

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 beim Tonsillenkarzinom:
Die Rolle des Sekretorischen Leukozytenproteaseinhibitors (SLPI) und
dessen Einfluss auf Überlebenszeiten betroffener Patienten**

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

vorgelegt von
Immanuel Christian Zacharias Merz
aus Karlsruhe

Kiel 2016

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

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Susanne Sebens
Institut für Experimentelle Tumorforschung

Tag der mündlichen Prüfung: 1. Dezember 2016

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 1. Dezember 2016

gez.: Prof. Dr. Johann Roeder

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Fragestellung	3
3. Material und Methoden	5
3.1 Material	5
3.2 Methoden.....	5
3.2.1 Extraktion der Nukleinsäuren.....	5
3.2.1.1 DNA-Extraktion	5
3.2.1.2 RNA-Extraktion	6
3.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	7
3.2.3 cDNA-Synthese.....	7
3.2.4 PCR	8
3.2.4.1 PCR-Methode.....	8
3.2.4.2 Size-Range-PCR.....	9
3.2.4.3 PCR zum Nachweis humaner Papillomviren.....	11
3.2.4.4 Real-time quantitative PCR.....	13
3.2.5 DNA-Detektion	15
3.2.5.1 Gelelektrophorese.....	15
3.2.5.2 Aufreinigung der PCR-Produkte	16
3.2.6 DNA-Sequenzierung	17
3.2.7 Aufreinigung der Sequenzierreaktion.....	18
3.2.8 Auswertung der DNA-Sequenz.....	18
3.2.9 Immunhistochemie	18
3.2.10 Statistische Auswertung	20
4. Ergebnisse	21
4.1 Patientenkollektiv.....	22
4.2 HPV-DNA-Nachweis und mRNA-Nachweis.....	24
4.3 Immunhistochemischer p16 ^{INK4A} -Nachweis	25
4.4 Korrelation zwischen HPV-Status und p16 ^{INK4A} -Proteinexpression.....	26
4.5 Immunhistochemischer SLPI-Nachweis	27
4.6 Korrelation zwischen HPV-Status und SLPI-Proteinexpression	28
4.7 Korrelation zwischen dem Rauchverhalten und der SLPI-Proteinexpression	28
4.8 Korrelation zwischen Rauchverhalten und HPV-Status	29
4.9 Einfluss des HPV-Status und des Rauchverhaltens auf die mRNA-Expression von SLPI und Annexin A2	29
4.10 Vergleich der Annexin-A2- und der SLPI-Genexpression.....	32

4.11 Überlebensdaten	33
5. Diskussion	39
5.1 HPV-Prävalenz in Kopf-Hals-Karzinomen	39
5.2 Altersverteilung der Patienten in Bezug auf den HPV-Status	41
5.3 p16 ^{INK4A} -Proteinexpression	42
5.4 SLPI-Genexpression und SLPI-Proteinexpression in HPV-assoziierten Kopf-Hals-Karzinomen sowie deren Beziehung zu HPV-Status und Rauchverhalten	43
5.5 Annexin-A2-Genexpression in HPV-assoziierten Tonsillenkarcinomen sowie deren Beziehung zu HPV-Status und Rauchverhalten	46
5.6 Vergleich der Annexin-A2-Genexpression mit der SLPI-Genexpression	47
5.7 Untersuchung des Einflusses des HPV-DNA-Status, der p16 ^{INK4A} - und der SLPI- Proteinexpression sowie des Rauchverhaltens auf das Überleben der Patienten.....	49
5.8 Schlussfolgerungen	50
6. Zusammenfassung	52
7. Literaturverzeichnis	54
Danksagung.....	61
Lebenslauf.....	62
Erklärung.....	64

Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaare
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DAB	3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochloridlösung Hydrat
DEPC	Diethyldicarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HPV	Humanes Papillomvirus
HPV+	HPV-positiv
HPV-	HPV-negativ
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IHC	Immunhistochemie
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NR	Nichtraucher
PCR	Polymerasekettenreaktion
pRB	Retinoblastom-Protein
R	Raucher
RNA	Ribonukleinsäure
RT-qPCR	Real-time quantitative PCR
SLPI	Sekretorischer Leukozytenproteaseinhibitor
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	Thermus aquaticus
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

1. Einleitung

Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs sind die sechstgrößte Gruppe aller Malignome des Menschen. Weltweit sterben jährlich etwa 350.000 Menschen an den Folgen von Kopf-Hals-Malignomen (Parkin et al., 2005). Risikofaktoren für die Tumorentwicklung im Kopf-Hals-Bereich sind hauptsächlich Nikotin- und Alkoholabusus (Vokes et al., 1993). Die Infektion der Schleimhäute mit humanen Papillomviren (HPV) gilt zusätzlich als Risikofaktor für die Karzinomentstehung (Hoffmann et al., 1998). Patienten mit HPV-assoziierten Tonsillenkarzinomen weisen nicht das typische Risikoprofil für Karzinome des Kopf-Hals-Bereichs auf (Klussmann et al., 2003). Es wird mittlerweile unter ätiologischen Gesichtspunkten bei Kopf-Hals-Karzinomen zwischen zwei unterschiedlichen Tumorentitäten unterschieden: Alkohol- und Nikotin-assoziierte sowie HPV-assoziierte Karzinome (Klussmann et al., 2003).

Die paarige Gaumenmandel (Tonsilla palatina) ist nach dem Larynx die zweithäufigste Lokalisation von Karzinomen im Kopf-Hals-Bereich (Guay und Lavertu, 1995). Die Tonsilla palatina liegt anatomisch im Oropharynx in der Fossa tonsillaris. Die Tonsilla palatina nimmt im Oropharynx im Hinblick auf die HPV-assoziierten Karzinome eine Sonderstellung ein. Der Anteil HPV-positiver Karzinome der Tonsilla palatina ist mit ca. 50% bis 60% im Vergleich zum Oropharynx mit ca. 25% (Hoffmann et al., 2005, 2010, 2012) und zum restlichen Kopf-Hals Bereich mit ca. 25% bis 30% (Hoffmann et al., 1998, 2005; Gillison et al., 2000; Gillison und Shah, 2001) signifikant höher. Es ist daher von Bedeutung bezüglich der Tumorlokalisierung zwischen der Region der Tonsilla palatina und den anderen Regionen des Oropharynx bzw. des Kopf-Hals-Bereichs zu unterscheiden. Diese Differenzierung zwischen Oropharynx- und Tonsillenkarzinomen wird in der Literatur oftmals unzureichend vorgenommen. Tonsillenkarzinome werden dabei ihrer anatomischen Lage entsprechend unter der Gruppe der Oropharynxkarzinome subsummiert (z.B. in Gillison und Shah, 2001; Kreimer et al., 2005). Karzinome der Tonsilla palatina sind in der vorliegenden Promotionsarbeit als einzige Tumorentität analysiert worden. Das hier vorliegende Patientenkollektiv entspricht somit einem der größten auf diese Parameter untersuchten Kollektive.

Der sekretorische Leukozytenproteaseinhibitor (*Secretory leukocyte protease inhibitor*, SLPI) ist eine Antileukoprotease mit der Funktion eines Serinproteaseninhibitors. SLPI hat anti-inflammatorische (Doumas et al., 2005), antibakterielle (Fahey und Wira, 2002), antifungale (Chattopadhyay et al., 2004) und antivirale (Shugars, 1999) Eigenschaften. Im Zusammenhang mit der antiviralen Wirkung von SLPI auch gegenüber HPV-Infektionen kommt dem Strukturprotein Annexin A2 eine besondere Bedeutung zu. Woodham und Mitarbeiter

identifizieren Annexin A2 als spezifischen HPV16-Rezeptor auf Epithelzellen (Woodham et al., 2012). SLPI ist ein natürlicher, endogener Ligand von Annexin A2. Die Blockade von Annexin A2 mit SLPI oder einem Annexin-A2t-Antikörper führt *in vitro* zu einer signifikanten Abnahme der HPV16-Infektionen (Woodham et al., 2012). Aktuelle Ergebnisse von Hoffmann und Mitarbeitern unterstreichen dies: In Gewebeproben von HPV-positiven Patienten wird keine oder nur eine geringe SLPI-Expression beobachtet, während in HPV-negativen Gewebeproben eine hohe SLPI-Expression nachweisbar ist (Hoffmann et al., 2013). Es wird weiterhin bei Rauchern eine erhöhte SLPI-Expression beobachtet (Hoffmann et al., 2013). Quabius und Mitarbeiter zeigen in einer kürzlich publizierten Arbeit eine signifikante Korrelation zwischen dem Rauchverhalten und der SLPI-Expression in Kopf-Hals-Karzinomen und gesunder Schleimhaut: Zigarettenrauchen sowie eine *ex-vivo*-Nikotininkubation von Zellen der Nasenschleimhaut der unteren Nasenmuschel (*Concha nasalis inferior*) führen zu einer gesteigerten SLPI-Expression (Quabius et al., 2014). Alle HPV-positiven Patienten im dort untersuchten Kollektiv zeigen bei negativer Rauchanamnese eine geringe oder keine SLPI-Expression (Quabius et al., 2014). Einer gesteigerten SLPI-Expression, unter anderem womöglich durch Zigarettenrauchen induziert, wird deshalb eine protektive Wirkung gegenüber HPV-Infektionen zugeschrieben (Quabius et al., 2014).

Aus den Ergebnissen der vorangegangenen Arbeiten lässt sich folgende Hypothese ableiten: Eine durch Zigarettenrauchen gesteigerte SLPI-Expression erschwert über die Blockade von Annexin A2 durch das SLPI-Protein die Infektion der Epithelzellen mit HPV. Tonsillenkarcinome von Rauchern sollten demnach aufgrund der hohen SLPI-Expression eine geringere HPV-Infektionsrate aufweisen als Tonsillenkarcinome von Nichtrauchern. Nicht-raucher sollten dahingegen bei geringer oder fehlender SLPI-Expression ein erhöhtes Risiko für eine HPV-Infektion haben und dementsprechend eine höhere HPV-Prävalenz zeigen.

2. Fragestellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, vor dem Hintergrund der vorangegangenen Arbeiten einen Beitrag zu einem besseren Verständnis der Zusammenhänge zwischen SLPI-Expression, dem Rauchverhalten der Patienten und dem HPV-Status der Karzinome der Tonsilla palatina zu leisten. Es wird zudem der Einfluss des SLPI-Expressionslevels und der Infektion mit HPV auf die Überlebenszeiten der Patienten untersucht.

Es ergeben sich folgende Fragen:

1. Wie hoch ist die HPV-Prävalenz in den Tonsillenkarcinomen des hier vorliegenden Kollektivs und wie hoch ist der Anteil aktiver HPV-Infektionen? Welche HPV-Typen liegen vor?

*Die Prävalenz der HPV-Infektionen in den hier untersuchten Tonsillenkarcinomen und die vorliegenden HPV-Typen werden durch den Nachweis und die Sequenzierung der HPV-DNA bestimmt. Der Anteil aktiver HPV-Infektionen wird durch den Nachweis der E6*I-mRNA in den HPV-DNA-positiven Gewebeproben bestimmt.*

2. Wie hoch ist die p16^{INK4A}-Proteinexpression im vorliegenden Kollektiv? Inwiefern korreliert der HPV-Status mit dem p16^{INK4A}-Proteinexpressionsmuster?

Die p16^{INK4A}-Proteinexpression wird mittels immunhistochemischer Färbung bestimmt. Das Protein p16^{INK4A} ist ein Surrogatmarker für das Vorliegen einer aktiven HPV-Infektion.

3. Wie hoch ist die SLPI-Proteinexpression im vorliegenden Kollektiv? Existiert eine Korrelation zwischen der SLPI-Proteinexpression, dem HPV-Status und dem Rauchverhalten?

Die SLPI-Proteinexpression wird mittels immunhistochemischer Färbung bestimmt. Es werden im Hinblick auf die formulierte Hypothese Korrelationen zwischen SLPI-Proteinexpression, HPV-Status und Rauchverhalten überprüft. Es wird zudem das Rauchverhalten auf eine Korrelation mit dem HPV-Status hin überprüft.

4. Kann der vermutete Zusammenhang zwischen der mRNA-Expression von SLPI und dem Rauchverhalten der Patienten bestätigt werden? Ist eine Korrelation zwischen der mRNA-Expression von Annexin A2 und der von SLPI sowie dem Rauchverhalten nachweisbar?

Die Genexpressionslevel von SLPI und Annexin A2 werden mittels RT-qPCR bestimmt. Das SLPI-Genexpressionslevel von Nichtrauchern und Rauchern wird verglichen und auf eine Korrelation mit dem HPV-Status hin überprüft. Die Genexpression von Annexin A2 wird in Bezug zur SLPI-Genexpression gesetzt und verglichen.

5. Welchen Einfluss haben HPV-Status, p16^{INK4A}- und SLPI-Proteinexpression sowie das Rauchverhalten auf das Gesamtüberleben und das progressionsfreie Überleben der Patienten?

Das Gesamtüberleben sowie das progressionsfreie Überleben der Patienten werden mittels Kaplan-Meier-Schätzern beurteilt.

3. Material und Methoden

3.1 Material

Gewebeproben von 126 Patienten wurden zwischen 2002 und 2010 in der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel entnommen. Das Einverständnis für die Entnahme der Gewebeproben und deren wissenschaftliche Nutzung liegt von allen Patienten schriftlich vor. Ein Votum der Ethikkommission der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel prüft und befürwortet dies (Ethikvotum D 409/13). Die in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben werden im Archiv des Instituts für Pathologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (Leitung: Prof. Dr. C. Röcken) gelagert und von diesem zur Verfügung gestellt. Bei allen Gewebeproben liegt ein histopathologisch gesichertes Plattenepithelkarzinom der Tonsilla palatina vor.

3.2 Methoden

3.2.1 Extraktion der Nukleinsäuren

3.2.1.1 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion erfolgt mit dem QIAamp[®] DNA Mini KIT (Qiagen[®], Hilden) nach Herstellerangaben.

Ausgangsmaterial für die DNA-Isolierung sind 10µm dicke, paraffinierte Gewebeschnitte auf Objektträgern. Die Objektträger werden für die Entparaffinierung schrittweise zunächst 5min in Xylol inkubiert, dann 5min in Ethanol (100%) inkubiert und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet. Der tumorhaltige Gewebebereich wird von den nicht-tumorhaltigen Gewebeteilen mit einem sterilen Skalpell getrennt und in ein 2ml-Reagenzgefäß überführt. Das Gewebe wird mit 180µl ATL-Puffer und 20µl der mitgelieferten Proteinase K versetzt. Das Reaktionsgemisch wird für 2 bis 4h bei 56°C und 550rpm im Thermomixer (comfort, Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Es folgt eine kurze Zentrifugation (Heraeus PICO 17, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) für 30s bei 15000g, damit Flüssigkeit aus dem Deckel entfernt und eine Kontamination beim Öffnen der Gefäße vermieden wird. Alle Zentrifugationsschritte erfolgen bei Raumtemperatur. Es werden 200µl AL-Puffer zu jeder Gewebeprobe hinzugefügt und 15s auf dem Vortex-Genie[®]2 (Scientific Industries, Bohemia, NY, USA) gemischt. Das Reaktionsgemisch wird für 10min bei 70°C im

Thermomixer inkubiert. Das Gemisch wird mit 200µl Ethanol (100%, nicht denaturiert) versetzt und erneut 15s auf dem Vortex-Genie®2 gemischt. Das Reaktionsgemisch wird inklusive des Präzipitats in ein QIAamp-Mini-spin-Röhrchen gegeben. Dieses wird in ein frisches 2ml-Reagenzgefäß überführt und 1min bei 6000g zentrifugiert. Das QIAamp-Mini-spin-Röhrchen wird in ein frisches 2ml-Reagenzgefäß überführt. Das Röhrchen mit dem Durchfluss wird verworfen. Es folgt die Zugabe von 500µl AW1-Puffer und eine erneute Zentrifugation für 1min bei 6000g. Dieser Schritt wird mit AW2-Puffer wiederholt. Das Röhrchen wird nach beiden Schritten jeweils in ein frisches 2ml-Reagenzgefäß überführt und der Durchfluss wird verworfen. Das Röhrchen wird anschließend für 5min bei 17000g zentrifugiert und danach in ein frisches 1,5ml-Reagenzgefäß überführt. Es werden 50µl des AE-Puffers direkt auf die Membran des QIAamp-Mini-spin-Röhrchens gegeben. Es folgt eine Inkubation für 1min bei Raumtemperatur und danach eine Zentrifugation für 1min bei 6000g. Das Eluat im 1,5ml-Reagenzgefäß enthält die aufgereinigte DNA. Diese DNA wird bis zur weiteren Bearbeitung bei 4°C aufbewahrt.

3.2.1.2 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion erfolgt mit dem ExpressArt FFPE RNAready Kit der Firma AmpTec (AmpTec GmbH, Hamburg) nach Herstellerprotokoll.

Ausgangsmaterial sind fünf konsekutive 10µm dicke Gewebeschnitte. Die Schnitte werden als Geweberöllchen in einem 2ml-Reagenzgefäß über Nacht bei -80°C gelagert. Die Entparaffinierung erfolgt im Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg) bei 1000rpm. Es wird den Gewebeproben 1,5ml Xylol hinzugefügt. Nach 20min Inkubation bei 37°C erfolgt eine Zentrifugation für 3min bei 16000g (Centrifuge 5418, Eppendorf, Hamburg). Anschließend wird das Xylol durch Abpipettieren entfernt. Dieser Vorgang wird einmal wiederholt. Durch Zugabe von 1ml Ethanol wird das Pellet ausgefällt. Nach erneuter Zentrifugation und Entfernen des Ethanols wird das Pellet bei 37°C getrocknet. Für die Gewebelyse wird das Pellet in 500µl Lysepuffer aufgelöst und mit 30µl Proteinase K (50U/ml) und 5µl NucleoGuard® versetzt. Es folgt eine Inkubation im Thermomixer für 3h bei 55°C bei 100rpm. Danach werden 130µl der mitgelieferten Demodification Solution (DeS) hinzugefügt. Nach dem Mischen auf dem Vortex-Genie®2 erfolgt eine Inkubation von 20min bei 80°C. Das Reaktionsgemisch wird anschließend sofort für 3min auf Eis gekühlt. Es folgt die RNA-Aufreinigung. Das Lysat wird 3min bei 13000g zentrifugiert. Vom Überstand werden 600µl in ein frisches 2ml-Reagenzgefäß überführt. Anschließend werden 750µl

Ethanol hinzugegeben und durch Pipettieren gemischt. Von diesem Reaktionsgemisch werden zunächst 700µl auf die mitgelieferte Säule gegeben, 30s bei 8600g zentrifugiert und dann die verbleibenden 650µl aufgetragen und erneut zentrifugiert. Es folgen zwei Waschschriffe mit den Waschpuffern WB1 und WB2. Vor dem ersten, zwischen dem ersten und dem zweiten und nach dem zweiten Waschvorgang wird das Reaktionsgemisch jeweils 30s bei 8600g zentrifugiert und der Durchfluss wird verworfen. Zuletzt erfolgt eine Zentrifugation für 1min bei maximaler Geschwindigkeit. Für den DNA-Verdau werden 45µl der mitgelieferten „DNase Working solution“ auf die Säule gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 15min bei Raumtemperatur folgen drei Waschschriffe mit den Waschpuffern WB1, WB2 und WB3 nach demselben, zuvor beschriebenen Prinzip. Die Säule wird in ein frisches 1,5ml-Reagenzgefäß überführt. Es werden 30µl RNase-freies Wasser mit einer Temperatur von 95°C hinzugefügt und für 1min inkubiert. Nach zwei Zentrifugationsschritten bei maximaler Geschwindigkeit ist die RNA aufgereinigt. Bis zur weiteren Verwendung wird die RNA bei -80°C gelagert.

3.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der extrahierten DNA wird mittels Absorptionsspektroskopie bestimmt und basiert auf dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei 260nm. Gemessen wird mit dem Spektralphotometer NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Das Photometer wird vor der ersten Messung mit dem AE-Puffer kalibriert. Eine DNA-Lösung mit einer Konzentration von 50ng/µl besitzt einen Absorptionswert von 1.

Der RNA-Gehalt wird mit dem Spektralphotometer (ND-1000, PeqLab, Erlangen) gemessen. Das Prinzip entspricht dem der DNA-Konzentrationsbestimmung. Eine RNA-Lösung mit einer Konzentration von 40ng/µl besitzt einen Absorptionswert von 1.

3.2.3 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wird mit dem ExpressArt[®]TR cDNA synthesis kit der Firma Amptec (Amptec, Hamburg) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Ausgangsmaterial ist die isolierte RNA. Zunächst wird der erste DNA-Strang synthetisiert. Es werden in einem Gesamtvolumen von 12µl 200ng RNA mit 1µl des mitgelieferten TR-Primers (10pmol/µl) für 4min bei 65°C in einem Thermocycler (T-1, Biometra, Göttingen) inkubiert. Der auf 105°C geheizte Deckel des Thermocyclers verhindert ein Verdampfen des

Reaktionsgemisches. Das Gemisch wird anschließend sofort für 5min auf Eis inkubiert. Es werden 8µl eines Mixes aus jeweils 1µl dNTP (20pMol je Nukleotid), 4µl des mitgelieferten Reaktionspuffers, 0,25µl Reverse Transkriptase (200U/µl) und 2,75µl DEPC-Wasser zum Reaktionsgemisch hinzugegeben. Es folgt eine erneute Inkubation in einem Thermocycler nach folgenden Schritten: 45min bei 37°C, 15min bei 45°C, 5min bei 50°C, 10min bei 70°C und anschließend wird das Reaktionsgemisch auf Eis abgekühlt. Es folgt die cDNA-Aufreinigung. Das Reaktionsgemisch wird mit dem mitgelieferten Aufreinigungspuffer versetzt und auf eine Aufreinigungssäule in einem frischen Reagenzgefäß pipettiert. Es folgt eine Zentrifugation für 1min bei 8600g. Der Durchfluss wird verworfen und es folgen zwei Waschschrte mit jeweils 200µl der mitgelieferten Wash Solution WS. Anschließend werden die Aufreinigungssäulen in ein frisches 1,5ml-Reagenzgefäß überführt und es folgen zwei Elutionsschritte mit jeweils 25µl des mitgelieferten Elutions Buffer. Das Ergebnis ist die synthetisierte cDNA. Durch die Säulenaufreinigung werden mögliche Störfaktoren wie Enzymreste, Primerreste und Pufferreste entfernt. Die cDNA wird bis zur anschließenden RT-qPCR (vgl. Kapitel 3.2.4.4) bei -20°C gelagert.

3.2.4 PCR

3.2.4.1 PCR-Methode

Die von Kary B. Mullis 1983 beschriebene Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction; PCR) ist ein Verfahren zur *in-vitro*-Amplifikation beliebiger, auch sehr kurzer Nukleinsäureabschnitte (Mullis et al., 1986).

Die PCR besteht aus einer Abfolge von meist 30 bis 35 Zyklen. Ein PCR-Zyklus besteht aus den drei Einzelschritten *Denaturierung*, *Primer-Annealing* und *Primer-Extension*. Bei der Denaturierung werden die Wasserstoffbrückenbindungen der DNA durch eine Temperaturerhöhung auf 95°C aufgebrochen. Der DNA-Doppelstrang wird in zwei komplementäre Einzelstränge aufgetrennt. Beim Primer-Annealing kommt es durch eine Temperatursenkung auf ca. 50°C bis 60°C zur Anlagerung der Primer an die DNA-Einzelstränge. Primer sind Oligonukleotide und dienen nach Anlagerung an ihre komplementäre DNA-Sequenz als Ausgangspunkt für die DNA-Polymerase. Die Auswahl und Anlagerung der Primer ist entscheidend für die Spezifität der PCR. Bei der Elongation wird die DNA durch die Taq-Polymerase bei deren Temperaturoptimum von 72°C verlängert. Die Taq-Polymerase ist ein hitzebeständiges Enzym aus dem in heißen Quellen lebenden Bakterium

Thermus aquaticus. Die DNA-Synthese erfolgt dabei in 5'-3'-Richtung. Die Taq-Polymerase erkennt ausschließlich DNA und cDNA als Matrize. Mit jedem Zyklus verdoppelt sich die Zahl der eingesetzten DNA-Abschnitte. Es liegt eine exponentielle Vervielfachung vor. Am Ende der PCR ist eine weitere Analyse der vervielfältigten Sequenz möglich.

Im molekularpathologischen Labor des Pathologischen Instituts der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel wird eine strikte räumliche Trennung zwischen den Arbeitsschritten vor und denen nach der PCR gewährleistet. Diese Trennung dient der Minimierung der bestehenden Kontaminationsgefahr. Zur Überprüfung und Qualitätssicherung werden bei jeder PCR Positiv- und Negativkontrollen durchgeführt. Die Positivkontrolle der Size-Range-PCR (vgl. Kapitel 3.2.4.2) wird mit DNA aus der humanen Zelllinie Raji und die der PCR zum HPV-Nachweis (vgl. Kapitel 3.2.4.3) mit kommerziell erhältlicher HPV-positiver DNA (Typ 16) durchgeführt. Die Negativkontrollen werden mit Nuklease-freiem Wasser (Ambion, Nuclease-Free Water, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) durchgeführt.

3.2.4.2 Size-Range-PCR

Die im Rahmen dieser Arbeit behandelten Gewebeproben sind in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Dies hat Einfluss auf die Qualität der DNA im Gewebe. Mit der Size-Range-PCR nach dem BIOMED-2-Protokoll (van Dongen et al., 2003) wird die Qualität bzw. die Amplifizierbarkeit der isolierten DNA bestimmt. Es werden Zielstrukturen mit einer Länge von 100 (TBXAS1, Exon 9), 200 (RAG1, Exon 2), 300 (PLZF, Exon 1) und 400 (AF4, Exon 3) Basenpaaren nachgewiesen. Die Primer werden von der Firma biomers.net (Biomers, Ulm) im Auftrag des Pathologischen Instituts der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel synthetisiert. Die PCR-Produkte werden auf einem 2% Agarosegel ausgewertet (vgl. Kapitel 3.2.5.1). Bei einer erfolgreichen Size-Range-PCR sind entsprechend der Amplifizierbarkeit der untersuchten DNA null bis vier Banden auf dem Agarosegel sichtbar. Sind weniger als zwei Banden in der Gelelektrophorese detektierbar, entspricht dies einer maximal amplifizierbaren DNA-Fragmentgröße von weniger als 200 Basenpaaren. Die betroffenen DNA-Proben werden in diesem Fall von weiteren Analysen ausgeschlossen (vgl. Seite 16, Abbildung 3.1).

Der PCR-Reaktionsansatz besteht aus 20µl eines vorgefertigten Prämix (vgl. Tabelle 3.1) und 5µl DNA (50ng/µl). Die Taq-Polymerase (0,25µl HotStarTaq, 5Units/µl) wird dabei erst unmittelbar vor dem Start der PCR-Reaktion zum Reaktionsansatz hinzugegeben.

Tabelle 3.1 Prämix der Size-Range-PCR

Reagenzien	Menge in μl
10x PCR-Puffer (mit 15mM MgCl_2)	2,5
MgCl_2 (25mM)	0,5
dNTP (je 2mM)	0,625
Primer TBXAS1/X9U (10 μM)	0,25
Primer TBXAS1/X9L (10 μM)	0,25
Primer RAG1/X2U (10 μM)	0,25
Primer RAG1/X2L (10 μM)	0,25
Primer PLZF/X1U (10 μM)	0,25
Primer PLZF/X1L(10 μM)	0,25
Primer AF4/X11U (10 μM)	0,25
Primer AF4/X11L(10 μM)	0,25
Wasser, Nuklease-frei	14,125
HotStarTaq (5Units/ μl)	0,25
Gesamtvolumen	20

Die PCR erfolgt im C1000 TouchTM Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Im Thermocycler erfolgt die DNA-Amplifikation nach dem in Tabelle 3.2 dargestellten Protokoll:

Tabelle 3.2 Protokoll der Size-Range-PCR

Schritt	Zeit in min	Temperatur in $^{\circ}\text{C}$
1	15:00	95
2	0:45	95
3	0:40	55
4	0:45	72
5	36 x Wiederholung ab Schritt 2	
6	7:00	72
7	∞	10

Der mit 105 $^{\circ}\text{C}$ beheizte Deckel des Thermocyclers verhindert ein Verdampfen des Reaktionsgemisches während der PCR. Die PCR-Produkte werden anschließend bei 4 $^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

3.2.4.3 PCR zum Nachweis humaner Papillomviren

In der PCR für den HPV-Nachweis werden zwei unabhängige Gensegmente mittels zweier unterschiedlicher Primersets amplifiziert. Es werden die Primer MY09/11/HMB01 und GP5⁺/6⁺ verwendet. Zielstruktur dieser Primer ist die konservierte L1-Region. Diese HPV-spezifische DNA-Region erlaubt die Detektion einer großen Bandbreite von HPV-Typen (Fuessel Haws et al., 2004). Der HMB01-Primer wird zusätzlich zu den Standardprimern eingesetzt und dient der spezifischen Detektion des HPV-Typs 51. Die Primer werden von der Firma biomers.net (Biomers, Ulm) hergestellt. Die Primersequenzen sind in Tabelle 3.3 dargestellt.

Tabelle 3.3 Primersequenzen zum HPV-Nachweis

HPV-Primer	Sequenz
GP5 ⁺	5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3'
GP6 ⁺	5'-GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3'
MY09	5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3'
MY11	5'-GCMCAGGGWCATAAAYAATGG-3'
HMB01	5'-GCGACCCAATGCAAATTGGT-3'

Das Ansetzen der PCR-Reaktion wird zur Minimierung der Kontaminationsgefahr auf sterilen Arbeitsplatten und räumlich getrennt von den Post-PCR-Arbeitsschritten durchgeführt. Der Reaktionsansatz der MY09/MY11-PCR ist in Tabelle 3.4 dargestellt.

Tabelle 3.4 Reaktionsansatz der MY09/MY11-PCR

Reagenzien	Menge in μ l
10x-Puffer (mit MgCl ₂)	2,5
MgCl ₂ (25mM)	2,5
dNTP (2mM)	2,5
Primer MY09 (10 μ M)	1,25
Primer MY11 (10 μ M)	1,25
Primer HMB01 (10 μ M)	0,2
Wasser, Nuklease-frei	9,55
HotStarTaq (5Units/ μ l)	0,25
DNA-Template (40ng/ μ l)	5
Gesamtvolumen	25

Der Reaktionsansatz der GP5⁺/GP6⁺-PCR ist in Tabelle 3.5 dargestellt.

Tabelle 3.5 Reaktionsansatz der GP5⁺/GP6⁺-PCR

Reagenzien	Menge in μl
10x-Puffer (mit MgCl ₂)	2,5
MgCl ₂ (25mM)	2
dNTP (2mM)	2,5
Primer GP5 ⁺ (10 μM)	1,25
Primer GP6 ⁺ (10 μM)	1,25
Wasser, Nuklease-frei	10,25
HotStarTaq (5Units/ μl)	0,25
DNA-Template (40ng/ μl)	5
Gesamtvolumen	25

Die PCR erfolgt im Thermocycler C1000 TouchTM (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) für die beiden Reaktionsansätze jeweils nach einem anderen Programm. Die Programme unterscheiden sich ausschließlich in der unterschiedlichen Annealingtemperatur der Primer. Die GP5⁺/6⁺-Primer benötigen 40°C für die Hybridisierung und die MY09/11-Primer benötigen eine höhere Temperatur von 55°C. Der Ablauf der PCR zum HPV-Nachweis ist in Tabelle 3.6 dargestellt.

Tabelle 3.6 Ablauf der PCR zum HPV-Nachweis

Schritt	Zeit in min	Temperatur in °C
1	15:00	95
2	1:00	95
3	1:00	HPV-GP: 40 HPV-MY: 55
4	1:00	72
5	39 x Wiederholung ab Schritt 2	
6	5:00	72
7	∞	12

Die PCR-Produkte werden anschließend bei 4°C aufbewahrt.

3.2.4.4 Real-time quantitative PCR

Die Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) ist ein Verfahren zur Quantifizierung eines spezifischen Gens. Das Verfahren basiert auf dem Prinzip der PCR (vgl. Kapitel 3.2.4.1). RNA wird durch die Taq-Polymerase nicht als Matrize erkannt. Die RNA wird deshalb in cDNA umgeschrieben (vgl. Kapitel 3.2.3). Die cDNA fungiert als Matrize für die Taq-Polymerase. Bei der RT-qPCR kommt der fluoreszierende Farbstoff SybrGreen zum Einsatz. SybrGreen fluoresziert beim Binden an Doppelstrang-DNA und wird zu deren Nachweis eingesetzt. Während der RT-qPCR wird das von SybrGreen emittierte Fluoreszenzsignal kontinuierlich in Echtzeit (engl. *real-time*) aufgezeichnet.

Die Korrelation zwischen Fluoreszenz und Menge des vermehrten Produkts ermöglicht eine Quantifizierung des Ausgangsmaterials (Nolan et al., 2006). Die Menge der Nukleinsäure ist proportional zur gemessenen Fluoreszenz. Je früher die exponentielle Phase der PCR beginnt, desto mehr Ausgangsprodukt liegt vor. Je mehr Ausgangsprodukt vorliegt, desto kleiner sind die sogenannten Ct-Werte (engl. *threshold level*).

In Tabelle 3.7 sind die Bestandteile des Reaktionsansatzes der RT-qPCR aufgelistet. Es werden 2,5µl cDNA hinzugegeben. Das entspricht einer Menge von 10ng RNA. Insgesamt hat der Reaktionsansatz ein Volumen von 20µl. Es werden pro 20µl RT-qPCR-Reaktionsansatz 0,2µl einer 100-fach konzentrierten SybrGreen-Lösung verwandt (AppliChem, Darmstadt).

Tabelle 3.7 Reaktionsansatz der RT-qPCR

Reagenzien	Menge in µl
ImmoMix, 2x konzentriert (Bioline, Luckenwalde)	10
forward-Primer (10pmol/µl)	0,4
reverse-Primer (10pmol/µl)	0,4
SybrGreen	0,2
cDNA (4ng/µl)	2,5
Wasser, Nuklease-frei	6,5
Gesamtvolumen	20

SLPI und Annexin A2 werden quantitativ mittels RT-qPCR analysiert. Die Primersequenzen für SLPI und Annexin A2 sind in Tabelle 3.8 aufgelistet.

Tabelle 3.8 Primersequenzen für SLPI- und Annexin-A2-RNA

SLPI, forward-Primer	5'-AATGCCTGGATCCTGTTGAC-3'
SLPI, reverse-Primer	5'-AAAGGACCTGGACCACACAG-3'
Annexin A2, forward-Primer	5'-AACCGACGAGGACTCTCTCA-3'
Annexin A2, reverse-Primer	5'-CGCTGATCCACTTGGGAACAT-3'

Zusätzlich werden von allen 126 Gewebeproben die drei *housekeeping*-Gene 18-S-RNA, β -Actin und β -2-Mikroglobulin bestimmt. Die Primer hierfür werden nach Herstellerangaben (Promolgene, Berlin) verwandt. Die Primersequenzen sind aufgrund des Firmengeheimnisses von Promolgene nicht bekannt. *Housekeeping*-Gene kommen in allen kernhaltigen Zellen vor und sichern basale Funktionen zum Überleben der Zelle (Pfaffl, 2001). Die mRNA-Expression der *housekeeping*-Gene unterliegt nur geringen Schwankungen zwischen unterschiedlichen Zelltypen (Thellin et al., 1999). Es wird ein sogenannter *housekeeping*-Index als Referenzwert gebildet. Die Auswertung der RT-qPCR und die Quantifizierung der mRNA erfolgt mittels der $\Delta\Delta$ ct-Methode (vgl. Kapitel 3.2.10).

In Tabelle 3.9 ist der Ablauf der RT-qPCR dargestellt. Die RT-qPCR erfolgt in einem Thermocycler (Rotor-Gene RG-3000, Corbett Research, LFT, Wasserburg). Für alle eingesetzten Primer ist die Annealing-Temperatur mit 60°C identisch.

Tabelle 3.9 Ablauf der RT-qPCR

Schritt	Zeit	Temperatur in °C
1. initiales Denaturieren	10min	95
2. 40x Wiederholung der Schritte 2.1 bis 2.3		
2.1 Denaturierung	20s	95
2.2 Annealing	20s	60
2.3 Elongation	20s	72
3. Schmelzkurvenanalyse		

3.2.5 DNA-Detektion

3.2.5.1 Gelelektrophorese

Ein 5µl-Aliquot der PCR-Produkte sowohl der Size-Range-PCR als auch der PCR zum Nachweis der HPV-DNA wird mittels Gelelektrophorese ausgewertet. Die Nukleinsäuren werden unter Anlage eines elektrischen Felds innerhalb eines festen Trägermaterials nach Größe und Ladung aufgetrennt. Nukleinsäuren sind wegen ihrer Phosphatgruppen negativ geladen. Im elektrischen Feld werden sie Richtung Anode bewegt. Das hier verwandte Trägermaterial ist ein 2% Agarosegel (Biozym LE Agarose, Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf). Es werden 4g der Agarose auf 200ml TAE-Puffer gegeben. Der TAE-Puffer setzt sich in 20-facher Konzentration aus 0,8M Tris, 0,4M Natriumacetat und 25mM EDTA zusammen. Der pH-Wert beträgt 8,3. Vor Gebrauch erfolgt eine Verdünnung mit destilliertem Wasser auf eine einfache Konzentration. Das Gemisch wird in einer Mikrowelle (NN-K105W, Panasonic, Osaka, Japan) aufgeköcht. Dem flüssigen Gel wird beim Erreichen einer Temperatur von 60°C 4µl Ethidiumbromid 1% (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) hinzugefügt. Ethidiumbromid führt durch Interkalation mit Nukleinsäuren zu einer Fluoreszenz der DNA-Banden unter UV-Licht. Den PCR-Produkten wird ein 6x Ladepuffer (6x DNA Loading, Dye, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) hinzugefügt. Das mit den Gewebeproben beladene Gel ist in einer Gelelektrophoreseapparatur (Modell 40-0708, PeqLab, Erlangen) mit dem TAE-Puffer bedeckt. Das elektrische Feld wird für ca. 20min angelegt. Für die Auswertung werden die DNA-Banden mit dem Transilluminator (Molecular Imager[®] Gel Doc[™] XR+, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) bei UV-Licht mit 302nm Wellenlänge visualisiert. Als Größenmaßstab für die Beurteilung der DNA-Banden wird der Gene Ruler 1kb (Gene Ruler 1kb Plus DNA Ladder, 0,5µg/µl, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) verwandt. Eine exemplarische Auswertung einer Size-Range-PCR ist in Abbildung 3.1 dargestellt.

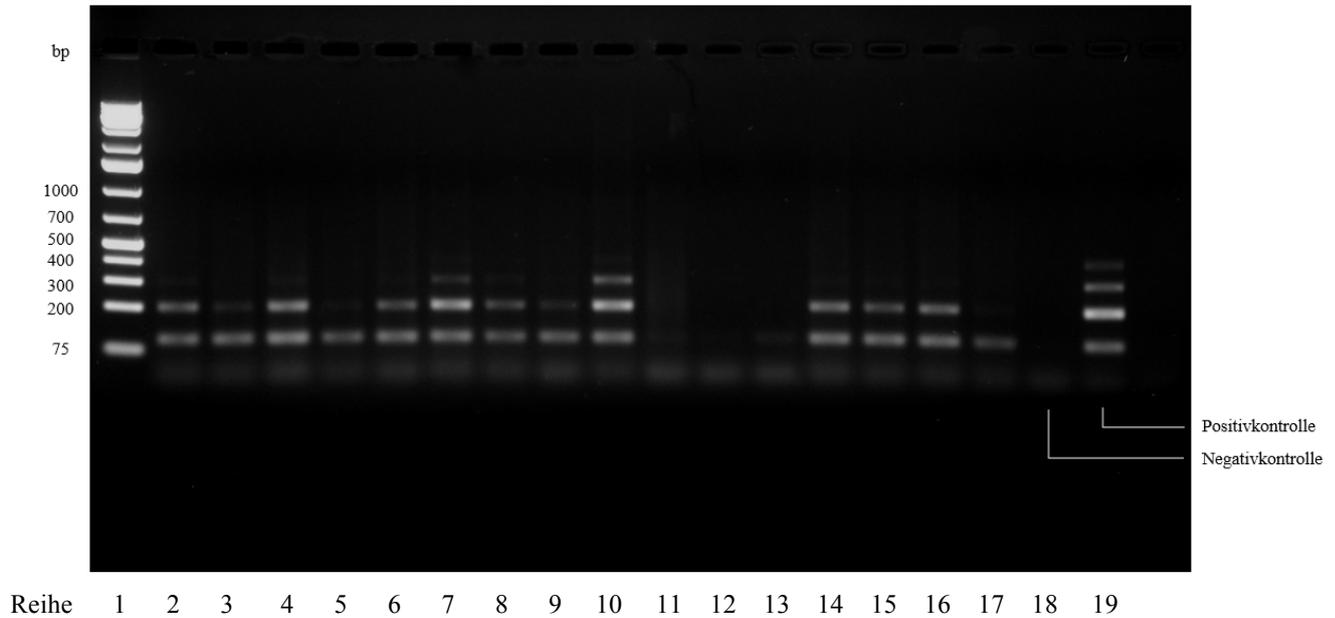


Abbildung 3.1 Auswertung der Size-Range-PCR mittels Gelelektrophorese (2% Agarosegel). Es handelt sich um eine repräsentative Abbildung der Auswertung einer anderen Versuchsreihe. Der Größenmaßstab Gene Ruler 1kb ist in der ersten Reihe von links aufgetragen. Die Zuordnung der Banden zur entsprechenden Größe der Basenpaare (bp) ist links neben der Abbildung dargestellt. Die MY09/MY11-PCR benötigt eine DNA-Länge von mindestens 400 Basenpaaren (vier Banden). Die GP5⁺/GP6⁺-PCR benötigt eine DNA-Länge von mindestens 200 Basenpaaren (zwei Banden). Die DNA-Qualität der Gewebeprobe in den Reihen elf bis 13 der hier dargestellten Abbildung wäre für eine weitere Untersuchung nicht ausreichend. Die Gewebeprobe der hier vorliegenden Arbeit weisen dahingegen durchgehend eine für die weitere Untersuchung ausreichende DNA-Qualität auf. Die Negativkontrolle ist in Reihe 18 und die Positivkontrolle in Reihe 19 aufgetragen.

3.2.5.2 Aufreinigung der PCR-Produkte

PCR-Produkte enthalten neben der vervielfältigten Nukleinsäuresequenz Verunreinigungen wie Salze, Nukleotide und Primer. Diese stellen Störgrößen bei nachfolgenden Analysen wie zum Beispiel der DNA-Sequenzierung dar. Deshalb wird eine Aufreinigung der PCR-Produkte mit dem NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Das PCR-Produkt wird in den mitgelieferten PCR-clean-up-Säulen mit 200µl NT1-Puffer versetzt. Es folgt eine Zentrifugation bei 11000g für 1min. Der Durchfluss im 2ml-Reagenzgefäß wird verworfen. Es werden 700µl NT3-Puffer auf die Membran der mitgelieferten PCR-clean-up-Säule gegeben und es folgt eine Zentrifugation bei 11000g für 1min. Dieser Waschschrift wird nach Empfehlung des Herstellers insgesamt zwei Mal durchgeführt. Der Durchfluss wird jeweils verworfen. Die Zentrifugation bei 11000g für 1min wird zur besseren Trocknung nach dem zweiten Waschschrift wiederholt. Es werden 40µl

NE-Puffer auf die Membran der Säule gegeben. Die PCR-clean-up-Säule wird in ein frisches 1,5ml-Reagenzgefäß überführt. Die Zentrifugation bei 11000g für 1min erfolgt nach einer Inkubationszeit von 1min. Das 1,5ml-Reagenzgefäß enthält das aufgereinigte PCR-Produkt. Das aufgereinigte Produkt wird der DNA-Sequenzierung zugeführt und kann bei einer Temperatur von 4°C gelagert werden.

3.2.6 DNA-Sequenzierung

Es wird das Didesoxyverfahren nach Sanger angewandt (Sanger et al., 1977). Bei diesem enzymatischen Verfahren werden basenspezifisch terminierte DNA-Fragmente synthetisiert. Bei der Sequenzierreaktion wird von einer bekannten DNA-Sequenz durch Zugabe eines Primers, Desoxynukleotiden, einer DNA-Polymerase und fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden die Synthese des komplementären DNA-Strangs initiiert. Beim Einbau der Didesoxynukleotide kommt es zum Kettenabbruch. Eine weitere Verlängerung der DNA-Matrize ist aufgrund der fehlenden Hydroxylgruppe am C3-Atom der Didesoxynukleotide nicht möglich. Ergebnis dieser Sequenzierreaktion sind viele unterschiedlich lange DNA-Fragmente. Das hier angewandte *Cycle-Sequencing* ist eine Kombination aus klassischer Didesoxymethode und PCR-Reaktion. Die Fragmente werden ihrer Größe nach aufgetrennt. Durch die Fluoreszenz der Strangenden kann die DNA-Sequenz im Elektropherogramm abgelesen werden.

Für die Sequenzierreaktion wird das BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit von der Firma Applied Biosystems (Lifetechnologies, Carlsbad, CA, USA) verwandt. In Tabelle 3.10 sind die Bestandteile des Reaktionsansatzes der Sequenzierreaktion für eine Gewebeprobe aufgelistet.

Tabelle 3.10 Reaktionsansatz der Sequenzierreaktion BigDye[®]

Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit

Reagenzien	Menge in µl
5x Puffer	2
BigDye [®] 1.1-Premix	2
Primer GP6 ⁺ (10µM)	0,5
Wasser, Nuklease-frei	14,5
Aufgereinigtes PCR-Produkt (15ng/µl)	1
Gesamtvolumen	20

Die Sequenzierreaktion erfolgt im TouchTM Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

3.2.7 Aufreinigung der Sequenzierreaktion

Die Produkte der Sequenzierreaktion werden mit dem NucleoSEQ[®]-Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) aufgereinigt. Die mitgelieferten NucleoSEQ[®]-Röhrchen enthalten eine trockene Gelmatrix. Es werden 600µl Wasser hinzugefügt. Es folgt eine Inkubation des Gemisches für mindestens 30min bei Raumtemperatur. Das Röhrchen wird in ein 2ml-Reagenzgefäß überführt und für 2min bei 750g zentrifugiert. Das Ergebnis ist eine hydratisierte Gelsäule im NucleoSEQ[®]-Röhrchen. Das Produkt der Sequenzierreaktion wird zentral auf die Gelsäule pipettiert. Ein Pipettieren seitlich der Gelsäule und die Zerstörung der Geloberfläche mit der Pipettenspitze verschlechtern das Aufreinigungsergebnis. Es folgt eine Zentrifugation für 5min bei 750g. Das NucleoSEQ[®]-Röhrchen wird verworfen und das Reagenzgefäß enthält das aufgereinigte Produkt der Sequenzierreaktion. Die Ermittlung der DNA-Sequenz erfolgt im 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Lifetechnologies, Carlsbad, CA, USA).

3.2.8 Auswertung der DNA-Sequenz

Die erhaltene DNA-Sequenz wird mit dem Online-Programm BLAST[®] (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ausgewertet. Das Programm gleicht Nukleotidsequenzen mit bekannten Sequenzen in Datenbanken ab und ermittelt statistische Übereinstimmungen zwischen den Sequenzen. So wird der HPV-Typ bestimmt.

3.2.9 Immunhistochemie

Zur Beurteilung des Proteinexpressionsmusters von p16^{INK4A} und SLPI werden 2µm dicke Schnitte der Gewebeproben immunhistochemisch angefärbt. Die Färbung wird vollautomatisch im Färbeautomaten BOND-Max der Firma Leica (Leica Microsystems, Wetzlar) durchgeführt. Die vollautomatische Färbung verringert das Auftreten manueller Fehler.

Der p16^{INK4A}-Nachweis erfolgt mittels des Antikörpers p16^{INK4A} CINTec[®] Histology der Firma Roche (Roche mtm laboratories AG, Mannheim). Der p16^{INK4A}-Antikörper wird in einem Verhältnis von 1:5 in BOND Primary Antibody Diluent (Leica Microsystems, Wetzlar)

verdünnt. Die Vorbehandlung erfolgt mit der BOND Epitope Retrieval Solution 1 (ER1, Leica Microsystems, Wetzlar) über 30min.

Der SLPI-Nachweis erfolgt mittels des Antikörpers Anti-SLPI Antibody der Firma LifeSpan (LifeSpan, BioSciences Inc., Seattle, WA, USA). Der SLPI-Antikörper wird in einem Verhältnis von 1:100 in BOND Primary Antibody-Diluent (Leica Microsystems, Wetzlar) verdünnt. Die Vorbehandlung erfolgt mit der BOND Epitope Retrieval Solution 1 (ER1, Leica Microsystems, Wetzlar) über 20min.

Die immunhistochemische Färbung für den p16^{INK4A}-Nachweis und für den SLPI-Nachweis erfolgt mit dem Bond Polymer Refine Detection Kit (Leica Microsystems, Wetzlar) nach dem jeweils selben Protokoll. Das dabei verwandte Polymer enthält sowohl Anti-Mouse-IgG (Mausantikörper) als auch Anti-Rabbit-IgG (Kaninchenantikörper) mit einem HRP-Konjugat (*horseradish peroxidase*). Die Reaktion wird mit DAB als HRP-Substrat visualisiert und die Zellkerne werden mit Hämatoxylin gegengefärbt. Das Protokoll ist in Tabelle 3.11 dargestellt. Nach jedem Schritt erfolgt ein Waschschrift.

Tabelle 3.11 Bond Polymer Refine IHC protocol (Leica Microsystems, Wetzlar)

Schritt	Zeit in min
1. Entparaffinierung des Gewebes (Dewax)	0:30
2. Antigendemaskierung mit Epitope Retrieval (ER1 Solution)	p16 ^{INK4A} : 30:00 SLPI: 20:00
3. Inkubation des Präparates mit Wasserstoffperoxid (Unterdrückung der endogenen Peroxidaseaktivität)	5:00
4. Inkubation mit Primärantikörper	20:00
5. Post-Primary-IgG-Linker-Reagenz	8:00
6. Poly-HRP-IgG-Reagenz	8:00
7. DAB (3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochloridlösung Hydrat) zur Sichtbarmachung der Komplexe (braunes Präzipitat)	10:00
8. Kontrastfärbung mit Hämatoxylin zur Sichtbarmachung der Zellkerne	5:00

Die Auswertung der Färbungen erfolgt durch die mikroskopische Beurteilung des Proteinexpressionsmusters. Die Auswertung der p16^{INK4A}-Immunhistochemie erfolgt anhand der Kriterien nach Klaes und Mitarbeitern (Klaes et al., 2001). Es wird der prozentuale Anteil

angefärbter Tumorzellen beurteilt. Die SLPI-Immunhistochemie wird anhand der modifizierten Kriterien nach Cordes und Mitarbeitern (Cordes et al., 2011) ausgewertet. Es werden 300 Zellen in fünf unterschiedlichen Bereichen bei 400-facher Vergrößerung beurteilt. Ein Anteil von $\leq 5\%$ angefärbter Tumorzellen wird als negativ (-) bewertet. Von 5-30% liegt ein schwach positiver (+), von 30-75% ein mäßig positiver (++) und bei $\geq 75\%$ angefärbter Tumorzellen ein stark positiver (+++) Befund vor (Cordes et al., 2011).

3.2.10 Statistische Auswertung

Die immunhistochemischen Daten werden mit dem zweiseitigen Exakten Fisher-Test analysiert (SPSS 20.0 Software, IBM, Armonk, NY, USA). Die Daten der RT-qPCR werden nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (Pfaffl, 2001) analysiert. Für diese relative Quantifizierung der RT-qPCR werden die mittleren Ct-Werte der bestimmten *housekeeping*-Gene verwandt (vgl. Kapitel 3.2.4.4). Die Fold-Change-Werte der Annexin-A2- und SLPI-Expressionslevel werden nach Pfaffl berechnet (Pfaffl, 2001) und für die statistische Analyse verwandt (SPSS 20.0 Software, IBM, Armonk, NY, USA).

Die Überlebensdaten werden mit dem Kaplan-Meier-Schätzer mittels SPSS 20.0 Software (IBM, Armonk, NY, USA) analysiert. Primärer statistischer Endpunkt sind dabei das progressionsfreie Überleben sowie das Gesamtüberleben der Patienten. Das progressionsfreie Überleben ist definiert als die Zeitspanne zwischen dem Zeitpunkt der Erstdiagnose und dem Zeitpunkt der Krankheitsprogression. Das Gesamtüberleben der Patienten ist definiert als die Zeitspanne zwischen dem Zeitpunkt der Erstdiagnose und dem Zeitpunkt der letzten Nachsorgeuntersuchung oder des Todes. Rauchverhalten, HPV-Status, p16^{INK4A}- und SLPI-Proteinexpression in den Gewebeproben werden auf eine prognostische Relevanz hin überprüft. Eine Überprüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen wird mittels des Logrank-Tests durchgeführt (SPSS 20.0 Software, IBM, Armonk, NY, USA).

HPV-Positivität und p16^{INK4A}-Proteinexpression sowie SLPI-Proteinexpression und Rauchverhalten werden mittels des Exakten Fisher-Tests (SPSS 20.0 Software, IBM, Armonk, NY, USA) in Bezug zueinander gesetzt. Die SLPI-Proteinexpression wird mit dem Rauchverhalten auf eine Korrelation hin überprüft. Das Signifikanzniveau der p-Werte beträgt $p \leq 0,05$ für alle angewandten Tests.

4. Ergebnisse

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse dargelegt. Zunächst werden die Charakteristika des Patientenkollektivs erläutert. Die angewandten Methoden liefern Aussagen über den HPV-DNA- und HPV-RNA-Status, über die SLPI- und p16^{INK4A}-Proteinexpressionsmuster sowie über die SLPI- und Annexin-A2-Genexpression. Der HPV-Status wird mit dem SLPI- und dem p16^{INK4A}-Expressionsmuster korreliert. Das Rauchverhalten wird auf eine Korrelation mit dem SLPI-Expressionsmuster und dem HPV-Status überprüft. Die Nachsorge der Patienten erfolgt über einen Zeitraum von bis zu 10 Jahren. Die Patienten werden anhand des HPV-Status, des p16^{INK4A}- und SLPI-Proteinexpressionsmusters sowie im Hinblick auf das Rauchverhalten in unterschiedliche Gruppen eingeteilt. Die im Rahmen der Nachsorge erhobenen Daten und die Einteilung in unterschiedliche Gruppen ermöglicht eine Beurteilung des Gesamtüberlebens der Patienten. Der Einfluss von Rauchverhalten und HPV-Status auf die Genexpressionsmuster von SLPI und Annexin A2 wird auf mRNA-Ebene untersucht.

4.1 Patientenkollektiv

Das untersuchte Kollektiv besteht aus 126 Patienten. Davon sind 91 (72,2%) Patienten männlichen und 35 (27,8%) weiblichen Geschlechts. Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird hier auf den parallelen Gebrauch männlicher und weiblicher Formen verzichtet. Die Bezeichnungen gelten durchweg für beiderlei Geschlecht. Bei allen Patienten liegt ein histologisch gesichertes Plattenepithelkarzinom der Tonsilla palatina vor. Insgesamt sind 94 (74,6%) Patienten Raucher und 30 (23,8%) Patienten Nichtraucher. In zwei Fällen (1,6%) liegt keine Rauchanamnese vor. Abbildung 4.1 zeigt die Altersverteilung des Kollektivs zum Diagnosezeitpunkt. Das Alter der Patienten liegt zwischen 36,28 und 88,88 Jahren. Das mediane Alter beträgt 59,90 Jahre.

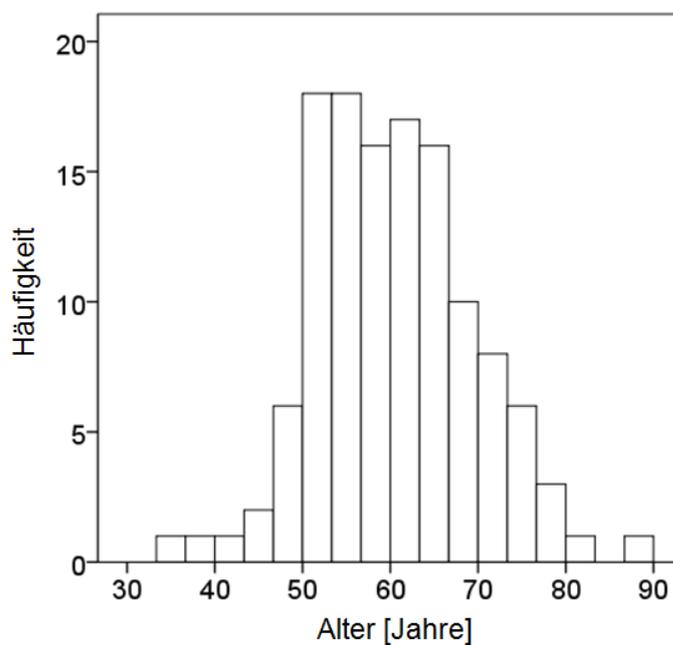


Abbildung 4.1 Altersverteilung des Patientenkollektivs zum Diagnosezeitpunkt. Auf der Abszisse ist das Alter der Patienten in Jahren dargestellt. Auf der Ordinate ist die absolute Häufigkeitsverteilung des Alters aufgetragen. Das Alter der Patienten liegt zwischen 36,28 und 88,88 Jahren. Das mediane Alter beträgt 59,90 Jahre.

Abbildung 4.2 zeigt die Altersverteilung zum Diagnosezeitpunkt in Abhängigkeit vom HPV-Status der Patienten. Die HPV-negativen Patienten sind signifikant jünger als die HPV-positiven Patienten ($p=0,0002$). Das Alter der HPV-negativen Patienten liegt zwischen 36,28 und 78,38 Jahren. Das mediane Alter beträgt 56,87 Jahre. Das Alter der HPV-positiven Patienten liegt zwischen 47,75 und 88,88 Jahren. Das mediane Alter beträgt 63,08 Jahre.

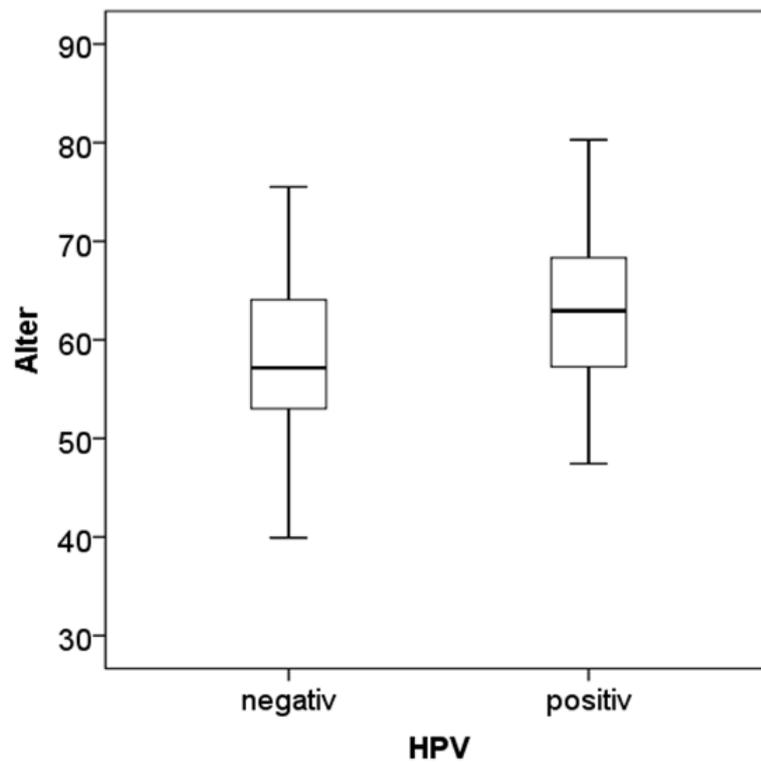


Abbildung 4.2 Box-Whisker-Plot zur Altersverteilung der HPV-negativen Patienten und der HPV-positiven Patienten. Auf der Abszisse ist der HPV-Status dargestellt. Auf der Ordinate ist das Alter in Jahren dargestellt. Die HPV-negativen Patienten sind jünger als die HPV-positiven Patienten ($p=0,0002$).

4.2 HPV-DNA-Nachweis und mRNA-Nachweis

Zum HPV-DNA-Nachweis wird an den 126 Gewebeproben eine HPV-PCR durchgeführt. In der GP5⁺/GP6⁺-PCR sind 53 der 126 Gewebeproben positiv. Das entspricht einem Anteil von 42,1%. Mittels der DNA-Sequenzierung nach Sanger wird der HPV-Genotyp identifiziert. Der Genotyp 16 liegt bei 48 (90,6%) der 53 HPV-positiven Gewebeproben vor. Die Genotypen 6, 18, 26, 33 und 35 liegen bei jeweils einer Gewebeprobe vor. HPV6 ist ein „*low-risk*“-Typ. Die anderen vorliegenden HPV-Typen zählen zur „*high-risk*“-Gruppe. Für alle HPV-DNA-positiven Gewebeproben wird eine Bestimmung der E6*I-mRNA durchgeführt. Ein positiver E6*I-mRNA-Nachweis gilt als Beweis für eine aktive HPV-Infektion. Bei 48 (90,6%) der 53 HPV-DNA-positiven Gewebeproben ist der E6*I-mRNA-Nachweis positiv. Insgesamt 46 der 48 E6*I-mRNA-positiven Gewebeproben weisen HPV16 und jeweils eine HPV6 sowie HPV33 auf. Es sind damit zwei der Gewebeproben mit dem HPV-DNA-Typ 16 E6*I-mRNA-negativ. Es sind weiterhin die Gewebeproben mit den HPV-DNA-Typen 18, 26 und 35 E6*I-mRNA-negativ. Es kann bei diesen insgesamt fünf E6*I-mRNA-negativen Gewebeproben von einer inaktiven HPV-Infektion ausgegangen werden.

4.3 Immunhistochemischer p16^{INK4A}-Nachweis

Die immunhistochemische p16^{INK4A}-Färbung wird für alle der 126 Gewebeproben durchgeführt. Die Bewertung der Färbungen wird anhand der in Kapitel 3.2.9 beschriebenen Kriterien durchgeführt. Von den 126 Gewebeschnitten sind 24 (19,0%) p16^{INK4A}-negativ, 19 (15,1%) schwach p16^{INK4A}-positiv, 25 (19,8%) mäßig p16^{INK4A}-positiv und 58 (46,0%) stark p16^{INK4A}-positiv. In Abbildung 4.3 sind repräsentative, lichtmikroskopische Bilder des immunhistochemischen p16^{INK4A}-Nachweises dargestellt.

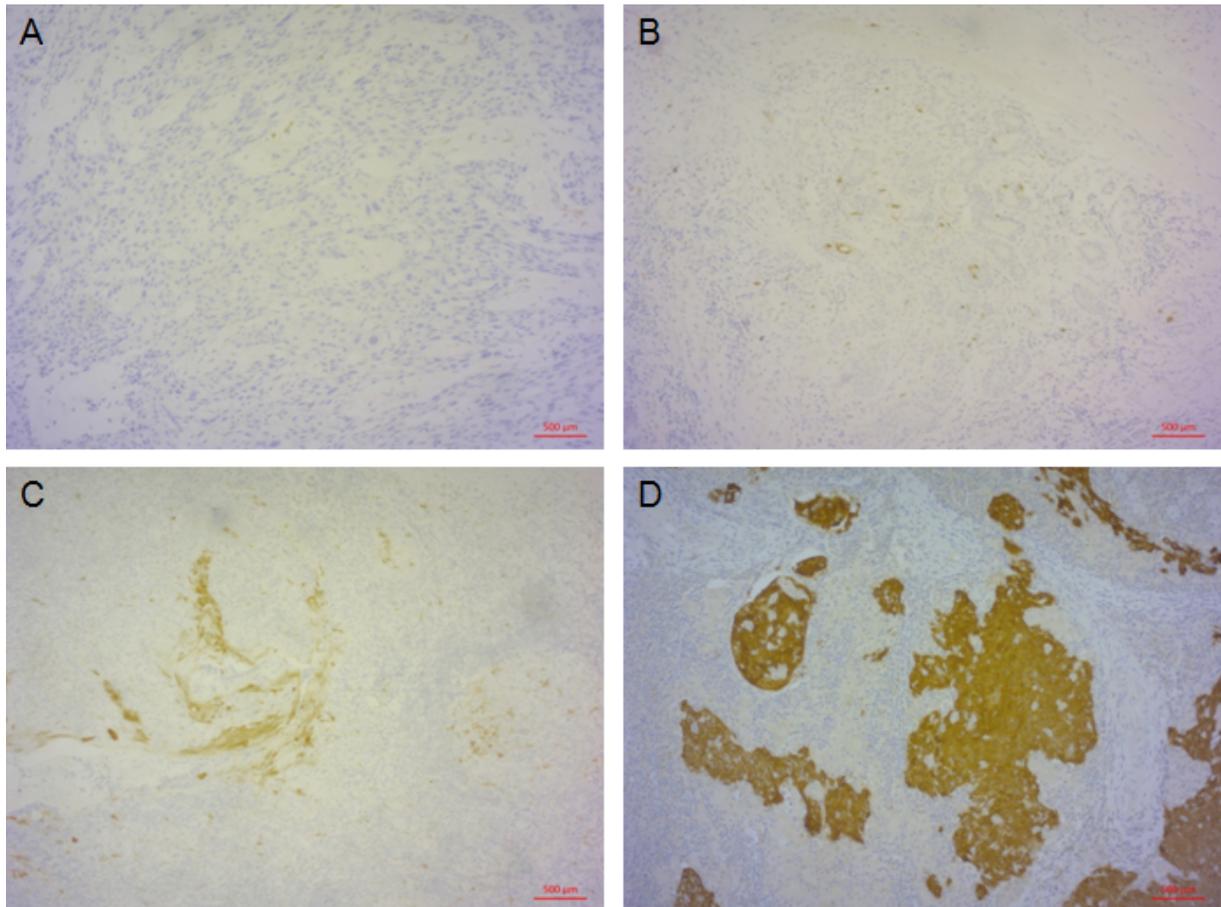


Abbildung 4.3 Ergebnisse des immunhistochemischen p16^{INK4A}-Nachweises. Es sind repräsentative, lichtmikroskopische Bilder der immunhistochemischen p16^{INK4A}-Färbung dargestellt (400-fache Vergrößerung). Ein Größenmaßstab von 500µm ist in den Bildern A bis D jeweils unten rechts angegeben. (A) p16^{INK4A}-negativ. (B) schwach p16^{INK4A}-positiv. (C) mäßig p16^{INK4A}-positiv. (D) stark p16^{INK4A}-positiv.

4.4 Korrelation zwischen HPV-Status und p16^{INK4A}-Proteinexpression

In Tabelle 4.1 wird das p16^{INK4A}-Expressionmuster in Abhängigkeit zum HPV-DNA-Status dargestellt. Es ergibt sich auf immunhistochemischer Ebene ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem HPV-DNA-Status und der p16^{INK4A}-Proteinexpression ($p \leq 0,001$).

Tabelle 4.1 p16^{INK4A}-Expressionsmuster in Abhängigkeit vom HPV-DNA-Status

	p16 ^{INK4A} -	p16 ^{INK4A} +	p16 ^{INK4A} ++	p16 ^{INK4A} +++	Total
HPV-DNA-positiv	2	1	3	47	53
HPV-DNA-negativ	22	18	22	11	73
Total	24	19	25	58	126

In Tabelle 4.2 wird das p16^{INK4A}-Expressionmuster in Abhängigkeit zum HPV-mRNA-Status dargestellt. Der HPV-mRNA-Status weist ebenfalls einen signifikanten Zusammenhang mit der p16^{INK4A}-Proteinexpression auf ($p \leq 0,001$).

Tabelle 4.2 p16^{INK4A}-Expressionsmuster in Abhängigkeit vom HPV-mRNA-Status

	p16 ^{INK4A} -	p16 ^{INK4A} +	p16 ^{INK4A} ++	p16 ^{INK4A} +++	Total
HPV-mRNA-positiv	2	1	3	42	48
HPV-mRNA-negativ	0	3	1	1	5
Total	2	4	4	43	53

4.5 Immunhistochemischer SLPI-Nachweis

Die immunhistochemische SLPI-Färbung wird für alle 126 Gewebeproben durchgeführt. Die Bewertung der Färbungen wird anhand der in Kapitel 3.2.9 beschriebenen Kriterien durchgeführt. Von den 126 Gewebeschnitten sind 9 (7,1%) SLPI-negativ, 32 (25,4%) schwach SLPI-positiv, 55 (43,7%) mäßig SLPI-positiv und 30 (23,8%) stark SLPI-positiv. In Abbildung 4.4 sind repräsentative, lichtmikroskopische Bilder des immunhistochemischen SLPI-Nachweises dargestellt.

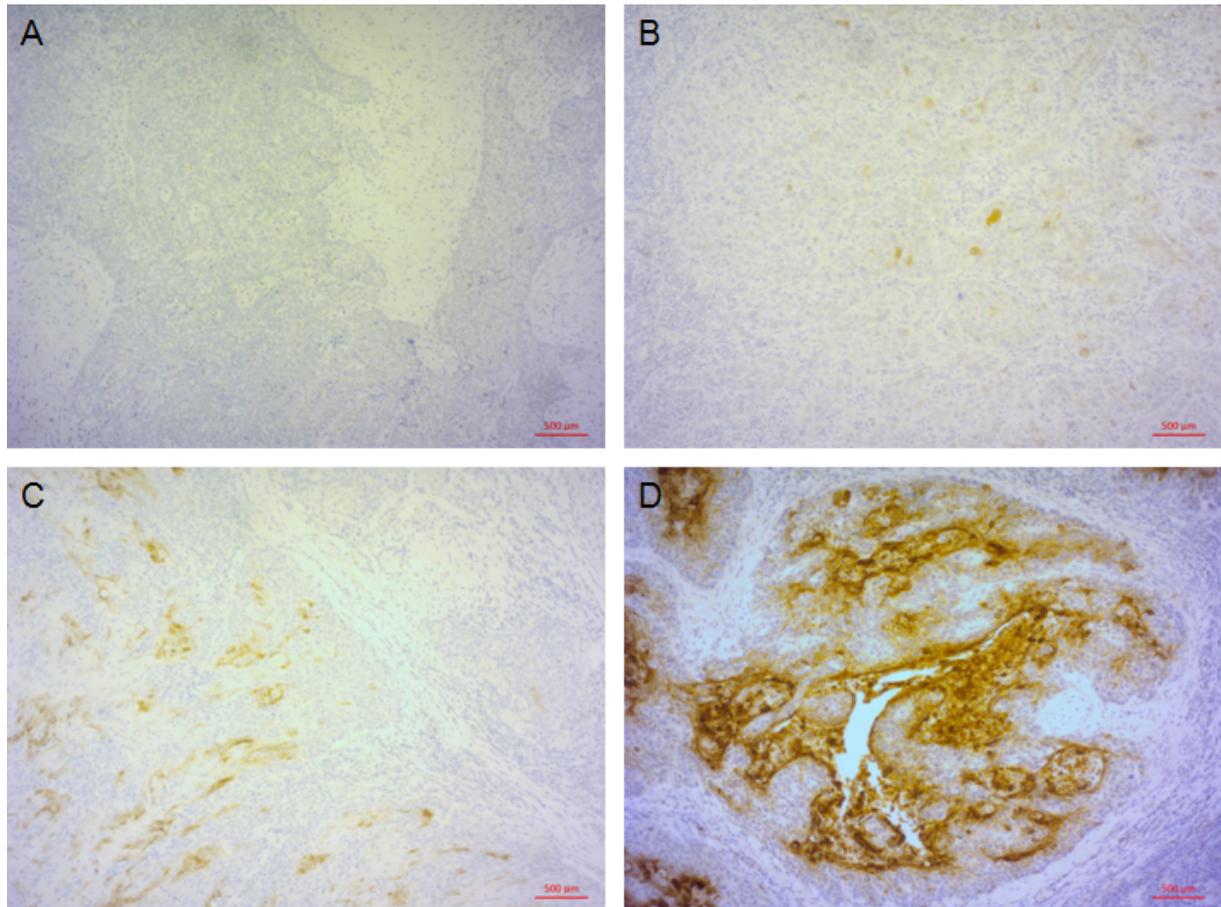


Abbildung 4.4 Ergebnisse des immunhistochemischen SLPI-Nachweises. Es sind repräsentative, lichtmikroskopische Bilder der immunhistochemischen SLPI-Färbung dargestellt (400-fache Vergrößerung). Ein Größenmaßstab von 500µm ist in den Bildern A bis D jeweils unten rechts angegeben. (A) SLPI-negativ. (B) schwach SLPI-positiv. (C) mäßig SLPI-positiv. (D) stark SLPI-positiv.

4.6 Korrelation zwischen HPV-Status und SLPI-Proteinexpression

Die Korrelation der Ergebnisse der SLPI-Immunhistochemie mit dem HPV-Status wird in Tabelle 4.3 dargestellt. Es ergibt sich auf immunhistochemischer Ebene keine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem HPV-Status und der SLPI-Proteinexpression ($p=0,375$).

Tabelle 4.3 SLPI-Expressionsmuster in Abhängigkeit vom HPV-Status

	SLPI -	SLPI +	SLPI ++	SLPI +++	Total
HPV-positiv	6	12	21	14	53
HPV-negativ	3	20	34	16	73
Total	9	32	55	30	126

4.7 Korrelation zwischen dem Rauchverhalten und der SLPI-Proteinexpression

Die Ergebnisse der SLPI-Immunhistochemie werden mit dem Rauchverhalten der Patienten korreliert. In Tabelle 4.4 ist das SLPI-Expressionsmuster in Abhängigkeit vom Rauchverhalten dargestellt. Der p-Wert beträgt $p=0,301$. Damit besteht auf immunhistochemischer Ebene kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Rauchverhalten und der SLPI-Expression. Die Zusammenfassung der SLPI-negativen und schwach positiven Tonsillenkarzinome und die der mäßig- und stark-positiven zu jeweils einer Gruppe zur Erhöhung der Fallzahlen ergibt ebenfalls kein signifikantes Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 4.4 SLPI-Expressionsmuster in Abhängigkeit vom Rauchverhalten

	SLPI -	SLPI +	SLPI ++	SLPI +++	Total
Raucher	6	24	38	26	94
Nichtraucher	3	7	16	4	30
Total	9	31	54	30	124

Zusätzlich zur Immunhistochemie wird die SLPI-Expression auch auf mRNA-Ebene untersucht (vgl. Kapitel 4.9 und 4.10).

4.8 Korrelation zwischen Rauchverhalten und HPV-Status

In Tabelle 4.5 ist der HPV-Status in Abhängigkeit zum Rauchverhalten dargestellt. Der p-Wert beträgt $p=0,001$. Damit ist der Zusammenhang zwischen dem HPV-Status und dem Rauchverhalten als signifikant zu bewerten.

Tabelle 4.5 HPV-Status in Abhängigkeit vom Rauchverhalten

	HPV-positiv	HPV-negativ	Total
Raucher	28	66	94
Nichtraucher	24	6	30
Total	52	72	124

4.9 Einfluss des HPV-Status und des Rauchverhaltens auf die mRNA-Expression von SLPI und Annexin A2

In der Gruppe der Raucher beträgt der Mittelwert der ΔCt -Werte für die SLPI-mRNA $5,16 \pm 1,99$ und bei den Nichtrauchern $7,87 \pm 1,49$. Der Mittelwert der ΔCt -Werte für die Annexin-A2-mRNA in der Rauchergruppe beträgt $5,08 \pm 2,05$ und in der Nichtrauchergruppe $5,56 \pm 2,25$. Die Raucher haben somit im Vergleich zu den Nichtrauchern ohne Berücksichtigung des HPV-Status eine $6,54 \pm 2,13$ -fach höhere SLPI- und eine $1,39 \pm 0,86$ -fach höhere Annexin-A2-Genexpression.

In Abbildung 4.5 wird die SLPI- und Annexin-A2-Genexpression in Abhängigkeit vom Rauchverhalten dargestellt. Das Raucher- und Nichtraucherkollektiv wird nach HPV-Status getrennt betrachtet. Die HPV-negativen Raucher haben eine $7,73 \pm 3,21$ -fach höhere SLPI- und eine $10,93 \pm 4,78$ -fach höhere Annexin-A2-Genexpression als die HPV-negativen Nichtraucher. Die HPV-positiven Raucher haben eine $7,21 \pm 4,09$ -fach höhere SLPI- und eine $2,87 \pm 0,6$ -fach höhere Annexin-A2-Genexpression. Die Gruppe der Raucher hat unabhängig vom HPV-Status eine höhere SLPI-Genexpression als die der Nichtraucher. Die Gruppe der Raucher hat eine höhere Annexin-A2-Genexpression als die der Nichtraucher. Dies ist im HPV-negativen Kollektiv deutlich stärker ausgeprägt. Das Signifikanzniveau liegt bei einem Fold-Change-Wert von 2 (Pfaffl, 2001). Die dargestellten Zusammenhänge sind damit als signifikant zu bewerten.

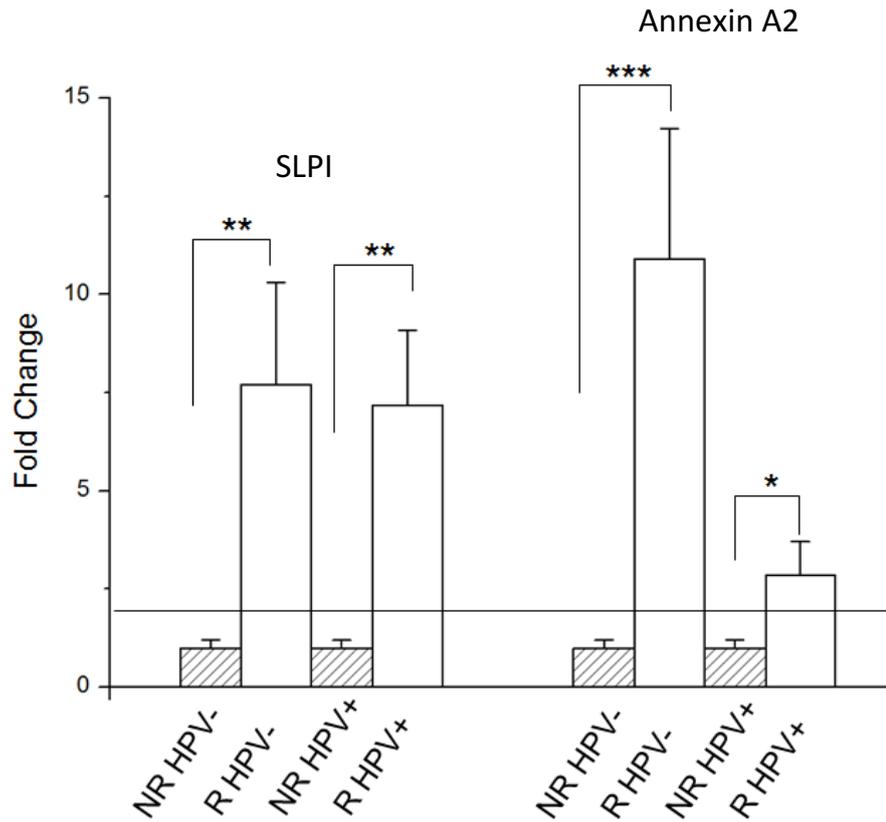


Abbildung 4.5 SLPI- und Annexin-A2-Genexpression in Abhängigkeit vom Rauchverhalten.

Links wird die SLPI-Genexpression und rechts wird die Annexin-A2-Genexpression dargestellt. Auf der Abszisse sind die Gruppen der Nichtraucher (NR) und der Raucher (R) nach HPV-Status aufgeteilt dargestellt. Auf der Ordinate ist der Fold-Change-Wert aufgetragen. Ein Fold-Change-Wert von 2 oder mehr wird als signifikant angesehen (Pfaffl, 2001). Die waagrechte Linie stellt das Signifikanzniveau dar. Die Sternchen kennzeichnen signifikante Zusammenhänge zwischen den verglichenen Gruppen: *entspricht mindestens 2-fach größer, **entspricht mindestens 5-fach größer und ***entspricht mindestens 10-fach größer. Die SLPI- und Annexin-A2-Genexpression werden durch das Rauchen hochreguliert.

In der Gruppe der HPV-positiven Patienten beträgt der Mittelwert der ΔCt -Werte für die SLPI-mRNA $5,97 \pm 2,47$ und bei den HPV-negativen Patienten $5,30 \pm 1,94$. Der Mittelwert der ΔCt -Werte für die Annexin-A2-mRNA beträgt bei den HPV-positiven Patienten $3,78 \pm 1,17$ und bei den HPV-negativen Patienten $5,99 \pm 2,02$. Die HPV-positiven Patienten haben somit im Vergleich zu den HPV-negativen Patienten ohne Berücksichtigung des Rauchverhaltens eine $1,59 \pm 0,2$ -fach niedrigere SLPI- und eine $2,21 \pm 0,29$ -fach höhere Annexin-A2-Genexpression. Der Zusammenhang zwischen dem HPV-Status und der SLPI-Genexpression ist nicht signifikant. Der beobachtete Rückgang der SLPI-Genexpression bei den HPV-positiven Patienten im Vergleich zu den HPV-negativen Patienten geht beim Aufteilen der HPV-positiven Gruppe in Raucher und Nichtraucher verloren. Dies wird in Abbildung 4.6

dargestellt. In Abbildung 4.6 wird die SLPI- und Annexin-A2-Genexpression in Abhängigkeit vom HPV-Status dargestellt. Die Raucher werden getrennt von den Nichtrauchern betrachtet. Bei der Annexin-A2-Genexpression ist ein signifikanter Zusammenhang mit dem HPV-Status zu beobachten. HPV-positive Patienten haben eine höhere Annexin-A2-Genexpression als HPV-negative Patienten. Bei den Nichtrauchern ist dieser Unterschied deutlicher als bei den Rauchern. HPV-positive Nichtraucher haben eine $27,47 \pm 6,29$ -fach höhere und HPV-positive Raucher eine $7,21 \pm 2,36$ -fach höhere Annexin-A2-Genexpression.

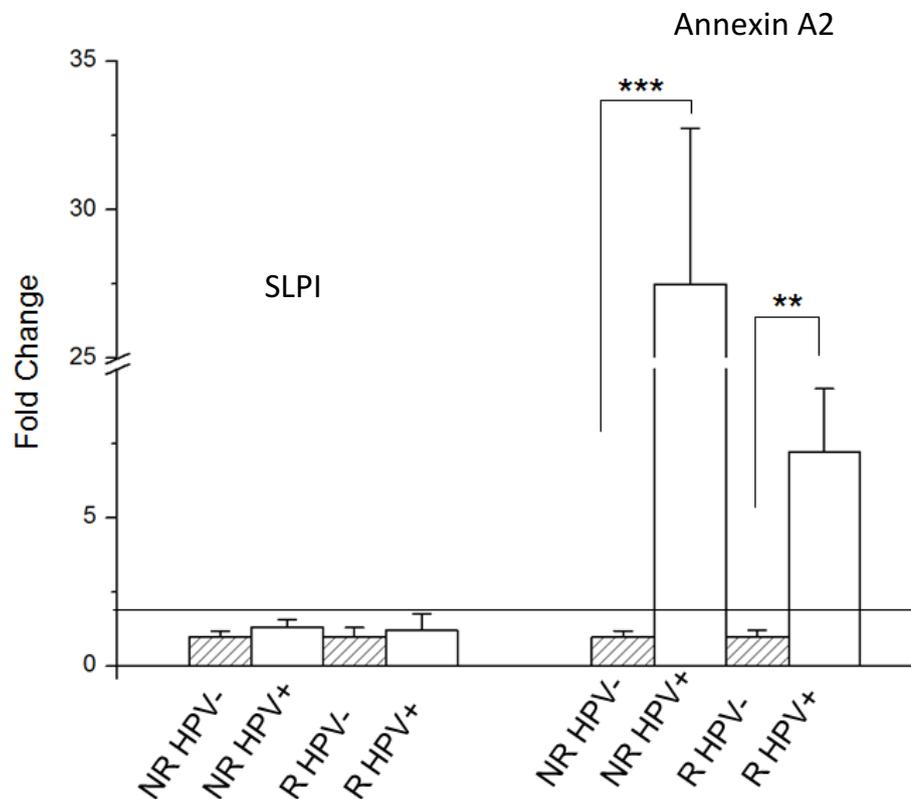


Abbildung 4.6 SLPI- und Annexin-A2-Expression in Abhängigkeit vom HPV-Status. Links wird die SLPI-Genexpression und rechts wird die Annexin-A2-Genexpression dargestellt. Auf der Abszisse sind die Gruppen der Raucher (R) und Nichtraucher (NR) nach HPV-Status aufgeteilt dargestellt. Auf der Ordinate ist der Fold-Change-Wert aufgetragen. Ein Fold-Change-Wert von 2 oder mehr wird als signifikant angesehen (Pfaffl, 2001). Die waagrechte Linie stellt das Signifikanzniveau dar. Die Sternchen kennzeichnen signifikante Zusammenhänge zwischen den verglichenen Gruppen: *entspricht mindestens 2-fach größer, **entspricht mindestens 5-fach größer und ***entspricht mindestens 10-fach größer. Die Annexin-A2-Genexpression ist bei HPV-positiven Patienten signifikant gesteigert. Die SLPI-Genexpression zeigt bei HPV-positiven Patienten ein geringfügig niedrigeres Niveau.

4.10 Vergleich der Annexin-A2- und der SLPI-Genexpression

Die Annexin-A2-Genexpression wird mit der SLPI-Genexpression verglichen. Die Werte der SLPI-Genexpression werden als „1“ gesetzt. Die Fold-Change-Werte werden nach Pfaffl berechnet. Ein Fold-Change-Wert von mindestens ± 2 wird als signifikant angesehen (Pfaffl, 2001). Die Annexin-A2-Genexpression wird zwischen den Rauchern und Nichtrauchern, zwischen den HPV-positiven und HPV-negativen Tonsillenkarcinomen und zwischen den Tonsillenkarcinomen mit negativer und positiver p16^{INK4A}-Immunhistochemie verglichen.

Die Tonsillenkarcinome der Nichtraucher weisen im Vergleich zur SLPI-Genexpression eine $4,42 \pm 0,9$ -fach höhere Annexin-A2-Genexpression auf. Die Untersuchung in der Gruppe der Raucher ergibt keinen signifikanten Unterschied zwischen der Annexin-A2- und der SLPI-Genexpression (Fold-Change $1,07 \pm 0,09$). Die HPV-positiven Tonsillenkarcinome weisen im Vergleich zur SLPI-Genexpression mit einem Fold-Change-Wert von $5,44 \pm 0,61$ eine signifikant höhere Annexin-A2-Genexpression auf. Die HPV-negativen Tonsillenkarcinome zeigen mit einer $1,66 \pm 0,25$ -fach geringeren Annexin-A2-Genexpression keinen signifikanten Unterschied. Die Untersuchung der p16^{INK4A}-Immunhistochemie ergibt damit vergleichbare Ergebnisse. Die Tonsillenkarcinome mit positivem p16^{INK4A}-Nachweis haben im Vergleich zur SLPI-Genexpression eine $3,75 \pm 0,7$ -fach höhere Annexin-A2-Genexpression. Die Tonsillenkarcinome mit negativer p16^{INK4A}-Immunhistochemie weisen mit $1,49 \pm 0,3$ -fach geringerer Annexin-A2-Genexpression keine signifikanten Unterschiede auf. In Abbildung 4.7 ist der Vergleich zwischen Annexin-A2- und SLPI-Genexpression dargestellt.

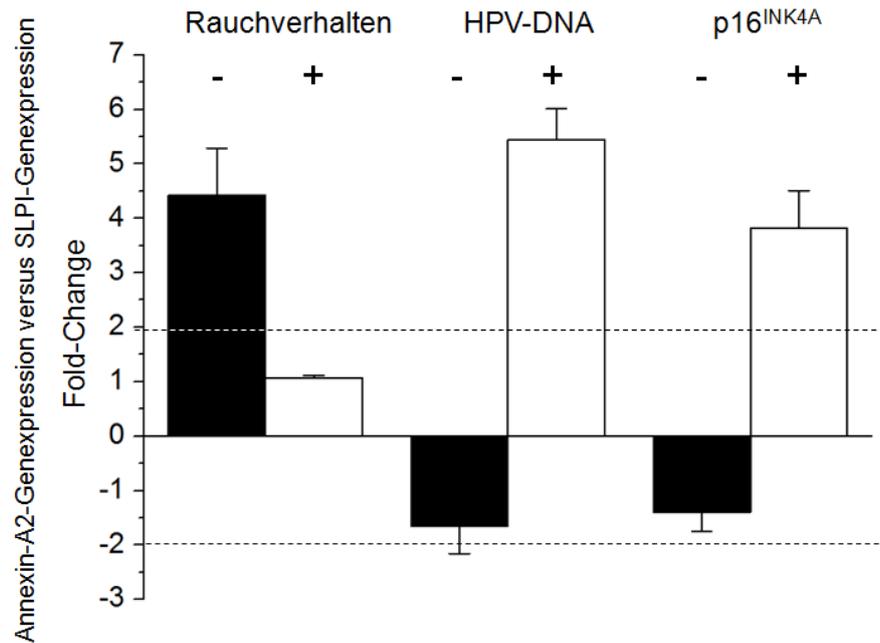


Abbildung 4.7 Vergleich zwischen Annexin-A2-Genexpression und SLPI-Genexpression. Die Fold-Change-Werte werden nach Pfaffl berechnet. Das Signifikanzniveau ist als gestrichelte Linie dargestellt und liegt bei einem Fold-Change-Wert von ± 2 (Pfaffl, 2001). Die Annexin-A2-Genexpression wird mit der SLPI-Genexpression verglichen. Die Werte der SLPI-Expression werden als „1“ gesetzt. Die Gruppe der Nichtraucher weist eine 4,42-fach höhere Annexin-A2-Genexpression auf. Die Gruppe der Raucher hat eine vergleichbare Annexin-A2- und SLPI-Genexpression (Fold Change 1,07). Die HPV-positiven Tonsillenkarzinome weisen eine 5,44-fach höhere Annexin-A2-Genexpression auf. Die HPV-negativen Tonsillenkarzinome weisen keine signifikanten Unterschiede zwischen Annexin-A2- und SLPI-Genexpression auf (Fold Change -1,66). Die Tonsillenkarzinome mit positivem p16^{INK4A}-Nachweis weisen eine 3,75-fach höhere Annexin-A2-Genexpression auf. Die p16^{INK4A}-negativen Tonsillenkarzinome zeigen keine signifikanten Unterschiede (Fold Change -1,49).

4.11 Überlebensdaten

Im folgenden Abschnitt wird das Patientenkollektiv anhand unterschiedlicher Merkmale in Gruppen eingeteilt und hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens beurteilt. Am Ende des Beobachtungszeitraums (10 Jahre) sind von den 126 Patienten 83 (65,9%) am Leben und 43 (34,1%) verstorben. Von den verstorbenen Patienten sind 24 Patienten (55,8%) tumorbedingt verstorben.

Überlebensdaten für Patienten mit HPV-positiven und HPV-negativen Tonsillenkarzinomen.

Abbildung 4.8 zeigt die Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben (A) und für das progressionsfreie Überleben (B) der Patienten mit HPV-DNA-positiven und mit HPV-DNA-negativen Karzinomen. Die Patienten mit einem HPV-DNA-positiven Tonsillenkarzinom zeigen einen Überlebensvorteil gegenüber den Patienten mit einem HPV-DNA-negativen Karzinom. Der Überlebensvorteil ist signifikant ($p=0,025$). Die Patienten mit HPV-DNA-positiven Tonsillenkarzinomen weisen auch ein längeres progressionsfreies Überleben auf. Der Vorteil gegenüber HPV-DNA-negativen Karzinomen ist signifikant ($p=0,015$). Die Analyse der Überlebenszeiten hinsichtlich des HPV-mRNA-Status wird aufgrund der geringen Anzahl HPV-mRNA-negativer Patienten ($n=5$) nicht durchgeführt.

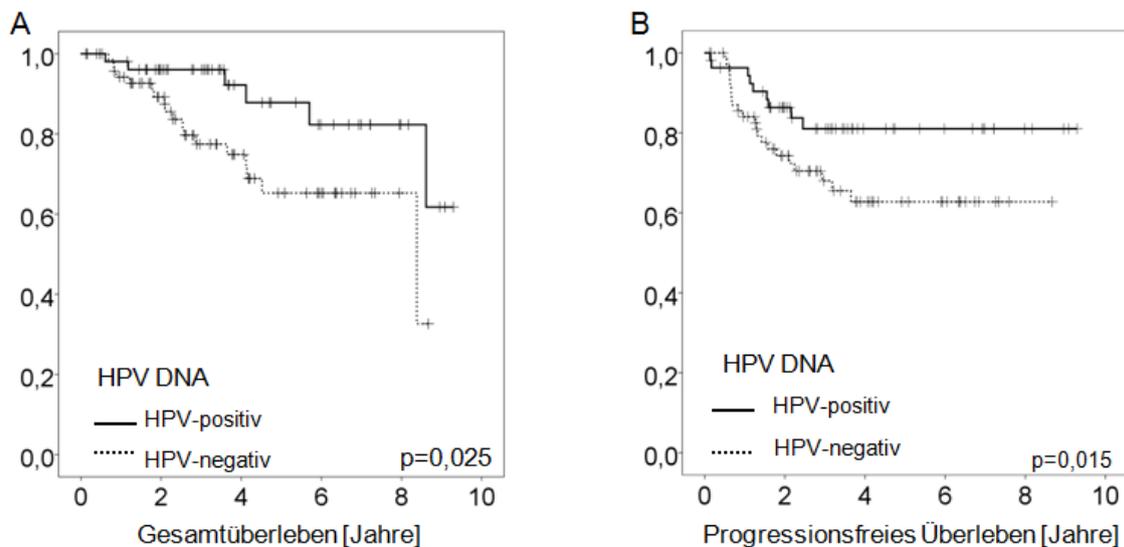


Abbildung 4.8 Gesamtüberlebensrate (A) und progressionsfreies Überleben (B) für Patienten mit HPV-positiven und HPV-negativen Tonsillenkarzinomen (Kaplan-Meier-Kurve). (A) Auf der Abszisse ist die Zeit in Jahren und auf der Ordinate das Gesamtüberleben dargestellt. Der Logrank-Test ergibt einen p-Wert von $p=0,025$. HPV-DNA-positive Patienten haben eine bessere Überlebensrate als Patienten mit HPV-DNA-negativen Tonsillenkarzinomen. Der Überlebensvorteil ist signifikant. (B) Auf der Abszisse ist die Zeit in Jahren und auf der Ordinate das progressionsfreie Überleben dargestellt. Der Logrank-Test ergibt einen p-Wert von $p=0,015$. HPV-DNA-positive Patienten haben ein längeres progressionsfreies Überleben als Patienten mit HPV-DNA-negativen Tonsillenkarzinomen. Die Beobachtung ist signifikant.

Überlebensdaten für Patienten mit $p16^{\text{INK4A}}$ -positiven und $p16^{\text{INK4A}}$ -negativen Tonsillenkarcinomen.

Abbildung 4.9 zeigt die Kaplan-Meier-Kurven für die Patienten mit einem $p16^{\text{INK4A}}$ -positiven und mit einem $p16^{\text{INK4A}}$ -negativen Tonsillenkarcinom. Die in der Immunhistochemie stark $p16^{\text{INK4A}}$ -positiven Tonsillenkarcinome zählen hier als $p16^{\text{INK4A}}$ -positiv. Die Tonsillenkarcinome mit einem schwach- bzw. mäßig positiven Ergebnis werden zu den $p16^{\text{INK4A}}$ -negativen Tonsillenkarcinomen gezählt. Diese Einteilung wird wegen des in der Literatur beschriebenen Zusammenhangs zwischen einem stark positiven $p16^{\text{INK4A}}$ -Befund und dem Vorliegen eines HPV-high-risk-Typs vorgenommen (Klaes et al., 2001). Patienten mit $p16^{\text{INK4A}}$ -positiven Tonsillenkarcinomen weisen eine bessere Prognose auf als diejenigen mit einem $p16^{\text{INK4A}}$ -negativen Tonsillenkarcinom. Der p-Wert des Logrank-Tests beträgt 0,182. Die beobachtete Tendenz ist damit nicht signifikant.

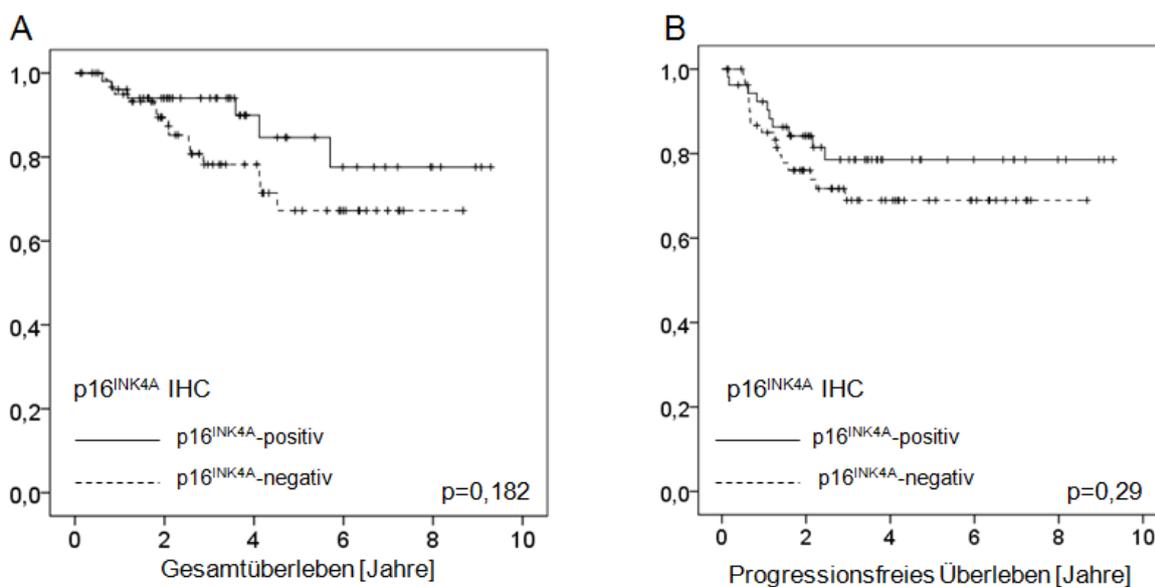


Abbildung 4.9 Gesamtüberlebensrate (A) und progressionsfreies Überleben (B) für Patienten mit $p16^{\text{INK4A}}$ -positiven und $p16^{\text{INK4A}}$ -negativen Tonsillenkarcinomen (Kaplan-Meier-Kurve). (A) Auf der Abszisse ist die Zeit in Jahren und auf der Ordinate das Gesamtüberleben dargestellt. Der Logrank-Test ergibt einen p-Wert von $p=0,182$. Damit haben $p16^{\text{INK4A}}$ -positive Patienten eine bessere Überlebensrate als Patienten mit $p16^{\text{INK4A}}$ -negativen Tonsillenkarcinomen. Die beobachtete Tendenz ist nicht signifikant. (B) Auf der Abszisse ist die Zeit in Jahren und auf der Ordinate das progressionsfreie Überleben dargestellt. Der Logrank-Test ergibt einen p-Wert von $p=0,29$. Damit haben $p16^{\text{INK4A}}$ -positive Patienten ein längeres progressionsfreies Überleben als Patienten mit $p16^{\text{INK4A}}$ -negativen Tonsillenkarcinomen. Die beobachtete Tendenz ist nicht signifikant.

Überlebensdaten für Patienten mit $p16^{\text{INK4A}}$ -positiven und $p16^{\text{INK4A}}$ -negativen Tonsillenkarcinomen in Kombination mit dem HPV-Status.

Abbildung 4.10 zeigt die Kaplan-Meier-Kurven für Patienten mit HPV-positiven und HPV-negativen Tonsillenkarcinomen in Kombination mit dem $p16^{\text{INK4A}}$ -Status. Es sind drei unterschiedliche Gruppen dargestellt: Patienten mit HPV- und $p16^{\text{INK4A}}$ -negativen, Patienten mit HPV- und $p16^{\text{INK4A}}$ -positiven und Patienten mit HPV-negativen und $p16^{\text{INK4A}}$ -positiven Tonsillenkarcinomen. HPV-positive und $p16^{\text{INK4A}}$ -negative Tonsillenkarcinome sind aufgrund einer zu geringen Anzahl an Patienten mit dieser Kombination nicht dargestellt. Die Patienten mit HPV-positiven und $p16^{\text{INK4A}}$ -positiven Karzinomen weisen über den gesamten Zeitraum betrachtet die beste Prognose auf. Eine genaue Aussage über die Prognose von Patienten mit HPV-negativen und $p16^{\text{INK4A}}$ -positiven Karzinomen kann nicht getroffen werden. Der Beobachtungszeitraum für diese Gruppe endet bereits nach vier Jahren. Zu diesem Zeitpunkt entspricht die Überlebensrate derjenigen der HPV- und $p16^{\text{INK4A}}$ -positiven Patienten.

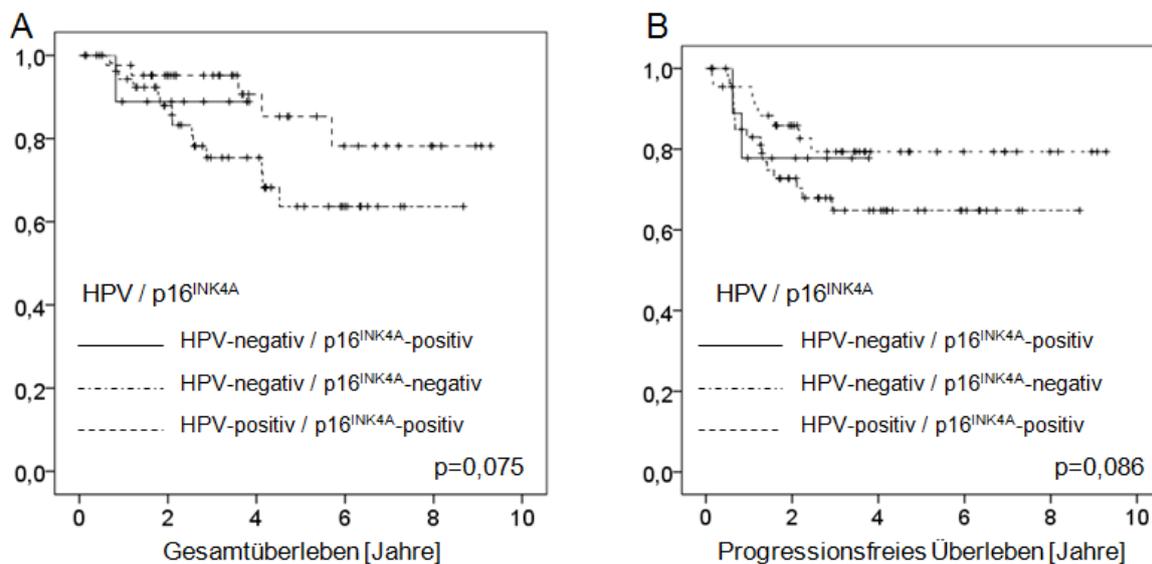


Abbildung 4.10 Gesamtüberlebensrate (A) und progressionsfreies Überleben (B) für Patienten mit $p16^{\text{INK4A}}$ -positiven und $p16^{\text{INK4A}}$ -negativen Tonsillenkarcinomen in Kombination mit dem HPV-Status (Kaplan-Meier-Kurve). (A) Auf der Abszisse ist die Zeit in Jahren und auf der Ordinate das Gesamtüberleben dargestellt. Der Logrank-Test ergibt einen p-Wert von $p=0,075$. Die Patienten mit HPV- und $p16^{\text{INK4A}}$ -positiven Patienten weisen die beste Prognose auf. Die Beobachtung ist nicht signifikant. (B) Auf der Abszisse ist die Zeit in Jahren und auf der Ordinate das progressionsfreie Überleben dargestellt. Der Logrank-Test ergibt einen p-Wert von $p=0,086$. Patienten mit HPV- und $p16^{\text{INK4A}}$ -positiven Tumoren haben das längste progressionsfreie Überleben. Die Beobachtung ist nicht signifikant.

Überlebensdaten für Raucher und Nichtraucher in Abhängigkeit zum HPV-Status.

Abbildung 4.11 zeigt die Kaplan-Meier-Kurven für Raucher und Nichtraucher in Abhängigkeit zum HPV-Status. Dabei werden in Anlehnung an Ang und Sturgis drei Risikogruppen gebildet: Gruppe 1 umfasst die HPV-positiven Nichtraucher, Gruppe 2 die HPV-negativen Nichtraucher und HPV-positiven Raucher und Gruppe 3 die HPV-negativen Raucher (Ang und Sturgis, 2012). HPV-positive Nichtraucher haben im vorliegenden Kollektiv die beste Prognose und das geringste Sterberisiko. HPV-negative Nichtraucher und HPV-positive Raucher zeigen ein mittleres Sterberisiko. Die schlechteste Prognose und damit das höchste Sterberisiko weisen die HPV-negativen Raucher auf.

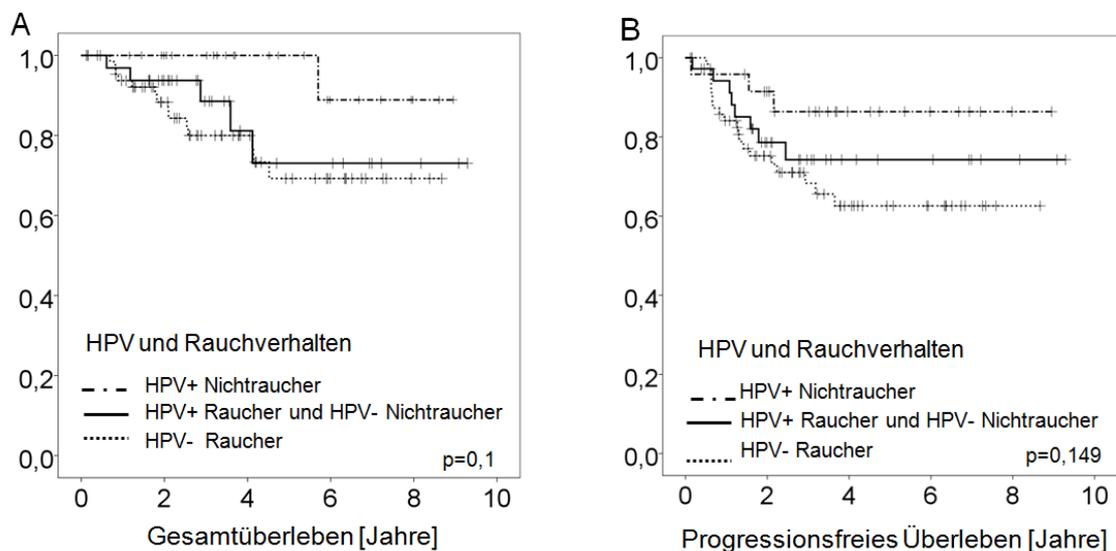


Abbildung 4.11 Gesamtüberlebensrate (A) und progressionsfreies Überleben (B) für Raucher und Nichtraucher in Abhängigkeit zum HPV-Status (Kaplan-Meier-Kurve). (A) Auf der Abszisse ist die Zeit in Jahren und auf der Ordinate das Gesamtüberleben dargestellt. Der Logrank-Test ergibt einen p-Wert von $p=0,1$. Die beste Prognose weisen HPV-positive Nichtraucher auf. Der Überlebensvorteil ist nicht signifikant. (B) Auf der Abszisse ist die Zeit in Jahren und auf der Ordinate das progressionsfreie Überleben dargestellt. Der Logrank-Test ergibt einen p-Wert von $p=0,149$. Das längste progressionsfreie Gesamtüberleben weisen HPV-positive Nichtraucher auf. Der Vorteil ist nicht signifikant.

Überlebensdaten für Patienten mit SLPI-positiven und SLPI-negativen Tonsillenkarcinomen.

Abbildung 4.12 zeigt die Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben (A) und das progressionsfreie Überleben (B) der Patienten mit positivem SLPI-Nachweis und für Patienten mit negativem SLPI-Nachweis. Die Karzinome mit negativem und schwach positivem SLPI-Nachweis sowie die Karzinome mit mäßig und stark positivem SLPI-Nachweis werden jeweils zu einer Gruppe zusammengefasst. Diese Gruppierung wird zur Erhöhung der Fallzahl pro Gruppe vorgenommen. Patienten mit einem negativen und schwach positiven SLPI-Nachweis haben einen Überlebensvorteil gegenüber den Patienten mit mäßig und stark positivem SLPI-Nachweis. Der p-Wert beträgt $p=0,029$. Der Überlebensvorteil ist signifikant. Patienten mit einem negativen SLPI-Nachweis weisen ein längeres progressionsfreies Überleben gegenüber der Vergleichsgruppe auf. Diese Beobachtung ist signifikant ($p=0,049$).

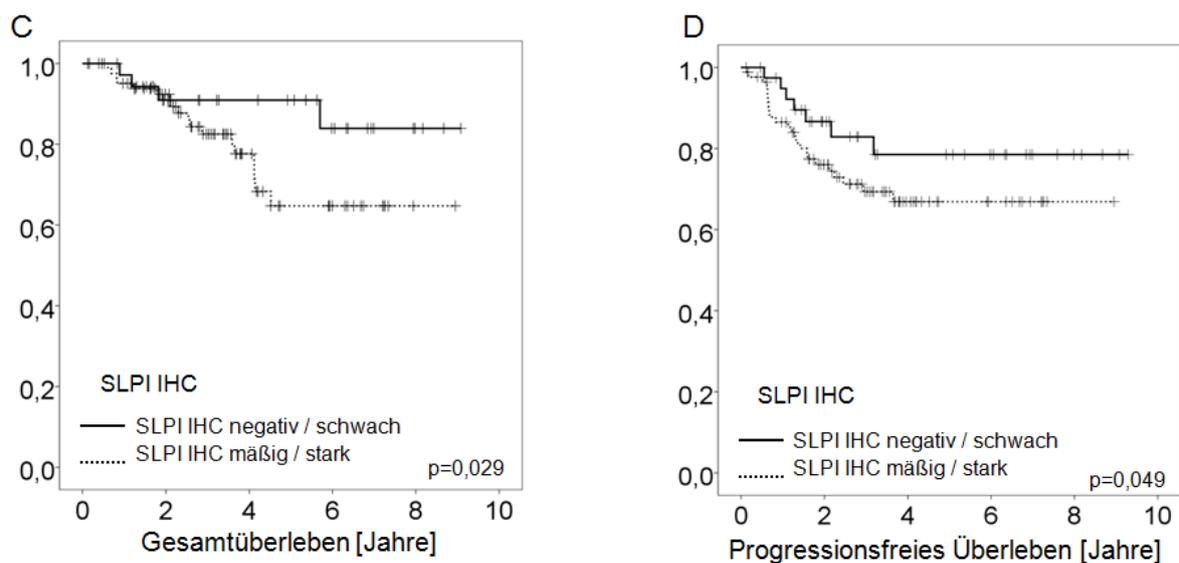


Abbildung 4.12 Gesamtüberlebensrate (A) und progressionsfreies Überleben (B) für Patienten mit SLPI-positiven und SLPI-negativen Tonsillenkarcinomen (Kaplan-Meier-Kurve). (A) Auf der Abszisse ist die Zeit in Jahren und auf der Ordinate das Gesamtüberleben dargestellt. Der Logrank-Test ergibt einen p-Wert von $p=0,029$. Die Patienten mit SLPI-negativen und schwach positiven Tonsillenkarcinomen weisen eine signifikant bessere Prognose auf als die Patienten mit mäßig und stark SLPI-positiven Tumoren. (B) Auf der Abszisse ist die Zeit in Jahren und auf der Ordinate das progressionsfreie Überleben dargestellt. Der Logrank-Test ergibt einen p-Wert von $p=0,049$. Die Patienten mit SLPI-negativen und schwach positiven Tonsillenkarcinomen weisen ein signifikant besseres progressionsfreies Überleben auf als die SLPI-positive Vergleichsgruppe.

5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit zeigt an einem Kollektiv von ausschließlich Tonsillenkarcinomen die Bedeutung der Rolle von SLPI und Annexin A2 in Bezug auf HPV-assoziierte Tonsillenkarcinome. Die eingangs aufgestellte Hypothese kann durch die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Die Korrelation zwischen Rauchverhalten und SLPI-Proteinexpression zeigt zwar keinen signifikanten Zusammenhang, dahingegen kann auf Genexpressionsebene eine signifikant gesteigerte SLPI-Genexpression bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern nachgewiesen werden. Die durch das Zigarettenrauchen gesteigerte SLPI-Expression scheint demnach einen Schutz vor einer HPV-Infektion zu bilden. Die vorliegende Arbeit zeichnet sich im Vergleich zu vorangegangenen Arbeiten mit Bezug zur bearbeiteten Thematik vor allem durch das Vorliegen eines homogenen Patientenkollektivs aus. Alle Patienten wurden in derselben Klinik behandelt und bei allen Patienten liegt ausnahmslos ein histologisch gesichertes Tonsillenkarcinom vor. Sämtliche Laborarbeiten wurden in der Universitätsklinik der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel durchgeführt. Die HPV-Diagnostik wurde im molekularpathologischen Labor des Pathologischen Instituts der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel durchgeführt. Die immunhistochemischen Analysen und die Untersuchung der Genexpression wurden im Labor der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie Christian-Albrechts-Universität zu Kiel durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Arbeit werden im Folgenden detailliert betrachtet.

5.1 HPV-Prävalenz in Kopf-Hals-Karzinomen

Die Häufigkeitsangaben zur Prävalenz von HPV-Infektionen in Kopf-Hals-Karzinomen unterliegen in der Literatur großen Schwankungen. Eine Rolle spielt dabei vor allem die anatomische Lokalisation der Kopf-Hals-Karzinome (Hoffmann et al., 2005, 2010, 2012). Es ist daher von Bedeutung im Hinblick auf die HPV-Prävalenz die genaue anatomische Lokalisation der Tumore zu differenzieren. Vorangegangene Arbeiten zeigen im Vergleich zum restlichen Kopf-Hals-Bereich insbesondere in Karzinomen der Tonsilla palatina eine erhöhte HPV-Prävalenz von über 50% bis zu 85% (Gillison und Shah, 2001; Klusmann et al., 2001, 2003; Hoffmann et al., 2005; Näsman et al., 2009; Hoffmann et al., 2010, 2012). Eine vorangegangene Arbeit von Quabius und Mitarbeitern (2015) untersucht Tonsillenkarcinome zeitgleich mit Karzinomen des Kopf-Hals-Bereichs anderer Lokalisationen aus verschiedenen deutschen Regionen. Es zeigt sich bei den Tonsillenkarcinomen eine HPV-

Prävalenz von 43,7% und bei den Karzinomen anderer Lokalisationen lediglich eine HPV-Prävalenz von 7,6% (Quabius et al., 2015). Hoffmann und Mitarbeiter (2013) kommen ebenfalls zu dem Ergebnis einer signifikant erhöhten HPV-DNA-Prävalenz von 60% in Tonsillenkarcinomen verglichen mit lediglich 16,7% bis 18% in Karzinomen anderer Lokalisationen des Kopf-Hals-Bereichs (Hoffmann et al., 2013). Die Untersuchung der Tonsillenkarcinome der hier vorliegenden Promotionsarbeit ergibt einen positiven HPV-DNA-Nachweis bei 53 der 126 Gewebeproben. Dies entspricht einem Anteil von 42,1%. Das Ergebnis steht damit in Einklang mit den Ergebnissen von Quabius und Mitarbeitern (Quabius et al., 2015). Kreimer und Mitarbeiter (2005) zeigen dahingegen in einer Metaanalyse an über 5000 Karzinomen des Kopf-Hals-Bereichs eine HPV-Prävalenz von insgesamt lediglich 25,9% für alle Tumorlokalisationen (Kreimer et al., 2005). Die höchste HPV-Prävalenz wird dabei im Oropharynx mit 35,6% beschrieben. Die HPV-Prävalenz in Tumoren der Tonsilla palatina wird bei Kreimer und Mitarbeitern (2005) nicht gesondert betrachtet. Der präzisen Differenzierung von Karzinomen der Tonsillen, die Teil der anatomischen Region Oropharynx sind, kommt besondere Bedeutung zu. Letzteres beruht auf der Tatsache, dass die besondere Empfänglichkeit für eine HPV-Infektion für das lymphoepitheliale Gewebe der Tonsillen gilt und nur in verminderter Ausprägung für die Schleimhäute des Oropharynx außerhalb der Tonsillenregion (Hoffmann et al., 2005, 2010, 2012, 2013). Die Empfänglichkeit in diesen Regionen des Oropharynx gleicht der der Mundhöhle, des Hypopharynx und des Larynx (Hoffmann et al., 1998, 2005). Quabius und Mitarbeiter (2015) untersuchen dementsprechend die HPV-Prävalenz von Tumoren des Oropharynx unter Ausschluss der Tonsillenkarcinome sowie die HPV-Prävalenz von ausschließlich Tonsillenkarcinomen. Tumoren des Oropharynx weisen unter Ausschluss von Tonsillenkarcinomen eine HPV-Prävalenz von 15% auf, wohingegen in Tonsillenkarcinomen eine HPV-Prävalenz von 43,7% vorliegt (Quabius et al., 2015). Die Ergebnisse der vorangegangenen Arbeiten und die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit unterstreichen in Bezug auf die HPV-Prävalenz die Bedeutung der Differenzierung der genauen anatomischen Lokalisation von Kopf-Hals-Karcinomen und die besondere HPV-Assoziation mit Karcinomen der Tonsillen.

Der HPV *high-risk*-Typ 16 kann in 48 der 53 HPV-DNA-positiven Gewebeproben nachgewiesen werden (90,6%). Die HPV *high-risk*-Typen 18, 26, 33 und 35 können in jeweils einer Gewebeprobe nachgewiesen werden. Ein Karcinom weist den HPV *low-risk*-Typ 6 auf. HPV16 ist der am weitesten verbreitete *high-risk*-Typ in Kopf-Hals-Karcinomen (Smith et al., 2004; Kreimer et al., 2005). Das Ergebnis der hier vorliegenden DNA-Sequenzierung wird durch die vorangegangenen Arbeiten bestätigt.

Die viralen Onkogene E6 und E7 leisten einen entscheidenden Beitrag zur HPV-abhängigen Karzinogenese (zur Hausen und De Villiers, 1994). Das Onkogen E6 führt zur Inaktivierung des Tumorsuppressorgens p53 (Scheffner et al., 1993). Das Onkogen E7 führt zur Inaktivierung des Tumorsuppressorgens pRb (Dyson et al., 1989). Diese Inaktivierungen führen synergistisch zu einem Verlust der Zellzykluskontrolle (Hawley-Nelson et al., 1989). Die E6*I-mRNA kodiert für das Onkogen E7 (Tang et al., 2006). Ein positiver E6*I-mRNA-Nachweis ist Ausdruck einer transkriptional aktiven HPV-Infektion. Es wird bei insgesamt 48 der 53 HPV-DNA-positiven Gewebeproben (90,6%) ein positiver E6*I-mRNA-Nachweis erbracht. Diese Karzinome weisen damit eine transkriptional aktive HPV-Infektion auf. Der HPV *high-risk*-Typ 16 liegt bei 46 der E6*I-mRNA-positiven Gewebeproben vor (95,8%). Die Gewebeproben mit dem HPV *high-risk*-Typ 33 und dem HPV *low-risk*-Typ 6 weisen mit einem positiven E6*I-mRNA-Nachweis ebenfalls eine aktive HPV-Infektion auf.

5.2 Altersverteilung der Patienten in Bezug auf den HPV-Status

Es liegen hinsichtlich einer möglichen Altersabhängigkeit des HPV-Status in der Literatur widersprüchliche Angaben vor. US-amerikanische Studien kommen regelmäßig zu dem Ergebnis, dass HPV-positive Patienten signifikant jünger sind als HPV-negative Patienten (Gillison, 2004; Smith et al., 2004; Cole et al., 2012). Europäische Studien erkennen oftmals keine signifikanten Altersunterschiede zwischen HPV-positiven und HPV-negativen Patienten (Näsman et al., 2009; Quabius et al., 2015; Tinhofer et al., 2015). Es zeigt sich in dieser Arbeit dahingegen ein signifikanter inverser Zusammenhang zwischen dem Alter der Patienten und dem HPV-Status. HPV-negative Patienten sind hier signifikant jünger als HPV-positive Patienten ($p=0,0002$). Das mediane Alter der HPV-negativen Patienten liegt bei 56,9 Jahren und das mediane Alter der HPV-positiven Patienten bei 63 Jahren. Das Ergebnis steht damit in direktem Gegensatz zu US-amerikanischen Studien jedoch in Einklang mit einer vorangegangenen Arbeit von Hoffmann und Mitarbeitern (2013). Hoffmann und Mitarbeiter (2013) zeigen an einem ebenfalls norddeutschen Kollektiv von 54 Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen unterschiedlicher Lokalisationen eine nahezu deckungsgleiche Altersverteilung (Hoffmann et al., 2013).

Eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der Altersverteilung der Patienten in Bezug auf den HPV-Status könnte das in europäischen Ländern vergleichbar junge Einstiegsalter von Rauchern sowie die im Allgemeinen große Verbreitung des Tabakkonsums sein. Die Prävalenz des Zigarettenrauchens liegt in der Altersgruppe der 15-

bis 16-jährigen in Europa bei 29% und in Deutschland im Speziellen bei 33% (Hibell et al., 2009). Die Prävalenz des Zigarettenrauchens in US-amerikanischen High-Schools liegt bei 15,7% (Kann et al., 2014). Die Daten der jeweiligen Studie zeigen eine mehr als doppelt so hohe Prävalenz des Zigarettenrauchens unter Jugendlichen in Deutschland verglichen mit Jugendlichen in den USA. Die US-amerikanische Studie untersucht das Konsumverhalten der Schüler neben dem Zigarettenrauchen auch bezüglich weiterer Tabakarten wie Kautabak und Zigarren. Die europäische Studie liefert diesbezüglich keine Daten. Die kumulative Prävalenz des Tabakkonsums von Zigaretten, Kautabak und Zigarren in US-amerikanischen High-Schools liegt bei 22,4% und damit immer noch unter dem Niveau der Prävalenz des Zigarettenrauchens in Europa. Die Prävalenz des Zigarettenrauchens im Erwachsenenalter liegt in Deutschland bei 29,7% (Lampert et al., 2013). Die Prävalenz des Zigarettenrauchens im Erwachsenenalter in den Vereinigten Staaten von Amerika liegt bei 17,8% (Jamal et al., 2014). Das Zigarettenrauchen ist demzufolge im europäischen und deutschen Raum deutlich verbreiteter als im US-amerikanischen Raum. Raucher aus dem europäischen bzw. deutschen Raum könnten demnach häufiger und auch früher an den Folgen des Tabakkonsums wie zum Beispiel HPV-negativen Tonsillenkarcinomen erkranken. HPV-negative Tonsillenkarcinome toxischer Genese sind Folge von chronischem Nikotin- und Alkoholabusus (Hoffmann et al., 2013).

5.3 p16^{INK4A}-Proteinexpression

Das Protein p16^{INK4A} wird als Surrogatmarker für den Nachweis einer aktiven HPV-Infektion eingesetzt (Smeets et al., 2007; Hoffmann et al., 2010). Es wird ein negativer Rückkopplungsmechanismus zwischen dem Tumorsuppressorgen pRb und p16^{INK4A} beobachtet (Klaes et al., 2001). Eine Inaktivierung des pRb durch das HPV-Onkogen E7 führt bei aktiven HPV-Infektionen zu einem Anstieg der p16^{INK4A}-Expression (Klaes et al., 2001). Die Korrelation zwischen HPV-Status und p16^{INK4A}-Proteinexpression auf immun-histochemischer Ebene ergibt im vorliegenden Kollektiv einen signifikanten Zusammenhang ($p < 0,001$) zwischen diesen beiden Parametern. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit den vorangegangenen Arbeiten von Smeets und Mitarbeitern (2007) und Hoffmann und Mitarbeitern (2010). Die Verlässlichkeit von p16^{INK4A} als Surrogatmarker für aktive HPV-Infektionen wird mittlerweile allerdings kontrovers diskutiert. Patienten mit der Kombination aus aktiver HPV-Infektion und negativer p16^{INK4A}-Expression erhalten bei alleinigem Einsatz von p16^{INK4A} als Surrogatmarker eine falsch-negative HPV-Diagnose. Im vorliegenden

Kollektiv zeigen insgesamt drei der 53 HPV-DNA-positiven Patienten die Kombination aus positivem HPV-DNA-Status, positivem E6*I-mRNA-Nachweis sowie negativer p16^{INK4A}-Expression. Dies entspricht einem falsch-negativen Anteil von 5,7%. Andererseits zeigen 22 der 73 HPV-DNA-negativen Patienten (30,1%) in der hier vorliegenden Arbeit eine mäßig positive p16^{INK4A}-Expression und elf HPV-DNA-negative Patienten (15,1%) eine stark positive p16^{INK4A}-Expression. Dies entspricht einem Anteil von insgesamt 45,2% aller HPV-negativen Patienten. Der alleinige Einsatz von p16^{INK4A} als Surrogatmarker für aktive HPV-Infektionen führt in diesen Fällen zu einer falsch-positiven HPV-Diagnose. Hoffmann und Mitarbeiter (2012) zeigen an einem Kollektiv von 78 Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen unterschiedlicher Lokalisationen ein mit dieser Arbeit vergleichbares Ergebnis. Ein Anteil von 21,4% der Patienten mit positivem HPV-DNA- und positivem E6*I-mRNA-Nachweis weist eine negative p16^{INK4A}-Expression auf (Hoffmann et al., 2012). Der Einsatz von p16^{INK4A} als Surrogatmarker bei ausschließlich Tonsillenkarzinomen ergibt demgegenüber in der Arbeit von Hoffmann und Mitarbeitern (2012) in Zusammenschau mit HPV-DNA- und HPV-mRNA-Status verlässliche Werte. In Bezug auf andere Lokalisationen des Kopf-Hals-Bereichs mit geringer HPV-Prävalenz wie Mundhöhle, Larynx (Hoffmann et al., 2012) und Hypopharynx (Dalianis et al., 2015) scheint p16^{INK4A} dahingegen als Surrogatmarker ungeeignet. Der HPV-Status ist entscheidend für die Therapie sowie für die Prognose der Patienten (Hoffmann et al., 2005). Das Protein p16^{INK4A} sollte demnach nicht als alleiniger Surrogatmarker für die Diagnose einer aktiven HPV-Infektion herangezogen werden. Ein positiver HPV-DNA-Status in Kombination mit einem positiven E6*I-mRNA-Nachweis gilt als verlässlichste Methode zum Nachweis aktiver HPV-Infektionen (Hoffmann et al., 2012). Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit unterstreichen dies.

5.4 SLPI-Genexpression und SLPI-Proteinexpression in HPV-assoziierten Kopf-Hals-Karzinomen sowie deren Beziehung zu HPV-Status und Rauchverhalten

Die Rolle von SLPI in Kopf-Hals-Karzinomen und insbesondere auch bei HPV-Infektionen ist von zentralem Interesse in der hier vorliegenden Arbeit. SLPI, ein Serinproteaseninhibitor, wird von einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen produziert und kommt unter anderem in Brust, Lunge, weiblichem Genitaltrakt, Samenflüssigkeit, Speicheldrüsen und auf Schleimhäuten vor (Franken et al., 1989; Abe et al., 1991). SLPI kommt auch in lymphatischem Gewebe vor und wird von Immunzellen wie Makrophagen und neutrophilen Granulozyten synthetisiert und gilt als Bestandteil des angeborenen Immunsystems (Jin et al., 1997; Doumas et al., 2005). In der Literatur wird bereits vielfach gezeigt, dass hohe SLPI-

Konzentrationen einer Infektion mit dem human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) entgegenwirken (z.B. in McNeely et al., 1997; Ma et al., 2004; Moutsopoulos et al., 2007). Die antivirale Wirkung von SLPI wird auch in Zusammenhang mit Herpes-simplex-Infektionen (Fakioglu et al., 2008) und Epstein-Barr-Virus-Infektionen (Tse et al., 2012) beschrieben. Es wird ebenfalls eine protektive Wirkung von SLPI gegenüber HPV-Infektionen angenommen (Hoffmann et al., 2013; Quabius et al., 2014).

Aktuelle Arbeiten zeigen eine bedeutende Rolle von SLPI im Hinblick auf HPV-assoziierte Karzinome. Hoffmann und Mitarbeiter (2013) zeigen erstmals eine signifikant inverse Korrelation zwischen der SLPI-Expression und dem HPV-Status in Kopf-Hals-Karzinomen. HPV-positive Patienten weisen eine geringere SLPI-Expression auf und ein hohes SLPI-Genexpressionslevel geht mit einer geringeren HPV-Prävalenz einher (Hoffmann et al., 2013). Rauchen führt sowohl bei Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen als auch bei Patienten mit gesunder Schleimhaut zu einem Anstieg der SLPI-Genexpression. Auch die Nikotinkubation von Zellen *ex vivo* führt zu einem Anstieg der SLPI-Genexpression (Quabius et al., 2014). Quabius und Mitarbeiter beobachten im Rahmen ihrer Arbeit des Weiteren bei HPV-positiven Tumoren eine geringere SLPI-Expression im Vergleich zu HPV-negativen Tumoren. Diese Ergebnisse stützen die Annahme, dass erhöhte SLPI-Konzentrationen einer HPV-Infektion entgegenwirken (Quabius et al., 2014).

Die hier vorliegende Untersuchung ergibt unabhängig vom HPV-Status eine signifikant erhöhte SLPI-Genexpression bei Rauchern (Fold Change $6,54 \pm 2,13$). Dieses Ergebnis steht somit in Einklang mit den vorangegangenen Untersuchungen von Hoffmann und Mitarbeitern (2013) und Quabius und Mitarbeitern (2014, 2015) und bestätigt einen Zusammenhang zwischen der SLPI-Genexpression und dem Rauchverhalten. Das Ergebnis der signifikant erhöhten SLPI-Genexpression bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern ist als ein zentrales Ergebnis der hier vorliegenden Arbeit zu werten. Diese Beobachtung wird auf Proteinebene wider Erwarten nicht bestätigt. Die Korrelation der SLPI-Proteinexpression mit dem Rauchverhalten ergibt in der hier vorliegenden Arbeit keinen signifikanten Zusammenhang ($p=0,301$). Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der Arbeiten von Quabius und Mitarbeitern (2014, 2015). Quabius und Mitarbeiter (2014) zeigen eine signifikante Korrelation zwischen SLPI-Proteinexpression und Rauchverhalten sowohl in Tumorgewebe ($p=0,046$) als auch in klinisch gesunder Schleimhaut ($p=0,014$). Die Anfang dieses Jahres veröffentlichte aktuelle Arbeit von Quabius und Mitarbeitern (2015) untersucht an einem Kollektiv von Kopf-Hals-Karzinomen unterschiedlicher Lokalisation die Rolle von

SLPI in Bezug auf die Prävention von HPV-Infektionen in Kopf-Hals-Karzinomen. Die Untersuchung ergibt dabei sowohl auf Ebene der SLPI-Genexpression als auch auf Ebene der SLPI-Proteinexpression signifikante Zusammenhänge zwischen HPV-Status und Rauchverhalten (Quabius et al., 2015). Die Gründe für die Diskrepanz zwischen Genexpression und Proteinexpression in der hier vorliegenden Arbeit sind unklar. Die Genexpression im Allgemeinen muss jedoch nicht mit dem Niveau der Proteinexpression übereinstimmen und kann nicht als Surrogatmarker für die Proteinexpression eingesetzt werden (Noorlag et al., 2014).

Der Zusammenhang zwischen SLPI-Genexpression und HPV-Status ist in dieser Arbeit nicht signifikant. HPV-positive Patienten haben im Vergleich zu HPV-negativen Patienten eine lediglich $1,59 \pm 0,2$ -fach geringere SLPI-Expression. Die Betrachtung der Korrelation zwischen SLPI-Proteinexpression und HPV-Status ergibt ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang ($p=0,397$). Es wird dahingegen eine statistisch signifikant inverse Korrelation zwischen HPV-Status und SLPI-Genexpression bzw. SLPI-Proteinexpression in vorangegangenen Arbeiten gezeigt (Hoffmann et al., 2013; Quabius et al., 2015).

Die nicht signifikanten Zusammenhänge zwischen dem Rauchverhalten und der SLPI-Proteinexpression sowie zwischen dem HPV-Status und der SLPI-Genexpression und SLPI-Proteinexpression stehen somit im Widerspruch zu vorangegangenen Untersuchungen (Hoffmann et al., 2013; Quabius et al., 2014, 2015). Eine mögliche Erklärung dieser nicht signifikanten Ergebnisse sowohl auf Ebene der Genexpression als auch auf Ebene der Proteinexpression könnte der in dieser Arbeit sehr hohe Anteil an Rauchern von 74,6% sein. Der hohe Anteil an Rauchern führt zu einer annähernd gleichen Verteilung von Rauchern und Nichtrauchern innerhalb der HPV-positiven Gruppe. Das Verhältnis von Rauchern zu Nichtrauchern in der Arbeit von Quabius und Mitarbeitern (2014) ist dahingegen nahezu ausgeglichen.

Die Korrelation zwischen HPV-Status und Rauchverhalten in der hier vorliegenden Arbeit ist signifikant ($p=0,001$). Es gibt in diesem Kollektiv eine inverse Korrelation zwischen HPV-Status und Rauchverhalten. Dieses signifikante Ergebnis bestätigt damit das Ergebnis von Quabius und Mitarbeitern (2014) und stützt indirekt auch in dieser Arbeit die Hypothese, dass die Steigerung der SLPI-Expression durch Nikotin einen protektiven Effekt gegenüber einer HPV-Infektion haben kann.

5.5 Annexin-A2-Genexpression in HPV-assoziierten Tonsillenkarcinomen sowie deren Beziehung zu HPV-Status und Rauchverhalten

Das Protein Annexin A2 hat bezüglich der Genese von HPV-Infektionen und auch im Zusammenhang mit SLPI eine besondere Bedeutung. Annexin A2 ist ein Heterotetramer (A2t) bestehend aus zwei Annexin A2 Monomeren und einem S100A10 Dimer. Woodham und Mitarbeiter (2012) identifizieren Annexin A2 bzw. dessen S100A10-Untereinheit als spezifischen HPV16-Rezeptor auf Epithelzellen (Woodham et al., 2012). SLPI ist ein natürlicher, endogener Ligand von Annexin A2. Die Blockade von Annexin A2 mit SLPI oder einem Annexin-A2t-Antikörper führt *in vitro* zu einer signifikanten Abnahme der HPV16-Infektionen (Woodham et al., 2012). Die Infektion von Epithelzellen mit HPV16 wird demnach über Annexin A2 vermittelt. Die antivirale Wirkung von SLPI wird über die Blockade von Annexin A2 vermittelt (Ma et al., 2004; Woodham et al., 2012). Es ist daher von Bedeutung im Zusammenhang mit der antiviralen Wirkung von SLPI auch die Genexpression von Annexin A2 zu untersuchen.

Die hier vorliegende Arbeit ergibt unabhängig vom HPV-Status einen signifikanten Zusammenhang zwischen Rauchverhalten und Annexin-A2-Genexpression. Raucher haben eine signifikant gesteigerte Annexin-A2-Genexpression gegenüber Nichtrauchern. Dieses Ergebnis lässt sich sowohl bei HPV-positiven Patienten als auch bei HPV-negativen Patienten beobachten. Der Zusammenhang zwischen dem Rauchverhalten und der Annexin-A2-Genexpression ist dabei im HPV-negativen Kollektiv stärker ausgeprägt. Quabius und Mitarbeiter (2014) erzielen in einer vorangegangenen Arbeit ein mit dieser Arbeit übereinstimmendes Ergebnis (Quabius et al., 2014). Die bei Rauchern gesteigerte Annexin-A2-Genexpression könnte Folge der vermehrten Besetzung von Annexin A2 durch den endogenen Liganden SLPI sein.

Die Annexin-A2-Genexpression zeigt in der hier vorliegenden Arbeit neben der Korrelation mit dem Rauchverhalten auch eine signifikante Abhängigkeit vom HPV-Status. HPV-positive Patienten haben ohne Berücksichtigung des Rauchverhaltens eine $2,21 \pm 0,29$ -fach höhere Annexin-A2-Genexpression als HPV-negative Patienten. Dies ist in der Gruppe der Nichtraucher deutlich stärker ausgeprägt als in der Gruppe der Raucher. HPV-positive Nichtraucher haben eine $27,47 \pm 6,29$ -fach höhere Annexin-A2-Genexpression als HPV-negative Nichtraucher. Die gesteigerte Annexin-A2-Genexpression in der Gruppe der HPV-positiven Nichtraucher gegenüber der HPV-negativen Gruppe legt die Vermutung nahe, dass durch humane Papillomviren Einfluss auf die Annexin-A2-Genexpression genommen werden

und zu deren Steigerung führen könnte. Die gesteigerte Annexin-A2-Genexpression könnte hypothetisch als Mechanismus interpretiert werden, einer noch größeren Anzahl an Viren den Eintritt in die Zelle zu ermöglichen. Humane Papillomviren könnten theoretisch als aktivierende Transkriptionsfaktoren fungieren.

Es kann zusammenfassend auf Ebene der Genexpression die bereits vorbeschriebene Trias aus positiver Rauchanamnese, daraus resultierender hoher SLPI-Genexpression und negativem HPV-Status bestätigt werden. Die in vorangegangenen Arbeiten bereits gezeigte Steigerung der Annexin-A2-Genexpression durch *ex vivo* Nikotinkubation von Zellen sowie bei Patienten mit positiver Rauchanamnese (Quabius et al., 2014) kann durch das Ergebnis der hier vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

Nach der isolierten Betrachtung der SLPI-Proteinexpression, SLPI-Genexpression und Annexin-A2-Genexpression sowie deren Relation zu HPV-Status und Rauchverhalten in den Kapiteln 5.4 und 5.5 behandelt das folgende Kapitel 5.6 die Beziehung der beiden Proteine zueinander.

5.6 Vergleich der Annexin-A2-Genexpression mit der SLPI-Genexpression

Die beiden vorangestellten Kapitel 5.4 und 5.5 betrachten die jeweils isolierte Untersuchung der Gen- und Proteinexpression von SLPI sowie der Genexpression von Annexin A2. Dieses Kapitel diskutiert die Beziehung der Genexpressionslevel von Annexin A2 und SLPI zueinander. Der Zusammenhang zwischen Annexin A2 und SLPI ist bereits vielfach Gegenstand vorangegangener Arbeiten (z.B. in Ma et al., 2004; Woodham et al., 2012; Quabius et al., 2015). Die Proteine stehen bezüglich der Genese von HPV-Infektionen und anderer viraler Infektionen in enger Verbindung zueinander. Es gibt Hinweise darauf, dass SLPI seine antivirale Wirkung über die Blockade von Annexin A2 als dessen endogener Ligand vermittelt (Ma et al., 2004; Woodham et al., 2012). Die Bindung von SLPI an Annexin A2 auf Membranen von Makrophagen wird unter anderem für die antivirale Wirkung gegenüber HIV-1 verantwortlich gemacht (McNeely et al., 1997; Ma et al., 2004). Quabius und Mitarbeiter (2015) zeigen in einer aktuellen Arbeit bei Nichtrauchern eine gegenüber der SLPI-Genexpression signifikant gesteigerte Annexin-A2-Genexpression. Es wird weiterhin eine signifikant gesteigerte Annexin-A2-Genexpression in HPV-positiven Tumoren gezeigt (Quabius et al., 2015). Woodham und Mitarbeiter (2012) zeigen in ihrer Arbeit eine signifikante Abnahme der HPV16-Infektionen durch die Blockade von Annexin

A2 (Woodham et al., 2012). Diese Arbeitsgruppe untersucht dabei HPV16 stellvertretend für die L2-vermittelte HPV-Infektion von Epithelzellen. Die von Woodham und Mitarbeitern (2012) bereits *in vitro* gezeigte Blockade von Annexin A2 durch SLPI wird von Quabius und Mitarbeitern (2015) *in vivo* bestätigt (Woodham et al., 2012; Quabius et al., 2015). Die Ergebnisse beider Arbeiten stehen in Einklang miteinander.

Die hier vorliegende Arbeit nimmt ebenfalls einen Vergleich der Annexin-A2- mit der SLPI-Genexpression vor. Es wird dabei jeweils der Einfluss des Rauchverhaltens, des HPV-DNA-Status sowie des p16^{INK4A}-Status untersucht (vgl. Seite 33, Abbildung 4.7). Die Gruppe der Nichtraucher weist im Vergleich zur SLPI-Genexpression eine 4,42±0,9-fach höhere Annexin-A2-Genexpression auf. Die Annexin-A2-Genexpression steht mit der SLPI-Genexpression dahingegen innerhalb der Gruppe der Raucher in einem Verhältnis von nahezu 1:1 (Fold Change 1,07±0,09). Dieses Ergebnis ist deckungsgleich mit dem Ergebnis von Quabius und Mitarbeitern (Quabius et al., 2015). Der Vergleich zwischen der Annexin-A2-Genexpression und der SLPI-Genexpression in der Gruppe der HPV-positiven Tonsillenzarzinome ergibt eine 5,44±0,61-fach höhere Annexin-A2-Genexpression. Die Untersuchung innerhalb der HPV-negativen Gruppe ergibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genexpressionsleveln. Das Protein p16^{INK4A} gilt als Surrogatmarker für aktive HPV-Infektionen. Die Gruppe mit einem positiven p16^{INK4A}-Nachweis hat eine im Vergleich zur SLPI-Genexpression 3,75±0,7-fach erhöhte Annexin-A2-Genexpression. Der Vergleich der Genexpressionslevel innerhalb der Gruppe mit einem negativen p16^{INK4A}-Nachweis ergibt keine signifikanten Unterschiede (Fold Change -1,49±0,3).

Es zeigt sich damit zusammenfassend eine im Vergleich zur SLPI-Genexpression jeweils statistisch signifikant höhere Annexin-A2-Genexpression in der Gruppe der Nichtraucher, der HPV-positiven Patienten sowie in der Gruppe mit einem positiven Nachweis für p16^{INK4A}. Nikotinabusus führt zu einer gesteigerten SLPI-Genexpression (Quabius et al., 2014). Die Blockade von Annexin A2 durch dessen natürlichen endogenen Liganden SLPI führt in der Folge zu einer signifikanten Abnahme der HPV16-Infektionen in den *in-vitro*-Versuchen (Woodham et al., 2012). Der eingangs formulierten Hypothese folgend, sind Raucher durch diesen Mechanismus vor einer HPV-Infektion geschützter als Nichtraucher (Quabius et al., 2014). Die Ergebnisse des Vergleichs zwischen Annexin-A2- und SLPI-Genexpression sind demnach mit der Trias aus positiver Rauchanamnese, daraus resultierender hoher SLPI-Genexpression und negativem HPV-Status vereinbar. Die Ergebnisse reihen sich in die der

vorangegangenen Arbeiten von Woodham und Mitarbeitern (2012) sowie von Quabius und Mitarbeitern (2015) ein.

5.7 Untersuchung des Einflusses des HPV-DNA-Status, der p16^{INK4A}- und der SLPI-Proteinexpression sowie des Rauchverhaltens auf das Überleben der Patienten

Es ist ein Ziel der hier vorliegenden Arbeit, den Einfluss des HPV-Status, der p16^{INK4A}- und SLPI-Proteinexpression sowie des Rauchverhaltens auf die Überlebensdaten der Patienten zu untersuchen. Die Ergebnisse sollen vor allem zu einem besseren Verständnis der Rolle von SLPI in Bezug auf die Überlebensdaten der Patienten mit Tonsillenkarcinomen beitragen.

HPV-DNA-positive Patienten haben in der hier vorliegenden Arbeit eine signifikant bessere Prognose als HPV-DNA-negative Patienten (vgl. Seite 34, Abbildung 4.8). Dieses Ergebnis steht in Einklang mit der gegenwärtigen Literatur (Andl et al., 1998; Hoffmann et al., 2005; Gillison, 2006). Für die bessere Prognose der HPV-positiven Patienten wird vor allem das bessere Ansprechen der Tumoren auf die Radiochemotherapie verantwortlich gemacht (Andl et al., 1998; Hoffmann et al., 2005).

Die Analyse des Einflusses der p16^{INK4A}-Proteinexpression auf das Überleben der Patienten soll eine Übereinstimmung mit dem Überlebensvorteil für HPV-positive Patienten überprüfen. Der Vergleich zwischen p16^{INK4A}-positiven Patienten und p16^{INK4A}-negativen Patienten lässt trotz fehlender Signifikanz einen Überlebensvorteil für p16^{INK4A}-positive Patienten erkennen (vgl. Seite 35, Abbildung 4.9). Die Kombination des p16^{INK4A}-Status mit dem HPV-Status zu jeweils einer Risikogruppe ergibt ebenfalls einen nicht signifikanten Überlebensvorteil für die p16^{INK4A}-positive und HPV-positive Gruppe (vgl. Seite 36, Abbildung 4.10). Es ergibt sich trotz fehlender Signifikanz ein mit der aktuellen Literatur vereinbarer Trend zugunsten der HPV-positiven Patienten (Gillison et al., 2000; Hoffmann et al., 2005).

Die Untersuchung der Überlebensdaten der Raucher und Nichtraucher in Kombination mit dem HPV-Status ergibt einen nicht signifikanten Überlebensvorteil für HPV-positive Nichtraucher (vgl. Seite 37, Abbildung 4.11). Es lässt sich trotz fehlender Signifikanz ein mit der aktuellen Literatur vereinbarer Trend beobachten (Ang et al., 2010). Das insgesamt günstigere Risikoprofil von Nichtrauchern im Allgemeinen und das in dieser Arbeit geringere Durchschnittsalter wird hier neben dem positiven HPV-Status ebenfalls verantwortlich für die bessere Prognose sein.

Die Gruppe mit negativem und schwach positivem SLPI-Nachweis hat gegenüber der Gruppe mit mäßig und stark positivem SLPI-Nachweis einen signifikanten Überlebensvorteil (vgl. Seite 38, Abbildung 4.12). Hohe SLPI-Konzentrationen durch Nikotinabusus könnten einen Schutz gegenüber HPV-Infektionen bieten (Quabius et al., 2014). Die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen HPV-Infektion einer Epithelzelle scheint demnach bei geringer SLPI-Konzentration oder fehlender SLPI-Proteinexpression erhöht. Es wird in aktuellen Arbeiten bereits eine fehlende oder verringerte SLPI-Proteinexpression in Verbindung mit einem positiven HPV-Status gezeigt (Hoffmann et al., 2013; Quabius et al., 2014). Der Überlebensvorteil für Patienten mit geringem SLPI-Expressionslevel lässt sich mit dem Überlebensvorteil für HPV-positive Patienten in Einklang bringen. Die Ergebnisse von Quabius und Mitarbeitern (2015) bestätigen das Ergebnis dieser hier vorliegenden Arbeit. Die bessere Prognose für Patienten mit negativem oder schwach positivem SLPI-Nachweis in diesem Kollektiv und bei Quabius und Mitarbeitern (2015) steht im Gegensatz zu einer kürzlich veröffentlichten Arbeit von Noorlag und Mitarbeitern (2014). Noorlag und Mitarbeiter zeigen bei Patienten mit höherem SLPI-Genexpressionslevel ein besseres Gesamtüberleben (Noorlag et al., 2014). Die mögliche Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte in der niedrigen HPV-Infektionsrate von unter einem Prozent in der Arbeit von Noorlag und Mitarbeitern (2014) begründet sein.

5.8 Schlussfolgerungen

Die Hauptergebnisse der hier vorliegenden Arbeit werden in diesem Kapitel abschließend betrachtet. Die HPV-Prävalenz im hier vorliegenden Kollektiv liegt bei 42,1%. Das Ergebnis ist mit der im Allgemeinen und bereits vielfach vorbeschriebenen, erhöhten HPV-Prävalenz in Tumoren der Tonsilla palatina vereinbar. HPV16 ist mit einem Anteil von 90,6% der am häufigsten für die Infektion verantwortliche Typ im hier vorliegenden Kollektiv. HPV-negative Patienten sind im hier vorliegenden Kollektiv signifikant jünger als HPV-positive Patienten. Diese im Vergleich zu US-amerikanischen Studien gegensätzliche Beobachtung ist vermutlich auf das jüngere Einstiegsalter sowie die weitere Verbreitung des Zigarettenrauchens im europäischen Raum zurückzuführen. Die Analyse der p16^{INK4A}-Proteinexpression stellt das Protein p16^{INK4A} als alleinigen Surrogatmarker für aktive HPV-Infektionen in Frage. Aktive HPV-Infektionen werden dieser und anderen aktuellen Arbeiten zufolge am verlässlichsten durch den Nachweis von HPV-DNA in Kombination mit dem Nachweis von E6*I-mRNA diagnostiziert (Hoffmann et al., 2012). Raucher haben unabhängig vom HPV-

Status eine signifikant erhöhte SLPI-Genexpression. Die inverse Korrelation zwischen HPV-Status und Rauchverhalten ist ebenfalls signifikant. Die inverse Korrelation zwischen HPV-Status und Rauchverhalten sowie das Ergebnis der SLPI-Genexpression stützen in Zusammenschau die Annahme der protektiven Wirkung eines hohen SLPI-Expressionslevels gegenüber einer erfolgreichen HPV-Infektion. Die Ergebnisse der Genexpression von Annexin A2 als spezifischem HPV-Rezeptor bzw. zumindest Modulator reihen sich in die Ergebnisse der SLPI-Genexpression ein. Die Annexin-A2-Genexpression zeigt eine signifikante Abhängigkeit sowohl vom HPV-Status als auch vom Rauchverhalten. Im direkten Vergleich der SLPI- mit der Annexin-A2-Genexpression zeigt sich eine signifikant erhöhte Annexin-A2-Genexpression bei Nichtrauchern, HPV-positiven Patienten sowie bei Patienten mit einem positiven p16^{INK4A}-Nachweis. Es kann so abschließend die Trias aus positiver Rauchanamnese, daraus resultierender hoher SLPI-Genexpression und somit negativem HPV-Status bestätigt werden. Die Überlebensdaten zeigen signifikante Überlebensvorteile für HPV-positive Patienten gegenüber HPV-negativen Patienten sowie für Patienten mit negativem bzw. schwach positivem SLPI-Nachweis gegenüber Patienten mit mäßigem bzw. stark positivem SLPI-Nachweis. Diese Ergebnisse sind mit der protektiven Wirkung von hoher SLPI-Expression gegenüber HPV-Infektionen vereinbar.

6. Zusammenfassung

Karzinome des Kopf-Hals-Bereichs als sechstgrößte Gruppe aller Malignome des Menschen können unter ätiologischen Gesichtspunkten in zwei unterschiedliche Tumorentitäten eingeteilt werden: Alkohol- und Nikotin-assoziierte sowie HPV-assoziierte Karzinome. Die Tumoren der Tonsilla palatina weisen mit einem Anteil von 50% bis 60% HPV-positiver Karzinome regelmäßig signifikant höhere Infektionsraten auf als die Karzinome anderer anatomischer Lokalisationen des Kopf-Hals-Bereichs, wie die Mundhöhle, der Hypopharynx und der Larynx. Es wird dem sekretorischen Leukozytenproteaseinhibitor (*secretory leucocyte protease inhibitor*, SLPI) eine antivirale Wirkung gegenüber HPV zugeschrieben. SLPI ist ein natürlicher endogener Ligand des Strukturproteins Annexin A2. Woodham und Mitarbeiter (2012) identifizieren Annexin A2 als spezifischen HPV16-Rezeptor. Eine Blockade von Annexin A2 führt dabei zu einer signifikanten Abnahme von HPV16-Infektionen. Vorangegangene Arbeiten zeigen erhöhte SLPI-Expressionslevel bei Rauchern sowie eine Steigerung der SLPI-Expression durch Zigarettenrauchen und eine *ex-vivo*-Nikotininkubation von Zellen. Der gesteigerten SLPI-Expression durch das Zigarettenrauchen wird vor diesem Hintergrund eine protektive Wirkung gegenüber HPV-Infektionen zugeschrieben. Diese Arbeit geht der Hypothese nach, dass eine durch das Zigarettenrauchen gesteigerte SLPI-Expression mit hohem SLPI-Expressionslevel über die Blockade von Annexin A2 die Infektion der Epithelzellen mit HPV erschwert. Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit ist vor diesem Hintergrund zu einem besseren Verständnis der Zusammenhänge zwischen der SLPI-Expression, dem Rauchverhalten und dem HPV-Status bei Patienten mit Karzinomen insbesondere der Tonsilla palatina beizutragen.

Es werden insgesamt 126 in Paraffin eingebettete Gewebeproben untersucht. Die Analyse der DNA wird zum Nachweis HPV-spezifischer Sequenzen durchgeführt. Es werden hierfür DNA-Extraktion, PCR, Elektrophorese und DNA-Sequenzierung angewandt. Die Analyse der HPV-spezifischen mRNA erfolgt zum Nachweis aktiver HPV-Infektionen sowie zur quantitativen Analyse der SLPI- und Annexin-A2-Genexpressionslevel. Es werden RNA-Extraktion, cDNA-Synthese sowie Real-time quantitative PCR durchgeführt. Die Proteinexpression von SLPI und p16^{INK4A} wird mittels immunhistochemischer Verfahren analysiert. Die statistische Auswertung der Daten erfolgt mit der SPSS 20.0 Software von IBM.

Der Anteil HPV-DNA-positiver Gewebeproben liegt im vorliegenden Kollektiv bei 42,1%. Der HPV-Genotyp 16 ist mit einem Anteil 90,6% am weitesten verbreitet. Der Anteil aktiver HPV-Infektionen mit einem positiven E6*I-mRNA-Nachweis beträgt 90,6%. Die HPV-

negativen Patienten sind in diesem hier vorliegenden Kollektiv signifikant jünger als die HPV-positiven Patienten ($p=0,0002$). Die Untersuchung der SLPI- und Annexin-A2-Genexpression ergibt bei Rauchern ohne Berücksichtigung des HPV-Status signifikant höhere Werte für die SLPI-Genexpression als bei Nichtrauchern. Die signifikant erhöhte SLPI-Genexpression bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern ist dabei als ein zentrales Ergebnis der hier vorliegenden Arbeit zu werten. Es ergeben sich diesbezüglich wider Erwarten keine Signifikanzen auf Ebene der Proteinexpression. Die Betrachtung der SLPI- und Annexin-A2-Genexpression zwischen Rauchern und Nichtrauchern innerhalb der HPV-positiven und HPV-negativen Gruppe ergibt signifikant gesteigerte Genexpressionslevel sowohl für SLPI als auch für Annexin A2. Die Annexin-A2-Genexpression weist zudem ohne Berücksichtigung des Rauchverhaltens einen signifikanten Zusammenhang mit dem HPV-Status auf. Der Vergleich zwischen Annexin-A2- und SLPI-Genexpression ergibt signifikant höhere Annexin-A2-Genexpressionslevel bei Nichtrauchern, HPV-positiven Patienten und p16^{INK4A}-positiven Karzinomen. Die Analyse der Überlebensdaten ergibt signifikante Vorteile für das Gesamtüberleben und das progressionsfreie Überleben sowohl für HPV-positive Patienten als auch für Patienten mit negativer bzw. schwach-positiver SLPI-Proteinexpression.

Die eingangs beschriebene Trias aus positiver Rauchanamnese, daraus resultierender hoher SLPI-Genexpression und somit negativem HPV-Status wird durch die Ergebnisse dieser hier vorliegenden Arbeit bestätigt. Es wird eine vom HPV-Status unabhängige, signifikant höhere SLPI-Genexpression bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern gezeigt. Die hier vorliegende inverse Korrelation zwischen HPV-Status und Rauchverhalten ist ebenfalls signifikant. Diese Ergebnisse reihen sich damit in die der vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe ein. Die Ergebnisse sind ebenfalls mit der Hypothese einer protektiven Wirkung von SLPI gegenüber einer HPV-Infektion vereinbar. Der in dieser Arbeit signifikante Überlebensvorteil HPV-DNA-positiver Patienten gegenüber HPV-DNA-negativen Patienten steht in Einklang mit der aktuellen Literatur. Der ebenfalls signifikante Überlebensvorteil von Patienten mit negativem bzw. schwach positivem SLPI-Nachweis lässt sich vor dem Hintergrund der vorangegangenen Arbeiten und den Ergebnissen dieser Arbeit mit dem Überlebensvorteil HPV-positiver Patienten vereinen. Eine niedrige SLPI-Expression geht der eingangs aufgestellten Hypothese zufolge mit positivem HPV-Status einher.

7. Literaturverzeichnis

- Abe T, Kobayashi N, Yoshimura K, Trapnell BC, Kim H, Hubbard RC, Brewer MT, Thompson RC, Crystal RG (1991): Expression of the secretory leukoprotease inhibitor gene in epithelial cells. *J. Clin. Invest.* 1991 Jun 1; 87(6):2207–2215. doi: 10.1172/JCI115255.
- Andl T, Kahn T, Pfuhl A, Nicola T, Erber R, Conradt C, Klein W, Helbig M, Dietz A, Weidauer H, Bosch FX (1998): Etiological Involvement of Oncogenic Human Papillomavirus in Tonsillar Squamous Cell Carcinomas Lacking Retinoblastoma Cell Cycle Control. *Cancer Res.* 1998 Jan 1; 58:5–12.
- Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF, Westra WH, Chung CH, Jordan RC, Lu C, Kim H, Axelrod R, Silverman CC, Redmond KP, Gillison ML (2010): Human Papillomavirus and Survival of Patients with Oropharyngeal Cancer. *N. Engl. J. Med.* 2010 Jul 1; 363(1):24–35. doi: 10.1056/NEJMoa0912217.
- Ang KK, Sturgis EM (2012): Human Papillomavirus as a Marker of the Natural History and Response to Therapy of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Semin. Radiat. Oncol.* 2012 Apr; 22(2):128–142. doi: 10.1016/j.semradonc.2011.12.004.
- Chattopadhyay A, Gray LR, Patton LL, Caplan DJ, Slade GD, Tien H-C, Shugars DC (2004): Salivary Secretory Leukocyte Protease Inhibitor and Oral Candidiasis in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Persons. *Infect. Immun.* 2004 Apr; 72(4):1956–1963. doi: 10.1128/IAI.72.4.1956-1963.2004.
- Cole L, Polfus L, Peters ES (2012): Examining the Incidence of Human Papillomavirus-Associated Head and Neck Cancers by Race and Ethnicity in the U.S., 1995–2005. *PLoS ONE.* 2012 Mar 20; 7(3):e32657. doi: 10.1371/journal.pone.0032657.
- Cordes C, Häsler R, Werner C, Görögh T, Röcken C, Hebebrand L, Kast WM, Hoffmann M, Schreiber S, Ambrosch P (2011): The level of secretory leukocyte protease inhibitor is decreased in metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Int. J. Oncol.* 2001 Jul; 39:185–191. doi: 10.3892/ijo.2011.1006.
- Dalianis T, Grün N, Koch J, Vlastos A, Tertipis N, Nordfors C, Näsman A, Wendt M, Romanitan M, Bersani C, Munck-Wikland E, Ramqvist T (2015): Human papillomavirus DNA and p16INK4a expression in hypopharyngeal cancer and in relation to clinical outcome, in Stockholm, Sweden. *Oral Oncol.* 2015 Sep; 51(9):857-861. doi: 10.1016/j.oraloncology.2015.06.002.
- van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PaS, Hummel M, Lavender FL, Delabesse E, Davi F, Schuurin E, García-Sanz R, van Krieken JHJM, Droese J, González

- D, Bastard C, White HE, Spaargaren M, González M, Parreira A, Smith JL, Morgan GJ, Kneba M, Macintyre EA (2003): Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936 Leukemia. 2003 Oct 10; 17:2257–2317. doi: 10.1038/sj.leu.2403202.
- Doulas S, Kolokotronis A, Stefanopoulos P (2005): Anti-Inflammatory and Antimicrobial Roles of Secretory Leukocyte Protease Inhibitor. *Infect. Immun.* 2005 Mar 1; 73(3):1271–1274. doi: 10.1128/IAI.73.3.1271-1274.2005.
 - Dyson N, Howley PM, Münger K, Harlow E (1989): The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science.* 1989 Feb 17; 243(4893):934–937.
 - Fahey JV, Wira CR (2002): Effect of Menstrual Status on Antibacterial Activity and Secretory Leukocyte Protease Inhibitor Production by Human Uterine Epithelial Cells in Culture. *J. Infect. Dis.* 2002 Jun 1; 185(11):1606–1613. doi: 10.1086/340512.
 - Fakioglu E, Wilson SS, Mesquita PMM, Hazrati E, Cheshenko N, Blaho JA, Herold BC (2008): Herpes Simplex Virus Downregulates Secretory Leukocyte Protease Inhibitor: a Novel Immune Evasion Mechanism. *J. Virol.* 2008 Oct 1; 82(19):9337–9344. doi: 10.1128/JVI.00603-08.
 - Franken C, Meijer CJ, Dijkman JH (1989): Tissue distribution of antileukoprotease and lysozyme in humans. *J. Histochem. Cytochem.* 1989 Apr 1; 37(4):493–498. doi: 10.1177/37.4.2926127.
 - Fuessel Haws AL, He Q, Rady PL, Zhang L, Grady J, Hughes TK, Stisser K, König R, Tying SK (2004): Nested PCR with the PGMY09/11 and GP5(+)/6(+) primer sets improves detection of HPV DNA in cervical samples. *J. Virol. Methods.* 2004 Dec 1; 122(1):87–93. doi: 10.1016/j.jviromet.2004.08.007.
 - Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zahurak ML, Daniel RW, Viglione M, Symer DE, Shah KV, Sidransky D (2000): Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* 2000 May 3; 92(9):709–720.
 - Gillison ML, Shah KV (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. *Curr. Opin. Oncol.* 2001 May; 13(3):183–188.
 - Gillison ML (2004): Human papillomavirus-associated head and neck cancer is a distinct epidemiologic, clinical, and molecular entity. *Semin. Oncol.* 2004 Dec; 31(6):744–754.

- Gillison ML (2006): Human papillomavirus and prognosis of oropharyngeal squamous cell carcinoma: implications for clinical research in head and neck cancers. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2006 Dec 20; 24(36):5623–5625. doi: 10.1200/JCO.2006.07.1829.
- Guay ME, Lavertu P (1995): Tonsillar Carcinoma. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 1995; 252(5):259–264.
- zur Hausen H, De Villiers E-M (1994): Human Papilloma Viruses. *Annu. Rev. Microbiol.* 1994; 48:427–447. doi: 10.1146/annurev.mi.48.100194.002235.
- Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, Schiller JT (1989): HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes.. *EMBO J.* 1989 Dec 1; 8(12):3905–3910.
- Hibell B, Guttormsson U, Alström S, Balakireva O, Bjanason T, Kokkevi A, Krauss L (2009): The European School Survey Project on Alcohol and Other Drugs (ESPAD Report). *CAN. EMCDDA. Pompidou Group.* 2009 Feb.
- Hoffmann M, Kahn T, Mahnke CG, Goeroegh T, Lippert BM, Werner JA (1998): Prevalence of human papillomavirus in squamous cell carcinoma of the head and neck determined by polymerase chain reaction and Southern blot hybridization: proposal for optimized diagnostic requirements. *Acta Otolaryngol.* 1998 Jan; 118(1):138–144.
- Hoffmann M, Görögh T, Gottschlich S, Lohrey C, Rittgen W, Ambrosch P, Schwarz E, Kahn T (2005): Human papillomaviruses in head and neck cancer: 8 year-survival-analysis of 73 patients. *Cancer Lett.* 2005 Feb 10; 218(2):199–206. doi: 10.1016/j.canlet.2004.09.027.
- Hoffmann M, Ihloff AS, Görögh T, Weise JB, Fazel A, Krams M, Rittgen W, Schwarz E, Kahn T (2010): p16INK4a overexpression predicts translational active human papillomavirus infection in tonsillar cancer. *Int. J. Cancer.* 2010 Oct 1; 127(7):1595–1602. doi: 10.1002/ijc.25174.
- Hoffmann M, Tribius S, Quabius ES, Henry H, Pfannenschmidt S, Burkhardt C, Görögh T, Halec G, Hoffmann AS, Kahn T, Röcken 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 Lett.* 2012 Oct 1; 323(1):88–96. doi: 10.1016/j.canlet.2012.03.033.
- Hoffmann M, Quabius ES, Tribius S, Hebebrand L, Görögh T, Halec G, Kahn T, Hedderich J, Röcken C, Haag J, Waterboer T, Schmitt M, Giuliano AR, Kast WM (2013): Human papillomavirus infection in head and neck cancer: The role of the secretory

leukocyte protease inhibitor. *Oncol. Rep.* 2013 May; 29(5):1962–1968. doi: 10.3892/or.2013.2327.

- Jamal A, Akagu IT, O'Conner E, King BA, Kenemer JB, Neff L (2014): Current Cigarette Smoking Among Adults - United States, 2005-2013. *MMWR.* 2014 Nov 28; 63(47):1108-1112
- Jin F, Nathan C, Radzioch D, Ding A (1997): Secretory Leukocyte Protease Inhibitor: A Macrophage Product Induced by and Antagonistic to Bacterial Lipopolysaccharide. *Cell.* 1997 Feb 7; 88(3):417–426. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81880-2.
- Kann L, Kinchen S, Shanklin SL, Flint KH, Hawkins J, Harris WA, Lowry R, O'Mally Olsen E, McManus T, Chyen D, Whittle L, Taylor E (2014): Youth Risk Behavior Surveillance - United States 2013. *MMWR.* 2014 Jun 13; 63(4):1-168.
- 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. *Int. J. Cancer.* 2001 Apr 15; 92(2):276–284.
- Klussmann JP, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Kolligs J, Jungehuelsing M, Eckel HE, Dienes HP, Pfister HJ, Fuchs PG (2001): Prevalence, distribution, and viral load of human papillomavirus 16 DNA in tonsillar carcinomas. *Cancer.* 2001 Dec 1; 92(11):2875–2884.
- Klussmann JP, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Eckel HE, Pfister HJ, Fuchs PG (2003): Human papillomavirus-positive tonsillar carcinomas: a different tumor entity?. *Med. Microbiol. Immunol.* 2003 Aug; 192(3):129–132. doi: 10.1007/s00430-002-0126-1.
- Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S (2005): Human Papillomavirus Types in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas Worldwide: A Systematic Review. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2005 Feb 1; 14(2):467–475. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-04-0551.
- Lampert T, von der Lippe E, Müters S (2013): Verbreitung des Rauchens in der Erwachsenenbevölkerung in Deutschland. *Bundesgesundheitsbl.* 2013 Mai 27; 56(5/6):802-808. doi: 10.1007/s00103-013-1698-1.
- Ma G, Greenwell-Wild T, Lei K, Jin W, Swisher J, Hardegen N, Wild CT, Wahl SM (2004): Secretory Leukocyte Protease Inhibitor Binds to Annexin II, a Cofactor for Macrophage HIV-1 Infection. *J. Exp. Med.* 2004 Nov 15; 200(10):1337–1346. doi: 10.1084/jem.20041115.

- McNeely TB, Shugars DC, Rosendahl M, Tucker C, Eisenberg SP, Wahl SM (1997): Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infectivity by Secretory Leukocyte Protease Inhibitor Occurs Prior to Viral Reverse Transcription. *Blood*. 1997 Aug 1; 90(3):1141–1149.
- Moutsopoulos NM, Nares S, Nikitakis N, Rangel Z, Wen J, Munson P, Sauk J, Wahl SM (2007): Tonsil Epithelial Factors May Influence Oropharyngeal Human Immunodeficiency Virus Transmission. *Am. J. Pathol.* 2007 Aug; 171(2):571–579. doi: 10.2353/ajpath.2007.061006.
- 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 Harb. Symp. Quant. Biol.* 1986; 51 Pt 1:263–273.
- Näsman A, Attner P, Hammarstedt L, Du J, Eriksson M, Giraud G, Ährlund-Richter S, Marklund L, Romanitan M, Lindquist D, Ramqvist T, Lindholm J, Sparén P, Ye W, Dahlstrand H, Munck-Wikland E, Dalianis T (2009): Incidence of human papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: An epidemic of viral-induced carcinoma?. *Int. J. Cancer.* 2009 Jul 15; 125(2):362–366. doi: 10.1002/ijc.24339.
- Nolan T, Hands RE, Bustin SA (2006): Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat. Protoc.* 2006 Nov; 1(3):1559–1582. doi: 10.1038/nprot.2006.236.
- Noorlag R, van der Groep P, Leusink FKJ, van Hooff SR, Frank MH, Willems SM, van Es RJJ (2014): Nodal metastasis and survival in oral cancer: Association with protein expression of SLPI, not with LCN2, TACSTD2, or THBS2. *Head Neck.* 2015 Aug; 37(8):1130-1136. doi: 10.1002/hed.23716. Epub 2014 Jul 19.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005): Global cancer statistics, 2002. *CA. Cancer J. Clin.* 2005 Mar-Apr; 55(2):74–108.
- Pfaffl MW (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001 May 1; 29(9):e45.
- Quabius ES, Möller P, Haag J, Pfannenschmidt S, Hedderich J, Görögh T, Röcken C, Hoffmann M (2014): The role of the antileukoprotease SLPI in smoking-induced human papillomavirus-independent head and neck squamous cell carcinomas. *Int. J. Cancer.* 2014 Mar 15; 134(6):1323–1334. doi: 10.1002/ijc.28462.
- Quabius ES, Görögh T, Fischer GS, Hoffmann AS, Gebhard M, Evert M, Beule A, Maune S, Knecht R, Óvári A, Durisin M, Hoppe F, Röcken C, Hedderich J, Ambrosch P, Hoffmann M (2015): The antileukoprotease secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI)

- and its role in the prevention of HPV-infections in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Lett.* 2015 Feb 1; 357(1):339–345. doi: 10.1016/j.canlet.2014.11.043.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1977 Dec; 74(12):5463–5467.
 - Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM (1993): The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell.* 1993 May 11; 75(3):495–505. doi: 10.1016/0092-8674(93)90384-3.
 - Shugars DC (1999): Endogenous Mucosal Antiviral Factors of the Oral Cavity. *J. Infect. Dis.* 1999 May; 179 Suppl 3:S431–S435. doi: 10.1086/314799.
 - Smeets SJ, Hesselink AT, Speel E-JM, Haesevoets A, Snijders PJF, Pawlita M, Meijer CJLM, Braakhuis BJM, Leemans CR, Brakenhoff RH (2007): A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. *Int. J. Cancer.* 2007 Aug 6; 121(11):2465–2472. doi: 10.1002/ijc.22980.
 - Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Klusmann JP, Lee JH, Wang D, Haugen TH, Turek LP (2004): Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int. J. Cancer.* 2004 Feb 20; 108(5):766–772. doi: 10.1002/ijc.11633.
 - Tang S, Tao M, McCoy JP, Zheng Z-M (2006): The E7 Oncoprotein Is Translated from Spliced E6*I Transcripts in High-Risk Human Papillomavirus Type 16- or Type 18-Positive Cervical Cancer Cell Lines via Translation Reinitiation. *J. Virol.* 2006 May 1; 80(9):4249–4263. doi: 10.1128/JVI.80.9.4249-4263.2006.
 - Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E (1999): Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J. Biotechnol.* 1999 Oct 8; 75(2-3):291–295.
 - Tinhofer I, Jöhrens K, Keilholz U, Kaufmann A, Lehmann A, Weichert W, Stenzinger A, Stromberger C, Klinghammer K, Becker E-T, Dommerich S, Stölzel K, Hofmann VM, Hildebrandt B, Moser L, Ervens J, Böttcher A, Albers A, Stabenow R, Reinecke A, Budach V, Hoffmeister B, Raguse JD (2015): Contribution of human papilloma virus to the incidence of squamous cell carcinoma of the head and neck in a European population with high smoking prevalence. *Eur. J. Cancer.* 2015 Mar; 51(4):514–521. doi: 10.1016/j.ejca.2014.12.018.
 - Tse K-P, Wu C-S, Hsueh C, Chang K-P, Hao S-P, Chang Y-S, Tsang N-M (2012): The relationship between secretory leukocyte protease inhibitor expression and Epstein-Barr

virus status among patients with nasopharyngeal carcinoma. *Anticancer Res.* 2012 Apr; 32(4):1299–1307.

- Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Hong WK (1993): Head and Neck Cancer. *N. Engl. J. Med.* 1993 Jan 21; 328(3):184–194. doi: 10.1056/NEJM199301213280306.
- Woodham AW, Da Silva DM, Skeate JG, Raff AB, Ambroso MR, Brand HE, Isas JM, Langen R, Kast WM (2012): The S100A10 Subunit of the Annexin A2 Heterotetramer Facilitates L2-Mediated Human Papillomavirus Infection. *PLoS ONE.* 2012 Aug 22; 7(8):e43519. doi: 10.1371/journal.pone.0043519

Danksagung

Zunächst möchte ich Frau Professorin Dr. Petra Ambrosch für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie die guten Arbeitsbedingungen in der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie im Universitätsklinikum der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Markus Hoffmann, leitender Oberarzt der Klinik, für die Vergabe des Themas und für die Ermöglichung dieser Promotionsarbeit. Weiterhin möchte ich mich herzlich für die ausgezeichnete wissenschaftliche und persönliche Betreuung bedanken. Seine konstruktiven Vorschläge sowie die anregende Kritik haben wesentlich zum Abschluss dieser Arbeit beigetragen.

Ich möchte mich ebenfalls bei Frau Dr. Elgar Susanne Quabius für die Hilfe bei der RNA-Analyse und bei der Auswertung der immunhistochemischen Schnitte bedanken. Auch möchte ich mich für ihre Geduld und die wertvolle Hilfe bei der Korrektur dieser Promotionsarbeit herzlich bedanken.

Herrn Privatdozent Dr. Tibor Görögh danke ich für die Anleitung und Hilfe bei der Auswertung der immunhistochemischen Schnitte.

Herrn Professor Dr. Christoph Röcken danke ich für die Bereitstellung der Gewebeproben sowie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im molekularpathologischen Labor des Pathologischen Instituts der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Herrn Dr. Jochen Haag danke ich für die ausgezeichnete Leitung, Anleitung und Unterstützung bei den Arbeiten im molekularpathologischen Labor des Pathologischen Instituts der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Herrn Dipl.-Inform. Jürgen Hedderich danke ich für die Unterstützung bei der Auswertung der statistischen Daten.

Frau Sandra Krüger und Frau Hilke Clasen danke ich für die unverzichtbare Unterstützung im Labor.

Ich danke meinen Eltern, Frau Astrid und Herrn Dr. Rüdiger Merz, für ihre allumfassende Unterstützung, die mir diese Promotionsarbeit sowie das gesamte Studium ermöglicht hat.

Ich widme diese Arbeit meiner im April 2015 verstorbenen Großmutter, Frau Gertrud Schieber, die den Abschluss dieser Promotionsarbeit sehr gerne miterlebt hätte.

Lebenslauf**Persönliche Angaben:**

Name: Immanuel Christian Zacharias Merz

Geburtsdatum: 15. Juli 1990

Geburtsort: Karlsruhe

Familienstand: ledig

Schulbildung:

1997–2001 Grundschule am Buschgraben in Berlin-Zehlendorf

2001–2009 Werner-von-Siemens-Gymnasium in Berlin-Zehlendorf

06/2009 Abitur

Studium:

2009–2011 Vorklinisches Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

09/2011 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2011–2014 Klinisches Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

10/2014 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2014–2015 Praktisches Jahr im Rahmen des Medizinstudiums

1. Tertial: Chirurgie, Klinikum Itzehoe

2. Tertial: Innere Medizin, Universitätsklinikum Kiel

3. Tertial: Gynäkologie und Geburtshilfe, Diakonissenkrankenhaus
Flensburg

11/2015 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Promotion:

2012-2015 Anfertigen einer Promotionsarbeit an der Universitätsklinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel mit dem Thema:
„Humane Papillomvirus-Infektionen beim Tonsillenkarzinom: Die Rolle des Sekretorischen Leukozytenproteaseinhibitors (SLPI) und dessen Einfluss auf die Überlebenszeiten betroffener Patienten.“

Publikationen:

2015 Quabius ES, Merz I, Görögh T, Hedderich J, Röcken C, Ambrosch P, Hoffmann M (2015): miRNA-Expression in Tonsillar Carcinomas in Relation to HPV-Infection and Expression of the Antileukoproteinase SLPI; 30th International Papillomavirus Conference & Clinical Workshop (HPV 2015); September 17-21, 2015; Lisbon, Portugal

Erklärung

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

Kiel, den.....

.....
(Immanuel Merz)