

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

**EINFLUSS EINER HPV-INFEKTION UND EINER POSITIVEN  
RAUCHANAMNESE AUF DIE ÜBERLEBENS DATEN VON PATIENTINNEN MIT  
EINEM VULVAKARZINOM IM KIELER PATIENTINNENKOLLEKTIV**

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

vorgelegt von

**JULIUS JAKOB LOEHR**

aus Leverkusen

Kiel, 2019

1. Berichterstatter : Prof. Dr. Markus Hoffmann  
2. Berichterstatter : Priv.-Doz. Dr. Katharina C. Kähler  
Tag der mündlichen Prüfung : 11.09.2020  
Zum Druck genehmigt, Kiel, den : 26.03.2020

gez. : \_\_\_\_\_

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>III</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Epidemiologie und Ätiologie des Vulvakarzinoms.....	1
1.1.1 HPV-Prävalenzen verschiedener Tumorentitäten im Vergleich.....	2
1.1.2 Klassifizierung der HPV-assoziierten intraepithelialen Neoplasien.....	3
1.2 Humane Papillomviren (HPV) .....	3
1.2.1 Geschichte der HPV-Forschung.....	3
1.2.2 Taxonomie, Einteilung in low risk und high risk Typen und deren assoziierte Läsionen .....	4
1.2.3 Clearance, Latenz und Persistenz von HPV.....	4
1.2.4 Struktur der Viruspartikel und des viralen Genoms.....	5
1.2.5 Die Proteinexpression im Verlauf des viralen Lebenszyklus .....	5
1.2.6 Der Pathomechanismus von E6 und E7 in der Karzinogenese .....	7
1.2.7 HPV-Impfstoffe .....	7
1.3 Sekretorische Antileukoproteinase .....	8
1.4 Annexin A2.....	9
1.5 Ziele der Arbeit.....	10
<b>2. Fragestellung.....</b>	<b>12</b>
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>13</b>
3.1 Material.....	13
3.1.1 Patientinnenkollektiv und Gewebeproben .....	13
3.1.2 Datenerhebung durch Anamnese und Nachsorge .....	13
3.2 Methoden .....	14
3.2.1 Extraktion der Nukleinsäuren .....	14
3.2.2 Bestimmung der Nukleinsäurenkonzentration.....	15
3.2.3 cDNA-Synthese .....	15
3.2.4 Die Polymerasekettenreaktion .....	16
3.2.4.1 Quantitative Echtzeit-PCR .....	17
3.2.4.2 Die qPCR zur HPV-Detektion.....	18
3.2.4.3 Die RT-qPCR zur Analyse der SLPI und AnxA2 Genexpression .....	19
3.2.5 DNA-Sequenzierung .....	20
3.2.5.1 Die Kapillarelektrophorese zur Bestimmung der DNA-Sequenz .....	21

3.2.5.2 Auswertung der DNA-Analyse .....	21
3.2.6 SLPI-Immunhistochemie .....	22
3.2.7 Statistische Auswertung .....	22
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>24</b>
4.1 Patientinnenkollektiv .....	24
4.2 HPV-Nachweis und Bestimmung der HPV-Typen .....	25
4.3 Immunhistochemischer SLPI-Nachweis .....	25
4.4 Korrelation zwischen dem HPV-Status und der SLPI-Expression .....	26
4.5 Korrelation zwischen dem Rauchverhalten und der SLPI-Expression .....	26
4.6 Der Einfluss einer HPV-Infektion auf die Genexpression von SLPI und AnxA2 ....	27
4.7 Effekt des Rauchverhaltens auf die Genexpression von SLPI und Annexin A2.....	27
4.8 Vergleich der Genexpression von SLPI und Annexin A2.....	28
4.9 Die Überlebensdaten im Gesamtüberleben und progressionsfreien Überleben .....	29
4.9.1 Einfluss des HPV-Status auf die Überlebensdaten .....	31
4.9.2 Einfluss des SLPI-Expressionsmuster auf die Überlebensdaten.....	32
4.9.3 Einfluss des Rauchverhaltens auf die Überlebensdaten.....	33
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>35</b>
5.1 Altersverteilung der Patientinnen .....	35
5.2 HPV-Prävalenz in Vulvakarzinomen .....	36
5.3 Die SLPI-Genexpression in Vulvakarzinomen .....	37
5.4 Die Annexin -A2-Genexpression in Vulvakarzinomen.....	39
5.5 Die Annexin-A2-Genexpression im Vergleich zur SLPI-Genexpression.....	40
5.6 Die Überlebensdaten in Abhängigkeit von HPV-Status, SLPI-Expression und Rauchverhalten .....	40
5.7 Effektivität der HPV-Impfung.....	43
5.8 Schlussfolgerungen.....	44
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>46</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>48</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>57</b>
<b>Erklärung.....</b>	<b>58</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

AnxA2	Annexin A2
A2t	Heterotetramer des Annexin A2 und S100A10
CDK	cyklin-abhängige Kinase
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CIN	zervikale intraepitheliale Neoplasie
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat (Kettenabbruch-Molekül)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
E2F	Familie eukaryotischer Transkriptionsfaktoren
FFPE	Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet
HIV	Humaner Immundefizienz-Virus
HPV	Humane Papillomviren
HR-HPV	humane Papillomviren der <i>high risk</i> Typen
HSIL	hochgradige squamöse intraepitheliale Läsion
LCR	Kontrollregion ( <i>long control region</i> )
LR-HPV	humane Papillomviren der <i>low risk</i> Typen
LSIL	geringgradige ( <i>low grade</i> ) squamöse intraepitheliale Läsion
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NCR	nichtkodierender DNA-Abschnitt ( <i>non-coding region</i> )
ORF	offene Leserahmen ( <i>open reading frames</i> )
OS	Gesamtüberleben ( <i>overall survival</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>Polymerase chain reaction</i> )
PFS	progressionsfreies Überleben ( <i>progression free survival</i> )
pRb	Retinoblastomprotein
qPCR	quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion
RT-qPCR	quantitative Echtzeit-PCR mit reverser Transkription von RNA
RNA	Ribonukleinsäure
SLPI	sekretorische Antileukoproteinase
STIKO	ständige Impfkommision
VIN	vulväre intraepitheliale Neoplasie
VLP	Viruspartikel ohne virale Nukleinsäuren ( <i>Virus-like-particles</i> )

## **1. Einleitung**

In vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe *HPV* an der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie der Christian Albrechts-Universität Kiel sind neue Erkenntnisse hinsichtlich der Korrelationen einiger innovativer Parameter mit der Genese von Karzinomen der Kopf- und Halsregion beschrieben worden: Es finden sich zwischen dem HPV-Status, dem Rauchverhalten der Patienten sowie dem Gen- und Proteinexpressionsmuster der zellulären Proteine SLPI und Annexin A2 (AnxA2) statistisch signifikante Zusammenhänge. Es ist aus diesen Zusammenhängen für Karzinome des Kopf- und Halsbereiches die folgende Hypothese abgeleitet worden: Raucher zeigen im Vergleich zu Nichtrauchern in den Schleimhäuten des oberen Aerodigestivtraktes erhöhte SLPI-Expressionswerte. SLPI ist der natürliche Ligand von AnxA2, welches wiederum auch für eine erfolgreiche HPV-Infektion der Zellen mit HPV in Interaktion tritt. Entsprechend ist bei Rauchern eine erfolgreiche HPV-Infektion aufgrund der hohen SLPI-Werte und folglich Besetzung des Infektions-Mediators AnxA2 weniger wahrscheinlich als bei Nichtrauchern mit weniger SLPI und mehr unbesetztem AnxA2. In dieser Arbeit wird der Hypothese nachgegangen, ähnliche Korrelationen auch in Karzinomen des weiblichen Genitaltrakts zu finden. Die für den Kopf-Hals-Bereich aufgestellte Hypothese ließe sich dann analog auf den Anogenitaltrakt übertragen. Im Folgenden werden die mit dem Thema dieser Arbeit verbundenen grundlegenden Sachverhalte und aktuelle Erkenntnisse dargestellt.

### **1.1 Epidemiologie und Ätiologie des Vulvakarzinoms**

Die malignen Neoplasien des weiblichen Genitaltrakts haben weltweit mit 15% den zweitgrößten Anteil aller bösartigen Tumore bei Frauen nach dem Mammakarzinom (24%). Es sterben jährlich etwa 610.000 Frauen an den Folgen eines solchen genitalen Malignoms. Tumore der Vulva sind in dieser Gruppe nach Cervix uteri, Corpus uteri und Ovarien mit knapp 4% beteiligt (Bray et al., 2018). Mehr als 90% der Tumore der Vulva lassen sich als Plattenepithelkarzinome beschreiben, im Folgenden Vulvakarzinom genannt (Faber et al., 2017).

Ätiologisch ist das Vulvakarzinom zwei Typen zuzuordnen: Der erste Typ ist gekennzeichnet durch eine Infektion mit dem humanen Papillomvirus (HPV) und eine dadurch induzierte Karzinogenese. In dieser Gruppe sind vergleichsweise jüngere Patientinnen (35-65 Jahre) betroffen. Die Virusinfektion kann hierbei zunächst zu einer vulvären intraepithelialen

Neoplasie (VIN) führen, aus denen in einigen Fällen das invasive Vulvakarzinom hervorgeht. Die zweite Gruppe ist in der Karzinogenese unabhängig von HPV und betrifft überwiegend ältere Patientinnen im Alter von 55-85 Jahren. Hier werden altersbedingte zelluläre Atypien sowie chronisch inflammatorische und lichenöse Vorerkrankungen als kanzerogene Faktoren beschrieben (Alkatout et al., 2015, Crum, 1992).

Es treten verschiedene histologische Varianten des Vulvakarzinoms auf: Dazu zählt die keratinisierte, die basaloiden sowie die kondylomatöse Form des Plattenepithelkarzinoms. Die keratinisierte Form scheint häufiger den HPV-unabhängigen Vulvakarzinomen zugeordnet zu sein, während die basaloiden und kondylomatösen Formen häufiger bei HPV-assoziierten Vulvakarzinomen zu finden sind. Anhand des histologischen Typs lässt sich jedoch nicht auf eine HPV-Infektion schließen (Rakislova et al., 2017a). Die betroffenen Patientinnen klagen mehrheitlich über zunehmenden Pruritus, welcher entsprechend als Leitsymptom gilt. Es können daneben auch Blutungen, Dysurie, Fluor vaginalis und Schmerzen auftreten (Alkatout et al., 2015).

### **1.1.1 HPV-Prävalenzen verschiedener Tumorentitäten im Vergleich**

Es ist gezeigt worden, dass eine HPV-Infektion der anogenitalen sowie oropharyngealen Schleimhaut die Karzinogenese in der jeweiligen Region induzieren kann (Faraji et al., 2017, Rakislova et al., 2017b). Ein signifikanter Teil der Plattenepithelkarzinome der Kopf- und Halsregion, sowie der anogenitalen Region stehen im Zusammenhang mit einer HPV-Infektion (Prigge et al., 2017). Dazu zählen insbesondere das Tonsillenkarzinom (Klussmann et al., 2003), sowie Karzinome des Cervix uteri, der Vulva und des Penis. Außerdem auch Karzinome des Anus bei Männern, welche zusätzlich die Infektion mit dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) vorweisen (Prigge et al., 2017). Die HPV-Infektion wird für Cervixkarzinome mit einer Prävalenzrate von über 90% als Voraussetzung für die Karzinogenese gesehen. In den Statistiken für Tonsillen- und Vulvakarzinome herrscht eine stark schwankende HPV-Prävalenz von 0% (Spanien) bis zu 90% (Skandinavien), je nach geographischer Herkunft der untersuchten Populationen (Faber et al., 2017, Quabius et al., 2015b). Faber und Mitarbeiter zeigen in einer kürzlich durchgeführten Meta-Analyse (2017) bei über 7000 Fällen, dass durchschnittlich 40% der Vulvakarzinome und 76% der intraepithelialen Neoplasien der Vulva HPV-assoziiert sind.

### 1.1.2 Klassifizierung der HPV-assoziierten intraepithelialen Neoplasien

Die für HPV-Infektionen typischen intraepithelialen Neoplasien werden nach neuer WHO-Klassifizierung in *low grade* (LSIL) und *high grade squamous intraepithelial lesions* (HSIL) eingeteilt. LSIL beschreibt die benignen Veränderungen, wie leichte Dysplasien und flache Kondylome. HSIL umfasst alle mittleren und schweren Dysplasien mit signifikantem Risiko der Progression zum invasiven Karzinom. Die Klassifizierung gilt als neuer Standard für alle anogenitalen intraepithelialen Neoplasien (Darragh et al., 2013, Reich et al., 2015). Die ältere und regionsspezifische Nomenklatur *vulvar intraepithelial neoplasia* (VIN) der Grade 1-3 sowie dVIN (differenziert, HPV-unabhängig), in Analogie zur CIN des Cervix uteri, wird weiterhin anerkannt und verwendet. Die VIN-Klassifizierung richtet sich nach morphologischen Kriterien, birgt jedoch einige terminologische Nachteile: Sie suggeriert, dass zwischen den Graden VIN1, VIN2 und VIN3 eine biologische Kausalität oder Kontinuität vorliegt, was nicht der Fall ist. Ebenso beschreibt VIN1 im Unterschied zu VIN2 und VIN3 keine präkanzeröse Läsion, da hier das Risiko zur malignen Transformation nicht höher als bei HPV-Infektionen mit unauffälliger Zytologie ist (Bornstein et al., 2016, Sideri et al., 2005).

## 1.2 Humane Papillomviren (HPV)

### 1.2.1 Geschichte der HPV-Forschung

Die Erkenntnisse über humane Papillomviren finden ihren Ursprung in der Forschung zu Haut- und Genitalwarzen. 1891 publizierte Payne erstmals den infektiösen Charakter dieser Hautveränderungen (Syrjanen und Syrjanen, 2008). Mehr als 40 Jahre später (1933) gelang Shope und Hurst die Isolation und Charakterisierung von tierischen Papillomviren, dem *cotton-tail rabbit* Papillomvirus. 1949 wurden erstmalig Viruspartikel aus Warzen des Menschen elektronenmikroskopisch dargestellt und beschrieben (Strauss et al., 1949). Die doppelsträngige DNA konnte einige Jahre später aus Warzen der Haut extrahiert und hinsichtlich ihrer molekularen Struktur analysiert werden (Crawford, 1965, Klug und Finch, 1965).

Die 1970er und 80er Jahre brachten einige Meilensteine in der HPV-Forschung. In dieser Zeit begann der heutige Nobelpreisträger Harald zur Hausen seine Arbeit dem Thema zu widmen und die bis dahin geltende These, Herpes-simplex-Viren wären verantwortlich für Cervixkarzinome, in Frage zu stellen. Stattdessen brachte er die humanen Papillomviren damit in Verbindung (zur Hausen et al., 1975). Es folgte der Nachweis der ersten vier HPV-Typen



(HPV1 - HPV4), gewonnen aus Zellen von Hautwarzen und die damit einhergehende Erkenntnis der genetischen Heterogenität von HPV (Gissmann et al., 1977). Weitere Typen konnten daraufhin aus Feigwarzen (HPV6), Larynxpapillomen (HPV11) und schließlich aus Cervixkarzinomen (HPV16 und 18) isoliert und charakterisiert werden (Syrjanen und Syrjanen, 2008, Tabelle 3). Inzwischen sind 225 HPV-Typen anhand ihres Genoms identifiziert und charakterisiert worden (NIAID; National Institute of Allergy and Infectious Diseases, 2018), wobei jedoch nicht alle Typen als humanpathogen gelten.

### **1.2.2 Taxonomie, Einteilung in low risk und high risk Typen und deren assoziierte Läsionen**

Die Viren sind in der Taxonomie zunächst zur Familie der *Papovaviridae* zugeordnet worden (Melnick, 1962, Rowson und Mahy, 1967). Diese Familie ist jedoch inzwischen als obsolet zu betrachten, da die Papillomviren aufgrund ihrer Genetik eine eigene Familie der *Papillomaviridae* bilden. Die verschiedenen HPV-Typen können anhand ihrer Sequenzmerkmale und Genomorganisation in Gattungen und Spezies eingeteilt werden ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\mu$ - und  $\nu$ -Papillomviren). Der größte Anteil der humanpathogenen HPV-Spezies ist der Alpha-Gattung zuzuordnen (de Villiers et al., 2004). Klinisch bedeutender ist jedoch die Zuordnung nach ihrem onkogenen Potential in *low risk* (LR) und *high risk* (HR) Typen. Es werden inzwischen 12 HPV Genotypen (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59) als erwiesene Verursacher von Karzinomen beim Menschen dieser HR-Gruppe zugeordnet, weitere Typen gelten als womöglich oder wahrscheinlich karzinogen (Doorbar et al., 2015). In HPV-assoziierten Vulvakarzinomen zeigt sich HPV16 mit einer Prävalenz von 76% als häufigster Typ, gefolgt von HPV33 mit 9% und HPV18 mit 5% (Faber et al., 2017). Ähnliche Prävalenzen dieser HPV-Typen zeigen sich in HSIL und HPV-assoziierten Karzinomen anderer anatomischer Regionen, womit sie die häufigsten Vertreter aus der HR-Gruppe stellen. Die LR HPV-Typen (u. a. 6 und 11) führen nur äußerst selten zu malignen Zelltransformationen. Aus deren Infektion bilden sich benigne Hautveränderungen wie Feigwarzen und LSIL (Munoz et al., 2003).

### **1.2.3 Clearance, Latenz und Persistenz von HPV**

Die Infektion der genitalen Mukosa mit einem *high risk* HP-Virus (s.u.) verläuft nicht immer neoplastisch und führt nur in seltenen Fällen zum invasiven Karzinom. Die Mehrzahl der HPV-Infektionen kann nach 2 Jahren nicht mehr nachgewiesen werden. Dies kann eine vollständige

virale *clearance* oder die Latenz der Viren in den Basalzellen als Ursache haben (Gravitt und Winer, 2017). Die Persistenz der Viren schwankt je nach HPV-Typ und liegt im Mittel aller *high risk* Typen nach sechs Monaten bei 57% und nach 18 Monaten nur noch bei 35%. Das Risiko der Ausbildung einer Präkanzerose steigt mit der Dauer der Persistenz von *high risk* HPV-Viren im betroffenen Gewebe (Plummer et al., 2007).

#### 1.2.4 Struktur der Viruspartikel und des viralen Genoms

Papillomviren sind doppelsträngige DNA-Viren ohne Membranhülle. Das äußere Gerüst, Kapsid genannt, wird von zwei Strukturproteinen gebildet und misst in seinem Durchmesser 55-60nm. Das Genom, die ringförmige doppelsträngige DNA, befindet sich im Inneren dieses Kapsids. Die als Superhelix vorliegende DNA besteht aus ca. 8000 Basenpaaren (Modrow et al., 2010: S. 501 f.). Einer der beiden DNA-Stränge ist kodierend und wird in drei Regionen eingeteilt, welche zusammen ca. zehn offene Leserahmen (*open reading frames*, ORF) beinhalten (Harden und Munger, 2017). Die Gene der Papillomviren werden fast ausschließlich polycistronisch exprimiert, die transkribierte mRNA trägt also mehrere ORFs. Durch alternatives Spleißen, ein vom Virus genutzter Mechanismus der Wirtszelle, kann das kompakte Genom auf effiziente Weise die verschiedenen Proteine exprimieren (Longworth und Laimins, 2004). Die *early region* (E) im Genom trägt bis zu sieben, die *late region* (L) zwei ORFs. Die viralen Proteine werden entsprechend der genomischen Region als E- und L-Proteine bezeichnet. Der dritte, dazwischenliegende und nichtkodierende DNA-Abschnitt des Genoms wird als *long control region* (LCR) oder *non-coding region* (NCR) bezeichnet (Zheng und Baker, 2006).

#### 1.2.5 Die Proteinexpression im Verlauf des viralen Lebenszyklus

Für die initiale virale Genomamplifikation nach Infektion nutzen die Viren den Teilungsmechanismus der undifferenzierten Keratinozyten in der basalen Hautschicht. Diese Zellen müssen folglich primär infiziert werden, um eine Persistenz der Viren zu ermöglichen (Harden und Munger, 2017). In der frühen Phase des viralen Lebenszyklus werden zunächst die ORFs E1 und E2 exprimiert: Die ATP-abhängige DNA-Helikase E1 sowie die Transaktivatorproteine E2 bilden zusammen mit Replikationsenzymen der Wirtszelle einen Komplex am *origin-of-replication*. Dieser Komplex entwindet und repliziert in der Folge das virale Genom. Es werden zunächst ca. 50-400 Genomkopien hergestellt. Die Genome liegen in

dieser Phase episomal vor, sind also nicht in die Wirts-DNA integriert (Modrow et al., 2010, S. 510).

Mit fortschreitender Differenzierung der Zelle steigt die virale Genomamplifikation. Diese in der G1-Phase befindlichen Zellen teilen sich normalerweise nicht mehr, müssen also von den Viren modifiziert werden, um weiterhin die notwendigen replikatorisch wirkenden Enzyme zu stellen. Dafür verantwortlich sind die Proteine E6 und E7 aufgrund ihrer Interaktion mit den zellulären Proteinen p53 und dem Retinoblastomprotein (pRb). E7 bindet einerseits direkt an das pRb, außerdem an Inhibitoren (p16, p21) von cyclin-abhängigen Kinasen 4 und 6 (CDK4/6), welches die Phosphorylierung von pRb zur Folge hat. Beide Wege führen dazu, dass die an pRb gebundenen E2F-Transkriptionsfaktoren (E2F) freigesetzt werden. Von pRb gelöste E2F induzieren den Übergang aus der G1-Phase in die S-Phase, die Zelle wird somit wieder replikatorisch aktiv (Munger und Howley, 2002, zur Hausen, 2002). E6 markiert das p53-Protein für die Ubiquitin abhängige proteasomale Degradierung, woraufhin p53 seine antiproliferative und pro-apoptotische Wirkung verliert (Scheffner et al., 1990, 1993).

Im fortgeschrittenen Differenzierungsgrad der Wirtszelle verändert sich das zelluläre Milieu, in dessen Folge sich transaktivierende Mechanismen in der E- und L-Region des viralen Genoms verstärken. Dessen Kopienanzahl steigt durch eine erhöhte Replikationsrate über tausendfach an (Modrow et al., 2010, S. 511). Die Strukturproteine (L1 und L2) bilden zusammen das Kapsid der Viren und werden erst in der späten Phase des viralen Zyklus synthetisiert. Die L1 *major capsid proteins* ordnen sich in Pentameren an. Insgesamt 72 Pentamere mit jeweils einem L2 *minor capsid protein* bilden das morphologisch ikosaedrisch organisierte Kapsid (Doorbar und Gallimore, 1987, Finnen et al., 2003). Die viralen Genome fügen sich mit den Strukturproteinen L1 und L2 in der Wirtszelle zu Viruspartikeln zusammen, bevor diese dann durch den natürlichen Zelltod freigesetzt werden. Dem von E4 kodierten Protein wird dabei eine Rolle zugeschrieben, in der es durch Wechselwirkungen mit dem Cytokeratingerüst die Freisetzung der Viruspartikel zusätzlich beeinflusst (Doorbar, 2013).

Als Dimer verfügt das E2-Protein über verschiedene Funktionen. Es besitzt eine DNA-bindende Domäne (C-Terminus) und eine transaktivierende Domäne (A-Terminus) (Hegde, 2002). E2 bindet an verschiedene Promotorelemente in der long control region. Am origin of replication interagiert es mit E1 und unterstützt die Replikation, zudem koordiniert es die Weitergabe der Virusgenome bei der Zellteilung auf die Tochterzellen. Durch alternatives Spleißen kann die am A-Terminus verkürzte Variante E2-Tr gebildet werden. Sie bindet an die

DNA ohne transaktivierende Wirkung und blockiert somit als Repressor die Transkription. Dies geschieht konditionell autoregulierend je nach Proteinkonzentration für die E2-Region, sowie transrepressiv für die E6 und E7 Region (Modrow et al., 2010, S. 503 f., Zheng und Baker, 2006).

### **1.2.6 Der Pathomechanismus von E6 und E7 in der Karzinogenese**

Für die HR-HPV Typen ist den Proteinen E6 und E7 in Kombination eine immortalisierende und transformierende Wirkung auf Keratinozyten und Fibroblasten nachgewiesen worden (Hawley-Nelson et al., 1989). Die zuvor beschriebene Bindung von E6 an das p53-Protein sowie von E7 an pRb und CDK-Inhibitoren p16(INK4a) und p21 und dadurch induzierte Proliferation ist für die Karzinogenese von entscheidender Bedeutung. Hinzu kommen noch einige weitere Pathomechanismen: Die Degradierung von p53 durch E6 führt vermehrt zu DNA-Schäden und genetischer Instabilität der Wirtszelle, dessen Folge die Transformation der Zelle sein kann. Darüber hinaus ist E6 in der Lage, die zelluläre Telomerase zu aktivieren und damit die Lebensdauer der Wirtszelle zu verlängern. Die generell vorhandenen proliferativen Effekte von E6 und E7 werden demnach durch immortalisierende und transformierende Wirkungen ergänzt (Ganguly und Parihar, 2009, Munger und Howley, 2002, zur Hausen, 2002). Diese Pathomechanismen werden durch eine Überexpression von E6 und E7 verstärkt, welche durch die Integration des viralen Genoms in die Wirts-DNA hervorgerufen werden kann. Bei der Integration der ringförmigen viralen DNA, rupturiert diese bevorzugt in der E1/E2 Region. Dadurch wird in den meisten Fällen das ORF E2, gelegentlich auch E1 zerstört. Durch die nun fehlende transrepressive Wirkung von E2 auf E6 und E7 kommt es zu einer Überexpression dieser Onkoproteine (Modrow et al., 2010, S. 515). Neben dieser integrierten Form der viralen DNA, sind in Tumorzellen auch rein episomal oder gemischt, integriert und episomal vorliegende Formen nachgewiesen worden. Die Integration des viralen Genoms in die Wirts-DNA ist also keine Voraussetzung für die Karzinogenese, dennoch ist sie in den meisten Fällen vorzufinden (Koskinen et al., 2003).

### **1.2.7 HPV-Impfstoffe**

Der erste HPV-Impfstoff ist seit dem Jahr 2006 auf dem europäischen und amerikanischen Markt zugelassen und erhältlich. Er ist als quadrivalenter Impfstoff, immunisierend für die HPV-Genotypen 6, 11, 16 und 18 entwickelt worden. In der weiteren Entwicklung folgte ein bivalenter Impfstoff (HPV16, 18). In Deutschland ist im Jahr 2007 schließlich die allgemeine

Empfehlung der ständigen Impfkommision (STIKO) zur Impfung für Mädchen im Alter von 12 bis 17 Jahren ausgesprochen worden. Die neueste Generation der HPV-Vakzine ist ein um weitere HR-Typen ergänzter nonavalenter Impfstoff (HPV6,11,16,18,31,33,45,52,58) und besitzt seit 2016 die Zulassung (Schneede, 2017).

Die Vakzine setzen sich aus *Virus like particles* (VLP) zusammen, bestehend aus den Strukturproteinen L1 der jeweiligen Subtypen. Eine Vakzinierung mittels dieser VLP führt zur typspezifischen Antikörperbildung gegen das entsprechende Kapsidprotein, nicht jedoch gegen das virale Genom. Eine Neuinfektion im Epithelium kann dadurch präventiv verhindert werden, therapeutische Wirksamkeit bei bestehender Infektion ist nicht gegeben. Es zeigt sich mittlerweile in den Follow-up Untersuchungen und Titerbestimmungen von Patientinnen, welche mit dem bivalenten Impfstoff die Immunisierung gegen HPV16 und HPV18 erhalten haben, dass aufgrund der hohen Kreuzreaktivität der VLP auch eine effektive Immunisierung von 80-90% gegen drei weitere häufig vorkommende HPV-Genotypen (31,33,45) zu erwarten ist (Wheeler et al., 2012). Der deutlich günstigere bivalente Impfstoff ist also weiterhin als vertretbare und wirtschaftlich sinnvolle Alternative, gerade in bevölkerungsreichen Entwicklungsländern zu betrachten (Brotherton, 2017). Ein nicht zu unterschätzender Nachteil dieses bivalenten Impfstoffes ist jedoch der fehlende Schutz gegen benigne Hautveränderungen, induziert durch LR-Typen 6 und 11.

In Deutschland herrscht nur eine mäßige Bereitschaft unter jungen Mädchen, sich gegen HPV impfen zu lassen: Im Jahr 2015 lag die Impfquote der 17-jährigen Mädchen bei 44,6% (Krause et al., 2018). Epidemiologische Studien zeigen, dass damit keine Herdenprotektion der Gesellschaft zu erreichen ist, da die Impfquote hierfür höher als 70% betragen muss. Homosexuelle Männer profitieren ebenfalls nicht von der HPV-Impfung von Mädchen. Nachdem in Deutschland über ein Jahrzehnt die Empfehlung zur Impfung ausschließlich junge Mädchen einschloss, gilt nun seit dem Jahr 2018 die allgemeine Empfehlung der STIKO sowohl für Mädchen als auch für Jungen im Alter von 9-14 Jahren, um den genannten Problematiken entgegenzuwirken (Klug et al., 2018).

### **1.3 Sekretorische Antileukoproteinase**

Die sekretorische Antileukoproteinase (SLPI) ist ein nicht-glykosyliertes, einsträngiges Protein mit einem Molekulargewicht von 11,7 kDa und einer Länge von 107 Aminosäuren (Kikuchi et al., 1998). Dieser Serinproteaseinhibitor wird in vielen verschiedenen Körperzellen exprimiert,

u. A. in Epithelzellen und Immunzellen wie Makrophagen, neutrophile Granulozyten oder B-Lymphozyten (Abe et al., 1991, Franken et al., 1989, Jin et al., 1997). SLPI hat eine protektive Wirkung in Epithelien, da es die Zellen durch Inhibition der neutrophilen Elastase vor endogener Proteolyse schützt (Hiemstra, 2002). Außerdem sind für SLPI antiinflammatorische, antibakterielle, antifungale und antivirale Eigenschaften beschrieben worden (Doumas et al., 2005).

Die Rolle von SLPI in der Tumorgenese ist nicht eindeutig geklärt, es wird aufgrund veränderter Expressionslevel jedoch als Tumormarker diskutiert (Devoogdt et al., 2004). In der Literatur finden sich teils kontroverse Aussagen, welche die SLPI-Expressionslevel mit der Metastasierung von Tumoren in Korrelation stellen. So zeigen Cheng und Mitarbeiter (2008) eine gesteigerte SLPI-Expression bei invasiven Magenkarzinomen, insbesondere solchen mit Lymphknotenmetastasen. Dem gegenüber stehen die Ergebnisse von Cordes und Mitarbeitern (2011), die eine negative Korrelation zwischen den SLPI-Expressionslevel und der Metastasierung von Karzinomen der Kopf- und Halsregion beschreiben.

Hoffmann und Mitarbeiter (2013) zeigen in vorangegangenen Arbeiten an Kopf-Hals-Karzinomen, dass eine erhöhte SLPI-Expression häufig mit einer fehlenden HPV-Infektion korreliert. Geringe SLPI-Expressionslevel finden sich wiederum regelmäßig in Anwesenheit einer HPV-Infektion. In derselben Studie ist an Proben gesunder Mukosa von Rauchern im Vergleich zu denen von Nichtrauchern eine erhöhte SLPI-Expression festgestellt worden. Erstmals ist hier demnach die Herabregulierung von SLPI mit der HPV-Infektion in Verbindung gesetzt worden, möglicherweise induziert durch exogene Faktoren wie dem Tabakkonsum.

In weiteren *ex vivo* Versuchen ist durch Nikotinbedampfung eine nikotininduzierte gesteigerte Genexpression des SLPI sowie von dessen spezifischen Rezeptor Annexin A2 gezeigt worden (Quabius et al., 2014). Daraus ergibt sich die Hypothese, dass eine nikotininduzierte gesteigerte SLPI-Expression eine protektive Wirkung auf die HPV-Infektion der oropharyngealen Mukosa besitzt.

#### **1.4 Annexin A2**

Das Strukturprotein Annexin A2 ist ein multifunktionales Calcium- und Phospholipidbindeprotein, welches von nahezu allen Zellen im menschlichen Körper exprimiert wird. AnxA2 liegt im Zytoplasma als Monomer vor, membranständig bildet es

zusammen mit der Untereinheit S100A10 ein Heterotetramer (A2t) (Gerke und Moss, 2002, Waisman, 1995). Als membranständiges Protein trägt A2t zu einigen wichtigen zellulären Prozessen bei, dazu zählen u. A. die Endozytose, Exozytose, Organisation der Zellmembran und der Ionentransport (Bharadwaj et al., 2013, Rescher und Gerke, 2004). A2t stellt einen Rezeptor für eine Vielzahl endogener und exogener Stoffe dar, unter anderem auch für SLPI (Ma et al., 2004). AnxA2 als Monomer besitzt regulatorische Funktionen durch die Fähigkeit RNA zu binden (Bharadwaj et al., 2013).

AnxA2 wird von einigen humanpathologischen Viren in unterschiedlichen Phasen der viralen Lebenszyklen genutzt. Während AnxA2 beim Hepatitis C-Virus (Saxena et al., 2012) und Influenza A-Virus (LeBouder et al., 2008) zur viralen Replikation beiträgt, nutzen andere Viren wie das Enterovirus 71, das Zytomegalievirus und humane Papillomviren die membranständige Form A2t zur Zellanheftung und zum Zelleintritt (Raynor et al., 1999, Taylor et al., 2018, Yang et al., 2011). Das Papillomvirus bindet hierbei an die S100A10 Untereinheit, wie eine *in vitro* Studie von Woodham und Mitarbeitern (2012) zeigen konnte. Die kompetitive Hemmung, also das Besetzen der Bindungsstelle von A2t durch SLPI verringerte in dieser Studie die Infektion der Zellen mit dem HP-Virus. Es kann also angenommen werden, dass A2t den spezifischen Rezeptor stellt, über den die HP-Viren bei der Infektion in die Zelle eintreten. Die Annahme der kompetitiven Hemmung von A2t unterstützt die oben genannte Hypothese bezüglich der protektiven Wirkung einer gesteigerten SLPI-Expression auf die HPV-Infektion.

## 1.5 Ziele der Arbeit

Die beschriebenen grundlegenden Sachverhalte lassen sich für die Zielsetzung dieser Arbeit demnach in wie folgt zusammenfassen: Tabakrauch induziert in der oropharyngealen Mukosa eine erhöhte Expression des SLPI, welches an das Rezeptorprotein AnxA2 bindet. AnxA2 wiederum stellt ebenso einen membranständigen Modulator für HPV dar. Eine durch das Rauchen induzierte erhöhte SLPI-Expression führt nun dazu, dass vermehrt SLPI an die Rezeptoren AnxA2 bindet und diese dadurch für HPV als exogenen Liganden blockiert werden. Da selbst bei Rauchern keine vollständige zelluläre Sättigung mit SLPI stattfindet, kann auch bei dieser Patientengruppe eine HPV-Infektion nicht ausgeschlossen werden und somit HPV-assoziierte Karzinome auftreten. Ebenso gibt es umgekehrt bei Nichtrauchern Fälle von HPV-unabhängigen Karzinomen. Ähnliche Beobachtungen wie für das Kopf-Hals-Karzinom zur Korrelation der SLPI-Expression und HPV-Infektion, gibt es für Analkarzinome bei HIV-positiven Männern (Nicol et al., 2016), wohingegen vergleichbare Studien für die Tumore des

weiblichen Genitaltrakts zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Dissertation in der Fachliteratur nicht zu finden sind.

Für tiefergreifende Erkenntnisse des Zusammenspiels zwischen SLPI, AnxA2, dem Rauchverhalten der Patienten, und deren Einfluss auf die HPV-Empfänglichkeit, untersuchen wir in dieser Studie Gewebeproben von Vulvakarzinomen auf entsprechende Parameter. Diese Tumorentität ist charakterisiert durch eine gewebsspezifische hohe HPV-Prävalenz, ähnlich wie in der Kopf- und Halsregion.



## **2. Fragestellung**

In dieser Arbeit sollen die Zusammenhänge zwischen dem Rauchverhalten der Patientinnen, der SLPI-Expression in Gewebeproben von Vulvakarzinomen und dem HPV-Status dieser Tumore genauer erörtert werden. Darüber hinaus sollen Überlebensdaten aus dem vorhandenen Patientinnenkollektiv erstellt werden, anhand derer spezifische klinische Prognosen für das Vulvakarzinom unter Betrachtung des HPV-Status, der SLPI-Expression und des Risikofaktors Rauchen gegeben werden können. In dieser Arbeit wird dabei auf folgende Fragen Bezug genommen:

1. Wie groß ist der Anteil an HPV-positiven Vulvakarzinomen im untersuchten Patientenkollektiv, und wie verhält sich dieser im Vergleich zu bisher beschriebenen HPV-Prävalenzen?
2. Gibt es eine Korrelation zwischen dem Rauchverhalten und einer gesteigerten SLPI-Expression in den Gewebeproben der Vulva?
3. Wie stellt sich der Zusammenhang zwischen den SLPI-Expressionslevel und dem HPV-Status der Vulvakarzinome dar?
4. Wie verhalten sich die Überlebensdaten in Form von progressionsfreiem Überleben und Gesamtüberleben bezüglich der vorliegenden Parameter wie HPV-Status, SLPI-Expression und positiver Rauchanamnese.
5. Welche prognostischen Konsequenzen können aus den gewonnenen Erkenntnissen gezogen werden?

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Material**

##### **3.1.1 Patientinnenkollektiv und Gewebeproben**

Die Gewebeproben stammen aus einem Patientinnenkollektiv der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (UKSH). Die Patientinnen wurden hier zwischen 1982 und 2011 aufgrund ihres Vulvakarzinoms aufgenommen und behandelt. Das Alter bei Erstdiagnose reichte von 26,3 bis 93,2 Jahren. Der Altersmedian lag bei 60,1 Jahren. Die Nachuntersuchung wurde meist ambulant durch niedergelassene Gynäkologen durchgeführt, das Follow-up der Patientinnen endete im August 2017 oder mit deren vorzeitigen Tod. Das Rauchverhalten wurde anamnestisch festgestellt und die Patientinnen anhand dessen in Raucherinnen oder Nichtraucherinnen eingeteilt. Formalin-fixierte Paraffin-eingebettete (FFPE) Gewebeproben dieser histopathologisch gesicherten Vulvakarzinome sind uns vom Institut für Pathologie des UKSH zur Verfügung gestellt worden. Die Zustimmung aller Patientinnen für die Forschung an ihren Gewebeproben ist vorhanden, ebenso hat die Studie durch die Ethikkommission ein positives Votum (D 483/17) zu der Durchführung erhalten.

##### **3.1.2 Datenerhebung durch Anamnese und Nachsorge**

Die Anamnesedaten, insbesondere die Rauchanamnese, sind aus archivierten digitalisierten Anamnesebögen entnommen worden, welche über das Orbis Klinikinformationssystem (AGFA Healthcare, Bonn) mit der entsprechenden Berechtigung zugänglich sind. Die Patientinnen waren meist nur zur primären Tumorbehandlung in der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des UKSH, daher fehlte in vielen Fällen eine Dokumentation über Nachsorgeuntersuchungen und den weiteren Verbleib der Patientinnen. Hierzu ließen sich in den meisten Fällen die Hausärzte oder weiterbehandelnden niedergelassenen Gynäkologen kontaktieren, mit deren Auskünften dann die Follow-up Daten vervollständigt werden konnten. Insgesamt stehen die Daten von 99 Patientinnen zur Verfügung, die sich jeweils den analysierten Gewebeproben zuordnen lassen.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Extraktion der Nukleinsäuren

Die DNA- und RNA-Extraktion erfolgte simultan mittels dem ExpressArt Mag FFPE RNA+DNA ready kit (AmpTec GmbH, Hamburg) nach Herstellerangaben. Die extrahierte DNA wird zur Bestimmung des HPV-Status und HPV-Genotyps genutzt, die RNA zur Analyse der Expression verschiedener Gene.

Als Ausgangsmaterial dienen je Probe 4-6 FFPE-Gewebeschnitte von jeweils 10 µm Dicke. Die Gewebeschnitte werden zunächst in 2ml Reaktionsgefäßen über Nacht bei -80°C gelagert und anschließend mit 0,5 ml *FFPE Clear* Lösung bei 80 °C für 1 min inkubiert. Hiernach werden dem Reaktionsgemisch 0,5 ml Lysepuffer, 30 µl Proteinase K und 5 µl NucleoGuard hinzugefügt. Es folgt die Inkubation im Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg) bei 55 °C und 1000 rpm. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wird der ein Aliquot entnommen und zur RNA-Extraktion weiterverarbeitet. Die DNA wird für weitere 15 Stunden inkubiert. Die RNA und DNA werden von nun an getrennt weiterverarbeitet.

Die folgenden Schritte gleichen sich für die Reaktionswege der DNA und RNA nach deren Auftrennung: Dem Proben werden 65 µl der mitgelieferten Demodification Solution (DeS) hinzugefügt und auf dem Vortex-Genie®2 miteinander vermischt. Es folgt eine weitere Inkubation für 20 min bei 80 °C und 1000 rpm im Thermomixer, direkt im Anschluss die Abkühlung für 3 min auf Eis. Danach wird das Lysat für 3 min bei 13 000 rpm zentrifugiert (Centrifuge 5418, Eppendorf, Hamburg). Von der wässrigen mittleren Phase werden 220 µl in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und 450 µl der zuvor angesetzten magnetischen *bead working solution* hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wird für 5 min bei Raumtemperatur und 750 rpm im Thermomixer inkubiert, danach wird es magnetisch separiert und der Überschuss verworfen. Die Proben werden nun in zwei Waschdurchgängen mit jeweils 400 µl Isopropanol (70%) gemischt, erneut magnetisch separiert und der Überschuss verworfen. Es folgt eine weitere Inkubation für 2 min bei 900 rpm.

Der nächste Arbeitsschritt ist die Verdauung zu der jeweils gewünschten Nukleinsäure. Für die Extraktion der RNA werden 22 µl *DNase working solution* hinzugegeben, für die Extraktion der DNA entsprechend 22 µl *RNase working solution*. Es folgt eine 15-minütige Inkubation im Thermomixer bei 750 rpm und Raumtemperatur. Anschließend wird 180 µl Lysepuffer verwendet um die RNase/DNase zu inaktivieren. Zwei weitere Waschdurchläufe mit jeweils

400 µl Isopropanol (70%) und magnetischer Separation sind nötig, dann wird die DNA bzw. RNA durch Hinzufügen von 30 µl 95 °C heißem Wasser und Zentrifugation bei 13 000 rpm (Centrifuge 5418, Eppendorf, Hamburg) aufgereinigt. Das Produkt ergibt ca. 30 µl isolierte RNA bzw. DNA. Bis zur weiteren Verwendung kann die extrahierte Nukleinsäure bei -80° C gelagert werden.

### **3.2.2 Bestimmung der Nukleinsäurenkonzentration**

Die Konzentration der Nukleinsäure sowie deren Qualität wurde mithilfe der Absorptionsspektroskopie gemessen, für die Nukleinsäuren gilt hierbei ein Absorptionsmaximum von 260 nm. Das Spektralphotometer Nanodrop 1000 (PeqLab, Erlangen) wurde für die Konzentrationsbestimmung verwendet, der Absorptionswert 1 steht für eine Konzentration von 50 ng/µl DNA. Für RNA gilt ein Absorptionswert 1 bei einer Konzentration von 40 ng/µl. Vor der Messung wurde das Gerät entsprechend kalibriert.

### **3.2.3 cDNA-Synthese**

Die extrahierte RNA ist für die weitere molekularbiologische Analyse in die komplementäre einsträngige cDNA überführt worden. Je Probe sind 200 ng RNA in cDNA transkribiert worden, dazu wurde das ExpressArt® TR cDNA synthesis kit (AmpTec GmbH, Hamburg) nach Herstellerangaben verwendet.

Zunächst werden hierbei 4 µl RNA-Lösung mit 2,4 µl DEPC-Wasser, 0,8 µl Desoxynukleosidtriphosphate (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) und 0,8 µl des mitgelieferten TR-Primer vermischt und für 4 min bei 65 °C in einem Thermocycler (T-1, Biometra, Göttingen) inkubiert (vgl. Tabelle 3.1, Reaktionsgemisch 1). Anschließend wird das Gemisch sofort für 5 min auf Eis heruntergekühlt. Nun werden weitere 4,2 µl DEPC-Wasser, 3,2 µl des mitgelieferten Reaktionspuffers, 0,3 µl des RNase Inhibitors und 0,3 µl Reverse Transkriptase hinzugegeben (vgl. Tabelle 3.1, Reaktionsgemisch 2). Anschließend erfolgt eine Inkubation im Thermocycler bei der Schrittweise die Temperatur erhöht wird (45 min bei 37° C, 15 min bei 45° C, 5 min bei 50° C, 10 min bei 70° C und danach die sofortige Abkühlung auf Eis. In Tabelle 3.1 sind die verwendeten Reagenzien der cDNA-Synthese dargestellt.

**Tabelle 3.1** Reaktionsgemische des ExpressArt® TR cDNA Synthese Kit

Reagenz	Menge
Reaktionsgemisch 1	4 µl
• DEPC-Wasser	2,4 µl
• dNTP-Gemisch	0,8 µl
• Tr-Primer	0,8 µl
Reaktionsgemisch 2	8 µl
• DEPC-Wasser	4,2 µl
• Reaktionspuffer	3,2 µl
• RNase Inhibitor	0,3 µl
• Reverse Transkriptase	0,3 µl

Das gewonnene Produkt muss zur weiteren Analyse noch aufgereinigt werden. In Vorbereitung hierfür werden 3 ml der mitgelieferten *Wash Solution* in 15 ml reinen Ethanol gelöst. Das cDNA Reaktionsprodukt (16 µl) wird mit 250 µl *Binding Solution* und 34 µl DEPC-Wasser vermischt und in ein DNA-Reinigungssäulchen gegeben, anschließend für 1 min bei 10 000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Nun werden zwei Waschläufe durchgeführt, hierfür werden jeweils 200 µl der in Ethanol gelösten *Wash Solution* in die Reinigungssäulchen pipettiert und für 1 min bei 10 000 rpm zentrifugiert, der Durchfluss wird jeweils verworfen. Die Reinigungssäulchen mit dem enthaltenen Lysat werden in frische 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und anschließend mit 25 µl Elutionspuffer für 2 min inkubiert, dann für 1 min bei 10 000 rpm zentrifugiert. Dieser Vorgang wird noch einmal wiederholt, dann ist die cDNA-Aufreinigung abgeschlossen. Die cDNA kann sofort für weitere Analysen verwendet oder für eine spätere Weiterverarbeitung bei -20° C gelagert werden.

### 3.2.4 Die Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Amplifikation beliebiger Nukleinsäureabschnitte. Das Grundprinzip der PCR ist erstmals 1983 beschrieben worden (Mullis et al., 1986).

Die PCR besteht meist aus 20-40 Zyklen, diese Zyklen werden durch Temperaturveränderungen im Thermocycler gesteuert. Ein Zyklus bedeutet jeweils die Wiederholung derselben drei Schritte: Zunächst wird die DNA durch Erhitzen auf 95 °C denaturiert, die Wasserstoffbrückenbindungen der Doppelhelix werden gespalten und die

Nukleinsäuren liegen nun als entwundene Einzelstränge vor (Denaturierung). Während der Primerhybridisierung (*Annealing*) wird durch das Abkühlen auf 50-60 °C die Bindung der Primer an ihre spezifische Sequenz auf den DNA-Einzelsträngen herbeigeführt. Diese Primer bilden den Startpunkt für die DNA-Polymerase. Die nun folgende Anhebung der Temperatur auf 72 °C im letzten Schritt des PCR-Zyklus führt zur enzymatischen Aktivität der DNA-Polymerase, komplementäre Stränge werden entlang der vorhandenen DNA neu synthetisiert (Elongation). Die DNA-Synthese verläuft hierbei von 3' in 5' Richtung. Es werden in der Regel zwei verschiedene Primersequenzen verwendet, um beide Stränge der zu amplifizierenden Gensequenz jeweils am 3'-Ende komplementär binden zu können. In der Elongation findet eine spezielle DNA-Polymerase Verwendung, welche ursprünglich aus dem, in heißen Quellen lebenden, Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen wurde und nun kommerziell erhältlich ist. Diese Taq-Polymerase übersteht auch das mehrmalige Aufheizen im Rahmen der Denaturierung auf 95 °C.

Durch die exponentielle Vervielfachung der DNA können innerhalb kurzer Zeit sehr viele Kopien eines Nukleinsäureabschnitts erzeugt werden. Es werden zur Kontrolle und Qualitätssicherung bei jeder PCR Positiv- und Negativkontrollen durchgeführt. Die Positivkontrollen werden mit kommerziell erhältlichen Gensequenzen durchgeführt, sie dienen zur Überprüfung des Reaktionsgemischs und der korrekten Einstellung von Temperatur und Zeitintervallen. Sollte mit der Positivkontrolle keine Amplifikation erreicht werden, deutet dies auf labortechnische Fehler hin. Die Negativkontrolle wird mit Nuklease-freiem Wasser durchgeführt, eine Amplifikation ist nicht zu erwarten und deutet in dem Fall auf eine Kontamination des Arbeitsumfelds hin.

#### **3.2.4.1 Quantitative Echtzeit-PCR**

Die Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) dient zur Amplifikation und gleichzeitig zur quantitativen Analyse eines spezifischen Gens. Möglich wird dies durch den Einsatz des fluoreszierenden Farbstoffes SybrGreen. Dieser Farbstoff bindet an die neu synthetisierten DNA-Doppelstränge während der qPCR und gibt bei erfolgreicher Bindung Fluoreszenzsignale ab. Mit steigender Menge der qPCR-Produkte nimmt die Fluoreszenzintensität zu, welche wiederum in Echtzeit gemessen wird. Hieraus kann nun eine Quantifizierung der qPCR-Produkte hergeleitet werden.

Es wird bei dieser Methode ein Schwellenwert der Fluoreszenz gemessen, der sogenannte Ct-Wert (engl. *Cycle threshold*). Dieser Schwellenwert wird dann erreicht, wenn sich die

Genamplifikation in ihre exponentielle Phase begibt. Je größer die Menge des Ausgangsmaterials ist, also der zu kopierenden DNA, desto früher wird die exponentielle Phase erreicht und desto eher wird der Schwellenwert der Fluoreszenz überschritten. Die Ct-Werte verhalten sich antiproportional zur Menge des Ausgangsmaterials, je mehr DNA anfangs vorhanden ist, desto kleinere Ct-Werte ergeben sich.

Das Reaktionsgemisch der qPCR besteht aus 6,5 µl Nuklease-freiem Wasser, 10 µl ImmoMix (2-fach konzentriert, Bioline, Luckenwalde) und 0,2 µl SybrGreen Farbstoff. Hinzu kommen jeweils spezifische Primer und 2,5 µl cDNA bzw. HPV-DNA. Eine Übersicht des Reaktionsansatzes ist in Tabelle 3.2 gegeben.

**Tabelle 3.2** Reaktionsansatz der 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 RNA/µl) oder HPV-DNA	2,5
Wasser, Nuklease-frei	6,5
Gesamtvolumen	20

#### 3.2.4.2 Die qPCR zur HPV-Detektion

Für den Nachweis von humanen Papillomviren wird die qPCR unter Verwendung von Gewebe DNA als grundlegende Methode verwendet. Im Falle des Vorhandenseins von HPV-DNA, werden genotypisch unspezifische Gensequenzen des Virus amplifiziert. In diesem Arbeitsschritt wird dementsprechend noch nicht zwischen verschiedenen HPV-Typen unterschieden. Die PCR-Produkte werden mittels quantitativer Echtzeit-PCR bestimmt und analysiert (vgl. Kapitel 3.2.4.1). Die qPCR wird in einem Thermocycler (Rotor-Gene RG-3000, Corbett Research, LFT, Wasserburg) durchgeführt, dabei werden 40 Zyklen durchlaufen. Die einzelnen Schritte sind in Tabelle 3.3 aufgelistet.

**Tabelle 3.3** Ablauf der qPCR zur HPV Detektion

Schritt	Zeit in min	Temperatur in °C
1. Initiales Denaturieren	15:00	95
2. 40 Zyklen der RT-qPCR		
2.1 Denaturierung	1:00	95
2.2 Primerhybridisierung	1:00	40
2.3 Elongation	1:00	72
3. Schmelzkurvenanalyse		40 ↗ 95 (5° / s)

Die verwendeten Primer GP5<sup>+</sup>/GP6<sup>+</sup> zielen auf Gensequenzen der L1-Region ab. Die Primersequenzen von GP5<sup>+</sup>/GP6<sup>+</sup> sind in Tabelle 3.4 dargestellt (Remmerbach et al., 2004). Die Genotypisierung bei positivem Ergebnis der HPV-PCR erfolgt durch die DNA-Sequenzierung nach Sanger (vgl. Kapitel 3.2.5).

**Tabelle 3.4** Primersequenzen der GP5<sup>+</sup>/GP6<sup>+</sup> Primer

Primer	Sequenz
GP5 <sup>+</sup>	5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3'
GP6 <sup>+</sup>	5'-GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3'

Die Schmelzkurvenanalyse dient der Bestimmung und Unterscheidung spezifischer PCR-Produkte. Sie wird im Anschluss an die RT-qPCR durchgeführt indem die Temperatur nochmals langsam und kontinuierlich (5° C / s), von der *Annealing*-Temperatur auf 95° C angehoben wird. Hierbei denaturieren die PCR Produkte, je nach Fragmentenlänge, bei einer spezifischen Schmelztemperatur. Es lassen sich Fluoreszenz-Peaks bei bestimmten Temperaturen darstellen, welche charakteristisch für ein PCR-Produkt stehen.

### 3.2.4.3 Die RT-qPCR zur Analyse der SLPI und AnxA2 Genexpression

In diesem Arbeitsschritt soll die Genexpression von SLPI und AnxA2 analysiert werden. Die Proben werden hierzu mittels der quantitativen reversen Transkription PCR (RT-qPCR) analysiert. Im Gegensatz zur qPCR dient bei der RT-qPCR die durch reverse Transkription (vgl. Kapitel 3.2.3) erhaltene cDNA als Ausgangsmaterial. Es werden die genspezifischen *forward* und *reverse* Primer von SLPI und AnxA2 verwendet. Die Primersequenzen sind in Tabelle 3.5 aufgelistet.



**Tabelle 3.5** Primersequenzen für SLPI und AnxA2 cDNA

Primer	Sequenz
SLPI, forward Primer	5'-AATGCCTGGATCCTGTTGAC-3'
SLPI, reverse Primer	5'-AAAGGACCTGGACCACACAG-3'
AnxA2, forward Primer	5'-AACCGACGAGGACTCTCTCA-3'
AnxA2, reverse Primer	5'-CGCTGATCCACTTGGGAACAT-3'

Für die quantitative Analyse der Genexpression durch die RT-qPCR braucht man einen Referenzwert. Dieser lässt sich, wie hier durchgeführt, anhand der *Housekeeping*-Gene 18S rRNA,  $\beta$ -Actin und  $\beta_2$ -Mikroglobulin, für jede Gewebeprobe einzeln bestimmen. *Housekeeping*-Gene werden unabhängig vom Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen exprimiert. Sie sollten also in jeder Probe nachgewiesen und mit dem entsprechenden Primern (Promogene, Berlin) quantifiziert werden können. Hieraus lässt sich dann der *Housekeeping*-Index bilden, welcher später für die Berechnung der Genexpression der Gene SLPI und AnxA2 herangezogen wird.

Die RT-qPCR wird wie die qPCR in einem Thermocycler (Rotor-Gene RG-3000, Corbett Research, LFT, Wasserburg) durchgeführt, dabei werden 40 Zyklen durchlaufen. Die einzelnen Schritte sind in Tabelle 3.6 aufgelistet.

**Tabelle 3.6** Ablauf der RT-qPCR

Schritt	Zeit	Temperatur in °C
1. Initiales Denaturieren	10min	95
2. 40 Zyklen der RT-qPCR		
2.1 Denaturierung	20s	95
2.2 Primerhybridisierung	20s	60
2.3 Elongation	20s	72
3. Schmelzkurvenanalyse		60 ↗ 95 (5° / s)

### 3.2.5 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der HPV-positiven PCR-Produkte, zur Bestimmung des HPV-Genotyps, wurde im Institut für Klinische Molekular Biologie, Kiel durchgeführt. Es wird hier nur das Prinzip der DNA-Sequenzierung nach Sanger (1977) erklärt. Diese Methode ermöglicht die

Bestimmung der Basenabfolge innerhalb eines DNA-Moleküls. Das Prinzip der Sanger-Sequenzierung beruht auf der PCR, jedoch werden dem Reaktionsgemisch zusätzlich fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide (ddNTP) beigefügt. Diese ddNTP sind am 3'-Kohlenstoff-Atom desoxidiert. Werden sie von der Taq-Polymerase während der Elongation in die DNA eingebaut, kommt es zum Kettenabbruch, da für die Phosphatgruppe des folgenden Nukleotids keine freie OH-Gruppe am 3'-Ende des ddNTP zur Bindung zur Verfügung steht. In der Folge entstehen während der Sequenzierungsreaktion für jede Basenposition entsprechend lange DNA-Fragmente, an deren Ende sich ein fluoreszenzmarkiertes ddNTP befindet. Es werden vier verschiedene fluoreszierende Farbstoffe verwendet, welche jeweils mit einem Typ der ddNTPs gekoppelt sind. Dies ermöglicht die spätere Zuordnung und Bestimmung der Gensequenz durch das Messen der Farbstoffe der einzelnen DNA-Fragmente.

#### ***3.2.5.1 Die Kapillarelektrophorese zur Bestimmung der DNA-Sequenz***

In diesem Arbeitsschritt wird die Basenabfolge der untersuchten DNA-Sequenz bestimmt. Dies erfolgt mittels der Kapillarelektrophorese. Hierbei werden die untersuchten Moleküle zunächst der Größe nach aufgetrennt und anschließend anhand ihrer Fluoreszenz detektiert. Die Produkte der Sequenzierungsreaktion wandern in einem oder mehreren Kapillarröhrchen durch ein elektrisches Feld. Je nach Größe, Ladung oder Form variiert dabei die Geschwindigkeit, mit der die Moleküle wandern. Kurze DNA-Fragmente wandern schneller durch die Kapillaren als lange DNA-Fragmente. Am Ende dieser Auftrennung werden die Fluoreszenzfarbstoffe der ddNTPs durch Laserbestrahlung angeregt. Die vier verschiedenen Farbstoffe können dann von einem Detektor gemessen und der entsprechenden Base zugeordnet werden. Ein Computerprogramm bestimmt daraus die Basenabfolge des sequenzierten Gens.

#### ***3.2.5.2 Auswertung der DNA-Analyse***

Für die HPV-Genotypisierung muss die DNA-Sequenz ausgewertet und mit bekannten DNA Sequenzen verglichen werden. Es wird das Online-Programm *Basic local alignment search tool* (BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) angewandt, welches nach der Methode von Altschul und Mitarbeitern (1990) arbeitet. Das Programm vergleicht übereinstimmende Gensequenzen und berechnet die statistische Signifikanz der Zugehörigkeit zu einem bestimmten Genom, in diesem Fall mit dem eines spezifischen HPV-Genotyps.

### 3.2.6 SLPI-Immunhistochemie

Von den paraffinierten Proben werden 4 µm dicke Schnitte zur Bestimmung der SLPI-Proteinexpression immunhistochemisch eingefärbt (Cordes et al., 2011). Zunächst werden die Schnitte entparaffiniert und rehydriert. Durch die Fixierung entstandene Quervernetzungen der Proteine werden durch Erhitzen aufgelöst (Antigendemaskierung). Die Proben werden für 10 min in Methanol mit 1% Wasserstoffperoxid inkubiert, um die endogene Peroxidase zu inaktivieren. Nun erfolgt die einstündige Inkubation mit dem SLPI-Primäranitkörper (LifeSpan BioSciences, Seattle, USA). Anschließend wird der mit Biotin markierte Anti-Maus IgG Sekundärantikörper (Dako, Hamburg) hinzugegeben und für weitere 30 min inkubiert. Nach drei Waschdurchgängen mit einem TBS-Puffer werden die Immunreaktionen mit dem ABC-Vectastain® Peroxidase Kit (Maravai LifeSciences, San Diego, USA) eingefärbt. Die Gegenfärbung erfolgt durch Hämatoxylin nach Mayer (1897). Die gefärbten Schnitte werden hiernach dehydriert und mit dem Permount Medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) eingedeckt. Dies schützt die Schnitte und ermöglicht eine Langzeitlagerung.

Die Auswertung der SLPI-Immunhistochemie wird anhand der modifizierten Kriterien nach Cordes und Mitarbeitern (2011) vorgenommen. Bei 400-facher Vergrößerung werden 300 Zellen in fünf Bereichen des Schnittes beurteilt und der Anteil immunhistochemisch eingefärbter Tumorzellen bestimmt. Ein Anteil von bis zu 5% wird als negativ (-) bewertet. Ein Anteil von 5-30% stellt eine schwach positive (+) SLPI-Expression dar, von 30-75% liegt ein moderat positiver (++) und bei mehr als 75% angefärbter Zellen eine stark positiver (+++) Befund vor. Die Auswertungskriterien sind in Tabelle 3.7 dargestellt.

**Tabelle 3.7** Einteilung der SLPI-Expressionsmuster

SLPI-Expression	Anteil der eingefärbten Zellen
Negativ (-)	< 5%
Schwach (+)	5% - 30%
Moderat (++)	31% - 75%
Stark (+++)	> 75%

### 3.2.7 Statistische Auswertung

Die Analyse der immunhistochemischen Daten werden mit dem zweiseitigen exakten Fischer-Test durchgeführt (SPSS 20.0 Software; IBM SPSS, Armonk, NY, USA). Die Quantifizierung

durch die RT-qPCR erfolgt nach der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (Pfaffl, 2001), dabei werden die mittleren Ct-Werte der ebenfalls analysierten *housekeeping*-Gene verwendet. Für die statistische Analyse der Genexpression von AnxA2 und SLPI werden die Fold-Change Werte nach Pfaffl berechnet. Der exakte Fischer-Test wird angewandt, um Korrelationen zwischen der SLPI Proteinexpression zur HPV-Infektion und dem Rauchverhalten darzustellen (SSPS 20.0 Software).

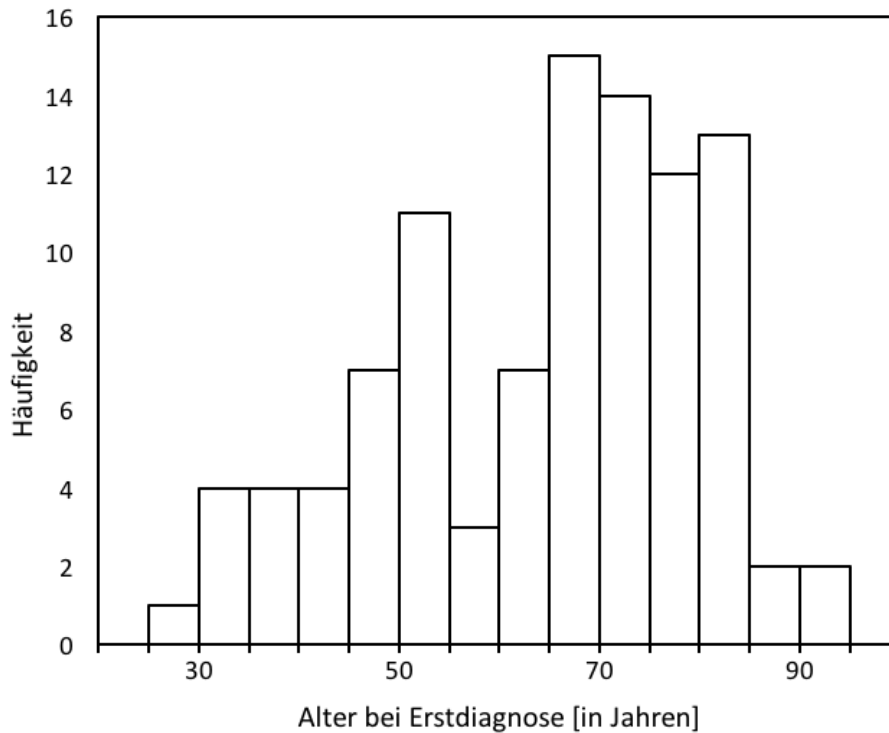
Die gesammelten Follow-up Daten werden anhand des Kaplan-Meier-Schätzers in einer Überlebensfunktion dargestellt (SPSS 20.0 Software). Das Gesamtüberleben (OS) und progressionsfreie Überleben (PFS) bilden die primären statistischen Endpunkte. Es werden jeweils die Zeitspannen gemessen von der Erstdiagnose bis zur letzten durchgeführten Nachsorgeuntersuchung. Das progressionsfreie Überleben endet mit dem Wiederauftreten der Erkrankung, also einem Rezidiv, das Gesamtüberleben endet mit dem Datum des letzten Follow-up (August 2017) oder dem Tod der Patientinnen. Die Überlebensdaten werden verglichen und es wird überprüft welchen Einfluss das Rauchverhalten, der HPV-Status und die SLPI-Expression darauf haben, und ob sich aus diesen Parametern ein prognostischer Wert herleiten lässt. Die Signifikanz der Ergebnisse wird anhand des p-Wertes ( $p \leq 0,05$ ) interpretiert.

## **4. Ergebnisse**

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Arbeit beschrieben und mithilfe von einigen Abbildungen veranschaulicht. Es wird zunächst das Patientinnenkollektiv dargelegt und auf dessen epidemiologischen Eigenschaften eingegangen. Des Weiteren werden die gewonnenen Ergebnisse der statistischen Auswertung erläutert, dabei soll insbesondere auf die, in Kapitel 2 formulierten, Fragestellungen Bezug genommen werden. Der HPV-Status und das Rauchverhalten der Patientinnen werden jeweils mit dem SLPI-Expressionsmuster verglichen. Die Genexpression von SLPI und AnxA2 wird auf den Einfluss von HPV-Status, Tabakkonsum sowie zueinander untersucht. Zuletzt werden die Überlebensdaten der Patientinnen in Form des progressionsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens dargestellt. Diese werden jeweils auf den Einfluss von Parametern wie HPV-Status, SLPI-Genexpression und Rauchverhalten analysiert.

### **4.1 Patientinnenkollektiv**

Das zugrundeliegende Patientenkollektiv besteht aus 99 Frauen, welche im Zeitraum von 1982 bis 2011 am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein aufgrund ihres Vulvakarzinoms in Behandlung waren. Die histologische Untersuchung sicherte bei 8 Patientinnen (8,1%) ein Carcinoma in Situ, bei 40 Patientinnen (40,4%) ein Plattenepithelkarzinom der T1 Kategorie und bei weiteren 51 Patientinnen (51,5%) ein Plattenepithelkarzinom der T2 oder T3 Kategorie, anatomisch jeweils der Vulva zuzuordnen. Insgesamt 33 Patientinnen (33,3%) gaben in der Anamnese an Raucherinnen gewesen zu sein, bei 66 Patientinnen (66,6%) liegt eine negative Rauchanamnese vor. Das Alter der Patientinnen bei Erstdiagnose reicht von 26 bis hin zu 93 Jahren, das mittlere Alter liegt bei 64,9 Jahren. Die Altersverteilung wird in Abbildung 4.1 dargestellt.



**Abbildung 4.1** Altersverteilung der Patientinnen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose. Auf der Abszisse ist das Alter der Patientinnen in Jahren dargestellt, jeweils in Altersgruppen von 5 Jahren zusammengefasst. Auf der Ordinate ist die Häufigkeit je Altersgruppe aufgetragen.

## 4.2 HPV-Nachweis und Bestimmung der HPV-Typen

Für den HPV-Nachweis der 99 untersuchten Gewebeproben wird zunächst die qPCR angewandt, welche mit den Primern GP5<sup>+</sup>/GP6<sup>+</sup> auf die genotypisch unspezifische L1-Region der HPV-DNA zielt. Bei insgesamt 10 Proben (10,1%) verlief dieser Test auf die HPV-DNA positiv. Für alle 10 Gewebeproben ist nachfolgend der Nachweis für die E6/E7 mRNA erbracht worden, somit kann von einer aktiven HPV-Infektion ausgegangen werden. Die Genotypisierung durch die Sequenzierung nach Sanger zeigte in 9 Fällen den HPV-Genotyp 16, in einem Fall den Genotyp 18. Beide Genotypen sind der *high risk* Gruppe zuzuordnen.

## 4.3 Immunhistochemischer SLPI-Nachweis

Der SLPI-Nachweis durch die immunhistochemische Färbung wird an allen 99 Gewebeproben durchgeführt. Die Kriterien für die Bewertung der Färbung ist in Kapitel 3.2.6 beschrieben. Es zeigt sich bei 27 Fällen (27,3%) eine negative SLPI-Expression (SLPI<sup>-</sup>), bei 29 Fällen (29,3%)

eine schwache SLPI-Expression (SLPI+), bei 18 Fällen (18,2%) eine moderate SLPI-Expression (SLPI++) und bei 25 Fällen (25,3%) eine starke SLPI-Expression (SLPI+++).

#### 4.4 Korrelation zwischen dem HPV-Status und der SLPI-Expression

Die Korrelation zwischen dem SLPI-Expressionsmuster und dem HPV-Status wird in Tabelle 4.1 dargestellt. Die HPV-positiven Gewebeproben sind in deren SLPI-Expression in 7 Fällen (70,0%) negativ und in 3 Fällen (30,0%) schwach positiv, jedoch in keinem Fall moderat oder stark positiv. Es zeigt sich eine signifikante inverse Korrelation zwischen dem HPV-Status und der SLPI-Expression ( $p=0,006$ ).

**Tabelle 4.1** Die SLPI-Expression in Korrelation zum HPV-Status ( $p=0,006$ )

	SLPI-	SLPI+	SLPI++	SLPI+++	Gesamt
<b>HPV positiv</b>	7	3	0	0	10
<b>HPV negativ</b>	20	26	18	25	89
<b>Gesamt</b>	27	29	18	25	99

#### 4.5 Korrelation zwischen dem Rauchverhalten und der SLPI-Expression

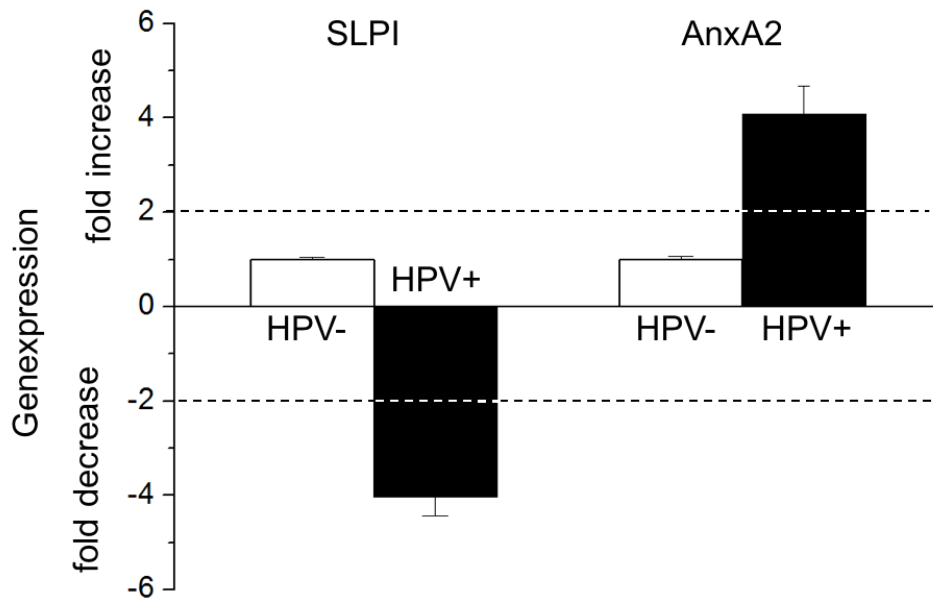
Die Korrelation zwischen dem Rauchverhalten der Patientinnen und dem SLPI-Expressionsmuster wird in Tabelle 4.2 dargestellt. Ähnlich zu den Ergebnissen aus Untersuchungen zu Kopf und Halskarzinomen kann hier eine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem Rauchverhalten der Patientinnen und dem SLPI-Expressionsmuster festgestellt werden ( $p<0,0001$ ). Die SLPI-Expression der 33 Raucherinnen ist in 18 Fällen (54,5%) stark positiv, in 6 Fällen (18,2%) moderat, in 5 Fällen (15,2%) schwach positiv und nur in 4 Fällen (12,1%) negativ. Die SLPI-Expression der 66 Nichtraucherinnen ist hingegen nur in 7 Fällen (10,6%) stark positiv, in 12 Fällen (18,2%) moderat, in 24 Fällen (36,4%) schwach und in 23 Fällen (34,8%) negativ.

**Tabelle 4.2** Die SLPI-Expression in Korrelation zum Rauchverhalten der Patientinnen

	SLPI-	SLPI+	SLPI++	SLPI+++	Gesamt
<b>Raucherin</b>	4	5	6	18	33
<b>Nichtraucherin</b>	23	24	12	7	66
<b>Gesamt</b>	27	29	18	25	99

#### 4.6 Der Einfluss einer HPV-Infektion auf die Genexpression von SLPI und AnxA2

Für alle 99 Gewebeproben wird die Genexpression von SLPI und AnxA2 mittels der RT-qPCR quantitativ analysiert und mit dem HPV-Status verglichen. Die  $\Delta\Delta C_t$ -Werte der Methode nach Pfaffl werden jeweils für die HPV-negativen Fälle als Referenzwert gleich 1 festgelegt. Der sich daraus ergebende *fold change* der HPV-positiven Fälle ist in Abbildung 4.2 dargestellt. Es zeigt sich eine 4,03-fach niedrigere SLPI-Genexpression und eine 4,07-fach höhere AnxA2-Genexpression. Die *fold change* Werte befinden sich jeweils im statistisch signifikanten Bereich von  $>\pm 2$ .



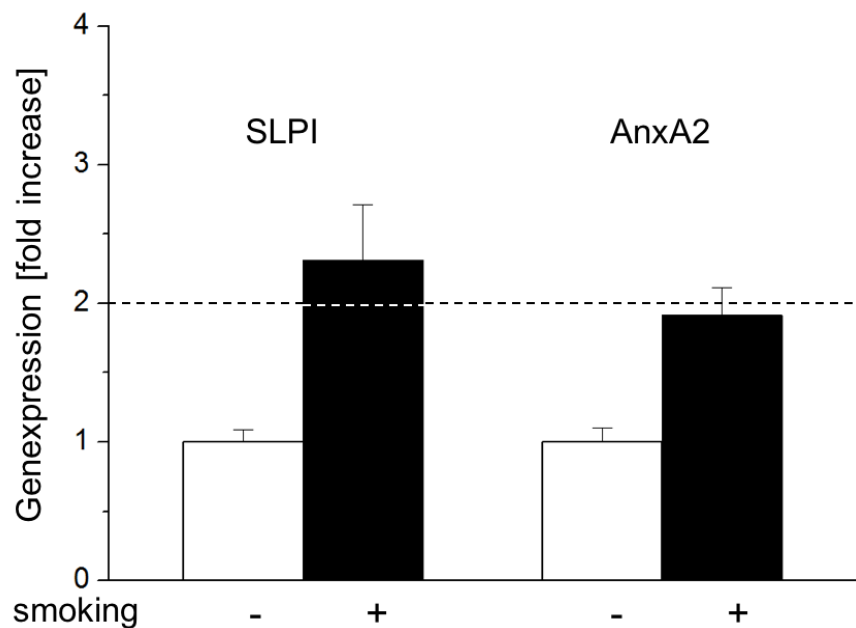
**Abbildung 4.2** Der Effekt einer HPV-Infektion auf die Genexpression von SLPI und AnxA2. Für die HPV-negativen Fälle wird der Ct-Referenzwert gleich 1 festgelegt. Die *fold change* Werte der HPV-positiven Werte sind entsprechend der Berechnung nach Pfaffl (2001) im Vergleich zu sehen. Das Signifikanzniveau ist jeweils durch eine gestrichelte Linie dargestellt und liegt bei  $\pm 2$ .

#### 4.7 Effekt des Rauchverhaltens auf die Genexpression von SLPI und Annexin A2

Die  $\Delta\Delta C_t$ -Werte der Genexpression von SLPI und AnxA2 werden für die Raucherinnen und Nichtraucherinnen zusammengefasst und miteinander verglichen. Es wird für die Raucherinnen



der *fold increase* nach Pfaffl berechnet, dabei bilden die Werte der Gruppe der Nichtraucherinnen jeweils den Referenzwert von 1. Die Ergebnisse dieser Berechnung sind in Abbildung 4.3 dargestellt. Es zeigt sich eine vom HPV-Status unabhängige um das 2,34-fach gesteigerte SLPI-Genexpression in der Gruppe der Raucherinnen. Die Genexpression von AnxA2 ist bei den Raucherinnen um 1,95-fach höher im Vergleich zu den Nichtraucherinnen. Während die gesteigerte SLPI-Genexpression im statistisch signifikanten Bereich  $\geq 2$  liegt, befindet sich der *fold increase* der AnxA2 Genexpression knapp unterhalb der statistischen Signifikanz.

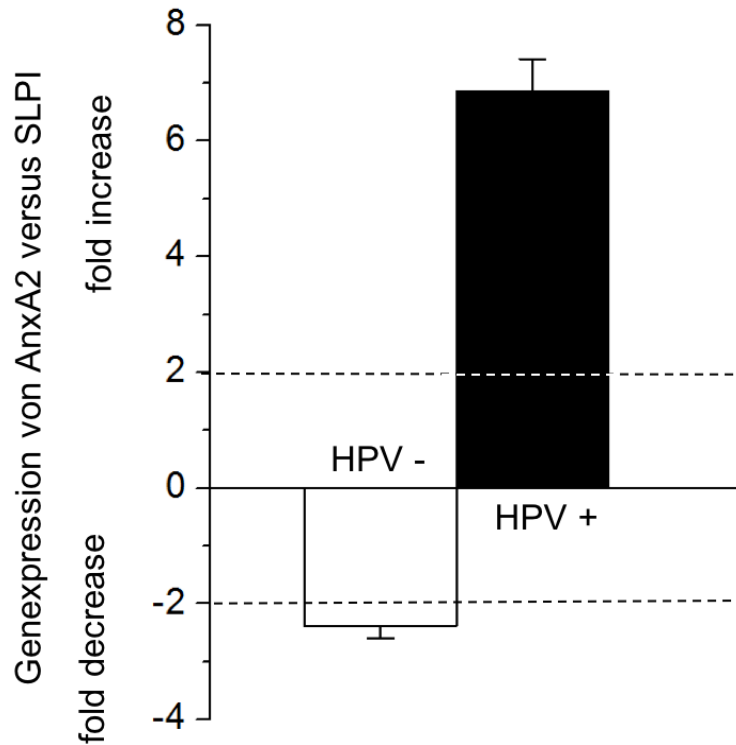


**Abbildung 4.3** Der Effekt des Rauchverhaltens auf die Genexpression von SLPI und AnxA2. Für die Nichtraucherinnen wird der Ct-Referenzwert gleich 1 festgelegt und in Form der weißen Balken dargestellt. Die *fold change* Werte der Gruppe der Raucherinnen Werte sind entsprechend der Berechnung nach Pfaffl (2001) im Vergleich zu sehen und als schwarze Balken dargestellt. Das Signifikanzniveau ist durch die gestrichelte Linie markiert und liegt bei +2.

#### 4.8 Vergleich der Genexpression von SLPI und Annexin A2

Für den Vergleich der Genexpression von SLPI und AnxA2 werden die Daten der HPV-positiven und HPV-negativen Fälle separat betrachtet. Es werden jeweils die *fold change* Werte für die Genexpression von AnxA2 nach Pfaffl berechnet. Der Referenzwert von 1 wird in diesem Fall durch die Ct-Werte der SLPI-Genexpression gebildet. Die Ergebnisse dieser Berechnung sind in Abbildung 4.4 dargestellt. Die HPV-positiven Tumore zeigen eine 6,86-

fach höhere AnxA2 Genexpression im Vergleich zur SLPI Genexpression. Die HPV-negativen Tumore zeigen eine 2,39-fach niedrigere AnxA2 Genexpression im Vergleich zur SLPI Genexpression. Die Ergebnisse dieses Vergleichs befinden sich im statistisch signifikanten Bereich bei *fold change* Werten von über  $\pm 2$ .



**Abbildung 4.4** Die Genexpression von AnxA2 zu der von SLPI im Vergleich. Die HPV-positiven und HPV-negativen Fälle werden separat betrachtet und deren *fold change* Werte von AnxA2 zu SLPI dargestellt. Die Ct-Werte der SLPI Genexpression bilden den Referenzwert von 1. Die *fold change* Werte der AnxA2 Genexpression sind entsprechend der Berechnung nach Pfaffl (2001) im Vergleich zu sehen. Das Signifikanzniveau ist jeweils durch eine gestrichelte Linie dargestellt und liegt bei  $\pm 2$ .

#### 4.9 Die Überlebensdaten im Gesamtüberleben und progressionsfreien Überleben

Das Patientinnenkollektiv wird für die Betrachtung der Überlebensdaten in unterschiedliche Gruppen aufgeteilt, welche dann anhand des progressionsfreien Überlebens und Gesamtüberlebens miteinander verglichen werden können. Die Daten ergeben sich aus den Nachsorgeaufzeichnungen, der Beobachtungszeitraum endet mit der letzten bekannten Nachsorgeuntersuchung oder mit dem Tod der Patientinnen. Das Gesamtüberleben endet mit

dem Tod, das progressionsfreie Überleben endet mit einem Rezidiv oder dem Tod der Patientinnen.

Von 99 Patientinnen waren zum Ende des Beobachtungszeitraumes (August 2017) noch 37 am Leben (37,4%). Insgesamt 32 Patientinnen (32,3%) sind verstorben, davon starben 13 Patientinnen (13,1%) durch unmittelbare Folgen des Tumors. Bei den übrigen 30 Patientinnen endete das Follow-up zu einem früheren Zeitpunkt, ohne dass es weitere Informationen über deren Verbleib oder deren Tod gibt.

Das Gesamtüberleben des Patientinnenkollektiv beträgt nach 3 Jahren 77,6%, nach 5 Jahren 72,3% und nach 10 Jahren 55,4%. Die Überlebensdaten des Gesamtüberlebens, aufgeteilt nach verschiedenen Parametern wie Rauchverhalten, HPV-Status und SLPI-Expressionsmuster sowie N- und T-Klassifizierung sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst.

**Tabelle 4.3** Gesamtüberleben aufgeteilt nach Rauchverhalten, SLPI Expressionsmuster, HPV-Status sowie T- und N-Klassifizierung

	n	3 Jahre [%]	5 Jahre [%]	10 Jahre [%]	Mittelwert [Jahre]	p-Wert
Nichtraucherinnen	66	78,5	70,5	51,7	7,13	0,217
Raucherinnen	33	78,8	75,8	62,7	7,54	
SLPI negativ/ schwach	56	78,6	71,2	52,0	7,32	0,502
SLPI moderat/ stark	43	78,7	73,7	60,2	7,19	
HPV-negativ	89	78,4	71,4	55,8	7,31	0,972
HPV-positiv	10	80,0	80,0		6,90	
Carcinoma in situ	8	87,5	87,5	87,5	11,75	0,027
T1a/ T1b	40	85,0	77,3	58,2	7,77	
T2/ T3	51	70,1	66,0	47,4	6,16	
cN0/pN0	72	81,7	74,4	60,6	7,75	0,115
pN1	12	75,0	75,0	43,8	6,50	
pN2/N3	10	50,0	50,0	37,5	5,31	
HPV+ cN0/pN0	6	100	100		8,66	0,006
HPV+ N1	1	100	100		6,68	
HPV+ pN2/N3	2				1,33	
HPV- cN0/pN0	66	80,0	72,0	59,0	7,66	
HPV- N1	11	72,7	72,7	40,9	6,48	
HPV- pN2/N3	8	62,5	62,5	46,9	6,31	

Das Progressionsfreie Überleben für alle Patientinnen liegt nach 3 Jahren bei 74,0%, nach 5 Jahren bei 72,8% und nach 10 Jahren bei 62,3%. Die Überlebensdaten des progressionsfreien Überlebens, aufgeteilt nach verschiedenen Parametern wie Rauchverhalten, HPV-Status und SLPI-Expressionsmuster sowie N- und T-Klassifizierung sind in Tabelle 4.4 zusammengefasst.

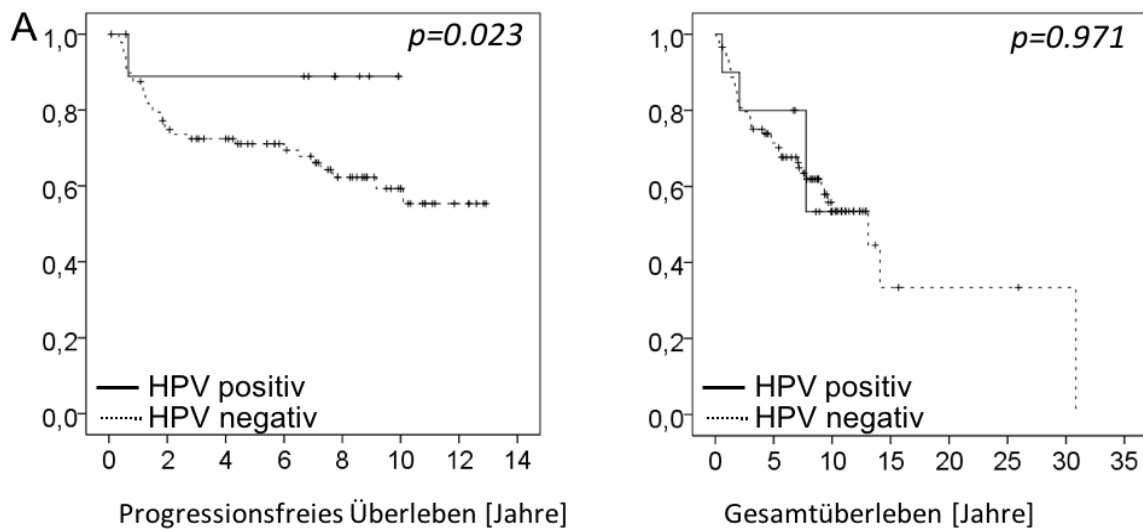
**Tabelle 4.4** Progressionsfreies Überleben aufgeteilt nach Rauchverhalten, SLPI Expression, HPV-Status sowie T- und N-Klassifizierung

	n	3 Jahre [%]	5 Jahre [%]	10 Jahre [%]	Mittelwert [Jahre]	p-Wert
Nichtraucherinnen	66	67,7	65,9	53,8	5,55	0,031
Raucherinnen	33	87,7	87,1	79,2	6,56	
SLPI negativ/ schwach	56	78,0	78,0	68,9	6,04	0,044
SLPI moderat/ stark	43	69,0	66,5	52,5	5,68	
HPV-negativ	89	72,4	71,1	59,3	5,79	0,023
HPV-positiv	10	88,9	88,9		6,76	
Carcinoma in situ	8	100	100	66,7	7,56	0,233
T1a/ T1b	40	79,6	76,8	69,6	6,54	
T2/ T3	51	65,3	65,3	56,1	5,11	
cN0/pN0	72	79,1	79,1	69,2	6,43	0,042
pN1	12	50,0	41,7	41,7	4,34	
pN2/N3	10	62,5	62,5	41,7	4,33	
HPV+ cN0/pN0	6	100	100		8,66	0,018
HPV+ N1	1	100	100		6,68	
HPV+ pN2/N3	2				0,62	
HPV– cN0/pN0	66	77,2	77,2	66,0	6,23	
HPV– N1	11	45,5	36,4	36,4	4,12	
HPV– pN2/N3	8	71,4	71,4	47,6	5,25	

#### 4.9.1 Einfluss des HPV-Status auf die Überlebensdaten

Der Vergleich der Überlebensdaten von Patientinnen mit HPV-positiven Tumoren zu denen mit HPV-negativen Tumoren ist in Abbildung 4.5 veranschaulicht. Die dort dargestellten Kaplan-Meier-Kurven zeigen den Verbleib der beiden Gruppen im progressionsfreien

Überleben und Gesamtüberleben. Die HPV-positiven Fälle zeigen nach 3 und 5 Jahren ein progressionsfreies Überleben von 88,9% und ein Gesamtüberleben von 80,0%. Die HPV-negativen Fälle zeigen nach 3, 5 und 10 Jahren ein progressionsfreies Überleben von 72,4%, 71,1% und 59,3% sowie ein Gesamtüberleben von 78,4%, 71,1% und 55,8%. Ein signifikant besseres Ergebnis der HPV-positiven Gruppe lässt sich nur für das progressionsfreie Überleben feststellen ( $p=0,023$ ).

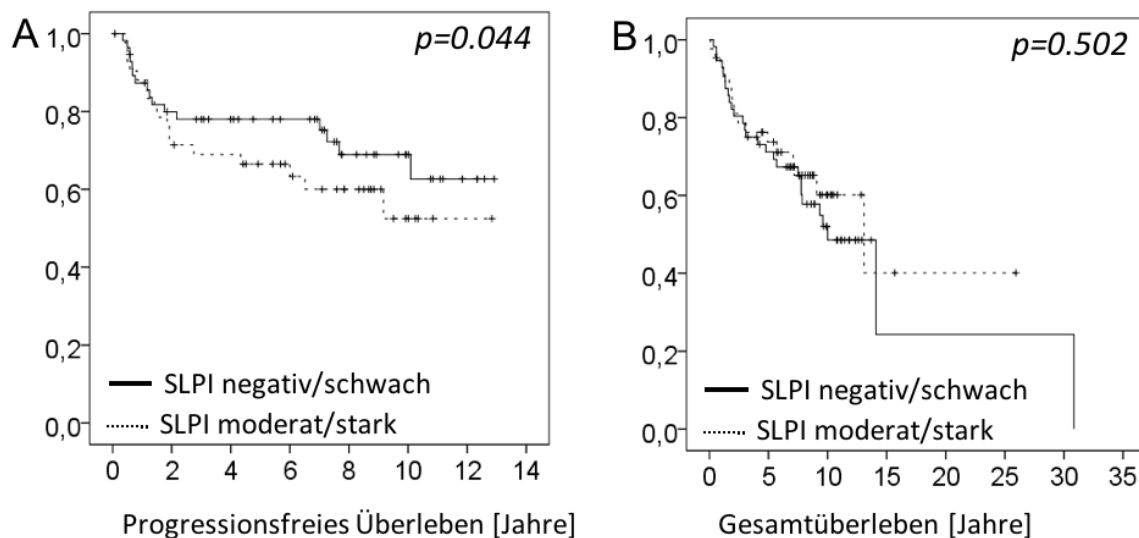


**Abbildung 4.5 (A)** Kaplan-Meier-Kurven der HPV-positiven und HPV-negativen Fälle im progressionsfreien Überleben. Auf der Abszisse ist der Beobachtungszeitraum in Jahren dargestellt und auf der Ordinate das progressionsfreie Überleben. Anhand des Logrank-Tests ergibt sich ein p-Wert von  $p=0,023$ . HPV-positive Patientinnen haben ein signifikant besseres progressionsfreies Überleben als HPV-negative Patientinnen. **(B)** Kaplan-Meier-Kurven der HPV-positiven und HPV-negativen Fälle im Gesamtüberleben. Auf der Abszisse ist der Beobachtungszeitraum in Jahren dargestellt und auf der Ordinate das Gesamtüberleben. Anhand des Logrank-Tests ergibt sich ein p-Wert von  $p=0,971$ . Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen im Gesamtüberleben.

#### 4.9.2 Einfluss des SLPI-Expressionsmuster auf die Überlebensdaten

In diesem Abschnitt wird der Einfluss der SLPI-Expression im Tumorgewebe auf die Überlebensdaten der Patientinnen überprüft. Für den Vergleich werden die Fälle mit negativen und schwach positiven SLPI-Expressionsmustern in einer Gruppe zusammengefasst ( $n=56$ ), ebenso wie die Fälle mit moderat und stark positiven SLPI-Expressionsmustern ( $n=43$ ). Die Fälle der negativen und schwachen SLPI-Expression zeigen nach 3 und 5 Jahren ein progressionsfreies Überleben von 78,0% und nach 10 Jahren von 68,9%, sowie ein

Gesamtüberleben von 78,6%, 71,2% und 52,0%. Die Fälle von starker und moderater SLPI-Expression zeigen nach 3, 5 und 10 Jahren ein progressionsfreies Überleben von 69,0%, 66,5% und 52,5% sowie ein Gesamtüberleben von 78,7%, 73,7% und 60,2%. Der Einfluss des SLPI-Expressionsmuster auf die Überlebensdaten der Patientinnen ist nur im progressionsfreien Überleben statistisch signifikant ( $p=0,044$ ). Das progressionsfreie Überleben und Gesamtüberleben in Abhängigkeit des SLPI-Expressionsmuster wird in Abbildung 4.6 in Form von Kaplan-Meier-Kurven dargestellt.

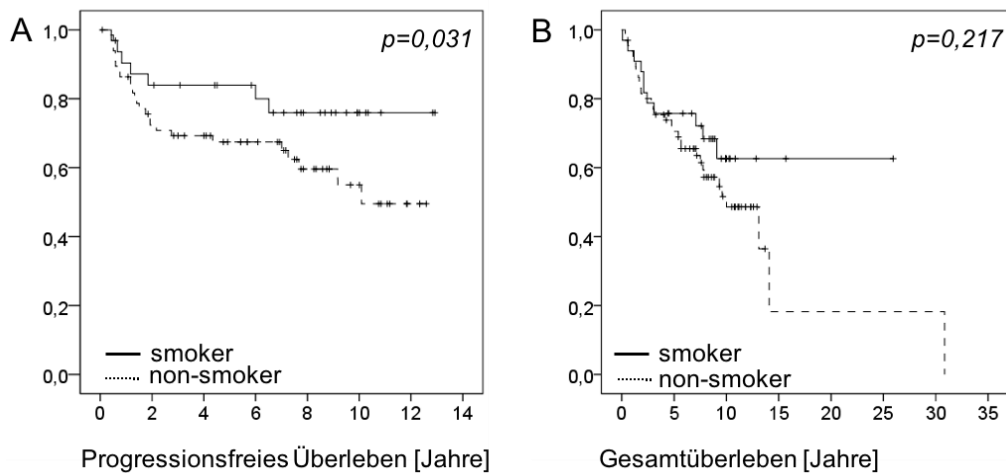


**Abbildung 4.6 (A)** Kaplan-Meier-Kurven der Fälle von negativ und schwach positiver SLPI-Expression im Vergleich zu denen von moderater und stark positiver SLPI-Expression, betrachtet im progressionsfreien Überleben. Auf der Abszisse ist der Beobachtungszeitraum in Jahren dargestellt und auf der Ordinate das progressionsfreie Überleben. Anhand des Logrank-Tests ergibt sich ein p-Wert von  $p=0,044$ . Patientinnen mit negativ oder schwach positivem SLPI-Expressionsmuster haben ein signifikant besseres progressionsfreies Überleben als Patientinnen mit moderater oder starker SLPI-Expression. **(B)** Kaplan-Meier-Kurven der Fälle von negativ und schwach positiver SLPI-Expression im Vergleich zu denen von moderater und stark positiver SLPI-Expression, betrachtet im Gesamtüberleben. Auf der Abszisse ist der Beobachtungszeitraum in Jahren dargestellt und auf der Ordinate das Gesamtüberleben. Anhand des Logrank-Tests ergibt sich ein p-Wert von  $p=0,502$ . Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen im Gesamtüberleben.

### 4.9.3 Einfluss des Rauchverhaltens auf die Überlebensdaten

Der Einfluss des Rauchverhaltens auf die Überlebensdaten der Patientinnen ist in Abbildung 4.7 anhand von Kaplan-Meier-Kurven dargestellt. Es werden die Raucherinnen

(n=33) mit den Nichtraucherinnen (n=66) im progressionsfreien Überleben und Gesamtüberleben miteinander verglichen. Die Nichtraucherinnen zeigen nach 3, 5 und 10 Jahren ein progressionsfreies Überleben von 67,7%, 65,9% und 53,28% und ein Gesamtüberleben von 78,5%, 70,5% und 51,7%. Die Raucherinnen zeigen ein progressionsfreies Überleben nach 3 und 5 Jahren von 87,1% und nach 10 Jahren von 79,2%, sowie ein Gesamtüberleben von 78,8%, 75,8% und 62,7%. Die Gruppe der Raucherinnen ist im progressionsfreien Überleben ist statistisch signifikant überlegen ( $p=0,031$ ), für das Gesamtüberleben ergibt sich kein signifikanter Einfluss des Rauchverhaltens.



**Abbildung 4.7 (A)** Kaplan-Meier-Kurven von Raucherinnen im Vergleich mit denen von Nichtraucherinnen, betrachtet im progressionsfreien Überleben. Auf der Abszisse ist der Beobachtungszeitraum in Jahren dargestellt und auf der Ordinate das progressionsfreie Überleben. Anhand des Logrank-Tests ergibt sich ein p-Wert von  $p=0,031$ . Die Raucherinnen haben ein signifikant besseres progressionsfreies Überleben als die Nichtraucherinnen. **(B)** Kaplan-Meier-Kurven von Raucherinnen im Vergleich mit denen von Nichtraucherinnen, betrachtet im Gesamtüberleben. Auf der Abszisse ist der Beobachtungszeitraum in Jahren dargestellt und auf der Ordinate das Gesamtüberleben. Anhand des Logrank-Tests ergibt sich ein p-Wert von  $p=0,217$ . Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen im Gesamtüberleben.

## 5. Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die anfangs aufgestellte Hypothese, dass eine vom Tabakrauch induzierte erhöhte SLPI-Expression die HPV-Infektion verhindert, möglicherweise über die kompetitive Hemmung des AnxA2 durch SLPI. Die Ergebnisse stimmen überein mit den Erkenntnissen der Arbeitsgruppe *HPV* der Kieler HNO-Klinik aus vorangegangenen Studien zu Karzinomen der Kopf- und Halsregion (Quabius et al., 2014). Im Unterschied dazu wird in der vorliegenden Arbeit jedoch gezeigt, dass es sich hierbei nicht um einen lokalen, sondern einen systemischen Effekt handeln muss: Auch entfernte Schleimhautareale, wie das der Vulva, welches keinen direkten Kontakt zum Tabakrauch findet, zeigen bezüglich der aufgestellten Hypothese unterstützende Korrelationen hinsichtlich der Genexpression von SLPI und AnxA2. Dank der Größe des hier untersuchten Patientenkollektivs von insgesamt 99 Patientinnen mit histologisch gesicherten Vulvakarzinomen sind viele der vorgefundenen Korrelationen im statistisch signifikanten Bereich und können für konkrete Schlussfolgerungen herangezogen werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen nun im Detail betrachtet und erläutert werden.

### 5.1 Altersverteilung der Patientinnen

Die Altersverteilung des untersuchten Patientenkollektivs, dargestellt in Abbildung 4.1, zeigt den ersten stärkeren Ausbruch in der Gruppe der 51 bis 55-Jährigen. Knapp ein Drittel (31,3%) der Patientinnen sind zum Zeitpunkt der Erstdiagnose 55 Jahre oder jünger gewesen. Die häufigsten Erstdiagnosen finden sich dann in der Gruppe der 66 bis 70-Jährigen, wonach die Verteilung bis in das Alter von 85 Jahren relativ konstant bleibt und erst darüber, wahrscheinlich demographisch bedingt, wieder stark nachlässt. Insbesondere die vielen Erstdiagnosen der unter 55-Jährigen stechen heraus. Creasman und Mitarbeiter formulierten in einem Review (1997) die Hypothese, dass 15% aller Vulvakarzinome sich bereits im Alter von unter 40 Jahren zu entwickeln beginnen. In der vorliegenden Arbeit beträgt der Anteil der Erstdiagnosen bei den bis zu 40-jährigen Patientinnen zwar nur 9,1%, allerdings sind darin die bis dato unerkannten und erst später diagnostizierten Fälle noch nicht enthalten. Somit muss für das Vulvakarzinom festgehalten werden, dass durchaus auch jüngere Frauen betroffen sind. Diesem gilt es in gynäkologischen Vorsorgeuntersuchungen entsprechend Beachtung zu schenken.



Ein Zusammenhang zwischen dem Alter bei Erstdiagnose und dem HPV-Status lässt sich aus der vorliegenden Promotionsschrift nicht ableiten. In der Literatur besteht jedoch Konsens darin, dass die HPV-Prävalenz invers mit dem Alter der Patientinnen korreliert (Alkatout et al., 2015). So zeigen de Sanjose et al. (2013), dass bei unter 56-jährigen Patientinnen der HPV-Prävalenz in Vulvakarzinomen signifikant höher ist, als bei den über 56-Jährigen.

## 5.2 HPV-Prävalenz in Vulvakarzinomen

Das Patientenkollektiv der vorliegenden Promotionsarbeit zeigt einen verhältnismäßig geringen Anteil von nur zehn Fällen mit einer HPV-Infektion. Die hier gemessene Prävalenz (10,1%) liegt damit deutlich unter den in der Literatur beschriebenen Prävalenzraten. Die umfassende Meta-Analyse von Faber und Mitarbeitern (2017) zu Vulvakarzinomen zeigt eine globale HPV-Prävalenz von 39,7% (n=5015) und für Europa von 31,7% (n=2010). Eine weitere Studie mit großer Fallzahl (n<sub>Europa</sub>=903) kommt auf eine HPV-Prävalenz von 18,3% in Europa (de Sanjose et al., 2013). Die Literatur birgt hier also noch erhebliche Diskrepanzen. Es ist jedoch unumstritten, dass die HPV-Prävalenz starken geographischen Schwankungen unterliegen (Quabius et al., 2015b). Die niedrige Prävalenz kann auch die Folge von falsch-negativen Testergebnissen sein. So wird die Qualität und das Alter der Gewebeproben für eine negative Beeinflussung der HPV-DNA Testergebnisse von bis zu 10% verantwortlich gemacht (de Sanjose et al., 2013). Die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit geben dennoch Grund zur Annahme, dass für die im Einzugsgebiet des UKSH, Campus Kiel, lebende Bevölkerung eine unterdurchschnittliche HPV-Prävalenz vorliegt. Die Validität der HPV-Ergebnisse dieser Arbeit wird durch die erfolgreichen Qualitätstestes zum Nachweis amplifizierbarer DNA mittels der *housekeeping* Gene bestätigt.

Neun von den insgesamt zehn HPV-positiven Fällen dieser Untersuchung lassen sich anhand der Gensequenzierung dem HPV-Genotyp 16 zuordnen, der übrige Fall ist dem Genotyp 18 zuzuordnen. Beide Genotypen sind Vertreter der *high risk* Gruppe. Diese Verteilung entspricht ungefähr der bekannten Prävalenz der einzelnen HPV-Subtypen für Vulvakarzinome, wonach HPV16 der mit Abstand am häufigsten vorkommende *high risk* Virustyp ist (72,1%-80,8%), gefolgt von HPV33 (5,9%-12,4%) und HPV18 (2,8%-8,6%).

### 5.3 Die SLPI-Genexpression in Vulvakarzinomen

Die Rolle der sekretorischen Antileukoproteinase in Karzinomen der Kopf- und Halsregion sowie dessen Einfluss auf eine HPV-Infektion ist in vorhergehenden Studien dieser Arbeitsgruppe bereits weitgehend beschrieben worden (Hoffmann et al., 2013, Quabius et al., 2014, Quabius et al., 2015a). Es lässt sich daraus die Kernaussage zusammenfassen, dass eine durch den Tabakrauch gesteigerte SLPI-Expression die Infektion im oropharyngealen Bereich mit dem humanen Papillomvirus verhindern kann. Es werden dem SLPI in der Literatur auch außerhalb dieser Arbeitsgruppe antivirale Eigenschaften zugesprochen, wie z.B. gegenüber dem humanen Immundefizienz-Virus (McNeely et al., 1997), dem Epstein-Barr-Virus (EBV) (Tse et al., 2012) und dem Herpes-simplex-Virus (HSV) (Fakioglu et al., 2008). Die beiden letztgenannten zeigen darüber hinaus eine herabregulierende Wirkung der Viren auf die SLPI-Genexpression, womit die Viren also umgekehrt auch dem Abwehrmechanismus der Zellen entgegenwirken.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen nun die anfangs aufgestellte Hypothese prüfen, ob es zunächst eine vom Rauchen abhängige Steigerung der SLPI-Expression auch im Gewebe von Vulvakarzinomen gibt und anschließend zeigen, ob die gesteigerte SLPI-Expression einen Einfluss auf die HPV-Infektion hat.

Die SLPI-Expression ist durch immunhistologische Färbungen in Expressionsmuster anhand der modifizierten Kriterien nach Cordes und Mitarbeitern (2011) in die Kategorien negativ, schwach, moderat und stark eingeteilt worden (vgl. Kapitel 3.2.6 und 4.3). Die Verteilung ist insgesamt unter allen Patientinnen relativ ausgeglichen (-27, +29, ++18, +++25). Die Ergebnisse zeigen, dass von den 33 Raucherinnen dieser Studie 18 Patientinnen eine starke und sechs Patientinnen eine moderate SLPI-Expression im Tumorgewebe vorweisen, zusammengefasst bilden sie einen Anteil von 72% innerhalb dieser Gruppe. Dem gegenüber finden sich bei den Raucherinnen nur vier Fälle von schwacher und fünf Fälle von negativer SLPI-Expression. Für die Nichtraucherinnen (n=66) kann wiederum eine deutliche Verschiebung hin zu den schwachen (n=24) und negativen (n=23) SLPI-Expressionsmustern festgestellt werden, hier ist der summierte Anteil bei 71%. Nur sieben Fälle der Nichtraucherinnen zeigen eine starke SLPI-Expression. Die hier zu erkennende Korrelation zwischen dem Tabakkonsum und einer gesteigerten SLPI-Konzentration ist hochsignifikant ( $p < 0.0001$ ).

Eine mögliche Beziehung zwischen dem SLPI-Expressionslevel und dem Risiko einer HR-HPV Infektion ist bereits an Analkarzinomen von HIV-infizierten Männern beschrieben worden (Nicol et al., 2016). Eine Korrelation zwischen der SLPI-Expression und dem HPV-Status zeigt sich auch in dieser Arbeit: Von den zehn HPV-positiven Fällen fällt die SLPI-Expression in sieben Fällen negativ und in drei Fällen schwach positiv aus, jedoch in keinem Fall moderat oder stark positiv. Die 89 HPV-negativen Fälle verteilen sich dagegen relativ gleichmäßig über alle Expressionsmuster ( $p=0.006$ ). Ähnliche Verteilungen finden sich in den Beobachtungen bei Kopf- und Halskarzinomen (Quabius et al., 2015a).

Die Erkenntnisse auf Ebene der Proteine werden bestätigt, wenn man sich nun die Ergebnisse der Analysen von SLPI-Expression auf genetischer Ebene veranschaulicht (vgl. Seite 28, Abbildung 4.2 und Seite 29, Abbildung 4.3). Insbesondere die signifikant niedrigeren *fold change* Werte der SLPI-Genexpression bei HPV-positiven Fällen gehen einher mit den zuvor formulierten Aussagen. Und auch hier stimmen die Ergebnisse mit jenen Beobachtungen überein, welche für die SLPI-Genexpression in der Kopf- und Halsregion gemacht wurden.

Für die Infektion mit EBV und HSV ist die inverse Korrelation zur SLPI-Expression mit einer viral bedingten Herabregulierung erklärt worden. Diese Herabregulierung lässt sich auch in der vorliegenden Arbeit und der darin beschriebenen Korrelation von HPV zu SLPI erkennen. Letztlich ist jedoch anhand der Korrelation nicht eindeutig festzustellen, ob die HPV-Infektion nun die SLPI-Expression herabreguliert oder umgekehrt ein niedriges SLPI-Expressionslevel die HPV-Infektion begünstigt. Dies gilt es in weiterführenden Versuchen auf molekularbiologischer Ebene genauer zu betrachten und zu erklären. Hinsichtlich der Korrelation vom Rauchverhalten zum SLPI-Expressionslevel ist mittels Nikotinbedampfung von Gewebeproben aus den unteren Nasenmuscheln eine direkte Beeinflussung gezeigt worden. Die Nikotinbedampfung führt zu signifikant höheren SLPI-Expressionslevels (Quabius et al., 2014). Darauf basierend kann für das Trias Tabakrauch, SLPI-Expression und HPV-Infektion in deren kausalen Reihenfolge angenommen werden, dass zunächst das Rauchen den Einfluss auf die SLPI-Expression verübt und dies in der Folge die HPV-Infektion bei Rauchern verhindert bzw. bei Nichtrauchern begünstigt.

Die vorhergehenden Studien zu dem Thema lassen bisher jedoch lediglich die Schlussfolgerung zu, dass die gesteigerte SLPI-Expression in der Mukosa des Mund- und Rachenraums ein lokaler Effekt sei, welcher durch den direkten Kontakt zum Tabakrauch induziert werde. Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse führen nun erstmals zu der Annahme,

dass die Ingredienzien des Tabakrauches einen Effekt haben, welcher über Lokaleffekte durch direkten Kontakt des Rauches mit der Schleimhaut hinausgeht. Basierend auf den *ex vivo* Nikotinbedampfungsversuchen ist davon auszugehen, dass Nikotin einer der Inhaltsstoffe des Tabakrauches ist, welcher den beschriebenen Effekt hervorruft. Das inhalierte und vom Blut transportierte Nikotin führt also wahrscheinlich auch in Schleimhäuten des weiblichen Genitaltrakts zu einer gesteigerten SLPI-Expression. Demzufolge zeigt sich dann eine protektive Wirkung auf die Infektion mit dem humanen Papillomvirus.

Für therapeutische Zwecke ist es von entscheidendem Interesse, ob die SLPI-Elevation auch Einfluss auf Clearance-Raten bei bestehender HPV-Infektion nimmt, möglicherweise in dem die Re-Infektion und Ausbreitung des Virus innerhalb des Gewebes verhindert wird. Wäre dies der Fall, muss ein völlig neuer Ansatz in der Behandlung von HPV-Infektionen und eventuell sogar bei bestehenden intraepithelialen Neoplasien untersucht und diskutiert werden.

#### **5.4 Die Annexin -A2-Genexpression in Vulvakarzinomen**

Die S100A10-Untereinheit des membranständigen Heterotetramers von AnxA2 bildet einen spezifischen Rezeptor für das humane Papillomvirus. SLPI wiederum ist ein endogener Ligand von AnxA2 und kann bei vermehrter Expression diese blockieren und damit den Eintritt von HPV in die Zelle erschweren (Woodham et al., 2012). Neben der Betrachtung von SLPI ist es daher ebenfalls von hohem Interesse, wie sich die AnxA2-Genexpression bezüglich der HPV-Infektion, dem Rauchverhalten und der SLPI-Genexpression verhält. Die Rolle des AnxA2 in Vulvakarzinomen ist in der Fachliteratur bisher nicht näher untersucht und beschrieben worden. Somit kann sich in diesem Abschnitt lediglich auf die möglichen Parallelen bezogen werden, die vom Verhalten der AnxA2-Genexpression aus Karzinomen der Kopf- und Halsregion bekannt sind.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine deutliche und signifikante Korrelation zwischen dem HPV-Status und der AnxA2-Genexpression. Wie in Abbildung 4.2 dargestellt, erkennt man in diesem Zusammenhang bei den HPV-positiven Fällen eine vermehrte AnxA2-Genexpression um das 4,07-fache im Vergleich zu den HPV-negativen Fällen. Dieses Ergebnis ist unabhängig vom Rauchverhalten der Patientinnen und geht einher mit den Ergebnissen aus der Arbeit von Quabius und Mitarbeitern zu Karzinomen der Kopf- und Halsregion (2015a). Die HPV-Infektion geht in der hier vorliegenden Arbeit also mit einer höheren AnxA2-Genexpression einher. Eine mögliche Erklärung für diese Transaktivierung könnte darin liegen,

dass sich die Viren damit im Laufe ihres Zyklus den Eintritt in die Zellen erleichtern. Sie agieren als Transkriptionsfaktor für ihren eigenen spezifischen Rezeptor (Merz, 2016).

Die Korrelation zwischen der AnxA2-Genexpression und dem Rauchverhalten der Patientinnen ist in den Ergebnissen dieser Arbeit zwar ersichtlich, jedoch liegt sie knapp unterhalb des Signifikanzniveaus. Wie in Abbildung 4.3 dargestellt, erkennt man in diesem Zusammenhang einen Anstieg der AnxA2-Genexpression um das 1,95-fache bei den Raucherinnen im Vergleich zu den Nichtraucherinnen, der signifikante Bereich beginnt bei Werten ab 2. In den Studien zu Kopf- und Halskarzinomen ist diese Korrelation in statistisch signifikanter Ausprägung vorgefunden worden. Möglicherweise wird bei Rauchern durch das erhöhte SLPI-Vorkommen und die Besetzung der AnxA2-Proteine indirekt auch deren Genexpression stimuliert.

### **5.5 Die Annexin-A2-Genexpression im Vergleich zur SLPI-Genexpression**

Eine weitere Korrelation auf Ebene der Genexpression lässt sich zwischen SLPI und AnxA2 zueinander formulieren, jeweils für die HPV-positiven und HPV-negativen Fälle separat betrachtet (vgl. Seite 29, Abbildung 4.4). In der Gruppe der HPV-positiven Fälle steigt die AnxA2-Genexpression um das 6,86-fache im Vergleich zur SLPI-Genexpression. Demgegenüber fällt die AnxA2-Genexpression bei den HPV-negativen Fällen um das 2,39-fache niedriger aus, verglichen mit der SLPI-Genexpression. Diese Korrelation ist deckungsgleich mit den Ergebnissen von Quabius und Mitarbeitern aus deren Studie zu Kopf- und Halskarzinomen (Quabius et al., 2015a).

Diese Korrelation unterstützt die Hypothese, dass humane Papillomviren die Fähigkeit besitzen könnten, dem Abwehrmechanismus der Zellen entgegen zu wirken: Sie schaffen eine Herabregulierung des antiviralen SLPI und gleichzeitig eine Transaktivierung des AnxA2 und erleichtern sich damit den Eintritt in die Zellen.

### **5.6 Die Überlebensdaten in Abhängigkeit von HPV-Status, SLPI-Expression und Rauchverhalten**

Die eingangs formulierte Fragestellung zielt unter anderem darauf ab, ob der HPV-Status, die SLPI-Expression oder das Rauchverhalten eine prognostische Relevanz für Patientinnen mit Vulvakarzinomen haben. Im folgenden Abschnitt sollen daher zunächst die Ergebnisse dieser

Arbeit auf diese Fragen hin überprüft werden und anschließend die Erkenntnisse daraus anhand ausgewählter Fachliteratur eingeordnet werden.

Die Kaplan-Meier-Analysen der 99 Patientinnen zeigen in den Überlebenskurven einen Einfluss durch den HPV-Status, die SLPI-Expression und das Rauchverhalten. Die HPV-positiven Patientinnen des untersuchten Patientenkollektivs haben einen signifikanten Überlebensvorteil im progressionsfreien Überleben (vgl. Seite 32, Abbildung 4.5). Dies gilt auch für die Patientinnen mit einer negativen oder schwachen SLPI-Expression (vgl. Seite 33, Abbildung 4.6) und ebenfalls für die Raucherinnen unter den Patientinnen (vgl. Seite 34, Abbildung 4.7). Auf ähnliche Ergebnisse hinsichtlich dieser Überlebensdaten kommen Quabius und Mitarbeiter in ihrer Studie zu Kopf- und Halskarzinomen. Die statistische Signifikanz im besseren Überleben von HPV-positiven Patientinnen sowie anderen Gruppen des Patientenkollektivs gehen allerdings verloren, wenn das Gesamtüberleben betrachtet wird. Interessanterweise zeigt auch der Vergleich von Patientinnen mit unterschiedlichem Lymphknoten-Status nur im progressionsfreien Überleben, nicht jedoch im Gesamtüberleben signifikante Vorteile der N0-Gruppe. Der Lymphknotenstatus stellt jedoch den wichtigsten prognostischen Faktor im Vulvakarzinom dar (Alkatout et al., 2015). Daher weist die fehlende Signifikanz an dieser Stelle auf eine generelle Schwäche der Studienergebnisse hin, sobald das Gesamtüberleben berechnet wird. Dies kann zum einen mit der aus statistischer Sicht betrachtet relativ geringen Größe des Patientenkollektivs erklärt werden. Einen weitaus größeren Einfluss auf diese Unschärfe der Ergebnisse hat jedoch die Tatsache, dass bei dem beträchtlichen Teil von 30 Patientinnen die Aufzeichnungen der Nachsorge-Daten schon vor Ende des Beobachtungszeitraums abbrechen, ohne dass gesicherte Informationen über deren weiteren Verbleib, eventuellem Tod und Todesursache in Erfahrung zu bringen waren. So ist zum Beispiel für einige Patientinnen ein Rezidiv mit Metastasierung des Tumors festgestellt worden, welches zuletzt rein palliativ behandelt werden konnte. Diese Information beeinflusst zunächst nur das progressionsfreie Überleben. Nun fehlt dann, von diesen wahrscheinlich tumorbedingt verstorbenen Patientinnen, in der Statistik die genaue Information zu deren Tod. In der Folge bleibt die Kurve des Gesamtüberlebens davon unbeeinflusst. Das einzige Szenario, in der sich ein signifikanter Überlebensvorteil sowohl im PFS als auch im OS ergibt, zeigt sich, wenn HPV-Status und Lymphknoten-Status zusammen betrachtet werden. So haben die HPV-positiven Fälle innerhalb der einzelnen N-Kategorien jeweils ein besseres Gesamtüberleben (vgl. Seite 30, Tabelle 4.3).

Der HPV-Status als prognostischer Faktor des Vulvakarzinoms wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Der primäre und wichtigste prognostische Faktor für die Überlebenswahrscheinlichkeit von Patientinnen mit Vulvakarzinomen liegt übereinstimmend in dem Befall der regionalen Lymphknoten. Extrakapsuläres Wachstum von Lymphknotenmetastasen, zwei oder mehr betroffene Lymphknoten sowie mehr als 50-prozentige Verdrängung des Lymphknotens durch Tumorgewebe weisen auf eine sehr ungünstige Prognose hin (Burger et al., 1995, Maggino et al., 2000). In dem beherrschenden Anteil der Studien findet sich wiederum kein Überlebensvorteil von HPV-positiven Fällen gegenüber HPV-negativen Fällen. Die Autoren dieser Studien sehen somit im HPV-Status auch keine prognostische und therapeutische Relevanz (Pinto et al., 2004, Rakislova et al., 2017b, van de Nieuwenhof et al., 2009). Dem widersprechen z.B. Wakeham und Mitarbeiter in ihrer Studie (2017) und finden in ihrem Patientenkollektiv für die HPV-positiven Fälle, passend zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, ein besseres progressionsfreies Überleben. In einer weiteren aktuellen Studie ist die HPV-Infektion oder die vermehrte Expression des Proteins p16<sup>INK4A</sup> als dessen Surrogatmarker zum unabhängigen prognostischen Faktor erklärt worden, wenn die Patientinnen eine adjuvante Radiotherapie erhalten (Lee et al., 2016). Die HPV-positiven Patientinnen in deren Studie zeigen eine signifikant höhere 5-Jahres-Überlebensrate sowohl im progressionsfreien Überleben (65% vs. 16%,  $p < 0,01$ ) als auch im Gesamtüberleben (65% vs. 22%,  $p < 0,01$ ); außerdem zeigen diese Patientinnen eine deutlich geringere Rate an Lokalrezidiven (19% vs. 75%,  $p < 0,01$ ). Die Ergebnisse der letztgenannten Studie deuten darauf hin, dass HPV-positive Vulvakarzinome besser auf die Radiotherapie ansprechen als HPV-unabhängige Vulvakarzinome. Dies steht dann wieder im Einklang mit den aktuellen Erkenntnissen zu HPV-positiven Karzinomen der Kopf- und Halsregion. Die prognostische Relevanz der HPV-Infektion ist hier weniger umstritten und wird bereits seit zwei Jahrzehnten anhand von Studien dargelegt (Andl et al., 1998, Gillison, 2006, Hoffmann et al., 2005).

Die Fälle mit negativer und schwacher SLPI-Expression haben ein signifikant besseres progressionsfreies Überleben (vgl. Seite 33, Abbildung 4.6). Dieser Einfluss geht auch hier im Gesamtüberleben verloren. Dennoch wird in dieser Arbeit erstmals ein solcher Zusammenhang zwischen SLPI und dem Vulvakarzinom aufgestellt. Dieser Überlebensvorteil lässt sich zum Teil damit begründen, dass die negativen und schwach positiven SLPI-Expressionsmuster häufig mit einer HPV-Infektion einhergehen, für die in dieser Arbeit ebenfalls der signifikante progressionsfreie Überlebensvorteil festgestellt worden ist.

Ein überraschendes Ergebnis liefert die vorliegende Arbeit für die Gruppe der Raucherinnen: Diese zeigen ein besseres progressionsfreies Überleben im Vergleich zur Gruppe der Nichtraucherinnen sowie leicht bessere Werte ohne statistische Signifikanz im Gesamtüberleben. Das Rauchen gehört beim Vulvakarzinom nicht zu den Risikofaktoren, insofern wäre ein ähnliches Ergebnis von Raucherinnen zu Nichtraucherinnen zu erwarten gewesen. Der Überlebensvorteil der Raucherinnen muss als statistische Abweichung innerhalb des untersuchten Patientenkollektivs betrachtet werden, ein kausaler Zusammenhang besteht in dem Fall nicht.

## **5.7 Effektivität der HPV-Impfung**

Die eingangs in Kapitel 1.2.7 beschriebenen HPV-Impfstoffe müssen als herausragende Errungenschaft in der Geschichte der Medizin eingeordnet werden. Den Grundstein dafür legte der dafür mit dem Nobelpreis prämierte Wissenschaftler Harald zur Hausen mit seiner Arbeitsgruppe und deren Forschung in den 1980er und 1990er Jahren. Seit nunmehr über 10 Jahren werden weltweit junge Menschen, bisher größtenteils Mädchen, gegen die wichtigsten Genotypen des humanen Papillomvirus immunisiert.

Die Effektivität der verfügbaren bivalenten, quadrivalenten und nonavalenten Impfstoffe hinsichtlich der Entwicklung von HPV-assoziierten HSIL und LSIL wird in der Literatur sehr präzise formuliert. Ein aktuelle systematische Übersichtsarbeit der Cochrane Collaboration (2018) sammelt umfassende Ergebnisse aus insgesamt 26 Studien zur Effektivität und Sicherheit der Vakzine. Demnach liegt die Effektivität bei jungen Frauen im Alter von 15 bis 26 Jahren, welche zu Beginn der Immunisierung keine nachweisbare HPV-Infektion hatten, bei über 95%. Die gleiche Altersgruppe, jedoch mit unbekanntem HPV-Status zeigt ein um 56% herabgesetztes relatives Risiko der Entwicklung von HPV16/18-assoziierten HSIL. Lediglich für die ältere Patientengruppe der 24 bis 45-jährigen Frauen mit unbekanntem HPV-Status besteht in der Statistik kein Vorteil durch die Immunisierung. Für diese Altersgruppe ist die Impfung dennoch sinnvoll, wenn eine HPV-Infektion zuvor ausgeschlossen werden kann. Auch die Sicherheit der Impfstoffe bestätigt die Übersichtsarbeit. Im Vergleich zu Kontrollgruppen zeigten sich keine relevanten Unterschiede hinsichtlich der Mortalität, sowie bei Schwangeren Frauen zu Fehlgeburten oder medizinisch bedingten Schwangerschaftsabbrüchen. Giuliano und Mitarbeiter (2011) nennen eine ähnliche Effektivität bezüglich der HPV-Immunisierung von Männern hinsichtlich der Prophylaxe von



HPV-assoziierten anogenitalen Läsionen. Für nachweisbar HPV-negative Patienten liegt in deren Studie die Effektivität bei 90% und bei unbekanntem HPV-Status bei 60%.

Trotz der erwiesenermaßen hohen Effektivität und Sicherheit von HPV-Impfstoffen, lag die Impfquote in Deutschland im Jahr 2015 bei den 17-jährigen Mädchen noch unter 50%, mit jährlich leicht steigender Tendenz. Im europäischen Vergleich ist Deutschland damit weit hinter Ländern wie Norwegen (83%), Großbritannien (85,3%) oder Schweden (73-77%) (Klug et al., 2018). Diese Länder führen allesamt Schulimpfprogramme durch, und scheinen damit erfolgreich hohe Impfquoten zu erzielen. Einer Umfrage nach, ist der wichtigste Faktor bei jungen Frauen für die Entscheidung zur Impfung, die Empfehlung der behandelnden Ärzte und Ärztinnen. Ebenso spielen Sicherheitsbedenken und Angst vor Nebenwirkungen in der Begründung zur Nicht-Impfung eine große Rolle. Daraus lässt sich schließen, dass in Deutschland von Seiten der Ärzte und Bildungseinrichtungen keine ausreichende Aufklärung zur HPV-Impfung stattfindet. Hinzu kommt die Verunsicherung der Eltern, durch die zum Teil sehr kritische Berichterstattung aus den späten 2000er Jahren nach Einführung der HPV-Impfung sowie die allgemeinen Bedenken neuen Impfstoffen gegenüber. Die konstant steigende Tendenz der Impfquote in den vergangenen Jahren ist positiv zu bewerten, ebenso wie die neue Impfempfehlung aus dem Jahr 2018, welche nun auch Jungen im Alter von 9 bis 14 Jahren einschließt. Mit einer zunehmenden Impfquote oberhalb der 50% bei Mädchen und nun auch Jungen werden die Herdeneffekte der Immunisierung deutlicher zum Tragen kommen. Diese Herdenprotektion muss gesundheitspolitisch als Ziel erklärt und verfolgt werden, um nachhaltig die HPV-Prävalenzen abzusenken und damit der Entstehung von HPV-assoziierten Karzinomen entgegenzuwirken.

## **5.8 Schlussfolgerungen**

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit führen nun abschließend zu folgenden Schlussfolgerungen. Die HPV-Prävalenz der untersuchten Vulvakarzinome im Kieler Patientinnenkollektiv liegt mit 10,1% deutlich unter der in der Literatur beschriebenen durchschnittlichen europäischen Prävalenz von 18,3% bis 31,7%. Mit 9 von 10 Fällen ist HPV16 der häufigste vorgefundene Genotyp, dies geht einher mit den gängigen Prävalenzen innerhalb der verschiedenen HPV-Subtypen.

Die analysierte SLPI-Genexpression der Gewebeproben korreliert statistisch signifikant zum Rauchverhalten der Patientinnen. Darüber hinaus zeigt sich eine statistisch signifikante inverse

Korrelation des SLPI zum HPV-Status. Diese Abhängigkeiten sind aus vorhergehenden Studien dieser Arbeitsgruppe zu Karzinomen der Kopf- und Halsregion bekannt, und können in dieser Arbeit nun erstmals auch als systemischer Effekt auf die genitale Mukosa übertragen werden. Dementsprechend ist die zentrale Schlussfolgerung dieser Arbeit die Bestätigung der eingangs formulierten Hypothese: Eine durch das Rauchen induzierte, systemisch verstärkte SLPI-Expression in der Mukosa des weiblichen Genitaltrakts, führt zu einer protektiven Wirkung des SLPI gegenüber einer HPV-Infektion. Das vermehrt exprimierte SLPI bindet an den membranständigen Modulator AnxA2 und blockiert diesen als Bindungsstelle für die humanen Papillomviren. Die Ergebnisse der AnxA2-Genexpression mit signifikanter Korrelation zum HPV-Status unterstützen diese Hypothese. Diese Erkenntnisse sollten in weiterführenden Studien zu anogenitalen Läsionen bestätigt und präzisiert werden.

Die Überlebensdaten des untersuchten Patientenkollektivs zeigen, bezogen auf das progressionsfreie Überleben, statistisch signifikante und damit relevante Ergebnisse hinsichtlich verschiedener Parameter, wie HPV-Status, SLPI-Expression und Rauchverhalten. Der HPV-Status wird in der Literatur bezüglich seiner prognostischen Relevanz bei Vulvakarzinomen unterschiedlich bewertet. Das Kieler Patientinnenkollektiv zeigt hier eine statistisch signifikant bessere 5-Jahres-Überlebensrate bei positivem HPV-Status im progressionsfreien Überleben. Dies gilt es in weiteren Studien zu überprüfen und den HPV-Status gegebenenfalls als weiteren prognostischen Faktor neben dem Lymphknotenstatus zu etablieren.

## 6. Zusammenfassung

Das Plattenepithelkarzinom der Vulva ist eine seltene maligne Neoplasie des weiblichen Genitaltrakts. In Deutschland erkranken jährlich etwa 3500 Frauen, die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei 68%. Das Vulvakarzinom lässt sich ätiologisch in zwei Typen einteilen: Das HPV-assoziierte und das HPV-unabhängige Vulvakarzinom. Die *high risk* HPV-Typen (u.a. 16, 18, 33) besitzen immortalisierende und transformierende Eigenschaften, welche die Ausbildung eines malignen Tumors in der infizierten Schleimhaut verursachen können. Insgesamt werden ca. 40% der Vulvakarzinome auf die Infektion mit dem humanen Papillomvirus zurückgeführt. Die sekretorische Antileukoproteinase (SLPI) trägt bei der Infektion mit HPV eine entscheidende Rolle: Als natürlicher endogener Ligand des membranständigen Strukturproteins Annexin A2 konkurriert es mit HPV um dessen Bindungsstelle. Hohe Expressionslevel von SLPI können somit die Infektion mit HPV verhindern. Vorhergehende Untersuchungen der Arbeitsgruppe HPV in Kiel zeigen für HPV-assoziierte Tumore der Kopf- und Halsregion einige neue Erkenntnisse: Das Rauchen führt zu gesteigerten SLPI-Expressionslevel im Gewebe der Mund- und Rachenschleimhaut. *Ex-vivo* Nikotinbedampfungssversuche bestätigen diese Wirkung auf molekularbiologischer Ebene. Demzufolge ergibt sich bei Rauchern durch die gesteigerte SLPI-Expression ein verringertes Risiko der HPV-Infektion und damit verbundener Neoplasien. In der vorliegenden Arbeit soll vor diesem Hintergrund überprüft werden, ob ähnliche Zusammenhänge für Vulvakarzinome festzustellen sind und darüber hinaus, ob das Rauchen über seine Inhaltsstoffe einen systemischen Einfluss auf die SLPI-Expression in entfernten Schleimhautregionen verübt.

Das untersuchte Patientinnenkollektiv besteht aus insgesamt 99 Patientinnen, die am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein aufgrund ihres Vulvakarzinoms in Behandlung waren. Ihre Gewebeproben werden auf verschiedene Parameter hin untersucht. Die Immunhistochemische Färbung zeigt die SLPI-Expression. Mittels DNA-Extraktion, cDNA-Synthese, verschiedener PCR-Varianten und DNA-Sequenzierung wird die HPV-Infektion festgestellt sowie eine HPV-Typisierung vorgenommen. Durch die RT-qPCR wird die SLPI- und AnxA2-Genexpression bestimmt. Anschließend werden die Daten statistisch ausgewertet (SPSS 20.0, IBM).

Eine HPV-Infektion besteht bei 10 von 99 Patientinnen (10,1%), die Typisierung zeigt 9 Fälle von HPV16 und 1 Fall von HPV18. Die Immunhistochemische Färbung von SLPI ergibt eine Verteilung der Gewebeproben in negative SLPI-Expression (27,3%), schwach (29,3%),

moderat (18,2%) und stark positiver SLPI-Expression (25,3%). Es zeigt sich eine signifikante inverse Korrelation zwischen dem HPV-Status und der SLPI-Expression ( $p=0,006$ ). Die HPV-positiven Fälle sind entweder SLPI-negativ (70%) oder schwach positiv (30%). Darüber hinaus kann im untersuchten Patientenkollektiv eine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem Rauchverhalten der Patientinnen und dem SLPI-Expressionsmuster festgestellt werden ( $p<0,0001$ ), die Raucher zeigen eine deutlich stärkere SLPI-Expression. Die untersuchten Parameter sollen auch auf deren prognostische Relevanz hin untersucht werden. Dafür werden das progressionsfreie Überleben und Gesamtüberleben in Abhängigkeit von HPV-Status, SLPI-Expression und Rauchverhalten mittels Kaplan-Mayer Kurven dargestellt. Es zeigen sich statistisch signifikante Vorteile im progressionsfreien Überleben jeweils für die Patientinnen mit HPV-Infektion, negativen und schwachen SLPI-Expressionsmuster und für die Raucherinnen. Die statistische Signifikanz fehlt im Gesamtüberleben.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die anfangs aufgestellte Hypothese, dass eine vom Tabakrauch induzierte gesteigerte SLPI-Expression die HPV-Infektion verhindert, dem aktuellen Verständnis nach über die kompetitive Hemmung des AnxA2 durch SLPI. Die Ergebnisse stimmen überein mit den Erkenntnissen der Arbeitsgruppe *HPV* der Kieler HNO-Klinik aus vorangegangenen Studien zu Karzinomen der Kopf- und Halsregion. In der vorliegenden Arbeit ist dieser Zusammenhang erstmals auch für entfernte Schleimhautareale der Genitalregion bestätigt worden. Besonders hervorzuheben ist also die Erkenntnis, dass es sich bei dem beschriebenen Effekt um eine systemische Wirkung des Nikotins handeln muss. In therapeutischer Konsequenz kann dies zu einem völlig neuen Ansatz in der Behandlung von HPV-Infektionen führen. Dazu muss in weiterführenden Studien die Frage geklärt werden, ob gesteigerte SLPI-Level auch Einfluss auf Clearance-Raten bei bestehenden HPV-Infektionen nehmen, in dem Re-Infektionen und Ausbreitung des Virus innerhalb des Gewebes verhindert werden.

Hinsichtlich der Überlebensdaten zeigt sich im progressionsfreien Überleben sowohl für die HPV-positiven Fälle als auch für die Gruppe mit moderater und starker SLPI-Expression ein statistisch signifikanter Vorteil. Dies geht sinngemäß mit der Korrelation von HPV-Status und SLPI-Expression einher. Aufgrund unzureichender Daten hinsichtlich Tod und Todesursache geht die statistische Signifikanz jedoch im Gesamtüberleben verloren. Die Überlebensdaten des untersuchten Patientenkollektivs deuten damit zumindest auf eine prognostische Relevanz des HPV-Status und des SLPI im Vulvakarzinom hin, dies gilt es in weiterführenden Studien zu bestätigen.

## 7. Literaturverzeichnis

- Abe, T., Kobayashi, N., Yoshimura, K., Trapnell, B. C., Kim, H., Hubbard, R. C., Brewer, M. T., Thompson, R. C. & Crystal, R. G. 1991. Expression of the secretory leukoprotease inhibitor gene in epithelial cells. *J Clin Invest*, 87, 2207-2215.
- Alkatout, I., Schubert, M., Garbrecht, N., Weigel, M. T., Jonat, W., Mundhenke, C. & Gunther, V. 2015. Vulvar cancer: epidemiology, clinical presentation, and management options. *Int J Womens Health*, 7, 305-313.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215, 403-410.
- Andl, T., Kahn, T., Pfuhl, A., Nicola, T., Erber, R., Conradt, C., Klein, W., Helbig, M., Dietz, A., Weidauer, H. & Bosch, F. X. 1998. Etiological involvement of oncogenic human papillomavirus in tonsillar squamous cell carcinomas lacking retinoblastoma cell cycle control. *Cancer Res*, 58, 5-13.
- Arbyn, M., Xu, L., Simoons, C. & Martin-Hirsch, P. P. 2018. Prophylactic vaccination against human papillomaviruses to prevent cervical cancer and its precursors. *Cochrane Database Syst Rev*, 5, CD009069.
- Bharadwaj, A., Bydoun, M., Holloway, R. & Waisman, D. 2013. Annexin A2 heterotetramer: structure and function. *Int J Mol Sci*, 14, 6259-6305.
- Bornstein, J., Bogliatto, F., Haefner, H. K., Stockdale, C. K., Preti, M., Bohl, T. G., Reutter, J. & Committee, I. T. 2016. The 2015 International Society for the Study of Vulvovaginal Disease (ISSVD) Terminology of Vulvar Squamous Intraepithelial Lesions. *J Low Genit Tract Dis*, 20, 11-14.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A. & Jemal, A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*.
- Brotherton, J. M. L. 2017. Confirming cross-protection of bivalent HPV vaccine. *Lancet Infect Dis*, 17, 1227-1228.
- Burger, M. P., Hollema, H., Emanuels, A. G., Krans, M., Pras, E. & Bouma, J. 1995. The importance of the groin node status for the survival of T1 and T2 vulval carcinoma patients. *Gynecol Oncol*, 57, 327-334.
- Cheng, W. L., Wang, C. S., Huang, Y. H., Liang, Y., Lin, P. Y., Hsueh, C., Wu, Y. C., Chen, W. J., Yu, C. J., Lin, S. R. & Lin, K. H. 2008. Overexpression of a secretory leukocyte protease inhibitor in human gastric cancer. *Int J Cancer*, 123, 1787-1796.

- Cordes, C., Hasler, R., Werner, C., Gorogh, T., Rocken, C., Hebebrand, L., Kast, W. M., Hoffmann, M., Schreiber, S. & Ambrosch, P. 2011. The level of secretory leukocyte protease inhibitor is decreased in metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*, 39, 185-191.
- Crawford, L. V. 1965. A study of human papilloma virus DNA. *J Mol Biol*, 13, 362-372.
- Creasman, W. T., Phillips, J. L. & Menck, H. R. 1997. The National Cancer Data Base report on early stage invasive vulvar carcinoma. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. *Cancer*, 80, 505-513.
- Crum, C. P. 1992. Carcinoma of the vulva: epidemiology and pathogenesis. *Obstet Gynecol*, 79, 448-454.
- Darragh, T. M., Colgan, T. J., Thomas Cox, J., Heller, D. S., Henry, M. R., Luff, R. D., Mccalmont, T., Nayar, R., Palefsky, J. M., Stoler, M. H., Wilkinson, E. J., Zaino, R. J., Wilbur, D. C. & Members of The, L. P. W. G. 2013. The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization project for HPV-associated lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *Int J Gynecol Pathol*, 32, 76-115.
- De Sanjose, S., Alemany, L., Ordi, J., Tous, S., Alejo, M., Bigby, S. M., Joura, E. A., Maldonado, P., Laco, J., Bravo, I. G., Vidal, A., Guimera, N., Cross, P., Wain, G. V., Petry, K. U., Mariani, L., Bergeron, C., Mandys, V., Sica, A. R., Felix, A., Usubutun, A., Seoud, M., Hernandez-Suarez, G., Nowakowski, A. M., Wilson, G., Dalstein, V., Hampl, M., Kasamatsu, E. S., Lombardi, L. E., Tinoco, L., Alvarado-Cabrero, I., Perrotta, M., Bhatla, N., Agorastos, T., Lynch, C. F., Goodman, M. T., Shin, H. R., Viarheichyk, H., Jach, R., Cruz, M. O., Velasco, J., Molina, C., Bornstein, J., Ferrera, A., Domingo, E. J., Chou, C. Y., Banjo, A. F., Castellsague, X., Pawlita, M., Lloveras, B., Quint, W. G., Munoz, N., Bosch, F. X. & Group, H. V. S. 2013. Worldwide human papillomavirus genotype attribution in over 2000 cases of intraepithelial and invasive lesions of the vulva. *Eur J Cancer*, 49, 3450-3461.
- De Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U. & Zur Hausen, H. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324, 17-27.
- Devoogdt, N., Revets, H., Ghassabeh, G. H. & De Baetselier, P. 2004. Secretory leukocyte protease inhibitor in cancer development. *Ann N Y Acad Sci*, 1028, 380-389.
- Doorbar, J. & Gallimore, P. H. 1987. Identification of proteins encoded by the L1 and L2 open reading frames of human papillomavirus 1a. *J Virol*, 61, 2793-2799.

- Doorbar, J. 2013. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology*, 445, 80-98.
- Doorbar, J., Egawa, N., Griffin, H., Kranjec, C. & Murakami, I. 2015. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev Med Virol*, 25 Suppl 1, 2-23.
- Doumas, S., Kolokotronis, A. & Stefanopoulos, P. 2005. Anti-inflammatory and antimicrobial roles of secretory leukocyte protease inhibitor. *Infect Immun*, 73, 1271-1274.
- Faber, M. T., Sand, F. L., Albieri, V., Norrild, B., Kjaer, S. K. & Verdoodt, F. 2017. Prevalence and type distribution of human papillomavirus in squamous cell carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva. *Int J Cancer*, 141, 1161-1169.
- Fakioglu, E., Wilson, S. S., Mesquita, P. M., Hazrati, E., Cheshenko, N., Blaho, J. A. & Herold, B. C. 2008. Herpes simplex virus downregulates secretory leukocyte protease inhibitor: a novel immune evasion mechanism. *J Virol*, 82, 9337-9344.
- Faraji, F., Zaidi, M., Fakhry, C. & Gaykalova, D. A. 2017. Molecular mechanisms of human papillomavirus-related carcinogenesis in head and neck cancer. *Microbes Infect*, 19, 464-475.
- Finnen, R. L., Erickson, K. D., Chen, X. S. & Garcea, R. L. 2003. Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. *J Virol*, 77, 4818-4826.
- Franken, C., Meijer, C. J. & Dijkman, J. H. 1989. Tissue distribution of antileukoprotease and lysozyme in humans. *J Histochem Cytochem*, 37, 493-498.
- Ganguly, N. & Parihar, S. P. 2009. Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. *J Biosci*, 34, 113-123.
- Gerke, V. & Moss, S. E. 2002. Annexins: from structure to function. *Physiol Rev*, 82, 331-371.
- Gillison, M. L. 2006. Human papillomavirus and prognosis of oropharyngeal squamous cell carcinoma: implications for clinical research in head and neck cancers. *J Clin Oncol*, 24, 5623-5625.
- Gissmann, L., Pfister, H. & Zur Hausen, H. 1977. Human papilloma viruses (HPV): characterization of four different isolates. *Virology*, 76, 569-580.
- Giuliano, A. R., Palefsky, J. M., Goldstone, S., Moreira, E. D., Jr., Penny, M. E., Aranda, C., Vardas, E., Moi, H., Jessen, H., Hillman, R., Chang, Y. H., Ferris, D., Rouleau, D., Bryan, J., Marshall, J. B., Vuocolo, S., Barr, E., Radley, D., Haupt, R. M. & Guris, D. 2011. Efficacy of quadrivalent HPV vaccine against HPV Infection and disease in males. *N Engl J Med*, 364, 401-411.

- Gravitt, P. E. & Winer, R. L. 2017. Natural History of HPV Infection across the Lifespan: Role of Viral Latency. *Viruses*, 9.
- Harden, M. E. & Munger, K. 2017. Human papillomavirus molecular biology. *Mutat Res Rev Mutat Res*, 772, 3-12.
- Hawley-Nelson, P., Vousden, K. H., Hubbert, N. L., Lowy, D. R. & Schiller, J. T. 1989. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J*, 8, 3905-3910.
- Hegde, R. S. 2002. The papillomavirus E2 proteins: structure, function, and biology. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 31, 343-360.
- Hiemstra, P. S. 2002. Novel roles of protease inhibitors in infection and inflammation. *Biochem Soc Trans*, 30, 116-120.
- Hoffmann, M., Gorogh, 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*, 218, 199-206.
- Hoffmann, M., Quabius, E. S., Tribius, S., Hebebrand, L., Gorogh, T., Halec, G., Kahn, T., Hedderich, J., Rocken, C., Haag, J., Waterboer, T., Schmitt, M., Giuliano, A. R. & Kast, W. M. 2013. Human papillomavirus infection in head and neck cancer: the role of the secretory leukocyte protease inhibitor. *Oncol Rep*, 29, 1962-1968.
- Jin, F. Y., Nathan, C., Radzioch, D. & Ding, A. 1997. Secretory leukocyte protease inhibitor: a macrophage product induced by and antagonistic to bacterial lipopolysaccharide. *Cell*, 88, 417-426.
- Kikuchi, T., Abe, T., Hoshi, S., Matsubara, N., Tominaga, Y., Satoh, K. & Nukiwa, T. 1998. Structure of the murine secretory leukoprotease inhibitor (Slpi) gene and chromosomal localization of the human and murine SLPI genes. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 19, 875-880.
- Klug, A. & Finch, J. T. 1965. Structure of Viruses of the Papilloma-Polyoma Type. I. Human Wart Virus. *J Mol Biol*, 11, 403-423.
- Klug, S., Meerpohl, J., Terhardt, M., Sande, M. V. D. & Zepp, F. 2018. Wissenschaftliche Begründung für die Empfehlung der HPV-Impfung für Jungen im Alter von 9 bis 14 Jahren. *Epid Bull* [Online], 26. Available: [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2018/Ausgaben/26\\_18.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2018/Ausgaben/26_18.pdf?__blob=publicationFile).



- Klussmann, J. P., Weissenborn, S. J., Wieland, U., Dries, V., Eckel, H. E., Pfister, H. J. & Fuchs, P. G. 2003. Human papillomavirus-positive tonsillar carcinomas: a different tumor entity? *Med Microbiol Immunol*, 192, 129-132.
- Koskinen, W. J., Chen, R. W., Leivo, I., Makitie, A., Back, L., Kontio, R., Suuronen, R., Lindqvist, C., Auvinen, E., Molijn, A., Quint, W. G., Vaheri, A. & Aaltonen, L. M. 2003. Prevalence and physical status of human papillomavirus in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Cancer*, 107, 401-406.
- Krause, L., Mauz, E., Houben, R., Lange, M. & Größwald, A. 2018. Die zweite Folgeerhebung der „Studie zur Gesundheit von Kindern und Jugendlichen in Deutschland“. *Epid Bull* [Online], 16. Available: [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2018/Ausgaben/16\\_18.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2018/Ausgaben/16_18.pdf?__blob=publicationFile).
- Lebouder, F., Morello, E., Rimmelzwaan, G. F., Bosse, F., Pechoux, C., Delmas, B. & Riteau, B. 2008. Annexin II incorporated into influenza virus particles supports virus replication by converting plasminogen into plasmin. *J Virol*, 82, 6820-6828.
- Lee, L. J., Howitt, B., Catalano, P., Tanaka, C., Murphy, R., Cimbak, N., Demaria, R., Bu, P., Crum, C., Horowitz, N., Matulonis, U. & Viswanathan, A. N. 2016. Prognostic importance of human papillomavirus (HPV) and p16 positivity in squamous cell carcinoma of the vulva treated with radiotherapy. *Gynecol Oncol*, 142, 293-298.
- Longworth, M. S. & Laimins, L. A. 2004. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev*, 68, 362-372.
- Ma, G., Greenwell-Wild, T., Lei, K., Jin, W., Swisher, J., Hardegen, N., Wild, C. T. & Wahl, S. M. 2004. Secretory leukocyte protease inhibitor binds to annexin II, a cofactor for macrophage HIV-1 infection. *J Exp Med*, 200, 1337-1346.
- Maggino, T., Landoni, F., Sartori, E., Zola, P., Gadducci, A., Alessi, C., Solda, M., Coscio, S., Spinetti, G., Maneo, A., Ferrero, A. & Konishi De Toffoli, G. 2000. Patterns of recurrence in patients with squamous cell carcinoma of the vulva. A multicenter CTF Study. *Cancer*, 89, 116-122.
- Mayer, P. 1897. Über Schleimfärbung. *Mitteilungen aus der Zoologischen Station zu Neapel*.
- Mcneely, T. B., Shugars, D. C., Rosendahl, M., Tucker, C., Eisenberg, S. P. & Wahl, S. M. 1997. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 infectivity by secretory leukocyte protease inhibitor occurs prior to viral reverse transcription. *Blood*, 90, 1141-1149.

- Melnick, J. L. 1962. Papova virus group. *Science*, 135, 1128-1130.
- Merz, I. 2016. *Humane Papillomvirus-Infektionen beim Tonsillenkarzinom: Die Rolle des Sekretorischen Leukozytenproteaseinhibitors (SLPI) und dessen Einfluss auf Überlebenszeiten betroffener Patienten*. Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Modrow, S., Falke, D., Truyen, U. & Schätzl, H. 2010. *Molekulare Virologie*. Heidelberg: Springer Akademischer Verlag.
- 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*, 51 Pt 1, 263-273.
- Munger, K. & Howley, P. M. 2002. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res*, 89, 213-228.
- Munoz, N., Bosch, F. X., De Sanjose, S., Herrero, R., Castellsague, X., Shah, K. V., Snijders, P. J., Meijer, C. J. & International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study, G. 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, 348, 518-527.
- Niaid; National Institute of Allergy and Infectious Diseases. 2018. *Reference genomes for Human papillomavirus* [Online]. National Institute of Allergy and Infectious Diseases,. Available: [https://pave.niaid.nih.gov/#explore/reference\\_genomes/human\\_genomes](https://pave.niaid.nih.gov/#explore/reference_genomes/human_genomes) [Accessed 2018-11-12].
- Nicol, A. F., Brunette, L. L., Nuovo, G. J., Grinsztejn, B., Friedman, R. K., Veloso, V. G., Cunha, C. B., Coutinho, J. R., Vianna-Andrade, C., Oliveira, N. S., Woodham, A. W., Dm, D. a. S. & Kast, W. M. 2016. Secretory Leukocyte Protease Inhibitor Expression and High-Risk HPV Infection in Anal Lesions of HIV-Positive Patients. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 73, 27-33.
- Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29, e45.
- Pinto, A. P., Schlecht, N. F., Pintos, J., Kaiano, J., Franco, E. L., Crum, C. P. & Villa, L. L. 2004. Prognostic significance of lymph node variables and human papillomavirus DNA in invasive vulvar carcinoma. *Gynecol Oncol*, 92, 856-865.
- Plummer, M., Schiffman, M., Castle, P. E., Maucort-Boulch, D., Wheeler, C. M. & Group, A. 2007. A 2-year prospective study of human papillomavirus persistence among women with a cytological diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intraepithelial lesion. *J Infect Dis*, 195, 1582-1589.

- Prigge, E. S., Von Knebel Doeberitz, M. & Reuschenbach, M. 2017. Clinical relevance and implications of HPV-induced neoplasia in different anatomical locations. *Mutat Res Rev Mutat Res*, 772, 51-66.
- Quabius, E. S., Moller, P., Haag, J., Pfannenschmidt, S., Hedderich, J., Gorogh, T., Rocken, 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*, 134, 1323-1334.
- Quabius, E. S., Gorogh, T., Fischer, G. S., Hoffmann, A. S., Gebhard, M., Evert, M., Beule, A., Maune, S., Knecht, R., Ovari, A., Durisin, M., Hoppe, F., Rocken, C., Hedderich, J., Ambrosch, P. & Hoffmann, M. 2015a. 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*, 357, 339-345.
- Quabius, E. S., Haag, J., Kuhnel, A., Henry, H., Hoffmann, A. S., Gorogh, T., Hedderich, J., Evert, M., Beule, A. G., Maune, S., Knecht, R., Ovari, A., Durisin, M., Hoppe, F., Tribius, S., Rocken, C., Ambrosch, P. & Hoffmann, M. 2015b. Geographical and anatomical influences on human papillomavirus prevalence diversity in head and neck squamous cell carcinoma in Germany. *Int J Oncol*, 46, 414-422.
- Rakislova, N., Clavero, O., Alemany, L., Saco, A., Quiros, B., Lloveras, B., Alejo, M., Pawlita, M., Quint, W., Del Pino, M., De Sanjose, S., Ordi, J. & Group, V. S. 2017a. "Histological characteristics of HPV-associated and -independent squamous cell carcinomas of the vulva: A study of 1,594 cases". *Int J Cancer*, 141, 2517-2527.
- Rakislova, N., Saco, A., Sierra, A., Del Pino, M. & Ordi, J. 2017b. Role of Human Papillomavirus in Vulvar Cancer. *Adv Anat Pathol*, 24, 201-214.
- Raynor, C. M., Wright, J. F., Waisman, D. M. & Pryzdial, E. L. 1999. Annexin II enhances cytomegalovirus binding and fusion to phospholipid membranes. *Biochemistry*, 38, 5089-5095.
- Reich, O., Regauer, S., Marth, C., Schmidt, D., Horn, L. C., Dannecker, C., Menton, M. & Beckmann, M. W. 2015. Precancerous Lesions of the Cervix, Vulva and Vagina According to the 2014 WHO Classification of Tumors of the Female Genital Tract. *Geburtshilfe Frauenheilkd*, 75, 1018-1020.
- Remmerbach, T. W., Brinckmann, U. G., Hemprich, A., Chekol, M., Kuhndel, K. & Liebert, U. G. 2004. PCR detection of human papillomavirus of the mucosa: comparison between MY09/11 and GP5+/6+ primer sets. *J Clin Virol*, 30, 302-308.

- Rescher, U. & Gerke, V. 2004. Annexins--unique membrane binding proteins with diverse functions. *J Cell Sci*, 117, 2631-2639.
- Rowson, K. E. & Mahy, B. W. 1967. Human papova (wart) virus. *Bacteriol Rev*, 31, 110-131.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 5463-5467.
- Saxena, V., Lai, C. K., Chao, T. C., Jeng, K. S. & Lai, M. M. 2012. Annexin A2 is involved in the formation of hepatitis C virus replication complex on the lipid raft. *J Virol*, 86, 4139-4150.
- Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J. & Howley, P. M. 1990. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*, 63, 1129-1136.
- Scheffner, M., Huibregtse, J. M., Vierstra, R. D. & Howley, P. M. 1993. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*, 75, 495-505.
- Schneede, P. 2017. [One decade of HPV vaccination in Germany]. *Urologe A*, 56, 728-733.
- Shope, R. E. & Hurst, E. W. 1933. Infectious Papillomatosis of Rabbits : With a Note on the Histopathology. *J Exp Med*, 58, 607-624.
- Sideri, M., Jones, R. W., Wilkinson, E. J., Preti, M., Heller, D. S., Scurry, J., Haefner, H. & Neill, S. 2005. Squamous vulvar intraepithelial neoplasia: 2004 modified terminology, ISSVD Vulvar Oncology Subcommittee. *J Reprod Med*, 50, 807-810.
- Strauss, M. J., Shaw, E. W. & Et Al. 1949. Crystalline virus-like particles from skin papillomas characterized by intranuclear inclusion bodies. *Proc Soc Exp Biol Med*, 72, 46-50.
- Syrjanen, S. & Syrjanen, K. 2008. The history of papillomavirus research. *Cent Eur J Public Health*, 16 Suppl, S7-13.
- Taylor, J. R., Skeate, J. G. & Kast, W. M. 2018. Annexin A2 in Virus Infection. *Front Microbiol*, 9, 2954.
- 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*, 32, 1299-1307.
- Van De Nieuwenhof, H. P., Van Kempen, L. C., De Hullu, J. A., Bekkers, R. L., Bulten, J., Melchers, W. J. & Massuger, L. F. 2009. The etiologic role of HPV in vulvar squamous cell carcinoma fine tuned. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 18, 2061-2067.

- Waisman, D. M. 1995. Annexin II tetramer: structure and function. *Mol Cell Biochem*, 149-150, 301-322.
- Wakeham, K., Kavanagh, K., Cuschieri, K., Millan, D., Pollock, K. G., Bell, S., Burton, K., Reed, N. S. & Graham, S. V. 2017. HPV status and favourable outcome in vulvar squamous cancer. *Int J Cancer*, 140, 1134-1146.
- Wheeler, C. M., Castellsague, X., Garland, S. M., Szarewski, A., Paavonen, J., Naud, P., Salmeron, J., Chow, S. N., Apter, D., Kitchener, H., Teixeira, J. C., Skinner, S. R., Jaisamrarn, U., Limson, G., Romanowski, B., Aoki, F. Y., Schwarz, T. F., Poppe, W. A., Bosch, F. X., Harper, D. M., Huh, W., Hardt, K., Zahaf, T., Descamps, D., Struyf, F., Dubin, G., Lehtinen, M. & Group, H. P. S. 2012. Cross-protective efficacy of HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by non-vaccine oncogenic HPV types: 4-year end-of-study analysis of the randomised, double-blind PATRICIA trial. *Lancet Oncol*, 13, 100-110.
- Woodham, A. W., Da Silva, D. M., Skeate, J. G., Raff, A. B., Ambroso, M. R., Brand, H. E., Isas, J. M., Langen, R. & Kast, W. M. 2012. The S100A10 subunit of the annexin A2 heterotetramer facilitates L2-mediated human papillomavirus infection. *PLoS One*, 7, e43519.
- Yang, S. L., Chou, Y. T., Wu, C. N. & Ho, M. S. 2011. Annexin II binds to capsid protein VP1 of enterovirus 71 and enhances viral infectivity. *J Virol*, 85, 11809-11820.
- Zheng, Z. M. & Baker, C. C. 2006. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci*, 11, 2286-2302.
- Zur Hausen, H., Gissmann, L., Steiner, W., Dippold, W. & Dreger, I. 1975. Human papilloma viruses and cancer. *Bibl Haematol*, 569-571.
- Zur Hausen, H. 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*, 2, 342-350.

## **Danksagung**

Mein Dank gilt Frau Professorin Dr. Petra Ambosch für die außerordentlich guten Arbeitsbedingungen und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes an der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie im Universitätsklinikum der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Markus Hoffmann, leitender Oberarzt der Klinik, für die Bereitstellung des Themas und die äußerst nette und exzellente wissenschaftliche Betreuung. Seine Anregungen und Impulse trugen maßgeblich zum Entstehen dieser Arbeit bei.

Frau Dr. Elgar Susanne Quabius möchte ich danken für ihre Hilfe bei der DNA-Analyse sowie der statistischen Auswertung der Ergebnisse. Ebenso bedanke ich mich für die vortreffliche Hilfe bei der Korrektur dieser Promotionsarbeit.

Herrn Professor Dr. Nicolai Maass danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und den Zugang zu wertvollen Daten in der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe.

Herrn Professor Ibrahim Alkatout danke ich für die sehr nette und fachliche Unterstützung in der Thematik des Vulvakarzinoms.

Frau Dr. Veronika Günther danke ich für die ausgezeichnete Unterstützung und technische Hilfe in der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe zur Erfassung der Patientendaten.

Herrn Professor Dr. Christoph Röcken vom Pathologischen Instituts der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel danke ich für die Unterstützung und die Bereitstellung der Gewebeproben.

Dem Institut für klinische Molekularbiologie danke ich für die Bereitstellung der Sanger Sequenzierung im Rahmen des Exzellenzclusters zur Entzündungsforschung. Besonderer Dank gilt der technischen Unterstützung von Tanja Naujoks und Christopher Noack.

Ich danke meinen Eltern, Frau Katrin von Bülow und Herrn Dr. Christian Loehr für die langjährige Unterstützung während des Studiums und darüber hinaus während dieser Promotionsarbeit. Ebenso danke ich meinen Geschwistern und meiner Freundin Lina für deren Motivation und Ansporn zur Vollendung dieser Arbeit.

Ich widme diese Arbeit meinen Großeltern Gisela und Dr. Hans-Christian Kersten, sowie Helga Loehr und meinem verstorbenen Großvater Helmut Loehr.

**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 .....

.....  
(Julius Jakob Loehr)