

Aus der Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie  
(Direktorin: Professor Dr. med. B. Wollenberg)  
der Universität zu Lübeck

**Vergleichende immunhistochemische Charakterisierung  
der humanen Beta-Defensin 1–3 Produktion in gesundem Gewebe,  
präkanzerösen Läsionen und Plattenepithelkarzinomen  
des Oropharynx**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Lübeck

vorgelegt von

**Patrick Albrecht Hörtling**  
aus  
München

Lübeck 2007

1. Berichterstatter:

Priv.-Doz. Dr. med. Jens Eduard Meyer

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. med., Dr. med. univ. (H), C. sc. (H) György Kovács

Tag der mündlichen Prüfung: 23.11.2007

zum Druck genehmigt. Lübeck, den 23.11.2007

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach

- Dekan der Medizinischen Fakultät -

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	5
1.1 Die Rolle humaner $\beta$ -Defensine im gesunden Oropharynx .....	5
1.2 Antimikrobielle Peptide in Tumoren.....	9
1.3 Fragestellung und Ziel der Arbeit .....	10
2. Patienten und Methoden.....	13
2.1. Materialien und Reagenzien.....	13
2.1.1. Materialien .....	13
2.1.2. Reagenzien .....	13
2.2 Patienten.....	13
2.2.1 Normale Schleimhaut des Oropharynx .....	13
2.2.2 Normale kindliche Tonsillen.....	14
2.2.3 Tonsillen von Patienten mit Nikotin- und Alkoholabusus.....	14
2.2.4 Oropharynxkarzinome.....	15
2.3 Immunhistochemie .....	15
2.3.1 Schneiden .....	15
2.3.2 Entparaffinieren.....	15
2.3.3. Färben.....	15
2.3.4 Auswerten.....	16
2.4 Statistische Auswertung .....	16
3. Ergebnisse .....	17
3.1 Quantitative Auswertung der Immunhistochemie in den einzelnen .....	17
Gruppen.....	17
3.1.1 hBD-1 .....	17
3.1.2 hBD-2 .....	18
3.1.3 hBD-3 .....	19
3.2 Vergleiche der einzelnen Gruppen.....	21
3.2.1 Vergleich von normaler oropharyngealer Schleimhaut und normaler Tonsille.....	21
3.2.2 Vergleich von normaler Tonsille und Tonsille mit chronischem Nikotin- und .....	22
Alkoholabusus.....	22
3.2.3 Vergleich von normaler Tonsille und Oropharynxkarzinomen .....	23
3.2.4 Vergleich von Tonsille mit chronischem Nikotin- und Alkoholabusus und.....	24
Oropharynxkarzinomen.....	24
4. Diskussion .....	26
4.1 Kritik der Methodik.....	26
4.2 Bedeutung der $\beta$ -Defensin-Produktion in der Onkogenese .....	28
4.3 Therapieansätze und Ausblick .....	31
5 Zusammenfassung.....	35
6 Literaturverzeichnis.....	37
7 Anhang .....	42
8 Lebenslauf.....	57
9 Danksagung.....	58

## Abkürzungsverzeichnis

ACTH	adrenocortikotropes Hormon
AP	antimikrobielle(s) Peptid(e)
CUP	cancer of unknown primary
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
hBD	humanes beta-Defensin
HNP	humanes Neutrophilen-Peptid
HPLC	high-pressure-liquid-chromatography (Hochdruckflüssigkeits- chromatographie)
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
LL-37	Cathelicidin
kDa	Kilodalton
LAP	Linguales antimikrobielles Peptid
LOH	loss of heterozygosity
MDR	multi-drug resistance
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure, Produkt der Transkription
NF-kB	nukleärer Faktor-kappaB, proinflammatorischer Transkriptionsfaktor
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
TAP	Tracheales antimikrobielles Peptid
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
$\mu\text{m}$	Mikrometer

# 1. Einleitung

## 1.1 Die Rolle humaner $\beta$ -Defensine im gesunden Oropharynx

Die Epithelien von Makroorganismen sind einem permanenten Angriff von potentiell pathogenen Mikroorganismen, Bakterien, Pilzen und Viren ausgesetzt. Dennoch sind Infektionen von Epithelien relativ selten. Lange Zeit bestand die Meinung, dass die Erregerabwehr bei höheren Organismen, insbesondere bei Säugern, entscheidend vom adaptiven Immunsystem mit seinen bekannten zellulären Bestandteilen und Antikörpern getragen wird. Die Grundlagenforschung insbesondere der letzten zwei Jahrzehnte hat jedoch ergeben, dass sich Wirbeltiere, Säuger und der Mensch hierbei auch einer Vielzahl von Molekülen aus einem phylogenetisch weitaus älteren Teil des Immunsystems bedienen. Und obwohl Alexander Fleming mit Lysozym bereits 1922 den ersten Vertreter dieses Abwehrsystems im menschlichen Nasensekret entdeckt hatte, wird diesen antimikrobiellen Peptiden erst in jüngerer Zeit eine zunehmende Bedeutung bei der Erregerabwehr zugeschrieben.

Zasloff isolierte 1987 mit den Magaininen beim afrikanischen krallentragenden Frosch *Xenopus laevis* die ersten antimikrobiellen Peptide bei einem Vertebraten [Zasloff 1987]. Das auffallend seltene Auftreten von Komplikationen nach Entfernung der Ovarien trotz Aufenthalt der Tiere im Aquarium hatte die Suche initiiert. Diese aus 23 bis 28 Aminosäuren bestehenden Antimikrobiellen Peptide (AP) werden in den Drüsen des Tieres gespeichert und sollen maßgeblich dafür verantwortlich sein, dass die Wunden sich nicht regelmäßig infizieren. Das Spektrum von AP's umfasst grampositive und -negative Bakterien, Pilze und Protozoen. Die Beobachtungen, dass Luftröhren von Rindern primär frei von Infektionen sind und Zungen von Rindern trotz häufiger Verletzungen sehr selten von pathogenen Keimen befallen werden, führten zur Entdeckung des Trachealen Antimikrobiellen Peptids (TAP) durch Diamond et al. und des Lingualen Antimikrobiellen Peptids (LAP) durch Schonwetter et al. in den entsprechenden bovinen Materialien [Diamond 1991, Schonwetter 1995]. LAP und TAP bestehen aus 38 bis 42 Aminosäuren, sind kationisch und weisen eine hohe Homologie zu den humanen  $\beta$ -Defensinen auf, deren erster Vertreter ebenfalls 1995 durch Bensch et al. beschrieben wurde [Bensch 1995].

Bei Säugern sind derzeit drei Gruppen von Defensinen bekannt. Defensine sind kationische Peptide mit einem Molekulargewicht von 3.5 – 4.5 kDa und drei intramolekularen, stabilisierenden Disulfid-Brücken zwischen zwei Cystein-Resten. Es werden  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\theta$ -Defensine unterschieden. Der Mensch produziert  $\alpha$ - und  $\beta$ -Defensine. Die zirkulären  $\theta$ -Defensine wurden kürzlich in Leukozyten von Rhesusaffen entdeckt. Sie werden aus zwei

Prekursormolekülen, die den  $\alpha$ -Defensinen ähneln, zusammengesetzt. Im menschlichen Genom ist für die  $\theta$ -Defensine ein Stop-Codon enthalten, was die fehlende Expression erklärt [Ganz 2003, Lehrer 2002].

Die humanen  $\alpha$ -Defensine finden sich vor allem in den Vakuolen von Phagozyten. Die humanen Neutrophilen-Peptide HNP-1 – 4 beispielsweise werden konstitutiv von Neutrophilen gebildet. Sie werden in den Granula der Neutrophilen und zu einem Teil auch in Makrophagen gespeichert. Außerdem werden sie von myeloiden Vorläuferzellen gebildet. Ihre Produktion soll durch aktivierte CD-8-positive T-Lymphozyten induziert werden [Oppenheim 2003]. HD-5 und -6 hingegen werden von den Paneth'schen Körnerzellen des Dünndarms produziert [Dale 2001a]. Die humanen  $\alpha$ -Defensine bestehen aus 29-35 Aminosäuren und bilden zwischen den Cystein-Resten-1 und -6, -2 und -4, -3 und -5 intramolekulare Disulfidbrücken aus. Ihr Molekulargewicht beträgt 3,5 – 4 kDa. Die  $\alpha$ -Defensine werden nach Degranulation aus den Neutrophilen und Paneth-Zellen ausgeschüttet. Ihre genaue pathophysiologische Rolle ist noch unklar, jedoch scheinen sie auf komplexe Weise an der lokalen und systemischen Infektabwehr beteiligt zu sein. Sie besitzen nicht nur eine direkte antibakterielle und antivirale Wirkung, sondern sollen auch an der Aktivierung des Komplementsystems und der Degranulation der Mastzellen beteiligt sein. Ihre chemotaktische Eigenschaft soll sich auf interdigitierende dendritische Zellen und ruhende T-Zellen erstrecken. Ein spezieller Rezeptor für  $\alpha$ -Defensine konnte bis jetzt nicht nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass ihre Aktivität durch Pertussis-Toxin gehemmt werden kann, legt einen G-Protein-gekoppelten Mechanismus nahe. Das Bakterientoxin wirkt durch ADP-Ribosylierung eines Cystinrestes der  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins, hemmt dessen Interaktion mit dem Rezeptor und führt dadurch zur Inhibition der intrazellulären Signaltransduktion. Unterstützt wird diese Annahme dadurch, dass  $\alpha$ -Defensine mit dem G-Protein-gekoppelten Rezeptor für das adrenocortikotrope Hormon (ACTH) interagieren und die Produktion von Kortikosteroiden hemmen können [Oppenheim 2003].

Die humanen  $\beta$ -Defensine (hBD's) wiederum werden von epithelialen Zellen verschiedener Organe produziert und in den Extrazellulärraum abgegeben. Die Bedeutung der  $\beta$ -Defensine als Teil der angeborenen Abwehr liegt in der Erregerbekämpfung an Haut und Schleimhäuten als erster Barriere gegen infektiöse Mikroorganismen. Im Unterschied zu den  $\alpha$ -Defensinen bestehen die  $\beta$ -Defensine aus bis zu 45 Aminosäureresten. Die Disulfid-Brücken bestehen zwischen den Cystein-Resten-1 und -5, -2 und -4 und -3 und -6. Relativ gesehen, sind mehr Lysin- als Arginin-Reste enthalten. Die große Ähnlichkeit der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Defensine jedoch und die Tatsache, dass ihre Gene eng benachbart auf dem kurzen Arm des Chromosoms 8 p22-23

liegen, unterstützen die Hypothese, dass  $\alpha$ - und  $\beta$ -Defensine einen gemeinsamen Ursprung haben. Das Wirkungsspektrum von hBD's umfasst sowohl gram-positive und gram-negative Bakterien als auch gekapselte Viren und Pilze. Durch ihren amphiphilen Charakter können Defensine sich in die äußere Zellmembran von Mikroorganismen einlagern, um dann mit der inneren Zellmembran in Wechselwirkung zu treten. Die Ausbildung von Poren in Form von Oligomeren bewirkt schließlich den Austritt von zellulären Bestandteilen und so den Zusammenbruch der intrazellulären Homöostase [Ganz 2003]. Zellen von Säugern sollen für diesen antimikrobiellen Wirkmechanismus in physiologischen Konzentrationen aufgrund ihres höheren Anteils an Cholesterin und Phospholipiden in der Membran weitgehend unempfindlich sein. Außerdem werden die antimikrobiellen Eigenschaften der Defensine durch Kochsalz bereits in physiologischen Konzentrationen und durch Serum gehemmt. Daher scheint der Wirkungsschwerpunkt der AP hauptsächlich an den epithelialen Oberflächen wie der Haut und der Mukosa sowie in den Phagolysosomen zu liegen.

Das humane  $\beta$ -Defensin-1, hBD-1, wurde 1995 von Bensch et al. aus dem Hämofiltrat von terminal niereninsuffizienten Patienten isoliert. Schließlich wurde hBD-1 im Epithel der Mukosa des Urogenital- und des Respirationstraktes entdeckt. Die antimikrobielle Aktivität von hBD-1 wurde erstmals 1997 von Goldman et al. genauer beschrieben [Goldman 1997]. Das Wirkspektrum umfasst vor allem gram-negative Bakterien, *Candida albicans* und einige gram-positive Bakterien, nicht jedoch *Staphylococcus aureus*. Die Expression von hBD-1 erfolgt konstitutiv. Auf mRNA-Ebene wurde die Expression von hBD-1 vor allem im Urogenitaltrakt und der Niere und in geringerer Ausprägung in der Haut, dem Respirationstrakt, den Speicheldrüsen, dem Darm und der Leber nachgewiesen.

Ebenfalls 1997 machten Harder et al. die Beobachtung, dass die Haut von Psoriatikern selten von Infektionen befallen werden und isolierten das zweite humane  $\beta$ -Defensin, hBD-2, aus den Hautschuppen dieser Patienten [Harder 1997]. Das hBD-2-Gen ist im Gegensatz zum hBD-1-Gen durch verschiedene Stimuli induzierbar. Nachgewiesen wurde dies zum einen für gram-negative Bakterien, wie zum Beispiel *Pseudomonas aeruginosa* oder *Escherichia coli*, zum anderen für proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$ . [Schröder 1999]. Die antimikrobielle Wirkung von hBD-2 erstreckt sich vor allem auf gram-negative Bakterien und Hefepilze, nicht jedoch auf gram-positive Bakterien. In Lösung liegt hBD-2 als dreiteiliges  $\beta$ -Faltblatt vor, wobei die zweite Domäne mit der dritten eine  $\beta$ -Haarnadel ergibt. Die Aminosäurereste 6-9 bilden eine kurze,  $\alpha$ -helikale Struktur aus, wie sie auch in ähnlicher Form bei hBD-1 gefunden wird. Außerdem haben röntgenkristallographische Untersuchungen gezeigt,

dass hBD-2 als Quartärstruktur Oktamere ausbilden kann [Lehrer 2002]. Mittlerweile wurde die mRNA von hBD-2 in der Haut, dem Respirationstrakt und in geringerem Maße in Speicheldrüsen und dem Urogenitaltrakt nachgewiesen [Schröder 1999].

2000 entdeckten Harder et al. auf der Suche nach einem epithelialen Agens gegen gram-positive Bakterien das dritte humane  $\beta$ -Defensin, hBD-3 [Harder 2001]. HBD-3 ist ein 5,6 kDa-Polypeptid von 45 Aminosäuren Länge. Das antimikrobielle Spektrum von hBD-3 umfasst sowohl potentiell pathogene gram-positive Bakterien als auch gram-negative Bakterien und Hefepilze. Dabei wirkt hBD-3 im Gegensatz zu hBD-2 ebenso gegen *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli*. Als Besonderheit ist hBD-3 hochwirksam gegen multiresistenten *Staphylococcus aureus* und Vancomycin-resistenten *Enterococcus faecium*. HBD-3 ist damit der Prototyp eines breitbandantimikrobiellen Peptids. Die Expression von hBD-3 ist, ebenso wie die von hBD-2, durch verschiedene Stimuli induzierbar. Auf mRNA-Ebene konnte eine Hochregulation des hBD-3-Gens sowohl durch TNF- $\alpha$  als auch durch hitzeinaktivierte gram-positive und gram-negative Bakterien nachgewiesen werden.

Kürzlich wurden weitere  $\beta$ -Defensine entdeckt [Schutte 2002]. Insgesamt konnten mit Hilfe des humanen Genomprojektes 31 hBD's gefunden werden, jedoch konnten bis jetzt nur sechs Defensine aus menschlichen Geweben isoliert werden. HBD -4, -5 und -6 sind ebenfalls induzierbare APs, ein Nachweis für ihre biologische Aktivität konnte bis jetzt jedoch nicht erbracht werden.

Einen aufgrund des dort herrschenden Milieus besonders interessanten Ort stellen die Mundhöhle und der Oropharynx dar. Auch hier wurde die Expression von antimikrobiellen Peptiden nachgewiesen, unter anderem auch in den Epithelien aus Gingiva, Zunge, Speicheldrüsen und Tonsillen [Bissell 2004, Dale 2001a/b]. Krisanprakornkit wies 1998 mittels RT-PCR in primären menschlichen Gingivaepithelien die konstitutive, entzündungsunabhängige Expression von hBD-1 nach [Krisanprakornkit 1998]. Chae et al. zeigten an Tonsillektomiepräparaten von Kindern ebenfalls eine epitheliale Expression von hBD-1 [Chae 2001]. Die Expression von hBD-1-mRNA und die erhöhte Expression von hBD-2-mRNA in Abhängigkeit von chronischen Entzündungen konnte am Tonsillengewebe in unserer Arbeitsgruppe bestätigt werden [Meyer 2002]. Ferner wurden hBD-1 und -2 im Epithel am Rand der Gingiva nachgewiesen, dem Ort, der oralen Bakterien am meisten ausgesetzt ist [Dale 2001b]. Für hBD-3 stellten Bissell et al. in gesundem Gingivaepithel eine signifikant höhere



Expression als in entzündlich verändertem fest [Bisell 2004]. Untersuchungen von Abiko et al. bzw. Nishimura und Abiko et al. zeigten für hBD-2 und hBD-3 in oraler Schleimhaut mit Lichen planus und Leukoplakie eine im Vergleich zu normalem Epithel verstärkte Expression [Abiko 2002, Nishimura 2003]. Weiterhin soll hBD-3 in regenerativen Zellen, wie zum Beispiel an Ulzerationen, verstärkt nachweisbar sein. Die Autoren postulieren, dass hBD-3 auch an der Differenzierung von Keratinozyten beteiligt ist. Hieraus lässt sich unter anderem auch auf eine mögliche Rolle der Defensine bei der Entstehung von bösartigen Tumoren schließen.

## **1.2 Antimikrobielle Peptide in Tumoren**

In letzter Zeit wird den antimikrobiellen Peptiden im Zusammenhang mit Tumoren ein zunehmendes Interesse zuteil. So konnte die Arbeitsgruppe um Mizukawa und Sawaki 1998 mittels HPLC das humane  $\alpha$ -Defensin HNP-1 im Speichel von Patienten nachweisen, die an Kopf-Hals-Karzinomen litten. Es zeigte sich für Patienten mit Plattenepithelkarzinomen eine erhöhte Konzentration von HNP-1 im Speichel als bei Patienten mit Adenokarzinomen oder Gesunden. Die Speichelkonzentration korrelierte unter anderem mit der Tumorgröße nach der TNM-Klassifikation. Ein Jahr später konnte gezeigt werden, dass karzinom-assoziierte Langerhans-Zellen immunhistochemisch ebenfalls positiv für HNP-1 sind [Mizukawa 1998,1999]. Langerhans-Zellen haben ihren Ursprung im Knochenmark und funktionieren als antigenpräsentierende Zellen für T-Lymphozyten. 2001 zeigte die Arbeitsgruppe in einer immunhistochemischen Untersuchung an Mukoepidermoidkarzinomen eine hohe Expression von hBD-2, kurz darauf ergab eine HPLC-Untersuchung auch eine signifikant höhere Konzentration von hBD-2 in Plattenepithelkarzinomen [Mizukawa 2001, Sawaki 2002].

Die Arbeitsgruppe um Abiko untersuchte mit RT-PCR die Expression von  $\beta$ -Defensinen an Zelllinien und Gewebeproben von Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen und fand heraus, dass hBD-1 und -2 in allen untersuchten Tumoren exprimiert werden. Meyer et al. stellten fest, dass orale Plattenepithelkarzinome mit erniedrigter hBD-Genexpression anfälliger für Candidainfektionen sind [Meyer 2004]. Ebenfalls beschrieben Abiko et al. an Plattenepithelkarzinomen und Leukoplakien die Expression von hBD-2 genauer mit Immunhistochemie und In-situ-Hybridisierung [Abiko 2001]. Es zeigte sich ein vom Verhornungsgrad des Epithels abhängendes Färbemuster. In normalem, oralem Gewebe fand sich die Immunoreaktivität für hBD-2 in verhornendem Epithel deutlich ausgeprägter als in nicht-verhornendem Epithel. Leukoplakisch verändertes Gewebe wies in den hyperkeratotischen und granulären Schichten eine intensive Färbung auf. In karzinomatösem Gewebe zeigte sich ein

heterogenes Muster. Epitheliale Hornperlen und die umgebenden Keratinozyten färbten intensiv an, teilweise vergleichbar mit dem Färbeverhalten der Leukoplakien. In wenig differenziertem Karzinomgewebe konnte keine Immunreaktivität gezeigt werden.

Sun et al. stellten für Nierenzellkarzinome einen Verlust von hBD-1 in 90% und für Prostatakarzinome in 82% der Fälle fest. Sie zeigten, dass synthetisches hBD-1 die Proliferation von Urothelkarzinomen der Blase hemmt und postulieren, dass das hBD-1-Gen ein potentielles Tumor-Suppressorgen ist [Sun et al. 2006].

### **1.3 Fragestellung und Ziel der Arbeit**

Antimikrobielle Peptide als Teil der angeborenen, epithelialen Abwehr leisten einen wichtigen Beitrag zur lokalen Abwehr von Mikroorganismen an Haut und Schleimhäuten. Die konstitutive Expression von hBD-1 und die Induzierbarkeit von hBD-2 und-3 scheinen bei der Abwehr von akuten Infektionen eine zentrale Rolle zu spielen. Die erhöhte Expression von hBD-2 bei chronischen Tonsillitiden legt zudem nahe, dass zumindest hBD-2 auch hier von Bedeutung ist.

Die Expression der humanen  $\beta$ -Defensine in karzinomatös entartetem Gewebe der Mundhöhle und des Oropharynx wurde, vor allem für hBD-2, beschrieben. Ihre genaue Funktion und Bedeutung bei der Entstehung von präkanzerösen Läsionen und Karzinomen hingegen ist noch unklar. So unterscheiden sich auch die Aussagen der verschiedenen Autoren zu diesem Thema. Einerseits soll die Expression von hBD-2 in Leukoplakien und Kopf-Hals-Karzinomen deutlich erhöht sein. Andererseits soll in wenig differenziertem Karzinomgewebe keine Defensinproduktion nachweisbar sein. Es liegt also nahe, dass die Expression der humanen  $\beta$ -Defensine im Zusammenhang mit der Entstehung von Kopf-Hals-Karzinomen steht.

Braakhuis et al. entwickelten zur Entstehung von Kopf-Hals-Karzinomen ein Progressionsmodell. Diesem Modell [Braakhuis 2004] zufolge durchläuft das Epithel der Schleimhaut bis zur Bildung eines invasiven Karzinoms mehrere Phasen. Es wird postuliert, dass es in der initialen Phase durch exogene Noxen zu genetischen Alterationen der Stammzellen kommt, unter anderem auch des p53-Gens. Die so genetisch veränderte Stammzelle bildet mit ihren Tochterzellen einen Fleck im Epithel, Patch genannt. In der nächsten Phase breitet sich der Patch nicht-invasiv nach lateral aus und bildet so ein Feld. Teilweise ist ein solches Feld makroskopisch als Leukoplakie erkennbar. Weiterer Noxeneinfluss bewirkt die Ausbildung multipler Klone, wobei jeweils die Tochterzellen des dominantesten Klons wellenartig das

Epithel im Feld ersetzen. Schließlich bewirken weitere Schädigungen des Genoms die Ausbildung eines Subklons mit invasivem und metastasierendem Wachstum. Hier ist eine genetische Alteration im kurzen Schenkel des Chromosoms 8, auf dem auch die Defensine clustern, von besonderer Bedeutung, zumal Untersuchungen ergaben, dass hier mindestens drei Tumorsuppressorgene lokalisiert sind und erst kürzlich für hBD-1 eine mögliche Rolle als Tumorsuppressorgen in urogenitalen Tumoren gezeigt wurde [Sun et al 2006].

Mit der vorliegenden Arbeit soll deshalb die Frage beantwortet werden, ob es Unterschiede in der epithelialen Produktion von hBD-1 – 3 in Gewebe aus dem Oropharynx gibt, das den einzelnen Phasen des Progressionsmodells entspricht. Es soll deshalb die Frage beantwortet werden, ob sich die epitheliale Produktion von hBD-1 – 3 in gesundem Gewebe des Oropharynx von der in Gewebe unterscheidet, das einem längeren potentiell karzinogenen Noxeneinfluß mit Nikotin und Alkohol ausgesetzt war und chronisch entzündlich verändert ist. Weiterhin soll untersucht werden, ob sich für die Produktion von hBD-1 – 3 ein Unterschied zwischen den beiden genannten Gewebearten und Karzinomen des Oropharynx nachweisen lässt.

Hierzu musste zuerst die Produktion von hBD-1 – 3 in gesundem oropharyngealen Gewebe dargestellt werden, da es sich hier besonders in der Tonsilla palatina um lymphoepitheliales Gewebe handelt, dessen hBD-Produktion bis dahin unbekannt war. Es wurde zunächst die Produktion von hBD-1 bis -3 in normaler Schleimhaut und lymphatischem Gewebe des Oropharynx untersucht, um so korrekt die hBD-Produktion in den Kontrollgruppen bestimmen zu können.

Als nächstes sollte die Produktion von hBD-1 – 3 in Gewebe des Oropharynx dargestellt werden, das einem chronischen Noxeneinfluss ausgesetzt war, in dem sich jedoch bisher noch keine maligne Entartung eingestellt hatte. Dieser Noxeneinfluss kommt in unserer Gesellschaft wohl am häufigsten in Form des Tabakrauchens, vor allem Zigarettenrauch, vor. Der Tabakrauch enthält eine Vielzahl von Kanzerogenen. Hierbei sind vor allem die Gruppen der Nitrosamine und polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe zu nennen. Torre et al. zeigten in einer Studie an Tonsillen, dass der chronische Einfluss von Tabakrauch manifeste Veränderungen am Gewebe bewirkt. Die Tonsillen von Rauchern wiesen, verglichen mit denen von Nichtrauchern, eine diffuse, lymphoide Hyperplasie mit Rarifizierung der Keimzentren auf. An den Tonsillen von Rauchern fanden sie fokale Defekte der Basalmembran, zelluläre Degenerationen und oberflächliche Erosionen. Intraepithelial zeigten sich inflammatorische Veränderungen in Form von Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten und Makrophagen. Diese Befunde gehen mit

einer beeinträchtigten Immunantwort bei Rauchern einher, die zu chronischen Entzündungen und zur Entwicklung von Tumoren führt [Torre 2005]. Häufig existieren sowohl Nikotin- als auch Alkoholabusus parallel, so dass die Koexistenz beider Risikofaktoren in einer Gruppe zusammengefasst wurde.

Schließlich sollte mit der vorliegenden Arbeit die Frage beantwortet werden, ob sich durch die maligne Entartung der Zellen die Produktion von hBD-1 – 3 in Oropharynxkarzinomen von der in normalem Oropharynxgewebe und karzinomfreiem Oropharynxgewebe mit dem gleichen langjährigen Risikofaktoren Nikotin- und Alkoholabusus wie in der Karzinomgruppe unterscheidet.

## **2. Patienten und Methoden**

### **2.1. Materialien und Reagenzien**

#### **2.1.1. Materialien**

Mikrotom 2050 supercut (Reichert-Jung, Nussloch, Deutschland); Einwegklingen N35 (Feather, Osaka, Japan); Adhäsionsobjektträger Superfrost plus (Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland); Pipetten (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

#### **2.1.2. Reagenzien**

Anti-human-Beta-Defensin-1, polyklonaler Antikörper (Art.-Nr.: DEF001, Biologo, Kronshagen, Deutschland); Anti-human-Beta-Defensin-2, polyklonaler Antikörper (Art.-Nr.: DEF002, Biologo, Kronshagen, Deutschland); Anti-Human-beta-Defensin-3 Polyclonal Antibody (Art.-Nr.: 24216, Gentaur, Brüssel, Belgien); Sekundärsystem EnVision (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark); Tris-Puffer (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland); Pertex (Medite, Burgdorf, Deutschland); Xylol (Merck, Darmstadt, Deutschland); Ethanol in 70, 96 und 100% (Merck, Darmstadt, Deutschland); Naphtol-AS-Biphosphat (Merck, Darmstadt, Deutschland); Hämalun (Merck, Darmsdtadt, Deutschland); Neufuchsin (Merck, Darmstadt, Deutschland)

## **2.2 Patienten**

Alle Patienten, deren Präparate und Daten in diese Arbeit eingehen, waren oder sind in der Universitäts-Hals-Nasen-Ohren-Klinik Kiel in Behandlung. Die histologischen Diagnosen, auf die sich diese Arbeit stützt, wurden durch wissenschaftliche Mitarbeiter des Institutes für Allgemeine Pathologie der Universität Kiel gestellt. Die Probenentnahme war mit dem Ethikkommissionsantrag D 310/98 nach dem Helsinki-Abkommen von 1983 genehmigt und erfolgte nach ausdrücklicher schriftlicher Zustimmung der Patienten ohne zusätzliche Probenentnahme.

### **2.2.1 Normale Schleimhaut des Oropharynx**

Als erstes sollte die Produktion von hBD-1 – 3 im Epithel normaler oropharyngealer Schleimhaut charakterisiert werden. Zum einen wurde Schleimhaut aus dem peritonsillären Randgewebe bei elektiven Tonsillektomien gewonnen, zum anderen Schleimhautresektate des weichen Gaumens oder der Uvula von Patienten, bei denen eine Uvulovelopharyngoplastik durchgeführt wurde. Diese Patienten hatten weder in der Vorgeschichte noch zum Zeitpunkt der Operation maligne Erkrankungen. Es wurden von dreizehn Patienten insgesamt

siebenundzwanzig Gewebeprobeen gewonnen. Zum Zeitpunkt der Operation waren die Patienten zwischen drei und fünfundsechzig Jahre alt, das Durchschnittsalter lag bei 40,3 Jahren. Acht Patienten waren männlich, fünf weiblich. In der Anamnese wiesen die Patienten weder Nikotin- noch Alkoholabusus auf.

### **2.2.2 Normale kindliche Tonsillen**

Um eine Referenzgruppe mit Gewebe zusammenzustellen, bei dem sowohl aufgrund des Alters der Patienten eine entsprechende Noxenexposition unwahrscheinlich ist als auch anamnestisch und histologisch keine chronische Entzündung nachweisbar war, wurde auf Tonsillektomiepräparate von Kindern zurückgegriffen. Alle Kinder dieser Gruppe wurden aufgrund einer Hyperplasie der Tonsilla palatina elektiv beidseits tonsillektomiert. Es gingen achtzehn Tonsillenresektate von neun Patienten in diese Untersuchung ein. Zum Zeitpunkt der Operation waren die Kinder zwischen zwei und fünfzehn Jahre alt, das durchschnittliche Alter betrug 4,9 Jahre. Vorerkrankungen, insbesondere maligne, bestanden keine. Zwei der Kinder waren Jungen, sieben waren Mädchen.

### **2.2.3 Tonsillen von Patienten mit Nikotin- und Alkoholabusus**

Nikotin- und Alkoholabusus spielen eine große Rolle bei der Entstehung von Kopf-Hals-Karzinomen. Um den Einfluß von Nikotin- und Alkoholabusus auf die Defensinproduktion zu untersuchen, wurde auf Resektate von Patienten, die an einer Halsmetastasierung ohne Primärtumor (Carcinoma of unknown primary-Syndrom, CUP-Syndrom) litten, zurückgegriffen. Alle eingeschlossenen Patienten hatten anamnestisch eine erhöhte Exposition mit Nikotin und Alkohol. Auf der Suche nach einem möglichen Primärtumor wird bei diesen Patienten routinemäßig eine Tonsillektomie beidseits durchgeführt. Von fünfzehn Patienten kamen fünfundzwanzig Gewebeprobeen. Das Alter zum Zeitpunkt der Operation lag zwischen vierzig und neunundsechzig Jahren, der Altersdurchschnitt bei 49,6 Jahren. Zwei der Patienten waren Frauen, dreizehn Männer. Bei neun Patienten bestand anamnestisch zum Zeitpunkt der Diagnose ein ausgeprägter Nikotinabusus mit über zwanzig Zigaretten täglich, fünf der Patienten waren ehemalige Raucher mit langjährigem Nikotinabusus und lediglich ein Patient war Nichtraucher. Acht der Patienten wiesen in der Anamnese einen aktiven regelmäßigen Alkoholabusus auf, wobei zwei Patienten sich als Alkoholiker bezeichneten. Zwei weitere Patienten bezeichneten sich als trockene Alkoholiker. Vier Patienten hatten keine Angaben zum Alkoholkonsum gemacht.

## **2.2.4 Oropharynxkarzinome**

Die Präparate von vierunddreißig Patienten, bei denen die Diagnose eines Oropharynxkarzinoms gestellt wurde, gehen in diese Gruppe ein. Das Alter der Patienten bei Diagnosestellung reichte von dreiundvierzig bis achtzig Jahre, der Durchschnitt lag bei 59,3 Jahren. Siebenundzwanzig Patienten waren männlich, sieben waren weiblich. Sechsendzwanzig der Patienten gaben einen regelmäßigen Nikotinkonsum von über zwanzig Zigaretten täglich an, vier Patienten waren ehemalige Raucher und ebenfalls vier Patienten waren Nichtraucher. Neun der Patienten gaben regelmäßigen Alkoholkonsum an, dreizehn bezeichneten sich als Alkoholiker und neun als trockene Alkoholiker. Drei Patienten hatten keine Angaben zum Alkoholkonsum gemacht.

## **2.3 Immunhistochemie**

### **2.3.1 Schneiden**

Von allen Präparaten wurden am Schlittenmikrotom jeweils drei Schnitte mit einer Dicke von 2 µm erstellt. Anschließend wurden die Schnitte bei 40° Celsius im Wasserbad entfaltet und auf Objektträger aufgezogen. Um das Wasser, das vom Gewebe hierbei aufgenommen wurde, zu entfernen, wurden die Schnitte bei 37° Celsius für vierundzwanzig Stunden im Brutschrank inkubiert.

### **2.3.2 Entparaffinieren**

Die so erhaltenen Leerschnitte wurden für 30 Minuten in Xylol und anschließend für jeweils 3 Minuten in einer absteigenden Alkoholreihe mit 100%, 96% und 70% Ethanolanteil entparaffiniert. Die entparaffinierten Leerschnitte wurden in destilliertem Wasser gespült und in einen Tris-Puffer mit einem ph-Wert von 7,5 gestellt.

### **2.3.3. Färben**

Die entparaffinierten Leerschnitte wurden mit dem jeweiligen Primärantikörper für hBD-1 – 3 für 30 Minuten bei 37° Celsius inkubiert. Hierzu wurden die Primärantikörper für hBD-1 und -2 in einer Verdünnung von 1:100 verwendet. Der Primärantikörper für hBD-3 wurde auf 1:200 verdünnt. Anschließend wurden die Schnitte mit Waschpuffer gespült und für 30 Minuten mit dem Sekundärsystem Envision von DAKO bei 37° Celsius inkubiert. Nach erneutem Spülen mit Waschpuffer erfolgte die Entwicklung mit Naphtol-AS-Biphosphat und Neufuchsin unter Sichtkontrolle für 5-10 Minuten. Die entwickelten Schnitte wurden wieder mit Waschpuffer gespült und für 5 Minuten nach Mayer mit Hämalaun gegengefärbt, in destilliertem Wasser gewaschen und gebläut. Schließlich durchliefen die Schnitte eine aufsteigende Alkoholreihe mit

70%, 96% und 100% Ethanolanteil, wurden für 10 Minuten in Xylol eingelegt und abschließend mit Pertex eingedeckt.

### 2.3.4 Auswerten

Zur Auswertung der immunhistochemischen Präparate musste eine quantifizierbare und reproduzierbare Methode gefunden werden. Hierzu wurden die Präparate entsprechend der immunhistochemischen Anfärbarkeit mit einem Score bewertet. Nicht anfärbende Präparate wurden mit 0 bewertet. Wiesen die Präparate in vereinzelt, eingestreuten Epithelzellen, also in unter 1% pro high-power-field, eine immunhistochemische Anfärbarkeit auf, wurde mit 1 bewertet. Lag die immunhistochemische Anfärbarkeit zwischen 1% und 5% der Epithelzellen, wurde mit 2 bewertet. Präparate, die in über 5% der Epithelzellen schwach und mäßig anfärbten, wurden mit 3 bewertet. Präparate, die nicht eindeutig auswertbar waren, wurden nicht gewertet.

Immunhistochemische Anfärbarkeit	Punktescore
Keine	0
< 1% positiv pro Sichtfeld (schwach)	1
1–5% positiv pro Sichtfeld (mäßig)	2
> 5% positiv pro Sichtfeld (stark)	3

Tabelle 1: Einteilung des Punktescores für die Beurteilung der immunhistochemischen Anfärbarkeit

## 2.4 Statistische Auswertung

Für die untersuchten antimikrobiellen Peptide hBD-1, hBD-2 und hBD-3 wurden zu jeder betrachteten Gewebeart absolute und prozentuale Häufigkeiten der ermittelten Punktescores zur immunhistochemischen Anfärbarkeit bestimmt.

Ausgewählte Gewebearten wurden paarweise mittels Chi-Quadrat-Test hinsichtlich der Ausprägung des jeweils untersuchten antimikrobiellen Peptids verglichen. Aufgrund der multiplen durchgeführten Paarvergleiche wurden die ermittelten p-Werte nach dem Verfahren von Holm nach oben korrigiert. Anhand von Balkendiagrammen wurden die durchgeführten Paarvergleiche grafisch dargestellt. Es wurde bei allen angewendeten statistischen Tests ein Signifikanzniveau von mindestens 5% zugrunde gelegt.



### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Quantitative Auswertung der Immunhistochemie in den einzelnen Gruppen

##### 3.1.1 hBD-1

Normale oropharyngeale Schleimhaut war in 44,4% der Fälle immunhistochemisch negativ für hBD-1. In 33,3% zeigte sich eine schwache und in 14,8% eine mäßige Produktion, ausschließlich in epithelialen Zellen. Lediglich in 7,4% ließ sich immunhistochemisch eine starke Produktion von hBD-1 im Epithel nachweisen. Normales Tonsillengewebe ohne chronischen Noxeneinfluss war immunhistochemisch in 66,6% der Fälle negativ für hBD-1. In 22,2% ließ sich eine schwache und in 11,1% eine mäßige Produktion von hBD-1 im Epithel nachweisen. Eine starke Produktion von hBD-1 konnte an normalen Tonsillen nicht gezeigt werden. Tonsillengewebe, das einem chronischen Einfluss der Noxen Nikotin und Alkohol ausgesetzt war, wies zu 40,0% eine starke Produktion von hBD-1 in Epithelzellen auf. In jeweils 24,0% der Fälle ließ sich keine beziehungsweise eine schwache Produktion von hBD-1 nachweisen. 12,0% der Fälle wiesen eine mäßige, ausschließlich epitheliale Produktion auf. Oropharynxkarzinome waren zu 67,6% immunhistochemisch negativ für hBD-1. In 26,5% der Fälle konnte eine starke epitheliale Produktion gezeigt werden und in jeweils 2,9% eine schwache, beziehungsweise mäßige Produktion von hBD-1.

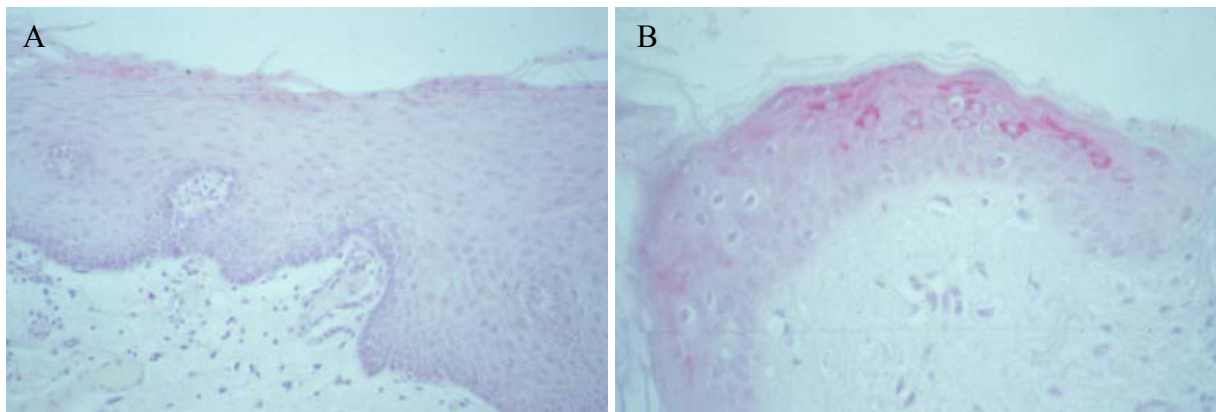


Abbildung 1: Schwach positive epitheliale Produktion von hBD-1 in normaler oropharyngealer Schleimhaut (A) und stark positive epitheliale Produktion in Tonsillengewebe mit chronischem Nikotin und Alkoholabusus (B).

<b>hBD-1</b>			
Gruppe		Häufigkeit	Prozent
normale Schleimhaut	Neg.	12	44,4
	Pos.1% Epithelz.	9	33,3
	Pos. 1-5% Epithelz.	4	14,8
	Pos. > 5% Epithelz.	2	7,4
	Gesamt	27	100,0
normale Tonsille	Neg.	12	66,7
	Pos.1% Epithelz.	4	22,2
	Pos. 1-5% Epithelz.	2	11,1
	Pos. > 5% Epithelz.		
	Gesamt	18	100,0
Tonsille mit chronischem Nikotin- und Alkoholabusus	Neg.	6	24,0
	Pos.1% Epithelz.	6	24,0
	Pos. 1-5% Epithelz.	3	12,0
	Pos. > 5% Epithelz.	10	40,0
	Gesamt	25	100,0
Oropharynxkarzinome	Neg.	23	67,6
	Pos.1% Epithelz.	1	2,9
	Pos. 1-5% Epithelz.	1	2,9
	Pos. > 5% Epithelz.	9	26,5
	Gesamt	34	100,0

Tabelle 2: Auswertung der Immunhistochemie – epitheliale Produktion von hBD-1. Dargestellt sind sowohl die absoluten Zahlen als auch die entsprechenden Prozentsätze.

### 3.1.2 hBD-2

Normale oropharyngeale Schleimhaut wies immunhistochemisch zu 37,0% eine schwache Produktion von hBD-2 in epithelialen Zellen auf. In 29,6% der Fälle ließ sich keine und in 22,2% eine mäßige Produktion nachweisen. Nur in 11,1% der Fälle konnte eine starke Produktion von hBD-2 in den Epithelzellen gezeigt werden. Normale Tonsille ohne chronischen Noxeneinfluss war in 72,2% der Fälle immunhistochemisch negativ für hBD-2. In 16,7% der Fälle konnte eine mäßige und in jeweils 5,6% der Fälle eine schwache, beziehungsweise eine starke, ausschließlich epitheliale Produktion von hBD-2 gezeigt werden. An Tonsillengewebe, das einem chronischen Einfluss der Noxen Nikotin und Alkohol ausgesetzt war, konnte in 48,0% der Fälle eine starke Produktion von hBD-2 im Epithel gezeigt werden. 36,0% der Fälle waren immunhistochemisch negativ. Das Epithel von jeweils 8,0% der Fälle wies eine schwache, beziehungsweise mäßige Produktion auf. Oropharynxkarzinome waren zu 52,9% immunhistochemisch negativ für hBD-2. In 20,6% der Fälle konnte eine starke Peptidproduktion in epithelialen Zellen gezeigt werden. Eine schwache Produktion von hBD-2 wiesen 17,6% auf, eine mäßige Produktion zeigte sich in 8,8% der Fälle.

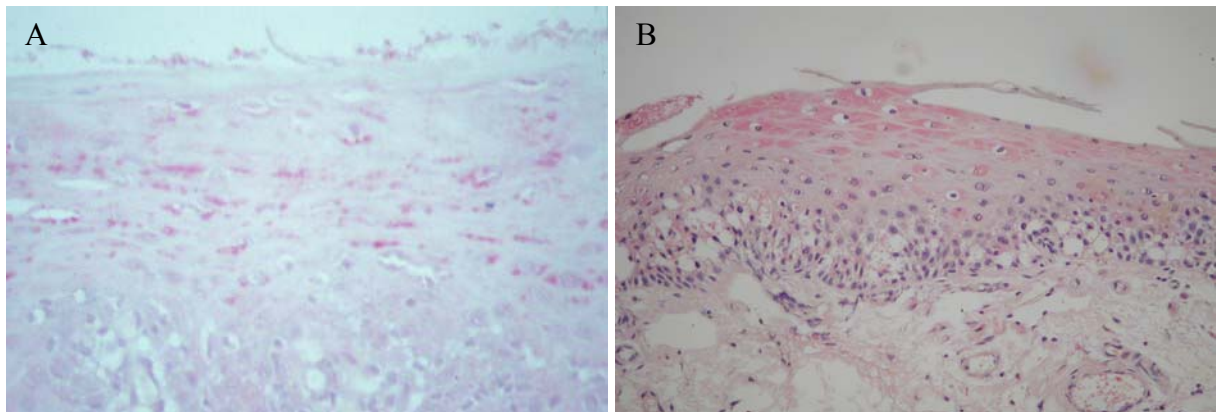


Abbildung 2: Schwach positive Produktion von hBD-2 in normaler oropharyngealer Schleimhaut (A) und stark positive Produktion in Tonsillengewebe mit chronischem Nikotin und Alkoholabusus (B).

<b>hBD-2</b>			
Gruppe		Häufigkeit	Prozent
normale Schleimhaut	neg.	8	29,6
	pos. 1% Epithelz.	10	37,0
	pos. 1-5% Epithelz.	6	22,2
	pos. > 5% Epithelz.	3	11,1
	Gesamt	27	100,0
normale Tonsille	neg.	13	72,2
	pos. 1% Epithelz.	1	5,6
	pos. 1-5% Epithelz.	3	16,7
	pos. > 5% Epithelz.	1	5,6
	Gesamt	18	100,0
Tonsille mit chronischem Nikotin- und Alkoholabusus	neg.	9	36,0
	pos. 1% Epithelz.	2	8,0
	pos. 1-5% Epithelz.	2	8,0
	pos. > 5% Epithelz.	12	48,0
	Gesamt	25	100,0
Oropharynxkarzinome	neg.	18	52,9
	pos. 1% Epithelz.	6	17,6
	pos. 1-5% Epithelz.	3	8,8
	pos. > 5% Epithelz.	7	20,6
	Gesamt	34	100,0

Tabelle 3: Auswertung der Immunhistochemie – epitheliale Produktion von hBD-2. Dargestellt sind sowohl die absoluten Zahlen als auch die entsprechenden Prozentsätze.

### 3.1.3 hBD-3

An normaler oropharyngealer Schleimhaut konnte in jeweils 29,6% der Fälle sowohl eine schwache als auch eine starke Produktion von hBD-3 ausschließlich in epithelialen Zellen gezeigt werden. In 25,4% der Fälle zeigte sich eine mäßige Produktion von hBD-3, wobei 14,8% der Fälle immunhistochemisch negativ für hBD-3 waren. Normale Tonsille ohne chronischen

Noxeneinfluss wies in 55,6% der Fälle eine mäßige Produktion von hBD-3 im Epithel auf. In 22,2% der Fälle zeigte sich eine schwache Produktion, weitere 22,2% der Fälle waren immunhistochemisch negativ. Eine starke Produktion von hBD-3 konnte an normalen Tonsillen nicht gezeigt werden. An Tonsillengewebe, das einem chronischen Einfluss der Noxen Nikotin und Alkohol ausgesetzt war, konnte in 76,0% der Fälle eine starke, ausschließlich epitheliale Produktion von hBD-3 gezeigt werden. 16,0% der Fälle wiesen eine mäßige und 4,0% eine schwache Produktion auf. Weitere 4,0% waren immunhistochemisch negativ für hBD-3. An Oropharynxkarzinomen konnte in 47,1% der Fälle eine starke Produktion für hBD-3 gezeigt werden, wobei 29,4% immunhistochemisch negativ waren. 14,7% wiesen eine schwache und 8,8% eine mäßige Produktion von hBD-3 auf.

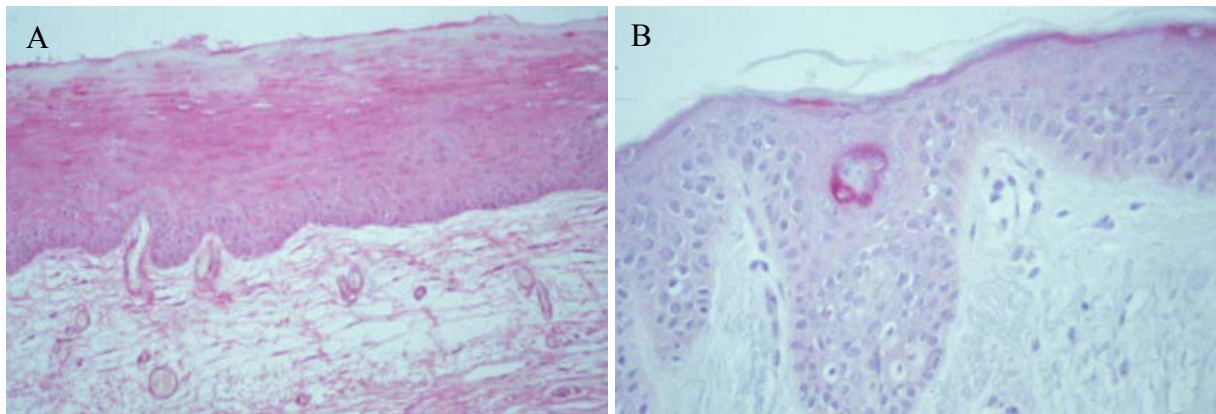


Abbildung 3: Stark positive Produktion von hBD-3 in normaler oropharyngealer Schleimhaut (A) und mässig starke Produktion in normalem Tonsillengewebe (B).

<b>hBD-3</b>			
Gruppe		Häufigkeit	Prozent
normale Schleimhaut	neg.	4	14,8
	pos.1% Epithelz.	8	29,6
	pos. 1-5% Epithelz.	7	25,9
	pos. > 5% Epithelz.	8	29,6
	Gesamt	27	100,0
normale Tonsille	neg.	4	22,2
	pos.1% Epithelz.	4	22,2
	pos. 1-5% Epithelz.	10	55,6
	pos. > 5% Epithelz.		
	Gesamt	18	100,0
Tonsille mit chronischem Nikotin- und Alkoholabusus	neg.	1	4,0
	pos.1% Epithelz.	1	4,0
	pos. 1-5% Epithelz.	4	16,0
	pos. > 5% Epithelz.	19	76,0
	Gesamt	25	100,0
Oropharynxkarzinome	neg.	10	29,4
	pos.1% Epithelz.	5	14,7
	pos. 1-5% Epithelz.	3	8,8
	pos. > 5% Epithelz.	16	47,1
	Gesamt	34	100,0

Tabelle 4: Auswertung der Immunhistochemie – epitheliale Produktion von hBD-3. Dargestellt sind sowohl die absoluten Zahlen als auch die entsprechenden Prozentsätze.

## 3.2 Vergleiche der einzelnen Gruppen

### 3.2.1 Vergleich von normaler oropharyngealer Schleimhaut und normaler Tonsille

Nach der Darstellung der Defensinproduktion in den einzelnen Gruppen war die Frage nach gruppenübergreifenden Unterschieden zu beantworten. Bisher existierten noch keine vergleichenden Daten zur Produktion von  $\beta$ -Defensinen in Tonsillen und normaler oropharyngealer Schleimhaut. Da aber die Expression und Produktion von  $\beta$ -Defensinen sowohl in Tonsillen als auch in normaler oraler Schleimhaut beschrieben ist [Weise 2002, Meyer 2004], sollte als erstes die Peptidproduktion von normaler Schleimhaut und lymphatischem Gewebe des Oropharynx verglichen werden. Hierbei zeigte sich, dass die Verteilung von hBD-1 in beiden Gruppen identisch war. Zwar waren in der Gruppe mit normalem Tonsillengewebe deutlich mehr negative und keine stark positiven Proben zu finden, dies erwies sich jedoch als statistisch nicht signifikant ( $p = 0,406$ ). Bei hBD-2 fanden sich deutlich mehr immunhistochemisch negative Proben und weniger schwach positive in der Gruppe mit normaler Tonsille, die jedoch statistisch nicht signifikant waren ( $p = 0,081$ ). Bei hBD-3 war die Verteilung bei normaler Schleimhaut annähernd gleichmäßig, während bei normaler Tonsille stark positive Proben fehlten und über

50% mäßig positiv waren. Auch hier ist der Unterschied jedoch nicht statistisch signifikant ( $p = 0,0520$ ). Somit unterscheiden sich normale Schleimhaut und normale Tonsille nicht hinsichtlich der Produktion von hBD-1, -2 und -3.

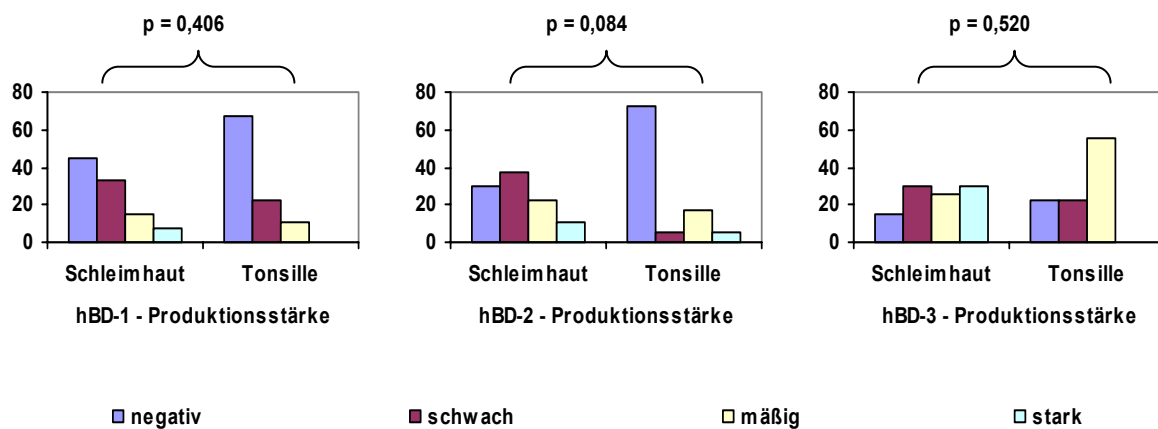


Abbildung 4: Gruppenvergleich normale oropharyngeale Schleimhaut - normale Tonsille

### 3.2.2 Vergleich von normaler Tonsille und Tonsille mit chronischem Nikotin- und Alkoholabusus

Nikotin- und Alkoholabusus sind die beiden Hauptrisikofaktoren für die Entstehung von Kopf-Hals-Karzinomen. Deswegen sollte zunächst isoliert untersucht werden, ob sich die Peptidproduktion von hBD-1 – 3 in Gewebe des Oropharynx mit chronischem Noxeneinfluss von der Produktion im Gewebe ohne langjährigen Einfluss schädlicher Noxen unterscheidet. Für hBD-1 zeigten sich in der Gruppe mit normalen Tonsillen deutlich mehr negative Proben. Weiterhin fielen bei Tonsillen mit chronischem Noxeneinfluss 40,0% stark positive Proben auf. Dieser Unterschied erwies sich als statistisch signifikant ( $p = 0,024$ ). Für hBD-2 waren ebenfalls deutlich mehr Proben mit normalen Tonsillen negativ. Auch überwog der Anteil der stark positiven Proben der Tonsillen mit chronischem Noxeneinfluss. Der Unterschied war statistisch jedoch nicht signifikant ( $p = 0,084$ ). Für hBD-3 war normale Tonsille überwiegend mäßig positiv, wobei stark positive Proben fehlten. Chronisch noxenexponierte Tonsillen waren überwiegend stark positiv. Auch dieser Unterschied war statistisch signifikant ( $p = 0,0004$ ). Somit unterscheiden sich normale und chronisch noxenexponierte Tonsille in der Produktion von hBD-1 und hBD-3. hBD-1 und -3 werden in Tonsillen mit chronischem Noxeneinfluss deutlich stärker produziert als in normalen Tonsillen. Für die Produktion von hBD-2 konnte kein Unterschied gezeigt werden.

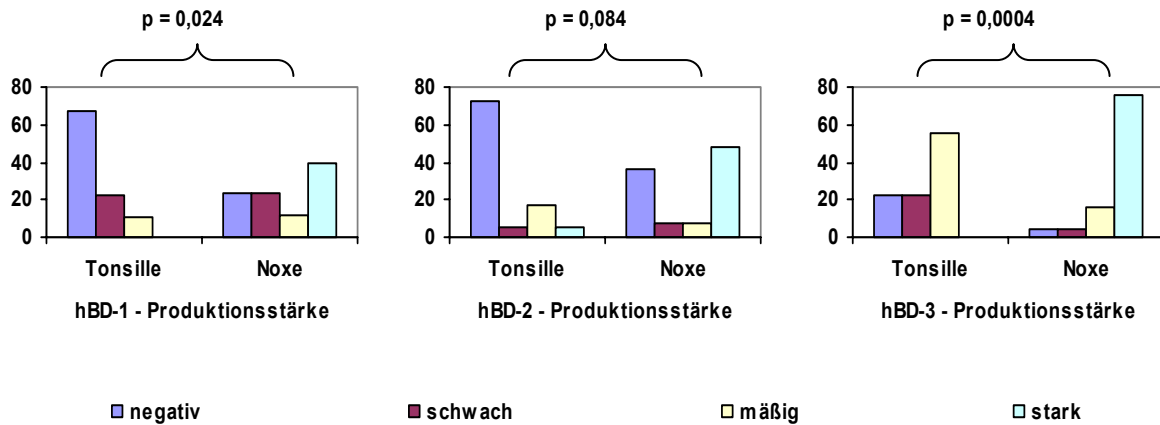


Abbildung 5: Gruppenvergleich normale Tonsille - Tonsille mit chronischem chronischem Nikotin und Alkoholabusus

### 3.2.3 Vergleich von normaler Tonsille und Oropharynxkarzinomen

Die Produktion der antimikrobiellen Peptide hBD-1 und -3 ist, wie oben gezeigt, in Tonsillengewebe mit chronischem Noxeneinfluss gegenüber normaler Tonsille signifikant erhöht. Als nächstes sollte nun geklärt werden, ob zwischen normalem Tonsillengewebe und Oropharynxkarzinomen ebenfalls ein Unterschied existiert. Für hBD-1 fanden sich in der Gruppe mit normaler Tonsille etwas mehr schwach und mäßig positive Proben. Jedoch fehlten hier stark positive Proben, während 26,5% der Oropharynxkarzinome stark positiv anfärbten. Dieser Unterschied war signifikant ( $p = 0,028$ ). Für hBD-2 überwogen die negativen und mäßig positiven Proben bei normaler Tonsille, wohingegen die Zahl der schwach und stark positiven Proben bei den Oropharynxkarzinomen höher war. Eine statistische Signifikanz ließ sich hier nicht zeigen ( $p = 0,306$ ). Die immunhistochemische Anfärbbarkeit von hBD-3 war bei normaler Tonsille überwiegend mäßig positiv und in der Gruppe der Karzinome in annähernd der Hälfte der Fälle stark positiv. Auch dieser Unterschied war statistisch signifikant ( $p = 0,0004$ ). Somit werden hBD-1 und -3 auch in Oropharynxkarzinomen deutlich stärker exprimiert als in normalem Tonsillengewebe. Die Expression von hBD-2 ist in beiden Gewebearten identisch.

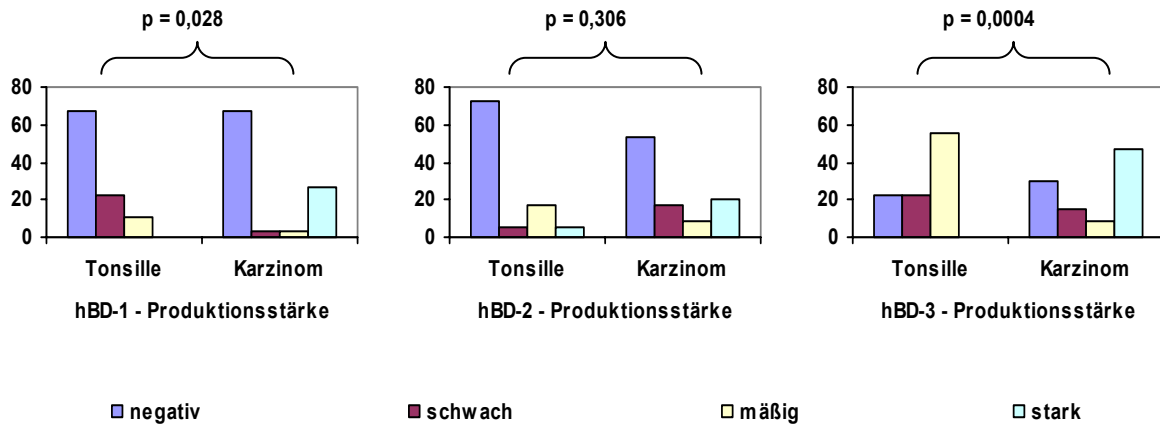


Abbildung 6: Gruppenvergleich normale Tonsille - Oropharynxkarzinome

### 3.2.4 Vergleich von Tonsille mit chronischem Nikotin- und Alkoholabusus und Oropharynxkarzinomen

Die oben angeführten Vergleiche haben gezeigt, dass hBD-1 und -3 in Tonsillen mit chronischem Noxeneinfluss und Oropharynxkarzinomen deutlich stärker produziert werden als in normalen Tonsillen. Daher war zu untersuchen, inwieweit sich die Peptidproduktion in Tonsillengewebe mit chronischem Nikotin- und Alkoholabusus von der in Oropharynxkarzinomen unterscheidet. Dabei fiel auf, dass über zwei Drittel der Karzinome negativ für hBD-1 waren, im Vergleich zu rund einem Viertel der Gruppe mit chronisch noxenexponiertem Tonsillengewebe. Außerdem waren lediglich 26,5% der Karzinome stark positiv. Demgegenüber stehen 40,0% der Tonsillen mit chronischem Noxeneinfluss. Der Unterschied war signifikant ( $p = 0,016$ ). Für hBD-2 waren in der Gruppe mit Karzinomen deutlich mehr Proben negativ und in der Gruppe mit chronisch noxenexponierten Tonsillen mehr Proben stark positiv. Hier konnte jedoch keine statistische Signifikanz gezeigt werden ( $p = 0,306$ ). Und obwohl auch deutlich mehr Karzinome negativ für hBD-3 waren als chronisch noxenexponierte Tonsillen und sich hier auch die Anzahl der schwach, mäßig und stark positiven Fälle unterschied, konnte auch hier kein statistisch bedeutender Unterschied gezeigt werden ( $p = 0,052$ ). HBD-1 wird also in Oropharynxkarzinomen deutlich geringer produziert als in Tonsillen mit chronischem Noxeneinfluss. Für die Produktion von hBD-2 und -3 konnte kein Unterschied dargestellt werden.



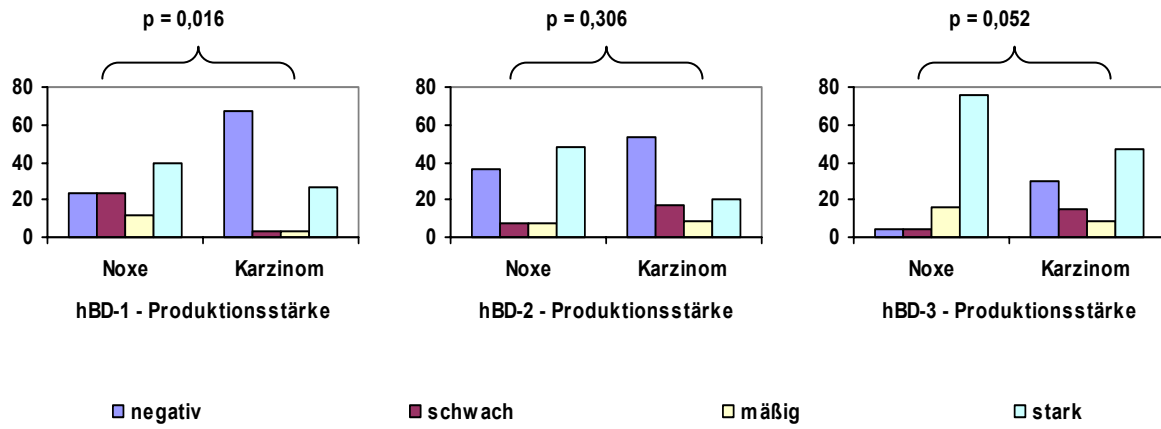


Abbildung 7: Gruppenvergleich Tonsille mit chronischem Nikotin und Alkoholabusus - Oropharynxkarzinome

## **4. Diskussion**

### **4.1 Kritik der Methodik**

Die Durchführung der vorliegenden Untersuchungen setzte zunächst die Etablierung einer reproduzierbaren immunhistochemischen Methode voraus. Dazu wurden zunächst Testfärbungen mit den drei verwendeten Antikörpern durchgeführt. Alle Antikörper wurden in verschiedenen Verdünnungsstufen und mit unterschiedlichen Inkubationszeiten getestet.

Die verwendeten Antikörper für die humanen  $\beta$ -Defensine hBD-1 – 3 sind polyklonal. Ein monoklonaler Antikörper war zum Zeitpunkt der Konzeption und Durchführung der vorliegenden Arbeit nicht auf dem Markt erhältlich. Homologien zwischen den untersuchten Defensinen sind beschrieben. Daher ergibt sich hier eine mögliche Fehlerquelle. Jedoch wurden in allen immunhistochemischen Arbeiten über hBD-1 – 3, die während der Literaturrecherche verfügbar waren, polyklonale Antikörper verwendet. Es bleibt abzuwarten, ob die Verwendung eines monoklonalen Antikörpers andere Resultate ergibt.

Die Auswertung der immunhistochemischen Präparate erfolgte semiquantitativ nach dem bereits angeführten Score (Kapitel 2.3.4). Die Genauigkeit der Ergebnisse und der daraus abgeleiteten Aussagen würde durch ein exakteres Auswertungsverfahren möglicherweise verbessert. Ein solches Verfahren jedoch, wie beispielsweise die Laser-Argon-Methode, stand zum Zeitpunkt der Durchführung der vorliegenden Arbeit weder an der Hals-Nasen-Ohren-Klinik noch am Institut für Allgemeine Pathologie am Campus Kiel des Universitätsklinikums Schleswig-Holsteins zur Verfügung.

Jedoch wurde die semiquantitative Auswertung durch zwei Untersucher unabhängig voneinander durchgeführt und durch einen erfahrenen Facharzt für Pathologie überwacht und bestätigt. Dadurch konnten Fehler der Untersucher korrigiert werden und einer Verfälschung der Aussagen dieser Arbeit vorgebeugt werden.

Torre beschrieb für Tonsillen von Rauchern eine inflammatorische Veränderung in Form von Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten und Makrophagen. Bei der Auswertung der Immunhistochemie in der Gruppe mit chronischem Nikotin- und Alkoholabusus wurde nicht differenziert, welchen Anteil diese Zellen an der Peptidproduktion im Epithel haben. Auch wurde nicht bearbeitet, ob eine strikte Noxenkarenz wieder zu einer Normalisierung der epithelialen Peptidproduktion führt.

Die Paraffinblöcke der Gruppe der Oropharynxkarzinome waren vor Einschluss in diese Arbeit alle im Rahmen der pathologischen Routinediagnostik bearbeitet worden. Daher kann insbesondere bei kleineren Gewebsfragmenten schon soviel Material abgehobelt worden sein, dass für die Anfertigung der Leerschnitte nicht genügend Karzinomgewebe im Block enthalten ist. Um solche Fälle auszusortieren, wurden die Blöcke vorher einzeln durchgemustert und solche mit unzureichendem Material aussortiert. Es wurde darauf geachtet, dass alle einbezogenen Blöcke ausreichend Material boten, um anschließend die Peptidproduktion im Zentrum der Karzinome zu untersuchen.

Der histologische Differenzierungsgrad von Plattenepithelkarzinomen wird in die Stufen gut, mässig und schlecht differenziert sowie undifferenziert eingeteilt. Eine genaue Darstellung der Produktion der  $\beta$ -Defensine hBD-1 – 3 in den unterschiedlichen Differenzierungsstadien wäre insofern sinnvoll, als mögliche Unterschiede in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad einen Hinweis auf die Rolle von hBD-1 – 3 bei der Entstehung von Kopf-Hals-Karzinomen liefern könnten. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Karzinome sind ausnahmslos mässig und schlecht differenziert. Trotz intensiver Suche gelang es nicht, während der Vorbereitungen für die vorliegende Arbeit jeweils ausreichend große Gruppen mit gut differenzierten beziehungsweise undifferenzierten Karzinomen zusammenzustellen. Statistische Unterschiede zwischen den untersuchten Karzinomgruppen fanden sich jedoch nicht, so dass von einer ähnlichen Produktionsstärke in den beiden häufigsten Differenzierungsgraden auszugehen ist.

Die Patienten der Gruppe mit Oropharynxkarzinomen hatten zum Zeitpunkt der Operation beziehungsweise Probenentnahme alle bereits ein weiter fortgeschrittenes Tumorstadium. Nach der Einteilung der UICC war in fast allen Fällen das Stadium III oder IV erreicht. Eine entsprechende Kontrollgruppe mit früheren Krankheitsstadien konnte nicht zusammengestellt werden. Nach Kaplan-Meyer ließ sich aus den Daten der eingeschlossenen Patienten keine signifikante Überlebensabhängigkeit zeigen (Daten nicht dargestellt). Daher konnte mit der vorliegenden Arbeit nicht beantwortet werden, ob die Stärke der Peptidproduktion mit dem Tumorstadium nach TNM beziehungsweise dem Krankheitsstadium nach UICC korreliert und ob sich anhand eines möglichen Zusammenhanges Aussagen über die Prognose für den einzelnen Patienten machen lassen.

## 4.2 Bedeutung der $\beta$ -Defensin-Produktion in der Onkogenese

Im Oropharynx existiert nicht nur normales Epithel, sondern auch lymphoepitheliales Gewebe in den Tonsillen. Diese gehören als Teil des Waldeyerschen Rachenrings zu den immunologisch aktiven Organen. Die Expression der humanen  $\beta$ -Defensine wurde für normale Schleimhaut und Tonsillen beschrieben. Ein direkter Vergleich der Produktion war bislang jedoch noch nicht durchgeführt worden. Wie unter 3.2.1. dargestellt, unterscheiden sich normale oropharyngeale Schleimhaut und Tonsillengewebe nicht signifikant in der Produktion von hBD-1 – 3.

Die Produktion von antimikrobiellen Peptiden in präkanzerösen Läsionen und karzinomatös entartetem Gewebe unterscheidet sich jedoch von der Produktion in gesundem Gewebe des Oropharynx. Diese Unterschiede scheinen zum einen mit den Veränderungen zusammenzuhängen, die sich am Epithel mit der Ausbildung einer chronischen Entzündung ergeben. Zum anderen ist davon auszugehen, dass die Produktionsunterschiede Ausdruck der während der Onkogenese auftretenden Veränderungen am Genom sind.

Für hBD-1 zeigte sich die Produktion in Oropharynxgewebe mit chronischem Noxeneinfluss gegenüber Oropharynxgewebe ohne Noxeneinfluss deutlich erhöht. Die Erhöhung der Peptidproduktion in Gewebe, das einem fortwährendem Einfluss der beiden Hauptrisikofaktoren Tabakrauch und Alkohol für die Entstehung von Kopf-Hals-Karzinomen ausgesetzt war, lässt sich durch folgende Hypothese erklären. Der langjährige Nikotin- und Alkoholkonsum geht mit der Ausbildung einer chronischen Entzündung der Schleimhaut des oberen Aerodigestivtraktes einher. Entsprechende histologische Veränderungen im Sinne einer lymphoiden Hyperplasie wurden beschrieben [Torre 2005]. Folglich wäre davon auszugehen, dass es im Rahmen der Hyperplasie in chronisch entzündetem Gewebe zu einer erhöhten Peptidmenge durch die Vermehrung der Zellzahl kommt. Eine andere Erklärung wäre die Induktion des hBD-1-Gens in chronisch entzündetem, hyperplastischem Gewebe. Dies widerspricht der gängigen Meinung, dass die Expression von hBD-1 ausschließlich konstitutiv erfolgt [Krisanprakornkit 1998]. Beide Ansätze werden durch die Ergebnisse unserer eigenen Arbeitsgruppe unterstützt. Wir konnten eine relative Zunahme der hBD-1-Genexpression in chronisch entzündeten Tonsillen im Vergleich mit nicht entzündeten Tonsillen zeigen [Weise et al. 2002]. Ferner ist zu bedenken, dass sich die Arbeiten zur Induzierbarkeit der humanen  $\beta$ -Defensin-Produktion ausschließlich auf akute Entzündungsvorgänge stützen. Für hBD-2 war der Unterschied zwischen Tonsillengewebe mit chronischem Noxeneinfluss gegenüber Tonsillengewebe ohne Noxeneinfluss nach Korrektur des p-Wertes nach Holm statistisch nicht signifikant. Jedoch fallen bei Tonsillengewebe mit Noxeneinfluss deutlich weniger negative Proben und deutlich

mehr stark positive Proben auf als bei normaler Tonsille. Außerdem lag der unkorrigierte Wert mit 0,021 im Signifikanzbereich. Wird dieses berücksichtigt, so ist auch für hBD-2 von einer Erhöhung der Peptidproduktion im Rahmen der chronischen Entzündung durch fortwährenden Noxeneinfluss auszugehen. Dies entspricht der Induzierbarkeit des hBD-2-Gens durch proinflammatorische Zytokine und stimmt mit den bisherigen Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe und anderen Publikationen überein [Weise et al. 2002, Schröder 1999]. Auch für hBD-3 konnte eine deutliche Erhöhung der Peptidproduktion in chronisch noxenexponiertem Gewebe dargestellt werden. Auffallend war hier die mit 76% hohe Zahl stark positiver Proben in chronisch entzündeten Tonsillen und die relative Abnahme negativer und schwach positiver Proben. Dies untermauert die Ergebnisse von Harder et al., deckt sich jedoch nicht mit den Untersuchungen von Bissell et al. an Gingivaepithelien, die eine signifikant niedrigere Expression von hBD-3 mRNA im periodontitisch entzündeten Gewebe beschreiben [Harder 2001, Bissell 2004].

Die Gene der humanen  $\beta$ -Defensine liegen geclustert auf dem kurzen Arm des Chromosoms 8p22-23. Trotz der Ergebnisse des Humanen Genom Projektes ist dieses Defensin-Cluster noch nicht vollständig aufgeklärt. Die Ursache dafür wird dem Polymorphismus dieser Gene zugeschrieben. Die Induzierbarkeit der Gene für hBD-2 und -3 wurde mehrfach nachgewiesen. Das hBD-2-Gen enthält mehrere Bindungsstellen für NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B ist klassischer Transkriptionsfaktor für proinflammatorische Zytokine, wie zum Beispiel TNF und soll sowohl an den Abläufen des adaptiven Immunsystems als auch der Innate Immunity beteiligt sein. Für das hBD-1-Gen wurden entsprechende Bindungsstellen bis jetzt nicht nachgewiesen. Die Existenz solcher Bindungsstellen erklärt einleuchtend die Zunahme der Produktionsstärke von hBD-2 und -3 in Oropharynxgewebe, das einem langjährigen Einfluss von Nikotin und Alkohol ausgesetzt war.

Wie von Bockmühl et al. beschrieben, kommt es während der Onkogenese unter anderem auch zu einem Verlust der Heterozygotität (loss of heterozygosity, LOH) auf Chromosom 8. Der Verlust von genetischem Material wurde für die Region 8p21-p22 beschrieben [Bockmühl 2002]. Hierbei handelt es sich um Veränderungen, die im Verlauf der Ausbildung von malignen Neoplasien relativ spät auftreten. Die Mutation dieser Region korreliert statistisch signifikant mit dem Auftreten von Lymphknoten- und Fernmetastasen. Die Gene der untersuchten Peptide hBD-1 – 3 liegen in unmittelbarer Nähe auf 8p22-23. Die hBD-1-Produktion lag in der Gruppe der Karzinome statistisch signifikant unter der in Tonsillen mit Noxeneinfluss. Für hBD-2 und -3 war der Unterschied zwar nicht statistisch signifikant, jedoch lag für hBD-3 zumindest der

unkorrigierte p-Wert im Signifikanzbereich. Außerdem zeigten sich für hBD-2 und -3 deutlich mehr negative Proben in der Gruppe der Karzinome als in der mit chronisch entzündeten Tonsillen. Die Lokalisation der Gene für hBD-1 – 3 und die Tatsache, dass sich letztendlich für alle drei untersuchten  $\beta$ -Defensine im Vergleich von Karzinomen mit Oropharynxgewebe mit langjährigem Noxeneinfluss eine Abnahme der Produktionsstärke beobachten lässt, geben Anlass zu der Annahme, dass die chromosomalen Veränderungen auf 8p ursächlich für die verminderte Defensinproduktion sind. Diese Theorie wird durch Ergebnisse unserer eigenen Arbeitsgruppe untermauert, bei denen in Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen ein LOH in 40% gezeigt werden konnte (unveröffentlichte Daten).

Es bleibt die Frage, in welchem Zusammenhang die verminderte Produktion von hBD-1 – 3 mit dem Wachstum von Kopf-Hals-Karzinomen steht. Für Nierenzellkarzinome und Adenokarzinome der Prostata wurde eine verminderte Produktion von hBD-1 bereits beschrieben. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Prostatakarzinome von Ratten nach erfolgter Transduktion von menschlichem Chromosom 8 in vitro signifikant an der Ausbildung von Metastasen gehindert werden. Die Region 8p23 soll hierbei das genetische Material enthalten, das die entscheidende metastasenunterdrückende Aktivität codiert [Donald 2003].

Möglich wäre also die Funktion der Gene der humanen  $\beta$ -Defensine als Tumorsuppressorgene oder als direkte antitumorale Gegenspieler. HBD-1 und -2 sind potente Chemoattraktanten. Unter anderem wirken sie über den Chemokinrezeptor CCR6 und bewirken das Einwandern von unreifen dendritischen Zellen und Memory-T-Zellen. Ein Mangel an hBD-1 – 3 aufgrund des Verlusts der Gene auf 8p könnte auf diese Art dazu beitragen, dass der Organismus die Tumorzellen nicht mehr als fremd erkennt. Dieser Ansatz deckt sich damit, dass bei Kopf-Hals-Karzinomen Verluste auf 8p mit dem Auftreten von Lymphknoten- und Fernmetastasen einhergehen. Außerdem sind Verluste auf 8p mit einer signifikant schlechteren Prognose für den Patienten verbunden [Bockmühl 2002].

Ein weiterer Punkt ist die antitumorale Aktivität von humanen  $\beta$ -Defensinen. Kommt es im Laufe der Akkumulation von DNA-Schäden zum Verlust der Gene von hBD-1 – 3, so fehlt deren antitumorale Wirkung auf die wachsende Neoplasie. Für andere APs ist beschrieben, dass ihre Expression mit dem teilweisen oder sogar vollständigen Verlust der Fähigkeit einhergeht, maligne Tumoren auszubilden. Diese Erkenntnisse beruhen auf antitumoralen Therapieansätzen, die unter 4.3 genauer beschrieben werden. Der genaue Zusammenhang zwischen Expression und antitumoralem Effekt ist jedoch noch unklar [Winder 1998].

### 4.3 Therapieansätze und Ausblick

Das antimikrobielle Spektrum von hBD-1 – 3 umfasst Bakterien, Pilze und Viren. Diese Eigenschaften wurden in vitro bereits mehrfach untersucht. Sie wirken unter anderem hochpotent gegen Keime, deren Resistenzentwicklungen gegen konventionelle, etablierte Antibiotika im klinischen Alltag zunehmend Probleme bereiten. Die Arbeitsgruppe um Ganz und Liu entwickelte erstmals ein in-vivo-Modell zur antimikrobiellen Gentherapie mit hBD-2. Zuerst wurde mittels eines retroviralen Vektors erfolgreich hBD-2-cDNA in verschiedene humane und Mäusezellen, unter anderem Fibroblasten, Speicheldrüsenzellen, Endothelzellen und T-Zellen transfiziert. Alle transfizierten Zellen produzierten voll funktionsfähiges hBD-2, dessen antimikrobielle Aktivität gegen *Escherichia coli* gezeigt wurde. Weiterhin implantierten sie Mäusen transfizierte Tumorzellen der Linie HAT-1080. Anschließend wurde in den sich ausbildenden Tumor *Escherichia coli* injiziert und der Tumor zur Untersuchung der Keimlast exzidiert. Im Vergleich mit Kontrollen wiesen transfizierte Tumoren lediglich 7,8% der Keimlast auf. Somit konnten die Autoren zeigen, dass die Gentransfektion von hBD-2 zur Therapie von Infektionen durchführbar ist [Huang 2002]. Das Therapiemodell einer anderen Arbeitsgruppe basiert ebenfalls auf transfizierten Zellen. Carretero et al. konnten die Gene von hBD-2, -3 und von LL-37 in der HaCaT-Zelllinie platzieren, die sich von menschlichen Keratinozyten ableitet. Die HaCaT-Zellen wurden anschließend auf einer fibroblastenhaltigen Fibrinmatrix kultiviert, einem biotechnologischen Hautäquivalent, wie es zur Defektdeckung von großflächigen Gewebsdefekten bei Brandopfern verwendet wird. Die von den HaCaT-Zellen in der Matrix produzierten APs waren hochwirksam gegen *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* [Carretero 2004]. Die Weiterentwicklung dieser Ansätze wird aktuell von verschiedenen biotechnologischen Firmen betrieben und wäre ein entscheidender Schritt zur Therapie von schweren Infektionen mit MRSA, VRE und anderen Problemkeimen.

Die andere klinisch relevante Eigenschaft der antimikrobiellen Peptide, die sie ins Interesse der Forschung gerückt hat, ist ihre antitumorale Aktivität. Ihr wird in letzter Zeit ein zunehmendes Interesse zuteil. Grundlage hierfür sind die verschiedenen Erklärungsansätze für die antitumoralen Wirkmechanismen der APs. Krebszellen unterscheiden sich von normalen Zellen. Ihre erhöhte Empfindlichkeit für einige kationische Peptide wird vor allem auf Unterschiede in der Beschaffenheit der Zellmembran zurückgeführt. Der hohe Gehalt an negativ geladenen Phosphatidylserinen soll hierbei die entscheidende Rolle spielen. Desweiteren weisen Tumorzellen deutlich mehr Mikrovilli auf. Die daher vergrößerte Zelloberfläche ermöglicht die Interaktion mit einer größeren Anzahl von Peptiden. Schließlich scheint das vergleichsweise höhere negative intrazelluläre Potential von Tumorzellen für die selektive membranolytische

Aktivität von AP unabdingbar zu sein. Die positiv geladenen AP sollen sich zuerst durch elektrostatische Interaktion mit der Zellmembran verbinden und diese wie ein Teppich überziehen. Nach Überschreiten einer Schwellenkonzentration durchdringen die AP die Membran. Dies führt durch Ausbildung von membrandurchspannenden Poren und Mizellenbildung zum Zelltod [Papo 2005].

Ein weiterer Angriffsort für APs in Tumorzellen sind die Mitochondrien. Nach Durchdringen der Zellmembran können APs zu einem Anschwellen der Mitochondrien, zur Freisetzung von Cytochrom C und somit zur Apoptose führen [Papo 2005].

Für die humanen  $\alpha$ -Defensine HNP-1 – 3 wurden zytotoxische Effekte auf Zelllinien von Nierenzellkarzinomen in Konzentrationen über 25  $\mu\text{g} / \text{ml}$  nachgewiesen. Interessanterweise jedoch wiesen HNP-1 – 3 in niedrigeren Konzentrationen sogar eine mitogene Wirkung auf die untersuchten Zelllinien auf [Müller 2002]. Entsprechende Untersuchungen zu den humanen  $\beta$ -Defensinen existieren noch nicht.

Für andere, nicht vom Menschen stammende AP gibt es jedoch weitere interessante Untersuchungen. Die Arbeitsgruppe um Zasloff wies für Magainin und Analoga des beim Frosch entdeckten AP in vivo antitumorale Aktivität gegen Leukämiezellen, Ovarialtumore und murine Asziteszellen im Mausexperiment nach. Für die S-180-Asziteszellen und die Ovarialtumore konnte eine Verlängerung der Überlebenszeit der Mäuse um 100% gezeigt werden. Das D-Aminosäure-Analogon MSI-238 wirkte noch deutlich potenter, was von den Autoren auf seinen niedrigeren enzymatischen Abbau zurückgeführt wird [Baker 1993].

In vivo wird die Anwendung von AP durch mehrere Faktoren beeinflusst. Außer dem Abbau durch Enzyme ist hier vor allem die toxische Wirkung auf normale Zellen zu nennen. Um therapeutisch wirksame Spiegel bei systemischer Anwendung zu erreichen, müssten die Peptide wiederholt und in relativ hohen Dosen appliziert werden. Außerdem würden die amphipathischen Moleküle dabei auch andere als die Zielzellen erreichen. Um diese Probleme zu umgehen, wurden verschiedene Strategien entwickelt. Hier konzentrierte sich die Forschung der vergangenen Jahre auf die APs Cecropin und Melittin. Cecropin wurde ursprünglich in der Hämolymphe der Seidenraupe *Hyalophora cecropia* entdeckt, Melittin im Bienengift. Winder et al. bedienten sich des murinen Leukämie Virus, um die Gene dieser APs mittels Transfektion in Zelllinien aus menschlichen Blasenkarzinomen einzubringen. Anschließend wurden diese Mäusen injiziert. Die Expression von Cecropin resultierte bei einigen Zellklonen in einem



völligen Verlust und bei anderen zumindest in einer deutlichen Verminderung der Fähigkeit, Tumore zu bilden [Winder 1998]. Ein anderer Ansatz, um die Toxizität von AP zu verringern, ist sie durch Homing-Domänen an den Zielort zu bringen. Das proapoptotische DP-1, bestehend aus einer Proteintransduktionsdomäne und einem AP, konnte nach lokaler Injektion *in vitro* bei verschiedenen Zelllinien Apoptose auslösen, unter anderem bei Zellen aus Fibrosarkomen und aus Kopf-Hals-Tumoren. Das Peptid war gegen die mitochondriale Membran aktiv, nicht jedoch gegen die Zellwand normaler Zellen [Mai 2001]. Auch für das Molekül RGD-Tachyplesin wird eine Hemmung des Wachstums von Zellen aus Melanomen und Prostatakarzinomen *in vitro* und im Mausmodell ohne weitere Nebenwirkungen beschrieben [Chen et al. 2001].

Schließlich wird die Aktivität von amphipathischen AP bei systemischer Anwendung durch Serumkomponenten beeinträchtigt. Insbesondere die low density Lipoproteine scheinen hierbei eine wichtige Rolle zu spielen. Um sowohl die Inaktivierung durch Serum als auch die Toxizität auf normale Zellen zu verringern, synthetisierten Shai et al. eine neue Gruppe diastereomerer Moleküle, die sowohl D- und L-Formen der Aminosäuren Leucin und Lysin enthalten. Die Aktivität dieser Moleküle gegen Krebszellen war vergleichbar mit der von Mitomycin C, wobei ihre Selektivität für Tumorzellen deutlich höher war. Diese wird von den Autoren auf die im Vergleich mit nativen AP verbesserte elektrostatische Anziehung der Peptide auf die sauren Bestandteile wie zum Beispiel Phosphatidylserine in der Membran zurückgeführt. Eine Inaktivierung durch Enzyme und andere Serumbestandteile konnte vermieden werden [Papo 2003]. Eines dieser Diastereomere mit 15 Aminosäuren war *in vitro* hochselektiv für Melanom- und Bronchialkarzinomzellen und konnte im Mausmodell die Metastasenlast um 86% verringern. Trotz intravenöser Applikation gab es weder klinisch noch histopathologisch einen Anhalt für Organschäden.

Ein ernsthaftes Problem bei der Behandlung krebserkrankter Patienten mit konventionellen Chemotherapeutika stellt die im Verlauf auftretende Resistenz des Tumors, multi-drug resistance (MDR) durch die übermäßige Expression von membrangebundenem P-Glykoprotein, einer aktiven, auswärts gerichteten Pumpe, dar. Die passiv in die Zelle diffundierenden Chemotherapeutika werden so aus der Tumorzelle entfernt. Diese MDR kann durch amphipathische AP, die aufgrund ihrer molekularen Beschaffenheit selektiv für Tumorzellen sind, umgangen werden. Für Cecropin A beispielsweise konnte *in vitro* ein synergistischer Effekt mit zytostatisch wirkenden Medikamenten wie 5-Fluorouracil und Cytarabin auf akute Lymphoblasten-Leukämiezellen gezeigt werden [Hui 2002]. Denkbar ist, dass die selektiven AP die Durchlässigkeit der Membran der Tumorzellen für die konventionellen Zytostatika drastisch

erhöhen. Die Wirkung von Pumpenmolekülen wäre dadurch minimiert. Dies wird durch die Ergebnisse einer anderen Arbeit unterstützt. In vitro wurde die hohe Aktivität von synthetischen Magainin-Analoga für sechs verschiedene Linien des kleinzelligen Bronchial-Karzinoms durch das MDR-1 Gen nicht beeinflusst. Auch in dieser Arbeit konnte ein synergistischer Effekt mit etablierten Zytostatika gezeigt werden. Die simultane Anwendung mit Cisplatin, Etoposid und Doxorubicin senkte den Prozentsatz überlebender Tumorzellen teilweise um 71% [Ohsaki 1992].

Anhand der angeführten Arbeiten und ihrer Ergebnisse ist zu erkennen, dass es bereits vielversprechende Ansätze gibt, das Potential antimikrobieller Peptide therapeutisch zu nutzen. Prinzipiell sind genterapeutische Modelle sowohl mit antiinfektiver als auch antitumoraler Zielsetzung durchführbar. Entsprechende Untersuchungen mit den humanen  $\beta$ -Defensinen stehen noch aus. Insbesondere hBD-3 wäre aufgrund seiner hervorragenden Eigenschaften bei therapieresistenten Problemkeimen ein ideales Therapeutikum. Auch bei Therapiekonzepten mit antitumoraler Zielsetzung sind die Ansätze viel versprechend. Die synergistischen Effekte mit etablierten Zytostatika, die für andere Defensine bereits nachgewiesen wurden, könnten die Ansprechraten auf Chemotherapien deutlich verbessern. Profitieren könnten hiervon zum einen Patienten mit primär inoperablen Tumoren mit palliativer Therapiezielsetzung als auch Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren mit adjuvanter, kurativer Zielsetzung. Hierbei sind systemische Konzepte bei metastasierten Kopf-Hals-Karzinomen im Rahmen von standardisierten Chemotherapieprotokollen und lokale Applikationsformen bei Tumoren ohne Lymphknotenbeteiligung oder aber auch begleitend, beispielsweise mit einem Debulking, prinzipiell möglich.

## 5 Zusammenfassung

Lange Zeit war man der Ansicht, dass die Erregerabwehr an den Körperoberflächen ausschließlich auf dem adaptiven Immunsystem mit seinen bekannten zellulären Bestandteilen und Antikörpern in Kombination mit den epithelialen Barrieren beruht. Vor kurzem jedoch konnte gezeigt werden, dass es auch eine phylogenetisch ältere Art der epithelialen Abwehr in Form der antimikrobiellen Peptide gibt. Defensine gehören zur Gruppe der antimikrobiellen Peptide. Der Mensch exprimiert  $\alpha$ - und  $\beta$ -Defensine. Ihr Wirkspektrum umfasst Bakterien, Viren und Pilze. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Abwehr pathogener Keime an den Grenzflächen zwischen Umwelt und Körperoberfläche. Einige werden konstitutiv produziert und tragen zur Kontrolle der physiologischen Keimflora bei, andere sind durch pathogene Keime induzierbar und durch ihre Interaktionen mit dem adaptiven Immunsystem maßgeblich an der schnellen und effektiven Erregerabwehr beteiligt. Mit der vorliegenden Arbeit wurde die Produktion der humanen  $\beta$ -Defensine 1 – 3 in gesunder oraler Schleimhaut, Tonsillen ohne Noxeneinfluss, Tonsillen mit langjährigem Noxeneinfluss und in Oropharynxkarzinomen immunhistochemisch dargestellt. Die Peptidproduktion war in allen Fällen auf das Epithel begrenzt. Es konnte gezeigt werden, dass zwischen normaler oropharyngealer Schleimhaut und normalen Tonsillen kein Unterschied für die Produktion von hBD 1 – 3 existiert. Das ist besonders interessant, da die Tonsillen mit ihrem lymphoepithelialen Gewebe als Teil des Waldeyer'schen Rachenrings eine Schlüsselrolle bei der Erregerabwehr spielen. Wie erwartet zeigte sich eine Zunahme der Peptidproduktion für hBD-2 und 3 und interessanterweise auch für hBD-1 in Tonsillen mit chronischem Noxeneinfluss. Dies legt nahe, dass die hBD-1-Produktion bei chronischen Entzündungen erhöht ist. Dies ist unseres Erachtens entweder durch die vermehrte Zellzahl in chronisch entzündetem, hyperplastischem Gewebe oder durch Induktion des hBD-1-Gens bedingt. Letzteres widerspricht der gängigen Meinung, dass die hBD-1-Expression ausschließlich konstitutiv erfolgt. In Karzinomen ergab die Auswertung letztendlich für alle drei Peptide eine Abnahme der Produktionsstärke. Die Gene von hBD-1 – 3 liegen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 8p22-23. Für diese Region ist ein Verlust der Heterozygotie beschrieben, der im Lauf der Onkogenese relativ spät zum Zeitpunkt der Entstehung eines invasiven Karzinoms aus einer Präkanzerose auftritt und mit der Ausbildung von Metastasen zu einer Verschlechterung der Prognose führt. Wir gehen daher davon aus, dass hBD-1 – 3 eine antitumorale Aktivität ausüben und ihre verminderte Produktion in Zusammenhang mit dem Fortschreiten von Kopf-Hals-Karzinomen steht, wie kürzlich für hBD-1 als Tumorsuppressoren in urogenitalen Karzinomen gezeigt wurde. Für antimikrobielle Peptide von Insekten wurde bereits eine antitumorale Wirkung nachgewiesen, die einen solchen Mechanismus auch für humane Peptide wahrscheinlich macht. Aufgrund ihrer antitumoralen Aktivität erscheinen uns

die humanen  $\beta$ -Defensine, insbesondere hBD-3 im Oropharynx, gut für die Entwicklung autogener antitumoraler Immuntherapeutika geeignet.

## 6 Literaturverzeichnis

Abiko Y, Suraweera AK, Nishimura M, Arakawa T, Takuma T, Mizoguchi I, Kaku T (2001) Differential expression of human beta-defensin 2 in keratinized and non-keratinized oral epithelial lesions; immunohistochemistry and in situ hybridization. *Virchows Arch* 438: 248-253

Abiko Y, Jinbu Y, Noguchi T, Nishimura M, Kusano K, Amaratunga P, Shibata T, Kaku T (2002) Upregulation of human beta-defensin 2 peptide expression in oral lichen planus, leukoplakia and candidiasis. An immunohistochemical study. *Pathol Res Pract* 198(8): 537-42.

Baker MA, Maloy WL, Zasloff M, Jacob LS (1993) Anticancer efficacy of magainin2 and analogue peptides. *Cancer Res* 53: 3052-3057

Bensch KW, Raida M, Magert HJ, Schulz KP, Forssmann WG (1995) HBD-1: a novel beta defensin from human plasma. *FEBS Letters* 368: 331-335.

Bissell J, Joly S, Johnson GK, Organ CC, Dawson D, McGray PB Jr, Guthmiller JM (2004) Expression of  $\beta$ -defensins in gingival health and periodontal disease. *J Oral Pathol Med* 33: 278-85

Bockmühl U, Schlüns K, Schmidt S, Matthias S, Petersen I (2002) Chromosomal alterations during metastasis formation of head and neck squamous cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 33: 29-35

Braakhuis, B J M, Leemans C R, Brakenhoff R H (2004) A genetic progression model of oral cancer: current evidence and clinical implications. *J Oral Pathol Med* 33: 317-22

Carretero M, del Rio M, Garcia M, Escámez MJ, Mirones I, Rivas L, Balague C, Torcano JL, Larcher F (2004) A cutaneous gene therapy approach to treat infection through keratinocyte-targeted overexpression of antimicrobial peptides. *FASEB article* 10.1096/fj.04-1515fje

Chae SW, Lee SH, Cho JH, Lee HM, Choi G, Hwang SJ (2001) Expression of human beta-defensin 1 mRNA in human palatine tonsil. *Acta Otolaryngol* 121(3): 414-8.

Chen Y, Xu X, Hong S, Chen J, Liu N, Underhill CB, Creswell K, Zhang L. (2001) RGD-Tachyplesin inhibits tumor growth. *Cancer Res.* 61(6): 2434-8.

Dale BA, Krisanaprakornkit S (2001a) Defensin antimicrobial peptides in the oral cavity. *J Oral Pathol Med* 30(6): 321-7.

Dale BA, Kimball JR, Krisanaprakorkit S, Roberts F, Robinovitch M, O'Neal R, Valore EV, Ganz T, Anderson GM, Weinberg A (2001b) Localized antimicrobial peptide expression in human gingiva. *J Periodont Res* 36: 285-294

Diamond G, Zasloff M, Eck H, Brasseur M, Maloy WL, Bevins CL (1991) Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 3952-6.

Donald CD, Sun CQ, Lim SD, Macoska J, Cohen C, Amin MB, Young AN, Ganz TA, Marshall FF, Petros JA (2003) Cancer-specific Loss of  $\beta$ -defensin 1 in renal and prostatic carcinomas. *Laboratory Investigation* 83: 501-505

Ganz T (2003) Defensins: Antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature* 3: 710-720

Goldman MJ, Anderson GM, Stolzenberg ED, Kari UP, Zasloff M, Wilson JM (1997) Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in Lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* 88: 553-60

Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM (1997) A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 387: 861

Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder JM (2001) Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J. Biol. Chem.* 76: 5707-5713.

Huang GTJ, Zhang HB, Kim D, Liu L, Ganz T (2002) A model for antimicrobial gene therapy: demonstration of human  $\beta$ -defensin 2 antimicrobial activities in vivo. *Human Gene Therapy* 13: 2017-2025

Hui I, Leung K, Chen HM (2002) The combined effects of antibacterial peptide Cecropin A and anti-cancer agents on leukemia cells. *Anticancer Res* 22: 2811-2816

Krisanaprakornkit S, Weinberg A, Perez CN, Dale BA (1998) Expression of the peptide antibiotic human beta defensin 1 in cultured gingival epithelial cells and gingival tissue. *Infect Immun* 66: 4222-4228

Lehrer RI, Ganz T (2001) Defensins of vertebrate animals. *Current Opinon in Immunology* 14: 96-102

Mai JC, Mi Z, Kim S-H, Ng B, Robbins PD (2001) A proapoptotic Peptide for the treatment of solid tumors. *Cancer Res* 61: 7709-7712

Meyer JE, Harder J, Gorogh T, Weise JB, Schubert S, Janssen D, Maune S (2004) Human beta-defensin-2 in oral cancer with opportunistic Candida infection. *Anticancer Res* 24(2B): 1025-30

Mizukawa N, Sugiyama K, Fukunaga J, Ueno T, Mishima K, Takagi S, Sugahara T (1998) Defensin-1, a peptide detevted in the saliva of oral squamous cell carcinoma patients. *Anticancer Res* 18: 4645-4649

Mizukawa N, Sugiyama K, Yamachika E, Ueno T, Mishima K, Takagi S, Sugahara T (1999) Presence of Defensin in Epiothelial Langerhans Cells Adjacent to Oral Carcinomas and Precancerous Lesions. *Anticancer Res* 19: 2969-2972

Mizukawa N, Sawaki K, Nagatsuka H, Kamio M, Yamachika E, Fukunaga J, Ueno T, Takagi S, Sugahara T (2001) Human  $\alpha$ - and  $\beta$ -Defensin Immunoreactivity in Oral Mucoepidermoid Carcinomas. *Anticancer Res* 21: 2171-2174

Müller CA, Markovic-Lipkovski J, Klatt T, Gamper J, Schwarz G, Beck H, Deeg, M, Kalbacher H, Widmann S, Wessels JT, Becker V, Müller GA, Flad T (2002) Human  $\alpha$ -Defensins HNPs-1,-2 and -3 in renal cell carcinoma. Influences on tumor cell proliferation. *Am J Pathol* 160: 1311-1324

Nishimura M, Abiko Y, Kusano K, Yamazaki M, Saitoh M, Mizoguchi I, Jinbu Y, Noguchi T, Kaku T (2003) Localization of human  $\beta$ -defensin 3 mRNA in normal oral epithelium, leukoplakia, and lichen planus: an in situ hybridization study. *Med Electron Microsc* 36: 94-97

Ohsaki Y, Gazdar AF, Chen H-C, Johnson BE (1992) Antitumor activity of magainin analogues against human lung cancer cell lines. *Cancer Res* 52: 3534-3538

Oppenheim JJ, Biragyn A, Kwak LW, Yang D (2003) Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. *Ann Rheum Dis* 62 (Suppl II): ii17-ii21

Papo N, Shai Y (2003) New lytic peptides based on the d/l-amphipathic helix motif preferentially kill tumor cells compared to normal cells. *Biochemistry* 42: 9346-9354

Papo N, Shai Y (2005) Host defense peptides as new weapons in cancer treatment. *Cell. Mol. Life Sci.* 62: 784-790

Sawaki K, Mizukawa N, Yamaai T, Yoshimoto T, Nakano M, Sugahara T (2002) High Concentration of  $\beta$ -defensin-2 in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Res* 22: 2103-2108

Schonwetter BS, Stolzenberg ED, Zasloff MA (1995) Epithelial antibiotics induced at sites of inflammation. *Science* 267(5204): 1645-8.

Schröder JM, Harder J (1999) Human beta-defensin-2. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 31 (6): 645-651

Schutte BC, Mitros JP, Bartlet JA, Walters JD, Jia HP, Welsh MJ, Casavant TL, McCray PBjr (2002) Discovery of five conserved  $\beta$ -defensin gene clusters using a computational search strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 2129-2133

Sun CQ, Arnold R, Fernandez-Golar C, Parrish AB, Almekinder T, He J, Ho SM, Svoboda P, Pohl J, Marshall FF, Petros JA (2006) Human beta-Defensin-1, a Potential Chromosome 8p Tumor Suppressor: Control of Transcription and Induction of Apoptosis in Renal Cell Carcinoma. *Cancer Res* 2006; 66(17): 8542-9



Torre V, Bucolo S, Giordano C, Ciccirello R, Cavallari V, Garofalo L, Beatrice F (2005) Palatine tonsils in smoker and non-smoker patients: a pilot clinicopathological and ultrastructural study. *J Oral Pathol Med* 34: 390-6

Weise JB, Meyer JE, Helmer H, Wittrock H, Maune S (2002) A newly discovered function of palatine tonsils in immune defence: the expression of defensins. *Otolaryngol Pol* 56(4): 409-13

Winder D, Günzburg WH, Erfle V, Salmons B (1998) Expression of antimicrobial peptides has an antitumor effect in human cells. *Biochem Biophys Res Commun* 242: 608-612

Zasloff M (1987) Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterisation of two active forms, and partial cDNA-sequence of a precursor. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 5449-53

## 7 Anhang

### Deskriptive Statistik

#### 1. Häufigkeiten

		Gruppe			
		Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	norm. SH	27	26,0	26,0	26,0
	norm. Tonsille	18	17,3	17,3	43,3
	Tonsille Noxe	25	24,0	24,0	67,3
	Ca	34	32,7	32,7	100,0
	Gesamt	104	100,0	100,0	

			Geschlecht			
			Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
norm. SH	Gültig	m	16	59,3	59,3	59,3
		w	11	40,7	40,7	100,0
		Gesamt	27	100,0	100,0	
norm. Tonsille	Gültig	m	4	22,2	22,2	22,2
		w	14	77,8	77,8	100,0
		Gesamt	18	100,0	100,0	
Tonsille Noxe	Gültig	m	21	84,0	84,0	84,0
		w	4	16,0	16,0	100,0
		Gesamt	25	100,0	100,0	
Ca	Gültig	m	27	79,4	79,4	79,4
		w	7	20,6	20,6	100,0
		Gesamt	34	100,0	100,0	

		Altersverteilung							
		N	Mittelwert	Standardab- weichung	Minimum	Maximum	Perzentile		
							25	50. (Median)	75
norm. SH	Alter	2	40,26	20,669	3	6	20,00	46,00	58,00
norm. Tonsille	Alter	1	4,89	3,984	2	1	2,00	4,00	6,00
Tonsille Noxe	Alter	2	57,64	11,979	4	8	46,00	61,00	68,00
C	Alter	3	59,29	9,916	4	8	52,75	57,50	66,75

## 2 Gegenüberstellungen aller Gruppen

### 2.1 hBD-1

**Kreuztabelle**

Anzahl		hBD-1				Gesamt
		neg.	pos. 1% Epithelz.	pos. 1-5% Epithelz.	pos. > 5% Epithelz.	
Gruppe	norm. SH	12	9	4	2	27
	norm. Tonsille	12	4	2		18
	Tonsille Noxe	6	6	3	10	25
	Ca	23	1	1	9	34
Gesamt		53	20	10	21	104

**Chi-Quadrat-Tests**

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	28,248 <sup>a</sup>	9	,001
Kontinuitätskorrektur			
Likelihood-Quotient	34,646	9	,000
Zusammenhang linear-mit-linear	,266	1	,606
Anzahl der gültigen Fälle	104		

a. 7 Zellen (43,8%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 1,73.

### 2.2 hBD-2

**Kreuztabelle**

Anzahl		hBD-2				Gesamt
		neg.	pos. 1% Epithelz.	pos. 1-5% Epithelz.	pos. > 5% Epithelz.	
Gruppe	norm. SH	8	10	6	3	27
	norm. Tonsille	13	1	3	1	18
	Tonsille Noxe	9	2	2	12	25
	Ca	18	6	3	7	34
Gesamt		48	19	14	23	104

### Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	27,488 <sup>a</sup>	9	,001
Kontinuitätskorrektur			
Likelihood-Quotient	26,436	9	,002
Zusammenhang linear-mit-linear	,006	1	,938
Anzahl der gültigen Fälle	104		

a. 8 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 2,42.

### 2.3 hBD-3

#### Kreuztabelle

Anzahl		hBD-3				Gesamt
		neg.	pos. 1% Epithelz.	pos. 1-5% Epithelz.	pos. > 5% Epithelz.	
Gruppe	norm. SH	4	8	7	8	27
	norm. Tonsille	4	4	10		18
	Tonsille Noxe	1	1	4	19	25
	Ca	10	5	3	16	34
Gesamt		19	18	24	43	104

### Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	38,465 <sup>a</sup>	9	,000
Kontinuitätskorrektur			
Likelihood-Quotient	44,864	9	,000
Zusammenhang linear-mit-linear	,262	1	,609
Anzahl der gültigen Fälle	104		

a. 7 Zellen (43,8%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 3,12.

### 3. Vergleiche der einzelnen Gruppen

#### 3.1 normale Schleimhaut – normale Tonsille

##### 3.1.1 hBD-1

**Kreuztabelle**

Anzahl		hBD-1				Gesamt
		neg.	pos. 1% Epithelz.	pos. 1-5% Epithelz.	pos. > 5% Epithelz.	
Gruppe	norm. SH	12	9	4	2	27
	norm. Tonsille	12	4	2		18
Gesamt		24	13	6	2	45

**Chi-Quadrat-Tests**

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	2,906 <sup>a</sup>	3	,406
Kontinuitätskorrektur			
Likelihood-Quotient	3,614	3	,306
Zusammenhang linear-mit-linear	2,344	1	,126
Anzahl der gültigen Fälle	45		

a. 4 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist ,80.

**Symmetrische Maße**

		Wert	Asymptotische r Standardfehler <sup>a</sup>	Näherung sweises T <sup>b</sup>	Näherungswei se Signifikanz
Nominal- bzgl. Nominalmaß	Kontingenzkoeffizient	,246			,406
Anzahl der gültigen Fälle		45			

a. Die Null-Hypothese wird nicht angenommen.

b. Unter Annahme der Null-Hypothese wird der asymptotische Standardfehler verwendet.

### 3.1.2 hBD-2

#### Kreuztabelle

Anzahl		hBD-2				Gesamt
		neg.	pos. 1% Epithelz.	pos. 1-5% Epithelz.	pos. > 5% Epithelz.	
Gruppe	norm. SH	8	10	6	3	27
	norm. Tonsille	13	1	3	1	18
Gesamt		21	11	9	4	45

#### Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	9,119 <sup>a</sup>	3	,028
Kontinuitätskorrektur			
Likelihood-Quotient	10,003	3	,019
Zusammenhang linear-mit-linear	3,656	1	,056
Anzahl der gültigen Fälle	45		

a. 4 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 1,60.

#### Symmetrische Maße

		Wert	Asymptotische r Standardfehler <sup>a</sup>	Näherung sweises T <sup>b</sup>	Näherungswei se Signifikanz
Nominal- bzgl. Nominalmaß	Kontingenzkoeffizient	,410			,028
Anzahl der gültigen Fälle		45			

a. Die Null-Hypothese wird nicht angenommen.

b. Unter Annahme der Null-Hypothese wird der asymptotische Standardfehler verwendet.

### 3.1.3 hBD-3

#### Kreuztabelle

Anzahl		hBD-3				Gesamt
		neg.	pos. 1% Epithelz.	pos. 1-5% Epithelz.	pos. > 5% Epithelz.	
Gruppe	norm. SH	4	8	7	8	27
	norm. Tonsille	4	4	10		18
Gesamt		8	12	17	8	45

#### Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	8,399 <sup>a</sup>	3	,038
Kontinuitätskorrektur			
Likelihood-Quotient	11,170	3	,011
Zusammenhang linear-mit-linear	1,512	1	,219
Anzahl der gültigen Fälle	45		

a. 5 Zellen (62,5%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 3,20.

#### Symmetrische Maße

		Wert	Asymptotische r Standardfehler <sup>a</sup>	Näherung sweises T <sup>b</sup>	Näherungswei se Signifikanz
Nominal- bzgl. Nominalmaß	Kontingenzkoeffizient	,397			,038
Anzahl der gültigen Fälle		45			

a. Die Null-Hyphothese wird nicht angenommen.

b. Unter Annahme der Null-Hyphothese wird der asymptotische Standardfehler verwendet.

### 3.2 normale Tonsille – Tonsille mit chronischem Noxeneinfluss

#### 3.2.1 hBD-1

**Kreuztabelle**

Anzahl		hBD-1				Gesamt
		neg.	pos. 1% Epithelz.	pos. 1-5% Epithelz.	pos. > 5% Epithelz.	
Gruppe	norm. Tonsille	12	4	2		18
	Tonsille Noxe	6	6	3	10	25
Gesamt		18	10	5	10	43

**Chi-Quadrat-Tests**

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	11,772 <sup>a</sup>	3	,008
Kontinuitätskorrektur			
Likelihood-Quotient	15,361	3	,002
Zusammenhang linear-mit-linear	10,847	1	,001
Anzahl der gültigen Fälle	43		

a. 4 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 2,09.

**Symmetrische Maße**

		Wert	Asymptotische r Standardfehler <sup>a</sup>	Näherungswertes T <sup>b</sup>	Näherungsweise Signifikanz
Nominal- bzgl. Nominalmaß	Kontingenzkoeffizient	,464			,008
Anzahl der gültigen Fälle		43			

a. Die Null-Hyphothese wird nicht angenommen.

b. Unter Annahme der Null-Hyphothese wird der asymptotische Standardfehler verwendet.



### 3.2.2 hBD-2

#### Kreuztabelle

Anzahl		hBD-2				Gesamt
		neg.	pos. 1% Epithelz.	pos. 1-5% Epithelz.	pos. > 5% Epithelz.	
Gruppe	norm. Tonsille	13	1	3	1	18
	Tonsille Noxe	9	2	2	12	25
Gesamt		22	3	5	13	43

#### Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	9,685 <sup>a</sup>	3	,021
Kontinuitätskorrektur			
Likelihood-Quotient	11,099	3	,011
Zusammenhang linear-mit-linear	7,206	1	,007
Anzahl der gültigen Fälle	43		

a. 4 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 1,26.

#### Symmetrische Maße

		Wert	Asymptotische r Standardfehler <sup>a</sup>	Näherung sweises T <sup>b</sup>	Näherungswei se Signifikanz
Nominal- bzgl. Nominalmaß	Kontingenzkoeffizient	,429			,021
Anzahl der gültigen Fälle		43			

a. Die Null-Hyphothese wird nicht angenommen.

b. Unter Annahme der Null-Hyphothese wird der asymptotische Standardfehler verwendet.

### 3.2.3 hBD-3

#### Kreuztabelle

Anzahl		hBD-3				Gesamt
		neg.	pos. 1% Epithelz.	pos. 1-5% Epithelz.	pos. > 5% Epithelz.	
Gruppe	norm. Tonsille	4	4	10		18
	Tonsille Noxe	1	1	4	19	25
Gesamt		5	5	14	19	43

#### Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	24,686 <sup>a</sup>	3	,000
Kontinuitätskorrektur			
Likelihood-Quotient	31,706	3	,000
Zusammenhang linear-mit-linear	17,201	1	,000
Anzahl der gültigen Fälle	43		

a. 4 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 2,09.

#### Symmetrische Maße

		Wert	Asymptotische r Standardfehler <sup>a</sup>	Näherung sweises T <sup>b</sup>	Näherungswei se Signifikanz
Nominal- bzgl. Nominalmaß	Kontingenzkoeffizient	,604			,000
Anzahl der gültigen Fälle		43			

a. Die Null-Hyphothese wird nicht angenommen.

b. Unter Annahme der Null-Hyphothese wird der asymptotische Standardfehler verwendet.

### 3.3 normale Tonsille – Karzinom

#### 3.3.1 hBD-1

**Kreuztabelle**

Anzahl		hBD-1				Gesamt
		neg.	pos. 1% Epithelz.	pos. 1-5% Epithelz.	pos. > 5% Epithelz.	
Gruppe	norm. Tonsille	12	4	2		18
	Ca	23	1	1	9	34
<b>Gesamt</b>		<b>35</b>	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>9</b>	<b>52</b>

**Chi-Quadrat-Tests**

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	10,678 <sup>a</sup>	3	,014
Kontinuitätskorrektur			
Likelihood-Quotient	13,256	3	,004
Zusammenhang linear-mit-linear	1,639	1	,200
<b>Anzahl der gültigen Fälle</b>	<b>52</b>		

a. 5 Zellen (62,5%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 1,04.

**Symmetrische Maße**

		Wert	Asymptotische r Standardfehler <sup>a</sup>	Näherung sweises T <sup>b</sup>	Näherungswei se Signifikanz
Nominal- bzgl. Nominalmaß	Kontingenzkoeffizient	,413			,014
<b>Anzahl der gültigen Fälle</b>		<b>52</b>			

a. Die Null-Hyphothese wird nicht angenommen.

b. Unter Annahme der Null-Hyphothese wird der asymptotische Standardfehler verwendet.

### 3.3.2 hBD-2

#### Kreuztabelle

Anzahl		hBD-2				Gesamt
		neg.	pos. 1% Epithelz.	pos. 1-5% Epithelz.	pos. > 5% Epithelz.	
Gruppe	norm. Tonsille	13	1	3	1	18
	Ca	18	6	3	7	34
Gesamt		31	7	6	8	52

#### Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	4,368 <sup>a</sup>	3	,224
Kontinuitätskorrektur			
Likelihood-Quotient	4,831	3	,185
Zusammenhang linear-mit-linear	1,533	1	,216
Anzahl der gültigen Fälle	52		

a. 5 Zellen (62,5%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 2,08.

#### Symmetrische Maße

		Wert	Asymptotische r Standardfehler <sup>a</sup>	Näherung sweises T <sup>b</sup>	Näherungswei se Signifikanz
Nominal- bzgl. Nominalmaß	Kontingenzkoeffizient	,278			,224
Anzahl der gültigen Fälle		52			

a. Die Null-Hyphothese wird nicht angenommen.

b. Unter Annahme der Null-Hyphothese wird der asymptotische Standardfehler verwendet.

### 3.3.3 hBD-3

**Kreuztabelle**

Anzahl		hBD-3				Gesamt
		neg.	pos. 1% Epithelz.	pos. 1-5% Epithelz.	pos. > 5% Epithelz.	
Gruppe	norm. Tonsille	4	4	10		18
	Ca	10	5	3	16	34
Gesamt		14	9	13	16	52

**Chi-Quadrat-Tests**

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	19,362 <sup>a</sup>	3	,000
Kontinuitätskorrektur			
Likelihood-Quotient	23,921	3	,000
Zusammenhang linear-mit-linear	1,337	1	,248
Anzahl der gültigen Fälle	52		

a. 3 Zellen (37,5%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 3,12.

**Symmetrische Maße**

		Wert	Asymptotische r Standardfehler <sup>a</sup>	Näherung sweises T <sup>b</sup>	Näherungswei se Signifikanz
Nominal- bzgl. Nominalmaß	Kontingenzkoeffizient	,521			,000
Anzahl der gültigen Fälle		52			

a. Die Null-Hyphothese wird nicht angenommen.

b. Unter Annahme der Null-Hyphothese wird der asymptotische Standardfehler verwendet.

### 3.4 Tonsille mit chronischem Noxeneinfluss – Karzinom

#### 3.4.1 hBD-1

**Kreuztabelle**

Anzahl		hBD-1				Gesamt
		neg.	pos. 1% Epithelz.	pos. 1-5% Epithelz.	pos. > 5% Epithelz.	
Gruppe	Tonsille Noxe	6	6	3	10	25
	Ca	23	1	1	9	34
Gesamt		29	7	4	19	59

**Chi-Quadrat-Tests**

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	13,532 <sup>a</sup>	3	,004
Kontinuitätskorrektur			
Likelihood-Quotient	14,317	3	,003
Zusammenhang linear-mit-linear	5,009	1	,025
Anzahl der gültigen Fälle	59		

a. 4 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 1,69.

**Symmetrische Maße**

		Wert	Asymptotische r Standardfehler <sup>a</sup>	Näherung sweises T <sup>b</sup>	Näherungswei se Signifikanz
Nominal- bzgl. Nominalmaß	Kontingenzkoeffizient	,432			,004
Anzahl der gültigen Fälle		59			

a. Die Null-Hyphothese wird nicht angenommen.

b. Unter Annahme der Null-Hyphothese wird der asymptotische Standardfehler verwendet.

### 3.4.2 hBD-2

#### Kreuztabelle

Anzahl		hBD-2				Gesamt
		neg.	pos. 1% Epithelz.	pos. 1-5% Epithelz.	pos. > 5% Epithelz.	
Gruppe	Tonsille Noxe	9	2	2	12	25
	Ca	18	6	3	7	34
Gesamt		27	8	5	19	59

#### Chi-Quadrat-Tests

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	5,265 <sup>a</sup>	3	,153
Kontinuitätskorrektur			
Likelihood-Quotient	5,306	3	,151
Zusammenhang linear-mit-linear	4,057	1	,044
Anzahl der gültigen Fälle	59		

a. 4 Zellen (50,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 2,12.

#### Symmetrische Maße

		Wert	Asymptotische r Standardfehler <sup>a</sup>	Näherung sweises T <sup>b</sup>	Näherungswei se Signifikanz
Nominal- bzgl. Nominalmaß	Kontingenzkoeffizient	,286			,153
Anzahl der gültigen Fälle		59			

a. Die Null-Hyphothese wird nicht angenommen.

b. Unter Annahme der Null-Hyphothese wird der asymptotische Standardfehler verwendet.

### 3.4.3 hBD-3

**Kreuztabelle**

Anzahl		hBD-3				Gesamt
		neg.	pos. 1% Epithelz.	pos. 1-5% Epithelz.	pos. > 5% Epithelz.	
Gruppe	Tonsille Noxe	1	1	4	19	25
	Ca	10	5	3	16	34
Gesamt		11	6	7	35	59

**Chi-Quadrat-Tests**

	Wert	df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	9,273 <sup>a</sup>	3	,026
Kontinuitätskorrektur			
Likelihood-Quotient	10,481	3	,015
Zusammenhang linear-mit-linear	8,126	1	,004
Anzahl der gültigen Fälle	59		

a. 5 Zellen (62,5%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 2,54.

**Symmetrische Maße**

		Wert	Asymptotische r Standardfehler <sup>a</sup>	Näherung sweises T <sup>b</sup>	Näherungswei se Signifikanz
Nominal- bzgl. Nominalmaß	Kontingenzkoeffizient	,369			,026
Anzahl der gültigen Fälle		59			

a. Die Null-Hypothese wird nicht angenommen.

b. Unter Annahme der Null-Hypothese wird der asymptotische Standardfehler verwendet.

### 4 p-Wert-Adjustierung nach Holm

Vergleich	hBD-1		hBD-2		hBD-3	
	p-Wert	korr. P-Wert	p-Wert	korr. p-Wert	p-Wert	korr. p-Wert
nSH – nTS	0.406	0.406	0.028	0.084	0.038	0.0520
nTS – TS Nx	0.008	0.024	0.021	0.084	0.0001	0.0004
nTS – Ca	0.014	0.028	0.224	0.306	0.0001	0.0004
TS Nx – Ca	0.004	0.016	0.153	0.306	0.026	0.0520



## 8 Lebenslauf

Am 29.04. 1976 wurde ich als erstes von fünf Kindern meiner Eltern Dr. med. Hermann Hörting, Arzt, und Annie Theresa Hörting, geb. Kelleher, Englischdozentin, in München geboren. Von 1982-86 besuchte ich die Grundschule Neuwiesen und von 1986-96 das Albert-Einstein-Gymnasium in Ravensburg/Baden-Württemberg, an dem ich das Abitur ablegte. Nach dem Abitur leistete ich von 1996-97 meinen Zivildienst zur einen Hälfte im Körperbehindertenzentrum Oberschwaben in Weingarten und zur anderen Hälfte auf der anästhesiologischen Intensivstation im Krankenhaus St.Elisabeth in Ravensburg ab.

Ab dem Wintersemester 1997-98 nahm ich an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel das Studium der Humanmedizin auf. Nach meinem zweiten Staatsexamen 2003 verbrachte ich mein praktisches Jahr an den Kliniken des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel mit dem Wahlfach HNO an der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel. 2004 legte ich ebenfalls in Kiel das dritte Staatsexamen ab.

Vom 01.07. 2004 bis 28.02. 2005 arbeitete ich zunächst als Arzt im Praktikum und dann als Assistenzarzt an der Universitäts-Hals-Nasen-Ohren-Klinik in Regensburg, seit dem 01.03.2005 als Assistenzarzt in der Medizinischen Klinik II, Gastroenterologie und Hämatonkologie, am Klinikum Neumarkt/Oberpfalz.

Die Experimente für die vorliegende Arbeit wurden 2004-05 in Kiel durchgeführt.



## **9 Danksagung**

Ich danke Frau Prof. Dr. med. P. Ambrosch, Direktorin der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Frau Prof. Dr. med. B. Wollenberg, Direktorin der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck und Herrn Prof. Dr. med. G. Klöppel, Direktor des Institutes für Allgemeine Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel für die Überlassung des Arbeitsplatzes.

Zu danken habe ich vor allem Herrn PD Dr. med. J. E. Meyer, Oberarzt an der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holsteins, Campus Lübeck für die Überlassung des Themas, die Einführung in die Materie, die geduldige Betreuung, wertvolle Hilfestellung bei praktischen Fragen und die Durchsicht und Korrektur meiner Dissertation.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. med. D. Janssen, Assistenzarzt am Institut für Allgemeine Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel für die Hilfe bei der korrekten Auswertung der immunhistochemischen Präparate.

Herrn Dipl.-Informatiker J. Hedderich und Frau Dipl.-Mathematikerin U. Schulz vom Institut für Statistik und Medizinische Informatik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel gilt mein Dank für die statistische Beratung.