

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

Humane Papillomvirus-Infektionen in Karzinomen des Kopf- und Halsbereiches:
Die Rolle der Antileukoproteinase „*secretory leukocyte protease inhibitor*“ (SLPI) in
Tabakrauch-induzierten, HPV-unabhängigen Plattenepithelkarzinomen

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

vorgelegt von
PAUL MÖLLER
aus Greifswald

Kiel 2014

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Markus Hoffmann, Klinik für Hals-, Nasen- und
Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dietrich Kabelitz, Institut für Immunologie

Tag der mündlichen Prüfung: 15.06.2015

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 13.04.2015

gez.: Prof. Dr. Hans-Jürgen Wenz
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Fragestellung	3
3.	Material und Methoden	4
3.1	Material	4
3.2	Methoden	4
3.2.1	DNA- und RNA-Extraktion	4
3.2.2	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	5
3.2.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	6
3.2.3.1	Amplifikationsfähigkeit der DNA	6
3.2.3.2	HPV-PCR	7
3.2.4	DNA-Detektion	8
3.2.4.1	Gelelektrophorese	8
3.2.4.2	Aufreinigung der PCR-Produkte	9
3.2.4.3	DNA-Sequenzierung	10
3.2.4.4	Auswertung der Gensequenz	10
3.2.5	Angewandte Färbemethoden	11
3.2.5.1	Gewebeaufarbeitung	11
3.2.5.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	11
3.2.5.3	SLPI-Immunhistochemie	11
3.2.5.4	P16 ^{INK4a} -Immunhistochemie	13
3.2.5.5	Auswertung	13
3.2.6	Statistische Analyse	14
4.	Ergebnisse	15
4.1	HPV-DNA-Nachweis	15
4.2	Immunhistochemischer Nachweis der p16 ^{INK4a} -Expression	16
4.3	Immunhistochemischer Nachweis der SLPI-Expression	16
4.3.1	SLPI-Expression bei Patienten mit Kopf- und Halskarzinomen	17
4.3.1.1	SLPI-Expression in Abhängigkeit der Rauchgewohnheiten bei Patienten mit Kopf- und Halskarzinomen	18
4.3.2	SLPI-Expression bei Patienten ohne Neoplasie	19

4.3.2.1	SLPI-Expression in Abhängigkeit der Rauchgewohnheiten bei Patienten ohne Neoplasie	19
4.3.3	SLPI-Expression in Abhängigkeit des HPV-Status	20
4.4	SLPI- und Annexin-A2-Genexpression	21
5.	Diskussion	23
5.1	Humane Papillomviren	23
5.1.1	Aufbau der humanen Papillomviren	24
5.1.2	Pathophysiologie der humanen Papillomviren	24
5.1.3	HPV-assoziierte Läsionen	27
5.2	P16 ^{INK4a}	29
5.3	Die Antileukoproteinase <i>Secretory Leucocyte Protease Inhibitor (SLPI)</i>	31
5.4	Annexin A2	33
5.5	HPV-Prävalenz in Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereiches	34
5.6	Zusammenhang zwischen SLPI-Expression und Rauchverhalten bei Patienten mit Kopf- und Halskarzinomen	36
5.7	SLPI- Expression in der gesunden Schleimhaut bei Patienten mit Kopf- und Halskarzinomen	37
5.8	Zusammenhang zwischen SLPI-Expression und Rauchverhalten bei Patienten ohne Neoplasie	38
5.9	Zusammenhang zwischen SLPI- und Annexin-A2- Genexpression	40
5.10	Schlussbetrachtung	41
6.	Zusammenfassung	43
7.	Literaturverzeichnis	45
	Danksagung	
	Erklärung	
	Lebenslauf	

Abkürzungsverzeichnis

CDK	Cyclin-abhängige Kinase
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF	Eukaryotischer Initiationsfaktor
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPV	Humanes Papillomvirus
IL	Interleukin
LCR	<i>Long control region</i>
mRNA	<i>Messenger-Ribonukleinsäure</i>
mTor	<i>mechanistic Target of Rapamycin</i>
n	Anzahl
NCR	<i>Non-coding region</i>
ORF	Offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
Ori	Replikationsursprung (<i>origin of replication</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PLZF	<i>Promyelocytic leukaemia zinc finger gene</i>
RAG	<i>Recombination activating gene</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RSV	Respiratorisches-Synzytial-Virus
SLPI	<i>Secretory Leukocyte Proteinase Inhibitor</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>Tris-buffered Saline</i>
TBXAS	<i>thromboxane synthase gene</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor α

1. Einleitung

Plattenepithelkarzinome des Kopf- und Halsbereiches stehen mit einem Anteil von sieben Prozent an der sechsten Stelle der häufigsten malignen Tumoren des Menschen. Jährlich werden in Europa und den Vereinigten Staaten von Amerika rund 70.000 neue Fälle diagnostiziert und etwa 10.000 Menschen erliegen dieser Erkrankung pro Jahr (Miller et al. 2012; Marty et al. 2013). Die Hauptrisikofaktoren in der Tumorentstehung bilden die karzinogenen Stoffe des Tabakrauchs und des Alkohols (Baez 2008). Es finden sich jedoch Patienten, bei denen diese Risikofaktoren nicht vorliegen. In diesen Fällen werden humane Papillomviren (HPV) als Ursache diskutiert (zur Hausen et al. 1994; Hoffmann et al. 1998; Gillison et al. 2001). In der Entstehung von Zervixkarzinomen sind die Viren seit Langem als kausale Ursache anerkannt (zur Hausen 1989). Dies betrifft wahrscheinlich auch Karzinome des oberen Aerodigestivtraktes. So zeigen epidemiologische Untersuchungen, dass etwa 20 bis 30 % aller Kopf- und Halskarzinome mit einer HPV-Infektion assoziiert sind (Ringstrom et al. 2002; Hoffmann et al. 2010).

Trotz Voranschreitens der Tumorchirurgie und der Weiterentwicklung von Radio- und Chemotherapie hat sich die Gesamtsterblichkeit der Kopf- und Halskarzinome mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 50 % in den letzten Jahrzehnten kaum verändert (O'Rorke et al. 2012). Dies ist möglicherweise auf einheitliche Therapieregimes zurückzuführen, welche nicht zwischen den verschiedenen biologischen Merkmalen der Karzinome unterscheidet (Akervall et al. 2004). HPV-assoziierte Tumoren zeigen unterschiedliches Verhalten bezüglich Differenzierung, Wachstum und Metastasierung gegenüber Tumoren mit klassischen Risikofaktoren, wie Tabak und Alkohol (Hoffmann et al. 2005a; Hoffmann et al. 2010; Syrjanen, S. 2010b). Diese Erkenntnisse stützen zunehmend den Verdacht einer eigenständigen Tumorentität. Mit der Unterscheidung zwischen HPV-positiven und HPV-negativen Tumorentitäten und daraus resultierenden unterschiedlichen Therapiestrategien zeigt sich nun eine Verbesserung der Prognose. Der Überlebensvorteil betrifft vor allem Patienten mit HPV-positiven Karzinomen (Weinberger et al. 2006; Hoffmann et al. 2010; Tribius et al. 2011).

Die Antileukoproteinase SLPI (*secretory leukocyte protease inhibitor*) schützt in seiner physiologischen Funktion Epithelien vor endogenen, proteolytischen Enzymen

und verhindert so beispielsweise eine Schädigung des Gewebes bei einer Entzündungsreaktion (Nakamura, A. et al. 2003; Sehnert et al. 2004). Die Rolle des Proteins in der Entstehung und Progression von Tumoren ist noch nicht abschließend geklärt. Bei vielen verschiedenen Tumorentitäten kann eine Erhöhung der SLPI-Expression beobachtet werden (Garver et al. 1994). Die Auswirkung auf die Entstehung von Metastasen wird hingegen kontrovers diskutiert. In Ovarialkarzinomen und auch in Karzinomen des Kopf- und Halsbereiches verhindern hohe SLPI-Konzentrationen die Metastasenbildung (Roepman et al. 2005; Nakamura, K. et al. 2008; Cordes et al. 2011), in Lungenkarzinomen fördern sie diese (Devoogdt et al. 2003).

In Kopf- und Halskarzinomen zeigen sich erhöhte SLPI-Expressionen im Vergleich zu gesundem Gewebe. Dies ist sowohl in vitro (Dasgupta et al. 2006) als auch in vivo (Roepman et al. 2005; Cordes et al. 2011) Untersuchungen nachgewiesen worden. Bei genauerer Betrachtung betrifft diese Expressionserhöhung vor allem Karzinome mit einem negativen HPV-Status. In der Tat besteht eine reziproke Korrelation zwischen HPV-Infektion und SLPI-Expression. Diese Beobachtung führt zu der Annahme, dass niedrige SLPI-Konzentrationen eine HPV-Infektion begünstigen. Im Umkehrschluss stellen hohe Konzentrationen des Proteins einen Schutzfaktor gegenüber einer Infektion mit dem Virus dar (Hoffmann et al. 2013). Diese protektive Rolle von SLPI wird durch eine aktuelle Untersuchung weiter untermauert: Es zeigt sich in vitro eine verminderte HPV-Infektion solcher Zellen, bei denen Annexin-A2, Bindungsmolekül für SLPI als auch HPV, durch seinen natürlichen Liganden SLPI geblockt ist (Woodham et al. 2012). Tabakrauch wiederum scheint einen positiven Effekt auf die SLPI-Expression zu haben. Letztere Beobachtung führt zu der Hypothese, dass Tabakrauch in den Schleimhäuten des Menschen zu erhöhten SLPI-Expressionen führt und damit einen Schutz vor HPV-Infektionen und konsekutiv vor HPV-induzierten Karzinomen darstellt. An diesem innovativen Punkt setzt die vorliegende Arbeit an und untersucht erstmals den Zusammenhang zwischen Tabakrauch und SLPI in Tumorgewebe und der gesunden Schleimhaut derselben Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen und in der klinisch unauffälligen Schleimhaut von Patienten ohne maligne Erkrankung.

2. Fragestellung

Die vorliegende Arbeit untersucht gezielt den Zusammenhang zwischen SLPI-Expression und Rauchverhalten. Es wird dabei erstmalig auf das Verhalten der SLPI-Expression bei gesunden Individuen eingegangen. Folgende Fragen werden in diesem Kontext erörtert:

1. Wie hoch ist die HPV-Prävalenz in Kopf- und Halskarzinomen? Wie hoch ist der Anteil in den Tonsillkarzinomen?
2. Kann der CDK-Inhibitor p16^{INK4a} zuverlässig HPV-positive Gewebeproben anzeigen und somit als Surrogatmarker dienen?
3. Findet sich im Karzinomgewebe des Kopf- und Halsbereiches eine Erhöhung der Expression der Antileukoproteinase SLPI?
4. Lassen sich erhöhte SLPI-Expressionen auch in der gesunden Schleimhaut von Patienten mit Kopf- und Halskarzinomen nachweisen?
5. Gibt es eine Korrelation zwischen Rauchverhalten und SLPI-Expression? Lässt sich diese Korrelation bereits in der Schleimhaut gesunder Individuen feststellen?
7. Wie stellt sich das SLPI-Expressionsmuster in HPV-positiven Gewebeproben dar?
8. Lässt sich eine Erhöhung der SLPI-Expression im Raucherkollektiv auch auf der Ebene der mRNA nachweisen? Wie verhält sich das Genexpressionsniveau des Rezeptors Annexin A2 in Abhängigkeit des Tabakkonsums?

3. Material und Methoden

3.1. Material

In den Jahren 2011 und 2012 sind in der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel 110 Gewebeproben von 74 Patienten gewonnen worden. Darunter befinden sich 36 Gewebeproben mit histopathologisch gesichertem Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Halsbereiches (36 Patienten: 26 männlich, 10 weiblich, 20 Raucher, 16 Nichtraucher, Altersspanne von 45 bis 87 Jahren, Altersdurchschnitt 64,5 Jahre), sowie jeweils eine Probe klinisch gesunder Schleimhaut derselben Patienten. Die anatomische Verteilung der Tumoren ist wie folgt: Tonsilla palatina, n = 6; Tonsilla lingualis, n = 6; Larynx, n = 8; Hypopharynx, n = 6; Oropharynx, n = 6; Cavum oris, n = 3. Es sind weiterhin 38 Gewebeproben klinisch gesunder Schleimhaut der Luft- und oberen Speisewege entnommen worden (38 Patienten: 26 männlich, 12 weiblich, 18 Raucher, 20 Nichtraucher, Altersspanne von 2 bis 83 Jahren, Altersdurchschnitt 47 Jahre), welche von Patienten mit einer nicht-malignen Erkrankung stammen. Für die Gewebeprobenentnahme liegt die schriftliche Zustimmung zur wissenschaftlichen Nutzung der Patienten vor. Die Ethikkommission der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel hat die vorliegende Untersuchung positiv bewertet (D417/12).

Für die DNA- und RNA-Gewinnung wird ein Teil jeder Gewebeprobe in sterile Reaktionsbehältnisse (Safe Lock, 1,5 ml, Eppendorf, Hamburg) überführt, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt. Weitere Anteile der Gewebeprobe werden in 4%igem Formalin fixiert und für die histopathologische Routineuntersuchung im Institut für Pathologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel aufbereitet.

3.2 Methoden

3.2.1 DNA- und RNA-Extraktion

Die DNA- und RNA-Extraktionen werden simultan mit dem Allprep Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt: Zunächst findet eine Homogenisierung (Precellys Homogenisator, Peq Lab, Erlangen) von 25 mg Gewebematerial in 600 µl der RLT-

Allprep-Pufferlösung statt. Das Lysat wird mittels einer Zentrifuge (Centrifuge 5418, Eppendorf, Hamburg) 3 min bei Höchstgeschwindigkeit sedimentiert, der Überstand vorsichtig abpipettiert, in eine DNA-Trennsäule gegeben und gut verschlossen für 30 s bei 10000 rpm zentrifugiert. Die Trennsäule filtert mittels einer speziellen Membran die DNA-Bestandteile aus dem Lysat. Die restliche Lösung wird in einem 2 ml-Reaktionsgefäß aufgefangen und für die Aufreinigung der RNA verwendet. Die DNA-Trennsäule durchläuft zwei Waschgänge mit 500 µl AW1-Puffer für 15 s bei 10000 rpm und 500 µl AW2-Puffer für 2 min auf höchster Stufe in der Zentrifuge. Dann kann die DNA aus der Membran gelöst werden. Es werden dazu 100 µl, auf 70 °C vorgewärmter EB-Puffer auf die Membran gegeben. Nach einer Inkubation von 2 min bei Raumtemperatur können die DNA-Bestandteile anschließend durch eine Zentrifugierung für 1 min bei 10000 rpm freigesetzt werden.

Für die RNA-Gewinnung wird dem oben erhaltenen Eluat 430 µl reines Ethanol hinzugegeben und mit Hilfe einer Pipette gut vermenget. Aus dieser Lösung werden 700 µl in die RNeasy-Trennsäule pipettiert und für 15 s bei 10000 rpm zentrifugiert. Das Prinzip ähnelt der DNA-Gewinnung. Die Trennsäule mit der angehefteten RNA wird zunächst dreimalig gewaschen: mit 700 µl RW1-Puffer für 15 s bei 10000 rpm, mit 500 µl RPE-Puffer für 15 s bei 10000 rpm und mit 500 µl RPE-Puffer für 2 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Nach jedem Waschvorgang wird der Puffer verworfen. Jetzt kann die RNA aus der Membran gelöst werden. In einem neuen Sammelreaktionsgefäß wird die RNeasy-Trennsäule mit 50 µl RNase-freiem Wasser (DEPC (diethylpyrocarbonate)-treated water, Bionline, Luckenwalde), bei 10000 rpm für 1 min zentrifugiert.

Die Lösungen mit der gewonnenen DNA und RNA werden bei 4 °C aufbewahrt.

3.2.2 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung erfolgt mittels eines Spektralphotometers (Nano Drop Spectrophotometer ND-1000, Peq Lab Biotechnologie GmbH, Erlangen) bei einer Wellenlänge von 260 nm.

Nach der Konzentrationsbestimmung werden alle DNA-Lösungen zu einer einheitlichen Konzentration von 10 ng/µl mit nukleasefreiem Wasser (Ambion, autoclaved, 0,2 µm filtered, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) verdünnt. Lösungen mit einer niedrigeren Konzentration durchlaufen die nächsten Schritte unverdünnt.

3.2.3 Polymerasekettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist eine Methode zur Vervielfältigung kleinster DNA-Mengen *in vitro*. Sie ist von Kary Mullis im Jahr 1983 erfunden worden (Mullis et al. 1986). Die Reaktion besteht aus 30 bis 40 identischen Zyklen. Jeder Zyklus beinhaltet ein definiertes Temperaturschema, durch welches die Schritte der Denaturierung, der Primerhybridisierung (*Annealing*) und der Extension (Polymerisation) katalysiert werden. Beliebige DNA-Sequenzen können so exponentiell amplifiziert werden. Die PCR stellt einen bedeutenden Schritt in der Molekularbiologie dar, der weitere DNA-Untersuchungsverfahren erst ermöglicht.

3.2.3.1 Amplifizierbarkeit der DNA

Die Fähigkeit zur Amplifikation der DNA wird durch das BIOMED-2 Protokoll (van Dongen et al. 2003) geprüft: Es werden Gene mit exakt 100 (TBXAS, Exon 9), 200 (RAG1, Exon 2), 300 (PLZF, Exon 1) und 400 (AF4, Exon 3) Basenpaaren vermehrt. Das Ergebnis der HPV-DNA-Analyse kann nur gewertet werden, wenn die Amplifizierbarkeit der DNA in diesem Schritt nachgewiesen wird. Eine Positiv- sowie eine Negativprobe werden bei jedem Schritt mitgeführt.

Der Reaktionsansatz besteht aus 2,5 µl 10-fach konzentriertem Puffer, 0,25 µl Taq-Polymerase (beide Hot Star Taq DNA Polymerase, Qiagen, Hilden), 1,25 µl Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP-Mix, 2 mM each, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), jeweils 2 Primerpaaren (je 10 µM) für die verschiedenen Exone je 1 µl und 14 µl RNase-freiem Wasser. Dazu werden 5 µl der DNA (10 ng/µl) pipettiert.

Die Polymerasekettenreaktion läuft in einem Thermocycler (DNA Engine Peltier Thermal Cycler, Bio Rad, Hercules, CA, USA) ab. Die Initialisierung für ein vollständiges Trennen der DNA-Doppelstränge erfolgt bei 95 °C für 10 min, gefolgt von 37 Wiederholungen mit einer Denaturierungstemperatur von 95 °C für 45 s, einer Annealingtemperatur von 55 °C für 40 s und der Elongationstemperatur von 72 °C für 45 s. Nach abschließenden 72 °C für 5 min werden die Reaktionsendprodukte bei 4 °C aufbewahrt. Während der Reaktion werden die Deckel der Reaktionsgefäße mit 105 °C beheizt, um ein Kondensieren der PCR-Produkte zu verhindern.

3.2.3.2 HPV-PCR

Für den HPV-Nachweis mittels Polymerasekettenreaktion werden zwei Primer-Systeme verwendet. Beide Systeme amplifizieren eine unterschiedliche Region aus dem Open-Reading-Frame L1. Es werden die Primer MY09/MY11 und die General Primer GP5+/GP6+ verwendet.

Alle Primer sind nach folgender Sequenz von der Firma „biomers.net“ (Biomers.net GmbH, Ulm) angefertigt worden (Tab.1):

HPV-Primer	Sequenz
GP5+	5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3'
GP6+	5'-GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3'
MY09	5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3'
MY11	5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3'
HMBO1	5'-GCGACCCAATGCAAATTGGT-3'

Tab. 1: Basensequenzen der verwendeten Primer für die HPV-Detektion

Die folgenden Arbeitsschritte werden auf sterilen Arbeitsplatten mit sterilen Arbeitsmaterialien und räumlich strikt getrennt vom PCR-Cycler und der weiteren DNA-Aufbereitung durchgeführt. Die Reagenzien werden während der Zusammenstellung auf Eis gelagert.

Der Ansatz pro Probe setzt sich wie folgt zusammen: für den HPV-General-Primer GP5+/GP6+: 2,5 µl 10-fach konzentrierter Puffer; 2 µl Magnesiumchlorid (MgCl₂);

0,25 µl Taq-Polymerase (alle Hot Star Taq DNA Polymerase, Qiagen, Hilden); 2,5 µl Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP-Mix, 2 mM each, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) 1,25 µl GP5+; 1,25 µl GP6+ (je 10 µM); 5,25 µl nukleasefreies Wasser (Ambion, autoclaved, 0,2 µm filtered, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) und 10 µl DNA in einer Konzentration von 10 ng/µl

Für die MY09/MY11-Primer: 2,5 µl 10-fach konzentrierter Puffer; 2,5 µl Magnesiumchlorid ($MgCl_2$); 2,5 µl Desoxyribonukleosidtriphosphate; 1,25 µl MY09; 1,25 µl MY11; 0,2 µl HMBO1 (je 10 µM); 4,55 µl nukleasefreies Wasser; 0,25 µl Taq-Polymerase und 10 µl DNA in einer Konzentration von 10 ng/µl. Zusammen enthält eine Probe 15 µl Reagenzien plus 100 ng DNA.

Die Polymerasekettenreaktion findet nach folgenden Schemata in einem Thermocycler (DNA Engine Peltier Thermal Cycler, Bio Rad, Hercules, CA, USA) statt: GP5+/6+ Primer: 95 °C für 15 min; 40 Wiederholungen mit 95 °C für 1 min; 40 °C für 1 min; 72 °C für 1 min und zum Abschluss 72 °C für 5 min. MY09/MY11 Primer: 95 °C für 15 min; 40 Wiederholungen mit 95 °C für 1 min; 55 °C für 1 min; 72 °C für 1 min und zum Abschluss 72 °C für 5 min. Die Aufbewahrung erfolgt jeweils bei 4 °C. Ebenfalls werden bei allen Reaktionen die Deckel auf 105 °C erwärmt, um die Kondensation der wässrigen Bestandteile zu verhindern.

Es werden bei jedem Reaktionsansatz sowohl eine Positiv- als auch eine Negativkontrolle mitgeführt. Für die Positivkontrolle dient die HPV16-positive Zervixkarzinomzelllinie Siha und für die Negativkontrolle ersetzt nukleasefreies Wasser die DNA-Probe.

3.2.4 DNA-Detektion

3.2.4.1 Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wird ein 2%iges Agarosegel angefertigt. Dazu werden vier Agatabs (0,5 g, Agatabs, Eurogentec, Köln) in 100 ml Agarosepuffer (4,84 g Trishydroxymethyl-aminomethan; 2 ml 0,5 M Natrium-EDTA, pH 8,0; 1,42 ml Essigsäure; alle Reaktionsbestandteile werden mit Aqua destillata auf 1000 ml auffüllt) gelöst und einmalig in der Mikrowelle (NN-K105W, Panasonic, Osaka,

Japan) aufgekocht. Nach der Abkühlung auf 60 °C wird für die Visualisierung der DNA pro 100 ml Agarose 5 µl Ethidiumbromid (1%ige Lösung in Wasser, Merck, Darmstadt) hinzugegeben. Dieses lagert sich zwischen den Basen der DNA an und verstärkt deren Fluoreszenz. Das Gel wird ausgegossen, abgekühlt und in die Reaktionskammer (MWG Biotec, Ebersberg) gegeben. Das Beladen der einzelnen Kammern erfolgt mit 5 µl DNA, welche zuvor mit einem Ladepuffer (6 x DNA Loading Dye, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) vermischt wird. Der Reaktionslauf wird bei 130 V (Power Supply 200/2.0, Bio Rad Hercules, CA, USA) für 30 min durchgeführt. Die Visualisierung erfolgt durch einen Transilluminator (Molecular Imager Gel Doc XR, Bio Rad, Hercules, CA, USA), welcher mittels UV-Licht mit einer Wellenlänge von 312 nm die DNA zur Fluoreszenz anregt.

3.2.4.2 Aufreinigung der PCR-Produkte

Mit einem Reaktionskit (Nucleo Spin Gel and PCR Clean-up, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren) werden die PCR-Produkte aufgereinigt, das heißt alle Salze, Enzyme und übrige Nukleotide werden eliminiert. Zunächst wird das Probenvolumen auf 100 µl mit nukleasefreiem Wasser verdünnt und mit 200 µl des Bindepuffers (Buffer NTI) vermengt. Das gesamte Volumen wird in eine Trennsäule mit einer Siliziumdioxidmembran gegeben. Nach der Zentrifugierung (Heraeus Pico 17, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) mit 11000 x g für 30 s binden die DNA-Anteile in der Membran. Die übrige Lösung wird verworfen. Mit 700 µl Waschpuffer (Buffer NT3) wird die Membran bei 11000 x g für 30 s gewaschen und anschließend 1 min bei 11000 x g in der Zentrifuge getrocknet. In einem neuen Auffanggefäß kann nun die DNA mit 30 µl Elutionspuffer (Buffer NE) und 1 min bei 11000 x g in der Zentrifuge gelöst werden. Mittels eines Photometers (Nano Drop 2000c, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) wird die Konzentration bestimmt und die gereinigte DNA-Lösung auf eine Konzentration von 15 ng/µl verdünnt.

3.2.4.3 DNA Sequenzierung

Die DNA Sequenzierung erfolgt mit der Didesoxymethode nach Sanger (Sanger et al. 1977). In dieser werden dem Reaktionsansatz fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleosidtriphosphate hinzugefügt. Ein Einbau dieser durch die DNA-Polymerase führt zum sofortigen Kettenabbruch. Es entstehen dadurch viele unterschiedlich lange DNA-Fragmente. Der Ansatz pro Probe enthält: 2 µl 5-fach Puffer; 2 µl Premix (Zusammensetzung wie unter Punkt 3.2.3.1); 0,5 µl des MY09-Primers (10 µM); 14,5 µl nukleasefreies Wasser und 1 µl der DNA. Die Sequenzierungsreaktion findet im Thermocycler statt: 5 min bei 95 °C; eine 27-fache Wiederholung zwischen 20 s bei 95 °C und 10 s bei 50 °C; anschließend 4 min bei 60 °C. Für die Aufbewahrung werden die Proben auf 10 °C abgekühlt.

Es folgt eine erneute Aufreinigung der Sequenzierungsreaktion mit Hilfe eines Kits (Nucleo SEQ, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren). Das Trenngel muss zunächst angemischt werden. Das geschieht direkt in der Trennsäule mit 600 µl nukleasefreiem Wasser und 30 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur. Überschüssiges Wasser wird in der Zentrifuge 2 min bei 750 x g entfernt. Die fertige Trennsäule wird mit 20 µl der Sequenzierlösung beladen und 6 min bei 750 x g zentrifugiert. Die erhaltenen, aufgereinigten Reaktionsprodukte werden in einen Detektor (Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) gegeben. Dieser trennt die DNA-Stränge mittels Kapillarelektrophorese nach Länge auf. Gleichzeitig detektiert das Gerät die Basen bei Kettenabbruch, indem es die fluoreszierende Farbe nach Anregung durch einen Laser ermittelt. Das Ergebnis wird in einem Elektropherogramm dargestellt.

3.2.4.4 Auswertung der Gensequenz

Die Gensequenz wird mit einer Online-Bibliothek (Basic Local Alignment Search Tool [BLAST], <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) abgeglichen, um den Genotyp des HP-Virus zu bestimmen.

3.2.5 Angewandte Färbemethoden

3.2.5.1 Gewebeaufarbeitung

Die in Formalin eingelegten Gewebeproben werden dehydriert und in Paraffin (Medite Pure Paraffin, Medite GmbH, Burgdorf) eingebettet. Sowohl für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung als auch für die spezifische Immunhistochemie werden mehrere Schnitte mit einer Schnittdicke 2 µm mit einem Mikrotom (Leica RM 2245, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Heidelberg) angefertigt, auf Objektträger gebracht (Menzel-Gläser, Superfrost Plus, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) und über Nacht bei 54 °C getrocknet (Trockenschrank WTB Binder E28, Binder GmbH, Tuttlingen).

3.2.5.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Die HE-Färbung wird mittels eines Färbeautomaten (Shanon Varistain 24-4, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) durchgeführt. Nach Entparaffinierung in Xylol und Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe erfolgt die Kernfärbung in Hämalaun nach Mayer [4 g Hämatoxylin gelöst in 4000 ml Aqua destillata; 0,8 g Natriumjodat; 200 g Kaliumaluminiumsulfat; 200 g Chloralhydrat; 4 g Zitronensäure (alle Merck, Darmstadt)] für 8 min. Die Bläuungsreaktion wird durch ein Bad in Leitungswasser für 10 min abgeschlossen. Anschließend folgt die Eosinfärbung [25 g Eosin G (Merck, Darmstadt) in 5000 ml 96%igem Ethanol] für 10 min. Nach dem Auswaschen in Leitungswasser für 10 min folgt die Differenzierung in 80%igem Ethanol. Die Konservierung des Schnitts wird durch die Dehydrierung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol erreicht.

3.2.5.3 SLPI-Immunhistochemie

Die Entparaffinierung und Rehydrierung wird mit einer absteigenden Alkoholreihe erreicht: Je 2x10 min in Xylol; 2x2 min in 96 % Ethanol; 2x2 min in 70 % Ethanol; 2x2 min in 50 % Ethanol und anschließend 2 x in Aqua destillata spülen.

Die Vorbehandlung der Schnitte erfolgt in einem Bad mit Citratpuffer (pH = 6). Dazu wird ein Schnellkochtopf (Schnellkochtopf, 6 l, Druck 0,6 - 0,9 bar, Haushalt International, Oldenburg) zu einem Drittel mit destilliertem Wasser befüllt, eine Plastikkuvette mit Citratpuffer (pH = 6) mit den Objektträgern bestückt und in den Schnellkochtopf gestellt. Der Deckel wird verschlossen und auf einer Herdplatte (THL 1597 Kochplatte, Rommelsbacher Elektro Hausgeräte GmbH, Dinkelsbühl) auf höchster Stufe 11 min erhitzt. Der Topf wird anschließend 10 min auf der ausgeschalteten Herdplatte stehen gelassen, dann erneut auf höchster Stufe 1 min erhitzt und nochmals 5 min auf der ausgeschalteten Platte gelassen. Darauf wird der Topf entdampft und unter Leitungswasser abgekühlt, geöffnet und mit kaltem Leitungswasser gewässert. Es folgt eine Spülung der Schnitte für 5 min in TBS (6,057 g Trishydroxymethyl-aminomethan; 8,766 g Natriumchlorid; die Reaktionsbestandteile werden auf 1000 ml mit Aqua destillata auffüllt und der pH-Wert auf 7,4 mit Salzsäure titriert).

Die Blockierung der endogenen Peroxidase erfolgt durch zwei bis drei Tropfen Hydrogen-Peroxide-Block (Hydrogen Peroxide Block TA-060-HP, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) und einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur. Nach dreimaliger Spülung (je 5 min) in TBS findet eine weitere Reduzierung der unspezifischen Hintergrundfärbung durch Ultra-V-Block (Ultra V Block TA-060-UB, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) statt. Es folgt eine Spülung (3x2 min) in TBS. Nun folgt der Primärantikörper [ALK1/SLPI Mouse anti-Human Monoclonal (Biotin) Antibody, Life Span Bio Sciences Inc., Seattle, WA, USA] in einer Konzentration von 1:50 gelöst in einem Verdünnungsmittel (Dako Antibody Diluent, Hamburg). Die Inkubationszeit beträgt zunächst 30 min bei Raumtemperatur und anschließend 18 h bei 4 °C. Das Verlaufen der Antikörperlösung wird durch Umranden der Schnitte mit einem Begrenzungsstift (Dako Pen, Hamburg) verhindert. Die Objektträger werden erneut 3x5 min in TBS gespült und anschließend mit dem Sekundärantikörper [Simple Stain MAX PO (Multi), N-HistofineH0906-1, Nichireibioscience, Japan] 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Sekundärantikörper ist mit einer Peroxidase verknüpft. Durch 3x5-minütiges Spülen in TBS werden alle nicht gebundenen Sekundärantikörper entfernt. Die Visualisierung folgt mit einem Peroxidase-Substrat-Kit [DAB (3, 3'-diaminobenzidine), Vector Laboratories, UK], welches exakt 5 min inkubiert wird. Es wird in destilliertem Wasser gespült, danach erfolgt die Gegenfärbung. Dazu verbringen die Schnitte 1 min in der Hämalaun-Lösung

(Hämalaunlösung sauer nach Mayer, Dr. K. Hollborn und Söhne, Leipzig) und bläuen anschließend 5 min unter warmen fließendem Leitungswasser. Die Dehydrierung geschieht durch eine aufsteigende Alkoholreihe gefolgt von Xylol. Zur Versiegelung werden die Schnitte mit einem xylollöslichem Eindeckmedium (Pertex, Medite GmbH, Burgdorf) eingebettet.

Es werden bei jedem Färbedurchgang sowohl eine Positiv- als auch eine Negativkontrolle mitgeführt. Die Positivkontrolle besteht aus einem stark SLPI-positiven Präparat der kleinen Speicheldrüsen. Bei der Negativkontrolle erhält der gleiche Schnitt anstatt des Primärantikörpers destilliertes Wasser.

3.2.5.4 P16^{INK4a}-Immunhistochemie

Die p16^{INK4a}-Immunhistochemie erfolgt mithilfe eines Färbeautomaten (Bond Max, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Heidelberg) und eines dazugehörigen Färbekits (Bond Polymer Refine Detection, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Heidelberg). Die Antigenwiederherstellung erfolgt in einem Citratpuffer (Bond Epitope Retrieval Solution 1, pH 6, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Heidelberg). Der Primärantikörper (p16^{INK4a}, BD Pharmingen, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) wird in einer Konzentration von 1:20 aufgetragen. Der Sekundärantikörper ist mit einer Peroxidase verknüpft. Als Substrat dient DAB-Chromogen. Am Ende folgt die Kernfärbung mit Hämalaun.

3.2.5.5 Auswertung

Die Auswertung erfolgt durch zwei unabhängige Wissenschaftler mittels 40-facher Vergrößerung unter einem Mikroskop (Lichtmikroskop Leica DM 300, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Heidelberg). Es werden je 300 Zellen in fünf Arealen ausgezählt um die SLPI-Expression einzuschätzen. Die Kategorien werden wie folgt festgelegt: (-) <5%; (+) 5-30%; (++) 31-75%; (+++) >75% der Zellen zeigen sich SLPI-positiv.

Die histologische Diagnosesicherung erfolgt durch einen erfahrenen Pathologen.

3.2.6 Statistische Analyse

Die aus den immunhistochemischen Färbungen gewonnenen Daten werden zweiseitig mittels Cochran-Armitage-Test und dem Exakten Fischer-Test mit Hilfe der SAS 9.2 Software ausgewertet. Ergebnisse mit einem p-Wert ≤ 0.05 werden als statistisch signifikant gewertet.

4. Ergebnisse

4.1 HPV-DNA-Nachweis

Der HPV-DNA-Nachweis erfolgt mittels Polymerasekettenreaktion. Von den 110 untersuchten Gewebeproben unterschiedlicher Dignität sind sieben positiv für HPV-DNA. Es entfallen fünf (5/36; 13,9%) positive Ergebnisse auf Gewebeproben von Karzinomen. Vier der HPV-positiven Karzinome gehören der Gruppe der Nichtraucher (4/16; 25%) an und einer der Gruppe der Raucher [1/20; 5% (Tab. 2)].

Alle HPV-positiven Fälle können Tonsillenkarcinomen (Tonsilla palatina, Tonsilla lingualis) zugeordnet werden, sodass insgesamt fünf von den hier untersuchten 12 (41,7%) Tonsillenkarcinomen HPV-DNA enthalten. Es kann darüber hinaus in zwei (2/74; 2,7%) Gewebeproben, die klinisch unauffälliger Schleimhaut entnommen worden sind, HPV-DNA nachgewiesen werden. In einem Fall ist HPV-DNA in Gewebeproben aus einem Karzinom und der dazugehörigen klinisch unauffälligen Schleimhaut desselben Patienten gefunden worden. Dieser Patient ist Raucher. Darüber hinaus ist HPV-DNA in einer Schleimhautgewebeprobe eines Nichtrauchers mit einem Zungengrundkarzinom, welches selbst HPV-negativ ist, nachgewiesen worden. Sämtliche Schleimhautproben der Probanden ohne Neoplasie sind ohne Nachweis von HPV-DNA geblieben. Die Sequenzierung der HPV-DNA zeigt in allen Fällen eine HPV-Infektion mit dem Genotyp 16. In einem Fall (Tonsillenkarcinom eines Ex-Rauchers) kann eine Infektion mit zwei verschiedenen Subtypen des HPV-16 nachgewiesen werden.

HPV-Status	Raucher	Nichtraucher	Total
HPV-DNA-positiv	1	4	5
HPV-DNA-negativ	19	12	31
Total	20	16	36

Tab. 2: HPV-Status der Kopf-Hals-Karzinome nach Rauchverhalten

4.2 Immunhistochemischer Nachweis der p16^{INK4a}-Expression

Der immunhistochemische Nachweis der p16^{INK4a}-Expression zeigt in den Präparaten der Kopf- und Halskarzinome folgendes Bild: 13 (13/36; 33,3%) negative, acht (8/36; 22,2%) schwache, sechs (6/36; 16,7%) mäßige und neun (9/36; 25%) starke Expressionsmuster.

Alle HPV-positiven Fälle zeigen eine mäßige bis starke p16^{INK4a}-Expression, welche als Indiz für eine aktive HPV-Infektion sprechen können. (Tab. 3)

HPV-Status	p16 ^{INK4a}				Total
	-	+	++	+++	
HPV-DNA+	0	0	1	4	5
HPV-DNA-	13	8	5	5	31
Total	13	8	6	9	36

Tab. 3: p16^{INK4a}-Expression in Abhängigkeit des HPV-Status bei Kopf- und Halskarzinomen

4.3 Immunhistochemischer Nachweis der SLPI-Expression

Die Auswertung der Immunhistochemie für SLPI unter dem Mikroskop zeigt eine verstärkte Anreicherung des Proteins in den kleinen Speicheldrüsen, in Keratozyten der Schleimhaut des oberen Aerodigestivtraktes, im lymphatischen Gewebe der Tonsillen und im Zytoplasma der Plattenepithelkarzinome. Die Abbildung zeigt exemplarisch die Bewertungsskala für die Expressionsstärke der Antileukoproteinase (Abb. 1).

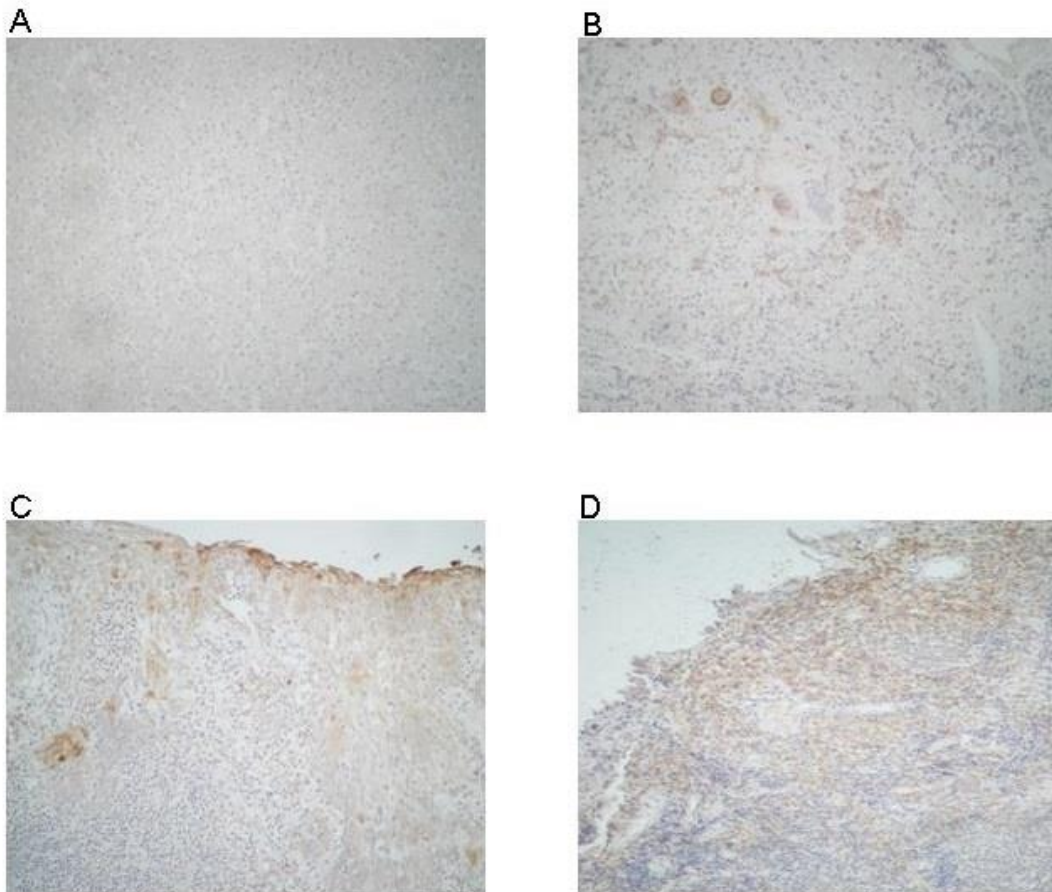


Abb. 1: immunhistochemischer Nachweis von SLPI in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches: A: keine SLPI-Expression (-); B: schwache SLPI-Expression (+); C: mäßige SLPI-Expression (++); D: starke SLPI-Expression (+++)

4.3.1 SLPI-Expression bei Patienten mit Kopf- und Halskarzinomen

Bei den Malignomen zeigen sich in der Immunhistochemie für SLPI zwei negativ [2/36; 5,6% (beide Nichtraucher)], 11 [11/36; 30,6% (6 Raucher, 2 Ex-Raucher, 3 Nichtraucher)] mit schwacher, 12 [12/36; 33,3% (8 Raucher, 3 Ex-Raucher, 1 Nichtraucher)] mit mäßiger und 11 [11/36; 30,6% (6 Raucher, 5 Ex-Raucher)] mit starker SLPI-Expression.

In der klinisch gesunden Schleimhaut desselben Patientenkollektivs ergibt sich bezüglich der SLPI-Expression folgendes Bild: Zehn (10/36; 27,8%) Fälle zeigen keine, 13 (13/36; 36,1%) eine schwache, sechs (6/36; 16,7%) eine mäßige und sieben (7/36; 19,4%) Fälle eine starke Expression. (Tab. 4)

	SLPI				Total
	-	+	++	+++	
Tumor	2	11	12	11	36
Mukosa	10	13	6	7	36

Tab. 4: SLPI-Expression bei Patienten mit Kopf- und Halskarzinomen

4.3.1.1 SLPI-Expression in Abhängigkeit der Rauchgewohnheiten bei Patienten mit Kopf- und Halskarzinomen

Die aus den Kopf- und Halskarzinomen entnommenen Gewebeproben zeigen in Abhängigkeit der Rauchgewohnheiten der jeweiligen Patienten folgende SLPI-Expression: im Kollektiv der Nichtraucher finden sich zwei (2/6; 33,3%) negative, drei (3/6; 50%) schwache und eine (1/6; 16,7%) mäßig starke Expression, in der Gruppe der Ex-Raucher sind zwei (2/10; 20%) schwache, drei (3/10; 30%) mäßige und fünf (5/10; 50%) starke Expressionsmuster nachgewiesen worden und Raucher kommen auf sechs (6/20; 30%) schwache, acht (8/20; 40%) mäßige und sechs (6/20; 30%) starke Expressionen der Antileukoproteinasen. (Tab. 5)

Die SLPI-Expression der Gruppe der Ex-Raucher ist nahezu identisch mit der Gruppe der Raucher ($p = 0,779$), hingegen zeigen die Nichtraucher einen signifikanten Unterschied zur Rauchergruppe ($p = 0,035$).

Rauchgewohnheiten	SLPI				Total
	-	+	++	+++	
Nichtraucher	2	3	1	0	6
Ex-Raucher	0	2	3	5	10
Raucher	0	6	8	6	20

Tab. 5: SLPI-Expression der Kopf- und Halskarzinome in Abhängigkeit der Rauchgewohnheiten

In den jeweiligen dazugehörigen gesunden Schleimhäuten zeigen sich bei den Nichtrauchern drei (3/6; 50%) ohne und drei (3/6; 50%) mit schwacher SLPI-Expression, bei den Ex-Rauchern drei (3/10; 30%) ohne, drei (3/10; 30%) mit

schwacher, drei (3/10; 30%) mit mäßiger und einer (1/10; 10%) mit starker Expression. Unter den Rauchern sind vier (4/20; 20%) ohne, sieben (7/20; 35%) mit schwacher, drei (3/20; 15%) mit mäßiger und sechs (6/20; 30%) mit starker Expression für SLPI. (Tab. 6)

In den klinisch gesunden Schleimhautgewebeproben finden sich keine Unterschiede bezüglich der SLPI-Expression zwischen den Gruppen der Nichtraucher und Ex-Raucher, weshalb beide Gruppen zusammen als Nichtraucher zusammengefasst werden können. Die Daten zeigen eine signifikante Korrelation des klinisch gesunden Schleimhäute zwischen Rauchern und Nichtrauchern ($p = 0,046$).

Rauchgewohnheiten	SLPI				Total
	-	+	++	+++	
Nichtraucher	3	3	0	0	6
Ex-Raucher	3	3	3	1	10
Raucher	4	7	3	6	20

Tab. 6: SLPI-Expression in klinisch gesunder Schleimhaut bei Patienten mit Kopf- und Halskarzinomen in Abhängigkeit der Rauchgewohnheiten

4.3.2 SLPI-Expression bei Patienten ohne Neoplasie

Es ergeben sich bei den Individuen ohne Neoplasie 16 (16/38; 42,1%) negative, 13 (13/38; 34,2%) schwach positive, sechs (6/38; 15,8%) mäßig positive und drei (3/38; 7,9%) stark positive SLPI-Expressionsmuster.

4.3.2.1 SLPI-Expression in Abhängigkeit der Rauchgewohnheiten bei Patienten ohne Neoplasie

In der Immunhistochemie zeigen sich in der Gruppe der Nichtraucher 11 (11/20; 55%) negative, sechs (6/20; 30%) schwache, zwei (2/20; 10%) mäßige und eine (1/20; 5%) starke Expression für SLPI. In der Gruppe der Raucher weisen fünf (5/18;

27,8%) keine, sieben (7/18; 38,9%) eine schwache, vier (4/18; 22,2%) eine mäßige und zwei (2/18; 11,1%) eine starke SLPI-Expression auf. (Tab. 7)

Es lässt sich ein signifikanter Unterschied der SLPI-Expression zwischen Rauchern und Nichtrauchern bei den Schleimhautpräparaten der Patienten ohne Neoplasie im Cochran-Armitage-Trend-Test feststellen ($p = 0,014$). Die Zusammenschau der Schleimhautpräparate aller Probanden (mit und ohne Malignom) zeigt eine deutliche Abhängigkeit der SLPI-Expression von den Rauchgewohnheiten mit niedrigen Expressionsmustern bei Nichtrauchern und umgekehrt ($p = 0,038$).

Rauchgewohnheiten	SLPI				Total
	-	+	++	+++	
Nichtraucher	11	6	2	1	20
Raucher	5	7	4	2	18
Gesamt	16	13	6	3	38

Tab. 7: SLPI-Expression bei Patienten ohne Neoplasie in Abhängigkeit der Rauchgewohnheiten

4.3.3 SLPI-Expression in Abhängigkeit des HPV-Status

In Korrelation zum HPV-Status fallen innerhalb der Gruppe der Karzinompatienten zwei negative und drei schwach positive SLPI-Ergebnisse auf die fünf HPV-positiven Fälle. Die 31 HPV-negativen Fälle zeigen acht schwache, 12 mäßig starke und 11 starke Expressionsmuster für SLPI. Durch das Zusammenfassen der SLPI-Expressionsmuster in zwei Gruppen ergeben alle fünf (5/5; 100%) HPV-positiven Fälle eine negative oder schwache Expression, bei den HPV-negativen Ergebnissen sind dies 8 (8/31; 25,8%) gegenüber 23 (23/31; 74,2%) mit mäßiger oder starker Expression. (Tab. 8)

Bezüglich des HPV-Status in Korrelation zur SLPI-Expression lässt sich ein statistisch signifikanter Unterschied feststellen ($p < 0,01$).

HPV-Status	SLPI				Total
	-	+	++	+++	
HPV-DNA+	2	3	0	0	5
	5		0		
HPV-DNA-	0	8	12	11	31
	8		23		
Total	2	11	12	11	36

Tab. 8: SLPI-Expression der Kopf- und Halskarzinome in Abhängigkeit des HPV-Status

4.4 SLPI- und Annexin-A2-Genexpression

Sowohl in den Proben der Patienten mit Karzinomen als auch bei Individuen ohne Neoplasie zeigt sich eine signifikant höhere SLPI-Expression bei Rauchern verglichen mit den Nichtrauchern. In der Schleimhaut der Patienten ohne Neoplasie konnte eine $10,49 \pm 1,89$ -fache (Abb. 2 C; links), in der klinisch gesunden Schleimhaut der Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen eine $18,02 \pm 3,93$ -fache (Abb. 2 C; rechts), im Karzinomgewebe eine $109,26 \pm 3,08$ -fache (Abb. 2 A) Erhöhung bei Rauchern festgestellt werden. Zwischen Ex- und Nichtrauchern konnte auf der Ebene der mRNA kein Unterschied nachgewiesen werden.

Ähnliche Ergebnisse bezüglich des Rauchverhaltens zeigt die Annexin-A2-Expression. Es findet sich bei Rauchern in der Schleimhaut der Patienten ohne Neoplasie eine Erhöhung auf das $8,96 \pm 1,09$ -fache (Abb. 2 D; links), in der klinisch gesunden Schleimhaut der Patienten mit Kopf- und Halskarzinomen eine Erhöhung auf das $14,68 \pm 0,94$ -fache (Abb. 2 D; rechts) und im Karzinomgewebe $68,63 \pm 12,15$ -fache (Abb. 2 B).

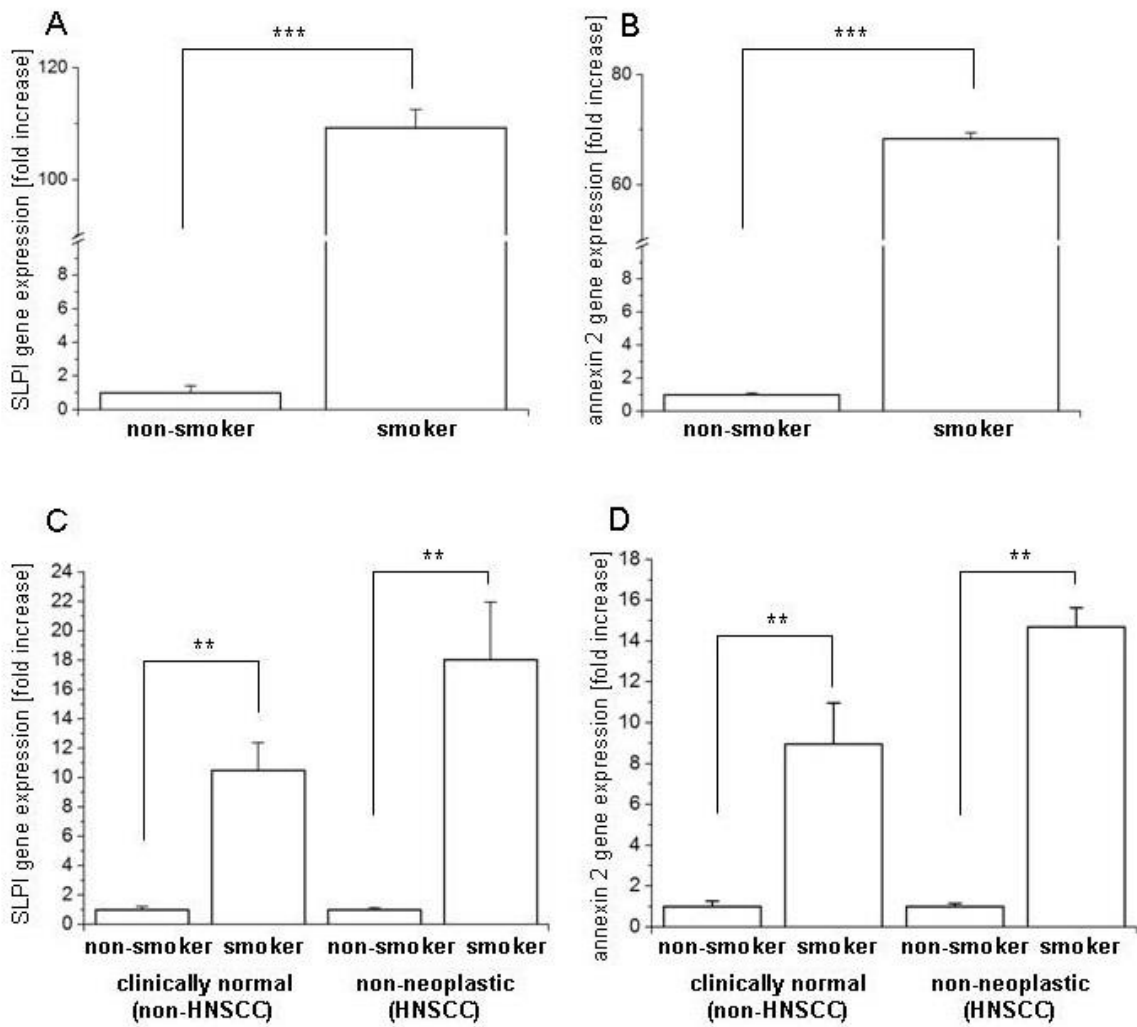


Abb. 2: Genexpressionslevel von SLPI (A, C) und Annexin A2 (B, D) in Abhängigkeit der Rauchgewohnheiten.

5. Diskussion

5.1 Humane Papillomviren

Die infektiöse Genese bei der Entstehung von Warzen ist Ende des 19. Jahrhunderts erstmalig vermutet worden, nachdem es erfolgreich gelungen ist, Warzen zwischen zwei Menschen zu übertragen. Anfang des 20. Jahrhunderts stellte der italienische Mediziner Guisepe Ciuffo die Hypothese einer viralen Infektion als Ursache von Warzen auf (Demonbreun et al. 1932; Lutzner 1983). Die ersten Papillomviren konnte Richard E. Shope 1932 aus Papillomen von Kaninchen isolieren (Shope 1932). Erstmalig im Zusammenhang mit malignen Erkrankungen ist das Virus 1972 genannt worden. In der Fallstudie einer Patientin mit Epidermodysplasia verruciformis und Hautläsionen des Morbus Bowen sind die Viren als Krankheitsursache diskutiert worden (Jablonska et al. 1972). Wenig später fand Harald zur Hausen heraus, dass die Viren eine tragende Rolle in der Genese von Karzinomen der Zervix uteri spielen (zur Hausen 1976). Die erste Erwähnung der Papillomviren in Kopf- und Halskarzinomen findet sich 1983 (Syrjanen, K. et al. 1983). Heute gilt die Korrelation zwischen humanen Papillomviren und der Entstehung von Karzinomen als gesichert.

Papillomviren gehören zur Familie der Papillomaviridae. Die frühere Annahme der Zugehörigkeit zur Familie der Papovaviridae ist verlassen worden. Die Viren können in nahezu allen Säugetierarten (de Villiers et al. 2004), Vögeln und Reptilien (Doorbar 2005) gefunden werden. Papillomviren sind dabei streng wirtsspezifisch und werden nur sehr selten zwischen verschiedenen Spezies übertragen (Mistry et al. 2008). Wie alle Viren sind Papillomviren obligat intrazelluläre Organismen und benötigen zur Replikation eine Wirtszelle (Horvath et al. 2010). Hierbei zeigt sich eine stark ausgeprägte Gewebespezifität: es werden ausschließlich Epithelien von Haut- und Schleimhaut infiziert (Schiller et al. 2010).

Heute sind mehr als 170 verschiedene humanpathogene Papillomviren bekannt (de Villiers 2013). Ein neuer Virustyp wird anerkannt, wenn das Genom vollständig sequenziert vorliegt und die Homologie zu bisher bekannten Typen weniger als 90% der DNA-Sequenz des L1-Proteins beträgt (de Villiers et al. 2004). Humane Papillomviren können phylogenetisch in fünf verschiedene Gattungen eingeteilt werden: Alphapapillomavirus, Betapapillomavirus, Gammapapillomavirus,

Mupapillomavirus und Nupapillomavirus. Die meisten der bekannten HP-Viren, die ursächlich für benigne und maligne Läsionen beim Menschen sind, fallen in die Gattung der Alphapapillomviren (Chouhy et al. 2013). Eine andere Einteilung der HP-Viren kann aufgrund ihres Gewebetropismus in haut- und schleimhautpathogene Papillomviren erfolgen. Die schleimhautpathogenen Viren können nach ihrem onkogenen Potential weiter in eine „high-risk-“ und eine „low-risk-“Gruppe eingeteilt werden (Bernard et al. 2010).

5.1.1 Aufbau der humanen Papillomviren

Das humane Papillomvirus ist ein unbekapseltes DNA-Virus mit einem Durchmesser von 55 bis 60 nm. Die äußere Form eines Ikosaeders wird durch die Kapsidhülle bestimmt. Diese besteht aus 72 regelmäßig angeordneten, sternförmigen Kapsomeren. Im Inneren der Hülle befindet sich die zirkulär konfigurierte, doppelsträngige DNA. Sie besitzt circa 8000 Basenpaare und wird mittels zellulärer Histonproteine zu einem Nukleoproteinkomplex konserviert. Nur auf einem der beiden Stränge sind die viralen Proteine kodiert. Das Genom kann in drei Funktionsbereiche eingeteilt werden: die Kontrollregion, die frühe und die späte Region. Die Kontrollregion (LCR, *long control region* oder NCR, *non coding region*) enthält den Replikationsursprung (ORI, *origin of replication*) und Elemente zur Regulation der Transkription der viralen DNA, wie zum Beispiel Enhancer und Promotoren. Im Uhrzeigersinn schließen sich die Gene der frühen Region (*early region*) an. Diese enthalten je nach Virustyp sechs bis acht offene Leserahmen (ORF, *open reading frame*), kodierend für regulatorische Proteine, welche in einer frühen Phase des Replikationszyklus von Bedeutung sind. Die späte Region (*late region*) besitzt hingegen zwei offene Leserahmen für Strukturproteine der Kapsidhülle (Zheng et al. 2006).

5.1.2 Pathophysiologie der humanen Papillomviren

Humane Papillomviren infizieren die Basalzellschicht von Epithelien. Es sind Mikrotraumen in den oberen Schichten notwendig, um diese Schicht zu erreichen

(Schiller et al. 2010). In mehreren experimentellen Studien wird für die Adsorption der Viren die Notwendigkeit einer Interaktion des L2-Proteins des Virus mit den Zellen über Heperansulfat-Proteoglykane (Combita et al. 2001; Giroglou et al. 2001; Johnson et al. 2009) und möglicherweise auch über Laminin (Culp et al. 2006) vermutet. Weitere Rezeptoren für diesen Vorgang werden diskutiert, unter anderem der Alpha-6-Integrin- und der Wachstumshormonrezeptor (Evander et al. 1997; Surviladze et al. 2012). Eine kürzlich erschienene Arbeit beschreibt Annexin als möglichen „Rezeptor“ (Woodham et al. 2012), der den Zelleintritt der Viren ermöglicht. Der genaue Mechanismus ist allerdings noch nicht exakt verstanden. Die Vielzahl der beschriebenen Adsorptionswege legt darüber hinaus den Schluss nahe, dass es sich nicht um einen einzelnen verantwortlichen Rezeptor handelt, sondern vielmehr um einen komplexen Vorgang unter Beteiligung mehrerer Rezeptoren oder Modulatoren.

Nach dem Eintritt in die Zelle erfolgt der endosomale Transport zum Zellkern und das Freisetzen der viralen DNA („*uncoating*“). Der Eintritt in den Zellkern wird ebenso durch das L2-Protein vermittelt, während das L1-Protein im Endosom verbleibt und anschließend in Lysosomen abgebaut wird (Bergant Marusic et al. 2012). Im Zellkern beginnt die Replikation der Viren mit der Vervielfältigung der DNA. Die virale DNA muss zunächst durch das erste Protein der frühen Region, E1, entwunden werden. E1 übt in dieser Funktion als einziges Protein der Papillomviren eine enzymatische Funktion aus (Hughes et al. 1993). Der nun freigelegte Replikationsursprung kann durch einen Komplex der Proteine E1 und E2 zusammen mit zellulären Polymerasen gebunden werden, um die Transkription zu initiieren (Mohr et al. 1990; Frattini et al. 1994; Conger et al. 1999). E2 hat bei der Transkription eine regulatorische Funktion. Niedrige E2-Konzentrationen lassen eine verstärkte Bindung des Proteins zum Replikationsursprung zu, entsprechend einer hohen Transkriptionsrate. Bei hohen E2-Konzentrationen erfolgt jedoch eine Blockierung der zellulären Transkriptionsfaktoren und die Replikation wird gestoppt. Durch diesen Kontrollmechanismus befindet sich in undifferenzierten Epithelzellen eine konstante Anzahl an Viruskopien und damit auch an den viralen Proteinen E6 und E7 (Cripe et al. 1987; Steger et al. 1997). Die viralen Proteine E4 und E5 modifizieren das zelluläre Milieu und tragen so zur Virusreplikation bei. E4 ist das virale Protein mit der höchsten Konzentration in virusreplizierenden Zellen (Doorbar et al. 1997). Als Hauptfunktion wird eine Beteiligung an der Virusfreisetzung und -übertragung

angenommen (Doorbar et al. 1991; Wang et al. 2004). E5 moduliert proliferationssteigernde Signalwege (Crusius et al. 2000; Genther et al. 2003) und scheint auch bei der koilozytären Transformation eine Rolle zu spielen (Krawczyk et al. 2008).

Die Proteine E6 und E7 agieren als virale Onkoproteine. Sie sind verantwortlich für die maligne Transformation der Zellen bei einer Infektion mit „high-risk-“ Papillomviren. E6 bindet den Tumorsuppressor p53 und erhöht dessen Umsatz, indem es seinen ubiquitinabhängigen Abbau fördert (Scheffner et al. 1990; Werness et al. 1990). P53 ist an verschiedenen Mechanismen der Zellkontrolle beteiligt. Nach einer Schädigung der DNA während der Zellteilung wird dieser Prozess am Übergang von G1 zur S-Phase durch p53 gestoppt und es werden ebenso DNA-Reparaturmechanismen durch den Tumorsuppressor aktiviert. Resultiert ein irreparabler DNA-Schaden, kann p53 den programmierten Zelltod einleiten (Kern et al. 1991; Lane 1992). Fehlt das Protein durch seinen erhöhten Abbau, resultiert eine fehlende DNA-Kontrolle mit der Anhäufung von Fehlern im Genom. Ein weiterer bedeutender Faktor in der kanzerogenen Wirkung von E6 liegt in einer Aktivierung der Telomerase (Klingelutz et al. 1996; Galloway et al. 2005). Dies verlängert die Lebensdauer infizierter Zellen und erhöht somit auch die Gefahr von Mutationen. E7 bindet und degradiert das Retinoblastomprotein (Dyson et al. 1989; Munger et al. 1989). Dieses fungiert ebenso als Tumorsuppressorprotein, da es den Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus reguliert. Das Retinoblastomprotein bindet in unphosphoryliertem Zustand den zellulären Transkriptionsfaktor E2F. Zyklin-abhängige Kinasen können das Retinoblastomprotein phosphorylieren und E2F dissoziiert von diesem Komplex ab. E2F, jetzt in seinem aktiven Zustand, kann die Zelle in die S-Phase schieben (zur Hausen 2002). E7 ist darüber hinaus in der Lage, Inhibitoren der Zyklin-abhängigen Kinasen (p16, p21) zu binden und führt so gleichsam zu erhöhten Konzentrationen des phosphorylierten Retinoblastomproteins (Bosch et al. 1995). Durch diese Mechanismen lösen HPV-Viren eine Störung in der Zellzykluskontrolle aus und begünstigen DNA-Fehler. Erniedrigte Konzentrationen von p53 und Retinoblastomprotein können bei HPV-assoziierten Karzinomen, inklusive Kopf- und Halskarzinomen, regelhaft gesehen werden (Andl et al. 1998; Wiest et al. 2002). Histologisches Korrelat für einen aktiven Zellzyklus und eine aktive Proteinsynthese ist eine Persistenz der Zellkerne bis in die obersten Epithelschichten.

Die Proteine der späten Region bilden die Kapsidhülle. Das L1-Protein formt die pentameren Kapsomere und ist Hautbestandteil des Kapsids. Es ist bei den humanen Papillomviren das spezifische Antigen, welches die Genotypen voneinander unterscheidet. Die L2-Proteine sind verantwortlich für die Verpackung des viralen Genoms in die Kapsidhülle (Buck et al. 2008). Neue Untersuchungen zeigen auch eine wesentliche Rolle des L2 bei der Infektion neuer Zellen (Johnson et al. 2009; Woodham et al. 2012). Die Virusreifung findet in den oberflächlichen, absterbenden Keratinozyten statt. Bei der Freisetzung der Virionen scheinen dann die hohen E4-Konzentrationen von Bedeutung zu sein (Wang et al. 2004).

Für die maligne Transformation der Zellen sind neben der HPV-Infektion somatische Mutationen nötig (Vousden 1993). Eine Integration der HPV-DNA in das Wirtsgenom wird in der Karzinogenese als bedeutender Schritt erachtet (Schneider-Maunoury et al. 1987; zur Hausen 1989). In Zervixkarzinomen kann regelhaft integrierte HPV-DNA im humanen Genom gefunden werden (Schwarz et al. 1985; Yee et al. 1985). Vermutlich zeigen die Viren in Kopf- und Halskarzinomen ein gleichartiges Verhalten. In benignen Läsionen und geringgradigen intraepithelialen Neoplasien liegt das Virusgenom hingegen episomal vor (Das et al. 1992; Peitsaro et al. 2002).

5.1.3 HPV-assoziierte Läsionen

Humane Papillomviren sind verantwortlich für zahlreiche benigne und maligne Tumoren der Haut und Schleimhäute. In den Läsionen können dabei meist typische HPV-Genotypen gefunden werden.

Zu den benignen HPV-bedingten Tumoren der Haut gehören verschiedene Arten von Warzen: Veruccae vulgares (HPV1, 2, 4, 26, 29 u. a.), Veruccae plantares (HPV1, 2, 4, 63) und Verrucae planae [HPV3, 10, u. a. (Hall et al. 2009)]. Eine besonders hohe Suszeptibilität der Haut gegenüber humanen Papillomviren besteht bei der Epidermodysplasia verruciformis, einer seltenen, hereditären Dermatose (Lazarczyk et al. 2008). Die Läsionen der Epidermodysplasia verruciformis reichen von benignen, disseminierten Papillomen bis hin zu Plattenepithelkarzinomen. Dabei spielen sowohl Genotypen der „high-risk-“ (HPV5, 8, 47), als auch der „low-risk-“ (HPV14, 20, 21) Gruppe eine Rolle (Orth 1986; Chang et al. 1991; Majewski et al.

1995). Ein Beispiel für eine maligne Läsion der Haut ist der Morbus Bowen. Der Tumor stellt eine frühe Stufe eines Plattenepithelkarzinoms der Haut dar. Dessen Pendant an der Schleimhaut ist die Erythroplasie Queyrat. Für beide gilt eine HPV-Infektion als mögliche Ursache (Wieland et al. 2000). Es werden verschiedene haut- (HPV1, 2, 3, 4, 7, 27) und schleimhautpathogene („low-risk“ [HPV6] und „high-risk“- [HPV16, 33, 35]) HPV-Genotypen in den Läsionen gefunden (Iftner et al. 2003).

An den Schleimhäuten der anogenitalen Regionen verursachen humane Papillomviren die benignen Feigwarzen (Condylomata accuminata). In über 90% der Papillome lassen sich HPV6 und 11 nachweisen, aber es werden auch andere Genotypen, sowohl „high-risk-“ als auch „low-risk-“ Typen, gefunden (Steben et al. 2007). Humane Papillomviren sind der Hauptrisikofaktor für die Entstehung intraepithelialer Neoplasien der Zervix, Vulva, Penis und Anus, aus denen im weiteren Verlauf invasive Karzinome entstehen können. Aus diesem Gebiet gelten die intraepitheliale Neoplasie und das Karzinom des Zervix im kausalen Zusammenhang mit einer HPV-Infektion als am besten beschrieben. Wegweisend waren die Arbeiten von Harald zur Hausen, der diesen Zusammenhang als erster erkannte (zur Hausen et al. 1974) und infolge dessen im Jahr 2008 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet worden ist. In nahezu allen Fällen eines Zervixkarzinoms kann HPV-DNA nachgewiesen werden. Die am häufigsten vorkommenden Genotypen sind die „high-risk-“ Papillomviren HPV16, 18, 45, 31, 33, 52, 58 und 35, wobei die Genotypen 16 und 18 in über 70% der Fälle gefunden werden (zur Hausen 1989; Steben et al. 2007; Bertuccio et al. 2011).

Weitere HPV-assoziierte Läsionen sind an der Schleimhaut des oberen Aerodigestivtraktes zu finden. Die fokale epitheliale Hyperplasie (Morbus Heck), eine benigne papillomatöse Erkrankung der Mundhöhle, ist in der Mehrheit der Fälle mit den HPV-Genotypen 13 und 32 assoziiert (Said et al. 2013). Die Larynxpapillomatose (sog. rezidivierende respiratorische Papillomatose, RRP) zählt auch zu den benignen Erkrankungen, verursacht hauptsächlich durch die HPV-Genotypen 6 und 11 (Venkatesan et al. 2012). Bei der juvenilen Form dieser Erkrankung wird eine perinatale Übertragung von der Mutter auf das Kind diskutiert (Larson et al. 2010; Syrjanen, S. 2010a). Bei malignen Erkrankungen des oberen Aerodigestivtraktes besteht eine Assoziation mit dem HP-Virus von 20 bis 30 %. Besonders ausgeprägt ist dieser Zusammenhang bei Plattenepithelkarzinomen der

Tonsillen des Waldeyer'schen Rachenrings. Hier weisen 50 bis 60 % der Tumoren eine HPV-Infektion auf (Hoffmann et al. 1998; Gillison et al. 2001). Der „high-risk-“ Typ HPV16 ist dabei in der überwiegenden Mehrheit (über 90 %) zu identifizieren (Klussmann et al. 2001; Gillison 2004; Hoffmann et al. 2004; Begum et al. 2005; Furniss et al. 2007). Ein kausaler Zusammenhang zwischen HPV-Infektion und der Karzinogenese gilt auch hier als wissenschaftlich belegt (Andl et al. 1998; Gillison et al. 2000; Gillison et al. 2001; Klussmann et al. 2001; Li et al. 2003). Die HPV-assoziierten Karzinome unterscheiden sich von denen mit klassischen Risikofaktoren des Zigarettenrauchens und des Alkohols und können als eigene Tumorentität betrachtet werden (Gillison et al. 2000). Sie zeigen ein aggressiveres biologisches Verhalten (Hoffmann et al. 2005a; Hoffmann et al. 2010; Syrjanen, S. 2010b), begründet durch eine frühe Metastasierung in die Lymphknoten des Halsbereiches (Hoffmann et al. 2005b; Hobbs et al. 2006; Gillison et al. 2008). Histopathologisch zeigt sich ein undifferenzierteres Zellbild im Vergleich zu HPV-negativen Karzinomen (Hobbs et al. 2006; Gillison et al. 2008). Trotz des aggressiveren Verhaltens dieser Karzinome weisen die Patienten ein besseres Gesamtüberleben auf (Lindquist et al. 2007; Ragin et al. 2007; Fakhry et al. 2008). Dies ist vor Allem auf ein besseres Ansprechen der Tumoren auf die Radiochemotherapie zurückzuführen (Hoffmann et al. 2005a; Fakhry et al. 2008; Hoffmann et al. 2010; Syrjanen, S. 2010b; Tribius et al. 2011).

5.2 P16^{INK4a}

P16^{INK4a} ist ein Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) und spielt damit eine große Rolle in der Regulation des Zellzyklus. Die Cyclin-abhängigen Kinasen CDK4 und CDK6 binden normalerweise Cyclin D. Dieser Proteinkomplex kann das Retinoblastomprotein phosphorylieren. Im phosphoryliertem Zustand dissoziiert der Transkriptionsfaktor E2F vom Retinoblastomprotein und initiiert die Transkription seiner Zielgene. Die Genprodukte sind essentiell für den Übertritt des Zellzyklus von der G1-Phase in die S-Phase. P16^{INK4a} bindet mit großer Affinität an CDK4 und CDK6 und verhindert so diesen Vorgang. Es wirkt somit als Tumorsuppressorprotein (Hara et al. 1996; Rayess et al. 2012).

Bei einer HPV-Infektion inaktiviert das Protein E7 das Retinoblastomprotein mit der Folge einer erhöhten Zellproliferation. Der Nutzen für das Virus besteht hierin in einer gleichzeitigen Transkription seiner viralen Proteine. Ein Abfall des Retinoblastomproteins führt über eine negative Rückkopplung zu einer Überexpression des p16^{INK4a} Gens. Somit kann p16^{INK4a} als Indikatorprotein für eine mögliche HPV-Infektion angesehen werden (Andl et al. 1998; Klaes et al. 2001; Wiest et al. 2002). In der Literatur sind ebenso Mechanismen des E7 beschrieben, welche unabhängig vom Retinoblastomprotein zu einer Erhöhung der p16^{INK4a}-Expression führen (McLaughlin-Drubin et al. 2011).

Im untersuchten Gewebe der Kopf- und Halskarzinome der vorliegenden Promotionsarbeit zeigen die fünf (5/5; 100%) HPV-positiven Fälle in der Immunhistochemie für p16^{INK4a} allesamt mäßige bis starke Expressionsmuster. Die HPV-negativen Gewebeproben weisen allerdings auch in zehn von 31 (10/31; 32%) Fällen eine vergleichbare Farbe-Intensität in der Immunhistochemie auf. Das Vorliegen einer HPV-induzierten Neoplasie kann nach den vorliegenden Ergebnissen nicht allein aufgrund des Expressionsmusters des CDK-Inhibitors erfolgen, da sich diesem Algorithmus folgend zahlreiche falsch-positive Fälle ergeben würden. Es sind aber auch umgekehrte Fälle, nämlich aktive HPV-Infektionen ohne p16^{INK4a}-Expressionsanstieg beschrieben worden (Hoffmann et al. 2012). Die teils übliche alleinige Anwendung der p16^{INK4a}-Immunhistochemie mit p16^{INK4a} als Surrogatmarker einer aktiven HPV-Infektion würde dementsprechend zu Fehlinterpretationen der Ergebnisse führen. Tatsächlich HPV-assoziierte Karzinome bleiben möglicherweise unerkant und HPV-negative Karzinome können fälschlicherweise als HPV-infiziert klassifiziert werden. In Hinblick auf die unterschiedliche Therapie und Prognose der Erkrankung ist das Wissen einer Beteiligung der HP-Viren jedoch unabdingbar. Die insgesamt schlechte Prognose von Kopf- und Halskarzinomen hat in den letzten Jahrzehnten zu einer Intensivierung der Therapie geführt. Konsekutiv ist auch die Nebenwirkungsrate der Therapie gestiegen. Das bessere Ansprechen der HPV-positiven Karzinome auf die Radiochemotherapie lässt nun die Überlegung einer Deeskalation der Therapie zu (Mirghani et al. 2014; Zaravinos 2014). Durch die Reduktion könnte bei gleicher Effektivität in der Karzinomtherapie die Nebenwirkungsrate gesenkt und somit die Lebensqualität erhöht werden. Insbesondere die Verminderung von Langzeitkomplikationen spielt für das tendenziell jüngere Patientenkollektiv mit HPV-positiven Karzinomen eine wichtige

Rolle (van Monsjou et al. 2013). Die falsche Einordnung bezüglich des HPV-Status bedeutet somit für einen Teil der Patienten eine zu geringe Intensität in der Therapie mit einem nicht ausreichenden therapeutischen Effekt, für einen anderen Teil eine zu hohe Therapieintensität mit erhöhten Therapiekomplicationen. Das p16^{INK4a}-Expressionsniveau ist daher als alleiniger Marker für eine aktive HPV-Infektion nicht ausreichend geeignet. Eine Zusammenschau von p16^{INK4a} und der Expression viraler Proteine, wie E6 und E7, könnte die Treffergenauigkeit erhöhen.

5.3 Die Antileukoproteiniase *Secretory Leucocyte Protease Inhibitor (SLPI)*

Die Antileukoproteiniase SLPI (*secretory leucocyte protease inhibitor*) ist ein kleines, nicht glykolysiertes Protein mit einer molekularen Masse von 11,7 kDa und einer Kettenlänge von 107 Aminosäuren, welche durch acht Disulfidbrücken stabilisiert wird. Am C- und N-terminalen Ende befindet sich jeweils eine strukturell homologe Region. Sie üben die inhibierende Funktion aus, wobei jedes Ende an spezifische Enzyme bindet (Eisenberg et al. 1990). Die äußere Form des Proteins erinnert an einen Bumerang (Thompson et al. 1986; Kikuchi et al. 1998; Lin et al. 2006). SLPI ist ein starker, sehr affiner Inhibitor der Enzyme Cathepsin, Chymotrypsin, Trypsin und der Leukozytenelastase (Thompson et al. 1986; Boudier et al. 1999). Die Antileukoproteiniase kann in verschiedenen Geweben wie Lunge, Endometrium, Speicheldrüsen, den Schleimhäuten des Respirationstraktes und der Gebärmutter sowie im Sperma, Tränenflüssigkeit und in Speichel-, Nasen- und Bronchialsekret gefunden werden (Thompson et al. 1986; Westin et al. 1994; Ohlsson et al. 1995). Weiterhin wird sie von Zellen des Immunsystems wie zum Beispiel Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und B-Lymphozyten exprimiert (Franken et al. 1989; Abe et al. 1991; Jin et al. 1997). Erstmals wird die Antileukoproteiniase im Jahr 1972 beschrieben, nachdem sie aus Bronchialsekret isoliert werden konnte (Hochstrasser et al. 1972).

Eine Veränderung der Konzentration des SLPI bei Karzinomen wird erstmals 1994 erwähnt. Dort wird eine Erhöhung der Antileukoproteiniase in Karzinomen von Lunge, Brust, Harnblase, Endometrium, Ovar und bei kolorektalen Karzinomen gezeigt (Garver et al. 1994). Auch in Karzinomen des Kopf- und Halsbereiches können im Tumorgewebe SLPI-Anstiege gefunden werden (Roepman et al. 2005; Dasgupta et

al. 2006; Cordes et al. 2011). Hier scheint SLPI eine negative Wirkung auf invasives Tumorwachstum und Metastasenbildung zu haben (Roepman et al. 2005; Cordes et al. 2011). Diese These wird gestützt durch auffallend niedrige SLPI-Spiegel in metastasierten Kopf- und Halskarzinomen (Cordes et al. 2011). In Ovarialkarzinomen sind ähnliche Beobachtungen bezüglich der Metastasenbildung gemacht worden (Nakamura, K. et al. 2008). Diese Korrelation kann allerdings nicht uneingeschränkt auf alle Tumorentitäten übertragen werden. So zeigt beispielsweise eine belgische Studie das Gegenteil, also eine höhere Metastasierungsrate bei erhöhtem SLPI-Expressionsniveau in Lungenkarzinomen (Devoogdt et al. 2003). Die molekularen Mechanismen, die zur SLPI-Erhöhung im Tumorgewebe führen, sind noch nicht gänzlich geklärt. Im Gewebe von Lungenkarzinomen konnte gezeigt werden, dass die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β zu erhöhten SLPI-Expressionen führen (Sallenave et al. 1994). Hingegen ist auch ein Anstieg der TNF- α -Konzentrationen aufgrund hoher SLPI-Spiegel in einer In-vitro-Studie von Ovarialkarzinomen nachgewiesen worden (Nakamura, K. et al. 2008).

In seiner Hauptfunktion verhindert SLPI die Schädigung eines Gewebes durch eine überschießende Entzündungsreaktion (Nakamura, A. et al. 2003; Sehnert et al. 2004). Die durch die Immunantwort aktivierten Makrophagen, Monozyten und neutrophilen Granulozyten setzen Enzyme und Mediatoren frei, welche durch SLPI inaktiviert oder gehemmt werden. Dazu zählen die Leukozytenelastase, verschiedene Matrixmetalloproteasen, Prostaglandin E2 und durch TNF- α induzierte Peroxide (Zhang et al. 1997; Sehnert et al. 2004). Ein weiterer antiinflammatorischer Mechanismus beruht auf der Hemmung von Makrophagen durch Degradierung des Transkriptionsfaktors NF κ B (Taggart et al. 2002). Aufgrund der SLPI-Funktion ist es wenig überraschend, dass erhöhte Konzentrationen des Proteins auch im entzündlichen Gewebe gefunden werden können (Kida et al. 1992; Maruyama et al. 1994).

SLPI besitzt antibakterielle und antivirale Funktionen: Ein vermindertes Bakterienwachstum kann zum Beispiel für *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylokokkus aureus* und verschiedene Streptokokkenspezies (Hiemstra et al. 1996; Sallenave 2002) und eine verminderte Replikation des HI-Virus in vitro (McNeely et al. 1995; Wahl et al. 1997) beobachtet werden. Umgekehrt wirken Mikroorganismen auf die SLPI-Expression. In einer durch Herpes-simplex-

Virus befallenen Zelllinie wird eine verminderte SLPI-Produktion beobachtet. Möglicherweise stellt dieser Vorgang einen Mechanismus dar, um dem Immunsystem zu entgehen (Fakioglu et al. 2008). Aber auch erhöhte SLPI-Expressionen nach Infektionen werden beobachtet, zum Beispiel durch das HI-Virus (Jana et al. 2005).

5.4 Annexin A2

Annexin A2 ist ein Protein, welches im Zytoplasma als Monomer und auf Zelloberflächen als Heterotetramer gefunden werden kann. Das Heterotetramer besteht aus zwei Annexin-A2-Monomeren, verbunden durch ein Dimer, die sogenannte Annexin-2-Leichtkette (auch S100A10). Aufgrund seiner Funktion wird die Leichtkette der Familie der Phospholipidbindepoteinen zugeordnet (Waisman 1995; Rescher et al. 2008). Annexin A2 ist an zahlreichen Membranumbauvorgängen beteiligt. Das Protein nimmt eine zentrale Rolle bei der Zelladhäsion ein, ebenso wie bei der Endo- und Exozytose (Gerke et al. 2005). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Annexin A2 eine Schlüsselrolle in der Bindung und Aufnahme verschiedener Viren spielt. So erhöht das Protein zum Beispiel die Membranfusion nach Bindung an das Zytomegalievirus (Wright et al. 1994; Raynor et al. 1999), stellt einen Rezeptor für Infektionen mit dem „*respiratory syncytial virus*“ (RSV) dar (Malhotra et al. 2003) und erhöht die Infektionsrate nach der Bindung an das Kapsid des Enterovirus 71 (Yang et al. 2011).

Das im Vorkapitel beschriebene SLPI stellt einen endogenen Liganden des Annexin A2 dar. Die antivirale Wirkung der Antileukoproteinase erklärt sich möglicherweise über dessen Bindung an den Rezeptor. So ist in einer In-vitro-Untersuchung nach der Bindung von SLPI an Annexin A2 eine verminderte HIV-Infektionsrate beobachtet worden (Wahl et al. 1997). In dem Zellkulturmodell einer weiteren Studie kann auch eine HPV-Infektion durch SLPI verhindert werden. Hier wird die Untereinheit S100A10 von Annexin A2 als Zielstruktur des HP-Virus, genauer des L2-Kapsidproteins, angesehen (Woodham et al. 2012).

5.5 HPV-Prävalenz in Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereiches

Die Prävalenz der HPV-positiven Plattenepithelkarzinome liegt bei 20 bis 30 % (Hoffmann et al. 1998; McKaig et al. 1998; Gillison et al. 2000). Im hier untersuchten Patientenkollektiv zeigen fünf (5/36; 13,9 %) Plattenepithelkarzinome positive Signale für HPV. Das Untersuchungsergebnis liegt damit deutlich unter der zu erwartenden Prävalenz in einem vergleichbaren Patientenkollektiv. Der Anteil der HPV-positiven Fälle unter den Plattenepithelkarzinomen des Waldeyer'schen Rachenrings ist mit 41,7 % (5/12) auch etwas geringer als für eigene und andere Patientenkollektive bisher beschrieben (Gillison et al. 2001; Klusmann et al. 2001; Hoffmann et al. 2005a; St Guily et al. 2011). Das Hauptaugenmerk der vorliegenden Arbeit liegt jedoch in der Untersuchung der SLPI-Expressionen im Tumorgewebe und in gesunder Schleimhaut von Karzinompatienten sowie in der Schleimhaut von Patienten ohne Neoplasie. Durch die Vielzahl an Gewebeproben und die umfangreichen Untersuchungen jeder Gewebeprobe sind daher die Fallzahlen unter anderem auch der Karzinomproben begrenzt worden. Dies könnte einen möglichen Grund für die Abweichungen der HPV-Prävalenzen darstellen. Die geringe Fallzahl pro Tumorentität lässt das Untersuchungsergebnis anfälliger für statistische Schwankungen werden. Es ist aber auch bekannt, dass die HPV-Prävalenz einer unterschiedlichen geographischen Verteilung unterliegt. So zeigt eine Studie aus der schwedischen Hauptstadt eine Prävalenz des Virus in Tonsillenkarzinomen von 90 % (Nasman et al. 2009), während in den Niederlanden 40 % (Braakhuis et al. 2004) und in Deutschland näherungsweise 60 % HPV-positiv in diesen Karzinomen beschrieben werden. Dieser Aspekt ist für die geringe Prävalenz in diesem Patientenkollektiv aber unerheblich.

Es ist aber deutlich zu erkennen, dass in dem Kollektiv dieser Arbeit Karzinome des Waldeyer'schen Rachenrings besonders prädestiniert für eine HPV-Infektion zu sein scheinen. Die Gründe für die Sonderstellung sind nicht hinreichend bekannt. Die Tonsillen des Waldeyer'schen Rachenrings sind mit ihrer Lokalisation als erster Berührungspunkt zwischen Umwelt und Abwehrsystem einer Vielzahl von pathogenen Organismen ausgesetzt (Wilczynski et al. 1998). So liegt hier die höchste Belastung unter anderem auch mit HP-Viren vor. Die Oberflächenbeschaffenheit der Tonsillen kann einen weiteren Grund für die Prädisposition darstellen. Die Krypten besitzen ausschließlich einschichtiges Epithel.

Mikrotraumen, wie in mehrschichtigen Epithelien, sind hier nicht für eine Infektion vonnöten. Eine geringere Virusclearance in den Tiefen der Krypten wird ebenfalls als begünstigender Faktor angenommen (Klussmann et al. 2001; Klussmann et al. 2004). Interessanterweise steigt die Inzidenz der Tonsillenkarcinome in den letzten Jahren deutlich an, während Karzinome an anderen Lokalisationen des Kopf- und Halsbereiches in Industrienationen rückläufig sind (Blomberg et al. 2011; Chaturvedi et al. 2013; Simard et al. 2014). Dies ließe sich auf eine erhöhte Zahl an oralen HPV-Infektionen an dieser Prädilektionsstelle zurückführen. Der Rückgang der klassischen Risikofaktoren des Tabakrauchs und Alkohols erklärt hingegen das verminderte Auftreten der Karzinogenese an anderen Lokalisationen. Eine abnehmende Inzidenz anderer typischer Tabakrauch-induzierten Karzinome, wie zum Beispiel des Bronchialkarzinoms, kann entsprechend beobachtet werden (Lortet-Tieulent et al. 2014).

Den mit Abstand am häufigsten nachgewiesenen Genotyp in Kopf- und Halskarzinomen stellt HPV16. Dieser Genotyp kann in über 90 % der Fälle nachgewiesen werden (Klussmann et al. 2001; Gillison 2004; Hoffmann et al. 2004; Begum et al. 2005; Furniss et al. 2007). Das hier vorliegende Untersuchungsergebnis deckt sich mit dieser Erkenntnis. Der Genotyp 16 kann in allen fünf HPV-positiven (5/5; 100 %) Proben nachgewiesen werden. Erwähnenswert scheint ein Fall (1/36; 2,8 %) eines Tonsillenkarcinoms mit einer Mischinfektion zweier verschiedener HPV16-Subtypen. Infektionen mit verschiedenen HPV-Typen im Kopf-Hals-Bereich werden im Vergleich zu regelmäßig auftretenden meist Doppel-Infektionen der Zervix uteri auch in der Literatur als Seltenheit angesehen. Eine große Metaanalyse mit über 5000 Fällen von Kopf- und Halskarzinomen zeigt eine Mehrfachinfektion in nur 3,6 % der Fälle (Kreimer et al. 2005).

Die Prävalenz der HPV-assoziierten Kopf- und Halskarzinome ist in Regionen mit einem hohen Anteil an Rauchern in der Bevölkerung geringer als in Regionen mit hohem Nichtraucheranteil (Marur et al. 2010). Der Zusammenhang zwischen Rauchverhalten und HPV-Infektion scheint dabei kein Zufall zu sein. Insbesondere Patienten ohne nennenswerte Tabakrauchanamnese weisen gehäuft HPV-positive Karzinome auf (Farshadpour et al. 2007; Andrews et al. 2009). Dies ist auch in dem hier untersuchten Patientenkollektiv festzustellen. Die eindeutig höhere HPV-Prävalenz liegt mit 25 % (4/16) auf Seiten des Nichtraucherkollektivs. Im

Raucherkollektiv findet sich im Vergleich eine HPV-Prävalenz von 5 % (1/20). Die Ingredienzien des Tabakrauches scheinen in der Schleimhaut Prozesse zu initiieren, die einen möglichen Schutzfaktor für eine Infektion mit HPV darstellen. Nichtraucher sind hingegen anfälliger für eine Infektion. Diese inverse Korrelation zwischen Tabakkonsum und HPV-Status widerspricht der Beobachtung in der Zervix uteri. Frauen mit einem Konsum von mehr als 15 Zigaretten pro Tag haben ein doppelt erhöhtes Risiko einer zervikalen HPV-Infektion. Metabolite des Tabaks führen zu einer Veränderung der Zusammensetzung des Zervixschleims und verringern dessen Schutzwirkung. Das Epithel wird vulnerabler für Infektionen (Vaccarella et al. 2008). Es scheint demnach in der Mundschleimhaut eher eine lokale Wirkung des Tabakrauchs zu sein, die vor einer Infektion schützt.

5.6 Zusammenhang zwischen SLPI-Expression und Rauchverhalten bei Patienten mit Kopf- und Halskarzinomen

Das Rauchverhalten bewirkt möglicherweise eine Veränderung der SLPI-Expression. Es ist bekannt, dass Nikotin zahlreiche Signalwege in der Zelle moduliert, die zu einer Erhöhung der Transkription führen (Shi et al. 2012; Wu et al. 2013). Die Erhöhung der SLPI-Transkription ist durch einen ähnlichen Mechanismus denkbar. Der genaue Prozess ist allerdings nicht bekannt. Raucher müssten nach dieser Theorie erhöhte Spiegel für SLPI aufweisen. Eine signifikante Korrelation zwischen SLPI-Expression und Rauchverhalten konnte in der hier vorliegenden Untersuchung für das Tumorgewebe nicht gezeigt werden. Es zeigen sich in der Rauchergruppe sechs (6/20; 30 %) schwache, acht (8/20; 40 %) mäßige und sechs (6/20; 30 %) starke Expressionen für SLPI. Die Nichtrauchergruppe zeigt hingegen zwei (2/16, 12,5 %) negative, fünf (5/16; 32 %) schwache, vier (4/16; 25 %) mäßige und fünf (5/16; 32 %) starke SLPI-Expressionsmuster. Der Grund für die schwache Korrelation könnte die Tatsache sein, dass für die statistische Auswertung zur Fallzahlerhöhung Ex-Raucher in die Nichtrauchergruppe aufgenommen worden sind. Als Einschlusskriterium für diese Gruppe ist eine mindestens 10-jährige Rauchabstinenz festgelegt worden, in der Annahme, dass nach diesem Zeitraum keine Einwirkungen des Tabakrauches auf die Genexpression zu finden sind und das Genexpressionsverhalten denen der Nichtraucher gleicht. Das SLPI-

Expressionsniveau der Ex-Raucher ähnelt interessanterweise denen der Raucher ($p = 0,779$). Es zeigen acht von zehn (8/10; 80 %) Ex-Raucher mäßige oder starke Expressionsmuster für SLPI. Patienten, die anamnestisch angeben niemals geraucht zu haben, zeigen hingegen einen signifikanten Unterschied zur Rauchergruppe ($p = 0,035$). Dieses Ergebnis stützt die Hypothese einer erhöhten, Tabakrauch-induzierten SLPI-Expression.

Ein erhöhtes SLPI-Expressionsniveau ist möglicherweise ursächlich für eine verminderte Prävalenz von Papillomviren in Kopf- und Halstumoren. Eine signifikante Korrelation zwischen SLPI-Expression und HPV-Status kann in der vorliegenden Untersuchung festgestellt werden ($p < 0,01$). Es sind in der Mehrheit (23/31; 74 %) der HPV-negativen Karzinome mäßige oder starke Expressionsmuster für SLPI zu finden. Es zeigt sich darüber hinaus in dieser Gruppe kein einziger Fall ohne erhöhte SLPI-Expression. Im Gegensatz weisen alle untersuchten HPV-positiven Karzinomproben (5/5, 100 %) keine oder niedrige SLPI-Spiegel auf.

5.7 SLPI-Expression in der gesunden Schleimhaut bei Patienten mit Kopf- und Halskarzinomen

Es ist sicherlich ungenügend, den Zusammenhang der SLPI-Expression in Karzinomzellen allein mit dem Rauchverhalten erklären zu wollen. Das Karzinomgewebe besteht aus Zellen, in denen die physiologische Zellkontrolle fehlt und es zu einer autonomen Teilung kommt. Es sind zahlreiche proliferationsfördernde Signalwege aktiv, die zu einer Veränderung verschiedener Transkriptionsvorgänge führen. Eine Erhöhung der SLPI-Expression in Kopf- und Halskarzinomen ist mehrfach beschrieben worden (Roepman et al. 2005; Cordes et al. 2011). Als mögliche Ursachen werden die erhöhten inflammatorischen Mediatoren TNF- α und IL-1 β im Tumorgewebe diskutiert (Sallenave et al. 1994). In anderen Tumorentitäten, wie zum Beispiel Ovarial-, Brust-, Kolon-, Pankreas- und Magentumoren sind ähnliche Effekte beobachtet worden (Devoogdt et al. 2004). Die SLPI-Expression im Tumorgewebe hängt also von verschiedenen, teils unbekanntem Faktoren ab. Es wird daher in dieser Arbeit auch die Neoplasie-freie, klinisch gesunde Schleimhaut derselben Patienten hinsichtlich der SLPI-Expression untersucht, welche den genannten Einflüssen auf die Transkription nicht ausgesetzt

sind. Das hier vorliegende Untersuchungsergebnis stimmt mit der Vermutung überein, dass auch die Expression der Antileukoproteinase im Tumorgewebe hochreguliert ist. Es zeigen sich höhere SLPI-Expressionsmuster im Karzinomgewebe im Vergleich zur gesunden Schleimhaut. Diese Tendenz konnte bei Rauchern in ausgeprägterer Form als bei Nichtrauchern festgestellt werden. Eine ähnliche Korrelation ist bereits in einer In-vitro-Untersuchung gezeigt worden. Hier haben Kopf- und Halskarzinome eine signifikant erhöhte SLPI-Expression gegenüber Fibroblasten aufgewiesen (Dasgupta et al. 2006). Eine US-amerikanische Studie kommt hingegen zu einem anderen Ergebnis der SLPI-Verteilung. Es kann in jener Untersuchung eine signifikant höhere SLPI-Expression in der nicht-neoplastischen Umgebung oraler Plattenepithelkarzinome im Vergleich zum Karzinomgewebe gezeigt werden (Wen et al. 2011). Eine Angabe über das Rauchverhalten des Patientenkollektivs kann jedoch nicht gefunden werden. Diese konträre Studie ist möglicherweise auch aufgrund einer kleinen Stichprobengröße ($n = 24$) zu einem anderen Ergebnis gekommen. Des Weiteren werden die Karzinome in einem sehr frühen Stadium und ausschließlich in den Bereichen des Mundbodens und der Zunge beurteilt.

5.8 Zusammenhang zwischen SLPI-Expression und Rauchverhalten in Patienten ohne Neoplasie

Das erhöhte Expressionsniveau der Antileukoproteinase SLPI bei Rauchern kann eine Erklärung für die niedrigere HPV-Prävalenz liefern. Die hohen Konzentrationen von SLPI konkurrieren mit den HP-Viren um den gemeinsamen Rezeptor oder Modulator Annexin A2 und behindern so die Viren am Zelleintritt. Die HPV-Infektion stellt den ersten Schritt in der Karzinogenese HPV-assoziiierter Tumore dar. Das Karzinom tritt nach mehreren Jahren bis Jahrzehnten als Spätkomplikation der HPV-Infektion auf. Bisher ist die SLPI-Expression nur im Karzinomgewebe untersucht worden. Der Prozess der HPV-Infektion betrifft jedoch die gesunde Schleimhaut. Es stellt sich hier die Frage, ob die SLPI-Expression auch in gesunden Individuen mit dem Rauchverhalten korreliert. Das untersuchte Raucherkollektiv dieser Arbeit zeigt deutlich höhere Expressionsspiegel für SLPI als das Nichtraucherkollektiv. Es zeigen sich in der Nichtrauchergruppe 11 der 20 (55 %) Schleimhautpräparate gänzlich

negativ für SLPI, sechs (6/20; 30 %) weisen eine schwache Expression auf. Im Raucherkollektiv sind sechs von 18 (33 %) Gewebeproben mäßig oder stark positiv und sieben (7/18; 39 %) schwach positiv für SLPI. Die hier gezeigten Ergebnisse zeigen eine signifikante, inverse Korrelation ($p = 0,038$) zwischen Rauchverhalten und SLPI-Expression in der Schleimhaut bei Patienten ohne Neoplasie. Es können der oben genannten Hypothese folgend bei Rauchern bereits in gesunder Schleimhaut erhöhte SLPI-Konzentrationen gefunden werden. Es bleibt jedoch unklar, warum fünf (5/18; 28 %) Patienten des Raucherkollektivs auch negative SLPI-Expressionsergebnisse zeigen. Denkbare Ursachen sind genetisch determinierte, unterschiedliche Suszeptibilitäten gegenüber den Inhaltsstoffen des Tabakrauchs. Andere Umweltfaktoren sind ebenfalls nicht ausgeschlossen. Eine Betrachtung des Kollektivs nach Alter, Vorerkrankungen oder beruflichen Exposition findet nicht statt.

Ein Kritikpunkt in der Bewertung der Ergebnisse ist die Tatsache, dass auch die „gesunde Schleimhaut“ von Patienten entnommen worden ist, welche sich mit Beschwerden in der Klinik vorgestellt haben. Chronische Tonsillitiden sind hier der häufigste Vorstellungsgrund gewesen. Entzündliche Prozesse lassen die Expression von SLPI ebenfalls ansteigen. Es ist, mit diesem Wissen, jedoch darauf geachtet worden, einen ausreichend großen Abstand zum Beschwerdeherd einzuhalten. Die entnommenen Schleimhäute zeigen makroskopisch und mikroskopisch keine entzündlichen Veränderungen. Durch diese Maßnahmen ist versucht worden, die Störgröße einer entzündlichen Aktivität möglichst gering zu halten. Eine Mitbeteiligung des hier untersuchten Gewebes ist aber nicht gänzlich auszuschließen.

Erwähnenswert scheinen die HPV-positiven Fälle in der untersuchten Arbeit. Es finden sich im Kollektiv zwei HPV-positive Schleimhautproben (2/74; 2,7 %), eine ohne und eine mit schwacher SLPI-Expression. Aus der sehr kleinen Anzahl der vorliegenden HPV-positiven Untersuchungspräparate lassen sich daraus keine Schlüsse ableiten. Die Ergebnisse zeigen aber ein zur Hypothese passendes Bild.

5.9 Zusammenhang zwischen SLPI- und Annexin-A2-Genexpression

Ein Zusammenhang zwischen SLPI und Annexin A2 gilt wissenschaftlich belegt. SLPI bildet einen endogenen Liganden des Rezeptors. Die antivirale Wirkung des SLPI ist möglicherweise eine Folge dieser Bindung. Es ist kürzlich gezeigt worden, dass Annexin A2 eine bedeutende Rolle bei der Invasion der Papillomviren in die Zelle spielt. Das L2-Protein des HPV interagiert mit einer Untereinheit des Annexin A2 (S100A10). Die Blockierung des Rezeptors durch SLPI hat in vitro zu einer signifikanten Verminderung der HPV-Infektionen geführt (Woodham et al. 2012). Es sind ähnliche Effekte bezüglich des HI-Virus beobachtet worden. Orale Infektionen zeigen sich seltener bei hohen SLPI-Spiegeln (Drannik et al. 2011). Hier wird ebenso keine virustoxische Wirkung angenommen, sondern eine Behinderung der Virusadhäsion. In Zellkulturen ist die Verhinderung einer HIV-Infektion durch SLPI bereits gezeigt worden (Wahl et al. 1997). Eine orale HIV-Neuinfektion ist möglicherweise auch nur aufgrund von hohen SLPI-Konzentrationen im humanen Speichel als sehr seltenes Ereignis beschrieben (Jana et al. 2005).

Es reicht nach dem Modell von Woodham möglicherweise nicht aus, sich allein das Expressionsverhalten des SLPI anzuschauen. Es wäre denkbar, dass ein niedriges Expressionsniveau der Antileukoproteinase bereits vor einer HPV-Infektion schützt, wenn Annexin A2 gleichzeitig auch niedrig exprimiert wird. Im umgekehrten Fall wären hohe SLPI-Spiegel kein Schutz bei einer gesteigerten Annexin A2-Expression. In der vorliegenden Arbeit ist daher das Verhältnis von SLPI und Annexin A2 auf mRNA-Ebene bestimmt worden. Es weisen beide Proteine einen Expressionsanstieg auf. Dabei findet sich eine starke Korrelation zwischen SLPI- und Annexin A2-Genexpression. Diese Beobachtung lässt sich im Tumorgewebe und auch in gesunder Schleimhaut feststellen. Die Korrelation ist jedoch in Karzinomen stärker ausgeprägt. Die Ursache könnten auch hier die im Tumorgewebe vermehrt gebildeten Zytokine sein. In Kopf- und Halskarzinomen können sowohl erhöhte IL-1-Konzentrationen (Chen et al. 1999) als auch Mediatoren des eIF2-, eIF4- und mTOR-Signalweges gefunden werden (Braakhuis et al. 2013). Beide Signalwege führen zu einer gesteigerten Translation und Transkription zellulärer Proteine, wie auch SLPI und Annexin A2. Eine positive Korrelation zwischen IL-1- und SLPI-Expression ist bereits beschrieben worden (Sallenave et al. 1994). Die Korrelation ist ebenso deutlicher bei Rauchern als bei Nichtrauchern. Die stärkere Ausprägung im

Raucherkollektiv könnte auf die zusätzlich bestehende, inflammatorische Wirkung des Nikotins (Sallenave et al. 1994) und anderer Inhaltsstoffe des Tabaks (Rom et al. 2013) sein.

Der Einfluss des Raucherverhaltens auf die SLPI- und Annexin-A2-Expression ist auch auf der mRNA-Ebene nachweisbar. Patienten mit einer Rauchanamnese zeigen einen deutlichen Expressionsanstieg beider Gene. Die SLPI-Genexpressionspiegel steigen dabei stärker als die Annexin-A2-Spiegel. Im Vergleich zum Nichtraucherkollektiv zeigt sich bei Rauchern bezüglich der SLPI-Expression in der Schleimhaut der Patienten ohne Neoplasie eine 10 (± 2)-fache, in der klinisch gesunden Schleimhaut der Patienten mit Neoplasie eine 18 (± 4)-fache und im Karzinomgewebe eine 110 (± 3)-fache Erhöhung. Die hier durchgeführten Untersuchungen zeigen weiterhin höhere Annexin-A2- als SLPI-Genexpressionsspiegel im Nichtraucherkollektiv sowohl im Tumorgewebe als auch in gesunder Schleimhaut. Es wären nach dem Modell, dass Annexin A2 als Rezeptor oder zumindest Mediator für das HP-Virus fungiert, diese Nichtraucher mit einem niedrigen SLPI-Expressionsniveau prädestiniert für eine Infektion, da die Vorteile bei um die konkurrierenden Rezeptorbindestellen klar auf der Seite des Virus lägen. Umgekehrt haben hohe SLPI-Konzentrationen über eine kompetitive Hemmung am Annexin-A2-Rezeptor eine niedrigere HPV-Infektionsrate zur Folge. Es weisen, dieser Hypothese folgend, alle fünf (5/5) untersuchten HPV-positiven Patienten eine niedrige SLPI-Expression auf mRNA-Ebene auf. Die Annexin-A2-Expression dieser Patientengruppe liegen hingegen über dem Durchschnittswert.

5.10 Schlussbetrachtung

Die vorliegende Arbeit zeigt eine Korrelation zwischen Expression der Antileukoproteinase SLPI und dem Rauchverhalten. Raucher haben signifikant höhere Expressionsspiegel für SLPI als Nichtraucher. Die Expressionserhöhung kann im Karzinomgewebe, in gesunder Schleimhaut der Patienten mit Neoplasie und erstmalig auch in gesunden Individuen nachgewiesen werden. Es können weiterhin in allen HPV-positiven Gewebeproben niedrige Expressionsniveaus für SLPI gezeigt werden. Das Ergebnis dieser Arbeit erhärtet die Hypothese, dass SLPI eine bedeutende Rolle bei der HPV-Infektion und in der Entstehung HPV-assoziiertes

Kopf- und Halskarzinome spielt. Ingredienzien des Tabakrauches scheinen in der Schleimhaut Prozesse zu initiieren, die zu einer Erhöhung der SLPI-Expression führen und so einen Schutzfaktor gegenüber HPV-Infektion darstellen. Die molekularen Mechanismen, die zu einer SLPI-Erhöhung führen und die klinisch-pathologischen Folgen dieses Prozesses sind jedoch nicht genau bekannt und bleiben Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Die gewonnene Erkenntnis dieser Arbeit trägt wesentlich zum Verständnis des Zusammenhangs zwischen HPV-assoziiierter Karzinogenese im Kopf- und Halsbereich bei. Die Ergebnisse liefern eine mögliche Erklärung für die bisher unverstandene Tatsache, warum Raucher an HPV-negativen und Nichtraucher an HPV-positiven Karzinomen erkranken.

6. Zusammenfassung

Humane Papillomviren sind ursächlich für eine Vielzahl verschiedener Haut- und Schleimhautläsionen unterschiedlicher Dignität. Zu malignen Läsionen zählen unter anderem Karzinome des Kopf- und Halsbereiches. Es besteht bei den Plattenepithelkarzinomen dieser Tumoren in 20 bis 30 % eine Assoziation mit dem HP-Virus. Plattenepithelkarzinome der Tonsillen scheinen besonders prädestiniert für eine Infektion. Hier beträgt der Anteil HPV-positiven Fälle 50 bis 60 %. HPV16 stellt mit über 90 % den häufigsten Genotypen in dieser Tumorentität. Kopf- und Halskarzinome auf dem Boden einer HPV-Infektion zeigen im Vergleich zu Karzinomen mit negativem HPV-Status ein aggressiveres biologisches Verhalten mit frühzeitiger Metastasierung in die lokoregionären Lymphknoten. Die Patienten weisen dennoch bessere Überlebensdaten auf. Dies begründet sich auf ein besseres Ansprechen der Therapie, insbesondere der Strahlentherapie.

Vorausgegangene Untersuchungen zeigen erhöhte HPV-Prävalenzen in Karzinomen von Patienten ohne nennenswerte Tabakrauchanamnese. Die Ursache der unterschiedlichen HPV-Prävalenz zwischen Rauchern und Nichtrauchern kann möglicherweise durch unterschiedliche Konzentrationen der Antileukoproteinase SLPI erklärt werden. SLPI ist der endogene Ligand des Rezeptors Annexin A2, der kürzlich als ein Aufnahmerezeptor der humanen Papillomviren identifiziert worden ist. Hohe SLPI-Konzentrationen haben bereits in einer In-vitro-Untersuchung zu einer Verminderung von HPV-Infektionen geführt.

Es wird in der vorliegenden Arbeit der Zusammenhang zwischen SLPI-Expression und dem Rauchverhalten untersucht. Für die Untersuchung werden 110 Gewebeproben von 74 Patienten sowohl mit Kopf- und Halskarzinomen (36/74; 20 Raucher; 16 Nichtraucher) als auch ohne Neoplasie (38/74; 20 Raucher; 18 Nichtraucher) ausgewertet. Jede Gewebeprobe wird mittels Polymerasekettenreaktion und anschließender Sequenzierung auf HPV-DNA überprüft. Es werden weiterhin die Proteinexpressionsniveaus für SLPI mittels Immunhistochemie und die Genexpressionsniveaus für SLPI und Annexin A2 mittels quantitativer PCR bestimmt. Die Ergebnisse werden mit dem Rauchverhalten und dem HPV-Status der Patienten korreliert.

Es sind in sieben (7/110) Gewebeproben HPV-DNA nachweisbar. Die HPV-Prävalenz beträgt unter den Karzinomen des Kopf- Hals-Bereiches 13,9 % (5/36) und unter den Tonsillenkarzinomen 41,7 % (5/12). HPV16 ist in allen HPV-positiven Gewebeproben als alleinig vorkommender Genotyp zu identifizieren. Die SLPI-Expressionen zeigen in der Immunhistochemie einen signifikanten Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern. Die Korrelation kann sowohl im Tumorgewebe ($p = 0,035$), in der klinisch gesunden Schleimhaut derselben Patienten ($p = 0,046$) und auch bei Patienten ohne Neoplasie ($p = 0,014$) festgestellt werden. Die Genexpressionsniveaus für SLPI zeigen bezüglich des Rauchverhaltens mit der Immunhistochemie übereinstimmende Ergebnisse. Es kann im Raucherkollektiv eine Erhöhung der SLPI-Genexpression gegenüber dem Nichtraucherkollektiv nachgewiesen werden: im Karzinomgewebe eine 109-fache (109.26 ± 23.08), in der gesunden Schleimhaut derselben Patienten eine 18-fache (18.02 ± 3.93) und bei Patienten ohne Neoplasie eine 10-fache (10.49 ± 1.89) Erhöhung.

Erstmalig kann in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine erhöhte SLPI-Expression bei Rauchern nicht nur das Karzinomgewebe betrifft, sondern auch die gesunde Schleimhaut. Die SLPI-Erhöhungen können bei Patienten mit und ohne Neoplasie beobachtet werden. Alle HPV-positiven Gewebeproben zeigen keine oder sehr schwache SLPI-Expressionen. Das Untersuchungsergebnis erhärtet die Hypothese, dass SLPI eine bedeutende Rolle bei der Infektion mit humanen Papillomviren und in der Entstehung HPV-assoziiertes Kopf- und Halskarzinome spielt. Tabakrauch erhöht über noch nicht genau bekannte Mechanismen die SLPI-Expression in der Schleimhaut und stellt so einen Schutzfaktor gegenüber HPV-Infektionen dar.

7. Literaturverzeichnis

Abe, T., Kobayashi, N., Yoshimura, K., Trapnell, B. C., Kim, H., Hubbard, R. C., Brewer, M. T., Thompson, R. C., Crystal, R. G. (1991): Expression of the secretory leukoprotease inhibitor gene in epithelial cells. *The Journal of clinical investigation*, 87, 2207-2215

Akervall, J., Guo, X., Qian, C. N., Schoumans, J., Leeser, B., Kort, E., Cole, A., Resau, J., Bradford, C., Carey, T., Wennerberg, J., Anderson, H., Tennvall, J., Teh, B. T. (2004): Genetic and expression profiles of squamous cell carcinoma of the head and neck correlate with cisplatin sensitivity and resistance in cell lines and patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 10, 8204-8213

Andl, T., Kahn, T., Pfuhl, A., Nicola, T., Erber, R., Conradt, C., Klein, W., Helbig, M., Dietz, A., Weidauer, H., Bosch, F. X. (1998): Etiological involvement of oncogenic human papillomavirus in tonsillar squamous cell carcinomas lacking retinoblastoma cell cycle control. *Cancer research*, 58, 5-13

Andrews, E., Seaman, W. T., Webster-Cyriaque, J. (2009): Oropharyngeal carcinoma in non-smokers and non-drinkers: a role for HPV. *Oral oncology*, 45, 486-491

Baez, A. (2008): Genetic and environmental factors in head and neck cancer genesis. *Journal of environmental science and health. Part C, Environmental carcinogenesis & ecotoxicology reviews*, 26, 174-200

Begum, S., Cao, D., Gillison, M., Zahurak, M., Westra, W. H. (2005): Tissue distribution of human papillomavirus 16 DNA integration in patients with tonsillar carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 11, 5694-5699

Bergant Marusic, M., Ozbun, M. A., Campos, S. K., Myers, M. P., Banks, L. (2012): Human papillomavirus L2 facilitates viral escape from late endosomes via sorting nexin 17. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 13, 455-467

Bernard, H. U., Burk, R. D., Chen, Z., van Doorslaer, K., zur Hausen, H., de Villiers, E. M. (2010): Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, 401, 70-79

Bertuccio, M. P., 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. *European journal of gynaecological oncology*, 32, 62-64

Blomberg, M., Nielsen, A., Munk, C., Kjaer, S. K. (2011): Trends in head and neck cancer incidence in Denmark, 1978-2007: focus on human papillomavirus associated sites. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 129, 733-741

Bosch, F. X., Manos, M. M., Munoz, N., Sherman, M., Jansen, A. M., Peto, J., Schiffman, M. H., Moreno, V., Kurman, R., Shah, K. V. (1995): Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a

worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *Journal of the National Cancer Institute*, 87, 796-802

Boudier, C., Cadene, M., Bieth, J. G. (1999): Inhibition of neutrophil cathepsin G by oxidized mucus proteinase inhibitor. Effect of heparin. *Biochemistry*, 38, 8451-8457

Braakhuis, B. J., Graveland, A. P., Dijk, F., Ylstra, B., van Wieringen, W. N., Leemans, C. R., Brakenhoff, R. H. (2013): Expression signature in peripheral blood cells for molecular diagnosis of head and neck squamous cell carcinoma. *Oral diseases*, 19, 452-455

Braakhuis, B. J., Snijders, P. J., Keune, W. J., Meijer, C. J., Ruijter-Schippers, H. J., Leemans, C. R., Brakenhoff, R. H. (2004): Genetic patterns in head and neck cancers that contain or lack transcriptionally active human papillomavirus. *Journal of the National Cancer Institute*, 96, 998-1006

Buck, C. B., Cheng, N., Thompson, C. D., Lowy, D. R., Steven, A. C., Schiller, J. T., Trus, B. L. (2008): Arrangement of L2 within the papillomavirus capsid. *Journal of virology*, 82, 5190-5197

Chang, F., Syrjanen, S., Kellokoski, J., Syrjanen, K. (1991): Human papillomavirus (HPV) infections and their associations with oral disease. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 20, 305-317

Chaturvedi, A. K., Anderson, W. F., Lortet-Tieulent, J., Curado, M. P., Ferlay, J., Franceschi, S., Rosenberg, P. S., Bray, F., Gillison, M. L. (2013): Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 31, 4550-4559

Chen, Z., Malhotra, P. S., Thomas, G. R., Ondrey, F. G., Duffey, D. C., Smith, C. W., Enamorado, I., Yeh, N. T., Kroog, G. S., Rudy, S., McCullagh, L., Mousa, S., Quezado, M., Herscher, L. L., Van Waes, C. (1999): Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 5, 1369-1379

Chouhy, D., Bolatti, E. M., Perez, G. R., Giri, A. A. (2013): Analysis of the genetic diversity and phylogenetic relationships of putative human papillomavirus types. *The Journal of general virology*, 94, 2480-2488

Combata, A. L., Touze, A., Bousarghin, L., Sizaret, P. Y., Munoz, N., Coursaget, P. (2001): Gene transfer using human papillomavirus pseudovirions varies according to virus genotype and requires cell surface heparan sulfate. *FEMS microbiology letters*, 204, 183-188

Conger, K. L., Liu, J. S., Kuo, S. R., Chow, L. T., Wang, T. S. (1999): Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human dna polymerase alpha/primase. *The Journal of biological chemistry*, 274, 2696-2705

Cordes, C., Hasler, R., Werner, C., Gorogh, T., Rocken, C., Hebebrand, L., Kast, W. M., Hoffmann, M., Schreiber, S., Ambrosch, P. (2011): The level of secretory leukocyte protease inhibitor is decreased in metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *International journal of oncology*, 39, 185-191

Cripe, T. P., Haugen, T. H., Turk, J. P., Tabatabai, F., Schmid, P. G., 3rd, Durst, M., Gissmann, L., Roman, A., Turek, L. P. (1987): Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. *The EMBO journal*, 6, 3745-3753

Crusius, K., Rodriguez, I., Alonso, A. (2000): The human papillomavirus type 16 E5 protein modulates ERK1/2 and p38 MAP kinase activation by an EGFR-independent process in stressed human keratinocytes. *Virus genes*, 20, 65-69

Culp, T. D., Budgeon, L. R., Marinkovich, M. P., Meneguzzi, G., Christensen, N. D. (2006): Keratinocyte-secreted laminin 5 can function as a transient receptor for human papillomaviruses by binding virions and transferring them to adjacent cells. *Journal of virology*, 80, 8940-8950

Das, B. C., Sharma, J. K., Gopalakrishna, V., Luthra, U. K. (1992): Analysis by polymerase chain reaction of the physical state of human papillomavirus type 16 DNA in cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *The Journal of general virology*, 73 (Pt 9), 2327-2336

Dasgupta, S., Tripathi, P. K., Qin, H., Bhattacharya-Chatterjee, M., Valentino, J., Chatterjee, S. K. (2006): Identification of molecular targets for immunotherapy of patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Oral oncology*, 42, 306-316

de Villiers, E. M. (2013): Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology*, 445, 2-10

de Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U., zur Hausen, H. (2004): Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324, 17-27

Demonbreun, W. A., Goodpasture, E. W. (1932): Infectious Oral Papillomatosis of Dogs. *The American journal of pathology*, 8, 43-56 47

Devoogdt, N., Hassanzadeh Ghassabeh, G., Zhang, J., Brys, L., De Baetselier, P., Revets, H. (2003): Secretory leukocyte protease inhibitor promotes the tumorigenic and metastatic potential of cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 5778-5782

Devoogdt, N., Revets, H., Ghassabeh, G. H., De Baetselier, P. (2004): Secretory leukocyte protease inhibitor in cancer development. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1028, 380-389

Doorbar, J. (2005): The papillomavirus life cycle. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 32 Suppl 1, S7-15

Doorbar, J., Ely, S., Sterling, J., McLean, C., Crawford, L. (1991): Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature*, 352, 824-827

Doorbar, J., Foo, C., Coleman, N., Medcalf, L., Hartley, O., Prospero, T., Naphine, S., Sterling, J., Winter, G., Griffin, H. (1997): Characterization of events during the late stages of HPV16 infection in vivo using high-affinity synthetic Fabs to E4. *Virology*, 238, 40-52

Drannik, A. G., Henrick, B. M., Rosenthal, K. L. (2011): War and peace between WAP and HIV: role of SLPI, trappin-2, elafin and ps20 in susceptibility to HIV infection. *Biochemical Society transactions*, 39, 1427-1432

Dyson, N., Howley, P. M., Munger, K., Harlow, E. (1989): The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science (New York, N.Y.)*, 243, 934-937

Eisenberg, S. P., Hale, K. K., Heimdal, P., Thompson, R. C. (1990): Location of the protease-inhibitory region of secretory leukocyte protease inhibitor. *The Journal of biological chemistry*, 265, 7976-7981

Evander, M., Frazer, I. H., Payne, E., Qi, Y. M., Hengst, K., McMillan, N. A. (1997): Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *Journal of virology*, 71, 2449-2456

Fakhry, C., Westra, W. H., Li, S., Cmelak, A., Ridge, J. A., Pinto, H., Forastiere, A., Gillison, M. L. (2008): Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *Journal of the National Cancer Institute*, 100, 261-269

Fakioglu, E., Wilson, S. S., Mesquita, P. M., Hazrati, E., Cheshenko, N., Blaho, J. A., Herold, B. C. (2008): Herpes simplex virus downregulates secretory leukocyte protease inhibitor: a novel immune evasion mechanism. *Journal of virology*, 82, 9337-9344

Farshadpour, F., Hordijk, G. J., Koole, R., Slootweg, P. J. (2007): Non-smoking and non-drinking patients with head and neck squamous cell carcinoma: a distinct population. *Oral diseases*, 13, 239-243

Franken, C., Meijer, C. J., Dijkman, J. H. (1989): Tissue distribution of antileukoprotease and lysozyme in humans. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 37, 493-498

Frattini, M. G., Laimins, L. A. (1994): Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 12398-12402

Furniss, C. S., McClean, M. D., Smith, J. F., Bryan, J., Nelson, H. H., Peters, E. S., Posner, M. R., Clark, J. R., Eisen, E. A., Kelsey, K. T. (2007): Human papillomavirus 16 and head and neck squamous cell carcinoma. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 120, 2386-2392

Galloway, D. A., Gewin, L. C., Myers, H., Luo, W., Grandori, C., Katzenellenbogen, R. A., McDougall, J. K. (2005): Regulation of telomerase by human papillomaviruses. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 70, 209-215

Garver, R. I., Jr., Goldsmith, K. T., Rodu, B., Hu, P. C., Sorscher, E. J., Curiel, D. T. (1994): Strategy for achieving selective killing of carcinomas. *Gene therapy*, 1, 46-50

Genther, S. M., Sterling, S., Duensing, S., Munger, K., Sattler, C., Lambert, P. F. (2003): Quantitative role of the human papillomavirus type 16 E5 gene during the productive stage of the viral life cycle. *Journal of virology*, 77, 2832-2842

Gerke, V., Creutz, C. E., Moss, S. E. (2005): Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 6, 449-461

Gillison, M. L. (2004): Human papillomavirus-associated head and neck cancer is a distinct epidemiologic, clinical, and molecular entity. *Seminars in oncology*, 31, 744-754

Gillison, M. L., D'Souza, G., Westra, W., Sugar, E., Xiao, W., Begum, S., Viscidi, R. (2008): Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, 100, 407-420

Gillison, M. L., Koch, W. M., Capone, R. B., Spafford, M., Westra, W. H., Wu, L., Zahurak, M. L., Daniel, R. W., Viglione, M., Symer, D. E., Shah, K. V., Sidransky, D. (2000): Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, 92, 709-720

Gillison, M. L., Shah, K. V. (2001): Human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma: mounting evidence for an etiologic role for human papillomavirus in a subset of head and neck cancers. *Current opinion in oncology*, 13, 183-188

Giroglou, T., Florin, L., Schafer, F., Streeck, R. E., Sapp, M. (2001): Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *Journal of virology*, 75, 1565-1570

Hall, J. C., Hall, B. J. (2009): *Skin Infections: Diagnosis and Treatment*. Cambridge University Press,

Hara, E., Smith, R., Parry, D., Tahara, H., Stone, S., Peters, G. (1996): Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Molecular and cellular biology*, 16, 859-867

Hiemstra, P. S., Maassen, R. J., Stolk, J., Heinzl-Wieland, R., Steffens, G. J., Dijkman, J. H. (1996): Antibacterial activity of antileukoprotease. *Infection and immunity*, 64, 4520-4524

Hobbs, C. G., Sterne, J. A., Bailey, M., Heyderman, R. S., Birchall, M. A., Thomas, S. J. (2006): Human papillomavirus and head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clinical otolaryngology : official journal of ENT-UK ; official journal of Netherlands Society for Oto-Rhino-Laryngology & Cervico-Facial Surgery*, 31, 259-266

Hochstrasser, K., Reichert, R., Schwarz, S., Werle, E. (1972): [Isolation and characterisation of a protease inhibitor from human bronchial secretion]. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur physiologische Chemie*, 353, 221-226

Hoffmann, M., Gorogh, T., Gottschlich, S., Lohrey, C., Rittgen, W., Ambrosch, P., Schwarz, E., Kahn, T. (2005a): Human papillomaviruses in head and neck cancer: 8 year-survival-analysis of 73 patients. *Cancer letters*, 218, 199-206

Hoffmann, M., Gottschlich, S., Gorogh, T., Lohrey, C., Schwarz, E., Ambrosch, P., Kahn, T. (2005b): Human papillomaviruses in lymph node neck metastases of head and neck cancers. *Acta oto-laryngologica*, 125, 415-421

Hoffmann, M., Ihloff, A. S., Gorogh, T., Weise, J. B., Fazel, A., Krams, M., Rittgen, W., Schwarz, E., Kahn, T. (2010): p16(INK4a) overexpression predicts translational active human papillomavirus infection in tonsillar cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 127, 1595-1602

Hoffmann, M., Kahn, T., Mahnke, C. G., Goeroegh, T., Lippert, B. M., Werner, J. A. (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 oto-laryngologica*, 118, 138-144

Hoffmann, M., Lohrey, C., Hunziker, A., Kahn, T., Schwarz, E. (2004): Human papillomavirus type 16 E6 and E7 genotypes in head-and-neck carcinomas. *Oral oncology*, 40, 520-524

Hoffmann, M., Quabius, E. S., Tribius, S., Hebebrand, L., Gorogh, T., Halec, G., Kahn, T., Hedderich, J., Rocken, C., Haag, J., Waterboer, T., Schmitt, M., Giuliano, A. R., Kast, W. M. (2013): Human papillomavirus infection in head and neck cancer: the role of the secretory leukocyte protease inhibitor. *Oncology reports*, 29, 1962-1968

Hoffmann, M., Tribius, S., Quabius, E. S., Henry, H., Pfannenschmidt, S., Burkhardt, C., Gorogh, T., Halec, G., Hoffmann, A. S., Kahn, T., Rocken, C., Haag, J., Waterboer, T., Schmitt, M. (2012): HPV DNA, E6*I-mRNA expression and p16INK4A immunohistochemistry in head and neck cancer - how valid is p16INK4A as surrogate marker? *Cancer letters*, 323, 88-96

Horvath, C. A., Boulet, G. A., Renoux, V. M., Delvenne, P. O., Bogers, J. P. (2010): Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. *Virology journal*, 7, 11

Hughes, F. J., Romanos, M. A. (1993): E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. *Nucleic acids research*, 21, 5817-5823

Iftner, A., Klug, S. J., Garbe, C., Blum, A., Stancu, A., Wilczynski, S. P., Iftner, T. (2003): The prevalence of human papillomavirus genotypes in nonmelanoma skin cancers of nonimmunosuppressed individuals identifies high-risk genital types as possible risk factors. *Cancer research*, 63, 7515-7519

Jablonska, S., Dabrowski, J., Jakubowicz, K. (1972): Epidermodysplasia verruciformis as a model in studies on the role of papovaviruses in oncogenesis. *Cancer research*, 32, 583-589

Jana, N. K., Gray, L. R., Shugars, D. C. (2005): Human immunodeficiency virus type 1 stimulates the expression and production of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in oral epithelial cells: a role for SLPI in innate mucosal immunity. *Journal of virology*, 79, 6432-6440

Jin, F. Y., Nathan, C., Radzioch, D., Ding, A. (1997): Secretory leukocyte protease inhibitor: a macrophage product induced by and antagonistic to bacterial lipopolysaccharide. *Cell*, 88, 417-426

Johnson, K. M., Kines, R. C., Roberts, J. N., Lowy, D. R., Schiller, J. T., Day, P. M. (2009): Role of heparan sulfate in attachment to and infection of the murine female genital tract by human papillomavirus. *Journal of virology*, 83, 2067-2074

Kern, S. E., Kinzler, K. W., Bruskin, A., Jarosz, D., Friedman, P., Prives, C., Vogelstein, B. (1991): Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science (New York, N.Y.)*, 252, 1708-1711

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. *The American review of respiratory disease*, 146, 1426-1429

Kikuchi, T., Abe, T., Hoshi, S., Matsubara, N., Tominaga, Y., Satoh, K., Nukiwa, T. (1998): Structure of the murine secretory leukoprotease inhibitor (Slpi) gene and chromosomal localization of the human and murine SLPI genes. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 19, 875-880

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. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 92, 276-284

Klingelutz, A. J., Foster, S. A., McDougall, J. K. (1996): Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature*, 380, 79-82

Klussmann, J. P., Dinh, S., Guntinas-Lichius, O., Wittekindt, C., Weissenborn, S., Wieland, U., Dienes, H. P., Hoffmann, T., Smith, E., Turek, L., Speel, E. J., Pfister, H. J. (2004): [HPV-associated tonsillar cancer. An update]. *Hno*, 52, 208-218

- Klussmann, J. P., Weissenborn, S. J., Wieland, U., Dries, V., Kolligs, J., Jungehuelsing, M., Eckel, H. E., Dienes, H. P., Pfister, H. J., Fuchs, P. G. (2001): Prevalence, distribution, and viral load of human papillomavirus 16 DNA in tonsillar carcinomas. *Cancer*, 92, 2875-2884
- Krawczyk, E., Supryniewicz, F. A., Liu, X., Dai, Y., Hartmann, D. P., Hanover, J., Schlegel, R. (2008): Koilocytosis: a cooperative interaction between the human papillomavirus E5 and E6 oncoproteins. *The American journal of pathology*, 173, 682-688
- Kreimer, A. R., Clifford, G. M., Boyle, P., Franceschi, S. (2005): Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 14, 467-475
- Lane, D. P. (1992): Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, 358, 15-16
- Larson, D. A., Derkay, C. S. (2010): Epidemiology of recurrent respiratory papillomatosis. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 118, 450-454
- Lazarczyk, M., Pons, C., Mendoza, J. A., Cassonnet, P., Jacob, Y., Favre, M. (2008): Regulation of cellular zinc balance as a potential mechanism of EVER-mediated protection against pathogenesis by cutaneous oncogenic human papillomaviruses. *The Journal of experimental medicine*, 205, 35-42
- Li, W., Thompson, C. H., O'Brien, C. J., McNeil, E. B., Scolyer, R. A., Cossart, Y. E., Veness, M. J., Walker, D. M., Morgan, G. J., Rose, B. R. (2003): Human papillomavirus positivity predicts favourable outcome for squamous carcinoma of the tonsil. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 106, 553-558
- Lin, C. C., Lu, B. Y., Chang, J. Y. (2006): Conformational stability of secretory leucocyte protease inhibitor: a protein with no hydrophobic core and very little secondary structure. *Biochimica et biophysica acta*, 1764, 1286-1291
- Lindquist, D., Romanitan, M., Hammarstedt, L., Nasman, A., Dahlstrand, H., Lindholm, J., Onelov, L., Ramqvist, T., Ye, W., Munck-Wikland, E., Dalianis, T. (2007): Human papillomavirus is a favourable prognostic factor in tonsillar cancer and its oncogenic role is supported by the expression of E6 and E7. *Molecular oncology*, 1, 350-355
- Lortet-Tieulent, J., Soerjomataram, I., Ferlay, J., Rutherford, M., Weiderpass, E., Bray, F. (2014): International trends in lung cancer incidence by histological subtype: adenocarcinoma stabilizing in men but still increasing in women. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 84, 13-22
- Lutzner, M. A. (1983): The human papillomaviruses: A review. *Archives of dermatology*, 119, 631-635
- Majewski, S., Jablonska, S. (1995): Epidermodysplasia verruciformis as a model of human papillomavirus-induced genetic cancer of the skin. *Archives of dermatology*, 131, 1312-1318

- Malhotra, R., Ward, M., Bright, H., Priest, R., Foster, M. R., Hurle, M., Blair, E., Bird, M. (2003): Isolation and characterisation of potential respiratory syncytial virus receptor(s) on epithelial cells. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 5, 123-133
- Marty, R., Roze, S., Bresse, X., Largeron, N., Smith-Palmer, J. (2013): Estimating the clinical benefits of vaccinating boys and girls against HPV-related diseases in Europe. *BMC cancer*, 13, 10
- Marur, S., D'Souza, G., Westra, W. H., Forastiere, A. A. (2010): HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *The lancet oncology*, 11, 781-789
- Maruyama, M., Hay, J. G., Yoshimura, K., Chu, C. S., Crystal, R. G. (1994): Modulation of secretory leukoprotease inhibitor gene expression in human bronchial epithelial cells by phorbol ester. *The Journal of clinical investigation*, 94, 368-375
- McKaig, R. G., Baric, R. S., Olshan, A. F. (1998): Human papillomavirus and head and neck cancer: epidemiology and molecular biology. *Head & neck*, 20, 250-265
- McLaughlin-Drubin, M. E., Crum, C. P., Munger, K. (2011): Human papillomavirus E7 oncoprotein induces KDM6A and KDM6B histone demethylase expression and causes epigenetic reprogramming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 2130-2135
- McNeely, T. B., Dealy, M., Dripps, D. J., Orenstein, J. M., Eisenberg, S. P., Wahl, S. M. (1995): Secretory leukocyte protease inhibitor: a human saliva protein exhibiting anti-human immunodeficiency virus 1 activity in vitro. *The Journal of clinical investigation*, 96, 456-464
- Miller, D. L., Puricelli, M. D., Stack, M. S. (2012): Virology and molecular pathogenesis of HPV (human papillomavirus)-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *The Biochemical journal*, 443, 339-353
- Mirghani, H., Amen, F., Blanchard, P., Moreau, F., Guigay, J., Hartl, D. M., Lacau St Guily, J. (2014): Treatment de-escalation in HPV-positive oropharyngeal carcinoma: Ongoing trials, critical issues and perspectives. *International journal of cancer. Journal international du cancer*,
- Mistry, N., Wibom, C., Evander, M. (2008): Cutaneous and mucosal human papillomaviruses differ in net surface charge, potential impact on tropism. *Virology journal*, 5, 118
- Mohr, I. J., Clark, R., Sun, S., Androphy, E. J., MacPherson, P., Botchan, M. R. (1990): Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science (New York, N.Y.)*, 250, 1694-1699
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 51 Pt 1, 263-273

Munger, K., Werness, B. A., Dyson, N., Phelps, W. C., Harlow, E., Howley, P. M. (1989): Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *The EMBO journal*, 8, 4099-4105

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. *The Journal of experimental medicine*, 197, 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. *Oncology reports*, 19, 1085-1091

Nasman, A., Attner, P., Hammarstedt, L., Du, J., Eriksson, M., Giraud, G., Ahrlund-Richter, S., Marklund, L., Romanitan, M., Lindquist, D., Ramqvist, T., Lindholm, J., Sparen, 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? *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 125, 362-366

O'Rourke, M. A., Ellison, M. V., Murray, L. J., Moran, M., James, J., Anderson, L. A. (2012): Human papillomavirus related head and neck cancer survival: a systematic review and meta-analysis. *Oral oncology*, 48, 1191-1201

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. *Journal of andrology*, 16, 64-74

Orth, G. (1986): Epidermodysplasia verruciformis: a model for understanding the oncogenicity of human papillomaviruses. *Ciba Foundation symposium*, 120, 157-174

Peitsaro, P., Johansson, B., Syrjanen, S. (2002): Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *Journal of clinical microbiology*, 40, 886-891

Ragin, C. C., Taioli, E. (2007): Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: review and meta-analysis. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 121, 1813-1820

Rayess, H., Wang, M. B., Srivatsan, E. S. (2012): Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 130, 1715-1725

Raynor, C. M., Wright, J. F., Waisman, D. M., Prydzial, E. L. (1999): Annexin II enhances cytomegalovirus binding and fusion to phospholipid membranes. *Biochemistry*, 38, 5089-5095

Rescher, U., Gerke, V. (2008): S100A10/p11: family, friends and functions. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 455, 575-582

Ringstrom, E., Peters, E., Hasegawa, M., Posner, M., Liu, M., Kelsey, K. T. (2002): Human papillomavirus type 16 and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 8, 3187-3192

Roepman, P., Wessels, L. F., Kettelarij, N., Kemmeren, P., Miles, A. J., Lijnzaad, P., Tilanus, M. G., Koole, R., Hordijk, G. J., van der Vliet, P. C., Reinders, M. J., Slootweg, P. J., Holstege, F. C. (2005): An expression profile for diagnosis of lymph node metastases from primary head and neck squamous cell carcinomas. *Nature genetics*, 37, 182-186

Rom, O., Avezov, K., Aizenbud, D., Reznick, A. Z. (2013): Cigarette smoking and inflammation revisited. *Respiratory physiology & neurobiology*, 187, 5-10

Said, A. K., Leao, J. C., Fedele, S., Porter, S. R. (2013): Focal epithelial hyperplasia - an update. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 42, 435-442

Sallenave, J. M. (2002): Antimicrobial activity of antiproteinases. *Biochemical Society transactions*, 30, 111-115

Sallenave, J. M., 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. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 11, 733-741

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74, 5463-5467

Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J., Howley, P. M. (1990): The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*, 63, 1129-1136

Schiller, J. T., Day, P. M., Kines, R. C. (2010): Current understanding of the mechanism of HPV infection. *Gynecologic oncology*, 118, S12-17

Schneider-Maunoury, S., Croissant, O., Orth, G. (1987): Integration of human papillomavirus type 16 DNA sequences: a possible early event in the progression of genital tumors. *Journal of virology*, 61, 3295-3298

Schwarz, E., Freese, U. K., Gissmann, L., Mayer, W., Roggenbuck, B., Stremlau, A., zur Hausen, H. (1985): Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature*, 314, 111-114

Sehnert, B., Cavcic, A., Bohm, B., Kalden, J. R., Nandakumar, K. S., Holmdahl, R., Burkhardt, H. (2004): Antileukoproteinase: modulation of neutrophil function and therapeutic effects on anti-type II collagen antibody-induced arthritis. *Arthritis and rheumatism*, 50, 2347-2359

Shi, D., Guo, W., Chen, W., Fu, L., Wang, J., Tian, Y., Xiao, X., Kang, T., Huang, W., Deng, W. (2012): Nicotine promotes proliferation of human nasopharyngeal carcinoma cells by regulating alpha7AChR, ERK, HIF-1alpha and VEGF/PEDF signaling. *PloS one*, 7, e43898

Shope, R. E. (1932): A FILTRABLE VIRUS CAUSING A TUMOR-LIKE CONDITION IN RABBITS AND ITS RELATIONSHIP TO VIRUS MYXOMATOSUM. *The Journal of experimental medicine*, 56, 803-822

Simard, E. P., Torre, L. A., Jemal, A. (2014): International trends in head and neck cancer incidence rates: differences by country, sex and anatomic site. *Oral oncology*, 50, 387-403

St Guily, J. L., Clavel, C., Okais, C., Pretet, J. L., Beby-Defaux, A., Agius, G., Birembaut, P., Jacquard, A. C., Leocmach, Y., Soubeyrand, B., Riethmuller, D., Denis, F., Mouglin, C. (2011): Human papillomavirus genotype distribution in tonsil cancers. *Head & neck oncology*, 3, 6

Steben, M., Duarte-Franco, E. (2007): Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology. *Gynecologic oncology*, 107, S2-5

Steger, G., Corbach, S. (1997): Dose-dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type 18 by the viral E2 protein. *Journal of virology*, 71, 50-58

Surviladze, Z., Dziduszko, A., Ozbun, M. A. (2012): Essential roles for soluble virion-associated heparan sulfonated proteoglycans and growth factors in human papillomavirus infections. *PLoS pathogens*, 8, e1002519

Syrjanen, K., Syrjanen, S., Lamberg, M., Pyrhonen, S., Nuutinen, J. (1983): Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *International journal of oral surgery*, 12, 418-424

Syrjanen, S. (2010a): Current concepts on human papillomavirus infections in children. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 118, 494-509

Syrjanen, S. (2010b): The role of human papillomavirus infection in head and neck cancers. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 21 Suppl 7, vii243-245

Taggart, C. C., Greene, C. M., McElvaney, N. G., O'Neill, S. (2002): Secretory leucoprotease inhibitor prevents lipopolysaccharide-induced IkappaBalpha degradation without affecting phosphorylation or ubiquitination. *The Journal of biological chemistry*, 277, 33648-33653

Thompson, R. C., Ohlsson, K. (1986): Isolation, properties, and complete amino acid sequence of human secretory leukocyte protease inhibitor, a potent inhibitor of leukocyte elastase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83, 6692-6696

Tribius, S., Ihloff, A. S., 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 letters*, 304, 71-79

Vaccarella, S., Herrero, R., Snijders, P. J., Dai, M., Thomas, J. O., Hieu, N. T., Ferreccio, C., Matos, E., Posso, H., de Sanjose, S., Shin, H. R., Sukvirach, S., Lazcano-Ponce, E., Munoz, N., Meijer, C. J., Franceschi, S. (2008): Smoking and human papillomavirus infection: pooled analysis of the International Agency for Research on Cancer HPV Prevalence Surveys. *International journal of epidemiology*, 37, 536-546

van Dongen, J. J., Langerak, A. W., Bruggemann, M., Evans, P. A., Hummel, M., Lavender, F. L., Delabesse, E., Davi, F., Schuurin, E., Garcia-Sanz, R., van Krieken, J. H., Droese, J., Gonzalez, D., Bastard, C., White, H. E., Spaargaren, M., Gonzalez, M., Parreira, A., Smith, J. L., Morgan, G. J., Kneba, M., Macintyre, E. A. (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, 2257-2317

van Monsjou, H. S., Wreesmann, V. B., van den Brekel, M. W., Balm, A. J. (2013): Head and neck squamous cell carcinoma in young patients. *Oral oncology*, 49, 1097-1102

Venkatesan, N. N., Pine, H. S., Underbrink, M. P. (2012): Recurrent respiratory papillomatosis. *Otolaryngologic clinics of North America*, 45, 671-694, viii-ix

Vousden, K. (1993): Interactions of human papillomavirus transforming proteins with the products of tumor suppressor genes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 7, 872-879

Wahl, S. M., McNeely, T. B., Janoff, E. N., Shugars, D., Worley, P., Tucker, C., Orenstein, J. M. (1997): Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in mucosal fluids inhibits HIV-I. *Oral diseases*, 3 Suppl 1, S64-69

Waisman, D. M. (1995): Annexin II tetramer: structure and function. *Molecular and cellular biochemistry*, 149-150, 301-322

Wang, Q., Griffin, H., Southern, S., Jackson, D., Martin, A., McIntosh, P., Davy, C., Masterson, P. J., Walker, P. A., Laskey, P., Omary, M. B., Doorbar, J. (2004): Functional analysis of the human papillomavirus type 16 E1=E4 protein provides a mechanism for in vivo and in vitro keratin filament reorganization. *Journal of virology*, 78, 821-833

Weinberger, P. M., Yu, Z., Haffty, B. G., Kowalski, D., Harigopal, M., Brandsma, J., Sasaki, C., Joe, J., Camp, R. L., Rimm, D. L., Psyrrri, A. (2006): Molecular classification identifies a subset of human

papillomavirus--associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 24, 736-747

Wen, J., Nikitakis, N. G., Chaisuparat, R., Greenwell-Wild, T., Gliozzi, M., Jin, W., Adli, A., Moutsopoulos, N., Wu, T., Warburton, G., Wahl, S. M. (2011): Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) expression and tumor invasion in oral squamous cell carcinoma. *The American journal of pathology*, 178, 2866-2878

Werness, B. A., Levine, A. J., Howley, P. M. (1990): Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science (New York, N.Y.)*, 248, 76-79

Westin, U., Fryksmark, U., Polling, A., Ohlsson, K. (1994): Localisation of secretory leucocyte proteinase inhibitor mRNA in nasal mucosa. *Acta oto-laryngologica*, 114, 199-202

Wieland, U., Jurk, S., Weissenborn, S., Krieg, T., Pfister, H., Ritzkowsky, A. (2000): Erythroplasia of queyrat: coinfection with cutaneous carcinogenic human papillomavirus type 8 and genital papillomaviruses in a carcinoma in situ. *The Journal of investigative dermatology*, 115, 396-401

Wiest, T., Schwarz, E., Enders, C., Flechtenmacher, C., Bosch, F. X. (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

Wilczynski, S. P., Lin, B. T., Xie, Y., Paz, I. B. (1998): Detection of human papillomavirus DNA and oncoprotein overexpression are associated with distinct morphological patterns of tonsillar squamous cell carcinoma. *The American journal of pathology*, 152, 145-156

Woodham, A. W., Da Silva, D. M., Skeate, J. G., Raff, A. B., Ambroso, M. R., Brand, H. E., Isas, J. M., Langen, R., Kast, W. M. (2012): The S100A10 subunit of the annexin A2 heterotetramer facilitates L2-mediated human papillomavirus infection. *PloS one*, 7, e43519

Wright, J. F., Kurosky, A., Wasi, S. (1994): An endothelial cell-surface form of annexin II binds human cytomegalovirus. *Biochemical and biophysical research communications*, 198, 983-989

Wu, L. Z., Duan, D. M., Liu, Y. F., Ge, X., Zhou, Z. F., Wang, X. J. (2013): Nicotine favors osteoclastogenesis in human periodontal ligament cells co-cultured with CD4(+) T cells by upregulating IL-1beta. *International journal of molecular medicine*, 31, 938-942

Yang, S. L., Chou, Y. T., Wu, C. N., Ho, M. S. (2011): Annexin II binds to capsid protein VP1 of enterovirus 71 and enhances viral infectivity. *Journal of virology*, 85, 11809-11820

Yee, C., Krishnan-Hewlett, I., Baker, C. C., Schlegel, R., Howley, P. M. (1985): Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *The American journal of pathology*, 119, 361-366

Zaravinos, A. (2014): An updated overview of HPV-associated head and neck carcinomas. *Oncotarget*, 5, 3956-3969

Zhang, Y., DeWitt, D. L., McNeely, T. B., Wahl, S. M., Wahl, L. M. (1997): Secretory leukocyte protease inhibitor suppresses the production of monocyte prostaglandin H synthase-2, prostaglandin E2, and matrix metalloproteinases. *The Journal of clinical investigation*, 99, 894-900

Zheng, Z. M., Baker, C. C. (2006): Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 11, 2286-2302

zur Hausen, H. (1976): Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer research*, 36, 794

zur Hausen, H. (1989): Papillomaviruses in anogenital cancer as a model to understand the role of viruses in human cancers. *Cancer research*, 49, 4677-4681

zur Hausen, H. (2002): Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature reviews. Cancer*, 2, 342-350

zur Hausen, H., de Villiers, E. M. (1994): Human papillomaviruses. *Annual review of microbiology*, 48, 427-447

zur Hausen, H., Meinhof, W., Scheiber, W., Bornkamm, G. W. (1974): Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 13, 650-656

Danksagung

Mein größter Dank gilt Herrn Prof. Dr. Markus Hoffmann, Leitender Oberarzt an der Universitätsklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel für die Überlassung des Themas und die ausgezeichnete Betreuung. Seine wertvollen Ratschläge und kritischen Anregungen haben maßgeblich zum guten Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ich danke vielmals Frau Dr. Susanne Quabius, Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Immunologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, für die sehr gute Zusammenarbeit während der gesamten Zeit. Sie stand mir stets mit Rat und Tat zur Seite.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Sandra Krüger, Medizinisch-Technische-Assistentin im Institut für Pathologie, für die hervorragende Unterstützung des experimentellen Teils dieser Arbeit. Für alle aufkommenden Fragen hatte sie einen kompetenten Rat und war jederzeit für mich ansprechbar.

Ich danke sehr Herrn Dr. Jochen Haag, Technischer Leiter für Molekularpathologische und prädiktive Diagnostik im Institut für Pathologie, für die ausgesprochen freundliche und geduldige Betreuung bei der molekularbiologischen Diagnostik der Promotionsarbeit.

Ein großer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. Tibor Görögh, Wissenschaftlicher Leiter der Experimentellen Onkologie der Universitätsklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel für die wissenschaftliche Betreuung und die zahlreichen Hilfestellungen insbesondere zu Beginn dieser Arbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Christoph Röcken, Leiter des Institutes für Pathologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, für die wertvollen Ratschläge bei aufkommenden Problemen und für die Bereitstellung des modern ausgestatteten Arbeitsplatzes.

Ich möchte mich herzlich bei meinen Eltern, Andrea und Frank, und meinen Geschwistern, Luise und Mathilde, für die ausdauernde moralische Unterstützung bedanken. Durch ihren Rückhalt konnte ich diese Arbeit erst verwirklichen.

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.

Ort, Datum

(Paul Möller)

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Paul Möller
Geburtsdatum	10.09.1985
Geburtsort	Greifswald
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Familienstand	Ledig

Hochschulstudium:

05.2014	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2010 bis 2014	Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts Universität Kiel
09.2009	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2006 bis 2009	Studium der Humanmedizin an der Semmelweis- Universität Budapest

Praktisches Jahr:

10.2013 bis 01.2014	Chirurgie (Viszeral- und Unfallchirurgie), Inland Klinikum Rendsburg
06.2013 bis 10.2013	Innere Medizin (Kardiologie und Gastroenterologie), Städtisches Krankenhaus, Kiel
02.2013 bis 06.2013	Neurologie (Wahlfach), Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Kiel

Promotion:

04.2012 bis 09.2014	Dissertation an der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie, Christian- Albrechts-Universität Kiel Thema: Humane Papillomvirus-Infektionen in Karzinomen des Kopf- und Halsbereiches: Die Rolle der Antileukoproteinase „ <i>secretory leukocyte protease inhibitor</i> “ (SLPI) in Tabakrauch-induzierten, HPV- unabhängigen Plattenepithelkarzinomen
---------------------	--

Publikation:

2014

“The role of the antileukoprotease SLPI in smoking-induced human papillomavirus-independent head and neck squamous cell carcinomas”, International Journal of Cancer, Volume 134, Issue 6, S. 1323-34

Schulbildung

1995 bis 2005

Fürst-Franz-Gymnasium in Dessau-Roßlau, Allgemeine Hochschulreife

1992 bis 1995

Grundschule in Dessau-Roßlau