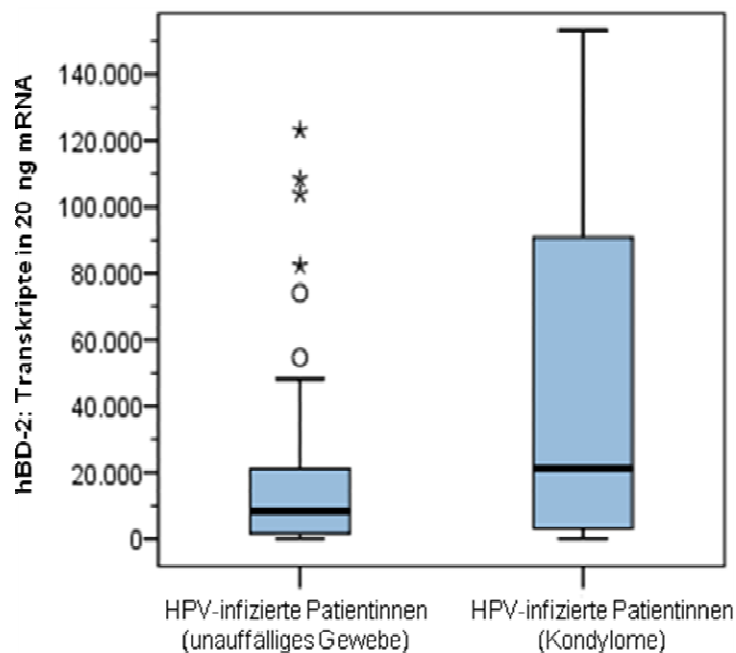


Abbildung 7C: Genexpression von hBD-2

Die hBD-2-Expression zeigte im Gewebe mit Kondylomen ($n=21$) einen signifikanten Anstieg ($p=0,001$) im Vergleich zur Expression im unauffälligen HPV-infizierten Gewebe ($n=21$). Der Box-Whisker-Plot zeigt den Median (fett gedruckte Linie), die zwei Quartile (Box), milde (Kreise) und extreme Ausreißer (Sterne). Zur übersichtlicheren Darstellung ist nur ein Ausschnitt aufgeführt, der nicht alle Ausreißer zeigt.

3.2.3 Genexpression von hBD-3

Das Expressionsmuster des antimikrobiellen Peptides hBD-3 ähnelte dem des hBD-2. Dieses β -Defensin wies eine basale Expression von 22.481 Kopien (SEM 37.119) auf, die damit unter der des hBD-1, jedoch über der des hBD-2 lag. In den Gewebeproben der HPV-infizierten Schleimhaut zeigte sich für dieses Defensin ebenfalls ein deutlicher Anstieg der Transkriptzahl. In den klinisch gesunden Bereichen betrug dieser etwa das 2,5-fache (59.054 Kopien, SEM 111.090, $p=0,35$), in den Bereichen mit klinisch sichtbarer Infektion annähernd das 10-fache der Transkriptzahl im Gewebe der Kontrollgruppe (209.196 Kopien, SEM 391.799). Die Zunahme der mRNA-Expression in der Schleimhaut mit Kondylomen war signifikant erhöht im Vergleich mit der in klinisch gesunder Schleimhaut von nicht-infizierten und HPV-infizierten Patientinnen ($p<0,001$ und $p=0,009$). Abb. 8 zeigt die Genexpression von hBD-3:

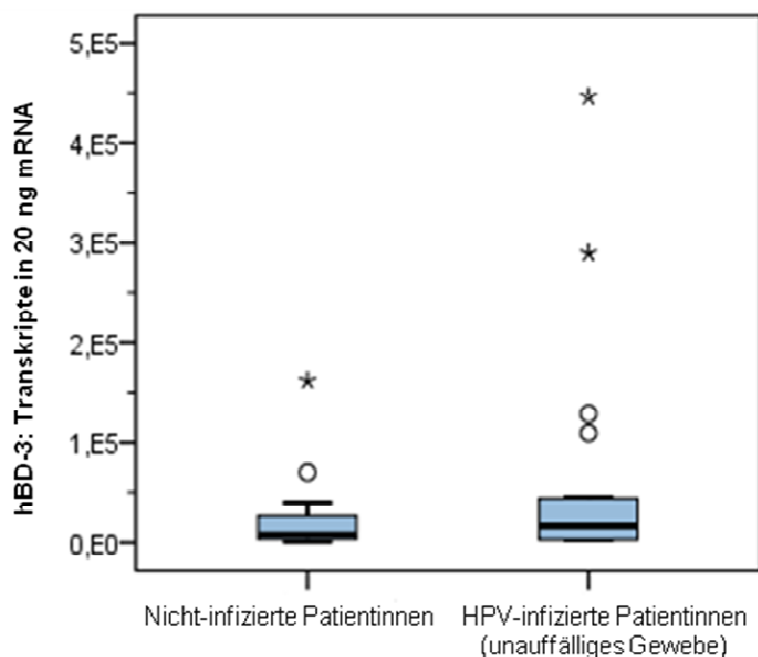


Abbildung 8A: Genexpression von hBD-3

Die hBD-3-Expression stieg im unauffälligen Gewebe der Kondylom-Patientinnen ($n=21$) um den Faktor 2,5 im Vergleich zur Expression im gesunden Gewebe ($n=20$) ($p=0,35$). Der Box-Whisker-Plot zeigt den Median (fett gedruckte Linie), die zwei Quartile (Box), milde (Kreise) und extreme Ausreißer (Sterne).

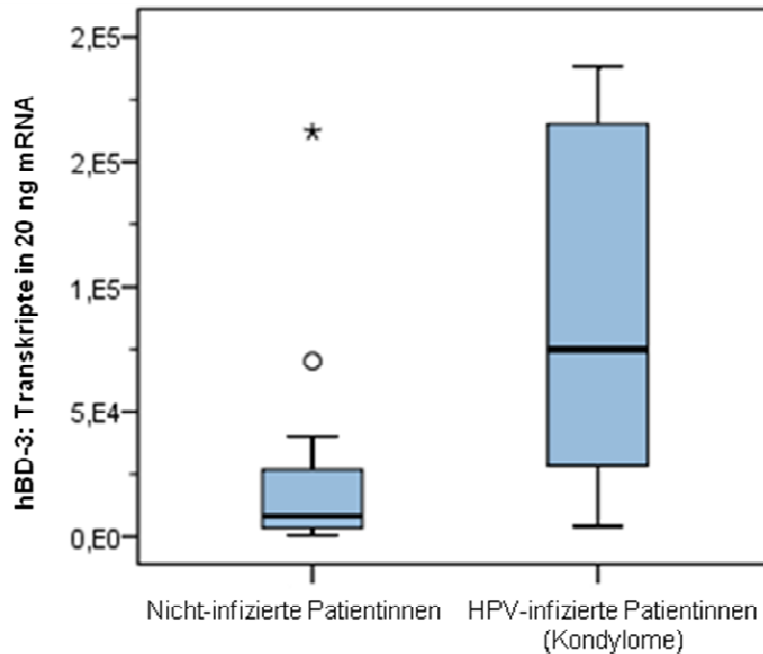


Abbildung 8B: Genexpression von hBD-3

Die hBD-3-Expression zeigte im Gewebe mit Kondylomen (n=21) einen signifikanten Anstieg ($p < 0,001$) im Vergleich zur Expression im gesunden Gewebe (n=20). Der Box-Whisker-Plot zeigt den Median (fett gedruckte Linie), die zwei Quartile (Box), milde (Kreise) und extreme Ausreißer (Sterne). Zur übersichtlicheren Darstellung ist nur ein Ausschnitt aufgeführt, der nicht alle Ausreißer zeigt.

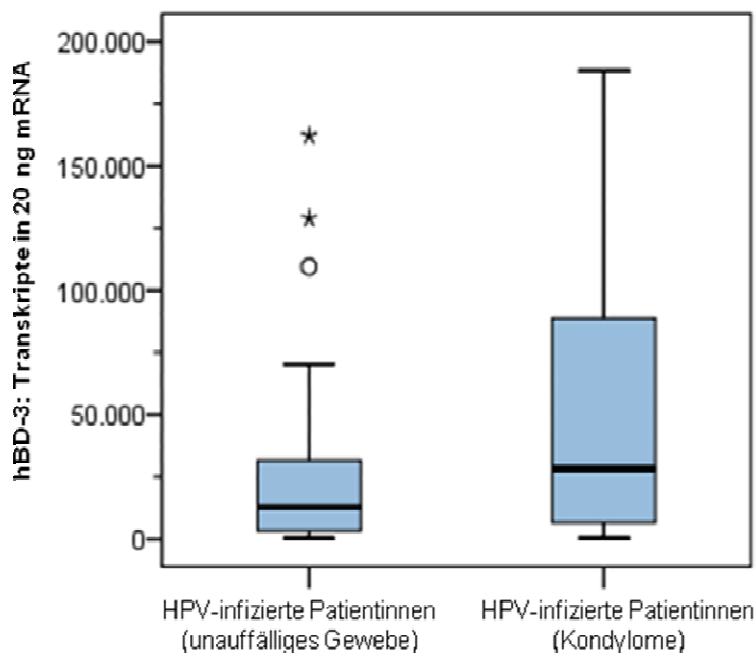


Abbildung 8C: Genexpression von hBD-3

Die hBD-3-Expression zeigte im Gewebe mit Kondylomen (n=21) einen signifikanten Anstieg ($p = 0,009$) im Vergleich zur Expression im unauffälligen HPV-infizierten Gewebe (n=21). Der Box-Whisker-Plot zeigt den Median (fett gedruckte Linie), die zwei Quartile (Box), milde (Kreise) und extreme Ausreißer (Sterne). Zur übersichtlicheren Darstellung ist nur ein Ausschnitt aufgeführt, der nicht alle Ausreißer zeigt.

3.3 Genexpression von Psoriasis

Die Messergebnisse für Psoriasis zeichneten sich dadurch aus, dass sie um ein Vielfaches höher lagen als die der anderen untersuchten Peptide. Im gesunden Gewebe fanden sich 5.545.064 Kopien (SEM 7.691.578). Die basale mRNA-Expression lag somit etwa 150-fach höher als die des hBD-1, dem Peptid mit der zweithöchsten Genexpression im gesunden Gewebe. Im untersuchten Gewebe der Kondylom-Patientinnen war ein starker Anstieg der Psoriasis-Expression zu verzeichnen. In den klinisch unauffälligen Bereichen verdoppelte sich die Expression (12.212.705 Kopien, SEM 14.040.000, $p=0,052$), in den Proben aus Arealen mit *Condylomata acuminata* stieg sie signifikant um den Faktor 4 auf 21.998.347 Kopien an (SEM 25.840.000, $p=0,001$). Der Anstieg der mRNA-Expression zwischen unauffälligem und verändertem Gewebe der HPV-infizierten Patientinnen war für Psoriasis nicht statistisch signifikant ($p=0,12$). Die Genexpression von Psoriasis ist in Abb. 9 dargestellt:

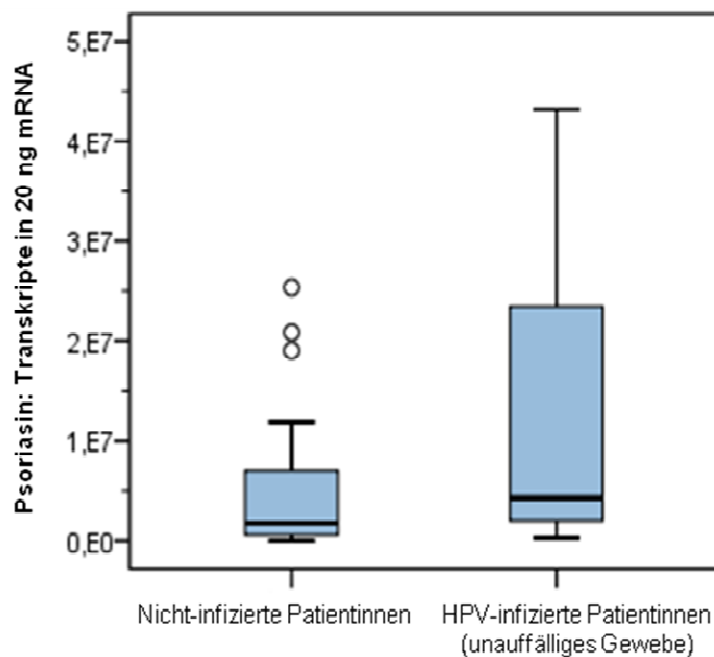


Abbildung 9A: Genexpression von Psoriasis

Die Psoriasis-Expression war im unauffälligen Gewebe der Kondylom-Patientinnen ($n=21$) doppelt so hoch wie die Expression im gesunden Gewebe ($n=20$) ($p=0,052$). Der Box-Whisker-Plot zeigt den Median (fett gedruckte Linie), die zwei Quartile (Box), milde (Kreise) und extreme Ausreißer (Sterne). Zur übersichtlicheren Darstellung ist nur ein Ausschnitt aufgeführt, der nicht alle Ausreißer zeigt.

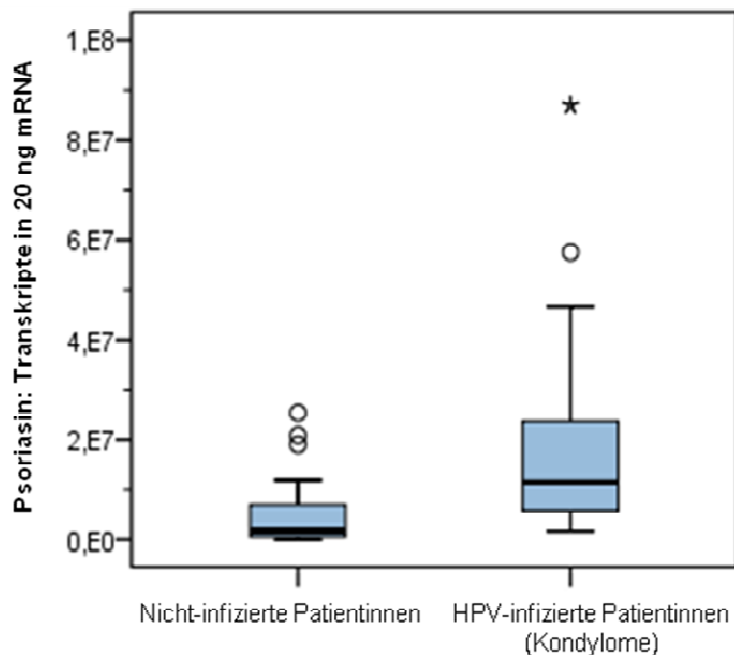


Abbildung 9B: Genexpression von Psoriasis

Die Psoriasis-Expression zeigte im Gewebe mit Kondylomen ($n=21$) einen signifikanten Anstieg ($p=0,001$) im Vergleich zur Expression im gesunden Gewebe ($n=20$). Der Box-Whisker-Plot zeigt den Median (fett gedruckte Linie), die zwei Quartile (Box), milde (Kreise) und extreme Ausreißer (Sterne).

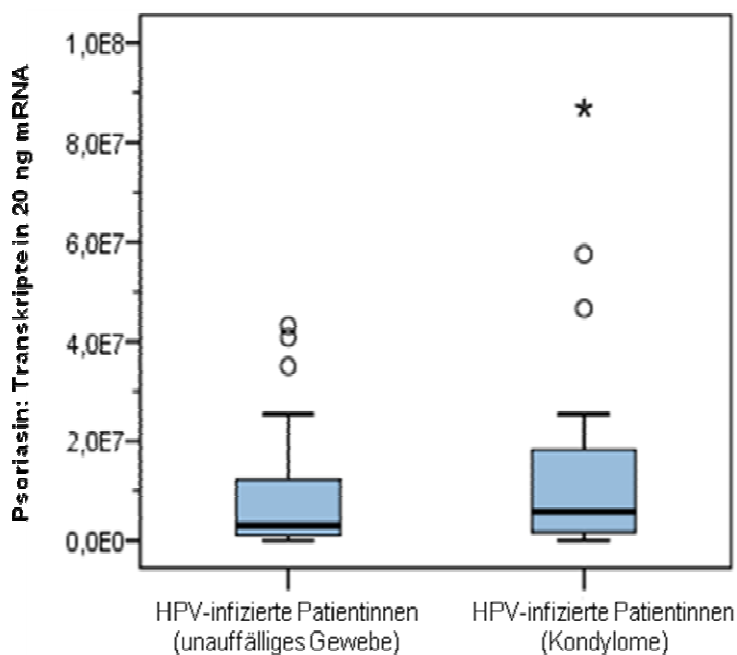


Abbildung 9C: Genexpression von Psoriasis

Die Psoriasis-Expression war im Gewebe mit Kondylomen ($n=21$) doppelt so hoch wie im unauffälligen HPV-infizierten Gewebe ($n=21$) ($p=0,12$). Der Box-Whisker-Plot zeigt den Median (fett gedruckte Linie), die zwei Quartile (Box), milde (Kreise) und extreme Ausreißer (Sterne).

3.4 Genexpression von RNase7

Bei den Messwerten von RNase7 fiel auf, dass diese im Vergleich zu denen der anderen untersuchten Peptide niedriger lagen und die Expression in gesunder und HPV-infizierter Schleimhaut nur leichte Schwankungen zeigte. Wie in Abb. 10 dargestellt, lag die basale Genexpression von RNase7 im Epithel der nicht-HPV-infizierten Patientinnen bei 9.032 Kopien (SEM 7.955). In den klinisch unauffälligen Arealen der Kondylompatientinnen wurde eine ähnliche Anzahl an mRNA-Produkten exprimiert (8.558 Kopien, SEM 14.743, $p=0,43$). In den klinisch veränderten Regionen war eine Genexpression von 15.108 Kopien zu verzeichnen (SEM 21.067). Die RNase7-Expression im Gewebe mit Feigwarzen war signifikant erhöht im Vergleich zu der im klinisch unauffälligen Gewebe der HPV-infizierten Patientinnen ($p=0,033$), jedoch nicht zu der im Gewebe der gesunden Kontrollgruppe ($p=0,55$).

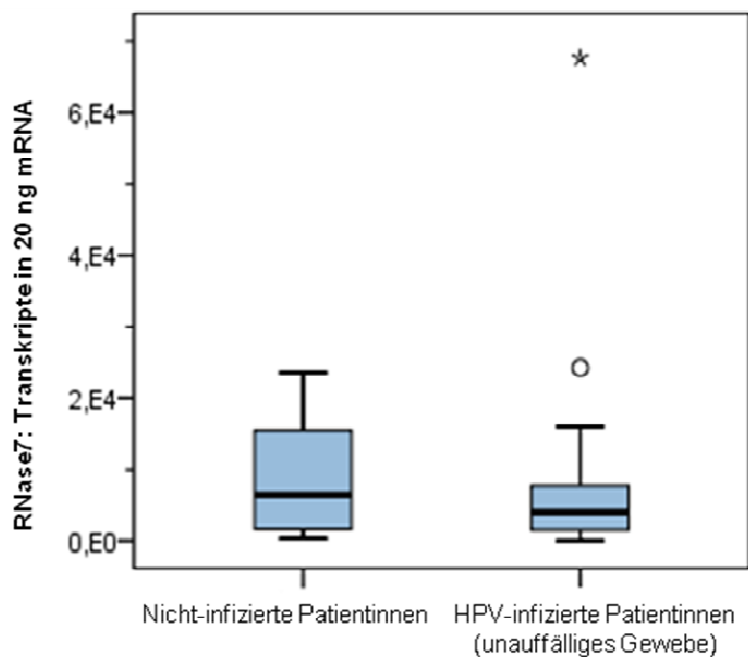


Abbildung 10A: Genexpression von RNase7

Die RNase7-Expression war im gesunden Gewebe ($n=20$) und im unauffälligen Gewebe der Kondylom-Patientinnen ($n=21$) ähnlich ($p=0,43$). Der Box-Whisker-Plot zeigt den Median (fett gedruckte Linie), die zwei Quartile (Box), milde (Kreise) und extreme Ausreißer (Sterne).

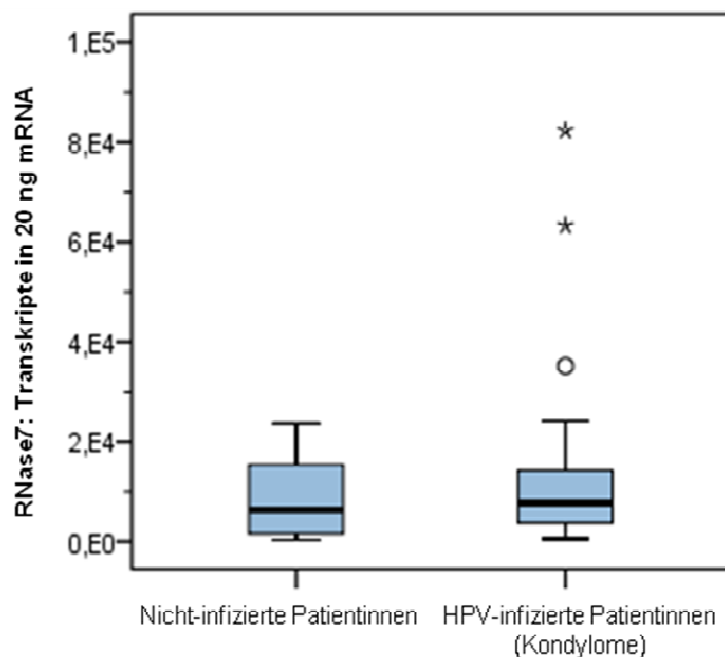


Abbildung 10B: Genexpression von RNase7

Die RNase7-Expression im Gewebe mit Kondylomen verdoppelte sich annähernd im Vergleich zur Expression im gesunden Gewebe (n=20) ($p=0,55$). Der Box-Whisker-Plot zeigt den Median (fett gedruckte Linie), die zwei Quartile (Box), milde (Kreise) und extreme Ausreißer (Sterne).

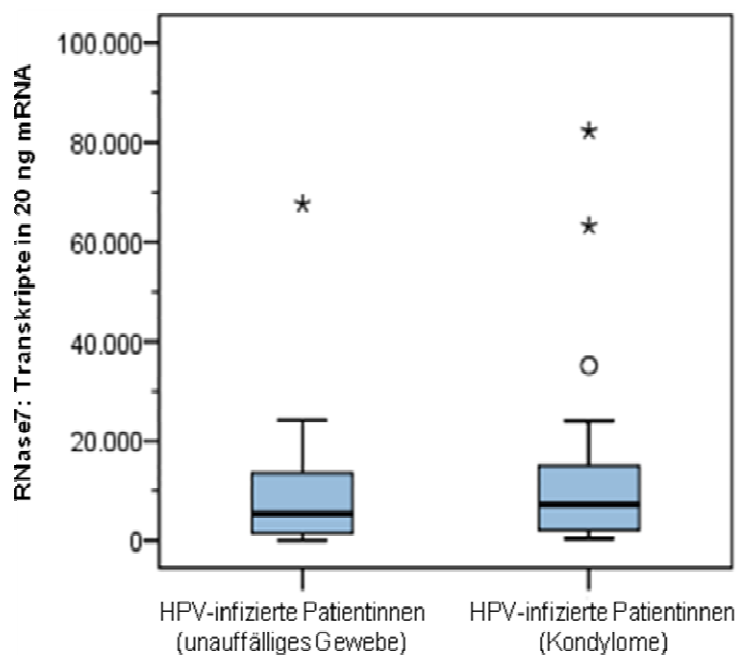


Abbildung 10C: Genexpression von RNase7

Die RNase7-Expression zeigte im Gewebe mit Kondylomen (n=21) einen signifikanten Anstieg ($p=0,033$) im Vergleich zur Expression im unauffälligen HPV-infizierten Gewebe (n=21). Der Box-Whisker-Plot zeigt den Median (fett gedruckte Linie), die zwei Quartile (Box), milde (Kreise) und extreme Ausreißer (Sterne).

3.5 Genexpression von LL-37

Das antimikrobielle Peptid LL-37 ließ sich mittels real-time PCR wie die α -Defensine nur in niedrigen Konzentrationen nachweisen und zeigte keine nennenswerten Schwankungen. Die maximale Transkriptzahl, die im Gewebe mit *Condylomata acuminata* bestimmt wurde, lag bei nur 88 Kopien (SEM 26). Die Anzahl der Transkripte und die Standardfehler (SEM) von LL-37 aus den untersuchten Regionen sind in Tab. 14 dargestellt:

Tabelle 14: Genexpression von LL-37

Gewebeprobe	LL-37 (Transkripte in 20ng mRNA)	SEM
gesunde Schleimhaut (n = 20) Nicht-infizierte Patientinnen	34	10
unauffällige Schleimhaut (n = 21) HPV-infizierte Patientinnen	73	24
veränderte Schleimhaut (n = 21) HPV-infizierte Patientinnen	88	26

3.6 Ergebnisse der morphologischen Untersuchungen

Während durch die Messungen mittels real-time PCR die mRNA Expression der untersuchten Gene ermittelt wurde, konnten durch die immunhistochemischen Färbungen die Expression der jeweiligen Proteine und ihre Lokalisation im Epithel untersucht werden. Mittels Immunhistologie wurden hBD-2, Psoriasin, RNase7 und LL-37 an Cryo-Schnitten von Gewebeproben der gesunden Kontrollgruppe und der veränderten Areale der HPV-infizierten Patientinnen untersucht. Auf eine Färbung der beiden anderen untersuchten β -Defensine, hBD-1 und -3, wurde verzichtet. HBD-1 war bereits im gesunden Gewebe in großen Konzentrationen vorhanden und der Anstieg der Expression dieses Peptides war vergleichsweise gering. Somit war bei den immunhistochemischen Färbungen mit einer gleichbleibenden Anfärbbarkeit zu rechnen. HBD-3 verhielt sich ähnlich wie hBD-2, weshalb auch für dieses Peptid auf die immunhistochemische Untersuchung verzichtet wurde.

3.6.1 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung zum Vergleich der Epithelstruktur

Um die Struktur der Epithelien von gesunder Vaginalschleimhaut und HPV-infizierter Schleimhaut mit *Condylomata acuminata* vergleichen zu können, wurden zunächst exemplarisch HE-Färbungen angefertigt, die freundlicherweise die Mitarbeiter der Klinik für Dermatologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, im Rahmen von Routinefärbungen durchführten.. Abb. 11 zeigt, dass das Epithel der kondylomatösen Läsionen hyperplastisch verändert ist. Das gesamte Epithel ist deutlich verbreitert und vor allem die obersten Zellschichten sind betont und vermehrt verhornt darstellbar.

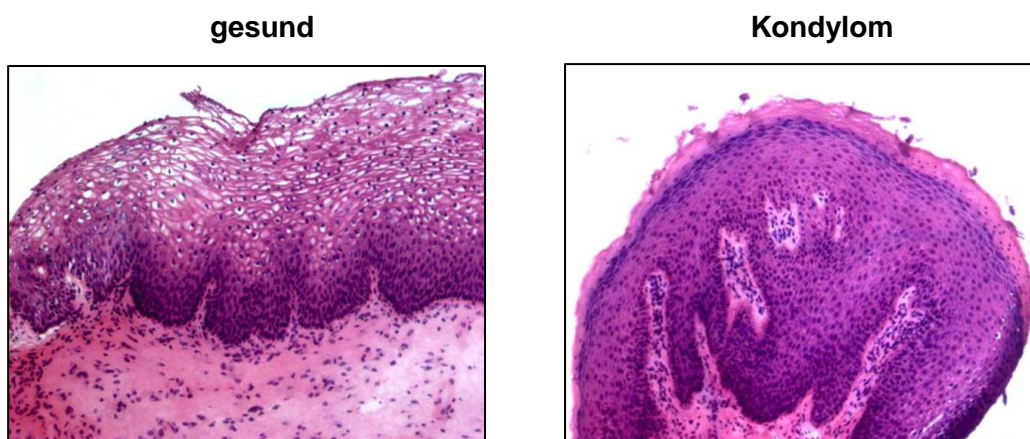


Abbildung 11: HE-Färbung von gesundem Gewebe und von einem Kondylom

Das kondylomatös veränderte Epithel (rechts) ist im Vergleich zum gesunden Gewebe (links) deutlich verbreitert, v. a. die obersten Epithelschichten sind hyperplastisch verändert und vermehrt verhornt.

3.6.2 Immunhistochemische Färbungen

HBD-2 ließ sich im gesunden Epithel in geringen Mengen und nur in den obersten Zellschichten, sowie sehr schwach auch in der Basalschicht nachweisen (Abb. 12A). Die immunhistochemische Färbung (Kap. 2.5) für hBD-2 im kondylomatös veränderten Gewebe (Abb. 12B) zeigte eine deutlich intensivere Braunfärbung, was auf eine hohe Proteinkonzentration hinwies. Das Peptid war v.a. in der stark verbreiterten und verhornten Superfizialschicht nachweisbar. Die Expression des Peptides in den Basalzellen war im Vergleich zu der im gesunden Gewebe nicht erhöht.

Psoriasin war in gesunder Schleimhaut in allen Epithelschichten in geringen Konzentrationen vorhanden. Wie für hBD-2 war auch für dieses Peptid die höchste Expressionsrate in den obersten Zellschichten nachweisbar (Abb. 12C). Im HPV-infizierten Gewebe zeigte sich für Psoriasin ein deutlich erhöhtes Vorkommen, das sich ebenfalls auf die oberen veränderten Epithelschichten beschränkte. Im übrigen Gewebe war keine verstärkte Expression von Psoriasin zu erkennen (Abb. 12D).

In Abb. 12E ist die immunhistochemische Untersuchung von RNase7 in gesundem Gewebe dargestellt. Im oberen Drittel des Epithels ist eine Braunfärbung erkennbar, die in den oberen Bereichen zunimmt, was auf das Vorhandensein des Peptides in diesen Zellschichten hinweist. Auch im untersuchten Gewebe der Kondylom-Patientinnen war die Färbung v.a. in den obersten Epithelschichten, dem *Stratum granulosum* und dem *Stratum corneum*, nachweisbar. Es zeigte sich allerdings auch eine leichte Anfärbbarkeit in der Basalschicht (Abb. 12F). Eine gesteigerte Bildung von RNase7 im HPV-infizierten Gewebe war somit auf Proteinebene nicht nachweisbar.

Das Peptid LL-37, das auf mRNA-Ebene nicht detektierbar war, ließ sich auf Proteinebene im gesunden Gewebe sowohl in den Basal- als auch den Superfizialzellen ermitteln (Abb. 12G). Die Konzentration des Proteins in der Basalschicht wies im untersuchten HPV-infizierten Gewebe keine Veränderung auf. In den oberflächlichen Zellschichten, die durch die HPV-Infektion hyperplastisch und vermehrt verhornt waren, zeigte sich hingegen eine deutlich vermehrte Konzentration (Abb. 12H).

Bei den parallel durchgeführten Kontrollfärbungen wurde für keines der untersuchten Peptide eine unspezifische Färbung gefunden (nicht gezeigt).

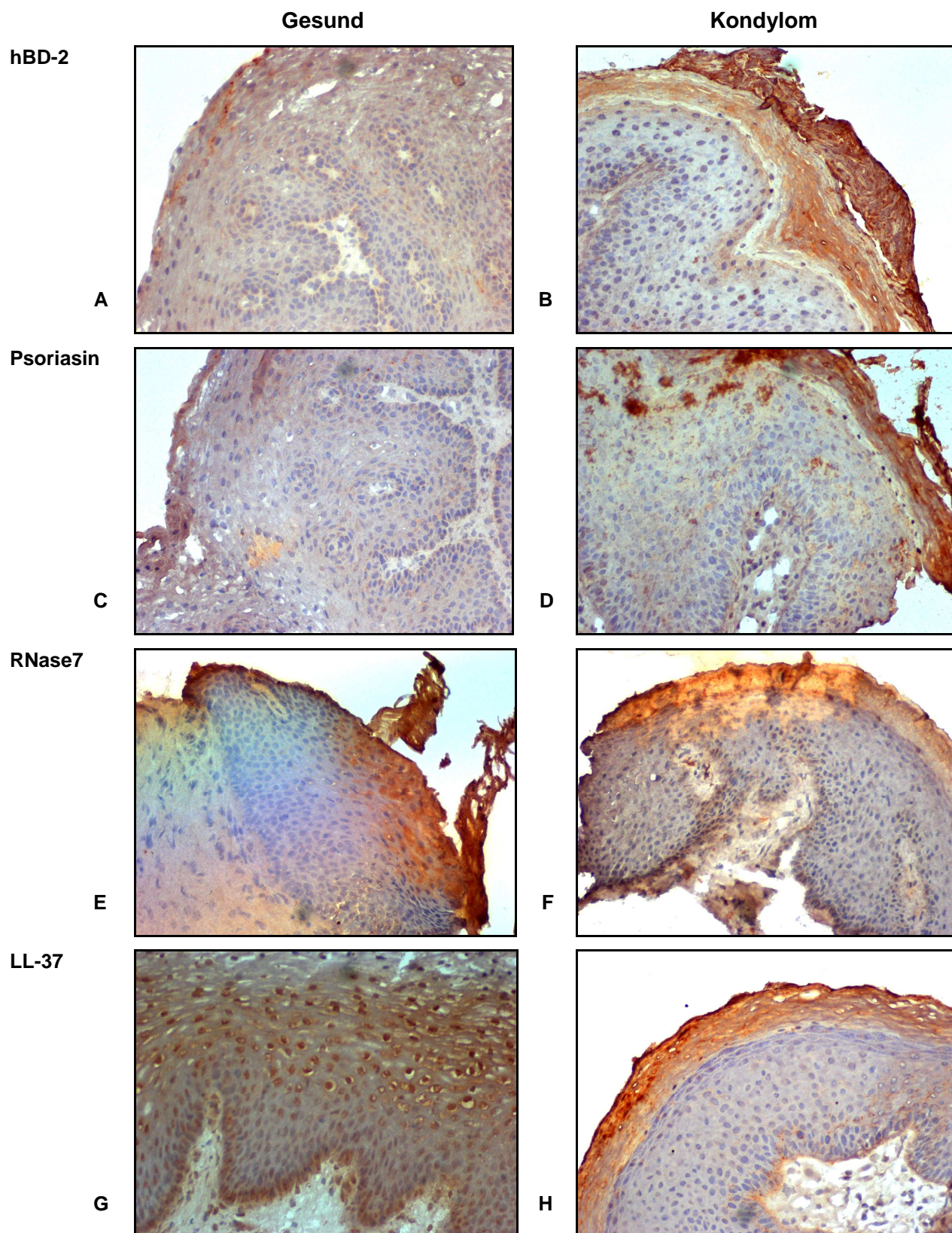


Abbildung 12: Immunhistochemische Färbungen für hBD-2, Psoriasin, RNase7 und LL-37

Immunhistochemie für hBD-2 (A, B), Psoriasin (C, D), RNase 7 (E, F) und LL-37 (G, H). 200x Vergrößerung der Proteinexpression im gesunden Gewebe (links) und im Gewebe mit Kondylomen (rechts). Exemplarische Darstellung von vier unabhängigen Färbungen.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Verhalten und die Bedeutung der Defensine, des Psoriasin, der RNase7 und des LL-37 bei genitalen HPV-Infektionen evaluiert werden. Da HPV-Infektionen, besonders bei jungen Frauen, sehr verbreitet sind und zur Entwicklung eines Zervixkarzinoms führen können, ist das Resultat dieser Arbeit, die gesteigerte Expression der β -Defensine und des Psoriasin in HPV-infizierter Vaginalschleimhaut, sehr interessant. Des Weiteren ist bemerkenswert, dass sich ein signifikanter Anstieg der Bildung der AMP erst im veränderten Gewebe der HPV-infizierten Patientinnen nachweisen ließ, was darauf hinweist, dass es bei manifesten Infektionen zu einer verstärkten Immunantwort kommt.

4.1 Methodik

Aufgrund der unterschiedlichen Lokalisationen der *Condylomata acuminata* konnten diese nicht aus einer einheitlichen Region entnommen werden, so dass Proben sowohl aus Gebieten mit verhorntem als auch unverhorntem Plattenepithel ausgewertet wurden. Die gesunde Kontrollgruppe wurde in den meisten Fällen am *Introitus vaginae* biopsiert, da diese Region eine Prädilektionsstelle für die Ausprägung HPV-induzierter Läsionen ist (Gross 2001). Des Weiteren wurde so oberflächlich wie möglich biopsiert, um die Untersuchungen v.a. an epithelialen Zellen durchführen zu können, welche die AMP bilden.

Die Aufarbeitung der Proben war nicht in allen Fällen erfolgreich, da die Biopsien oft sehr klein waren und es aus diesem Grund nicht immer möglich war, eine ausreichende Menge an mRNA zu isolieren, um diese in cDNA für die real-time PCR umzuschreiben. Einige Biopsien der Areale mit *Condylomata acuminata* waren so derb, dass sie nicht ausreichend zerkleinert werden konnten und die ungelösten Bestandteile anschließend die Säulen des „RNeasy Mini Kits“ verstopften, so dass es auch in diesen Fällen nicht möglich war ausreichend mRNA zu isolieren. Die Patientinnen mit *Condylomata acuminata* wurden nur in die Auswertung eingeschlossen, wenn sowohl die Aufarbeitung der Proben von klinisch gesundem Scheidengewebe als auch die der Biopsien von Arealen mit Feigwarzen möglich war, da nur so der direkte Vergleich vorgenommen werden konnte.

Insgesamt konnten von den 25 Proben gesunder Vaginalschleimhaut 20 Proben verwertet werden. Bei den Kondylom-Patientinnen war die Aufarbeitung von 21 der 35 entnommenen Proben erfolgreich, hier jeweils aus unauffälligen und veränderten Regionen.

Der direkte Peptidnachweis, der mittels immunhistochemischer Färbung erfolgte, wurde nur für das gesunde Gewebe der Kontrollgruppe und das klinisch auffällige Gewebe der HPV-infizierten Patientinnen vorgenommen, da durch diese Methode nur ein visueller Vergleich

und keine Quantifizierung wie bei der real-time PCR erfolgen konnte. Eine Unterscheidung zwischen den drei untersuchten Geweberegionen wäre somit schwierig gewesen. Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden nur für hBD-2, Psoriasin, RNase7 und LL-37 durchgeführt. Die α -Defensine wurden immunhistochemisch nicht untersucht, da sie mittels real-time PCR nicht nachweisbar waren. Auf die Färbung von hBD-1 wurde auf Grund der hohen Konzentration dieses Peptides im gesunden Gewebe und dem, im Vergleich zu den anderen untersuchten β -Defensinen, relativ geringen Anstieg der Expression im HPV-infizierten Gewebe verzichtet, da nicht mit einem Unterschied der Anfärbbarkeit zu rechnen war. Auf die Färbung von hBD-3 wurde verzichtet, da das Verhalten dieses Peptides dem des hBD-2 ähnelte. LL-37 wurde trotz fehlendem Nachweis auf mRNA-Ebene immunhistochemisch untersucht, da ein gesteigertes Vorkommen dieses Peptides bei Patientinnen mit *Condylomata acuminata* beschrieben ist (Conner, *et al.* 2002).

4.2 Patientenkollektiv

In die gesunde Kontrollgruppe wurden Patientinnen eingeschlossen, die prämenopausal waren und bei denen weder bekannte maligne noch infektiöse Erkrankungen vorlagen. Eine HPV-Infektion wurde bei dieser Gruppe vor der Probenentnahme durch einen Abstrich ausgeschlossen. Bei den Patientinnen mit *Condylomata acuminata* wurde vor dem operativen Eingriff ebenfalls ein HPV-Abstrich durchgeführt um sicherzustellen, dass den Feigwarzen nicht eine andere Ursache zu Grunde lag. Die HPV-infizierten Patientinnen wurden nicht in Gruppen in Bezug auf High-Risk- oder Low-Risk-HPV-Infektion eingeteilt, da *Condylomata acuminata* als Läsionen angesehen werden, die durch Low-Risk-HPV-Typen hervorgerufen werden und Arbeiten bekannt sind, die keine Korrelation zwischen Expression der AMP und Infektionen mit verschiedenen HPV-Typen oder HPV-DNA-Last ermittelten (Chong, *et al.* 2006; Kreuter, *et al.* 2009). Es wäre aber sicherlich interessant gewesen, eine weitere Unterteilung vorzunehmen, auch im Hinblick auf mögliche Koinfektionen mit Low-Risk- und High-Risk-HPV-Typen. Zu diesem Zweck hätte man allerdings mit einer deutlich höheren Stichprobengröße arbeiten müssen um statistisch signifikante Ergebnisse zu erhalten.

Das mittlere Alter der Patientinnen mit *Condylomata acuminata* lag bei 26 Jahren, das der gesunden Kontrollgruppe bei 39 Jahren. Dieses verdeutlicht, dass das Risiko an einer genitalen HPV-Infektion zu erkranken mit dem Alter geringer wird (Koutsky 1997; Trottier and Franco 2006). Es gibt keine Arbeiten, die sich mit der Entwicklung der Expression der AMP mit zunehmendem Alter befassen. Da jedoch alle in die Untersuchungen eingeschlossenen Frauen prämenopausal waren, wurde von einer gleichbleibenden Genexpression ausgegangen.

4.3 Expression der α -Defensine

Die HNP 1-3 ließen sich in keinem der untersuchten Areale in nennenswerten Kopienzahlen nachweisen (siehe Kap. 3.1). Von Valore *et al.* wurde hingegen das Vorkommen dieser Peptide, wenn auch auf Proteinebene und lediglich in geringen Konzentrationen, im Vaginalsekret beschrieben (Valore, *et al.* 2002). In einer anderen Arbeit wurde eine gesteigerte Bildung der HNP 1-3, ebenfalls im Vaginalsekret, bei genitalen Infektionen mit *Neisseria gonorrhoeae* nachgewiesen (Levinson, Kaul *et al.* 2009). Der fehlende Nachweis in der vorliegenden Arbeit war allerdings dadurch zu erklären, dass primär die Immunantwort des Epithels untersucht wurde. Die HNP 1-3 werden jedoch aus neutrophilen Granulozyten freigesetzt, die nicht im Vaginalepithel selbst vorkommen, aber physiologischerweise im Vaginalsekret vorhanden sind und hier bei Infektionen darüber hinaus ein vermehrtes Vorkommen zeigen (Cauci, *et al.* 2003). Bei genitalen HPV-Infektionen ist ebenfalls ein gesteigertes Vorkommen von neutrophilen Granulozyten beschrieben. Dieses Vorkommen wurde jedoch mittels Immunhistochemie ausschließlich im bindegewebigen Stroma nachgewiesen, eine Infiltration des Vaginalepithel wurde nicht geschildert (Kobayashi, *et al.* 2004).

Die ermittelten Kopienzahlen für das α -Defensin HD5 lagen an der unteren Nachweisgrenze und die Genexpression dieses Peptides zeigte keine Schwankungen in den verschiedenen untersuchten Arealen. Das Vorkommen von HD5 im Vaginalepithel ist zwar von Quayle *et al.* beschrieben worden, in dieser Arbeit wurde jedoch keine Aussage über die Größenordnung des Vorhandenseins von HD5 gemacht (Quayle, *et al.* 1998). Im Vergleich zur Genexpression im Dünndarm, wo HD5 in den Paneth-Körnerzellen gebildet wird und das Peptid eine wichtige Rolle bei der Abwehr pathogener Mikroorganismen spielt, war die hier gemessene Konzentration sehr gering. Im Dünndarm liegt die Genexpression dieses Peptides in der Größenordnung 10^6 Kopien pro 20 ng mRNA und somit über 1000-fach höher (Kiehne, *et al.* 2006) als die von uns ermittelten Transkriptzahlen von HD5 im Epithel des weiblichen Genitaltraktes.

Über das Vorhandensein von HD6 im Epithel des weiblichen Urogenitaltraktes ist bisher nichts bekannt. Auch durch unsere Untersuchungen ließ HD6 sich nicht in nennenswerten Konzentrationen nachweisen.

HD5 und HD6 sind auch im Hinblick auf eine vorliegende HPV-Infektion bereits beschrieben worden. Chong *et al.* untersuchten diese Peptide in HPV-induzierten Läsionen der Atemwege. HD5 und HD6 waren auch hier nicht in beachtenswerten Konzentrationen detektierbar und wiesen keine Induktion bei Bestehen einer HPV-Infektion auf (Chong, *et al.* 2006).

In vitro-Versuche haben gezeigt, dass die α -Defensine HNP 1-3 sowie HD5 die Fähigkeit haben, genitale HPV-Infektionen zu verhindern, indem sie nach Andocken und Eindringen des Virus die Freisetzung von Viruspartikeln in die Zelle unterbinden (Buck, *et al.* 2006). Hubert *et al.* (2007) beschrieben, dass HNP 2 in zervikalen HPV-assoziierten intraepithelialen Neoplasien chemotaktisch auf dendritische Zellen wirkt (Hubert, *et al.* 2007). Den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zufolge, scheint dieses *in vivo* im Rahmen der Immunantwort der Genitalschleimhaut aber unwahrscheinlich, da die Expression der α -Defensine im Vaginalepithel sehr niedrig war, Papillomaviren jedoch nur Epithelzellen befallen.

4.4 Expression der β -Defensine

4.4.1 hBD-1

Für das β -Defensin hBD-1 konnte eine hohe Genexpression im gesunden Scheidengewebe festgestellt werden (siehe Kap. 3.2.1). Dieses stimmt mit den Ergebnissen von Valore *et al.* (1998) überein, die eine ausgedehnte Expression von hBD-1 im weiblichen Urogenitaltrakt beschrieben. In den klinisch gesunden Bereichen der HPV-infizierten Patientinnen konnte eine vergleichbare hBD-1-Expression wie bei Gesunden verzeichnet werden, ein signifikanter Anstieg fand sich in den Arealen mit *Condylomata acuminata*, der einer Verdopplung der Expression in den unauffälligen Arealen der erkrankten Patientinnen und in der gesunden Vaginalschleimhaut der Kontrollgruppe entsprach .

Diese Ergebnisse stehen nicht im Einklang mit den Beschreibungen, die hBD-1 als nicht induzierbares antimikrobielles Peptid beschreiben. Zhao *et al.* (1996) fanden bei der Untersuchung von hBD-1 in Gegenwart von bakteriellen Bestandteilen und inflammatorischen Zytokinen eine unveränderte Expression dieses Peptides. Auch in Bezug auf virale Infektionen wird hBD-1 als nicht induzierbar beschrieben. Duits *et al.* untersuchten das Verhalten der β -Defensine in Bronchialepithelzellen bei Infektionen mit Rhinoviren, die wie humane Papillomaviren unbehüllte Viren sind. HBD-1 zeigte in dieser Arbeit keine erhöhte Expression bei Kontakt mit dem Virus (Duits, *et al.* 2003). Ebenfalls bei Infektionen mit behüllten Viren wie dem HI-Virus wurde hBD-1 als nicht induzierbar beschrieben (Weinberg, *et al.* 2006).

Auch bei Infektionen mit HPV ist das Verhalten von hBD-1 bereits untersucht worden. Buck *et al.* (2006) untersuchten im *in vitro*-Versuch die Fähigkeit des Defensins eine HPV-Infektion zu verhindern, konnten dieses aber für hBD-1 nicht bestätigen. Von Kreuter *et al.* wurden 2009 verschiedene antimikrobielle Peptide in HPV-induzierten analen intraepithelialen Neoplasien und analen *Condylomata acuminata* bei homosexuellen Männern gemessen. Die Genexpression von hBD-1 zeigte in dieser Untersuchung keine Steigerung im Vergleich zu

der in gesunder Analhaut. Das untersuchte Gewebe stammte allerdings von Männern, bei denen neben der HPV-Infektion gleichzeitig eine HIV-Infektion vorlag und somit mit einer abgeschwächten Immunantwort zu rechnen war (Kreuter, *et al.* 2009). Von Chong *et al.* (2006) wurde die Expression der β -Defensine in HPV-assoziierten Läsionen der Atemwege beschrieben. Entsprechend unserer Ergebnisse zeigte die Genexpression von hBD-1 in dieser Arbeit eine signifikante Steigerung (Chong, *et al.* 2006). HBD-1 scheint somit eine Rolle bei der lokalen Immunantwort verschiedener Epithelien gegen humane Papillomaviren zu spielen.

Es ist bekannt, dass die Genexpression von hBD-1 durch Interferon-Gamma (IFN- γ) gesteigert wird. Es läßt sich daher vermuten, dass die erhöhte Bildung von hBD-1 Teil des therapeutischen Nutzens der Behandlung HPV-infizierter Frauen mit rekombinatem IFN- γ oder Imiquimod, einem Wirkstoff, der die Immunantwort durch Stimulation u.a. von IFN- γ moduliert, ist (Duits, *et al.* 2002; Sikorski and Zrubek 2003; Todd, *et al.* 2004).

4.4.2 hBD-2 und hBD-3

Die β -Defensine hBD-2 und hBD-3 ließen sich sowohl im gesunden als auch im HPV-infizierten Epithel in deutlichen Konzentrationen nachweisen (siehe Kap. 3.2.2 und 3.2.3). Dieses steht im Einklang mit den Ergebnissen von Valore *et al.* (2002), die das Vorkommen von hBD-2 im weiblichen Genitaltrakt beschrieben und denen von Harder *et al.* (2001), die hBD-3 im Vaginalepithel nachwiesen. Die basale Expression beider Peptide war in unserem Kollektiv niedriger, als die des hBD-1, der Anstieg in der HPV-infizierten Schleimhaut hingegen um ein Vielfaches höher. Bereits in den unauffälligen Arealen der HPV-infizierten Patientinnen zeigte hBD-2 eine Verdopplung, in den Arealen mit Kondylomen einen 44-fachen Anstieg. Die immunhistochemische Färbung der Gewebeproben für hBD-2 bestätigte dieses Ergebnis und zeigte auch auf Proteinebene eine gesteigerte Bildung dieses Peptides bei HPV-Infektionen (siehe Abb. 12). Die Genexpression von hBD-3 verhielt sich ähnlich wie die des hBD-2, sie stieg in der klinisch gesunden Vaginalschleimhaut der HPV-infizierten Patientinnen um den Faktor 2,5, in den kondylomatös veränderten Arealen um den Faktor 10.

Bereits publizierte Arbeiten bezeichnen hBD-2 und hBD-3 als induzierbare antimikrobielle Peptide. Diese β -Defensine sind sowohl durch bakterielle Bestandteile, inflammatorische Zytokine und Pilze (Harder, *et al.* 2000; O'Neil, *et al.* 1999; Harder, *et al.* 1997; Harder, *et al.* 2001) als auch durch behüllte Viren wie z.B. HIV und unbehüllte Viren wie Rhinoviren induzierbar (Duits, *et al.* 2003; Weinberg, *et al.* 2006).

Auch im Vaginalepithel ist eine Induktion dieser beiden antimikrobiellen Peptide beschrieben worden. Von Pivarcsi *et al.* (2005) wurde eine Steigerung der Genexpression von hBD-2 im Scheidengewebe in Gegenwart von Bakterien und Pilzen nachgewiesen. Levinson *et al.*

schilderten eine gesteigerte Bildung von hBD-2 und hBD-3 bei genitalen Infektionen mit *Chlamydia trachomatis* und *Neisseria gonorrhoeae* (Levinson, Kaul *et al.* 2009).

Des Weiteren ist bereits das Verhalten dieser beiden antimikrobiellen Peptide in Hinblick auf eine vorliegende HPV-Infektion untersucht worden. Die Genexpression beider Peptide zeigte einen deutlichen Anstieg in HPV-induzierten Veränderungen der Atemwege (Chong, *et al.* 2006). Eine Induzierbarkeit beider Proteine durch HPV ließ sich ebenfalls in der Arbeit von Kreuter *et al.* (2009) nachweisen, in der sowohl die hBD-2- als auch die hBD-3-Expression einen starken Anstieg in analen intraepithelialen Neoplasien und analen *Condylomata acuminata* im Vergleich zu gesunder Anahlhaut bei homosexuellen Männern erfuhr. Meyer-Hoffert *et al.* untersuchten mittels Immunhistochemie hBD-2 und hBD-3 in HPV-induzierten Läsionen der Haut (*Verrucae vulgares*) sowie in *Condylomata acuminata*. In beiden Fällen ließ sich ein vermehrtes Vorkommen beider Peptide im Vergleich zur gesunden Epidermis bzw. zum gesunden Vaginalepithel nachweisen (Meyer-Hoffert, *et al.* 2008). Eine weitere interessante Arbeit, die hBD-2 im Bezug auf vaginale Infektionen mit HPV untersuchte, beschrieb, dass die Expression dieses Peptides in höhergradigen intraepithelialen Läsionen der Zervix signifikant geringer war als im gesunden Gewebe (Hubert, *et al.* 2007). Dieses könnte ein Anhalt für die verschiedenen Effekte von High-Risk- und Low-Risk-HPV-Typen bezüglich der Regulation der Defensine sein. Außerdem wurde in dieser Arbeit geschildert, dass hBD-2 in zervikalen HPV-assoziierten neoplastischen Läsionen chemotaktisch auf dendritische Zellen wirkt (Hubert, *et al.* 2007). Die β -Defensine hBD-2 und hBD-3 scheinen somit neben Bakterien, Pilzen, Hefen und behüllten Viren auch durch unbehüllte Viren wie HPV in vielen Epithelien induzierbar zu sein und zur lokalen Immunantwort verschiedener Epithelien gegen HPV-Infektionen beizutragen.

4.5 Expression von Psoriasin

Psoriasin war das Peptid, welches von den untersuchten Proteinen in der höchsten Konzentration nachgewiesen werden konnte (siehe Kap. 3.3). Schon die basale mRNA-Expression lag 150-fach höher als die basale Expression von hBD-1, welches das Peptid mit der zweithöchsten gemessenen Genexpression im Gewebe der Kontrollgruppe war. Auch die immunhistochemische Untersuchung belegte das Vorhandensein von Psoriasin im gesunden Vaginalepithel (siehe Abb. 12).

Psoriasin gilt als induzierbares antimikrobielles Peptid. Bakterielle Bestandteile und inflammatorische Zytokine führen zu einer erhöhten Psoriasin-Expression (Glaser, *et al.* 2005). In dieser Arbeit stellten wir ebenfalls eine Induktion von Psoriasin bei genitalen HPV-Infektionen fest. Die Genexpression des Peptides war in den klinisch gesunden Arealen der Patientinnen mit *Condylomata acuminata* etwa doppelt so hoch wie im Gewebe der Kontrollgruppe, im veränderten Vaginalepithel fand sich ein 4-facher signifikanter Anstieg.

Die immunhistochemische Untersuchung stand im Einklang mit der mRNA-Analyse, sie wies, vor allem in den oberen Epithelschichten, ein vermehrtes Vorkommen des Proteins nach (siehe Abb. 12).

Bisher ist das Vorhandensein und Verhalten von Psoriasin bei Infektionen im weiblichen Urogenitaltrakt noch nicht beschrieben worden, ebenso wenig die Regulation bei viralen Infektionen. Die Größenordnung, in der Psoriasin bereits im gesunden Vaginalepithel vorkommt, und die starke Induktion sprechen jedoch dafür, dass es einen Anteil an der lokalen Abwehrfunktion des Scheidenepithels gegen pathogene Mikroorganismen hat und auch bei genitalen HPV-Infektionen von Bedeutung ist.

4.6 Expression von RNase 7

Das antimikrobielle Peptid RNase7 ließ sich im gesunden Vaginalepithel in deutlicher, wenn auch im Vergleich zu den β -Defensinen und Psoriasin niedrigeren Kopienzahlen nachweisen. Das Vorkommen von RNase7 im weiblichen Urogenitaltrakt wurde ebenfalls von Harder *et al.* beschrieben (2002).

RNase7 gilt als durch bakterielle Bestandteile und inflammatorische Zytokine induzierbares Protein (Harder and Schroder 2002). In unseren Untersuchungen hingegen konnte bei Vorliegen einer genitalen HPV-Infektion keine signifikante Steigerung der Bildung dieses Peptides im Vergleich zu gesunder Vaginalschleimhaut beobachtet werden, interessanterweise war jedoch der Anstieg der Genexpression von RNase7 zwischen unauffälliger und kondylomatös veränderter HPV-infizierter Schleimhaut signifikant (siehe Kap. 3.4). Der direkte Proteinnachweis durch die immunhistochemische Färbung zeigte keine größeren Veränderungen in den verschiedenen untersuchten Arealen (siehe Abb. 12). In Zusammenhang mit viralen Infektionen ist das Verhalten von RNase7 bisher nur bei Bestehen einer HPV-Infektion der Analhaut mit Ausbildung von analen intraepithelialen Neoplasien und analen *Condylomata acuminata* beschrieben worden. Auch in dieser Arbeit konnten keine signifikante Steigerung der RNase7-Genexpression im Vergleich mit gesunder Schleimhaut festgestellt werden (Kreuter, *et al.* 2009). Dieses Peptid scheint somit, anders als in Gegenwart von Bakterien, bei einer Infektion durch unbehüllte Viren wie HPV nicht induzierbar zu sein. Auf Grund der nur leicht gesteigerten Bildung und der geringen Konzentration von RNase7, im Vergleich mit den anderen untersuchten Peptiden, scheint dieses Protein eine weniger wichtige Rolle bei der Immunantwort des Vaginalepithels gegen HPV-Infektionen zu spielen.

4.7 Expression von LL-37

LL-37 gilt als ein durch inflammatorische Stimuli induzierbares antimikrobielles Peptid. In der Haut ist eine gesteigerte LL-37-Expression bei entzündlichen Reaktionen beschrieben worden und auch Infektionen mit *Streptococcus pyogenes* führten zu einer gesteigerten Bildung von LL-37 (Frohm, *et al.* 1997; Johansson, *et al.* 2008). Ebenfalls wurde eine erhöhte Konzentration des Peptides bei genitalen Infektionen mit bakteriellen Erregern, wie *Chlamydia trachomatis*, und auch bei genitalen Pilzinfektionen durch *Candida albicans* beschrieben (Levinson, *et al.* 2009).

In der vorliegenden Arbeit ließ sich LL-37 auf mRNA-Ebene in keinem der untersuchten Arelae in nennenswerten Konzentrationen nachweisen. Im Einklang hierzu stehen die Untersuchungen von Kreuter *et al.* (2008), die die Genexpression von LL-37 in analen HPV-induzierten Läsionen untersuchten und ebenfalls keine Steigerung der Expression bei vorliegender HPV-Infektion fanden, ebenso wenig eine nennenswerte basale Expression in gesunder Anahaut (Kreuter, *et al.* 2009).

Interessanterweise ließ sich das Peptid durch die immunhistochemische Untersuchung sowohl im Epithel der Kontrollgruppe als auch im Epithel der Patientinnen mit *Condylomata acuminata* nachweisen. Im HPV-infizierten Epithel war außerdem eine vermehrte Bildung erkennbar (siehe Abb. 12). Diesem Ergebnis entspricht die Arbeit von Conner *et al.* (2002), in welcher mittels Immunhistochemie ebenfalls eine erhöhte LL-37-Konzentration in HPV-induzierten *Condylomata acuminata* des weiblichen Genitaltraktes ermittelt wurde. Von Buck *et al.* (2006) wurde wie für HNP 1-3 und HD5 auch für dieses Peptid im *in vitro*-Versuch das Verhindern einer HPV-Infektion durch die Blockierung der Freisetzung der Viruspartikel in die Zelle beschrieben (Buck, *et al.* 2006).

Die hier gefundenen Regulationen von LL-37 bei genitalen HPV-Infektionen unterschieden sich somit auf mRNA- und Proteinebene. Auf mRNA-Ebene ließen sich keine nennenswerten Konzentrationen detektieren, auf Proteinebene war das Peptid deutlich nachweisbar. Arbeiten über eine mögliche posttranskriptionale Regulation von LL-37 oder einen schnellen Abbau der mRNA sind nicht bekannt, dieses könnten jedoch mögliche Erklärungen für unsere Ergebnisse für das Peptid LL-37 sein.

4.8 Unterscheidet sich die Regulation antimikrobieller Peptide bei viralen und bakteriellen Infektionen?

Die hier geschilderten Ergebnisse und einige der zitierten Arbeiten zeigen Unterschiede der Regulation der antimikrobiellen Peptide bei bakteriellen und viralen Infektionen auf.

Die drei untersuchten β -Defensine zeigten in unserer Untersuchung eine signifikante Steigerung der Genexpression in den Bereichen mit *Condylomata acuminata*. HBD-2 und -3

werden auch bei Infektionen durch Bakterien vermehrt gebildet, hBD-1 gilt hingegen als nicht induzierbar durch bakterielle Erreger. Psoriasin ist durch bakterielle Bestandteile induzierbar, unserer Arbeit zeigte, dass das gleiche auch für virale Infektionen gilt. RNase7 wurde in den untersuchten HPV-infizierten Proben weder auf mRNA- noch auf Proteinebene vermehrt gebildet, was nicht dem Verhalten dieses Peptides in Gegenwart von bakteriellen Erregern und inflammatorischen Zytokinen entspricht. Die α -Defensine zeigten keine gesteigerte Bildung bei Vorliegen einer HPV-Infektion, weder die als nicht induzierbar geltenden HNPs noch die durch bakterielle Bestandteile und inflammatorische Zytokine induzierbaren Defensine HD5 und HD6. LL-37, das ebenfalls ein durch inflammatorische Prozesse induzierbares antimikrobielles Peptid ist, war zwar auf mRNA-Ebene nicht detektierbar, auf Proteinebene zeigte das Protein jedoch eindeutig eine Induzierbarkeit bei Vorliegen einer HPV-Infektion und verhielt sich somit ähnlich wie bei bakteriellen Infekten.

4.9 Welche Rolle spielen antimikrobielle Peptide bei genitalen HPV-Infektionen?

Die gemessenen Konzentrationen und die Steigerung der Peptidbildung in den HPV-infizierten Arealen sprechen dafür, dass vor allem die β -Defensine und Psoriasin eine wichtige Rolle bei der Immunantwort des Vaginalepithels gegen HPV spielen.

Ihr Vorhandensein könnte dazu beitragen, dass sich die Infektion nicht in allen befallenen Arealen ausprägt, da bereits in den klinisch unauffälligen HPV-infizierten Regionen erhöhte Mengen dieser Peptide zu ermitteln waren. Es wäre auch möglich, dass die Peptide dafür verantwortlich sind, dass nur ein geringer Anteil HPV-infizierter Frauen *Condylomata acuminata* oder auch intraepitheliale Neoplasien ausbildet. Auch könnte die Tendenz der kondylomatösen Läsionen sich spontan zurückzubilden auf die heraufregulierten AMP zurückzuführen sein.

Auf der anderen Seite erscheint die Möglichkeit, dass die antimikrobiellen Peptide eine Infektion mit HPV von vornherein verhindern können, unwahrscheinlich, da die immunhistochemischen Untersuchungen alle untersuchten antimikrobiellen Peptide vor allem in den obersten Schichten des Plattenepithels nachwies. Humane Papillomaviren befallen jedoch nur die Basalzellen des Epithels. Es ist also wahrscheinlicher, dass die Peptide erst im Verlauf der Infektion wichtig für den Krankheitsverlauf werden, da das Virus nach Replikation erst in den obersten Epithelschichten komplett vorliegt, in denen auch die antimikrobiellen Peptide in den größten Konzentrationen vorkommen und so die klinische Ausprägung der Infektion verhindern könnten.

4.10 Ausblick

Im Hinblick auf die hier beschriebenen Ergebnisse wäre es interessant weitere Versuche durchzuführen, die den Zusammenhang von antimikrobiellen Peptiden und genitalen Infektionen mit HPV untersuchen.

Eine Möglichkeit wäre, eine longitudinale Studie mit einer weitaus größeren Anzahl an Probandinnen durchzuführen und bei diesen über mehrere Jahre hinweg jeweils zu definierten Zeitpunkten Genexpression der antimikrobiellen Peptide und Vorliegen einer HPV-Infektion zu ermitteln. So könnte man untersuchen, ob das Erlangen, die Persistenz und die Ausbildung von *Condylomata acuminata* oder intraepithelialen Läsionen mit der basalen Expression der Peptide und deren gesteigerter Bildung bei HPV-Infektionen zusammenhängt.

Im Tierversuch könnte man mittels Knockout-Mäusen untersuchen, ob es in Abwesenheit der β -Defensine oder des Psoriasin bei Kontakt mit Papillomaviren vermehrt zu Infektionen mit HPV und zur Ausprägung von *Condylomata acuminata* oder intraepitheliale Neoplasien kommt.

Um das therapeutische Potential der Peptide zu untersuchen, könnte man weitere *in vitro*-Untersuchungen für β -Defensine und Psoriasin durchführen, die die antivirale Effektivität dieser Peptide gegen HPV analysieren, wie es bereits durch Buck *et al.* (2006) geschehen ist. Bei bestehender antiviraler Aktivität könnte man im nächsten Schritt darüber nachdenken, wie man die Peptide pharmakologisch bei genitalen Infektionen mit HPV und Ausprägung von *Condylomata acuminata* bzw. intraepithelialen Neoplasien einsetzen könnte.

5 Zusammenfassung

Genitale Infektionen mit humanen Papillomaviren (HPV) gehören weltweit zu den häufigsten sexuell übertragbaren Krankheiten. Infektionen mit einem Low-Risk-HPV-Typ führen im Genitalbereich zur Ausprägung von *Condylomata acuminata* (Feigwarzen), High-Risk-HPV-Typen sind für die Entstehung des Zervixkarzinoms ursächlich. Das Virus infiziert die Basalschicht des Plattenepithels, welches die erste Schutzbarriere gegen pathogene Mikroorganismen darstellt. Eine Abwehrfunktion von Epithelien ist die Produktion antimikrobieller Peptide (AMP). Wichtige Gruppen dieser „körpereigenen Antibiotika“ sind die Defensine, die sich weiter in α - und β -Defensine unterteilen lassen, und die Cathelicidine, von denen im Menschen nur ein Genprodukt, das LL-37, hergestellt wird. Weitere Vertreter sind die RNase7 und das Psoriasin. AMP haben die Fähigkeit mit der Membran von Mikroorganismen zu interagieren und können so Gram-positive und Gram-negative Bakterien, Pilze und einige behüllte Viren abtöten. Einige der Peptide sind durch bakterielle Bestandteile oder inflammatorische Zytokine induzierbar, andere werden auf einem konstanten Niveau gebildet.

Über das Verhalten der AMP bei viralen Infektionen ist bisher wenig bekannt. Ihre Regulation bei Infektionen mit unbehüllten Viren wurde in dieser Arbeit am Beispiel von genitalen HPV-Infektionen mit Ausprägung von *Condylomata acuminata* untersucht.

Zu diesem Zweck wurden Gewebeproben von HPV-infizierter Schleimhaut aus Arealen ohne klinische Veränderungen und aus Arealen mit *Condylomata acuminata* entnommen. Zum Vergleich wurde auch gesunde Vaginalschleimhaut untersucht. Das Verhalten der antimikrobiellen Peptide wurde sowohl auf mRNA-Ebene mittels quantitativer real-time PCR als auch auf Proteinebene mittels immunhistochemischen Färbungen analysiert.

Die untersuchten β -Defensine, hBD-1, -2 und -3, waren sowohl im gesunden als auch im HPV-infizierten Gewebe in deutlicher Konzentration nachweisbar und zeigten im HPV-infizierten Gewebe mit *Condylomata acuminata* eine signifikante Steigerung der Expression. Dieser Anstieg war für hBD-2 auch auf Proteinebene mittels Immunhistochemie nachweisbar. RNase7 und Psoriasin wurden im gesunden und HPV-infizierten Gewebe ebenfalls in deutlichen Konzentrationen exprimiert. Sowohl die Genexpression als auch die Proteinexpression des Psoriasin steigerten sich bei Vorliegen einer HPV-Infektion. Das Vorkommen von RNase7 unterlag hingegen weder auf mRNA- noch auf Proteinebene starken Schwankungen. Sämtliche α -Defensine konnten weder im gesunden noch im HPV-infizierten Gewebe in nennenswerten Konzentrationen nachgewiesen werden. Auch für LL-37 gelang der Nachweis auf mRNA-Ebene nicht. Das LL-37-Protein konnte hingegen durch

die immunhistochemischen Färbungen detektiert werden und zeigte eine gesteigerte Bildung im HPV-infizierten Epithel.

Die hohe mRNA-Expression der untersuchten AMP und der signifikante Anstieg dieser bei vorliegender HPV-Infektion belegen, dass sie an der lokalen Immunantwort des Scheidenepithels gegen pathogene Mikroorganismen beteiligt sind. Die größte Bedeutung kommt dabei den β -Defensinen und dem Psoriasin zu, die des Weiteren eine deutliche Induktion durch HPV zeigten. Auch das als nicht induzierbar geltende hBD-1 wies eine signifikante Steigerung der Genexpression auf. Für das durch bakterielle Bestandteile induzierbare antimikrobielle Peptid RNase7 konnte hingegen keine signifikant erhöhte Bildung bei Kontakt mit dem Virus im Vergleich zum gesunden Gewebe nachgewiesen werden, das Peptid war jedoch in allen untersuchten Arealen in deutlichen Konzentrationen nachweisbar. Dieses bestätigt, dass die Regulation der untersuchten antimikrobiellen Peptide unterschiedlich zu sein scheint, je nachdem, ob eine virale oder bakterielle Infektion vorliegt.

6 Literaturverzeichnis

- Agerberth, B., Gunne, H., Odeberg, J., Kogner, P., Boman, H. G., and Gudmundsson, G. H.
1995 **FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis.** Proc Natl Acad Sci U S A 92(1):195-9.
- Arbyn, M., Autier, P., and Ferlay, J.
2007 **Burden of cervical cancer in the 27 member states of the European Union: estimates for 2004.** Ann Oncol 18(8):1423-5.
- Bedell, M. A., Hudson, J. B., Golub, T. R., Turyk, M. E., Hosken, M., Wilbanks, G. D., and Laimins, L. A.
1991 **Amplification of human papillomavirus genomes in vitro is dependent on epithelial differentiation.** J Virol 65(5):2254-60.
- Bensch, K. W., Raida, M., Magert, H. J., Schulz-Knappe, P., and Forssmann, W. G.
1995 **hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma.** FEBS Lett 368(2):331-5.
- Beral, V.
1974 **Cancer of the cervix: a sexually transmitted infection?** Lancet 1(7865):1037-40.
- Bevins, C. L., Martin-Porter, E., and Ganz, T.
1999 **Defensins and innate host defence of the gastrointestinal tract.** Gut 45(6):911-5.
- Boman, H. G.
2003 **Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts.** J Intern Med 254(3):197-215.
- Boris, S., Suarez, J. E., Vazquez, F., and Barbes, C.
1998 **Adherence of human vaginal lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens.** Infect Immun 66(5):1985-9.

-
- Boshart, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., Kleinheinz, A., Scheurlen, W., and zur Hausen, H.
1984 **A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer.** EMBO J 3(5):1151-7.
- Broome, A. M., Ryan, D., and Eckert, R. L.
2003 **S100 protein subcellular localization during epidermal differentiation and psoriasis.** J Histochem Cytochem 51(5):675-85.
- Buck, C. B., Day, P. M., Thompson, C. D., Lubkowski, J., Lu, W., Lowy, D. R., and Schiller, J.
2006 **Human alpha-defensins block papillomavirus infection.** Proc Natl Acad Sci U S A 103(5):1516-21.
- Burk, R. D., Ho, G. Y., Beardsley, L., Lempa, M., Peters, M., and Bierman, R.
1996 **Sexual behavior and partner characteristics are the predominant risk factors for genital human papillomavirus infection in young women.** J Infect Dis 174(4):679-89.
- Carlsson, H., Yhr, M., Petersson, S., Collins, N., Polyak, K., and Enerback, C.
2005 **Psoriasin (S100A7) and calgranulin-B (S100A9) induction is dependent on reactive oxygen species and is downregulated by Bcl-2 and antioxidants.** Cancer Biol Ther 4(9):998-1005.
- Cauci, S., Guaschino, S., De Aloysio, D., Driussi, S., De Santo, D., Penacchioni, P., and Quadrifoglio, F.
2003 **Interrelationships of interleukin-8 with interleukin-1beta and neutrophils in vaginal fluid of healthy and bacterial vaginosis positive women.** Mol Hum Reprod 9(1):53-8.
- Chong, K. T., Xiang, L., Wang, X., Jun, E. L., Xi, L. F., and Schweinfurth, J. M.
2006 **High level expression of human epithelial beta-defensins (hBD-1, 2 and 3) in papillomavirus induced lesions.** Virol J 3:75.
- Chuang, T. Y., Perry, H. O., Kurland, L. T., and Ilstrup, D. M.
1984 **Condyloma acuminatum in Rochester, Minn, 1950-1978. II. Anaplasias and unfavorable outcomes.** Arch Dermatol 120(4):476-83.

Conner, K., Nern, K., Rudisill, J., O'Grady, T., and Gallo, R. L.

2002 **The antimicrobial peptide LL-37 is expressed by keratinocytes in condyloma acuminatum and verruca vulgaris.** *J Am Acad Dermatol* 47(3):347-50.

Cripe, T. P., Haugen, T. H., Turk, J. P., Tabatabai, F., Schmid, P. G., 3rd, Durst, M., Gissmann, L., Roman, A., and Turek, L. P.

1987 **Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis.** *EMBO J* 6(12):3745-53.

De Smet, K., and Contreras, R.

2005 **Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins.** *Biotechnol Lett* 27(18):1337-47.

De, Yang, Chen, Q., Schmidt, A. P., Anderson, G. M., Wang, J. M., Wooters, J., Oppenheim, J. J., and Chertov, O.

2000 **LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells.** *J Exp Med* 192(7):1069-74.

Di Nardo, A., Vitiello, A., and Gallo, R. L.

2003 **Cutting edge: mast cell antimicrobial activity is mediated by expression of cathelicidin antimicrobial peptide.** *J Immunol* 170(5):2274-8.

Duits, L. A., Nibbering, P. H., van Strijen, E., Vos, J. B., Mannesse-Lazeroms, S. P., van Sterkenburg, M. A., and Hiemstra, P. S.

2003 **Rhinovirus increases human beta-defensin-2 and -3 mRNA expression in cultured bronchial epithelial cells.** *FEMS Immunol Med Microbiol* 38(1):59-64.

Duits, L. A., Ravensbergen, B., Rademaker, M., Hiemstra, P. S., and Nibbering, P. H.

2002 **Expression of beta-defensin 1 and 2 mRNA by human monocytes, macrophages and dendritic cells.** *Immunology* 106(4):517-25.

Durst, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., and zur Hausen, H.

1983 **A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions.** Proc Natl Acad Sci U S A 80(12):3812-5.

Dyson, N., Howley, P. M., Munger, K., and Harlow, E.

1989 **The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product.** Science 243(4893):934-7.

Egawa, K.

2003 **Do human papillomaviruses target epidermal stem cells?** Dermatology 207(3):251-4.

Fang, X. M., Shu, Q., Chen, Q. X., Book, M., Sahl, H. G., Hoefft, A., and Stuber, F.

2003 **Differential expression of alpha- and beta-defensins in human peripheral blood.** Eur J Clin Invest 33(1):82-7.

Fredricks, D. N., Fiedler, T. L., and Marrazzo, J. M.

2005 **Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis.** N Engl J Med 353(18):1899-911.

Frisch, M., Glimelius, B., van den Brule, A. J., Wohlfahrt, J., Meijer, C. J., Walboomers, J. M., Goldman, S., Svensson, C., Adami, H. O., and Melbye, M.

1997 **Sexually transmitted infection as a cause of anal cancer.** N Engl J Med 337(19):1350-8.

Frohm, M., Agerberth, B., Ahangari, G., Stahle-Backdahl, M., Liden, S., Wigzell, H., and Gudmundsson, G. H.

1997 **The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders.** J Biol Chem 272(24):15258-63.

Fujii, G., Selsted, M. E., and Eisenberg, D.

1993 **Defensins promote fusion and lysis of negatively charged membranes.** Protein Sci 2(8):1301-12.

Ganz, T., Selsted, M. E., Szklarek, D., Harwig, S. S., Daher, K., Bainton, D. F., and Lehrer, R. I.

1985 **Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils.** J Clin Invest 76(4):1427-35.

Garcia, J. R., Krause, A., Schulz, S., Rodriguez-Jimenez, F. J., Kluver, E., Adermann, K., Forssmann, U., Frimpong-Boateng, A., Bals, R., and Forssmann, W. G.

2001 **Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity.** FASEB J 15(10):1819-21.

Glaser, R., Harder, J., Lange, H., Bartels, J., Christophers, E., and Schroder, J. M.

2005 **Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from Escherichia coli infection.** Nat Immunol 6(1):57-64.

Gross, G.

2001 **Condylomata acuminata and other HPV-associated manifestations of the genitals and urethra.** Guideline of the German STD Society (DSTG)]. Hautarzt 52(5):405-10.

Gross, G., Ikenberg, H., Gissmann, L., and Hagedorn, M.

1985 **Papillomavirus infection of the anogenital region: correlation between histology, clinical picture, and virus type. Proposal of a new nomenclature.** J Invest Dermatol 85(2):147-52.

Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., and Schroder, J. M.

1997 **A peptide antibiotic from human skin.** Nature 387(6636):861.

Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., and Schroder, J. M.

2001 **Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic.** J Biol Chem 276(8):5707-13.

Harder, J., Meyer-Hoffert, U., Teran, L. M., Schwichtenberg, L., Bartels, J., Maune, S., and Schroder, J. M.

2000 **Mucoid Pseudomonas aeruginosa, TNF-alpha, and IL-1beta, but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia.** Am J Respir Cell Mol Biol 22(6):714-21.

Harder, J., and Schroder, J. M.

2002 **RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin.** J Biol Chem 277(48):46779-84.

Heilborn, J. D., Nilsson, M. F., Kratz, G., Weber, G., Sorensen, O., Borregaard, N., and Stahle-Backdahl, M.

2003 **The cathelicidin anti-microbial peptide LL-37 is involved in re-epithelialization of human skin wounds and is lacking in chronic ulcer epithelium.** J Invest Dermatol 120(3):379-89.

Hosaka, Y., Koslowski, M., Nuding, S., Wang, G., Schlee, M., Schafer, C., Saigenji, K., Stange, E. F., and Wehkamp, J.

2008 **Antimicrobial host defense in the upper gastrointestinal tract.** Eur J Gastroenterol Hepatol 20(12):1151-8.

Huang, L. C., Petkova, T. D., Reins, R. Y., Proske, R. J., and McDermott, A. M.

2006 **Multifunctional roles of human cathelicidin (LL-37) at the ocular surface.** Invest Ophthalmol Vis Sci 47(6):2369-80.

Hubert, P., Herman, L., Maillard, C., Caberg, J. H., Nikkels, A., Pierard, G., Foidart, J. M., Noel, A., Boniver, J., and Delvenne, P.

2007 **Defensins induce the recruitment of dendritic cells in cervical human papillomavirus-associated (pre)neoplastic lesions formed in vitro and transplanted in vivo.** FASEB J 21(11):2765-75.

Jeon, S., and Lambert, P. F.

1995 **Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis.** Proc Natl Acad Sci U S A 92(5):1654-8.

Johansson, L., Thulin, P., Sendi, P., Herten, E., Linder, A., Akesson, P., Low, D. E., Agerberth, B., and Norrby-Teglund, A.

2008 **Cathelicidin LL-37 in severe Streptococcus pyogenes soft tissue infections in humans.** Infect Immun 76(8):3399-404.

Jones, D. E., and Bevins, C. L.

-
- 1992 **Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene.** *J Biol Chem* 267(32):23216-25.
- Jones, D. E., and Bevins, C. L.
- 1993 **Defensin-6 mRNA in human Paneth cells: implications for antimicrobial peptides in host defense of the human bowel.** *FEBS Lett* 315(2):187-92.
- Kiehne, K., Brunke, G., Wegner, F., Banasiewicz, T., Folsch, U. R., and Herzig, K. H.
- 2006 **Defensin expression in chronic pouchitis in patients with ulcerative colitis or familial adenomatous polyposis coli.** *World J Gastroenterol* 12(7):1056-62.
- Kobayashi, A., Greenblatt, R. M., Anastos, K., Minkoff, H., Massad, L. S., Young, M., Levine, A. M., Darragh, T. M., Weinberg, V., and Smith-McCune, K. K.
- 2004 **Functional attributes of mucosal immunity in cervical intraepithelial neoplasia and effects of HIV infection.** *Cancer Res* 64(18):6766-74.
- Koutsky, L.
- 1997 **Epidemiology of genital human papillomavirus infection.** *Am J Med* 102(5A):3-8.
- Kreuter, A., Skrygan, M., Gambichler, T., Brockmeyer, N. H., Stucker, M., Herzler, C., Potthoff, A., Altmeyer, P., Pfister, H., and Wieland, U.
- 2009 **Human papillomavirus-associated induction of human beta-defensins in anal intraepithelial neoplasia.** *Br J Dermatol* 160(6):1197-205.
- Levinson, P., Kaul, R., Kimani, J., Ngugi, E., Moses, S., MacDonald, K. S., Broliden, K., and Hirbod, T.
- 2009 **Levels of innate immune factors in genital fluids: association of alpha defensins and LL-37 with genital infections and increased HIV acquisition.** *AIDS* 23(3):309-17.
- Liu, L., Wang, L., Jia, H. P., Zhao, C., Heng, H. H., Schutte, B. C., McCray, P. B., Jr., and Ganz, T.
- 1998 **Structure and mapping of the human beta-defensin HBD-2 gene and its expression at sites of inflammation.** *Gene* 222(2):237-44.

Maden, C., Sherman, K. J., Beckmann, A. M., Hislop, T. G., Teh, C. Z., Ashley, R. L., and Daling, J. R.

1993 **History of circumcision, medical conditions, and sexual activity and risk of penile cancer.** J Natl Cancer Inst 85(1):19-24.

Madkan, V. K., Cook-Norris, R. H., Steadman, M. C., Arora, A., Mendoza, N., and Tyring, S. K.

2007 **The oncogenic potential of human papillomaviruses: a review on the role of host genetics and environmental cofactors.** Br J Dermatol 157(2):228-41.

Madsen, P., Rasmussen, H. H., Leffers, H., Honore, B., Dejgaard, K., Olsen, E., Kiil, J., Walbum, E., Andersen, A. H., Basse, B., and et al.

1991 **Molecular cloning, occurrence, and expression of a novel partially secreted protein "psoriasin" that is highly up-regulated in psoriatic skin.** J Invest Dermatol 97(4):701-12.

Meyer-Hoffert, U., Schwarz, T., Schroder, J. M., and Glaser, R.

2008 **Expression of human beta-defensin-2 and -3 in verrucae vulgares and condylomata acuminata.** J Eur Acad Dermatol Venereol 22(9):1050-4.

Milde-Langosch, K., Riethdorf, S., and Park, T. W.

1999 **Natural course of HPV infection. Usefulness of HPV analysis in cervix diagnosis.** Pathologie 20(1):15-24.

Mohr, I. J., Clark, R., Sun, S., Androphy, E. J., MacPherson, P., and Botchan, M. R.

1990 **Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator.** Science 250(4988):1694-9.

Munger, K.

2002 **The role of human papillomaviruses in human cancers.** Front Biosci 7:d641-9.

Niyonsaba, F., Iwabuchi, K., Someya, A., Hirata, M., Matsuda, H., Ogawa, H., and Nagaoka, I.

2002 **A cathelicidin family of human antibacterial peptide LL-37 induces mast cell chemotaxis.** Immunology 106(1):20-6.

O'Neil, D. A., Cole, S. P., Martin-Porter, E., Housley, M. P., Liu, L., Ganz, T., and Kagnoff, M. F.

2000 **Regulation of human beta-defensins by gastric epithelial cells in response to infection with *Helicobacter pylori* or stimulation with interleukin-1.** *Infect Immun* 68(9):5412-5.

O'Neil, D. A., Porter, E. M., Elewaut, D., Anderson, G. M., Eckmann, L., Ganz, T., and Kagnoff, M. F.

1999 **Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium.** *J Immunol* 163(12):6718-24.

Ogushi, K., Wada, A., Niidome, T., Mori, N., Oishi, K., Nagatake, T., Takahashi, A., Asakura, H., Makino, S., Hojo, H., Nakahara, Y., Ohsaki, M., Hatakeyama, T., Aoyagi, H., Kurazono, H., Moss, J., and Hirayama, T.

2001 **Salmonella enteritidis FliC (flagella filament protein) induces human beta-defensin-2 mRNA production by Caco-2 cells.** *J Biol Chem* 276(32):30521-6.

Otte, J. M., Kiehne, K., and Herzig, K. H.

2003 **Antimicrobial peptides in innate immunity of the human intestine.** *J Gastroenterol* 38(8):717-26.

Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., and Pisani, P.

2001 **Estimating the world cancer burden: Globocan 2000.** *Int J Cancer* 94(2):153-6.

Pivarcsi, A., Nagy, I., Koreck, A., Kis, K., Kenderessy-Szabo, A., Szell, M., Dobozy, A., and Kemeny, L.

2005 **Microbial compounds induce the expression of pro-inflammatory cytokines, chemokines and human beta-defensin-2 in vaginal epithelial cells.** *Microbes Infect* 7(9-10):1117-27.

Quayle, A. J., Porter, E. M., Nussbaum, A. A., Wang, Y. M., Brabec, C., Yip, K. P., and Mok, S. C.

1998 **Gene expression, immunolocalization, and secretion of human defensin-5 in human female reproductive tract.** *Am J Pathol* 152(5):1247-58.

Ridinger, K., Ilg, E. C., Niggli, F. K., Heizmann, C. W., and Schafer, B. W.

1998 **Clustered organization of S100 genes in human and mouse.** *Biochim Biophys Acta* 1448(2):254-63.

Rolfe, M., Beer-Romero, P., Glass, S., Eckstein, J., Berdo, I., Theodoras, A., Pagano, M., and Draetta, G.

1995 **Reconstitution of p53-ubiquitinylation reactions from purified components: the role of human ubiquitin-conjugating enzyme UBC4 and E6-associated protein (E6AP).** *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(8):3264-8.

Schiffman, M., and Castle, P. E.

2003 **Human papillomavirus: epidemiology and public health.** *Arch Pathol Lab Med* 127(8):930-4.

Schiffman, M. H.

1992 **Recent progress in defining the epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia.** *J Natl Cancer Inst* 84(6):394-8.

Schutte, B. C., Mitros, J. P., Bartlett, J. A., Walters, J. D., Jia, H. P., Welsh, M. J., Casavant, T. L., and McCray, P. B., Jr.

2002 **Discovery of five conserved beta -defensin gene clusters using a computational search strategy.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(4):2129-33.

Selsted, M. E., and Harwig, S. S.

1989 **Determination of the disulfide array in the human defensin HNP-2. A covalently cyclized peptide.** *J Biol Chem* 264(7):4003-7.

Severson, J., Evans, T. Y., Lee, P., Chan, T., Arany, I., and Tyring, S. K.

2001 **Human papillomavirus infections: epidemiology, pathogenesis, and therapy.** *J Cutan Med Surg* 5(1):43-60.

Sikorski, M., and Zrubek, H.

2003 **Recombinant human interferon gamma in the treatment of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) associated with human papillomavirus (HPV) infection.** *Eur J Gynaecol Oncol* 24(2):147-50.

Singh, P. K., Jia, H. P., Wiles, K., Hesselberth, J., Liu, L., Conway, B. A., Greenberg, E. P., Valore, E. V., Welsh, M. J., Ganz, T., Tack, B. F., and McCray, P. B., Jr.

1998 **Production of beta-defensins by human airway epithelia.** Proc Natl Acad Sci U S A 95(25):14961-6.

Singh, P. K., Tack, B. F., McCray, P. B., Jr., and Welsh, M. J.

2000 **Synergistic and additive killing by antimicrobial factors found in human airway surface liquid.** Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 279(5):L799-805.

Sparkes, R. S., Kronenberg, M., Heinzmann, C., Daher, K. A., Klisak, I., Ganz, T., and Mohandas, T.

1989 **Assignment of defensin gene(s) to human chromosome 8p23.** Genomics 5(2):240-4.

Tang, Y. Q., and Selsted, M. E.

1993 **Characterization of the disulfide motif in BNBD-12, an antimicrobial beta-defensin peptide from bovine neutrophils.** J Biol Chem 268(9):6649-53.

Todd, R. W., Steele, J. C., Etherington, I., and Luesley, D. M.

2004 **Detection of CD8+ T cell responses to human papillomavirus type 16 antigens in women using imiquimod as a treatment for high-grade vulval intraepithelial neoplasia.** Gynecol Oncol 92(1):167-74.

Trottier, H., and Franco, E. L.

2006 **The epidemiology of genital human papillomavirus infection.** Vaccine 24 Suppl 1:S1-15.

Valore, E. V., Park, C. H., Igrati, S. L., and Ganz, T.

2002 **Antimicrobial components of vaginal fluid.** Am J Obstet Gynecol 187(3):561-8.

Valore, E. V., Park, C. H., Quayle, A. J., Wiles, K. R., McCray, P. B., Jr., and Ganz, T.

1998 **Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues.** J Clin Invest 101(8):1633-42.

von Knebel Doeberitz, M., Oltersdorf, T., Schwarz, E., and Gissmann, L.

1988 **Correlation of modified human papilloma virus early gene expression with altered growth properties in C4-1 cervical carcinoma cells.** *Cancer Res* 48(13):3780-6.

Walboomers, J. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., Snijders, P. J., Peto, J., Meijer, C. J., and Munoz, N.

1999 **Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide.** *J Pathol* 189(1):12-9.

Wehkamp, J., Fellermann, K., Herrlinger, K. R., Baxmann, S., Schmidt, K., Schwind, B., Duchrow, M., Wohlschlager, C., Feller, A. C., and Stange, E. F.

2002 **Human beta-defensin 2 but not beta-defensin 1 is expressed preferentially in colonic mucosa of inflammatory bowel disease.** *Eur J Gastroenterol Hepatol* 14(7):745-52.

Weinberg, A., Quinones-Mateu, M. E., and Lederman, M. M.

2006 **Role of human beta-defensins in HIV infection.** *Adv Dent Res* 19(1):42-8.

Wentzensen, N., Ridder, R., Klaes, R., Vinokurova, S., Schaefer, U., and Doeberitz, M. K.

2002 **Characterization of viral-cellular fusion transcripts in a large series of HPV16 and 18 positive anogenital lesions.** *Oncogene* 21(3):419-26.

Wolf, R., Voscopoulos, C., Winston, J., Dharamsi, A., Goldsmith, P., Gunsior, M., Vonderhaar, B. K., Olson, M., Watson, P. H., and Yuspa, S. H.

2009 **Highly homologous hS100A15 and hS100A7 proteins are distinctly expressed in normal breast tissue and breast cancer.** *Cancer Lett* 277(1):101-7.

Yamaguchi, Y., Nagase, T., Makita, R., Fukuhara, S., Tomita, T., Tominaga, T., Kurihara, H., and Ouchi, Y.

2002 **Identification of multiple novel epididymis-specific beta-defensin isoforms in humans and mice.** *J Immunol* 169(5):2516-23.

Yamamoto, T., Zhou, X., Williams, C. J., Hochwalt, A., and Forney, L. J.

2009 **Bacterial populations in the vaginas of healthy adolescent women.** *J Pediatr Adolesc Gynecol* 22(1):11-8.

Yang, D., Chen, Q., Chertov, O., and Oppenheim, J. J.

2000 **Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells.** *J Leukoc Biol* 68(1):9-14.

Yang, D., Chertov, O., Bykovskaia, S. N., Chen, Q., Buffo, M. J., Shogan, J., Anderson, M., Schroder, J. M., Wang, J. M., Howard, O. M., and Oppenheim, J. J.

1999 **Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6.** *Science* 286(5439):525-8.

Zanetti, M., Gennaro, R., and Romeo, D.

1995 **Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain.** *FEBS Lett* 374(1):1-5.

Zhao, C., Wang, I., and Lehrer, R. I.

1996 **Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells.** *FEBS Lett* 396(2-3):319-22.

Zheng, Y., Niyonsaba, F., Ushio, H., Nagaoka, I., Ikeda, S., Okumura, K., and Ogawa, H.

2007 **Cathelicidin LL-37 induces the generation of reactive oxygen species and release of human alpha-defensins from neutrophils.** *Br J Dermatol* 157(6):1124-31.

zur Hausen, H.

1976 **Condylomata acuminata and human genital cancer.** *Cancer Res* 36(2 pt 2):794.

zur Hausen, H.

1977 **Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas.** *Curr Top Microbiol Immunol* 78:1-30.

7 Anhang

7.1 Chemikalien

Tabelle 15: Chemikalien

Produkt	Hersteller
β- Mercaptoethanol	Sigma, Dreisenhofen, D
Aceton	Merck, Darmstadt, D
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe, D
Antikörperdiluent-Diluent	Dako Cytomation GmbH, Hamburg, D
Ammoniumperoxodisulfat (AMPS) 10%	Merck, Darmstadt, D
Aquatex	Merck, Darmstadt, D
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, D
Blockserum "Normalserum"	Dako Cytomation GmbH, Hamburg, D
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP` s)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Diaminobenzidin (DAB)	Dako Cytomation GmbH, Hamburg, D
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Dreisenhofen, D
Ethanol	Merck, Darmstadt, D
Ethylenediaminetetraaceticacid (EDTA)	Merck, Darmstadt, D
Ethidiumbromid	Sigma, Dreisenhofen, D
Glycerol	Merck, Darmstadt, D
Hämatoxylin III nach Gill	Merck, Darmstadt, D
Kanamycin	Boehringer, Mannheim, D
LB-Flüssigmedium	Invitrogen, Karlsruhe, D
Lysis-Puffer	Qiagen, Hilden, D
Magnesiumchlorid	Invitrogen, Karlsruhe, D
Methanol	Merck, Darmstadt, D
NB-Agar	Invitrogen, Karlsruhe, D
Polyacrylamid	Sigma, Dreisenhofen, D
S.O.C. Medium Ultrapur	Invitrogen, Karlsruhe, D
Streptavidin-Komplex	Dako Cytomation GmbH, Hamburg, D
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt, D
Tissue Tech	Miles Scientific, USA
Top 10 E.coli	Invitrogen, Karlsruhe, D
Tris-Base	Merck, Darmstadt, D
Tris-HCl	Merck, Darmstadt, D
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt, D
Xylencyanol	Merck, Darmstadt, D

7.2 Geräte

Tabelle 16: Geräte

Produkt	Name	Hersteller
Biofuge	fresco	Hereus
Fluoreszenz Temperatur Cycler	LightCycler	Roche, Mannheim, D
Gelkammer horizontal	Horizon	Invitrogen, Karlsruhe, D
Gelkammer vertikal	Gelkammer vertikal	Biometra, Göttingen, D
Kühlschrank - 80 °C	Kyrosave	Schröder GmbH, Hamburg, D
Kühlschrank - 20 °C	Premium	Liebherr GmbH, Biberbach, D
Lichtmikroskop	Axioplan	Zeiss, Jena, D
Microtom	Microm HM 560	Microm International GmbH, Volketswil, CH
Netzgerät für Elektrophoresen	3000 Xi	BioRad, Hercules, CA, USA
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, D
Pipetten (1, 10, 100 µl)	Eppendorf	Eppendorf, Hamburg, D
Sequenzierer	ALA Express	Pharmacia, Uppsala, S
Sofortbildkamera	Camag Reprostar II	Polaroid, Cambridge, MA, USA
Thermocycler	Gene Amp PCR System 2400	Perkin Elmer, Überlingen, D
Thermomixer	5436	Eppendorf, Hamburg, D
Thermozentrifuge	5402	Eppendorf, Hamburg, D
Ultraturrax	T 25	Janke und Kunkel, D
UV-Lampe	high performance transluminator	Ultraviolet products, CA, USA GFL, Burgwedel, D
Wärmebad	Typ 1002	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge	5415C	

7.3 Kits

Tabelle 17: Kits

Produkt	Hersteller
LightCycler –Fast Start DNA Master SYBR Green mix	Roche, Mannheim, D
Miniprep Kit	Qiagen, Hilden, D
QuiaexII Kit	Qiagen, Hilden, D
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, D
StreptABComplex/HRP	Dako Cytomation GmbH, Hamburg, D
You-Prime First Strand Beads	Pharmacia Biotech, Freiburg, D
Zero Blunt Topo Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe, D
Taq DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe, D

7.4 Enzyme

Tabelle 18: Enzyme

Produkt	Hersteller
Desoxiribonuklease I	Qiagen, Hilden D
Proof reading enzyme	Roche
Restriktionsenzyme (Hint3)	Boehringer, Mannheim, D
PCR-Blunt-II-Topo Vektor (3519bp)	Invitrogen, Karlsruhe, D

7.5 Nukleotide

Tabelle 19: Nukleotide

Produkt	Hersteller
DNA-Leiter 100 bp	Invitrogen, Karlsruhe, D
Oligo-dT Primer	Promega, Madison, WI, USA
Primer	Sigma-Genosys, Steinheim, D
Puc A, Puc B	Invitrogen, Karlsruhe, D

7.6 Gele

Tabelle 20: Gele

Bestandteile	Menge
Agarose	1,7 g
TAE-Puffer 1 x	100 ml

Produkt	Hersteller
Agarosegel Ultrapur 8 %	Invitrogen, Karlsruhe, D
Agarosegel Ultrapur 1,7 %	Invitrogen, Karlsruhe, D

7.7 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 21: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
LB-Agarplatten	Invitrogen, Karlsruhe, D
Objekträger SuperFrost plus	Menzel GmbH, Braunschweig, D
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, D
Polaroid Filme	Kodak, Köln, D
Probengefäße (Tubes, 1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg, D
Probengefäße (Tubes 50 ml)	Sarstedt, Nürnberg, D

7.8 Puffer und Lösungen

Tabelle 22: Puffer und Lösungen

Puffer	Bestandteile	Menge
cDNA-Auftragspuffer	Glycerol (50%tig) Bromphenolblau (100mg/10ml) Xylencyanol (100mg/10ml) H ₂ O	50 ml 2,5 ml 2,5 ml ad 100 ml
RNase freies Wasser	Destilliertes Wasser DEPC (0,1 %) Über 16 Stunden inkubiert und anschließend autoklaviert	Gewünschte Menge
TAE Laufpuffer 50x Tris-Acetat-EDTA	Tris-Base (2 M) Natriumacetat (1 M) EDTA (0,5 M, pH 8)	24,2 g 5,71 g 10 ml
TBE Laufpuffer 5x Tris-Borat-EDTA pH = 8	Tris-Base (2 M) Natriumborat (1 M) EDTA (0,5 M , pH 8) H ₂ O	54 g 27,5 g 20 ml ad 1000 ml
TBS Puffer 10x	Tris-Base (1 M) Tris-HCL (1 M) NaCl ad 1L (ph=7,6)	250 ml 250 ml 87 g

7.9 Antikörper

Tabelle 23: Antikörper

Antikörper	Art des Antikörpers	Hersteller
hBD-2	Rabbit-anti-human	Santa Cruz Biotechnology
Psoriasisin	Mouse-anti-human	Santa Cruz Biotechnology
RNase 7	Goat-anti-human	Arbeitsgruppe Schröder/Harder
LL-37	Goat-anti-human	Santa Cruz Biotechnology
E 0353 (für hBD-2)	Pig-anti-rabbit, Biotin-gekoppelt	Dako
E 0354 (für Psoriasisin)	Rabbit-anti-mouse, Biotin-gekoppelt	Dako
E 0466 (für RNase 7)	Rabbit-anti-goat, Biotin-gekoppelt	Dako
E 0466 (für LL-37)	Rabbit-anti-goat, Biotin-gekoppelt	Dako

7.10 Genehmigung Ethikkommission

Alle Patientinnen wurden über den Zweck der Gewebeentnahme aufgeklärt und gaben schriftlich ihre Zustimmung. Die Probenentnahme und Gewebeuntersuchung wurde von der Ethikkommission der Universität Kiel genehmigt (Code AZ.: D 420/07).

8 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Ivo Meinhold-Heerlein bedanken, der mir das spannende Thema dieser Dissertation überlies, die nötigen Mittel zur Durchführung dieser zur Verfügung stellte, mich sachkundig und zuverlässig betreute und bei der Erstellung von Dissertation und Publikation stets tatkräftig unterstützte.

Ein aufrichtiges Dankeschön möchte ich Frau Dipl. Biologin Gabriele Brunke aussprechen, die mich kompetent und sehr geduldig in die Labormethodik eingearbeitet hat und mir sowohl beim experimentellen als auch beim schriftlichen Teil der Dissertation eine große Hilfe war. Sehr herzlich danke ich Herrn PD Dr. Alexander Arlt für die stetige Unterstützung, die zahlreichen Anregungen und kritischen Anmerkungen, die sehr wertvoll beim Fertigen dieser Arbeit waren.

Zu Dank verpflichtet bin ich Herrn Prof. Dr. Walter Jonat, dem Direktor der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, und Herrn Prof. Dr. Norbert Arnold für die Möglichkeit der Durchführung dieser Dissertation und ihr Interesse am Fortgang der Untersuchungen. Herrn Prof. Dr. Stefan Schreiber, dem Direktor der Klinik für Innere Medizin I der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, danke ich für die Möglichkeit der Durchführung der vorliegenden Untersuchungen im Hormon- und Rezeptorlabor.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. Dipl. Biol. Özkan Alkaşi für die Unterstützung bei der Gewinnung der Gewebeproben und seine wertvollen Ratschläge bedanken. Frau Dr. Franziska Wegener danke ich für die Begründung des Themas und die Einführung in die theoretischen Grundlagen. Bei Frau Dipl. Math. Ulrike Schulz möchte ich mich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung und der Erstellung der Diagramme bedanken.

Mein Dank gilt außerdem den Mitarbeiterinnen des Labors Frau Conny Wilgus und Frau Gunda Dechow-Seligmann für die schöne und intensive Zeit, in der ich viel gelernt habe. Neben der fachlichen Unterstützung danke ich ihnen für das angenehme Arbeitsklima.

Meinen Freundinnen Frau Dr. Katja Klausz und Frau Melanie Müller möchte ich herzlich für die kritische Durchsicht dieser Dissertationsschrift danken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht und mich stets liebevoll und tatkräftig unterstützt haben.

9 Lebenslauf

Zur Person

Name: Wiebke Erhart
Geburtsdatum und -ort: 20.03.1985 in Düsseldorf
Adresse: Westring 346
24118 Kiel
Tel.: 0431-2202843
E-Mail: wiebke.erhart@gmx.net
Familienstand: ledig

Schulbildung

1991 – 1995 Grundschule Hohenaspe
1995 – 2004 Sophie-Scholl-Gymnasium, Itzehoe
08/2001- 06/2002 St. Joseph College, Athlone, Irland

Hochschulbildung

2004 - 2010 Medizinstudium an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
08/2006 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2010 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Beruflicher Werdegang

Seit 3/2011 Assistenzärztin in der 1. Medizinischen Klinik, UK-SH, Campus Kiel

Veröffentlichungen

Posterpräsentation auf dem Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, Hamburg (2008)

Erhart, W., Alkasi, Ö., Brunke, G., Wegener, F., Maass, N., Arnold, N., Arlt, A., Meinhold-Heerlein, I. Induction of human β -defensins and psoriasin in vulvovaginal Human Papillomavirus (HPV)-associated lesions. *J Infect Dis.* in press.