

Aus der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie  
Direktorin: Prof. Dr. med. P. Ambrosch  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**HUMANE PAPILLOMVIRUS-INFEKTION IN KOPF- UND HALSKARZINOMEN:  
DIE ROLLE DER ANTILEUKOPROTEINASE  
„SECRETORY LEUKOCYTE PROTEASE INHIBITOR“  
(SLPI)**

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

vorgelegt von

**LENA CHARLOTTE HEBEBRAND**

aus Bonn

Kiel 2012

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Hoffmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Schröder

Tag der mündlichen Prüfung: 21. März 2013

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 21. März 2013

gez.: Prof. Dr. Petra Ambrosch  
(Vorsitzende der Prüfungskommission)

# INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG.....	1
2. FRAGESTELLUNG.....	5
3. MATERIAL UND METHODEN.....	6
3.1 Material.....	6
3.1.1 Gewebeproben.....	6
3.1.2 Patienten und klinische Daten.....	7
3.2 Methoden.....	7
3.2.1 Extraktion der Nukleinsäuren.....	7
3.2.1.1 DNA-Extraktion.....	7
3.2.1.2 RNA-Extraktion.....	8
3.2.1.3 Photometrische Bestimmung der RNA-/DNA-Konzentration.....	8
3.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	9
3.2.2.1 Detektion von HPV-DNA mittels Polymerasekettenreaktion.....	10
3.2.2.2 Primer zur Detektion von HPV-DNA.....	11
3.2.2.3 Aufreinigung der PCR-Produkte.....	12
3.2.3 DNA-/RNA-Analyse.....	13
3.2.3.1 HPV-DNA-Genotypisierung.....	13
3.2.3.2 HPV-E6*I-mRNA-Analyse in gefrorenem Frischgewebe.....	15
3.2.4 Angewandte Färbungen.....	15
3.2.4.1 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung.....	15
3.2.4.2 SLPI-Immunhistochemie.....	16
3.2.4.3 p16 <sup>INK4a</sup> -Immunhistochemie.....	17
3.2.5 Statistische Analyse.....	18
4. ERGEBNISSE.....	19
4.1 $\beta$ -Globin Nachweis.....	19
4.2 HPV-DNA-Nachweis.....	19
4.3 Expression der E6/E7-mRNA.....	20
4.4 Immunhistochemischer Nachweis der SLPI-Expression.....	21
4.5 SLPI-Expression in Korrelation zum HPV-Status.....	24
4.6 Betrachtung des Lymphknoten-Status in Abhängigkeit vom HPV-Infektionsstatus und in Korrelation zur SLPI-Expression.....	25
4.7 Immunhistochemischer Nachweis der p16 <sup>INK4a</sup> -Expression.....	26
5. DISKUSSION.....	29
5.1 Humane Papillomviren (HPV).....	29
5.1.1 HPV-assoziierte Läsionen.....	32
5.2 Secretory Leukocyte Protease Inhibitor (SLPI).....	34
5.2.1 Vorkommen und Funktion des SLPI.....	34
5.3 HPV-Prävalenz in Plattenepithelkarzinomen.....	36
5.4 mRNA-Expression der Onkogene E6 und E7.....	37
5.5 P16 <sup>INK4a</sup> -Immunhistochemie.....	39
5.6 Die SLPI-Expression in Kopf-Hals-Karzinomen.....	40
5.7 Der Zusammenhang zwischen Lymphknoten-Status, HPV-DNA-Status und SLPI- Expression.....	41
5.8 Die SLPI-Expression in klinisch gesunder Mukosa von Patienten ohne maligne Neoplasien.....	42
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	45
7. LITERATURVERZEICHNIS.....	48
8. ANHANG.....	63

DANKSAGUNG.....	69
LEBENS LAUF .....	71
ERKLÄRUNG .....	73

## Abkürzungen/Legende:

aHPV	Aktive HPV-Infektion
ALP	Antileukoproteinase
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
CIN	Zervikale intraepitheliale Neoplasie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DEPC	Diethylpyrocarbonat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Ethylen-Diamin-Tetraacetat)
E-Region	Early Region
EV	Epidermodysplasia verruciformis
HCL	Chlorwasserstoff
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPV	Humane Papillomviren
HPV-HR	Humane Papillomviren der high-risk Typen
HPV-LR	Humane Papillomviren der low-risk Typen
iaHPV	Inaktive HPV-Infektion
IL	Interleukin
L-Region	Late Region
MMP	Matrixmetalloproteinase
MPG	Multiplex HPV-Genotypisierung
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NCR	Non-coding region
NMSC	Non melanoma skin cancer
N-Status	Lymphknoten-Status
ORF	Open reading frame
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
Rb	Retinoblastom
RNA	Ribonukleinsäure
RRP	Rezidivierende respiratorische Larynxpapillomatose
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
SLPI	Secretory Leukocyte Proteinase Inhibitor
Taq	Termus aquinus
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
URR	Upstream regulatory region
WAP	Whey Acidic Protein

## 1. EINLEITUNG

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches machen mit 570.000 neu diagnostizierten Fällen weltweit pro Jahr die sechst größte Gruppe aller Malignome aus (Kamangar et al. 2006). Die Inzidenz steigt mit dem Alter an, wobei die meisten Patienten zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr erkranken. Plattenepithelkarzinome mit den anatomischen Lokalisationen Mundhöhle, Naso-, Oropharynx, Hypopharynx und Larynx werden in dieser Gruppe der Kopf-Hals-Karzinome zusammengefasst. Die 5-Jahres-Überlebensrate aller Kopf-Hals-Karzinome insgesamt beträgt 40-50 % (Leemans et al. 2011, Ferlay et al. 2010). Die Exposition von karzinogenen Noxen, orale Hygiene, Ernährungsgewohnheiten, Familien- und Eigenanamnese spielen bei der Karzinogenese als Risikofaktoren von Kopf-Hals-Malignomen eine Rolle (Pai und Westra 2009). Die karzinogenen Substanzen des Tabakrauchs haben sich dabei als die bedeutendsten Risikofaktoren herausgestellt. Alkoholkonsum, insbesondere von hochprozentigem Alkohol, erhöht in Verbindung mit den karzinogenen Substanzen des Tabakrauchs das Risiko, ein Malignom im Kopf-Hals-Bereich zu entwickeln, gravierend (Talamini et al. 2002).

Die kausale Verwicklung humaner Papillomviren (HPV) in die Karzinogenese von Karzinomen des Kopf-Hals-Bereiches ist neben den genannten Risikofaktoren aufgrund zahlreicher epidemiologischer und molekularbiologischer Untersuchungen an Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen hochwahrscheinlich. Die Inzidenzen von Oropharynxkarzinomen zeigen, dass Patienten im Altersbereich unter 45 Jahren zunehmend an diesen Karzinomen erkranken, obwohl sie anamnestisch weder Alkohol- noch Tabakkonsum angeben. Epidemiologische Daten zeigen dabei eine HPV-Prävalenz von 20-30 % in Karzinomen aller anatomischen Regionen des Kopf-Hals-Bereiches (Kreimer et al. 2005, Termine et al. 2008, Hoffmann et al. 2010), wobei Plattenepithelkarzinome des Oropharynx, vor allem der Tonsillen des Waldeyer'schen Rachenringes, mit einer Prävalenz von 60 % besonders prädestiniert für eine HPV-Infektion sind (Hoffmann et al. 2005, Chung et al. 2009, Torrente et al. 2011). Eine Infektionsrate von sogar 90 % der untersuchten Tonsillenkarzinome wurde in einer Studie aus Schweden gezeigt (Näsman et al. 2009), was auf unterschiedliche Raten der HPV-Prävalenz in den untersuchten Patientenkollektiven verschiedener geographischer Regionen der Welt und Europas hinweist. Sozioepidemiologische Untersuchungen vor allem der anglo-amerikanischen Bevölkerung haben gezeigt, dass mögliche Risikofaktoren für eine HPV-

Infektion eine frühe Kohabitarche, Promiskuität und risikoreiches Sexualverhalten sein könnten (Smith et al. 2004).

Kenntnisse über die Bedeutung einer HPV-Infektion bei der Entstehung und Progression der Karzinome sind in den vergangenen Jahren zunehmend gewonnen worden. Kürzlich durchgeführte molekularbiologische Untersuchungen zeigen dabei allerdings, dass der alleinige Nachweis von HPV-DNA im Tumorgewebe nicht beweisend für das Vorliegen einer tatsächlich aktiven Virusinfektion ist (Hoffmann et al. 2010, 2012, eingereicht). Es wird derzeit angenommen, dass eine HPV-Infektion als aktiv eingestuft werden kann, wenn der Nachweis von HPV-DNA mit dem zeitgleichen Nachweis von mRNA der viralen Onkogene E6 und E7 gelingt und/oder mit der Überexpression eines sogenannten Surrogat-Markers wie dem zellulären Protein p16<sup>INK4a</sup> einhergeht (Smeets et al. 2007, Hoffmann et al. 2010). Die viralen Onkogene E6 und E7 sind für die kanzerogene Wirkung der Viren verantwortlich. Die Proteine E6 und E7 interagieren mit zwei der Hauptregulatoren des menschlichen Zellzyklus, dem p53-Protein (p53) und dem Retinoblastomprotein (pRb). E6 ist in der Lage p53 zu degradieren, wodurch es zu einem interzellulären Mangel an p53 kommt. Die zelluläre Telomerase wird ebenfalls durch E6 aktiviert, hierdurch kann die Lebensdauer der infizierten Zelle verlängert werden. E7 ist in der Lage pRb zu degradieren, wodurch es zu einer gesteigerten Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F kommt. Dies führt zu einem Anstieg des E2F-Transkriptionsfaktors, der Einfluss auf die Zellproliferation nimmt (Dell und Gaston 2001). Die Zelle kann so in den Zellzyklus eintreten und virale DNA synthetisieren. Das Protein pRb ist in HPV-positiven Tumoren als Zeichen der E7-Aktivität herunter reguliert (Wiest et al. 2002, Hoffmann et al. 2004). Die negative Rückkopplung des pRb auf p16<sup>INK4a</sup> verursacht eine p16<sup>INK4a</sup>-Überexprimierung (Smith et al. 2008, Klaes et al. 2001). Humane Papillomviren sind demnach in der Lage Onkoproteine zu synthetisieren, welche Tumorsuppressorproteine inaktivieren oder zur Degradierung markieren können. In der Folge kommt es zu einer Akkumulation von DNA-Schäden, welche die Transformation der Wirtszelle letztlich bedingen (Zerfass et al. 1995, Havre et al. 1995).

Während die Auswirkungen der Onkogene E6 und E7 bekannt sind, sind die exakten molekularen Mechanismen, die zur Tumorentstehung, -progression und Metastasierung führen bis zum heutigem Zeitpunkt noch unbekannt. HPV-positive Kopf- und Halskarzinome, vor allem Tonsillenkarzinome, metastasieren früh in die lokoregionären Lymphknoten und weisen somit im Vergleich zu HPV-negativen Karzinomen ein biologisch aggressiveres

Verhalten auf (Hoffmann et al. 2005, Hoffmann et al. 2010, Syrjanen 2010, Mendelsohn et al. 2010). Patienten mit HPV-positiven Tumoren weisen dennoch im Vergleich zu Patienten mit einem negativen HPV-Status ein besseres Gesamtüberleben und ein längeres rezidivfreies Überleben auf, was auf eine erhöhte Sensibilität der HPV-positiven Tumoren auf die Therapie, insbesondere die Strahlentherapie zurückgeführt wird (Licitra et al. 2006, Furniss et al. 2007, Fakhry et al. 2008).

Es ist in vergleichenden Vorversuchen mittels Microarray-Analysen an metastasierten und nicht metastasierten Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches gezeigt worden, dass die Expression des Gens einer Antileukoproteinase, nämlich des sog. „Secretory Leukocyte Protease Inhibitor“ (SLPI), eine deutliche Signifikanz als Marker aufweist. SLPI zeigte in Untersuchungen auf Protein- und mRNA-Ebene eine statistisch signifikante Herabregulierung in metastasierten Kopf- und Halskarzinomen im Vergleich zu nicht metastasierten Karzinomen (Cordes et al. 2011). SLPI wird von verschiedenen Organen bzw. Zelltypen synthetisiert, unter anderem in Mammagewebe, Endometrium, Ovar sowie Lunge und Speicheldrüsen. SLPI wird darüber hinaus von diversen immunologisch aktiven Zellen, wie Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und B-Lymphozyten, produziert (Abe et al. 1991, Franken et al. 1989, Jin et al. 1997). Das Protein dient zum Schutz der Gewebe vor den endogenen Serinproteasen neutrophile Elastase und Cathepsin G sowie vor Pankreasenzymen wie Chymotrypsin, Trypsin und Pankreaselastase. Es leistet so einen Beitrag zum Immunsystem (Nystrom et al. 1999, Taggart et al. 2002).

Eine Arbeitsgruppe aus den USA hat in Untersuchungen an Zellkulturen parallel zu den eben genannten Erkenntnissen gezeigt, dass verminderte Expression von SLPI einen zellulären Oberflächenrezeptor freisetzt, welcher dann als „Aufnahme-Rezeptor“ für HPV in die Zellen zu fungieren scheint (Kast WM et al., persönliche Mitteilung und eingereicht). Es ist vor diesem Hintergrund Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit, einen möglichen Zusammenhang zwischen SLPI-Expression und dem HPV-Infektions-Status bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches zu untersuchen und eine mögliche Verbindung beider Parameter, allein und kombiniert, zur Metastasierung in die Halslymphknoten zu analysieren. Es wurden zu diesem Zweck 78 Tumorproben von metastasierten und nicht metastasierten Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches retrospektiv untersucht. Eine vergleichbare Untersuchung ist bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht durchgeführt worden. Die HPV-Prävalenz ist mit den derzeit sensitivsten und spezifischsten Nachweismethoden bestimmt worden. Die



Tumoren sind zur Bestimmung der biologischen Aktivität der HPV-Infektion auf die Nachweisbarkeit von viraler mRNA der Onkogene E6 und E7 untersucht worden. Das p16<sup>INK4a</sup>-Expressionsmuster ist mittels Immunhistochemie untersucht, das SLPI-Expressionsmuster immunhistochemisch semiquantitativ bestimmt und in Korrelation zu der HPV-DNA-Prävalenz gesetzt worden. Der Lymphknoten-Status (N-Status) des lateralen Halses der Patienten ist in Beziehung zu den so gewonnenen Ergebnissen gesetzt worden. Es ist zusätzlich das SLPI-Expressionsmuster von 19 Patienten mit klinisch unauffälliger Mukosa, die aufgrund nicht-maligner Erkrankungen behandelt worden sind, immunhistochemisch semiquantitativ bestimmt und mit den Rauchgewohnheiten der Patienten korreliert worden. Sämtliche Ergebnisse sind einer statistischen Analyse unterzogen worden.

## **2. FRAGESTELLUNG**

Das Ziel dieser Arbeit ist es, erstmalig einen Zusammenhang zwischen der SLPI-Expression und dem HPV-Status von Kopf- und Halsplatteneithelkarzinomen zu untersuchen, sowie eine mögliche Korrelation zum Halslymphknotenstatus betroffener Patienten zu analysieren. Dies wird mit der Beantwortung folgender Fragestellungen verfolgt:

1. Wie hoch ist die HPV-DNA-Prävalenz in den untersuchten Tumorbiopsaten und wie hoch ist der Anteil biologisch aktiver Infektionen?
2. Wie stellt sich die SLPI-Expression in den Tumoren des untersuchten Patientenkollektivs dar? Existiert ein signifikanter Zusammenhang zwischen der SLPI-Expression und dem HPV-Infektionsstatus der Karzinome?
3. Zeigt sich ein Zusammenhang zwischen Metastasierung, SLPI-Expression und HPV-Infektionsstatus?
4. Kann anhand der Daten die Hypothese der Existenz eines zellulären Rezeptors, um den zwei Liganden, nämlich SLPI und HPV, konkurrieren, unterstützt werden?
5. Können bereits bei gesunden Individuen Unterschiede in der SLPI-Expression in klinisch normaler Schleimhaut nachgewiesen werden?

### **3. MATERIAL UND METHODEN**

#### **3.1 Material**

##### **3.1.1 Gewebeproben**

Gewebeproben von 78 Patienten wurden in einem Zeitraum zwischen 2004 und 2009 in der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel gewonnen. Die Proben wurden den Patienten im Rahmen von diagnostischen und therapeutischen Eingriffen entnommen. Es wurde entsprechend einer von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Kiel (D 438/10) befürworteten Einverständniserklärung von allen Patienten die Zustimmung zur wissenschaftlichen Bearbeitung des Gewebes eingeholt. Molekulargenetische Analysen der Gewebeproben bezüglich der Prävalenz und Typisierung von HPV-DNA-Sequenzen erfolgten nachdem die Proben in histopathologischen Untersuchungen am Institut für Pathologie (Direktor: Prof. Dr. med. Röcken) des Universitätsklinikums als Plattenepithelkarzinome diagnostiziert wurden. Die in Paraffin fixierten Gewebeproben der vorliegenden Untersuchung wurden vom o. g. Institut zur Verfügung gestellt.

Von jeder intraoperativ entnommenen Gewebeprobe wurde unter Wahrung der Resektionsgrenzen ein Teil für Routineuntersuchungen in der Pathologie aufbereitet und ein Teil in sterile Reaktionsgefäße (Safe-Lock Reaktionsgefäß 1,5 ml, Eppendorf, Hamburg) überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Es wurden zusätzlich Gewebeproben klinisch unauffälliger Mukosa der oberen Atemwege von 19 Patienten, die wegen nicht-maligner Erkrankungen in der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel behandelt wurden, entnommen (Ethikvotum D 467/11).

Es wurden für die Durchführung der Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung und der immunhistochemischen p16<sup>INK4a</sup>-Färbung, sowie der SLPI-Färbung, von jeder Gewebeprobe mittels eines Mikrotomes (Reichert-Jung Supercut, Cambridge Instruments GmbH, Nußloch) mehrere Schnitte mit einer Schnittdicke von 5 µm angefertigt.

### **3.1.2 Patienten und klinische Daten**

Es wurden 78 Tumore von 66 Männern und zwölf Frauen untersucht. Das Alter der Patienten reichte von 43 bis 76 Jahren. Das mittlere Alter lag bei 59,95 Jahren. Die anatomische Lokalisation der untersuchten Primärtumoren waren Oropharynx [(n= 20); Tonsilla palatina n= 14, Tonsilla lingualis n= 6], Larynx (n= 22), Hypopharynx (n= 24), weicher Gaumen (n= 4) und Zungenrand (n= 8) (Tabelle 1, Anhang). Die anatomischen Lokalisationen weicher Gaumen und Zungenrand wurden - obwohl der weiche Gaumen zur anatomischen Region des Oropharynx gehört - folgend in dieser Promotionsarbeit unter der Lokalisation „Mundhöhle“ zusammengefasst, da es sich bei der Schleimhaut des weichen Gaumens nicht um tonsilläres Gewebe handelt und HPV-Status sowie biologisches Verhalten eher Karzinomen der Mundhöhle gleicht als HPV-assoziierten Karzinomen der Tonsille. Das histologische Grading ergab bei vier Karzinomen eine hohe Differenzierung, bei 56 Karzinomen eine mäßige Differenzierung, bei drei Karzinomen eine mäßige bis niedrige sowie bei 15 Karzinomen eine niedrige Differenzierung.

Es wurden 19 Schleimhautproben von zwölf Männern und sieben Frauen mit nicht-malignen Erkrankungen untersucht. Das Alter dieser Patienten reichte von zwei bis 63 Jahren, das mittlere Alter lag bei 43 Jahren. Weitere klinisch-pathologische Angaben zu den Patienten, inklusive der Rauchgewohnheiten, sind in Tabelle 2 im Anhang zu finden.

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Extraktion der Nukleinsäuren**

#### **3.2.1.1 DNA-Extraktion**

Die Isolation der DNA aus den jeweiligen Gewebeproben erfolgte mit dem QIAamp® DNA Mini Set (QIAGEN® GmbH, Hilden) nach folgenden Arbeitsschritten:

Es wurden jeweils 25 mg schockgefrorene Tumorbiopsate zu feinem Pulver homogenisiert, in ein Eppendorfhütchen überführt und durch Zugabe von 180 µl des mitgelieferten Lysepuffers (ATL Buffer) lysiert. Zur Inaktivierung der Proteine wurde der Probe 20 µl einer 1 mg/ml Proteinase-K-Lösung beigemischt. Die vollständige Lyse der Gewebeproben erfolgte während der Inkubation im Wasserbad (Typ 1083, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel) bei 56 °C für drei Stunden, sowie durch weitere Zugabe von 200 µl des mitgelieferten AL Buffers und abschließende Inkubation im Wasserbad bei 70 °C für zehn Minuten. Die DNA wurde

durch Hinzufügen von 200 µl Ethanol (96-100 %) präzipitiert und zusammen mit dem Ethanol über die Membran der QIAamp Extraktionssäule geschichtet. Das Gemisch wurde bei 8000 U/min in einer Tischzentrifuge (Centrifuge 5417R, Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg) abzentrifugiert und die DNA während der Zentrifugation selektiv von der Silicium-Gel-Membran der Extraktionssäule absorbiert. Polysaccharide und Proteine wurden nicht an die Matrix gebunden und dadurch entfernt. Das Waschen der gebundenen DNA erfolgte anschließend in zwei Zentrifugationsschritten mittels der im Set enthaltenen Waschpuffer AW1 und AW2. Es wurden zunächst 500 µl des Waschpuffers AW1 hinzugefügt und für eine Minute bei 8000 U/min zentrifugiert. Nach Hinzufügen von AW2 folgte die Zentrifugation für drei Minuten bei 14.000 U/min. Störende Kontaminationen wurden durch den Waschvorgang aus der Membran entfernt und der Reinheitsgrad der DNA erhöht. Die DNA wurde durch zweimalige Hinzugabe von 200 µl AE-Puffer und einer jeweiligen einminütigen Zentrifugation bei 8000 U/min in ein Sammelplastikhütchen (Sarstedt AG & CO, Nümbrecht) eluiert. Das Gemisch wurde vor der Zentrifugation für je eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert.

### **3.2.1.2 RNA-Extraktion**

Die Gesamtzell-RNA wurde mit Hilfe des pegGOLD TriFast™ Reagenz (PeqLab, Erlangen) nach dem Herstellerprotokoll isoliert. Die schockgefrorenen Biopsate wurden in einem sterilen Mörser zu einem feinen Pulver homogenisiert. Die vollständige Lyse der Proben erfolgte durch die Zugabe von 1 ml TriFast™ zu jeweils 50-100 mg Gewebe. Eine Phasentrennung wurde durch die Zugabe von 0,2 ml Chloroform zu jeweils 1 ml TriFast™ und Zentrifugation bei 12000 U/min für fünf Minuten erreicht. Die in der wässrigen Phase gelöste RNA wurde durch die anschließende Zugabe von 0,5 ml Isopropanol zu jeweils 1 ml TriFast™ präzipitiert. Es folgte zweimaliges Waschen der RNA-Pellets in 75 %-iger Ethanollösung und eine weitere Zentrifugation für zehn Minuten bei 12000 U/min. Die RNA-Probe wurde abschließend an der Luft getrocknet und in 50 µl 40 %-iger Formamidlösung gelöst.

### **3.2.1.3 Photometrische Bestimmung der RNA-/DNA-Konzentration**

Die Bestimmung der RNA-Konzentrationen der einzelnen Proben erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm in einem UV-Spektralphotometer (BioPhotometer, Eppendorf

AG, Hamburg). Eine Eichung des Photometers mit 40 %-iger Formamidlösung wurde vor der ersten Messung durchgeführt.

Die RNA-Konzentration ließ sich nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz aus den ermittelten Absorptionen der Proben errechnen.

$$30 \mu\text{l} / \text{ml} : 1 = X \mu\text{g} / \text{ml} : \text{gemessene Absorption}$$

Auch die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm im UV-Spektralphotometer. Das Spektrometer wurde vor jeder Messreihe und nach jeder vierten Messung mit AE-Puffer geeicht. UV-transparente Einmal-Küvetten (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) wurden für die Messung benutzt.

Die Konzentrationen der einzelnen Proben wurden nach der folgenden Verhältnisrechnung ermittelt:

$$50 \mu\text{l} / \text{ml} : 1 = X \mu\text{g} / \text{ml} : \text{gemessene Absorption}$$

### **3.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Die 1983 von K. B. Mullis beschriebene PCR (Tony S. Ma 1995) dient der enzymatischen *in-Vitro*-Amplifizierung von kleinsten Mengen an Nukleinsäurefragmenten. Genomisches Material (z.B. DNA) von einigen hundert bis einigen tausend Basenpaaren kann exponentiell vervielfacht werden.

Das Reaktionsverfahren besteht aus 30-40 Zyklen, wobei jeder Zyklus aus drei Teilschritten besteht: Denaturierung, Primerhybridisierung (Annealing) und Extension (Polymerisation). Es erfolgt zunächst die Denaturierung der DNA bei 94 °C. Die Wasserstoffbrückenbindungen, welche die komplementären DNA-Stränge miteinander verbinden, werden bei dieser Temperatur gelöst und die DNA-Stränge somit zum Auseinanderweichen gebracht. Diese Trennung ist erforderlich, damit sich synthetisch hergestellte Oligonukleotidprimer an jeweils einen der beiden DNA-Einzelstränge anlagern können (Annealing). Als Primer werden Oligonukleotide bezeichnet, die von DNA-replizierenden Enzymen wie der DNA-Polymerase als Startpunkt benötigt werden. Sie lagern sich spontan an einen DNA-Strang mit komplementärer Nukleotidabfolge an und ermöglichen damit die Replikation. Die Temperatur wird in der Annealingphase auf 55 °C gesenkt, so dass sich Wasserstoffbrücken zwischen den DNA-Einzelsträngen und den Primern ausbilden können. Die Extension der Primer bei 72 °C

schließt sich als letzter Teilschritt an. Das thermostabile Enzym Taq-Polymerase (aus *Thermus aquaticus* = Taq) synthetisiert von den Primern aus die komplementären Stränge zu den vorhandenen DNA-Ausgangssträngen in 3'-5'-Richtung, wobei die dazu benötigten Nukleotide im Überschuss in den PCR-Reaktionsgefäßen vorhanden sein müssen.

Die gesuchte DNA-Sequenz wurde mit Hilfe dieser Reaktionsabfolge einmal amplifiziert. Die gesuchten Gensequenzen wurden durch mehrfaches Durchlaufen dieses Thermozyklus exponentiell amplifiziert. DNA-Sequenzen können innerhalb von Stunden mit der Polymerasekettenreaktion millionenfach mit hoher Spezifität amplifiziert werden und ermöglichen damit weitere Detektionen und Analysen (Scharfetter et al. 1991).

### **3.2.2.1 Detektion von HPV-DNA mittels Polymerasekettenreaktion**

Die folgenden Arbeitsschritte wurden zur Vermeidung von Kontaminationen auf einer sterilen Arbeitsfläche durchgeführt. Die PCR-Reagenzien wurden in 0,2 ml Reaktionsgefäßen (Multiply® -µstrip 0,2 ml Kette, Sarstedt AG & CO, Nümbrecht) pipettiert, welche vorab in einem Autoklaven (EK Laborautoklav, Systec GmbH Laborsystemtechnik, Wettenberg) sterilisiert wurden. Alle Reagenzien wurden während des Pipettierens auf Eis gelagert. Das Gesamtvolumen, das 50 µl betrug, wurde mit der benötigten Menge an DEPC (Diethylpyrocarbonat)-Wasser (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) eingestellt. Die Reaktionsansätze enthielten 5 µl von dem 10x Dream Taq-Puffer, 5 µl von dem 2 mM dNTP-Mix, jeweils 2,5 µl typenspezifischen Oligonukleotide, 200 ng genomische DNA der zu untersuchenden Probe und 0,5 µl der Dream Taq-DNA-Polymerase. Das Gesamtvolumen wurde mit 0,01%-igem Diethylpyrocarbonat (Fa. Sigma)-haltigen Wasser auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt. (Der PCR-Puffer, der dNTP-Mix und die Taq-Polymerase wurden von Fa. Fermentas Life Sciences bezogen). Zusätzlich zu den HPV-16 typenspezifischen Primern und den General-Primern (GP5/GP6) wurden zur Sicherstellung der Amplifizierbarkeit der DNA die konstitutive Expression des  $\beta$ -Globingens durch Verwendung  $\beta$ -Globin genspezifischer Primer nachgewiesen (Eurofins MWG Operon, Ebersberg).

Die Amplifizierung der DNA-Fragmente erfolgte in einem Thermocycler (Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 9600, USA), wobei ein Amplifikationszyklus sich aus einer einminütigen Denaturierungsphase bei 94 °C, einer einminütigen Annealingphase bei 55 °C und einer zweiminütigen Extensionsphase bei 72 °C zusammensetzte. Es wurden insgesamt 39 Amplifikationszyklen durchlaufen. Positiv und Negativkontrollen wurden in jeder PCR mit-

geführt. Die HPV16-positive Zervixkarzinomzelllinie SiHa wurde als Positivkontrolle verwendet (bereitgestellt von der Abteilung Angewandte Tumorstudiologie des Deutschen Krebsforschungszentrums Heidelberg). In der Negativkontrolle wurde DNA durch DEPC-haltiges Wasser substituiert. Die Amplifikationsprodukte wurden anschließend bis zur Weiterverarbeitung bei 4 °C gelagert.

### **3.2.2.2 Primer zur Detektion von HPV-DNA**

Die DNA jeder Gewebeprobe wurde in Anlehnung an die Methode von Saiki (1985) unter Verwendung von  $\beta$ -Globin-Primern amplifiziert. Diese Primer sind spezifisch für ein 268 Basenpaar langes Fragment des humanen  $\beta$ -Globin-Gens.

Es folgten PCR-Amplifikationen für den spezifischen Nachweis von HPV16 sowie Amplifikationen zum unspezifischen Nachweis von HPV mit Hilfe des General-Primers GP5+/GP6+ (Snijders et al. 1990, Jacobs et al. 1995). Die Primer der HPV16 spezifischen PCR binden im Bereich der „upstream regulatory region (URR)“, die zwischen den einzelnen Typen variabel ist. Eine typenspezifische, hochsensitive PCR ist hierdurch möglich.

Der Primer GP5/GP6 mit einer Länge von 20 Nukleotiden wurde bei der Consensus-Primer-PCR eingesetzt. Die Zielsequenz umfasste eine Region von ca. 140-150 Basenpaaren der verschiedenen HPV-Genome und erlaubte den Nachweis von mindestens 26 verschiedenen HPV-Typen. Klinische Proben, die nach Untersuchung mit dem General-Primer HPV-positiv waren, konnten nochmals mit typenspezifischen Primern amplifiziert werden. Diese Methode wurde modifiziert, indem hoch konservierte Sequenzen in der Nähe des 3'-Endes der GP5- und GP6-Primer mit eingeschlossen wurden (drei Nukleotide für GP5 und fünf Nukleotide für GP6). Zwischen zehn und 200 HPV-Kopien konnten durch die Benutzung dieser verlängerten Primer (GP5+/GP6+) je nach vorliegendem HPV-Typ nachgewiesen werden.



<b>Primer</b>	<b>Nukleotidsequenz</b>
β-Globin	5'-CAACCTCATCCACGTTCCACC-3'
β-Globin	5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3'
HPV 16-S	5'-TGCTAGTGCTTATGCAGCAA-3'
HPV 16-AS	5'-ATTTACTGCAACATTGGTAC-3'
GP 5+	5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3'
GP 6+	5'-GAAAAATAAACTGTAAATCATAAT-3'

**Tabelle 3:** Sequenzen der für die PCR verwendeten Oligonukleotide

### 3.2.2.3 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden von überschüssigen Salzen und Nukleotiden gemäß des QIAquick® Herstellerprotokolls wie folgt entfernt. Es wurde zunächst ein Volumenanteil PCR-Lösung mit fünf Volumenteilen des mitgelieferten Puffers PB vermischt. Wenn sich dabei eine orange-violette Färbung ergab, deutete das darauf hin, dass die Lösung basisch war. In diesem Falle wurden 10 µl Natrium-Acetat (pH 5,0) hinzugefügt und die Farbe verwandelte sich in gelb als Zeichen für neutralen pH-Wert. Das Gemisch wurde anschließend auf die mitgelieferten QIAquick-Säulchen aufgetragen und mit der Tischzentrifuge (Centrifuge 5417R, Eppendorf-Netheler GmbH, Hamburg) für eine Minute bei 13.000 U/min abzentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Es wurden zum Waschen 0,75 ml Puffer PE hinzugefügt und das Gemisch zweimal für je eine Minute zentrifugiert. Die QIAquick-Säulchen wurden anschließend in 1,5 ml Eppendorf-Hütchen (Sarstedt AG & CO, Nümbrecht) gesetzt und die DNA mit 40 µl DEPC-haltigem Wasser (0,01%) eluiert. Die Lösung wurde um die DNA-Konzentration zu erhöhen bei Raumtemperatur für eine Minute inkubiert. Die DNA-Lösung wurde anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

### 3.2.3 DNA-/RNA-Analyse

#### 3.2.3.1 HPV-DNA-Genotypisierung

Es wurden zwei verschiedene Methoden zur Ermittlung von HPV-DNA in den Gewebeproben angewandt. Die eine ist Multiplex-HPV-Genotyping-Assay/Luminex und die zweite ist die HPV<sup>Type</sup> 3.5 LCD- Array. Sie basieren auf der vorherigen Durchführung einer PCR. Die Durchführung beider Methoden erhöhte die Genauigkeit der Validität und Reliabilität der HPV-DNA-Diagnostik:

##### 1.) Multiplex-HPV-Genotyping-Assay/Luminex

Wissenschaftler am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg entwickelten einen HPV-Genotyping-Assay für 27 Typen Humaner Papillomviren (HPV) (Schmitt et al. 2006, Schmitt et al 2008, Schmitt et al 2010). Das Verfahren ist geeignet für die simultane Detektion von multiplen high- und low-risk HPV-Typen.

Das Luminex-Verfahren basiert auf der Amplifikation von Genfragmenten der 27 wichtigsten HPV-Typen mit einem General-Primer (BSGP5+/ biotinierter BSGP6+) (Multiplex PCR Set, Qiagen, Hilden, Germany). Die Amplifikation des  $\beta$ -Globins erfolgte zusätzlich mittels PCR zur Überprüfung der Intaktheit der zu untersuchenden humanen DNA. MS3 und 5'-biotiniliertes MS10 wurden als  $\beta$ -Globin-Primer verwendet. Die Denaturierung der doppelsträngigen PCR-Produkte erfolgte anschließend. Die Zielsequenzen wurden mit HPV-Typenspezifischen Oligonukleotidsonden zur Detektion der verschiedenen HPV-Typen hybridisiert.

Fluoreszenz-markierte Polystyrol-Kügelchen (Luminex SeroMAP Beads) sind an diese Sonden gebunden. Die Beads unterscheiden sich durch ihre unterschiedlichen Absorptionsspektren. Der Nachweis der Hybridisierung fand anhand von fluoreszenzmarkiertem Streptavidin im Luminex-Analysegerät statt, welches an die biotinylierten PCR-Produkte bindet. Das Hybridisierungsgemisch enthielt außerdem eine  $\beta$ -Globin-genspezifische Sonde, welche zusätzlich zur Kontrolle der Hybridisierung verwendet wurde. Ein zusätzlicher Waschvorgang eliminierte den nicht-gebundenen Fluoreszenzfarbstoff.

Die Auswertung erfolgte abschließend durch das Luminex-Analysegerät, welches die unterschiedlichen Fluoreszenz-Spektren der Beads misst. Die einzelnen Ergebnisse wurden

als mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) von mindestens 100 Beads pro Durchlauf ausgedrückt. Das Gerät entspricht weitgehend einem Durchflusszytometer mit zwei Lasern.

Die Bewertung der HPV-Signale erfolgte durch die Ermittlung des relativen HPV-MFI-Signals (%) für jede positive Reaktion. Dieses relative HPV-MFI-Signal (%) errechnet sich aus dem gemessenen HPV-MFI-Wert geteilt durch den ermittelten maximalen typenspezifischen MFI-Wert. Die maximalen MFI-Werte jedes HPV-Typen wurden aus typenspezifischen PCR-Produkten zuvor ermittelt. Der relative MFI-Wert (%) wurde schließlich durch den gemessenen  $\beta$ -Globin MFI-Wert geteilt, um einen nicht-deskriptiven viralen Belastungswert zu bilden (% HPV MFI/  $\beta$ -Globin MFI). Eine hohe virale Belastung wurde für netto MFI-Werte über fünf festgelegt (cutoff-Wert) (Schmitt et al. 2006). Proben wurden in der dargelegten Studie als HPV-DNA-positiv eingestuft, wenn eine hohe virale Belastung ermittelt werden konnte. Dieser hohe virale cutoff-Wert erwies sich als zuverlässig auch für extrahierte DNA aus frisch gefrorenen Gewebeproben (Holzinger et al. eingereicht). Proben wurden in der dargelegten Studie als HPV-DNA-positiv eingestuft, wenn eine hohe virale Belastung ermittelt werden konnte. Es wurden Negativkontrollen in jedem PCR-Durchlauf mitgeführt. In den Negativkontrollen wurde DNA durch DEPC-haltiges Wasser substituiert. Es konnten keine PCR-Kontaminationen nachgewiesen werden.

## 2.) HPV<sup>Type</sup> 3.5 LCD- Array

Eine hoch qualitative PCR wurde durchgeführt, um die Qualität der isolierten DNA zu ermitteln. Die PCR wurde mit vier Primerpaaren ausgeführt. Diese Primer amplifizieren DNA-Regionen zwischen 100, 200, 300 und 400 Basenpaaren (van Dongen et al. 2003).

Die HPV-Detektion und Typisierung der extrahierten DNA erfolgte mittels einer Chip-basierten Detektionsmethode (HPV<sup>Type</sup> 3.5 LCD-Array-Set, Chipron GmbH, Berlin). Diese Methode erlaubt die Identifizierung von 32 verschiedenen HPV-Typen. HPV-spezifische DNA-Segmente (L1-Region) wurden mittels zweier Primerpaare - HPV MY11/09 (~430 bp) und HPV“125“(~125 bp) - amplifiziert. Anschließend erfolgte die Hybridisierung von jeweils 10  $\mu$ l der biotinylierten PCR-Produkte an Subtypspezifische Sonden auf der LCD-Chip Oberfläche. Zwei stringente Waschschrte folgten, bei denen ungebundene Komponenten entfernt wurden. Die gebundenen PCR-Produkte wurden mittels Reaktion eines Enzyms mit einem chromogenen Substrat als blaues Präzipitat sichtbar gemacht. Die Auswertung der

Ergebnisse erfolgte durch optische Kontrolle mittels einer Mustermatrix (LCD-Array-Set).

Die Hybridisierung, die Waschvorgänge und die Identifizierung der HPV-PCR-Fragmente erfolgten nach den entsprechenden Herstellerempfehlungen.

### **3.2.3.2 HPV-E6\*I-mRNA-Analyse in gefrorenem Frischgewebe**

54 RNA-Proben standen insgesamt für weitere Analysen zur Verfügung. Es wurden jeweils 2 µl Gesamt-RNA in ultra-kurzer-typspezifischer Reverse Transkriptase (RT)-PCR untersucht. Halec et al. (in Bearbeitung) entwickelten diese Methode zum Nachweis der Amplifikation von ~ 65 bp der E6\*I-mRNA von 14 high-risk- (Hr) und sechs putativen high-risk- (pHr) HPV-Typen. Der Nachweis der RNA-Integrität erfolgte durch zusätzliches Amplifizieren von 85 bp langen Ubiquitin-C-Transkripten. Die weitere Detektion der PCR-Produkte erfolgte anschließend mittels der Luminex Hybridisierung. Es wurden typen-, spleiß-Lage-spezifische HPV-E6\*I und Ubiquitin- C-Sonden verwendet. Reaktionen mit einem netto MFI-Wert über fünf (Cutoff-Wert) wurden als HPV-E6\*I-mRNA positiv definiert (Schmitt et al. 2008). Es wurde DEPC-haltiges Wasser als Negativkontrolle in jedem (RT)-PCR-Durchlauf mitgeführt. Es konnten keine PCR-Kontaminationen erfasst werden.

## **3.2.4 Angewandte Färbungen**

### **3.2.4.1 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung**

Die histologischen Schnitte wurden mittels Xylol (Vogel, Giessen) 2x 10 Minuten entparaffiniert. Die HE-Färbung mit Meyers Hämalaun 1:1 (Meyers Hämalaunlösung, Merck KgaA, Darmstadt) erfolgte für vier Minuten und anschließend mit 0,5%-igem Eosin (SIGMA-Aldrich®, Chemie-GmbH, Steinheim) für eine Minute. Die Schnitte wurden wie unter Punkt 3.2.4.3 beschrieben mit Ethanol unterschiedlicher Konzentration entwässert und mit Eukitt (Fluka, Sigma Albrich Chemie GmbH, Steinheim) eingedeckt.

### 3.2.4.2 SLPI-Immunhistochemie

Die 5µm-dicken Formalin-fixierten in Paraffin eingebetteten Schnitte wurden nach dem folgendem Protokoll gefärbt:

Die Schnitte wurden entparaffiniert und rehydriert:

- 2x 10 min Xylol
- 2x 10 min 100% Ethanol (J.T. Baker, Deventer Niederlande)
- 5 min 96% Ethanol (BÜFA Chemkalien GmbH & Co, Hude)
- 5 min 80% Ethanol
- 5 min 70% Ethanol
- Spülen mit Aqua dest.
- 10 min TBS-Puffer

Die Schnitte wurden anschließend in zehn mM Citratpuffer (2,1 g Zitronensäuremonohydrat/L; pH 6,0) in der Mikrowelle (Triple Distribution System, Samsung) bei 450 W 2x 7 Minuten erhitzt und dazwischen mit 50 ml Aqua dest. (Ampuwa® Spüllösung, Fresenius Kabi Ag, Bad Homburg) aufgefüllt. Die Schnitte wurden nach einer 15 minütigen Abkühlphase bei Raumtemperatur mit Aqua dest. gespült. Die endogene Peroxidaseaktivität wurde mit 1 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol (Emsure™, Merck KgaA, Darmstadt) für zehn Minuten geblockt, die Schnitte daraufhin kurz in Aqua dest. und TBS-Puffer (26,29 g NaCl, 23,64 g Tris-HCL auf 3 L Aqua dest.; pH 7,4) gespült und für 15 Minuten mit Kaninchenserum (3 % in TBS-Puffer) (Biologo, Kronshagen) geblockt. Die Schnitte wurden anschließend für 60 Minuten mit dem primären monoklonalen Antikörper (LifeSpan BioSciences, Seattle, WA) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 3x 5 Minuten Spülen in TBS, folgte eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit dem biotinyliertem Sekundäantikörper (Dako, Hamburg). Nach Waschen mit TBS für 3x 10 Minuten wurde zur Visualisierung ein Peroxidase-Komplex-System (ABC-Vectastain, Dako, Hamburg) für 30 Minuten aufgetragen, die Schnitte darauf folgend mit TBS gespült. Die Gegenfärbung erfolgte nach Waschen mit TBS und Aqua dest. mit frisch gefilterter Hämalaun-Lösung (1:2) (Meyers Hämalaunlösung, Merck KgaA, Darmstadt). Die Schnitte wurden entwässert und mit Eukitt (Fluka) eingebettet.

## Auswertung der Färbung

Kleine Speicheldrüsen dienten als interne Positivkontrolle; Negativkontrollen wurden durch das Ersetzen des Primär-Antikörper durch Aqua dest. erstellt. Die Schnitte wurden von zwei unabhängigen Experten ausgewertet und zusätzlich von einem erfahrenen Pathologen (C. Röcken) überprüft. 300 Zellen in mindestens fünf Arealen wurden bei 400facher Vergrößerung analysiert, um die SLPI-Protein-Expression zu beurteilen. Die Schnitte wurden in die folgenden Kategorien eingeteilt: (-) <5 %, (I) 5-30 %, (II) 31-75 %, (III) >75 % der Zellen gefärbt. Die Schnitte der Kategorie (-) wurden hierbei als negativ und die der Kategorien (I)-(III) als positiv betrachtet.

### 3.2.4.3 p16<sup>INK4a</sup>-Immunhistochemie

Die Färbung der Formalin-fixierten in Paraffin eingebetteten 5 µm-dicken Schnitte erfolgte mittels des CINtec® Histology-Set (mtm laboratories AG) nach folgendem Färbeprotokoll:

Die Schnitte wurden zunächst entparaffiniert und in Alkohol unterschiedlicher Konzentration rehydriert.

2x 10 min Xylol

2x 10 min 100% Ethanol (J.T. Baker, Deventer Niederlande)

5 min 96% Ethanol (BÜFA Chemikalien GmbH & Co, Hude)

5 min 80% Ethanol

5 min 70% Ethanol

Spülen mit Aqua dest.

Die Schnitte wurden zur Epitopdemaskierung in Citronensäure-Monohydrat (Roth Chemie GmbH, Karlsruhe) (1:10 in Aqua dest.) für 2x 7 Minuten in der Mikrowelle bei 450 W erhitzt und dabei mit 50 ml Aqua dest. aufgefüllt. Nach 15-minütiger Abkühlung bei Raumtemperatur wurden sie für fünf Minuten mit Waschpuffer (1:10 in Aqua dest.) gewaschen. Das Blocken der endogenen Peroxidaseaktivität erfolgte anschließend durch eine fünfminütige Inkubation mit Peroxidase-Blockierungsreagenz (Methanol mit 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Nach weiterem Waschen für fünf Minuten mit 100 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,9% NaCl (TBS) wurden die Schnitte für 30 Minuten mit dem monoklonalen Mausantikörper (Klon E6H4®) bei Raumtemperatur inkubiert und daraufhin erneut für fünf Minuten in TBS gespült. Die Inkubation mit Visualisierungsreagenz erfolgte für 30 Minuten. Anschließend fand die Inkubation mit der Substrat-Chromogenlösung (DAB - (3,3'-Diaminobenzidin) Chromogen-

lösung) für zehn Minuten statt. Die Gegenfärbung folgte nach Spülen mit Aqua dest. mit frisch gefilterter Hämalaun-Lösung (1:2) für fünf Sekunden. Die Entwässerung und die Einbettung mit Eukitt (Fluka) schlossen sich zuletzt an.

#### Auswertung der Färbung

Positivkontrollen von Zervixkarzinomen wurden zur Auswertung der p16<sup>INK4a</sup>-Immunhistologie der Formalin-fixierten in Paraffin eingebetteten Schnitte verwendet. Die Schnitte wurden von zwei unabhängigen Experten ausgewertet. Eine zusätzliche Überprüfung erfolgte durch einen erfahrenen Pathologen (C. Röcken). Es wurden sowohl nukleäre als auch zytoplasmatische Färbungen als positiv gewertet. Alle Schnitte wurden unter dem Lichtmikroskop (bei 400facher Vergrößerung) semiquantitativ nach der Einteilung von Klaes und Mitarbeitern (Klaes et al. 2001) ausgewertet: (negativ) <1 %, (sporadisch positiv) 1-5 %, (fokal positiv) 5-25 %, (diffus positiv) >25 % der Zellen gefärbt. Die Einstufung der Ergebnisse erfolgte abhängig von dieser Einteilung in negativ, schwach (+), mäßig (++) und stark (+++). Moderate p16<sup>INK4a</sup>-Färbungen wurden zur Minimierung falsch-negativer Ergebnisse positiv gewertet (Smeets et al. 2007).

#### **3.2.5 Statistische Analyse**

Der Exakte Fisher-Test wurde durchgeführt, um die Unterschiede zwischen den Gruppen zu testen. Alle statistischen Analysen wurden mit der SAS 9.2 – Software durchgeführt. Alle Tests wurden zweiseitig durchgeführt und p-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant erachtet.

## **4. ERGEBNISSE**

### **4.1 $\beta$ -Globin Nachweis**

Die Amplifizierbarkeit der extrahierten DNA aller 78 Gewebeproben wird mittels Nachweis einer Gensequenz des humanen  $\beta$ -Globins untersucht. Das DNA-Segment des humanen  $\beta$ -Globins lässt sich mittels der Multiplex-HPV-Genotypisierung/Luminex in allen 78 Proben nachweisen. Die Amplifizierbarkeit der DNA ist damit belegt.

### **4.2 HPV-DNA-Nachweis**

Die DNA der 78 Tumorproben wird nach der Extraktion mit dem BSGP5+/6+-PCR-Multiplex HPV-Genotypisierungs-Verfahren (MPG) auf 27 unterschiedliche HPV-Typen untersucht. 70 Fälle zeigen Signale für HPV-DNA, von denen 21 nach den angewandten Grenzwerten eine hohe Viruslast aufweisen. Nur diese 21 (30 %) der 70 Proben werden definitionsgemäß als HPV-DNA-positiv klassifiziert. 20 der 21 Fälle werden durch die LCD Chip-HPV-DNA-Bestimmung bestätigt. In einem Fall (Tabelle 4, Fall 25, Anhang) wird von der MPG eine hohe Viruslast detektiert, wohingegen das LCD-Chip-Array keine HPV-DNA nachweisen kann. Dieser Fall wird als HPV-negativ klassifiziert, da in der E6\*I-mRNA-Analyse (s. u.) ebenfalls ein negatives Ergebnis vorliegt. HPV-DNA wird in drei weiteren Fällen mittels des LCD-Chip-Arrays detektiert, während eine niedrige Viruslast in der MPG nachgewiesen wird (Tabelle 4, Fall 20, 23 und 54). Zwei der Fälle werden als HPV-DNA-positiv klassifiziert, da in diesen Fällen auch E6\*I-mRNA nachweisbar vorliegt (Fall 20 und 23). Der dritte Fall wird als HPV-DNA-negativ klassifiziert, da hier keine virale mRNA nachgewiesen werden kann. 22 der 78 Proben (28,2 %) sind entsprechend dem angewandten Algorithmus (s.u.) in dieser Untersuchung als HPV-DNA-positiv klassifiziert worden. 20 der HPV-positiven Fälle (90,9 %) weisen den HPV-Genotyp 16 auf, ein Fall den HPV-Genotyp 18. Andere HPV-Typen können nicht identifiziert werden. Ein Fall zeigt eine Infektion mit beiden Typen. Es lassen sich für beide Typen zwar nur schwache Signale nachweisen, aber da ebenfalls schwache Signale für HPV16- E6\*I-mRNA vorliegen, wird dieser Fall insgesamt als HPV-DNA-positiv gewertet.

HPV-DNA kann auch mittels PCR unter Verwendung von Consensus-Primern in den restlichen 56 Tumorproben nicht nachgewiesen werden.



Die Verteilung der so ermittelten HPV-positiven Fälle auf die anatomischen Lokalisationen der Kopf- und Halskarzinome sieht wie folgt aus: Zwölf (60 %) der 20 untersuchten Tonsillenkarzinome sind HPV-DNA-positiv. Der Fall mit der HPV18-Infektion und auch der Fall mit der Mischinfektion fallen darunter. Vier (18,2 %) von 22 untersuchten Larynxkarzinomen werden als HPV-DNA-positiv getestet, sowie zwei (16,7 %) von zwölf Karzinomen des Zungenrandes und weichen Gaumens (Palatum molle). Vier (16,6 %) der 24 Hypopharynxproben weisen HPV-DNA auf. Die HPV-Prävalenz zeigt sich in den Tonsillenkarzinomen statistisch signifikant erhöht ( $p < 0.05$ ).

HPV-Status	Lokalisation			
	Tonsille	Larynx	Zungenrand/weicher Gaumen	Hypopharynx
HPV-DNA+	12	4	2	4
HPV-DNA-	8	18	10	20
Total	20	22	12	24

**Tabelle 5:** Verteilung des HPV-Status auf die anatomischen Lokalisationen

Tabelle 4 (Anhang) zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse mit den Resultaten der mRNA-Analyse der E6/E7-mRNA Expression und der SLPI-Immunhistochemie; in der Legende wird der angewandte Algorithmus zur Bestimmung der biologischen Aktivität einer HPV-Infektion im Detail beschrieben.

### 4.3 Expression der E6/E7-mRNA

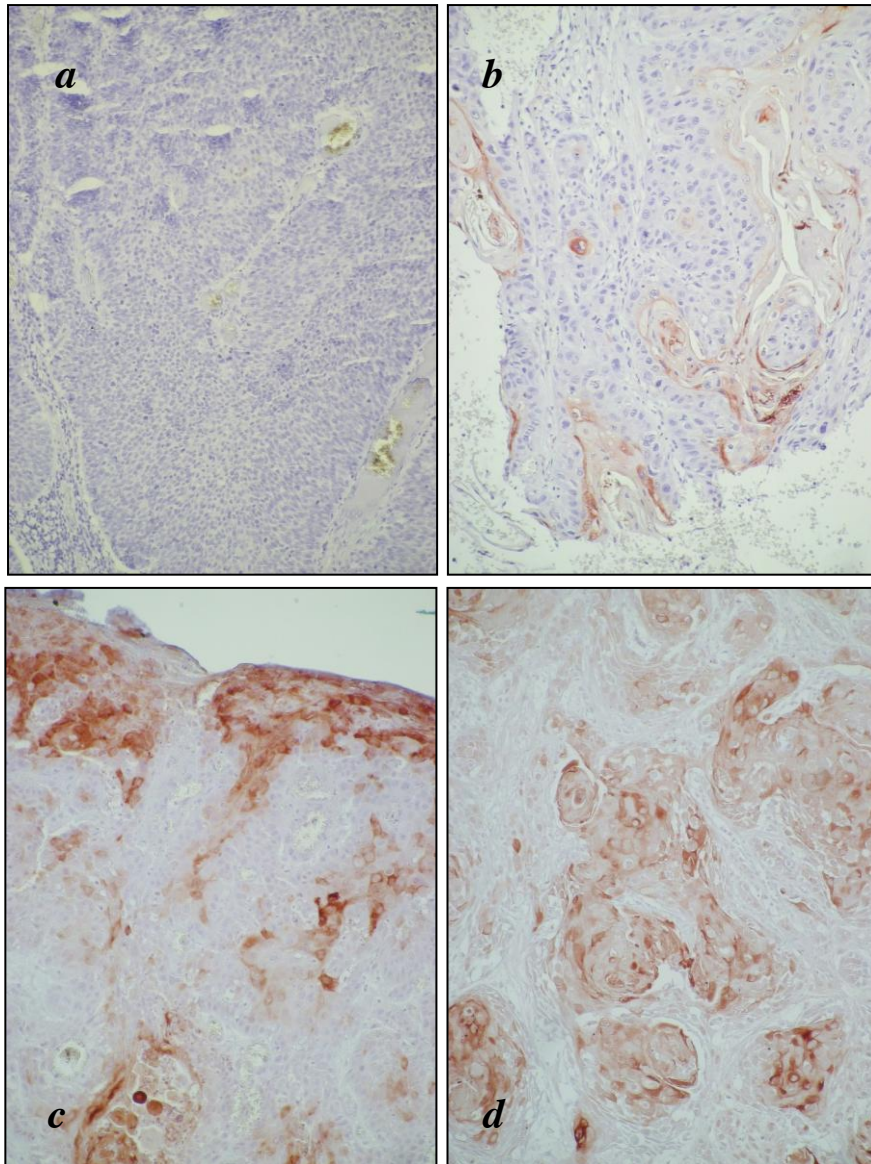
Alle Fälle mit verfügbarer RNA (n= 54) werden einer typenspezifischer E6\*I-mRNA-Analyse unterzogen. 17 Proben zeigen sich nach der Hybridisierung als positiv für exprimierte mRNA des Onkogens E6/E7. 14 der 17 Fälle können den HPV16-positiven Proben zugeordnet werden und ein weiterer der 17 Fälle der Probe mit der Mischinfektion. E6\*I-mRNA kann zwar in den drei weiteren Fällen nachgewiesen werden, die DNA-Nachweis-Verfahren können in diesen Fällen jedoch keine HPV-DNA detektieren. E6\*I-mRNA kann darüber hinaus in vier der HPV-DNA positiven Proben, von denen mRNA zur Analyse zur Verfügung steht (n= 18), nicht nachgewiesen werden. Diese Proben entstammen den Larynx- (n= 1) und Hypopharynxkarzinomen (n= 3) und werden folglich als Beispiel einer inaktiven HPV-

Infektion (iaHPV) klassifiziert. Die 17 HPV-DNA-positiven Fälle mit nachweisbarer viraler mRNA werden dagegen als aktive HPV-Infektionen (aHPV) bewertet. In vier Fällen mit nachgewiesener HPV-DNA, aber ohne zur für Analysen vorhandener RNA, werden die Ergebnisse der p16<sup>INK4a</sup>-Immunhistochemie berücksichtigt, um zu entscheiden, ob die Infektion als aktiv oder inaktiv gewertet werden kann. Drei der Fälle werden als aktive HPV-Infektionen klassifiziert, da sie eine starke immunhistochemische Färbung aufweisen. 17 aktive HPV-Infektionen stehen somit insgesamt fünf als inaktiv zu bewertenden HPV-Infektionen gegenüber. Die Verteilung auf die anatomischen Lokalisationen des Kopf- und Halsbereiches stellt sich wie folgt dar: Aktive HPV-Infektionen werden in allen zwölf HPV-DNA-positiven Tonsillenkarzinomen detektiert, in zwei der vier DNA-positiven Larynxkarzinomen, in zwei von zwei DNA-positiven Zungenrand- und Weichgaumenkarzinomen sowie in einem der fünf DNA-positiven Hypopharynxkarzinomen.

#### **4.4 Immunhistochemischer Nachweis der SLPI-Expression**

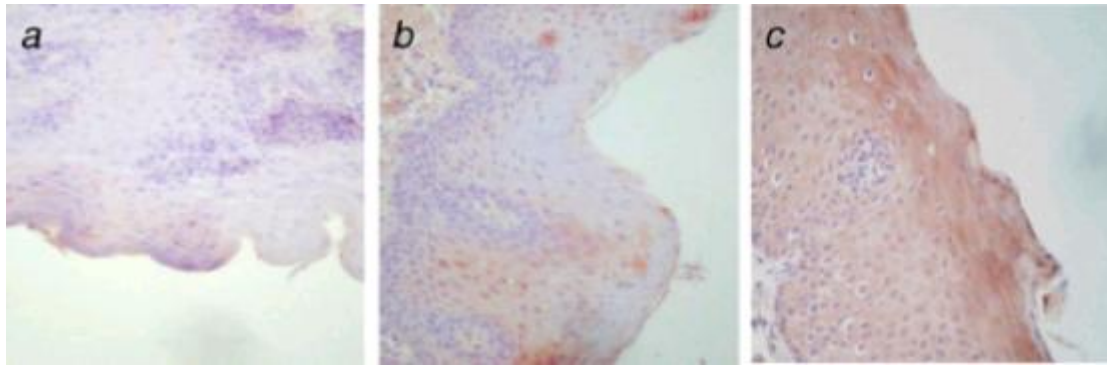
Die Immunhistochemie wird mittels eines SLPI-Antikörpers bei 78 Karzinomen durchgeführt. Das SLPI-Protein ist in den Tumorproben sowohl in den serösen Teilen der submukösen Drüsen, als auch im Zytoplasma der Zellen des oberen Aerodigestivtraktes und in Teilen des Zytoplasmas der Karzinomzellen lokalisiert. Eine starke SLPI-Expression zeigt sich vor allem in den Keratinozyten und in den Karzinomzellen. 28 (35,9 %) der untersuchten Fälle zeigen keine erhöhte Expression des SLPI-Proteins. 25 (32,1 %) weisen dagegen eine schwache Expression auf, 18 (23,1 %) eine mäßige und sieben (9,0 %) eine starke Expression (Abb. 1). Die primär nicht metastasierten (N0) Tumore weisen dabei eine starke SLPI-Expression auf, wohingegen die metastasierten Tumore (N1-3) eine schwächere Antigen-Antikörperreaktivität zeigen. Dieser Unterschied zeigt sich in der statistischen Analyse als hochsignifikant.

Die Fälle mit mäßiger bis starker SLPI-Expression werden im weiteren Text und in Bezug auf die Korrelation mit dem HPV-DNA-Status als Einheit (n= 25) betrachtet.



**Abb. 1:** Immunhistochemischer SLPI Nachweis in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches: *a*: keine SLPI-Expression, *b*: schwache SLPI-Expression, *c*: mäßige und *d*: starke SLPI-Expression

Die SLPI-Immunhistochemie wird zusätzlich an 19 Proben klinisch unauffälliger Mukosa durchgeführt. Keine SLPI-Expression zeigt sich dabei in einem der untersuchten Fälle und sehr schwache (bis keine) Signale in zwei weiteren Fällen. Schwache, aber deutliche SLPI-Expressionen zeigen sich des Weiteren in zehn und sogar mäßige bis starke Expression in sechs der untersuchten Fälle.



**Abb. 2:** Immunhistochemischer SLPI Nachweis in klinisch unauffälligen Mukosabiopsaten. **a:** keine Reaktivität mit dem Antikörper (Fall 17, Tabelle 2), **b:** schwache Reaktivität (Fall 6, Tabelle 2), **c:** mäßige Reaktivität (Fall 3, Tabelle 2) (x200)

In Korrelation zu den Rauchgewohnheiten der Patienten ergibt sich bei den Patienten, die regelmäßigen Tabakkonsum in der Anamnese angegeben haben (n= 7) folgendes Bild: Drei (42,9 %) der Patienten zeigen keine bis schwache SLPI-Expression, während vier Patienten (57,1 %) eine mäßige bis starke Expression zeigen. Patienten ohne Tabakkonsum in der Anamnese (n= 12) zeigen dagegen in zehn (83,3 %) Fällen keine bis schwache SLPI-Expression und in zwei (16,7 %) Fällen eine mäßig bis starke Expression für SLPI (Tabelle 6). 67 % der Raucher zeigen somit eine mäßige bis starke SLPI-Expression während dieses nur 16 % der Nichtraucher zeigen. Andererseits exprimieren 83 % der Nichtraucher SLPI allenfalls schwach, wohingegen nur 42 % der Raucher dieser Gruppe zugeordnet werden.

	SLPI		Total
	-/+	++/+++	
Raucher bzw. Ex-Raucher	3	4	7
Nichtraucher	10	2	12
Total	13	6	19

**Tabelle 6:** Verteilung der SLPI-Expression (keine-schwache: -/+, mäßig-stark positiv: ++/+++) auf die Rauchgewohnheiten der Patienten mit klinisch unauffälliger Mukosa

Die absoluten Zahlen liegen damit am Rande der statistischen Signifikanz (p= 0,085), wahrscheinlich bedingt durch die kleine Stichprobengröße und die ungleiche Verteilung an

Patienten mit und ohne Tabakkonsum in der Anamnese. Die berechneten Prozentwerte zeigen dagegen eine sehr enge Korrelation zwischen den Rauchgewohnheiten und der SLPI-Expression ( $p < 0,0001$ ).

#### 4.5 SLPI-Expression in Korrelation zum HPV-Status

Es wird in dieser Arbeit von der Hypothese ausgegangen, dass die SLPI-Expression Einfluss auf die initiale Infektion der Epithelzellen mit Virus-DNA hat, nicht aber auf die weitere Aktivität des Virus. Der Aktivitätsstatus der HPV-Infektion kann demzufolge zur Beurteilung des Einflusses der SLPI-Expression auf die HPV-Infektionsrate vernachlässigt werden. Alle HPV-DNA-positiven Tumorproben werden demnach unabhängig vom Vorhandensein viraler mRNA ( $n = 22$ ) in Bezug zur SLPI-Expression gesetzt. Nur zwei Tumorproben zeigen im Fall von einer mäßigen bis starken SLPI-Expression ( $n = 25$ ) eine Infektion mit HPV-DNA, neun Tumorproben in der Gruppe mit schwacher Expression und elf in der Gruppe ohne SLPI-Expression. Die Korrelation der mäßigen bis starken SLPI-Expression mit der detektierten HPV-DNA ist gegenüber der Korrelation mit schwacher oder keiner SLPI-Expression statistisch signifikant ( $p = 0,01$ ).

Die Verteilung der SLPI-Expression auf die HPV-DNA-negativen Proben ( $n = 56$ ) fällt dagegen folgendermaßen aus: 23 (41,1 %) Tumoren zeigen eine mäßige bis starke Expression, 16 (28,6 %) eine schwache und 17 (30,4 %) Proben zeigen keine SLPI-Expression.

Die Ergebnisse der Verteilung der SLPI-Expression auf die Gruppe der HPV-negativen und HPV-positiven Patienten sind in der Tabelle 7 zusammengefasst.

HPV-Status	SLPI			Total
	-	+	++/+++	
HPV-DNA+	11	9	2	22
HPV-DNA-	17	16	23	56
Total	28	25	25	78

**Tabelle 7:** Verteilung der SLPI-Expression (negativ:-, schwach positiv: +, mäßig-stark positiv: ++/+++) auf die HPV-DNA-positiven (+) und negativen (-) Fälle

#### 4.6 Betrachtung des Lymphknoten-Status in Abhängigkeit vom HPV-Infektionsstatus und in Korrelation zur SLPI-Expression

Ausgehend von der Annahme, dass erst eine aktive HPV-Infektion eine progressions- und proliferations-stimulierende Wirkung in der infizierten Zelle ausübt mit konsekutiv entsprechendem biologischen Verhalten des Tumors mit unter anderem frühzeitiger Halslymphknotenmetastasierung, wird diese biologische Aktivität der Infektion (aHPV und iaHPV) und nicht der alleinige HPV-DNA-Nachweis in Korrelation zum Halslymphknoten-Status (N-Status) der Patienten gesetzt. Metastasen (N1-3) werden bei 13 (76,5 %) der Patienten mit einer aktiven HPV-Infektion (n= 17) nachgewiesen, keine Metastasen (N0) bei vier (23,5 %) Patienten dieser Gruppe.

25 Patienten aus der Gruppe mit fehlender beziehungsweise mit einer inaktiven HPV-Infektion (n= 61) haben keine Halslymphknotenmetastasen (N0), während 36 Patienten solche Metastasen zeigen (N1-3). Dieser Zusammenhang zeigt allerdings keine Signifikanz ( $p>0,05$ ).

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 8 zusammengefasst.

HPV-Infektionsstatus	N-Status		Total
	0	1-3	
aHPV	4	13	17
iaHPV und HPV-	25	36	61
Total	29	49	78

**Tabelle 8:** Lymphknoten-Status (N-Status) in Bezug zum HPV-Infektionsstatus

Die Verteilung der Halslymphknoten-kategorien bei aktiver HPV-Infektion und in Korrelation zur SLPI-Expression stellt sich wie folgt dar: Vier der Patienten weisen bei fehlender bis schwacher SLPI-Expression und aktiver HPV-Infektion (n= 15) keine Lymphknoten-Metastasen (N0) auf, wohingegen elf dieser Patienten Metastasen (N1-3) zeigen.

16 Fälle aus der Gruppe der Patienten mit mäßiger bis starker SLPI-Expression und einer inaktiven oder fehlenden HPV-Infektion (n= 23) haben keine nachweisbaren Metastasen in

den ableitenden Lymphabflusswegen (N0), während sieben solche Metastasen aufweisen. Diese Korrelation ist statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ).

Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

HPV/SLPI-Status	N-Status		Total
	0	1-3	
aHPV/SLPI -/+	4	11	15
iaHPV und HPV-/SLPI ++/+++	16	7	23
Total	20	18	38

**Tabelle 9:** Lymphknoten-Status in Bezug zum HPV-Infektions-Status und zur SLPI-Expression

#### 4.7 Immunhistochemischer Nachweis der p16<sup>INK4a</sup>-Expression

Die p16<sup>INK4a</sup>-Immunhistochemie wird bei allen 78 Tumorproben durchgeführt. Das Protein ist sowohl im Zytoplasma, als auch nukleär lokalisierbar. Eine p16<sup>INK4a</sup>-Überexpression kann in insgesamt 45 Fällen gezeigt werden. 16 Fälle weisen nach den Kriterien von Kleas et al. eine schwache (+), zwölf eine mäßige (++) und 17 Fälle eine starke (+++) Expression auf.

HPV-Status	p16 <sup>INK4a</sup>				Total
	-	+	++	+++	
HPV +	4	2	2	14	22
HPV-	29	14	10	3	56
Total	33	16	12	17	78

**Tabelle 10:** Verteilung der p16<sup>INK4a</sup>-Expression auf HPV-DNA-positive (+) und negative (-) Fälle

Die p16<sup>INK4a</sup>-Expression ergibt in Korrelation zum HPV- und mRNA-Status folgende Verteilung: Ein Fall der Patientengruppe mit nachweisbarer HPV-DNA und mRNA der Onkogene E6 und E7 (n= 14) zeigt eine mäßige p16<sup>INK4a</sup>-Expression, während zehn eine starke Expression zeigen. Drei Fälle sind des Weiteren negativ für eine p16<sup>INK4a</sup>-Expression.

Ein Fall der Gruppe mit nachgewiesener HPV-DNA, aber fehlendem Nachweis viraler mRNA (n= 4) weist eine schwache, ein Fall eine mäßige und ein weiterer Fall eine starke Färbung in der p16<sup>INK4a</sup>-Immunhistochemie auf. Überhaupt keine positiven Signale für p16<sup>INK4a</sup> in der Immunhistochemie können in einem weiteren Fall gefunden werden. Zehn Fälle der HPV-DNA-negativen Tumorproben und fehlendem Nachweis viraler mRNA (n= 33) zeigen eine schwache, vier eine mäßige und ein einzelner Fall eine starke Expression des p16<sup>INK4a</sup> während p16<sup>INK4a</sup> in dieser Gruppe bei 18 nicht nachgewiesen werden kann. Der Zusammenhang zwischen der p16<sup>INK4a</sup>-Expression und dem HPV-DNA-Status, sowie die Korrelation der beiden Faktoren mit der mRNA-Expression des Onkogens E6/E7 hat sich als statistisch hoch signifikant (p<0,0001) erwiesen.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

HPV-/mRNA-Status	p16 <sup>INK4a</sup>				Total
	-	+	++	+++	
HPV-DNA+/mRNA+	3	0	1	10	14
HPV-DNA+/mRNA-	1	1	1	1	4
HPV-DNA-/mRNA-	18	10	4	1	33
HPV-DNA-/mRNA+	1	0	2	0	3
Total	23	11	8	12	54

**Tabelle 11:** p16<sup>INK4a</sup>-Expression in Bezug zum HPV-DNA-Status und mRNA-Status des Onkogens E6/E7. Nur die Fälle, die eine verfügbare mRNA aufweisen (n= 54) werden mit einbezogen.



Tabelle 12 zeigt die Verteilung der p16<sup>INK4a</sup>-Expression auf Fälle mit aktiven HPV-Infektionen und auf Fälle mit inaktiven HPV-Infektionen beziehungsweise negativem HPV-DNA-Status.

HPV-Status	p16 <sup>INK4a</sup>				Total
	-	+	++	+++	
aHPV	3	-	1	13	17
iaHPV und HPV-	30	16	11	4	61
Total	33	16	12	17	78

**Tabelle 12:** Verteilung der p16<sup>INK4a</sup>-Expression auf aktive (aHPV), inaktive (iaHPV) HPV-Infektionen und auf die HPV-negativen (HPV-) Fälle

## 5. DISKUSSION

Es wird in dieser Promotionsarbeit erstmalig ein statistisch signifikanter inverser Zusammenhang zwischen der Infektion mit humanen Papillomviren in Kopf-Hals-Karzinomen und der Expression des secretory leukocyte protease inhibitors (SLPI), einer Antileukoproteinase, gezeigt. Ebenfalls zum ersten Mal wird eine inverse Korrelation zwischen dieser SLPI-Expression und dem Tabak-Konsumverhalten bei Patienten ohne Tumorerkrankung in klinisch gesunder Mukosa des oberen Aerodigestivtraktes nachgewiesen. Beide Erkenntnisse sind von weitreichender Bedeutung für die HPV-assoziierte Karzinogenese im Kopf-Hals-Bereich.

Es folgt im Weiteren zunächst ein Überblick zu a) humanen Papillomviren und deren assoziierten Läsionen und b) dem Protein SLPI, dessen biologisches Vorkommen und Funktion beschrieben werden, bevor die Ergebnisse dieser Promotionsarbeit detailliert diskutiert werden.

### 5.1. Humane Papillomviren (HPV)

Die Geschichte der Erforschung von Papillomviren reicht bis zum Anfang des letzten Jahrhunderts zurück. Infektionsversuche mit Warzen lieferten die ersten Grundlagen. Das kanzerogene Potenzial der Papillomviren wurde erstmalig in den 30er Jahren bei Versuchen mit Kaninchen nachgewiesen (Rous und Beard 1934; Rous und Kidd 1938). Shope und Hurst (1933) publizierten kurz zuvor über die Möglichkeit einer Übertragung von Papillomen bei Kaninchen. Es gelang ihnen der Nachweis von Viren (Cottontail Rabbit Virus) in den entsprechenden Läsionen. Die elektronenmikroskopische Darstellung viraler Partikel erfolgte erstmalig 1949 (Strauss et al. 1949). Eine Karzinomentwicklung im Bereich der Schleimhäute von Kaninchen nach Transfer von gereinigter Virus-DNA wurde 1961 von Ito und Evans beschrieben. Dies trug wesentlich zur Kenntnis über die kanzerogene Wirkung der Papillomviren bei (zur Hausen und de Villiers, 1994).

Papillomviren wurden zunächst der Gruppe der Papovaviridae zugeordnet (Melnick 1962, Melnick et al. 1974, Pfister 1984). Sie stellen heute aufgrund von signifikanter Unterscheidbarkeit in der DNA-Sequenz, in der RNA-Synthese und der Verarbeitung (processing) eine eigene Familie dar (Broker und Botchan 1986, Broker 1987, Bernard et al. 1994). Die Doppelsträngigkeit der DNA der Papillomviren ist seit 1965 bekannt (Übersicht bei zur Hausen 2009). Verschiedene HPV-Typen konnten in den 80er Jahren in Genital-

warzen isoliert werden; es erfolgte die Isolation verschiedener Typen in Zervixkarzinomen (zur Hausen 1998). Papillomviren vermehren sich beim Menschen nur in Keratinozyten und gelten bislang als streng wirts- und gewebsspezifisch. Die Viren sind resistent gegenüber Austrocknung und Frost (Chang et al. 1991).

HPV bestehen aus einem zentralem DNA-Innenkörper (core) und aus einer Proteinkapsidhülle. Die Viren haben die Form eines Ikosaeders, der Durchmesser beträgt 55-60 nm. Das hüllenlose Kapsid der Papillomviren besteht aus 72 pentameren Kapsoiden. Diese werden aus den viralen Proteinen L1 und L2 gebildet (Pfister 1984, Pfister und Fuchs 1987, 1994, Jo und Kim 2005). Die doppelsträngige, zirkuläre DNA besteht aus 8000 Basenpaaren und wird durch das Kapsid umschlossen. Die DNA-Sequenz beinhaltet nur auf einem der Stränge hoch konservierte offene Leserahmen („open reading frames“, ORF). Diese werden in drei Gruppen eingeteilt (Chen et al.1982): Frühe E-Region („early region“), späte L-Region („late region“) und eine nicht kodierende Region („non coding region“, NCR). Die NCR enthält regulierende Elemente, die für die Replikation der DNA unabdingbar sind (Galloway et al. 1989). Die frühe E-Region besteht aus 6-8 offenen Leserahmen (E1-E8), diese E-Gene kodieren vorwiegend für Regulatorproteine und sind für die Regulation der viralen Replikation, der Persistenz in der Zelle und der Zelltransformation verantwortlich. Die L-Region beinhaltet die Leserahmen 1 und 2, die für Strukturproteine des viralen Kapsids kodieren (Jo und Kim 2005).

E1 und E2 kodieren für Proteine die mit der DNA der Wirtszelle interagieren. Diese beiden Proteine bilden einen Komplex, der an den viralen Startpunkt der Replikation bindet (origin of replication). Polymerasen der Wirtszelle werden anschließend für die Replikation rekrutiert (Ganguly und Parihar 2009). E1 kodiert zudem für eine ATP-abhängige Helikase, welche die Replikation ermöglicht. Es ist das einzige HPV-Protein mit einer enzymatischen Aktivität (Clertant und Seif 1984). E2 hat eine Regulatorfunktion bei Transkription und Replikation. Es bindet an den eigenen Promotor und induziert die Transkription, sofern die zelluläre Konzentration des Proteins niedrig ist. E2 unterdrückt jedoch die Transkription der Gene aus der frühen E-Region, inklusive der Transkription der Gene E6 und E7 (Longworth und Laimins 2004), wenn die Konzentration in der Zelle hoch ist; das Protein führt dann eine Silencerfunktion aus. E4 kodiert für ein Zinkfinger-Protein und wird erst in der späten Phase des viralen Lebenszyklus exprimiert (Ganguly und Parihar 2009). E5 kodiert für ein Protein, das durch Bindung an zelluläre Transmembranproteine wachstumsstimulierende Signalkaskaden aktiviert. Die E6- und E7-Proteine sind dazu fähig, Zellen zu immortalisieren und

zu transformieren (zur Hausen 2000, Longworth und Laimins 2004, Bartmann et al. 2007); somit sind sie für die kanzerogene Wirkung der Papillomviren verantwortlich. Das karzinogene Potenzial resultiert aus Wechselwirkungen dieser viralen Proteine mit verschiedenen zellulären Proteinen, die in der Zellwachstumskontrolle eine Rolle spielen (s.u.). Die Integration des viralen Genoms in die Wirtszelle führt regelmäßig zu einem Bruch in der E1/E2-Region; dieses Ereignis führt somit zu einem Verlust der Repression der Transkription von E6 und E7 (Finzer et al. 2002).

Integrierte, transkriptionell aktive HPV-DNA ist häufig in der Gruppe der durch HPV verursachten Tumoren nachweisbar. Die viralen Proteine E6 und E7 interagieren mit den zellulären Tumorsuppressorproteinen p53 und pRb (Retinoblastomprotein). Diese Proteine fungieren als zwei der Hauptregulatoren des menschlichen Zellzyklus. P53 ist in der Lage die Apoptose bei DNA-Schäden einzuleiten, die nicht eigens von der Zelle repariert werden können. E6 ist in der Lage p53 zu degradieren, wodurch es zu einem intrazellulären Mangel an letzterem kommt. Dies spielt eine wichtige Rolle für die Karzinomentwicklung und -progression (Smith et al. 2008). Die zelluläre Telomerase wird zusätzlich durch E6 aktiviert; hierdurch kann die Lebensdauer der infizierten Zelle verlängert werden. E7 ist in der Lage pRb zu degradieren, wodurch es zu einer gesteigerten Freisetzung der Transkriptionsfaktoren E2F kommt. Dies führt zu einem Anstieg des Transkriptionsfaktors, der Einfluss auf die Zellproliferation nimmt (Dell und Gaston 2001). Die Zelle kann hierdurch in den Zellzyklus eintreten und virale DNA synthetisieren. Das Protein pRb ist in HPV16-positiven Tumoren als Folge der E7-Aktivität herunter reguliert (Hoffmann et al. 2004). pRb übt eine negative Rückkopplung auf p16<sup>INK4a</sup> aus: Durch die Herabregulierung von pRb wird p16<sup>INK4a</sup> in den betroffenen Zellen überexprimiert (Smith et al. 2008, Klussmann et al. 2009). Das Protein p16<sup>INK4a</sup> kann den Eintritt einer Zelle in den Zellzyklus verhindern, indem es die cyclin-abhängigen Kinasen 4 und 6 (CDK 4/6) inhibiert. Es wirkt im geregelten Ablauf des Zellzyklus antiproliferativ. Durch die Inhibierung wird die Phosphorylierung des pRb vermindert, welches in hypophosphorylierter Form den Transkriptionsfaktor E2F bindet.

Humane Papillomviren sind demnach in der Lage, Onkoproteine zu synthetisieren, die Tumorsuppressorproteine inaktivieren oder zur Degradierung markieren können. Es kommt in der Folge zu einer Akkumulation von DNA-Schäden, welche die Transformation der Wirtszelle bedingen (Zerfass et al. 1995, Havre et al. 1995).

HPV infizieren ausschließlich Epithelien der Haut oder Schleimhaut, sie sind somit streng epitheliotrop. Eine Infektion entsteht durch das Eindringen der Viren in die äußeren Hautschichten, wozu kleinste Verletzungen, sog. Mikroläsionen der Mukosa, genügen. Die basale Zellschicht wird infiziert. Die Infektiosität kann dabei sehr variieren; sie ist sowohl von der Menge der vorhandenen Viruspartikel, der Art und Intensität des Kontaktes und auch vom Immunstatus des betroffenen Individuums abhängig (Stockfleth 2005). Der genaue Mechanismus der HPV-Infektion ist bis zum heutigen Zeitpunkt unbekannt. Allgemein verlaufen virale Infektionen jedoch wie folgt: Das Eindringen der Viren in den Makroorganismus geschieht durch Adaptation an die Zelle; es kommt zur Penetration der Zellmembran. Die viralen Nukleinsäuren werden aus dem Kapsid freigesetzt und mit zunehmender Differenzierung der Epidermiszellen erfolgt die Replikation der Viren. Diese werden dann aus der Hornschicht abgesondert (Doerr und Gerrlich 2002).

Über 200 verschiedene Papillomvirus-Typen sind mittlerweile bekannt. Etwa 150 von ihnen wurden beim Menschen nachgewiesen, wobei das Genom aller HPV-Typen viele Gemeinsamkeiten aufweist (Bernard et al. 2010, Kovanda et al. 2011). Die Genomsequenz variiert bei den verschiedenen Typen; Typen und Subtypen werden nach Homologien der Nukleotidsequenz im L1-Open reading frame (ORF) eingeteilt. Ein HPV-Isolat liegt dann vor, wenn sich die L1 Gensequenz mindestens um 10 % von einem anderen Typ unterscheidet. Ein Subtyp zum nächstverwandten HPV-Typ liegt vor, wenn sich die Gensequenz zwischen 2-10 % unterscheidet. Liegt eine nahezu 100 %-ige Sequenzhomologie vor, spricht man von einem varianten Typ (Calleja-Macias et al. 2005, Pfister und Fuchs 1987, de Villiers 1994, Chan et al. 1995, Myers et al. 1996). Die Papillomviren werden anhand der Sequenzhomologien taxonomisch in drei Gruppen eingeteilt (A-, B- und E-Gruppe) (Pfister und Fuchs 1994, de Villiers 1994). In der A-Gruppe befindet sich die Mehrzahl der humanpathogenen HPV-Typen (van Ranst et al. 1992, Bernard et al. 1994). Ein Stammbaum mit den drei Hauptästen – 1) Kutane Humane Papillomviren, 2) Typen der Epidermodysplasia verruciformis (EV) und 3) Mukosotrope HPV-Typen - wurde durch Genomvergleich erstellt (Wieland und Pfister 1997).

### **5.1.1 HPV-assoziierte Läsionen**

Die mukosalen HPV werden in zwei Klassen unterteilt. Man unterscheidet anhand des onkogenen Transformationsrisikos die „low-risk“ (LR) Typen und die „high-risk“ (HR) Typen (zur Hausen und de Villiers 1994, Gissmann 1992). Diese Einteilung erfolgte, weil in

Karzinombiopsaten vorherrschend die „high-risk“-Typen gefunden wurden. Die „low-risk“-Typen rufen vornehmlich benigne Läsionen hervor (zur Hausen und de Villiers 1994, Kumaraswamy und Vidhya 2011). Hyperplastische, papillomatöse und verruköse Läsionen an kutanen, mukokutanen und mukösen Epithelien können von HPV verursacht werden. Bestimmte HPV-Genotypen lassen sich mit spezifischen klinischen Entitäten assoziieren.

Gutartige Tumoren wie Condylomata acuminata im Genitalbereich, meist verursacht durch die LR-HPV-Genotypen 6 und 11, sowie die fokale epitheliale Hyperplasie (Morbus Heck) zählen ebenso zu den benignen Läsionen wie durch LR-Typen induzierte Papillome im Bereich des Mundes, des Rachens und der Konjunktiven. Ein Beispiel ist die rezidivierende respiratorische Papillomatose (RRP oder Larynxpapillomatose) (Levi et al. 1989, Coope und Connett 2006, Larson und Derkay 2010). Die Läsionen der hereditären Hauterkrankung Epidermodysplasia verruciformis (EV) weisen sowohl HPV-Genotypen mit niedrigem (HPV14, 20 und 21) als auch mit hohem onkogenen Potenzial (HPV5, 8 und 47) auf (Chang et al. 1991, Majewski und Jablonska 1995, Marcuzzi et al. 2009).

Die HR-Typen können prämaligne und maligne Zelltransformationen auslösen. Sie gelten als bedeutsamer Risikofaktor für anogenitale Läsionen, wobei der Zusammenhang zwischen HPV-Infektionen und der zervikalen intraepithelialen Neoplasie (CIN), wie auch dem Plattenepithelkarzinom der Zervix am ausgiebigsten beschrieben ist. HPV-DNA kann in über 80 % der zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN) und in fast 100 % der Zervixkarzinome nachgewiesen werden (Walboomers et al. 1999). Die HPV-Typen 16, 18, 31, 33, 35 und 45 sind hierbei die hauptsächlichen Verursacher der Infektion (zur Hausen 1989, Richart et al. 1998, Bertuccio et al. 2011). Die HPV-Infektion ist als wichtigster Risikofaktor für diese Neoplasie anerkannt. Papillomviren sind zudem möglicherweise mit nicht melanotischem Hautkrebs (non melanoma skin cancer, NMSC) assoziiert (Biliris et al. 2000, Iftner et al. 2003) und konnten auch in Läsionen des Tracheobronchialbaumes, des Ösophagus und der Urethra, sowie in extragenitalen Präkanzerosen bei Morbus Bowen nachgewiesen werden (Gissmann 1984, Chang et al. 1991, Tonna et al. 2010, Clavel et al. 1999, Zheng et al. 2005).

Es wird für die Gesamtheit der Kopf-Hals-Karzinome eine HPV Assoziation in 20-30 % angenommen (Hoffmann et al. 2010, Ringström et al. 2002). Die überwiegende Mehrzahl der HPV-positiven Tumoren weist dabei den Hochrisikotyp HPV16 auf (Klussmann et al. 2001, Hoffmann et al. 2003, Gillison 2004, Begum et al. 2005, Furniss et al. 2007). Plattenepithelkarzinome des Oropharynx, vor allem der Tonsillen des Waldeyer'schen Rachenringes, sind

mit einer HPV-Prävalenz von 60 % besonders prädestiniert für eine solche HPV-Infektion (Hoffmann et al. 2005, Chung et al. 2009, Torrente et al. 2011). HPV-positive Karzinome, vor allem die Tonsillenkarcinome, metastasieren früh in die lokoregionären Lymphknoten und zeigen ein aggressiveres biologisches Verhalten als HPV-negative Tumore des Kopf-Hals-Bereiches. Dennoch wird für Patienten mit HPV-positiven Karzinomen im Vergleich zu Patienten mit HPV-negativen Karzinomen ein besseres Gesamt- und auch rezidivfreies Überleben angegeben, was auf das bessere Ansprechen der HPV-positiven Tumore auf die Therapie, vor allem die Strahlentherapie, zurückgeführt wird (Hoffmann et al. 2005, Hoffmann et al. 2010, Syrjanen 2010, Mendelsohn et al. 2010, Tribius et al. 2011).

## **5.2 Secretory Leukocyte Protease Inhibitor (SLPI)**

Das Gen SLPI („Secretory Leukocyte Protease Inhibitor“) zeigte in einer vorangegangenen Untersuchung eine statistisch signifikante Herabregulierung in metastasierten Kopf- und Halskarzinomen im Vergleich zu nicht metastasierten Karzinomen (Cordes et al. 2011). Es kodiert für das Protein Antileukoproteinase (ALP). Es gibt durch das ubiquitäre Vorkommen mehrere Synonyme für das Protein; in dieser Promotionsschrift wird folgend die Abkürzung SLPI durchgehend verwendet. Das Gen befindet sich auf Chromosom 20q12, umfasst eine Basensequenz von 2,65 Kilobasen (kb) und beinhaltet vier Exons und drei Introns (Kikushi et al. 1998). Das Genprodukt ist ein nicht-glykolysiertes, einsträngiges, säurestabiles und Cystein-reiches Protein, das aus zwei Domänen aufgebaut ist. Die Domänen sind zu etwa 30 % homolog (Vogelmeier et al. 1996). Jede Domäne beinhaltet achtmal die Aminosäure Cystein, so dass vier Disulfidbrücken gebildet werden und die Struktur dadurch stabilisiert wird. Die Cystein-reichen Domänen werden auch WAP-Domänen genannt, da eine solche Anordnung der Disulfidbrücken (motif signature) erstmalig im Whey acidic-Protein (WAP), eines der Hauptproteine in der Milch von Mäusen und Ratten, gefunden wurde (Wiesner und Vilcinskas 2010). SLPI gehört somit zur Familie der Proteine mit WAP-Motiv.

Das Molekulargewicht SLPIs beträgt 11,7 Kilodalton (kDa; Thompson und Ohlsson, 1986). Die Tertiärstruktur erinnert an einen Bumerang, dessen Arme jeweils eine Domäne tragen.

### **5.2.1 Vorkommen und Funktion des SLPI**

SLPI wurde 1972 erstmalig aus humanen Bronchialsekreten von Patienten mit obstruktiven Lungenerkrankungen und zystischer Fibrose isoliert (Hochstrasser et al. 1972). Das Protein wird von verschiedenen Organen bzw. Zelltypen synthetisiert, unter anderem Mammagewebe,

Endometrium, Ovar sowie Lunge und Speicheldrüsen. SLPI wird zudem von diversen immunologisch aktiven Zellen, wie Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und B-Lymphozyten, produziert (Abe et al. 1991, Franken et al. 1989, Jin et al. 1997). Wallner und Fritz wiesen 1974 SLPI im Sekret des Zervix nach; es erfolgten Nachweise in der Samenflüssigkeit, in Parotisdrüsen-, Nasen- und Bronchialsekret, in Tränenflüssigkeit, sowie in der humanen Muttermilch (Ohlsson et al. 1995, Thompson und Ohlsson 1986, Hochstrasser et al. 1972, Westin et al. 1994, Franken et al. 1989). Die physiologische Konzentration von SLPI in Speichelflüssigkeit beträgt 0, 1 – 10 µg/ml (McNeely et al. 1995, Shugars 1999). SLPI-Konzentrationen sind im Serum und im Epithel des respiratorischen Traktes bei inflammatorischen Lungenerkrankungen (z.B. Pneumonien) erhöht (Kida et al. 1992, Maruyama et al. 1994).

Das Protein dient zum Schutz der Gewebe vor den endogenen Serinproteasen neutrophile Elastase und Cathepsin G sowie vor Pankreasenzymen wie Chymotrypsin, Trypsin und Pankreaselastase. Es leistet so einen Beitrag zum Immunsystem (Nystrom et al. 1999, Taggart et al. 2002).

Die inhibitorische Region für Proteasen ist an der C-terminalen Domäne lokalisiert (Eisenberg et al. 1990). SLPI besitzt zusätzlich zu den antiproteolytischen Eigenschaften auch eine Vielzahl antiinflammatorischer Wirkungen auf Makrophagen und neutrophile Zellen, die bei Stimulation durch Lipopolysaccharide (LPS) hochreguliert werden (Sehnert et al. 2004). So zeigten Nakamura et al. (2003) an Versuchen mit SLPI-defizienten Mäusen, dass SLPI übermäßige Entzündungsreaktionen abdämpft und für eine ausgeglichene Funktionalität des angeborenen Immunsystems sorgt. SLPI unterdrückt zudem das Wachstum von Bakterien (Hiemstra et al. 1996), hemmt *in vitro* die Infektion von Lymphozyten durch Humane Immundefizienz-Viren (HIV) des Typs 1 (McNeely et al. 1995) und wird darüber hinaus in HIV-Typ 1-infizierten Patienten verstärkt exprimiert (Baqui et al. 1999). Es senkt den Schweregrad von Arthritiden (Song et al. 1999, Sehnert et al. 2004) und verringert die Produktion von Prostaglandin (PG) E<sub>2</sub> und Matrixmetalloproteinasen (MMP) 1 und 9 (Zhang et al. 1997, Nelson et al. 2000). SLPI wird zudem eine zentrale Rolle für Apoptose und Wundheilung zugesprochen (Ashcroft et al. 2000, Odaka et al. 1999, Sorensen et al. 2003).

Die von Cordes et al. (2011) beschriebene Assoziation einer reduzierten SLPI-Expression bei metastasierten Kopf- und Halskarzinomen wurde ebenfalls von einer holländischen Arbeitsgruppe gezeigt (Roepman et al. 2005). Kast et al. (2012, eingereicht) stellten kürzlich anhand



von Untersuchungen an Zellkulturen die Hypothese auf, dass verminderte SLPI-Expressionslevel einen Oberflächenrezeptor freisetzen, welcher dann als Aufnahme-Rezeptor für HPV in die Zellen zu fungieren scheint. In Anbetracht des biologischen Verhaltens der HPV-positiven Karzinome mit frühzeitiger Metastasierung ist in der vorliegenden Promotionsarbeit ein möglicher Zusammenhang zwischen dem HPV-Infektionsstatus und der SLPI-Expression untersucht worden und einer möglich erscheinenden Verbindung beider Parameter zur Metastasierung in die Halslymphknoten nachgegangen worden. Es ist zudem der Zusammenhang zwischen der SLPI-Expression und dem Tabak-Konsumverhalten bei Patienten mit nicht-malignen Erkrankungen untersucht und der Zusammenhang mit der Karzinogenese von HPV-positiven Karzinomen diskutiert worden.

### **5.3 HPV-Prävalenz in Plattenepithelkarzinomen**

Es zeigen sich 22 (28,2 %) der 78 in dieser Promotionsarbeit untersuchten Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches als positiv für HPV-DNA. Dies entspricht zunächst den Ergebnissen, die in der Literatur für solche Karzinome angegeben werden (McKaig et al. 1998, Hoffmann et al. 1998, Gillison et al. 2000). Der HPV-Genotyp 16 ist nach der gegenwärtigen Literatur der dominierende Genotyp in Karzinomen des Kopf-Halsbereiches, worauf der HPV-Typ 18 folgt (Kreimer et al. 2005, Termine et al. 2008, Hoffmann et al. 2005, Hoffmann et al. 2010). „High-risk“ – Typen werden in der vorliegenden Untersuchung bei allen 22 HPV-positiven Karzinomen nachgewiesen, wobei die Typisierung mit einer Prävalenz von 95,5 % (20/22) in nahezu allen Fällen den HPV-Genotypen 16 ergibt. In lediglich einem Fall wird eine Mischinfektion mit HPV16 und HPV18 nachgewiesen und in einem weiteren eine HPV18-Infektion. Diese Ergebnisse entsprechen ebenfalls den Erwartungen, die aus der Literatur abgeleitet werden können (McKaig et al. 1998, Hoffmann et al. 1998, Gillison et al. 2000). Mehrfach-Infektionen eines Tumors mit zwei oder mehreren unterschiedlichen HPV-Genotypen scheinen demnach, zumindest in dieser Promotionsarbeit für Norddeutschland bestätigt, ein seltenes Phänomen in Kopf- und Halskarzinomen zu sein (Hoffmann et al. 2005, Hoffmann et al. 2010, Schmitt et al. 2006, Schmitt et al. 2008).

Tonsillenkarzinome zeigen mit einer HPV-DNA-Prävalenz von 60 % (12/20) im Vergleich zu den anderen Lokalisationen erwartungsgemäß einen besonders hohen Anteil an HPV-positiven Karzinomen. Die vergleichsweise geringere Zahl HPV-positiver Fälle in Mundhöhlen-, Hypopharynx- und Larynxkarzinomen entspricht ebenfalls den aus der gegenwärtigen Literatur ableitbaren Erwartungen (Hoffmann et al. 2005, Chung et al. 2009,

Torrente et al. 2011, St Guily et al. 2011). Tonsillenkarcinome erweisen sich somit offensichtlich als prädestiniert für eine viral verursachte Karzinogenese. Eine Prävalenz von sogar 90 % der untersuchten Tonsillenkarcinome ist in einer Studie aus Schweden gezeigt worden (Näsman et al. 2009). Dies weist auf unterschiedliche Raten der HPV-Prävalenz in den untersuchten Patientenkollektiven aus verschiedenen geographischen Regionen der Welt und Europas hin. Es ist bei den Vergleichen zu den unterschiedlichen Untersuchungen aus verschiedenen geographischen Regionen darauf geachtet worden, dass ähnliche Verfahren zum HPV-DNA-Nachweis angewandt worden sind. Es ist bisher unklar, warum Tonsillen für eine HPV-Infektion permissiver sind als andere Schleimhautregionen des Kopf-Hals-Bereiches. Die Oberfläche des lymphatischen Gewebes der Tonsille ist wie die Schleimhaut des Oropharynx und der Mundhöhle durch ein mehrschichtiges Plattenepithel begrenzt. Die Krypten der Tonsille sind indes nur von einem teilweise einschichtigen Epithel ausgekleidet, welches der Basalzellschicht entspricht. Das Epithel weist Zeichen geringer Differenzierung auf (Mischke et al. 1991, Frisch und Biggar 1999, Klussmann et al. 2001). Der HPV-Replikationszyklus ist streng von der Zelldifferenzierung abhängig und die Viren können primär nur die Basalzellschicht infizieren. Dies könnte eine Erklärung für eine höhere Permissivität des Kryptenepithels für HPV-Infektionen sein (Klussmann et al. 2003).

#### **5.4 mRNA-Expression der Onkogene E6 und E7**

Die biologische Aktivität einer viralen Infektion kann bei Nachweis viraler mRNA in den infizierten Zellen angenommen werden (Braakhuis et al. 2004).

Alle Proben mit verfügbarer RNA (n= 54) sind einer typenspezifischer E6\*I-mRNA-Analyse unterzogen worden. 17 Proben zeigen sich in dieser Untersuchung als positiv für exprimierte mRNA der Onkogene E6 und E7. 14 dieser 17 Fälle können den HPV-DNA-positiven Proben zugeordnet werden; womit 63,6 % der insgesamt 22 HPV-DNA-positiven Karzinome mRNA für E6/E7 aufweisen. HPV-Infektionen, die auf DNA-Basis nachgewiesen werden, müssen also nicht zwingend einer biologisch aktiven Infektion entsprechen. Diese Ergebnisse unterstützen die Studie von Braakhuis et al. (2004), in der von 143 untersuchten Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches 50 % der 24 HPV-DNA-positiven Karzinomen E6/E7-mRNA aufweisen. Die in dieser Promotionsschrift gezeigten Daten entsprechen ebenfalls einer Studie, in der 62 % (50/72) der HPV-DNA-positiven Läsionen unterschiedlicher Dignität des Anogenitaltraktes E6/E7-mRNA aufweisen (Andersson et al. 2006). Smeets et al. haben 2007 in einer Untersuchung an 48 Karzinomen des Kopf-Hals-Bereiches

15 HPV-DNA-positive Karzinome gezeigt, von denen sogar 12 (80 %) E6/E7-mRNA aufgewiesen haben.

Drei der in dieser Arbeit untersuchten 17 Proben weisen zwar virale mRNA auf, ohne dass in diesen Gewebeproben HPV auf DNA-Ebene nachgewiesen werden konnte. Eine Begründung hierfür kann sein, dass die DNA-Detektionsverfahren in diesen Fällen nicht in der Lage waren, diese zu detektieren. Eine Kontamination mit RNA der positiven Fälle ist dagegen eher unwahrscheinlich, da die Negativkontrollen immer negativ waren.

Es ist interessanterweise festzustellen, dass alle HPV-DNA-positiven Mundhöhlen- und Tonsillenzarzinome aktive Infektionen beinhalten, während sich zwei der vier HPV-DNA-positiven Larynxkarzinome und drei der vier HPV-DNA-positiven Hypopharynxkarzinome als inaktive Infektionen erwiesen. An dieser Stelle soll nochmals darauf hingewiesen werden, dass in dieser Promotionsarbeit die anatomischen Lokalisationen weicher Gaumen und Zungenrand - obwohl der weiche Gaumen zum Oropharynx gehört - unter der Lokalisation Mundhöhle zusammengefasst werden, da es sich bei der Schleimhaut des weichen Gaumens nicht um tonsilläres Gewebe handelt.

Es ist bekannt, dass Patienten mit aktiven HPV-Infektionen bei der Erstdiagnose im Vergleich zu HPV-negativen Patienten ein fortgeschritteneres Tumorstadium aufweisen (Smeets et al. 2007, Hoffmann et al. 2010). Diese Beobachtung deckt sich mit der klinisch-pathologischen Begebenheit, dass gerade Patienten mit Tonsillenzarzinomen unabhängig vom HPV-Status häufig mit Halslymphknotenmetastasen zur Erstdiagnose kommen. Patienten mit HPV-positiven Karzinomen weisen dennoch ein besseres Gesamtüberleben und ein längeres rezidivfreies Überleben auf, was auf eine erhöhte Sensibilität der HPV-positiven Tumoren auf die Therapie, insbesondere die Strahlentherapie zurückgeführt wird (Ringström et al. 2002, Licitra et al. 2006, Furniss et al. 2007, Fakhry et al. 2008). Es erscheint demnach aus therapeutischer Sicht sinnvoll den HPV-Infektionsstatus der Karzinome des Kopf-Hals-Bereiches zu identifizieren.

Es ist hervorzuheben, dass aktive HPV-Infektionen auch in Karzinomen der Mundhöhle, des Larynx und Hypopharynx gezeigt werden können, wenn auch in einem geringeren Prozentsatz. Weiterführende Studien werden zeigen, ob die Prävalenz aktiver HPV-Infektionen in diesen anatomischen Lokalisationen in anderen und größeren Studienpopulationen bestätigt werden können, einschließlich des für das Kieler Patientenkollektiv

bereits gezeigte bessere Überleben im Fall des HPV-DNA-Nachweises (Hoffmann et al. 2005).

### **5.5 P16<sup>INK4a</sup>-Immunhistochemie**

P16<sup>INK4a</sup> fungiert als CDK4/6-Inhibitor und hemmt somit die pRb-Phosphorylierung; es trägt eine wesentliche Rolle in der Regulation der pRb-Aktivität (Serrano et al. 1993, Lukas et al. 1995). Die Existenz einer inversen Korrelation zwischen der pRb- und p16<sup>INK4a</sup>-Expression wurde in mehreren Studien gezeigt (Whitaker et al. 1995, Shapiro et al. 1995, Kinoshita et al. 1996). Das virale Protein E7 degradiert pRb. P16<sup>INK4a</sup> wird somit durch den Wegfall des negativen Feedbacks in den infizierten Zellen verstärkt exprimiert.

Es wurde in der vorliegenden Arbeit bei 78 Karzinomen des Kopf-Hals-Bereiches die p16<sup>INK4a</sup>-Expression untersucht. 45 Proben zeigten eine p16<sup>INK4a</sup>-Expression, 16 davon eine schwache, 12 eine mäßige und 17 eine starke. Der Zusammenhang von p16<sup>INK4a</sup>-Expression und dem HPV-DNA-Status sowie die Korrelation der beiden Faktoren mit der mRNA-Expression des Onkogens E6/E7 haben sich als statistisch hochsignifikant ( $p < 0,0001$ ) erwiesen.

P16<sup>INK4a</sup> ist als immunologischer Marker für dysplastische und maligne HPV-assoziierte Läsionen der Zervix geeignet (Sano et al. 1998, Klaes et al. 2001, Srivastava 2010). Klusmann et al. (2003), Cunningham et al. (2006) und Reimers et al. (2007) haben gezeigt, dass p16<sup>INK4a</sup> auch bei hochgradigen, durch HPV induzierten, Dysplasien des Oropharynx speziell bei Tonsillenkarzinomen, als immunhistologischer Marker geeignet ist. Hoffmann et al. (eingereicht) haben kürzlich jedoch beschrieben, dass p16<sup>INK4a</sup> alleine nicht ausreicht, um biologisch aktive und inaktive HPV-Infektionen in der Gesamtheit der Kopf-Hals-Karzinome zu unterscheiden. In der vorliegenden Untersuchung wären nahezu 20 % der HPV-DNA und E6\*I-mRNA-positiven Karzinome nicht identifiziert worden, wenn die p16<sup>INK4a</sup>-Immunhistochemie die einzig angewandte Methode gewesen wäre. Eine präzise Bestimmung erweist sich somit bei der Identifikation aktiver HPV-Infektionen als entscheidend, um die wahre Inzidenz der biologisch aktiven HPV-Infektionen in Kopf-Hals-Karzinomen zu bestimmen.

## 5.6 Die SLPI-Expression in Kopf-Hals-Karzinomen

In der vorliegenden Promotionsarbeit ist bei 78 Karzinomproben die Intensität der SLPI-Expression untersucht worden. 25 der 78 Proben weisen dabei eine schwache, 18 eine mäßige und sieben eine starke Expression auf, wohingegen 53 Proben keine positiven Signale in der SLPI-Immunhistochemie gezeigt haben. Die primär nicht metastasierten Karzinome haben wie erwartet eine starke SLPI-Expression aufgewiesen, während die metastasierten Karzinome eine schwächere Expression gezeigt haben.

Die in dieser Promotionsarbeit gezeigten Ergebnisse der SLPI-Expression in den Tumorbiopsaten unterstützen die Resultate einer Studie von Nakamura et al. (2008) in der Ovarialkarzinome mit und ohne Lymphknotenmetastasen zur Untersuchung kamen und SLPI in den nicht metastasierten Ovarialkarzinomen in höherer Konzentration als in metastasierten Ovarialkarzinomen beschrieben worden ist.

Verschiedene Autoren berichteten von einer SLPI-Überexpression in Pankreas-, papillären Schilddrüsen-, Zervix-, Endometrium- und Ovarialkarzinomen im Vergleich zu normalen Gewebeproben dergleichen Patienten (Iacobuzio-Donahue et al. 2003, Jarzab et al. 2005, Rein et al. 2004, Zhang et al. 2002, Hough et al. 2002, Israeli et al. 2005). SLPI-mRNA und das Protein SLPI erweisen sich unabhängig vom HPV-Status in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches im Vergleich zu entsprechenden normalen Gewebeproben als überexprimiert (Dasgupta et al. 2006). SLPI-Überexpression in Tumorgewebe ist daher nicht als spezifischer Surrogatmarker für eine bestimmte Tumorentität geeignet. Diese Daten zeigen, dass sowohl erhöhte SLPI-Konzentrationen in Karzinomproben im Vergleich zu normalen Gewebeproben dergleichen Patienten, als auch niedrigere SLPI-Konzentrationen in Proben metastasierter Karzinome im Vergleich zu Proben nicht metastasierter Karzinome, vorkommen können.

Die genaue Rolle von SLPI in der Karzinomentwicklung und Metastasierung wird derzeit kontrovers diskutiert. Die SLPI-Expression wird durch Progesteron und durch die proinflammatorisch wirkenden Zytokine  $TNF\alpha$  und  $IL1-\beta$  signifikant gesteigert (Sallenave et al. 1994). SLPI ist in der Lage die Aktivität von Karzinomzellen durch Inhibierung von Enzymen zu beeinflussen, die für Invasion und Progression verantwortlich sind (Del Rosso et al. 2002, Sun und Yang 2004). Das Protein wirkt somit als ein protektiver Faktor. Die metastasierten Karzinome des in dieser Promotionsarbeit untersuchten Patientenkollektivs zeigen eine

fehlende oder unterdrückte Expression des SLPI und damit folglich der antiproteolytischen Funktion. Die Tumorprogression könnte so durch die vom Tumor sezernierten Proteasen begünstigt werden. Eine weitere Erklärung für den auch in dieser Promotionsarbeit bestätigten Zusammenhang zwischen der Metastasierung und der SLPI-Expression in Kopf-Hals-Karzinomen könnte darüber hinaus sein, dass SLPI in der Lage ist die Produktion von den Metalloproteinasen 1 und 9 zu unterdrücken, welche wiederum eine Rolle bei Tumorinvasion und Metastasierung spielen (Zhang et al. 1999, Nelson et al. 2000).

### **5.7 Der Zusammenhang zwischen Lymphknoten-Status, HPV-DNA-Status und SLPI-Expression**

Die Daten der vorliegenden Promotionsarbeit zeigen erstmalig, dass eine schwache SLPI-Expression mit einer erhöhten Prävalenz für HPV-Infektionen in Kopf-Hals-Karzinomen einhergeht, während eine Überexpression von SLPI bei den untersuchten Tumoren mit einer niedrigen Prävalenz für HPV-Infektionen assoziiert ist: HPV-DNA-positive Fälle dominieren in der Gruppe mit fehlender oder schwacher SLPI-Expression, HPV-DNA-negative Fälle weisen dagegen eine ausgeglichene Verteilung der SLPI-Expression auf. Aus diesen Ergebnissen lässt sich die Hypothese herleiten, dass die Interaktion von HPV und SLPI ein frühes Ereignis im Infektions-Prozess zu sein scheint. Eine Ansammlung von HPV-DNA-negativen Fällen wäre andernfalls in der Gruppe der Fälle mit mäßiger bis starker SLPI-Expression zu erwarten. Diese Ergebnisse unterstützen die Auffassung, dass SLPI die Papillomvirus-Infektion in einer frühen Phase der Virus-Zell-Interaktion beeinflusst.

Beide Parameter, also das Vorliegen einer HPV-Infektion sowie die fehlende oder schwach vorhandenen SLPI-Expression, scheinen allein schon einzeln die Entstehung von Halslymphknotenmetastasen bei den betroffenen Patienten zu begünstigen. Dieser Effekt scheint aufgrund entsprechender Synergismen bei der Kombination der beiden Parameter sogar verstärkt zu verzeichnen zu sein. Die HPV-DNA-negativen Fälle mit einer starken SLPI-Expression weisen dagegen in der überwiegenden Mehrheit keine Halslymphknotenmetastasen auf. In Folgeuntersuchungen wird daher untersucht, ob reduzierte SLPI-Expression in metastasierten Kopf-Hals-Karzinomen durch eine HPV-Infektion verursacht wird oder ob die HPV-Infektion eine Folge der reduzierten bis nicht-vorhandenen SLPI-Expression ist. Es ist allerdings auch nicht völlig auszuschließen, dass mit zunehmender Progression von HPV-DNA-positiven Karzinomen die initial erhöhte SLPI-Expression deutlich herunter reguliert wird.

Die aktuellen, im folgenden Abschnitt beschriebenen Ergebnisse zur SLPI-Expression in klinisch gesunder Mukosa von Patienten ohne maligne Neoplasien werfen jedoch ein völlig neues, als revolutionär zu bezeichnendes Licht auf die eben beschriebenen Zusammenhänge.

### **5.8 Die SLPI-Expression in klinisch gesunder Mukosa von Patienten ohne maligne Neoplasien**

Es sind in dieser Promotionsarbeit zusätzlich zu den Karzinomproben 19 Gewebeproben klinisch unauffälliger Mukosa von Patienten ohne maligne Erkrankungen mittels Immunhistochemie auf den SLPI-Expressionsgrad untersucht worden. 13 dieser Proben zeigen keine oder eine nur schwache SLPI-Expression, während sechs eine mäßig bis starke Expression des SPLI zeigen. Hierbei kann interessanterweise eine inverse Korrelation zwischen der SLPI-Expression und dem Tabakkonsum der Patienten beobachtet werden. Die Ergebnisse der SLPI-Immunhistochemie in dieser kleinen Stichprobe zeigen in Korrelation zum Tabakkonsum einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen den Rauchgewohnheiten und der Intensität der SLPI-Expression ( $p < 0,0001$  bei prozentualer Betrachtung der Ergebnisse). Es ist Gegenstand derzeitiger weiterer Untersuchungen, ob Inhaltsstoffe des Tabakrauchs, insbesondere das Nikotin, eine Erhöhung der SLPI-Expression in Schleimhautzellen induzieren können.

Es lässt sich aus den soeben beschriebenen Ergebnissen zur SLPI-Expression in normaler Schleimhaut von Patienten ohne eine Tumorerkrankung folgende hochinteressante und ebenso wichtige Hypothese ableiten: Die Inhaltsstoffe des Tabakrauches provozieren einen Anstieg der SLPI-Expression in der Mukosa, was wiederum zu einer Blockade des oben beschriebenen Rezeptors führt, wodurch einer HPV-Infektion der Epithelzellen entgegengewirkt wird. Tabakabstinenz führt zu einer niedrigeren SLPI-Konzentration und erleichtert so die Infektion mit HPV.

Kritisch zu betonen ist der hypothetische Charakter dieser Interpretation der Ergebnisse: Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Daten erlauben eigentlich keine Aussage darüber, ob die SLPI-Konzentration im Karzinomgewebe im Vergleich zur normalen Mukosa der oberen Atemwege des jeweiligen Patienten hoch oder herunter reguliert ist, da keine korrespondierenden, nach klinischen Kriterien unauffälligen Schleimhautproben der Tumorpatienten selbst untersucht worden sind. Es ist Gegenstand von Folgeuntersuchungen, diesen Aspekt zu beleuchten.

SLPI und dessen Rolle in der Karzinomentstehung rücken durch die hier beschriebene Abhängigkeit von HPV-Infektion und Metastasierung HPV-DNA-positiver Karzinome ins Blickfeld zukünftiger Forschungsbemühungen. Es bleibt jedoch zu klären, welche Ereignisse SLPI zugeschrieben werden können und welche auf die onkogene Aktivität von HPV zurückgeführt werden können. Studien zur Bestätigung der beschriebenen Korrelation zwischen SLPI-Expression, Tabakkonsum und HPV-Infektionsstatus insbesondere bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen und nicht-malignen Erkrankungen des Kopf-Hals-Bereiches werden derzeit durchgeführt.

Es lässt sich abschließend sagen, dass in der vorliegenden Promotionsarbeit erstmals ein statistisch signifikanter inverser Zusammenhang zwischen HPV-Infektionen und der SLPI-Expression festgestellt worden ist. Darüber hinaus ist eine ebenfalls statistisch signifikante Korrelation zwischen dem Tabakkonsum und der SLPI-Expression bei Patienten mit klinisch unauffälliger Mukosa festgestellt worden. Diese Ergebnisse stützen somit die bereits erwähnte Hypothese, dass reduzierte SLPI-Expression die Freisetzung eines Rezeptors auf der Zelloberfläche bewirkt, der dann eine HPV-Infektion erleichtert (Kast et al. 2012, eingereicht). Diese Annahme wird dadurch bestärkt, dass aktive HPV-Infektionen vorwiegend in Fällen mit fehlender bis schwacher SLPI-Expression nachgewiesen werden können. Beide Parameter scheinen einen synergistischen Effekt auf klinisch-pathologische Merkmale zu haben; auch dies passt zur genannten Hypothese: Betroffene Patienten weisen ein fortgeschritteneres Tumorstadium auf als Patienten mit HPV-negativen Karzinomen. Dieser Umstand kann entweder der HPV-Infektion oder der herabgesetzten SLPI-Expression zugeschrieben werden. Die Ergebnisse zeigen darüber hinaus erstmals, dass die Korrelation zwischen SLPI-Expression und Tabakkonsum möglicherweise das fehlende Bindeglied darstellen könnte, welches erklärt, warum Patienten, welche Tabak regelmäßig konsumieren eher an HPV-unabhängigen, nämlich Noxen-assoziierten Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches und Patienten, die keinen solchen Missbrauch betreiben, an HPV induzierten Karzinomen erkranken. Die beschriebene Hypothese ist so auch geeignet, den Inzidenzpeak in der Lebenszeit der Patienten, welcher bei Tabakrauch-assoziierten Karzinomen etwa ein Jahrzehnt später zu verzeichnen ist, zu erklären.

Diese Untersuchung ist eine Aufforderung zu weiterführenden Untersuchungen. Es gilt herauszufinden, ob die beschriebenen Ergebnisse in anderen Studienpopulationen bestätigt werden können, ob die hier aufgeführten Mechanismen, die zu einem unterschiedlichen Maß an SLPI-Expression in der Mukosa der oberen Atemwege führen, gezeigt werden können und



ob SLPI- und HPV-Proteine Bindungsstellen aufweisen, die mit demselben Rezeptor interagieren können. Auch der Rezeptor an sich müsste schließlich auch in Kopf-Hals-Karzinomen identifiziert werden.

Die Ausbreitung von HPV-Infektionen von infizierten auf nicht infizierte Zellen wird in Zusammenhang mit der rezidivierenden respiratorischen Papillomatose diskutiert (Smeets et al. 2007, Pawlita et al. 2009). Unsere Erkenntnisse könnten daher - zusammen mit möglichen zukünftigen Ergebnissen - eine Grundlage für die Entwicklung von Therapeutika sein, die als Target diesen postulierten Rezeptor aufweisen, um so die weitere Verbreitung von HPV-Infektionen zu verringern bzw. zu vermeiden.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Humane Papillomviren werden mit der Genese benigner und maligner Läsionen an Schleimhäuten unterschiedlicher anatomischer Lokalisationen in kausalen Zusammenhang gebracht. Papillome des Mundes und des Rachens, wie z.B. die rezidivierende respiratorische Larynxpapillomatose – verursacht durch die HPV Typen 6 und 11 – zählen im Kopf-Hals-Bereich zu den benignen Läsionen. Eine HPV-Assoziation wird in 20-30 % der Gesamtheit der Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches angenommen, besonders die Tonsillen sind mit einer Prävalenz von 60 % für eine HPV-Infektion prädestiniert. HPV16 ist der mit Abstand häufigste nachgewiesene Genotyp in Kopf-Hals-Karzinomen und somit am stärksten mit der Genese dieser Karzinome verknüpft. HPV-positive Kopf-Hals-Karzinome metastasieren frühzeitig in die lokoregionären Halslymphknoten und weisen somit im Vergleich zu HPV-negativen Karzinomen ein biologisch aggressiveres Verhalten auf.

In einer eigenen vorausgegangenen Untersuchung ist gezeigt worden, dass die Expression des Secretory Leukocyte Protease Inhibitor (SLPI) Gens, welches für eine Antileukoproteinase kodiert, in metastasierten Kopf-Hals-Karzinomen im Vergleich zu nicht metastasierten Karzinomen statistisch signifikant herabreguliert ist. Es ist kürzlich zudem anhand von Untersuchungen an Zellkulturen gezeigt worden, dass eine verminderte SLPI-Expression einen zellulären Oberflächenrezeptor freizusetzen scheint, der möglicherweise als Aufnahme-Rezeptor für HPV in die humanen Epithelzellen fungiert. Die verminderte Bildung von SLPI könnte so eine HPV-Infektion der mukösen Epithelzellen erleichtern.

Es ist in der vorliegenden Promotionsarbeit somit untersucht worden, ob ein Zusammenhang zwischen dem HPV-Infektionsstatus und der SLPI-Expression besteht. Hierzu ist DNA, extrahiert aus schockgefrorenem Gewebe von 78 Karzinomen des Kopf-Hals-Bereiches [Mundhöhle (n= 12), Tonsille (n= 20), Larynx (n= 22) und Hypopharynx (n= 24)], zur Detektion von HPV-DNA einer PCR unterzogen worden. Aus den gleichen Gewebeproben extrahierte RNA wurde mittels Reverse Transkriptase-PCR auf Vorhandensein von mRNA der viralen Onkogene E6 und E7 untersucht. Histopathologische Schnitte der Tumoren sind des Weiteren mittels Immunhistochemie auf die zelluläre Lokalisation und nach semi-quantitativen Kriterien auf den Expressionsgrad von SLPI untersucht worden. Es sind abschließend 19 Schleimhautgewebeproben von Patienten mit nicht-malignen Erkrankungen des Kopf-Hals-Bereiches auf den SLPI-Expressionsgrad untersucht und diese Ergebnisse mit dem Tabakkonsum der Patienten korreliert worden. So ist der Frage nachgegangen worden,

(i) in welchem Zusammenhang zelluläre SLPI-Konzentrationen von Kopf-Hals-Karzinomen und klinisch unauffälliger Mukosa mit dem HPV-Status der Karzinome stehen, sowie (ii) ob die SLPI-Expression eine Korrelation mit dem Tabakkonsum der Patienten aufweist.

Es wird gezeigt, dass in den untersuchten Karzinomen aller anatomischen Lokalisationen des Kopf-Hals-Bereiches die HPV-Prävalenz 28,2 % (22/78) beträgt, wobei Karzinome der Tonsillen mit 60 % HPV-positiven Fällen eine erwartete deutliche Prädisposition für die HPV-assoziierte Karzinogenese zeigen. Der Anteil biologisch aktiver Infektionen liegt in den HPV-DNA-positiven Karzinomen bei 77,3 % (17/22). Die Immunhistochemie zeigt insgesamt in 28 (35,9 %) Fällen keine SLPI-Expression, in 25 (32,1 %) eine schwache, in 18 eine mäßige und in sieben (9,0 %) eine starke SLPI-Expression. Elf (50 %) der 22 HPV-DNA-positiven Karzinome zeigen keine SLPI-Expression, neun (40,9 %) eine schwache und zwei (9,1 %) eine mäßig bis starke SLPI-Expression. Dreiundzwanzig (41,1 %) der 56 HPV-DNA-negativen Tumorproben haben dagegen eine mäßige bis starke, 16 (28,6 %) eine schwache und weitere 17 (30,4 %) keine SLPI-Expression nachgewiesen.

Die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen (i) dem HPV-Infektionsstatus, der SLPI-Expression und dem Halslymphknotenstatus sowie zwischen (ii) der SLPI-Expression und dem Tabakkonsum hat Folgendes ergeben: Elf Patienten mit aktiver HPV-Infektion und fehlender bis schwach ausgeprägter SLPI-Expression haben Halslymphknotenmetastasen, wohingegen vier Patienten dieser Gruppe keine Metastasen entwickelt haben. Sieben Patienten mit inaktiver oder nicht vorhandener HPV-Infektion und mäßig bis stark ausgeprägter SLPI-Expression haben Halslymphknotenmetastasen aufgewiesen, 16 Patienten dieser Gruppe dagegen nicht. In der Gruppe der Tabak konsumierenden Patienten mit nicht-malignen Erkrankungen (n= 7) zeigen drei schwache bis keine Expression und vier mäßige bis starke SLPI-Expression, während in der Gruppe ohne Tabakkonsum (n= 12) zehn fehlende bis schwache und zwei eine mäßige bis starke SLPI-Expression erkennen lassen haben.

Die Ergebnisse der Untersuchungen der HPV-Prävalenz und des HPV-Infektionsstatus liegen aufgrund eigener Voruntersuchungen und aufgrund der Angaben in der Literatur im Bereich der erwarteten HPV-Prävalenz in einer vergleichbaren Studienpopulation. Die Ergebnisse zeigen erstmals einen statistisch signifikanten inversen Zusammenhang zwischen SLPI-Expression und HPV-Infektionsstatus ( $p < 0,05$ ) sowie zwischen der SLPI-Expression in nach klinischen Kriterien gesunder Mukosa von Patienten ohne Tumorerkrankungen und dem

Tabakkonsum ( $p= 0,0001$ ). Die Daten stützen die Hypothese, dass bei verminderter SLPI-Expression ein zellulärer Oberflächenrezeptor freigesetzt zu werden scheint, welcher durch eine dann ermöglichte Bindung von HPV dessen Aufnahme in die Zelle erleichtert, also die HPV-Infektion erst ermöglicht wird. Dem gegenüber stehen hohe SLPI-Konzentrationen, wahrscheinlich durch Umweltfaktoren wie zum Beispiel Tabakkonsum induziert, mit einem protektiven Effekt gegen HPV-Infektionen. SLPI scheint somit in den molekularen Prozess der HPV-Infektion der humanen Epithelzellen involviert zu sein.

Die in dieser Promotionsarbeit gezeigten Ergebnisse werfen ein beinahe revolutionäres Licht auf die initiale Phase der HPV-Infektion in Kopf-Hals-Karzinomen. Offensichtlich führen exogene Faktoren, wie der Tabakrauch, zur elevierten SLPI-Expression, sodass diese Patienten im Vergleich zu Nicht-Rauchern vor einer HPV-Infektion geschützt zu sein scheinen. Dieser hypothetische Zusammenhang von HPV und SLPI kann als fehlendes Bindeglied im Verständnis dafür interpretiert werden, weshalb (i) Raucher Noxen-assoziierte und Nicht-Raucher HPV-assoziierte Karzinome entwickeln und (ii) letztere durchschnittlich bei der Erstdiagnose 10 Jahre jünger sind als erstere. Bei Bestätigung dieser Ergebnisse in anderen und größeren Populationen kann die nähere Identifizierung und Charakterisierung des HPV-Rezeptors auch in Kopf-Hals-Karzinomen zu Erkenntnissen führen, die sogar neuen Therapieansätzen mit dem Rezeptor als Target den Weg ebnen können.

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

- Abe T, Kobayashi N, Yoshimura K, Trapnell BC, Kim H, Hubbard RC, Brewer MT, Thompson RC, Crystal RG (1991): Expression of the secretory leukoprotease inhibitor gene in epithelial cells. *J Clin Invest* 87: 2207-2215
- Alkemade HA, van Vlijmen-Willems IM, van Haelst UJ, van de Kerkhof PC, Schalkwijk J (1994): Demonstration of skin-derived antileukoproteinase (SKALP) and its target enzyme human leukocyte elastase in squamous cell carcinoma. *J Pathol* 174: 121-129
- Andersson S, Hansson B, Norman I, Gaberi V, Mints M, Hjerpe A, Karlsen F, Johansson B (2006): Expression of E6/E7 mRNA from 'high risk' human papillomavirus in relation to CIN grade, viral load and p16<sup>INK4a</sup>. *Int J Oncol* 29: 705-711
- Ashcroft GS, Lei K, Jin W (2000): Secretory leukocyte protease inhibitor mediates non-redundant functions necessary for normal wound healing. *Nat Med* 6: 1147-1153
- Baqui AA, Meiller TF, Falkler WA Jr (1999): Enhanced secretory leukocyte protease inhibitor in human immunodeficiency virus type 1-infected patients. *Clin Diagn Lab Immunol* 6: 808-811
- Bartmann P, Heininger U, Huppertz HI, et al.: Infektionsprophylaxe gegen das humane Papillomavirus (HPV)- Stellungnahme der Deutschen Akademie für Kinder- und Jugendmedizin e.V. und der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e.V., 22.01.2007
- Begum S, Cao D, Gillison M, Zahurak M, Westra Wh (2005): Tissue distribution of human papillomavirus 16 DNA integration in patients with tonsillar carcinoma. *Clin Cancer Res* 11: 5694-5699
- Bernard HU, Chan SY, Manos MM, Ong CK, Villa LL, Delius H, Peyton CL, Bauer HM, Wheeler CM. (1994): Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis* 170: 1077-1085
- Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, Hausen H, de Villiers EM (2010): Classification of papillomaviruses (PVx) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 401:70-79

- Bertuccio MP, Spataro P, Caruso C, Picerno I (2011): Detection of human papillomavirus E6/E7 mRNA in women with high-risk HPV types 16, 18, 31, 33 and 45 which are associated with the development of human cervical cancer. *Eur J Gynaecol Oncol.* 32: 62-64
- Biliris KA, Koumantakis E, Dokianakis DN, Sourvinos G, Spandidos DA (2000): Human papillomavirus infection of non-melanoma skin cancers in immunocompetent hosts. *Cancer Lett.* 161: 83-88
- Braakhuis BJ, Snijders PJ, Keune WJ, Meijer CJ, Ruijter-Schippers HJ, Leemans CR, Brakenhoff RH (2004): Genetic patterns in head and neck cancers that contain or lack transcriptionally active human papillomavirus. *J Natl Cancer Inst.* 96: 998-1006
- Broker TR (1987): Structure and genetic expression of papillomaviruses. *Obstet Gynecol Clin North Am* 14: 329-348
- Broker TR, Botchan M (1986): Papillomaviruses: Retrospectives and prospectives. *Cancer Cells 4/DNA Tumor Viruses.* Cold Spring Harbor USA S 17-36
- Calleja-Macias IE, Kalantari M, Allan B, Williamson AI, Chung LP, Collins RJ, Zuna RE, Dunn ST, Ortiz-Lopez R, Barrera-Saldaña HA, Cubie HA, Cuschieri K, Villa LL, Bernard HU (2005): Papillomavirus subtypes are natural and old taxa: phylogeny of human papillomavirus types 44 and 55 and 68a and -b. California, Irvine: *J Virol* 79: 6565-6569
- Chan SY, Delius H, Halpen AL, Bernard HU (1995): Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny, and taxonomy. *J Virol* 68: 3074-3083
- Chang F, Syrjänen S, Kellokoski J, Syrjänen K (1991): Human papillomavirus (HPV) infections and their associations with oral disease. *J Oral Pathol Med* 20: 305-317
- Chen MJ, Shimada T, Moulton AD, Harrison M, Nienhuis AW (1982): Intronless human dihydrofolate reductase genes are derived from RNA molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 7435-7439
- Chung CH, Gillison ML (2009): Human papillomavirus in head and neck cancer: its role in pathogenesis and clinical implications. *Clin Cancer Res* 15: 6758-62
- Clavel C, Masure M, Bory JP, Putaud I, Mangeonjean C, Lorenzato M, Gabriel R, Quereux C, Birembaut P (1999): Hybrid Capture II-based human papillomavirus detection, a sensitive test to detect in routine high-grade cervical lesions: a preliminary study on 1518 women. *Br J Cancer* 80: 1306-1311

- Clertant P, Seif I (1984): A common function for polyoma virus large-T and papillomavirus E1 proteins? *Nature* 311: 276-279
- Coope G, Connett G (2006): Juvenile laryngeal papillomatosis. *Prim Care Respir J* 15: 125-127
- Cordes C, Häsler R, Werner C, Görögh T, Röcken C, Hebebrand L, Kast WM, Hoffmann M, Schreiber S, Ambrosch P (2011): The level of secretory leukocyte inhibitor is decreased in metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* (epub ahead of printing)
- Cunningham LL, Pagano GM, Mengtao L, Tandon, R, Holm S, White DK, Subodh L (2006): Overexpression of p16<sup>INK4</sup> is a reliable marker for human papillomavirus-induced oral high-grade squamous dysplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 102: 77-81
- Dasgupta S, Tripathi Pk, Qin H, Bhattacharya-Chatterjee M, Valentino J, Chatterjee SK (2006): Identification of molecular targets for immunotherapy of patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 42: 306-316
- de Villiers EM (1994): Human pathogenic papillomavirus types: an update. *Curr Top Microbiol Immunol* 186: 1-12
- Del Rosso M, Fibbi G, Pucci M, D'Alessio S, Del Rosso A, Magnelli L, Chiarugi V (2002): Multiple pathways of cell invasion are regulated by multiple families of serine proteases. *Clin Exp Metastasis* 19: 193-207
- Dell G, Gaston K (2001): Human papillomaviruses and their role in cervical cancer. *Cell Mol Sci* 58: 1923-1942
- Doerr HW und Gerrlich WH, *Medizinische Virologie: Grundlagen, Diagnostik und Therapie virologischer Krankheitsbilder*. Thieme 2002
- Eisenberg SP, Hale KK, Heimdal P, Thompson RC (1990): Location of the protease-inhibitory region of secretory leukocyte protease inhibitor. *J Biol Chem* 265: 7976-7981
- Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, Forastiere A, Gillison ML (2008): Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst* 100: 261-269
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM (2010): Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 127: 2893-2917

- Finzer P, Aguilar-Lemarroy A, Rösl F (2002): The role of human papillomavirus oncoproteins E6 and E7 in apoptosis. *Cancer Lett.* 188: 15-24
- Franken C, Meijer CJ, Dijkman JH (1989): Tissue distribution of antileukoprotease and lysozyme in humans. *J Histochem Cytochem* 37: 493–498
- Frisch M, Biggar R (1999): Aetiological parallel between tonsillar and anogenital squamous-cell carcinomas. *Lancet* 354: 1442-1443
- Furniss CS, McClean MD, Smith JF, Bryan J, Nelson HH, Peters ES, Posner MR, Clark JR, Eisen EA, Kelsey KT (2007): Human papillomavirus 16 and head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 120: 2386-2392
- Galloway DA, McDougall JK (1989): Human papillomaviruses and carcinomas. *Adv Virus Res* 37: 125-171
- Ganguly N, Parihar SP (2009): Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. *J Biosci.* 34: 113-123
- Gillison ML (2004): Human papillomavirus-associated head and neck cancer is a distinct epidemiologic, clinical, and molecular entity. *Semin Oncol* 31: 744-754
- Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Wu L, Sidransky D (2000): Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Nat Cancer Inst* 9: 709-720
- Gissmann L (1984): Papillomavirus and their association with cancers in animals and man. *Cancer Surv* 3: 161-181
- Gissmann L (1992): Human papillomaviruses and genital cancer. *Semin Cancer Biol* 3: 253-61
- Havre PA, Yuan J, Hedrick L, Cho KR, Glazer PM (1995): p53 inactivation by HPV16 E6 results in increased mutagenesis in human cells. *Cancer Res* 55: 4420-4424
- Hiemstra PS, Maassen RJ, Stolk J, Heinzl-Wieland R, Steffens GJ, Dijkman JH (1996): Antibacterial activity of antileukoprotease. *Infect Immun.* 64: 4520-4524
- Hochstrasser K, Reichert R, Schwartz S, Werle E (1972): Isolation and characterisation of a protease inhibitor from human bronchial secretion. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol Chem* 353: 221-226.
- Hoffman M, Lohrey C, Hunziker A, Kahn T, Schwarz E (2004): Human papillomavirus type 16 E6 and E7 genotypes in head-and-neck carcinomas. *Oral oncol* 40: 520-524



- Hoffmann M, Görögh T, Gottschlich S, Lohrey C, Rittgen W, Ambrosch P, Schwarz E, Kahn T (2005): Human papillomavirus in head and neck cancer: 8-year-survival analysis of 73 patients. *Cancer Lett* 218: 199-206
- Hoffmann M, Ihloff AS, Görögh T, Weise JB, Fazel A, Krams M, Rittgen W, Schwarz E, Kahn T (2010): p16(INK4a) overexpression predicts translational active human papillomavirus infection in tonsillar cancer. *Int J Cancer* 127: 1595-1602
- Hoffmann M, Kahn T, Mahnke CG, Görögh T, Lippert BM, Werner JA (1998): Prevalence of human papillomavirus in squamous cell carcinoma of the head and neck determined by polymerase chain reaction and Southern blot hybridization: proposal for optimized diagnostic requirements. *Acta Otolaryngol* 118: 138-44
- Hoffmann M, Lohrey C, Hunziker A, Kahn T, Schwarz E (2003): Human papillomavirus type 16 E6 and E7 genotypes in head-and-neck carcinomas. *Oral Oncology* 40: 520-524
- Hough CD, Cho KR, Zonderman AB, Schwartz DR, Morin PJ (2001): Coordinately up-regulated genes in ovarian cancer. *Cancer Res.* 61: 3869-3876
- Iacobuzio-Donahue CA, Ashfaq R, Maitra A, Adsay NV, Shen-Ong GL, Berg K, Hollingsworth MA, Cameron JL, Yeo CJ, Kern SE, Goggins M, Hruban RH (2003): Highly expressed genes in pancreatic ductal adenocarcinomas: a comprehensive characterization and comparison of the transcription profiles obtained from three major technologies. *Cancer Res* 63: 8614-8622
- Iftner A, Klug SJ, Garbe C, Blum A, Stancu A, Wilczynski SP, Iftner T (2003): The prevalence of human papillomavirus genotypes in nonmelanoma skin cancer of nonimmunosuppressed individuals identifies high-risk genital types as possible risk factors. *Cancer Res.* 61: 7515-9
- Innis MA, Gelfand DH (1990): Optimisation of PCRs. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ et al., eds. *PCR protocols a guide to methods and applications*. New York, Academic Press: 3-12
- Ito Y, Evans CA (1961): Induction of tumors in domestic rabbits with nucleic acid preparations from partially purified Shope papilloma virus and from extracts of the papillomas of domestic and cottontail rabbits. *J Exp Med* 114: 485-500
- Israeli O, Goldring-Aviram A, Rienstein S, Ben-Baruch G, Korach J, Goldman B, Friedman E: In silico chromosomal clustering of genes displaying altered expression patterns in ovarian cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 160: 35-42

- Jacobs MV, deRoda Husman AM, van den Brule AJ, Snijders PJ, Meijer CJ, Walboomers JM (1995): Group-specific differentiation between high- and low-risk human papillomavirus genotypes by general primer-mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes. *Journal of Clinical Microbiology*, April: 901-905
- Jarzab B, Wiench M, Fujarewicz K, Simek K, Jarzab M, Oczko-Wojciechowska M, Wloch J, Czarniecka A, Chmielik E, Lange D, Pawlaczek A, Szpak S, Gubala E, Swierniak A (2005): Gene expression profile of papillary thyroid cancer: sources of variability and diagnostic implications. *Cancer Res* 65: 1587-1597
- Jin FY, Nathan C, Radzioch D, Ding A (1997): Secretory leukocyte protease inhibitor: a macrophage product induced by and antagonistic to bacterial lipopolysaccharide. *Cell* 88: 417-26
- Jo H, Kim JW (2005): Implications of HPV infection in uterine cervical cancer. *Cancer Ther.* 3: 419-434
- Kamangar F, Dores GM, Anderson WF (2006): Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol* 24: 2137-50
- Kida K, Mizuuchi T, Takeyama K, Hiratsuka T, Jinno S, Hosoda K, Imaizumi A, Suzuki Y (1992): Serum secretory leukoprotease inhibitor levels to diagnose pneumonia in the elderly. *Am Rev Respir Dis* 146: 1426-9
- Kikushi TT, Abe, Hoshi S (1998): Structure of the murine secretory leukoprotease inhibitor (Slpi) gene and chromosomal localization of the human and murine SLPI genes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19: 875-880
- Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Mishina T, Akie K, Nishi M, Hiroumi H, Hommura F, Kawakami Y (1996): Altered p16<sup>INK4</sup> and retinoblastoma protein status in non-small cell lung cancer: potential synergistic effect with altered p53 protein on proliferative activity. *Cancer Res* 56: 5557-5562
- Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, Dallenbach-Hellweg G, Schmidt D, von Knebel Doeberitz M (2001): Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *92*: 276-84
- Klussmann JP, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Kolligs J, Jungehuelsing M, Eckel HE, Dienes HP, Pfister HJ, Fuchs PG (2001): Prevalence, distribution, and viral load of human papillomavirus 16 DNA in tonsillar carcinomas. *Cancer* 92: 2875-2884

- Klussmann JP, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Eckel HE, Pfister HJ, Fuchs PG (2003): Human Papillomavirus-positive tonsillar carcinomas : a different tumor entity? *Med Microbiol Immunol* 192: 129-132
- Klussmann JP, Preuss SF, Speel EJ (2009): Humane Papillomaviren und Oropharynxkarzinome. *HNO* 57: 113-122
- Kocher TD, Wilson AC (1991): DNA amplification by polymerase chain reaction. In Brown TA, ed *Essential molecular biology a practical approach*, Vol. II. Oxford: IRL Press: 185-207
- Kovanda A, Kocjan BJ, Luzar B, Bravo IG, Poljak M (2011): Characterization of Novel Cutaneous Human Papillomavirus Genotypes HPV-150 and HPV-151. *PLoS One* 6: e22529
- Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S (2005): Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14: 467-75
- Kumaraswamy KL, Vidhya M (2011): Human papilloma virus and oral infections: An update. *J Can Res Ther* 7:120-127
- Larson DA, Derkay CS (2010): Epidemiology of recurrent respiratory papillomatosis. *APMIS* 118: 450-454
- Leemans Cr, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH (2011): The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev. Cancer* 11:9-22, Epub 2010
- Levi JE, Delcelo R, Alberti VN, Torloni H, Villa LL (1989): Human papillomavirus DNA in respiratory papillomatosis detected by in situ hybridization and the polymerase chain reaction. *Am J Pathol.* 135: 1179-84
- Licitra L, Perrone F, Bossi P, Suardi S, Mariani L, Artusi R, Oggioni M, Roscini C, Cantù G, Squadrelli M, Quattrone P, Locati LD, Bergamini C, Olmi P, Pierotti MA, Pierotti MA, Pilotti S (2006): High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 24:5630-5636
- Longworth MS und Laimins LA (2004): Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68: 362-372
- Lukas J, Parry D, Aagaard L (1995): Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumor suppressor p16. *Nature* 375: 503-506

- Majewski S und Jablonska S (1995): Epidermodysplasia verruciformis as model of human papillomavirus-induced genetic cancer of the skin. *Arch Dermatol* 131: 1312-1318
- Marcuzzi GP, Hufbauer M, Kasper HU, Weissenborn SJ, Smola S, Pfister H (2009): Spontaneous tumour development in human papillomavirus type 8 E6 transgenic mice and rapid induction by UV-light exposure and wounding. *J Gen Virol.* 90: 2855-64
- Maruyama M, Hay JG, Yoshimura K, Chu CS, Crystal RG (1994): Modulation of secretory leukoprotease inhibitor gene expression in human bronchial epithelial cells by phorbol ester. *J Clin Invest* 94: 368-75
- McKaig RG, Baric RS, Olshan AF (1998): Human papillomavirus and head and neck cancer: epidemiology and molecular biology. *Head Neck* 20: 250-265
- McNeely T B, Dealy M, Dripps DJ (1995): Secretory leukocyte protease inhibitor: a human saliva protein exhibiting anti-human immunodeficiency virus 1 activity in vitro. *J Clin Invest* 96: 456-464
- Melnick JL (1962) : Papovavirus group. *Science* 135: 1128-1130
- Melnick JL, Allison AC, Butel JS, Echart W, Eddy BE, Kit S, Levine AJ, Miles JAR, Pagano JS, Sachs L, Vonka V (1974): Papovaviridae. *Intervirology* 3: 106-120
- Mendelsohn AH, Lai CK, Shintaku IP, Elashoff DA, Dubinett SM, Abemayor E, St John MA (2010): Histopathologic findings of HPV and p16 positive HNSCC. *Laryngoscope* 120: 1788-94
- Mischke D, Genka T, Wille G, Lobeck H, Wild AG (1991): Keratins as molecular markers of epithelial differentiation: differential expression in crypt epithelium of human palatine tonsils. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 100: 372-377
- Myers G, Lu H, Calef C, Leitner T (1996): Heterogeneity of papillomaviruses. *Semin Cancer Biology* 7: 349-358
- Nakamura A, Mori Y, Hagiwara K, Suzuki T, Sakakibara T, Kikuchi T, Igarashi T, Ebina M, Abe T, Miyazaki J, Takai T, Nukiwa T (2003): Increased Susceptibility to LPS-induced Endotoxin Shock in Secretory Leukoprotease Inhibitor (SLPI)-deficient Mice. *J Exp Med.* 195: 669-674
- Nakamura K, Takamoto N, Hongo A, Kodama J, Abrzua F, Nasu Y, Kumon H, Hiramatsu Y (2008): Secretory leukoprotease inhibitor inhibits cell growth through apoptotic pathway on ovarian cancer. *Oncol Rep.* 19: 1085-1091

- Näsman A, Attner P, Hammarstedt L, Du J, Eriksson M, Giraud G, Ahrlund-Richter S, Marklund L, Romanitan M, Lindquist D, Ramqvist T, Lindholm J, Sparén P, Ye W, Dahlstrand H, Munck-Wikland E, Dalianis T (2009): Incidence of human papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: an epidemic of viral-induced carcinoma? *Int J Cancer* 125: 362-366
- Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM (2000): Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 18: 1135-1149
- Nystrom M, Bergenfeldt M, Ljungcrantz I, Lindeheim A, Ohlsson K (1999): Production of secretory leucocyte protease inhibitor (SLPI) in human pancreatic beta-cells. *Mediators Inflamm* 8: 147-51
- Odaka C, Mizuochi T, Yang J, Ding A(2003): Murine macrophages produce secretory leukocyte protease inhibitor during clearance of apoptotic cells: implications for resolution of the inflammatory response. *J Immunol* 171: 1507-1514
- Ohlsson K, Bjartell A, Lilja H (1995): Secretory leucocyte protease inhibitor in the male genital tract: PSA-induced proteolytic processing in human semen and tissue localization. *J Androl* 16: 64-74
- Old RW, Primrose SB (1994): Principles of gene manipulation. An introduction to genetic engineering. 5<sup>th</sup> ed. Oxford: Blackwell Science Ltd: 178-190
- Pai S, Westra W (2009): Molecular pathology of head and neck cancer: Implications for diagnosis, Prognosis, and Treatment. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 4: 49-70
- Pawlita M, Gissmann L (2009): [Recurrent respiratory papillomatosis: indication for HPV vaccination?]. *Dtsch Med Wochenschr* 134 Suppl 2: 100-102
- Pfister H (1984): Biology and biochemistry of papillomavirus types. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 99: 112-181
- Pfister H, Fuchs PG (1987): Papillomavirus: Particles, genome organisation and proteins. Heidelberg, Springer
- Pfister H, Fuchs PG (1994): Anatomy, taxonomy and evolution of papillomaviruses. *Intervirology* 37: 143-149
- Reimers N, Kasper HU, Weissenborn SJ, Stützer H, Preuss SF, Hoffmann TK, Speel EJM, Dienes HP, Pfister HJ, Guntinas-Lichius O, Klusmann JP (2007): Combined analysis of HPV-DNA, p16 and EGFR expression to predict prognosis in oropharyngeal cancer. *Int J Cancer* 120: 1731-1738

- Rein DT, Breidenbach M, Nettelbeck DM, Kawakami Y, Siegal GP, Huh WK, Wang M, Hemminki A, Bauerschmitz GJ, Yamamoto M, Adachi Y, Takayama K, Dall P, Curiel DT (2004): Evaluation of tissue-specific promoters in carcinomas of the cervix uteri. *J Gene Med* 6: 1281-1289
- Richart RM, Masood S, Syrjanen KJ, Vassilakos P, Kaufman RH, Meisels A, Olszewski WT, Sakamoto A, Stoler MH, Vooijs GP, Wilbur DC. (1998): Human papillomavirus. International Academy of Cytology Task Force summary. *Diagnostic Cytology Towards the 21st Century: An International Expert Conference and Tutorial. Acta Cytol* 42: 50-58
- Ringström E, Peters E, Hasegawa M, Posner M, Liu M, Kelsey KT (2002): Human papillomavirus type 16 and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res.* 8: 3187-92
- Roepman P, Wessels LFA, Kettelarij N, Kemmeren P, Miles AJ, Lijnzaad P, Tilanus MG, Koole R, Hordijk GJ, van der Vliet PC, Reinders MJ, Slootweg PJ, Holstege FC (2005): An expression profile for diagnosis of lymph node metastases from primary head and neck squamous cell carcinomas. *Nat Genet.* 37: 182-186
- Rous P, Kidd JG (1938): The carcinogenic effect of a papillomavirus on the tarred skin of rabbits. I. Description of the phenomenon, *J Exp Med* 67:399–422
- Rous P, Beard JW (1934): Carcinomatous changes in virus-induced papillomas of the skin of the rabbit, *Proc Soc Exp Biol Med* 32: 578–580
- Rubicki EP (1994): Standard PCR protocol. In: Coyne VE, James MD, Reid SJ, et al., eds. *Molecular biology techniques manual* 3<sup>rd</sup> ed. Capetown
- Saiki RK, Scharf S, Faloona FA (1985): Enzymatic amplification of beta globin sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anaemia. *Science* 230: 1350-1354
- Sallenave JM, Shulmann J, Crossley J, Jordana M, Gauldie J (1994): Regulation of secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI) and elastase-specific inhibitor (ESI/elafin) in human airway epithelial cells by cytokines and neutrophilic enzymes. *Am. J. Respir. Cell Mol Biol* 11: 733-741
- Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T (1998): Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol* 153: 1741-1748

- Schmitt M, Bravo IG, Snijders PJ, Gissmann L, Pawlita M, Waterboer T (2006): Bead-based multiplex genotyping of human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 44: 504-12
- Schmitt M, Dondog B, Waterboer T, Pawlita M (2008): Homogeneous amplification of genital human alpha papillomaviruses by PCR using novel broad-spectrum GP5+ and GP6+ primers. *J Clin Microbiol* 46: 1050-9
- Schmitt M, Dondog B, Waterboer T, Pawlita M, Tommasino M, Gheit T (2010): Abundance of multiple high-risk human papillomavirus (HPV) infections found in cervical cells analyzed by use of an ultrasensitive HPV genotyping assay. *J Clin Microbiol* 48:143-149
- Sehnert B, Cavcic A, Bohm B, Kalden JR, Nandakumar KS, Holmdahl R, Burkhardt H (2004): Antileukoproteinase: modulation of neutrophil function and therapeutic effects on anti-type II collagen antibody-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 50: 2347-59
- Serrano M, Hannon GJ, Beach D (1993): A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366: 704-707
- Shapiro GI, Edwards CD, Kobzik L (1995): Reciprocal Rb inactivation and p16<sup>INK4a</sup> expression in primary lung cancers and cell lines. *Cancer Res.* 55: 505-509
- Shope RE, Hurst EW (1933): Infectious papillomatosis of rabbits. *J Exp Med* 58: 607-627
- Shugars DC (1999): Endogenous mucosal antiviral factors of the oral cavity. *J Infect Dis* 179(Suppl. 3): 431-435
- Smeets SJ, Hesselink AT, Speel EJ, Haesevoets A, Snijders PJ, Pawlita M, Meijer CJ, Braakhuis BJ, Leemans CR, Brakenhoff RH (2007): A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. *Int J Cancer* 121: 2465-72
- Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Klussmann JP, Lee JH, Wang D, Haugen TH, Turek LP (2004): Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int. J. Cancer* 108: 766-772
- Smith EM, Wang D, Kim Y, Rubenstein LM, Lee JH, Haugen TH, Turek LP (2008): p16(INK4a) Expression, human papillomavirus, and survival in head and neck cancer. *Oral Oncol* 44: 133-142.

- Smith EM, Wang D, Rubenstein LM, Morris WA, Turek LP, Haugen TH (2008): Association between p53 and human papillomavirus in head and neck cancer survival. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 17: 421-427
- Snijders PJF, van den Brule HJF, Schreijnemakers HF, Snow GB, Meijer CJ, Walboomers JMM (1990): The use of general primers in the polymerase chain reactin permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *J Gen Virol* 71: 173-181
- Song X, Zeng L, Jin W, Thompson J, Mizel DE, Lei K, Billingham RC, Poole AR, Wahl SM (1999) : Secretory leukocyte protease inhibitor suppresses the inflammation and joint damage of bacterial cell wall-induced arthritis. *J Exp Med.* 190 : 535-542
- Sorensen O E, Cowland JB, Theilgaard-Monch K, Liu L, Ganz T, Borregaard N (2003): Wound healing and expression of antimicrobial peptides/polypeptides in human keratinocytes, a consequence of common growth factors. *J Immunol* 170: 5583-5589
- Srivastava S (2010): P16INK4a and MIB-1: an immunohistochemical expression in preneoplasia and neoplasia of the cervix. *Indian J Pathol Microbiol.* 53: 518-524
- St Guily JL, Clavel C, Okaïs C, Ptétet JL, Beby-Defaux A, Agius G, Birembaut P, Jacquard AC, Léocmach Y, Soubeyrand B, Riethmuller D, Denis R, Mougín C (2011): Human papillomavirus genotype distribution in tonsil cancers. *Head Neck Oncol.* 3: 6
- Stockfleth E, *Humane Papillomviren.* Springer Berlin/ Heidelberg 2005: 45-5
- Strauss MJ, Shaw EW, Bunting H, Melnick JL (1949): Crystalline virus-like particles from skin papillomas characterized by intranuclear inclusion bodies, *Proc Soc Exp Biol Med* 72: 46–50
- Sun Z, Yang P (2004): Role of imbalance between neutrophil elastase and alpha 1-antitrypsin in cancer development and progression. *Lancet Oncol* 5: 182-190
- Syrjanen S (2010): The role of human papillomavirus infection in head and neck cancers. *Ann Oncol* 21: 243-245
- Taggart CC, Greene CM, McElvaney NG, O'Neill S (2002): Secretory leucoprotease inhibitor prevents lipopolysaccharide-induced IkappaBalpha degradation without affecting phosphorylation or ubiquitination. *J Biol Chem* 277: 33648-33653
- Talamini R, Bosetti C, La Vecchia C, Dal Maso L, Levi F, Bidoli E, Negri E, Pasche C, Vaccarella S, Barzan L, Franceschi S (2002): Combined effect of tobacco and



alcohol on laryngeal cancer risk: a case-control study. *Cancer Causes Control* 13: 957-964

- Taylor GR (1992): Polymerase chain reaction: basic principles and automation. In: McPherson MJ, Quirke P, Taylor GR, eds. *PCR a practical approach*. Oxford, IRL Press: 1-14
- Termine N, Panzarella V, Falaschini S, Russo A, Matranga D, Lo Muzio L, Campisi G (2008): HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a meta-analysis (1988-2007). *Ann Oncol* 19: 1681-90
- Thompson RC, Ohlsson K (1986): Isolation, properties, and complete amino acid sequence of human secretory leukocyte protease inhibitor, a potent inhibitor of leukocyte elastase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 6692-6696
- Tonna J, Palefsky JM, Rabban J, Campos GM, Theodore P, Ladabaum U (2010): Esophageal verrucous carcinoma arising from hyperkeratotic plaques associated with human papilloma virus type 51. *Dis Esophagus* 23:E17-20
- Torrente MC, Rodrigo JP, Haigentz M Jr, Dikkers FG, Rinaldo A, Takes RP, Olofsson J, Ferlito A (2011): Human papillomavirus infections in laryngeal cancer. *Head Neck* 33: 581-586
- Tribius S, Ihloff AS, Rieckmann T, Petersen C, Hoffmann M (2011): Impact of HPV status on treatment of squamous cell cancer of the oropharynx: what we know and what we need to know. *Cancer Lett* 304: 71-79
- van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, Delabesse E, Davi F, Schuurin E, García-Sanz R, van Krieken JH, Droese J, Gonzáles D, Bastard C, White HE, Spaargaren M, Gonzáles M, Parreira A, Smith JL, Morgan GJ, Kneba M, Macintyre EA (2003): Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 17:2257-317
- van Ranst M, Fuse A, Fiten P, Beuken E, Pfister H, Burk RD, Opdenakker G. (1992): Human papillomavirus type 13 and pygmy chimpanzee papillomavirus type 1: comparison of the genome organizations. *Virology* 190: 587-596
- Vogelmeier C, Gillissen A, Buch R (1996): Use of secretory leukoprotease inhibitor to augment lung antineutrophil elastase activity. *Chest* 110: 261-266

- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah K (1999): Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189: 12-19
- Wallner O, Fritz H (1974): Characterization of an acid-stable proteinase inhibitor in human cervical mucus. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 355: 709–715
- Westin U, Fryksmark U, Polling A, Ohlsson K (1994): Localisation of secretory leucocyte proteinase inhibitor mRNA in nasal mucosa. *Acta Otolaryngol* 114: 199-202
- Westin U, Nyström M, Ljungcrantz I, Eriksson B, Ohlsson K (2002): The presence of elafin, SLPI, IL1-RA and STNF $\alpha$  in head and neck squamous cell carcinomas and their relation to the degree of tumor differentiation. *Mediat. Inflamm.* 11: 7-12
- Wieland U, Pfister H (1997): Molecular diagnosis of persistent human papilloma virus infections. *Intervirolgy* 39: 145-157
- Wiest T, Schwarz E, Enders C, Flechtenmacher C, Bosch FX (2002): Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control. *Oncogene* 21:1510-1517
- Wiesner J, Vilcinskas A (2010): Antimicrobial peptides: The ancient arm of the human immune system. *Virulence* 1:5: 440-464
- Whitaker NJ, Bryan TM, Bonnefin P, Chang AC, Musgrove EA, Braithwaite AW, Reddel RR (1995): Involvement of RB-1, p53, p16<sup>INK4</sup> and telomerase in immortalisation of human cells. *Oncogene* 11: 971-976
- Zhang Y, DeWitt DL, McNeely Tb, Wahl SM, Wahl LM (1997): Secretory leukocyte protease inhibitor suppresses the production of monocyte prostaglandin H synthase-2, prostaglandin E2, and matrix metalloproteinases. *J Clin Invest* 99: 894-900
- Zhang D, Simmen RCM, Michel FJ, Zhao G, Vale-Cruz D, Simmen FA (2002): Secretory leukocyte protease inhibitor mediates proliferation of human endometrial epithelial cells by positive and negative regulation of growth-associated genes. *J Biol Chem* 277: 29999-30009
- Zerfass K, Schulze A, Spitkosky D, Friedman V, Henglein B, Jansen-Dürr P (1995): Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. *J Virol* 69: 6389-6399

- Zheng S, Adachi A, Shimizu M, Shibata SI, Yasue S, Sakakibara A, Sugiura M, Nagasaka T, Tomita Y (2005): Human papillomaviruses of the mucosal type are present in some cases of extragenital Bowen`s disease. *Br J Dermatol.* 152: 1243-7
- zur Hausen H (1989): Papillomavirus in anogenital cancer as a model to understand the role of viruses in human cancer. *Cancer Res* 63: 4898-4903
- zur Hausen H (1998): Papillomavirus and p53. *Nature* 393: 217
- zur Hausen H (2000): Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 92: 690-8
- zur Hausen H (2009): Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology* 384: 260–265
- zur Hausen H, de Villiers EM (1994): Human Papillomaviruses. *Annu Rev Mikrobiol* 48: 427-447

## 8. ANHANG

	<b>Alter/ Geschlecht</b>	<b>Tumorlokalisation</b>	<b>TNM-Stadium/Grading</b>
1	47/m	T. lingualis	T4N2bM0/G3
2	67/w	T. palatina	T2N0M0/G2
3	61/m	T. lingualis	T3N2bM0/G2
4	61/m	T. palatina	T4N2bM0/G2
5	63/m	T. palatina	T1N2bM0/G2
6	53/w	T. palatina	T2N1M0/G2
7	64/m	T. palatina	T1N1M0/G2
8	70/w	T. palatina	T3N1M0/G1
9	60/m	T. lingualis	T3N2bM0/G2
10	51/m	T. lingualis	T2N1M0/G3
11	76/m	T. lingualis	T4N0M0/G2
12	53/m	T. palatina	T1N2aM0/G3
13	52/m	T. palatina	T1N2bM0/G2
14	54/m	T. palatina	T3N0M0/G2
15	59/m	T. palatina	T2N0M0/G3
16	47/m	T. palatina	T4N2bM0/G3
17	67/w	T. palatina	T3N2cM0/G2
18	72/m	T. lingualis	T4N2bM0/G2
19	63/m	T. palatina	T4aN2cM0/G2
20	68/m	T. palatina	T2N0M0/G2
21	54/m	Larynx	T3N0M0/G2
22	53/w	Larynx	T4N0M1/G3
23	72/m	Larynx	T3N0M0/G2
24	52/w	Larynx	T2N2cM0/G2
25	69/m	Larynx	T2N0M0/G2
26	70/m	Larynx	T4aN1M0/G2
27	61/m	Larynx	T4aN2bM0/G2
28	55/m	Larynx	T3N2cM0/G2-3
29	73/w	Larynx	T3N2cM0/G2
30	48/w	Larynx	T3N0M0/G2
31	58/m	Larynx	T3N2cM0/G2-3
32	73/m	Larynx	T3N0M0/G2
33	54/w	Larynx	T4N2cM0/G2
34	75/m	Larynx	T4aN0M0/G2
35	54/m	Larynx	T3N1M0/G2
36	55/w	Larynx	T3N0M0/G1
37	58/m	Larynx	T4N1M0/G2
38	56/m	Larynx	T3N0M0/G2
39	69/m	Larynx	T1N2cM1/G2
40	73/m	Larynx	T3N0M0/G2
41	58/w	Larynx	T4aN2cM0/G2
42	64/m	Larynx	T3N3M0/G2
43	56/m	Zungenrand	T4N3M0/G2

44	57/m	Zungenrand	T4aN0M0/G2
45	53/m	Zungenrand	T4N2cMx/G2
46	43/m	Zungenrand	T4N2cM0/G2
47	57/m	Zungenrand	T3N2bM0/G3
48	58/m	Zungenrand	T2N1M0/G3
49	52/m	Zungenrand	T2N0M0/G2
50	44/m	Zungenrand	T2N0M0/G2
51	64/m	Palatum molle	T3N2cM1/G1
52	53/w	Palatum molle	T1N2bM0/G2
53	71/m	Palatum molle	T3N2bM0/G3
54	52/m	Palatum molle	T2N0M0/G1
55	59/m	Hypopharynx	T4N1M0/G2
56	63/m	Hypopharynx	T3N0Mx/G2
57	52/m	Hypopharynx	T4N2bM0/G2
58	60/m	Hypopharynx	T4aN2bM0/G2
59	64/m	Hypopharynx	T4aN2bM0/G2
60	72/m	Hypopharynx	T4N0Mx/G2
61	55/m	Hypopharynx	T2N2bMx/G2
62	68/m	Hypopharynx	T2N0M0/G2
63	52/m	Hypopharynx	T4aN0M0/G2
64	79/m	Hypopharynx	T3N2cM0/G2
65	61/m	Hypopharynx	T1N2cM0/G2
66	52/m	Hypopharynx	T2N0M1/G2
67	43/m	Hypopharynx	T4aN2bM0/G3
68	69/m	Hypopharynx	T4aN0M0/G3
69	62/m	Hypopharynx	T4N2cM0/G2
70	65/m	Hypopharynx	T4aN0M0/G3
71	64/m	Hypopharynx	T2N2bM0/G3
72	47/m	Hypopharynx	T4N3M0/G3
73	61/m	Hypopharynx	T4N0M0/G2
74	75/m	Hypopharynx	T4N3M0/G2
75	57/m	Hypopharynx	T4N2cM0/G2
76	56/m	Hypopharynx	T4N2cM1/G3
77	58/m	Hypopharynx	T4N0M0/G2
78	66/m	Hypopharynx	T4aN0M0/G2-3

**Tabelle 1:** Klinikopathologische Daten der untersuchten Patienten, anatomische Tumorlokalisation, Tumorstadium und Grading der Karzinome (nach der TNM-Klassifikation der UICC 1992), benutzte Abkürzung: (m): männlich; (w): weiblich; (T): Tonsilla

	Alter/ Geschlecht	Lokalisation <sup>1</sup>	Diagnose <sup>2</sup>	Rauchgewohnheiten in Packungsjahren <sup>3</sup>	Alkohol- konsum <sup>4</sup>	SLPI <sup>5</sup>
1	51/m	Palatum molle	Rhonchopathie	Ex-Raucher (1,5 J)	-	+
2	63/m	Hypopharynx	Zenker Divertikel	Ex-Raucher (1,5 J),5PJ	<10g	++
3	51/m	Mundhöhle	Bronchialzyste	30PJ	<10g	++
4	52/m	Larynx	Chron. Laryngitis	50PJ	<10g	-/+
5	43/w	Larynx	Reinke Ödem	40PJ	<10g	++
6	49/m	Palatum molle	Rhonchopathie	30PJ	<10g	+
7	26/m	Palatum molle	Chron. Tonsillitis	15 PJ	<10g	++
8	13/w	Palatum molle	Chron. Tonsillitis	-	-	+
9	6/m	Palatum molle	Chron. Tonsillitis	-	-	+
10	53/m	Hypopharynx	Valleculazyste	-	<10g	+
11	59/m	Palatum molle	Rhonchopathie	-	<10g	+
12	2/w	Palatum molle	Hyperplastische Tonsillen	-	-	+
13	48/m	Palatum molle	Rhonchopathie	-	<10g	+
14	24/w	Palatum molle	Chron. Tonsillitis	-	<10g	-
15	24/m	Palatum molle	Chron. Tonsillitis	-	<10g	++
16	16/w	Palatum molle	Chron. Tonsillitis	-	-	+
17	46/m	Oropharynx	Chron. Tonsillitis	-	-	-/+
18	22/w	Palatum molle	Chron. Tonsillitis	-	-	++
19	4/w	Oropharynx	Chron. Tonsillitis	-	-	+

**Tabelle 2:** Demographische und klinische Merkmale der Patienten und Ergebnisse der untersuchten SLPI-Expression in klinisch unauffälliger Mukosa

Anmerkungen: benutzte Abkürzung: (m): männlich; (w): weiblich;

<sup>1</sup>Anatomische Lokalisation der entnommen Biopsie

<sup>2</sup>Diagnose und Begründung der Operation des Patienten

<sup>3</sup>Tabakkonsum in Packungsjahren

<sup>4</sup>Alkohol-Trinkgewohnheiten der Patienten. Alle Patienten, die über gelegentlichen Alkoholkonsum berichteten, sind leichte Trinker mit einem Alkoholkonsum von weniger als 10g pro Tag

<sup>5</sup>SLPI-Immunhistochemie-Ergebnisse: ++ mäßig positives Signal, + schwach positives Signal, - negativ.

	Alter/ Geschlecht	Tumor- Lokalisation	TNM/Grading	HPV-DNA-Genotypisierung			RNA <sub>3</sub>	SLPI <sub>4</sub>	p16 <sup>INK4</sup> <sub>5</sub>	Biologische Aktivität <sup>6</sup>	
				MPG/ Luminex <sup>1</sup>	LCD chip						End- ergebnis <sup>2</sup>
					PCR	Array					
1	47/m	T. lingualis	T4N2bM0/G3	16 niedrig	-			-	+++	++	
2	67/f	T. palatina	T2N0M0/G2	16 hoch	+	16	HPV16	+	+	+++	Aktiv
3	61/m	T. lingualis	T3N2bM0/G2	16 hoch	+	16	HPV16		++	+++	Aktiv*
4	61/m	T. palatina	T4N2bM0/G2	16 niedrig	-			-	-	-	
5	63/m	T. palatina	T1N2bM0/G2	16 hoch	+	16	HPV16	+	-	+++	Aktiv
6	53/f	T. palatina	T2N1M0/G2	16 hoch	+	16	HPV16	+	+++	+++	Aktiv
7	64/m	T. palatina	T1N1M0/G2	16 hoch	+	16	HPV16	+	-	+++	Aktiv
8	70/f	T. palatina	T3N1M0/G1	16 hoch	+	16	HPV16	+	+	+++	Aktiv
9	60/m	T. lingualis	T3N2bM0/G2	16 hoch	+	16	HPV16	+	-	+++	Aktiv
10	51/m	T. lingualis	T2N1M0/G3	16 hoch	+	16	HPV16	+	+	+++	Aktiv
11	76/m	T. lingualis	T4N0M0/G2	16 niedrig	-			-	++	++	
12	53/m	T. palatina	T1N2aM0/G3	16/42 niedrig	-				++	+	
13	52/m	T. palatina	T1N2bM0/G2	16 hoch	+	16	HPV16	+	+	-	Aktiv
14	54/m	T. palatina	T3N0M0/G2	16 niedrig	-			-	++	++	
15	59/m	T. palatina	T2N0M0/G3	16 niedrig	-	-		+	+	-	
16	47/m	T. palatina	T4N2bM0/G3	16 niedrig	-			-	+	-	
17	67/f	T. palatina	T3N2cM0/G2	16 hoch	+	16	HPV16	+	-	+++	Aktiv
18	72/m	T. lingualis	T4N2bM0/G2	16 niedrig	-			-	+	+	
19	63/m	T. palatina	T4aN2cM0/G2	16/18 hoch	+	18	HPV18		-	+++	Aktiv*
20	68/m	T. palatina	T2N0M0/G2	16 niedrig	+	16/18	HPV16/ 18	+	+	++	Aktiv
21	54/m	Larynx	T3N0M0/G2	16 niedrig	-			-	+++	-	
22	53/f	Larynx	T4N0M1/G3	16 niedrig	-			-	-	+	
23	72/m	Larynx	T3N0M0/G2	16 niedrig	+	16	HPV16	+	-	-	Aktiv
24	52/f	Larynx	T2N2cM0/G2	16 hoch	-	16	HPV16	+	-	+++	Aktiv
25	69/m	Larynx	T2N0M0/G2	16 hoch	-	-		-	++	++	
26	70/m	Larynx	T4aN1M0/G2	16 hoch	+	16	HPV16		+	+	Inaktiv*
27	61/m	Larynx	T4aN2bM0/G2	0	-			-	-	-	
28	55/m	Larynx	T3N2cM0/G2- 3	16 niedrig	-			-	+	-	
29	73/f	Larynx	T3N2cM0/G2	16 niedrig	-	-		+	+	++	
30	48/f	Larynx	T3N0M0/G2	16 niedrig	-	-		+	++	++	
31	58/m	Larynx	T3N2cM0/G2- 3	0	-			-	++	-	
32	73/m	Larynx	T3N0M0/G2	16 niedrig	-			-	-	+	
33	54/f	Larynx	T4N2cM0/G2	16 hoch	-	16	HPV16	-	-	-	Inaktiv
34	75/m	Larynx	T4aN0M0/G2	0	-				+++	-	
35	54/m	Larynx	T3N1M0/G2	16 niedrig	-				+	++	
36	55/f	Larynx	T3N0M0/G1	16 niedrig	-				++	-	
37	58/m	Larynx	T4N1M0/G2	16 niedrig	-				+	+++	
38	56/m	Larynx	T3N0M0/G2	16 niedrig	-			-	+++	-	
39	69/m	Larynx	T1N2cM1/G2	16 niedrig	-			-	+	+	
40	73/m	Larynx	T3N0M0/G2	16/18 niedrig	-				++	-	
41	58/f	Larynx	T4aN2cM0/G2	16 niedrig	-				+	-	
42	64/m	Larynx	T3N3M0/G2	16 niedrig	-				+	+	
43	56/m	Zungenrand	T4N3M0/G2	16 niedrig	-				++	+++	
44	57/m	Zungenrand	T4aN0M0/G2	16/18 niedrig	-			-	++	-	
45	53/m	Zungenrand	T4N2cMx/G2	16 niedrig	-				+++	+	
46	43/m	Zungenrand	T4N2cM0/G2	16 niedrig	-			-	+	-	
47	57/m	Zungenrand	T3N2bM0/G3	16 hoch	+	16	HPV16	+	-	+++	Aktiv

48	58/m	Zungenrand	T2N1M0/G3	16 hoch	-	16	HPV16	+	+	-	Aktiv
49	52/m	Zungenrand	T2N0M0/G2	16 niedrig	-			-	++	-	
50	44/m	Zungenrand	T2N0M0/G2	16 niedrig	-				++	+	
51	64/m	Palatum molle	T3N2cM1/G1	16/18 niedrig	-			-	-	-	
52	53/f	Palatum molle	T1N2bM0/G2	0	-				+	++	
53	71/m	Palatum molle	T3N2bM0/G3	16 niedrig	-			-	+	+	
54	52/m	Palatum molle	T2N0M0/G1	16 niedrig	+	16		-	+	+	
55	59/m	Hypopharynx	T4N1M0/G2	0	-			-	++	+	
56	63/m	Hypopharynx	T3N0Mx/G2	0	-				-	++	
57	52/m	Hypopharynx	T4N2bM0/G2	16 niedrig	-				-	-	
58	60/m	Hypopharynx	T4aN2bM0/G2	16 hoch	-	16	HPV16	-	-	+	Inaktiv
59	64/m	Hypopharynx	T4aN2bM0/G2	16 niedrig	-				-	-	
60	72/m	Hypopharynx	T4N0Mx/G2	16 niedrig	-			-	-	+	
61	55/m	Hypopharynx	T2N2bMx/G2	16 niedrig	-				-	++	
62	68/m	Hypopharynx	T2N0M0/G2	0	-			-	++	+++	
63	52/m	Hypopharynx	T4aN0M0/G2	16 hoch	-	16	HPV16	-	+	+++	Inaktiv
64	79/m	Hypopharynx	T3N2cM0/G2	16 niedrig	-			-	+	+	
65	61/m	Hypopharynx	T1N2cM0/G2	16 niedrig	-			-	-	-	
66	52/m	Hypopharynx	T2N0M1/G2	16 niedrig	-			-	++	-	
67	43/m	Hypopharynx	T4aN2bM0/G3	16 niedrig	-			-	-	-	
68	69/m	Hypopharynx	T4aN0M0/G3	16 niedrig	-			-	-	-	
69	62/m	Hypopharynx	T4N2cM0/G2	16 niedrig	-				-	-	
70	65/m	Hypopharynx	T4aN0M0/G3	16 hoch	+	16	HPV16		-	+++	Aktiv*
71	64/m	Hypopharynx	T2N2bM0/G3	16 hoch	+	16	HPV16	-	+	++	Inaktiv
72	47/m	Hypopharynx	T4N3M0/G3	0	-			-	-	-	
73	61/m	Hypopharynx	T4N0M0/G2	16 niedrig	-			-	+	-	
74	75/m	Hypopharynx	T4N3M0/G2	16 niedrig	-			-	-	-	
75	57/m	Hypopharynx	T4N2cM0/G2	16 niedrig	-			-	++	-	
76	56/m	Hypopharynx	T4N2cM1/G3	16 niedrig	-			-	-	+	
77	58/m	Hypopharynx	T4N0M0/G2	16 niedrig	-			-	+++	-	
78	66/m	Hypopharynx	T4aN0M0/G2-3	16 niedrig	-				++	-	

**Tabelle 4:** Demographische und klinische Merkmale der Patienten und Ergebnisse der untersuchten Tumore



Anmerkungen: benutzte Abkürzung: (m): männlich; (w): weiblich; (T): Tonsilla

<sup>1</sup>MPG/Luminex: Fälle mit niedriger viraler Belastung wurden als HPV-DNA negativ betrachtet und Fälle mit hoher viraler Belastung als HPV-DNA positiv.

<sup>2</sup>Für die endgültige Bestimmung des HPV-DNA-Status und der HPV-Genotypisierung wurden die Ergebnisse der MPG/ Luminex-, LCD-chip-array -DNA-Analyse und die E6\*I-mRNA-Analyse betrachtet. Wenn zwei von den drei Methoden korrespondierende positive Ergebnisse erzielten, wurden die Fälle als HPV-DNA positiv eingestuft.

<sup>3</sup>Ergebnisse der E6\*I-mRNA-Analyse. Wenn keine RNA verfügbar war (n= 24), ist kein Ergebnis angegeben.

<sup>4</sup>SLPI-Immunhistochemie-Ergebnisse: +++ stark positives Signal, ++ mäßig positives Signal, + schwach positives Signal, - negativ.

<sup>5</sup>p16<sup>INK4a</sup>-Immunhistochemie-Ergebnisse: +++ stark positives Signal, ++ moderat positives Signal, + schwach positives Signal, - negativ.

<sup>6</sup>Als biologisch aktive HPV-Infektionen wurden die Fälle dann betrachtet, wenn die E6\*I-mRNA-Analyse positiv und auch eine der beiden angewandten HPV-DNA-Detektion positiv waren. Eine Ausnahme bilden die vier\*-markierten Fälle. RNA für weitere Analysen war in diesen Fällen nicht verfügbar, so dass in diesen Fällen mit zweifach positivem HPV-DNA-Nachweis die Ergebnisse der p16<sup>INK4a</sup>-Immunhistochemie mit betrachtet wurden. Dabei ist eine starke Färbung als biologisch aktiv und eine schwache Färbung als biologisch inaktiv gewertet worden.

## DANKSAGUNG

Für den Arbeitsplatz an der Universitätsklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und die dort vorgefundenen guten Arbeitsbedingungen danke ich der Direktorin, Frau Professor Dr. Petra Ambrosch.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. Markus Hoffmann, leitender Oberarzt dieser Klinik, für die Überlassung des Themas und die wirklich sehr freundliche, engagierte und hervorragende wissenschaftliche Betreuung und die jederzeit gewährte Unterstützung. Sein Engagement weckte in mir die Begeisterung für wissenschaftliches Arbeiten.

Danken möchte ich auch Dr. Christian Cordes, der uns ebenfalls bestens betreute und bei der anfänglichen Laborarbeit immer helfend zur Seite stand.

Ein großer Dank gilt auch Herrn Privatdozent Dr. Tibor Görögh für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und die vielen Hilfestellungen bei der Durchführung des experimentellen Teils dieser Promotionsarbeit.

Ebenso möchte ich mich herzlich bei Frau Anne-Marie Roen für ihre unverzichtbare Unterstützung und für die vielen angenehmen Stunden im Labor bei der Durchführung der Experimente bedanken.

In Dankbarkeit verbunden bin ich Herrn Dr. Markus Schmitt vom Forschungsschwerpunkt Infektionen und Krebs des Deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg für eine hervorragende Zusammenarbeit sowie für seinen fachlichen Rat und die Ermöglichung der Durchführung der Luminex-Methode im Labor des Forschungsschwerpunktes.

Für die professionelle Begleitung in der Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Schnitte danke ich Herrn Prof. Dr. Christoph Röcken, Leiter des Institutes für Pathologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Meiner sehr guten Freundin Claudia Burkhardt danke ich sehr für die vielen schönen, abwechslungsreichen und manchmal auch nervenaufreibenden Stunden bei der Durchführung der Experimente; ohne sie wäre ich nicht zu diesem Dissertationsthema gekommen.

Danken möchte ich auch meinen Großeltern, die mir viele Stunden beim Schreiben der Promotionsarbeit und während des gesamten Studiums verschönert haben. Ebenso danke ich meinem Freund Steffen, der mir wertvolle Ratschläge geben konnte, sowie meinen Geschwistern Jan, Moritz und Franziska.

In Liebe und ganz besonderer Dankbarkeit möchte ich diese Arbeit meinen Eltern Kathrin und Johannes widmen, die mich immer unterstützt haben und einen großen Teil zur Korrektur dieser Promotionsarbeit beigetragen haben.

**LEBENS LAUF****Persönliche Angaben:**

Name: Lena Charlotte Hebebrand

Geburtsdatum: 24.07.1987

Geburtsort: Bonn

Familienstand: ledig

**Schulbildung:**

1993-1997 Gerhart-Hauptmann-Schule in Marburg

1997-2003 Gymnasium Philippinum in Marburg

2003-2004 Evansville Day School in Evansville, Indiana, USA

2004-2006 Grashof-Gymnasium in Essen

2006 Abitur

**Studium:**

2006-2008 Vorklinisches Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

2008 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

2008-2011 Klinisches Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

2011-2012 Praktisches Jahr im Rahmen des Medizinstudiums  
 1. Tertial: Kinder- und Jugendpsychiatrie ZIP UKSH Kiel  
 2. Tertial: Chirurgie Städtisches Krankenhaus Kiel  
 3. Tertial: Innere Medizin Diakonie Flensburg

2012 voraussichtlich 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

**Promotion:**

2009-2012           Anfertigung der Dissertation an der Universitätsklinik für Hals-, Nasen-,  
Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Christian-Albrechts-  
Universität zu Kiel mit dem Thema:  
Humane Papillomvirus-Infektion in Kopf- und Halskarzinomen:  
Die Rolle der Antileukoproteinase „Secretory Leukocyte Protease  
Inhibitor“ (SLPI)

**Publikationen:**

The level of secretory leukocyte protease inhibitor is decreased in metastatic head and neck  
squamous cell carcinoma. International Journal of Oncology

Human papillomavirus infection in head and neck cancer – does the secretory leukocyte  
protease inhibitor (SLPI) matter? (eingereicht)

**ERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit selbständig von mir verfasst wurde und keine weiteren als die darin angegebenen Quellen und Hilfsmittel Verwendung fanden. Diese Arbeit wurde bisher weder ganz noch in Auszügen an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Ferner erkläre ich, dass ich noch keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

Kiel, den.....

.....  
(Lena Hebebrand)