

Aus dem Bereich Medizinische Biochemie und Molekularbiologie  
Theoretische Medizin und Biowissenschaften  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

# **Anwendung nicht-invasiver Methoden für die Diagnostik und personalisierte Therapieplanung bei Kopf-Hals-Karzinomen**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes  
2020

vorgelegt von Florian Martin Bochen  
geboren am 6. 11. 1988 in Paderborn



Die Untersuchungen zur vorliegenden Promotionsarbeit wurden in Homburg an der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde und dem Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes durchgeführt.

Tag der Promotion: Dienstag, 4. Mai 2021

Dekan: Herr Prof. Dr. Michael Menger

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. Richard Zimmermann

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Alessandro Bozzato

Drittgutachterin: Frau Prof. Dr. Christine Peinelt

## Zusammenfassung

Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region (HNSCCs) sind eine der häufigsten Krebserkrankungen weltweit. Eine späte Diagnose, in meist fortgeschrittenem Stadium des Tumors, mit ausgeprägtem Befall der Lymphknoten und reduziertem Allgemeinzustand der Patienten stellt weiterhin eine deutliche Hürde für das klinische Management von HNSCCs dar. Darüber hinaus scheint die hohe molekulare Heterogenität einen individualisierten Therapieansatz zur erfolgreichen Behandlung zu erfordern. Trotz gewisser Fortschritte konnten bisher keine signifikanten Verbesserungen der Überlebensrate von HNSCC-Patienten erreicht werden; validierte Biomarker zur effizienten Therapiestratifizierung fehlen bis heute größtenteils. Eine möglichst frühe und potenziell nicht-invasive Form der Diagnosestellung und das bessere Verständnis der molekularen Tumorzellbiologie scheinen daher von übergeordneter Bedeutung für eine Verbesserung der Therapiekonzepte zu sein. Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein multifaktorieller Ansatz verfolgt werden, um einen möglichen Nutzen nicht-invasiver Methoden für die Diagnostik und personalisierte Therapieplanung zu überprüfen. Hierbei konnte mithilfe der flüssigkeitsbasierten Abstrichzytologie ein System entwickelt werden, welches ein hohes Potenzial für eine nicht-invasive Form der Diagnostik von HNSCCs bietet und darüber hinaus eine zuverlässige Bestimmung des HPV-Tumorstatus ermöglicht. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass abstrichzytologische Proben für molekulare Methoden zugänglich sind, welche bisher nur an invasiv gewonnenen Gewebeproben etabliert waren. In diesem Zusammenhang war es möglich, *SEC62* als potenziell tumorinduzierendes und migrationsstimulierendes Protoonkogen in der Entstehung von HNSCCs sowie von Zervixkarzinomen zu identifizieren. Zusätzlich konnte anhand minimal-invasiv entnommener Blutproben gezeigt werden, dass bei HNSCC-Patienten mit hoher Prävalenz ein ausgeprägter Vitamin D Mangel vorliegt. Dieser scheint dabei mit einer höheren Rate lymphogener Metastasierung, einem deutlich veränderten Profil der Immunzellinfiltration und einem signifikant verkürzten Gesamtüberleben verbunden zu sein. Durch Substitution von Vitamin D war es nachfolgend möglich, die antitumorale Immunaktivität der untersuchten Patienten deutlich zu steigern. Obwohl weitere Studien notwendig sind, um das genaue Potenzial der beschriebenen Methoden kritisch zu überprüfen, scheinen sie einen zentralen Ausgangspunkt für die personalisierte medizinische Behandlung von HNSCC-Patienten darstellen zu können.

## Summary

### **Application of non-invasive methods for diagnostics and personalized treatment planning in head and neck cancer**

Head and neck squamous cell carcinomas (HNSCCs) are one of the most common cancers worldwide. Delayed diagnosis, usually in an advanced stage of the tumor, with pronounced lymphatic metastasis and decreased general condition of the patients, remains a major challenge for the clinical management of HNSCCs. Furthermore, the high molecular heterogeneity seems to require an individualized therapeutic approach for successful treatment. Despite some progress, no significant improvements in survival rates of HNSCC patients have been achieved so far; validated biomarkers for efficient therapy stratification are still largely missing. Therefore, an early and potentially non-invasive form of diagnosis and a better understanding of the molecular tumor cell biology seem to be of overriding importance for an improvement of therapeutic concepts. In the context of this work, a multifactorial approach was pursued in order to verify a possible benefit of non-invasive methods for diagnostics and personalized treatment planning. Using liquid-based cytology, a system has been developed that offers a high potential for a non-invasive form of HNSCC diagnosis and also enables a reliable determination of the HPV tumor status. Furthermore, it could be shown that liquid-based cytology samples are accessible for molecular methods, which have so far only been established on invasively obtained tissue specimens. In this context, *SEC62* could be identified as a potential tumor-driving and migration-stimulating protooncogene in the development of HNSCC and cervical cancer. In addition, it was demonstrated using minimally invasive blood sampling that a pronounced vitamin D deficiency is highly prevalent in HNSCC patients. Low vitamin D serum levels seem to be associated with a higher rate of lymphatic metastasis, a markedly altered profile of immune cell infiltration and a significantly shortened overall survival. By substitution of vitamin D, it was subsequently possible to notably increase the antitumor immune response of the investigated patients. Although further studies are necessary to critically verify the exact potential of the described methods, they seem to be a central starting point for the personalized medical treatment of HNSCC patients.

## Abkürzungen und Fachbegriffe

Abb.	Abbildung
AMPS	Ammoniumperoxodisulfat
ANOVA	Varianzanalyse
ATPase	Adenosintriphosphatase
BAPTA	1,2-Bis(2-aminophenyl)-ethan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
betr.	betreffend
BiP	„immunoglobulin heavy-chain binding protein“
BMI	Body-Mass-Index
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
Ca <sup>2+</sup>	Calciumionen
ca.	circa
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CGH	komparative genomische Hybridisierung
cm	Zentimeter
CMV	Zytomegalievirus
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
d. h.	das heißt
DMEM	„Dulbecco's Modified Eagle Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	fetales Kälberserum
FFPE	Formalin-fixiertes und Paraffin-eingebettetes Gewebe
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde(n)
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	zweifach destilliertes Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	einfach destilliertes Wasser
HNSCC	Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region
HPV	Humane Papillomviren
HPV+	positiver HPV-Status
HPV-	negativer HPV-Status
ICC	Immunzytochemie
ICF	Immunzytofluoreszenz
IE	Internationale Einheit
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
kDa	Kilodalton
l	Liter
μ	mikro
m	milli
mm	Millimeter
M	Molarität, Stoffmengenkonzentration (mol/l)
mA	Milliampere
mRNA	„messenger“ Ribonukleinsäure
MW	Molekülmasse, Molekulargewicht
n	nano
N+	vorliegende Lymphknotenmetastase(n)
N-	keine Lymphknotenmetastasen
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	perkutane endoskopische Gastrostomie
pers.	persönlich

PET	Polyethylenterephthalat
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RM	Raue Mikrosomen
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SCC	Plattenepithelkarzinom
SCC-Puffer	Natriumcitrat-Salzlösung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SERCA	Sarko- und Endoplasmatische-Retikulum-Calcium-ATPase
siRNA	„small interfering“ Ribonukleinsäure
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TexR	Texas Red, Sulforhodamin
TFP	Trifluoperazin
TG	Thapsigargin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamin
Tween 20	Polysorbat 20
UdS	Universität des Saarlandes
UkS	Universitätsklinikum des Saarlandes
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenprozent („volume/volume“)
Vitamin D	sofern nicht anders angegeben Vitamin D <sub>3</sub>
vgl.	vergleiche
w/v	Gewichtsprozent („weight/volume“)
WB	Western Blot
WHO	Weltgesundheitsorganisation
$\bar{x}$	arithmetisches Mittel
z. B.	zum Beispiel
25-OH-Vitamin D	Calcidiol
95% CI	95% Konfidenzintervall
#	Bestellnummer

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>I</b>
<b>Summary</b>	<b>II</b>
<b>Abkürzungen und Fachbegriffe</b>	<b>III</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>VI</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region	1
1.1.1 Epidemiologie, Prognose und klinisches Management von HNSCCs	3
1.1.2 Risikofaktoren und molekulare Pathogenese von HNSCCs	7
1.2 Bedeutung des Gens <i>SEC62</i> für die molekulare Onkologie	11
1.3 Bedeutung der Vitamin D Versorgung vor dem Hintergrund onkologischer Erkrankungen	15
1.4 Ziele dieser Arbeit	19
<b>2. Ergebnisse</b>	<b>20</b>
2.1 Einfluss des Gens <i>SEC62</i> auf die Onkogenese des Zervixkarzinoms	20
2.1.1 Analyse der Expression von <i>SEC62</i> an zytologischem Abstrichmaterial dysplastischer Läsionen der Zervix	21
2.1.2 Auswirkungen der Expression von <i>SEC62</i> auf die Tumorzellbiologie des Zervixkarzinoms	24
2.2 Anwendung flüssigkeitsbasierter Abstrichzytologie zur Diagnostik von HNSCCs	27
2.2.1 Zytomorphologie von Kopf-Hals-Karzinomen	27
2.2.2 Nachweis des HPV-Status an zytologischem Abstrichmaterial	32
2.2.3 Analyse der Expression von <i>SEC62</i> an zytologischem Abstrichmaterial von HNSCC-Patienten	37
	VI

2.2.4	Einfluss des Gens <i>SEC62</i> auf die lymphogene Metastasierung von HNSCCs	40
2.2.4.1	Analyse und prognostische Relevanz der Expression von <i>SEC62</i>	40
2.2.4.2	Auswirkungen der Expression von <i>SEC62</i> auf die HNSCC-Tumorzellbiologie	44
2.3	Untersuchungen zur Vitamin D Versorgung bei HNSCC-Patienten	47
2.3.1	Prävalenz und prognostische Relevanz eines Vitamin D Mangels	47
2.3.2	Auswirkungen eines Vitamin D Mangels auf die tumorspezifische Immunfunktion und dessen prognostische Implikationen	54
2.3.3	Einfluss von Vitamin D auf die zytotoxische Aktivität Natürlicher Killerzellen von HNSCC-Patienten	60
<b>3.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>62</b>
3.1	Nutzen der flüssigkeitsbasierten Abstrichzytologie für die Diagnostik von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region	62
3.1.1	Nicht-invasive Malignitätsdiagnostik von HNSCCs	62
3.1.2	Nicht-invasive Analyse molekularer Biomarker	67
3.2	<i>SEC62</i> als Onkogen der chromosomalen Region 3q26	71
3.3	Auswirkungen und prognostische Implikationen eines Vitamin D Mangels bei HNSCC-Patienten	75
<b>4.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>80</b>
4.1	Allgemeine Materialien und Bezugsquellen	80
4.1.1	Chemikalien, Kits, Puffer und Lösungen	80
4.1.2	Geräte, zugehörige Software und Verbrauchsmaterialien	85
4.2	Von Patienten entnommenes Untersuchungsmaterial und grundlegende Analysen	89
4.2.1	Patientenmaterial	89

4.2.2	Klassifizierung, Staging und histopathologische Begutachtung von HNSCCs	89
4.2.3	Vitamin D Substitution von HNSCC-Patienten	90
4.2.4	Flüssigkeitsbasierte Abstrichzytologie	90
4.2.4.1	Färbung zytologischer Präparate nach Papanicolaou	91
4.2.4.2	Zytologische Diagnostik und Beurteilung der Zelldifferenzierung	91
4.2.5	Blutproben und darauf basierende Untersuchungen	92
4.2.6	Invasiv gewonnene Tumorgewebebeben	93
4.2.6.1	Hämatoxylinfärbung von FFPE-Schnittpräparaten	94
4.3	Proteinbiochemische Methoden	95
4.3.1	Antikörper	95
4.3.2	Raue Mikrosomen	96
4.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	97
4.3.4	Western Blot	98
4.3.5	Detektion und Quantifizierung von Proteinen auf PVDF-Membranen	99
4.3.6	CINtec Plus Färbung	100
4.3.7	SEC62-Immunzytochemie	101
4.3.8	Immunzytofluoreszenz	102
4.3.9	Immunhistochemie	104
4.4	Methoden der Zellkultur	107
4.4.1	Zelllinien	107
4.4.2	Kultivierung und Subkultivierung von humanen Zelllinien	107
4.4.3	Zellzählung	108
4.4.4	Präparation von Zelllysate	108
4.4.5	siRNA-vermittelte Gen-Stillegung	109
4.4.6	Plasmid-vermittelte Gen-Überexpression	110

4.5	Methoden der Zellanalyse	111
4.5.1	Echtzeit-Proliferationsanalyse	111
4.5.2	Migrationsanalyse	112
4.5.3	HPV-DNA-PCR	112
4.5.4	Komparative genomische Hybridisierung	113
4.5.5	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	114
4.5.6	Analyse der zytotoxische Aktivität Natürlicher Killerzellen	115
4.6	Statistische Analysen	116
<b>5.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>117</b>
	<b>Publikationen und Kongressbeiträge</b>	<b>136</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>140</b>

# 1. Einleitung

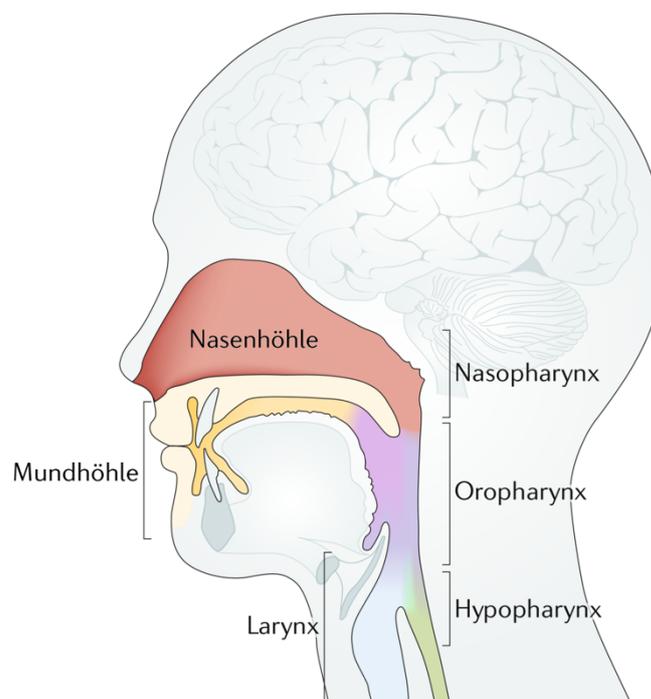
Weltweit stellen bösartige Gewebeneubildungen bereits zum jetzigen Zeitpunkt eine der häufigsten Todesursachen des Menschen dar. Hierbei ist über den Verlauf der letzten Jahrzehnte weiterhin eine deutliche Zunahme der Inzidenz wie auch der Mortalität dieses Krankheitsbildes zu beobachten. Die Ursachen hierfür scheinen komplex, jedoch an das allgemeine Bevölkerungswachstum, eine Alterung der Gesellschaft und diverse sozioökonomische Faktoren geknüpft zu sein (Bray *et al.*, 2018). Ausgehend von diesen Entwicklungen nimmt die Weltgesundheitsorganisation an, dass sich Krebserkrankungen als die größte Hürde für eine Verbesserung der nationalen Lebenserwartungen im 21. Jahrhundert herausstellen werden. Auch in Deutschland sind maligne Neoplasien, neben Krankheiten des Herz-Kreislaufsystems, mit über 24% die zweithäufigste Todesursache (Statistisches Bundesamt, Daten betr. 2018). Hierbei liegen aktuell eine 10-Jahres-Prävalenz von circa 3 Millionen, eine jährliche Neuerkrankungsrate von nahezu 500 000 betroffenen Patienten und eine absolute Überlebensrate von unter 50% vor (Robert Koch-Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V., 2019). Die meisten Krebserkrankungen gehen vom Deck- und Drüsengewebe aus, welches die inneren und äußeren Körperoberflächen auskleidet. Weltweit, wie auch in Deutschland, betrifft etwa die Hälfte aller Fälle das Epithel der Lunge, der Brustdrüse, der Prostata oder des Dickdarms (Bray *et al.*, 2018).

## 1.1 Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region

Krebserkrankungen der Kopf-Hals-Region stellen eine heterogene Gruppe verschiedener bösartiger Neubildungen dar. Sie umfassen hierbei Karzinome, welche vom Gewebe der oberen Atem- und Speisewege ausgehen, das heißt von der Mund- bzw. Nasenhaupthöhle und den Nasennebenhöhlen, der Zunge, den Regionen des Rachens (Pharynx) und vom Kehlkopf (Larynx; Abb. 1). Typischerweise handelt es sich bei über 90% der Fälle histologisch um Plattenepithelkarzinome, welche basierend auf dieser Klassifizierung auch als sogenannte HNSCCs („head and neck squamous cell carcinoma“) bezeichnet werden. Bei Manifestation des Tumors an von außen einsehbaren Lokalisationen sind

diese bereits oft mit dem Auge schon gut zu erkennen. Meist handelt es sich um knotig erhabene, geschwülstige Neoplasien, allerdings sind auch Formen mit oberflächlich nur geringen Veränderungen des Epithels und invasivem Wachstum in tieferen Gewebeschichten zu beobachten. Gleichwohl zeichnen sich beide Formen durch eine deutlich gesteigerte Gefäßzufuhr des Tumors aus. Eine Absiedlung der Krebszellen über die Blutbahn (hämatogene Metastasierung) ist selten und eher in fortgeschrittenen Stadien des Karzinoms zu beobachten. Dennoch kommt es in den meisten Fällen bereits zu einer frühen Invasion der Lymphgefäße, vor allem des Halsbereichs, und zu einer nachfolgenden Bildung von Lymphknotenmetastasen (World Health Organization & International Agency for Research on Cancer, 2005; Stenzinger *et al.*, 2014; World Health Organization & International Agency for Research on Cancer, 2017).

Die Mehrheit der weiteren Neoplasien wird mit etwa 5% hauptsächlich durch Adenokarzinome, vor allem der Speicheldrüsen, bestimmt (World Health Organization & International Agency for Research on Cancer, 2017). Aufgrund ihrer eher geringen Inzidenz, teilweise abweichender Ätiologie und meist differenter Pathogenese sollten sie und alle weiteren bösartigen Neubildungen der Kopf-Hals-Region im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht werden.



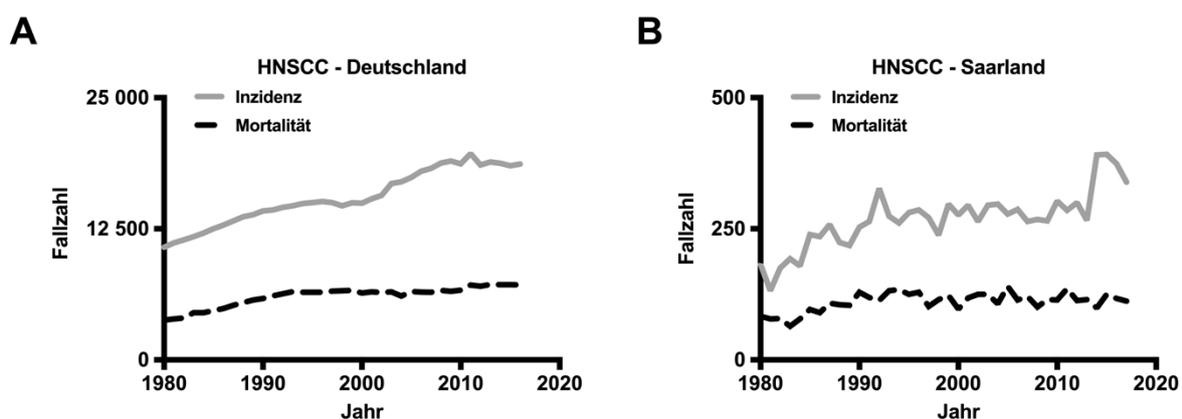
**Abb. 1: Schematische Darstellung der anatomischen Bezirke der Kopf-Hals-Region**  
(Abbildung modifiziert nach Cramer *et al.*, 2019).

### 1.1.1 Epidemiologie, Prognose und klinisches Management von HNSCCs

Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region gehören zu einer der häufigsten Krebserkrankungen weltweit und waren im Jahr 2018 für etwa eine Millionen Neuerkrankungen und den Tod von circa einer halben Million Patienten verantwortlich (Bray *et al.*, 2018). Mit über der Hälfte der Fälle sind die Mundhöhle und der obere Anteil des Rachens (Oropharynx) als Tumorlokalisationen am meisten betroffen, etwa ein Viertel aller Fälle geht von der Region des Kehlkopfs aus (Cramer *et al.*, 2019). In Deutschland erkrankten im Jahr 2016 circa 18 000 Patienten an einem HNSCC, wobei Männer hiervon etwa dreimal so häufig betroffen waren wie Frauen. Das mittlere Erkrankungsalter lag im Median bei 64 Jahren und damit deutlich unter dem Durchschnitt aller bösartigen Neubildungen insgesamt (70 Jahre). Die häufigsten Tumorlokalisationen waren im Einklang mit den weltweiten Beobachtungen die Mundhöhle und der Oropharynx; die Inzidenz von Larynxkarzinomen war verhältnismäßig höher, wobei hiervon vor allem Männer betroffen waren. Mehr als die Hälfte aller Tumoren wurde erst in einem sehr fortgeschrittenen Stadium (UICC IV) diagnostiziert. Hierbei war auffällig, dass eine Erstdiagnose bei Frauen durchweg in einem früheren Tumorstadium erfolgte als bei Männern. Diese Tatsache scheint sich auch in der relativen Überlebensrate widerzuspiegeln, welche bezogen auf 10 Jahre für Frauen mit 53% deutlich günstiger ausfällt, als für Männer mit 39% (Robert Koch-Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V., 2019). Ursächlich hierfür könnte von Bedeutung sein, dass Männern weiterhin einen höheren Anteil prognostisch ungünstiger Tabak- und Alkoholkonsum-assoziiertes Karzinome aufweisen (siehe Kapitel 1.1.2). Jedoch ist die relative Überlebensrate bei Diagnose eines HNSCCs für beide Geschlechter weiterhin verhältnismäßig niedrig und liegt merklich unter dem Durchschnitt der Gesamtheit aller Krebserkrankungen, welche nach aktuellen Schätzungen für Frauen in Deutschland bei 61% und für Männer bei 54% liegt (Robert Koch-Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V., 2019). Insgesamt entspricht die Inzidenz in Deutschland aktuell etwa dem europäischen Mittel, mit einer leicht überdurchschnittlichen Überlebensrate. Allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass innerhalb der EU besonders in Bezug auf die Sterblichkeit teils erhebliche regionale Unterschiede bestehen (Gatta *et al.*, 2015).

Betrachtet man die Entwicklung der Erkrankungsrate von HNSCCs in Deutschland, so fällt auf, dass nach einem deutlichen Anstieg bis Anfang der 1990er Jahre die Inzidenz bis in

die 2000er Jahre konstant bis rückläufig war (Abb. 2A). Dies lässt sich größtenteils durch eine in dem Zeitraum stattgefundenene Veränderung des Konsumprofils der hauptsächlichen Risikofaktoren Alkohol und Tabak erklären, aber auch durch eine geringere, vorher meist berufsbedingte Belastung durch Gefahrstoffexposition mit zum Beispiel Asbest, Nickel, polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen oder Holzstaub (Sturgis & Cinciripini, 2007; Robert Koch-Institut, 2010; Wyss *et al.*, 2013). Zwischen den Jahren 2000 und 2010 ist ein erneuter Anstieg der Inzidenz zu beobachten, welcher beide Geschlechter in gleichem Ausmaß betraf. Während sich in dieser Zeit der oben beschriebene Trend einer rückläufigen Inzidenz der typischerweise Noxen-induzierten Larynxkarzinome weiterhin fortsetzte, war eine signifikante Zunahme an Malignomen des Oropharynx festzustellen. Kausal scheint diese Entwicklung eng mit einer stetig zunehmenden Rate chronischer Infektionen mit Humanen Papillomviren (HPV) der Hochrisikotypen verbunden zu sein (Chaturvedi *et al.*, 2013; Pytynia *et al.*, 2014; Wienecke & Kraywinkel, 2019). Seit dem Jahr 2011 verlaufen die Erkrankungsraten für HNSCCs in Deutschland nahezu konstant, wobei für Männer sogar eine leicht rückläufige Inzidenz festzustellen ist. Die Mortalitätsraten orientieren sich über den gesamten beobachteten Zeitraum für beide Geschlechter im Wesentlichen an der Gesamtinzidenz (Abb. 2A). Eine etwa zehnpromtente Zunahme der relativen 5-Jahres-Überlebensrate seit den frühen 2000er Jahren scheint sich auf den zunehmenden Anteil HPV-assoziiertes HNSCCs zurückführen zu lassen, welche sich im Verlauf der Krankheit oft als prognostisch günstiger darstellen (Benson *et al.*, 2014).



**Abb. 2: Entwicklung der Fallzahlen von HNSCCs in Deutschland zwischen den Jahren 1980 und 2016.** Dargestellt sind die jährliche Inzidenz (grau) und Mortalität (schwarz) von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region (HNSCCs) in der Bundesrepublik Deutschland (A) bzw. im Saarland (B). Die Fallzahlen beziehen sich auf die Jahre 1980 bis 2016 und basieren auf den aktuellen Daten des Zentrums für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut (A) und denen des Saarländischen Krebsregisters (B).

Im Saarland folgten die Inzidenz sowie die Mortalität von HNSCCs mit hoher Übereinstimmung den Trends, die für die gesamte Bundesrepublik Deutschland zwischen den Jahren 1980 und 2016 beobachtet werden konnten (Abb. 2B). Jedoch lagen die Erkrankungs- und Sterblichkeitsrate, vor allem bei Männern, teils deutlich über dem Bundesdurchschnitt, womit das Saarland verhältnismäßig eines der am häufigsten von HNSCCs betroffenen Bundesländer ist. Das beschriebene Phänomen der im Verlauf der letzten 20 Jahre zu beobachtenden, signifikanten Zunahme oft HPV-assoziiierter Oropharynxkarzinome war auch im Saarland deutlich nachzuvollziehen (Epidemiologisches Krebsregister Saarland, 2009; Robert Koch-Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V., 2019).

Oft verlaufen die Entwicklung und das Wachstum von HNSCCs über lange Zeiträume hinweg schmerzlos oder ähneln hierbei den typischen Symptomen einer zumeist gewöhnlichen Entzündung. Folglich kommt es häufig erst zu einer zeitlich verzögerten Vorstellung der betroffenen Patienten beim Arzt und somit auch zu einer verspäteten medizinischen Abklärung des Befundes (Pitiphat *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2006). Bei Verdacht auf das Vorliegen eines Karzinoms der Kopf-Hals-Region umfasst die klinische Primärdiagnostik die optische Inspektion der betroffenen Regionen, gegebenenfalls auch durch Spiegeluntersuchung oder Endoskopie. Auffällige Schleimhautläsionen müssen hierbei zur histologischen Klärung des Befundes im Rahmen einer sogenannten Panendoskopie unter Narkose biopsiert werden, welche eine Naso-, Oro-, Hypopharyngoskopie, Mikrolaryngoskopie, Tracheobronchoskopie und Ösophagogastroskopie umfasst. Um die lokale Ausdehnung des Karzinoms zu ermitteln, sollten außerdem bildgebende Verfahren wie die Sonographie, Computer- oder Magnetresonanztomographie genutzt werden. Diese Untersuchungen dienen zusätzlich, ebenso wie die Panendoskopie, der Identifikation möglicherweise parallel vorliegender (Zweit-)Karzinome oder Fernmetastasen und der Abklärung des Befalls der umliegenden Lymphknoten (Leitlinienprogramm Onkologie, 2019b, c). Bei diagnostisch gesichertem Vorliegen eines Karzinoms der Kopf-Hals-Region erfolgt in der Regel die chirurgische Resektion des Tumors. Da oft bereits ein lokal fortgeschrittenes Tumorgeschehen mit zumeist lymphogener Metastasierung festgestellt werden kann, ist eine Ergänzung der Behandlung durch eine adjuvante Strahlen- oder kombinierte Radiochemotherapie häufig indiziert (Leitlinienprogramm Onkologie, 2019b, c). Zusätzlich stellt der gegen den EGF-Rezeptor (EGFR; „epidermal growth factor receptor“) gerichtete Antikörper Cetuximab eine erste zielorientierte molekulare Therapieoption bei fortgeschrittenen

oder therapieresistenten Karzinomen dar und zeigte durchweg positive Auswirkungen auf das Überleben der Patienten (Bonner *et al.*, 2006; Vermorken *et al.*, 2008; Echarri *et al.*, 2016). Aufgrund der in den letzten Jahren rasant erfolgenden Entwicklungen auf dem Gebiet der Immunonkologie, zum Beispiel durch Antikörper-vermittelte Inhibition verschiedener Immuncheckpoints (PD-1/PD-L1 Achse, etc.), ist mit einer zeitnahen Aufnahme derartiger Therapiekonzepte auch in den deutschen Behandlungsstandards zu rechnen. Die PD-1 Inhibitoren Nivolumab und Pembrolizumab sind hierbei bereits für eine Monotherapie von rezidierten oder metastasierten HNSCCs, mit Progress der Erkrankung während oder nach Platin basierter Systemtherapie, zugelassen. Diese Indikation gilt für Nivolumab unabhängig von der PD-L1 Expression des Tumors und ist bei Pembrolizumab an eine Expression in über 50% der Tumorzellen geknüpft (Ferris *et al.*, 2016; Cohen *et al.*, 2019). Zusätzlich ist Pembrolizumab bei Patienten mit rezidiertem oder metastasiertem HNSCC und einer verhältnismäßig erhöhten Anzahl PD-L1 positiver Zellen (Tumorzellen, Lymphozyten und Makrophagen) auch als Monotherapie oder in Kombination mit einer Chemotherapie in der Erstlinienbehandlung zugelassen (Burtneß *et al.*, 2019). Für beide Pharmaka konnten zumeist Vorteile in Bezug auf die Überlebensrate und die Lebensqualität der betroffenen Patienten nachgewiesen werden. Allerdings wird die genaue Einordnung der bisherigen Studienergebnisse in die klinische Praxis, und damit ihre Auswirkungen auf die etablierten Therapieoptionen, aktuell noch kontrovers diskutiert (Doescher *et al.*, 2019; Gavrielatou *et al.*, 2020).

Wie vorausgehend beschrieben, konnten trotz gewisser Fortschritte in der Diagnostik und Therapie in den letzten 20 Jahren keine signifikanten Verbesserungen der Mortalitäts- und Überlebensraten von Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region erreicht werden. Des Weiteren stellt eine späte Diagnose, in meist fortgeschrittenem Stadium des Tumors, mit ausgeprägtem Befall der Lymphknoten und reduziertem Allgemeinzustand der Patienten, weiterhin eine deutliche Hürde für das klinische Management von HNSCCs dar. Folglich scheinen eine möglichst frühe und potenziell nicht-invasive Form der Diagnosestellung und das bessere Verständnis der zugrunde liegenden molekularen Tumorzellbiologie von übergeordneter Bedeutung für eine Verbesserung der Therapiekonzepte von HNSCCs zu sein.

Im Gegensatz zu den vorausgehenden Erläuterungen sind Karzinome des Nasenrachens (Nasopharynx) eine weltweit eher selten auftretende Krankheit, mit einer lokal ausgeprägten Inzidenz im südostasiatischen und chinesischen Raum. Ursächlich hierfür scheinen neben einer Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus auch verschiedene genetische

und ökologische Faktoren zu sein (Yoshizaki *et al.*, 2012). Da das Nasopharynxkarzinom mit jährlich circa 250 Fällen in Deutschland sehr selten vorkommt (Wienecke & Kraywinkel, 2019) und auch im Rahmen dieser Arbeit kein Patient ein Malignom dieser Lokalisation aufwies, sollte die Erkrankung in den nachfolgenden Kapiteln nicht näher behandelt werden.

### **1.1.2 Risikofaktoren und molekulare Pathogenese von HNSCCs**

Die Forschungsergebnisse der letzten Jahre legen nahe, dass die Heterogenität von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region nicht allein durch ihre unterschiedlichen Ausgangslokalisationen zu begründen ist. Hierbei scheint hauptsächlich zwischen einer Noxen-induzierten und einer durch die chronische Infektion mit Humanen Papillomviren (HPV) verursachten Karzinogenese differenziert werden zu müssen, welche sich deutlich im Patientenprofil, der molekularen Pathogenese und hinsichtlich ihres klinischen Verlaufs unterscheiden (Leemans *et al.*, 2018). Auf beide Formen soll nachfolgend näher eingegangen werden.

Mit über 75% ist in Europa weiterhin die Mehrheit der Karzinome des Kopf-Hals-Bereichs auf einen oft langfristig erhöhten Konsum von Tabak und bzw. oder Alkohol zurückzuführen. Für beide Noxen konnte bei Einzelkonsum jeweils ein mehr als zweifach erhöhtes Risiko an einem HNSCC zu erkranken nachgewiesen werden (Hashibe *et al.*, 2007). Hierbei war eine klare Dosis-Wirkungs-Beziehung für die Menge, die Häufigkeit sowie für die Dauer des jeweiligen Konsums zu beobachten (Bagnardi *et al.*, 2001; Vineis *et al.*, 2004). Im Kopf-Hals-Bereich scheint Tabakrauch dabei besonders das Risiko für die Ausbildung von Larynxkarzinomen zu erhöhen, wohingegen ein gesteigerter Alkoholkonsum vornehmlich die Regionen des Pharynx betrifft. Des Weiteren ist für den gemeinsamen Konsum beider Substanzen ein stark multiplikativer Effekt der jeweiligen Einzelrisiken anzunehmen. Verschiedene Studien konnten diesbezüglich ein mehr als fünffach erhöhtes HNSCC-Risiko nachweisen, wobei multipler Substanzgebrauch vorwiegend bei Männern zu beobachten war. Generell lässt sich feststellen, dass besonders Patienten höheren Alters von Alkohol- und Tabak-assoziierten Karzinomen der Kopf-Hals-Region betroffen sind (Hashibe *et al.*, 2007; 2009). Diverse Inhaltsstoffe des Tabakrauchs (Aldehyde, Nitrosamine, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, Arsen, Cadmium etc.) wie auch Alkohol und sein Metabolit Acetaldehyd

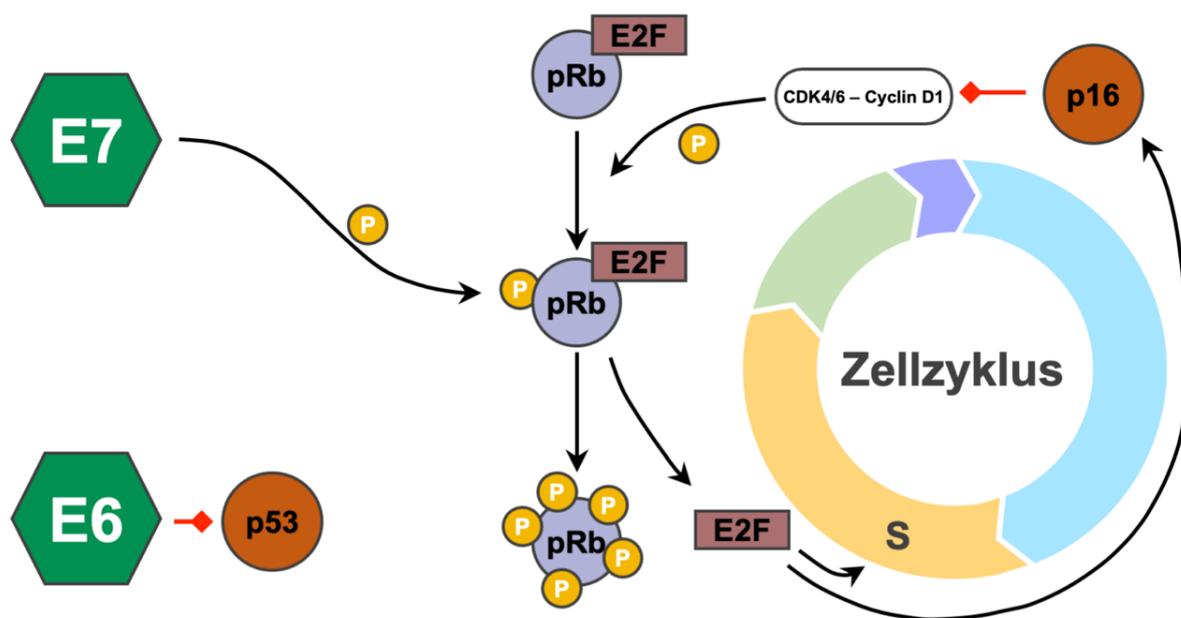
scheinen hierbei über verschiedene Zell- und DNA-schädigende Mechanismen ihre karzinogene Wirkung auszuüben oder als Lösemittel für weitere Karzinogene zu wirken (Boffetta & Hashibe, 2006; Sobus & Warren, 2014; Leon *et al.*, 2015). Folglich erscheint es nachvollziehbar, dass Noxen-induzierte HNSCCs typischerweise durch eine hohe Mutationslast und eine ausgeprägte zelluläre Heterogenität der Tumoren charakterisiert sind (Mroz *et al.*, 2015; Keck *et al.*, 2015). Molekular ist eine frühe Phase der komplexen Karzinogenese durch die Ausbildung von Vorläuferläsionen gekennzeichnet, welche in der Mehrheit der Fälle genetische Veränderungen und Verluste des kurzen Arms (p-Region) der Chromosomen 3, 9 und 17 zeigen. Als Zielgene dieser Regionen konnten hierbei die Tumorsuppressoren *RASSF1*, *CDKN2A* und *TP53* identifiziert werden, deren Genprodukte zentrale Regulatoren des Zellzyklus sind (Califano *et al.*, 1996; Chung *et al.*, 2004; Lawrence *et al.*, 2015). Im Verlauf der Tumorprogression ist eine weitere Zunahme der genomischen Instabilität und eine Akkumulation genetischer Veränderungen zu beobachten. Diese umfassen Amplifikationen des langen Arms (q-Region) der Chromosomen 3 und 11 und Inaktivierungen oder genetische Verluste der Regionen 4q, 6p, 8p, 10q, 13q und 14q. Viele der betroffenen Gene zeigen hierbei eine klare Verbindung zu bekannterweise Onkogenen-assoziierten Signaltransduktionswegen, welche sich zum Beispiel auf die zelluläre Reaktion gegenüber Wachstumssignalen (EGFR, PIK3CA, HRas), die Zelldifferenzierung (Wnt-Signalweg, Notch-Signalweg, p63) und die Regulation von oxidativem Stress (NFE2L2) auswirken (Stransky *et al.*, 2011; Polanska *et al.*, 2014; Lawrence *et al.*, 2015; Leemans *et al.*, 2018). Alle genannten Eigenschaften scheinen zusätzlich Evasionsmechanismen des Karzinoms gegenüber zytotoxischen Therapieoptionen, vermutlich durch Resistenzentwicklung, zu begünstigen und resultieren damit in einem erhöhten Risiko für die Entstehung von Rezidiven, welches sich letztendlich in einer deutlich reduzierten Überlebensrate der betroffenen Patienten ausdrückt (Leemans *et al.*, 2010; Marusyk *et al.*, 2014; Leemans *et al.*, 2018).

Neben den beschriebenen kanzerogenen Noxen stellen chronische Infektionen mit Humanen Papillomviren mittlerweile einen der größten Risikofaktoren für die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region dar. Im Mittel kann davon ausgegangen werden, dass in Deutschland bereits über 25% aller HNSCCs eine HPV-assoziierte Karzinogenese aufweisen, vor allem Tumore des Oropharynx scheinen hiervon betroffen zu sein. Im Verlauf der letzten Jahre war dabei eine kontinuierliche Zunahme ihrer Inzidenz zu beobachten, wobei dies besonders auf Männer und Patienten jüngeren Alters zutrifft (Pytynia *et al.*, 2014; Quabius *et al.*, 2015; Jansen *et al.*, 2018).

Als Hauptinfektionsweg gilt vermutlich eine Übertragung der Viren durch sexuellen Kontakt; eine Assoziation zu einer erhöhten Anzahl wechselnder Geschlechtspartner und zu oralem Geschlechtsverkehr konnte dabei festgestellt werden (Moody & Laimins, 2010). Von aktuell über 200 bekannten HPV-Genotypen werden aktuell mindestens 15 den sogenannten Hochrisikotypen zugeordnet, da für sie nach persistenter Infektion von humanem Epithel eine maligne Transformation der betroffenen Zellen ursächlich nachgewiesen werden konnte. In der Mehrzahl der Fälle scheint im Kopf-Hals-Bereich besonders der Hochrisikosubtyp HPV-16 für die Entstehung von Karzinomen des Oropharynx, hierbei vor allem der Tonsillarregion, verantwortlich zu sein (Muñoz *et al.*, 2003; de Villiers *et al.*, 2004; Cogliano *et al.*, 2005; D'Souza *et al.*, 2007).

Die Karzinogenese des HPV-assoziierten HNSCCs beginnt ausgehend von einer latenten Infektion mit Viren der Hochrisikotypen durch Linearisierung und nachfolgende Integration der viralen DNA in das Genom der befallenen Zelle. Die anschließende Expression der viralen Onkoproteine E6 und E7 treibt dabei durch Beeinflussung zellulärer Tumorsuppressoren die weitere maligne Transformation der Zellen voran: E6 vermittelt durch Ubiquitinierung des zellulären Proteins p53 dessen proteosomalen Abbau und damit seine Inaktivierung (Mantovani & Banks, 2001). Zusätzlich unterbricht HPV E7 durch Beeinflussung des Retinoblastom-Proteins (pRb) die enge Kontrolle von Differenzierung und Proliferation im normalen Epithel. Hierbei wird pRb vornehmlich in seiner aktiven, unphosphorylierten Form durch E7 gebunden und inaktiviert, wodurch ein kontinuierliches Fortschreiten des Zellzyklus induziert wird (Münger *et al.*, 2001). Unter physiologischen Bedingungen formt pRB einen Komplex mit Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie und verhindert somit einen Eintritt der Zelle in die S-Phase des Zellzyklus. Durch Akkumulation des Proteins p16 würde außerdem die Aktivität von Cyclin D1 und CDK4 bzw. CDK6 inhibiert, was durch ausbleibende Phosphorylierung von pRB normalerweise zu einer weiteren Verlangsamung des Zellzyklus führt (siehe Abb. 3). Durch die bereits viral erfolgte Inaktivierung von p53 scheint es darüber hinaus zu einem bedeutend geringeren Selektionsdruck gegenüber der Ausbildung von Mutationen dieses Proteins zu kommen. Trotz des p53 Funktionsverlustes sind HPV-assoziierte HNSCCs auch allgemein durch eine geringere Mutationslast als Noxen-induzierte Tumoren gekennzeichnet (Lawrence *et al.*, 2015). Folglich erscheint es nachvollziehbar, dass sich die gravierenden Unterschiede in der molekularen Pathogenese beider Subtypen des Karzinoms auch im Therapieansprechen und im klinischen Verlauf widerspiegeln. HPV-assoziierte HNSCCs zeigen hierbei in der Regel ein besseres Ansprechverhalten auf

eine Strahlentherapie, wie auch auf kombinierte Radiochemotherapien. Des Weiteren war zu beobachten, dass betroffene Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung zwar eine erhöhte Neigung zur Ausbildung lymphogener Metastasen aufwiesen, im weiteren Verlauf der Therapie jedoch ein signifikant geringeres Rezidivrisiko zeigten. Insgesamt resultieren diese Faktoren in einer über 10% höheren 5-Jahres-Überlebensrate und einer signifikant besseren Prognose von Patienten mit HPV-positiven Tumoren (Fakhry *et al.*, 2008; Abrahão *et al.*, 2018; Anantharaman *et al.*, 2018). Aufgrund des klinisch deutlich unterschiedlichen Phänotyps beider HNSCC Subtypen erscheint ein zuverlässiger Nachweis des HPV-Tumorstatus von zentralem Interesse zu sein, dennoch konnte trotz intensiver Forschungsbemühungen in der klinischen Praxis bisher keine einheitliche Methode etabliert werden (Venuti & Paolini, 2012; Kobayashi *et al.*, 2018; Craig *et al.*, 2019).



**Abb. 3: Schematische Darstellung der molekularen Mechanismen HPV-induzierter Karzinogenese.** Die Beeinflussung molekularer Signalwege durch die Expression der Onkoproteine E6 und E7 von Humanen Papillomviren ist in vereinfachter und schematisierter Form dargestellt. Durch funktionelle Inaktivierung der Tumorsuppressoren p53 und pRb wird ein kontinuierliches Fortschreiten des Zellzyklus und damit eine Progression des Tumors induziert. Rote Pfeile mit flachem Ende symbolisieren eine Inhibition bzw. Inaktivierung von Zielstrukturen; Phosphorylierungen bzw. die Phosphorylierung von Zielstrukturen sind durch einen orangen Kreis mit dem Buchstaben „P“ dargestellt. Nähere Erläuterungen befinden sich im Text (Abbildung modifiziert nach Leemans *et al.*, 2010 und Polanska *et al.*, 2014).

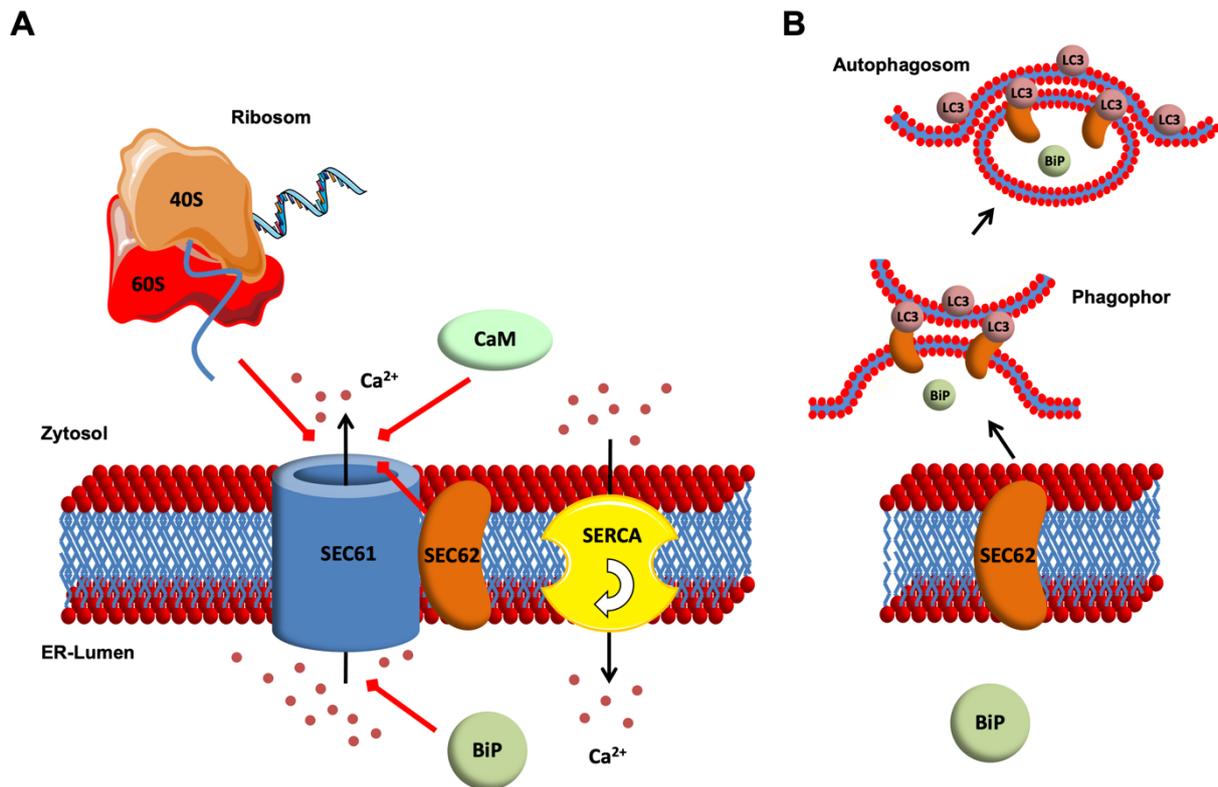
Zusammenfassend scheint die hohe molekulare Heterogenität von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region einen individualisierten Therapieansatz zur erfolgreichen Behandlung dieser Tumorentität zu erfordern. Obwohl in den vergangenen Jahren eine Vielzahl an molekularen Zielstrukturen entdeckt werden konnten, sind weiterhin nur wenige zielgerichtete Therapeutika zur Behandlung von HNSCCs zugelassen. Validierte Biomarker zur effizienten Stratifizierung möglicher Patienten fehlen bis heute größtenteils.

## 1.2 Bedeutung des Gens *SEC62* für die molekulare Onkologie

Das Chromosom 3 ist mit etwa zwei Millionen Basenpaaren und 1078 proteincodierenden Genen das drittgrößte humane Chromosom. In diversen Tumorentitäten stellen Gewinne und Verluste der genetischen Informationen des Chromosoms 3 eine typische genomische Veränderung der Tumorzellen dar. Amplifikationen des langen Arms von Chromosom 3 (3q) konnten hierbei für zahlreiche solide Tumoren verschiedener Lokalisationen festgestellt werden und zählen somit zu einer der häufigsten genetischen Veränderungen humaner Karzinome, wobei die kleinste amplifizierte Region auf den Chromosomenabschnitt 3q26 eingegrenzt werden konnte (Knuutila *et al.*, 1998; Rooney *et al.*, 1999; Ciriello *et al.*, 2013). Zusätzlich wurde in den nachfolgenden Jahren gezeigt, dass eine 3q26-Amplifikation mit hoher Prävalenz in Karzinomen der Kopf-Hals-Region und des Gebärmutterhalses (Zervix) vorkommt, oft aber auch in weiteren, meist plattenepithelialen Tumoren vorliegt (Fields *et al.*, 2016). Typischerweise markiert eine 3q26-Amplifikation dabei den Übergang von einer präkanzerösen Läsion zu einem invasiv wachsenden Karzinom und scheint darüber hinaus mit einer erhöhten Metastasierungsneigung und einer verschlechterten Überlebensrate der betroffenen Patienten assoziiert zu sein (Singh *et al.*, 2002; Sakai *et al.*, 2010). Ausgehend von den beschriebenen Erkenntnissen führten in der Folge zahlreiche Studien zur Identifikation mindestens 21 potenzieller Onkogene dieser Region. Diese umfassen unter anderem die Gene *SOX2*, *ECT2*, *PIK3CA* und *PRKCI*, für welche eine zentrale Rolle in einem vielschichtigen biochemischen Netzwerk vorgeschlagen wird, was durch Beeinflussung Onkogen-assoziiertes Signaltransduktionswege eine maligne Transformation der Zellen voranzutreiben scheint. Trotz intensiver Forschungsbemühungen konnten jedoch die

genauen molekularen Vorgänge und ihr potenzieller Einfluss auf die Tumorzellbiologie bisher nicht komplett aufgeklärt werden (Fields *et al.*, 2016; Davidson & Shanks, 2017; Liu *et al.*, 2020).

Ein weiteres potenzielles Onkogen der 3q26-Region ist das Gen *SEC62*, welches für ein gleichnamiges Transmembranprotein des Endoplasmatischen Retikulums (ER) codiert. *SEC62* ist hierbei mit dem heterotrimeren *SEC61*-Komplex assoziiert, der als Kanal des ERs mit zentraler wässriger Pore maßgeblich die Maschinerie der Proteintranslokation bestimmt. Beide Proteine bzw. Proteinkomplexe scheinen im Rahmen des Proteinimports in das ER direkt mit dem ribosomalen Tunnelausgang interagieren zu können (Müller *et al.*, 2010; Rapoport *et al.*, 2017). In diesem Zusammenhang scheint *SEC62* möglicherweise am cotranslationalen Proteintransport beteiligt, für den posttranslationalen Transport hingegen essentiell zu sein (Lakkaraju *et al.*, 2012; Conti *et al.*, 2015; Schorr *et al.*, 2020). Des Weiteren stellt das ER einen der hauptsächlichen zellulären Speicher für Calciumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) dar, welche als sogenannte sekundäre Botenstoffe eine zentrale Rolle in der Signalgebung der Zelle einnehmen. Zwischen dem Lumen des Endoplasmatischen Retikulums und dem Zytosol der Zelle besteht hierbei ein ausgeprägter  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradient, der einer engen Kontrolle und Regulation unterliegt (Rizzuto & Pozzan, 2006; Clapham, 2007; Bagur & Hajnóczky, 2017). Einem passiven Calciumefflux, welcher vornehmlich durch die transiente Öffnung des *SEC61*-Kanals zu erfolgen scheint, wird durch die Funktion der Sarko- und Endoplasmatischen-Retikulum-Calcium-ATPase (SERCA) entgegengewirkt (Lang *et al.*, 2014). Zusätzlich wird ein Verschluss des *SEC61*-Kanals durch das ER-lumenale Chaperon BiP und den aktivierten, zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin-Komplex (CaM) herbeigeführt (Erdmann *et al.*, 2011; Schäuble *et al.*, 2012). In diesem Zusammenhang scheint *SEC62* durch eine putative EF-Hand zytosolisch lokalisierte Calciumionen detektieren zu können (Abb. 4A) und durch direkte Interaktion mit dem *SEC61*-Komplex dessen Verschluss durch Calmodulin weiter zu fördern (Linxweiler *et al.*, 2013; Zimmermann, 2016; Lang *et al.*, 2017). Neben den beschriebenen Funktionen von *SEC62* konnte darüber hinaus eine mit LC3 interagierende Region (LIR) im zytosolischen Abschnitt des Proteins identifiziert werden, welche durch Interaktion mit Phagophoren gebundenem LC3 als Rezeptor und Startpunkt der Autophagozytose wirkt (Abb. 4B). Dieser Vorgang scheint für die Wiederherstellung des Gleichgewichtes nach Bedingungen des ER-Stresses von zentraler Bedeutung zu sein und wird seit seiner Entdeckung als ER-phagie bezeichnet (Fumagalli *et al.*, 2016; Bergmann *et al.*, 2016; Grumati *et al.*, 2018).



**Abb. 4:** Schematische Darstellung der molekularen Funktionen des Proteins SEC62 in Bezug auf die zelluläre Calciumhomöostase und Autophagozytose. **(A)** Regulation des passiven Effluxes von Calciumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) durch den transient geöffneten SEC61-Kanal mittels Calmodulin (CaM), SEC62 und BiP. Rote Pfeile mit flachem Ende symbolisieren einen inhibitorischen Effekt auf den Calciumefflux. **(B)** Initiation der ER-assoziierten Autophagozytose (ER-phagie) durch Interaktion von SEC62 mit Phagophor gebundenem LC3. Nähere Erläuterungen befinden sich im Text (Abbildung modifiziert nach Linxweiler *et al.*, 2017).

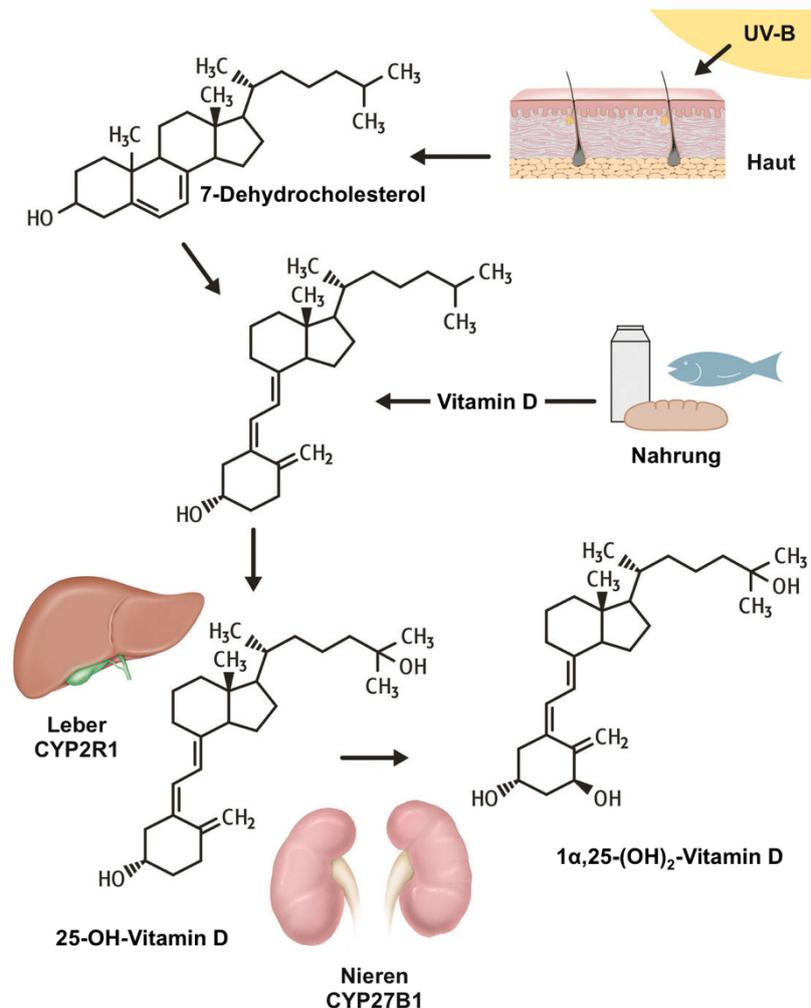
In den vergangenen Jahren konnte außerdem ein enger Zusammenhang des Proteins SEC62 mit Tumorerkrankungen nachgewiesen werden: Genomische Amplifikationen wie auch eine erhöhte Expression von *SEC62* lagen hierbei unter anderem in Malignomen der Prostata, der Schilddrüse, der Lunge und der Leber vor (Jung *et al.*, 2006; Weng *et al.*, 2012; Linxweiler *et al.*, 2012). Zusätzlich korrelierte ein hoher SEC62-Proteingehalt in Prostata- und Lungenkarzinomen erheblich mit einer fortschreitenden Entdifferenzierung des Tumorgewebes (Greiner *et al.*, 2011; Linxweiler *et al.*, 2012). Eine Überexpression von *SEC62* war darüber hinaus in hepatozellulären Karzinomen und Plattenepithelkarzinomen der Lunge mit einer signifikant verringerten Überlebensrate der untersuchten Patienten verbunden, was insgesamt nahelegt, dass SEC62 mindestens in diesen Tumorentitäten als diagnostischer, auch wie auch prognostischer Biomarker dienen könnte (Weng *et al.*, 2012; Linxweiler *et al.*, 2013). Vor dem Hintergrund der molekularen Tumorzellbiologie konnte in mehreren *in vitro* Modellen gezeigt werden,

dass SEC62 essentiell für die Invasions- und Migrationsfähigkeit verschiedener Zelllinien zu sein scheint, wobei eine Überexpression von *SEC62* in einem erhöhten Migrationspotenzial und einem Verlust verschiedener Mechanismen der Wachstumskontrolle von nicht-onkogen transformierten Zellen resultierte (Greiner *et al.*, 2011a; Hagerstrand *et al.*, 2013). Des Weiteren war zu beobachten, dass ein hoher SEC62-Proteingehalt mit einer gesteigerten Resistenz der Tumorzellen gegenüber ER-Stress einherging, welcher durch Thapsigargin-induzierte Inhibition der SERCA ausgelöst wurde (Greiner *et al.*, 2011b; Linxweiler *et al.*, 2013). Bemerkenswerterweise stellen alle oben genannten Vorgänge bedeutende Prozesse in der Entstehung und weiteren Progression von Tumoren dar und unterliegen dabei unter anderem einer klaren Abhängigkeit von Calcium vermittelten Signalen innerhalb der Zelle (Hanahan & Weinberg, 2011; Stewart *et al.*, 2015; Monteith *et al.*, 2017; Roberts-Thomson *et al.*, 2019).

Grundsätzlich scheint SEC62 damit eine zentrale Rolle im Rahmen der zellulären Prozesse der Proteintranslokation, der Aufrechterhaltung der Calciumhomöostase und der Stressregulation zuzukommen. Dennoch konnten seine genauen molekularen Funktionen bisher nicht vollständig aufgeklärt werden. In vielen Karzinomen scheint darüber hinaus eine massive Fehlregulation der Expression von *SEC62* vorzuliegen, welche in ersten Untersuchungen mit einer gesteigerten Migrationsfähigkeit und Stresstoleranz der Tumorzellen einherging. Folglich stellt *SEC62* ein potenzielles Onkogen der 3q26-Region dar, dessen Rolle auch im Rahmen der Entstehung und Progression von HNSCCs von gesteigertem Interesse sein könnte. In der wissenschaftlichen Literatur lagen zu Beginn dieser Dissertation hierzu keine näheren Informationen vor.

### 1.3 Bedeutung der Vitamin D Versorgung vor dem Hintergrund onkologischer Erkrankungen

Unter dem Namen Vitamin D wird eine Gruppe fettlöslicher Verbindungen zusammengefasst, welche sich von der chemischen Klasse der Steroide ableiten und auch als Calciferole bezeichnet werden. Die wichtigsten Formen sind hierbei das überwiegend in Pilzen und Pflanzen vorkommende Vitamin D<sub>2</sub> (Ergocalciferol) und das in allen weiteren Eukaryoten vorherrschende Vitamin D<sub>3</sub> (Cholecalciferol) sowie deren Stoffwechselprodukte. Obwohl verschiedene Pilzarten und fettreicher Fisch eine natürliche Quelle für Vitamin D darstellen, scheint die überwiegende Mehrheit des menschlichen Bedarfs unter Einfluss der UV-B Strahlung des Sonnenlichtes durch endogene Synthese in der Haut gedeckt zu werden (Holick, 2002c; DeLuca, 2004; Lamberg-Allardt, 2006). Die historische bedingte Einordnung als Vitamin trifft insofern nicht vollkommen zu, da es sich vielmehr um ein nur teilweise essentielles Prohormon handelt, welches im weiteren Verlauf in seine physiologisch aktive Form umgewandelt werden kann. Die Synthese von Vitamin D<sub>3</sub> erfolgt in den oberen Hautschichten des Menschen, in welchen durch Absorption ultravioletter Strahlung der Wellenlängen 290 bis 315 nm die Vorstufe 7-Dehydrocholesterol in der Plasmamembran epidermaler Zellen photolytisch gespalten wird. Das hierdurch entstandene, thermodynamisch instabile Prävitamin D<sub>3</sub> isomerisiert daraufhin in einem nicht katalytischen Prozess zu Vitamin D<sub>3</sub> und wird nachfolgend in den Extrazellulärraum entlassen, von wo es über die Kapillaren in den Blutkreislauf übergeht und vom Vitamin D-bindenden Protein aufgenommen wird (Haddad *et al.*, 1993; Tian *et al.*, 1993; Holick, 2002c; 2003). In einem schrittweisen Prozess erfolgt anschließend die endogene Aktivierung von Vitamin D in seine hormonell aktive Form (Abb. 5). In der Leber wird Vitamin D<sub>3</sub> vornehmlich durch das Enzym CYP2R1 zu Calcidiol (25-OH-Vitamin D) hydroxyliert, wobei dieser Schritt auch durch weitere Vertreter der Cytochrom-P450-Familie erfolgen kann. Aufgrund seiner langen Plasmahalbwertszeit von über 14 Tagen und einer engen Bindung an die physiologische Funktion des Hormons stellt 25-OH-Vitamin D die hauptsächliche Speicherform des Körpers dar und wird als Marker zur Bestimmung des Vitamin D Status des Menschen genutzt. In der Blutbahn zirkulierendes 25-OH-Vitamin D wird durch Endozytose von Nierenzellen aufgenommen und im proximalen Tubulus der Niere durch das Enzym CYP27B1 letztendlich in seine aktive Form Calcitriol (1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D) überführt (DeLuca, 2004; Bischoff-Ferrari *et al.*, 2006; Holick, 2006; Bikle, 2014).



**Abb. 5: Schematische Darstellung der Biosynthese von Vitamin D<sub>3</sub> und seiner Metabolite.** In der Haut wird aus 7-Dehydrocholesterol durch UV-B Strahlung und einen weiteren Zwischenschritt Vitamin D<sub>3</sub> gebildet. Dieses und zusätzlich über die Nahrung aufgenommenes Vitamin D zirkulieren im Blut und werden in der Leber und der Niere in einem schrittweisen Prozess durch Vertreter der Cytochrom-P450-Familie zuerst in die Speicherform 25-OH-Vitamin D und anschließend in das aktive Hormon 1α,25-(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D überführt. Nähere Erläuterungen befinden sich im Text (Abbildung modifiziert nach Steinhilber, 2020).

Durch Bindung des Vitamin D Rezeptors vermag Calcitriol in verschiedenen Zielorganen seine hormonelle Wirkung auszuüben. Hierbei scheint der Rezeptor durch seine direkte Funktion als ligandenaktivierter Transkriptionsfaktor, aber auch durch weitere Interaktion mit diversen Cofaktoren die Expression einer Vielzahl Vitamin D abhängiger Gene zu regulieren und somit als eine Art molekularer Genschalter zu wirken (Pike & Meyer, 2010; Carlberg & Campbell, 2013). Seine bisher am besten erforschte Funktion umfasst die komplexe Steuerung der Calcium- und Phosphathomöostase des Körpers in den typischen Zielorganen Darm, Knochen und Niere, unter Mitwirkung des Parathormons und des Proteins FGF23 (Holick, 2006; 2007; Bouillon *et al.*, 2008).

In verschiedenen bioinformatischen Sequenzanalysen konnten jedoch mittlerweile weit über 20 000 genomische Bindungsstellen des Vitamin D Rezeptors identifiziert werden, welche eine deutliche zellspezifische Heterogenität aufweisen und mehr als 1000 Gene in ihrer Expression zu beeinflussen scheinen. Folglich ist davon auszugehen, dass diverse physiologische Prozesse in ihrer Steuerung einer komplexen Abhängigkeit von Vitamin D unterliegen und hierbei je nach Zelltypus deutliche Unterschiede in den jeweils beeinflussten Signalwegen vorliegen (Heikkinen *et al.*, 2011; Carlberg, 2014; Tuoresmäki *et al.*, 2014). Dies wird weiterhin dadurch unterstrichen, dass gezeigt werden konnte, dass sich eine ausreichende Versorgung mit Vitamin D nicht nur positiv auf die Knochenmineralisation und Prävention von Osteoporose und Frakturen auswirkt (Bischoff-Ferrari *et al.*, 2009; Bikle, 2012), sondern auch die Proliferation und Differenzierung von epidermalen Zellen (Bikle, 2011) sowie die Entstehung von Diabetes mellitus und des metabolischen Syndroms (Shi *et al.*, 2001; Pittas *et al.*, 2007; Kayaniyil *et al.*, 2010; Mitri *et al.*, 2011) oder von kardiovaskulären Erkrankungen zu beeinflussen vermag (Brøndum-Jacobsen *et al.*, 2012; Gardner *et al.*, 2013).

Zusätzlich erscheint eine Auswirkung von Vitamin D auf verschiedene Immunkellpopulationen vor dem Hintergrund onkologischer Erkrankungen und den entstehenden Konzepten der Immunonkologie von besonderem Interesse zu sein. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Vitamin D durch Beeinflussung der Genexpression das jeweilige Zytokinprofil sowohl von verschiedenen Zellen des angeborenen Immunsystems (NK-Zellen, Makrophagen, Monozyten) als auch der adaptiven Immunantwort (B- und T-Lymphozyten) beeinflusst und hierdurch vermutlich diverse immunmodulatorische Effekte ausüben könnte. Die konkreten molekularen Vorgänge sind indessen weiterhin Gegenstand intensiver Forschungsarbeiten und bis dato nicht genau aufgeklärt (Baeke *et al.*, 2010; Hewison, 2012; Chirumbolo *et al.*, 2017; Martens *et al.*, 2020). Bemerkenswert ist ebenso, dass für einige Tumorerkrankungen ein Einfluss der Vitamin D Versorgung nachgewiesen werden konnte: Pathologisch niedrige 25-OH-Vitamin D Serumspiegel korrelierten sowohl mit der Entstehung von kolorektalen Karzinomen als auch mit solchen der Bauspeicheldrüse, der Brustdrüse und der Prostata (Giovannucci *et al.*, 2006; Garland *et al.*, 2007; Knight *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2011; Wolpin *et al.*, 2012). Des Weiteren kam eine groß angelegte Metaanalyse, welche etwa 45 000 Probanden umfasste zu dem Ergebnis, dass eine ausreichende Vitamin D Versorgung bei Vorliegen einer onkologischen Erkrankung durchschnittlich zu einer 25% höheren Gesamtüberlebensrate führte (Vaughan-Shaw *et al.*, 2017). Erste Untersuchungen an

HNSCC-Patienten zeigten ebenfalls einen oft ausgeprägten Vitamin D Mangel, welcher darüber hinaus mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung eines Karzinoms der Kopf-Hals-Region und einer schlechteren Prognose der betroffenen Patienten korrelierte (Arem *et al.*, 2011; Gugatschka *et al.*, 2011; Orell-Kotikangas *et al.*, 2012; Afzal *et al.*, 2013). Allerdings umfassten diese Studien jeweils nur verhältnismäßig kleine Patientenkollektive einer Größenordnung von etwa 100 Patienten, so dass die Datenlage bezüglich möglicher Effekte von Vitamin D auf HNSCCs weiterhin sehr spärlich ist.

Da somit ein direkter Zusammenhang zwischen der Vitamin D Versorgung, der Aktivität des Immunsystems und der Entstehung und Progression von onkologischen Erkrankungen naheliegt, stellt Vitamin D folglich einen interessanten Biomarker bei der Diagnostik von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region dar. In diesem Zusammenhang erscheinen auch personalisierte Therapiekonzepte, welche auf einer Supplementation von Vitamin D basieren, vorstellbar und besonders vor dem Hintergrund einer möglichen Immuntherapie von gesteigertem Interesse zu sein.

## 1.4 Ziele dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein bewusst multifaktorieller Ansatz verfolgt werden, um einen möglichen Nutzen der Anwendung nicht-invasiver Methoden für die Diagnostik und personalisierte Therapieplanung von Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region zu überprüfen.

Da die Methodik der flüssigkeitsbasierten Abstrichzytologie bereits seit vielen Jahren erfolgreich in der klinischen Routinediagnostik zur Früherkennung des Zervixkarzinoms angewendet wird, erfolgten erste Untersuchungen an dieser Tumorentität. Im Rahmen des Projektes sollte untersucht werden, ob abstrichzytologische Proben für molekulare Methoden zugänglich sind, welche bisher nur an invasiv gewonnen Gewebeproben etabliert waren. Basierend hierauf galt es, die Rolle von *SEC62* als mögliches Onkogen in der Entstehung des Zervixkarzinoms näher zu charakterisieren.

Anschließend sollte diese Methode der nicht-invasiven Probengewinnung für Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region etabliert werden, um darüber hinaus mit ihrer Hilfe ein System zu entwickeln, welches zuverlässig den HPV-Tumorstatus des Patienten zu bestimmten vermag. Des Weiteren galt es auch hier einen möglichen Einfluss des Gens *SEC62* auf die Onkogenese und Tumorzellbiologie von HNSCCs zu bestimmen und nachfolgend seinen potenziellen Nutzen als Biomarker dieser Tumorentität zu überprüfen.

Da sich in den vergangenen Jahren vermehrt Hinweise auf einen direkten Zusammenhang zwischen der Vitamin D Versorgung und der Inzidenz maligner Erkrankungen finden, sollte außerdem der Vitamin D Status von HNSCC-Patienten näher charakterisiert und mögliche Auswirkungen auf die antitumorale Immunaktivität untersucht werden.

## 2. Ergebnisse

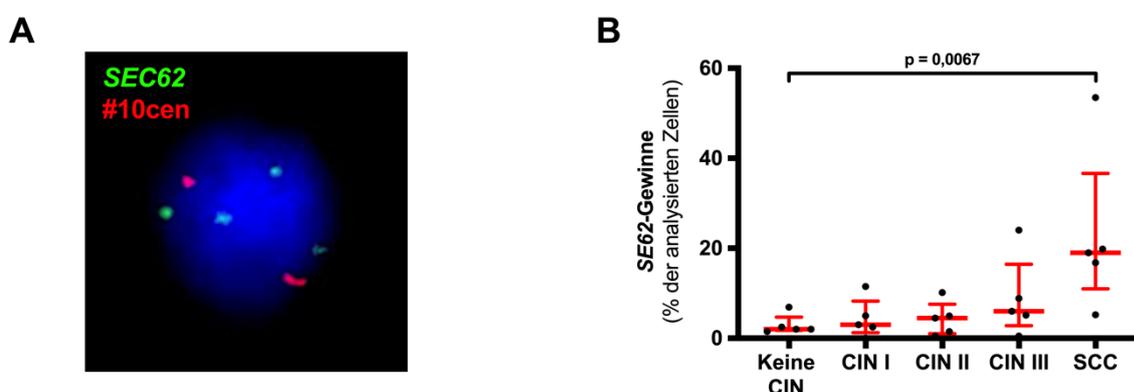
### 2.1 Einfluss des Gens *SEC62* auf die Onkogenese des Zervixkarzinoms

In der Gynäkologie wird die nicht-invasive, flüssigkeitsbasierte Abstrichzytologie bereits seit vielen Jahren erfolgreich in der klinischen Routinediagnostik im Rahmen des Projekts zur Früherkennung des Zervixkarzinoms angewendet. Aufgrund des umfangreichen, durch eine Kooperation mit der Klinik für Frauenheilkunde, Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin des Universitätsklinikums des Saarlandes zur Verfügung stehenden Abstrichmaterials erfolgten erste Untersuchungen an diesem Patientenkollektiv, bevor im Anschluss die Methoden schwerpunktmäßig bei HNSCC-Patienten angewendet wurden. In einem ersten Schritt sollte hierbei untersucht werden, ob die abstrichzytologischen Proben für molekulargenetische und proteinbiochemische Methoden genutzt werden können, welche bisher nur an invasiv gewonnenen Gewebeproben etabliert waren.

Eine Amplifikation des langen Armes von Chromosom 3 (3q) stellt in über 75% der Fälle auch beim Zervixkarzinom eine typische genomische Veränderung dar, wobei die kleinste amplifizierte Region auf den Chromosomenabschnitt 3q26-27 eingegrenzt werden konnte. Die Häufigkeit einer 3q-Amplifikation nimmt mit steigendem Grad der Dysplasie zu und markiert charakteristischerweise den Übergang von präkanzerösen, intraepithelialen Neoplasien (CIN; „cervical intraepithelial neoplasia“) zu einem invasiven Plattenepithelkarzinom (SCC; „cervical squamous cell carcinoma“). Dennoch konnten auf molekularer Ebene bisher nahezu keine funktionellen Korrelate einer 3q-Amplifikation aufgezeigt werden (vgl. Einleitung Kapitel 1.2). In den nachfolgend beschriebenen Versuchen sollte daher die Rolle von *SEC62* als mögliches 3q-Onkogen in der Entstehung des Zervixkarzinoms näher charakterisiert werden. Hierbei sollte auch der Einfluss der Expression von *SEC62* auf das Protein Vimentin untersucht werden, vor dem Hintergrund einer potenziellen Induktion der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT), welche mit einem Übergang zu invasivem Tumorwachstum und einer erhöhten Metastasierungsneigung einhergeht. Die in diesem Kapitel beschriebenen Untersuchungen und Ergebnisse konnten von unserer Arbeitsgruppe im Jahr 2016 im Journal *BMC Cancer* publiziert werden (Linxweiler *et al.*, 2016).

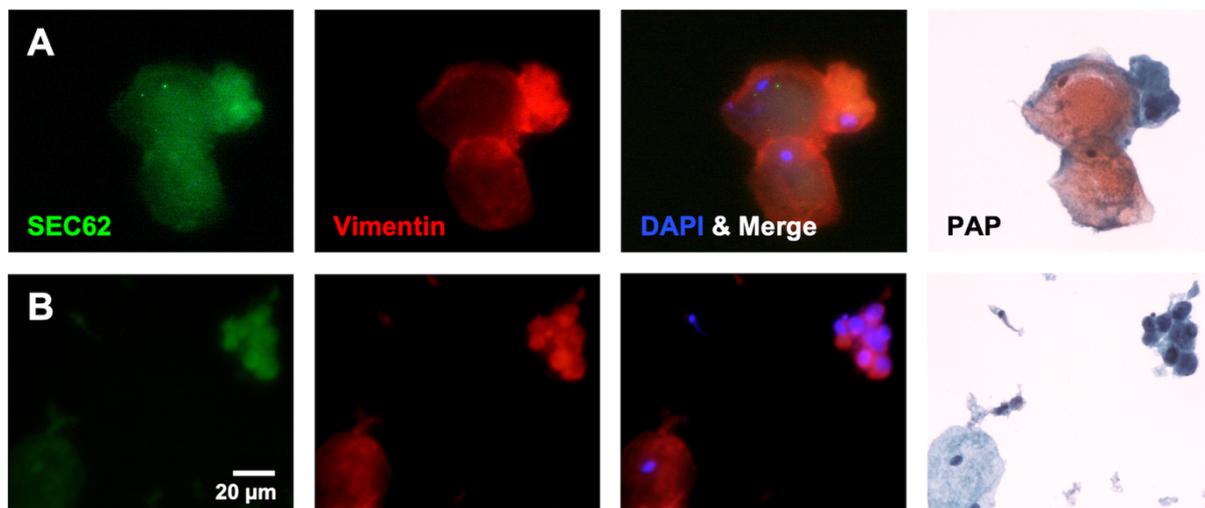
### 2.1.1 Analyse der Expression von *SEC62* an zytologischem Abstrichmaterial dysplastischer Läsionen der Zervix

Um die Zugänglichkeit abstrichzytologischer Proben für molekulargenetische und proteinbiochemische Methoden zu evaluieren, sollte zuerst das Vorliegen möglicher Gewinne des Gens *SEC62* mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) ermittelt werden. Eine exemplarische Darstellung des zytogenetischen Nachweises von *SEC62* ist in Abbildung 6A gezeigt. Für die Analyse wurden abstrichzytologische Präparate einer repräsentativen Subgruppe von 25 Patientinnen mit dysplastischen Läsionen der Zervix verwendet. Diese waren basierend auf den ggf. zusätzlich vorliegenden histomorphologischen Beurteilungen gleichmäßig auf die fünf jeweiligen Gruppen ohne präkanzeröse Neoplasie (Keine CIN), beziehungsweise mit steigendem Grad der Neoplasie (CIN I bis III), hin zum Plattenepithelkarzinom (SCC) aufgeteilt. Hierbei zeigte sich mit zunehmendem Grad der Dysplasie eine gesteigerte Anzahl der Zellen mit genomischen *SEC62*-Gewinnen. Die höchste Inzidenz, mit einer signifikanten Zunahme der betroffenen Zellen, war bei invasiven Plattenepithelkarzinomen zu beobachten ( $p = 0,0067$ ; Abb. 6B). Des Weiteren waren *SEC62*-Amplifikationen in den Zellkernen von zwei CIN-I-, einem CIN-III- und vier SCC-Fällen nachzuweisen (Daten nicht gezeigt).



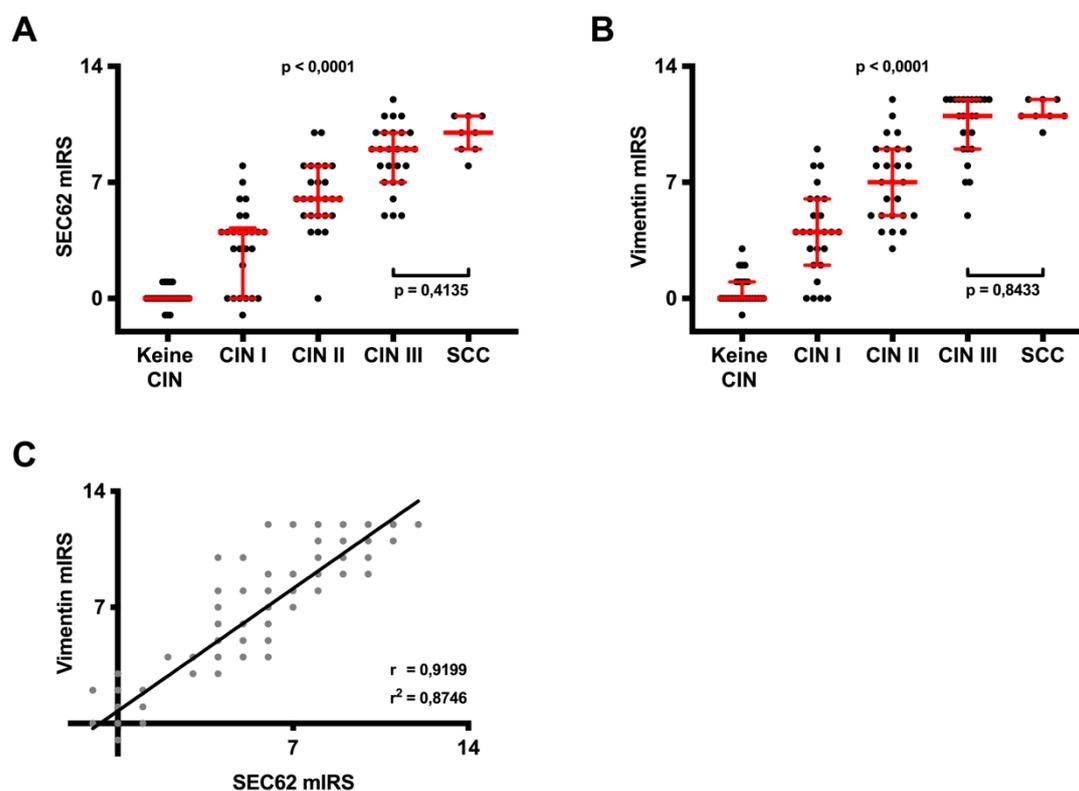
**Abb. 6: FISH-Analyse von *SEC62* in dysplastischen Zellen der Zervix.** Das Vorliegen des Gens *SEC62* wurde zytogenetisch mittels FISH an abstrichzytologischen Präparaten dysplastischer Läsionen der Zervix untersucht. **(A)** Repräsentative Darstellung eines Zellkerns in der FISH-Analyse, zur Identifikation von Gewinnen und Amplifikationen von *SEC62* (grün markiert). **(B)** Statistische Analyse des prozentualen Anteils der untersuchten Zellen mit *SEC62*-Gewinnen, segregiert nach histomorphologischer Gruppe. Es wurden jeweils Abstriche von fünf repräsentativen Patientinnen pro Gruppe analysiert (insgesamt  $n = 25$ ; siehe Text). Alle Einzelwerte sind als Punkt im Diagramm aufgetragen. Der Median wird durch eine rote Linie angezeigt, die Whisker stellen den Abstand vom ersten zum dritten Quartil dar. In (A) wurde eine Sonde gegen die Zentromerregion von Chromosom 10 (#10cen; rot) als interne Hybridisierungskontrolle verwendet. Eine Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Aufnahme in 60facher Vergrößerung.

Zusätzlich sollten die Expression von *SEC62* und ein möglicher Einfluss auf das Protein Vimentin näher untersucht werden. Hierzu wurden mittels Fluoreszenzfärbungen der Proteingehalt von *SEC62* und Vimentin an abstrichzytologischen Präparaten von 107 Patientinnen analysiert. Die Gruppen von „Keine CIN“ bis „CIN III“ umfassten jeweils 25 Patientinnen; sieben Patientinnen wiesen ein invasives Plattenepithelkarzinom auf. Zur Auswertung der immunzytologischen Färbungen, welche exemplarisch in Abbildung 7 dargestellt sind, wurde ein modifizierter Immunreaktiver Score (mIRS) verwendet, welcher die Färbeintensität dysplastischer Zellen in Relation zu unauffälligen Zellen im selben Präparat setzt (siehe Material und Methoden Kapitel 4.3.8).



**Abb. 7: Repräsentative Darstellung der immunzytologischen Färbungen von *SEC62* und Vimentin.** Der *SEC62*- und Vimentin-Proteingehalt wurde mittels Immunfluoreszenz an abstrichzytologischen Präparaten dysplastischer Läsionen der Zervix untersucht. Es sind Mikroskopaufnahmen zweier repräsentativer Patientinnen gezeigt, welche mit **(A)** „CIN I“ bzw. **(B)** „CIN III“ diagnostiziert wurden. Die Färbung von *SEC62* ist in der ersten Spalte in Grün dargestellt, rechts daneben Vimentin in Rot und in der dritten Spalte die Überlagerung beider Fluoreszenzkanäle (Merge), inklusive einer Gegenfärbung der Zellkerne mittels DAPI (blau). Ganz rechts ist zur morphologischen Beurteilung die Färbung derselben Präparate nach Papanicolaou (PAP) abgebildet.

Die statistische Analyse zeigte mit fortschreitendem Grad der Dysplasie eine schrittweise hochsignifikante Zunahme des SEC62- sowie des Vimentin-Proteingehalts in den untersuchten Präparaten (jeweils  $p < 0,0001$ ; Abb. 8A & B). Von hochgradigen CIN-III-Dysplasien zum invasiven Plattenepithelkarzinom waren keine signifikanten Steigerungen der jeweiligen Expression mehr zu beobachten. Der SEC62- und Vimentin-Proteingehalt wiesen einen deutlichen, linearen Zusammenhang mit einem Korrelationskoeffizienten beider Parameter von  $r = 0,9199$  auf (Abb. 8C). Da in Kontrollfärbungen von zehn repräsentativen Fällen die Fluoreszenzintensität des zytoplasmatischen Proteins  $\beta$ -Aktin nicht mit dem Dysplasiegrad stieg, kann eine Beeinträchtigung der Ergebnisse durch ein generell gesteigertes Färbeverhalten dysplastischer Zellen somit vermutlich größtenteils ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt).



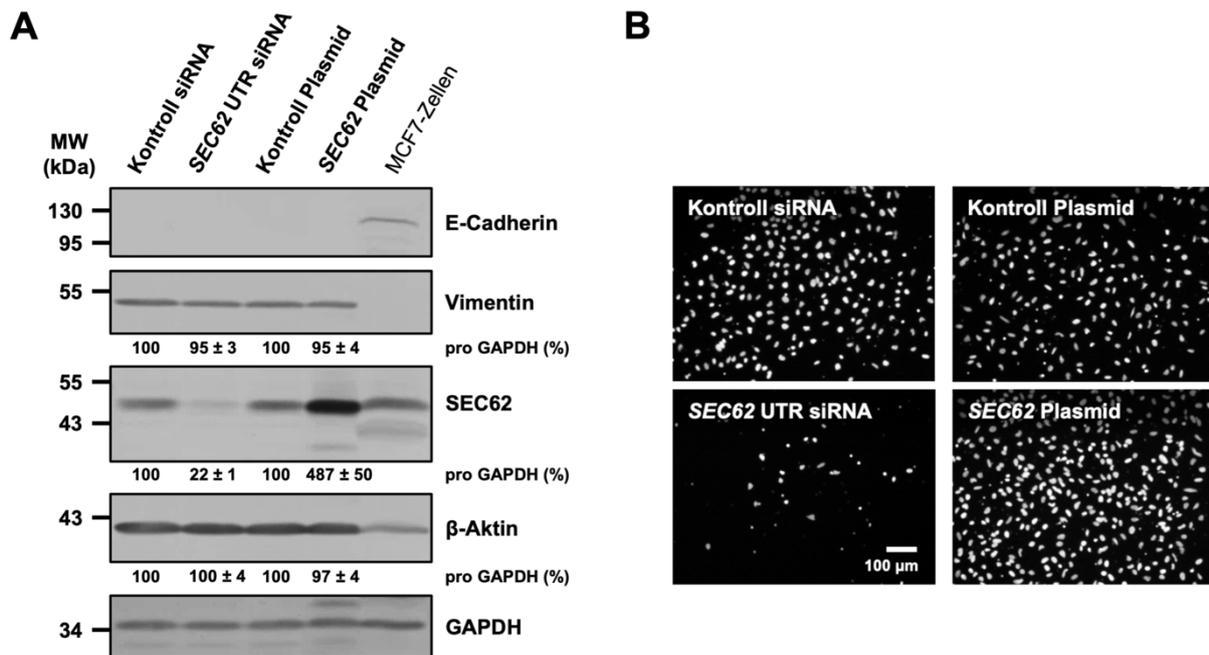
**Abb. 8:** Analyse des SEC62- und Vimentin-Proteingehalts in dysplastischen Zellen der Zervix. Der Proteingehalt von **(A)** SEC62 und **(B)** Vimentin wurde mittels Immunfluoreszenz an abstrichzytologischen Präparaten dysplastischer Läsionen der Zervix untersucht und durch einen mIRS analysiert. Die statistische Auswertung ist in die einzelnen histomorphologischen Gruppen aufgeteilt. Die Gruppen von „Keine CIN“ bis „CIN III“ umfassten jeweils 25 Patientinnen, „SCC“ sieben Patientinnen (insgesamt  $n = 107$ ). **(C)** Korrelationsanalyse und lineare Einfachregression des zellulären SEC62- und Vimentin-Proteingehalts pro Patientin. Die Regressionsgerade ist in Schwarz, inklusive des Korrelations- ( $r$ ) und ihres Determinationskoeffizienten ( $r^2$ ) dargestellt. Alle Einzelwerte sind als Punkt im jeweiligen Diagramm aufgetragen. In **(A)** und **(B)** wird der Median durch eine rote Linie angezeigt, die Whisker stellen den Abstand vom ersten zum dritten Quartil dar. Das Signifikanzniveau  $p < 0,0001$  bezieht sich auf alle zulässigen statistischen Vergleiche einzelner Gruppen, bis auf den jeweils weiterhin angegebenen Vergleich zwischen „CIN III“ und „SCC“.

### 2.1.2 Auswirkungen der Expression von *SEC62* auf die Tumorzellbiologie des Zervixkarzinoms

Basierend auf den vorausgehenden Ergebnissen sollte der Einfluss einer veränderten *SEC62*-Expression auf die Tumorzellbiologie funktionell näher charakterisiert werden. Hierzu wurde in einem *in vitro* Modell die Zelllinie HeLa verwendet, welche aus dem Epithel eines Zervixkarzinoms etabliert worden ist. Aus der Literatur und bisherigen Voruntersuchungen ging hervor, dass diese Zelllinie in komparativen genomischen Hybridisierungen (CGH) und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen (FISH) eine nahezu reguläre Anzahl an Kopien des langen Arms von Chromosom 3 (3q) aufweist (Macville *et al.*, 1999). Auch war in vorausgehenden Arbeiten in HeLa-Zellen eine unveränderte *SEC62*-Expression festzustellen, welche mit der von nicht-malignem Normalgewebe vergleichbar war. Folglich scheint diese Zelllinie ein Modell für Zervixkarzinomzellen mit regulärem *SEC62*-Proteingehalt darzustellen.

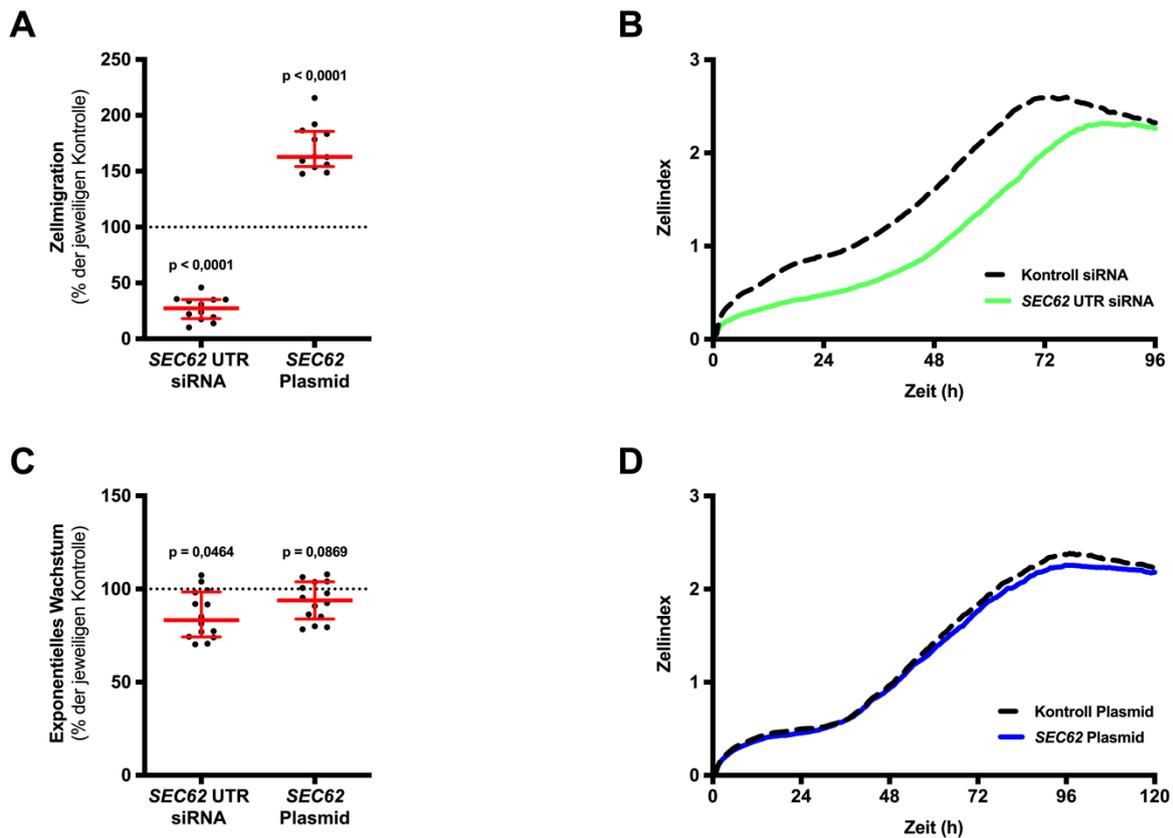
Für die nachfolgenden funktionellen Analysen sollte in HeLa-Zellen die Expression des *SEC62*-Gens mittels transienter Transfektion einer gegen das Genprodukt gerichteten siRNA (*SEC62* UTR siRNA) stillgelegt, beziehungsweise durch die eines *SEC62*-codierenden Plasmids gesteigert werden. Durch die siRNA-vermittelte Gen-Stillegung von *SEC62* war es möglich, dessen Proteingehalt auf circa 22% des Gehalts der Kontrollzellen zu reduzieren; die Plasmid-vermittelte Überexpression vermochte den *SEC62*-Proteingehalt auf durchschnittlich 487% zu steigern (Abb. 9A). Die derartig behandelten Zellen wurden anschließend auf ihr Migrations- und Proliferationspotenzial hin untersucht. Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der im Boyden-Kammer-System migrierten Tumorzellen sind in Abbildung 9B dargestellt.

Die statistische Analyse der Zellmigration zeigte, dass die Gen-Stillegung von *SEC62* in HeLa-Zellen zu einer signifikanten Reduktion des Migrationspotenzials führte, wohingegen dessen Überexpression in einer deutlichen Stimulation der Migrationsfähigkeit resultierte (jeweils  $p < 0,0001$ ; Abb. 10A). In der Auswertung des exponentiellen Wachstums der untersuchten Zellpopulationen, welches exemplarisch in Abbildung 10B und D dargestellt ist, war besonders im Falle der siRNA-Transfektion eine gewisse Reduktion des Proliferationspotenzials der Zellen zu beobachten (Abb. 10C). Diese geringfügig verminderte Zellproliferation vermag jedoch nicht vollständig die ausgeprägten Phänotypen zu erklären, welcher in der Zellmigration nachgewiesen werden konnten.



**Abb. 9: Analyse des SEC62-Proteingehalts, verschiedener EMT-Marker und der Zellmigration nach Transfektion von HeLa-Zellen.** Der SEC62-Proteingehalt, die Expression mehrerer EMT-Marker und das Zellmigrationspotenzial von HeLa-Zellen wurden nach Gen-Stillegung von *SEC62* (*SEC62* UTR siRNA) und dessen Überexpression (*SEC62* Plasmid; siehe Text) analysiert. **(A)** SDS-Page- und Western-Blot-Analyse zur Bestimmung des SEC62-, so wie E-Cadherin-, Vimentin- und  $\beta$ -Aktin-Proteingehalts der jeweils transfizierten Zellpopulationen. Der relative Proteingehalt pro GAPDH ist unter den jeweiligen Banden als Mittelwert von vier biologischen Replikaten ( $n = 4$ ), inklusive seines Standardfehlers, angegeben. Die Probengewinnung erfolgte nach Abschluss der Migrationsanalyse. **(B)** Repräsentative Darstellung der nach 15 Stunden im Boyden-Kammer-System migrierten HeLa-Zellen. Eine Anfärbung der Zellkerne erfolgte mittels DAPI. In (A) dienen MCF7-Zellen als Positivkontrolle für den Nachweis von E-Cadherin.

Zusätzlich sollte im Rahmen der funktionellen Analysen auch ein möglicher Einfluss der Expression von *SEC62* auf die EMT-beteiligten Proteine Vimentin, E-Cadherin und  $\beta$ -Aktin untersucht werden. In keiner der analysierten HeLa-Zellpopulationen ließ sich eine *SEC62*-abhängige Beeinflussung des Vimentin- und  $\beta$ -Aktin-Proteingehalts beobachten (Abb. 9A). E-Cadherin ließ sich im Einklang mit der bisherigen Literatur nicht nachweisen (Vessey *et al.*, 1995). Auch waren in Immunfluoreszenz Untersuchungen keine Änderungen der zellulären Lokalisation von SEC62 und Vimentin, oder des Aktin-Zytoskeletts zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Folglich scheint der SEC62-Proteingehalt in HeLa-Zellen keinen Einfluss auf eine Induktion der EMT zu haben, so dass die Stimulation des Migrationsverhaltens der Zellen vermutlich auf anderen Mechanismen beruht.



**Abb. 10: Migrations- und Proliferationspotenzial von HeLa-Zellen in Abhängigkeit der *SEC62*-Expression.** Die Migration von HeLa-Zellen und ihr Proliferationspotenzial wurden nach Genstilllegung von *SEC62* (*SEC62* UTR siRNA) und dessen Überexpression (*SEC62* Plasmid; siehe Text) analysiert. **(A)** Statistische Auswertung der nach 15 Stunden im Boyden-Kammer-System migrierten HeLa-Zellen, bezogen auf die jeweiligen siRNA- bzw. Plasmid-Kontrolltransfektionen. Des Weiteren sind repräsentative Messungen des Zellindex dargestellt, zur Analyse der Zellproliferation nach **(B)** siRNA- bzw. **(D)** Plasmid-Transfektion. **(C)** Statistische Auswertung des exponentiellen Wachstums (50 – 74 h) der Proliferationskurve von HeLa-Zellen, bezogen auf die jeweiligen siRNA- bzw. Plasmid-Kontrolltransfektionen. Die in (A) und (C) gezeigten Experimente wurden in vier biologischen Replikaten durchgeführt ( $n = 4$ ), wobei jeweils mindestens Triplikate untersucht wurden. Alle Einzelwerte sind als Punkt im Diagramm aufgetragen. Der Median wird durch eine rote Linie angezeigt, die Whisker stellen den Abstand vom ersten zum dritten Quartil dar.

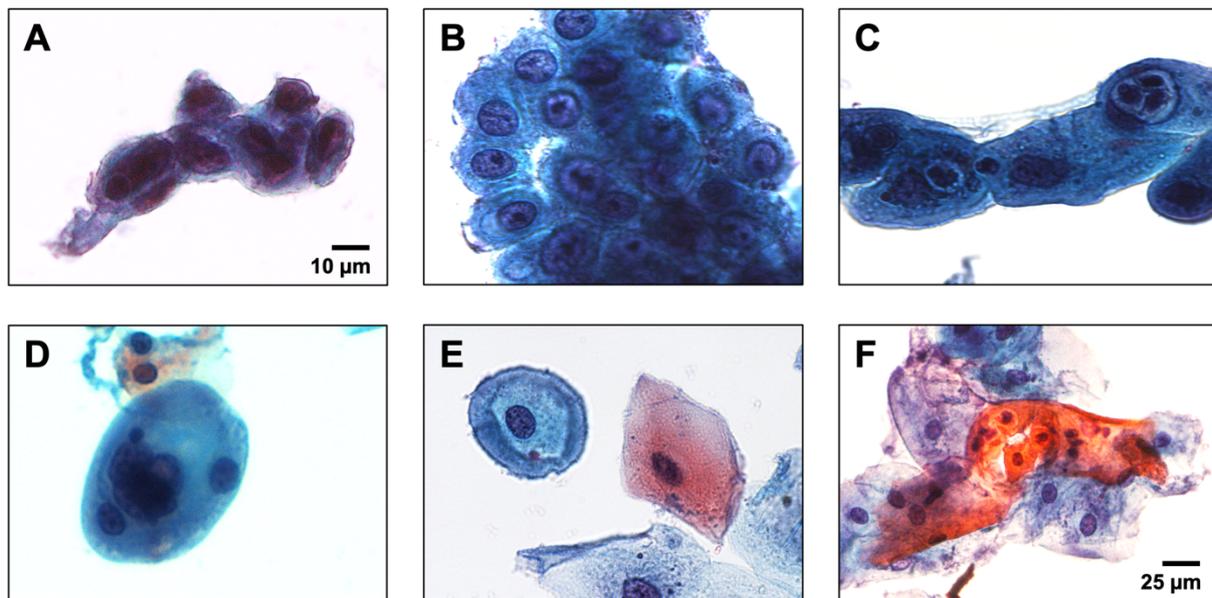
Im Rahmen dieses Projektes konnte somit gezeigt werden, dass flüssigkeitsbasierte, abstrichzytologische Proben von dysplastischen Läsionen der Zervix für verschiedene molekularbiologische Methoden zugänglich sind. Gleichzeitig konnte auf Basis dieser Untersuchungen *SEC62* als potenzieller Marker einer 3q26-Amplifikation und als migrationsstimulierendes Onkogen in der Entstehung des Zervixkarzinoms identifiziert werden.

## **2.2 Anwendung flüssigkeitsbasierter Abstrichzytologie zur Diagnostik von HNSCCs**

Nach den positiven Ergebnissen der Untersuchung flüssigkeitsbasierter, abstrichzytologischer Proben der Zervix sollte die Methodik nachfolgend für Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region etabliert werden. Zusätzlich sollten auf Basis der zytologischen Proben potenzielle Biomarker dieser Tumorentität identifiziert und auf ihre prognostische Validität hin überprüft werden. Eine Mehrheit der bisher veröffentlichten Studien zu prognostischen und prädiktiven Biomarkern bei HNSCCs wurde an invasiv gewonnenem Untersuchungsmaterial durchgeführt. Typischerweise zeigen HNSCC-Patienten häufig aber schon zum Zeitpunkt der Diagnosestellung einen deutlich reduzierten Allgemeinzustand, welcher mit einem erhöhten Risiko für intraoperative Komplikationen und Narkosezwischenfälle einhergeht. Die Abstrichzytologie bietet hierbei den Vorteil, dass Proben im Rahmen einer ambulanten Vorstellung des Patienten nicht-invasiv gewonnen werden können.

### **2.2.1 Zytomorphologie von Kopf-Hals-Karzinomen**

Zur Überprüfung des Nutzens der flüssigkeitsbasierten Zytologie wurde jeweils Material eines Bürstenabstrichs von 183 HNSCC-Patienten und 20 gesunden Kontrollpatienten gesammelt. Von den gewonnenen Proben wurden in einem ersten Schritt zytologische Präparate angefertigt; anschließend diente eine Färbung nach Papanicolaou (PAP; siehe Material und Methoden Kapitel 4.2.4.1) der Beurteilung der Morphologie und gegebenenfalls Malignität des enthaltenen Zellmaterials. Hierbei konnten charakteristische, zytomorphologische Merkmale einer malignen Transformation von Plattenepithelzellen beobachtet werden, wie zum Beispiel eine erhöhte Chromatindichte und eine zugunsten des Zellkerns verschobene Kern-Plasma-Relation (Abb. 11).



**Abb. 11: Zytomorphologische Merkmale maligne transformierter Plattenepithelzellen der Kopf-Hals-Region.** Es sind exemplarische Mikroskopaufnahmen von PAP-gefärbten, zytologischen HNSCC-Präparaten dargestellt, welche charakteristische Merkmale maligne transformierter Plattenepithelzellen aufweisen. Diese umfassen: **(A)** zugunsten des Zellkerns verschobene Kern-Plasma-Relation, **(B)** verdickte Kernmembran und prominente Nukleoli, **(C)** zellulären Kannibalismus, **(D)** Mehrkernigkeit, **(E)** Koilozytose und **(F)** Parakeratose. Die jeweiligen Maßstabsangaben beziehen sich auf die Aufnahmen (A) - (E) beziehungsweise (F).

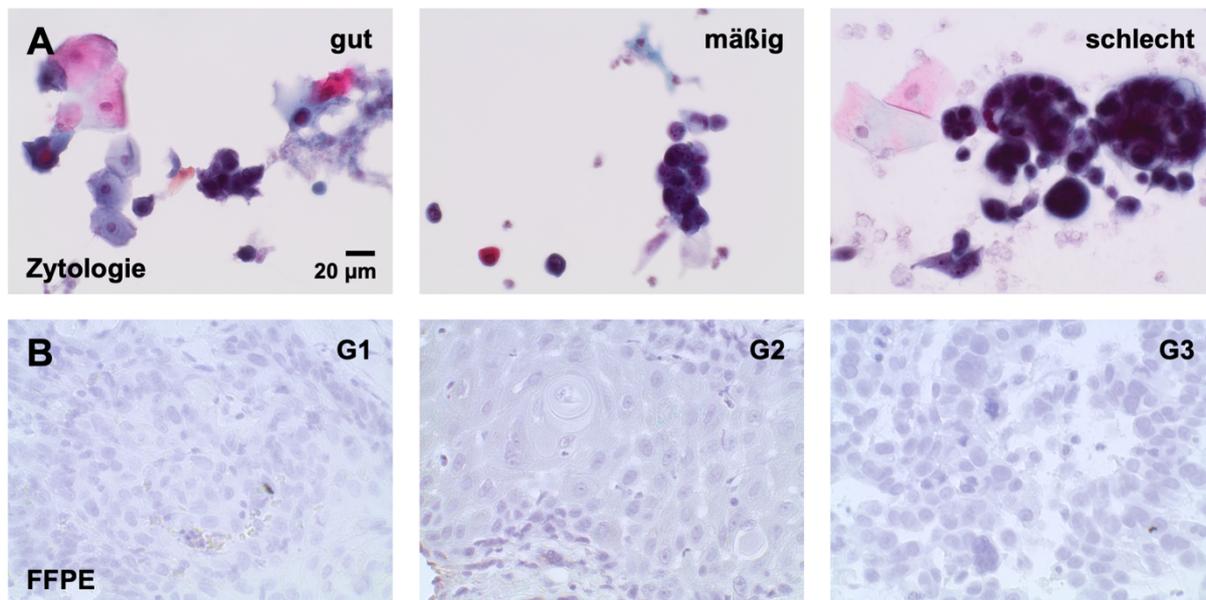
Die Gesamtauswertung zeigte, dass in 175 von 183 histologisch gesicherten HNSCC-Fällen Karzinomanteile im zytologischen Präparat nachzuweisen waren. Die acht karzinomfreien Präparate zeigten keine besonderen Auffälligkeiten der Patientengruppe in Bezug auf das Stadium oder die Lokalisation des Primärtumors. Alle 20 Präparate der gesunden Kontrollpatienten wiesen ausschließlich morphologisch unauffällige Plattenepithelien auf. Basierend auf diesen Ergebnissen ergäbe sich für die Methodik der flüssigkeitsbasierten Abstrichzytologie von HNSCC-Patienten eine Sensitivität von 96% (175 von 183 korrekt maligne detektiert) bei einer Spezifität von 100%. Um eine konkrete Aussage über die genaue Sensitivität und Spezifität dieser Methodik treffen zu können, wäre eine weitere Verifikation dieser Ergebnisse an einem größeren HNSCC-Patientenkollektiv und unter Berücksichtigung zusätzlicher gesunder Kontrollpatienten notwendig. Detaillierte klinische, wie auch epidemiologische Daten des somit zytologisch untersuchten HNSCC-Patientenkollektivs sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die gesunden Probanden waren im Hinblick auf eine möglichst hohe Übereinstimmung in Alters- und Geschlechtszusammensetzung mit dem HNSCC-Kollektiv ausgewählt worden.

**Tabelle 1:** Klinische und epidemiologische Daten des in der Abstrichzytologie untersuchten Patientenkollektivs mit einem Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs (HNSCC).

Kollektiv Zytologie		HNSCC	
Median Alter		64,0	
		<i>n</i>	Anteil
Gesamt		175	100%
Geschlecht	männlich	136	78%
	weiblich	39	22%
Primärtumor	Tonsille	41	23%
	Larynx	37	21%
	Hypopharynx	28	16%
	Zungengrund	26	15%
	Zunge	23	13%
	Mundboden	10	6%
	Weichgaumen	9	5%
	Wange	1	1%
UICC-Stadium	I	18	10%
	II	24	14%
	III	30	17%
	IVa	83	47%
	IVb	7	4%
	IVc	13	7%

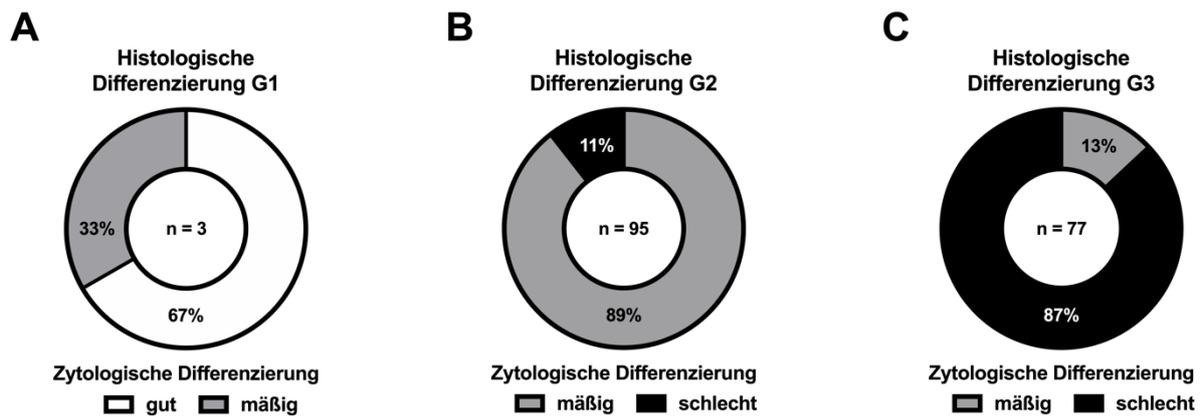
Das Medianalter des untersuchten HNSCC-Kollektivs betrug 64 Jahre, es beinhaltete zu 78% Männer und zu 22% Frauen. Die meisten Patienten (47%) wurden im UICC-Stadium IVa diagnostiziert, die häufigste Lokalisation des Primärtumors war mit 23% die Tonsille, gefolgt vom Larynx mit 21%.

Nachfolgend sollte für jeden Patienten der Differenzierungsgrad als Maß der Entartung der Karzinomzellen zytologisch bestimmt werden. Hierzu wurden die Chromatindichte und -struktur, eine mögliche Verhornung der Zellen und ihre Pleomorphie mikroskopisch bewertet. Diese Charakteristika sind ebenso Grundlage der pathologischen Diagnostik von Plattenepithelkarzinomen und stellen somit bereits etablierte Malignitätskriterien dar. Die mikroskopische Auswertung und Beurteilung der Präparate, welche exemplarisch in Abbildung 12 dargestellt ist, fand zusammen mit einer langjährig erfahrenen Zytologieassistentin statt (Barbara Linxweiler; Labor der Klinik für Frauenheilkunde, Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin des Universitätsklinikums des Saarlandes).



**Abb. 12: Repräsentative Darstellung der Bewertung des Differenzierungsgrads.** Der Differenzierungsgrad des jeweiligen Karzinoms der untersuchten HNSCC-Patienten wurde an abstrichzytologischen Präparaten **(A)** und histologisch an Tumorgewebeproben **(B)** bestimmt (siehe Text). Es sind repräsentative Mikroskopaufnahmen aller vorgekommenen Differenzierungsgrade gezeigt. Eine Anfärbung des zytologischen Materials erfolgte nach Papanicolaou (PAP), der histologischen Proben (FFPE) durch Hämatoxylin.

Für die statistische Analyse wurden die Ergebnisse der zytologischen Beurteilung des Differenzierungsgrades mit der pathologischen Diagnose, welche unabhängig und anhand invasiv gewonnener Tumorgewebeproben erfolgt war, korreliert (Abb. 13). Hierbei zeigte sich in 154 (88%) der 175 untersuchten Fälle eine identische Beurteilung des Differenzierungsgrades in beiden Methoden. Tendenziell war in histologisch niedrigen Graden der Entdifferenzierung (G1 und G2; Abb. 13A und B) eine leichte Überbewertung durch die zytologische Analyse und in hohen Graden eine Unterbewertung feststellbar (G3; Abb. 13C). Bei keinem der untersuchten Fälle wichen zytologische und histologische Beurteilung um mehr als eine Stufe ab. Der Differenzierungsgrad wirkte sich nicht auf das Gesamtüberleben der HNSCC-Patienten aus; bei reiner Berücksichtigung HPV-negativer Patienten (vgl. Kapitel 2.2.2) zeigte sich ein leichter Überlebensvorteil für niedrigere Differenzierungsgrade, sowohl in der zytologischen als auch in der histologischen Analyse (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse decken sich mit den bisherigen Erkenntnissen der Literatur (Zätterström *et al.*, 1991).



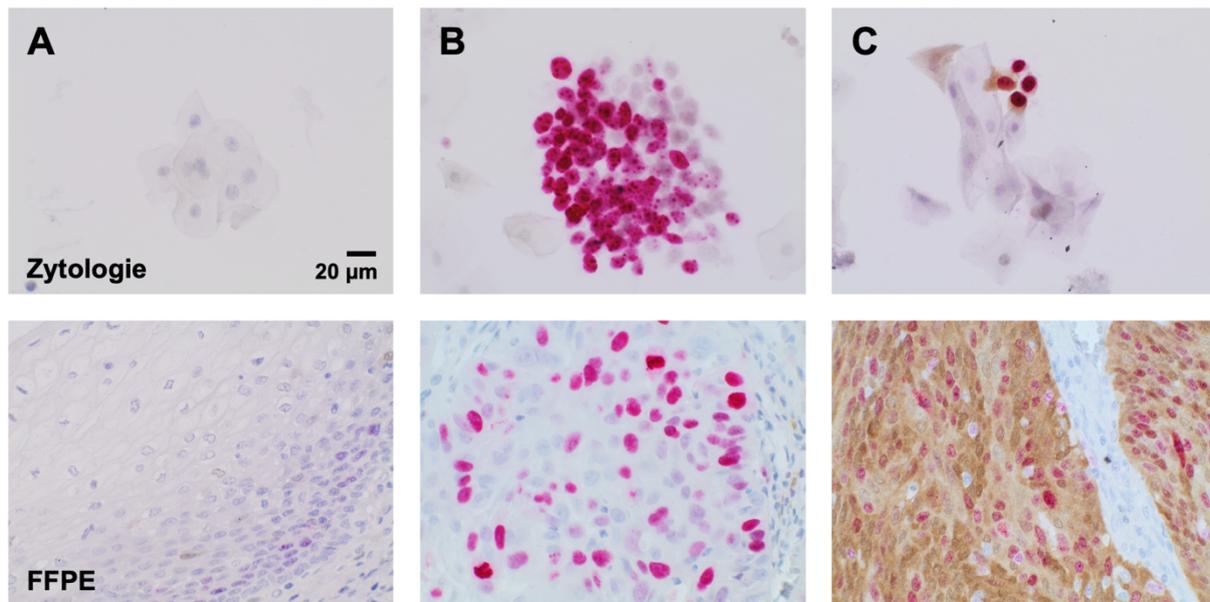
**Abb. 13: Korrelation der Ergebnisse der Zytomorphologie und der Histologie.** Der Differenzierungsgrad der untersuchten HNSCC-Zellen wurde anhand verschiedener etablierter Malignitätskriterien im zytologischen Präparat bestimmt (siehe Text). Die Ergebnisse wurden anschließend mit der pathologischen Diagnose des histologischen Präparates verglichen. Basierend auf den histologischen Differenzierungsgraden **(A)** G1, **(B)** G2 und **(C)** G3 sind jeweils die prozentualen Ergebnisse der Zytomorphologie dargestellt.

Dieses Projekt konnte somit die flüssigkeitsbasierte Abstrichzytologie zur nicht-invasiven Probengewinnung auf dem Gebiet der HNO-Onkologie etablieren. Durch die Anfertigung und Analyse mikroskopischer Präparate war eine Malignitätsdiagnostik des gewonnenen Zellmaterials möglich, für welche methodisch eine hohe Sensitivität sowie Spezifität nachgewiesen werden konnte.

### 2.2.2 Nachweis des HPV-Status an zytologischem Abstrichmaterial

Zahlreiche Studien der vergangenen Jahre konnten zeigen, dass neben dem bekannten Einfluss von Alkohol- und Nikotinkonsum eine Infektion mit Humanen Papillomviren (HPV) einen wesentlichen Risikofaktor für die Entstehung von Karzinomen der Kopf-Hals-Region darstellt. Trotz intensiver Forschungsarbeiten existiert auf dem Gebiet der HNO-Onkologie bisher keine einheitliche Methode zur Detektion des HPV-Tumorstatus. Weiterhin ist es schwierig zwischen einer latenten HPV-Infektion mit potenziell selbstlimitierendem Verlauf und einer transformierenden Infektion mit hohem Progressionsrisiko zu unterscheiden (vgl. Einleitung Kapitel 1.1.2). Im Jahr 2011 wurde daher, in Form der CINtec Plus Färbung, eine neue Methode der simultanen immunzytochemischen Detektion von p16 und Ki67 an zytologischem Abstrichmaterial der Zervix vorgestellt. Das Protein p16 dient hierbei als Surrogatmarker für die Aktivität des HPV-Onkogens E7, Ki67 als Proliferationsmarker der untersuchten Zellen. Da p16 regulär als Tumorsuppressor fungiert, ist eine simultane Expression beider Marker charakteristisch für Zellen, welche durch eine high-risk HPV-Infektion kanzerogen transformiert sind. Auf dem Gebiet der Gynäkologie konnte bereits ein hohes diagnostisches Potenzial dieser Methodik nachgewiesen werden (siehe auch Diskussion Kapitel 3.1.2). Eine erste Studie an invasiv gewonnenen Tumorgewebeproben konnte zudem die simultane Detektion von p16 und Ki67 zum Nachweis einer HPV-Infektion bei HNSCC-Patienten anwenden (Prigge *et al.*, 2014). Nachfolgend sollte die CINtec Plus Färbung auf die nicht-invasiv gewonnen abstrichzytologischen Proben der HNSCC-Patienten übertragen werden. Durch die zusätzliche hochsensitive Detektion der DNA von high-risk Papillomviren sollte die diagnostische Validität der Methodik weiter gesteigert werden. Die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen und Ergebnisse konnten in einem früheren Stadium von unserer Arbeitsgruppe im Jahr 2014 im Journal *Cancer Cytopathology* publiziert werden (Linxweiler *et al.*, 2014b).

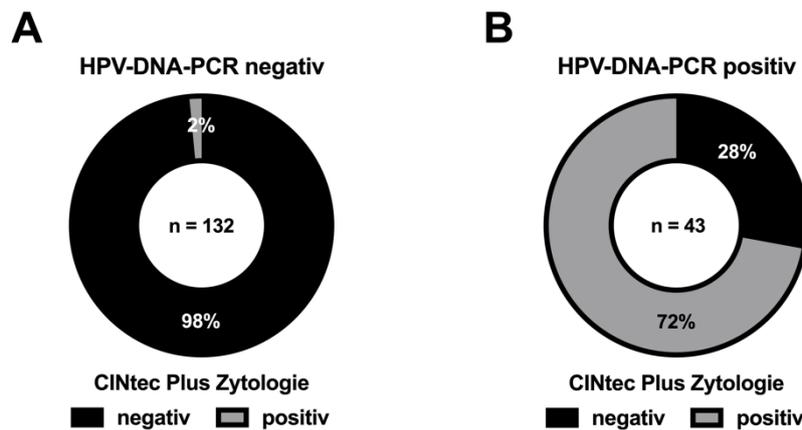
Eine exemplarische Darstellung der CINtec Plus Färbungen und der möglichen Detektionsmuster ist in Abbildung 14 gezeigt. Für eine repräsentative Subgruppe von 75 Patienten wurden zusätzlich immunhistochemische Färbungen an invasiv gewonnen Tumorgewebeproben (FFPE) durchgeführt. Diese stimmten in allen Fällen mit den Ergebnissen der zytologischen Präparate überein (Abb. 14, unten).



**Abb. 14: Repräsentative Darstellung der CINTec Plus Färbungen zum Nachweis einer HPV-Infektion.**

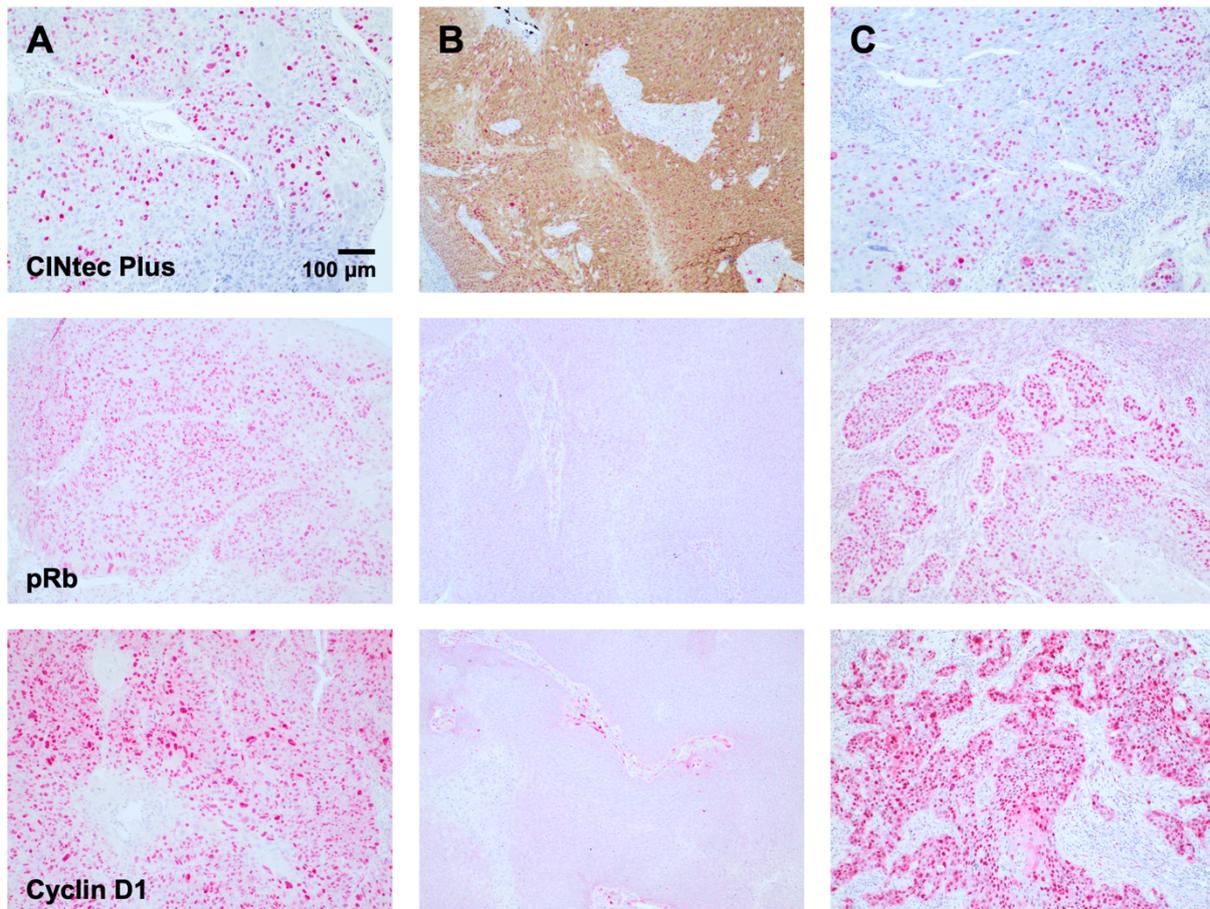
Das mögliche Vorliegen einer karzinogenen HPV-Infektion wurde mittels CINTec Plus Färbung (siehe Text) an abstrichzytologischen Präparaten von HNSCC-Patienten untersucht (Zytologie). Die Abbildung zeigt repräsentative Mikroskopaufnahmen eines gesunden Probanden (**A**) und zweier HNSCC-Patienten (**B**) & (**C**). Eine nukleäre Färbung des Proliferationsmarkers Ki67 ist in Rot dargestellt, eine zytoplasmatische Färbung des HPV-Surrogatmarkers p16 in Braun. Die Färbung von Tumorgewebeprobe(n) (FFPE) einer exemplarischen Auswahl an Patienten diente als interne histologische Kontrolle.

In der anschließenden statistischen Analyse zeigte sich erwartungsgemäß für alle 20 gesunden Kontrollpatienten ein negatives Ergebnis der CINTec Plus Zytologie sowie der HPV-DNA-PCR. Von 132 Fällen, die ein negatives Ergebnis in der HPV-DNA-PCR aufwiesen, zeigten 130 Fälle (98%) ebenfalls ein negatives Ergebnis der CINTec Plus Zytologie (Abb. 15A). Bei der nachträglichen Betrachtung eines Patienten mit abweichendem Ergebnis fiel auf, dass die initial in der PCR analysierte Probe keine Karzinomzellen enthalten hatte. Eine weitere Probe, welche zu einem späteren Zeitpunkt analysiert wurde und gesichert Anteile eines HNSCC enthielt, zeigte einen deutlichen Nachweis der DNA Humaner Papillomviren. Effektiv lag somit für 130 von 131 Patienten ein in beiden verwendeten Methoden einheitlich negatives Ergebnis für eine high-risk HPV-Infektion vor. Für diese Patienten wurde nachfolgend ein negativer HPV-Tumorstatus angenommen. Von den 43 positiven Fällen der HPV-DNA-PCR zeigten 31 Fälle (72%) ebenfalls ein positives Ergebnis der CINTec Plus Zytologie (Abb. 15B). Bei diesen Patienten kann somit von einem positiven HPV-Status ausgegangen werden. Die häufigste Lokalisation eines solchen HPV-positiven Primärtumors war mit 68% die Tonsille, gefolgt vom Zungenrund mit 19%.



**Abb. 15: Korrelation der Ergebnisse der HPV-DNA-PCR und der CINtec Plus Zytologie.**  
Die Ergebnisse der angewendeten Methoden zur Bestimmung einer möglichen, karzinogenen HPV-Infektion wurden miteinander verglichen. Basierend auf einem positiven **(A)** bzw. negativen **(B)** HPV-DNA-PCR-Nachweis sind jeweils anteilig die prozentualen Ergebnisse der CINtec Plus Zytologie dargestellt. Nähere Erläuterungen befinden sich im Text.

Zwölf Patienten (28%) mit positivem HPV-DNA-Nachweis zeigten in der immunzytologischen Doppelfärbung ein abweichendes negatives Ergebnis für die Detektion von p16, bei gleichzeitig gesichertem Vorliegen maligner Zellen mit deutlicher Ki67-Expression. Um dieses Phänomen genauer zu charakterisieren, wurden zusätzliche Färbungen der HPV-Surrogatmarker Retinoblastom-Protein (pRb) und Cyclin D1 an Tumorgewebeproben der betreffenden Patienten durchgeführt. Beide Gene werden bedingt durch die Aktivität des HPV-Onkogens E7, im Falle einer der Tumorerkrankung zugrunde liegenden HPV-Infektion, nur sehr gering exprimiert. Das jeweils resultierende Expressionsmuster wurde mit den parallel untersuchten Proben verglichen, welche einen eindeutig positiven beziehungsweise negativen HPV-Tumorstatus aufwiesen. Hierbei zeigte sich in allen Fällen eine Übereinstimmung der Expression von pRb und Cyclin D1 mit der HPV-negativer Fälle (Abb. 16). Dieses Ergebnis könnte somit auf eine latente HPV-Infektion schließen lassen, welche vermutlich nicht ursächlich für eine maligne Transformation der Zellen gewesen ist. Basierend auf diesen Ergebnissen ergäbe sich für die Methodik der CINtec Plus Immunzytologie an Abstrichpräparaten von HNSCC-Patienten eine Spezifität von 99% (130 von 131 Fällen korrekt negativ detektiert). Durch die Kombination mit der sensitiveren HPV-DNA-PCR würde, bei einer reinen Berücksichtigung der einheitlichen Ergebnisse, eine Sensitivität von 100% erreicht werden. Dies setzt jedoch voraus, dass die beschriebene Detektion und Interpretation einer latenten HPV-Infektion sich weiterhin bestätigen lässt.



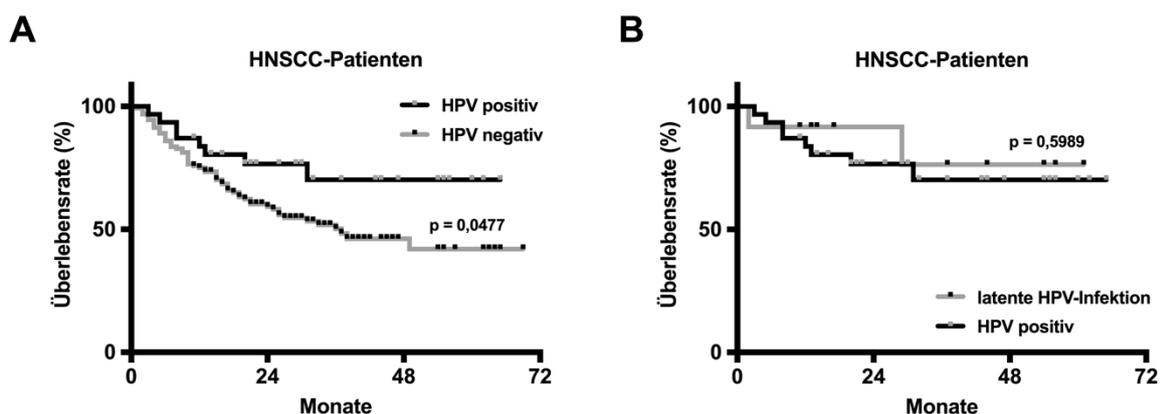
**Abb. 16: Repräsentative Darstellung der immunhistochemischen Färbungen verschiedener HPV-Surrogatmarker.** Es sind repräsentative Mikroskopaufnahmen immunhistochemischer Färbungen der HPV-Surrogatmarker pRb und Cyclin D1 gezeigt; zusätzlich ist das Ergebnis der korrespondierenden CINtec Plus Färbung dargestellt. Darstellung eines beispielhaften Patienten mit: **(A)** einheitlich negativem HPV-Nachweis in HPV-DNA-PCR und CINtec Plus Zytologie; **(B)** einheitlich positivem HPV-Nachweis; **(C)** negativer HPV-DNA-PCR und positiver CINtec Plus Zytologie.

Um valide Aussagen über die genaue Sensitivität und Spezifität dieser Methodik treffen zu können, wäre eine Verifikation dieser Ergebnisse an einem größeren HNSCC-Patientenkollektiv und unter Berücksichtigung zusätzlicher gesunder Kontrollpatienten notwendig.

Zur Untersuchung einer möglichen prognostischen Relevanz der erzielten Ergebnisse wurden der HPV-Status der HNSCC-Patienten, welcher durch Kombination der CINtec Plus Zytologie mit einer HPV-DNA-PCR bestimmt wurde, mit deren Gesamtüberleben korreliert. Hierbei konnte festgestellt werden, dass ein positiver HPV-Tumorstatus signifikanter Prädiktor eines besseren Gesamtüberlebens der Patienten ist ( $p = 0,0477$ ; Abb. 17A). Die Hazard Ratio nach der logrank-Methode liegt für die HPV-positiven Patienten bei 0,4856 (95% Konfidenzintervall: 0,2724 – 0,8657), was bedeutet,

dass bei den hier untersuchten HNSCC-Patienten ein positiver HPV-Tumorstatus mit einem um 51,4% verringerten Sterberisiko einherging. Dieses Ergebnis entspricht vollständig der Datenlage in der aktuellen Literatur, muss jedoch unter dem Vorbehalt gesehen werden, dass im hier untersuchten Kollektiv nur 31 Patienten einen positiven HPV-Status aufwiesen. Die mediane Nachbeobachtungsdauer der Patienten betrug 35 Monate. Bemerkenswerterweise zeigten die zwölf Patienten mit potenziell latenter HPV-Infektion ein zu HPV-positiven Patienten vergleichbares Gesamtüberleben (Abb. 17B). Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch bei diesen Patienten eine HPV-induzierte kanzerogene Transformation der Zellen stattgefunden hat. Ein Verlust der Aktivität des viralen Onkogens E7 zum Zeitpunkt der durchgeführten Analysen scheint dennoch wahrscheinlich.

Zusammenfassend zeigen die beschriebenen Untersuchungen, dass die in der gynäkologischen Onkologie etablierte Methode der CIntec Plus Immunzytologie erfolgreich an abstrichzytologischen Proben von HNSCC-Patienten angewandt werden konnte. Zusätzlich war es möglich, durch die Kombination mit einer HPV-DNA-PCR die Sensitivität der Methodik weiterhin zu erhöhen. Hierdurch liegt nun ein System vor, welches anhand von nicht-invasiv gewonnenen Proben zuverlässig den HPV-Tumorstatus von HNSCC-Patienten zu bestimmen vermag.



**Abb. 17: Prognostische Relevanz des HPV-Status bei HNSCC-Patienten.** Mithilfe von Kaplan-Meier-Analysen wurde der Einfluss des HPV-Status auf das Gesamtüberleben der HNSCC-Patienten überprüft. Der HPV-Status wurde hierbei über die kombinierten Ergebnisse der HPV-DNA-PCR und der CIntec Plus Zytologie definiert: Ein HPV-Nachweis in beiden Methoden wurde als positiver HPV-Status interpretiert (**A**), ein fehlender Nachweis in beiden Methoden als negativer HPV-Status und (**B**) ein positives PCR-Ergebnis bei negativer Zytologie als potenziell latente HPV-Infektion (siehe Text). Schwarze oder graue Punkte auf den Kurven zeigen zensierte Überlebensdaten an.

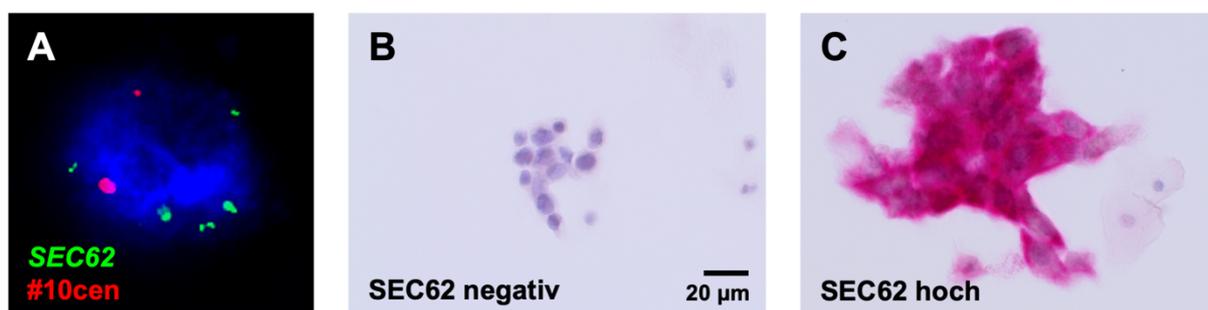
### 2.2.3 Analyse der Expression von *SEC62* an zytologischem Abstrichmaterial von HNSCC-Patienten

Nachdem, wie in den vorherigen Abschnitten beschrieben, die flüssigkeitsbasierte Abstrichzytologie erfolgreich bei Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region angewendet werden konnte, sollte nachfolgend auch bei dieser Entität die weitere Zugänglichkeit der Proben für molekularbiologische Methoden untersucht werden. Hierbei sollten zusätzlich erste Hinweise auf einen möglichen Einfluss des potenziellen 3q-Onkogens *SEC62* auf die Karzinogenese von HNSCCs gesammelt werden (vgl. Einleitung Kapitel 1.2). Da für die vorausgegangenen Versuche bereits ein bis zwei Präparate der jeweiligen Abstrichsuspension angefertigt worden waren, standen für die nachfolgenden Untersuchungen noch 121 der ursprünglich 175 Proben zur Verfügung.

**Tabelle 2:** Klinische und epidemiologische Daten des immunzytochemisch untersuchten (ICC) Patientenkollektivs mit einem Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs (HNSCC).

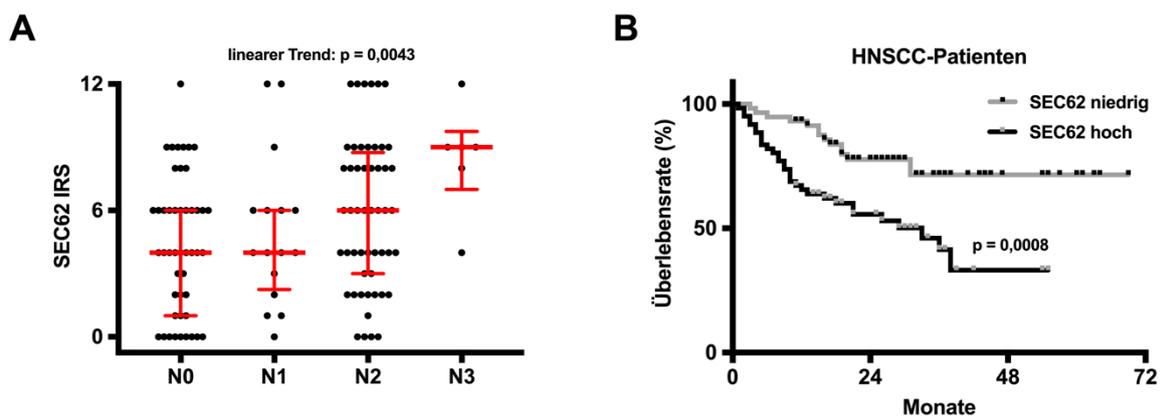
Kollektiv ICC		HNSCC	
Median Alter		65,0	
		<i>n</i>	Anteil
Gesamt		121	100%
Geschlecht	männlich	97	80%
	weiblich	24	20%
Primärtumor	Tonsille	28	23%
	Larynx	29	24%
	Hypopharynx	20	17%
	Zungengrund	15	12%
	Zunge	16	13%
	Mundboden	8	7%
	Weichgaumen	5	4%
HPV-Status	negativ	91	75%
	latent	7	6%
	positiv	23	19%
UICC-Stadium	I	15	12%
	II	17	14%
	III	24	20%
	IVa	54	45%
	IVb	5	4%
	IVc	6	5%

Die 54 ausgeschlossenen Proben wiesen zu diesem Zeitpunkt eine zu geringe Anzahl oder keine valide bewertbaren Karzinomzellen mehr auf. Detaillierte klinische sowie epidemiologische Daten des weiterhin untersuchten Patientenkollektivs sind in Tabelle 2 aufgeführt. Es zeigten sich keine bedeutenden Abweichungen vom ursprünglichen Kollektiv, so dass eine generell geringere Qualität der Proben einer bestimmten Tumorlokalisierung oder Patientensubgruppe größtenteils ausgeschlossen werden kann. In einem begrenzten Rahmen sollte das Vorliegen möglicher Gewinne und Amplifikationen des Gens *SEC62* mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) ermittelt werden. Eine exemplarische Darstellung des zytogenetischen Nachweises von *SEC62* ist in Abbildung 18A gezeigt. Die erste Analyse einer repräsentativen Subgruppe von 20 Patienten ergab eine gute Zugänglichkeit der abstrichzytologischen HNSCC-Präparate, bei jedoch teilweise vermehrt auftretender, durch bakterielle Besiedlung des Pharynx, Larynx und der Mundhöhle verursachter, Hintergrundfluoreszenz. Aufgrund daher notwendiger methodischer Anpassungen wurde eine FISH-Analyse der abstrichzytologischen Präparate in ein weiteres, umfassenderes Projekt ausgelagert, welches sich aktuell weiterhin in Bearbeitung befindet. Des Weiteren sollte mittels immunzytochemischer Färbungen der Proteingehalt von *SEC62* in den 121 vorliegenden Proben ermittelt und durch einen Immunreaktiven Score (IRS) bewertet werden, welcher die Färbeintensität in Relation zum Anteil der gefärbten Zellen setzt (siehe Material und Methoden Kapitel 4.3.7). Die immunzytochemischen Färbungen von *SEC62* sind exemplarisch in Abbildung 18B und C dargestellt.



**Abb. 18: Repräsentative Darstellung der zytologischen Analysen zur Expression von *SEC62*.** Das Vorliegen und die Expression des Gens *SEC62* wurde an abstrichzytologischen Präparaten von HNSCC-Patienten untersucht. **(A)** Repräsentative Darstellung eines Zellkerns in der FISH-Analyse zur Identifikation von Gewinnen und Amplifikationen von *SEC62* (grün markiert). Des Weiteren sind repräsentative Mikroskopaufnahmen immunzytochemischer *SEC62*-Färbungen zweier HNSCC-Patienten gezeigt, welche ein negatives Färbemuster **(B)** bzw. eine starke Anfärbung aufwiesen **(C)**. In **(A)** wurde eine Sonde gegen die Zentromerregion von Chromosom 10 (#10cen; rot) als interne Hybridisierungskontrolle verwendet. Eine Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Aufnahme in 60facher Vergrößerung.

Die statistische Analyse zeigte mit fortschreitendem Grad der Metastasierung, gemessen an der pathologischen N-Klassifikation, eine schrittweise gesteigerte Zunahme des SEC62-Proteingehalts (Abb. 19A). Die deutlichste Zunahme war hierbei von den Stadien N1 bis N3 zu beobachten. Insgesamt ließ sich ein signifikanter linearer Trend nachweisen ( $p = 0,0043$ ). Zur Untersuchung einer möglichen prognostischen Relevanz wurde der SEC62-Proteingehalt mit dem Gesamtüberleben der HNSCC-Patienten korreliert. Hierbei konnte festgestellt werden, dass Patienten mit einer hohen SEC62-Expression ein hochsignifikant kürzeres Gesamtüberleben aufwiesen ( $p = 0,0008$ ; Abb. 19B). Die Hazard Ratio nach der logrank-Methode liegt für diese Patientengruppe bei 2,789 (95% Konfidenzintervall: 1,548 – 5,022), was bedeutet, dass bei den hier zytologisch untersuchten HNSCC-Patienten ein hohes Vorliegen von SEC62 mit einem um 178% erhöhten Sterberisiko einherging. Die mediane Nachbeobachtungsdauer betrug 32 Monate.



**Abb. 19: Analyse des SEC62-Proteingehalts und dessen prognostischer Relevanz bei HNSCC-Patienten.** Der Proteingehalt von SEC62 wurde immunzytochemisch an abstrichzytologischen Präparaten von HNSCC-Patienten ( $n = 121$ ) untersucht und mittels des IRS quantifiziert. **(A)** Statistische Analyse des SEC62-Proteingehalts, segregiert nach pathologischem N-Stadium. **(B)** Kaplan-Meier-Analyse zur Bestimmung des Einflusses der SEC62-Expression auf das Gesamtüberleben der HNSCC-Patienten. Schwarze oder graue Punkte auf den Kurven zeigen zensierte Überlebensdaten an. In (A) sind alle Einzelwerte als Punkt im Diagramm aufgetragen. Der Median wird durch eine rote Linie angezeigt, die Whisker stellen den Abstand vom ersten zum dritten Quartil dar. Das Signifikanzniveau von  $p = 0,0043$  wurde mittels einfaktorierlicher Varianzanalyse (one-way ANOVA) und nachfolgendem Test auf einen linearen Trend ermittelt.

In diesem Teilprojekt konnte somit gezeigt werden, dass auch flüssigkeitsbasierte, abstrichzytologische Proben von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region für verschiedene molekularbiologische Methoden zugänglich sind. Zusätzlich konnten erste Hinweise auf eine mögliche Beteiligung und Metastasierungs-Assoziation von *SEC62* bei der Entstehung von HNSCCs gesammelt werden. Nachfolgend sollte in diesem Zusammenhang die Rolle von *SEC62* näher untersucht werden, auch basierend auf invasiv gewonnenem Material, als aktuellem Goldstandard zum immunhistochemischen Nachweis von Proteinen.

#### **2.2.4 Einfluss des Gens *SEC62* auf die lymphogene Metastasierung von HNSCCs**

Auf molekularer Ebene konnten neben dem HPV-Status bisher nur wenige prognostische und prädiktive Marker für Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region identifiziert werden (vgl. Einleitung Kapitel 1.1.2). Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben konnten jedoch erste Hinweise auf eine Beteiligung des Chromosomenabschnitt 3q-codierten Gens *SEC62* bei der Entstehung von HNSCCs gesammelt werden. Nachfolgend sollte daher dessen Einfluss auf die lymphogene Metastasierung und die Tumorzellmigration bei HNSCC-Patienten untersucht werden, um die Rolle von *SEC62* als mögliches Onkogen näher zu charakterisieren. In Ergänzung der Ergebnisse der zytologischen Untersuchungen sollte eine Analyse der *SEC62*-Expression hierbei an invasiv gewonnenen Tumorgewebeproben erfolgen, da diese den aktuellen Goldstandard für den immunhistochemischen Nachweis von Proteinen darstellen. Die in diesem Kapitel beschriebenen Untersuchungen und Ergebnisse konnten von unserer Arbeitsgruppe im Jahr 2016 im Journal *Oncotarget* publiziert werden (Bochen *et al.*, 2016).

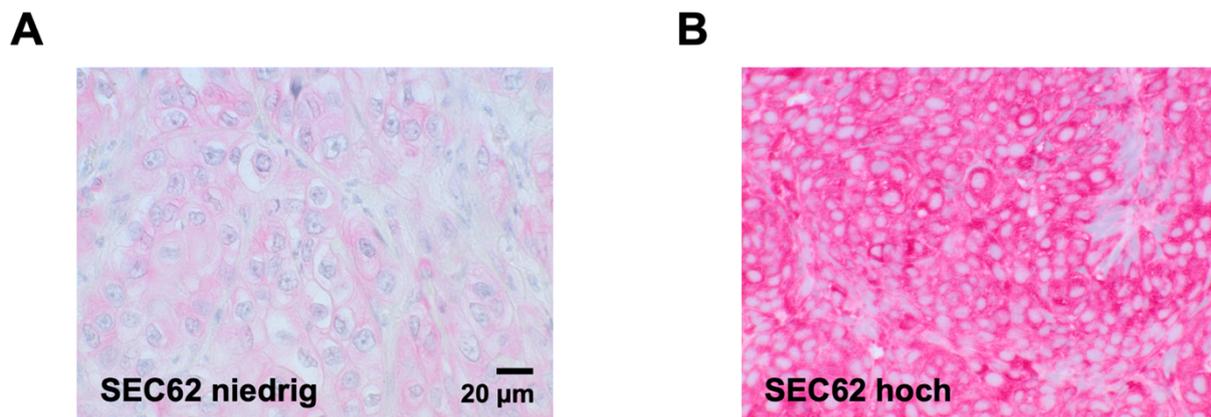
##### **2.2.4.1 Analyse und prognostische Relevanz der Expression von *SEC62***

Um die Rolle von *SEC62* näher zu charakterisieren, wurde zuerst dessen Expression immunhistochemisch an Tumorgewebeproben von 65 Patienten mit einem lymphogen metastasierten HNSCC auf Proteinebene bestimmt. Hierzu wurden jeweils repräsentative Gewebeproben des Primärtumors und einer Lymphknotenmetastase untersucht. Das Medianalter des so untersuchten HNSCC-Kollektivs betrug 65 Jahre, es beinhaltete zu

82% Männer und zu 18% Frauen. Die meisten Patienten (43%) wurden im UICC-Stadium III diagnostiziert, die häufigste Lokalisation des Primärtumors war mit 37% die Tonsille, gefolgt vom Zungengrund mit 22%. Ein positiver HPV-Tumorstatus konnte in 29% der Patienten nachgewiesen werden. Detaillierte klinische sowie epidemiologische Daten des eingeschlossenen Patientenkollektivs sind in Tabelle 3 aufgeführt. Zur Auswertung der immunhistochemischen Färbungen, welche exemplarisch in Abbildung 20 dargestellt sind, wurde ein modifizierter Immunreaktiver Score (mIRS) verwendet, welcher die zwei hauptsächlich im Präparat vorkommenden Färbeintensitäten bewertet und in Bezug zu einer parallel untersuchten Positivkontrolle setzt (siehe Material und Methoden Kapitel 4.3.9). Die nachfolgend beschriebene Analyse der *SEC62*-Expression wurde in Zusammenarbeit mit cand. med. Hana Adisurya im Rahmen ihrer medizinischen Promotionsarbeit „Einfluss der 3q-Onkogene *SEC62* und *SOX2* auf die lymphogene Metastasierung bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich; Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes, seit 2015“ durchgeführt.

**Tabelle 3:** Klinische und epidemiologische Daten des immunhistochemisch untersuchten (IHC) Patientenkollektivs mit einem Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs (HNSCC).

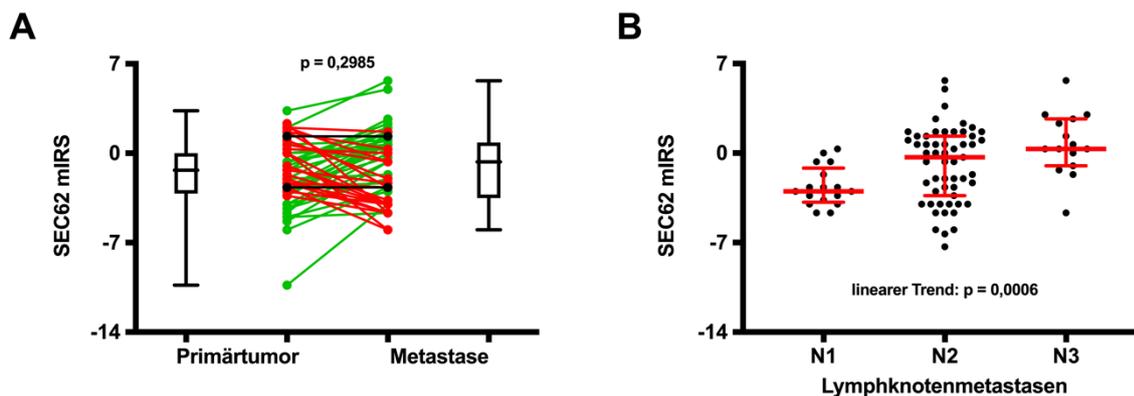
Kollektiv IHC		HNSCC	
Median Alter		65,0	
		<b>n</b>	<b>Anteil</b>
<b>Gesamt</b>		65	100%
<b>Geschlecht</b>	männlich	53	82%
	weiblich	12	12%
<b>Primärtumor</b>	Tonsille	24	37%
	Larynx	10	15%
	Hypopharynx	12	18%
	Zungengrund	14	22%
	Zunge	1	2%
	Mundboden	4	6%
	Wange	0	0%
<b>HPV-Status</b>	negativ	46	71%
	positiv	19	29%
<b>UICC-Stadium</b>	I	0	0%
	II	2	3%
	III	28	43%
	IVa	22	34%
	IVb	11	17%
	IVc	2	3%



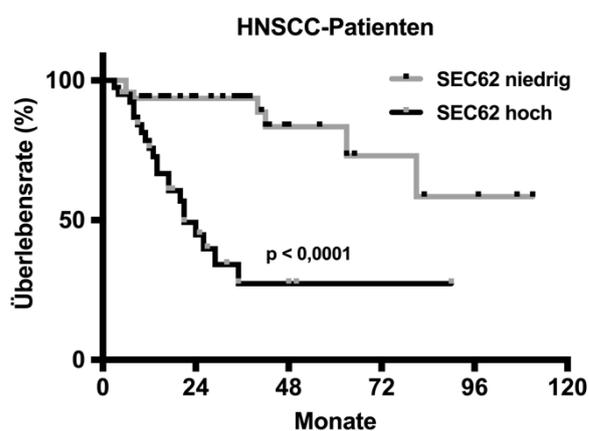
**Abb. 20: Repräsentative Darstellung der immunhistochemischen Färbungen von SEC62.** Es sind repräsentative Mikroskopaufnahmen immunhistochemischer Färbungen zweier Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region gezeigt, welche ein schwaches Färbemuster des Proteins SEC62 (**A**) bzw. eine starke Anfärbung aufwiesen (**B**).

Die statistische Analyse der immunhistochemischen Färbungen zeigte eine geringfügige Tendenz zu einem vermehrten Vorliegen des Proteins SEC62 in den Lymphknotenmetastasen der untersuchten HNSCC-Patienten, verglichen mit dem jeweiligen Primärtumor ( $p = 0,2985$ ; Abb. 21A). Zusätzlich ließ sich eine schrittweise gesteigerte Zunahme des SEC62-Proteingehalts in den Lymphknotenmetastasen feststellen, welche mit einem fortschreitenden Grad der Metastasierung, gemessen an der pathologischen N-Klassifikation, korrelierte (Abb. 21B). Die deutlichste Zunahme war hierbei vom Stadium N1 zu N2 zu beobachten. Insgesamt ließ sich ein signifikanter linearer Trend nachweisen ( $p = 0,0006$ ).

Zur Untersuchung einer möglichen prognostischen Relevanz wurde der in den Lymphknotenmetastasen bestimmte SEC62-Proteingehalt mit dem Gesamtüberleben der HNSCC-Patienten korreliert. Hierbei konnte festgestellt werden, dass Patienten mit einer hohen SEC62-Expression ein hochsignifikant kürzeres Gesamtüberleben aufwiesen ( $p < 0,0001$ ; Abb. 22). Die Hazard Ratio nach der logrank-Methode liegt für diese Patientengruppe bei 5,714 (95% Konfidenzintervall: 2,621 – 12,460), was bedeutet, dass bei den hier untersuchten HNSCC-Patienten ein hohes Vorliegen von SEC62 mit einem um 471% erhöhten Sterberisiko einherging. Die mediane Nachbeobachtungsdauer betrug 35 Monate.



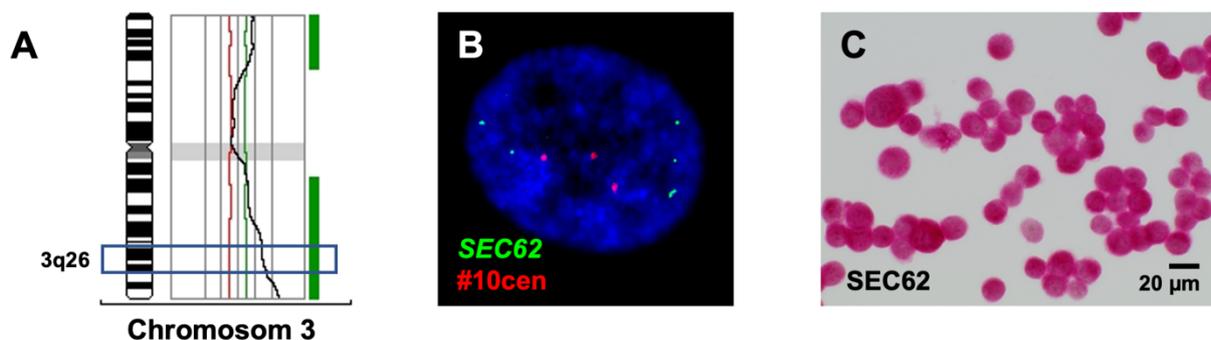
**Abb. 21: Analyse des SEC62-Proteingehalts in Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen von HNSCC-Patienten.** Der Proteingehalt von SEC62 wurde immunhistochemisch an Tumorgewebeproben von HNSCC-Patienten ( $n = 65$ ) untersucht und mittels des mIRS quantifiziert. **(A)** Vergleich des SEC62-Proteingehalts in Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen. Alle Einzelwerte sind als farblich markierter Punkt im Diagramm aufgetragen, eine Linie verbindet die beiden Werte für den Primärtumor und die Lymphknotenmetastasen desselben Patienten. Ein in der Metastase erhöhter SEC62-Proteingehalt ist in Grün, ein verringerter in Rot und ein gleichbleibender in Schwarz dargestellt. **(B)** Statistische Analyse des SEC62-Proteingehalts in Lymphknotenmetastasen, segregiert nach pathologischem N-Stadium. Alle Einzelwerte sind als Punkt im Diagramm aufgetragen. Der Median wird durch eine rote Linie angezeigt, die Whisker stellen den Abstand vom ersten zum dritten Quartil dar. Das Signifikanzniveau von  $p = 0,0006$  wurde mittels einfaktorierlicher Varianzanalyse (one-way ANOVA) und nachfolgendem Test auf einen linearen Trend ermittelt. In (A) stellt jede Box der Box-Whisker-Plots den Abstand vom ersten zum dritten Quartil dar, der Median wird durch eine Linie innerhalb der Box angezeigt. Die Whisker außerhalb der Box reichen jeweils vom kleinsten bis zum größten Datenpunkt.



**Abb. 22: Prognostische Relevanz der SEC62-Expression bei HNSCC-Patienten.** Mithilfe von Kaplan-Meier-Analysen wurde der Einfluss der SEC62-Expression auf das Gesamtüberleben der HNSCC-Patienten überprüft. Schwarze oder graue Punkte auf den Kurven zeigen zensierte Überlebensdaten an.

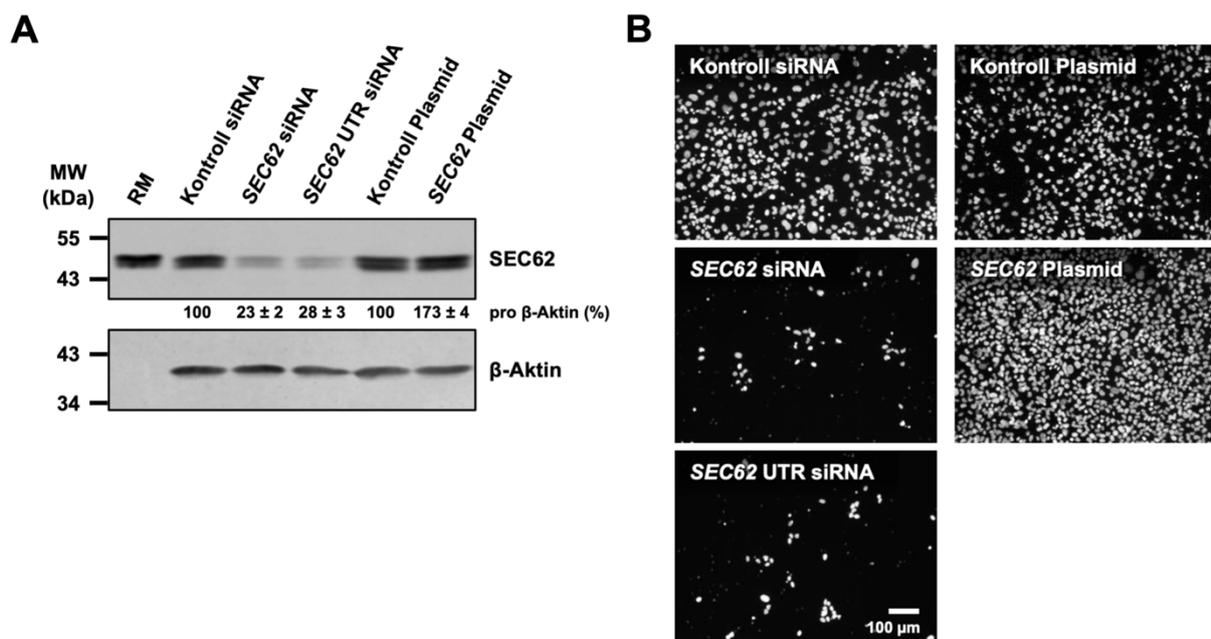
### 2.2.4.2 Auswirkungen der Expression von *SEC62* auf die HNSCC-Tumorzellbiologie

Basierend auf den vorausgehenden Ergebnissen der immunzytologischen und -histochemischen Analysen sollte nachfolgend der Einfluss einer veränderten *SEC62*-Expression auf die Tumorzellbiologie funktionell näher charakterisiert werden. Hierzu wurde in einem *in vitro* Modell die Zelllinie UM-SCC1 verwendet, welche aus dem Plattenepithel eines Mundbodenkarzinoms etabliert worden ist. Diese wies bei der Karyotypisierung in allen untersuchten Zellen eine Trisomie des Chromosoms 3 auf (Daten nicht gezeigt) und zeigte in komparativen genomischen Hybridisierungen (CGH) zusätzlich Gewinne der genetischen Informationen des gesamten langen Arms von Chromosom 3, inklusive der *SEC62*-codierenden Region 3q26 (Abb. 23A). Bei der genaueren Analyse dieser Region mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen (FISH) waren deutliche Amplifikationen des Gens *SEC62* nachzuweisen (Abb. 23B). Des Weiteren konnte in immunzytochemischen Färbungen ein hoher *SEC62*-Proteingehalt beobachtet werden (Abb. 23C). Folglich scheint die Zelllinie UM-SCC1 damit ein Modell für Zellen eines Plattenepithelkarzinoms der Kopf-Hals-Region mit gesteigerter *SEC62*-Expression darzustellen.



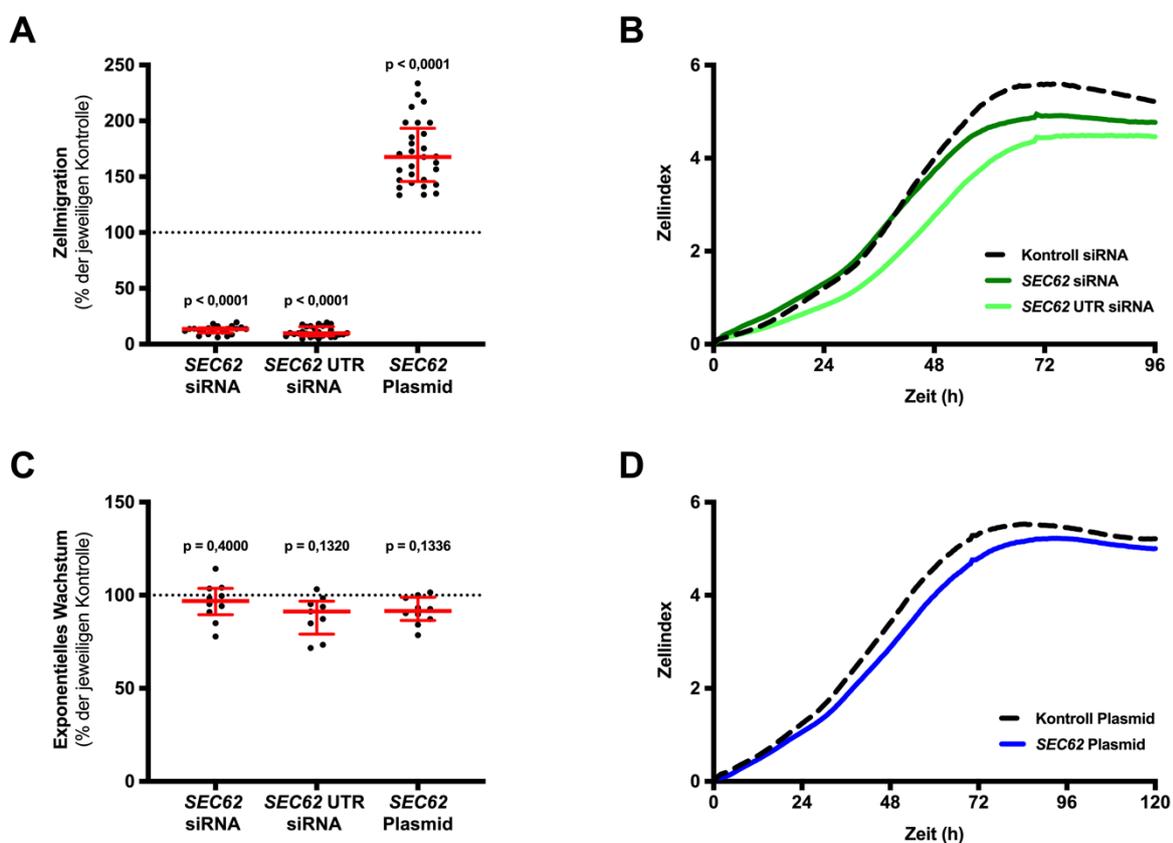
**Abb. 23: Zytologische Analyse der *SEC62*-Expression von UM-SCC1-Zellen.** Das Vorliegen und die Expression des Gens *SEC62* wurde in der Zelllinie UM-SCC1 mittels CGH, FISH und immunzytochemischer Färbungen analysiert (siehe Text). **(A)** Statistische Auswertung der in der CGH analysierten Metaphase-Chromosomen. Dargestellt ist das betreffende Summenprofil von Chromosom 3 zur Identifikation von genetischen Gewinnen und Verlusten. Der Zugewinn genetischer Informationen ist durch einen grünen Balken markiert, der Verlust in Rot. **(B)** Repräsentative Darstellung eines Zellkerns in der FISH-Analyse, zur Identifikation von Gewinnen und Amplifikationen des Gens *SEC62* (grün markiert). **(C)** Repräsentative Mikroskopaufnahme der immunzytochemischen Färbung von *SEC62* in UM-SCC1-Zellen. Die *SEC62*-codierende Region 3q26 ist in (A) durch einen blauen Balken hervorgehoben. In (B) wurde eine Sonde gegen die Zentromerregion von Chromosom 10 (#10cen; rot) als interne Hybridisierungskontrolle verwendet. Eine Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Aufnahme in 60facher Vergrößerung.

Für die nachfolgenden funktionellen Analysen sollte in UM-SCC1-Zellen die Expression des Gens *SEC62* mittels transienter Transfektion zweier verschiedener, jeweils gegen das Genprodukt gerichteter siRNAs (*SEC62* siRNA und *SEC62* UTR siRNA) stillgelegt beziehungsweise durch die eines *SEC62*-codierenden Plasmids gesteigert werden. Hierbei sollten durch die Verwendung unterschiedlicher siRNAs die möglichen Effekte gegebenenfalls auftretender unspezifischer Nebenwirkungen der einzelnen siRNAs minimiert werden. Durch die Gen-Stillegung von *SEC62* war es im Fall der Transfektion beider siRNAs möglich, den SEC62-Proteingehalt jeweils auf circa 25% des Gehalts der Kontrollzellen zu reduzieren. Die Plasmid-vermittelte Überexpression steigerte den SEC62-Proteingehalt auf durchschnittlich 173% (Abb. 24A). Die derartig behandelten Zellen wurden anschließend auf ihr Migrations- und Proliferationspotenzial hin untersucht. Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der im Boyden-Kammer-System migrierten Tumorzellen sind in Abbildung 24B dargestellt.



**Abb. 24: Analyse des SEC62-Proteingehalts und der Zellmigration nach Transfektion von UM-SCC1-Zellen.** Der SEC62-Proteingehalt und das Zellmigrationspotenzial von UM-SCC1-Zellen wurden nach Gen-Stillegung von *SEC62* (*SEC62*- und *SEC62* UTR siRNA) und dessen Überexpression (*SEC62* Plasmid; siehe Text) analysiert. **(A)** SDS-Page- und Western-Blot-Analyse zur Bestimmung des SEC62-Proteingehalts der jeweils transfizierten Zellpopulationen. Der relative SEC62-Proteingehalt pro  $\beta$ -Aktin ist unter den jeweiligen Banden als Mittelwert von drei biologischen Replikaten ( $n = 3$ ), inklusive seines Standardfehlers angegeben. Die Probengewinnung erfolgte nach Abschluss der Migrationsanalyse. **(B)** Repräsentative Darstellung der nach 72 Stunden im Boyden-Kammer-System migrierten UM-SCC1-Zellen. Eine Anfärbung der Zellkerne erfolgte mittels DAPI. In (A) dienten Raue Mikrosomen (RM) als Positivkontrolle für den Nachweis von SEC62.

Die statistische Analyse der Zellmigration zeigte, dass die Gen-Stillegung von *SEC62* in UM-SCC1-Zellen zu einer signifikanten Reduktion des Migrationspotenzials führte, wohingegen dessen Überexpression in einer deutlichen Stimulation der Migrationsfähigkeit resultierte (jeweils  $p < 0,0001$ ; Abb. 25A). In der Auswertung des exponentiellen Wachstums der untersuchten Zellpopulationen, welches exemplarisch in Abbildung 25B und D dargestellt ist, waren nur geringfügige, nicht signifikante Beeinflussungen des Proliferationspotenzials durch die jeweiligen Transfektionen zu beobachten (Abb. 25C).



**Abb. 25: Migrations- und Proliferationspotenzial von UM-SCC1-Zellen in Abhängigkeit der *SEC62*-Expression.** Die Migration von UM-SCC1-Zellen und ihr Proliferationspotenzial wurden nach Gen-Stillegung von *SEC62* (*SEC62*- und *SEC62* UTR siRNA) und dessen Überexpression (*SEC62* Plasmid; siehe Text) analysiert. **(A)** Statistische Auswertung der nach 72 Stunden im Boyden-Kammer-System migrierten UM-SCC1-Zellen, bezogen auf die jeweiligen siRNA- bzw. Plasmid-Kontrolltransfektionen. Des Weiteren sind repräsentative Messungen des Zellindex dargestellt, zur Analyse der Zellproliferation nach **(B)** siRNA- bzw. **(D)** Plasmid-Transfektion. **(C)** Statistische Auswertung des exponentiellen Wachstums (42 – 62 h) der Proliferationskurve von UM-SCC1-Zellen, bezogen auf die jeweiligen siRNA- bzw. Plasmid-Kontrolltransfektionen. Die in **(A)** und **(C)** gezeigten Experimente wurden in drei biologischen Replikaten durchgeführt ( $n = 3$ ), wobei jeweils mindestens Triplikate untersucht wurden. Alle Einzelwerte sind als Punkt im Diagramm aufgetragen. Der Median wird durch eine rote Linie angezeigt, die Whisker stellen den Abstand vom ersten zum dritten Quartil dar.

Basierend auf den zuvor genannten klinischen Analysen und *in vitro* Untersuchungen scheint eine gesteigerte *SEC62*-Expression das Metastasierungspotenzial von Kopf-Hals-Tumoren zu fördern und signifikanter Prädiktor eines schlechteren Gesamtüberlebens der betroffenen Patienten zu sein. Somit konnte *SEC62* als migrationsstimulierendes Onkogen in der Entstehung von HNSCC identifiziert werden. Dies stellt auf molekularer Ebene eine mögliche Erklärung für die klinisch oft schlechte Prognose von HNSCC-Patienten dar.

## **2.3 Untersuchungen zur Vitamin D Versorgung bei HNSCC-Patienten**

In den vergangenen Jahren finden sich in der wissenschaftlichen Literatur vermehrt Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen dem Vorliegen eines Vitamin D Mangels und der Inzidenz maligner Erkrankungen; für einige Entitäten konnte bereits auch eine prognostische Relevanz gezeigt werden. Zusätzlich scheinen diverse Komponenten des Immunsystems in ihrer Funktion und Spezifität auf eine ausreichende Vitamin D Versorgung angewiesen zu sein (vgl. Einleitung Kapitel 1.3). Daher sollten nachfolgend die Vitamin D Versorgung von HNSCC-Patienten näher charakterisiert und mögliche Auswirkungen auf die antitumorale Immunaktivität untersucht werden. Die Analyse der Vitamin D Serumspiegel bietet hierbei den Vorteil, dass sie auf Blutproben basieren kann, welche routinemäßig im Rahmen der ambulanten Vorstellung der Patienten in der Klinik minimal-invasiv entnommen werden. Die in diesem Kapitel beschriebenen Untersuchungen und Ergebnisse konnten von unserer Arbeitsgruppe im Jahr 2018 im Journal *OncImmunity* publiziert werden (Bochen *et al.*, 2018).

### **2.3.1 Prävalenz und prognostische Relevanz eines Vitamin D Mangels**

Um die Prävalenz eines möglichen Vitamin D Mangels von Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs zu untersuchen, wurden 231 HNSCC-Patienten und 232 gesunden Kontrollpatienten Blutproben entnommen und deren 25-OH-Vitamin D Serumspiegel bestimmt. Das Medianalter des untersuchten HNSCC-Kollektivs betrug 63 Jahre, es beinhaltete zu 80% Männer und zu 20% Frauen.

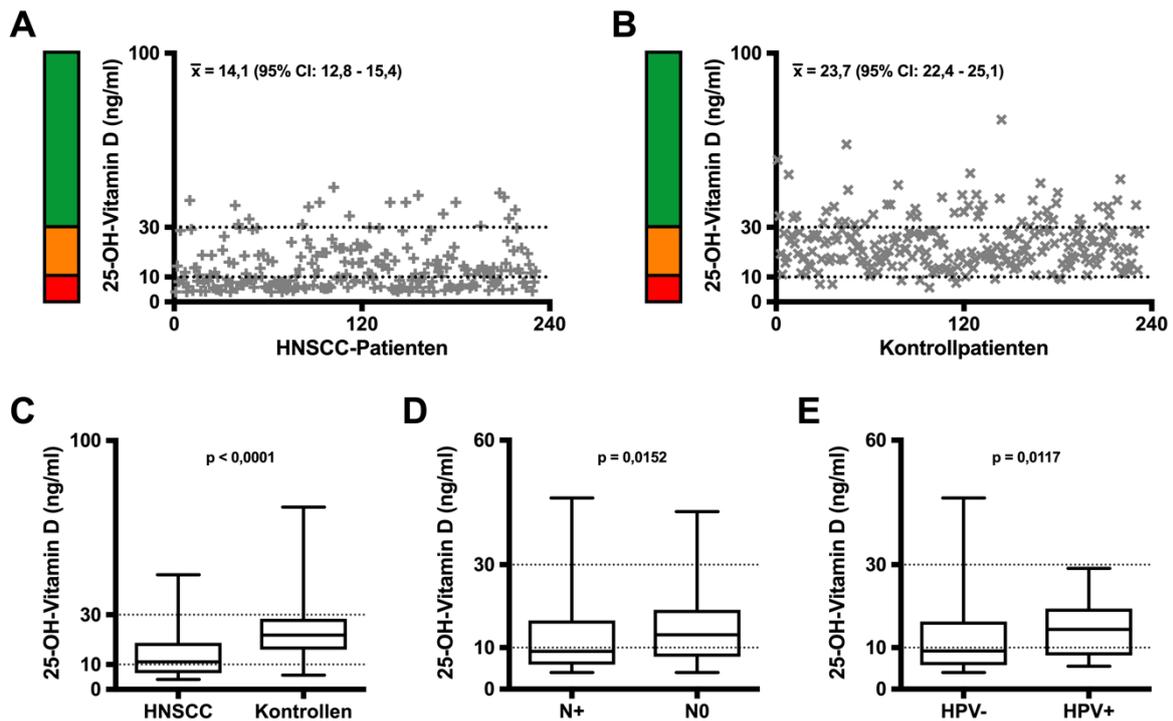
Die meisten Patienten (44%) wurden im UICC-Stadium IVa diagnostiziert, die häufigste Lokalisation des Primärtumors war mit 35% die Tonsille, gefolgt vom Larynx mit 24%. Ein positiver HPV-Tumorstatus konnte in 15% der Patienten nachgewiesen werden. Die gesunden Probanden wurden mit Hinblick auf eine möglichst hohe Übereinstimmung des Kontrollkollektives in Alters- und Geschlechtszusammensetzung mit dem HNSCC-Kollektiv ausgewählt. Die Kontrollpatienten wiesen ein Medianalter von 60,5 Jahren auf, bei einer Verteilung von 78% Männern und 22% Frauen. Detaillierte klinische sowie epidemiologische Daten der eingeschlossenen Patientenkollektive sind in Tabelle 4 aufgeführt. In Anlehnung an aktuelle Publikationen wurden 25-OH-Vitamin D Serumspiegel unter 10 ng/ml als Vitamin D Mangel, zwischen 10 und 30 ng/ml als unzureichende Versorgung und Werte über 30 bis zu 100 ng/ml als ausreichende Vitamin D Versorgung definiert (siehe auch Diskussion Kapitel 3.3).

**Tabelle 4:** Klinische und epidemiologische Daten des untersuchten Patientenkollektivs mit einem Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs (HNSCC), bzw. der gesunden Kontrollpatienten (Kontrollen).

Kollektiv		HNSCC		Kontrollen	
Median Alter		63,0		60,5	
		<i>n</i>	Anteil	<i>n</i>	Anteil
Gesamt		231	100%	232	100%
Geschlecht	männlich	184	80%	182	78%
	weiblich	47	20%	50	22%
Primärtumor	Tonsille	80	35%		
	Larynx	56	24%		
	Hypopharynx	30	13%		
	Zungengrund	26	11%		
	Zunge	22	10%		
	Mundboden	16	7%		
	Wange	1	0,4%		
HPV-Status	negativ	196	85%		
	positiv	35	15%		
UICC-Stadium	I	26	11%		
	II	31	13%		
	III	42	18%		
	IVa	102	44%		
	IVb	16	7%		
	IVc	14	6%		

Es zeigte sich, dass bei nur 18 Patienten (7,8%) des HNSCC-Kollektivs zum Zeitpunkt der Analyse eine ausreichende Versorgung mit Vitamin D vorlag, 108 Patienten (46,8%) wiesen einen deutlichen Mangel auf (Abb. 26A). Hingegen waren im Kontrollkollektiv 52 Probanden (22,4%) ausreichend versorgt und nur neun (3,9%) von einem deutlichen Mangel betroffen; die Mehrheit der Kontrollpatienten ( $n = 171$ ; 73,7%) zeigte eine unzureichende Vitamin D Versorgung (Abb. 26B). Der 25-OH-Vitamin D Serumspiegel der HNSCC-Patienten, im Median 11,1 ng/ml, lag signifikant unter dem der Kontrollpatienten, welche einen Wert von 21,8 ng/ml aufwiesen ( $p < 0,0001$ ; Abb. 26C). Ein Abgleich der Serumspiegel der HNSCC-Patienten mit ihren klinischen und pathologischen Parametern ergab, dass niedrige 25-OH-Vitamin D Werte signifikant mit dem Vorliegen einer Lymphknotenmetastasierung korrelierten ( $p = 0,0152$ ; Abb. 26D). Des Weiteren hatten HPV-positive HNSCC-Patienten signifikant höhere Serumspiegel als Patienten mit negativem HPV-Tumorstatus ( $p = 0,0117$ ; Abb. 26E).

Da sich in der vorausgegangenen Analyse gezeigt hatte, dass die Mehrheit der HNSCC-Patienten einen ausgeprägten Vitamin D Mangel aufwies und nur eine äußerst geringe Anzahl Patienten ausreichend versorgt war, wurde in allen nachfolgenden Analysen des HNSCC-Kollektivs ein 25-OH-Vitamin D Serumspiegel von  $\geq 15$  ng/ml als hohe Versorgung und Serumspiegel  $< 15$  ng/ml als niedrige Vitamin D Versorgung definiert. Dieses Vorgehen sollte Kohorten von ausreichender Größe und vergleichbarer Patientenzusammensetzung ermöglichen, welche sich in den nachfolgenden Untersuchungen aufgrund ihrer unterschiedlichen Vitamin D Versorgung potenziell voneinander abgrenzen würden. Die HNSCC-Patienten wurden hierdurch in eine „Vitamin D hoch“- ( $n = 76$ ; 33% des HNSCC-Kollektivs) und eine „Vitamin D niedrig“-Gruppe ( $n = 155$ ; 67%) aufgeteilt, deren 25-OH-Vitamin D Serumspiegel im Median bei 21,7 ng/ml bzw. bei 7,8 ng/ml lagen. Detaillierte klinische sowie epidemiologische Daten dieser Kohorten sind in Tabelle 5 aufgeführt.

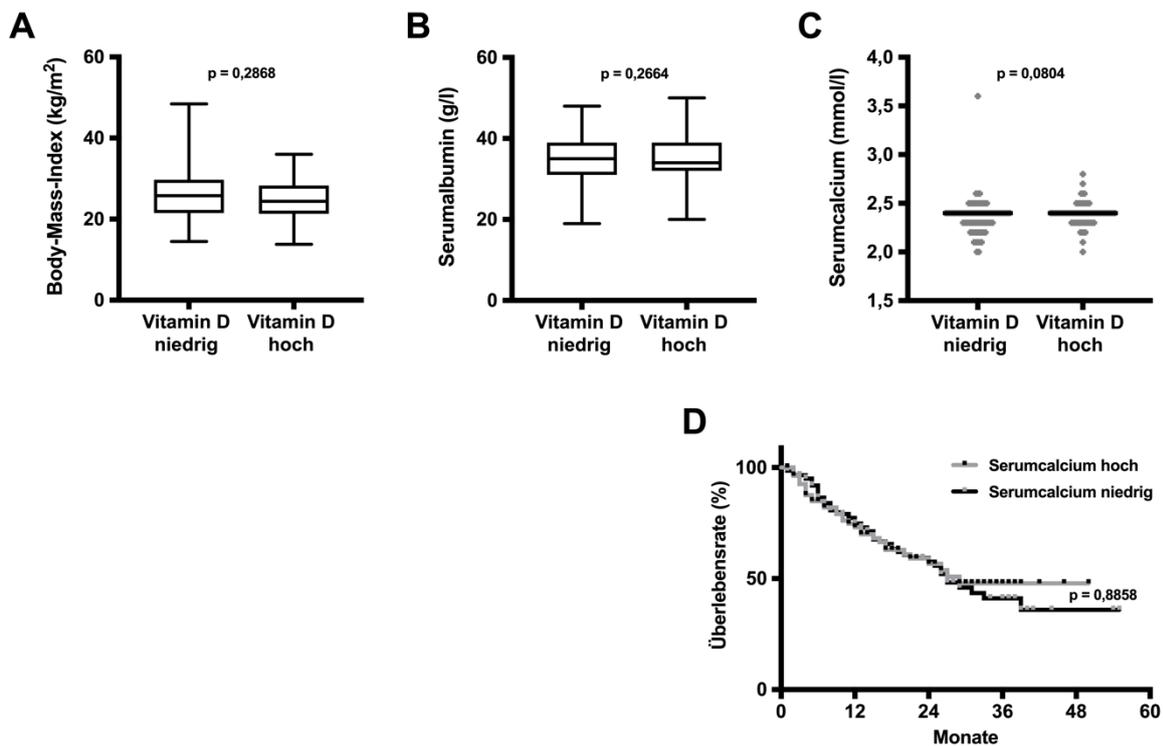


**Abb. 26: Darstellung der 25-OH-Vitamin D Serumspiegel von HNSCC- und Kontrollpatienten und ihrer Korrelation mit klinischen Parametern.** Die 25-OH-Vitamin D Serumspiegel von **(A)** 231 HNSCC-Patienten und **(B)** 232 gesunden, in Alters- und Geschlechtszusammensetzung übereinstimmenden, Kontrollpatienten wurden bestimmt. Im Diagramm sind jeweils alle gemessenen Einzelwerte so wie das arithmetische Mittel ( $\bar{x}$ ) und dessen 95% Konfidenzintervall (95% CI) dargestellt. Der Bereich eines Vitamin D Mangels (Serumspiegel < 10 ng/ml) wurde durch eine rote Säule und eine gepunktete Linie markiert, der einer unzureichenden Versorgung (10 - 30 ng/ml) durch eine orange Säule und eine gepunktete Linie und der einer ausreichenden Vitamin D Versorgung (> 30 ng/ml) durch eine grüne Säule. **(C)** Gegenüberstellung der 25-OH-Vitamin D Serumspiegel von HNSCC- und Kontrollpatienten. **(D)** Korrelation des 25-OH-Vitamin D Serumspiegels mit dem Lymphknoten- und **(E)** HPV-Status von HNSCC-Patienten. Jede Box der Box-Whisker-Plots in (C) - (E) stellt den Abstand vom ersten zum dritten Quartil dar, der Median wird durch eine Linie innerhalb der Box angezeigt. Die Whisker außerhalb der Box reichen jeweils vom kleinsten bis zum größten Datenpunkt.

**Tabelle 5:** Klinische und epidemiologische Daten des untersuchten Patientenkollektivs mit einem Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs (HNSCC) und seiner Kohorten mit niedriger bzw. hoher Vitamin D Versorgung (siehe Text).

Kollektiv		HNSCC		Vitamin D niedrig		Vitamin D hoch	
Median Alter		63,0		63,0		62,5	
		<i>n</i>	Anteil	<i>n</i>	Anteil	<i>n</i>	Anteil
<b>Gesamt</b>		231	100%	155	67%	76	33%
<b>Geschlecht</b>	männlich	184	80%	128	83%	56	74%
	weiblich	47	20%	27	17%	20	26%
<b>Primärtumor</b>	Tonsille	80	35%	54	35%	26	34%
	Larynx	56	24%	39	25%	17	22%
	Hypopharynx	30	13%	22	14%	8	11%
	Zungengrund	26	11%	17	11%	9	12%
	Zunge	22	10%	10	6%	12	16%
	Mundboden	16	7%	13	8%	3	4%
	Wange	1	0,4%	0	0%	1	1%
<b>HPV-Status</b>	negativ	196	85%	137	88%	59	78%
	positiv	35	15%	18	12%	17	22%
<b>UICC-Stadium</b>	I	26	11%	14	9%	12	16%
	II	31	13%	21	14%	10	13%
	III	42	18%	23	15%	19	25%
	IVa	102	44%	71	46%	31	41%
	IVb	16	7%	14	9%	2	3%
	IVc	14	6%	12	8%	2	3%

Um im weiteren Verlauf einen möglichen Einfluss des allgemeinen Ernährungszustands auf den Vitamin D Serumspiegel zu überprüfen, wurden als generelle Parameter der Ernährung der Body-Mass-Index (BMI) und die Serumalbuminspiegel aller Tumorpatienten untersucht. Hierbei waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patienten der beiden Kohorten feststellbar: Der BMI der „Vitamin D niedrig“-Gruppe lag mit im Median 25,8 kg/m<sup>2</sup> leicht über dem der „Vitamin D hoch“-Gruppe mit 24,4 kg/m<sup>2</sup> (Abb. 27A), der Serumalbuminspiegel lag mit einem Median von 35 g/l leicht über dem der „Vitamin D hoch“-Gruppe mit 34 g/l (Abb. 27B). Die Analyse des Serumcalciums zeigte eine minimale Tendenz zu verringerten Werten bei Patienten mit niedriger Vitamin D Versorgung bei im Median identischen Serumspiegeln beider Gruppen von 2,4 mmol/l (Abb. 27C). Des Weiteren ließ sich kein signifikanter Einfluss der Serumcalciumspiegel auf das Gesamtüberleben der HNSCC-Kohorte nachweisen ( $p = 0,8858$ ; Abb. 27D).

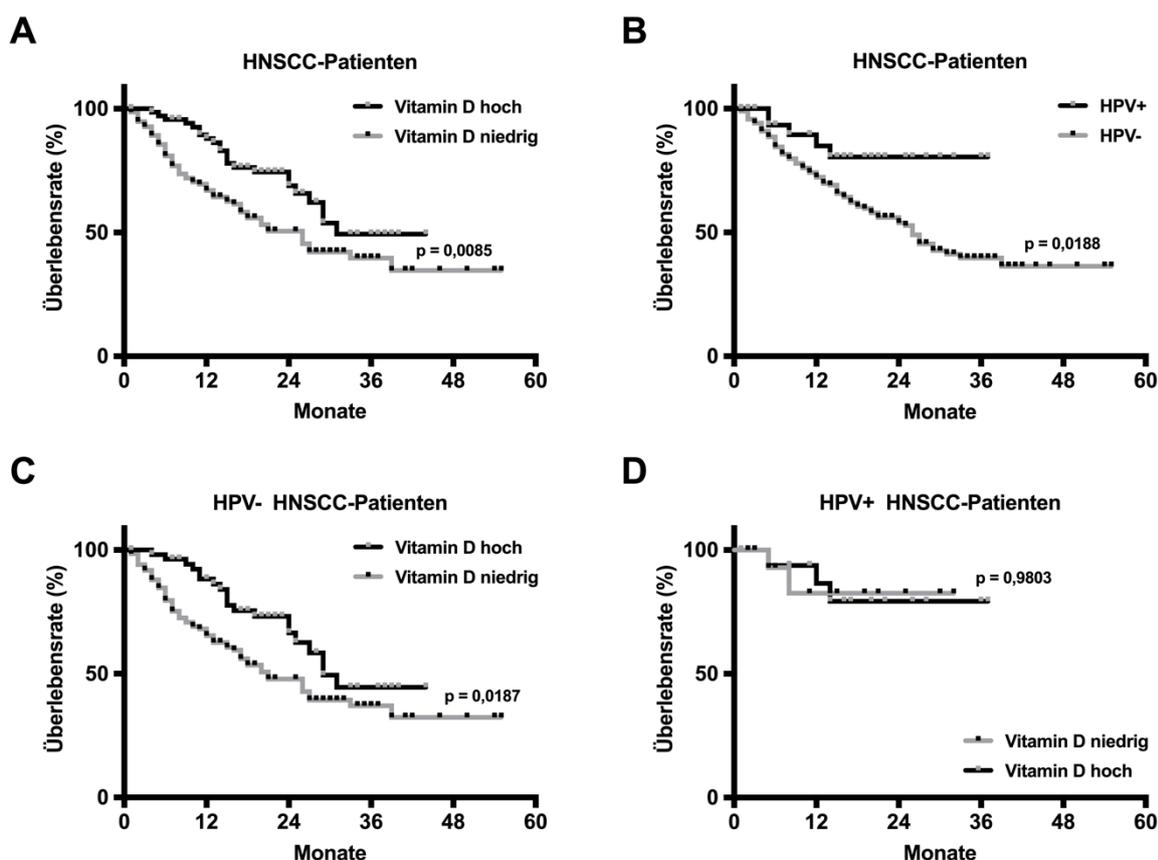


**Abb. 27: Analyse einzelner Parameter des Ernährungsstatus und des Calciumhaushalts von HNSCC-Patienten, segregiert nach Vitamin D Versorgung.** Der Body-Mass-Index (A), Albumin (B) sowie Calcium Serumspiegel (C) der HNSCC-Patienten wurden analysiert und zwischen der Kohorte mit niedriger Vitamin D Versorgung (25-OH-Vitamin D < 15 ng/ml;  $n = 155$ ) und der mit hoher (25-OH-Vitamin D  $\geq 15$  ng/ml;  $n = 76$ ) verglichen. In (D) wurde der Serumcalciumspiegel mit dem Gesamtüberleben der HNSCC-Patienten korreliert. Jede Box der Box-Whisker-Plots in (A) und (B) stellt den Abstand vom ersten zum dritten Quartil dar, der Median wird durch eine Linie innerhalb der Box angezeigt. Die Whisker außerhalb der Box reichen jeweils vom kleinsten bis zum größten Datenpunkt. Im Diagramm (C) sind alle gemessenen Einzelwerte aufgetragen, der Median wird durch eine Linie angezeigt. In der Kaplan-Meier-Kurve in (D) weisen schwarze oder graue Punkte auf zensierte Überlebensdaten hin.

Folglich scheint der festgestellte Vitamin D Mangel keinen Indikator einer generellen Fehl- oder Mangelernährung und keine Begleiterscheinung eines grundlegend gestörten Calciumstoffwechsels der HNSCC-Patienten darzustellen.

Zur Untersuchung einer möglichen prognostischen Relevanz der Vitamin D Versorgung wurden die 25-OH-Vitamin D Serumspiegel der HNSCC-Patienten mit deren Gesamtüberleben korreliert. Hierbei konnte festgestellt werden, dass Patienten mit geringer Vitamin D Versorgung, im Vergleich zu den besser versorgten Patienten, ein signifikant kürzeres Überleben aufwiesen ( $p = 0,0085$ ; Abb. 28A). Während der Nachbeobachtungszeit starben 66 von 155 Patienten der „Vitamin D niedrig“-Gruppe (42,6%) und 23 von 76 Patienten der „Vitamin D hoch“-Gruppe (30,3%), die mediane Gesamtüberlebenszeit betrug 26 beziehungsweise 31 Monate. Die Hazard Ratio nach der

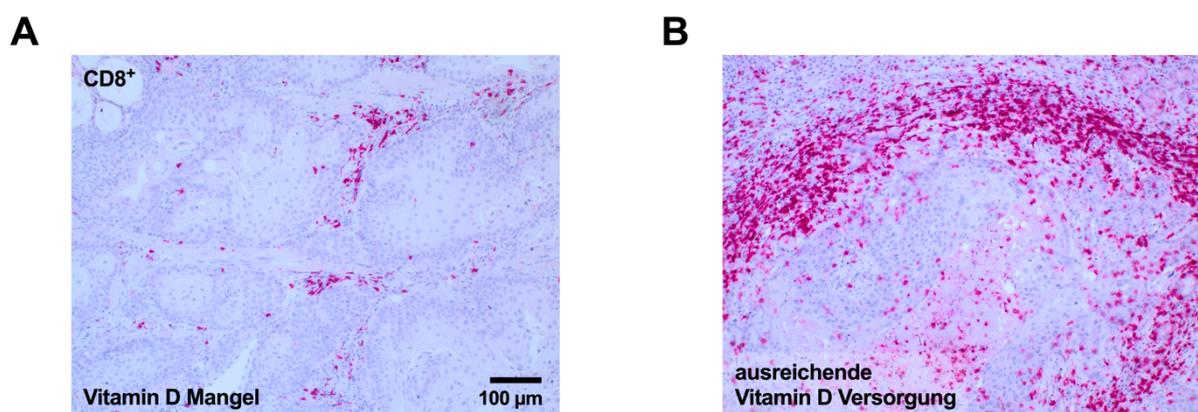
logrank-Methode liegt für die „Vitamin D niedrig“-Kohorte bei 1,855 (95% Konfidenzintervall: 1,212 - 2,839), was bedeutet, dass bei den hier untersuchten HNSCC-Patienten eine niedrige Vitamin D Versorgung mit einem um 85,5% erhöhten Sterberisiko einherging. Es muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass im Verlauf der Nachbeobachtungszeit für beide Gruppen keine vollkommen gleichmäßige Sterberate (Hazard) vorlag und eine Interpretation der Hazard Ratio daher vorsichtig erfolgen sollte. Im Einklang mit der bestehenden Literatur (Marur *et al.*, 2010) war ein HPV-positiver Tumorstatus signifikanter Prädiktor eines besseren Gesamtüberlebens der HNSCC-Patienten ( $p = 0,0188$ ; Abb. 28B). Bei HPV-positiven Tumorpatienten konnte kein Einfluss der Vitamin D Versorgung auf das Gesamtüberleben festgestellt werden, jedoch unter dem Vorbehalt, dass diese Kohorte nur aus 35 Patienten bestand, wobei 18 Patienten niedrige und 17 Patienten hohe 25-OH-Vitamin D Serumspiegel aufwiesen. Im Gegensatz hierzu korrelierte eine niedrige Vitamin D Versorgung bei HPV-negativen Patienten mit einem signifikant kürzeren Gesamtüberleben (Abb. 28C und D).



**Abb. 28: Prognostische Relevanz des 25-OH-Vitamin D Serumspiegels und des HPV-Status bei HNSCC-Patienten.** Mithilfe von Kaplan-Meier-Analysen wurde der Einfluss des 25-OH-Vitamin D Serumspiegels (A), des HPV-Status (B), des Vitamin D Serumspiegels bei HPV-negativen (C;  $n = 196$ ) sowie bei HPV-positiven (D;  $n = 35$ ) HNSCC-Patienten auf deren Gesamtüberleben überprüft. Schwarze oder graue Punkte auf den Kurven zeigen zensierte Überlebensdaten an.

### 2.3.2 Auswirkungen eines Vitamin D Mangels auf die tumorspezifische Immunfunktion und dessen prognostische Implikationen

Um einen möglichen Einfluss eines Vitamin D Mangels auf die tumorspezifische Immunfunktion der HNSCC-Patienten zu überprüfen, sollte zusätzlich das Infiltrationsprofil verschiedener Leukozyten in das peritumorale Stroma sowie in den Tumor charakterisiert werden. Hierzu wurden immunhistochemische Färbungen von Tumorgewebeproben einer repräsentativen Auswahl von 102 Patienten angefertigt. Das Kollektiv bestand aus 59 Patienten mit hoher Vitamin D Versorgung (25-OH-Vitamin D Serumspiegel  $\geq 15$  ng/ml) und 43 Patienten mit niedriger Versorgung (Serumspiegel  $< 15$  ng/ml); detaillierte klinische sowie epidemiologische Daten dieses Kollektives und seiner Kohorten sind in Tabelle 6 aufgeführt. Zur Auswertung der immunhistochemischen Färbungen, welche exemplarisch in Abbildung 29 dargestellt sind, wurde ein modifizierter Immunreaktiver Score (mIRS) verwendet, der sowohl die Gesamtmenge der Leukozyten im Präparat als auch die Anzahl der jeweils gefärbten Zellen bewertet (siehe Material und Methoden Kapitel 4.3.9). Die nachfolgend beschriebene Analyse der Präparatecharakteristika und der Infiltration mit T-Helferzellen, zytotoxischen T-Zellen und Makrophagen wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Benedikt Balensiefer im Rahmen seiner medizinischen Promotionsarbeit „Einfluss von Vitamin D auf die tumorspezifische Immunabwehr bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich; Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes, 2018“ durchgeführt.

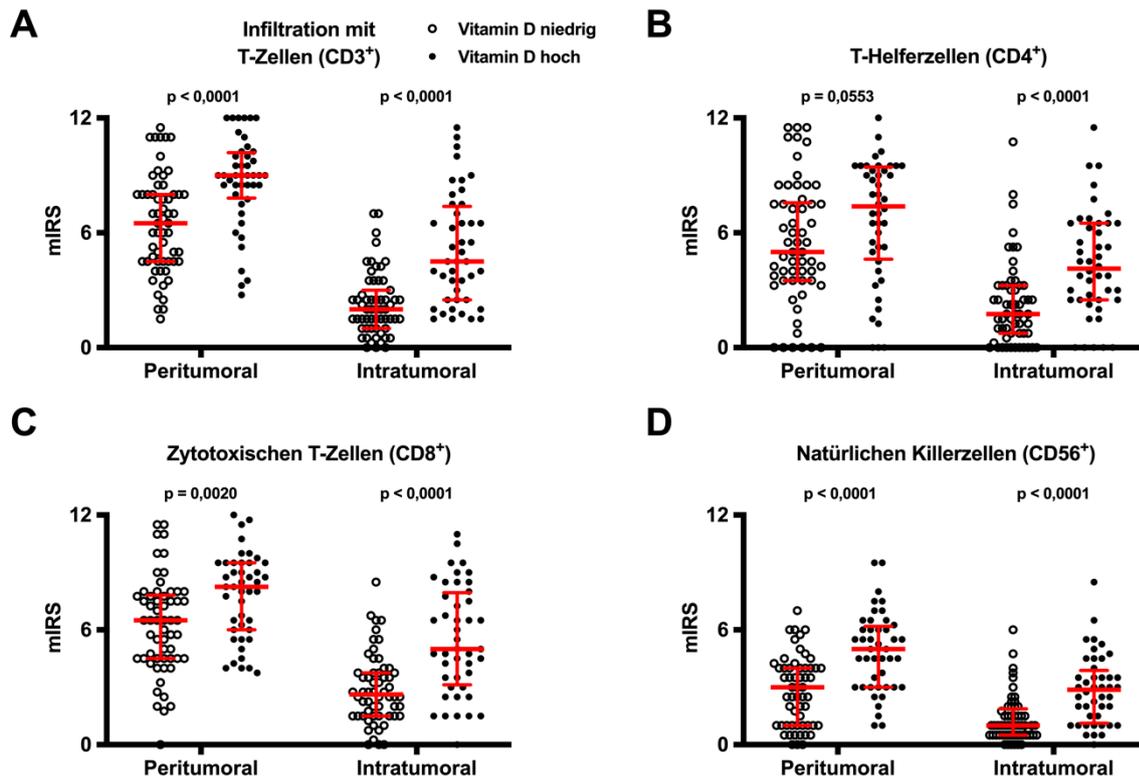


**Abb. 29: Repräsentative Darstellung der immunhistochemischen Färbungen.** Es sind repräsentative Mikroskopaufnahmen immunhistochemischer Färbungen zweier Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Mundbodens gezeigt, welche einen Vitamin D Mangel (**A**), bzw. eine ausreichende Vitamin D Versorgung aufwiesen (**B**). Die Färbungen dienten jeweils der Darstellung CD8-positiver Zellen.

**Tabelle 6:** Klinische und epidemiologische Daten des immunhistochemisch untersuchten (IHC) repräsentativen Patientenkollektivs mit einem Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region (HNSCC) und seiner Kohorten mit niedriger bzw. hoher Vitamin D Versorgung (siehe Text).

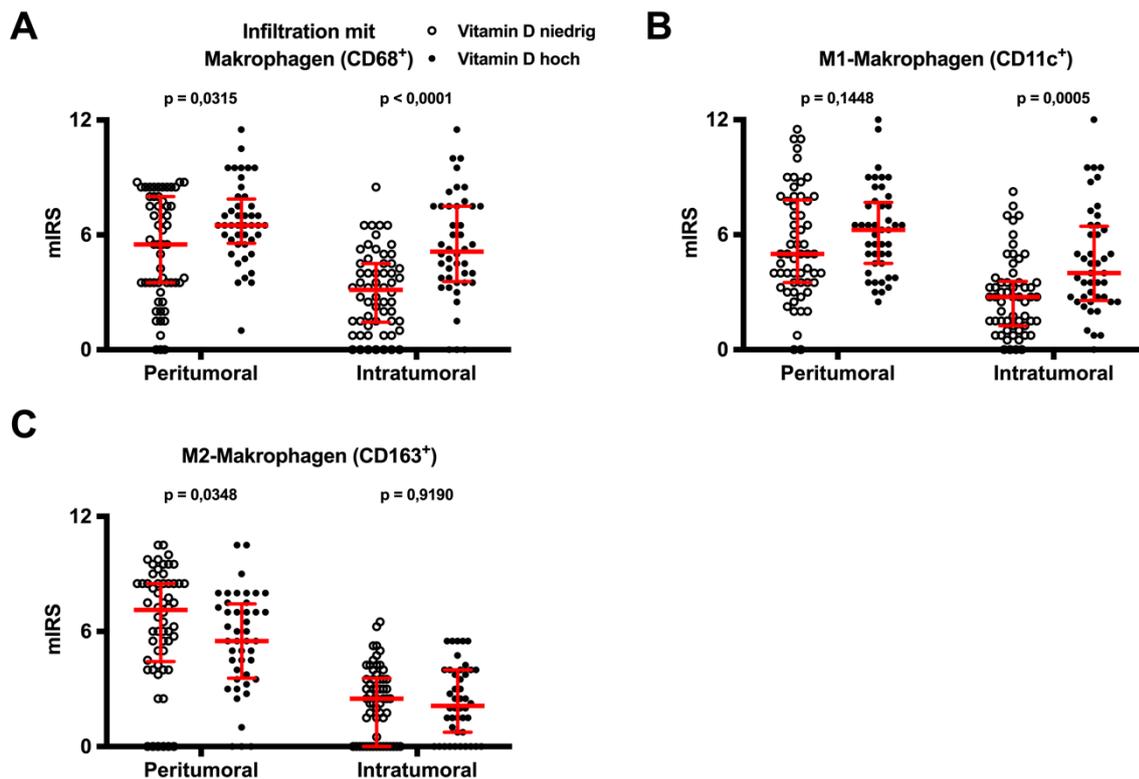
Kollektiv IHC		HNSCC		Vitamin D niedrig		Vitamin D hoch	
Median Alter		62,0		63,0		61,0	
		<i>n</i>	Anteil	<i>n</i>	Anteil	<i>n</i>	Anteil
<b>Gesamt</b>		102	100%	59	58%	43	42%
<b>Geschlecht</b>	männlich	82	80%	52	88%	30	70%
	weiblich	20	20%	7	12%	13	30%
<b>Primärtumor</b>	Tonsille	16	16%	9	15%	7	16%
	Larynx	32	31%	18	31%	14	33%
	Hypopharynx	14	14%	10	17%	4	9%
	Zungengrund	25	25%	15	25%	10	23%
	Zunge	7	7%	3	5%	4	9%
	Mundboden	7	7%	4	7%	3	7%
<b>HPV-Status</b>	negativ	88	86%	56	95%	32	74%
	positiv	14	14%	3	5%	11	26%
<b>UICC-Stadium</b>	I	9	9%	4	7%	5	12%
	II	15	15%	8	14%	7	16%
	III	18	18%	8	14%	10	23%
	IVa	48	47%	30	51%	18	42%
	IVb	5	5%	5	8%	0	0%
	IVc	7	7%	4	7%	3	7%

Bei der semiquantitativen Beschreibung der Präparategröße und des Verhältnisses von Tumor zu peritumoralem Stroma ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Präparaten der Kohorte mit niedriger Vitamin D Versorgung und der mit hoher feststellen (Daten nicht gezeigt). Eine mögliche Beeinträchtigung der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen durch diese Parameter kann somit vermutlich größtenteils ausgeschlossen werden.



**Abb. 30: Analyse der peri- und intratumoralen Infiltration mit Lymphozyten bei HNSCC-Patienten, segregiert nach Vitamin D Versorgung.** Die Infiltration von Lymphozyten in das peritumorale Stroma und den Tumor wurde immunhistochemisch an HNSCC-Patienten mit einer niedrigen Vitamin D Versorgung (25-OH-Vitamin D < 15 ng/ml;  $n = 59$ ) oder einer hohen Versorgung (25-OH-Vitamin D  $\geq 15$  ng/ml;  $n = 43$ ) untersucht. Die Infiltration mit T-Zellen **(A)**, T-Helferzellen **(B)**, Zytotoxischen T-Zellen **(C)** und Natürlichen Killerzellen **(D)** wurde mittels des mIRS quantifiziert; alle Einzelwerte sind als Punkt im Diagramm aufgetragen. Der Median wird durch eine rote Linie angezeigt, die Whisker stellen den Abstand vom ersten zum dritten Quartil dar.

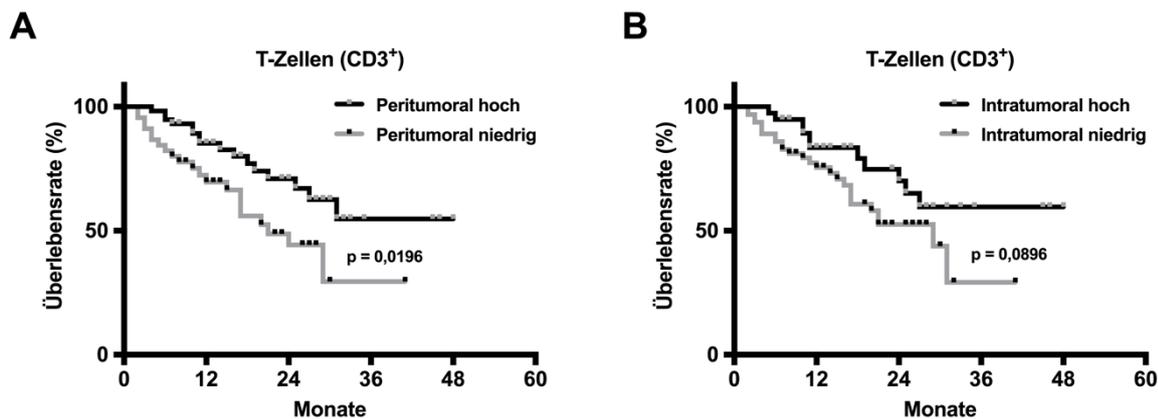
Die Färbung des generellen T-Zell-Markers CD3 zeigte, dass bei Patienten mit hoher Vitamin D Versorgung eine signifikant höhere Infiltration durch T-Zellen sowohl im peritumoralen Stroma als auch im Tumor vorlag (Abb. 30A). Um diesen Effekt näher zu charakterisieren, wurde nachfolgend mithilfe der Marker CD4 und CD8 zwischen Unterformen der T-Zellen unterschieden. Hierbei ließen sich bei Patienten mit hoher Vitamin D Versorgung T-Helferzellen (CD4<sup>+</sup>) und insbesondere Zytotoxische T-Zellen (CD8<sup>+</sup>) signifikant häufiger peri- wie auch intratumoral nachweisen (Abb. 30B und C). Dies stellte sich ebenso für die Infiltration mit Natürlichen Killerzellen (CD56<sup>+</sup>) dar, welche in Abhängigkeit von Vitamin D signifikant gesteigert war (Abb. 30D).



**Abb. 31: Analyse der peri- und intratumoralen Infiltration mit Makrophagen bei HNSCC-Patienten, segregiert nach Vitamin D Versorgung.** Die Infiltration von Makrophagen in das peritumorale Stroma und den Tumor wurde immunhistochemisch an HNSCC-Patienten mit einer niedrigen Vitamin D Versorgung (25-OH-Vitamin D < 15 ng/ml;  $n = 59$ ) oder einer hohen Versorgung (25-OH-Vitamin D  $\geq 15$  ng/ml;  $n = 43$ ) untersucht. Die Infiltration mit Makrophagen **(A)**, M1-Makrophagen **(B)** und M2-Makrophagen **(C)** wurde mittels des mIRS quantifiziert; alle Einzelwerte sind als Punkt im Diagramm aufgetragen. Der Median wird durch eine rote Linie angezeigt, die Whisker stellen den Abstand vom ersten zum dritten Quartil dar.

Ebenso zeigte die Färbung CD68-positiver Makrophagen (Abb. 31A) und der M1-Subpopulation (CD11c<sup>+</sup>; Abb. 31B) bei der „Vitamin D hoch“-Kohorte die Tendenz zu einer gesteigerten Infiltration in das peritumorale Stroma, bei gleichzeitig signifikant erhöhter Infiltration des Tumors. Antiinflammatorische M2-Makrophagen (CD163<sup>+</sup>; Abb. 31C) waren in dieser Gruppe peritumoral signifikant erniedrigt.

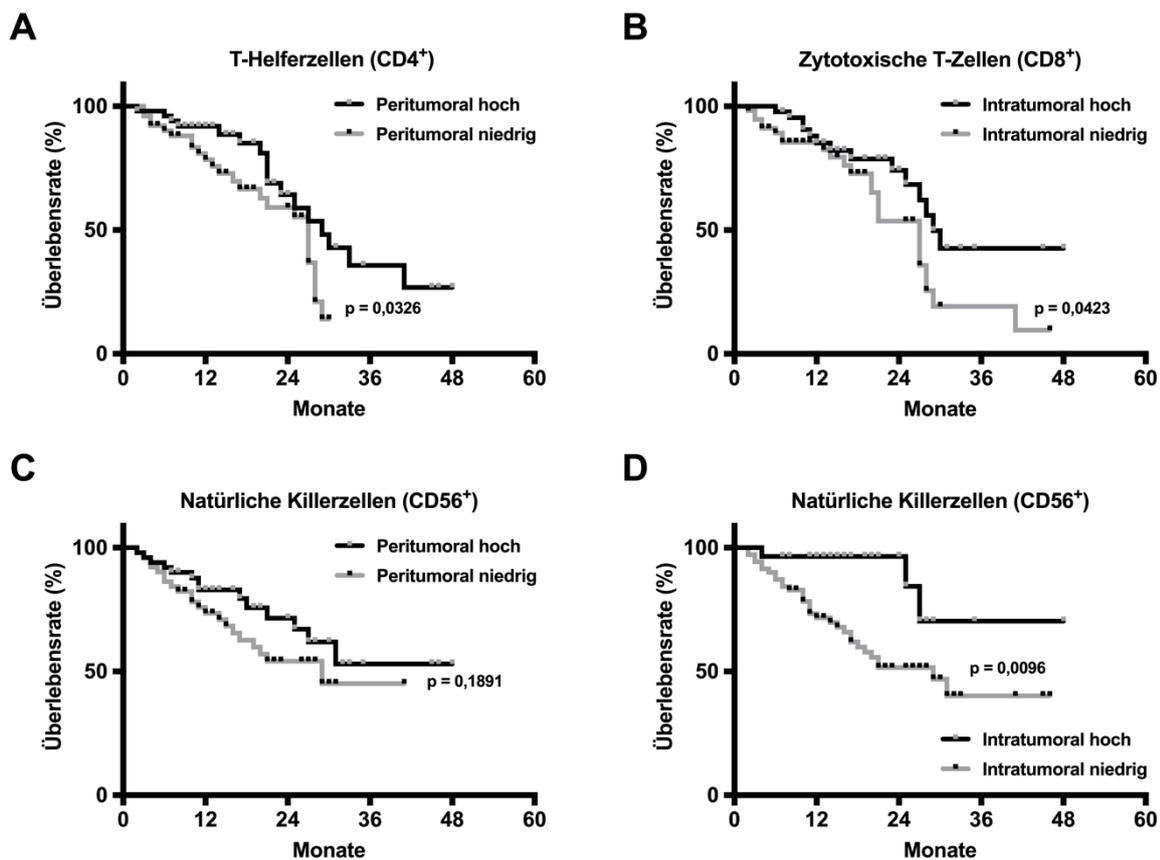
Das unter Einfluss eines Vitamin D Mangels wie beschrieben veränderte Infiltrationsprofil der verschiedenen Leukozyten sollte nachfolgend auf seine mögliche prognostische Relevanz hin überprüft werden. Hierbei zeigte sich, dass sowohl eine hohe peritumorale (Abb. 32A) als auch intratumorale Infiltration mit CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten (Abb. 32B) signifikante Prädiktoren eines besseren Gesamtüberlebens der untersuchten HNSCC-Patienten waren.



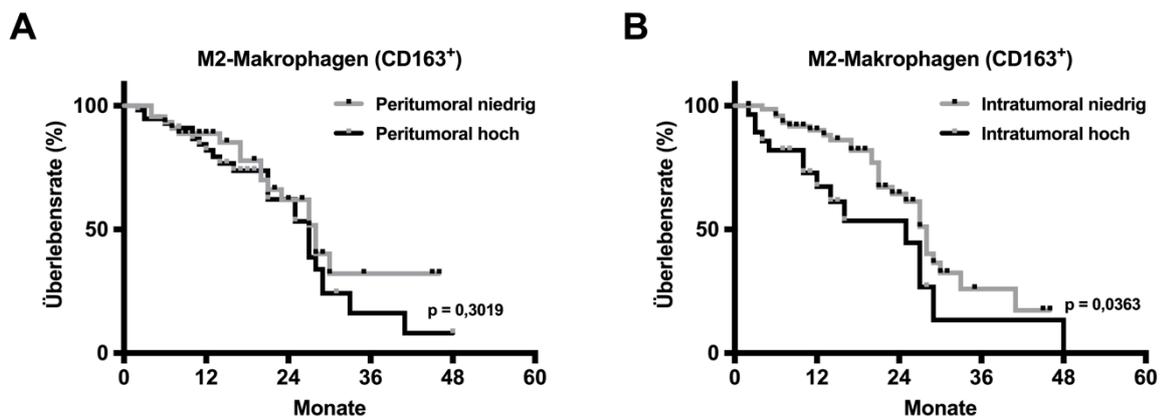
**Abb. 32: Prognostische Relevanz der peri- und intratumoralen Infiltration mit T-Zellen bei HNSCC-Patienten.** Mithilfe von Kaplan-Meier-Analysen wurde der Einfluss der Infiltration von T-Zellen in das peritumorale Stroma (**A**) und in den Tumor (**B**) auf das Gesamtüberleben der HNSCC-Patienten überprüft. Schwarze oder graue Punkte auf den Kurven zeigen zensierte Überlebensdaten an.

Die genauere Analyse der T-Zell-Subtypen ergab, dass eine hohe Infiltration von T-Helferzellen in das peritumorale Stroma (Abb. 33A) wie auch von Zytotoxischen T-Zellen in den Tumor (Abb. 33B) mit einem signifikant längeren Überleben korrelierte. Eine Tendenz zu längerem Gesamtüberleben war ebenfalls für eine gesteigerte Infiltration des peritumoralen Stromas durch Natürliche Killerzellen nachzuweisen (Abb. 33C); die Infiltration des Tumors durch diese Zellen war hoch signifikant mit einem längeren Überleben der Patienten verbunden ( $p = 0,0096$ ; Abb. 33D).

Für die Infiltration durch M1-Makrophagen konnte kein signifikanter Einfluss auf das Überleben der HNSCC-Patienten festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Jedoch war eine hohe Anzahl der antiinflammatorisch wirkenden M2-Makrophagen Subpopulation ein, intratumoral signifikanter, Prädiktor eines kürzeren Gesamtüberlebens (Abb. 34).



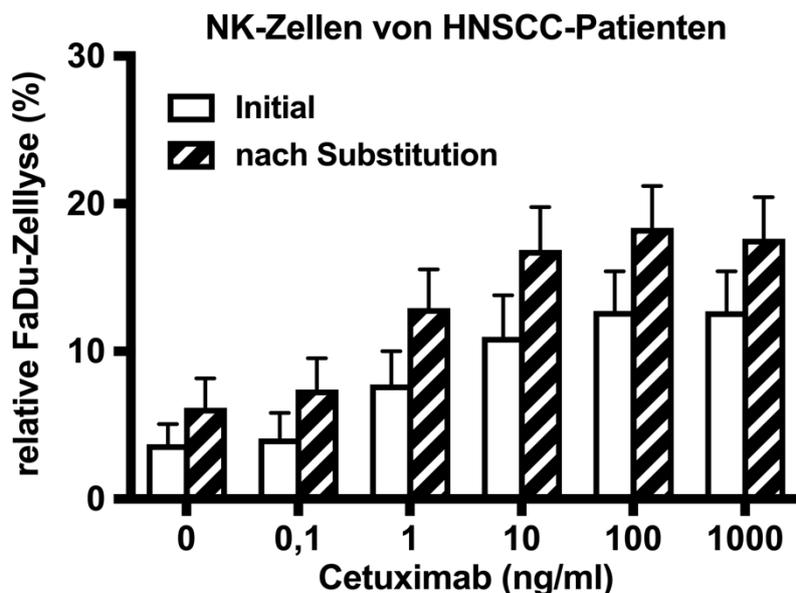
**Abb. 33: Prognostische Relevanz der peri- und intratumoralen Infiltration mit Lymphozyten bei HNSCC-Patienten.** Mithilfe von Kaplan-Meier-Analysen wurde der Einfluss der Infiltration von T-Helferzellen in das peritumorale Stroma (A), von Zytotoxischen T-Zellen in den Tumor (B) wie auch von Natürlichen Killerzellen in das peritumorale Stroma (C) und in den Tumor (D) auf das Gesamtüberleben der HNSCC-Patienten überprüft. Schwarze oder graue Punkte auf den Kurven zeigen zensierte Überlebensdaten an.



**Abb. 34: Prognostische Relevanz der peri- und intratumoralen Infiltration mit M2-Makrophagen bei HNSCC-Patienten.** Mithilfe von Kaplan-Meier-Analysen wurde der Einfluss der Infiltration von M2-Makrophagen in das peritumorale Stroma (A) und in den Tumor (B) auf das Gesamtüberleben der HNSCC-Patienten überprüft. Schwarze oder graue Punkte auf den Kurven zeigen zensierte Überlebensdaten an.

### **2.3.3 Einfluss von Vitamin D auf die zytotoxische Aktivität Natürlicher Killerzellen von HNSCC-Patienten**

Basierend auf den vorausgehenden Ergebnissen sollte zusätzlich untersucht werden, ob Vitamin D auch die gegen HNSCC-Zellen gerichtete zytotoxische Aktivität von NK-Zellen beeinflusst. Hierzu wurden elf repräsentativen HNSCC-Patienten mit Vitamin D Mangel (25-OH-Vitamin D < 10 ng/ml) Blutproben entnommen und jeweils durch magnetische Depletion die Natürlichen Killerzellen isoliert. Diese wurden als Effektorzellen zusammen mit der Hypopharynxkarzinom-Zelllinie FaDu inkubiert und anschließend die relative FaDu-Zellyse quantifiziert. Die Versuche fanden ohne sowie mit steigender Konzentration des therapeutischen anti-EGFR-Antikörpers Cetuximab statt, welcher für die Therapie des lokal fortgeschrittenen metastasierten Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinoms in Verbindung mit einer Strahlen- oder Chemotherapie zugelassen ist. Nach dieser initialen Analyse der antitumoralen NK-Zell-Aktivität erfuhren alle Patienten eine dreimonatige, an die jeweilige Ernährungssituation angepasste, Vitamin D Substitution, woraufhin abermals die zytotoxische Aktivität gemessen wurde. Neun der elf Probanden zeigten nach Substitution eine deutliche Zunahme der Vitamin D Serumspiegel um über 10 ng/ml (Median  $\Delta$  25-OH-Vitamin D: 27,6 ng/ml; 95% Konfidenzintervall: 13,5 - 30,3 ng/ml). All diese Probanden wiesen nach Substitution eine teils signifikante Zunahme der zytotoxischen Aktivität ihrer NK-Zellen auf, sowohl ohne als auch mit Zugabe von Cetuximab (Abb. 35).



**Abb. 35: Effekt einer Vitamin D Substitution auf die antitumorale Aktivität von Natürlichen Killerzellen.** Es wurde die relative Lyse von FaDu-Zellen durch Natürliche Killerzellen, welche aus HNSCC-Patienten isoliert wurden, vor und nach Vitamin D Substitution analysiert. Die Versuche fanden jeweils ohne sowie mit steigender Konzentration des anti-EGFR-Antikörpers Cetuximab statt. Jede Säule stellt den Mittelwert von neun HNSCC-Patienten dar, welche eine signifikante Zunahme der Vitamin D Serumlevel aufwiesen ( $\Delta$  25-OH-Vitamin D > 10 ng/ml). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts an.

Zusammenfassend zeigen die vorausgehend beschriebenen Untersuchungen, dass bei HNSCC-Patienten mit hoher Prävalenz ein ausgeprägter Vitamin D Mangel vorliegt, welcher mit einer höheren Rate lymphogener Metastasierung und einem signifikant verkürzten Gesamtüberleben verbunden zu sein scheint. Dieser Mangel scheint zusätzlich zu einem deutlich veränderten Profil der Immuneinfiltration in das peritumorale Stroma sowie den Tumor und zu einer verringerten zytotoxischen Aktivität der Natürlichen Killerzellen zu führen.

## **3. Diskussion**

### **3.1 Nutzen der flüssigkeitsbasierten Abstrichzytologie für die Diagnostik von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region**

#### **3.1.1 Nicht-invasive Malignitätsdiagnostik von HNSCCs**

Wie eingangs beschrieben, werden Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region trotz intensiver Forschungsbemühungen weiterhin größtenteils erst in einem fortgeschrittenen Stadium des Tumors mit bereits ausgeprägter lymphogener Metastasierung diagnostiziert. Die aktuelle klinische Praxis sieht dabei vor, dass auffällige Schleimhautläsionen zur histologischen Abklärung des Befundes im Rahmen einer sogenannten Panendoskopie unter Narkose biopsiert werden. Allerdings zeigen derart betroffene Patienten zu diesem Zeitpunkt häufig schon einen deutlich reduzierten Allgemeinzustand, welcher mit einem erhöhten Risiko für intraoperative Komplikationen und Narkosezwischenfälle einhergeht. Folglich erscheint eine möglichst frühe und nicht-invasive Form der Diagnosestellung von übergeordnetem Interesse für das klinische Management von HNSCCs zu sein. Vor diesem Hintergrund bietet die flüssigkeitsbasierte Abstrichzytologie den Vorteil, dass zytologisches Tumormaterial im Rahmen einer ambulanten Vorstellung der Patienten nicht-invasiv und ohne die Notwendigkeit einer Narkose gewonnen werden kann.

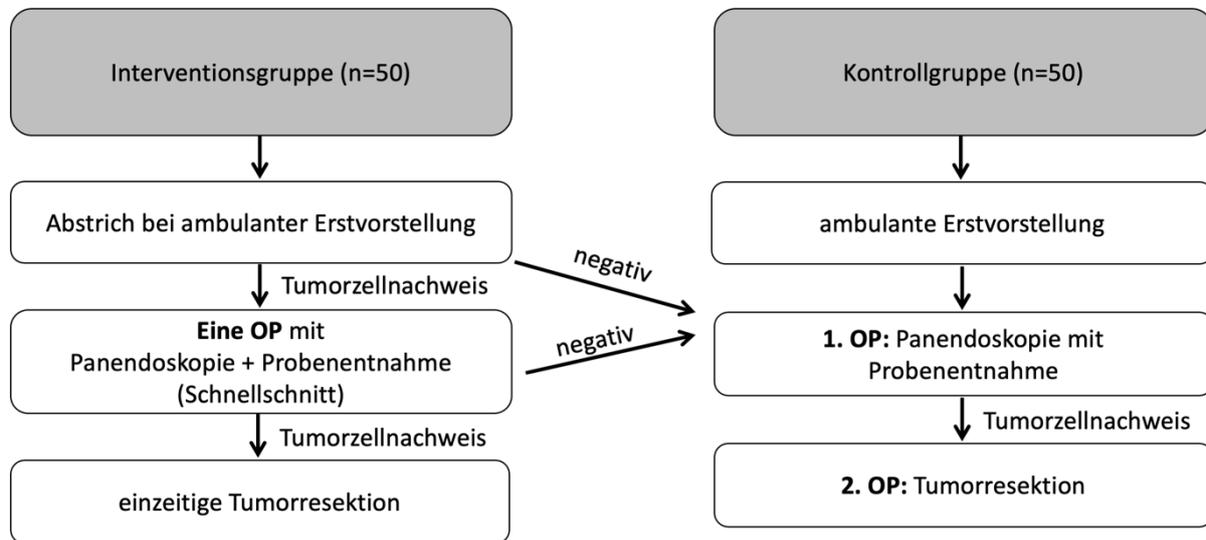
Mithilfe der Methodik war es im Rahmen dieser Arbeit möglich, in der überwiegenden Mehrheit der Fälle valide zytologische Präparate der nachfolgend auch histologisch gesicherten Plattenepithelkarzinome anzufertigen. Des Weiteren waren bei allen gesunden Kontrollpatienten ausschließlich morphologisch unauffällige Plattenepithelien nachzuweisen. Somit ergab sich für die flüssigkeitsbasierte Abstrichzytologie bei der Untersuchung von 203 Patienten insgesamt eine Sensitivität von 96%, bei einer gleichzeitigen Spezifität von 100%. Diese Ergebnisse decken sich dabei mit den aktuellen Erkenntnissen der wissenschaftlichen Literatur: Ein systematischer Vergleich bisheriger Studien zur abstrichzytologischen Diagnostik von Läsionen der Mundhöhle kam zu dem Ergebnis, dass die Sensitivität für den Nachweis von Karzinomen typischerweise zwischen 70 und 100% und die Spezifität zumeist über 90% lag. Allerdings konnte auch

festgestellt werden, dass die bisherigen Untersuchungen überwiegend an verhältnismäßig kleinen Kollektiven mit weniger als 100 Patienten und unter Anwendung verschiedenster Methodiken durchgeführt wurden, welche sich dabei deutlich in der Probengewinnung (Bürstentyp, Entnahme und Aufbereitung des Abstrichmaterials) und nachfolgenden Anfertigung des mikroskopischen Präparates unterschieden. Diese Tatsache scheint sich ebenfalls in den bisher stark voneinander abweichenden Angaben zur Sensitivität wie auch zur Spezifität der Abstrichzytologie im Mund-Rachen-Bereich widerzuspiegeln. Jedoch erzielten flüssigkeitsbasierte Systeme der Abstrichzytologie in Bezug auf beide Parameter bisher in allen Studien durchgängig bessere Ergebnisse als konventionelle Methoden der exfoliativen Zytologie (Alsarraf *et al.*, 2017). Dies scheint vor allem durch eine insgesamt verlässlichere Art der Anfertigung sowie durch eine höhere Qualität der Präparate (geringere Zellüberlappung, weniger Kontamination durch Blutbestandteile) bedingt zu sein und somit letztendlich eine bessere Beurteilung der vorliegenden Zytomorphologie zuzulassen (Alves *et al.*, 2004; Navone *et al.*, 2007; Remmerbach *et al.*, 2017). Limitationen der Methodik zeigten sich in unseren Untersuchungen hauptsächlich vor dem Hintergrund von Ulzerationen, welche im Bereich des Tumorgeschehens auftraten. Ein hoher Anteil nekrotischer Strukturen bzw. entzündungsbedingte Fibrinbeläge können hierbei die Gewinnung vitaler Anteile des Karzinoms erschweren oder diese im Präparat überlagern, wodurch eine valide Beurteilung der Zellen und ihrer Morphologie erschwert wird. Jedoch enthielten nur acht von 183 abstrichzytologisch untersuchten HNSCC-Proben kein oder nur unzureichend bewertbares Tumormaterial, so dass allgemein von einer hohen Zuverlässigkeit der Methodik zur nicht-invasiven Gewinnung von Gewebeproben bei HNSCC-Patienten ausgegangen werden kann. In allen weiteren untersuchten Präparaten war es darüber hinaus möglich, anhand von charakteristischen, morphologischen Malignitätsmerkmalen den Differenzierungsgrad der gewonnenen Tumorzellen zytologisch zu bestimmen. Hierbei lag in der überwiegenden Mehrheit der Fälle eine hohe Korrelation zur histopathologischen Diagnose vor, welche unabhängig und basierend auf invasiv gewonnenem Material durchgeführt worden war und als aktueller diagnostischer Goldstandard gilt. Dennoch konnte in verschiedenen Studien auch für diese Methode eine mitunter hohe Rate fehlerhafter oder falsch negativer Diagnosen von bis zu 30% nachgewiesen werden, welche unter anderem aufgrund einer starken intratumoralen Heterogenität vor allem von der Auswahl des Ortes der Probenentnahme abhängig war (Pentenero *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2018). In diesem Zusammenhang

bietet die Abstrichzytologie neben der Vermeidung eines invasiven Eingriffes und aller damit verbundenen Risiken zusätzlich den Vorteil, verhältnismäßig große Areale für die Gewinnung der Proben einschließen zu können. Auch die Anfertigung mehrerer Abstriche und gegebenenfalls unterschiedlicher Proben scheint dabei komplikationslos möglich zu sein. Beide Methoden erfordern jedoch die Verfügbarkeit von ausgebildetem Fachpersonal, welches in der pathologischen Beurteilung von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region versiert ist. Diese Voraussetzung scheint eine ansonsten in der klinischen Praxis potenziell routinemäßig durchführbare Anwendung der Abstrichzytologie vornehmlich in der ambulanten Situation niedergelassener Ärzte zu limitieren. Mit der flächendeckenden Schaffung der notwendigen Infrastruktur und der Einführung nationaler Programme konnte in den letzten Jahrzehnten allerdings ein vergleichbarer Ansatz zur Früherkennung und Diagnostik des Zervixkarzinoms mittels flüssigkeitsbasierter Abstrichzytologie bereits erfolgreich in zahlreichen Ländern etabliert werden (Gibb & Martens, 2011; Bentz, 2014; Bujan Rivera & Klug, 2018). Zur möglichen Realisation eines derartigen Programmes in der Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde fehlt jedoch bisher ein einheitlicher Standard zur zytologischen Beurteilung von Gewebeabstrichen, vor allem auch potenziell maligner Vorläuferläsionen (Böcking, 1998; Speight *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2018). Vor diesem Hintergrund erscheint eine objektivierbare und gegebenenfalls automatisierte Auswertung, beispielsweise durch computergestützte Systeme, wünschenswert – ein Ansatz, der derzeit in unserer Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Informatik der Hochschule Trier untersucht wird. Bisherige Entwicklungen dieser Art konnten trotz intensiver Bemühungen noch keine Ergebnisse hervorbringen, welche einer versierten menschlichen Beurteilung ebenbürtig oder überlegen waren (Sciubba, 1999; Weigum *et al.*, 2010; Abram *et al.*, 2016; Sunny *et al.*, 2019). Durch Übertragung und Anpassung des bereits etablierten Bethesda Systems zur Beurteilung dysplastischer Läsionen der Zervix war es einer australischen Arbeitsgruppe jedoch bereits mithilfe konventioneller Methoden möglich, bei etwa 100 Patienten erste Erfahrungen hinsichtlich einer Früherkennung oraler Plattenepithelkarzinome zu sammeln (Nayar & Wilbur, 2015; Alsarraf *et al.*, 2018). Aufgrund bedeutender Fortschritte hinsichtlich der Applikation von maschinellem Lernen und sogenannter künstlicher Intelligenz im Kontext biomedizinischer Fragestellungen erscheint ein zeitnaher Übertrag derartiger Methoden auf die pathologische Beurteilung von (HNSCC-)Gewebeproben dennoch realistisch (Wainberg *et al.*, 2018; Bera *et al.*, 2019; McRae *et al.*, 2019; Goecks *et al.*, 2020).

Trotz des beschriebenen Potenzials der flüssigkeitsbasierten Abstrichzytologie zur Diagnostik von HNSCCs wird sie bisher in der klinischen Praxis nur selten benutzt und findet bis dato keine nennenswerte Berücksichtigung in den entsprechenden deutschen Behandlungsleitlinien (Leitlinienprogramm Onkologie, 2019a, c). Eine weitere potenzielle Limitation der Abstrichzytologie könnte sich auch aus der anatomischen Zugänglichkeit der zu untersuchenden Läsion ergeben. Um im Rahmen dieser Arbeit eine ausreichende Größe des analysierten Patientenkollektivs zu gewährleisten, wurde ein Teil der Abstriche nicht nur bei der ambulanten Vorstellung des Patienten, sondern auch im Rahmen einer Panendoskopie vor der chirurgischen Biopsieentnahme durchgeführt. In der klinischen Routine werden Karzinome des Larynx und des Hypopharynx für einen Bürstenabstrich vermutlich in einem ambulanten Setting am wachen Patienten nur schwer ohne endoskopische Untersuchung erreichbar sein. Neoplasien der Mundhöhle und der Rachenregion, für welche in den letzten Jahren eine stetig zunehmende Inzidenz beobachtet werden kann (siehe Einleitung Kapitel 1.1.1), scheinen durch ihre gute äußere Zugänglichkeit hingegen prädestiniert für eine abstrichzytologische Diagnostik zu sein. Auf den Aspekt einer Reduktion der narkosebedingten Belastung von HNSCC-Patienten zielt auch eine aktuelle klinische Studie unserer Arbeitsgruppe ab: Wie eingangs beschrieben, ist bei Patienten mit Verdacht auf ein Karzinom des Kopf-Hals-Bereichs aktuell eine Panendoskopie in Intubationsnarkose zwingend erforderlich. Die Panendoskopie erfolgt hierbei zur Sicherung der Diagnose und zur genauen Bestimmung der Ausdehnung eines Tumors vor der eigentlichen operativen Tumorresektion. Betroffene Patienten müssen dementsprechend zwei Operationen in Allgemeinanästhesie unterzogen werden, einschließlich typischerweise mehrtägiger stationärer Aufenthalte im Krankenhaus. Mithilfe der Abstrichzytologie könnte eine erste Diagnose stattdessen bereits bei der ambulanten Vorstellung des Patienten zytologisch erfolgen, was nachfolgend eine direkte Planung der Tumorresektion ermöglicht. Im Rahmen einer einzelnen Operation wäre es nun möglich, die zytologische Diagnose durch eine Biopsie und Schnellschnittanalyse histologisch zu sichern, mittels Panendoskopie möglicherweise parallel vorliegende Karzinome zu identifizieren und anschließend eine Resektion des Tumors durchzuführen. Dieses Vorgehen würde dem Patienten nicht nur eine vollständige Operation ersparen, sondern auch die Zeit zwischen der ambulanten Erstvorstellung und der tatsächlichen Therapie des Tumors deutlich verkürzen. Eine prospektive, randomisierte klinische Studie zur Überprüfung einer potenziellen Überlegenheit dieses Konzeptes wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer des

Saarlandes im April 2017 bewilligt und wird aktuell an unserer Klinik unter Leitung von Herrn PD Dr. Maximilian Linxweiler durchgeführt. Eine schematische Übersicht des Studienablaufs ist in Abbildung 36 dargestellt.



**Abb. 36: Schematische Darstellung des Studienablaufs zur Evaluation der zytologiebasierten Tumorchirurgie in der Kopf-Hals-Onkologie.** Im Rahmen einer prospektiven, randomisierten klinischen Studie soll überprüft werden, ob bei Patienten mit Verdacht auf ein Karzinom des Kopf-Hals-Bereichs mithilfe der flüssigkeitsbasierten Abstrichzytologie die Zeit zwischen der ambulanten Erstvorstellung und der Therapie des Tumors verkürzt und ein vollständiger Operationstermin eingespart werden kann. Die Studie ist hierbei zweiarstig ausgelegt und vergleicht das beschriebene Vorgehen mit dem derzeitigen Goldstandard der histologischen Beurteilung einer im Rahmen der Panendoskopie invasiv gewonnenen Biopsie. Insgesamt sollen 100 Patienten in den Studienablauf eingeschlossen werden. Nähere Erläuterungen befinden sich im Text.

Neben der Primärdiagnostik von HNSCCs würde sich auch im Rahmen der Tumornachsorge ein möglicher Nutzen der flüssigkeitsbasierten Abstrichzytologie ergeben. Durch die nicht-invasive Form der Probengewinnung wäre eine engmaschige Überprüfung des Therapieerfolges möglich, da verhältnismäßig risikoarm eine frühzeitige Analyse potenziell auftretender Schleimhautläsionen erfolgen könnte. Ein derartiges Konzept wurde im Jahr 2005 erstmals an 10 Patienten mit einer Leukoplakie der Mundschleimhaut überprüft und ermöglichte nach abgeschlossener Therapie die erfolgreiche zytologische Früherkennung rezidivierender Schleimhautdysplasien (Schwarz *et al.*, 2005). Soweit in der wissenschaftlichen Literatur nachvollziehbar, hat eine nähere Überprüfung des Potenzials der Abstrichzytologie in der HNSCC-Nachsorge bisher nicht stattgefunden und wird daher von unserer Arbeitsgruppe derzeit im Rahmen einer klinischen Studie analysiert.

### 3.1.2 Nicht-invasive Analyse molekularer Biomarker

Ein weiterer bedeutender Vorteil der flüssigkeitsbasierten Abstrichzytologie besteht darin, zeitlich unabhängig voneinander mehrere zytologische Präparate aus derselben Zellsuspension anfertigen zu können, welche nachfolgend beispielsweise für die Analyse molekularer Biomarker genutzt werden können. Dies scheint vor allem vor dem Hintergrund einer mitunter deutlich voneinander abweichenden Pathogenese und einer hohen molekularen Heterogenität von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region von zentralem Interesse für die Entwicklung individualisierter Therapieansätze zu sein. Im Rahmen dieser Arbeit war es uns dabei für alle 175 eingeschlossenen HNSCC-Patienten möglich, aus derselben Abstrichsuspension mindestens zwei zytologische Präparate anzufertigen, welche bei der mikroskopischen Begutachtung eine ausreichende Anzahl valide bewertbarer Karzinomzellen enthielten. Darüber hinaus war es für etwa 70% der gesammelten Proben möglich, auch weitere Präparate mit ausreichendem Tumoranteil anzufertigen. Da sich für die zu diesem Zeitpunkt aufgebrauchten Proben keine bedeutenden Abweichungen vom ursprünglichen Patientenkollektiv zeigten, wurde angenommen, dass eine generell geringere Qualität der Proben einer bestimmten Tumorlokalisierung oder Patientensubgruppe größtenteils ausgeschlossen werden kann. Anhand derart angefertigter Zweit- oder Drittpräparate war es sowohl für abstrichzytologische Proben der Zervix als auch von HNSCCs möglich zu zeigen, dass diese für verschiedene molekulare Methoden zugänglich sind. Die hier beschriebenen Methoden der FISH und verschiedener immunzytochemischer Proteinnachweise waren dabei bisher nur an invasiv gewonnenen Gewebeproben etabliert und konnten von uns nahezu uneingeschränkt auf die Abstrichzytologie übertragen werden. Unspezifische und durch bakterielle Besiedlung der analysierten Regionen bedingte Hintergrundfärbungen konnten durch eine Anpassung der Versuchsbedingungen zumeist effektiv reduziert werden. Im Rahmen der beschriebenen Analysen war es somit letztendlich möglich das Protein SEC62 als migrationsstimulierendes Onkogen in der Entstehung des HNSCCs sowie des Zervixkarzinoms zu identifizieren. Eine ausführlichere Diskussion der Rolle von *SEC62* vor dem Hintergrund der molekularen Onkologie findet sich in Kapitel 3.2. Die nicht-invasive flüssigkeitsbasierte Abstrichzytologie war hierbei zentraler Ausgangspunkt für alle Untersuchungen und zeigte eine hohe Übereinstimmung mit den Ergebnissen invasiv gewonnener Proben. Darüber hinaus erscheint es zudem möglich, zukünftig die maximale

Anzahl der zytologischen Präparate einer Zellsuspension weiter zu erhöhen. Beispielsweise könnten mehrere Bürstenabstriche eines Tumors in derselben Flüssigkeit aufgenommen werden, um so die Zelldichte der erhaltenen Suspension zu steigern. Wie bereits erwähnt, scheint auch die Anfertigung mehrerer Abstriche der gleichen Tumorlokalisation komplikationslos möglich zu sein. Die beschriebenen Erkenntnisse decken sich auch mit ersten Erfahrungen aus der Literatur: Zytologische Proben der Mundschleimhaut von 50 gesunden Kontrollpatienten konnten nach morphologischer Begutachtung der enthaltenen Zellen erfolgreich für verschiedene molekulare Untersuchungen genutzt werden. Diese umfassten Methoden zur Analyse der DNA-Sequenz und des mRNA-Expressionsprofils, wobei der HPV-Status des untersuchten Materials bestimmt werden sollte (Kujan *et al.*, 2006).

Eine Methodik zur zuverlässigen Bestimmung des HPV-Tumorstatus scheint dabei von zentralem Interesse für das klinische Management von HNSCC-Patienten zu sein, da die chronische Infektion mit Humanen Papillomviren mittlerweile als ein bedeutender Risikofaktor für die Entstehung von HNSCCs, insbesondere von Oropharynxkarzinomen, identifiziert werden konnte. Trotz intensiver Forschungsbemühungen wird der potenzielle Nutzen einer Vielzahl an Methoden bis dato kontrovers diskutiert. Diese basieren dabei hauptsächlich auf einem direkten Nachweis der viralen DNA bzw. der Genprodukte Humaner Papillomviren, oder auf einer Analyse der Expression zellulärer Surrogatmarker (Abreu *et al.*, 2012; Venuti & Paolini, 2012; Burd, 2016; Kim *et al.*, 2018; Salazar *et al.*, 2019). Ein Vergleich der prognostischen Aussagekraft aller am Universitätsklinikum des Saarlandes etablierten Methoden zur Bestimmung des HPV-Tumorstatus von HNSCC-Patienten wird von unserer Arbeitsgruppe aktuell untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die simultane immunzytochemische Detektion der Proteine p16 und Ki67 in Form der CINTec Plus Färbung auf die abstrichzytologischen Präparate von HNSCC-Patienten übertragen werden, da auf dem Gebiet der Gynäkologie für diese Methodik bereits ein hohes diagnostisches Potenzial nachgewiesen werden konnte (Schmidt *et al.*, 2011; Wentzensen *et al.*, 2012; Ikenberg *et al.*, 2013; McMenamin *et al.*, 2018). Die diagnostische Validität der Methodik sollte durch eine zusätzliche Detektion der DNA von Papillomviren der Hochrisikotypen mittels PCR weiter gesteigert werden. Insgesamt war es so möglich, anhand von nicht-invasiv gewonnenem Material den HPV-Tumorstatus von 175 HNSCC-Patienten zu bestimmen und zwischen einer latenten und einer transformierenden HPV-Infektion zu unterscheiden. In 92% der Fälle waren die Ergebnisse der CINTec Plus Zytologie und der hochsensitiven HPV-DNA-PCR

deckungsgleich, so dass von einer einheitlichen Bestimmung des HPV-Status ausgegangen werden konnte. Zwölf Patienten mit positivem HPV-DNA-Nachweis zeigten sowohl in der immunzytologischen Doppelfärbung als auch in der nachträglichen Analyse der Surrogatmarker pRb und Cyclin D1 ein hiervon abweichendes Expressionsmuster, welches mit dem eindeutig HPV-negativer Patienten übereinstimmte. Eine Beeinflussung der genannten zellulären Proteine durch die Aktivität des viralen Onkoproteins E7 konnte somit an der Stelle nicht nachgewiesen werden. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde in den vorliegenden Fällen auf eine latente HPV-Infektion geschlossen, welche vermutlich nicht ursächlich für eine maligne Transformation der Zellen gewesen ist. Insgesamt würde sich somit durch die Kombination beider Methoden eine Spezifität von 99% bei einer gleichzeitigen Sensitivität von 100% für die Bestimmung des HPV-Tumorstatus bei HNSCC-Patienten ergeben. Dieses Ergebnis entspricht auch den bisherigen Beschreibungen in der wissenschaftlichen Literatur: Eine erste Studie an circa 200 invasiv gewonnenen Gewebeproben konnte bereits nachweisen, dass durch die CINtec Plus Färbung eine hochspezifische Detektion von HNSCC-Zellen möglich ist, welche durch eine HPV-Infektion maligne transformiert wurden (Prigge *et al.*, 2014). Die p16-Ki67-Doppelfärbung scheint dabei einer Einzelfärbung von p16 in seinem diagnostischen Potenzial deutlich überlegen, da in zahlreichen Fällen eine erhöhte, HPV unabhängige Expression des Proteins, vor allem im Kryptenepithel der Tonsille, beobachtet werden kann (Hoffmann *et al.*, 2012; Rietbergen *et al.*, 2013; Michaelsen *et al.*, 2014; Prigge *et al.*, 2016). Entgegen unserer initialen Erwartungen zeigte sich im weiteren Verlauf, dass alle Patienten mit einer potenziell latenten HPV-Infektion ein zu HPV-positiven Patienten vergleichbares Gesamtüberleben aufwiesen. Somit kann trotz fehlendem Nachweis einer Aktivität des viralen Onkoproteins E7 nicht ausgeschlossen werden, dass ursprünglich eine HPV-induzierte kanzerogene Transformation der Zellen vorlag. Klassischerweise wird davon ausgegangen, dass die HPV-induzierte Karzinogenese mit einer Linearisierung der viralen DNA im E2-Leserahmen und einer nachfolgenden Integration in das humane Genom beginnt. Ausgehend hiervon kommt es zu einer starken Expression der viralen Onkoproteine. Allerdings konnte in den letzten Jahren beobachtet werden, dass in zahlreichen HNSCC-Fällen die DNA des Virus lediglich episomal vorlag und eine Expression von E6 und E7 unabhängig vom Integrationsstatus oder der Anzahl der integrierten Kopien zu sein scheint (Olthof *et al.*, 2014b, a; Nulton *et al.*, 2017; Khanal *et al.*, 2018). Des Weiteren wird die Expression der viralen Onkoproteine vermutlich durch diverse Mechanismen gesteuert, wobei vor allem eine Methylierung der

E2-Bindestellen in E6- und E7-Regulatorregionen von zentraler Bedeutung zu sein scheint (Oka *et al.*, 2013; Leung *et al.*, 2015; Torres-Rojas *et al.*, 2018). Ein möglicher Erklärungsansatz für das von uns beobachtete Phänomen könnte somit in einer zeitweisen Unterdrückung oder einem vollständigen Verlust der Expression von E7 liegen, trotz ursprünglicher Aktivität der viralen Onkoproteine. Dennoch konnte durch die Kombination der CINtec Plus Zytologie mit einer HPV-DNA-PCR ein System entwickelt werden, durch welches es in der Mehrheit der Fälle möglich war, anhand von nicht-invasiv gewonnenem Material den HPV-Tumorstatus von HNSCC-Patienten zuverlässig zu bestimmen. Vor dem Hintergrund eines auch im Rahmen dieser Arbeit beobachteten deutlichen Überlebensvorteils von Patienten mit HPV-positiven Tumoren und aktuellen Studien zu einer potenziellen Reduktion der notwendigen Therapiemaßnahmen betroffener Patienten scheint dies für eine Stratifizierung und personalisierte Therapieplanung von besonderem Interesse zu sein (Masterson *et al.*, 2014; Wirth *et al.*, 2019; Venz *et al.*, 2019). Ebenso erscheint ein Nutzen der Methodik auch vor dem Hintergrund der Tumornachsorge vorstellbar, um persistierende HPV-Infektionen und damit möglicherweise auftretende Rezidive frühzeitig erkennen zu können. Für dieses Konzept konnten von einer italienischen Arbeitsgruppe bei der Analyse konventioneller Bürstenabstriche bereits erfolgreich erste Erfahrungen gesammelt werden (Morbini *et al.*, 2013).

Zusammenfassend wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass die flüssigkeitsbasierte Abstrichzytologie ein hohes Potenzial für eine nicht-invasive Form der Diagnostik von HNSCCs bietet und dabei zusätzlich die valide Analyse diverser molekularer Biomarker dieser Tumorentität ermöglicht. Obwohl weitere Studien notwendig sind, um das genaue diagnostische Potenzial dieser Methodik kritisch zu überprüfen, scheint sie einen zentralen Ausgangspunkt für die personalisierte medizinische Behandlung von HNSCC-Patienten darstellen zu können.

### 3.2 *SEC62* als Onkogen der chromosomalen Region 3q26

Amplifikationen des langen Arms von Chromosom 3 (3q) zählen zu einer der häufigsten genetischen Veränderungen humaner Karzinome, wobei die kleinste amplifizierte Region auf den Chromosomenabschnitt 3q26 eingegrenzt werden konnte. Auch in Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region und des Gebärmutterhalses liegt eine derartige Amplifikation oft mit hoher Prävalenz vor. Trotz intensiver Forschungsbemühungen konnten jedoch die konkreten Onkogene und ihr Einfluss auf die Tumorzellbiologie bisher nicht komplett aufgeklärt werden. Ein potenzielles Onkogen der 3q26-Region ist dabei das Gen *SEC62*, welches für ein gleichnamiges Transmembranprotein des ER codiert. In den vergangenen Jahren konnte bereits gezeigt werden, dass in verschiedenen Tumorentitäten eine massive Fehlregulation der Expression von *SEC62* im Sinne einer Genamplifikation und -überexpression vorzuliegen scheint, welche in ersten Untersuchungen mit einer gesteigerten Migrationsfähigkeit und Stresstoleranz der Tumorzellen einherging. Da in der wissenschaftlichen Literatur zu Beginn dieser Dissertation keine näheren Informationen zu einer möglichen Rolle von *SEC62* in der Onkogenese von HNSCCs wie auch von Zervixkarzinomen vorlag, sollte dies nachfolgend näher untersucht werden. Bei der Analyse 100 abstrichzytologischer Präparate dysplastischer Läsionen der Zervix zeigte sich hierbei mit zunehmendem Grad der Dysplasie eine gesteigerte Anzahl der Zellen mit genomischen *SEC62*-Gewinnen, wobei die höchste Inzidenz beim Übergang von präkanzerösen Neoplasien zu einem invasiv wachsenden Plattenepithelkarzinom beobachtet werden konnte. Aufgrund einer vermehrt auftretenden bakteriellen Besiedlung der oberen Atem- und Speisewege wurde eine äquivalente Untersuchung abstrichzytologischer Präparate von HNSCC-Patienten in ein umfassenderes Projekt ausgelagert, welches aktuell von unserer Arbeitsgruppe bearbeitet wird. Um hierbei zukünftig eine genauere Kontrolle des in Karzinomen oft veränderten Ploidiegrades von Chromosom 3 zu gewährleisten, wurde für die FISH-Analyse die interne Hybridisierungskontrolle auf eine Sonde gegen die Zentromerregion eben dieses Chromosoms umgestellt. Erste Ergebnisse des Projektes deuten darauf hin, dass Amplifikationen von *SEC62* auch bei Karzinomen der Kopf-Hals-Region eng mit der Ausbildung eines invasiv wachsenden Phänotyps verbunden zu sein scheinen (pers. Mitteilung Dr. Silke Wemmert, HNO-Forschungslabor, UkS). Die genannten Ergebnisse decken sich dabei vollkommen mit den bisherigen Beobachtungen zum allgemeinen Vorliegen einer 3q26-Amplifikation vor dem Hintergrund onkologischer Erkrankungen,

können diese aber konkretisieren und unter anderem auf das Gen *SEC62* eingrenzen (siehe auch Einleitung Kapitel 1.2). In beiden Tumorentitäten war darüber hinaus eine signifikante Steigerung der Expression von *SEC62* in Form eines jeweils erhöhten *SEC62*-Proteingehalts nachzuweisen, was aufgrund der beschriebenen genomischen Amplifikationen des Gens unseren Erwartungen entsprach. Hierbei war in Schleimhautläsionen der Zervix mit fortschreitendem Grad der Dysplasie eine schrittweise Zunahme des *SEC62*-Proteingehaltes und bei HNSCC-Patienten sowohl in zytologischen als auch in histologischen Untersuchungen eine deutliche Assoziation zur Metastasierungsneigung des Karzinoms zu beobachten. Bemerkenswerterweise war ein erhöhter *SEC62*-Proteingehalt zudem signifikanter Prädiktor eines kürzeren Gesamtüberlebens der untersuchten HNSCC-Patienten, wobei durchschnittlich ein etwa drei- bis sechsfach erhöhtes Sterberisiko festgestellt werden konnte. Ein erster Hinweis auf eine derartige prognostische Relevanz der *SEC62*-Expression bei Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region konnte von unserer Arbeitsgruppe bereits kurz zuvor bei der Analyse invasiv gewonnener Tumorgewebeprobe von 35 Patienten gesammelt werden (Wemmert *et al.*, 2016). In Zusammenarbeit mit der Klinik für Frauenheilkunde, Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin konnten außerdem in einer unabhängigen Untersuchung die bisherigen Ergebnisse der Analyse dysplastischer Läsionen der Zervix weiterhin bestätigt werden (Takacs *et al.*, 2019b). Zudem war es möglich, einen erhöhten *SEC62*-Proteingehalt auch in Karzinomen der Vulva und in invasiv wachsenden duktalem Tumoren der Brustdrüse nachzuweisen, wobei dies im zuletzt genannten Fall ebenso mit einer gesteigerten Rate der Metastasierung verbunden war (Takacs *et al.*, 2019a, c). Funktionell konnte auf Ebene der molekularen Tumorzellbiologie im Rahmen dieser Arbeit mithilfe zweier *in vitro* Modelle gezeigt werden, dass die Migrationsfähigkeit von Zellen eines HNSCCs wie auch eines Zervixkarzinoms maßgeblich vom Expressionsstatus des Gens *SEC62* abhängig zu sein scheint, wobei eine Überexpression in einem deutlich erhöhten Migrationspotenzial der Zellen resultiert. Weiterhin unklar ist in diesem Zusammenhang, ob der beschriebene Effekt auf eine Beeinflussung der zellulären Prozesse der Calciumhomöostase oder der Proteintranslokation zurückzuführen ist. Aufgrund der weiterhin nicht vollständig charakterisierten molekularen Funktion von *SEC62* erscheinen beide Möglichkeiten, sowie ein synergistischer Effekt realistisch vorstellbar. Erste Hinweise aus der Literatur auf einen Einfluss der Expression von *SEC62* auf das Protein Vimentin und eine dadurch potenziell bedingte Induktion der epithelial-mesenchymalen Transition konnten hier für dysplastische Läsionen der Zervix auch

beobachtet, funktionell jedoch nicht näher bestätigt werden (Linxweiler *et al.*, 2014a). Mechanistisch konnte im vergangenen Jahr außerdem eine Beeinflussung der Integrin-Signalgebung und einer Adenosin-Methyltransferase durch SEC62 festgestellt werden, wodurch in beiden Fällen das Wachstumspotenzial transformierter Zelllinien beeinflusst wurde (He *et al.*, 2019; Du *et al.*, 2019).

Das Protein SEC62 konnte somit als Marker einer Amplifikation des Chromosomenabschnittes 3q26 in der Entstehung von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region sowie der Zervix identifiziert werden. Dieser Vorgang scheint dabei eng mit dem Übergang des Tumors zu einem invasiven Wachstum verbunden zu sein. Ausgehend von einer Überexpression des Gens konnte *in vitro* eine signifikante Stimulation der Migration betroffener Zellen beobachtet werden, welche darüber hinaus auf klinischer Seite mit einer fortschreitenden (lymphogenen) Metastasierung und einem verkürzten Gesamtüberleben der Patienten assoziiert war. Folglich schlagen wir *SEC62* als Protoonkogen der hier untersuchten Tumorentitäten vor, welches durch Genamplifikation aktiviert zu werden scheint und nachfolgend bei übermäßiger Expression vermutlich als zelluläres Onkogen zu betrachten ist. Aufgrund einer frühen Amplifikation von *SEC62* in einer Mehrheit der untersuchten Tumoren, auch unabhängig von deren HPV-Status, liegt eine Einordnung als sogenannter onkogener Treiber nahe. Für eine genauere Einschätzung der Rolle von *SEC62* als humanes Protoonkogen scheinen dennoch nähere Analysen notwendig zu sein, zum Beispiel zur Bestimmung des Potenzials der Induktion einer malignen Transformation von regulären Zellen. Auch eine weitere Untersuchung molekularer Interaktionspartner und einer möglichen Beeinflussung onkogener Signaltransduktionswege scheint hierbei von zentralem Interesse. Vor dem Hintergrund des klinischen Managements onkologischer Erkrankungen ist außerdem ein Nutzen von SEC62 in der Tumorfrüherkennung und zur Therapiestratifizierung betroffener Patienten vorstellbar und sollte darüber hinaus auch in weiteren Tumorentitäten untersucht werden.

Basierend auf den vorausgehenden Beschreibungen stellt das Protein SE62 zudem eine attraktive Zielstruktur für eine potenzielle Therapie verschiedener onkologischer Erkrankungen mit einer Überexpression von *SEC62* dar. Trotz intensiver Bemühungen scheitern RNA-Interferenz basierte Ansätze zur Reduktion der Expression verschiedener Onkogene im humanmedizinischen Einsatz bisweilen oft noch an ausgeprägten toxischen Nebenwirkungen und Problemen der Erreichbarkeit der zu behandelnden Gewebe (Bonetta, 2009; Dowdy, 2017; Chakraborty *et al.*, 2017; Nogrady, 2019).

Ausgehend von der molekularen Funktion des Proteins SEC62 im Rahmen der zellulären Calciumhomöostase konnte in den vergangenen Jahren jedoch eine potenzielle Therapieoption entwickelt werden: Durch Behandlung der Zellen mit Calmodulin-Antagonisten, war es in *in vitro* Experimenten möglich, den Phänotyp einer SEC62-Depletion funktionell zu kopieren. Die Applikation der niedermolekularen Verbindungen Trifluoperazin (TFP) oder Ophiobolin A führte hierbei in HeLa-Zellen jeweils zu einem erhöhten basalen zytosolischen Calciumgehalt sowie zu einem gesteigerten Calciumausstrom aus dem ER nach Thapsigargin (TG) induzierter, nicht-kompetitiver Inhibition der SERCA. Darüber hinaus war eine dosisabhängige Inhibition der Zellmigration verschiedener Zelllinien sowie eine Sensibilisierung gegenüber TG-induziertem ER-Stress festzustellen (Linxweiler *et al.*, 2013). Insgesamt scheint somit auf molekularer Ebene den beschriebenen onkogenen Effekten einer Überexpression von *SEC62* in Karzinomen effektiv entgegengewirkt werden zu können. Das Molekül TFP bietet hierbei den Vorteil als Neuroleptikum bereits seit vielen Jahren eine Arzneimittelzulassung in der Humanmedizin zu besitzen (Shen, 1999). Zusätzlich wurde im Rahmen einer retrospektiven Analyse eine zum damaligen Zeitpunkt unbeabsichtigte Nebenwirkung in Form eines Überlebensvorteils verschiedener Karzinompatienten nachgewiesen (Zacharski *et al.*, 1990). Auch die Anwendung von TG sowie verschiedener zielgerichteter Derivate dieses Moleküls zeigte in mehreren *in vitro* Experimenten sowie in einer ersten klinischen Studie zur Therapie solider Karzinome bereits vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich seiner antitumoralen Effektivität (Denmeade *et al.*, 2012; Mahalingam *et al.*, 2016). Eine Kombination beider Pharmaka konnte von unserer Arbeitsgruppe in enger Zusammenarbeit mit den Instituten für Medizinische Biochemie und Klinisch-Experimentelle-Chirurgie zudem bereits in einem heterotopen Mausmodell zu der Behandlung *SEC62* überexprimierender Zellen eines Hypopharynxkarzinoms erfolgreich genutzt werden (Körbel *et al.*, 2018). Zur Untersuchung einer potenziell migrationshemmenden Wirkung derartiger Mono- oder Kombinationstherapien befinden sich zwei orthotope Tiermodelle, welche jeweils die lymphogene bzw. hämatogene Metastasierung von HNSCCs abbilden, aktuell in Vorbereitung. Aufgrund der zentralen Funktion von SEC62 im Zuge der ER-phagozytose erscheint zudem ein Nutzen von Autophagie-Inhibitoren, wie zum Beispiel Bafilomycin A1 oder Chloroquin, im Rahmen derartiger Therapiekonzepte ebenfalls vorstellbar (Bergmann *et al.*, 2016).

### 3.3 Auswirkungen und prognostische Implikationen eines Vitamin D Mangels bei HNSCC-Patienten

Unter dem Namen Vitamin D wird eine Gruppe lipophiler Secosteroide zusammengefasst, deren physiologisch aktive Form im Menschen eine hormonelle Wirkung in verschiedenen Zielorganen ausüben kann. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl Vitamin D abhängiger Gene identifiziert, so dass davon auszugehen ist, dass diverse physiologische Prozesse in ihrer Steuerung einer komplexen Abhängigkeit von Vitamin D unterliegen. Bemerkenswerterweise scheint hierbei ein Zusammenhang zwischen der Vitamin D Versorgung, der Entstehung und Progression von onkologischen Erkrankungen und der Aktivität des Immunsystems vorzuliegen. Da sich in der wissenschaftlichen Literatur vermehrt Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen dem Vorliegen eines Vitamin D Mangels und der Inzidenz maligner Erkrankungen finden, sollte im Rahmen dieser Arbeit die Vitamin D Versorgung von HNSCC-Patienten näher charakterisiert werden. Die Analyse bot hierbei den Vorteil, auf minimal-invasiven Blutproben zu basieren, welche bei einer ambulanten Vorstellung der Patienten routinemäßig entnommen werden. Aufgrund einer bedarfsgerechten Synthese der physiologisch aktiven Form besteht wissenschaftlicher Konsens darüber, dass eine Analyse der Gesamtmenge aller Vitamin D Metabolite im Blut zur Bestimmung des Vitamin D Status nicht zielführend ist. Stattdessen sollte dieser anhand der Konzentration der Speicherform 25-OH-Vitamin D ermittelt werden, welche eine verhältnismäßig lange Plasmahalbwertszeit von über 14 Tagen aufweist (DeLuca, 2004; Bischoff-Ferrari *et al.*, 2006; Holick, 2009). Allerdings wird die genaue Definition des Vitamin D Status bzw. eines potenziell vorliegenden Mangels aktuell weiterhin ausgiebig diskutiert: 25-OH-Vitamin D Serumspiegel unter 10 ng/ml werden einheitlich als manifester Vitamin D Mangel angesehen, da sie klinisch mit ausgeprägten muskuloskelettalen Symptomen in Form demineralisierter Knochen und einer deutlich verringerten Muskelkraft verbunden sind (Lips, 2001; Need *et al.*, 2008). Jedoch wurde auch für Konzentrationen von bis zu 30 ng/ml eine klare inverse Korrelation zum Parathormonspiegel und zur intestinalen Calciumresorption festgestellt – beide Vorgänge stehen dabei physiologisch in direkter Abhängigkeit zur Vitamin D Versorgung. Folglich können 25-OH-Vitamin D Serumspiegel zwischen 10 und 30 ng/ml sehr wahrscheinlich auch als Mangel, mindestens aber als unzureichende Versorgung angesehen werden (Bischoff-Ferrari *et al.*, 2006; Holick, 2009; Holick *et al.*, 2011). Werte über 30 und bis zu 100 ng/ml gelten gemeinhin als

ausreichende Serumspiegel und scheinen eine längerfristig stabile Vitamin D Versorgung sicherstellen zu können. Toxische Effekte, welche sich klinisch zumeist durch Symptome einer Hypercalcämie äußern, werden hingegen selten und erst ab 25-OH-Vitamin D Konzentrationen von deutlich über 150 ng/ml beobachtet. Sie sind dabei zumeist auf eine unbeabsichtigt starke Einnahme hochkonzentrierter Vitamin D Präparate zurückzuführen, da die endogene Prävitamin D<sub>3</sub> Synthese beim Erreichen derartiger Schwellenwerte selbstlimitierend ist (Heaney, 2004; Holick, 2017; Pilz *et al.*, 2019). Ausgehend von den beschriebenen Grenzwerten sollte im Rahmen dieser Arbeit die Vitamin D Versorgung der untersuchten Patientenkollektive analysiert werden. Hierbei zeigte sich, dass bei HNSCC-Patienten mit hoher Prävalenz ein ausgeprägter Vitamin D Mangel vorlag; lediglich 18 von 231 untersuchten Patienten wiesen ausreichende Serumspiegel auf. Diese Beobachtung war dabei augenscheinlich nicht auf den allgemeinen Ernährungszustand oder einen grundlegend gestörten Calciumstoffwechsel der HNSCC-Patienten zurückzuführen. HPV-positive Patienten zeigten im Durchschnitt eine bessere Vitamin D Versorgung als Patienten mit Noxen-induzierten Karzinomen, was zu der eingangs beschriebenen Beobachtung passt, dass es sich hierbei zumeist um jüngere Patienten in einem besseren Allgemeinzustand handelt. Darüber hinaus war ein Vitamin D Mangel mit einer höheren Rate lymphogener Metastasierung und einem signifikant verkürzten Gesamtüberleben verbunden, wobei durchschnittlich ein nahezu verdoppeltes Sterberisiko der betroffenen Patienten festgestellt werden konnte. Die von uns hier gemachten Beobachtungen bestätigen dabei die bisherigen Ergebnisse zur potenziellen Prävalenz und prognostischen Aussagekraft eines Vitamin D Mangels bei HNSCC-Patienten und konnten diese an einem deutlich größeren Patientenkollektiv nachvollziehen (siehe auch Einleitung Kapitel 1.3). Als vornehmliche Ursache für einen Vitamin D Mangel konnte in den letzten Jahrzehnten eine verminderte Syntheseleistung durch unzureichende Sonnenlicht-Exposition identifiziert werden, welche unter anderem durch die Pigmentierung der Haut, den Lebensstil (Aufenthalt in geschlossenen Räumen) und Kleidungsgewohnheiten bedingt wird. Eine zentrale Rolle scheinen hierbei aber vor allem auch der Breitengrad des Wohnortes und die jeweiligen Witterungsverhältnisse zu spielen. So nimmt die für die endogene Synthese notwendige UV-B Strahlung in ihrer Intensität und Dauer in höher gelegenen Breiten deutlich ab und ist in Deutschland nur zwischen den Monaten von circa April bis September intensiv genug, um bei geeignetem Aufenthalt im Freien den menschlichen Vitamin D Bedarf ausreichend zu decken (Holick, 2003; 2007; Wacker & Holick, 2014; Holick, 2016). Um in dem Zusammenhang den

Einfluss potenziell abweichender Parameter bei der Beurteilung der Vitamin D Versorgung von HNSCC-Patienten möglichst zu minimieren, wurde von uns eine parallele Analyse gesunder Kontrollprobanden der gleichen Alters- und Geschlechtszusammensetzung und des gleichen Einzugsgebietes durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass HNSCC-Patienten durchschnittlich um über 10 ng/ml niedrigere 25-OH-Vitamin D Serumspiegel aufwiesen als vergleichbare Kontrollpatienten, womit davon ausgegangen werden kann, dass eine spezifische Korrelation zwischen dem Vorliegen eines Vitamin D Mangels und einer onkologischen Erkrankung der Kopf-Hals-Region besteht. In beiden Kollektiven war zudem eine gewisse saisonale Variation der Vitamin D Serumspiegel zu beobachten, welche so auch bereits in der Literatur beschrieben ist und mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die im Verlauf eines Jahres wechselnde Intensität der UV-B Strahlung zurückzuführen ist (Holick, 2002a, b; 2003). Allerdings fand die Gewinnung der Blutproben sowohl der HNSCC-Patienten als auch der gesunden Kontrollprobanden gleichmäßig auf die Sommer- (April bis September) bzw. Wintermonate (Oktober bis März) verteilt statt, so dass davon auszugehen ist, dass die Ergebnisse nur marginal von unterschiedlichen Zeitpunkten der Patientenrekrutierung beeinflusst wurden. Gleichwohl können grundlegende Unterschiede zwischen den beiden Kollektiven trotz aller Bemühungen nicht vollständig ausgeschlossen werden. Abweichende Gewohnheiten in der Lebensführung und eine potenzielle Beeinflussung metabolischer Prozesse sind zum Beispiel aufgrund eines bei HNSCC-Patienten oft erhöhten Tabak- und Alkoholkonsums durchaus vorstellbar, in der klinischen Praxis aber mitunter schwer zu quantifizieren. Bemerkenswert ist ebenso, dass auch die Mehrheit der untersuchten Kontrollpatienten 25-OH-Vitamin D Serumspiegel unter 30 ng/ml aufwiesen. Deutliche Hinweise auf eine möglicherweise generell unzureichende Vitamin D Versorgung in der deutschen Bevölkerung finden sich in den letzten Jahren so auch zunehmend in der wissenschaftlichen Literatur (Hintzpeter *et al.*, 2007; Kramer *et al.*, 2014; Rabenberg *et al.*, 2015).

Des Weiteren konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine verminderte Immunezellinfiltration bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region mit einer deutlich schlechteren Prognose verbunden war. Hierbei wirkte sich vor allem das Infiltrationsprofil potenziell zytotoxischer Effektorzellen (CD8<sup>+</sup> und CD56<sup>+</sup>) signifikant auf das Gesamtüberleben der jeweiligen Patienten aus. Diese Ergebnisse bestätigen dabei die bisherigen Erkenntnisse der wissenschaftlichen Literatur zu einer umfassenden Unterdrückung der Aktivität diverser Komponenten des Immunsystems

durch onkologische Erkrankungen. Hierbei scheinen besonders auch HNSCCs durch ein immunsupprimierendes Tumormikromilieu gekennzeichnet zu sein, welches unter anderem durch eine vielschichtige Beeinflussung tolerogener Signalwege eine Immunevasion des Karzinoms und letztendlich die Progression des Tumorgeschehens ermöglicht (Allen *et al.*, 2015; Davis *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2019). Für zahlreiche Tumorentitäten, aber auch für Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region, konnte so bereits gezeigt werden, dass eine verminderte Anzahl tumorinfiltrierender, zytotoxischer Immunzellpopulationen deutlich mit einer verschlechterten Prognose der jeweiligen Patienten korrelierte (Balermipas *et al.*, 2013; Gentles *et al.*, 2015; Lei *et al.*, 2016; Chen & Mellman, 2017; Fridman *et al.*, 2017). Charakteristisch für eine derartig beeinflusste Immunlandschaft scheint zudem das vermehrte Vorliegen antiinflammatorisch wirkender M2-Makrophagen zu sein, was so auch von uns bei den hier untersuchten Patienten beobachtet werden konnte (Thorsson *et al.*, 2018). Die Unterdrückung einer derartigen Immunmodulation durch das Karzinom sowie die Aktivierung antitumoraler Komponenten der Immunantwort ist dabei Gegenstand intensiver Forschungsarbeiten und führt aktuell zu einer rasanten Entwicklung vielversprechender Therapiekonzepte auf dem Gebiet der sogenannten Immunonkologie (Ferris, 2015; Cramer *et al.*, 2019; Gavrielatou *et al.*, 2020). Vor diesem Hintergrund erscheint es besonders bemerkenswert, dass im Rahmen der hier beschriebenen Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass Patienten mit höheren 25-OH-Vitamin D Serumspiegeln ein bedeutend günstigeres Profil der Immunzellinfiltration aufwiesen, welches sich zudem signifikant auf das Gesamtüberleben der betreffenden Patienten auswirkte. Möglicherweise kann so durch eine suffiziente Vitamin D Versorgung eine funktionelle Kompensation der verschiedenen Immunevasionsmechanismen des Tumors und eine weitere Aktivierung antitumoraler Komponenten des Immunsystems erreicht werden. Folglich erscheint es naheliegend, dass sich durch die Substitution von Vitamin D eine kostengünstige und verhältnismäßig risikoarme Möglichkeit einer effektiven Immunstimulation zumeist gravierend unterversorgter HNSCC-Patienten ergeben könnte. Die Analyse eines derartigen Therapiekonzepts der Vitamin D Substitution konnte in Zusammenarbeit mit der Klinik für Innere Medizin I bereits eine signifikante Steigerung der zytotoxischen Aktivität der Natürlichen Killerzellen von neun HNSCC-Patienten zeigen. Hierbei war nach Substitution ebenso eine erhöhte Wirksamkeit des therapeutischen Antikörpers Cetuximab zu beobachten, was vermutlich durch eine Steigerung der Antikörper-vermittelten zellulären Zytotoxizität der NK-Zellen zu erklären ist (Kimura *et al.*, 2007; Ferris *et al.*, 2018). Somit scheint

eine Vitamin D Substitution zudem einen wertvollen Beitrag zu aktuell aufkommenden Immuntherapiekonzepten von HNSCC-Patienten leisten zu können. Obwohl nachgewiesen wurde, dass nahezu alle immunologischen Zellen eine Expression des Vitamin D Rezeptors aufweisen und in ihrer Funktion vermutlich durch eine ausreichenden Vitamin D Versorgung beeinflusst werden, bleiben die konkreten Mechanismen der vermutlich weitreichenden immunmodulatorischen Wirkungen bis heute allerdings weiterhin unklar (Chun *et al.*, 2014; Chirumbolo *et al.*, 2017; Medrano *et al.*, 2018; Martens *et al.*, 2020). Eine genauere Analyse immunregulatorischer Zellpopulationen, der lytischen Potenz zytotoxischer Immunzellen und der Expression verschiedener Immuncheckpoint Moleküle wird von unserer Arbeitsgruppe unter Berücksichtigung der Vitamin D Versorgung der jeweiligen Patienten aktuell durchgeführt. Da ebenso eine direkte Beeinflussung des Karzinoms vorstellbar ist, werden zudem potenzielle Auswirkungen der Vitamin D Versorgung auf HNSCC-Zellen von uns aktuell näher untersucht, wobei erste Hinweise auf eine antiproliferative und migrationsinhibierende Wirkung von Vitamin D in der Literatur bereits beschrieben werden konnten (Fathi *et al.*, 2019).

Insgesamt konnte somit im Rahmen dieser Arbeit die Vitamin D Versorgung als Biomarker für die Diagnostik von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region identifiziert werden, wobei eine Analyse hierbei anhand von minimal-invasiv entnommenen Blutproben erfolgte. Aufgrund der hohen Prävalenz eines Vitamin D Mangels bei HNSCC-Patienten und einer vermutlich damit einhergehenden, verstärkten Immunevasion des Tumors scheint eine Substitution von Vitamin D folglich einen vielversprechenden Ausgangspunkt für personalisierte Therapiekonzepte, besonders auch vor dem Hintergrund von Immuntherapien, darzustellen.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Allgemeine Materialien und Bezugsquellen

#### 4.1.1 Chemikalien, Kits, Puffer und Lösungen

<b>Vertrieb</b>	<b>Artikel</b>
Agilent Technologies Germany; Waldbronn	Dako EpiTop Demaskierungslösung, S1699; Dako REAL Detektionssystem, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse; K5005
CSL Behring; Marburg	Humanes Serumalbumin, PZN: 03572808
DiaSorin Deutschland; Dietzenbach	LIAISON 25-OH-Vitamin D TOTAL Assay, #310600
Fisher Scientific; Schwerte	Thermo Scientific PageRuler vorgefärbte Proteinleiter 10 – 180 kDa, #26616
Heyl Chemisch-pharmazeutische Fabrik; Berlin	D <sub>3</sub> -Vicotrat Vitamin D <sub>3</sub> Injektions-Lösung 100 000 IE, PZN 679049
Hologic Deutschland; Wiesbaden	ThinPrep Bluing Lösung, #70793; ThinPrep EA Lösung, #70782; ThinPrep Nuclear Stain, #70780; ThinPrep Orange G Lösung, #70781; ThinPrep Rinse Lösung, #70780; PreservCyt Lösung, #0234004
Lonza Group; Basel, Schweiz	X-Vivo 15 serumfreies Zellkultur-Medium; #04-418Q
Macherey-Nagel; Düren	NucleoBond PC 100 DNA-Extraktionskits, #740573

Merck; Darmstadt

Fetales Kälberserum, F7524;  
Sigma-Aldrich 2-Mercaptoethanol,  
#M3148;  
Sigma-Aldrich bovines Serum-  
albumin, #A9418;  
Sigma-Aldrich Chloroform, #C7559;  
Sigma-Aldrich DAPI-Lösung  
(1 mg/ml), #MBD0015;  
Sigma-Aldrich Dinatriumhydrogen-  
phosphat, #S0876;  
Sigma-Aldrich DMSO, #D2650;  
Sigma-Aldrich EDTA, #EDS;  
Sigma-Aldrich Entellan,  
#1079600500;  
Sigma-Aldrich Essigsäure, #A6283;  
Sigma-Aldrich Formamid, #F9037;  
Sigma-Aldrich Giemsalösung,  
#GS500;  
Sigma-Aldrich Glycerin, #G5516;  
Sigma-Aldrich Hämatoxylinlösung,  
#MHS32;  
Sigma-Aldrich Kaliumchlorid,  
#P9541;  
Sigma-Aldrich Kaliumdihydrogen-  
phosphat, #P9791;  
Sigma-Aldrich Magnesiumchlorid,  
#M8266;  
Sigma-Aldrich Methanol, #34860;  
Sigma-Aldrich Natriumacetat,  
#S2889;  
Sigma-Aldrich Natriumdihydrogen-  
phosphat, #S0751;  
Sigma-Aldrich Natriumhydroxid,  
#S8045;

	Sigma-Aldrich Paraformaldehyd, #158127;
	Sigma-Aldrich Proteinase K, #P2308;
	Sigma-Aldrich Salzsäure, #H1758;
	Sigma-Aldrich Tri-Natriumcitrat- Dihydrat, #S1804;
	Sigma-Aldrich Tris-Base, #T1503;
	Sigma-Aldrich Triton X-100, #X100;
	Sigma-Aldrich Zitronensäure- Monohydrat, #C1909;
	Supelco Ethanol 100%, #1.07017;
	Vigantolekten Vitamin D <sub>3</sub> Tabletten 1000 IE, PZN 10544155
Mibe Arzneimittel; Brehna	Dekristol Vitamin D <sub>3</sub> Kapseln 20 000 IE, PZN 4007393
Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach	NK-Zell Isolationskit, #130-092-657
Otto Fischar; Saarbrücken	Formaldehyd-Lösung 4,0%, #27279; Xylol, #304
Qiagen; Hilden	Allstars Negativ Kontroll siRNA, #1027281; HP Custom kundenspezifische siRNAs, #1027423; HiPerFect Transfektionsreagenz, #301705; QIAamp Blood DNA Extraktions- Kit, #51104;
Roche Diagnostics; Mannheim	Biotin-Nick Translationsmix, #11745824910; CINtec Plus Zytologie Kit, #0688956500; cobas Albumin Gen.2 Assay, #05166861;

	cobas Calcium Gen.2 Assay, #05168449;
	Digoxigenin-Nick Translationsmix, #11745816910;
	Humane Cot-1 DNA, #11581074001;
	Pepsin, #10108057001;
	Ribonuklease H, #10786357001;
	X-tremeGENE HP Transfektions- reagenz, #06366236001;
	Zytotoxizitäts Detektions Kit Plus (LDH), #4744926001
Serva Electrophoresis; Heidelberg	Acrylamid, #10677;
	Agar, #11396;
	AMPS, #13376;
	Bisacrylamid, #29197;
	Bromphenolblau, #15375;
	Ethanol 96%, #11096;
	Glycin, #23391;
	Isopropanol, #39559;
	Natriumchlorid, #39781;
	SDS, #20765;
	TEMED, #35930;
	Tween 20, #39796
Thermo Fisher Scientific; Karlsruhe	Invitrogen AlexaFluor 488 Phalloidin, #A12379;
	Invitrogen BioPrime DNA Markierungssystem, #18094011;
	Invitrogen Trypanblau (0,4%) Färbemittel, #T10282;
	Gibco DMEM GlutaMAX Zellkulturmedium, #31966;
	Gibco Opti-MEM serumreduziertes Zellkulturmedium, #31985;

	Gibco PBS pH 7,2 Pufferlösung für die Zellkultur, #20012;
	Gibco Penicillin (10 000 units/ml)
	Streptomycin (10 000 µg/ml)
	100x Antibiotikalösung, #15140;
	Gibco Trypsin/EDTA (0,05%)
	Dissoziationslösung, #25300
TSI; Zeven	Sucofin Magermilchpulver, #4502110715
Vector Laboratories; Burlingame, CA, USA	Streptavidin-Fluorescein, #SA-5001;
	Vectashield Fluoreszenz-Eindeck- medium, #H-1000;
	Vectashield Fluoreszenz-Eindeck- medium mit DAPI, #H-1200

#### 4.1.2 Geräte, zugehörige Software und Verbrauchsmaterialien

##### Vertrieb

ACEA Biosciences; San Diego, CA, USA

Beckman Coulter; Krefeld

Bemis; Neenah, WI, USA

Bio-Flow Technik; Meckenheim

Bio-Rad Laboratories; Feldkirchen

Cooper Surgical; Trumbull, CT, USA

Corning; Corning, NY, USA

DWK Life Sciences; Wertheim

Eppendorf; Hamburg

Fisher Scientific; Schwerte

Fröbel Labortechnik; Lindau

GE Healthcare Europe; Freiburg

##### Artikel

E-Plate 16 & 96; RTCA CIM Plate 16;

RTCA Software Version 2.1.0,

xCelligence RTCA SP & DP

Rotor JA-10, Zentrifuge GS6-KR

Parafilm M

Gelaire TC72 Sterilbank

Trans-Blot Zelle mit

Plattenelektroden, #1703939

Medscand Cytobrush Plus GT

Abstrichbürste, #C0104

FluoroBlok Migrationseinsätze,

8 µm Porengröße, #351152;

24-well FluoroBlok Zellkultur

Begleitplatten, #353504

Duran Laborglasflaschen GL45

Kühlzentrifuge 5402, 5415R, 5840R;

Pipette Research Pro 4860;

Reaktionsgefäß 1,5 ml 3810X;

Thermomixer 5436;

Thermomixer Comfort 5355

Thermo Scientific Heracell

Brutschrank 150i, #51026281;

Thermo Scientific Objektträger

SuperFrost Plus, #J1800AMNZ;

Systec Autoklav DX-65;

Whatman Filterpapiere

Rocky Wipptisch

MultiTemp II Durchlaufkühler;

Netzteile EPS 200, 600, 601, 3500;

ImageQuant Software TL 1D 5.1 & 7.0,

Typhoon Trio 9410

Gilson; Middleton, WI, USA	Pipetman P2, P20, P200, P1000, P5000, P8x300, P8x200M, P8x1200M
GraphPad Software; San Diego, CA, USA	Prism Version 8.4.3, Statistiksoftware
Greiner Bio-One; Frickenhausen	Einfrierröhrchen 2 ml, #122279; Zellkulturflaschen Cellstar 250 ml (75 cm <sup>2</sup> ), #658175 & 550 ml (175 cm <sup>2</sup> ), #660175; Zellkulturschale Cellstar 6 cm Durchmesser, #628160
Heraeus; Hanau	Trockenschrank T12
Hirschmann Laborgeräte; Eberstadt	Pipetus Pipettierhilfe, #9907200
Hologic Deutschland; Wiesbaden	ThinPrep Krebsabstrich Filter und Objektträger, #70137; ThinPrep Prozessor TP 2000
IKA Werke; Staufen	Combimag RCT Magnetrührer
Jenoptik; Jena	ProgRes MF Digitalkamera
KGW-Isotherm; Karlsruhe	Dewargefäß
Lauda-GFL Labortechnik; Lauda-Königshofen	Schüttelwasserbad 1083
Leica Mikrosysteme; Wetzlar	SM 200R Schlittenmikrotom; RM 2235 Rotationsmikrotom
Medax; Neumünster	WB24 Paraffinstreckbad
Merck; Darmstadt	Immobilon-P PVDF Transfer- membran, 0,45 µm, #IPVH00010; Millipore Reinstwasseranlage MilliQ; Sigma-Aldrich Glaskugeln 1 mm, #Z250473
Metasystems; Altlußheim	Isis FISH und Fluoreszenz- mikroskopie Software Version 5.7.2
Nikon; Düsseldorf	Eclipse TE2000S Fluoreszenz- Mikroskop; Fluoreszenzfilter (Exzitation, dichroitische Trennung, Emission): DAPI: 340 – 380, 400, 435 – 485 nm FITC: 465 – 495, 505, 515 – 555 nm

	<p>TRITC: 528 – 552, 565, 582 – 627 nm          TexR: 540 – 580, 595, 600 – 660 nm;          PlanFluor Objektiv 10x/0,3 &amp;          PlanFluor Objektiv ELWD 20x/0,45 &amp;          PlanFluor Objektiv 60x Oil/1,25;          DS-5Mc Digitalkamera;          NIS-Elements AR          Software Version 3.22.14</p>
Olympus Europa; Hamburg	<p>BX61 Fluoreszenzmikroskop;          Fluoreszenzfilter (Exzitation,          dichroitische Trennung, Emission):          DAPI: 360 – 370, 400, ab 420 nm          FITC: 470 – 490, 500, ab 520 nm          Cy3: 510 – 560, 565, 575 – 640 nm;          UPlanFl Objektiv 10x/0,3 &amp;          UPlanFl Objektiv 40x/0,75 Ph2 &amp;          UPlan Fl Objektiv 60x/1,25 Oil &amp;          UPlan Fl Objektiv 100x/1,30 Oil;          SC30 Digitalkamera;          cellSens Standard Software          Version 1.12</p>
Panasonic; Hamburg	Mikrowelle
PerkinElmer; Rodgau	<p>Wallac Victor 2 Spektrometer,          MultiCalc Software, #1420</p>
R. Langenbrinck; Emmendingen	<p>Deckgläser, 24 x 60 mm, Stärke          0,13 - 0,16 mm, #01-2460/1</p>
Roche Diagnostics; Mannheim	<p>LightCycler 2.0 Thermocycler,          Software 4.1, #03531414001</p>
Sarstedt; Nümbrecht	<p>Pipettenspitzen 10, 200, 300, 1000,          5000 µl; Schraubröhre 15 &amp; 50 ml</p>
Sartorius; Göttingen	<p>BP61, BP4100, ED5201, LA420          Feinwaagen</p>
Scientific Industries; Bohemia, NY, USA	<p>Vortex Genie 2 Vibrationsmischer,          #SI-0256</p>

Tefal; Rumilly, Frankreich	Reiskocher, #RK1001
Thermo Fisher Scientific; Karlsruhe	Countess, automatisiertes Zellzählgerät, #C10227; Countess Zellzählungs-Kammer- Objektträger, #C10228; MSC-Advantage Sicherheits- Werkbank, #51025411; Nalgene Rapidflow Flaschenaufsatz- filter, #295-3345; NanoDrop ND-1000 Spectrophoto- meter, Software Version 3.8.1; Varistain 24-4 Shandon Färbeautomat, #74200001
VWR International; Darmstadt	Pasteurpipetten aus Glas, 150 ml, #612-1701
Werkstatt Biochemie 1; Göttingen	Elektrophoresekammer (Eigenbau)
Werkstatt Medizinische Biochemie; Homburg	Elektrophoresekammer (Eigenbau)
Wenzel Glaserei; München	Glasplatten für Gelelektrophorese
Xylem Analytics; Weilheim	WTW pH-Meter pH573
Zeiss; Jena	Axiolab Hellfeldmikroskop
Ziegra Eismaschinen; Isernhagen	Eismaschine

## **4.2 Von Patienten entnommenes Untersuchungsmaterial und grundlegende Analysen**

### **4.2.1 Patientenmaterial**

Für die Analysen im Rahmen dieser Arbeit wurden Tumorgewebe- und Blutproben, sowie Abstrichmaterial von Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region, Abstrichmaterial von Patientinnen mit dysplastischen Läsionen der Zervix, sowie Blutproben von gesunden Kontrollpatienten verwendet. Eine nähere Beschreibung der jeweils analysierten Patientenkollektive befindet sich in den betreffenden Abschnitten des Ergebnisteils in Kapitel 2. Alle eingeschlossenen Patientinnen, Patienten und Kontrollprobanden haben nach ausführlicher, medizinischer Beratung und Aufklärung schriftlich eingewilligt an der jeweiligen Studie teilzunehmen. Für alle Untersuchungen lagen bereits zu Beginn positive Ethikvoten der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes zur Nutzung des Patientenmaterials und der klinischen Daten unter den Kennziffern 207/10, 218/10 und 227/12 vor.

### **4.2.2 Klassifizierung, Staging und histopathologische Begutachtung von HNSCCs**

Aufgrund eines Rekrutierungszeitraumes der untersuchten HNSCC-Patienten zwischen den Jahren 2013 bis einschließlich 2017, erfolgte eine TNM und UICC Klassifizierung, sowie die Beurteilung des Differenzierungsgrades der Tumoren anhand der für diesen Zeitraum gültigen, dritten Ausgabe der von der Weltgesundheitsorganisation herausgegebenen Klassifizierung von Kopf-Hals-Karzinomen (World Health Organization & International Agency for Research on Cancer, 2005). Alle untersuchten Tumorproben wurden in der histopathologischen Begutachtung von Fachärzten des Institutes für Allgemeine und Spezielle Pathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes als Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region klassifiziert und hinsichtlich ihres histologischen Differenzierungsgrades befundet.

#### **4.2.3 Vitamin D Substitution von HNSCC-Patienten**

Eine Vitamin D Substitution von elf HNSCC-Patienten mit nachgewiesenem Vitamin D Mangel (25-OH-Vitamin D Serumspiegel < 10 ng/ml) erfolgte im Rahmen der Messungen der zytotoxischen Aktivität ihrer Natürlicher Killerzellen (siehe Ergebnisse Kapitel 2.3.3). Je nach individueller Möglichkeit der oralen Medikamenteneinnahme erfolgte die Substitution entweder enteral (Vigantoletten 1000 IE einmal täglich oral oder durch eine PEG-Sonde, bzw. Dekristol 20 000 IE einmal wöchentlich oral) oder parenteral durch intramuskuläre Infusion (D<sub>3</sub>-Vicotrat 100 000 IE einmal monatlich). Die Vitamin D Substitution erfolgte über einen Zeitraum von drei Monaten; vor und nach Substitution wurden jeweils die 25-OH-Vitamin D Serumspiegel bestimmt.

#### **4.2.4 Flüssigkeitsbasierte Abstrichzytologie**

Bürstenabstriche zur Gewinnung von zytologischem Material wurde mithilfe der Medscand Cytobrush Plus GT Abstrichbürste im Rahmen einer ambulanten Untersuchung der Patienten, oder während einer Panendoskopie angefertigt. Hierzu wurden die suspekten Schleimhautareale mit der Abstrichbürste mehrfach und in verschiedenen Richtungen abgestrichen. Bei soliden Tumoren wurde hierbei das Zentrum und bei ulzerierenden Tumoren der Randbereich der Läsion gewählt. Anschließend wurden die Bürsten direkt in mit PreservCyt Lösung gefüllten ThinPrep Gefäßen durch mehrfaches Schütteln ausgewaschen und abschließend verworfen. Die erhaltene ThinPrep Zellsuspension wurde nachfolgend lichtgeschützt und bei 4°C gelagert. Eine Anfertigung der zytologischen Präparate erfolgte bei allen untersuchten Patienten im Regelfall innerhalb von vier Monaten, maximal jedoch 18 Monate nach Probengewinnung. Die Anfertigung der Präparate erfolgte mittels des halbautomatisierten ThinPrep Prozessors TP 2000, unter Verwendung der zugehörigen ThinPrep Filter und Objektträger, nach den Angaben des Herstellers, wobei das Programm zur Herstellung zytologischer Präparate von Abstrichproben der Zervix verwendet wurde. Alle zytologischen Präparate wurden maximal 24 Stunden vor Durchführung der nachfolgenden Analysen angefertigt.

#### **4.2.4.1 Färbung zytologischer Präparate nach Papanicolaou**

Eine Färbung der abstrichzytologischen Präparate nach Papanicolaou (PAP) diene der Darstellung der Zellmorphologie und ermöglichte somit eine mikroskopische Beurteilung des jeweiligen Abstrichmaterials und einer gegebenenfalls vorliegenden Malignität. Die PAP Färbung basiert dabei auf einem schrittweisen, dreistufigen Färbeprozess. Nach Überführung der Präparate durch eine absteigende Alkoholreihe in ein wässriges Milieu werden die Zellkerne durch eine Hämatoxylinlösung, in diesem Falle den ThinPrep Nuclear Stain angefärbt. Anschließend folgen Waschschrte mit destilliertem Wasser und der ThinPrep Rinse Lösung. Die Hämatoxylinfärbung wird nachfolgend durch kurze Inkubation in saurem Milieu, hier der ThinPrep Bluing Lösung, differenziert. Anschließend folgt ein Waschschrte in destilliertem Wasser und die Entwässerung der Präparate durch eine aufsteigende Alkoholreihe. Das Zytoplasma wird dann, unter anderem durch die Färbung von Keratinen, mit einer (ThinPrep) Orange G Lösung und, nach weiteren alkoholischen Waschschrten, schließlich durch eine kombinierte Eosin-Azurblau Färbung (hier: ThinPrep EA Lösung) dargestellt. Nach weiteren alkoholischen Waschschrten werden die Präparate abschließend zur mikroskopischen Beurteilung mithilfe von Xylol, dem Eindeckmedium Entellan und einem Deckglas eingedeckt. Eine Lagerung der nach einigen Tagen ausgehärteten Präparate erfolgte lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Die Präparate wurden mithilfe des Olympus BX61 Mikroskops und der zugehörigen Software ausgewertet. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die PAP Färbung mittels des halbautomatisierten Shandon Varistain 24-4 Färbeautomaten und eines von der Firma Hologic zur Verwendung mit den ThinPrep Lösungen vorgegebenen Standardfärbeprotokolls.

#### **4.2.4.2 Zytologische Diagnostik und Beurteilung der Zelldifferenzierung**

Die zytologische Diagnostik von Abstrichpräparaten dysplastischer Läsionen der Zervix erfolgte durch zwei langjährig erfahrene Zytologieassistentinnen der Klinik für Frauenheilkunde, Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin des Universitätsklinikums des Saarlandes anhand der Münchner Nomenklatur III (Griesser *et al.*, 2013). Die Abstrichproben waren an dieser Klinik im Rahmen der Routinediagnostik des nationalen Projektes zur Früherkennung des Zervixkarzinoms zwischen Januar 2012 und

Januar 2013 gesammelt worden. Die Probenentnahme und Anfertigung zytologischer Präparate erfolgte mithilfe der Medscand Cytobrush Plus GT Abstrichbürste und dem zuvor beschriebenen ThinPrep System. Für alle auffälligen Schleimhautdysplasien lag eine gesicherte Diagnose der histopathologischen Begutachtung von Inzisionsbiopsien vor. Keine der untersuchten Patientinnen wies zum Zeitpunkt der Probenentnahme eine Zervizitis bzw. Kolpitis auf, oder war zuvor aufgrund dysplastischer Läsionen der Zervix bereits therapeutisch behandelt worden (Linxweiler *et al.*, 2016).

Die zytologische Diagnostik von HNSCC-Abstrichpräparaten erfolgte zusammen mit der langjährig erfahrenen Zytologieassistentin Barbara Linxweiler der Klinik für Frauenheilkunde, Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin des Universitätsklinikums des Saarlandes. Da in der Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde bisher ein einheitlicher Standard zur zytologischen Beurteilung von Gewebeabstrichen fehlt, erfolgte die Beurteilung der Zellmorphologie in Anlehnung an die Münchner Nomenklatur III (siehe auch Diskussion Kapitel 3.1.1). Zusätzlich wurde zur zytologischen Bestimmung des Differenzierungsgrades der enthaltenen Karzinomzellen deren Chromatindichte und -struktur, eine mögliche Verhornung der Zellen und ihre Pleomorphie mikroskopisch bewertet. Die Charakterisierung erfolgte hierbei in Anlehnung an die für die histopathologische Diagnostik von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region bereits langjährig etablierten, morphologischen Malignitätskriterien (World Health Organization & International Agency for Research on Cancer, 2005; Agaimy & Weichert, 2016). Äquivalent zu den histologischen Graduierungsstufen G1, G2 und G3 wurden die zytologischen Differenzierungsgrade in gut, mittel und schlecht eingestuft. Die zytologische Bewertung fand ohne vorherige Kenntnis der histopathologischen Beurteilung des jeweiligen Differenzierungsgrades statt.

#### **4.2.5 Blutproben und darauf basierende Untersuchungen**

Blutproben von HNSCC-Patienten und gesunden Kontrollpatienten wurden routinemäßig im Rahmen einer ambulanten Untersuchung, bei HNSCC-Patienten gegebenenfalls vor einer Panendoskopie, minimal-invasiv entnommen. Kein eingeschlossener Patient war zum Zeitpunkt der Probenentnahme oder in den vorausgehenden fünf Jahren aufgrund eines Karzinoms der Kopf-Hals-Region bereits therapeutisch oder palliativ behandelt worden. Die Entnahme der Blutproben fand maximal zwölf Wochen vor oder nach

Feststellung der Erstdiagnose statt. Die Untersuchung aller Blutproben erfolgte durch das Zentrallabor des Universitätsklinikums des Saarlandes. Die 25-OH-Vitamin D Serumspiegel der HNSCC- und Kontrollpatienten wurden basierend auf der CLIA Chemolumineszenz Technologie mithilfe des LIAISON 25-OH-Vitamin D TOTAL Immunassays bestimmt. Die Serumalbumin- und Serumcalciumspiegel der HNSCC-Patienten wurden photometrisch durch Bromkresolgrün mithilfe des cobas Ablumin Gen.2 Assays bzw. durch 5-Nitro-5'-Methyl-BAPTA und EDTA mithilfe des cobas Calcium Gen.2 Assays bestimmt.

#### **4.2.6 Invasiv gewonnene Tumorgewebeproben**

Für die Untersuchung invasiv gewonnenen Materials wurden Formalin-fixierte und Paraffin-eingebettete Gewebeproben (FFPE) des jeweiligen Primärtumors oder der zugehörigen Lymphknotenmetastasen verwendet. Diese Behandlung dient der Konservierung des Gewebes der betreffenden Proben und ermöglicht seine histologische Begutachtung und eine Zugänglichkeit für möglicherweise nachfolgende Analysen. Die verwendeten FFPE-Proben entstammten dem Archiv des Institutes für Allgemeine und Spezielle Pathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes und wurden zuvor jeweils durch Fachärzte histopathologisch klassifiziert. Zur Anfertigung von Schnittpräparaten der FFPE-Proben wurden mithilfe des SM 200R Schlitten- oder des RM 2235 Rotationsmikrotoms zuerst drei Schnitte von jeweils 10 µm Dicke abgetragen und verworfen und anschließend Schnitte von 3 bis 4 µm Dicke angefertigt. Zur Ausstreckung der Paraffinschnitte wurden diese in ein lauwarmes Wasserbad überführt und anschließend auf Adhäsionsobjektträger aufgebracht. Alle Schnittpräparate wurden maximal vier Monate vor Durchführung der nachfolgenden Analysen angefertigt. Vor Durchführung aller Untersuchungen erfolgte über Nacht eine Trocknung der Präparate bei 37°C im Wärmeschrank.

#### **4.2.6.1 Hämatoxylinfärbung von FFPE-Schnittpräparaten**

Zur mikroskopischen Beurteilung der FFPE-Schnittpräparate erfolgte eine Darstellung der Zell- und Gewebestrukturen durch eine alkoholfreie Hämatoxylinlösung nach Mayer. Hierzu wurden die Präparate durch Einstellen in Xylol 15 Minuten lang entparaffiniert und anschließend dreimal in Xylol gewaschen. Nach Überführung der Präparate in ein wässriges Milieu durch eine absteigende Alkoholreihe und mehrfaches Waschen mit destilliertem Wasser wurden die Präparate für sieben Minuten in der Hämatoxylinlösung angefärbt. Anschließend wurde die Färbung durch zehninütiges Spülen mit kaltem Leitungswasser differenziert. Mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Präparate nachfolgend entwässert und mithilfe von Xylol, dem Eindeckmedium Entellan und einem Deckglas eingedeckt. Eine Lagerung der nach einigen Tagen ausgehärteten Präparate erfolgte lichtgeschützt bei Raumtemperatur.

## 4.3 Proteinbiochemische Methoden

### 4.3.1 Antikörper

In Tabelle 7 sind nähere Details und Beschreibungen der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten primären und sekundären Antikörper zusammengefasst.

**Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Antikörper, unter Angabe der eingesetzten Verdünnung und der Herkunft.** CGH: komparative genomische Hybridisierung; FISH: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung; ICC: Immunzytochemie; ICF: Immunzytofluoreszenz; IHC: Immunhistochemie; WB: Western Blot

Antikörper	Typus; Spezies	Herkunft	Verdünnung		
			Zytologie	IHC	WB
anti- $\beta$ -Aktin	Monoklonal, IgG1, Klon AC-15; Maus	Sigma-Aldrich, #A5441			1:5000
anti-CD3	Monoklonal, IgG, Klon SP7; Kaninchen	Thermo Fisher, #RM-9107		1:300	
anti-CD4	Monoklonal, IgG1, Klon 1F6; Maus	abcam, Cambridge, UK, #ab846		1:40	
anti-CD11c	Monoklonal, IgG, Klon EP1347Y; Kaninchen	abcam, Cambridge, UK, #ab52632		1:100	
anti-CD56	Monoklonal, IgG1, Klon 123C3; Maus	Agilent, Dako #M7304		1:50	
anti-CD68	Monoklonal, IgG1, Klon KP1; Maus	abcam, Cambridge, UK, #ab955		1:200	
anti-CD163	Polyklonal, IgG, affinitätsgereinigt; Kaninchen	abcam, Cambridge, UK, #ab87099		1:16 000	
anti-Cyclin D1	Monoklonal, IgG, Klon SP4; Kaninchen	abcam, Cambridge, UK, #ab16663		1:150	
anti-E-Cadherin	Polyklonal, affinitätsgereinigt; Kaninchen	Cell Signaling Technology Europe, Frankfurt am Main, #4065			1:1000
anti-GAPDH	Polyklonal; Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, #sc-25778			1:1000
anti-pRB	Monoklonal, IgG1, Klon 1F8; Maus	abcam, Cambridge, UK, #ab81701		1:2500	

Antikörper	Typus; Spezies	Herkunft	Verdünnung		
			Zytologie	IHC	WB
anti-SEC62	Polyklonal; Kaninchen	Prof. Martin Jung, Medizinische			1:1000
anti-SEC62 (affinitäts- gereinigt)	Polyklonal, affinitätsgereinigt; Kaninchen	Biochemie, Universität des Saarlandes	1:100 ICF 1:400 ICC	1:400	
anti-Vimentin	Monoklonal, IgG1, Klon V9, Cy3- Konjugat; Maus	Sigma-Aldrich, #9080	1:100 ICF		
anti-Vimentin	Monoklonal, IgG1, Klon V9; Maus	Agilent, Dako #M0725			1:1000
Cetuximab (anti-EGFR, Erbix)	Monoklonal, IgG1, chimär	Merck Healthcare; Darmstadt, PZN 00493528	Verwendung bei der Bestimmung der zytotoxischen Aktivität Natürlicher Killerzellen (Kapitel 2.3.3), Konzentrationen wie angegeben		
anti-Kaninchen	Polyklonal, IgG, Cy5-Konjugat; Ziege	GE Healthcare Europe #PA45001			1:5000
anti-Kaninchen	Polyklonal, IgG, Fluorescein- Konjugat; Ziege	Dianova, Hamburg #DAB-87693	1:100 ICF		
anti-Digoxigenin	Polyklonal, IgG, aufgereinigtes Fab- Fragment, Rhodamin-Konjugat; Schaf	Roche Diagnostics #11207750910	1:20 CGH 1:200 FISH		
anti-Maus	Polyklonal, IgG, Cy3-Konjugat; Ziege	GE Healthcare Europe #PA43009			1:5000

#### 4.3.2 Raue Mikrosomen

Vesikuläre Partikel und Fragmente des Rauhen Endoplasmatischen Retikulums werden als Raue Mikrosomen (RM) bezeichnet. Typischerweise entsprechen sie größtenteils der ursprünglichen, biologischen Zusammensetzung des Organells und können daher zum Beispiel bei der immunologischen Detektion von ER-Proteinen mittels des Western Blot Verfahrens als Positivkontrolle dienen. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Rauhen Mikrosomen wurden von Prof. Martin Jung (Institut für Medizinische Biochemie der Universität des Saarlandes) nach etablierten Protokollen aus Hundepankreas gewonnen (Walter & Blobel, 1983; Watts *et al.*, 1983). Bei allen hier beschriebenen Western Blot Experimenten wurden Raue Mikrosomen in einer Konzentration von zwei Membranäquivalenten (Eq) eingesetzt. Ein Membranäquivalent ist dabei als ein

Mikroliter einer Suspension Rauer Mikrosomen mit einem photometrischen Extinktionswert von 50 bei einer Wellenlänge von 280 nm definiert.

### 4.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteingemischen nach Molekülgröße wurde eine denaturierende, diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) nach Laemmli genutzt (Laemmli, 1970). Dabei wurde ein vertikales Gelsystem mit Ausmaßen von 14 x 11x 0,1 cm verwendet, welches sich aus Sammel- und Trenngel zusammensetzt. Die genaue Zusammensetzung der verwendeten Gele ist in Tabelle 8 aufgeführt. Im Gelsystem diente SDS-Elektrophoresepuffer als Laufpuffer. Die Elektrophorese wurde für drei Stunden bei einer Spannung von 40 mA oder über Nacht bei 5 mA durchgeführt. Zur Vorbereitung der jeweils zu analysierenden Proteingemische wurden diese mit SDS-Probenpuffer versehen, für 10 Minuten bei 65°C erhitzt und anschließend für 30 Sekunden bei 14 000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Bei der Analyse von Lysaten kultivierter Zellen wurde jeweils ein Probenvolumen aufgetragen, welches einer Gesamtzahl von 225 000 Zellen entsprach. Die Molekülmasse (Molekulargewicht, MW) der aufgetragenen Proteingemische wurde jeweils durch einen vorgefärbten Proteinstandard analysiert (PageRuler 10 – 180 kDa).

#### SDS-Probenpuffer

60 mM Tris-HCl, pH 6,8  
 10% (v/v) Glycerin  
 5% (w/v) 2-Mercaptoethanol  
 2% (w/v) SDS  
 0,01% (w/v) Bromphenolblau

#### SDS-Elektrophoresepuffer

384 mM Glycin  
 50 mM Tris  
 0,1% (w/v) SDS  
 in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

**Tabelle 8: Zusammensetzung der in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendeten Gele.** Die jeweilige Acrylamidkonzentration ist in Klammern angegeben.

Lösung	Sammelgel (5%)	Trenngel (12,5%)
40% (w/v) Acrylamid	0,9 ml	4,7 ml
2% (w/v) Bisacrylamid	0,2 ml	1,25 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	5 ml	2,9 ml
1 M Tris-HCl, pH 6,8	0,9 ml	/
1,875 M Tris-HCl, pH 8,8	/	6 ml
10% (w/v) SDS	72 µl	150 µl
TEMED	10,5 µl	5 µl
20% (w/v) AMPS	67,5 µl	45 µl

#### 4.3.4 Western Blot

Zur Analyse der in der SDS-Page aufgetrennten Proteingemische wurden diese mittels des Western Blot Verfahrens auf eine PVDF-Membran mit einer Porengröße von 0,45 µm transferiert (Moritz, 2020). Eine Aktivierung der PVDF-Membranen erfolgte durch Inkubation in 100%igem Methanol für mindestens 30 Sekunden und mehrfaches Waschen in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>. Nachfolgend wurden die Membran, mehrere Filterpapiere gleicher Größe und das SDS-Gel für mindestens fünf Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Der Proteintransfer fand anschließend unter Verwendung von Transferpuffer in der Trans-Blot Zelle mittels des sogenannten Nassblot Verfahrens für mindestens drei Stunden bei einer Spannung von 400 mA und einer Temperatur von 14°C statt.

#### Transferpuffer

96 mM Glycin

12,4 mM Tris

in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

#### 4.3.5 Detektion und Quantifizierung von Proteinen auf PVDF-Membranen

Eine immunologische Detektion einzelner Proteine der auf PVDF-Membranen übertragenen Proteingemische erfolgte jeweils mithilfe geeigneter primärer und sekundärer Antikörper (siehe Kapitel 4.3.1). Eine Blockade potenziell unspezifischer Bindungsstellen erfolgte durch Inkubation der Membran für mindestens 30 Minuten in Blockierlösung. Anschließend wurde die Membran in Antikörperlösung, welche den jeweiligen Primärantikörpern enthielt, über Nacht bei 4°C geschwenkt. Überschüssige Antikörperlösung und ungebundene Antikörper sollten nachfolgend durch viermaliges Waschen in TBS-T, für jeweils fünf Minuten bei Raumtemperatur, entfernt werden. Zur Detektion der Primärantikörper erfolgte dann eine lichtgeschützte Inkubation der Membran in Antikörperlösung, welche den jeweiligen Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörper enthielt, für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran zweimal in TBS-T und zweimal in TBS jeweils für fünf Minuten lichtgeschützt gewaschen und dann für mindestens 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet. Die Visualisierung erfolgte mithilfe des Typhoon Trio 9410 Systems. Hierbei wurde zur Detektion von Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpern der grüne Laser (532 nm Wellenlänge) und bei Cy5-Konjugaten der rote Laser (633 nm) für die Anregung der Fluorophore genutzt und jeweils die Emission bei einer Wellenlänge zwischen 565 und 595 nm bzw. 655 und 685 nm gemessen. Die Intensität der jeweiligen Signale wurde anschließend mithilfe der Software ImageQuant TL 1D in der Version 5.1 oder 7.0 quantifiziert, welche eine computerbasierte Analyse der Farbintensität pro Flächeneinheit ermöglicht (Densitometrie).

<b>TBS</b>	150 mM NaCl 50 mM Tris-HCl, pH 7,4 in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
<b>TBS-T</b>	0,05% (v/v) Tween 20 in TBS
<b>Blockierlösung</b>	5% (w/v) Magermilchpulver in TBS
<b>Antikörperlösung</b>	2,5% (w/v) Magermilchpulver in TBS

#### 4.3.6 CINtec Plus Färbung

Das mögliche Vorliegen einer potenziell karzinogenen HPV-Infektion wurde an abstrichzytologischen Präparaten durch die simultane Detektion der Proteine p16 und Ki67 mithilfe des CINtec Plus Kits der Firma Roche Diagnostics untersucht. Die Färbung basiert hierbei auf einem zweistufigen immunzytochemischen Färbeprozess und wurde nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Die Demaskierung potenziell verborgener Epitope erfolgte durch zehnmünütige Inkubation der Präparate in über 95°C warmer Demaskierungslösung in einem kochenden Wasserbad, was im Rahmen dieser Arbeit durch Inkubation in einem Reiskocher ermöglicht wurde. Nach Blockade potenziell unspezifischer Bindungsstellen wurden die Präparate mit einem Primärantikörpergemisch bei Raumtemperatur inkubiert. Dieses Gemisch enthält monoklonale Mausantikörper, welche gegen das humane Protein p16 (Klon E6H4) gerichtet sind und monoklonale Kaninchenantikörper gegen humanes Ki67 (Klon 274-11 AC3). Anschließend folgte eine Detektion der Primärantikörper mittels Peroxidase-, bzw. Phosphatase-gekoppelter Fab-Antikörperfragment-Polymere und eine Visualisierung der Antigen-Antikörperkomplexe durch Umwandlung der Chromogene DAB, bzw. Fast Red. Zwischen allen Inkubationsschritten wurden die Präparate dreimal für jeweils fünf Minuten mit dem im Kit enthaltenen Waschpuffer gewaschen. Zur Darstellung zytologischer Strukturen wurden die Präparate nachfolgend sieben Minuten mit einer alkoholfreien Hämatoxylinlösung nach Mayer gefärbt, eine Differenzierung der Färbung erfolgt durch zehnmünütiges Spülen mit kaltem Leitungswasser. Abschließend wurden die Präparate zuerst mit einem wässrigen Eindeckmedium und dann mithilfe von Xylol, dem Eindeckmedium Entellan und einem Deckglas eingedeckt. Eine Lagerung der nach einigen Tagen ausgehärteten Präparate erfolgte lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Jede Färbeserie umfasste zusätzlich die im Kit enthaltenen Negativ- und Positivkontrollen. Die Färbung von FFPE-Schnittpräparaten wurde anhand eines zur Immunzytochemie deckungsgleichen Protokolls durchgeführt. Alle Präparate wurden mithilfe des Olympus BX61 Mikroskops und der zugehörigen Software ausgewertet. Die Auswertung der Färbung wurde zusätzlich durch die langjährig erfahrene Zytologieassistentin Barbara Linxweiler der Klinik für Frauenheilkunde, Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin des Universitätsklinikums des Saarlandes unabhängig kontrolliert. Der Nachweis von mindestens einer, eindeutig doppelt immunreaktiven Epithelzelle wurde als positives Ergebnis der CINtec Plus Zytologie definiert.

#### 4.3.7 SEC62-Immunzytochemie

Die zelluläre Expression von *SEC62* wurde in abstrichzytologischen Präparaten durch eine immunzytochemische Färbung des Proteins SEC62 dargestellt und anschließend mithilfe eines Immunreaktiven Scores bewertet. Hierzu wurden die zytologischen Präparate zuerst für zehn Minuten in  $H_2O_{bidest}$  rehydratiert und dann in einer 4%igen, stabilisierten und gepufferten Formaldehydlösung (pH 7,2) für 15 Minuten fixiert. Die Demaskierung potenziell verborgener Epitope erfolgte durch dreißigminütige Inkubation der Präparate in Demaskierungslösung (Dako S1699) in einem kochenden Wasserbad, was im Rahmen dieser Arbeit durch Inkubation in einem Reiskocher ermöglicht wurde. Eine Blockade potenziell unspezifischer Bindungsstellen erfolgte durch Inkubation in Blockierlösung für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Nachfolgend wurden die Präparate für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Antikörperlösung, welche einen affinitätsgereinigten SEC62 Primärantikörper enthielt, inkubiert. Anschließend folgte eine Detektion und Visualisierung des Primärantikörpers mithilfe des Dako REAL Detektionssystems (K5005) nach den Vorgaben des Herstellers. Das System basiert dabei auf einem Nachweis der Primärantikörper mittels biotinylierter Sekundärantikörper und einer nachfolgenden Visualisierung der Antigen-Antikörperkomplexe durch alkalische-Phosphatase-gekoppelte Streptavidin-Konjugate und eine Umwandlung des Chromogens Fast Red. Zwischen allen Inkubationsschritten wurden die Präparate dreimal für jeweils fünf Minuten mit PBS gewaschen. Zur Darstellung zytologischer Strukturen wurden die Präparate nachfolgend sieben Minuten mit einer alkoholfreien Hämatoxylinlösung nach Mayer gefärbt, eine Differenzierung der Färbung erfolgt durch zehnminütiges Spülen mit kaltem Leitungswasser. Abschließend wurden die Präparate mithilfe von Xylol, dem Eindeckmedium Entellan und einem Deckglas eingedeckt. Eine Lagerung der nach einigen Tagen ausgehärteten Präparate erfolgte lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Jede Färbeserie umfasste zusätzlich geeignete Negativ- (abstrichzytologische Präparate unauffälliger Mundschleimhaut) und Positivkontrollen (abstrichzytologische Präparate der *SEC62* überexprimierenden Zelllinie UM-SCC1). Die Präparate wurden mithilfe des Olympus BX61 Mikroskops und der zugehörigen Software ausgewertet. Die Auswertung aller immunzytochemischer Färbungen erfolgte, in Bezug auf die klinische Diagnose des jeweils untersuchten Patienten, verblindet. Die Auswertung der Färbung wurde zusätzlich durch die langjährig erfahrene Zytologieassistentin Barbara Linxweiler der Klinik für Frauenheilkunde, Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin des

Universitätsklinikums des Saarlandes unabhängig kontrolliert. Es wurden nur immunreaktive Epithelzellen bewertet, welche morphologisch eindeutig Merkmale einer malignen Transformation aufwiesen. Die Auswertung der Färbung erfolgte anhand eines langjährig etablierten, semiquantitativen Immunreaktiven Scores (Remmele & Stegner, 1987). In diesem System wird zuerst die Intensität der Färbereaktion (0: keine Färbung; 1: schwach; 2: mäßig; 3: stark) und anschließend der prozentuale Anteil gefärbter Zellen bewertet (0: < 10%; 1: 10 – 50%; 2: 51 – 80%; 3: > 80%). Das Produkt beider Einzelwerte ergibt den Immunreaktiven Score (IRS), welcher somit Werte zwischen 0 und 12 annehmen kann.

<b>PBS</b> (pH 7,2 – 7,4)	137 mM NaCl
	10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	2,7 mM KCl
	1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
<b>Blockier- und Antikörperlösung</b>	3% (w/v) BSA in PBS

#### 4.3.8 Immunzytofluoreszenz

Die Proteine SEC62 und Vimentin wurden in abstrichzytologischen Präparaten durch eine Immunzytofluoreszenz Doppelfärbung simultan dargestellt und anschließend mithilfe eines modifizierten Immunreaktiven Scores bewertet. Hierzu wurden die zytologischen Präparate zuerst für zehn Minuten in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> rehydratiert. Die Demaskierung potenziell verborgener Epitope erfolgte durch sechzigminütige Inkubation der Präparate in Demaskierungslösung (Dako S1699) in einem kochenden Wasserbad, was im Rahmen dieser Arbeit durch Inkubation in einem Reiskocher ermöglicht wurde. Eine Blockade potenziell unspezifischer Bindungsstellen erfolgte durch Inkubation in Blockierlösung für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Nachfolgend wurden die Präparate für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit Antikörperlösung, welche die jeweiligen Primärantikörper enthielt, inkubiert. Anschließend folgte eine Detektion und Visualisierung der SEC62

Primärantikörper durch Inkubation der Präparate für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit Antikörperlösung, welche einen Fluorescein-gekoppelten Sekundärantikörper enthielt (Dianova, #DAB-87693). Der eingesetzte Vimentin Primärantikörper war bereits direkt an das Fluorophor Cy3 gekoppelt. Zwischen allen Inkubationsschritten wurden die Präparate dreimal für jeweils fünf Minuten mit PBS gewaschen. Abschließend wurden die Präparate mit Fluoreszenz-Eindeckmedium und einem Deckglas eingedeckt. Eine Lagerung der Präparate erfolgte lichtgeschützt bei 4°C. Die Präparate wurden mithilfe des Nikon Eclipse TE2000S Fluoreszenz-Mikroskops und der zugehörigen Software ausgewertet. Die Auswertung aller immunzytologischer Fluoreszenzfärbungen wurde durch sechs unabhängige Untersucher durchgeführt, welche in Bezug auf die klinische Diagnose des jeweils untersuchten Patienten und die Bewertung durch die weiteren Untersucher verblindet waren. Die Auswertung der Färbung erfolgt anhand eines modifizierten, Immunreaktiven Scores, welcher die Färbeintensität dysplastischer Zellen in Relation zu unauffälligen Zellen im selben Präparat setzt, wobei Werte von -1 bis +3 erreicht werden konnten (-1: geringere Färbeintensität in dysplastischen Zellen; 0: kein Unterschied; 1 – 3: schwach, mäßig bis stark erhöhte Färbeintensität in dysplastischen Zellen). Wurden keine dysplastischen Zellen im Präparat gefunden, wurde die Färbeintensität unauffälliger Zellen miteinander verglichen. Die Summe aller Einzelwerte der sechs Untersucher ergab den modifizierten Immunreaktiven Score (mIRS), welcher somit Werte zwischen -6 und 18 annehmen konnte. Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Immunzytofluoreszenz Analysen wurden von Dr. Maximilian Linxweiler, Mitarbeiter der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums des Saarlandes, durchgeführt (Linxweiler *et al.*, 2016).

<b>PBS</b> (pH 7,2 – 7,4)	137 mM NaCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2,7 mM KCl 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
<b>Blockierlösung</b>	3% (w/v) BSA in PBS
<b>Antikörperlösung</b>	0,1% (w/v) BSA in PBS

#### 4.3.9 Immunhistochemie

Zur Analyse ihrer zellulären Expression oder zur Identifikation verschiedener Immunzellpopulationen wurden diverse Proteine durch immunhistochemische Färbungen in FFPE-Schnittpräparaten dargestellt und anschließend mithilfe modifizierter Immunreaktiver Scores bewertet. Hierzu wurden die Präparate durch Einstellen in Xylol 15 Minuten lang entparaffiniert und anschließend dreimal in Xylol gewaschen. Nach Überführung der Präparate in ein wässriges Milieu, durch eine absteigende Alkoholreihe und mehrfaches Waschen mit destilliertem Wasser, erfolgte die Demaskierung potenziell verborgener Epitope durch Inkubation der Präparate in der jeweiligen Demaskierungslösung in einem kochenden Wasserbad, was im Rahmen dieser Arbeit durch Inkubation in einem Reiskocher ermöglicht wurde. Zur Demaskierung der Epitope der Proteine CD3, CD4, CD11c, CD56, CD68, CD163, Cyclin D1 und pRB wurden die jeweiligen Präparate für 20 Minuten in Tris-EDTA-Demaskierungslösung mit einem pH von 9,0 kochend inkubiert, zur Demaskierung der Epitope von SEC62 für 30 Minuten in Natriumcitrat-Demaskierungslösung mit einem pH von 6,0. Eine Blockade potenziell unspezifischer Bindungsstellen erfolgte durch anschließende Inkubation in Blockierlösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Nachfolgend wurden die Präparate für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit Antikörperlösung, welche den jeweiligen Primärantikörper enthielt, inkubiert. Anschließend folgte eine Detektion und Visualisierung des Primärantikörpers mithilfe des Dako REAL Detektionssystems (K5005) nach den Vorgaben des Herstellers. Das System basiert dabei auf einem Nachweis der Primärantikörper mittels biotinylierter Sekundärantikörper und einer nachfolgenden Visualisierung der Antigen-Antikörperkomplexe durch alkalische-Phosphatase-gekoppelte Streptavidin-Konjugate und eine Umwandlung des Chromogens Fast Red. Zwischen allen Inkubationsschritten wurden die Präparate dreimal für jeweils fünf Minuten mit PBS gewaschen. Zur Darstellung zytologischer Strukturen wurden die Präparate nachfolgend sieben Minuten mit einer alkoholfreien Hämatoxylinlösung nach Mayer gefärbt, eine Differenzierung der Färbung erfolgt durch zehnmütiges Spülen mit kaltem Leitungswasser. Mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Präparate nachfolgend entwässert und mithilfe von Xylol, dem Eindeckmedium Entellan und einem Deckglas eingedeckt. Eine Lagerung der nach einigen Tagen ausgehärteten Präparate erfolgte lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Jede Färbeserie umfasste zusätzlich geeignete Negativ- (Durchführung ohne Primärantikörper) und Positivkontrollen (FFPE-

Schnittpräparate von Tonsillen). Die Präparate wurden mithilfe des Olympus BX61 Mikroskops und der zugehörigen Software ausgewertet. Die Auswertung aller immunhistochemischer Färbungen erfolgte durch drei unabhängige Untersucher, welche in Bezug auf die klinische Diagnose des jeweils untersuchten Patienten und die Bewertung durch die weiteren Untersucher verblindet waren. Ein Untersucher war dabei jeweils ein Facharzt des Institutes für Allgemeine und Spezielle Pathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes.

Die Auswertung der immunhistochemischen SEC62-Färbungen erfolgte anhand eines modifizierten Immunreaktiven Scores (mIRS), da die Mehrzahl der analysierten Tumore bzw. Lymphknotenmetastasen innerhalb eines Präparates oft eine uneinheitliche Färbereaktion zeigten. Zunächst wurden hierzu zwei Areale innerhalb des Präparates identifiziert, welche repräsentativ für die hauptsächlichen Färbeintensitäten des Gesamtpräparates waren. Beide Areale wurden dann mit dem konventionellen, Immunreaktiven Scores nach Remmele und Stegner analysiert (Remmele & Stegner, 1987). In diesem System wird zuerst die Intensität der Färbereaktion (0: keine Färbung; 1: schwach; 2: mäßig; 3: stark) und anschließend der prozentuale Anteil gefärbter Zellen bewertet (0: < 10%; 1: 10 – 50%; 2: 51 – 80%; 3: > 80%). Das Produkt beider Einzelwerte ergibt den Immunreaktiven Score, welcher somit Werte zwischen 0 und 12 annehmen kann. Nachfolgend wurde die Summe der beiden einzeln bewerteten Areale gebildet, welche den vorläufigen mIRS darstellte - dieser konnte Werte zwischen 0 und 14 annehmen. Anschließend wurde zur Berechnung des finalen mIRS die Differenz zum vorläufigen mIRS einer parallel untersuchten Positivkontrolle gebildet ( $mIRS = \text{vorläufiger mIRS der Positivkontrolle} - mIRS \text{ des zu untersuchenden Falls}$ ). Der finale mIRS konnte somit Werte zwischen -14 und +14 annehmen (Bochen *et al.*, 2016). Die Auswertung des Infiltrationsprofils verschiedener Leukozyten erfolgte anhand eines modifizierten Immunreaktiven Scores, welcher auf dem konventionellen Immunreaktiven Score nach Remmele und Stegner basierte (Remmele & Stegner, 1987). In dem hier verwendeten System wurde zuerst die Stärke der Immunzellinfiltration (0: keine Infiltration; 1: < 25 %; 2: 25 – 50%; 3: > 50% des untersuchten Gewebes infiltriert) und anschließend der prozentuale Anteil gefärbter Leukozyten bewertet (1: < 30 %; 2: 30– 60%; 3: > 60%). Das Produkt beider Einzelwerte ergab den modifizierten Immunreaktiven Score (mIRS), welcher somit Werte zwischen 0 und 12 annehmen konnte (Bochen *et al.*, 2018).

**PBS (pH 7,2 – 7,4)**

137 mM NaCl  
10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
2,7 mM KCl  
1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

**Demaskierungslösung pH 6,0**

10 mM Natriumcitrat  
in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

**Demaskierungslösung pH 9,0**

10 mM Tris  
1 mM EDTA  
in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

**Blockierlösung**

3% (w/v) BSA in PBS

**Antikörperlösung**

1% (w/v) BSA in PBS

## **4.4 Methoden der Zellkultur**

### **4.4.1 Zelllinien**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Versuche mit den humanen Zelllinien HeLa (DSMZ #ACC-57), UM-SCC1 (Merck, Sigma-Aldrich #SCC070) und FaDu (DSMZ #ACC-784) durchgeführt, welche aus dem Epithel eines Karzinoms der Zervix, des Mundbodens bzw. des Hypopharynx etabliert worden waren. Alle Zelllinien wurden nach Abschluss der jeweils beschriebenen Analysen durch die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ; Braunschweig) mittels Short-Tandem-Repeat-Profilanalyse genetisch authentifiziert, sowie die Mycoplasmenfreiheit der Kultur mikrobiologisch und mittels PCR-Analyse verifiziert.

### **4.4.2 Kultivierung und Subkultivierung von humanen Zelllinien**

Humane Zellen der Zelllinien HeLa und UM-SCC1 wurden routinemäßig in 250 ml Zellkulturflaschen in einem Brutschrank kultiviert, dessen Atmosphäre eine Temperatur von 37°C, eine CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5% (v/v) und eine relative Luftfeuchtigkeit von 95% aufwies. Die Kultivierung erfolgte jeweils in 15 ml DMEM GlutaMAX Zellkulturmedium, welches zuvor mit 10% (v/v) fetalem Kälberserum (FCS) und 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin-Antibiotikallösung versehen worden war. Die Zellen wurden bei Erreichen einer Konfluenz von etwa 80 bis 90%, durchschnittlich alle drei bis vier Tage, durch Ausdünnen in einem Verhältnis von eins zu zehn subpassagiert. Hierzu wurde das Zellkulturmedium aus den jeweiligen Kulturflaschen entfernt, die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen und dann durch Inkubation mit 1 ml Trypsin-EDTA-Dissoziationslösung für etwa 10 Minuten im Brutschrank abgelöst. Der enzymatische Dissoziationsprozess wurde anschließend durch Hinzufügen von mindestens 5 ml FCS-haltigem Zellkulturmedium abgestoppt und die erhaltene Zellsuspension entsprechend des gewählten Verhältnisses der Ausdünnung abermals in Kulturflaschen ausgesät. Eine langfristige Kryokonservierung der Zelllinien erfolgte durch Lagerung von Aliquots in flüssigem Stickstoff, welche eine Suspension von zwei bis vier Millionen Zellen in 20% (v/v) FCS- und 10% (v/v) DMSO-haltigem Kulturmedium enthielten.

#### **4.4.3 Zellzählung**

Zur Bestimmung der Zellzahl und einer Überprüfung der Zellvitalität wurden die jeweiligen Zellsuspensionen mithilfe des automatisierten Countess Zellzählgerätes, zugehöriger Kammerobjektträger und einer Trypanblaulösung entsprechend den Angaben des Herstellers analysiert. Da der Farbstoff Proteine sequenzunspezifisch anfärbt und dabei nicht membranpermeabel ist, ermöglicht die Analyse des Färbeverhaltens einer Zellsuspension einen Rückschluss auf die Anzahl der enthaltenen Zellen und die Integrität ihrer Zellmembran.

#### **4.4.4 Präparation von Zellysat**

Zur Präparation von Lysaten kultivierter Zellen, wurden diese in 5 ml PBS gewaschen und durch Inkubation mit Trypsin-EDTA-Dissoziationslösung für etwa 10 Minuten im Brutschrank abgelöst. Der enzymatische Dissoziationsprozess wurde anschließend durch Hinzufügen von FCS-haltigem Zellkulturmedium abgestoppt und die erhaltene Zellsuspension gezählt (siehe Kapitel 4.4.3). Nach Pelletierung der Zellen durch Zentrifugation in einer Tischzentrifuge bei 3000 rpm für drei Minuten wurde der Überstand verworfen und die Zellen in SDS-Probenpuffer (siehe Kapitel 4.3.3) mit einer Konzentration von 10 000 Zellen pro Mikroliter Puffer resuspendiert. Zur mechanischen Lyse der Zellen wurden dann 30 bis 60 kleine Glaskugeln hinzugegeben und die Proben durch dreißigminütiges, starkes Schütteln auf einem Vibrationsmischer aufgeschlossen. Abschließend wurden die Proben für 10 Minuten bei 65°C erhitzt und für 30 Sekunden bei 14 000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert.

#### 4.4.5 siRNA-vermittelte Gen-Stillegung

Zur funktionellen Stillegung der Expression verschiedener Gene erfolgte eine transiente Transfektion kultivierter Zellen durch siRNA-Moleküle („small interfering RNA“), welche homolog zu einem Sequenzabschnitt des jeweiligen Genproduktes waren und das Lipid-basierte Transfektionsreagenz HiPerFect. Um sicherzustellen, dass sich die jeweiligen Zellpopulationen während der gesamten Behandlung in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, wurden diese zwei Tage vor Versuchsbeginn in einem Verhältnis von eins zu vier ausgedünnt. Am Versuchstag wurden die Zellen entsprechend des in Kapitel 4.4.2 beschriebenen Vorgehens in PBS gewaschen und dissoziiert. Anschließend wurde die Zellzahl der erhaltenen Suspension bestimmt und 520 000 vitale Zellen in 6 cm Zellkulturschalen in 3,9 ml Zellkulturmedium (10% (v/v) FCS und 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin-Antibiotikalösung) ausgesät. Parallel dazu wurde die zu verwendende siRNA in 76 µl serumreduziertem Opti-MEM Medium verdünnt, 20 µl HiPerFect Transfektionsreagenz hinzugegeben und eine Ausbildung der Transfektionskomplexe durch zehnmünütige Inkubation bei Raumtemperatur ermöglicht. Der so vorbereitete Ansatz wurde dann vorsichtig auf die Zellsuspension pipettiert und durch Schwenken der Kulturschalen gleichmäßig verteilt. Zur Steigerung der Effizienz der Gen-Stillegung, wurde 24 Stunden nach initialer Transfektion das Kulturmedium erneuert und die Zellen abermals wie beschrieben transfiziert, jedoch ohne vorherige Dissoziation. Zwischen und nach allen Schritten der Transfektion wurden die Zellen unter normalen Kulturbedingungen kultiviert. In Tabelle 9 sind nähere Details und Beschreibungen der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten siRNAs zusammengefasst.

**Tabelle 9: Übersicht der verwendeten siRNAs, unter Angabe der eingesetzten Konzentration und Sequenz.** UTR: untranslatierte Region

Name	Zielstruktur	Herkunft	Sequenz	Endkonzentration	
				HeLa	FaDu
Kontroll siRNA	keine Sequenz-homologie	Qiagen, #1027281	proprietär	12 nM	20 nM
SEC62 siRNA	SEC62 mRNA	Qiagen, #1027423	GGAGAGGAAGCUUUUUUUAdTdT	12 nM	20 nM
SEC62 UTR siRNA	5'-UTR der SEC62 mRNA		CGUAAAGUGUAUUCUGUACdTdT	12 nM	20 nM

#### 4.4.6 Plasmid-vermittelte Gen-Überexpression

Zur Überexpression verschiedener Gene erfolgte eine transiente Transfektion kultivierter Zellen durch Plasmide, welche eine komplementäre DNA-Sequenz (cDNA) des jeweiligen Genproduktes enthielten und das Lipid-basierte Transfektionsreagenz X-tremeGENE HP. Um sicherzustellen, dass sich die jeweiligen Zellpopulationen während der gesamten Behandlung in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, wurden diese zwei Tage vor Versuchsbeginn in einem Verhältnis von eins zu vier ausgedünnt. Am Versuchstag wurden die Zellen entsprechend des in Kapitel 4.4.2 beschriebenen Vorgehens in PBS gewaschen und dissoziiert. Anschließend wurde die Zellzahl der erhaltenen Suspension bestimmt und 520 000 vitale Zellen in 6 cm Zellkulturschalen in 3,8 ml Zellkulturmedium (10% (v/v) FCS und 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin-Antibiotikallösung) ausgesät und die Zellen für 24 Stunden unter normalen Kulturbedingungen kultiviert. Am Folgetag wurde das Kulturmedium erneuert. Parallel dazu wurden 4 µg des zu verwendenden Plasmids in 180 µl serumreduziertem Opti-MEM Medium verdünnt, 16 µl X-tremeGENE HP Transfektionsreagenz hinzugegeben und eine Ausbildung der Transfektionskomplexe durch 20- bis 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur ermöglicht. Der so vorbereitete Ansatz wurde dann vorsichtig auf die Zellsuspension pipettiert und durch Schwenken der Kulturschalen gleichmäßig verteilt. Zwischen und nach allen Schritten der Transfektion wurden die Zellen unter normalen Kulturbedingungen kultiviert. In Tabelle 10 sind nähere Details und Beschreibungen der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide zusammengefasst.

**Tabelle 10: Übersicht und Beschreibung der verwendeten Plasmide, unter Angabe der Herkunft.**

Name	Beschreibung	Herkunft
Kontroll Plasmid	pcDNA3-Neo-IRES-GFP; Insertion einer IRES-GFP Sequenz in den pcDNA3-Neo-Basisvektor; CMV-Promotor	Dr. Ulrich Wissenbach, Pharmakologie und Toxikologie, Universität des Saarlandes
<i>SEC62</i> Plasmid	pcDNA3-Neo-SEC62-IRES-GFP; Insertion einer wildtypischen <i>SEC62</i> cDNA in den pcDNA3-Neo-IRES-GFP-Vektor; CMV-Promotor	Julia Benedix, Medizinische Biochemie und Molekularbiologie, Universität des Saarlandes

## **4.5 Methoden der Zellanalyse**

### **4.5.1 Echtzeit-Proliferationsanalyse**

Die Analyse des Proliferationspotenzials der untersuchten Zellpopulationen erfolgte in Echtzeit mithilfe des xCelligence RTCA Systems nach den Vorgaben des Herstellers. In diesem System können Änderungen im Wechselstromwiderstand, der sogenannten Impedanz, durch Mikroelektroden am Boden zugehöriger Kulturplatten gemessen werden. Die Impedanz ist dabei proportional zur Konfluenz der jeweils untersuchten Zellen und wird in Form des dimensionslosen Parameters des Zellindex gemessen. Zur Messung des Zellindex wurden die jeweiligen Zellpopulationen 24 Stunden nach der letzten Transfektion entsprechend des in Kapitel 4.4.2 beschriebenen Vorgehens in PBS gewaschen und dissoziiert; anschließend wurde die Zellzahl der erhaltenen Suspension bestimmt. Parallel dazu wurde eine Kalibrierungsmessung der Impedanz in der Kulturplatte durchgeführt, welche pro Kavität mit 100 µl des regulären Kulturmediums befüllt war. Nachfolgend wurden jeweils 2 500 vitale HeLa bzw. 10 000 vitale UM-SCC1-Zellen in 50 µl Kulturmedium hinzugefügt und eine vorläufige Sedimentation der Zellen durch erschütterungsfreie Inkubation für 30 Minuten ermöglicht. Zur Echtzeitbestimmung des Proliferationspotenzials wurde dann der jeweilige Zellindex alle 15 Minuten für mindestens 120 Stunden mithilfe der zugehörigen RTCA Software automatisiert gemessen. Während der gesamten Analyse wurden die Zellen unter normalen Kulturbedingungen kultiviert. Zur Bestimmung des exponentiellen Wachstums der untersuchten Zellpopulationen wurde die Steigung der jeweiligen Proliferationskurve während dieses Zeitraums mithilfe der RTCA Software bestimmt.

#### **4.5.2 Migrationsanalyse**

Die Analyse des Migrationspotenzials der untersuchten Zellpopulationen erfolgte mithilfe der FluoroBlok Migrationseinsätze und Kulturplatten. Das Funktionsprinzip basiert hierbei auf dem einer Boyden-Kammer, wobei ein FCS-Gradient zwischen Migrationseinsatz und Kulturplatte als Chemoattraktant dient. Zur Analyse des Migrationspotenzials wurden die jeweiligen Zellpopulationen 24 Stunden nach der letzten Transfektion entsprechend des in Kapitel 4.4.2 beschriebenen Vorgehens in PBS gewaschen und dissoziiert; anschließend wurde die Zellzahl der erhaltenen Suspension bestimmt. Nachfolgend wurden jeweils 50 000 vitale Zellen in 500 µl des entsprechenden Migrationsmediums aufgenommen und in die Migrationseinsätze ausgesät. Das Migrationsmedium bestand hierbei aus unsupplementiertem Kulturmedium, welchem zuvor für die Analyse von HeLa-Zellen 5% bzw. von UM-SCC1-Zellen 1% (jeweils v/v) FCS zugesetzt worden waren. Die so befüllten Migrationseinsätze wurden anschließend in die begleitenden Kulturplatten gehängt, welche reguläres Kulturmedium mit einem FCS-Gehalt von 10% enthielten. Diese Einheiten wurden dann für den jeweils beschriebenen Zeitraum unter normalen Kulturbedingungen inkubiert. Nach Abschluss der Migrationsanalyse wurden die Zellen in den jeweiligen Migrationseinsätzen mit Methanol bei -20°C für zehn Minuten fixiert und durch lichtgeschützte Inkubation in DAPI-Lösung mit einer Konzentration von 1 µg pro Milliliter für sieben Minuten gefärbt. Da die PET-Membran an der Unterseite der verwendeten Migrationseinsätze lichtundurchlässig ist, werden bei der Analyse mithilfe eines inversen Fluoreszenzmikroskops nur Zellen erfasst, welche während des Versuchs durch die 8 µm großen Poren der Membran migriert sind. Alle Analysen erfolgten mithilfe des Nikon Eclipse TE2000S Fluoreszenz-Mikroskops; pro Migrationseinsatz wurden drei repräsentative Bilder aufgenommen und analysiert. Die Anzahl der migrierten Zellen wurde mithilfe der NIS-Elements AR Software (Version 3.22.14) halbautomatisiert bestimmt.

#### **4.5.3 HPV-DNA-PCR**

Zur Detektion der DNA von high-risk Papillomviren wurden DNA-Moleküle einer Größe von 200 Basenpaaren bis zu 50 Kilobasen aus einem Milliliter der zu untersuchenden ThinPrep Zellsuspension mittels des QIAamp Blood DNA Extraktions Kits nach den

Vorgaben des Herstellers isoliert. Anschließend wurde mithilfe der bereits zuvor in der Literatur beschriebenen GP5+ und GP6+ Primer eine sogenannte touchdown-PCR im LightCycler 2.0 Thermocycler durchgeführt (de Roda Husman *et al.*, 1995). Nach einer initialen Denaturierung bei 95°C für 15 Minuten folgten hierbei 45 PCR Zyklen, welche jeweils eine Denaturierungsphase bei 95°C für zehn Sekunden, eine Primer Hybridisierung bei 45°C für fünf Sekunden und eine Elongationsphase bei 72°C für 18 Sekunden umfassten. Nach der Amplifikation folgte eine Schmelzkurvenanalyse der PCR-Produkte bei Temperaturen zwischen 45 und 95°C und einem Temperaturanstieg von 0,2°C pro Sekunde. Die jeweiligen PCR-Amplifikate wurden sowohl durch SYBR-Green als auch durch eine Gelelektrophorese detektiert. Die Analyse erfolgte unter Verwendung geeigneter Positivkontrollen der Hochrisikosubtypen HPV-16 und HPV-18, welche eine Schmelztemperatur von 79°C bzw. 82°C aufwiesen. Zusätzlich wurde als Positivkontrolle für jede Probe, wie bereits zuvor in der Literatur beschrieben, eine GAPDH-PCR durchgeführt (Ruprecht *et al.*, 2008). Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten HPV-DNA-PCR Analysen wurden vom Institut für Virologie der Universität des Saarlandes durchgeführt.

#### **4.5.4 Komparative genomische Hybridisierung**

Komparative genomische Hybridisierungen (CGH) wurden wie in der Literatur bereits beschrieben durchgeführt (Wemmert *et al.*, 2015; Bochen *et al.*, 2016). Hierzu wurde genomische DNA der zu analysierenden Zellen, sowie aus dem peripheren Blut eines gesunden Kontrollpatienten durch eine reguläre Phenol-Chloroform-Extraktion gewonnen. Eine Markierung durch Biotin und Digoxigenin erfolgte anschließend mittels Nick-Translations-Kits nach den Angaben des Herstellers Roche Diagnostics. Die Hybridisierung an Metaphase-Chromosomen, welche zuvor nach einem Standardprotokoll aus humanen Lymphozyten gewonnen worden waren, wurde zusammen mit Cot-1 DNA durchgeführt. Die anschließende Stringenzwaschung erfolgte durch 50% Formamid in 2x SCC-Puffer, 2x SCC und 0,1x SCC bei 45°C. Die zu untersuchende DNA wurde dann durch Streptavidin-Fluorescein und die Referenz-DNA durch ein anti-Digoxigenin-Rhodamin Antikörper-Konjugat detektiert. Abschließend wurden die Präparate durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und mit DAPI-haltigem Fluoreszenz-Eindeckmedium eingedeckt. Die Auswertung erfolgte mithilfe des Olympus BX61

Mikroskops und der Isis Fluoreszenzmikroskopie Software. Zur Erstellung der durchschnittlichen Summenprofile wurden 12 bis 15 Metaphasen analysiert. Die heterochromatinen Regionen der Chromosomen 1, 9 und 16, sowie die kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen und das Y-Chromosom wurden aufgrund potenzieller Interferenzen mit der verwendeten Cot-1 DNA von der Analyse ausgeschlossen. Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten CGH-Analysen wurden von Dr. Silke Wemmert und Dr. Cornelia Lerner der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums des Saarlandes durchgeführt.

**20x SCC (pH 7,0)**

3 M NaCl

300 mM Natriumcitrat

in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

#### **4.5.5 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung**

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) wurden wie in der Literatur bereits beschrieben durchgeführt (Linxweiler *et al.*, 2016; Bochen *et al.*, 2016; Körbel *et al.*, 2018). Hierzu wurden die zu untersuchenden Präparate durch Inkubation in Methanol-Essigsäure (Verhältnis drei zu eins) fixiert und mit Ribonuklease H und Pepsin vorbehandelt. Eine Postfixation erfolgte durch Inkubation in einer 4%igen Paraformaldehydlösung in PBS; anschließend wurden die Präparate durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und luftgetrocknet. Parallel dazu wurde die DNA eines *SEC62*-codierenden, künstlichen Bakterienchromosoms (#RP11-379K17; ImaGenes, Berlin) mithilfe des NucleoBond PC 100 DNA Extraktionskits isoliert und durch das BioPrime DNA System markiert; beides wurde nach den jeweiligen Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Zusätzlich erfolgte die Markierung einer Sonde gegen die Zentromerregion von Chromosom 10 (#D10Z3) durch Digoxigenin mittels eines Nick-Translations-Kits nach den Angaben des Herstellers Roche Diagnostics. Die zweifarbige Hybridisierung wurde mit 50% Formamid in 2x SCC-Puffer zusammen mit Cot-1 DNA über Nacht bei 37°C durchgeführt. Die anschließende Stringenzwaschung erfolgte durch 50% Formamid in 2x SCC und 2x SCC bei 42°C. Die jeweils hybridisierte DNA wurde dann

durch Streptavidin-Fluorescein und ein anti-Digoxigenin-Rhodamin Antikörper-Konjugat detektiert. Abschließend wurden die Präparate durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und mit DAPI-haltigem Fluoreszenz-Eindeckmedium eingedeckt. Die Auswertung erfolgte mithilfe des Olympus BX61 Mikroskops und der Isis FISH-Mikroskopiesoftware. Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten FISH-Analysen wurden von bzw. in Zusammenarbeit mit Dr. Silke Wemmert der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums des Saarlandes durchgeführt.

**20x SCC (pH 7,0)**

3 M NaCl

300 mM Natriumcitrat

in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

#### **4.5.6 Analyse der zytotoxische Aktivität Natürlicher Killerzellen**

Die Analyse der zytotoxischen Aktivität Natürlicher Killerzellen wurde wie in der Literatur bereits beschrieben durchgeführt (Bittenbring *et al.*, 2014; Bochen *et al.*, 2018). Hierzu wurden Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) aus dem peripheren Blut der jeweils zu untersuchen Probanden, durch magnetische Depletion aller CD56 negativer Zellen, mittels des NK-Zell Isolationskits nach den Vorgaben des Herstellers Miltenyi isoliert. Bei der anschließenden Analyse ihrer zytotoxischen Aktivität wurden Zellen der EGFR-positive Hypopharynxkarzinom Zelllinie FaDu als Zielzellen verwendet. Diese wurden entsprechend des in Kapitel 4.4.2 beschriebenen Vorgehens dissoziiert, in PBS gewaschen und gezählt. Jeweils 4 000 vitale Zellen wurden dann in 75 µl X-Vivo 15 Kulturmedium, welches zuvor mit 2% (v/v) humanem Serumalbumin versehen worden war, aufgenommen und mit dem therapeutischen anti-EGFR-Antikörper Cetuximab in den jeweils beschriebenen Konzentrationen für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Nachfolgend wurden die so vorbehandelten Zellpopulationen in eine 96-Well-Kulturplatte ausgesät und zusammen mit den Natürlichen Killerzellen in einem Effektor-zu-Ziel-Verhältnis von fünf zu eins für vier Stunden unter normalen Kulturbedingungen inkubiert. Die maximale Lyse wurde jeweils durch zusätzliche Inkubation mit dem Detergens Triton X-100 kontrolliert. Die gegen die Tumorzellen gerichtete zytotoxische Aktivität der NK-Zellen wurde anschließend durch eine Messung der durch eine Lyse der Zielzellen freigesetzten

Laktatdehydrogenase bestimmt. Hierzu wurden die Kulturplatten bei 200 g für sechs Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und 50 µl des Kulturüberstands mit einem identischen Volumen des LDH-Substrates des Zytotoxizitäts-Detektions-Kits für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Beendigung der Reaktion, entsprechend den Vorgaben des Herstellers Roche Diagnostics, wurde die jeweilige Extinktion bei einer Wellenlänge von 490 nm mithilfe des Wallac Victor 2 Spektrometers photometrisch bestimmt. Eine prozentuale Angabe der relativen Zelllyse wurde anschließend in Relation zur maximalen Lyse und abzüglich der jeweils gemessenen Spontanlyse berechnet ( $\text{relative Zelllyse} = (\text{Testlyse} - \text{Spontanlyse}) / (\text{maximale Lyse} - \text{Spontanlyse}) \times 100$ ). Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Analysen der zytotoxischen Aktivität Natürlicher Killerzellen wurden von bzw. in Zusammenarbeit mit Dr. Frank Neumann der Klinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums des Saarlandes durchgeführt.

#### **4.6 Statistische Analysen**

Alle statistischen Analysen im Rahmen dieser Arbeit wurden mithilfe der Software Prism des Herstellers GraphPad in der Version 8.4.3 durchgeführt. Experimentelle Daten wurden dabei mittels F-Test auf eine Homogenität der Varianzen und mittels eines Tests nach D'Agostino und Pearson auf eine Normalverteilung hin überprüft. Unterschiede zwischen zwei unabhängigen Stichproben wurden mithilfe eines zweiseitigen, ungepaarten t-Tests bzw. eines zweiseitigen Mann-Whitney-U-Tests analysiert, Unterschiede zwischen mehreren unabhängigen Stichproben mittels univarianter, einfaktorierter Varianzanalyse (one-way ANOVA) und nachfolgendem Test auf einen linearen Trend bzw. posthoc-Test nach Tukey. Die statistische Analyse des Überlebens der untersuchten Patienten erfolgte mittels Kaplan-Meier-Schätzfunktion und des logrank-Tests nach Mantel und Cox; alle Hazard Ratios wurden nach der logrank-Methode berechnet. Die Einteilung der Patienten in Kohorten mit hoher bzw. niedriger Ausprägung eines untersuchten Merkmals (SEC62-Proteingehalt, Immunzellinfiltration, Serumparameter, etc.) erfolgte, sofern nicht anders beschrieben, bei Werten über oder gleich dem Mittelwert (hoch) bzw. unter dem Mittelwert der entsprechend untersuchten Gruppe (niedrig). Als Signifikanzniveau ( $\alpha$ ) wurde ein Wert von 0,05 festgelegt, womit p-Werte kleiner als 0,05 als signifikantes Ergebnis angesehen wurden.

## 5. Literaturverzeichnis

**Abrahão R, Anantharaman D, Gaborieau V, Abedi-Ardekani B, Lagiou P, Lagiou A, Ahrens W, Holcatova I, Betka J, Merletti F, et al. 2018.** The influence of smoking, age and stage at diagnosis on the survival after larynx, hypopharynx and oral cavity cancers in Europe: The ARCAGE study. *International Journal of Cancer* **143**: 32–44.

**Abram TJ, Floriano PN, Christodoulides N, James R, Kerr AR, Thornhill MH, Redding SW, Vigneswaran N, Speight PM, Vick J, et al. 2016.** ‘Cytology-on-a-chip’ based sensors for monitoring of potentially malignant oral lesions. *Oral Oncology* **60**: 103–111.

**Abreu ALP, Souza RP, Gimenes F, Consolaro MEL. 2012.** A review of methods for detect human Papillomavirus infection. *Virology Journal* **9**: 262–9.

**Afzal S, Bojesen SE, Nordestgaard BG. 2013.** Low Plasma 25-Hydroxyvitamin D and Risk of Tobacco-Related Cancer. *Clinical Chemistry* **59**: 771–780.

**Agaimy A, Weichert W. 2016.** Grading of head and neck neoplasms. *Der Pathologe* **37**: 285–292.

**Allen C, Clavijo P, Van Waes C, Chen Z. 2015.** Anti-Tumor Immunity in Head and Neck Cancer: Understanding the Evidence, How Tumors Escape and Immunotherapeutic Approaches. *Cancers* **7**: 2397–2414.

**Alsarraf A, Kujan O, Farah CS. 2018.** Liquid-based oral brush cytology in the diagnosis of oral leukoplakia using a modified Bethesda Cytology system. *Journal of Oral Pathology & Medicine* **47**: 887–894.

**Alsarraf AH, Kujan O, Farah CS. 2017.** The utility of oral brush cytology in the early detection of oral cancer and oral potentially malignant disorders: A systematic review. *Journal of Oral Pathology & Medicine* **47**: 104–116.

**Alves VAF, Bibbo M, Schmitt FCL, Milanezi F, Longatto Filho A. 2004.** Comparison of Manual and Automated Methods of Liquid-Based Cytology. *Acta Cytologica* **48**: 187–193.

**Anantharaman D, Billot A, Waterboer T, Gheit T, Abedi-Ardekani B, Lagiou P, Lagiou A, Ahrens W, Holcátová I, Merletti F, et al. 2018.** Predictors of oropharyngeal cancer survival in Europe. *Oral Oncology* **81**: 89–94.

**Arem H, Weinstein SJ, Horst RL, Virtamo J, Yu K, Albanes D, Abnet CC. 2011.** Serum 25-Hydroxyvitamin D and Risk of Oropharynx and Larynx Cancers in Finnish Men. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **20**: 1178–1184.

**Baeke F, Takiishi T, Korf H, Gysemans C, Mathieu C. 2010.** Vitamin D: modulator of the immune system. *Current Opinion in Pharmacology* **10**: 482–496.

**Bagnardi V, Blangiardo M, Vecchia CL, Corrao G. 2001.** A meta-analysis of alcohol drinking and cancer risk. *British Journal of Cancer* **85**: 1700–1705.

- Bagur R, Hajnóczky G. 2017.** Intracellular Ca<sup>2+</sup> Sensing: Its Role in Calcium Homeostasis and Signaling. *Molecular Cell* **66**: 780–788.
- Benson E, Li R, Eisele D, Fakhry C. 2014.** The clinical impact of HPV tumor status upon head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncology* **50**: 565–574.
- Bentz JS. 2014.** Liquid-based cytology for cervical cancer screening. *Expert Review of Molecular Diagnostics* **5**: 857–871.
- Bera K, Schalper KA, Rimm DL, Velcheti V, Madabhushi A. 2019.** Artificial intelligence in digital pathology — new tools for diagnosis and precision oncology. *Nature Reviews Clinical Oncology* **16**: 703–715.
- Bergmann TJ, Fumagalli F, Loi M, Molinari M. 2016.** Role of SEC62 in ER maintenance: A link with ER stress tolerance in SEC62-overexpressing tumors? *Molecular & Cellular Oncology* **4**: e1264351.
- Bikle DD. 2011.** Vitamin D and the skin: Physiology and pathophysiology. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* **13**: 3–19.
- Bikle DD. 2012.** Vitamin D and Bone. *Current Osteoporosis Reports* **10**: 151–159.
- Bischoff-Ferrari HA, Giovannucci E, Willett WC, Dietrich T, Dawson-Hughes B. 2006.** Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *The American Journal of Clinical Nutrition* **84**: 18–28.
- Bischoff-Ferrari HA, Willett WC, Wong JB, Stuck AE, Staehelin HB, Orav EJ, Thoma A, Kiel DP, Henschkowski J. 2009.** Prevention of Nonvertebral Fractures With Oral Vitamin D and Dose Dependency. *Archives of Internal Medicine* **169**: 551.
- Bittenbring JT, Neumann F, Altmann B, Achenbach M, Reichrath J, Ziepert M, Geisel J, Regitz E, Held G, Pfreundschuh M. 2014.** Vitamin D Deficiency Impairs Rituximab-Mediated Cellular Cytotoxicity and Outcome of Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated With but Not Without Rituximab. *Journal of Clinical Oncology* **32**: 3242–3248.
- Bochen F, Adisurya H, Wemmert S, Lerner C, Greiner M, Zimmermann R, Hasenfus A, Wagner M, Smola S, Pfuhl T, et al. 2016.** Effect of 3q oncogenes SEC62 and SOX2 on lymphatic metastasis and clinical outcome of head and neck squamous cell carcinomas. *Oncotarget* **8**: 4922–4934.
- Bochen F, Balensiefer B, Körner S, Bittenbring JT, Neumann F, Koch A, Bumm K, Marx A, Wemmert S, Papaspyrou G, et al. 2018.** Vitamin D deficiency in head and neck cancer patients – prevalence, prognostic value and impact on immune function. *OncolImmunology* **7**: e1476817.
- Boffetta P, Hashibe M. 2006.** Alcohol and cancer. *The Lancet Oncology* **7**: 149–156.
- Bonetta L. 2009.** RNA-based therapeutics: ready for delivery? *Cell* **136**: 581–584.

- Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, Jones CU, Sur R, Raben D, Jassem J, et al. 2006.** Radiotherapy plus Cetuximab for Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *New England Journal of Medicine* **354**: 567–578.
- Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A, Luderer HF, Lieben L, Mathieu C, Demay M. 2008.** Vitamin D and Human Health: Lessons from Vitamin D Receptor Null Mice. *Endocrine Reviews* **29**: 726–776.
- Böcking A. 1998.** Standardisierte Befunderstellung in der extragenitalen Zytologie. *Der Pathologe* **19**: 235–236.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. 2018.** Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **68**: 394–424.
- Brøndum-Jacobsen P, Benn M, Jensen GB, Nordestgaard BG. 2012.** 25-Hydroxyvitamin D Levels and Risk of Ischemic Heart Disease, Myocardial Infarction, and Early Death. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **32**: 2794–2802.
- Bujan Rivera J, Klug SJ. 2018.** Cervical cancer screening in Germany. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* **61**: 1528–1535.
- Burd EM. 2016.** Human Papillomavirus Laboratory Testing: the Changing Paradigm. *Clinical Microbiology Reviews* **29**: 291–319.
- Burtness B, Harrington KJ, Greil R, Tahara M, de Castro G Jr, Basté N, Bratland Å, Fuereder T, Hughes BGM, Mesia R, et al. 2019.** Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study. *The Lancet* **394**: 1915–1928.
- Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, Corio R, Lee D, Greenberg B, Koch W, et al. 1996.** Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Research* **56**: 2488–2492.
- Carlberg C. 2014.** Genome-wide (over)view on the actions of vitamin D. *Frontiers in Physiology* **5**: 480.
- Carlberg C, Campbell MJ. 2013.** Vitamin D receptor signaling mechanisms: Integrated actions of a well-defined transcription factor. *Steroids* **78**: 127–136.
- Chakraborty C, Sharma AR, Sharma G, Doss CGP, Lee S-S. 2017.** Therapeutic miRNA and siRNA: Moving from Bench to Clinic as Next Generation Medicine. *Molecular Therapy: Nucleic Acids* **8**: 132–143.
- Chaturvedi AK, Anderson WF, Lortet-Tieulent J, Curado MP, Ferlay J, Franceschi S, Rosenberg PS, Bray F, Gillison ML. 2013.** Worldwide Trends in Incidence Rates for Oral Cavity and Oropharyngeal Cancers. *Journal of Clinical Oncology* **31**: 4550–4559.

- Chen YP, Wang YQ, Lv JW, Li YQ, Chua MLK, Le QT, Lee N, Colevas AD, Seiwert T, Hayes DN, et al. 2019.** Identification and validation of novel microenvironment-based immune molecular subgroups of head and neck squamous cell carcinoma: implications for immunotherapy. *Annals of Oncology* **30**: 68–75.
- Chirumbolo S, Bjørklund G, Sboarina A, Vella A. 2017.** The Role of Vitamin D in the Immune System as a Pro-survival Molecule. *Clinical Therapeutics* **39**: 894–916.
- Chun RF, Liu PT, Modlin RL, Adams JS, Hewison M. 2014.** Impact of vitamin D on immune function: lessons learned from genome-wide analysis. *Frontiers in Physiology* **5**: 787.
- Chung CH, Parker JS, Karaca G, Wu J, Funkhouser WK, Moore D, Butterfoss D, Xiang D, Zanation A, Yin X, et al. 2004.** Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression. *Cancer Cell* **5**: 489–500.
- Ciriello G, Miller ML, Aksoy BA, Senbabaoglu Y, Schultz N, Sander C. 2013.** Emerging landscape of oncogenic signatures across human cancers. *Nature Genetics* **45**: 1127–1133.
- Clapham DE. 2007.** Calcium Signaling. *Cell* **131**: 1047–1058.
- Cogliano V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, Ghissassi FE. 2005.** Carcinogenicity of human papillomaviruses. *The Lancet Oncology* **6**: 204–1.
- Cohen EEW, Ahn M-J, Burtness B, Zhang P, Cheng J, Swaby RF, Harrington KJ, Acosta-Rivera M, Adkins DR, Aghmesheh M, et al. 2019.** Pembrolizumab versus methotrexate, docetaxel, or cetuximab for recurrent or metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma (KEYNOTE-040): a randomised, open-label, phase 3 study. *The Lancet* **393**: 156–167.
- Conti BJ, Devaraneni PK, Yang Z, David LL, Skach WR. 2015.** Cotranslational Stabilization of Sec62/63 within the ER Sec61 Translocon Is Controlled by Distinct Substrate-Driven Translocation Events. *Molecular Cell* **58**: 269–283.
- Craig SG, Anderson LA, Schache AG, Moran M, Graham L, Currie K, Rooney K, Robinson M, Upile NS, Brooker R, et al. 2019.** Recommendations for determining HPV status in patients with oropharyngeal cancers under TNM8 guidelines: a two-tier approach. *British Journal of Cancer* **120**: 827–833.
- Cramer JD, Burtness B, Le QT, Ferris RL. 2019.** The changing therapeutic landscape of head and neck cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology* **16**: 669–683.
- D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, Westra WH, Gillison ML. 2007.** Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *New England Journal of Medicine* **356**: 1944–1956.
- Davidson MA, Shanks EJ. 2017.** 3q26-29 Amplification in head and neck squamous cell carcinoma: a review of established and prospective oncogenes. *The FEBS Journal* **284**: 2705–2731.

- Davis RJ, Van Waes C, Allen CT. 2016.** Overcoming barriers to effective immunotherapy: MDSCs, TAMs, and Tregs as mediators of the immunosuppressive microenvironment in head and neck cancer. *Oral Oncology* **58**: 59–70.
- de Roda Husman AM, Walboomers JMM, van den Brule AJC, Meijer CJLM, Snijders PJF. 1995.** The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *Journal of General Virology* **76**: 1057–1062.
- de Villiers E-M, Fauquet C, Broker TR, Bernard H-U, Hausen zur H. 2004.** Classification of papillomaviruses. *Virology* **324**: 17–27.
- DeLuca HF. 2004.** Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *The American Journal of Clinical Nutrition* **80**: 1689S–1696S.
- Denmeade SR, Mhaka AM, Rosen DM, Brennen WN, Dalrymple S, Dach I, Olesen C, Gurel B, Demarzo AM, Wilding G, et al. 2012.** Engineering a Prostate-Specific Membrane Antigen-Activated Tumor Endothelial Cell Prodrug for Cancer Therapy. *Science Translational Medicine* **4**: 140ra86.
- Doescher J, Busch CJ, Wollenberg B, Dietz A, Würdemann N, Schuler P, Hoffmann TK, Laban S. 2019.** Immunotherapy for head and neck cancer. *HNO* **67**: 905–911.
- Dowdy SF. 2017.** Overcoming cellular barriers for RNA therapeutics. *Nature Biotechnology* **35**: 222–229.
- Du J, Zhao Z, Zhao H, Liu D, Liu H, Chen J, Cheng B, Zhai X, Yin Z, Zhang Y, et al. 2019.** Sec62 promotes early recurrence of hepatocellular carcinoma through activating integrin $\alpha$ /CAV1 signalling. *Oncogenesis* **8**: 74.
- Echarri M, Lopez-Martin A, Hitt R. 2016.** Targeted Therapy in Locally Advanced and Recurrent/Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (LA-R/M HNSCC). *Cancers* **8**: 27.
- Epidemiologisches Krebsregister Saarland. 2009.** *Krebs im Saarland*. Saarbrücken: Ministerium für Justiz, Arbeit, Gesundheit und Soziales.
- Erdmann F, Schäuble N, Lang S, Jung M, Honigmann A, Ahmad M, Dudek J, Benedix J, Harsman A, Kopp A, et al. 2011.** Interaction of calmodulin with Sec61 $\alpha$  limits Ca<sup>2+</sup> leakage from the endoplasmic reticulum. *The EMBO Journal* **30**: 17–31.
- Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, Forastiere A, Gillison ML. 2008.** Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *Journal of the National Cancer Institute* **100**: 261–269.
- Fathi N, Ahmadian E, Shahi S, Roshangar L, Khan H, Kouhsoltani M, Maleki Dizaj S, Sharifi S. 2019.** Role of vitamin D and vitamin D receptor (VDR) in oral cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **109**: 391–401.
- Ferris RL. 2015.** Immunology and Immunotherapy of Head and Neck Cancer. *Journal of Clinical Oncology* **33**: 3293–3304.

- Ferris RL, Blumenschein G Jr., Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L, Harrington K, Kasper S, Vokes EE, Even C, et al. 2016.** Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *New England Journal of Medicine* **375**: 1856–1867.
- Ferris RL, Lenz H-J, Trotta AM, García-Foncillas J, Schulten J, Audhuy F, Merlano M, Milano G. 2018.** Rationale for combination of therapeutic antibodies targeting tumor cells and immune checkpoint receptors: Harnessing innate and adaptive immunity through IgG1 isotype immune effector stimulation. *Cancer Treatment Reviews* **63**: 48–60.
- Fields AP, Justilien V, Murray NR. 2016.** The chromosome 3q26 OncCassette: A multigenic driver of human cancer. *Advances in Biological Regulation* **60**: 47–63.
- Fumagalli F, Fumagalli F, Noack J, Noack J, Bergmann TJ, Cebollero E, Bergmann TJ, Presmanes EC, Pisoni GB, Fasana E, et al. 2016.** Translocon component Sec62 acts in endoplasmic reticulum turnover during stress recovery. *Nature Cell Biology* **18**: 1173–1184.
- Gardner DG, Chen S, Glenn DJ. 2013.** Vitamin D and the heart. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **305**: R969–R977.
- Garland CF, Gorham ED, Mohr SB, Grant WB, Giovannucci EL, Lipkin M, Newmark H, Holick MF, Garland FC. 2007.** Vitamin D and prevention of breast cancer: Pooled analysis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **103**: 708–711.
- Gatta G, Botta L, Sánchez MJ, Anderson LA, Pierannunzio D, Licitra L, Hackl M, Zielonke N, Oberaigner W, Van Eycken E, et al. 2015.** Prognoses and improvement for head and neck cancers diagnosed in Europe in early 2000s: The EURO CARE-5 population-based study. *European Journal of Cancer* **51**: 2130–2143.
- Gavrielatou N, Doulas S, Economopoulou P, Foukas PG, Psyrri A. 2020.** Biomarkers for immunotherapy response in head and neck cancer. *Cancer Treatment Reviews* **84**: 101977.
- Gibb RK, Martens MG. 2011.** The Impact of Liquid-Based Cytology in Decreasing the Incidence of Cervical Cancer. *Reviews in Obstetrics & Gynecology* **4**: S2–S11.
- Giovannucci E, Liu Y, Rimm EB, Hollis BW, Fuchs CS, Stampfer MJ, Willett WC. 2006.** Prospective Study of Predictors of Vitamin D Status and Cancer Incidence and Mortality in Men. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* **98**: 451–459.
- Goecks J, Jalili V, Heiser LM, Gray JW. 2020.** How Machine Learning Will Transform Biomedicine. *Cell* **181**: 92–101.
- Greiner M, Kreutzer B, Jung V, Grobholz R, Hasenfus A, Stöhr RF, Tornillo L, Dudek J, Stöckle M, Unteregger G, et al. 2011a.** Silencing of the SEC62 gene inhibits migratory and invasive potential of various tumor cells. *International Journal of Cancer* **128**: 2284–2295.
- Greiner M, Kreutzer B, Lang S, Jung V, Cavalié A, Unteregger G, Zimmermann R, Wullich B. 2011b.** Sec62 protein level is crucial for the ER stress tolerance of prostate cancer. *The Prostate* **71**: 1074–1083.

- Griesser H, Marquardt K, Jordan B, Kühn W, Neis K, Neumann HH, Bollmann R, Pöschel B, Steiner M, Schenck U. 2013.** Münchner Nomenklatur III. *Frauenarzt* **54**: 1042–1048.
- Grumati P, Dikic I, Stolz A. 2018.** ER-phagy at a glance. *Journal of Cell Science* **131**: jcs217364.
- Gugatschka M, Kiesler K, Obermayer-Pietsch B, Groselj-Strele A, Griesbacher A, Friedrich G. 2011.** Vitamin D status is associated with disease-free survival and overall survival time in patients with squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology and Head & Neck* **268**: 1201–1204.
- Haddad JG, Matsuoka LY, Hollis BW, Hu YZ, Wortsman J. 1993.** Human Plasma Transport of Vitamin D after its Endogenous Synthesis. *The Journal of Clinical Investigation* **91**: 2552–2555.
- Hagerstrand D, Tong A, Schumacher SE, Ilic N, Shen RR, Cheung HW, Vazquez F, Shrestha Y, Kim SY, Giacomelli AO, et al. 2013.** Systematic interrogation of 3q26 identifies TLOC1 and SKIL as cancer drivers. *Cancer Discovery* **3**: 1044–1057.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2011.** Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**: 646–674.
- Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, Maso LD, Daudt AW, Fabianova E, Wunsch-Filho V, et al. 2007.** Alcohol Drinking in Never Users of Tobacco, Cigarette Smoking in Never Drinkers, and the Risk of Head and Neck Cancer: Pooled Analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* **99**: 777–789.
- Hashibe M, Brennan P, Chuang SC, Boccia S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, Dal Maso L, Daudt AW, Fabianova E, et al. 2009.** Interaction between Tobacco and Alcohol Use and the Risk of Head and Neck Cancer: Pooled Analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **18**: 541–550.
- He H, Wu W, Sun Z, Chai L. 2019.** MiR-4429 prevented gastric cancer progression through targeting METTL3 to inhibit m6A-caused stabilization of SEC62. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **517**: 581–587.
- Heaney RP. 2004.** Functional indices of vitamin D status and ramifications of vitamin D deficiency. *The American Journal of Clinical Nutrition* **80**: 1706S–1709S.
- Heikkinen S, Väisänen S, Pehkonen P, Seuter S, Benes V, Carlberg C. 2011.** Nuclear hormone 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> elicits a genome-wide shift in the locations of VDR chromatin occupancy. *Nucleic Acids Research* **39**: 9181–9193.
- Hewison M. 2012.** An update on vitamin D and human immunity. *Clinical Endocrinology* **76**: 315–325.
- Hintzpeter B, Mensink GBM, Thierfelder W, Müller MJ, Scheidt-Nave C. 2007.** Vitamin D status and health correlates among German adults. *European Journal of Clinical Nutrition* **62**: 1079–1089.

- Hoffmann M, Tribius S, Quabius ES, Henry H, Pfannenschmidt S, Burkhardt C, Görögh T, Halec G, Hoffmann AS, Kahn T, et al. 2012.** HPV DNA, E6\*I-mRNA expression and p16<sup>INK4A</sup> immunohistochemistry in head and neck cancer – How valid is p16<sup>INK4A</sup> as surrogate marker? *Cancer Letters* **323**: 88–96.
- Holick MF. 2002a.** Vitamin D: the underappreciated D-lightful hormone that is important for skeletal and cellular health. *Current Opinion in Endocrinology & Diabetes* **9**: 87–98.
- Holick MF. 2002b.** Sunlight and Vitamin D. *Journal of General Internal Medicine* **17**: 733–735.
- Holick MF. 2002c.** Vitamin D: A Millenium Perspective. *Journal of Cellular Biochemistry* **88**: 296–307.
- Holick MF. 2003.** Vitamin D. *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism* **1**: 181–208.
- Holick MF. 2006.** Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *The Journal of Clinical Investigation* **116**: 2062–2072.
- Holick MF. 2007.** Vitamin D Deficiency. *New England Journal of Medicine* **357**: 266–281.
- Holick MF. 2009.** Vitamin D Status: Measurement, Interpretation, and Clinical Application. *Annals of Epidemiology* **19**: 73–78.
- Holick MF. 2016.** Biological Effects of Sunlight, Ultraviolet Radiation, Visible Light, Infrared Radiation and Vitamin D for Health. *Anticancer Research* **36**: 1345–1356.
- Holick MF. 2017.** The vitamin D deficiency pandemic: Approaches for diagnosis, treatment and prevention. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* **18**: 153–165.
- Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, Murad MH, Weaver CM. 2011.** Evaluation, Treatment, and Prevention of Vitamin D Deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **96**: 1911–1930.
- Ikenberg H, Bergeron C, Schmidt D, Griesser H, Alameda F, Angeloni C, Bogers J, Dachez R, Denton K, Hariri J, et al. 2013.** Screening for Cervical Cancer Precursors With p16/Ki-67 Dual-Stained Cytology: Results of the PALMS Study. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* **105**: 1550–1557.
- Jansen L, Buttman-Schweiger N, Listl S, Rassing M, Holleczeck B, Katalinic A, Luttmann S, Kraywinkel K, Brenner H, GEKID Cancer Survival Working Group. 2018.** Differences in incidence and survival of oral cavity and pharyngeal cancers between Germany and the United States depend on the HPV-association of the cancer site. *Oral Oncology* **76**: 8–15.
- Jones TM, Hargrove O, Lancaster J, Fenton J, Shenoy A, Roland NJ. 2006.** Waiting times during the management of head and neck tumours. *The Journal of Laryngology & Otology* **116**: 275–279.

- Jung V, Kindich R, Kamradt J, Jung M, Müller M, Schulz WA, Engers R, Unteregger G, Stöckle M, Zimmermann R, et al. 2006.** Genomic and expression analysis of the 3q25-q26 amplification unit reveals TLOC1/SEC62 as a probable target gene in prostate cancer. *Molecular Cancer Research* **4**: 169–176.
- Kayaniyil S, Vieth R, Retnakaran R, Knight JA, Qi Y, Gerstein HC, Perkins BA, Harris SB, Zinman B, Hanley AJ. 2010.** Association of Vitamin D With Insulin Resistance and  $\beta$ -Cell Dysfunction in Subjects at Risk for Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* **33**: 1379–1381.
- Keck MK, Zuo Z, Khattri A, Stricker TP, Brown CD, Imanguli M, Rieke D, Endhardt K, Fang P, Bragelmann J, et al. 2015.** Integrative Analysis of Head and Neck Cancer Identifies Two Biologically Distinct HPV and Three Non-HPV Subtypes. *Clinical Cancer Research* **21**: 870–881.
- Khanal S, Shumway BS, Zahin M, Redman RA, Strickley JD, Trainor PJ, Rai SN, Ghim S-J, Jenson AB, Joh J. 2018.** Viral DNA integration and methylation of human papillomavirus type 16 in high-grade oral epithelial dysplasia and head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* **9**: 30419–30433.
- Kim KY, Lewis JS Jr, Chen Z. 2018.** Current status of clinical testing for human papillomavirus in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *The Journal of Pathology: Clinical Research* **4**: 213–226.
- Kimura H, Sakai K, Arao T, Shimoyama T, Tamura T, Nishio K. 2007.** Antibody-dependent cellular cytotoxicity of cetuximab against tumor cells with wild-type or mutant epidermal growth factor receptor. *Cancer Science* **98**: 1275–1280.
- Knight JA, Lesosky M, Barnett H, Raboud JM, Vieth R. 2007.** Vitamin D and Reduced Risk of Breast Cancer: A Population-Based Case-Control Study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **16**: 422–429.
- Knuutila S, Björkqvist AM, Autio K, Tarkkanen M, Wolf M, Monni O, Szymanska J, Larramendy ML, Tapper J, Pere H, et al. 1998.** DNA copy number amplifications in human neoplasms: review of comparative genomic hybridization studies. *The American Journal of Pathology* **152**: 1107–1123.
- Kobayashi K, Hisamatsu K, Suzui N, Hara A, Tomita H, Miyazaki T. 2018.** A Review of HPV-Related Head and Neck Cancer. *Journal of Clinical Medicine* **7**: 241.
- Körbel C, Linxweiler M, Bochen F, Wemmert S, Schick B, Meyer M, Maurer H, Menger MD, Zimmermann R, Greiner M. 2018.** Treatment of SEC62 over-expressing tumors by Thapsigargin and Trifluoperazine. *Biomolecular Concepts* **9**: 53–63.
- Kramer J, Diehl A, Lehnert H. 2014.** Epidemiologische Untersuchung zur Häufigkeit eines Vitamin-D-Mangels in Norddeutschland. *DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift* **139**: 470–475.
- Kujan O, Desai M, Sargent A, Bailey A, Turner A, Sloan P. 2006.** Potential applications of oral brush cytology with liquid-based technology: Results from a cohort of normal oral mucosa. *Oral Oncology* **42**: 810–818.

- Laemmli UK. 1970.** Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
- Lakkaraju AKK, Thankappan R, Mary C, Garrison JL, Taunton J, Strub K. 2012.** Efficient secretion of small proteins in mammalian cells relies on Sec62-dependent posttranslational translocation. (RS Hegde, Ed.). *Molecular Biology of the Cell* **23**: 2712–2722.
- Lamberg-Allardt C. 2006.** Vitamin D in foods and as supplements. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **92**: 33–38.
- Lang S, Erdmann F, Jung M, Wagner R, Cavalié A, Zimmermann R. 2014.** Sec61 complexes form ubiquitous ER Ca<sup>2+</sup> leak channels. *Channels* **5**: 228–235.
- Lang S, Pfeffer S, Lee P-H, Cavalié A, Helms V, Förster F, Zimmermann R. 2017.** An Update on Sec61 Channel Functions, Mechanisms, and Related Diseases. *Frontiers in Physiology* **8**: 887.
- Lawrence MS, (null) TCGA, Sougnez C, Lichtenstein L, Cibulskis K, Lander E, Gabriel SB, Getz G, Ally A, Balasundaram M, et al. 2015.** Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature* **517**: 576–582.
- Lee J-J, Hung H-C, Cheng S-J, Chiang C-P, Liu B-Y, Yu C-H, Jeng J-H, Chang H-H, Kok S-H. 2007.** Factors associated with underdiagnosis from incisional biopsy of oral leukoplakic lesions. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* **104**: 217–225.
- Lee JE, Li H, Chan AT, Hollis BW, Lee I-M, Stampfer MJ, Wu K, Giovannucci E, Ma J. 2011.** Circulating Levels of Vitamin D and Colon and Rectal Cancer: The Physicians' Health Study and a Meta-analysis of Prospective Studies. *Cancer Prevention Research* **4**: 735–743.
- Leemans CR, Braakhuis BJM, Brakenhoff RH. 2010.** The molecular biology of head and neck cancer. *Nature Reviews Cancer* **11**: 9–22.
- Leemans CR, Snijders PJF, Brakenhoff RH. 2018.** The molecular landscape of head and neck cancer. *Nature Reviews Cancer* **18**: 269–282.
- Leitlinienprogramm Onkologie. 2019a.** *S2k-Leitlinie Diagnostik und Management von Vorläuferläsionen des oralen Plattenepithelkarzinoms in der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde*. Hofheim: Deutsche Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, AWMF.
- Leitlinienprogramm Onkologie. 2019b.** *S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Larynxkarzinoms*. Berlin: Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF).
- Leitlinienprogramm Onkologie. 2019c.** *S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms*. Berlin: Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF).

- Leon ME, Peruga A, McNeill A, Kralikova E, Guha N, Minozzi S, Espina C, Schüz J. 2015.** European Code against Cancer, 4th Edition: Tobacco and cancer. *Cancer Epidemiology* **39**: S20–S33.
- Leung T-W, Liu SS, Leung RCY, Chu MMY, Cheung ANY, Ngan HYS. 2015.** HPV 16 E2 binding sites 1 and 2 become more methylated than E2 binding site 4 during cervical carcinogenesis. *Journal of Medical Virology* **87**: 1022–1033.
- Linxweiler J, Kollipara L, Zahedi RP, Lampel P, Zimmermann R, Greiner M. 2014a.** Proteomic insights into non-small cell lung cancer: New ideas for cancer diagnosis and therapy from a functional viewpoint. *EuPA Open Proteomics* **4**: 25–39.
- Linxweiler M, Bochen F, Schick B, Wemmert S, Al-Kadah B, Greiner M, Hasenfus A, Bohle RM, Juhasz-Böss I, Solomayer E-F, et al. 2016.** Identification of SEC62 as a potential marker for 3q amplification and cellular migration in dysplastic cervical lesions. *BMC Cancer* **16**: 69.
- Linxweiler M, Bochen F, Wemmert S, Lerner C, Hasenfus A, Bohle RM, Al-Kadah B, Takacs ZF, Smola S, Schick B. 2014b.** Combination of p16<sup>(INK4a)</sup>/Ki67 immunocytology and HPV polymerase chain reaction for the noninvasive analysis of HPV involvement in head and neck cancer. *Cancer Cytopathology* **123**: 219–229.
- Linxweiler M, Linxweiler J, Barth M, Benedix J, Jung V, Kim Y-J, Bohle RM, Zimmermann R, Greiner M. 2012.** Sec62 bridges the gap from 3q amplification to molecular cell biology in non-small cell lung cancer. *The American Journal of Pathology* **180**: 473–483.
- Linxweiler M, Schick B, Zimmermann R. 2017.** Let's talk about Secs: Sec61, Sec62 and Sec63 in signal transduction, oncology and personalized medicine. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **2**: 17002–10.
- Linxweiler M, Schorr S, Schäuble N, Jung M, Linxweiler J, Langer F, Schäfers H-J, Cavalié A, Zimmermann R, Greiner M. 2013.** Targeting cell migration and the endoplasmic reticulum stress response with calmodulin antagonists: a clinically tested small molecule phenocopy of SEC62 gene silencing in human tumor cells. *BMC Cancer* **13**: 574.
- Lips P. 2001.** Vitamin D Deficiency and Secondary Hyperparathyroidism in the Elderly: Consequences for Bone Loss and Fractures and Therapeutic Implications. *Endocrine Reviews* **22**: 477–501.
- Liu Y, Yin N, Wang X, Khor A, Sambandam V, Ghosh AB, Fields ZA, Murray NR, Justilien V, Fields AP. 2020.** Chromosome 3q26 Gain Is an Early Event Driving Coordinated Overexpression of the PRKCI, SOX2, and ECT2 Oncogenes in Lung Squamous Cell Carcinoma. *Cell reports* **30**: 771–782.e6.
- Macville M, Schröck E, Padilla-Nash H, Keck C, Ghadimi BM, Zimonjic D, Popescu N, Ried T. 1999.** Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping. *Cancer Research* **59**: 141–150.

- Mahalingam D, Wilding G, Denmeade S, Sarantopoulos J, Cosgrove D, Cetnar J, Azad N, Bruce J, Kurman M, Allgood VE, et al. 2016.** Mipsagargin, a novel thapsigargin-based PSMA-activated prodrug: results of a first-in-man phase I clinical trial in patients with refractory, advanced or metastatic solid tumours. *British Journal of Cancer* **114**: 986–994.
- Mantovani F, Banks L. 2001.** The Human Papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* **20**: 7874–7887.
- Martens P-J, Gysemans C, Verstuyf A, Mathieu C. 2020.** Vitamin D's Effect on Immune Function. *Nutrients* **12**: 1248.
- Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA. 2010.** HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *The Lancet Oncology* **11**: 781–789.
- Marusyk A, Tabassum DP, Altrock PM, Almendro V, Michor F, Polyak K. 2014.** Non-cell-autonomous driving of tumour growth supports sub-clonal heterogeneity. *Nature* **514**: 54–58.
- Masterson L, Moualed D, Liu ZW, Howard JEF, Dwivedi RC, Tysome JR, Benson R, Sterling JC, Sudhoff H, Jani P, et al. 2014.** De-escalation treatment protocols for human papillomavirus-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis of current clinical trials. *European Journal of Cancer* **50**: 2636–2648.
- McMenamin M, McKenna M, McDowell A. 2018.** Clinical Utility of CINtec PLUS Triage in Equivocal Cervical Cytology and Human Papillomavirus Primary Screening. *American Journal of Clinical Pathology* **150**: 512–521.
- McRae MP, Modak SS, Simmons GW, Trochesset DA, Kerr AR, Thornhill MH, Redding SW, Vigneswaran N, Kang SK, Christodoulides NJ, et al. 2019.** Point-of-care oral cytology tool for the screening and assessment of potentially malignant oral lesions. *Cancer Cytopathology* **128**: 207–220.
- Medrano M, Carrillo-Cruz E, Montero I, Perez-Simon J. 2018.** Vitamin D: Effect on Haematopoiesis and Immune System and Clinical Applications. *International Journal of Molecular Sciences* **19**: 2663.
- Michaelsen SH, Larsen CG, Buchwald von C. 2014.** Human Papillomavirus Shows Highly Variable Prevalence in Esophageal Squamous Cell Carcinoma and No Significant Correlation to p16INK4a Overexpression: A Systematic Review. *Journal of Thoracic Oncology* **9**: 865–871.
- Mitri J, Dawson-Hughes B, Hu FB, Pittas AG. 2011.** Effects of vitamin D and calcium supplementation on pancreatic  $\beta$  cell function, insulin sensitivity, and glycemia in adults at high risk of diabetes: the Calcium and Vitamin D for Diabetes Mellitus (CaDDM) randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition* **94**: 486–494.
- Monteith GR, Prevarskaya N, Roberts-Thomson SJ. 2017.** The calcium–cancer signalling nexus. *Nature Reviews Cancer* **17**: 373–380.
- Moody CA, Laimins LA. 2010.** Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature Reviews Cancer* **10**: 550–560.

- Morbini P, Dal Bello B, Alberizzi P, Mannarini L, Mevio N, Garotta M, Mura F, Tinelli C, Bertino G, Benazzo M. 2013.** Oral HPV infection and persistence in patients with head and neck cancer. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology* **116**: 474–484.
- Moritz CP. 2020.** 40 years Western blotting: A scientific birthday toast. *Journal of Proteomics* **212**: 103575.
- Mroz EA, Tward AM, Hammon RJ, Ren Y, Rocco JW. 2015.** Intra-tumor Genetic Heterogeneity and Mortality in Head and Neck Cancer: Analysis of Data from The Cancer Genome Atlas (AH Beck, Ed.). *PLOS Medicine* **12**: e1001786.
- Müller L, de Escauriaza MD, Lajoie P, Theis M, Jung M, Müller A, Burgard C, Greiner M, Snapp EL, Dudek J, et al. 2010.** Evolutionary Gain of Function for the ER Membrane Protein Sec62 from Yeast to Humans (RS Hegde, Ed.). *Molecular Biology of the Cell* **21**: 691–703.
- Münger K, Basile JR, Duensing S, Eichten A, Gonzalez SL, Grace M, Zacny VL. 2001.** Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* **20**: 7888–7898.
- Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJF, Meijer CJLM. 2003.** Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *New England Journal of Medicine* **348**: 518–527.
- Navone R, Burlo P, Pich A, Pentenero M, Broccoletti R, Marsico A, Gandolfo S. 2007.** The impact of liquid-based oral cytology on the diagnosis of oral squamous dysplasia and carcinoma. *Cytopathology* **18**: 356–360.
- Nayar R, Wilbur DC (Eds.). 2015.** *The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology*. Cham (Switzerland): Springer International Publishing.
- Need AG, O'Loughlin PD, Morris HA, Coates PS, Horowitz M, Nordin BC. 2008.** Vitamin D Metabolites and Calcium Absorption in Severe Vitamin D Deficiency. *Journal of Bone and Mineral Research* **23**: 1859–1863.
- Nogrady B. 2019.** The challenge of delivering RNA-interference therapeutics to their target cells. *Nature* **574**: S8–S9.
- Nulton TJ, Olex AL, Dozmorov M, Morgan IM, Windle B. 2017.** Analysis of The Cancer Genome Atlas sequencing data reveals novel properties of the human papillomavirus 16 genome in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* **8**: 17684–17699.
- Oka N, Kajita M, Nishimura R, Ohbayashi C, Sudo T. 2013.** L1 Gene Methylation in High-Risk Human Papillomaviruses for the Prognosis of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *International Journal of Gynecological Cancer* **23**: 235–243.
- Olthof NC, Huebbers CU, Kolligs J, Henfling M, Ramaekers FCS, Cornet I, van Lent-Albrechts JA, Stegmann APA, Silling S, Wieland U, et al. 2014a.** Viral load, gene expression and mapping of viral integration sites in HPV16-associated HNSCC cell lines. *International Journal of Cancer* **136**: E207–E218.

- Olthof NC, Speel E-JM, Kolligs J, Haesevoets A, Henfling M, Ramaekers FCS, Preuss SF, Drebber U, Wieland U, Silling S, et al. 2014b.** Comprehensive Analysis of HPV16 Integration in OSCC Reveals No Significant Impact of Physical Status on Viral Oncogene and Virally Disrupted Human Gene Expression. *PLoS ONE* **9**: e88718.
- Orell-Kotikangas H, Schwab U, Österlund P, Saarilahti K, Mäkitie O, Mäkitie AA. 2012.** High prevalence of vitamin D insufficiency in patients with head and neck cancer at diagnosis. *Head & Neck* **34**: 1450–1455.
- Pentenero M, Carrozzo M, Pagano M, Galliano D, Broccoletti R, Scully C, Gandolfo S. 2003.** Oral mucosal dysplastic lesions and early squamous cell carcinomas: underdiagnosis from incisional biopsy. *Oral Diseases* **9**: 68–72.
- Pike JW, Meyer MB. 2010.** The Vitamin D Receptor: New Paradigms for the Regulation of Gene Expression by 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* **39**: 255–269.
- Pilz S, Zittermann A, Trummer C, Theiler-Schwetz V, Lerchbaum E, Keppel MH, Grübler MR, März W, Pandis M. 2019.** Vitamin D testing and treatment: a narrative review of current evidence. *Endocrine Connections* **8**: R27–R43.
- Pitiphat W, Diehl SR, Laskaris G, Cartsos V, Douglass CW, Zavras AI. 2002.** Factors Associated with Delay in the Diagnosis of Oral Cancer. *Journal of Dental Research* **81**: 192–197.
- Pittas AG, Lau J, Hu FB, Dawson-Hughes B. 2007.** The Role of Vitamin D and Calcium in Type 2 Diabetes. A Systematic Review and Meta-Analysis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **92**: 2017–2029.
- Polanska H, Raudenska M, Gumulec J, Sztalmachova M, Adam V, Kizek R, Masarik M. 2014.** Clinical significance of head and neck squamous cell cancer biomarkers. *Oral Oncology* **50**: 168–177.
- Prigge E-S, Arbyn M, Knebel Doeberitz von M, Reuschenbach M. 2016.** Diagnostic accuracy of p16<sup>INK4a</sup> immunohistochemistry in oropharyngeal squamous cell carcinomas: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Cancer* **140**: 1186–1198.
- Prigge E-S, Toth C, Dyckhoff G, Wagner S, Müller F, Wittekindt C, Freier K, Plinkert P, Hoffmann J, Vinokurova S, et al. 2014.** p16 INK4a/Ki-67 co-expression specifically identifies transformed cells in the head and neck region. *International Journal of Cancer* **136**: 1589–1599.
- Pytynia KB, Dahlstrom KR, Sturgis EM. 2014.** Epidemiology of HPV-associated oropharyngeal cancer. *Oral Oncology* **50**: 380–386.
- Quabius ES, Haag J, Kühnel A, Henry H, Hoffmann AS, Görögh T, Hedderich J, Evert M, Beule AG, Maune S, et al. 2015.** Geographical and anatomical influences on human papillomavirus prevalence diversity in head and neck squamous cell carcinoma in Germany. *International Journal of Oncology* **46**: 414–422.

- Rabenberg M, Scheidt-Nave C, Busch MA, Rieckmann N, Hintzpeter B, Mensink GBM. 2015.** Vitamin D status among adults in Germany – results from the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1). *BMC Public Health* **15**: 76–15.
- Rapoport TA, Li L, Park E. 2017.** Structural and Mechanistic Insights into Protein Translocation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **33**: 369–390.
- Remmele W, Stegner HE. 1987.** Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Der Pathologe* **8**: 138–140.
- Remmerbach TW, Pomjanski N, Bauer U, Neumann H. 2017.** Liquid-based versus conventional cytology of oral brush biopsies: a split-sample pilot study. *Clinical Oral Investigations* **21**: 2493–2498.
- Rietbergen MM, Snijders PJF, Beekzada D, Braakhuis BJM, Brink A, Heideman DAM, Hesselink AT, Witte BI, Bloemena E, Baatenburg-De Jong RJ, et al. 2013.** Molecular characterization of p16-immunopositive but HPV DNA-negative oropharyngeal carcinomas. *International Journal of Cancer* **134**: 2366–2372.
- Rizzuto R, Pozzan T. 2006.** Microdomains of Intracellular Ca<sup>2+</sup>: Molecular Determinants and Functional Consequences. *Physiological Reviews* **86**: 369–408.
- Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland eV. 2019.** *Krebs in Deutschland 2015/2016*. Berlin: Robert Koch-Institut.
- Roberts-Thomson SJ, Chalmers SB, Monteith GR. 2019.** The Calcium-Signaling Toolkit in Cancer: Remodeling and Targeting. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **11**: a035204.
- Rooney PH, Murray GI, Stevenson DAJ, Haites NE, Cassidy J, McLeod HL. 1999.** Comparative genomic hybridization and chromosomal instability in solid tumours. *British Journal of Cancer* **80**: 862–873.
- Ruprecht K, Ferreira H, Flockerzi A, Wahl S, Sauter M, Mayer J, Mueller-Lantsch N. 2008.** Human Endogenous Retrovirus Family HERV-K(HML-2) RNA Transcripts Are Selectively Packaged into Retroviral Particles Produced by the Human Germ Cell Tumor Line Tera-1 and Originate Mainly from a Provirus on Chromosome 22q11.21. *Journal of Virology* **82**: 10008–10016.
- Sakai N, Kajiyama Y, Iwanuma Y, Tomita N, Amano T, Isayama F, Ouchi K, Tsurumaru M. 2010.** Study of abnormal chromosome regions in esophageal squamous cell carcinoma by comparative genomic hybridization: relationship of lymph node metastasis and distant metastasis to selected abnormal regions. *Diseases of the Esophagus* **23**: 415–421.
- Salazar KL, Duhon DJ, Olsen R, Thrall M. 2019.** A review of the FDA-approved molecular testing platforms for human papillomavirus. *Journal of the American Society of Cytopathology* **8**: 284–292.

- Schäuble N, Lang S, Jung M, Cappel S, Schorr S, Ulucan Ö, Linxweiler J, Dudek J, Blum R, Helms V, et al. 2012.** BiP-mediated closing of the Sec61 channel limits Ca<sup>2+</sup> leakage from the ER. *The EMBO Journal* **31**: 3282–3296.
- Schmidt D, Bergeron C, Denton KJ, Ridder R, for the European CINtec Cytology Study Group. 2011.** p16/ki-67 dual-stain cytology in the triage of ASCUS and LSIL Papanicolaou cytology. *Cancer Cytopathology* **119**: 158–166.
- Schorr S, Nguyen D, Haßdenteufel S, Nagaraj N, Cavalié A, Greiner M, Weissgerber P, Loi M, Paton AW, Paton JC, et al. 2020.** Identification of signal peptide features for substrate specificity in human Sec62/Sec63-dependent ER protein import. *The FEBS Journal*: febs.15274.
- Schwarz F, Maraki D, Yalcinkaya S, Bieling K, Böcking A, Becker J. 2005.** Cytologic and DNA-cytometric follow-up of oral leukoplakia after CO<sub>2</sub>- and Er:YAG-laser assisted ablation: A pilot study. *Lasers in Surgery and Medicine* **37**: 29–36.
- Sciubba JJ. 1999.** IMPROVING DETECTION OF PRECANCEROUS AND CANCEROUS ORAL LESIONS. *The Journal of the American Dental Association* **130**: 1445–1457.
- Shen WW. 1999.** A history of antipsychotic drug development. *Comprehensive Psychiatry* **40**: 407–414.
- Shi H, Norman AW, Okamura WH, Sen A, Zemel MB. 2001.** 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> modulates human adipocyte metabolism via nongenomic action. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **15**: 1–15.
- Singh B, Stoffel A, Gogineni S, Poluri A, Pfister DG, Shaha AR, Pathak A, Bosl G, Cordon-Cardo C, Shah JP, et al. 2002.** Amplification of the 3q26.3 Locus Is Associated with Progression to Invasive Cancer and Is a Negative Prognostic Factor in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *The American Journal of Pathology* **161**: 365–371.
- Sobus SL, Warren GW. 2014.** The biologic effects of cigarette smoke on cancer cells. *Cancer* **120**: 3617–3626.
- Speight PM, Abram TJ, Floriano PN, James R, Vick J, Thornhill MH, Murdoch C, Freeman C, Hegarty AM, D'Apice K, et al. 2015.** Interobserver agreement in dysplasia grading: toward an enhanced gold standard for clinical pathology trials. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology* **120**: 474–482.e2.
- Steinhilber D. 2020.** Vitamin D: Kritische Betrachtung. *Pharmazeutische Zeitung* **165**: 1082–1089.
- Stenzinger A, Kriegsmann M, Kraywinkel K, Weichert W. 2014.** Pathology of malignant head and neck tumors. *Der Onkologe* **20**: 116–129.
- Stewart TA, Yapa KTDS, Monteith GR. 2015.** Altered calcium signaling in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1848**: 2502–2511.
- Stransky N, Egloff AM, Tward AD, Kostic AD, Cibulskis K, Sivachenko A, Kryukov GV, Lawrence MS, Sougnez C, McKenna A, et al. 2011.** The Mutational Landscape of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Science* **333**: 1157–1160.

- Sunny S, Baby A, James BL, Balaji D, N A V, Rana MH, Gurpur P, Skandarajah A, D'Ambrosio M, Ramanjinappa RD, et al. 2019.** A smart tele-cytology point-of-care platform for oral cancer screening. *PloS ONE* **14**: e0224885.
- Takacs FZ, Radosa JC, Bochen F, Juhasz-Böss I, Solomayer E-F, Bohle RM, Breitbach G-P, Schick B, Linxweiler M. 2019a.** Sec62/Ki67 and p16/Ki67 dual-staining immunocytochemistry in vulvar cytology for the identification of vulvar intraepithelial neoplasia and vulvar cancer: a pilot study. *Archives of Gynecology and Obstetrics* **299**: 825–833.
- Takacs FZ, Radosa JC, Bohle RM, Bochen F, Juhasz-Böss I, Solomayer E-F, Schick B, Linxweiler M. 2019b.** Sec62/Ki67 dual staining in cervical cytology specimens: a new marker for high-grade dysplasia. *Archives of Gynecology and Obstetrics* **299**: 481–488.
- Takacs FZ, Radosa JC, Linxweiler M, Kasoha M, Bohle RM, Bochen F, Unger C, Solomayer E-F, Schick B, Juhasz-Böss I. 2019c.** Identification of 3q oncogene SEC62 as a marker for distant metastasis and poor clinical outcome in invasive ductal breast cancer. *Archives of Gynecology and Obstetrics* **299**: 1405–1413.
- Thorsson V, Gibbs DL, Brown SD, Wolf D, Bortone DS, Ou Yang T-H, Porta-Pardo E, Plaisier CL, Eddy JA, Ziv E, et al. 2018.** The Immune Landscape of Cancer. *Immunity* **48**: 812–830.e14.
- Tian XQ, Chen TC, Matsuoka LY, Wortsman J, Holick MF. 1993.** Kinetic and Thermodynamic Studies of the Conversion of Previtamin D<sub>3</sub> to vitamin D<sub>3</sub> in Human Skin. *The Journal of Biological Chemistry* **268**: 14888–14892.
- Torres-Rojas FI, Alarcón-Romero LDC, Leyva-Vázquez MA, Ortiz Ortiz J, Mendoza-Catalán MÁ, Hernández-Sotelo D, Del Moral-Hernández O, Rodríguez-Ruiz HA, Leyva Illades D, Flores-Alfaro E, et al. 2018.** Methylation of the L1 gene and integration of human papillomavirus 16 and 18 in cervical carcinoma and premalignant lesions. *Oncology Letters* **15**: 2278–2286.
- Tuoresmäki P, Väisänen S, Neme A, Heikkinen S, Carlberg C. 2014.** Patterns of Genome-Wide VDR Locations (AT Slominski, Ed.). *PloS ONE* **9**: e96105.
- Vaughan-Shaw PG, O'Sullivan F, Farrington SM, Theodoratou E, Campbell H, Dunlop MG, Zgaga L. 2017.** The impact of vitamin D pathway genetic variation and circulating 25-hydroxyvitamin D on cancer outcome: systematic review and meta-analysis. *British Journal of Cancer* **116**: 1092–1110.
- Ventz S, Trippa L, Schoenfeld JD. 2019.** Lessons Learned from Deescalation Trials in Favorable Risk HPV-Associated Squamous Cell Head and Neck Cancer—A Perspective on Future Trial Designs. *Clinical Cancer Research* **25**: 7281–7286.
- Venuti A, Paolini F. 2012.** HPV Detection Methods in Head and Neck Cancer. *Head and Neck Pathology* **6**: 63–74.
- Vermorcken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kaweckki A, Rottey S, Erfan J, Zabolotnyy D, Kienzer H-R, Cupissol D, et al. 2008.** Platinum-Based Chemotherapy plus Cetuximab in Head and Neck Cancer. *New England Journal of Medicine* **359**: 1116–1127.

- Vessey CJ, Wilding J, Folarin N, Hirano S, Takeichi M, Soutter P, Stamp GWH, Pignatelli M. 1995.** Altered expression and function of E-cadherin in cervical intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma. *The Journal of Pathology* **176**: 151–159.
- Vineis P, Alavanja M, Buffler P, Fontham E, Franceschi S, Gao YT, Gupta PC, Hackshaw A, Matos E, Samet J, et al. 2004.** Tobacco and Cancer: Recent Epidemiological Evidence. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* **96**: 99–106.
- Wacker M, Holick MF. 2014.** Sunlight and Vitamin D. *Dermato-Endocrinology* **5**: 51–108.
- Wainberg M, Merico D, Delong A, Frey BJ. 2018.** Deep learning in biomedicine. *Nature Biotechnology* **36**: 829–838.
- Walter P, Blobel G. 1983.** Preparation of Microsomal Membranes for Cotranslational Protein Translocation. *Methods in Enzymology* **96**: 84–93.
- Watts C, Wickner W, Zimmermann R. 1983.** M13 procoat and a pre-immunoglobulin share processing specificity but use different membrane receptor mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **80**: 2809–2813.
- Weigum SE, Floriano PN, Redding SW, Yeh CK, Westbrook SD, McGuff HS, Lin A, Miller FR, Villarreal F, Rowan SD, et al. 2010.** Nano-Bio-Chip Sensor Platform for Examination of Oral Exfoliative Cytology. *Cancer Prevention Research* **3**: 518–528.
- Wemmert S, Lindner Y, Linxweiler J, Wagenpfeil S, Bohle R, Niewald M, Schick B. 2016.** Initial evidence for Sec62 as a prognostic marker in advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Oncology Letters* **11**: 1661–1670.
- Wemmert S, Willnecker V, Kulas P, Weber S, Lerner C, Berndt S, Wendler O, Schick B. 2015.** Identification of CTNNB1 mutations, CTNNB1 amplifications, and an Axin2 splice variant in juvenile angiofibromas. *Tumor Biology* **37**: 5539–5549.
- Weng L, Du J, Zhou Q, Cheng B, Li J, Zhang D, Ling C. 2012.** Identification of cyclin B1 and Sec62 as biomarkers for recurrence in patients with HBV-related hepatocellular carcinoma after surgical resection. *Molecular cancer* **11**: 39.
- Wentzensen N, Schwartz L, Zuna RE, Smith K, Mathews C, Gold MA, Allen RA, Zhang R, Dunn ST, Walker JL, et al. 2012.** Performance of p16/Ki-67 Immunostaining to Detect Cervical Cancer Precursors in a Colposcopy Referral Population. *Clinical Cancer Research* **18**: 4154–4162.
- Wienecke A, Kraywinkel K. 2019.** Epidemiology of head and neck cancer in Germany. *Der Onkologe* **25**: 190–200.
- Wirth LJ, Burtness B, Nathan C-AO, Grégoire V, Richmon J. 2019.** Point/Counterpoint: Do We De-escalate Treatment of HPV-Associated Oropharynx Cancer Now? And How? *American Society of Clinical Oncology Educational Book*: 364–372.
- Wolpin BM, Ng K, Bao Y, Kraft P, Stampfer MJ, Michaud DS, Ma J, Buring JE, Sesso HD, Lee I-M, et al. 2012.** Plasma 25-Hydroxyvitamin D and Risk of Pancreatic Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **21**: 82–91.

**World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. 2005.** *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours* (L Barnes, JW Evenson, P Reichart, and D Sidransky, Eds.). Lyon: IARC.

**World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. 2017.** *WHO Classification of Head and Neck Tumours* (AK El-Naggar, JKC Chan, JR Grandis, T Takata, and PJ Slootweg, Eds.). Lyon: IARC.

**Yang EC, Tan MT, Schwarz RA, Richards-Kortum RR, Gillenwater AM, Vigneswaran N. 2018.** Noninvasive diagnostic adjuncts for the evaluation of potentially premalignant oral epithelial lesions: current limitations and future directions. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology* **125**: 670–681.

**Yoshizaki T, Ito M, Muro S, Wakisaka N, Kondo S, Endo K. 2012.** Current understanding and management of nasopharyngeal carcinoma. *Auris Nasus Larynx* **39**: 137–144.

**Zacharski LR, Moritz TE, Haakenson CM, O'Donnell JF, Ballard HS, Johnson GJ, Ringenberg QS, Schilsky RL, Spaulding MB, Tornoyos K, et al. 1990.** Chronic Calcium Antagonist Use in Carcinoma of the Lung and Colon: A Retrospective Cohort Observational Study. *Cancer Investigation* **8**: 451–458.

**Zätterström UK, Wennerberg J, Ewers SB, Willen R, Attewell R. 1991.** Prognostic factors in head and neck cancer: Histologic grading, dna ploidy, and nodal status. *Head & Neck* **13**: 477–487.

**Zimmermann R. 2016.** Components and Mechanisms of Import, Modification, Folding, and Assembly of Immunoglobulins in the Endoplasmic Reticulum. *Journal of Clinical Immunology* **36**: 5–11.

## Publikationen und Kongressbeiträge

### Publikationen

Linxweiler M, **Bochen F**, Wemmert S, Lerner C, Hasenus A, Bohle RM, Al-Kadah B, Takacs ZF, Smola S, Schick B. 2014. **Combination of p16<sup>(INK4a)</sup>/Ki67 immunocytology and HPV polymerase chain reaction for the noninvasive analysis of HPV involvement in head and neck cancer.** *Cancer Cytopathology* 123: 219–229.

Schorr S, Klein M-C, Gamayun I, Melnyk A, Jung M, Schäuble N, Wang Q, Hemmis B, **Bochen F**, Greiner M, *et al.* 2015. **Co-chaperone Specificity in Gating of the Polypeptide Conducting Channel in the Membrane of the Human Endoplasmic Reticulum.** *The Journal of Biological Chemistry* 290: 18621–18635.

Lerner C, Wemmert S, **Bochen F**, Kulas P, Linxweiler M, Hasenus A, Heinzelmann J, Leidinger P, Backes C, Meese E, *et al.* 2015. **Characterization of miR-146a and miR-155 in blood, tissue and cell lines of head and neck squamous cell carcinoma patients and their impact on cell proliferation and migration.** *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 142: 757–766.

Linxweiler M, **Bochen F**, Schick B, Wemmert S, Al-Kadah B, Greiner M, Hasenus A, Bohle RM, Juhasz-Böss I, Solomayer E-F, *et al.* 2016. **Identification of SEC62 as a potential marker for 3q amplification and cellular migration in dysplastic cervical lesions.** *BMC Cancer* 16: 69.

**Bochen F\***, Adisurya H\*, Wemmert S, Lerner C, Greiner M, Zimmermann R, Hasenus A, Wagner M, Smola S, Pfuhl T, *et al.* 2016. **Effect of 3q oncogenes SEC62 and SOX2 on lymphatic metastasis and clinical outcome of head and neck squamous cell carcinomas.** *Oncotarget* 8: 4922–4934. \* geteilte Erstautorenschaft

Wemmert S, Linxweiler M, Lerner C, **Bochen F**, Kulas P, Linxweiler J, Smola S, Urbschat S, Wagenpfeil S, Schick B. 2018. **Combinational chromosomal aneuploidies and HPV status for prediction of head and neck squamous cell carcinoma prognosis in biopsies and cytological preparations.** *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 144: 1129–1141.

Körbel C, Linxweiler M, **Bochen F**, Wemmert S, Schick B, Meyer M, Maurer H, Menger MD, Zimmermann R, Greiner M. 2018. **Treatment of SEC62 over-expressing tumors by Thapsigargin and Trifluoperazine.** *Biomolecular Concepts* 9: 53–63.

**Bochen F**, Balensiefer B, Körner S, Bittenbring JT, Neumann F, Koch A, Bumm K, Marx A, Wemmert S, Papaspyrou G, *et al.* 2018. **Vitamin D deficiency in head and neck cancer patients – prevalence, prognostic value and impact on immune function.** *OncImmunity* 7: e1476817.

Krombach S, Reissmann S, Kreibich S, **Bochen F**, Kahmann R. 2018. **Virulence function of the Ustilago maydis sterol carrier protein 2.** *The New Phytologist* 220: 553–566.

Takacs FZ, Radosa JC, Bohle RM, **Bochen F**, Juhasz-Böss I, Solomayer E-F, Schick B, Linxweiler M. 2019b. **Sec62/Ki67 dual staining in cervical cytology specimens: a new marker for high-grade dysplasia.** *Archives of Gynecology and Obstetrics* 299: 481–488.

Müller CSL, Kreie L, **Bochen F**, Pfuhl T, Smola S, Gräber S, Vogt T, Schick B, Linxweiler M. 2019. **Expression of 3q oncogene SEC62 in atypical fibroxanthoma-immunohistochemical analysis of 41 cases and correlation with clinical, viral and histopathologic features.** *Oncology Letters* 17: 1768–1776.

Takacs FZ, Radosa JC, **Bochen F**, Juhasz-Böss I, Solomayer E-F, Bohle RM, Breitbach G-P, Schick B, Linxweiler M. 2019a. **Sec62/Ki67 and p16/Ki67 dual-staining immunocytochemistry in vulvar cytology for the identification of vulvar intraepithelial neoplasia and vulvar cancer: a pilot study.** *Archives of Gynecology and Obstetrics* 299: 825–833.

Takacs FZ, Radosa JC, Linxweiler M, Kasoha M, Bohle RM, **Bochen F**, Unger C, Solomayer E-F, Schick B, Juhasz-Böss I. 2019c. **Identification of 3q oncogene SEC62 as a marker for distant metastasis and poor clinical outcome in invasive ductal breast cancer.** *Archives of Gynecology and Obstetrics* 299: 1405–1413.

Linxweiler M, Pillong L, Kopanja D, Kühn JP, Wagenpfeil S, Radosa JC, Wang J, Morris LGT, Al-Kadah B, **Bochen F**, *et al.* 2020. **Augmented reality-enhanced navigation in endoscopic sinus surgery: A prospective, randomized, controlled clinical trial.** *Laryngoscope Investigative Otolaryngology* 5: 621–629.

Krebs-Fleischmann HA, Linxweiler M, Körner S, Kühn JP, Smola S, Wagner M, Schick B, Bozzato A, **Bochen F**. 2020. **Biological and prognostic effects of vitamin D and HPV in head and neck cancer: a focus on tumor-associated immune checkpoint molecules.**  
*In Vorbereitung*

**Bochen F**, Linxweiler B, Kühn JP, Wagner M, Schick B, Bozzato A, Linxweiler M. 2020. **Diagnostic efficacy of liquid-based cytology for the detection and molecular analysis of head and neck cancer.**  
*In Vorbereitung*

**Bochen F**, Schmid W, Kühn JP, Körner S, Wagner M, Schick B, Bozzato A, Linxweiler M. 2020. **Comparative analysis of current methods to determine the HPV tumor-status in head and neck cancer patients.**  
*In Vorbereitung*

**Bochen F**, Feld JM, Sterkel F, Balensiefer B, Körner S, Kühn JP, Wagner M, Schick B, Bozzato A, Linxweiler M. 2020. **Influence of vitamin D on the lytic signature of tumor-infiltrating leukocytes in head and neck cancer.**  
*In Vorbereitung*

**Bochen F**, Sterkel F, Feld JM, Balensiefer B, Körner S, Kühn JP, Wagner M, Schick B, Bozzato A, Linxweiler M. 2020. **Vitamin D deficiency impacts the regulation of the tumor inflammasome in head and neck cancer.**  
*In Vorbereitung*

## **Kongressbeiträge (nur Erstautorenschaften)**

**Bochen F**, Bittenbring JT, Neumann F, Schick B, Linxweiler M. 2016. **Vitamin D<sub>3</sub> serum level influences lymphogenic metastasization as well as natural killer cell-mediated cytotoxicity in patients with head and neck squamous cell carcinoma.** *Poster mit Kurzvortrag.* Präsentiert auf dem 32. Deutschen Krebskongress der Deutschen Krebsgesellschaft e. V. und der Stiftung Deutsche Krebshilfe, vom 24. bis zum 27. Februar 2016 in Berlin; doi: 10.1159/000444354

**Bochen F**, Bittenbring JT, Neumann F, Schick B, Linxweiler M. 2016. **Einfluss des Vitamin D<sub>3</sub> Serumspiegels auf die lymphogene Metastasierung, sowie die zytotoxische Aktivität von Natürlichen Killerzellen in Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren.** *Poster mit Kurzvortrag.* Präsentiert auf der 87. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e. V., vom 4. bis zum 7. Mai 2016 in Düsseldorf; doi: 10.3205/cpo001537

## Preise

Alois-Lauer-Förderpreis für Medizin, Dillingen, November 2019

„Einfluss der 3q-Onkogene *SEC62* und *SOX2* auf die lymphogene Metastasierung von Kopf-Hals-Tumoren“

## Experimentell betreute Doktoranden

Hana Adisurya	medizinische Promotion	seit 2014
Dr. med. Benedikt Balensiefer	medizinische Promotion	2016 – 2018

## Betreute Doktoranden

Helge Anand Krebs-Fleischmann	medizinische Promotion	2017 – 2019
Wendelin Schmid	medizinische Promotion	seit 2017
Jule-Maria Feld	medizinische Promotion	seit 2018
Franziska Sterkel	medizinische Promotion	seit 2018
Jana Schnatmann	medizinische Promotion	seit 2019
Meike Vorschel	medizinische Promotion	seit 2019
Moritz Knebel	medizinische Promotion	seit 2019

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Richard Zimmermann für die aufmerksame und stets konstruktive Begleitung an zahlreichen Stationen meines Masterstudiums und speziell während der Anfertigung der Promotion. Deine großzügige Unterstützung und fortwährende Hilfsbereitschaft haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen – vielen Dank!

Zudem möchte ich allen Mitarbeitern der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde für die herzliche Aufnahme in das Team und das fortwährende Engagement danken; besonders anerkennen möchte ich auch die Unterstützung und das entgegengebrachte Vertrauen von Herrn Prof. Dr. Alessandro Bozzato.

Für die hervorragende Betreuung und die Hilfe, sowohl während der Labor- als auch der Schreibphase, möchte ich Herrn PD Dr. Maximilian Linxweiler außerordentlich danken! Dein persönlicher Einsatz und auch der von Barbara Linxweiler haben meine wissenschaftliche Arbeit ganz entscheidend geprägt.

Allen Mitarbeitern des Forschungslabors, besonders auch Lukas Pillong, Sandrina Körner, Dr. Sebastian Hölters und Dr. Joana Heinzemann sowie allen Doktoranden unserer Arbeitsgruppe, danke ich für Ihre Hilfsbereitschaft, die tolle Atmosphäre und zahlreiche wertvolle Anregungen. Dr. Sven Lang, Dr. Johanna Dudek, Prof. Dr. Martin Jung sowie allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Zimmermann und Schlenstedt danke ich ganz besonders für die bereits langjährige und immer großartige Hilfe und Unterstützung im Labor der Medizinischen Biochemie. Ein herzliches Dankeschön auch an Dr. Silke Wemmert, Ulrike Bechtel, Monika Hoffmann und Dr. Cornelia Lerner für die tatkräftige Unterstützung und das angenehme sowie stets kollegiale Arbeitsklima im HNO-Labor. Mein Dank gilt ebenso unseren Kooperationspartnern, der Alois-Lauer-Stiftung und allen Studienprobanden.

Für die langjährige Freundschaft und alle gemeinsam gemeisterten Hürden spreche ich dem gesamten Mensa-Komitee sowie meinen Freunden aus Marburg und der Heimat meinen großen Dank aus! Liebe Nicola, für all die kleinen und auch großen Ermutigungen sowie die Hilfe, besonders während der heißen Phase der Promotion, möchte ich mich bei Dir besonders bedanken.

Vor allem danke ich auch meinen Eltern Annekathrin und Martin Bochen für die permanente Unterstützung in jeglicher Hinsicht und die vielen in euren Augen selbstverständlichen Dinge. Danke dafür, dass ihr immer an mich geglaubt und mir den Rücken freigehalten habt. Euch ist diese Arbeit gewidmet.