

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

**Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der
Technischen Universität München, Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. K.-D. Wolff)**

Immunhistologische Untersuchung von Host Defense Peptiden in Speicheldrüsentumoren und Kontrollen

Alexandra Kuppek

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Zahnheilkunde

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E.J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. Dr. M.R. Kesting
2. Univ.-Prof. Dr. H.A. Bier

Die Dissertation wurde am 01.12.2011 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin
am 23.05.2012 angenommen.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	9
1 Einleitung	10
1.1 Tumoren der Speicheldrüsen.....	10
1.2 Die Rolle der HDPs bei der Immunabwehr	12
1.3 Die Entdeckung der HDPs	13
1.4 Einteilung	13
1.4.1 Cathelicidin	13
1.4.2 Defensine.....	14
1.4.2.1 α -Defensine.....	15
1.4.2.2 β -Defensine.....	16
1.4.2.2.1 HBD-1	17
1.4.2.2.2 HBD-2	17
1.4.2.2.3 HBD-3	17
1.4.3 Psoriasin	18
1.5 Die Expression der HDPs in Speicheldrüsen	19
1.5.1 Die Expression von hBD-1, hBD-2 und hBD-3 in Speicheldrüsen	19
1.5.2 Die Expression von Psoriasin in Speicheldrüsen	20
1.6 Die Rolle der HDPs bei der Tumorentstehung.....	20
1.6.1 HBD-1	20
1.6.2 HBD-2	21
1.6.3 HBD-3	21
1.7 Die Rolle von Psoriasin bei der Tumorentstehung.....	22
1.8 Die Expression der HDPs in Speicheldrüsentumoren.....	23
1.8.1 HBD-1	23
1.8.2 HBD-2	23
1.8.3 HBD-3	24
1.8.4 Psoriasin	24
1.9 Die Wirksamkeit von HDPs gegen Tumorzellen.....	25
1.9.1 Mechanismus der HDPs bei der Zerstörung von Tumorzellen	26
1.9.2 Die Wirkung von Defensinen auf Tumorzellen	27
1.9.2.1 α -Defensine.....	27
1.9.2.2 β -Defensine.....	27
1.9.3 Die Wirkung von Psoriasin auf Tumorzellen.....	28
2 Problemstellung.....	29

3	Material und Methode	31
3.1	Patienten	31
3.2	Material	32
3.3	Immunhistochemische Färbungen.....	34
3.3.1	Die Vorbereitung der Gewebeproben für die Immunhistologie.....	34
3.3.2	Grundprinzip der immunhistochemischen Färbung nach der ABC-Methode	34
3.3.3	Immunhistochemische Gebrauchslösungen	35
3.3.3.1	PBS Puffer („PBS Grube“).....	35
3.3.3.2	Citratpuffer	36
3.3.3.3	3,3 Diaminobenzidin (DAB)	36
3.3.3.4	Chemikalien.....	37
3.3.4	Antikörper	38
3.3.5	Färbeprotokoll für hBD-1, hBD-2 und hBD-3	39
3.3.6	Färbeprotokoll für Psoriasin.....	40
4	Ergebnisse	42
4.1	Deskriptive Beurteilung der immunhistologischen Untersuchungen.....	42
4.1.1	Allgemeine Beschreibung der Ergebnisse.....	42
4.1.2	Immunhistochemischer Nachweis von hBD-1 in gesundem Speicheldrüsengewebe und Speicheldrüsentumoren	43
4.1.3	Immunhistochemischer Nachweis von hBD-2 in gesundem Speicheldrüsengewebe und in Speicheldrüsentumoren	46
4.1.4	Immunhistochemischer Nachweis von hBD-3 in gesundem Speicheldrüsengewebe und in Speicheldrüsentumoren	47
4.1.5	Immunhistochemischer Nachweis von Psoriasin in gesundem Speicheldrüsengewebe und in Speicheldrüsentumoren	49
4.2	Semiquantitative Auswertung	51
4.2.1	Auswertungssystem.....	51
4.2.2	Ergebnisse der semiquantitativen Auswertung	52
4.2.2.1	Ergebnisse für hBD-1	52
4.2.2.2	Ergebnisse für hBD-2	53
4.2.2.3	Ergebnisse für hBD-3	54
4.2.2.4	Ergebnisse für Psoriasin	54
4.2.2.5	Die Auswertung der malignen Speicheldrüsentumoren mit dem Punktesystem.....	55
5	Diskussion	56
5.1	Reduzierte Expression von hBD-1 in Speicheldrüsentumoren	56

5.2	Reduzierte Expression von hBD-2 in Speicheldrüsentumoren	57
5.3	Reduzierte hBD-3-Expression in Speicheldrüsentumoren.....	59
5.4	Konstitutive Expression von Psoriasin in gesundem Speicheldrüsengewebe und reduzierte Expression von Psoriasin in Speicheldrüsentumoren.....	61
5.5	Welche Bedeutung hat die reduzierte HDP-Expression bei der Entstehung von Speicheldrüsentumoren ?.....	63
5.6	HDPs als alternative Chemotherapeutika der Zukunft ?.....	65
6	Zusammenfassung.....	66
7	Literaturverzeichnis.....	68
8	Danksagung.....	82
9	Lebenslauf.....	83

Tabellenverzeichnis

Table	Seite
1.1 Histologische Einteilung der Speicheldrüsentumoren nach der gültigen WHO Klassifikation	11
1.2 Zusammenfassung einiger natürlich vorkommender, kationischer HDPs mit Wirksamkeit gegen maligne Zellen.....	25
3.1 Zusammensetzung der Patienten	31
3.2 Zusammensetzung der entnommenen Gewebeproben	32
3.3 Histologische Zusammensetzung der benignen Speicheldrüsentumoren	33
3.4 Histologische Kriterien der 5 malignen Tumoren	33
3.5 Chemikalien	37
3.6 Primärantikörper.....	38
3.7 Sekundärantikörper	38
4.1 Einteilung der Färbeintensität in Punktwerte	51
4.2 Auswertung für hBD-1 mit dem Punktesystem	53
4.3 Auswertung für hBD-2 mit dem Punktesystem	53
4.4 Auswertung für hBD-3 mit dem Punktesystem	54
4.5 Die Auswertung für Psoriasin mit dem Punktesystem	55
4.6 Auswertung der Färbeintensität der Karzinome mit dem Punktesystem	55

Abbildungsverzeichnis

Abbildungen	Seite
1.1 Organisation der Disulfidbrücken bei den Defensinen	15
1.2 Dreidimensionale Struktur eines α -Defensins und eines β -Defensins	16
4.1 Glandula submandibularis, immunhistochemischer Nachweis von hBD-1, Balken entspricht 100 μ m	44
4.2 Pleomorphes Adenom der Glandula submandibularis, immunhistochemischer Nachweis von hBD-1, Balken entspricht 100 μ m.....	44
4.3 Glandula submandibularis, Negativkontrolle, Balken entspricht 100 μ m	45
4.4 Glandula submandibularis, immunhistochemischer Nachweis von hBD-2, Balken entspricht 100 μ m	46
4.5 Plattenepithelkarzinom der Glandula parotis, immunhistochemischer Nachweis von hBD-2, Balken entspricht 100 μ m	47
4.6 Glandula submandibularis, immunhistochemischer Nachweis von hBD-3, Balken entspricht 100 μ m	48
4.7 Adenoidzystisches Karzinom der Glandulae palatinae, immunhistochemischer Nachweis von hBD-3, Balken entspricht 100 μ m.....	48
4.8 Glandula submandibularis, immunhistochemischer Nachweis von Psoriasin, Balken entspricht 100 μ m	49
4.9 Pleomorphes Adenom der Glandula parotis, immunhistochemischer Nachweis von Psoriasin, Balken entspricht 100 μ m.....	50

Abkürzungen

ABC-Methode	Avidin-Biotin-Komplex-Methode
AMP	antimikrobielles Peptid
Aqua dest	destilliertes Wasser
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
c-erbB2	<i>cellular avian erythroblastosis homologue B2</i>
CMV	Cytomegalievirus
Cys	Cystein
DAB	3,3-Diaminobenzidin
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
g	Gramm
hBD-1	humanes-beta-Defensin-1
hBD-2	humanes-beta-Defensin-2
hBD-3	humanes-beta-Defensin-3
hCAP18	<i>human cationic antimicrobial protein 18</i>
HD	Humanes Defensin
HDP	<i>host defense peptid</i>
HER-2	<i>human epidermal growth factor receptor-2</i>
HNP	Humanes neutrophiles Peptid
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HSV	Herpes simplex Virus
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
jab1	<i>c-jun activation domain binding protein-1</i>
kDa	Kilodalton

mg	Milligramm
ml	Milliliter
MMP	Metalloproteinase
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
OSCC	<i>oral squamous cell carcinoma</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TNM	<i>tumor node metastasis</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
RT-PCR	<i>reverse transcription-polymerase chain reaction</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
W	Watt
WHO	<i>World Health Organisation</i>
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

1 Einleitung

1.1 Tumoren der Speicheldrüsen

Die Tumoren der Speicheldrüsen repräsentieren zwischen 2% und 3% aller Neoplasien im Kopf- und Halsbereich und treten überwiegend in den großen Speicheldrüsen auf (Weber et al., 2002, S. 428). In der Mehrzahl sind diese Tumoren gutartig und entstehen in der Glandula parotis (Madani und Beale, 2006, S. 452). Maligne Tumoren der Speicheldrüsen haben nur eine geringe Inzidenz von $< 1:100000$ (Schoenfeld et al., 2010, S. 1). Jedoch sind Neoplasien der Glandula submandibularis zu einem Anteil von beinahe 50% bösartig und bei Neubildungen der Glandulae palatinae trifft dies sogar auf 80% zu (Madani und Beale, 2006, S. 425).

Die Therapie der Wahl für benigne und maligne Neoplasien der Speicheldrüsen besteht in den meisten Fällen ausschließlich in der vollständigen Resektion des Tumors (Gehrking et al., 2007, S. 195, Lang et al., 2005, S. 907). Metastasierende Karzinome in fortgeschrittenen Stadien stellen sehr häufig eine Indikation für eine Neck-Dissection und gegebenenfalls für eine postoperative Radiatio dar (Lang et al., 2005, S. 910). Für prognostisch sehr ungünstige oder inoperable Tumoren kommen teilweise auch Chemotherapeutika, wie beispielweise Cisplatin, 5-Fluorouracil und Adriamycin zum Einsatz, die bereits Wirksamkeit gegen Malignome der Speicheldrüsen gezeigt haben (Schoenfeld et al., 2010, S. 2).

Die 5 und 10 Jahresüberlebensrate für Patienten mit Karzinomen der Speicheldrüsen beträgt 92% und 90%, wobei die Prognose für fortgeschrittene Stadien häufig nicht so günstig ist (Liu et al., 2010, S. 1). Wichtige Prognoseparameter sind hier auch die histologische Klassifikation des Tumors sowie der häufig daraus ableitbare Malignitätsgrad (Lang et al., 2005, S. 822). Als „*high-grade*“ maligne sind das hochgradig maligne Mukoepidermoidkarzinom, das Speichelgangskarzinom und das Karzinom ex pleomorphes Adenom einzustufen, während das niedrigmaligne Mukoepidermoidkarzinom, das Azinuszellkarzinom und das polymorphe niedrigmaligne Adenokarzinom als „*low grade*“ Tumoren angesehen werden können (Leivo, 2006, S. 662). Die häufigsten benignen Neoplasien der Speicheldrüsen sind das pleomorphe Adenom der Glandula parotis, gefolgt von den Zystadenolymphomen und anderen, nicht pleomorphen Tumortypen (Gehrking et al., 2007, S. 195).

Tabelle 1.1 zeigt die gültige WHO (*World Health Organisation*) Klassifikation von 2005 für die histologische Einteilung von Tumoren der Speicheldrüsen und verdeutlicht den enormen Variantenreichtum in dieser Tumorgruppe.

Tabelle 1.1: Histologische Einteilung der Speicheldrüsentumoren nach der gültigen WHO Klassifikation

Maligne epitheliale Tumoren	Benigne epitheliale Tumoren
Azinuszellkarzinom	Pleomorphes Adenom
Mukoepidermoidkarzinom	Myoepitheliom
Adenoidzystisches Karzinom	Basalzelladenom
Niedrigmalignes polymorphes Adenokarzinom	Warthin Tumor
Epithelial-myoepitheliales Karzinom	Onkozytom
Klarzelliges Karzinom („ <i>not otherwise specified</i> “)	Kanalikuläres Adenom
Basalzellkarzinom	Talgdrüsenadenom
Talgdrüsenkarzinom	Talgdrüsen-Lymphadenom
Talgdrüsen-Lymphadenokarzinom	
Zystadenokarzinom	
Niedrigmalignes kribiformes Zystadenokarzinom	Speichelgangsadenome
Muzinöses Adenokarzinom	Invertiertes duktales Adenom
Onkozytäres Karzinom	Intraduktales Papillom
Speichelgangskarzinom	Sialadenoma papilliferum
Adenokarzinom („ <i>not otherwise specified</i> “)	Zystadenoma
Myoepitheliales Karzinom	
Karzinom ex pleomorphes Adenom	<u>Weichgewebstumoren</u>
Karzinosarkom	Hämangiom
Metastasierendes pleomorphes Adenom	
Plattenepithelkarzinom	<u>Hämatolymphoide Tumoren</u>
Kleinzelliges Karzinom	Hodgkin Lymphom
Großzelliges Karzinom	Diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom
Lymphoepitheliales Karzinom	Extranodales Marginalzonen B-Zell-Lymphom
Sialoblastom	

(modifiziert nach Leivo, 2006, Tabelle 1)

Als eindeutig gesicherter Risikofaktor für die Entwicklung eines Speicheldrüsenkarzinoms gilt eine lange zurückliegende Strahlenexposition. Es gibt jedoch auch Hinweise auf weitere potentiell belastende Faktoren, wie Alkohol- und Nikotinabusus, genetische Veranlagung oder Umweltbelastungen (Lang et al., 2005, S. 818).

Die molekularbiologischen und immunologischen Mechanismen bei der Ätiologie der gut- und bösartigen Speicheldrüsentumoren sind bisher ebenfalls nur teilweise erforscht (Pantelis et al., 2009, S. 526). Neuere Erkenntnisse haben gezeigt, dass bei pleomorphen Adenomen und Mukoepidermoidkarzinomen eine Veränderung auf chromosomaler Ebene stattfindet (Cheuk und Chan, 2007, S. 3). Eine Überexpression der Proteine p63 und p73 ist bereits bekannt (Weber et al., 2002, S. 435). Außerdem tragen Mutationen von Onkogenen, das die Proliferation anregende Antigen Ki-67 und die Überexpression des Rezeptors HER-2/neu (*human epidermal growth factor receptor 2*) zur Entstehung der Neoplasien in Speicheldrüsen bei (Jaehne et al., 2005, S. 2530). Als Faktoren, die die Entdifferenzierung von schon bestehenden Speicheldrüsenkarzinomen verstärken können, werden genetische Veränderungen wie p53 Mutationen, verstärkte Expression von Cyclin D1 und eine Überproduktion des Proteins c-erbB2 (*cellular avian erythroblastosis homologue B2*) diskutiert (Cheuk und Chan, 2007, S. 16).

Seit einiger Zeit gibt es auch vermehrt Hinweise darauf, dass sogenannte *host defense peptides* (HDPs), auch antimikrobielle Peptide (AMPs) genannt, eine wichtige Bedeutung bei der Kanzerogenese und der körpereigenen Tumorabwehr besitzen (Meyer und Harder, 2007, S. 3125).

1.2 Die Rolle der HDPs bei der Immunabwehr

Die Immunabwehr der Säugetiere setzt sich aus der angeborenen und der adaptiven (angepassten) Immunabwehr zusammen (Steinstraesser et al., 2008, S. 528). Die angeborene Immunabwehr kann neben der Aktivierung von Leukozyten auch eine Reihe von humoralen Mediatoren in Gang setzen (Meyer und Harder, 2007, S. 3119). Ein wichtiger Teil dieser Primärabwehr des körpereigenen Immunsystems ist die Gruppe der antimikrobiellen Peptide (Boman, 2003, S. 198). Diese HDPs haben teilweise nicht nur die Funktion endogener Antibiotika, sondern sorgen auch durch Chemotaxis für eine effektive Zusammenarbeit mit der adaptiven Immunabwehr (Wehkamp et al., 2007, S. 258). Einige HDPs besitzen auch antivirales Potential oder sogar die Fähigkeit Tumorzellen zu bekämpfen (De Smet und Contreras, 2005, S. 1338).

1.3 Die Entdeckung der HDPs

Bereits in den 50er Jahren bemerkte man eine gegen Bakterien effektive Substanz in Leukozyten (Meyer und Harder, 2007, S. 3119). Die ersten antimikrobiellen Peptide wurden ca. ein Jahrzehnt später in Granulozyten von Hasen und Meerschweinchen nachgewiesen (Zeya und Spitznagel, 1966, S. 752). In den frühen 70ern konnten Peptide aus Pflanzen isoliert werden, die ebenfalls antibakterielle Fähigkeiten aufwiesen (Fernandez de Caley et al., 1972, S. 999). Die ersten humanen HDPs wurden 1985 aus menschlichen Granulozyten separiert (Ganz et al., 1985, S. 1431).

1.4 Einteilung

Die HDPs sind kleine Peptidmoleküle, die aus weniger als 100 Aminosäuren zusammengesetzt sind (Bals, 2000, S. 496). Sie sind positiv geladen und nahezu ubiquitär in allen Lebewesen existent (Hancock und Scott, 2000, S. 8856). Es ist bereits gelungen, über 900 verschiedene antimikrobielle Peptide zu identifizieren, die in eukaryonten Organismen vorkommen (Brahmachary et al., 2004, S. D588). Beim Menschen bestehen im Wesentlichen 2 wichtige Gruppen der HDPs: Die Cathelicidine und die Defensine (Steinstraesser et al., 2008, S. 528).

1.4.1 Cathelicidin

Das bis jetzt einzige humane Cathelicidin, LL-37 und sein Vorprotein hCAP18 (*human cationic antimicrobial protein 18*), wurden 1995 aus Knochenmark isoliert (Larrick et al., 1995, S. 1292). In der sehr vielfältigen Gruppe der Cathelicidine der Säugetiere haben jedoch alle das stabile N-terminale Cathelin und den antimikrobiellen C-terminalen

Bereich gemeinsam (Zanetti et al., 1995, S. 2). Cathelicidine sind kationisch und besitzen die Struktur einer α -Helix (Hirsch et al., 2008, S. 239). Das LL-37 wird vor allem in neutrophilen Granulozyten, Keratinozyten, Epithelien des Gastrointestinal-, Respirations- und Urogenitaltraktes sowie in Mastzellen, Monozyten und T-Zellen gebildet und zeichnet sich durch immunmodulierende Fähigkeiten, ein breites antimikrobielles Spektrum sowie antivirales und antimykotisches Potential aus (Steinstraesser et al., 2008, S. 529).

1.4.2 Defensine

Die in einer beta-Faltblattstruktur angeordneten, amphipathischen, kationischen Defensine sind in Pflanzen, Insekten sowie Wirbeltieren vorhanden und spielen auch beim Menschen eine wichtige Rolle (Pazgier et al., 2006, S. 1294). Die Defensine der Säugetiere bekämpfen Bakterien und Viren, werden in Leukozyten und Epithelien gebildet und haben Bedeutung bei der Koordination der körpereigenen Abwehr (Droin et al., 2009, S. 918). Beim Menschen gibt es jeweils die Gruppe der α - und der β -Defensine, die beide ein Molekulargewicht zwischen 3,6 und 6 kDa, sowie 6 Cysteinreste aufweisen, die durch 3 intramolekulare Disulfidbrücken verbunden sind (De Smet und Contre-ras, 2005, S. 1338). Die jeweils unterschiedliche Anordnung der Disulfidbrücken entscheidet über die verschiedenartige dreidimensionale Struktur der Defensine (Pazgier et al., 2006, S. 1297). Die Gene der α - und β -Defensine befinden sich in einem Cluster des Chromosoms 8p23 (Beisswenger und Bals, 2005, S. 256). Einige Defensine wurden ausschließlich in Insekten und Pflanzen gefunden (Lehrer und Ganz, 2002, S. 96). Eine weitere Gruppe, die sogenannten θ -Defensine (cyclische Defensine) wurden bis jetzt nur aus den Leukozyten von Rhesusaffen isoliert (Pazgier et al., 2006, S. 1297). Abbildung 1.1 verdeutlicht, wie unterschiedlich die Cysteine der 4 Defensingruppen jeweils über die Disulfidbrücken verbunden sind.

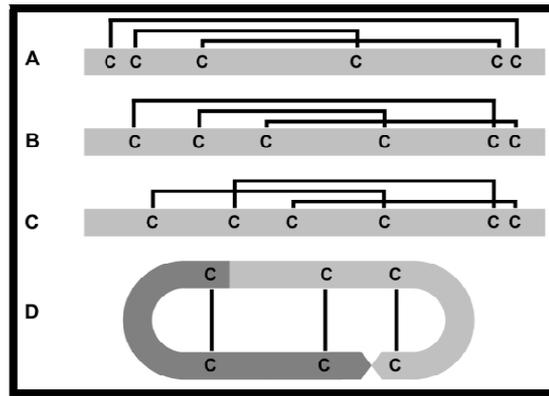


Abbildung 1.1: **Organisation der Disulfidbrücken bei den Defensinen:** A Disulfidbrücken bei α -Defensinen (1-6, 2-4, 3-5), (B) Disulfidbrücken bei β -Defensinen (1-5, 2-5, 3-6), (C) Disulfidbrücken bei den Defensinen von Insekten (1-4, 2-5, 3-6), (D) Disulfidbrücken und Struktur bei den θ -Defensinen (modifiziert nach Palfy et al., 2009, Abbildung 1)

1.4.2.1 α -Defensine

Beim Menschen gibt es 6 α -Defensine, die eine Länge von 29 bis 35 Aminosäuren haben und deren 6 Cysteine jeweils an den Positionen 1-6, 2-4 und 3-5 durch Disulfidbrücken verbunden sind (Beisswenger und Bals, 2005, S. 256). Abbildung 1.1 zeigt die Anordnung der Disulfidbrücken, während Abbildung 1.2 den dreidimensionalen Aufbau von α -Defensinen verdeutlicht.

Die ersten α -Defensine, die entdeckt wurden, waren gleichzeitig die ersten erforschten humanen antimikrobiellen Peptide (Ganz et al., 1985, S. 1431). Die 4 Humanen Neutrophilen Peptide (HNP-1 – HNP-4) werden in neutrophilen Granulozyten, B-Zellen, natürlichen Killerzellen und T-Zellen produziert. Diese HDPs besitzen umfangreiche antimikrobielle Aktivität, wirken effektiv gegen *Candida albicans*, den Herpes simplex Virus (HSV) und den Cytomegalievirus (CMV), können Exotoxin inaktivieren und die Immunabwehr ankurbeln (Hirsch et al., 2008, S. 239). Die beiden Humanen Defensine HD-5 und HD-6 entstammen den Paneth'schen Körnerzellen (De Smet und Contreras, 2005, S. 1339). Immunhistologische Tests konnten diese α -Defensine in den Sekretionsgranula der Epithelien der Lieberkühnschen Krypten lokalisieren (Bevins et al., 1999, S. 912). Außerdem werden sie in neutrophilen Granulozyten und natürlichen Killerzellen gebildet, sind gegen zahlreiche Bakterien und *Candida albicans* wirksam und können die Bildung von Interleukin-8 induzieren (Hirsch et al., 2008, S. 239).

1.4.2.2 β -Defensine

Die β -Defensine bestehen aus 36 bis 42 Aminosäuren, weisen die typischen beta-Faltblattstruktur auf und die Cysteinreste sind jeweils an den Positionen 1-5, 2-4 und 3-6 über Disulfidbrücken verbunden (Beisswenger und Bals, 2005, S. 257). Abbildung 1.1 zeigt die Anordnung der Disulfidbrücken der β -Defensine. In Abbildung 1.2 ist die dreidimensionale Struktur des Peptids dargestellt.

Das erste β -Defensin wurde Anfang der 90er Jahre aus der trachealen Schleimhaut von Kühen isoliert (Selsted und Ouellette, 2005, S. 552). Bis heute hat man im menschlichen Genom ungefähr 40 für β -Defensine codierende Regionen, sogenannte DEFBs entdeckt (Pazgier et al., 2006, S. 1297). Die β -Defensine stellen eine Art Erstbarriere gegen Bakterien und Viren dar, da sie in den Epithelien der Haut und Schleimhäute gebildet werden (Ouhara et al., 2005, S. 888). Diese Peptide haben direkte antimikrobielle Aktivität, indem sie mit den Membranen der Mikroorganismen reagieren und sind dabei gleichzeitig Effektormoleküle des angeborenen Immunsystems, die die Histaminfreisetzung in Mastzellen anregen und Chemoattraktion auf unreife dendritische Zellen sowie T-Zellen ausüben (Beisswenger und Bals, 2005, S. 260).

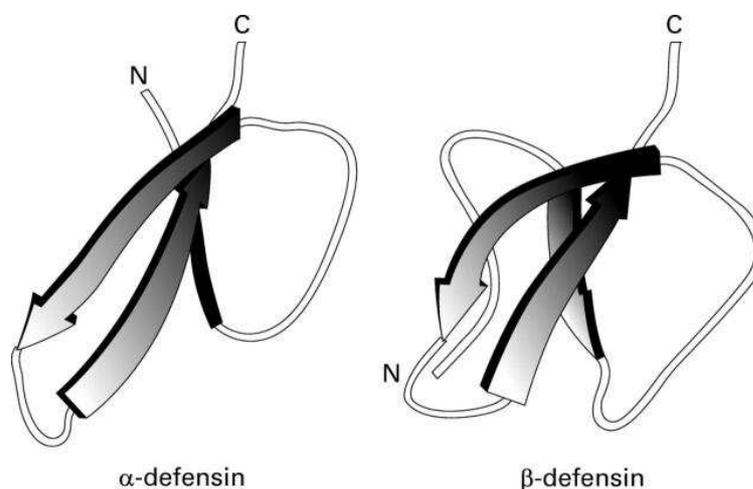


Abbildung 1.2: Links: dreidimensionale Struktur eines α -Defensins, rechts: dreidimensionale Struktur eines β -Defensins (modifiziert nach Bevins et al., 1999, Abbildung 1)

1.4.2.2.1 HBD-1

HBD-1, das zuerst entdeckte menschliche β -Defensin konnte 1995 aus dem Plasma nierenkranker Patienten isoliert werden (Bensch et al., 1995, S. 332). Es wird konstitutiv vor allem in T-Zellen, dendritischen Zellen, Epithelien der Haut, des Respirations-, Gastrointestinal- und Urogenitaltraktes gebildet (Prado-Montes de Oca, 2010, S. 801). HBD-1 ist wirksam gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien, Viren und Pilze und hat immunmodulierende Eigenschaften wie die Induktion von Interleukinen, die Degranulation von Mastzellen und die Unterstützung der Phagozytose (Steinstraesser et al., 2008, S. 529). HBD-1 wird zum Beispiel auch in den Moll-Drüsen des Lidrandes exprimiert und schützt vermutlich in Zusammenarbeit mit anderen antimikrobiellen Peptiden die Augenoberfläche vor Infektionen (Stoeckelhuber et al., 2008, S. 235).

1.4.2.2.2 HBD-2

HBD-2 wurde erstmals 1997 in psoriatischen Hautläsionen entdeckt (Harder et al., 1997, S. 861). Dieses antimikrobielle Peptid ist zum Beispiel in der Gingiva sowie gingivalen Keratinozyten nachweisbar und wird in entzündeten Regionen verstärkt gebildet (Mathews et al., 1999, S. 2743). Es zeigt ein ähnliches Wirkspektrum wie hBD-1, wird jedoch in nicht ganz so zahlreichen Körperregionen konstitutiv exprimiert (Steinstraesser et al., 2008, S. 239). Allerdings kann die Produktion von hBD-2 durch Bakterien (Liu et al., 2002, S. 277) oder Entzündungszellen (Selsted und Ouellette, 2005, S. 553) gesteigert werden. Dies trifft auch besonders auf die Interleukine IL-1 β , IL-6, IL-8 und den Tumornekrosefaktor TNF- α zu (Pantelis et al., 2009, S. 526).

1.4.2.2.3 HBD-3

Das Peptid hBD-3 wurde 2001 fast gleichzeitig von 2 Forschungsgruppen entdeckt (Garcia et al., 2001, S. 259, Harder et al., 2001, S. 5709). Dunsche et al. konnten mRNA (*messenger* Ribonukleinsäure) von hBD-3 überwiegend in der Zunge, der Gingiva und

der Wangen- und Lippen Schleimhaut feststellen (Dunsche et al., 2002, S. 123). HBD-3 hat ebenfalls antibakterielle, antivirale sowie antimykotische Fähigkeiten und wird primär in Monozyten, T-Zellen, Epithelien des Gastrointestinal- und Urogenitaltraktes sowie der Haut und Schleimhäute exprimiert (Steinstraesser et al., 2008, S. 529). Die Bildung von hBD-3 kann durch IFN- μ (Interferon- γ) angekurbelt werden und wirkt chemotaktisch auf Monozyten (Garcia et al., 2001, S. 263).

1.4.3 Psoriasin

Psoriasin war 1991 als ein neues Calcium-bindendes S100-Protein in den Läsionen psoriatischer Haut entdeckt worden (Madsen et al., 1991, S. 707). Dieses HDP mit dem Molekulargewicht von 11,4 kDa, ist ein Mitglied der S100 Genfamilie und liegt auf dem S100 Gencluster auf Chromosom 1q21, weshalb es auch als S100A7 bezeichnet wird (Watson et al., 1998, S. 567). Alle S100 Proteine besitzen 4 α -Helices und 2 Calcium-Bindungsstellen des EF-Hand-Typs (Eckert et al., 2004, S. 25). Psoriasin wird vor allem in psoriatischen Keratinozyten exprimiert (Enerback et al., 2002, S. 43). S100 Proteine haben eine Reihe von Funktionen, wie Zellzyklusprogression und intrazelluläre Calcium-Signalübermittlung und sie besitzen eine chemotaktische Wirkung auf Leukozyten (Eckert et al., 2004, S. 30). Psoriasin ist wirksam gegen Gram-positive sowie Gram-negative Bakterien und kann die Haut vor Infektionen mit *Escherichia coli* schützen (Glaser et al., 2005, S. 60). Außerdem ist die Expression von Psoriasin bei der Wundheilung, einigen entzündlichen oder hyperproliferativen Hauterkrankungen sowie bei der atopischen Dermatitis und bei Mykosen erhöht (Zhou et al., 2008, S. 1).

1.5 Die Expression der HDPs in Speicheldrüsen

Die Speicheldrüsen exprimieren das *host defense peptid* Cathelicidin (LL37) (Woo et al., 2003, S. 3). Auch im Speichel ist dieses Peptid enthalten (Murakami et al., 2002, S. 848). Die Glandula parotis und die Glandula submandibularis bilden in den Zellen der Ausführungsgänge außerdem das antimikrobielle Peptid Histatin, das im Speichel vermutlich Wirksamkeit gegen *Candida albicans* besitzt (Meyer und Harder, 2007, S. 3119). Die α -Defensine HNP-1, HNP-2 und HNP-3 sind im Speichel sowie in den kleinen Speicheldrüsen und der Glandula submandibularis nachweisbar (Tao et al., 2005, S. 3885). Zusätzlich sind im Speichel einige weitere antimikrobielle Bestandteile enthalten, die die Mundschleimhaut vor Infektionen schützen, wie Lysozyme, Lactoferrin und Agglutinin (Dale und Fredericks, 2005, S. 123).

1.5.1 Die Expression von hBD-1, hBD-2 und hBD-3 in Speicheldrüsen

In der Glandula parotis, der Glandula submandibularis und den kleinen Speicheldrüsen wurde mRNA des antimikrobiellen Peptids hBD-1 gefunden (Bonass et al., 1999, S. 372). Sahasrabudhe et al. entdeckten das Peptid hBD-1 durch immunhistologische Untersuchungen in den Ausführungsgängen der kleinen Speicheldrüsen sowie mit Hilfe der Western Blotting Methode im Speichel und vermuteten eine Bedeutung von hBD-1 bei der lokalen Immunabwehr (Sahasrabudhe et al., 2000, S. 1673). Bonass et al. konnten 1999 teilweise hBD-2 mRNA in einigen Proben der Glandula submandibularis und der kleinen Speicheldrüsen nachweisen (Bonass et al., 1999, S. 372). Mathews et al. stellten durch Western Blotting Analyse das Peptid hBD-2 im Speichel fest (Mathews et al., 1999, S. 2743). In der Glandula submandibularis und in den kleinen Speicheldrüsen konnte man außerdem mRNA von hBD-3 nachweisen (Dunsche et al., 2002, S. 123). Pantelis et al. entdeckten später auch in der Glandula parotis hBD-3 mRNA (Pantelis et al., 2009, S. 528). Zusätzliche immunhistologische Untersuchungen gaben Aufschluss über die genaue Lokalisation von hBD-1, hBD-2 und hBD-3 in der Glandula parotis und der Glandula submandibularis. Dabei stellte sich heraus, dass hauptsächlich die Ausführungsgänge und die azinären Endstücke der Drüsen Expression zeigten (Pantelis et al., 2009, S. 528).

1.5.2 Die Expression von Psoriasin in Speicheldrüsen

Über die Expression des antimikrobiellen Peptids Psoriasin in Speicheldrüsen sind noch keine Studien veröffentlicht worden.

In der Zunge und im Speichel konnte Psoriasin jedoch bereits nachgewiesen werden und hat dort vermutlich Bedeutung für die orale Immunabwehr (Meyer und Harder, 2007, S. 3120).

1.6 Die Rolle der HDPs bei der Tumorentstehung

Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass die HDPs in malignen Tumoren anders reguliert werden als in gesundem Gewebe (Meyer und Harder, 2007, S. 3122).

Das humane α -Defensin-1 (HNP-1) konnte im Speichel von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen nachgewiesen werden (Abiko et al., 2003, S. 248). Auch in der Glandula submandibularis von Patienten mit oralen Plattenepithelkarzinomen wurde das Peptid HNP-1 gefunden (Mizukawa et al., 2001, S. 2171). In Tumorzellen scheinen α -Defensine häufig vermehrte Expression aufzuweisen (Droin et al., 2009, S. 922). Einige β -Defensine zeigen dagegen eher Eigenschaften von Tumorsuppressorgenen (Abiko und Saitoh, 2007, S. 182).

1.6.1 HBD-1

Es spricht vieles dafür, dass DEFB1, das Gen für hBD-1, ein Tumorsuppressorgen ist (Prado-Montes de Oca, 2010, S. 803). Dies scheint zum Beispiel bei einigen malignen urologischen Tumoren Bedeutung zu haben, da als Ursache für deren fehlende hBD-1

Expression Mutationen des Promoterpunktes vermutet werden (Sun et al., 2006, S. 8548). In einer Studie zeigte sich bei mehr als 80% der Prostatatumoren und bei 90% der Nierenkarzinome keine oder stark abgeschwächte Nachweisbarkeit von hBD-1 (Donald et al., 2003, S. 503). In Zellkulturen von Prostatakarzinomen bewirkte die Induktion einer hBD-1 Expression einen durch Caspase programmierten Zelltod der Tumorzellen (Bullard et al., 2008, S. 845). Außerdem zeigte sich, dass dieser Effekt besonders deutlich bei Zellen eines Prostatakarzinoms im Spätstadium auftrat (Bullard et al., 2008, S. 847). In Plattenepithelkarzinomen wurde nur geringe Expression von hBD-1 gefunden, was ebenfalls auf eine Rolle dieses antimikrobiellen Peptids als Tumorsuppressor hindeutet (Wenghoefer et al., 2008, S. 662).

1.6.2 HBD-2

Sawaki et al. entdeckten durch HPLC (*high performance liquid chromatography*) in Gewebeproben von oralen Plattenepithelkarzinomen höhere Konzentrationen von hBD-2 als im Kontrollgewebe (Sawaki et al., 2002, S. 2104). Wenghoefer et al. berichteten hingegen, dass die Genexpression von hBD-2 mRNA in oralen Plattenepithelkarzinomen (OSCCs) geringer als in den Gesundproben war (Wenghoefer et al., 2008, S. 662). In Basalzellkarzinomen zeigte sich die Expression von hBD-2 mRNA im Vergleich mit gesundem Kontrollgewebe jedoch erhöht (Gambichler et al., 2006, S. 3). In immunhistologischen Untersuchungen mit Gewebeproben von malignen Lungentumoren konnte aber wiederum eine Korrelation zwischen niedriger hBD-2 Expression und geringem Differenzierungsgrad festgestellt werden (Shestakova et al., 2010, S. 276).

1.6.3 HBD-3

Kesting et al. berichteten über eine signifikant höhere Expression von hBD-3 mRNA in oralen Plattenepithelkarzinomen als in gesunder Mundschleimhaut, die sich zusätzlich umso ausgeprägter darstellte, je besser der Tumor differenziert war (Kesting et al., 2009, S.578). Wenghoefer et al. stellten in 5 untersuchten Plattenepithelkarzinomen im

Vergleich mit gesundem Gewebe auch eine zumindest leicht verstärkte Genexpression von hBD-3 fest (Wenghoefer et al., 2008, S. 662). In Zellen von Basalzellkarzinomen war die Konzentration an hBD-3 mRNA ebenfalls geringgradig höher als im gesunden Referenzgewebe (Gambichler et al., 2006, S. 4).

1.7 Die Rolle von Psoriasin bei der Tumorentstehung

Es gibt einige Hinweise darauf, dass Psoriasin eine Rolle bei der Kanzerogenese spielt (Banerjee et al., 2005, S. 873). Psoriasin wird in Plattenepithelkarzinomen der Blase (Celis et al., 1996, S. 2108), und in invasiven Tumoren der Brust gebildet (Al-Haddad et al., 1999, S. 2061). Außerdem scheint bei Karzinomen der Brustdrüse ein Zusammenhang zwischen ungünstiger Prognose und Psoriasinexpression zu bestehen (Krop et al., 2005, S. 11332). In präkanzerösen Hautläsionen, in Plattenepithelkarzinomen und Basalzellkarzinomen wurde eine im Vergleich mit Gesundkontrollen signifikant vermehrte Bildung von Psoriasin mRNA gemessen (Moubayed et al., 2007, S. 256). Kesting et al. berichteten über eine signifikant erhöhte Expression von Psoriasin mRNA in oralen Plattenepithelkarzinomen im Vergleich mit normaler Mundschleimhaut (Kesting et al., 2009, S. 734). Banerjee et al. stellten außerdem auf immunhistologischer Ebene in prä-maligner und maligner Mundschleimhaut eine stärkere Psoriasinexpression fest als in gesundem Kontrollgewebe (Banerjee et al., 2005, S.872).

1.8 Die Expression der HDPs in Speicheldrüsentumoren

In Mukoepidermoidkarzinomen von Speicheldrüsen konnte in den Zellen der Ausführungsgänge und in den neutrophilen Granulozyten eine positive immunhistologische Färbung für die α -Defensine HNP-1, HNP-2 und HNP-3 festgestellt werden (Mizukawa et al., 2001, S. 2171).

1.8.1 HBD-1

Pantelis et al. fanden in pleomorphen Adenomen eine signifikant niedrigere Expression von hBD-1 mRNA als in gesundem Referenzgewebe, was sich in der Tendenz auch in den Ergebnissen der immunhistologischen Untersuchungen widerspiegelte (Pantelis et al., 2009, S. 528). Wenghoefer et al. untersuchten 7 benigne und 7 maligne Speicheldrüsentumoren und entdeckten, dass hBD-1 in den Karzinomen und teilweise auch in einigen pleomorphen Adenomen in den Zellkernen akkumulierte. Die Autoren vermuteten daher eine Promotorderegulation als begünstigenden Faktor für die festgestellte verminderte Proteinexpression von hBD-1 (Wenghoefer et al., 2008, S. 3).

1.8.2 HBD-2

In den keratinisierten Regionen eines pleomorphen Adenoms konnte bereits im Jahr 2003 hBD-2 nachgewiesen werden (Abiko et al., 2003, S. 249). In Gewebeschnitten von 10 Mukoepidermoidkarzinomen wurde vor allem in den epidermoiden und intermedialen Tumorzellen hBD-2 immunhistochemisch nachgewiesen (Mizukawa et al., 2001, S. 2171). Wenghoefer et al. fanden hBD-2 in den Zellen der Ausführungsgänge, sowohl der benignen als auch der malignen Tumoren (Wenghoefer et al., 2008, S. 4).

In der Studie von Pantelis et al., in der die relative Genexpression durch RT-PCR (*reverse transcription –polymerase chain reaktion*) gemessen wurde, zeigte sich die Expression von hBD-2 mRNA in pleomorphen Adenomen im Vergleich zu gesunden Speicheldrüsen vermindert (Pantelis et al., 2009, S. 528).

1.8.3 HBD-3

Wenghoefer et al. berichteten über eine überwiegende Expression des Peptids hBD-3 im Zytoplasma der Zellen der Ausführungsgänge, was sowohl auf die gut- als auch auf die bösartigen Speicheldrüsentumoren zutraf (Wenghoefer et al., 2008, S. 4). Pantelis et al. fanden auf hBD-3 mRNA-Ebene keinen deutlichen Unterschied zwischen der Expression von hBD-3 in pleomorphen Adenomen und in gesunden Speicheldrüsen. Immunhistologisch zeigte sich hBD-3 allerdings teilweise in einigen pleomorphen Adenomen auch in den Zellkern verschoben (Pantelis et al., 2009, S. 528).

1.8.4 Psoriasin

Über die Expression von Psoriasin in Speicheldrüsentumoren wurde noch keine Studie veröffentlicht.

1.9 Die Wirksamkeit von HDPs gegen Tumorzellen

Es hat sich herausgestellt, dass einige antimikrobiellen Peptide auch antitumorale Fähigkeiten besitzen (Mader und Hoskin, 2006, S. 934). Da die wachsende Resistenz der Krebszellen gegen Chemotherapeutika ein Problem darstellt, könnten einige der natürlich vorkommenden antimikrobiellen Peptide, aber auch teil- und vollsynthetische Varianten neue Behandlungsmöglichkeiten aufzeigen (Hoskin und Ramamoorthy, 2008, S. 358). Tabelle 1.2 zeigt einige natürliche, beim Menschen oder bei Tieren vorkommende HDPs, die in der Lage sind, maligne Tumorzellen direkt oder indirekt zu bekämpfen.

Tabelle 1.2: Zusammenfassung einiger natürlich vorkommender, kationischer HDPs mit Wirksamkeit gegen maligne Zellen

Peptid	Ursprung	Klassifizierung	Wirksamkeit gegen Krebszellen
BMAP-28	Bos taurus (Hausrind)	α -Helix	membranolytisch
HNP-1 (β -Defensin)	Homo sapiens	β -Faltblattstruktur	membranolytisch antiangiogenetisch?
Lactoferricin B	Bos taurus (Hausrind)	β -Faltblattstruktur	membranolytisch induziert Apoptose
LL-37 (Cathelicidin)	Homo sapiens	α -Helix	membranolytisch
Magainin 2	Xenopus laevis (Krallenfrosch)	α -Helix	membranolytisch induziert Apoptose?
Melittin	Apis mellifera (Honigbiene)	α -Helix	membranolytisch
Tachyplesin 1	Tachypleus tridentatus (Pfeilschwanzkrebs)	β -Faltblattstruktur	aktiviert Komplement antiangiogenetisch? induziert die Differenzierung von Krebszellen

(modifiziert nach Hoskin und Ramamoorthy, 2008, Tabelle 1)

Für eine klinische Anwendung sind HDPs nötig, die keine oder nur sehr geringe Toxizität gegen Zellen von Säugetieren haben, aber dennoch das Potential besitzen, maligne Zellen zu zerstören (Hoskin und Ramamoorthy, 2008, S. 370). Das aus Bienen gewonnene Melittin und das humane LL-37 sind jedoch sowohl für transformierte als auch für

gesunde Zellen toxisch (Schweizer, 2009, S. 191). Es stellt sich zunächst die Frage, wie die entsprechenden HDPs die malignen Zellen von den gesunden unterscheiden (Papo und Shai, 2005, S. 785). Die Membranen von Tumorzellen haben unter anderem einen höheren Gehalt an Phosphatidylserin, was zu einer stärkeren Anfälligkeit für die Permeabilisierung durch HDPs führen kann (Palffy et al., 2009, S. 55). Die Krebszellen haben zudem eine höhere Anzahl von Mikrovilli, wodurch vermutlich mehr antimikrobielle Peptide andocken können (Hoskin und Ramamoorthy, 2008, S. 361).

1.9.1 Mechanismus der HDPs bei der Zerstörung von Tumorzellen

Grundsätzlich gibt es 3 verschiedene Möglichkeiten, die den Tod einer Krebszelle bewirken können: Die Permeabilisierung der Zellmembran, die Zerstörung der mitochondrialen Membran und weitere, membranunabhängige Wirkmechanismen (Papo und Shai, 2005, S. 785). Bei dem antimikrobiellen Peptid Magainin konnte man erstmals einen antitumoralen Effekt feststellen (Cruciani et al., 1991, S. 3793). Ähnlich der Zerstörung der Bakterienmembranen durch HDPs kann man diesen Vorgang auch bei Krebszellen mit dem sogenannten „*carpet modell*“ erklären: Die kationischen Peptide werden durch elektrostatische Anziehung der oft negativ geladenen Membranen der Krebszellen angezogen (Mader und Hoskin, 2006, S. 936). Sie legen sich wie ein Teppich („*carpet-like manner*“) parallel an die Membranen an und sobald eine bestimmte Schwellenkonzentration überschritten ist, passieren die Peptide die Membran, was meist den Kollaps der Membran und den Tod der Krebszelle zur Folge hat (Papo und Shai, 2005, S. 786). Die HDPs können über hydrophobe Vorgänge in den Membranen von Krebszellen auch durch den sogenannten „*barrel-stave*“ Mechanismus Poren oder Kanäle bilden (Mader und Hoskin, 2006, S. 936). HDPs können auch den Tod einer Krebszelle bewirken, indem sie einmal in das Zytoplasma eingeschleust, die Membranen der Mitochondrien zerstören (Hoskin und Ramamoorthy, 2008, S. 361). Außerdem scheinen einige HDPs die Fähigkeit zu besitzen, auch hemmend auf interzelluläre Wirkmechanismen der Tumorzellen, wie zum Beispiel die Signaltransduktion, zu wirken (Winder et al., 1998, S. 611). Einige antimikrobiellen Peptide sind auch in der Lage, die Immunabwehr gegen Krebs zu steigern und eine Art Resistenz zu generieren (Chernysh et al., 2002, S. 12632, Papo und Shai, 2005, S. 787).

1.9.2 Die Wirkung von Defensinen auf Tumorzellen

In Zellkulturen können Defensine zytotoxisch auf Tumorzellen wirken (Lichtenstein et al., 1986, S. 1409). Defensine haben das Potential Tumorzellen aufzulösen, indem sie deren Membran durchdringen und die DNA vernichten (Droin et al., 2009, S. 923).

1.9.2.1 α -Defensine

Auch die α -Defensine HNP-1, HNP-2 und HNP-3 können durch Zerstörung des Membranpotentials und der Membran toxisch auf maligne Zellen wirken (Hoskin und Ramamoorthy, 2008, S. 367). HNP-1 ist zum Beispiel in der Lage, in Zellkulturen Tumorzellen eines Plattenepithelkarzinoms zu zerstören (McKeown et al., 2006, S. 687). Jedoch lösen α -Defensine ab einer bestimmten Konzentration nicht nur transformierte, sondern auch gesunde Zellen auf (Nishimura et al., 2004, S. 92).

1.9.2.2 β -Defensine

Die induzierte Expression von hBD-1 in einer Prostatakarzinomzellkultur bewirkte die Zerstörung der Tumorzellen (Bullard et al., 2008, S. 844). Im Mausmodell wurde durch Impfung mit murinem β -Defensin-2 die Immunabwehr der Mäuse gegen Leukämie gesteigert (Ma et al., 2006, S. 1172). Möglicherweise können in der Zukunft zum Beispiel DEFB1 Elicitoren eingesetzt werden, die eine Überexprimierung des Tumorsuppressors hBD-1 bewirken und als Therapeutikum gegen Krebs einsetzbar wären (Prado-Montes de Oca, 2010, S. 803). Die Rolle der Defensine in der Onkogenese und ihr therapeutisches Potential müssen noch weiter geklärt werden (Droin et al., 2009, S. 924).

1.9.3 Die Wirkung von Psoriasin auf Tumorzellen

Da Psoriasin häufig stärker in *Carcinoma in situ* Tumoren der Brustdrüsen als in invasiven Karzinomen oder gesundem Gewebe exprimiert wird, könnte dieses antimikrobielle Peptid bei den *Carcinomata in situ* auch eine inhibierende Wirkung auf die Epithelmigration haben, die, sobald sie jedoch verlorengelht, zum Beginn einer erfolgreichen Invasion beiträgt (Watson et al., 1998, S. 570). In der Zellkultur eines Plattenepithelkarzinoms und im Mausmodell konnte schon gezeigt werden, dass die induzierte Expression von S100A7 eine hemmende Wirkung auf die Proliferation und das Wachstum von Tumorzellen haben kann (Zhou et al., 2008, S. 2)

2 Problemstellung

Tumoren der Speicheldrüsen sind selten (Targa-Stramandinoli et al., 2009, S. 200). Häufig erschwert jedoch, vor allem bei Tumorresektionen im Bereich der Glandula parotis, das Risiko einer Nervverletzung das therapeutische Vorgehen (Gehrking et al., 2007, S. 195). Zusätzlich stellt auch der enorme histologische Variantenreichtum der Karzinome bei der histopathologischen Einordnung der Tumoren nicht selten eine Herausforderung dar (Bjorndal et al., 2011, S. 679). Trotz Fortschritten bei der Behandlung der Patienten mit angemessener Radio- und Chemotherapie ist die Prognose bei Speicheldrüsenkarzinomen im fortgeschrittenen Stadium noch immer sehr ungünstig (Liu et al., 2010, S. 1). Dabei wären praktikable Prognoseparameter, die ein frühzeitiges Diagnostizieren der besonders aggressiven Malignome ermöglichen, von großem klinischen Nutzen (Lang et al., 2005, S. 910). Potentielle Biomarker auf molekularer Ebene, die mit der Ätiologie und der Progression von Speicheldrüsentumoren in Verbindung gebracht werden sind die Überexpression von HER-2, Mutationen des p53 Tumorsuppressorgens, H-ras Mutationen und die teilweise Überexpression von VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (Liu et al., 2010, S. 8). Neuere, zahlreiche Studienergebnisse deuten drauf hin, dass auch einige *host defense peptides* das Potential besitzen, maligne Zellen zu zerstören, die Funktion von Tumorsuppressorgenen zu übernehmen oder das Tumorwachstum direkt zu beeinflussen und dass somit auch die Dysregulation der HDP-Expression eine Rolle bei der Tumorgenese spielen könnte (Meyer und Harder, 2007, S. 3125). Insbesondere das Defensin hBD-1 scheint tumorsuppressives Potential zu besitzen (Prado-Montes de Oca, 2010, S. 802).

Pantelis et al. konnten bereits darlegen, dass neben der verringerten Expression der antimikrobiellen Peptide hBD-2 und hBD-3 vor allem die Expression der mRNA von hBD-1 in pleomorphen Adenomen deutlich niedriger als in gesundem Speicheldrüsen-gewebe war (Pantelis et al., 2009, S. 528). Die immunhistologischen Tests der gleichen Studie zeigten außerdem eine überwiegende Lokalisation von hBD-1 im Nukleus der Tumorzellen, was zusätzlich die Hypothese der Autoren unterstützte, dass hBD-1 auch für Speicheldrüsentumoren ein Tumorsuppressor ist, der durch Akkumulation im Zellkern dereguliert werden kann (Pantelis et al., 2009, S. 528). Wenghoefer et al., deren Arbeitsgruppe die Expression von hBD-1, hBD-2 und hBD-3 sowohl in benignen als auch malignen Speicheldrüsentumoren immunhistologisch untersuchte, berichteten über ähnliche Ergebnisse (Wenghoefer et al., 2008, S. 4).

Gerade aufgrund der histologischen Vielfalt der Speicheldrüsentumoren besteht jedoch großer Bedarf nach weiteren, ähnlich konzipierten Studien. Außerdem gibt es Hinweise, dass auch das in Speicheldrüsen und Speicheldrüsentumoren noch nicht nachgewiesene

HDP Psoriasin bei der Entstehung und Progression von Malignomen ein wichtiger Faktor sein könnte (Kesting et al., 2009, S. 735).

Ziel dieser Studie war es, ein Expressionsprofil der antimikrobiellen Peptide hBD-1, hBD-2, hBD-3 und Psoriasin sowohl von gesundem Speicheldrüsengewebe als auch von Speicheldrüsentumoren zu erstellen. Dazu wurden zunächst Gesundproben und Proben von malignen und benignen Neoplasien der Speicheldrüsen gesammelt und anschließend mit immunhistologischen Testreihen untersucht.

Besonderes Interesse galt hierbei potentiellen Konzentrationsunterschieden der Peptide hBD-1, hBD-2 und hBD-3 in gesundem Speicheldrüsengewebe im Vergleich mit Tumorgewebe. Außerdem sollte geklärt werden, ob das *host defense peptid* Psoriasin in gesundem Speicheldrüsengewebe konstitutiv gebildet wird und ob auch für dieses Peptid eine veränderte Expression in den Speicheldrüsentumoren festgestellt werden kann. Durch diese Studie sollten die Kenntnisse über eine mögliche Bedeutung von HDPs bei der Entstehung von Speicheldrüsentumoren erweitert werden.

3 Material und Methode

3.1 Patienten

Das untersuchte Gewebe der Speicheldrüsen oder Speicheldrüsentumoren stammt von 20 männlichen (43,5%) und 26 weiblichen (56,5%) Patienten, die zum Zeitpunkt der Probenentnahme im Durchschnitt 57,6 Jahre alt waren. Tabelle 3.1 verdeutlicht die weit gestreute Altersverteilung im Patientenkollektiv.

Tabelle 3.1: Zusammensetzung der Patienten

	Anzahl	Alter von – bis (Jahre)	Durchschnittsalter (Jahre)
Patienten gesamt	46	4 – 96	57,6
Männliche Patienten	20	4 – 80	53,9
Weibliche Patienten	26	38 – 96	60,5

Alle Patienten wurden in der Klinik für Mund-, Kiefer- Gesichtschirurgie oder der Klinik für Hals-, Nasen- Ohrenheilkunde an der Technischen Universität München behandelt und operiert. Das Entnahmeprotokoll wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität München (Registrierungs-Nummer 2705/10) bewilligt und ist in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki (1964). Alle Patienten gaben durch ihre Unterschrift eine schriftliche Einverständniserklärung.

3.2 Material

Die Entscheidung zur Resektion der jeweiligen Speicheldrüse war aus unterschiedlichen Gründen getroffen worden: Die Entfernung einer gesunden Glandula submandibularis erfolgte überwiegend im Rahmen einer Neck-Dissection, die aufgrund einer malignen Tumorerkrankung im Kopfbereich notwendig geworden war. Keiner der Patienten war präoperativ bestrahlt worden. Tabelle 3.2 verdeutlicht, dass der Hauptanteil der Proben mit gesundem Gewebe von einer Glandula submandibularis stammte.

Tabelle 3.2: Zusammensetzung der entnommenen Gewebeproben

	Anzahl (gesamt)	Glandula parotis	Glandula submandibularis	Glandula palatinae
Kontrollgewebe	35	6	27	2
Tumoren gesamt	17	13	1	3
Benigne Tumoren	12	10	1	1
Maligne Tumoren	5	3	-	2

Bei 6 Patienten, bei denen ein Speicheldrüsentumor entfernt werden musste, war gleichzeitig gesundes Referenzgewebe der betroffenen Drüse entnommen und der Gruppe mit gesundem Speicheldrüsenngewebe hinzugefügt worden. Dies traf auf Proben von 2 Gaumensspeicheldrüsen (Glandulae palatinae) und von 4 Ohrspeicheldrüsen (Glandula parotis) zu.

Alle Tumoren wurden im Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie im Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München untersucht und histologisch typisiert. Bei den 12 benignen Tumoren handelte es sich um 7 pleomorphe Adenome, 1 Myoepitheliom und 2 Warthin Tumoren (Adenolymphome) der Glandula parotis, sowie um je ein pleomorphes Adenom der Glandula submandibularis und der Gaumensspeicheldrüsen. Tabelle 3.3 gibt einen Überblick über die histologischen Tumortypen der untersuchten gutartigen Neoplasien.

Tabelle 3.3: Histologische Zusammensetzung der benignen Speicheldrüsentumoren

Tumortyp	Glandula parotis	Glandula submandibularis	Glandulae palatinae
Pleomorphes Adenom	7	1	1
Myoepitheliom	1	-	-
Warthin Tumor	2	-	-

Die Gruppe der malignen Tumoren bestand aus 2 Plattenepithelkarzinomen der Glandula parotis, je einem Mukoepidermoidkarzinom der Glandula parotis und der Gaumenspeicheldrüsen sowie aus einem Adenoidzystischen Karzinom der Gaumenspeicheldrüsen. Tabelle 3.4 gibt zusätzliche Informationen über Malignitäts- und Differenzierungsgrad der Karzinome.

Tabelle 3.4: Histologische Kriterien der 5 malignen Tumoren

Karzinomtyp	Drüse	Malignität	Differenzierung
Mukoepidermoidkarzinom	Glandula parotis	Hoch	Gering
Adenoidzystisches Karzinom	Glandulae palatinae	Niedrig	Hoch
Mukoepidermoidkarzinom	Glandulae palatinae	Niedrig	Hoch
Plattenepithelkarzinom	Glandula parotis	Mittel	Mäßig
Plattenepithelkarzinom	Glandula parotis	Hoch	Gering

3.3 Immunhistochemische Färbungen

3.3.1 Die Vorbereitung der Gewebeproben für die Immunhistologie

Die Proben mit gesundem Speicheldrüsengewebe und Speicheldrüsentumoren wurden intraoperativ gewonnen und in 3,7%-iger Formaldehyd-Lösung fixiert. Danach wurden die Gewebeteile in Einbettkapseln verbracht und in einem Einbettautomaten (TES-1, Firma: Wendt GmbH & Co. KG, Georgsmarienhütte) mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (1 x 70%, 2 x 96%, 3 x 100%) entwässert und durch das Durchlaufen von 2 x Xylol sowie 4 x Paraffin für den nächsten Arbeitsschritt vorbereitet. Anschließend wurden die Kapseln mit den Gewebeproben auf Einbettförmchen aus Metall gelegt und mit heißem, flüssigem Paraffin aufgefüllt und bis zum vollständigen Erhärten des Paraffinblocks auf einer Kühlplatte stehen gelassen.

Danach konnten aus den Paraffin-Gewebeblöcken mit einem Schlittenmikrotom 4 µm starke Schnitte hergestellt werden und auf Superfrost® Plus Gläser (Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig) aufgebracht werden. Zur Erhöhung der Haftung auf dem Glas-träger wurden die Paraffinschnitte über Nacht im Wärmeschrank bei 48 Grad Celsius getrocknet.

3.3.2 Grundprinzip der immunhistochemischen Färbung nach der ABC-Methode

Grundsätzlich soll durch ein immunhistochemisches Verfahren ein bestimmtes Antigen bzw. Protein im Gewebe nachgewiesen und lokalisiert werden. Hierbei benötigt man einen spezifischen Primärantikörper, der sich ausschließlich und stark an das zu untersuchende Antigen anlagert. An diesen Antigen-Antikörperkomplex muss ein zuverlässiges Detektionssystem gekoppelt sein, das ein späteres Sichtbarmachen des gesamten Komplexes im Gewebe ermöglicht.

In dieser Studie wurde die Immunhistologie mit der ABC (Avidin-Biotin-Complex)-Methode bzw. Streptavidin-Biotin-Methode durchgeführt. Der Vorteil dieser Methode ist die hohe Affinität von Avidin (Hühnereiweiß) für Biotin. Ein biotinylierter Sekundärantikörper lagert sich an den, bereits an das gesuchte Antigen gebundenen Primärantikörper an, der jetzt als Antigen fungiert. Der jetzt hinzugefügte Peroxidase-Avidin-Biotin-Komplex kann sich an die biotinylierte Region des Sekundärantikörpers binden. Die Peroxidase (Meerrettich-Peroxidase) ist wiederum in der Lage mit einem zugefügten Chromogen (Substrat) zu reagieren. Durch diesen Vorgang kann das Antigen bzw. Protein sichtbar gemacht werden.

In der hier vorliegenden Studie kam als Chromogen 3,3-Diaminobenzidin (DAB) zum Einsatz. Durch Zugeben von Wasserstoffperoxid zur Peroxidase werden Protonen freigesetzt und das DAB wird selbst oxidiert. Durch diesen Vorgang entsteht ein braunes, im Gewebe sichtbares Endprodukt, das in Färbintensität und Verteilungsmuster direkt mit dem zu detektierenden Protein zusammenhängt.

3.3.3 Immunhistochemische Gebrauchslösungen

Folgende Lösungen wurden je nach Bedarf mehrfach selbst hergestellt:

3.3.3.1 PBS Puffer („PBS Grube“)

Um den PBS-Puffer (*phosphat buffered saline*) mit einem pH-Wert von 7,4 anzufertigen mussten zunächst die Stammlösungen A und B hergestellt werden. Für die Stammlösung A wurden 27,6 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) in 1 Liter Aqua dest titriert. Für die Stammlösung B wurden 35,6 g di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) in 1 Liter Aqua dest unter Rühren aufgelöst.

Zur Produktion von 1 Liter PBS-Puffer musste als erster Schritt 8,77 g Natriumchlorid (NaCl , Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) in 900 ml Aqua dest aufgelöst werden. Sodann wurden 10 ml der Stammlösung A hinzu gegeben. Danach wurden mindestens 40 ml, oder nach Bedarf eine größere Menge der Stammlösung B hinzupipettiert, bis

das pH-Meter einen pH-Wert von 7,4 für die Pufferlösung anzeigte. Zum Schluss wurde die Lösung mit Aqua dest auf 1 Liter aufgefüllt.

3.3.3.2 Citratpuffer

Auch die Herstellung des Citratpuffers mit einem pH-Wert von 6,0 erforderte die vorherige Anfertigung seiner Stammlösungen A und B. Für die Stammlösung A wurden 21,01 g Citronensäure-Monohydrat ($C_6H_8O_7 \times H_2O$, Merck KGaA, Darmstadt) in 1 Liter Aqua dest in Lösung gebracht. Für die Herstellung von Stammlösung B mussten 29,41 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat ($C_6H_5Na_3O_7 \times 2 H_2O$, Merck KGaA, Darmstadt) in 1 Liter Aqua dest titriert werden. Die Stammlösungen A und B wurden im Kühlschrank bei 4 Grad Celsius gelagert.

Zur Produktion von 1 Liter Citratpuffer wurden 18 ml der Stammlösung A mit 82 ml der Stammlösung B in einem Gefäß unter Rühren gemischt und mit Aqua dest auf 1 Liter aufgefüllt. Der pH-Wert der Lösung wurde mit dem pH-Meter kontrolliert. In seltenen Fällen musste durch zusätzliche, vorsichtige Zugabe der Stammlösung B der fast fertige Citratpuffer noch auf den pH-Wert 6 angehoben werden.

3.3.3.3 3,3 Diaminobenzidin (DAB)

Um eine gebrauchsfertige DAB-Lösung herzustellen wurde 1 DAB-Tablette (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) im Dunkeln in 15 ml PBS-Lösung aufgelöst und anschließend 90 Minuten unter Lichtausschluss gerührt. Nach Filtration der DAB-Lösung erfolgte das portionsweise Abfüllen von je 500 µl in Eppendorf-Cups. Bis zum Gebrauch wurden die Cups bei -20 Grad Celsius gelagert.

3.3.3.4 Chemikalien

Tabelle 3.5: Chemikalien

Produkt	Hersteller
DPX	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Eosin 1% Lösung	Bio-Optica, Mailand, Italien
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Formaldehyd-Lösung 3,5-3,7%	Fischar GmbH & Co.KG, Saarbrücken, Deutschland
Goat Serum (Blocking Reagenz)	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Mayer`s hematoxylin	Bio-Optica, Mailand, Italien
Vectastain® ABC Kit (Avidin-Biotin-Komplex)	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Wasserstoffperoxid 30%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Xylol	Mallinckrodt Baker B.V., Niederlande

3.3.4 Antikörper

Tabelle 3.6: Primärantikörper

Primärantikörper	Verdünnung	Spezies	Hersteller
β-defensin 1 (FL-68), polyklonal	1:100	Hase	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
β-defensin 2 (FL-64), polyklonal	1:100	Hase	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
β-defensin 3, polyklonal	1:100	Hase	Novus Biologicals, Littleton, CO, USA
Psoriasis/HID5, monoclonal 47C1068	1:50	Maus	Imgenex, San Diego, CA, USA

Tabelle 3.7: Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Verdünnung	Hersteller
Biotinylated Anti-Rabbit IgG	1:200	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Biotinylated Anti-Mouse IgG	1:200	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

3.3.5 Färbeprotokoll für hBD-1, hBD-2 und hBD-3

Das Verfahren zum immunhistologischen Nachweis für die 3 Peptide hBD-1, hBD-2 und hBD-3 wurde vorab in Testläufen erprobt. Dabei orientierte man sich primär an einem bereits bewährten Routineprotokoll zur Detektion dieser Proteine in ähnlichem Gewebe, in diesem Fall an Gewebeschnitten des Augenlids eines Guanakos. Nach mehreren Variationen der Verdünnung des 1. Antikörpers (1:100, 1:500, 1:1000) und Wechsel des Blocking Serums von Schweineserum auf ein Ziegenserum wurden gute Resultate beim Sichtbarmachen der 3 nachzuweisenden Defensine erzielt.

Alle Färbungen erfolgten dann immer nach dem gleichen, im Folgenden beschriebenen Protokoll:

Die zu färbenden Schnitte wurden 2 x 10 Minuten in reinem Xylol und danach 1 x 10 Minuten in einem 50%-igen Xylol-Ethanol-Gemisch rehydriert. Sodann fand eine je 2 Minuten dauernde Spülung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 80%, 2 x 100%) und ein kurzes Eintauchen in Aqua dest statt. Zur Antigendemaskierung folgte danach das Erhitzen der Schnitte in einer Lösung aus Citratpuffer für 3 x 5 Minuten in einer Mikrowelle bei 600 Watt (W) und anschließend eine Abkühlungsphase von 20 Minuten außerhalb der Mikrowelle. Daraufhin wurden die Gewebeproben für 1 Minute in Puffer gespült und für 10 Minuten in eine 3%-ige Wasserstoffperoxid-Lösung gestellt und lichtundurchlässig mit Aluminiumfolie abgedeckt, um die Wirksamkeit des H₂O₂ sicherzustellen. Anschließend erfolgte eine Spülung in Aqua dest und in PBS-Puffer für je 1 Minute, das Abtupfen der Schnitte mit Filterpapier und das Auslegen in einer feuchten Kammer. Um potentiell störende, unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurde danach das Blocking Reagenz appliziert und für 30 Minuten Einwirkzeit belassen. Für das Blocking Reagenz wurde 30 µl Ziegenserum mit 1ml PBS-Pufferlösung verdünnt.

Nach Abtupfen der Gewebeschnitte mit Filterpapier wurde der erste Antikörper in einer 1:100 mit PBS-Puffer verdünnten Lösung aufgebracht. Dann wurden die Schnitte für 1 Stunde bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer stehen gelassen und über Nacht im Kühlschrank bei 4 Grad Celsius aufbewahrt. Am nächsten Tag erwärmten die Paraffinschnitte wiederum 1 Stunde bei Raumtemperatur, bevor eine 3 x 5 Minuten dauernde Spülung in PBS-Puffer folgte. Nach erneutem vorsichtigen Abtupfen der Gewebeschnitte mit Filterpapier konnte der zweite Antikörper (biotinyliert) in einer 1:200 mit PBS verdünnten Lösung aufgetragen und für 45 Minuten belassen werden. Anschließend wurden die Proben nach erneutem Spülen für 3 x 5 Minuten in PBS-Puffer und Abtupfen mit Filterpapier für 45 Minuten der Streptavidin-Lösung (Vectastain® ABC Kit) ausgesetzt. Für diese Lösung war 30 Minuten vor dem Auftragen je 10 µl Avidin mit 10 µl biotinylierte Meerrettich-Peroxidase gemischt worden. Daraufhin wurden alle Proben

wieder 3 x 5 Minuten in PBS-Puffer gewaschen. Danach wurden je 500 µl kurz zuvor aufgetautes 3,3-Diaminobenzidin (DAB, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) mit 1 µl H₂O₂ gemischt und diese Lösung wurde auf die Schnitte appliziert und für 5 Minuten belassen. Anschließend folgte ein zügiges Abspülen der Schnitte mit Hilfe einer mit Aqua dest befüllten Spritzflasche und ein 2 Minuten dauerndes Eintauchen in Aqua dest. Um eine Kernfärbung durchzuführen, wurden die Gewebeschnitte nur für ca. 1 Sekunde in Hämalaun gehalten. Dann wurden die Schnitte für 8 Minuten unter langsam laufendes Leitungswasser gestellt (gebläut). Nach anschließendem Durchlaufen einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 80%, 2 x 100%) für jeweils 2 Minuten folgte eine Einwirkzeit von 5 Minuten in einer Lösung aus 50% Ethanol und 50% Xylol. Daraufhin wurden die gefärbten Gewebeschnitte 2 x 5 Minuten in reinem Xylol gespült und abschließend mit Deckgläsern und einem histologischen Einschlussmittel (DPX, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) zum Trocknen und Mikroskopieren eingedeckelt. In allen Durchläufen wurde mindestens eine Negativprobe mitgeführt, auf die anstelle des 1. Antikörpers PBS-Puffer aufgetragen worden war.

Die verwendeten Antikörper und Chemikalien sind in Tabelle 3.5, Tabelle 3.6 und Tabelle 3.7 aufgelistet

3.3.6 Färbeprotokoll für Psoriasis

Da das HDP Psoriasis zuvor noch nicht in Speicheldrüsen oder Speicheldrüsentumoren nachgewiesen worden war, wurden als Positivkontrollen bei den immunhistochemischen Färbungen Paraffinschnitte mit humanen Lippengewebe mitgeführt. Der immunhistologische Nachweis für Psoriasis musste ebenfalls vorher in mehreren Testläufen standardisiert werden. Nach Variationen einiger Parameter, wie verschiedene Verdünnungen des 1. Antikörpers (1:50, 1:100) und unterschiedliche Wirkzeiten des 2. Antikörpers und des 3,3 Diaminobenzidins konnte für die Detektion von Psoriasis in Speicheldrüsen und Speicheldrüsentumoren ein Routineprotokoll etabliert werden. Bis auf folgende Unterschiede entsprachen die einzelnen Arbeitsschritte exakt dem Vorgehen für hBD-1, hBD-2 und hBD-3.:

Der 1. Antikörper wurde in der Verdünnung 1:50 aufgetragen. Der 2. Antikörper verblieb für eine Einwirkzeit von 80 Minuten auf den Gewebeschnitten. Die Einwirkzeit für das DAB betrug 10 Minuten.

Auch hier wurde in allen Durchläufen mindestens eine Negativprobe mitgeführt, auf die anstelle des 1. Antikörpers nur PBS-Puffer aufgetragen wurde.

In Tabelle 3.5, Tabelle 3.6 und Tabelle 3.7 sind die verwendeten Chemikalien und Antikörper aufgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Deskriptive Beurteilung der immunhistologischen Untersuchungen

Alle bearbeiteten Gewebeschnitte wurden mikroskopiert (Nikon Eclipse 80i Mikroskop, Düsseldorf) und in verschiedenen Vergrößerungen digital fotografiert.

4.1.1 Allgemeine Beschreibung der Ergebnisse

Die Expressionsmuster in den gesunden Speicheldrüsen waren für alle 4 untersuchten antimikrobiellen Peptide ähnlich: Sowohl die Defensine als auch das somit in Speicheldrüsen erstmals nachgewiesene Psoriasin konnten vorrangig in den intralobulär liegenden Schalt- und Streifenstücken sowie in den interlobulären Ausführungsgängen der untersuchten Gewebeproben lokalisiert werden. In den serösen Endstücken des Parenchyms wurde allgemein eine geringere Peptidexpression festgestellt als im Bereich der Gangsysteme. In der Bindegewebskapsel und den Septen des Drüsenstromas zeigte sich kaum Expression. In den größeren, mukösen Drüsenendstücken konnte grundsätzlich keines der hier untersuchten Peptide nachgewiesen werden. Die immunhistologische Nachweisbarkeit von hBD-1, hBD-2, hBD-3 und Psoriasin war im Großteil der Speicheldrüsentumoren deutlich geringer als in den gesunden Speicheldrüsen. Im neoplastisch umgeformten Gewebe war die Expression der 4 untersuchten Peptide meist nur abgeschwächt erkennbar. Dies traf besonders auf Tumoren zu, in denen kaum noch reguläre Drüsenstrukturen vorhanden waren. In zumindest noch rudimentär erkennbaren Ausführungsgängen konnten häufig Defensine oder Psoriasin nachgewiesen werden. Teilweise war auch im metaplastisch veränderten Tumorstroma noch eine angedeutete diffuse Anfärbbarkeit des jeweiligen HDPs zu erkennen. Dies traf sowohl auf benigne

als auch auf maligne Tumoren zu. Insgesamt war die Expression in den 5 malignen Tumoren meist noch schwächer als in den gutartigen Neubildungen.

4.1.2 Immunhistochemischer Nachweis von hBD-1 in gesundem Speicheldrüsengewebe und Speicheldrüsentumoren

Abbildung 4.1 verdeutlicht ein typisches Expressionsmuster des hier in immunhistologischen Tests nachgewiesenen hBD-1. Die Fotografie zeigt die Lokalisation von hBD-1 in gesundem Gewebe einer Glandula submandibularis. Die stärkste Färbung ist in den Streifenstücken, interlobulären Ausführungsgängen (gelber Pfeil) und Schaltstücken erkennbar. Das Peptid hBD-1 ist im gesamten Zytoplasma der Epithelzellen vorhanden. Zum Lumen der Ausführungsgänge scheint sich die Färbung wie in Form von Sekretionsgranula häufig noch zu verdichten. Die Anfärbbarkeit für hBD-1 ist in den serösen Azini (roter, gekerbter Pfeil) zwar vorhanden aber deutlich schwächer als in den Zellen des Gangsystems.

Abbildung 4.2 zeigt ein Beispiel für den immunhistochemischen Nachweis von hBD-1 in einem benignen Speicheldrüsentumor, in diesem Fall in einem pleomorphen Adenom einer Glandula submandibularis. Die Proteinexpression für hBD-1 ist in den strang- und netzförmigen gewucherten Epithelien nur vereinzelt und schwach zu erkennen. Im aufgelockerten Grundgewebe des Tumors ist kaum Färbung feststellbar. In der mitgeführten Negativkontrolle für hBD-1 ist keinerlei Braunfärbung verifizierbar. (Abbildung 4.3)

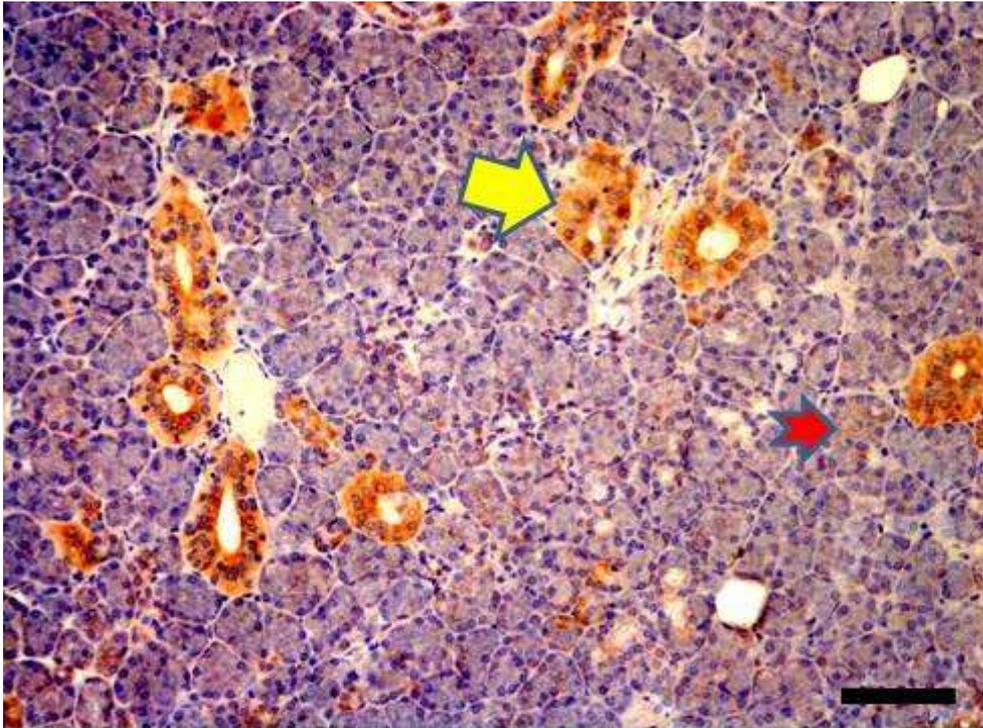


Abbildung 4.1: Glandula submandibularis, immunhistochemischer Nachweis von hBD-1, starke Färbung eines Ausführungsgangs (gelber Pfeil), schwächere Färbung eines serösen Endstückes (roter, gekerbter Pfeil), Balken entspricht 100 μm

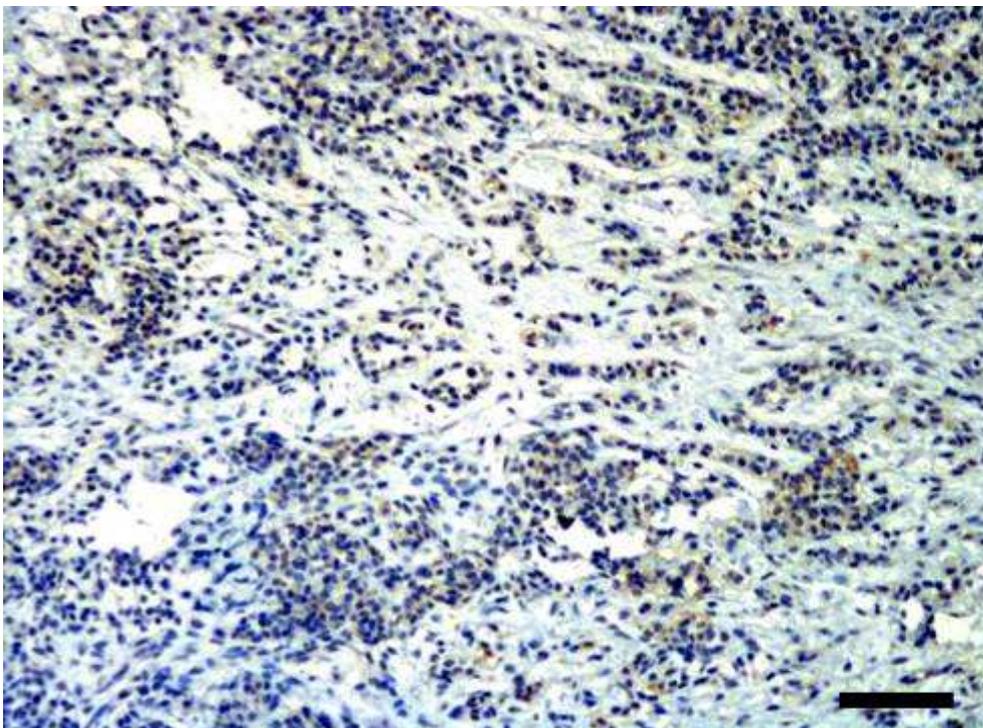


Abbildung 4.2: Pleomorphes Adenom der Glandula submandibularis, Immunhistochemischer Nachweis von hBD-1, Balken entspricht 100 μm

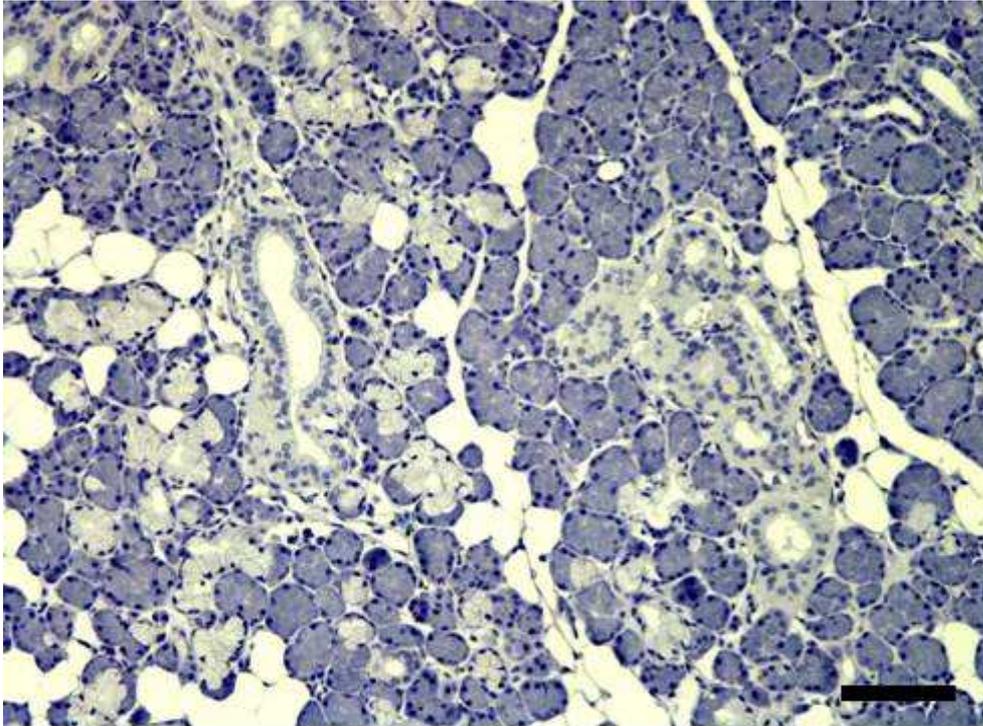


Abbildung 4.3: Glandula submandibularis, Negativkontrolle, mitgeführt bei einer Färbung für den immunhistochemischen Nachweis von hBD-1, Balken entspricht 100 μm

4.1.3 Immunhistochemischer Nachweis von hBD-2 in gesundem Speicheldrüsenngewebe und in Speicheldrüsentumoren

Abbildung 4.4 veranschaulicht die immunhistologische Lokalisation des antimikrobiellen Peptids hBD-2 in einer Glandula submandibularis. Das Expressionsmuster von hBD-2 weist große Ähnlichkeit mit dem Grundmuster der Nachweisbarkeit von hBD-1 in Abbildung 4.1 auf. Auch hier zeigen vorrangig die Streifenstücke und Ausführungsgänge eine deutliche Braunfärbung und somit Proteinexpression.

Wie bereits erwähnt, war auch die Expression von hBD-2 in den Tumoren allgemein weniger stark ausgeprägt als im gesunden Speicheldrüsenngewebe. Abbildung 4.5 zeigt die Expression des Peptids hBD-2 in einem gering differenzierten Plattenepithelkarzinom der Glandula parotis. Bis auf wenige, sehr kleine Bezirke ist hBD-2 im Gewebe kaum nachweisbar.

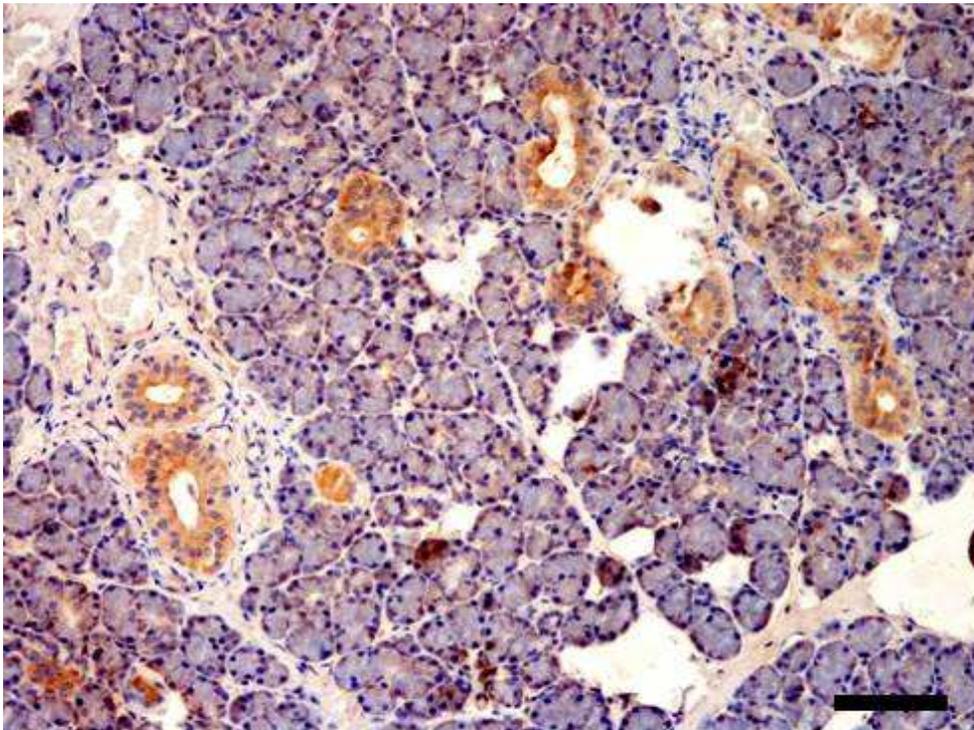


Abbildung 4.4: Glandula submandibularis, Immunhistochemischer Nachweis von hBD-2, Balken entspricht 100 µm

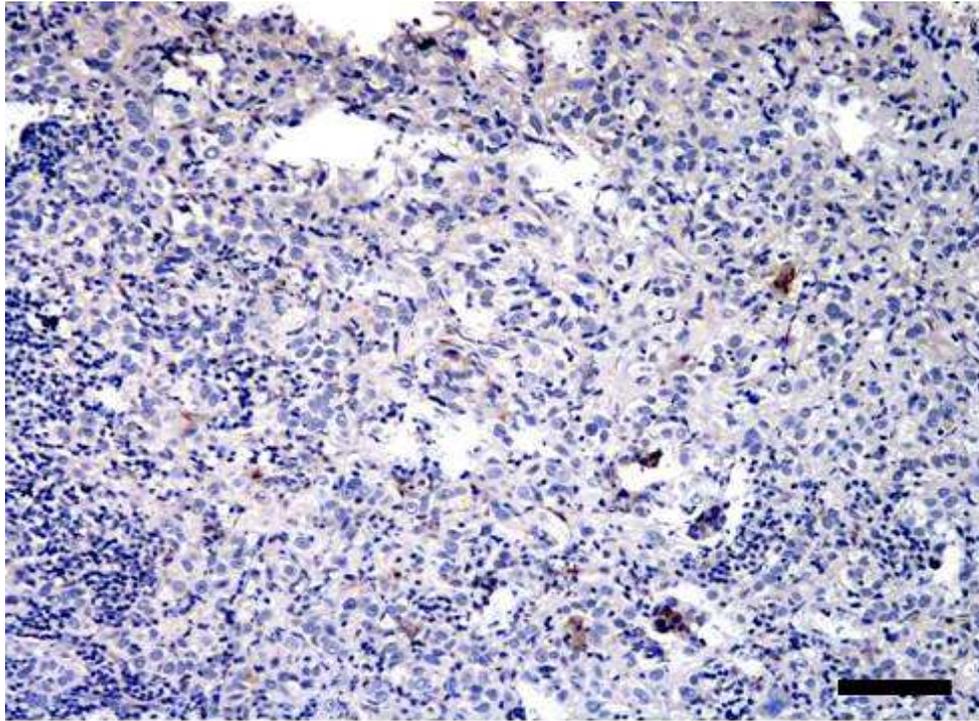


Abbildung 4.5: Plattenepithelkarzinom der Glandula parotis, Immunhistochemischer Nachweis von hBD-2, Balken entspricht 100 μm

4.1.4 Immunhistochemischer Nachweis von hBD-3 in gesundem Speicheldrüsengewebe und in Speicheldrüsentumoren

Auch die Ergebnisse der immunhistologischen Testreihen von hBD-3 in gesundem Speicheldrüsengewebe ähneln den vorher beschriebenen Expressionsmustern von hBD-1 und hBD-2. Abbildung 4.6 stellt die typischen, primär auffälligen, durch das Chromogen DAB braun gefärbten Expressionsareale von hBD-3 in den Streifenstücken sowie in den interlobulären Ausführungsgängen der Drüse dar. Die serösen Azini sind nur schwach angefärbt. In diesem Gewebeschnitt ist gut zu erkennen, dass die mukösen Drüsenendstücke (gelber Pfeil) keinerlei Expression von hBD-3 zeigen.

Wie schon erläutert, war die Expression auch von hBD-3 in den meisten Tumoren geringer als in den Proben mit gesundem Speicheldrüsengewebe. Abbildung 4.7 zeigt die Expression des Peptids hBD-3 in einem „*low grade*“ adenoidzystischen Karzinom der kleinen Speicheldrüsen des Gaumens. Größtenteils ist nur im Stroma eine schwach ausgeprägte Braunfärbung zu erkennen.

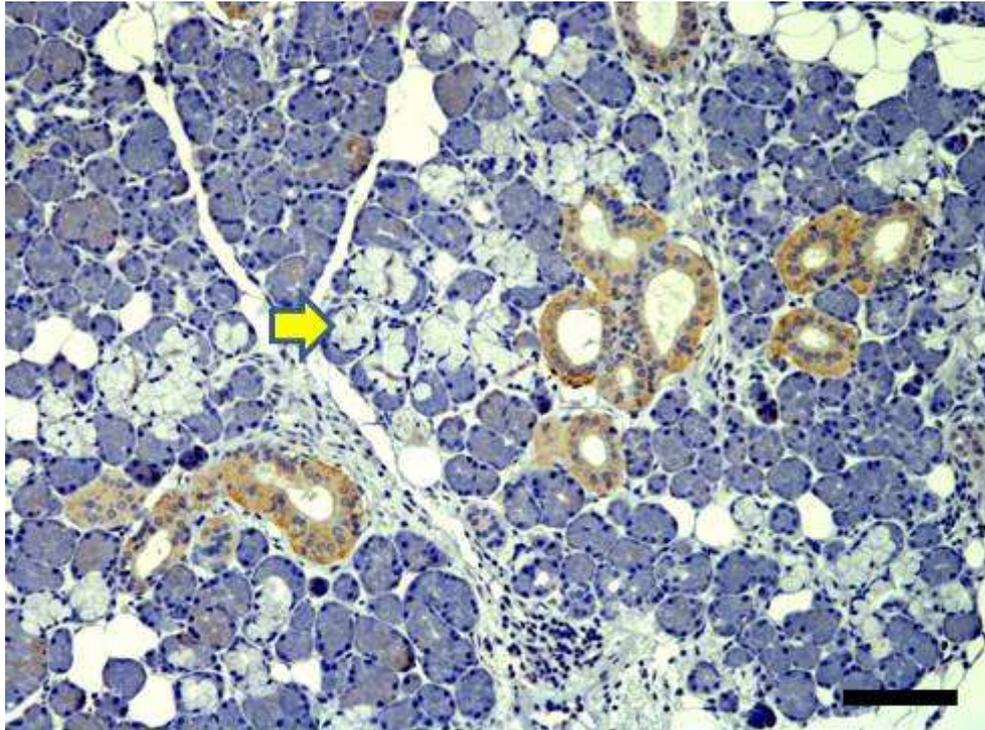


Abbildung 4.6: Glandula submandibularis, Immunhistochemischer Nachweis von hBD-3, keine Färbung der mukösen Endstücke (gelber Pfeil), Balken entspricht 100 μm

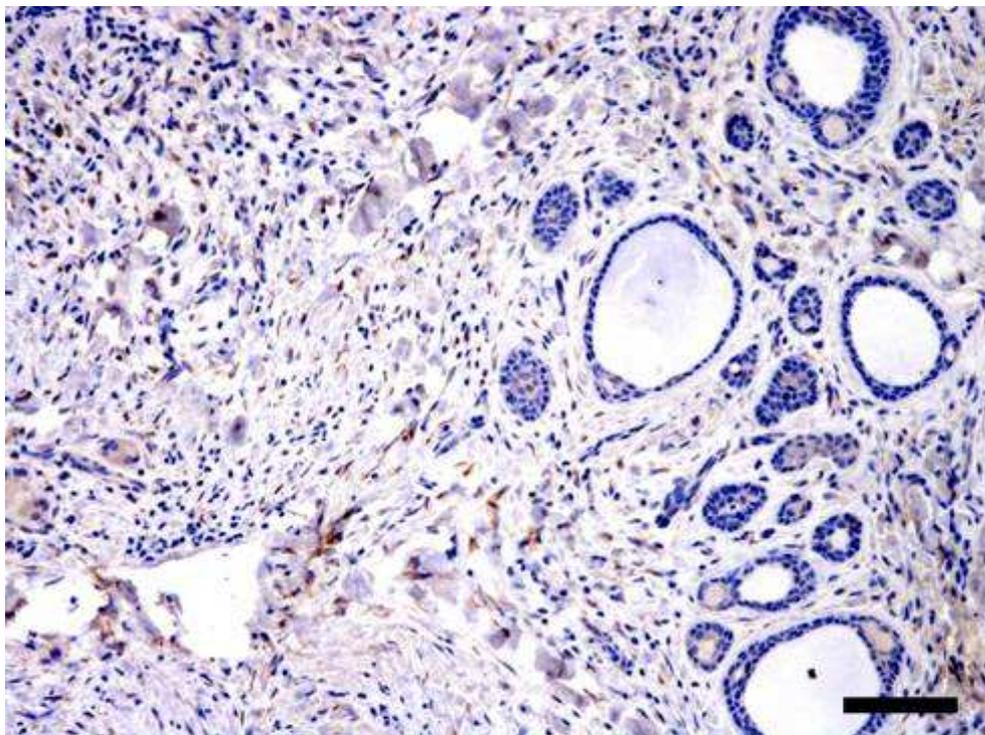


Abbildung 4.7: Adenoidzystisches Karzinom der Glandulae palatinae, Immunhistochemischer Nachweis von hBD-3, Balken entspricht 100 μm

4.1.5 Immunhistochemischer Nachweis von Psoriasin in gesundem Speicheldrüsengewebe und in Speicheldrüsentumoren

Abbildung 4.8 stellt die Lokalisation von Psoriasin in gesundem Gewebe einer Glandula submandibularis dar. Man kann gut erkennen, dass die Regionen mit der stärksten Expression, wie bei den Defensinen, im Wesentlichen die Streifenstücke und interlobulären Ausführungsgänge sind. Die azinösen Drüsenendstücke sind nur sehr schwach gefärbt.

Bei der Beurteilung der Speicheldrüsentumoren zeigten diese in der Mehrzahl ebenfalls eine geringere Färbeintensität für den Nachweis des antimikrobiellen Peptids Psoriasin. Abbildung 4.9 zeigt die immunhistochemische Lokalisation von Psoriasin in einem vorwiegend myxoiden pleomorphen Adenom der Glandula parotis. In den epithelialen Zellproliferaten und im Tumorstroma ist eine mittelstarke Färbung feststellbar.

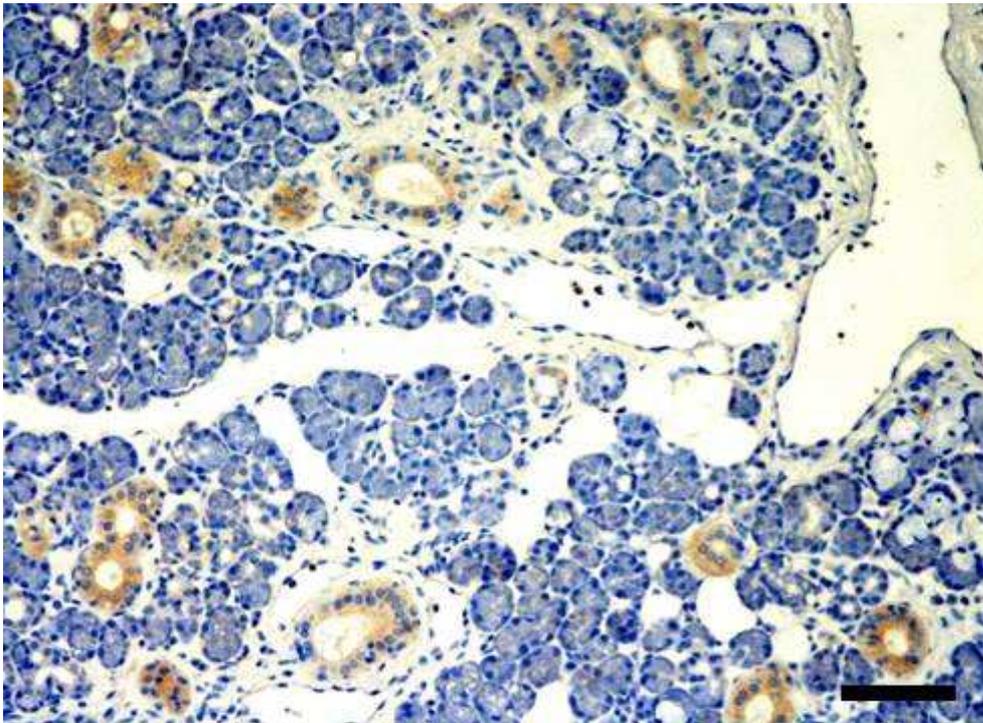


Abbildung 4.8: Glandula submandibularis, Immunhistochemischer Nachweis von Psoriasin, Balken entspricht 100 μm

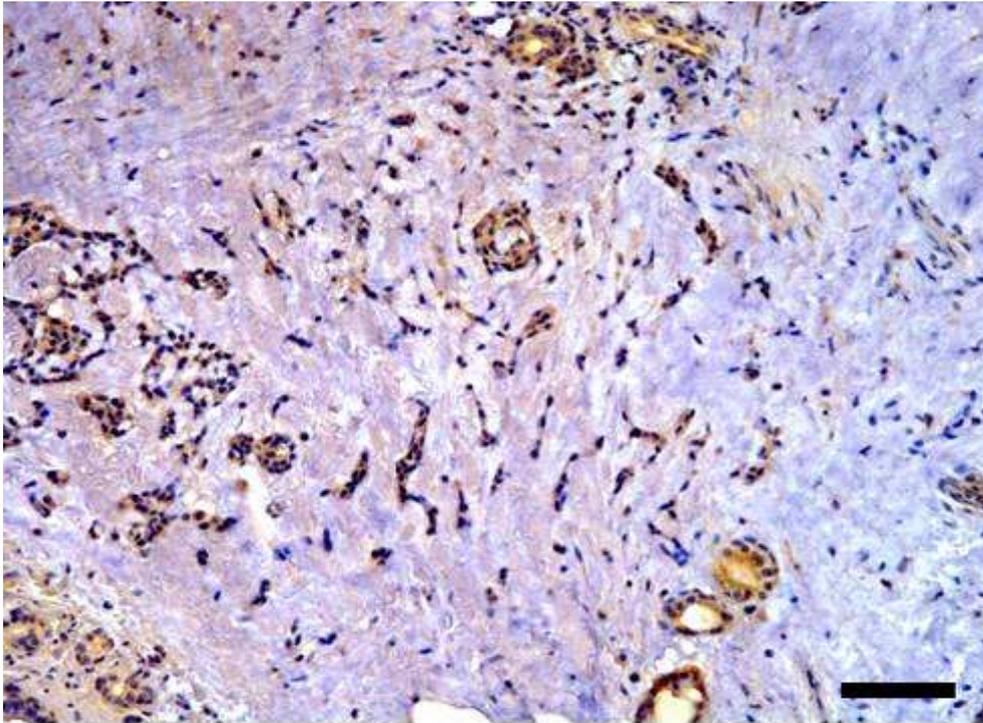


Abbildung 4.9: Pleomorphes Adenom der Glandula parotis, Immunhistochemischer Nachweis von Psoriasin, Balken entspricht 100 μm

4.2 Semiquantitative Auswertung

4.2.1 Auswertungssystem

Um die Ergebnisse semiquantitativ erfassen zu können, wurde jeweils ein spezieller Bereich der Gewebeschnitte durch Betrachten bei 150-facher (Objektiv 10 x) Vergrößerung mit Hilfe des Nikon Eclipse 80i Mikroskops ausgewählt und digital fotografiert. Die Auswahl der Areale konzentrierte sich auf Regionen mit Schalt-, Streifenstücken und interlobulären Ausführungsgängen, da hier die stärkste Färbung zu erkennen war. Sofern bei den Tumoren noch neoplastisch veränderte Gangstrukturen sichtbar waren, wurden diese Segmente für die Auswertung herangezogen. War im gesamten histologischen Schnitt keinerlei Drüsengewebe mehr auffindbar, wurde ein repräsentativer Bereich des Tumorgewebes für das Foto ausgewählt.

Die Beurteilung der Färbeintensität erfolgte getrennt durch 2 voneinander unabhängige Mitarbeiter. Dafür wurden 3 Intensitätsklassen mit den Attributen keine bis schwache Färbung, moderate Färbung und starke Färbung generiert und für diese jeweils aufsteigend Punktwerte von 1 (keine bis schwache Färbung, Klasse 1) bis 3 (starke Färbung, Klasse 3) vergeben. In Tabelle 4.1 ist das System der Punktevergabe nochmals verdeutlicht.

Tabelle 4.1: Einteilung der Färbeintensität in Punktwerte

Klassifikation	Färbeintensität	Punktwert
Klasse 1	keine bis schwache Färbung	1
Klasse 2	moderate Färbung	2
Klasse 3	starke Färbung	3

Die immunhistologischen Ergebnisse aller 3 untersuchten Defensine sowie von Psoriasisin wurden durch die semiquantitative Auswertung erfasst.

4.2.2 Ergebnisse der semiquantitativen Auswertung

Die Ergebnisse der semiquantitativen Auswertung der immunhistochemischen Testreihen für hBD-1, hBD-2, hBD-3 und Psoriasin bestätigten den bereits nur durch alleiniges Mikroskopieren der Gewebeschnitte gewonnenen Eindruck: Bei allen 4 untersuchten HDPs lag der ermittelte durchschnittliche Punktwert der Tumorgesamtgruppe (benigne und maligne Tumoren zusammengefasst) unter dem der Gruppe mit den gesunden Speicheldrüsenorgewebeprobe. Bei hBD-1, hBD-3 und Psoriasin betrug die Differenz mehr als 0,2 Punkte. Für das antimikrobielle Peptid hBD-2 war der Unterschied mit einer durchschnittlichen Punktzahl von 1,69 für die Fraktion der Gesundproben und von 1,53 für die Tumoren weniger deutlich. Tabelle 4.2, Tabelle 4.3, Tabelle 4.4 und Tabelle 4.5 geben detaillierte Informationen zu den für hBD-1, hBD-2, hBD-3 sowie zu Psoriasin ermittelten Punktwerten. In Tabelle 4.6 sind die Punktzahlen der einzelnen malignen Tumoren in Zusammenhang mit ihrem histologischen Differenzierungsgrad aufgeführt. Bei den 2 gering differenzierten, sowie bei einem hoch differenzierten Karzinom betrug der durchschnittliche Punktwert 1. Nur bei dem mäßig differenzierten und bei einem der beiden hoch differenzierten Malignomen lag der Durchschnitt für alle 4 gemessenen HDPs zusammen bei 1,75 Punkten.

4.2.2.1 Ergebnisse für hBD-1

Bei der immunhistologischen Färbung für das antimikrobielle Peptid hBD-1 wies der Großteil der gesunden Speicheldrüsen eine moderate Färbintensität auf. In der Tumorguppe gab es keinen Gewebeschnitt mit starker Färbung und der durchschnittliche Punktwert lag mit 1,41 deutlich unter dem entsprechenden Punktwert der gesunden Proben von 1,80. Tabelle 4.2 gibt einen Überblick der ermittelten Punktwerte.

Tabelle 4.2: Auswertung für hBD-1 mit dem Punktesystem

Gewebe	Gesamt (Anzahl)	Schwache Färbung (Anzahl)	Moderate Färbung (Anzahl)	Starke Färbung (Anzahl)	Punktwert (Durchschnitt)
Gesundes Gewebe	35	9	24	2	1,80
Tumoren (Gesamt)	17	10	7	0	1,41
Benigne Tumoren	12	7	5	0	1,42
Maligne Tumoren	5	3	2	0	1,40

4.2.2.2 Ergebnisse für hBD-2

Im Hauptanteil der Proben von gesunden Speicheldrüsen konnte das Defensin hBD-2 immunhistologisch mit mittlerer Färbeintensität nachgewiesen werden. Der durchschnittliche Punktwert lag mit 1,69 über den Tumoren, in deren Gruppe die meisten Gewebeschnitte nur schwache Anfärbbarkeit zeigten.

Tabelle 4.3: Auswertung für HBD-2 mit dem Punktesystem

Gewebe	Gesamt (Anzahl)	Schwache Färbung (Anzahl)	Moderate Färbung (Anzahl)	Starke Färbung (Anzahl)	Punktwert (Durchschnitt)
Gesundes Gewebe	35	12	22	1	1,69
Tumoren (Gesamt)	17	10	5	2	1,53
Benigne Tumoren	12	6	5	1	1,58
Maligne Tumoren	5	4	0	1	1,40

4.2.2.3 Ergebnisse für hBD-3

Das Peptid hBD-3 hatte bei den gesunden Speicheldrüsen einen durchschnittlichen Punktwert von 1,91. Die Gruppe der benignen und malignen Neoplasien hatte mit 1,47 Punkten im Durchschnitt eine weniger ausgeprägte Färbeintensität.

Tabelle 4.4: Auswertung für HBD-3 mit dem Punktesystem

Gewebe	Gesamt (Anzahl)	Schwache Färbung (Anzahl)	Moderate Färbung (Anzahl)	Starke Färbung (Anzahl)	Punktwert (Durchschnitt)
Gesundes Gewebe	35	5	28	2	1,91
Tumoren (Gesamt)	17	10	6	1	1,47
Benigne Tumoren	12	6	5	1	1,58
Maligne Tumoren	5	4	1	0	1,20

4.2.2.4 Ergebnisse für Psoriasin

Auch bei den Ergebnissen der immunhistologischen Testreihen für Psoriasin traten im Durchschnitt erkennbare Abweichungen in der Färbeintensität auf. Die gesunden Speicheldrüsen erreichten einen Punktwert von 1,80, während die Tumorguppe mit dem durchschnittlichen Punktwert von 1,59 als Ganzes betrachtet weniger stark anfärbbar war.

Tabelle 4.5: Die Auswertung für Psoriasin mit dem Punktesystem

Gewebe	Gesamt (Anzahl)	Schwache Färbung (Anzahl)	Moderate Färbung (Anzahl)	Starke Färbung (Anzahl)	Punktwert (Durchschnitt)
Gesundes Gewebe	35	13	16	6	1,80
Tumoren (Gesamt)	17	9	6	2	1,59
Benigne Tumoren	12	5	5	2	1,75
Maligne Tumoren	5	4	1	0	1,20

4.2.2.5 Die Auswertung der malignen Speicheldrüsentumoren mit dem Punktesystem

Die malignen Speicheldrüsentumoren zeigten bei allen 4 Peptiden überwiegend schwache oder mittlere immunhistologische Nachweisbarkeit. Die 2 Karzinome mit dem niedrigsten histologischen Differenzierungsgrad erreichten überall nur die geringste Färbintensität von 1 Punkt. Deutlich höher lagen das mäßig differenzierte Plattenepithelkarzinom einer Glandula parotis und das hoch differenzierte Mukoepidermoidkarzinom einer Glandulae palatinae mit einem durchschnittlichen Punktwert von 1,75. Aber auch das hoch differenzierte Adenoidzystische Karzinom der Gaumenspeicheldrüsen zeigte bei den immunhistochemischen Tests aller 4 HDPs durch schwache oder keine Färbung. (Punktwert 1)

Tabelle 4.6: Auswertung der Färbintensität der Karzinome mit dem Punktesystem

Histologischer Befund	Drüse	Differenzierung	HBD-1	HBD-2	HBD-3	Psoriasin	Punktwert (Durchschnitt)
Mukoepidermoidkarzinom	Parotis	Gering	1	1	1	1	1
Plattenepithelkarzinom	Parotis	Gering	1	1	1	1	1
Plattenepithelkarzinom	Parotis	Mäßig	2	1	2	2	1,75
Mukoepidermoidkarzinom	Glandulae palatinae	Hoch	2	3	1	1	1,75
Adenoidzystisches Karzinom	Glandulae palatinae	Hoch	1	1	1	1	1

5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Studie war es, mit Hilfe von immunhistologischen Methoden, Kenntnisse über die Proteinexpression der HDPs hBD-1, hBD-2, hBD-3 und Psoriasin sowohl in gesundem Speicheldrüsengewebe als auch in benignen und malignen Tumoren zu erhalten und miteinander zu vergleichen. Durch die Ergebnisse dieser Untersuchung konnte das antimikrobielle Peptid Psoriasin erstmalig in Speicheldrüsen und Speicheldrüsentumoren nachgewiesen werden. Das bisherige Wissen über die Expression der Defensine hBD-1, hBD-2 und hBD-3 konnte durch die hier vorliegende Studie überwiegend bestätigt und erweitert werden. Die Anfärbbarkeit und damit die Höhe der Proteinexpression von hBD-1, hBD-2, hBD-3 und Psoriasin war sowohl in den gutartigen als auch in den bösartigen Neoplasien schwächer als in den Proben mit gesundem Drüsengewebe.

5.1 Reduzierte Expression von hBD-1 in Speicheldrüsentumoren

Das antimikrobielle Peptid hBD-1 wird in zahlreichen Epithelien konstitutiv exprimiert (Meyer und Harder, 2007, S. 2123). In vielen Tumorgewebeproben fehlt es jedoch oder ist deutlich reduziert (Prado-Montes de Oca, 2010, S. 803). Pantelis et al. stellten in pleomorphen Adenomen der Speicheldrüsen eine signifikant niedrigere Expression von hBD-1 mRNA fest als in gesunden Speicheldrüsen (Pantelis et al., 2009, S. 528). Möglicherweise geht in malignen Zellen durch Mutationen des Promoterpunktes für die mRNA-Polymerase die Expression von hBD-1 verloren (Sun et al., 2006, S. 8854). Auch maligne Tumoren der Niere und Prostata werden mit Mutationen des Promoters für das hBD-1 Gen in Verbindung gebracht (Kawsar et al., 2009, S. 696). Immunhistologische Untersuchungen betreffend berichteten sowohl Pantelis et al. als auch Wenghoefer et al. bei den pleomorphen Adenomen über eine teilweise Verlagerung des hBD-1 Peptids vom Zytoplasma in den Kern der Tumorzellen (Pantelis et al., 2009, S. 528, Wenghoefer et al., 2008, S. 3). In den Gewebeschnitten der malignen Speicheldrüsentumoren war diese Verschiebung von hBD-1 in den Nukleus und verminderte Expressi-

on noch ausgeprägter (Wenghoefer et al., 2008, S. 3). In den hier beschriebenen Untersuchungen konnte zwar, wie in den beiden Vergleichsstudien, eine verminderte Expression von hBD-1 in den benignen und noch deutlicher in den malignen Speicheldrüsentumoren festgestellt werden, eine gleichzeitige Akkumulation in den Zellkernen war jedoch nicht erkennbar. Eine mögliche Erklärung könnten die vor allem zu Beginn der immunhistochemischen Färbungen teilweise von den beiden anderen Studien abweichenden Arbeitsschritte sein. Zusätzlich ist aufgrund der in der hier vorliegenden Studie relativ geringen Anzahl, histomorphologischen Vielfalt und unterschiedlichen Differenzierungsgrade der Karzinome ein direkter Vergleich nicht uneingeschränkt möglich. Da die Expression von hBD-1 in den Tumoren der hier vorliegenden Studie trotz nicht erkennbarer Akkumulation des Peptids im Zellkern reduziert war, unterstützen die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung dennoch die Vermutung, dass hBD-1 ein Tumorsuppressor ist. Es konnte auch schon gezeigt werden, dass ein synthetisch hergestelltes hBD-1 die Proliferation der Zelllinie eines Blasenkarzinoms hemmt oder auch die Apoptose von Zellen eines Nierenkarzinoms bewirkt (Sun et al., 2006, S. 8547). Bullard et al. induzierten die Expression von hBD-1 in Zellkulturen von Prostatakarzinomen und berichteten über eine durch Veränderungen in ihren Membranen und die Aktivierung von Caspase hervorgerufene Zerstörung der Tumorzellen (Bullard et al., 2008, S. 847). Es wäre daher sinnvoll, die Wirkung von hBD-1 auch auf Zellkulturen von Speicheldrüsenkarzinomen zu testen, um herauszufinden, ob und durch welche molekularen Mechanismen dieses antimikrobielle Peptid das Potential aufweist deren Tumorzellen direkt oder indirekt negativ zu beeinflussen.

5.2 Reduzierte Expression von hBD-2 in Speicheldrüsentumoren

Die Bildung des antimikrobiellen Peptids hBD-2 ist in Epithelien vor allem durch die Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen und Mikroorganismen induzierbar (Abiko und Saitoh, 2007, S. 3066). Interessanterweise war in der hier vorliegenden Studie die hBD-2 Expression in den Proben mit gesundem Speicheldrüsen Gewebe, also die konstitutive Expression, auch schwächer als bei den anderen 3 nachgewiesenen Peptiden. Trotzdem war auch die Proteinexpression von hBD-2 in den Tumoren der hier vorliegenden Studie weniger ausgeprägt als in den meisten Gesundkontrollen.

Es wurde bereits gezeigt, dass hBD-2 in oralen malignen Tumoren exprimiert wird (Mizukawa et al., 2000, S. 2005). In pleomorphen Adenomen fanden Pantelis et al. eine um mehr als die Hälfte niedrigere hBD-2 mRNA Expression als in gesundem Speicheldrüsengewebe. In der gleichen Studie konnte jedoch auf immunhistologischer Ebene in den Gewebestrukturen der 5 untersuchten pleomorphen Adenome keinerlei Expression des hBD-2 Peptids lokalisiert werden (Pantelis et al., 2009, S. 528). In der hier vorliegenden Arbeit wurde hingegen in allen 9 pleomorphen Adenomen, den 2 Adenolymphomen (Warthin-Tumoren) und dem Myoepitheliom eine, wenn auch häufig abgeschwächte, immunhistochemische Färbung von hBD-2 festgestellt. Wenghoefer et al. berichten in Übereinstimmung mit den hier präsentierten Ergebnissen zwar ebenso über eine hBD-2 Expression im Zytoplasma der Tumorzellen von allen 3 untersuchten pleomorphen Adenomen, jedoch traf dies nicht auf die 2 Zystadenolymphome und eines der beiden Onkozytome ihrer Studie zu (Wenghoefer et al., 2008, S. 4). Eine Erklärung für diese Abweichung könnte teilweise die in allen 3 Studien unterschiedliche Schichtdicke der vorbereiteten Gewebeschnitte sein, da Pantelis et al. mit nur 1µm die schwächste Nachweisbarkeit hatten, die bei Wenghoefer et al. mit 2µm und in der hier vorliegenden Studie mit 4µm deutlicher wurde (Pantelis et al., 2009, S. 527, Wenghoefer et al., 2008, S. 2). Außerdem darf wiederum die auf alle 3 Studien zutreffende geringe Fallzahl und der gleichzeitig große histologische Variantenreichtum der Speicheldrüsentumoren nicht außer Acht gelassen werden, weshalb die Ergebnisse nicht für alle Tumorsubtypen repräsentativ sein können und nur Hinweise aufzeigen.

Mizukawa et al. entdeckten im Jahr 2001 das Peptid hBD-2 in einem Mukoepithelkarzinom und beschrieben, dass Mukoepithelkarzinome in ihrem Expressionsverhalten teilweise Plattenepithelkarzinomen ähneln und dass basale Zellen sowohl Mukoepithel- als auch Plattenepithelkarzinome generieren könnten (Mizukawa et al., 2001, S. 2174). In der hier vorliegenden Studie gab es 2 Mukoepithelkarzinome, von denen das hoch differenzierte eine starke Färbung und das gering differenzierte nur eine sehr schwache Färbungsintensität aufwies. Abiko et al. konnten moderate bis starke Expression in den keratinisierten Bereichen von gut differenzierten Plattenepithelkarzinomen feststellen (Abiko et al., 2001, S. 250). In der hier dargestellten Studie hatten jedoch auch das hoch differenzierte Adenoidzystische Karzinom der Gaumenspeicheldrüsen und das mäßig differenzierte Plattenepithelkarzinom der Glandula parotis nur schwache hBD-2 immunhistologische Anfärbbarkeit, wobei hier wiederum zu bedenken ist, dass das histologische Muster eines Plattenepithelkarzinoms der Haut oder Schleimhaut nur bedingt mit einem Adenoidzystischen Karzinom zu vergleichen ist. Im Zusammenhang mit der Graduierung und Prognose des Plattenepithelkarzinoms der Glandula parotis ist jedoch interessant, dass die Gruppe um Lang et al. diese Malignome grundsätzlich als „*high-grade*“ Karzinome einstuft (Lang et al., 2005, S. 825). Das mäßig differenzierte Plattenepithelkarzinom dieser Stufe wäre somit als biologisch aggressiv einzustufen und niedrige Expression von hBD-2 wäre auch hier mit hohem Malignitätsgrad vergesellschaftet. Zusammengefasst zeigte die hier vorgelegte Arbeit, etwas

weniger deutlich als bei hBD-1 und hBD-3, auch bei hBD-2 in der semiquantitativen Auswertung, bei den Karzinomen und auch in der Gesamtbetrachtung der benignen und malignen Tumoren durchschnittlich eine schwächere Expression des HDP hBD-2 als bei den Gewebeproben der gesunden Speicheldrüsen. Dies stimmt teilweise mit den Ergebnissen von Wenghoefer et al. überein, die in Plattenepithelkarzinomen der Mundschleimhaut eine um mehr als die Hälfte verminderte hBD-2 mRNA Expression im Vergleich mit gesunder Gingiva feststellten (Wenghoefer et al., 2008, S. 661). Auch Meyer et al. fanden in mit *Candida albicans* infizierten Tonsillenkarzinomen eine niedrigere hBD-2 mRNA Nachweisbarkeit als in gesunden Tonsillen. (Meyer et al., 2004, S. 1029). Im Gegensatz dazu untersuchten Sawaki et al. 2002 die Konzentration von hBD-2 in Plattenepithelkarzinomen durch HPLC (*high performance liquid chromatography*) und stellten in den malignen Läsionen höhere Werte als im gesunden Vergleichsgewebe fest. Die Autoren berichteten weiter, dass die hBD-2 Konzentrationen unabhängig von der TNM Stadien der Karzinome waren und dass diejenigen Patienten mit höherem hBD-2 Level nach den Operationen einen besseren Gesundungsverlauf und geringere Metastasenbildung zeigten (Sawaki et al., 2002, S. 2106). Diese teilweise stark abweichenden Ergebnisse fordern zu weiteren umfangreichen Studien auf, um die Rolle von hBD-2 in Tumoren des Kopf- und Halsbereichs weiter zu klären.

5.3 Reduzierte hBD-3-Expression in Speicheldrüsentumoren

Das Peptid hBD-3 besitzt ein großes antimikrobielles Spektrum und seine Expression kann durch TNF- α und Bakterien induziert werden (Harder et al., 2001, S. 5712). Wie hBD-1 und hBD-2, scheint auch hBD-3 Bedeutung bei der Pathogenese von oralen Plattenepithelkarzinomen zu haben (Meyer und Harder, 2007, S. 3122). Pantelis et al. fanden jedoch keinen Unterschied zwischen der hBD-3 mRNA Expression in pleomorphen Adenomen und gesundem Speicheldrüsenngewebe. Ähnlich der hier vorgestellten Studie zeigten die Ergebnisse der immunhistologischen Tests jedoch im gesunden Gewebe das typische Expressionsmuster für hBD-3 in Speicheldrüsen, während in den neoplastisch umgewandelten Strukturen nur noch sporadische Färbung für das hBD-3 Peptid erkennbar war (Pantelis et al., 2009, S. 528). Wenghoefer et al., untersuchten 7 benigne und 7 maligne Speicheldrüsentumoren und entdeckten, außer der teilweisen Akkumulation von hBD-3 in den Zellkernen eines einzigen Karzinoms, keine wesentlichen Unterschiede zu der Lokalisation dieses Peptids in gesundem Speicheldrüsenngewebe (Wenghoefer et al., 2008, S. 4). Wenghoefer et al. richteten bei ihrer Auswertung das

Interesse jedoch hauptsächlich auf die Lokalisation des Peptids und quantifizierten nur den jeweiligen Anteil von Zellen mit positiver Färbung im Nukleus gegenüber dem Anteil von Zellen mit positiver Färbung im Zytoplasma, während sie zur Gesamtbeurteilung der Expression von hBD-3 keine genaueren Angaben machten (Wenghoefer et al., 2008, S. 4). In der hier vorgelegten Arbeit war die mit semiquantitativen Methoden entwickelte, durchschnittliche Punktzahl als Maßstab für die Färbeintensität, bei den Karzinomen deutlich niedriger als bei den Proben mit gesundem Speicheldrüsengewebe. Nur Yoshimoto et al. kamen zu teilweise ähnlichen Ergebnissen, da sie die hBD-3 Expression in Plattenepithelkarzinomen durch in situ Hybridisierung untersuchten und nur in 4 von 20 OSSCs Signale für hBD-3 fanden. Sie stellten jedoch auch keine hBD-3 Expression in normalem, weit von der Entnahmestelle der Plattenepithelkarzinom entfernten Epithel fest (Yoshimoto et al., 2003, S. 4632). Andere Ergebnisse lieferte die Studie von Kesting et al., in der die immunhistochemischen Färbung in oralen Plattenepithelkarzinomen stark und deutlich intensiver als in nicht neoplastischen Gewebe war, was sich auch bei der hBD-3 mRNA Expression signifikant nachweisen ließ. Außerdem war die Expression in den gut differenzierten Tumoren deutlich höher als in den weniger gut differenzierten Neubildungen (Kesting et al., 2009, S. 578). Auch Wenghoefer et al. berichteten über eine 6,5 fach höhere hBD-3 mRNA Expression in oralen Plattenepithelkarzinomen als in gesunder Gingiva (Wenghoefer et al., 2008, S. 662).

Die Rolle von hBD-3 bei der Entstehung und Progression von oralen Plattenepithelkarzinomen scheint sehr komplex zu sein und bedarf weiterer Untersuchungen, um die zugrunde liegenden Mechanismen zu verstehen und die Expression von hBD-3 eventuell als klinischen Prognoseparameter und Referenzwert für ein molekulares Staging nutzen zu können (Kesting et al., 2009, S. 580). Diese Forderungen treffen sicher in mindestens dem gleichen Maße auf die Notwendigkeit von diagnostischen Markern für maligne Speicheldrüsentumoren zu.

5.4 Konstitutive Expression von Psoriasin in gesundem Speicheldrüsengewebe und reduzierte Expression von Psoriasin in Speicheldrüsentumoren

Das Expressionsmuster von Psoriasin in gesundem Speicheldrüsengewebe ähnelte sehr stark den Ergebnissen bei den Defensinen. Da die Färbeintensität zum Lumen der Ausführungsgänge häufig etwas stärker war, ist dies ein Indiz dafür, dass die Speicheldrüsen Psoriasin sezernieren und damit vermutlich ihr Gangsystem vor Infektionen schützen können. Da Meyer et al. bereits Psoriasin im Speichel entdeckt haben, liefert die hier vorliegende Studie wichtige Erkenntnisse über den Produktionsort dieses antimikrobiellen Peptids. Wahrscheinlich trägt Psoriasin auf diese Weise, wie in der äußeren Haut, auch zur Gesunderhaltung der oralen Schleimhaut bei (Meyer und Harder, 2007, S. 3120).

Wie bei den 3 Defensinen der hier vorliegenden Studie war auch die Expression des antimikrobiellen Peptids Psoriasin in gesundem Speicheldrüsengewebe deutlich stärker als im Gewebe der Tumoren.

Dieses Ergebnis widerspricht vielen Veröffentlichungen, in denen das S100A7 schon als Tumormarker für Brustkrebs und andere epitheliale Karzinomtypen beschrieben worden ist (Celis et al., 1996, S. 2111, Krop et al., 2005, S. 11332, Moubayed et al., 2007, S. 256, Ralhan et al., 2008, S. 1168). Unter anderem zeigte sich bei *Carcinoma in situ* Tumoren der menschlichen Brustdrüse eine Korrelation zwischen dem Expressionslevel von S100A7 und Faktoren, die mit einer ungünstigen Prognose zusammenhängen (Emberley et al., 2004, S. R313). In einer Xenograft Versuchsreihe mit Nacktmäusen bewirkte die absichtlich verminderte Expression von Psoriasin eine eindeutige Reduktion des Tumorwachstums der zuvor durch Injektion von Karzinomzellen aus einer Brustkrebszellkultur (MDA-MB-468) in den Mäusen induzierten malignen Neoplasien. Jedoch wurde in der gleichen Studie im *in vitro* Experiment bei einer Senkung der Psoriasinlevel eine erhöhte Zellmigration und -invasion festgestellt (Krop et al., 2005, S. 11328). Bei genauerem Hinsehen scheint die funktionelle Rolle von Psoriasin bei der Tumorentwicklung und -progression also sehr vielschichtig zu sein (Zhou et al., 2008, S. 1). Zum Beispiel zeigten die höher differenzierten Plattenepithelkarzinome der Blase eine stärkere Expression von Psoriasin als die geringer ausdifferenzierten (Martinsson, Yhr et al. 2005, S. 165, Ostergaard et al., 1997, S. 4113). Martinsson et al. berichteten über eine deutlich stärkere Expression von Psoriasin in *Carcinoma in situ* Tumoren und in den gut differenzierten Regionen von Plattenepithelkarzinomen der Haut als in den geringer differenzierten Karzinomanteilen und stellen dabei auch eine Korrelation zwischen dem Peptidlevel von S100A7 und dem Grad der Keratinozytendifferenzierung

fest (Martinsson et al., 2005, S. 167). Diese Ergebnisse haben teilweise Parallelen zu der hier vorliegenden Studie, da in der Gruppe der Karzinome die stärkste Psoriasinexpression in der Gewebeprobe eines zumindest mäßig differenzierten, verhornendem Plattenepithelkarzinom der Glandula parotis festgestellt werden konnte. Zhou et al. zeigten, dass Psoriasin in gut differenzierten oralen Plattenepithelkarzinomen stärker als in den schlechter differenzierten, invasiven Varianten exprimiert wurde und beobachteten außerdem eine negative Korrelation zwischen der β -catenin Signalübertragung und der Höhe der Psoriasinexpression (Zhou et al., 2008, S. 10). In der hier vorgestellten Untersuchung war ein Mukoepidermoidkarzinom der Gaumenspeicheldrüsen das am höchsten differenzierteste Malignom, das jedoch, wie die 2 gering differenzierten Karzinome, nur schwache Psoriasinexpression aufwies. Eine Erklärung könnte der histomorphologische Aufbau dieser Karzinomvariante sein, da Mukoepidermoidkarzinome überwiegend aus Zysten mit mukoiden, schleimbildenden Zellen bestehen (Lang et al., 2005, S. 822). Bereits bei den immunhistochemischen Tests für Psoriasin in gesunden Speicheldrüsen konnte in der hier vorgestellten Untersuchung in den mukösen Endstücken keine Expression von S100A7 gefunden werden.

Kesting et al. stellten in den Frühstadien der Plattenepithelkarzinome und nicht metastasierenden Formen eine signifikant höhere Psoriasin mRNA Expression fest als in Karzinomen im fortgeschrittenem Stadium oder metastasierenden Malignomen (Kesting et al., 2009, S. 735). In der hier vorliegenden Studie hatten 2 der gering differenzierten Karzinome bereits Lymphknotenmetastasen gebildet und nur kaum Psoriasinexpression gezeigt.

Zusammengefasst passen die oben genannten Veröffentlichungen zumindest teilweise zu der hier vorliegenden Studie, in der die benignen Tumoren und das mäßig differenzierte Karzinom eine stärkere immunhistologische Nachweisbarkeit von Psoriasin aufwiesen, als die nur schlecht differenzierten Karzinome. Jedoch war die durchschnittliche Expression in gesundem Speicheldrüsengewebe deutlich höher als in den Tumoren, während diese in anderen Studien häufig niedriger war (Kesting et al., 2009, S. 734). Man muss jedoch berücksichtigen, dass Psoriasin erstmals in gesundem Speicheldrüsengewebe und in Speicheldrüsentumoren immunhistochemisch nachgewiesen wurde und die Ergebnisse daher ohnehin nur bedingt mit vorausgegangenen Untersuchungen an anderen Gewebearten verglichen werden können. Man hat zum Beispiel festgestellt, dass der Differenzierungsgrad der Keratinozyten bei der Psoriasinexpression der Haut, von Basaliomen, von *Carcinomata in situ* und von Plattenepithelkarzinomen eine wichtige Rolle spielt (Martinsson et al., 2005, S. 164). Die Ergebnisse dieser Studie zeigen jedoch, dass Psoriasin in den Speicheldrüsen vor allem in den Epithelzellen der Drüsenausführungsgänge exprimiert wird, was die histologischen Unterschiede verdeutlicht. Da Plattenepithelzellen und sekretorische Epithelzellen von unterschiedlichen Stammzelllinien abstammen, ist dies auch eine mögliche Erklärung für die teilweise abweichenden Ergebnisse für die Expression von Psoriasin bei Karzinomen der Brustdrüsen

und Plattenepithelkarzinomen (Zhou et al., 2008, S. 10). Ein weiterer Diskussionspunkt für die allgemeingültige Aussagekraft und Übertragbarkeit der hier vorgestellten Ergebnisse ist die nur relativ geringe Fallzahl von 5 Karzinomen und das Fehlen von *Carcinoma in situ* Tumoren. Einige benigne Speicheldrüsentumoren, wie pleomorphe Adenome oder Myoepitheliome, besitzen jedoch auch das Potential zu einer möglichen malignen Transformation (Weber et al., 2002, S. 428). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie unterstützen die These, dass S100A7 auch als Tumorsuppressor fungieren kann (Zhou et al., 2008, S. 11). Ob Psoriasin als Marker für eine beginnende maligne Progression (Kesting et al., 2009, S. 735) auch bei Speicheldrüsentumoren in Frage kommt, sollte durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

5.5 Welche Bedeutung hat die reduzierte HDP-Expression bei der Entstehung von Speicheldrüsentumoren ?

Die molekularen Abläufe bei der Entwicklung von Speicheldrüsentumoren sind immer noch nicht ausreichend geklärt (Lujan et al., 2010, S. 510).

Defensine scheinen in einigen Tumortypen eine veränderte oder reduzierte Expression aufzuweisen, was eine Einbindung dieser Peptide bei der Tumorentwicklung wahrscheinlich macht (Shestakova et al., 2010, S. 273). Die humanen Defensine befinden sich alle in einem Cluster auf dem kurzen Arm des Chromosoms 8 (Meyer und Harder, 2007, S. 3123). Bei zahlreichen malignen Tumoren im Kopf- und Halsbereich wurde ein Defekt des Allels auf 8p festgestellt (Field et al., 1995, S. 1182, Scholnick et al., 1996, S. 1680, Sunwoo et al., 1996, S. 164). Bei 39% der pleomorphen Adenome und häufig bei Karzinomen ex pleomorphem Adenom konnte eine Veränderung auf dem Chromosom 8q12 beobachtet werden (Cheuk, Chan et al. 2007, S. 15). Es ist also durchaus denkbar, dass die für Defensine codierenden Gene die Funktionen von Tumorsuppressorgenen haben (Abiko et al., 2007, S. 183). Außerdem koordinieren β -Defensine die Zusammenarbeit der angeborenen mit der adaptiven Immunabwehr und haben somit möglicherweise eine weitere wichtige Rolle bei der Bekämpfung von Tumorzellen. (Diamond und Ryan, 2011, S. 4). Die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie unterstützen diese These, da die Expression der in dieser Studie untersuchten *host defense peptides* hBD-1, hBD-2 und hBD-3 in den Speicheldrüsentumoren reduziert war. Noch nicht veröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe zeigten außerdem erstmalig, dass auch die durch RT-PCR quantifizierte Expression der mRNA der Defensine hBD-

1, hBD-2, hBD-3 und auch des S100 Proteins Psoriasin in benignen und malignen Speicheldrüsentumoren deutlich niedriger als in gesundem Speicheldrüsenengewebe war. Andererseits lässt sich die Rolle der β -Defensine nicht ohne weiteres auf einen Nenner bringen (Diamond und Ryan, 2011, S. 5). Bereits bei der bisher ausführlicher erforschten Bedeutung der Defensine bei der Pathogenese von oralen Karzinomen gibt es stark abweichende Erkenntnisse (Kawsar et al., 2009, S. 700). Ähnliches trifft vermutlich auch auf das HDP Psoriasin zu, das in dieser Studie das erste Mal in Speicheldrüsen und Speicheldrüsentumoren nachgewiesen wurde. Aufgrund fehlender Vergleichsstudien ist eine Einordnung der hier gewonnenen Erkenntnisse nur mit Hilfe der Ergebnisse aus Untersuchungen mit anderen Tumorentitäten möglich. Aber auch bezüglich der Bedeutung der schon mehrfach untersuchten Expression von Psoriasin bei der Pathogenese von oralen Plattenepithelkarzinomen bleiben noch Fragen offen (Kesting et al., 2009, S. 735). Diese eher duale Rolle als gleichzeitiger Tumorsuppressor und Onkogen scheint jedoch auch auf andere HDPs wie zum Beispiel das Cathelicidin LL-37 zuzutreffen. Die Expression von LL-37 wird in malignen Brust- und Lungentumoren hochreguliert und scheint dort die Zellproliferation und Metastasierung zu begünstigen, während dieses Peptid in Magenkrebs dereguliert wird und dabei das Tumorstadium eher hemmt (Wu et al., 2010, S. 1745). Möglicherweise spielen bei dieser unterschiedlichen Wirkung aber auch Faktoren und intramolekulare Abläufe eine Rolle, die noch unbekannt sind oder bis dato noch nicht ausreichend verstanden werden. Da HDPs aber der Immunabwehr angehören ist eventuell auch ihre Überexpression in Tumorgewebe nur eine Art überschießende Reaktion des Immunsystems um beispielsweise eine drohende Metastasierung zu vermeiden, die aber nicht immer Erfolg hat. Möglicherweise sind HDPs somit zwar Biomarker für einige Tumorerkrankungen oder eine mögliche Progression aber keine begünstigenden Faktoren.

Um die molekularen Vorgänge bei der Pathogenese von Speicheldrüsentumoren noch besser verstehen und bereits gewonnene Erkenntnisse weiter absichern und prüfen zu können, sind weitere breit gefächerte Studien mit möglichst hohen Fallzahlen und idealerweise pathohistologisch ähnlichen Tumorvarianten nötig.

5.6 HDPs als alternative Chemotherapeutika der Zukunft?

Die Entwicklung neuer medikamentöser Therapeutika, die vor allem für Patienten mit malignen Speicheldrüsentumoren in fortgeschrittenen Stadien wichtig wären, ist aufgrund der Seltenheit dieser Neoplasien eine besondere Herausforderung. Klinische Studien mit Herceptin (Trastuzumab) oder EGFR (*epidermal growth factor receptor*) Antagonisten zeigten noch nicht den gewünschten Erfolg (Lujan et al., 2010, S. 510).

Da die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie eine reduzierte Expression der untersuchten HDPs in den Speicheldrüsentumoren zeigten, stellt sich auch die Frage nach einer potentiellen therapeutischen Anwendung der antimikrobiellen Peptide.

Das *host defense peptid* hBD-1 scheint auch für Speicheldrüsentumoren ein Tumorsuppressor zu sein. Künftige Studien müssen klären, ob DEFB1 Elicitoren oder das Peptid hBD-1 selbst als alternative Therapie in Frage kommt (Prado-Montes de Oca, 2010, S. 803).

Denkbar wäre auch der Einsatz von HDPs als Immuntherapeutika. Das Cathelicidin LL-37 wird zum Beispiel als immunstimulierendes Therapeutikum für die körpereigene Abwehr bei der Elimination der Tumorzellen diskutiert (Wu et al., 2010, S. 1744). Möglicherweise könnten HDPs auch durch Induktion der Apoptose und erhöhter Membranpermeabilität die Tumorzelle initial schwächen und somit empfindlicher für eine geplante Radio- und Chemotherapie machen (Xu et al., 2008, S. 1596).

Xu et al. konnten zeigen, dass die über ein Plasmid induzierte intrazelluläre Expression des α -Defensin HNP-1 sowohl *in vitro* als auch im Xenograft Modell an Nacktmäusen das Wachstum von Tumorzellen eines humanen Lungenadenokarzinoms hemmen konnte (Xu et al., 2008, S. 1594). Steinstraesser et al. generierten ein synthetisches onkolytisches *host defense peptid* und testeten dessen Potential *in vitro* an Tumorzellen eines Liposarkoms sowie *in vivo* durch Xenografts an Nacktmäusen. In der Zelllinie des Sarkoms zeigten sich starke zytotoxische und antiproliferative Auswirkungen und bei den Tieren konnte eine Remission des Tumolvolumens festgestellt werden (Steinstraesser et al., 2011, S. 3003). Das neu entwickelte Arzneimittel und HDP Glutoxim/nov-002 (Pharma BAM/Noveios) befindet sich bereits in Phase II der klinischen Prüfung und wird in diesem Rahmen in Nordamerika als Medikament gegen Lungenkrebs verabreicht (Steinstraesser et al., 2011, S. 329).

Diese Berichte und die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie ermutigen dazu, auch für die Gruppe der Speicheldrüsentumoren in Zukunft ähnlich konzipierte Studien durchzuführen.

6 Zusammenfassung

Die Tumoren der Speicheldrüsen repräsentieren 2%-3% aller Neoplasien im Kopf- und Halsbereich und nur 0,3% aller Krebserkrankungen. Die Diagnostik und Therapie dieser Tumoren ist jedoch häufig aufgrund ihrer anatomischen Nähe zum Nervus facialis und ihrer histologischen Vielfalt eine Herausforderung. Trotz Weiterentwicklungen im Bereich postoperativer Radiotherapie und auch Chemotherapie ist die Prognose von Speicheldrüsenkarzinomen in fortgeschrittenen Stadien häufig noch ungünstig. Geeignete Prognoseparameter, die eine frühzeitigere histologische Identifikation und somit besser angepasste Therapien der besonders aggressiven Malignome ermöglichen, wären hier von großem klinischem Nutzen.

Das Wissen über die molekularen Abläufe bei der Entstehung von Speicheldrüsentumoren ist noch unvollständig. In den letzten Jahren gibt es jedoch immer mehr Hinweise, dass sogenannte *host defense peptides* (HDPs), auch antimikrobielle Peptide genannt, als Effektormoleküle des angeborenen Immunsystems auch bei der Abwehr von malignen Prozessen im Körper eine Rolle spielen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass einige Tumoren eine veränderte Expression bestimmter HDPs aufweisen.

In dieser Studie wurde die immunhistochemische Nachweisbarkeit der antimikrobiellen Peptide beta-Defensin (hBD) -1, -2, -3 und Psoriasin (S100A7) in Proben von gesundem Speicheldrüsenparenchym (n = 35), Proben von benignen Speicheldrüsentumoren (n = 12) sowie Proben von malignen Speicheldrüsentumoren (n = 5) untersucht. Die durch die ABC-Methode erzielten Färbungen der Gewebeschnitte wurden mit 150-facher Vergrößerung fotografiert und entsprechend ihrer Färbeintensitäten und Muster deskriptiv beurteilt. Zusätzlich erfolgte eine semiquantitative Auswertung der Färbeergebnisse durch die Einordnung in 3 Intensitätsklassen, für die jeweils aufsteigend Punkte (1-3) vergeben wurden.

Die Expression von hBD-1, hBD-2, hBD-3 und Psoriasin war in der Mehrzahl der benignen und malignen Speicheldrüsentumoren geringer als in den Proben mit gesundem Speicheldrüsenparenchym. Die Unterschiede waren für alle 4 HDPs etwa gleich ausgeprägt. Überwiegend war die Expression aller untersuchten Peptide in den malignen Tumoren noch niedriger als im Großteil der benignen Speicheldrüsentumoren. Daraus lässt

sich die Schlussfolgerung ziehen, dass die reduzierte Expression von hBD-1, hBD-2, hBD-3 und Psoriasin bei der Pathogenese von Speicheldrüsentumoren eine Rolle spielt.

Die Kenntnisse über die verminderte Expression der einzelnen HDPs in benignen und malignen Speicheldrüsentumoren im Vergleich mit gesundem Speicheldrüsengewebe geben Anlass zu der Vermutung, dass HDPs Bedeutung bei der körpereigenen Immunabwehr gegen Tumorzellen besitzen, deren Potential und Präsenz möglicherweise aber mit fortschreitender Malignität abnimmt.

Die Ergebnisse dieser Studie fordern zu weiteren Untersuchungen von HDPs in der histologisch sehr variantenreichen Gruppe der Speicheldrüsentumoren auf, um das bisherige Wissen über die Funktionen der antimikrobiellen Peptide bei der Tumorgenese zu erweitern und somit die Suche nach molekularen Markern oder möglicherweise sogar alternativen Chemotherapeutika fortzusetzen.

7 Literaturverzeichnis

- 1 Abiko Y., Nishimura M., Kaku T.
Defensins in saliva and the salivary glands
Med Electron Microsc. 36 (2003) 247-52
- 2 Abiko Y., Saitoh M.
Salivary defensins and their importance in oral health and disease
Curr Pharm Des. 13 (2007) 3065-72
- 3 Abiko Y., Saitoh M., Nishimura M., Yamazaki M., Sawamura D., Kaku T.
Role of beta-defensins in oral epithelial health and disease
Med Mol Morphol. 40 (2007) 179-84
- 4 Abiko Y., Suraweera A.K., Nishimura M., Arakawa T., Takuma T.,
Mizoguchi T., Kaku T.
Differential expression of human beta-defensin 2 in keratinized and
non-keratinized oral epithelial lesions; immunohistochemistry and in situ hybridization
Virchows Arch. 438 (2001) 248-53
- 5 Al-Haddad S., Zhang Z., Leygue E., Snell L., Huang A., Niu Y.,
Hiller-Hitchcock T., Hole K., Murphy L.C., Watson P.H.
Psoriasin (S100A7) expression and invasive breast cancer
Am J Pathol. 155 (1999) 2057-66
- 6 Bals R.
Antimicrobial peptides and peptide antibiotics
Med Klin (Munich). 95 (2000) 496-502
- 7 Banerjee A., Bhattacharyya G.I., Vishwanatha J.K.
Identification of genes and molecular pathways involved in the progression of
pre-malignant oral epithelia
Mol Cancer Ther. 4 (2005) 865-75

- 8 Beisswenger C., Bals R.
Functions of antimicrobial peptides in host defense and immunity
Curr Protein Pept Sci. 6 (2005) 255-64

- 9 Bensch K.W., Raida M., Magert H.J., Schulz-Knappe P., Forssmann W.G.
hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma
FEBS Lett. 368 (1995) 331-5

- 10 Bevins C., Martin-Porter L.E., Ganz T.
Defensins and innate host defence of the gastrointestinal tract
Gut. 45 (1999) 911-5

- 11 Bjorndal K., Krogdahl A., Therkildsen M.H., Overgaard J., Johansen J.,
Kristensen C.A., Homoe P., Sorensen C.H., Andersen E., Bundgaard T.,
Primdahl H., Lambertsen K., Andersen L.J., Godballe C.
Salivary gland carcinoma in Denmark 1990-2005: a national study of incidence,
site and histology. Results of the Danish Head and Neck Cancer Group (DA-
HANCA)
Oral Oncol. 47 (2011) 677-82

- 12 Boman H.G.
Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts
J Intern Med. 254 (2003) 197-215

- 13 Bonass W.A., High A.S., Owen, P.J., Devine D.J.
Expression of beta-defensin genes by human salivary glands
Oral Microbiol Immunol. 14 (1999) 371-4

- 14 Brahmachary M., Krishnan S.P., Koh J.L., Khan A.M., Seah S. H.,
Tan T.W., Brusica V., Bajic V.B.
ANTIMIC: a database of antimicrobial sequences
Nucleic Acids Res. 32 (2004) D586-9

- 15 Bullard R.S., Gibson W., Bose S.K., Belgrave J.K., Eaddy A.C.,
Wright C.J., Hazen-Martin D.J., Lage J.M., Keane T.E., Ganz T.A.,
Donald C.D.
Functional analysis of the host defense peptide Human Beta Defensin-1:
new insight into its potential role in cancer
Mol Immunol. 45 (2008) 839-48

- 16 Celis J.E., Rasmussen H.H., Vorum H., Madsen P., Honore B., Wolf H., Orntoft T.F.
Bladder squamous cell carcinomas express psoriasin and externalize it to the urine
J Urol. 155 (1996) 2105-12

- 17 Chernysh S., Kim S. I., Bekker G., Pleskach V.A., Filatova N.A., Anikin V.B., Platonov V.G., Bulet P.
Antiviral and antitumor peptides from insects
Proc Natl Acad Sci U S A. 99 (2002) 12628-32

- 18 Cheuk W., Chan J.K.
Advances in salivary gland pathology
Histopathology. 51 (2007) 1-20

- 19 Cruciani R.A., Barker J.L., Zasloff M., Chen H.C., Colamonici O.
Antibiotic magainins exert cytolytic activity against transformed cell lines through channel formation
Proc Natl Acad Sci U S A. 88 (1991) 3792-6

- 20 Dale B.A., Fredericks L.P.
Antimicrobial peptides in the oral environment: expression and function in health and disease
Curr Issues Mol Biol. 7 (2005) 119-33

- 21 De Smet K., Contreras R.
Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins
Biotechnol Lett. 27 (2005) 1337-47

- 22 Diamond G., Ryan L.
Beta-defensins: what are they REALLY doing in the oral cavity?
Oral Dis (2011) Epub ahead of print

- 23 Donald C.D., Sun C.Q., Lim S.D., Macoska J., Cohen C., Amin M.B., Young A.N., Ganz T.A., Marshall F.F., Petros J.A.
Cancer-specific loss of beta-defensin 1 in renal and prostatic carcinomas
Lab Invest. 83 (2003) 501-5

- 24 Droin N., Hendra J.B., Ducoroy P., Solary E.
Human defensins as cancer biomarkers and antitumour molecules
J Proteomics. 72 (2009) 918-27

- 25 Dunsche A., Acil Y., Dommisch H., Siebert H., Schroder J.M., Jepsen S.
The novel human beta-defensin-3 is widely expressed in oral tissues
Eur J Oral Sci. 110 (2002) 121-4

- 26 Eckert R.L., Broome A.M., Ruse M., Robinson N., Ryan D., Lee K.
S100 proteins in the epidermis
J Invest Dermatol. 123 (2004) 23-33

- 27 Emberley E.D., Alowami S., Snell L., Murphy L.C., Watson P.H.
S100A7 (psoriasin) expression is associated with aggressive features and alteration of Jab1 in ductal carcinoma in situ of the breast
Breast Cancer Res. 6 (2004) R308-15

- 28 Enerback C., Porter D.A., Seth P., Sgroi D., Gaudet J., Weremowicz S., Morton C.C., Schnitt S., Pitts R.L., Stampf J., Barnhart K., Polyak K.
Psoriasin expression in mammary epithelial cells in vitro and in vivo
Cancer Res. 62 (2002) 43-7

- 29 Fernandez de Caleyra R., Gonzalez-Pascual B., Garcia-Olmedo F., Carbonero P.
Susceptibility of phytopathogenic bacteria to wheat purothionins in vitro
Appl Microbiol. 23 (1972) 998-1000

- 30 Field J.K., Kiaris H., Risk J.M., Tsiriyotis C., Adamson R., Zoumpourlis V., Rowley H., Taylor K., Whittaker J., Howard P., Beirne J.C., Gosney J.R., Woolgar J., Vaughan E.D., Spandidos D.A., Jones A.S.
Allelotype of squamous cell carcinoma of the head and neck: fractional allele loss correlates with survival
Br J Cancer. 72 (1995) 1180-8

- 31 Gambichler T., Skrygan M., Huyn J., Bechara F. G., Sand M., Altmeyer P., Kreuter A.
Pattern of mRNA expression of beta-defensins in basal cell carcinoma
BMC Cancer. 6 (2006) 163

- 32 Ganz T., Selsted M.E., Szklarek D., Harwig S.S., Daher K., Bainton D.F., Lehrer R.I.
Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils
J Clin Invest. 76 (1985) 1427-35
- 33 Garcia J.R., Jaumann F., Schulz S., Krause A., Rodriguez-Jimenez J., Forssmann U., Adermann K., Kluver E., Vogelmeier C., Becker D., Hedrich R., Forssmann W.G., Bals R.
Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction
Cell Tissue Res. 306 (2001) 257-64
- 34 Gehrking E., Gehrking I., Moubayed P.
Surgery of benign tumors of the parotid gland: the value of fine needle aspiration cytology
HNO. 55 (2007) 195-201
- 35 Glaser R., Harder J., Lange H., Bartels J., Christophers E., Schroder J.M.
Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from *Escherichia coli* infection
Nat Immunol. 6 (2005) 57-64
- 36 Hancock R.E., Scott M.G.
The role of antimicrobial peptides in animal defenses
Proc Natl Acad Sci U S A. 97 (2000) 8856-61
- 37 Harder J., Bartels J., Christophers E., Schroder J.M.
Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic
J Biol Chem. 276 (2001) 5707-13
- 38 Harder J., Bartels J., Christophers E., Schroder J.M.
A peptide antibiotic from human skin
Nature. 387 (1997) 861
- 39 Hirsch T., Jacobsen F., Steinau H.U., Steinstraesser L.
Host defense peptides and the new line of defence against multiresistant infections
Protein Pept Lett. 15 (2008) 238-43

- 40 Hoskin D., Ramamoorthy W.A.
Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides
Biochim Biophys Acta. 1778 (2008) 357-75
- 41 Jaehne M., Roeser K., Jaekel T., Schepers J.D., Albert N., Loning T.
Clinical and immunohistologic typing of salivary duct carcinoma: a report of 50 cases
Cancer. 103 (2005) 2526-33
- 42 Kawsar H.I., Weinberg A., Hirsch S.A., Venizelos A., Howell S., Jiang B., Jin G.
Overexpression of human beta-defensin-3 in oral dysplasia: potential role in macrophage trafficking
Oral Oncol. 45 (2009) 696-702
- 43 Kesting M.R., Loeffelbein D.J., Hasler R.J., Wolff K.D., Rittig A., Schulte M., Hirsch T., Wagenpfeil S., Jacobsen F., Steinstraesser L.
Expression profile of human beta-defensin 3 in oral squamous cell carcinoma
Cancer Invest. 27 (2009) 575-81
- 44 Kesting M.R., Sudhoff H., Hasler R.J., Nieberler M., Pautke C., Wolff K.D., Wagenpfeil S., Al-Benna S., Jacobsen F., Steinstraesser L.
Psoriasin (S100A7) up-regulation in oral squamous cell carcinoma and its relation to clinicopathologic features
Oral Oncol. 45 (2009) 731-6
- 45 Krop I., Marz A., Carlsson H., Li X., Bloushtain-Qimron N., Hu M., Gelman R., Sabel M.S., Schnitt S., Ramaswamy S., Kleer C.G., Enerback C., Polyak K.
A putative role for psoriasin in breast tumor progression
Cancer Res. 65 (2005) 11326-34
- 46 Lang S., Rotter N., Lorenzen A., Ihrler S., Eckel R., Holzel D., Rasp G., Wollenberg B., Sommer K.
Salivary gland carcinomas Part II. Diagnosis and therapy
HNO. 53 (2005) 905-11; quiz 912-3

- 47 Lang S., Rotter N., Lorenzen A., Ihrler S., Eckel R., Holzel D., Rasp G., Wollenberg B., Sommer K.
Salivary gland carcinomas. 1. Epidemiology, etiology, malignancy criteria, prognostic parameters and classification
HNO. 53 (2005) 817-26; quiz 827-8
- 48 Larrick J.W., Hirata M., Balint R.F., Lee J., Zhong J., Wright S.C.
Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein
Infect Immun. 63 (1995) 1291-7
- 49 Lehrer R.I., Ganz T.
Defensins of vertebrate animals
Curr Opin Immunol. 14 (2002) 96-102
- 50 Leivo I.
Insights into a complex group of neoplastic disease: advances in histopathologic classification and molecular pathology of salivary gland cancer
Acta Oncol. 45 (2006) 662-8
- 51 Lichtenstein A., Ganz T., Selsted M.E., Lehrer R.I.
In vitro tumor cell cytolysis mediated by peptide defensins of human and rabbit granulocytes
Blood. 68 (1986) 1407-10
- 52 Liu A.Y., Destoumieux D., Wong A.V., Park C.H., Valore E.V., Liu L., Ganz T.
Human beta-defensin-2 production in keratinocytes is regulated by interleukin-1, bacteria, and the state of differentiation
J Invest Dermatol. 118 (2002) 275-81
- 53 Liu G., Zheng H., Zhang Z., Wu Z., Xiong H., Li J., Song L.
Overexpression of sphingosine kinase 1 is associated with salivary gland carcinoma progression and might be a novel predictive marker for adjuvant therapy
BMC Cancer. 10 (2010) 495

- 54 Lujan B., Hakim S., Moyano S., Nadal A., Caballero M., Diaz A., Valera A., Carrera M., Cardesa A., Alos L.
Activation of the EGFR/ERK pathway in high-grade mucoepidermoid carcinomas of the salivary glands
Br J Cancer. 103 (2010) 510-6
- 55 Ma X.T., Xu B., An L.L., Dong C.Y., Lin Y.M., Shi Y., Wu K.F.
Vaccine with beta-defensin 2-transduced leukemic cells activates innate and adaptive immunity to elicit potent antileukemia responses
Cancer Res. 66 (2006) 1169-76
- 56 Madani G., Beale T.
Tumors of the salivary glands
Semin Ultrasound CT MR. 27 (2006) 452-64
- 57 Mader J.S., Hoskin D.W.
Cationic antimicrobial peptides as novel cytotoxic agents for cancer treatment
Expert Opin Investig Drugs. 15 (2006) 933-46
- 58 Madsen P., Rasmussen H.H., Leffers H., Honore B., Dejgaard K., Olsen E., Kiil J., Walbum E., Andersen A.H., Basse B., Lauridsen J. B., Ratz G.P., Celis, A., Vandekerckhove J., Celis J.E.
Molecular cloning, occurrence, and expression of a novel partially secreted protein "psoriasin" that is highly up-regulated in psoriatic skin
J Invest Dermatol. 97 (1991) 701-12
- 59 Martinsson H., Yhr M., Enerback C.
Expression patterns of S100A7 (psoriasin) and S100A9 (calgranulin-B) in keratinocyte differentiation
Exp Dermatol. 14 (2005) 161-8
- 60 Mathews M., Jia H.P., Guthmiller J.M., Losh G., Graham S., Johnson G.K., Tack B.F., McCray P.M.
Production of beta-defensin antimicrobial peptides by the oral mucosa and salivary glands
Infect Immun. 67 (1999) 2740-5

- 61 McKeown S.T., Lundy F.T., Nelson J., Lockhart D., Irwin C.R., Cowan C.G., Marley J.J.
The cytotoxic effects of human neutrophil peptide-1 (HNP1) and lactoferrin on oral squamous cell carcinoma (OSCC) in vitro
Oral Oncol. 42 (2006) 685-90
- 62 Meyer J.E., Harder J.
Antimicrobial peptides in oral cancer
Curr Pharm Des. 13 (2007) 3119-30
- 63 Meyer J.E., Harder J., Gorogh T., Weise J.B., Schubert S., Janssen D., Maune S.
Human beta-defensin-2 in oral cancer with opportunistic Candida infection
Anticancer Res. 24 (2004) 1025-30
- 64 Mizukawa N., Sawaki K., Nagatsuka H., Kamio M., Yamachika E., Fukunaga J., Ueno T., Takagi S., Sugahara T.
Human alpha-and beta-defensin immunoreactivity in oral mucoepidermoid carcinomas
Anticancer Res. 21 (2001) 2171-4
- 65 Mizukawa N., Sawaki K., Yamachika E., Fukunaga J., Ueno T., Takagi S., Sugahara T.
Presence of human beta-defensin-2 in oral squamous cell carcinoma
Anticancer Res. 20 (2000) 2005-7
- 66 Moubayed N., Weichenthal M., Harder J., Wandel E., Sticherling M., Glaser R.
Psoriasin (S100A7) is significantly up-regulated in human epithelial skin tumours
J Cancer Res Clin Oncol. 133 (2007) 253-61
- 67 Murakami M., Ohtake T., Dorschner R. A., Gallo R.L.
Cathelicidin antimicrobial peptides are expressed in salivary glands and saliva
J Dent Res. 81 (2002) 845-50
- 68 Nishimura M., Abiko Y., Kurashige Y., Takeshima M., Yamazaki M., Kusano K., Saitoh M., Nakashima K., Inoue T., Kaku T.
Effect of defensin peptides on eukaryotic cells: primary epithelial cells, fibroblasts and squamous cell carcinoma cell lines
J Dermatol Sci. 36 (2004) 87-95

- 69 Ostergaard M., Rasmussen H.H., Nielsen H.V., Vorum H., Orntoft T.F., Wolf H., Celis J.E.
Proteome profiling of bladder squamous cell carcinomas: identification of markers that define their degree of differentiation
Cancer Res. 57 (1997) 4111-7
- 70 Ouhara K., Komatsuzawa H., Yamada S., Shiba H., Fujiwara T., Ohara M., Sayama K., Hashimoto K., Kurihara H., Sugai M.
Susceptibilities of periodontopathogenic and cariogenic bacteria to antibacterial peptides, {beta}-defensins and LL37, produced by human epithelial cells
J Antimicrob Chemother. 55 (2005) 888-96
- 71 Palfy R., Gardlik R., Behuliak M., Kadasi L., Turna J., Celec P.
On the physiology and pathophysiology of antimicrobial peptides
Mol Med. 15 (2009) 51-9
- 72 Pantelis A., Wenghoefer M., Haas S., Merkelbach-Bruse S., Pantelis D., Jepsen S., Bootz F., Winter J.
Down regulation and nuclear localization of human beta-defensin-1 in pleomorphic adenomas of salivary glands
Oral Oncol. 45 (2009) 526-30
- 73 Papo N., Shai Y.
Host defense peptides as new weapons in cancer treatment
Cell Mol Life Sci. 62 (2005) 784-90
- 74 Pazgier M., Hoover D.M., Yang D., Lu W., Lubkowski J.
Human beta-defensins
Cell Mol Life Sci. 63 (2006) 1294-313
- 75 Prado-Montes de Oca E.
Human beta-defensin 1: a restless warrior against allergies, infections and cancer
Int J Biochem Cell Biol. 42 (2010) 800-4
- 76 Ralhan R., Desouza L.V., Matta A., Chandra Tripathi S., Ghanny S., Datta Gupta S., Bahadur S., Siu K.W.
Discovery and verification of head-and-neck cancer biomarkers by differential protein expression analysis using iTRAQ labeling, multidimensional liquid chromatography, and tandem mass spectrometry
Mol Cell Proteomics. 7 (2008) 1162-73

- 77 Sahasrabudhe K.S., Kimball J.R., Morton T.H., Weinberg A., Dale B.A.
Expression of the antimicrobial peptide, human beta-defensin 1, in duct cells of minor salivary glands and detection in saliva
J Dent Res. 79 (2000) 1669-74
- 78 Sawaki K., Mizukawa N., Yamaai T., Yoshimoto T., Nakano M., Sugahara T.
High concentration of beta-defensin-2 in oral squamous cell carcinoma
Anticancer Res. 22 (2002) 2103-7
- 79 Schoenfeld J.D., Sher D.J., Norris C.M., Haddad R.I., Posner M.R., Balboni T.A., Tishler R.B.
Salivary Gland Tumors Treated With Adjuvant Intensity-Modulated Radiotherapy With or Without Concurrent Chemotherapy
Int J Radiat Oncol Biol Phys. (2010)
- 80 Scholnick S.B., Haughey B.H., Sunwoo J.B., el-Mofty S.K., Baty J.D., Piccirillo J.F., Zequeira M.R.
Chromosome 8 allelic loss and the outcome of patients with squamous cell carcinoma of the supraglottic larynx
J Natl Cancer Inst. 88 (1996) 1676-82
- 81 Schweizer F.
Cationic amphiphilic peptides with cancer-selective toxicity
Eur J Pharmacol. 625 (2009) 190-4
- 82 Selsted M.E., Ouellette A.J.
Mammalian defensins in the antimicrobial immune response
Nat Immunol. 6 (2005) 551-7
- 83 Shestakova T., Zhuravel E., Bolgova L., Zaitsev S., Efanova O., Soldatkina M., Pogrebnoy P.
Immunohistochemical analysis of beta-defensin-2 expression in human lung tumors
Exp Oncol. 32 (2010) 273-6
- 84 Steinstraesser L., Koehler T., Jacobsen F., Daigeler A., Goertz O., Langer S., Kesting M., Steinau H., Eriksson E., Hirsch T.
Host defense peptides in wound healing
Mol Med. 14 (2008) 528-37

- 85 Steinstraesser L., Kraneburg U., Jacobsen F., Al-Benna S.
Host defense peptides and their antimicrobial-immunomodulatory duality
Immunobiology. 216 (2011) 322-33
- 86 Steinstraesser L., Schubert C., Hauk J., Becerikli M., Stricker I., Koeller M.
Hatt H., von Duering M., Shai Y., Steinau H.U., Jacobsen F.
Oncolytic designer host defense peptide suppresses growth of human liposarcoma
Int J Cancer. 128 (2011) 2994-3004
- 87 Stoeckelhuber M., Messmer E.M., Schubert C., Stoeckelhuber B.M., Koehler C.,
Welsch U., Bals R.
Immunolocalization of defensins and cathelicidin in human glands of Moll
Ann Anat. 190 (2008) 230-7
- 88 Sun C.Q., Arnold R., Fernandez-Golarz C., Parrish A.B., Almekinder T., He J.,
Ho S.M., Svoboda P., Pohl J., Marshall F.F., Petros J.A.
Human beta-defensin-1, a potential chromosome 8p tumor suppressor: control of
transcription and induction of apoptosis in renal cell carcinoma
Cancer Res. 66 (2006) 8542-9
- 89 Sunwoo J.B., Holt M.S., Radford D.M., Deeker C., Scholnick S.B.
Evidence for multiple tumor suppressor genes on chromosome arm 8p in
supraglottic laryngeal cancer
Genes Chromosomes Cancer. 16 (1996) 164-9
- 90 Tao R., Jurevic R.J., Coulton K.K., Tsutsui M.T., Roberts M.C., Kimball J.R.,
Wells N., Berndt J., Dale B.A.
Salivary antimicrobial peptide expression and dental caries experience in children
Antimicrob Agents Chemother. 49 (2005) 3883-8
- 91 Targa-Stramandinoli R., Torres-Pereira C., Piazzetta C.M., Giovanini A.F.,
Amenabar J.M.
Minor salivary gland tumours: a 10-year study
Acta Otorrinolaringol Esp. 60 (2009) 199-201
- 92 Watson P.H., Leygue E.R., Murphy L.C.
Psoriasin (S100A7)
Int J Biochem Cell Biol. 30 (1998) 567-71

- 93 Weber A., Langhanki L., Schutz A., Gerstner A., Bootz F., Wittekind C., Tannapfel A.
Expression profiles of p53, p63, and p73 in benign salivary gland tumors
Virchows Arch. 441 (2002) 428-36
- 94 Wehkamp J., Bals R., Kreft B., Schröder J., Stange E.F.
Innate immunity-the clinical significance of endogenous antimicrobial peptides in internal medicine and dermatology
Deutsches Ärzteblatt
104 (2007) 257-265
- 95 Wenghoefer M., Pantelis A., Dommisch H., Gotz W., Reich R., Berge S., Martini M., Allam J.P., Jepsen S., Merkelbach-Bruse S., Fischer H.P., Novak N., Winter J.
Nuclear hBD-1 accumulation in malignant salivary gland tumours
BMC Cancer. 8 (2008) 290
- 96 Wenghoefer M., Pantelis A., Dommisch H., Reich R., Martini M., Allam J.P., Novak N., Berge S., Jepsen S., Winter J.
Decreased gene expression of human beta-defensin-1 in the development of squamous cell carcinoma of the oral cavity
Int J Oral Maxillofac Surg. 37 (2008) 660-3
- 97 Winder D., Gunzburg W.H., Erfle V., Salmons B.
Expression of antimicrobial peptides has an antitumour effect in human cells
Biochem Biophys Res Commun. 242 (1998) 608-12
- 98 Woo J.S., Jeong J.Y., Hwang Y.J., Chae S.W., Hwang S.J., Lee H.M.
Expression of cathelicidin in human salivary glands
Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 129 (2003) 211-4
- 99 Wu W.K., Wang G., Coffelt S.B., Betancourt A.M., Lee C.W., Fan D., Wu K., Yu J., Sung J.J., Cho C.H.
Emerging roles of the host defense peptide LL-37 in human cancer and its potential therapeutic applications
Int J Cancer. 127 (2010) 1741-7

- 100 Xu N., Wang Y.S., Pan W.B., Xiao B., Wen Y.J., Chen X.C., Chen L.J., Deng H.X., You J., Kann B., Fu A.F., Li D., Zhao X., Wie Y.Q.
Human alpha-defensin-1 inhibits growth of human lung adenocarcinoma xenograft in nude mice
Mol Cancer Ther. 7 (2008) 1588-97
- 101 Yoshimoto T., Yamaai T., Mizukawa N., Sawaki K., Nakano M., Yamachika E., Sugahara T.
Different expression patterns of beta-defensins in human squamous cell carcinomas
Anticancer Res. 23 (2003) 4629-33
- 102 Zanetti M., Gennaro R., Romeo D.
Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain
FEBS Lett. 374 (1995) 1-5
- 103 Zeya H.I., Spitznagel J.K.
Cationic proteins of polymorphonuclear leukocyte lysosomes. II. Composition, properties, and mechanism of antibacterial action
J Bacteriol. 91 (1966) 755-62
- 104 Zhou G., Xie T.X., Zhao M., Jasser S.A., Younes M.N., Sano D., Lin J., Kupferman M.E., Santillan A.A., Patel V., Gutkind J.S., Ei-Naggar A.K., Emberley A.D., Watson P.H., Matsuzawa S.I., Reed J.C., Myers J.N.
Reciprocal negative regulation between S100A7/psoriasin and beta-catenin signaling plays an important role in tumor progression of squamous cell carcinoma of oral cavity
Oncogene. 27 (2008) 3527-38

8 Danksagung

Meinen besonderen Dank möchte ich Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. dent. Marco Kesting für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie die stets ausgezeichnete und nette Betreuung bedanken. Auch Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Mechthild Stöckelhuber möchte ich für die immer freundliche Betreuung und große Hilfe bei der Arbeit im Labor und mit dem Mikroskop meinen Dank aussprechen.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Klaus-Dietrich Wolff und dem gesamten Team der Klinik und Poliklinik der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie sowie bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Henning Bier und dem gesamten Team der Klinik und Poliklinik für Hals- Nasen- und Ohrenheilkunde der Technischen Universität München im Klinikum rechts der Isar für die Unterstützung meiner Arbeit bedanken.

Mein Dank gilt auch allen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe, die mich durch ihre Kollegialität häufig motiviert haben.

Ich bedanke mich außerdem für die Nutzung der Geräte und Laborräume, um die immunhistochemischen Färbungen dieser Studie durchführen zu können.

Meiner Familie möchte ich besonders herzlichen Dank für die stetige Unterstützung und Motivation aussprechen.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Alexandra Kuppek
Geburtsdatum	08.02.1971 in Coburg

Schulbildung

1977 – 1981	Volksschule Weitramsdorf
1981 – 1990	Gymnasium Alexandrinum Coburg

Studium

1990 – 1992	Studium der Kommunikationswissenschaft und Politischen Wissenschaft an der Ludwig-Maximilians-Universität München
1992 – 1998	Studium der Zahnmedizin an der Friedrich- Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
Seit 2010	Postgraduales Universitätsstudium zum Master of Science Kieferorthopädie an der Donau-Universität Krems

Beruflicher Werdegang

11/1998 – 03/2000	Vorbereitungsassistentärztin in der Zahnarztpraxis Dr. U. Nedelko, Nürnberg
11/1999 – 06/2001	Vorbereitungsassistentärztin in der Zahnarztpraxis Dr. J. Stahl, Untersiemau
07/2001 – 12 /2008	Selbstständige Tätigkeit in Praxisgemeinschaft mit Dr. J. Stahl, Untersiemau
06/2009 – 12/2009	Assistentärztin in der Zahnarztpraxis Dr. F. Müller und S. Melde, Großhesselohe
06/2010 – 06/2011	Angestellte Zahnärztin in der Kieferorthopädischen Fachpraxis Dr. I. Schleiwies-Schmid, München
Seit 09/2011	Angestellte Zahnärztin in der Kieferorthopädischen Fachpraxis Dr. U. Schweißinger, Coburg