

Aus dem Bereich
Klinische Medizin - Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Immunhistochemische und molekularbiologische Analysen an Plattenepithelkarzinomen der Kopf-
Hals-Region zur Ermittlung von Biomarker-Konstellationen mit prognostischer Relevanz**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

2022

vorgelegt von: Jean-Luc Heinrich
geb. am 12.03.1995 in Luxemburg-Stadt/Luxemburg

Tag der Promotion: Montag, den 27. November 2023

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Maximilian Linxweiler
Prof. Dr. med. Lorenz Thurner

Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

0. Abkürzungsverzeichnis

1. Summary / Zusammenfassung	1
2. Einleitung	5
2.1 Einführung	5
2.2 Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region	6
2.2.1 Risikofaktoren und Ätiologie	6
2.2.2 Klassifikation	9
2.2.3 Prognose	12
2.3 Vitamin D	13
2.4 Sec62	14
2.4.1 Intrazellulärer Transport von Proteinen	15
2.4.2 Sec62, ein Regulator des Proteintransportes?	17
2.4.3 Hinweise auf eine Beteiligung der Sec-Maschinerie an der zellulären Calciumhomöostase	18
2.4.4 Sec62 ist an der Bewältigung von ER-Stress beteiligt	19
2.4.5 Sec62 steigert das Migrationspotential von Tumorzellen	20
2.4.6 Sec62 als prognostischer Biomarker	20
2.5 Survivin	21
2.5.1 Apoptose oder der programmierte Zelltod	21
2.5.2 <i>Inhibitors of Apoptosis</i> (IAPs)	22
2.5.3 Survivin, ein besonderer Vertreter der IAPs	23
2.5.4 Survivin und seine Funktion als Apoptose-Inhibitor	24
2.5.5 Nukleäres Survivin als Bestandteil des <i>chromosomal passenger complex</i>	24
2.5.6 Survivin vermittelt Chemoresistenz in Endothelzellen	26
2.5.7 Survivin als prognostischer Biomarker	26
2.6 MicroRNAs (miRNA)	27
2.6.1 Entdeckung	27
2.6.2 Biogenese der miRNAs	27
2.6.3 Funktion der miRNAs	29
2.6.4 Nomenklatur	29
2.6.5 MiRNAs und ihre Rolle in der Tumorgenese	30
2.6.6 MiRNA-Analysen bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region	30
2.7 Hinführung zum Thema	32

3. Material und Methoden	34
3.1 Untersuchungsmaterialien für immunhistochemische Analysen	34
3.1.1 Tumorgewebe	34
3.1.2 Geräte, Software und Verbrauchsmaterialien	34
3.1.3 Puffer, Lösungen und weitere Chemikalien	35
3.2 Immunhistochemische Untersuchungen	37
3.2.1 Funktionsweise immunhistochemischer Analysen	37
3.2.2 Adaptierung des Versuchsprotokolls an das zu untersuchende Gewebe	38
3.2.3 Kontrollen	38
3.2.4 Versuchsprotokoll für immunhistochemische Färbungen an FFPE-Gewebeschnitten	39
3.2.5 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	40
3.3 Untersuchungsmaterialien für miRNA-Analysen	43
3.3.1 Blutproben	43
3.3.2 Geräte und Software	43
3.3.3 Chemikalien, Enzyme, Verbrauchsmaterialien und Kits	44
3.4 Molekularbiologische Methoden zur Analyse des miRNA-Profiles von HNSCC-Patienten	44
3.4.1 RNA-Isolierung inklusive miRNA aus Vollblut	44
3.4.2 Bestimmung des miRNA-Profiles durch quantitative Real-Time PCR	46
3.4.3 Relative Quantifizierung	52
4. Ergebnisse	55
4.1 Beschreibung des Patientenkollektivs	55
4.2 Analyse der klinischen Parameter „HPV-Status“ und „Vitamin D-Versorgung“	59
4.2.1 HPV-Status	59
4.2.2 Vitamin D-Versorgung der Patienten	62
4.3 Immunhistochemische Analyse der Sec62-Expression in Kopf-Hals-Tumoren	63
4.4 Immunhistochemische Analyse der Survivin-Expression in Kopf-Hals-Tumoren	69
4.5 Kombinierte Betrachtung der Sec62- und nukleären Survivin-Expression und Analyse ihres Einflusses auf das Gesamtüberleben der untersuchten HNSCC-Patienten	74
4.6 Analyse von HNSCC-Patienten mit unterschiedlicher Vitamin D-Versorgung	75
4.6.1 Betrachtung der Patienten mit einem Vitamin D-Mangel	75
4.6.2 Betrachtung der Patienten mit einer ausreichenden Vitamin D-Versorgung	78
4.7 Analyse von HNSCC-Patienten mit unterschiedlicher tumoraler Sec62-Expression	81
4.7.1 Betrachtung der Patienten mit einer geringen tumoralen Sec62-Expression	81
4.7.2 Betrachtung der Patienten mit einer ausgeprägten tumoralen Sec62-Expression	83

4.8 Analyse von HNSCC-Patienten mit unterschiedlicher nukleärer Survivin-Expression	
des Tumorgewebes	85
4.8.1 Betrachtung der Patienten mit einer geringen Survivin-Expression der Tumorzellkerne	85
4.8.2 Betrachtung der Patienten mit einer hohen Survivin-Expression der Tumorzellkerne	87
4.9 Analyse von HNSCC-Patienten mit unterschiedlicher zytoplasmatischer Survivin-Expression des Tumorgewebes	89
4.9.1 Betrachtung der Patienten mit einer geringen zytoplasmatischen Survivin-Expression der Tumore	89
4.9.2 Betrachtung der Patienten mit einer hohen zytoplasmatischen Survivin-Expression der Tumore	89
4.10 Untersuchung der Expression miRNA-codierender Gene im Blut von HNSCC-Patienten	92
4.10.1 Untersuchung der <i>miR-101</i> -Expression im Vollblut von HNSCC-Patienten	93
4.10.2 Untersuchung der <i>miR-218</i> -Expression im Vollblut von HNSCC-Patienten	96
4.10.3 Untersuchung der <i>miR-203a</i> - und <i>miR-455</i> -Expression im Vollblut von HNSCC-Patienten	101
5. Diskussion	102
5.1 Kritische Beurteilung des Patientenkollektivs für immunhistochemische Analysen	103
5.2 Relevanz von Sec62 als Biomarker bei HNSCCs	104
5.3 Relevanz von Survivin als Biomarker bei HNSCCs	106
5.4 Statistische Analyse von Subgruppen des Kollektivs	110
5.4.1 Betrachtung von Patienten mit unterschiedlicher Vitamin D-Versorgung	111
5.4.2 Betrachtung von Patienten mit unterschiedlicher tumoraler Sec62-Expression	112
5.4.3 Betrachtung von Patienten mit unterschiedlicher tumoraler Survivin-Expression der Zellkerne	114
5.4.4 Betrachtung von Patienten mit unterschiedlicher tumoraler Survivin-Expression des Zytoplasmas	114
5.5 Kritische Beurteilung des Patientenkollektivs und der Methodik für molekular-biologische Analysen	115
5.6 Stellenwert von <i>miR-101</i> bei Krebserkrankungen	117
5.7 Stellenwert von <i>miR-218</i> bei Krebserkrankungen	118
5.8 Stellenwert von <i>miR-203a</i> und <i>miR-455</i> bei Krebserkrankungen	120
5.9 Schlussfolgerungen und Ausblick	121
6. Literaturverzeichnis	122
7. Danksagung	143

0. Abkürzungsverzeichnis

µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Art.	Artikel
ATP	Adenosintriphosphat
BiP	Binding immunoglobulin protein
BIRC5	Baculoviral IAP Repeat Containing 5
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CdK-Inhibitors	cyclin-dependent kinases-Inhibitors
cDNA	complementary DNA
Ct	Crossing threshold
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DNA	Deoxyribonucleic acid
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
e.V.	eingetragener Verein
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
et al.	et alii
FFPE-Gewebeschnitte	formalin-fixed paraffin-embedded (tissue)
G	Grading
GATA6	GATA-binding protein 6
GDP	Guanosindiphosphat
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
Grp78	Glucose-regulated protein 78
GTP	Guanosintriphosphat
HNO	Hals-Nasen-Ohren
HNSCC	Head and Neck Squamous-Cell Carcinoma
HPV	human papilloma virus
IAPs	Inhibitors of Apoptosis
IRS	Immunreaktiver Score
kb	Kilobasen
LCR	Ligase Chain Reaction
M.	Musculus
miRNA	micro RNA
mL	Milliliter
N-Terminus	Amino-Terminus
ng	Nanogramm
NHL	Non-Hodgkin-Lymphome
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
NSCLCs	Non-small-cell lung cancer
OSCC	Oral squamous cell carcinoma

PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
pH	potentia hydrogenii
Pol II	Polymerase II
RT-qPCR	real-time quantitative PCR
Rb	Retinoblastom
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonucleic acid
RNC	Ribosome nascent chain complex
ROBO1	Roundabout guidance receptor 1
rpm	revolutions per minute
RT-Primer	reverse transcription-Primer
S.	Seite
sog.	sogenannt
TNM	Tumor-Node-Metastasis
u. / o.	und / oder
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslated region
UV-B-Strahlung	Ultraviolett- B-Strahlung
v.	von
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein
z.B.	zum Beispiel
ZfKD	Zentrum für Krebsregisterdaten

1. Summary

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is the sixth most common cancer worldwide and represents a heterogeneous disease which regroups various malignancies of different localizations. Despite large efforts in developing new treatments of cancer in the last years, prognosis of head and neck squamous cell carcinoma remains poor with a 5-year overall-survival of 50 to 60%. In part, this is due to a late detection of these malignancies and therefore frequent presence of lymph node or distant metastasis at this stage. Several risk factors and noxes which lead to the development of HNSCC (such as smoking, alcohol abuse or infection with human papillomavirus) have been identified a long time ago but only little is known about the molecular mechanisms that are responsible for the malignant transformation of the head and neck mucosa. Current scientific research attempts to identify biological markers which play an important role in tumorigenesis and allow to further characterize the cancer disease in terms of biological behaviour and prognosis.

The aim of this study consists in the simultaneous analysis of promising biomarker candidates in order to determine molecular patterns in HNSCC of prognostic value. For this project, we focused on the ER-transmembrane protein Sec62, which have previously been shown to be often overexpressed in HNSCC, as well as on the member of the inhibitor of apoptosis family Survivin, which occurs in both the cytoplasm and the nucleus of the cell and seems to fulfill different roles during cell cycle.

The tumor tissue of 98 patients was subjected to immunohistochemical analyses in order to determine the expression of Sec62, nuclear and cytoplasmic Survivin of the selected samples and to statistically correlate the results with corresponding clinical and pathological patients' data. Half of the 98 patients showed a deficiency in Vitamin D (25-(OH)₂-Vitamin D < 10ng/ml) while the other patients had normal serum levels of Vitamin D (25-(OH)₂-Vitamin D ≥ 10ng/ml). The differentiation into two groups of different serum levels of Vitamin D was performed as a response to published data suggesting a poorer prognosis of Vitamin D-deficient patients suffering from a malignancy in comparison to those patients with adequate serum Vitamin D levels. The immunohistochemical staining of the tumor samples was evaluated using two different semiquantitative immunoreactive scores. In accordance with previous studies, HNSCC patients with a Vitamin D deficiency showed a significantly lower overall survival than those with adequate serum levels of Vitamin D ($p = 0.016$). Furthermore, a high Sec62 staining of the tumor tissue was associated with a poorer prognosis in comparison to HNSCCs with a low expression of Sec62 ($p = 0.047$). In contrast to these results, the tumoral expression of nuclear or cytoplasmic Survivin had no significant effect on the patients' overall survival. However, a delayed tendency towards a survival benefit of HNSCCs with a high nuclear staining of Survivin was shown, indicating a possible protective influence of a high nuclear

Survivin expression. This effect was especially pronounced for larynx carcinomas, although no statistical significance could be reached. Finally, a more detailed analysis of subgroups was performed. For patients with a deficiency of Vitamin D, the tumoral expression of nuclear Survivin has been found to be significantly higher in HNSCCs of earlier T-stages compared to those of advanced T-stages supporting the role of nuclear Survivin as a protective factor ($p = 0.037$). Interestingly, the unfavorable prognostic effect of a high staining of Sec62 in HNSCCs seems to be mitigated in patients with adequate serum levels of Vitamin D.

Scientific research of the last decade has revealed differences in the miRNA-expression in normal and cancer tissue as well as in the blood of healthy people and patients who suffer from a malignancy, suggesting additional mechanisms in tumorigenesis based on over- or underexpression of these small non-coding RNA molecules. Therefore, blood samples of a part of the analyzed patients ($n = 29$) have been screened for the expression of selected miRNA-candidates that could influence the expression of Sec62 or Survivin by acting as a tumor suppressor or oncogene. To this end, blood samples' RNA including miRNA was isolated, first. Next, a reverse transcription of the isolated RNA and miRNA into cDNA was performed. Finally, the miRNA-expression was determined by real-time PCR experiments and correlated with clinicopathological data. In this study, no connection between the analyzed circulating miRNA (miR-101, miR-218) and the tumor expression of Sec62 and Survivin could be identified. Interestingly, downregulation of miR-101 was shown to be associated with the presence of distant metastasis ($p = 0.044$). Furthermore, patients with sufficient Vitamin D serum levels were shown to present a higher expression of circulating miR-218 ($p = 0.025$), suggesting a possible role of Vitamin D as a transcriptional factor. Regarding the small number of patients, further analyses on bigger patient collectives are required to verify these tendencies. For two of the selected miRNAs (miR-203a and miR-455), no signal could be detected during real-time PCR-experiments.

1. Zusammenfassung

Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region (*head and neck squamous cell carcinoma*; HNSCC) belegen den sechsten Platz der weltweit häufigsten Krebserkrankungen und stellen eine heterogene Erkrankung dar, welche verschiedene Malignome unterschiedlicher Lokalisationen umfasst. Mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 50 bis 60% bleibt die Prognose von Kopf-Hals-Tumoren trotz bemerkenswerter Fortschritte in der Krebstherapie schlecht. Zum Teil ist dieser Umstand auf eine späte Diagnosestellung und, damit einhergehend, den häufigen Nachweis von Lymphknoten- und Fernmetastasen zurückzuführen. Risikofaktoren, welche die Entwicklung von Plattenepithelkarzinomen begünstigen (wie beispielsweise Nikotin- und Alkoholabusus oder Infektionen mit humanen Papillomaviren), sind bereits seit mehreren Jahren bekannt. Bisher weiß man jedoch nur wenig über die molekularen Mechanismen, welche zur malignen Transformation der Schleimhäute des Kopf-Hals-Bereichs beitragen. Aktuelle Studien arbeiten an der Identifikation von Biomarkern, denen eine Schlüsselrolle in der Tumorgenese zukommt und welche eine genauere Charakterisierung der Malignome hinsichtlich biologischem Verhalten und Prognose erlauben.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der simultanen Analyse vielversprechender Biomarker-Kandidaten zur Bestimmung molekularer „Muster“ von prognostischer Relevanz in Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region. Wir fokussierten uns hauptsächlich auf das ER-Transmembranprotein Sec62, welches in HNSCCs oft überexprimiert wird, sowie Survivin, einen Vertreter der *Inhibitors-of-apoptosis*-Familie, welcher sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma von HNSCCs nachweisbar ist und verschiedene Aufgaben während des Zellzyklus erfüllt.

Tumorgewebeproben von insgesamt 98 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region wurden immunhistochemischen Analysen unterzogen, mit dem Ziel, die Expression von Sec62, nukleärem und zytoplasmatischem Survivin im Tumorgewebe zu bestimmen und diese mit den korrespondierenden klinischen und pathologischen Patientendaten zu korrelieren. Die Hälfte der 98 Patienten wiesen einen Vitamin D-Mangel ($25\text{-(OH)}_2\text{-Vitamin D} < 10\text{ng/ml}$) auf, während bei der anderen Hälfte normale Serum-Vitamin D-Spiegel ($25\text{-(OH)}_2\text{-Vitamin D} \geq 10\text{ng/ml}$) vorlagen. Diese Unterteilung wurde vorgenommen, weil Studien der vergangenen Jahre eine schlechtere Prognose von HNSCC-Patienten mit einem Vitamin D-Mangel im Vergleich zu solchen mit ausreichender Vitamin D-Versorgung nachweisen konnten. Die Auswertung der immunhistochemischen Analysen erfolgte anhand zweier semiquantitativer immunreaktiver Scores. In Übereinstimmung mit der aktuellen Datenlage in der Literatur wiesen in der vorliegenden Arbeit Patienten mit einem Vitamin D-Mangel im Vergleich zu solchen mit normalen Vitamin D-Spiegeln ein signifikant schlechteres

Gesamtüberleben auf ($p = 0.016$). Außerdem war eine hohe Sec62-Expression des Tumorgewebes im Vergleich zu einer niedrigen Sec62-Expression mit einer signifikant schlechteren Prognose assoziiert ($p = 0.047$). Dagegen hatte die tumorale Expression von nukleärem und zytoplasmatischem Survivin keinen signifikanten Effekt auf das Gesamtüberleben der Patienten. Allerdings zeigte sich eine Tendenz in Richtung eines Überlebensvorteils von Patienten mit einer hohen nukleären Survivin-Expression, welche einen möglichen protektiven Einfluss einer hohen nukleären Survivin-Expression suggeriert. Dieser Zusammenhang war für Larynx-Karzinome am deutlichsten ausgeprägt, wenngleich keine statistische Signifikanz erreicht werden konnte. Im weiteren Verlauf wurde eine Untersuchung von Untergruppen vorgenommen. Für Patienten mit einem Vitamin D-Mangel konnte gezeigt werden, dass HNSCCs früherer T-Stadien im Vergleich zu denjenigen fortgeschrittener T-Stadien eine signifikant höhere Survivin-Expression aufwiesen ($p = 0.037$). Diese Beobachtung unterstützt die These des protektiven Einflusses einer erhöhten nukleären Survivin-Expression. Interessanterweise schien darüber hinaus eine ausreichende Vitamin D-Versorgung den prognostisch negativen Einfluss einer hohen tumoralen Sec62-Expression zu verzögern.

Anhand wissenschaftlicher Arbeiten des vergangenen Jahrzehnts konnte gezeigt werden, dass sich gesundes und entartetes Gewebe hinsichtlich ihrer miRNA-Expression unterscheiden. Dies gilt ebenfalls für die Expression zirkulierender miRNAs im Blut von gesunden Patienten und Patienten mit einer malignen Erkrankung. Diese Erkenntnisse lassen auf zusätzliche Mechanismen der Tumorgenese schließen, welche auf einer Über- bzw. Unterfunktion dieser kleinen, nicht-codierenden RNA-Moleküle basieren. Von einem Teil des Kollektivs dieser Arbeit ($n = 29$) standen Vollblutproben zur Verfügung, welche hinsichtlich der Expression von bestimmten miRNAs untersucht wurden, die wiederum Einfluss auf die tumorale Sec62- bzw. Survivin-Expression nehmen könnten. Zunächst isolierten wir die in den Vollblutproben enthaltene RNA inklusive miRNA. In einem nächsten Schritt erfolgte die reverse Transkription der isolierten RNA und miRNA in cDNA. Schließlich wurde die miRNA-Expression mittels *real-time* PCR bestimmt und anschließend mit klinisch-pathologischen Patientendaten korreliert. In dieser Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen den analysierten zirkulierenden miRNAs (miR-101, miR-218) und der tumoralen Expression von Sec62 und Survivin festgestellt werden. Eine Herunterregulierung von miR-101 war jedoch mit dem Vorliegen von Fernmetastasen assoziiert ($p = 0.044$). Außerdem wiesen Patienten mit einer ausreichenden Vitamin D-Versorgung eine höhere Expression von miR-218 im Blut auf ($p = 0.025$), woraus sich eine mögliche Rolle von Vitamin D als Transkriptionsfaktor ableiten lässt. Aufgrund der geringen Fallzahlen sind zur Bestätigung der beschriebenen Tendenzen weitere Analysen an größeren Kollektiven erforderlich. Für zwei der untersuchten miRNAs (miR-203a und miR-455) konnte kein Signal in der *real-time* PCR detektiert werden.

2. Einleitung

2.1 Einführung

Krebserkrankungen stellen nach wie vor die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar und werden lediglich von Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems übertroffen (Daten des Statistischen Bundesamtes, Wiesbaden, 2014). Aus Schätzungen des Zentrums für Krebsregisterdaten (ZfKD) im Robert Koch-Institut geht hervor, dass die Zahl der neu diagnostizierten Krebserkrankungen in Deutschland im Jahre 2014 bei insgesamt rund 476.000 lag. Die Aufteilung nach Geschlechtern ergab 249.200 Krebsneuerkrankungen bei Männern und 227.000 bei Frauen. Spitzenreiter sind dabei bösartige Neubildungen von Brustdrüse, Darm, Prostata und Lunge (Robert Koch-Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2013).

Statistisch gesehen erkrankt zurzeit jeder Zweite im Laufe seines Lebens an Krebs. Dabei treten Krebserkrankungen bei Frauen zwar seltener, dafür aber bereits früher auf als bei Männern. Das ist der Grund, weshalb zurzeit die Erkrankungsraten für Krebs bei Frauen unter 55 Jahren noch höher sind als die von Männern in der gleichen Altersklasse. Dem steht allerdings ein fast doppelt so hohes Erkrankungsrisiko bei Männern über 65 Jahren im Vergleich zu Frauen gleichen Alters gegenüber. Aufgrund derzeitiger demographischer Entwicklungen in Richtung einer zunehmend älter werdenden Bevölkerung ist für beide Geschlechter ein Anstieg der absoluten Anzahl der Krebsneuerkrankungen zu beobachten (Anstieg bei Männern um 6%, bei Frauen um 9%). Nach der Altersstandardisierung liegt der Anstieg der Erkrankungsraten bei Frauen immerhin noch bei 3%, bei Männern hingegen detektiert man auf diese Weise einen Rückgang um 10%. Ein möglicher Erklärungsansatz für diese gegensätzliche Entwicklung sind die veränderten Rauchgewohnheiten und eine Verschiebung der Inzidenz von Neoplasien der Lunge in Richtung des weiblichen Geschlechts. Bei den altersstandardisierten Sterberaten ist für beide Geschlechter zwischen den Jahren 2005 und 2015 ein Rückgang zu beobachten (Abnahme bei Männern um 12%, bei Frauen um 7%). Auch hier ist jedoch aufgrund der demographischen Gegebenheiten ein Anstieg der absoluten Zahlen zu vermerken, der für Männer um 10%, bei Frauen um 4% liegt (Robert Koch-Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2013).

Für das Jahr 2018 geht man von weltweit 18,1 Millionen Krebsneuerkrankungen und 9,6 Millionen durch Krebs induzierten Todesfällen aus. In Asien ist die Inzidenz von Krebserkrankungen mit etwa der Hälfte aller weltweit auftretenden Fälle besonders hoch, nicht zuletzt aufgrund der Tatsache, dass ca. 60% der Weltbevölkerung auf diesem Kontinent beheimatet ist. 23,4% der neu

diagnostizierten Krebserkrankungen und 20,3% der Krebstodesfälle sind in Europa zu verzeichnen (Bray *et al.*, 2010).

Die meisten bösartigen Neoplasien entstammen den Epithelien, also den äußeren und inneren Körperoberflächen. Dabei handelt es sich in 15% der Fälle um Plattenepithelkarzinome, Urothelkarzinome oder kleinzellige Karzinome (Robert Koch-Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2013). Eine international anerkannte Einteilung der Plattenepithelkarzinome aus dem Hals-Nasen-Ohren-Bereich sieht eine Differenzierung in Mundhöhlen-, Nasopharynx-, Oropharynx-, Hypopharynx- und Larynx-Karzinome vor. Für das Jahr 2018 liegen die Zahlen der Erstdiagnosen für Lippen- und Mundhöhlenkarzinome bei 354.864, für Nasopharynx-Karzinome bei 129.079, für Oropharynx-Karzinome bei 92.887, für Hypopharynx-Karzinome bei 80.608 und für Larynx-Karzinome bei 177.422. Die Todeszahlen lauten wie folgt: Lippen- und Mundhöhlenkarzinome 177.384, Nasopharynx-Karzinome 72.987, Oropharynx-Karzinome 51.005, Hypopharynx-Karzinome 34.984 und Larynx-Karzinome 94.771 (Bray *et al.*, 2010). Lippen- und Mundhöhlenkarzinome stellen demnach in beiden Fällen die größte Entität dar.

2.2 Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region

Als Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region (Head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) werden bösartige Neubildungen bezeichnet, welche ihren Ursprung im Epithel des oberen Aerodigestivtraktes (Nasenhaupt- und -nebenhöhlen, Mundhöhle inklusive Zunge, Pharynx mit der Unterteilung in Naso- Oro- und Hypopharynx sowie Larynx) haben. Aus der Übersicht zu den Krebsneuerkrankungen und Krebssterbefällen in Deutschland des Robert Koch-Instituts geht hervor, dass im Jahre 2014 Tumoren von Mundhöhle und Rachen bei Männern den 9. und bei Frauen den 15. Platz der häufigsten Tumorlokalisationen belegten. Dies entspricht 9130 Neuerkrankungen bei Männern und 3700 Neuerkrankungen bei Frauen. Tumoren des Larynx sind mit 2980 Erstdiagnosen bei Männern und 520 Neuerkrankungen bei Frauen etwas seltener (Robert Koch-Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2013). Weltweit stellen HNSCCs ca. 5% aller Krebserkrankungen dar (Ferlay *et al.*, 2010). In der vorliegenden Arbeit werden Plattenepithelkarzinome der Lokalisationen Mundhöhle, Oropharynx, Hypopharynx und Larynx untersucht.

2.2.1 Risikofaktoren und Ätiologie

Alkohol und Tabak

Bereits im frühen 20. Jahrhundert fiel auf, dass überdurchschnittlich viele Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren Raucher waren u./o. einen starken Alkoholkonsum aufwiesen (Abbe *et al.*, 1915). Erste

Quantifizierungen dieser Beobachtungen wurden jedoch erst ab den 1950er Jahren vorgenommen (Wynder *et al.*, 1957). Dabei wurden beide Einflussfaktoren allerdings meist gemeinsam betrachtet. Heute geht man davon aus, dass 75% der Kopf-Hals-Tumoren durch das Zusammenspiel beider Noxen hervorgerufen werden, wobei sich ihre Effekte nicht additiv sondern multiplikativ verhalten (Blot *et al.*, 1988).

In einer Metaanalyse des International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortiums wurde der getrennte Einfluss der beiden Noxen Alkoholabusus und Tabakkonsum auf die Entstehung von Tumoren der Kopf-Hals-Region untersucht (Hashibe *et al.*, 2007). Für Alkoholkonsumenten, die nie geraucht haben, konnte bei Genuss von drei oder mehr Drinks pro Tag ein zweifach erhöhtes Risiko für Kopf-Hals-Tumoren im Gegensatz zu Nichttrinkern nachgewiesen werden. Bezogen auf die unterschiedlichen Tumorlokalisationen lässt sich festhalten, dass das Risiko an Rachenkrebs zu erkranken bereits bei einem täglichen Alkoholkonsum von einem bis zwei Drinks erhöht ist, während für Larynx-Karzinome erst bei fünf oder mehr Drinks pro Tag eine deutliche Risikoerhöhung zu verzeichnen ist. Das kanzerogene Potential alkoholischer Getränke scheint sich demnach besonders im Bereich des Pharynx zu entfalten (Hashibe *et al.*, 2007). Das Risiko für die Entwicklung von Kopf-Hals-Tumoren ist jedoch abhängig von der Art des regelmäßig konsumierten alkoholischen Getränks. Während insbesondere der übermäßige Genuss von Bier oder hochprozentigen Drinks mit einem hohen Risiko einhergeht, scheint ein Weinkonsum unter vier Drinks pro Tag nicht mit einer Risikoerhöhung vergesellschaftet zu sein. Ein möglicher Erklärungsansatz ist die schädliche Wirkung von Inhaltsstoffen hochprozentiger alkoholischer Getränke, wie z.B. Nitrosaminen oder polyzyklischen Kohlenwasserstoffen (Blot *et al.*, 1988).

Für Raucher, die keinen Alkohol konsumieren, ist das Risiko für Kopf-Hals-Tumoren ebenfalls erhöht. Ein besonders eindeutiger Zusammenhang besteht für Tumoren des Kehlkopfes (7-fach erhöhtes Risiko) (Hashibe *et al.*, 2007). In einer Studie von Vineis *et al.* ist das Risiko für Kehlkopftumoren sogar 10-fach höher als das von Nichtrauchern (Vineis *et al.*, 2004). Mundhöhle und Rachen scheinen hingegen weniger betroffen zu sein (Hashibe *et al.*, 2007; Vineis *et al.*, 2004). Es besteht eine Dosis-Wirkungsbeziehung sowohl für die Dauer und Häufigkeit des Zigarettenkonsums als auch für den kumulativen Zigarettenkonsum (Zigarettenpackungen pro Jahr) (Blot *et al.*, 1988; Hashibe *et al.*, 2007). Interessanterweise ist das Risiko unabhängig von der Art der Tabakaufnahme (Zigarette, Zigarre, Pfeife, rauchfreie Einnahmeformen [Kaugummi, nasal]) (Blot *et al.*, 1988; Hashibe *et al.*, 2007). Interessant ist auch die Beobachtung, dass das Risiko für Kopf-Hals-Krebs wieder sinkt, wenn das Rauchen unterlassen wird: nach einem rauchfreien Intervall von 10 Jahren ist, wenn überhaupt, nur noch ein geringfügig erhöhtes Risiko vorhanden (Blot *et al.*, 1988; Altieri *et al.*, 2002). In einer

Studie von Altieri *et al.* sinkt das Risiko nach 10 rauchfreien Jahren um mehr als 70% (Altieri *et al.*, 2002). Bei Männern, die ausschließlich Filterzigaretten geraucht haben, beträgt das Risiko für Kopf-Hals-Tumoren 50% des Risikos von Männern, die ausnahmslos filterlose Zigaretten konsumierten. Bei Mischkonsum liegt das Risiko bei 80% desjenigen von Konsumenten filterloser Zigaretten. Für das weibliche Geschlecht sind die Unterschiede weniger deutlich (Blot *et al.*, 1988).

Humane Papillomaviren

Bei den humanen Papillomaviren (HPV) handelt es sich um etwa 55nm kleine Viruspartikel ohne Hülle aus der Familie der Papillomaviridae (Longworth *et al.*, 2004; Betiol *et al.*, 2013). Von etwa 40 Virustypen ist bekannt, dass sie die Schleimhaut der Anogenitalregion befallen können. Humane Papillomaviren mit onkogenem Potential (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 und 66) werden als *high-risk*-HPV bezeichnet und sind für die Entstehung von Zervix- und Anal-Karzinomen verantwortlich. *Low-risk*-Typen (HPV 6, 11, 40, 42, 43 und 54) führen zur Ausbildung von anogenitalen Feigwarzen (Condylomata acuminata), eine Entartung der befallenen Zellen wird jedoch nicht beobachtet (Betiol *et al.*, 2013).

Die etwa 8 kb große doppelsträngige Virus-DNA befindet sich in einem ikosaedrischen Kapsid, das sich aus den Virusproteinen L1 und L2 zusammensetzt (Longworth *et al.*, 2004; Betiol *et al.*, 2013). Das virale Genom lässt sich in drei Abschnitte unterteilen: die frühe (early) E-Region, welche für Proteine der viralen Replikation und Transkription codiert, die späte (late) L-Region, welche die Information für die Kapsidproteine L1 und L2 enthält und eine nicht codierende Region (LCR) mit regulatorischen cis-Elementen für Replikation und Transkription (Betiol *et al.*, 2013).

Als Zielzellen der HPV-Viren fungieren die Zellen des Stratum basale der Epithelien von Haut und Schleimhäuten. Man geht davon aus, dass kleinste Läsionen des gesunden Epithels als Eintrittspforte für die Viren dienen; der Oberflächenrezeptor für HPV-Viren ist jedoch unbekannt. Es gilt jedoch als gesichert, dass u.a. heparansulfatmodifizierte Proteoglykane bei der Adhäsion der Viren an die Zielzelle eine entscheidende Rolle spielen (Longworth *et al.*, 2004). Die Zellen der basalen Schicht von Epithelien zeichnen sich durch eine hohe Teilungsrate aus und dienen zur Erneuerung der suprabasal liegenden Zellschichten. In diesen Stammzellen beginnen die HPV-Viren mit der Produktion erster viraler Proteine wie z.B. den Replikationsfaktoren E1 und E2. Letztere sind u.a. dazu in der Lage, Polymerasen und weitere Mitspieler der zelleigenen Replikationsmaschinerie für die Vermehrung der viralen DNA zu rekrutieren (Longworth *et al.*, 2004).

Mithilfe weiterer viraler Proteine verhindern HPV-Viren, dass die Epithelzellen im Laufe ihrer Differenzierung die S-Phase des Zellzyklus verlassen. Als pathologisch-anatomisches Korrelat dieser

Tatsache weisen infizierte Epithelien auch in den obersten Epithelschichten noch Zellkerne auf. Auf diese Weise bleibt die Replikation des viralen Erbgutes erhalten (Longworth *et al.*, 2004). Das virale Onkoprotein E6 vermag mit dem körpereigenen Tumorsuppressor p53 zu interagieren. Mithilfe des p53-Proteins kann bei Vorliegen von DNA-Schäden der Zellzyklus mit dem Ziel der Einleitung von Reparaturvorgängen angehalten oder die Apoptose eingeleitet werden. Dies geschieht u.a. durch die gesteigerte Expression des CdK-Inhibitors p21. In mit HPV infizierten Keratinozyten wird der proapoptotische Effekt des p53 übergangen: durch die Ausbildung eines Komplexes aus E6, p53 und einer Ubiquitin-Ligase erfolgt der Proteasomen-vermittelte Abbau von p53 (Longworth *et al.*, 2004). Für die Unsterblichkeit infizierter Zellen sind jedoch zusätzlich das virale E7-Protein und seine Wirkung auf den Retinoblastom-Tumorsuppressor (Rb) erforderlich. Die unphosphorylierte Form von Rb bildet in der G0-Phase des Zellzyklus mit dem Transkriptionsfaktor E2F einen Komplex und verhindert so den Eintritt in die S-Phase. Beim Übergang von der G1 zur S-Phase wird Rb durch cyclinabhängige Kinasen phosphoryliert, woraufhin es sich aus dem Komplex mit E2F löst und der Zellzyklus angetrieben wird. Das virale E7 verhindert ein erneutes Interagieren von Rb mit E2F und induziert darüber hinaus dessen Degradierung über Proteasomen (Longworth *et al.*, 2004).

In etwa jedem dritten Plattenepithelkarzinom des Oropharynx lässt sich HPV-DNA nachweisen, verglichen mit etwa 1/5 - 1/4 aller Larynx- und Mundhöhlenkarzinome. Ähnlich dem Übergangsepithel der Cervix uteri scheint das Nebeneinander von Plattenepithel und lymphatischem Gewebe im Oropharynx das Gewebe für den Virusbefall zu prädisponieren. Eine weitere Analogie besteht in der Prävalenz der einzelnen HPV-Typen: wie beim Zervixkarzinom ist HPV 16 der am häufigsten vertretene Typ in Oropharynx-Karzinomen. Im Gegensatz dazu sind andere HPV-Typen (HPV 31, 33, 35, 45, 56, 58, und 59), die bei Zervixkarzinomen keine Seltenheit sind, im HNO-Bereich wenn überhaupt nur vereinzelt auffindbar. Zweithäufigster Virustyp in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs ist HPV 18 (Kreimer *et al.*, 2005). HNSCCs mit positivem HPV-Status finden sich insbesondere bei jüngeren Patienten, zeigen bessere Ansprechraten auf Chemotherapie und Bestrahlung und haben eine günstigere Prognose als Tumoren ohne HPV-Genese (Marur *et al.*, 2010). Die Prävalenz HPV-positiver Oropharynx-Karzinome steigt mit der Anzahl an Sexualpartnern (vaginaler u./o. analer Geschlechtsverkehr) und einem unregelmäßigen Gebrauch von Kondomen. Weiterhin ist das Risiko einer HPV-Infektion umso höher, je früher der erste Geschlechtsverkehr stattfindet (D'Souza *et al.*, 2007).

2.2.2 Klassifikation

Das TNM-System stellt ein international gebräuchliches Klassifikationssystem bösartiger Neoplasien dar. Es berücksichtigt die lokale Ausdehnung des Primärtumors (T) und erlaubt darüber hinaus eine Aussage über das Vorliegen von Lymphknoten- (N) u./o. Fernmetastasen (M). Tumoren lassen sich

dabei sowohl pathologisch anhand makroskopischer und histologischer Kriterien als auch klinisch durch die Zusammenschau der Ergebnisse aus Anamnese, körperlicher Untersuchung und Bildgebung nach der TNM-Klassifikation beurteilen. Eine Unterscheidung beider Systeme erfolgt durch die zusätzliche Verwendung von Präfixen, wobei "p" für die pathologische und "c" für die klinische Einteilung stehen (Wittekind *et al.*, 2001; Wittekind *et al.*, 2005; Barnes *et al.*, 2005). Ein Überblick über die TNM-Klassifikation von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region findet sich in Tabelle 1. Da das *Staging* der in dieser Arbeit untersuchten histologischen Präparate bereits vor Inkrafttreten der neuesten Klassifikationskriterien (8. Edition) erfolgte, wird hier aus Gründen der Nachvollziehbarkeit die damals aktuelle TNM-Klassifikation (7. Edition) angeführt.

Tabelle 1: TNM-Klassifikation von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region (Wittekind *et al.*, 2005; Barnes *et al.*, 2005)

T-Stadium	Kriterien
T	Primärtumor
Tx	Beurteilung des Primärtumors nicht möglich
T0	Kein Hinweis auf einen Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
Mundhöhle	
T1	Tumor ≤ 2 cm in größter Ausdehnung
T2	Tumor > 2 cm, aber ≤ 4 cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor > 4 cm in größter Ausdehnung
T4a	Infiltration von Nachbarstrukturen wie kortikaler Knochen, äußere Zungenmuskulatur (M. genioglossus, M. hyoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), Kieferhöhle oder Gesichtshaut
T4b	Infiltration von Nachbarstrukturen wie Mastikatorraum, Pterygoidplatten oder Schädelbasis; oder Tumor umschließt die A. carotis interna
Oropharynx	
T1	Tumor ≤ 2 cm in größter Ausdehnung
T2	Tumor > 2 cm, aber ≤ 4 cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor > 4 cm in größter Ausdehnung
T4a	Infiltration von Nachbarstrukturen wie Larynx, äußere Zungenmuskulatur (M. genioglossus, M. hyoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), Lamina medialis des Processus pterygoideus, harter Gaumen oder Unterkiefer
T4b	Infiltration von Nachbarstrukturen wie M. pterygoideus lateralis, Lamina lateralis des Processus pterygoideus, Schädelbasis; oder Tumor umschließt die A. carotis interna

Hypopharynx	
T1	Tumor ist auf einen Unterbezirk des Hypopharynx begrenzt und ≤ 2 cm in größter Ausdehnung
T2	Tumor infiltriert mehr als einen Unterbezirk des Hypopharynx oder einen benachbarten Bezirk oder hat eine Größe von > 2 cm, aber ≤ 4 cm in größter Ausdehnung, ohne Fixation des Hemilarynx
T3	Tumor > 4 cm in größter Ausdehnung oder Primärtumor mit Fixation des Hemilarynx
T4a	Infiltration von Nachbarstrukturen wie Schild-/Ringknorpel, Zungenbein, Schilddrüse, Ösophagus, zentrale Weichteile des Halses
T4b	Tumor infiltriert die prävertebralen Faszien, umschließt die A. carotis interna oder befällt Strukturen des Mediastinums
Larynx	
T1	Tumor auf einen Unterbezirk (Supraglottis, Glottis oder Subglottis) begrenzt, bewegliche Stimmlippe
T1a	Eine Stimmlippe ist befallen
T1b	Beide Stimmlippen sind befallen
T2	Ausdehnung des Tumors auf zwei Unterbezirke, Stimmlippe bei Befall nur eingeschränkt beweglich
T3	Ausdehnung des Tumors auf mehr als zwei Unterbezirke, Stimmlippen bei Befall fixiert
T4a	Tumor durchbricht den Schildknorpel und/oder breitet sich außerhalb des Kehlkopfes aus (Halsweichteile, Trachea, Ösophagus, Schilddrüse, äußere Zungenmuskulatur, gerade Halsmuskulatur)
T4b	Tumor infiltriert den Prävertebralraum, umschließt die A. carotis interna oder befällt Strukturen des Mediastinums
N-Stadium	Kriterien
N	Vorhandensein von regionären Lymphknotenmetastasen (hier: Halslymphknoten)
Nx	Beurteilung der regionären Halslymphknoten nicht möglich
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Befall eines ipsilateralen Lymphknotens, ≤ 3 cm in größter Ausdehnung
N2a	Befall eines ipsilateralen Lymphknotens, > 3 cm, aber ≤ 6 cm in größter Ausdehnung
N2b	Befall mehrerer ipsilateraler Lymphknoten, ≤ 6 cm in größter Ausdehnung
N2c	Bilateraler oder kontralateraler Lymphknoten-Befall, ≤ 6 cm in größter Ausdehnung
N3	Befall von Lymphknoten mit > 6 cm in größter Ausdehnung
M-Stadium	Kriterien
M	Vorhandensein von Fernmetastasen
Mx	Beurteilung von Fernmetastasen nicht möglich
M0	Kein Nachweis von Fernmetastasen

M1	<p>Nachweis von Fernmetastasen</p> <p>Von Fernmetastasen betroffene Organe werden durch Affixe gekennzeichnet:</p> <p>LYM: Lymphknoten</p> <p>PUL: Lunge</p> <p>HEP: Leber</p> <p>BRA: ZNS</p> <p>SKI: Haut</p> <p>ADR: Nebenniere</p> <p>OSS: Knochen</p> <p>MAR: Knochenmark</p> <p>PLE: Pleura</p> <p>PER: Peritoneum</p> <p>OTH: Andere</p>
----	---

2.2.3 Prognose

Wie bereits erwähnt, werden Plattenepithelkarzinome aus dem Kopf-Hals-Bereich in der Literatur als HNSCCs zusammengefasst. Unter prognostischen Gesichtspunkten ist es jedoch angebracht, die unterschiedlichen Tumorentitäten gesondert zu betrachten. So haben etwa Plattenepithelkarzinome des Oropharynx oft eine bessere Prognose als andere HNSCCs, da diese öfter eine HPV-basierte Tumorgenese aufweisen (Marur *et al.*, 2010). Larynxkarzinome haben aufgrund der besseren Möglichkeiten einer radikalen Tumorsektion ebenfalls eine günstigere Prognose als andere Tumorentitäten. Im Wesentlichen hängt die Prognose jedoch vom jeweiligen Tumorstadium ab, welches anhand der TNM-Klassifikation definiert wird. Insbesondere das Vorliegen von Lymphknoten- und Fernmetastasen verschlechtert die Prognose erheblich und erfordert nicht selten eine Intensivierung oder gar eine Umstellung der Therapie. Da bei etwa 50% der HNSCC-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits Lymphknotenmetastasen vorliegen, ist die Therapie oft langwierig und das *Outcome* als eher schlecht einzustufen (Magnano *et al.*, 1999).

Trotz einheitlicher Therapieschemata an Tumoren identischer Lokalisation und Histologie unterscheiden sich die Ansprechraten der Patienten zum Teil erheblich (Burri *et al.*, 2009). Aus diesem Grund liegt ein wissenschaftlicher Schwerpunkt in der Identifikation möglicher molekularer Marker, welche eine fallbezogene Aussage über die Prognose des jeweiligen Patienten ermöglichen. Dies setzt jedoch die Kenntnis molekularer Mechanismen der Karzinogenese von HNSCCs voraus, welche ebenfalls Gegenstand aktueller Forschung sind.

2.3 Vitamin D

Vitamin D₃ (Calcitriol bzw. 1,25-Dihydroxycholecalciferol) ist ein Vertreter der menschlichen Steroide. Das in der Haut gespeicherte Provitamin D₃ (7-Dehydrocholesterin) wird durch die UV-B-Strahlung des Sonnenlichts in Cholecalciferol umgewandelt. Letzteres wird in der Leber unter dem Einfluss der 25-Hydroxylase zu 25-Hydroxy-Cholecalciferol hydroxyliert. Eine zweite Hydroxylierung findet in der Niere statt; das verantwortliche Enzym ist die 1-alpha-Hydroxylase. Es resultiert die biologisch aktive Form 1,25-Dihydroxycholecalciferol.

Vitamin D nimmt neben Parathormon und Calcitonin eine Schlüsselrolle in der Regulation des Calcium- und Phosphat-Haushaltes des menschlichen Organismus ein. So steigert Calcitriol die intestinale Calcium-Resorption und folglich den Plasma-Calciumspiegel. Die erhöhte Konzentration an frei zirkulierenden Calcium-Ionen im Blut wirkt inhibierend auf die Parathormon-Sekretion aus den Epithelkörperchen. Das Gleichgewicht zwischen Knochenauf- (Osteoblasten) und -abbau (Osteoklasten) verschiebt sich zugunsten des Aufbaus der Knochenmatrix mit verstärkter Mineralisierung. Neben einer gesteigerten intestinalen Calcium-Resorption kommt es unter dem Einfluss von Vitamin D weiterhin zu einer vermehrten intestinalen Phosphatresorption sowie zu einer erhöhten Reabsorption von Calcium in der Niere. Eine suffiziente Versorgung mit Vitamin D erhöht die Knochendichte (Dawson-Hughes *et al.*, 1997), reduziert das Risiko pathologischer Frakturen (Sato *et al.*, 2005) und senkt signifikant die Sturzrate im Alter (Broe *et al.*, 2007).

Neben diesen Wirkungen auf Mineralhaushalt und Knochenstoffwechsel scheint Vitamin D auch antitumoröse Eigenschaften zu besitzen. Bereits in den 1940er Jahren fiel auf, dass Landarbeiter und Soldaten der US-Navy, welche berufsbedingt eine hohe Sonnenexposition aufwiesen, signifikant weniger Malignome entwickelten als vergleichbare Populationen mit geringerer Sonnenexposition. Bei beiden Berufsgruppen war allerdings eine höhere Inzidenz an bösartigen Hauttumoren zu verzeichnen (Peller *et al.*, 1937; Apperly *et al.*, 1941). In späteren Arbeiten konnte ein Zusammenhang zwischen niedrigen Vitamin D-Serumspiegeln und der Inzidenz verschiedener Tumorentitäten (darunter Mammakarzinom, Prostatakarzinom, kolorektales Karzinom sowie HNSCC) nachgewiesen werden (Giovanucci *et al.*, 2006; Garland *et al.*, 2006; Feskanich *et al.*, 2004).

Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich zeigen im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen mehrheitlich eine Unterversorgung mit Vitamin D (Orell-Kotikangas *et al.*, 2012; Bochen *et al.*, 2018), welche unabhängig vom Ernährungszustand beider Gruppen ist (Bochen *et al.*, 2018). Niedrige Vitamin D-Serumspiegel korrelieren bei diesen Patienten mit dem Vorliegen von Lymphknotenmetastasen sowie einer signifikant geringeren Überlebensrate. Patienten mit HPV-

positiven HNSCCs weisen höhere Vitamin D-Spiegel und signifikant bessere Überlebensraten auf als solche mit HPV-negativen Tumoren (Bochen *et al.*, 2018).

Bochen *et al.* untersuchten den Einfluss von Vitamin D auf die tumorgerichtete Immunreaktion, indem sie histologisch die peri- und intratumorale Infiltration mit Zellen des Immunsystems analysierten. Die Unterscheidung zwischen den beteiligten Abwehrzellen erfolgte anhand zellspezifischer Oberflächenproteine, welche als Targets für die immunhistochemische Darstellung dienten. Bei Patienten mit hohen Vitamin D-Serumspiegeln konnte im Vergleich zu solchen mit Vitamin D-Mangel eine signifikant höhere peri- und intratumorale Infiltration mit CD3⁺ T-Zellen, CD4⁺ T-Helferzellen, CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen, NK-Zellen, CD68⁺-Makrophagen und M1-Makrophagen sowie eine tendenziell geringere peritumorale Infiltration mit M2-Makrophagen nachgewiesen werden. Die intratumorale Infiltration mit zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen sowie die peritumorale Infiltration mit CD3⁺ T-Zellen und T-Helferzellen sind mit einer signifikant höheren Überlebensrate assoziiert, wohingegen die intratumorale Infiltration mit M2-Makrophagen mit einer verkürzten Überlebensrate einhergeht. Nicht zuletzt führte eine Substitution von Vitamin D bei Patienten mit Vitamin D-Defizienz zu einer erhöhten zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen (Bochen *et al.*, 2018).

2.4 Sec62

Obwohl bereits vor längerer Zeit Nikotinkonsum, Alkoholabusus (Blot *et al.*, 1988; Hashibe *et al.*, 2007; Vineis *et al.*, 2004) und Schleimhaut-Infektionen mit *high-risk* humanen Papillomaviren (Marur *et al.*, 2010) als entscheidende Noxen am Beginn der Tumorgenese von Kopf-Hals-Tumoren identifiziert worden sind, fehlt auch heute noch ein eindeutiges Konzept, welches die molekularbiologischen Vorgänge beschreibt, die zur Entartung von Zellen in diesem Bereich beitragen.

Aus einer Vielzahl von molekulargenetischen Untersuchungen der vergangenen Jahre geht hervor, dass bestimmten Tumorentitäten, darunter nichtkleinzellige Lungenkarzinome, Zervix-, Ösophagus- und Prostatakarzinome, eine Amplifizierung des langen Arms von Chromosom 3 (3q) gemeinsam ist (Chujo *et al.*, 2002; Caraway *et al.*, 2008; Yen *et al.*, 2005; Sattler *et al.*, 2000). Auch in Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region konnte diese genetische Alteration nachgewiesen werden und sie stellt gleichzeitig die häufigste genetische Modifikation dieser Entität dar (Bockmühl *et al.*, 1996; Abou-Elhamd *et al.*, 2008). Der Schluss liegt nahe, dass besagter Chromosomenabschnitt für ein oder mehrere Onkogene codiert, welche eine maligne Entartung

von Zellen unterschiedlicher Organe initiieren. Aus mehreren infrage kommenden Zielgenen wie beispielsweise *PIK3CA*, *FXR1*, *CLPM1*, *EIF4G* und *P63* (Yamamoto *et al.*, 2008; Comtesse *et al.*, 2007; Bauer *et al.*, 2002; Massion *et al.*, 2003) hat sich *SEC62* als ein vielversprechendes Onkogen hervorgetan (Jung *et al.*, 2006).

SEC62 codiert für ein Transmembranprotein des endoplasmatischen Retikulums (Sec62), dessen Funktion noch nicht gänzlich geklärt ist (Deshaies *et al.*, 1990). Aus den Ergebnissen erster Studien geht jedoch hervor, dass Sec62 sowohl eine Rolle beim intrazellulären Transport von Proteinen (Lakkaraju *et al.*, 2012; Lang *et al.*, 2012) als auch im Rahmen der zellulären Calciumhomöostase (Linxweiler *et al.*, 2013) spielen könnte. Auch bei der Bewältigung von ER-Stress scheint Sec62 beteiligt zu sein (Fumagalli *et al.*, 2016). Schließlich konnte für bestimmte Malignome, welche Sec62 überexprimierten, ein Einfluss von Sec62 auf Invasion und Migration von Tumorzellen gezeigt werden (Greiner *et al.*, 2011). Im Folgenden sollen diese Erkenntnisse näher beleuchtet werden.

2.4.1 Intrazellulärer Transport von Proteinen

Den im Zytoplasma einer jeden Zelle synthetisierten Polypeptiden und Proteinen obliegen im menschlichen Organismus zahlreiche Funktionen. Sie spielen unter anderem eine bedeutende Rolle in der interzellulären Kommunikation, sind wichtige Komponenten der körpereigenen Immunabwehr oder sind als Enzyme an der Umsetzung zahlreicher Substrate beteiligt. Diese beachtliche funktionelle Vielfalt macht deutlich, dass neben einer streng regulierten Proteinbiosynthese auch ein gezielter Transport der Proteine vom Ort ihrer Synthese, dem Zytoplasma, an ihren Wirkungsort für das spätere Zusammenspiel im Körper unabdingbar ist. Je nachdem ob der Transport von Proteinen zeitgleich mit ihrer Synthese am Ribosom oder erst im Anschluss daran stattfindet, spricht man von co- bzw. posttranslational transportierten Proteinen. Im Zentrum des Transportprozesses steht das raue endoplasmatische Retikulum, das die entstehenden Proteine entweder in Zusammenarbeit mit dem Golgi-Apparat aus der Zelle hinausbefördert oder aber als Transmembranproteine in die Phospholipid-Doppelschicht der Zellmembran zu integrieren vermag (Zimmermann *et al.*, 2011).

Allen sekretorischen Proteinen gemeinsam ist die Eigenschaft, dass sie als Vorläuferproteine aus der Translation hervorgehen. Letztere weisen eine spezifische hydrophobe Signalsequenz am N-Terminus auf, welche vom sogenannten *signal recognition particle* (SRP) erkannt wird. Dieses Ribonucleoprotein-Partikel ist dazu in der Lage, sowohl an die Signalsequenz der naszierenden Polypeptidkette als auch an das Ribosom zu binden und eine zeitweilige Blockierung der Translation zu induzieren. Dieser Translationsarrest verhindert eine vorzeitige und lediglich auf unspezifischen

intramolekularen Wechselwirkungen basierende Faltung des entstehenden Peptids und gewährleistet so dessen ungehinderte Passage durch die ER-Membran. Auf diese Weise wird ein cotranslatinaler Proteintransport ermöglicht (Walter et al., 1980; Walter et al., 1981). In der ER-Membran befindet sich der sogenannte SRP-Rezeptor, bestehend aus einer zytosolischen alpha-Untereinheit und einer transmembranären beta-Untereinheit. Die alpha-Untereinheit des SRP-Rezeptors vermag mit der SRP54-Untereinheit des SRP-Moleküls zu interagieren. Voraussetzung hierfür ist eine Beladung beider Moleküle mit Guanosintriphosphat (GTP). In diesem Zustand kann der Komplex aus Ribosom und unvollständiger Polypeptidkette (*ribosome nascent chain complex*, RNC) auf den Sec61-Transportkanal der ER-Membran übertragen und der Translationsblock aufgehoben werden. Die GDP-gebundenen Formen von SRP54 und SR-alpha dissoziieren und stehen für einen weiteren Transportvorgang zur Verfügung (Römisch *et al.*, 1989; Rapiejko *et al.*, 1997).

Das Sec61-Molekül besteht aus drei Untereinheiten (alpha, beta und gamma) und hat die Form einer Pore mit einer lateralen Öffnung zur hydrophoben Komponente der Phospholipiddoppelschicht der ER-Membran. Die außergewöhnliche dreidimensionale Struktur des Sec61-Moleküls erlaubt demnach einerseits die Integrierung des entstehenden Proteins in die ER-Membran, vorausgesetzt das entsprechende Protein besitzt eine ausreichend große hydrophobe Domäne, und andererseits ein "Einfädeln" der Polypeptidkette in das ER-Lumen. Die laterale Diffusion des neu entstehenden Proteins in die Phospholipiddoppelschicht stellt die Grundlage der Entstehung von Transmembranproteinen dar. Soll das Protein hingegen in das ER befördert werden, bedarf es der Mithilfe zusätzlicher molekularer Mitspieler. Insbesondere die ER-eigenen Chaperone BiP und Grp78 gewährleisten einen unidirektionalen und kontrollierten Transport in das ER-Innere (Tyedmers *et al.*, 2003; Alder *et al.*, 2005). Da die Aktivität von BiP ATP-abhängig ist, sind weitere Moleküle, wie z.B. Sil1 und GRP170 nötig, welche den Austausch von ADP gegen ATP ermöglichen (Weitzmann *et al.*, 2007). Der letzte Schritt des Proteintransports ins ER-Lumen besteht in der Abspaltung der Signalsequenz durch die Signalpeptidase. Erst jetzt kann die Faltung der neu entstandenen Polypeptidkette erfolgen (Blobel *et al.*, 1975).

Im Unterschied zum Transportprozess cotranslatinal transportierter Proteine besitzen post-translatinal transportierte Proteine keine Signalsequenz mit ausreichender Hydrophobizität, um mit dem SRP-Molekül zu interagieren, oder sind schlicht zu kurz. Daraus resultiert, dass die vollständige Synthese dieser Proteine am Ribosom und somit im Zytosol stattfindet (Ng *et al.*, 1996; Schlenstedt *et al.*, 1990). Damit die Proteine trotzdem durch die Pore des Sec61-Translokons passen und dem ER zugänglich gemacht werden können, verhindern die zytosolischen Hitzeschockproteine Hsp40 und Hsp70 deren vorzeitige Faltung (Wiech *et al.*, 1990).

Der Transport von Vorläuferproteinen durch die Membran des ER stellt einen hochkonservierten Prozess in eukaryontischen Zellen dar (Zimmermann *et al.*, 2011). Die Tatsache, dass die Zelle Energie in Form von ATP für diesen Vorgang aufbringen muss, belegt die Wichtigkeit eines geordneten und regulierten Proteintransportes.

2.4.2 Sec62, ein Regulator des Proteintransportes?

In Hefepilzen wie beispielsweise *Saccharomyces cerevisiae* spielt vor allem der ATP-abhängige, posttranslationale Translokationsmechanismus sekretorischer Proteine eine Rolle (Hansen *et al.*, 1986), wobei neben Sec61 eine Reihe weiterer Proteine für diesen Prozess benötigt werden. Hierzu gehören insbesondere Sec62 und Sec63, zwei Transmembranproteine des rauhen endoplasmatischen Retikulums, welche in den späten 1980er Jahren erstmals beschrieben wurden (Deshaies *et al.*, 1989; Rothblatt *et al.*, 1989). Während die Aktivität von Sec62 in Hefen spezifisch für den SRP-unabhängigen Transportmechanismus von Proteinen zu sein scheint (Deshaies *et al.*, 1989), kommt Sec63 sowohl beim co- als auch beim posttranslationalen Translokationsmechanismus zum Einsatz (Brodsky *et al.*, 1995). Im Jahre 1997 gelang der Nachweis der beiden genannten Proteine auch in Zellen von Säugetieren (Tyedmers *et al.*, 2000). Aufgrund der räumlichen Nähe zum Sec61-Protein und erster richtungsweisender Studien geht man auch hier von einer Beteiligung des Sec62/63-Komplexes am Transportprozess naszierender Proteine in das endoplasmatische Retikulum aus, jedoch bleibt bis heute die genaue Rolle beider Proteine in diesem Vorgang unklar (Lakkaraju *et al.*, 2012; Lang *et al.*, 2012). Fest steht allerdings, dass das Sec62-Protein der Säugetiere sowohl mit Sec63 als auch mit Sec61 interagiert und außerdem - im Gegensatz zu seinem Hefe-Homologon - zwei spezifische Domänen am zytosolischen N-Terminus besitzt, welche Wechselwirkungen mit dem Ribosom erlauben. Im Vergleich zur Hefe scheint es demnach zu einem Funktionsgewinn von Sec62 in Säugetierzellen gekommen zu sein (Müller *et al.*, 2010).

In einer Studie von Lakkaraju *et al.* wurden Vorläuferproteine unterschiedlicher Länge hinsichtlich ihres intrazellulären Transportmechanismus untersucht. Hierbei fiel auf, dass die posttranslationale Translokation kleinerer Proteine, welche sich aus maximal 100 Aminosäuren zusammensetzten, stark von der Anwesenheit von Sec62 abhängig war. Bei Proteinen mit einer Kettenlänge von 120-160 Aminosäuren gewährleistete Sec62 die Effizienz des SRP-abhängigen Transportmechanismus. Lediglich bei Proteinen, welche größer als 160 Aminosäuren waren, schien die Translokation unabhängig von Sec62 vonstatten zu gehen (Lakkaraju *et al.*, 2012). In einer Arbeit von Lang *et al.* führte ein *silencing* des *SEC62*-Gens zu einem unzureichenden posttranslationalen Transport kleiner sekretorischer Proteine, ohne jedoch den cotranslationalen Transportmechanismus oder die

posttranslationale Integrierung von Proteinen in Membranen zu beeinflussen (Lang *et al.*, 2012). Beide Studien suggerieren demnach, dass Sec62 insbesondere für den posttranslationalen Transport kleinerer Proteine essenziell ist. Inwiefern eine Interaktion mit dem Ribosom für diesen Prozess von Bedeutung ist, werden weitere Untersuchungen klären müssen (Lakkaraju *et al.*, 2012; Lang *et al.*, 2012).

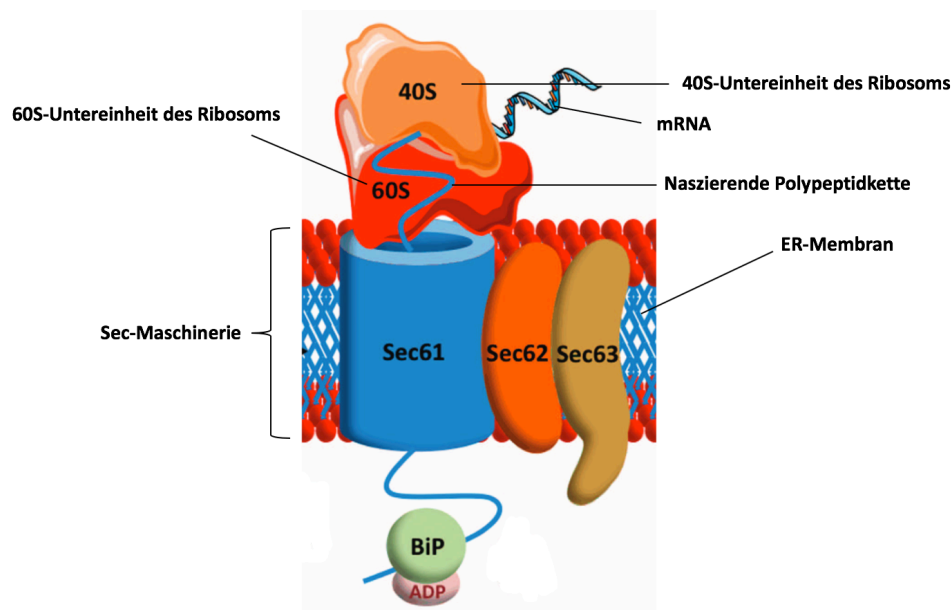


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Sec-Translokons (modifiziert nach: Linxweiler M, Schick B, Zimmermann R. Let's talk about Secs: Sec61, Sec62 and Sec63 in signal transduction, oncology and personalized medicine. Signal Transduction and Targeted Therapy 2017; 2.)

2.4.3 Hinweise auf eine Beteiligung der Sec-Maschinerie an der zellulären Calcium-Homöostase

Einige Studien postulieren eine Beteiligung des Sec61-Translokons an der Aufrechterhaltung des intrazellulären Calcium-Gleichgewichts. Demnach wäre das Sec61-Protein nicht nur dazu imstande, Proteine in das ER zu translozieren, sondern würde auch einen passiven Efflux von Calcium-Ionen aus dem ER in das Zytosol ermöglichen (Lomax *et al.*, 2002; Van Coppenrolle *et al.*, 2004; Flourakis *et al.*, 2006; Giunti *et al.*, 2007; Wonderlin *et al.*, 2009). In der Tat stellt das ER das größte intrazelluläre Reservoir für Calcium-Ionen dar. Der Calcium-Strom aus dem ER konnte erstmals von Lang *et al.* gemessen und dem Sec61-Protein zugeordnet werden (Lang *et al.*, 2011). Im vorgeschlagenen Modell arbeitet Sec61 gegen den primär aktiven Transport von Calcium-Ionen in das ER-Lumen, welcher u.a. über die in der ER-Membran lokalisierte Calcium-ATPase (SERCA) erfolgt (Wuytack *et al.*, 2002). Der Calcium-Efflux aus dem ER kann jedoch nicht unkontrolliert erfolgen, da eine Erhöhung

der zytoplasmatischen Calcium-Konzentration zahlreiche zelluläre Mechanismen wie Apoptose (Scorrano *et al.*, 2003) oder Zellmigration (Huang *et al.*, 2004) triggert. Man geht deshalb von einer strengen Regulation dieses Vorganges aus.

Erdmann *et al.* zeigten, dass zytoplasmatisches Calmodulin - in Anwesenheit von Calcium - an die zytosolische Domäne von Sec61 zu binden und damit den Efflux von weiteren Calcium-Ionen aus dem ER einzudämmen vermag (Erdmann *et al.*, 2011). Auch die Bindung von BiP an Schleife 7 (*loop 7*) von Sec61 auf der luminalen Seite reduziert den Calcium-Strom aus dem ER (Schäuble *et al.*, 2012). Schließlich fanden Linxweiler *et al.* heraus, dass das *Silencing* von *SEC62* einen Anstieg des Calcium-Effluxes zur Folge hat, woraus sich schließen lässt, dass auch Sec62 einen inhibitorischen Effekt auf den Calcium-Fluss aus dem ER ausübt (Linxweiler *et al.*, 2013). Der Calcium-Ausstrom scheint darüber hinaus während des Translokationsprozesses von Proteinen nicht möglich zu sein (Crowley *et al.*, 1994).

2.4.4 Sec62 ist an der Bewältigung von ER-Stress beteiligt

Voraussetzung für einen ungehinderten Abtransport der Proteine aus dem ER an ihren jeweiligen Wirkort ist deren regulierte und korrekt durchgeführte Faltung durch Chaperone. Kommt es jedoch zur Anhäufung von unvollständig oder fehlerhaft gefalteten Proteinen auf der luminalen Seite des endoplasmatischen Retikulums, ist das ER-Milieu in seiner Funktionalität gestört. Man spricht von ER-Stress. In diesem Zustand ist die Zelle nicht mehr dazu in der Lage, das Zusammenspiel zwischen Proteosynthese, Proteintransport und Faltung aufrechtzuerhalten (Walter *et al.*, 2011). Die Zelle verfügt über zwei Mechanismen, welche es ihr erlauben, diesen "Stress-Zustand" zu überwinden. Bei hochgradigem ER-Stress leitet die Zelle - vermutlich durch einen Sec61-gesteuerten Calcium-Efflux aus dem ER - den programmierten Zelltod (Apoptose) ein (Walter *et al.*, 2011). Bei einem geringeren Ausmaß an fehlgefalteten Proteinen finden in der Zelle Kompensationsmechanismen (*unfolded protein response*) statt, welche es ihr erlauben, ihre normale Aktivität wieder aufzunehmen. Im Wesentlichen bestehen diese Vorgänge in einem Translationsarrest zahlreicher Proteine, einer Größenzunahme des endoplasmatischen Retikulums, einer zeitweiligen Expressionssteigerung ER-eigener Chaperone (BiP, Herp u.a.) sowie der Eliminierung irreversibel fehlgefalteter Proteine (Pisoni *et al.*, 2016; Guerriero *et al.*, 2012).

Nach durchgeführter Reparatur muss die Chaperon-Expression wieder auf physiologische Level gesenkt werden. Chaperon-haltige Vesikel werden vom ER abgeschnürt, fusionieren anschließend mit Phagophoren, um letztlich als Autophagosomen in den Lysosomen degradiert zu werden. Diese

Autophagie kompensiert gleichzeitig die kurzzeitige ER-Vergrößerung (Birgisdottir *et al.*, 2013). Fumagalli *et al.* fanden heraus, dass dieser Wiederherstellungsprozess ein Sec62-vermittelter Vorgang ist. Am C-Terminus des Sec62-Moleküls befindet sich nämlich ein LIR-Motiv, welches mit dem LC3-Protein an der Phagophoren-Oberfläche zu interagieren vermag und auf diese Weise den Prozess der Autophagie anstößt. Demnach kommt dem Sec62-Molekül zusätzlich eine Sec61- bzw. Sec63-unabhängige Funktion in der Bewältigung von ER-Stress zu (Fumagalli *et al.*, 2016).

2.4.5 Sec62 steigert das Migrationspotential von Tumorzellen

Greiner *et al.* zeigten, dass ein siRNA-vermitteltes *silencing* von *SEC62* eine starke Beeinträchtigung der Migrations- und Invasionskapazität von Prostatakarzinomzellen zur Folge hat (Greiner *et al.*, 2011). Auch in anderen Tumorentitäten wie nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen, Schilddrüsenkarzinomen, Zervixkarzinomen und HNSCCs wird das Migrationspotential durch einen *knockdown* von *SEC62* deutlich herabgesetzt (Linxweiler *et al.*, 2012; Linxweiler *et al.*, 2016; Bochen *et al.*, 2017). Hieraus lässt sich ein möglicher Nutzen der Überexpression von *SEC62* für Tumorzellen herleiten. In der Tat stellen sowohl die Invasion von umliegendem Gewebe als auch die Migration von Zellen essenzielle biologische Prozesse für die Metastasierung von Malignomen dar. Allerdings fehlt bis heute ein molekulares Erklärungsmodell, welches eine Verbindung zwischen dem Sec62-Protein und einer erhöhten Metastasierungsrate herstellt. Mit Blick auf bisherige Erkenntnisse zur Funktion von Sec62 in gesunden Zellen könnten sowohl der inhibitorische Effekt hoher Sec62-Spiegel auf den Calcium-Efflux durch das Sec61-Translokon als auch der Sec62-vermittelte Transport von für die Zellmigration wichtigen Proteinen in das endoplasmatische Retikulum am Beginn der molekularen Wechselwirkungen stehen.

2.4.6 Sec62 als prognostischer Biomarker

Aus den Ergebnissen immunhistochemischer Analysen geht hervor, dass gesundes Schleimhautepithel der Kopf-Hals-Region lediglich in der regenerativen Basalzellschicht Sec62 exprimiert. Im Gegensatz dazu zeichnen sich Tumorzellen von HNSCCs durch eine höhere Sec62-Expression aus (Wemmert *et al.*, 2016; Bochen *et al.*, 2017). Dies gilt sowohl für den Primärtumor als auch für dessen Metastasen (Bochen *et al.*, 2017). Weiterhin konnte in ersten Studien gezeigt werden, dass HNSCCs, welche eine hohe Sec62-Expression aufweisen, mit einer deutlich schlechteren Prognose einhergehen als solche mit geringer Sec62-Expression. Die tumorspezifische Überexpression von Sec62, in Kombination mit signifikant schlechteren Überlebensraten von Sec62-positiven Tumoren, macht Sec62 zu einem geeigneten Biomarker, der nicht nur prognostische Aussagen ermöglicht, sondern auch als mögliches Ziel für *targeted therapies* infrage kommt (Wemmert *et al.*, 2016; Bochen *et al.*, 2017).

2.5. Survivin

2.5.1 Apoptose oder der programmierte Zelltod

Die Apoptose, auch programmierter Zelltod genannt, bezeichnet einen auf genetischer Basis streng regulierten, zellulären Vorgang, welcher es erlaubt, geschädigte Zellen aus dem Organismus zu eliminieren. Am Ursprung der Zellschädigung stehen nicht selten DNA-Schäden, welche wiederum eine Entartung der betroffenen Zellen zur Folge haben können (Fuchs *et al.*, 2011). Durch die Initiierung der Apoptose können solche potentiell schädigenden Zellen gezielt zerstört und somit ein späteres Tumorwachstum verhindert werden. Liegt jedoch eine Störung des programmierten Zelltods vor, kommt es zu ungebremster Zellproliferation, Krebsentwicklung und Ausbildung von Resistenzen gegen bestimmte Ansätze der Tumorthherapie (Plati *et al.*, 2008; Fulda *et al.*, 2009).

Wird eine Zelle durch bestimmte Signalwege dazu veranlasst, in Apoptose zu gehen, verändert sie progressiv ihre Struktur. Zunächst kommt es zu einer Schrumpfung des Zellkerns, welche auf eine Kondensation des darin enthaltenen Chromatins zurückzuführen ist. Es folgen eine Blasenbildung der Zellmembran (*membrane blebbing*), welche jedoch selbst während des gesamten Prozesses intakt bleibt, eine Fragmentierung des Zellkerns sowie ein Zerfall der Zelle in apoptotische Partikel. Über die Expression von Phosphatidylserin an der Außenseite der Zellmembran werden Makrophagen rekrutiert, welche die apoptotischen Partikel phagozytieren. Auf diese Weise wird eine durch proinflammatorische, freie Zellbestandteile ausgelöste Immunreaktion umgangen (Hacker *et al.*, 2000; Saraste *et al.*, 2000; Bucur *et al.*, 2001).

Auf molekularer Ebene steht eine Familie von proteolytischen Proteinen, die sogenannten Caspasen, im Zentrum der Signaltransduktion. Es handelt sich um Cysteinyl-Aspartat-Proteasen, welche als Procaspasen synthetisiert und durch limitierte Proteolyse in ihre enzymatisch aktiven Formen überführt werden (Nicholson 1999; Li *et al.*, 2008).

Die Apoptose kann im Wesentlichen durch zwei Mechanismen ausgelöst werden. Der **extrinsische Weg** beginnt mit der Bindung von Liganden der Tumornekrosefaktor-(TNF)-Familie an sog. Todesrezeptoren der Zellmembran. Die Todesrezeptoren besitzen an ihrer zytoplasmatischen Seite eine sogenannte Todesdomäne (*death domain, DD*), welche nach Liganden-induzierter Oligomerisierung und Konformationsänderung des Rezeptors präsentiert wird. An die freigelegte Todesdomäne binden weitere zelluläre Proteine mit eigenen Todesdomänen (FADD/TRADD), welche schließlich die Procaspasen 8 und 10 durch limitierte Proteolyse aktivieren. Die Initiatorcaspasen 8 und 10 aktivieren ihrerseits die Effektorprocaspasen 3, 6 und 7, welche schließlich für das Überleben

essenzielle Zellbestandteile spalten und somit den Zelltod einleiten (Degterev *et al.*, 2003; Boatright *et al.*, 2003; Guicciardi *et al.*, 2009).

Der **intrinsische** oder auch mitochondriale **Weg** kommt in Situationen zum Tragen, in denen die Zelle unter Stress gerät. Hierzu zählen einerseits zellschädigende Therapieformen wie Chemotherapien oder eine Strahlentherapie und andererseits Störungen der zellulären Homöostase durch Sauerstoffmangel, oxidativen Stress oder einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration. Beim intrinsischen Signalweg spielen neben den Caspasen vor allem die Proteine der Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*)-Familie eine entscheidende Rolle. Alle Vertreter dieser Familie weisen als gemeinsames Merkmal eine oder mehrere BH (*Bcl-2 Homology*)-Domänen (BH1 bis BH4) auf. Man unterscheidet Apoptose-fördernde und Apoptose-hemmende Proteine, wobei die Funktion direkt vom jeweiligen BH-Profil abhängig ist. Apoptose-fördernde Proteine mit lediglich einer BH3-Domäne wie Bax und Bak inhibieren die antiapoptotischen Effekte der Proteine Bcl-2, Bcl-xL und Mcl-1, woraus eine gesteigerte Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran resultiert. Cytochrom c, ein Protein des mitochondrialen Intermembranraumes, gelangt ins Zytosol, wo es an Apaf-1 (*apoptosis protease activating factor-1*) bindet. Der entstehende Komplex trägt den Namen "Apoptosom" und rekrutiert die Initiatorprocaspase 9, welche sich selbst durch limitierte Proteolyse aktiviert und ebenso wie die Initiatorcaspasen 8 und 10 des extrinsischen Weges die Procaspasen 3, 6 und 7 zu spalten vermag. Die Endstrecke des intrinsischen Weges entspricht somit derjenigen des extrinsischen Weges (Slee *et al.*, 1999; Green *et al.*, 2004; Kroemer *et al.*, 2007).

Erwähnenswert ist eine Kurzschlussverbindung zwischen beiden Signalwegen, welche durch das Protein Bid vermittelt wird. Die Initiatorcaspase 8 des extrinsischen Weges ist dazu in der Lage, Bid proteolytisch zu spalten. Das auf diese Weise entstehende tBid (*truncated bid*) bewirkt seinerseits eine Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium, wodurch letztlich der intrinsische Weg koaktiviert wird (Plati *et al.*, 2008).

2.5.2 Inhibitors of Apoptosis (IAPs)

Im Rahmen von Virusinfektionen stellt die Apoptose einen wirksamen Abwehrmechanismus des Wirtes dar, um der viralen Replikation und Ausbreitung entgegenzuwirken (Shen *et al.*, 1995). Um diesen Schutzmaßnahmen zu entkommen, exprimieren einige Viren, wie bspw. Vertreter der *Baculoviridae*, bestimmte Proteine, die sog. *Inhibitors of Apoptosis* (IAPs), welche die gezielte Eliminierung ihrer Wirtszellen durch Apoptose blockieren (Clem *et al.*, 1993; Birnbaum *et al.*, 1994). Baculoviren befallen ausschließlich wirbellose Lebewesen und besitzen eine Reihe von Genen,

welche für zellähnliche Proteine codieren (Ayres *et al.* 1994). In einer Arbeit von Hay *et al.* gelang im Rahmen eines genetischen Screenings bei Mücken der Gattung *Drosophila* der Nachweis von homologen Proteinen der viralen IAPs (Hay *et al.*, 1995). Auch in Säugetieren konnten Vertreter solcher antiapoptotisch wirkenden Proteine gefunden werden (Orme *et al.*, 2009). Wichtige Vertreter menschlicher IAPs sind NAIP (*BIRC1*), cIAP1 (*BIRC2*), cIAP2 (*BIRC3*), XIAP (*X-linked IAP, BIRC4*), Survivin (*BIRC5*), Apollon (*BRUCE, BIRC6*), Livin/ML-IAP (*BIRC7*) und ILP2 (*IAP-like protein, BIRC8*). XIAP stellt den am besten untersuchten menschlichen Apoptoseinhibitor dar und gilt als ihr potentester Vertreter (Pistretto *et al.*, 2016).

Proteine der IAP-Familie besitzen einige hochkonservierte, strukturelle Gemeinsamkeiten, von denen insbesondere zwei für ihre antiapoptotische Wirkung essenziell sind. Zum einen weisen sie je Protein eine bis drei Sequenzwiederholungen (*tandem repeats*) auf, welche als BIR (*Baculovirus Iap Repeat*)-Domänen bezeichnet werden. Dabei handelt es sich um N-terminale, etwa 70 Aminosäuren umfassende, Zink-bindende Motive, welche im Falle der meisten IAP-Proteine an aktivierte, d.h. prozessierte, Caspasen binden und diese inaktivieren. Zum anderen besitzen IAPs an ihrem C-Terminus eine Zinkfingerdomäne (*RING zinc-finger*) mit E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität. Demnach sind IAPs an der Markierung von Proteinen beteiligt, welche nicht mehr benötigt und folglich über das 26S-Proteasom abgebaut werden. Die Ringfingerdomäne ermöglicht darüber hinaus eine Zusammenlagerung von IAPs zu Homo- oder Heterodimeren und scheint so Einfluss auf Stabilität und Aktivität dieser Proteine zu nehmen (Berthelet *et al.*, 2013).

2.5.3 Survivin, ein besonderer Vertreter der IAPs

Ambrosini *et al.* beschrieben in den späten 1990er Jahren Survivin als einen Vertreter menschlicher IAPs mit besonderen strukturellen Merkmalen. Im Gegensatz zu anderen Proteinen der IAP-Familie fehlt bei Survivin die charakteristische C-terminale Zinkfingerdomäne. Darüber hinaus besitzt Survivin lediglich eine BIR-Domäne. Das Gen, welches für Survivin codiert (*BIRC5*), liegt auf dem langen Arm von Chromosom 17 (17q25) und umfasst ca. 15 kb. Survivin besteht aus 142 Aminosäuren und ist mit einem Molekulargewicht von 16,389 kDa deutlich leichter als die anderen humanen IAPs (Ambrosini *et al.*, 1997). Durch alternatives Splicen entstehen fünf Survivin-Isoformen - Survivin, Survivin 2B, Survivin Δ Ex3, Survivin 3B und Survivin 2 α - welche sich auch durch ihre Lokalisation innerhalb der Zelle unterscheiden (Mahotka *et al.*, 1999; Badran *et al.*, 2004; Caldas *et al.*, 2005).

Survivin lässt sich in fetalem, nicht jedoch in reifem, adultem Gewebe nachweisen. Eine Ausnahme bilden Zellen des Thymus, der Plazenta, hämatopoetische Stammzellen sowie die Basalzellen der Kolonschleimhaut (Ambrosini *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2001; Fukuda *et al.*, 2001). Allerdings zeigen

maligne transformierte Zellen sowie solide Tumoren aus u.a. Lunge, Ösophagus, Magen, Kolon, Pankreas, Kopf-Hals-Region, Brust, Ovarien und Prostata eine deutlich erhöhte nukleäre und zytoplasmatische Survivin-Expression. Darüber hinaus kann Survivin auch bei etwa der Hälfte aller *high-grade* Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) nachgewiesen werden, wohingegen *low-grade* NHL kein Survivin exprimieren. Survivin gilt demnach als vielversprechender, tumorspezifischer Marker, welcher ein mögliches Ziel für sog. *targeted therapies* darstellt (Ambrosini *et al.*, 1997).

2.5.4 Survivin und seine Funktion als Apoptose-Inhibitor

Zahlreiche Studien konnten belegen, dass eine Überexpression von Survivin mit einem besseren Zellüberleben einhergeht (Altieri *et al.*, 2003). Diese antiapoptotische Wirkung ist jedoch im Gegensatz zu anderen Vertretern der IAP-Familie nicht auf eine direkte Inhibition von Caspasen zurückzuführen, sondern wird indirekt auf früheren Stufen der Signaltransduktion vermittelt (Banks *et al.*, 2000). Dabei ist es unwesentlich, ob der Stimulus für die Einleitung der Apoptose vom intrinsischen oder vom extrinsischen Schenkel ausgeht. So vermag Survivin den proteasomalen Abbau von XIAP zu erschweren und folglich die XIAP-vermittelte Hemmung der Caspasen 3 und 9 zu verstärken (Dohi *et al.*, 2004). Außerdem verhindert Survivin über die Bildung des sog. *survivin-hepatitis B X-interacting protein complex* (HBXIP) die Bindung von Apaf-1 an Caspase 9 (Marusawa *et al.*, 2003).

Aus neueren Erkenntnissen geht hervor, dass die zytoprotektive Wirkung von Survivin hauptsächlich auf dessen mitochondrialem Pool beruht (Altieri *et al.*, 2008). Laut diesem Modell folgt auf proapoptotische Stimuli eine Freisetzung von mitochondrialem Survivin ins Zytosol, nachdem es zuvor im Mitochondrium posttranslational modifiziert wurde. In diesem Zusammenhang ist beispielsweise eine Dephosphorylierung an Ser20 des Survivin-Moleküls durch die Proteinphosphatase 2A (PP2A) erforderlich, welche aufgrund der räumlichen Nähe von Substrat und Enzym im Mitochondrium begünstigt ablaufen kann und für die Interaktion zwischen Survivin und XIAP unerlässlich ist. Darüber hinaus hemmt Survivin das mitochondriale Protein SMAC (*second mitochondria-derived activator of caspases*; auch als DIABLO bezeichnet), welches seinerseits Caspasen aus der Bindung mit IAPs lösen kann und somit apoptosefördernd wirkt (Sun *et al.*, 2005; Altieri *et al.*, 2008).

2.5.5 Nukleäres Survivin als Bestandteil des "chromosomal passenger complex"

Die Expression von Survivin variiert mit den Phasen des Zellzyklus. So steigt die Survivin-Expression in der G1-Phase an, um während der G2-M-Phase ihr Maximum zu erreichen. Diese Beobachtungen suggerieren eine Beteiligung von Survivin an der Zellzyklus-Regulation (Altieri *et al.*, 2006; Lens *et al.*,

2006). In der Tat stellt Survivin einen Bestandteil des sog. *chromosomal passenger complex* (CPC) dar, zu dem auch die Proteine Aurora B, INCENP (*Inner Centromere Protein*) und Borealin gehören (siehe Abbildung 2). Man geht davon aus, dass dieser Komplex an der Regulation mehrerer Zwischenschritte der Mitose wie bspw. der Kondensation des Chromatins zu Chromosomen, der korrekten Ausbildung des Spindelapparates (durch Korrektur von fehlerhaften Anlagerungen der Mikrotubuli an die Chromosomen) sowie der Trennung homologer Chromosomen beteiligt ist (Altieri *et al.*, 2006; Carmena *et al.*, 2012).

Aurora B stellt die eigentliche enzymatische Komponente des CPC dar. Als Serin-Threonin-Kinase phosphoryliert bzw. aktiviert Aurora B die für oben genannte Prozesse benötigten Substrate. INCENP verbindet dieses enzymatische Modul mit den beiden verbleibenden Proteinen des Komplexes, Survivin und Borealin. Letztere lagern sich über ihre jeweilige α -Helix mit dem N-Terminus von INCENP zum sog. Lokalisationsmodul zusammen. Damit der CPC in den unterschiedlichen Mitosephasen regulierend agieren kann, ist eine Dislokation des Proteinkomplexes an den jeweiligen Ort des Geschehens erforderlich. Die BIR-Domäne von Survivin sowie der C-Terminus von Borealin vermitteln dabei die Anlagerung des CPC an das chromosomale Kinetochor bzw. die Mikrotubuli (Carmena *et al.*, 2012).

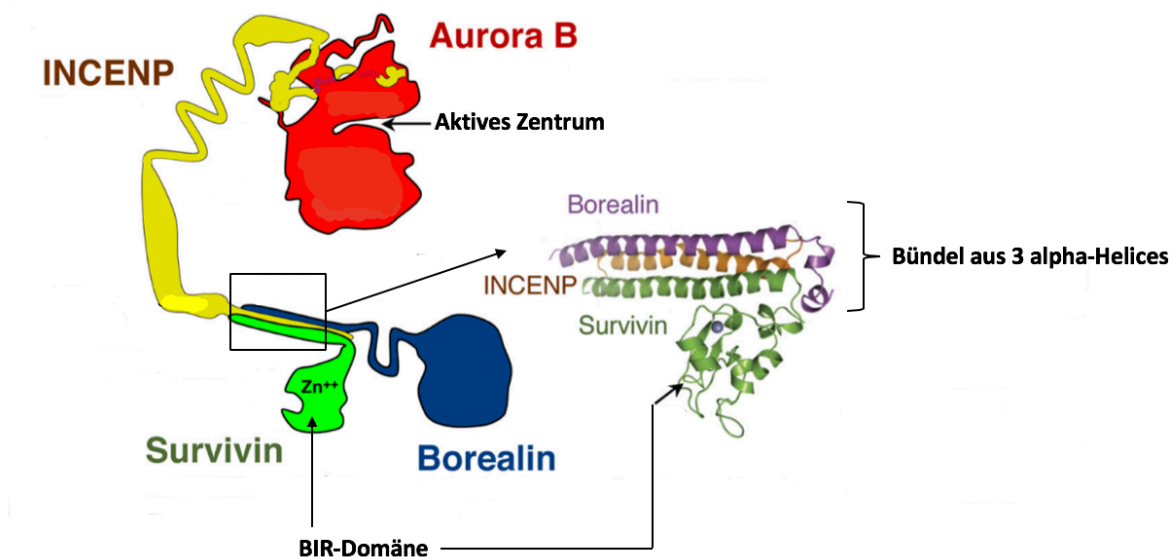


Abbildung 2: Schematische Darstellung des *chromosomal passenger complex* (CPC) (modifiziert nach: Carmena M, Wheelock M, Funabiki H, Earnshaw WC. The Chromosomal Passenger Complex (CPC): From Easy Rider to the Godfather of Mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012; 13 (12): 789-803.)

2.5.6 Survivin vermittelt Chemoresistenz in Endothelzellen

Als Ziel einer Zytostatikatherapie kommen neben dem eigentlichen Tumorgewebe auch die Endothelzellen der Tumor-versorgenden Gefäße in Betracht. Man geht davon aus, dass letztere eine deutlich geringere genetische Instabilität als das Tumorgewebe an sich aufweisen und folglich weniger zur Entwicklung von Resistenzen gegen die eingesetzten Medikamente beitragen. Darüber hinaus reichen bereits geringe Dosierungen aus, um die gewünschte antiangiogenetische Wirkung zu erzielen, woraus eine geringere Toxizität für den Patienten resultiert. Allerdings verfügen auch die Endothelzellen über bestimmte Abwehrmechanismen, welche das Ansprechen auf Chemotherapien reduzieren können. Zahlreiche Malignome exprimieren beispielsweise den Wachstumsfaktor VEGF (*vascular endothelial growth factor*), welcher auf mehreren Wegen einem Zytostatika-induzierten Zelltod entgegenwirkt. So induziert VEGF u.a. die Expression von Survivin, welches wiederum einen protektiven Einfluss auf den Spindelapparat ausübt und somit Schäden an den Mikrotubuli verhindert. Die Konsequenz ist eine durch Survivin vermittelte Chemoresistenz des Tumors (Tran *et al.*, 2002).

2.5.7 Survivin als prognostischer Biomarker

Wie bereits erwähnt, zeichnen sich zahlreiche Tumoren durch eine Überexpression von Survivin aus. Hiermit unterscheiden sie sich vom gesunden, ausdifferenzierten Gewebe, welches bis auf wenige Ausnahmen kein Survivin exprimiert (Ambrosini *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2001; Fukuda *et al.*, 2001). Im Rahmen von immunhistochemischen Analysen an Tumorgewebe unterschiedlichen Ursprungs konnte zudem nachgewiesen werden, dass Survivin sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma der entarteten Zellen vorkommt. In der Literatur herrscht jedoch weitgehend Uneinigkeit über den Stellenwert von Survivin als Prognosemarker. Während die einen Autoren eine hohe tumorale Survivin-Expression mit einer schlechten Prognose assoziieren, stellen andere einen Zusammenhang zwischen einer hohen Survivin-Expression und einem besseren Gesamtüberleben der Tumorpatienten dar. Durch ein besseres Verständnis funktioneller Eigenschaften des Survivin-Moleküls könnte die Ursache dieser gegensätzlichen Beobachtungen aufgeklärt werden (Li *et al.*, 2005).

2.6. MicroRNAs (miRNA)

Bei den sog. microRNAs (miRNAs oder miRs) handelt es sich um eine Gruppe von einzelsträngigen, nicht-kodierenden RNA-Molekülen, welche eine posttranskriptionale Regulation der Genexpression ermöglichen. Grundlage hierfür ist eine partielle Komplementarität der miRNA zur mRNA (*messenger RNA*) des zu regulierenden Gens. Das Interesse an miRNAs wuchs über die letzten Jahre, nicht zuletzt aufgrund der Tatsache, dass bestimmte Erkrankungen des Menschen auf eine Fehlfunktion dieser aus 21 bis 25 Nukleotiden (nt) bestehenden, regulatorischen RNA-Moleküle zurückzuführen sind.

2.6.1 Entdeckung

Im Rahmen genetischer Untersuchungen im Nematoden *Caenorhabditis elegans* gelang Rosalind C. Lee, Rhonda L. Feinbaum und Victor Ambros im Jahre 1993 die Entdeckung des Gens *lin-4*, welches jedoch nicht für ein Protein codiert, sondern für die Expression zweier RNA-Moleküle mit einer Länge von 22 bzw. 61 Nukleotiden verantwortlich ist. Damals fiel auf, dass die identifizierten RNA-Moleküle komplementäre Sequenzen zur 3' untranslatierten Region (UTR) der mRNA des *lin-14*-Gens besitzen, weshalb man ihnen eine regulatorische Funktion im Rahmen der Translation des genannten Gens zuschrieb (Lee *et al.*, 1993). Es ist davon auszugehen, dass es sich beim 61 nt langen RNA-Molekül um die Vorläufer-miRNA (pre-miRNA) der eigentlichen, aus 22 Nukleotiden bestehenden miRNA handelt. Zu Beginn des 21. Jahrhunderts konnte auch bei anderen Lebewesen, darunter *Drosophila melanogaster* und *Homo sapiens*, die Existenz von miRNAs nachgewiesen werden (Lagos *et al.*, 2001; Lee & Ambros, 2001). Aus der Beobachtung, dass Patienten, welche an einer chronisch lymphatischen Leukämie vom B-Zell-Typ erkrankt waren, mehrheitlich Mutationen in den *miR-15* und *miR-16*-Genen aufwiesen, gewann man schnell die Erkenntnis, dass eine Störung der Funktion von miRNAs weitreichende medizinische Folgen haben kann (Calin *et al.*, 2002).

Heute bemüht man sich, alle bisher identifizierten miRNAs in Datenbanken zusammenzufassen, wobei die biologischen Funktionen der meisten dort aufgeführten miRNAs noch aufzudecken sind (Ambros *et al.*, 2003; Griffiths-Jones *et al.*, 2006). Aktuelle Forschungsschwerpunkte sind demnach neben der aktiven Suche nach bisher unbekanntem miRNAs insbesondere die Vorhersage und anschließende Bestätigung von funktionellen Aspekten selektierter miRNAs.

2.6.2 Biogenese der miRNAs

Das menschliche Genom enthält miRNA-codierende Gene, welche mithilfe der RNA Polymerase II (Pol II) transkribiert werden (Lee *et al.*, 2004). Aus der Transkription geht die sog. pri-miRNA (*primary micro RNA*) als Primärtranskript hervor, welche sich durch imperfekte Basenpaarung zu einer

doppelsträngigen Schleife ("Haarnadelstruktur") zusammenlagert. Die pri-miRNA-Transkripte zeichnen sich durch ein 7-Methylguanosin-Cap am 5'-Ende und einen Poly-A-Schwanz am 3'-Ende aus (siehe Abbildung 3, Nr. 1) (Lee *et al.*, 2004; Cai *et al.*, 2004). Mithilfe eines Proteinkomplexes, bestehend aus der RNase III Endonulease Drosha und dem Protein Pasha (DGCR8), wird der doppelsträngige Anteil der pri-miRNA herausgeschnitten, welcher fortan als pre-miRNA bezeichnet wird und eine Länge von ca. 70 nt besitzt (siehe Abbildung 3, Nr. 2). Die pre-miRNA besitzt als strukturelle Merkmale einen "stem-loop" mit einem Monophosphat am 5'-Ende sowie einen Überhang von 2 Nukleotiden am 3'-Ende (Lee *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2004; Gregory *et al.*, 2004; Denli *et al.*, 2004). Durch die Interaktion der pre-miRNA mit dem Protein Exportin 5 sowie dem Cofaktor Ran-GTP wird die pre-miRNA aktiv über die Kernporen ins Zytoplasma transportiert (siehe Abbildung 3, Nr. 3) (Bohnsack *et al.*, 2004; Lund *et al.*, 2004). Im Zytoplasma erfolgt die Prozessierung der pre-miRNA zur reifen miRNA, welche durch die RNase III Endonuklease Dicer vermittelt wird (siehe Abbildung 3, Nr. 4) (Hutvágner *et al.*, 2001; Knight *et al.*, 2001; Ketting *et al.*, 2001). Das immer noch doppelsträngige RNA-Molekül, bestehend aus reifer miRNA und komplementärem Strang (miRNA*), wird schließlich mithilfe einer Helicase in zwei Einzelstränge zerlegt (siehe Abbildung 3, Nr.5). Während miRNA* meist degradiert wird, geht die reife miRNA eine Verbindung mit dem Ribonukleoprotein-Komplex RISC (*RNA-induced silencing complex*) ein (Khvorova *et al.*, 2003; Schwarz *et al.*, 2003).

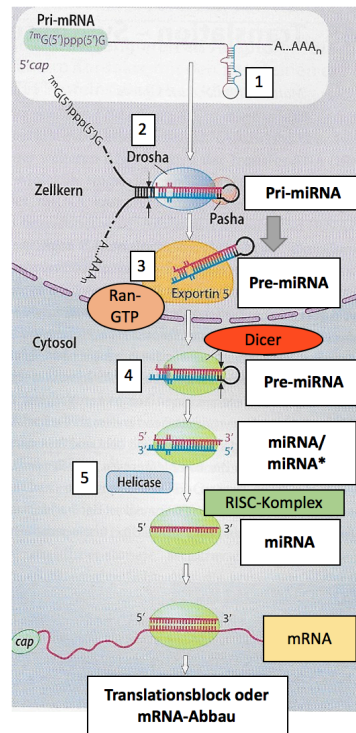


Abbildung 3: Biogenese humaner miRNAs (modifiziert nach Heinrich, Müller, Graeve. Löffler-Petrides: Biochemie und Pathobiochemie. 2014. 9. Auflage. Springer Medizin Verlag, Heidelberg. Abb. 47.13 S. 599.); Erklärungen: siehe Text

2.6.3 Funktion der miRNAs

Die Regulierung der Genexpression durch miRNAs beruht auf der Inaktivierung bestimmter Gene durch die Bindung der miRNA an ihren komplementären Strang der mRNA und somit der codierenden Sequenz. Dabei bestimmt der Grad der Komplementarität zwischen miRNA und mRNA, ob es zu einer Hemmung der Translation oder zu einer Degradierung der mRNA kommt. Eine partielle Komplementarität führt lediglich zu einem Translationsarrest, wohingegen vollständig komplementäre Stränge den Abbau der mRNA einleiten. Zudem kann nur dann eine Degradierung der mRNA erfolgen, wenn der RISC-Komplex, bzw. dessen zentrales Protein Argonaut, eine RNase-Aktivität besitzt. Argonaut kommt beim Menschen in 8 unterschiedlichen Ausführungen vor, von denen nicht alle zum RNA-Abbau befähigt sind. Fehlt die RNase-Aktivität, wird auch hier die Genexpression über eine Blockierung der Translation vermittelt (Hutvágner *et al.*, 2002; Zeng *et al.*, 2003).

Man geht heute davon aus, dass mindestens ein Drittel bis die Hälfte aller Protein-codierenden Gene einer posttranskriptionalen Kontrolle durch miRNAs unterliegen. Zahlreiche miRNAs binden jedoch nur durch imperfekte Basenpaarung an die 3'-UTR der zu regulierenden Zielsequenz. Aus diesem Grund wird vermutet, dass eine einzelne miRNA die Translation gleich mehrerer hundert Zielgene zu regulieren vermag (Huppi *et al.*, 2007). Durch die Entwicklung verschiedener computergestützter Vorhersagealgorithmen konnten bereits zahlreiche mögliche Zielgene für unterschiedliche miRNAs identifiziert und einer experimentellen Validierung unterzogen werden.

2.6.4 Nomenklatur

MiRNAs werden anhand eines einheitlichen Nomenklatur-Schemas benannt (z.B. hsa-miR-101). Der Organismus, in dem die zu benennende miRNA identifiziert wurde, wird durch ein Präfix aus drei Buchstaben angegeben. Für *Homo sapiens* wird beispielsweise das Präfix "hsa" und für Mäuse das Präfix "mmu" verwendet. Hieran schließt sich die Bezeichnung "miR" an, welche für die reife miRNA steht, gefolgt von einer Zahl, welche entsprechend dem Zeitpunkt der Entdeckung der jeweiligen miRNA vergeben wird. Unterscheiden sich zwei reife miRNAs lediglich an einer oder zwei Positionen ihrer jeweiligen Sequenzen, bedient man sich mit Buchstaben bezeichneter Suffixe (z.B. mmu-miR-10a und mmu-miR-10b), um die Verwandtschaft beider Sequenzen hervorzuheben. Unterschiedliche Vorläufersequenzen, aus denen identische miRNAs hervorgehen, werden durch mit Zahlen bezeichnete Suffixe markiert (z.B. hsa-miR-218-1 und hsa-miR-218-2) (Ambros *et al.*, 2003; Griffiths-Jones *et al.*, 2006).

2.6.5 miRNAs und ihre Rolle in der Tumorgenese

Bei mehr als der Hälfte aller chronisch lymphatischen Leukämien vom B-Zell-Typ (B-CLL) lassen sich Deletionen der Chromosomenregion 13q14 nachweisen. Calin *et al.* zeigten, dass auf genanntem Chromosomenabschnitt u.a. die Gene *miR15* und *miR16* lokalisiert sind, welche für zwei miRNAs codieren, und erhoben daraufhin die Hypothese, dass die Deletion dieser Gene eine Rolle im Rahmen der Pathogenese der B-CLL spielen könnte. In der Tat konnte bei 68% der untersuchten Fälle eine signifikant reduzierte Expression beider miRNAs nachgewiesen werden. Auf diese Weise ließ sich erstmals ein kausaler Zusammenhang zwischen dysregulierten miRNAs und einer malignen Erkrankung darstellen (Calin *et al.*, 2002). In einer umfangreichen Übersichtsarbeit zeigten Violinia *et al.* im Rahmen von Microarray-Analysen, dass sich solide Tumoren unterschiedlicher Lokalisation (Lunge, Brust, Magen, Kolon, Prostata und Pankreas) und korrespondierendes gesundes Gewebe deutlich hinsichtlich ihres miRNA-Profiles unterscheiden. Die untersuchten Tumorentitäten zeigten im Vergleich zum Normalgewebe insgesamt 26 miRNAs mit einer erhöhten Expression und 17 miRNAs mit einer erniedrigten Expression (Violinia *et al.*, 2006). Analoge Arbeiten wurden u.a. an Glioblastomen (Chan *et al.*, 2005), hepatozellulären Karzinomen (Murakami *et al.*, 2006) und papillären Schilddrüsenkarzinomen (He *et al.*, 2005) durchgeführt, wobei auch in diesen Fällen ein Malignom-spezifisches miRNA-Profil identifiziert werden konnte.

Aus der Beobachtung, dass in Tumoren die Expression bestimmter miRNAs sowohl hoch- als auch herunterreguliert sein kann, entwickelte man ein Modell, nach dem die miRNA-vermittelte Tumorgenese auf zwei Wegen erfolgen kann. Einerseits führen Deletionen der miRNA-codierenden Gene oder eine gestörte miRNA-Synthese zu einer verminderten Expression reifer miRNAs mit Tumorsuppressor-Funktion. Die Folge ist eine Anreicherung onkogener Proteine, welche in diverse zellbiologische Vorgänge wie Proliferation und Apoptose eingreifen und somit die Tumorgenese initiieren kann. Andererseits ist auch eine Überexpression von miRNA-codierenden Genen möglich, welche über eine posttranskriptionale Blockierung der mRNA von Tumorsuppressorgenen eine onkogene Wirkung entfalten (Esquela-Kerschner & Slack, 2006).

2.6.6 miRNA-Analysen bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region

Im Rahmen zahlreicher Studien der vergangenen Jahre wurden auch Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region hinsichtlich ihres miRNA-Expressionsprofils analysiert. Wie bereits für andere Tumorentitäten beschrieben, heben sich auch HNSCCs durch eine Vielzahl an dysregulierten miRNAs vom benachbarten, nicht entarteten Gewebe ab. So zeichnen sich Gewebeproben und Zelllinien von Kopf-Hals-Tumoren beispielsweise durch eine erhöhte Expression für miR-18a, miR-21, miR-106b, miR-155, miR-205, miR-221 und miR-345 aus. Darüber hinaus finden sich in HNSCCs auch miRNAs mit einer erniedrigten Expression wie beispielsweise miR-10a, miR-23b, miR-125a, miR-125b, miR-375

und miR-494 (Avisar *et al.*, 2009; Cervigne *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2008; Kimura *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2014; Ramdas *et al.*, 2009; Tran *et al.*, 2007).

Avisar *et al.* zeigten, dass durch die Berechnung des Verhältnisses von miR-221 zu miR-375 eine Unterscheidung zwischen Tumorgewebe und gesundem Gewebe vorgenommen werden kann, wobei die Sensitivität dieser Methode bei 92% und die Spezifität bei 93% liegt (Avisar *et al.*, 2009). Cervigne *et al.* fanden Hinweise darauf, dass der Übergang zwischen einer oralen Leukoplakie und einem Mundhöhlenkarzinom (*oral squamous cell carcinoma*; OSCC) auf frühen Veränderungen in der Expression bestimmter miRNAs (miR-21, miR-181b, miR-345) beruhen könnte (Cervigne *et al.*, 2009). Fletcher *et al.* identifizierten die Überexpression von miR-205 im Tumorgewebe als einen neuen molekularen Marker für das Vorliegen von Lymphknotenmetastasen bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region (Fletcher *et al.*, 2008).

MiR-21 stellt eine in ihrer Expression häufig veränderte miRNA dar. Sie ist bei einer Vielzahl von soliden Tumoren (Mammakarzinom, Lungenkarzinom, Magenkarzinom, Kolonkarzinom, Pankreaskarzinom, Prostatakarzinom, Glioblastom, HNSCCs u.a.) überexprimiert, wodurch man von einer entscheidenden Rolle dieser dysregulierten miRNA in der Tumorgenese ausgeht (Calin & Croce, 2006; Violinia *et al.*, 2006). In einer Arbeit von Chan *et al.* führte ein *knockdown* von miR-21 in Glioblastomzellen zu einer erhöhten Caspase-Aktivität und somit zu einer proapoptotischen Wirkung. MiR-21 scheint demnach einen hemmenden Einfluss auf die Aktivität bestimmter Apoptose-fördernder Gene zu entfalten. Darüber hinaus konnten die Tumorsuppressorgene *TPM1* (Tropomyosin 1), *PTEN*, *PDCD4* und *maspin* als weitere Zielgene von miR-21 identifiziert werden. Durch die Aktivitätsminderung dieser Tumorsuppressorgene vermittelt miR-21 einerseits eine erhöhte Invasivität der Tumorzellen und fördert andererseits ihre Metastasierung (Chan *et al.*, 2005; Meng *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2008).

Neben der Untersuchung des miRNA-Profiles von soliden Tumoren bzw. Tumorzelllinien besteht zusätzlich die Möglichkeit, die Expression von im Blut zirkulierenden miRNAs zu bestimmen. Als mögliche Quellen der im Blut nachweisbaren und in diesem Medium stabilen miRNAs kommen beispielsweise zirkulierende Tumorzellen oder Leukozyten infrage (Brito *et al.*, 2010). Diverse Studien haben belegt, dass sich das miRNA-Profil von Tumorpatienten und gesunden Probanden nicht nur im Gewebe, sondern auch im Vollblut unterscheidet, wobei die miRNA-Expression im Blut nicht zwingend mit derjenigen im Tumorgewebe übereinstimmen muss. Diese Beobachtung stößt auf großes wissenschaftliches Interesse, da sich das veränderte miRNA-Muster im Blut von Tumorpatienten im Rahmen von minimalinvasiven Methoden bestimmen lässt und somit auf eine vergleichbar einfache Weise eine Charakterisierung der biologischen Eigenschaften des Tumors ermöglicht werden könnte (Heneghan *et al.*, 2010; Kosaka *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011). Ries *et al.* bestimmten das miRNA-Profil im Vollblut von 57 Patienten mit einem

diagnostizierten Mundhöhlenkarzinom sowie von 33 gesunden Probanden, welche als Kontrollen dienten. Dabei konnten mit miR-186, miR-494 und miR-3651 drei dysregulierte miRNAs im Vollblut von OSCC-Patienten identifiziert werden, welche für den Nachweis und die Überwachung eines Mundhöhlenkarzinoms eingesetzt werden könnten (Ries *et al.*, 2014). In einer Arbeit von Brito *et al.* zeigten Patienten mit einem Mundhöhlenkarzinom im fortgeschrittenen Stadium (Stadium IV) und vorliegenden Lymphknotenmetastasen im Gegensatz zu OSCCs in früheren Tumorstadien (Stadien I bis III) ohne nachweisbare Lymphknotenmetastasen eine erniedrigte Expression von miR-15a im Vollblut (Brito *et al.*, 2010). Schließlich konnten Lerner *et al.* einen signifikanten Zusammenhang zwischen einer erniedrigten Expression von miR-146a und miR-155 im Vollblut von HNSCC-Patienten und dem Vorhandensein von Fernmetastasen darstellen. In dieser Arbeit unterschieden sich Tumorpatienten und Kontrollen allerdings weder in Microarray-Analysen noch in quantitativen real-time PCRs signifikant hinsichtlich ihres miRNA-Profiles im Blut (Lerner *et al.*, 2016).

2.7. Hinführung zum Thema

Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region (*head and neck squamous cell carcinoma*; HNSCC) stellen eine heterogene Gruppe von Tumoren unterschiedlicher Lokalisationen dar und gehören zu den weltweit häufigsten Krebserkrankungen. Trotz Fortschritten in der Diagnostik und Therapie von Tumorerkrankungen bleibt die Prognose von HNSCCs mit einer 5-Jahresüberlebensrate zwischen 50% und 60% ungünstig. Ein wissenschaftlicher Schwerpunkt liegt demnach in der Erforschung der Tumorbilogie. Diese hat zum Ziel, geeignete molekulare Marker zu identifizieren, welche eine frühe Diagnose und eine individuelle Aussage über die Prognose der Erkrankung ermöglichen.

In den letzten Jahren wurden einige vielversprechende Biomarker beschrieben und ihre Rolle in der Tumorgenese näher untersucht. Hierzu zählen beispielsweise das in der ER-Membran lokalisierte Sec62-Protein und das in mehreren Zellkompartimenten vorkommende Survivin. In der vorliegenden Arbeit soll im Rahmen von immunhistochemischen Analysen die Sec62- und Survivin-Expression in Gewebeprobe von HNSCC-Patienten bestimmt und im Anschluss mit klinischen und histopathologischen Patientendaten korreliert werden. Dabei werden erstmals definierte Untergruppen von Patienten untersucht, welche sich durch ein bestimmtes Merkmal, wie beispielsweise eine Vitamin D-Mangelversorgung, auszeichnen.

MicroRNAs (miRNAs) sind kleine, nicht-codierende, einzelsträngige RNA-Moleküle, welche einen Einfluss auf die Expression von Genen ausüben, indem sie mit der korrespondierenden mRNA interagieren. Aus der Beobachtung, dass sich das miRNA-Profil von Tumorpatienten und gesunden Probanden unterscheidet, gewann man die Erkenntnis, dass auch dysregulierte miRNAs in der Pathogenese maligner Erkrankungen eine Rolle spielen können. Da eine definierte miRNA die

Expression zahlreicher Gene beeinflussen kann, werden mögliche Zielgene solcher miRNAs unter Zuhilfenahme von computergestützten Algorithmen bzw. Sequenzanalysen vorhergesagt und in Datenbanken zusammengefasst. Die vorgeschlagenen Gene werden anschließend im Rahmen von molekularbiologischen Untersuchungen als Zielgene für eine bestimmte miRNA bestätigt oder verworfen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei solcher Datenbanken konsultiert, mit dem Ziel, miRNAs zu identifizieren, welche die Expression der interessierenden Gene *SEC62* (Sec62) und *BIRC5* (Survivin) beeinflussen könnten. Dabei wurden miR-101, miR-203a, miR-218 und miR-455 für weitere Untersuchungen ausgewählt. Für miR-203a und miR-218 wird *BIRC5* als mögliches Zielgen genannt, während für miR-455 das *SEC62*-Gen als Zielsequenz infrage kommt. MiR-101 könnte laut den Angaben der konsultierten Datenbanken die Expression beider Gene beeinflussen. In quantitativen Real-Time PCR-Analysen sollte die Expression der zu untersuchenden miRNAs im Vollblut von HNSCC-Patienten und gesunden Probanden bestimmt werden und anschließend mit den erhobenen klinisch-pathologischen Patientendaten sowie den Ergebnissen der immunhistochemischen Analysen korreliert werden.

3. Material und Methoden

3.1 Untersuchungsmaterialien für immunhistochemische Analysen

3.1.1 Tumorgewebe

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgten immunhistochemischen Untersuchungen wurden an Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben (FFPE-Schnitte, Dicke: 1µm) eines Kollektivs von HNSCC-Patienten (n = 98) durchgeführt. Die entsprechenden Tumor-Präparate wurden freundlicherweise vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes zur Verfügung gestellt. Die Behandlung der zum Kollektiv gehörigen Patienten erfolgte in den Jahren 2011 bis 2017 an der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums des Saarlandes. Das untersuchte Gewebe stammt von Tumoren der Lokalisationen Zungengrund, Zunge, Mundboden, Wange, Tonsille, Oropharynx, Hypoharynx und Larynx und wurde im Zuge von operativen Eingriffen gewonnen. Überschüssiges Gewebe, welches nicht für eine histopathologische Begutachtung benötigt wurde, konnte nach vorheriger Aufklärung des Patienten und nach dessen schriftlicher Einwilligung zu Forschungszwecken weiterverwendet werden. Die Nutzung des Patientenmaterials sowie das Zurückgreifen auf die für diese Arbeit relevanten klinischen Daten wurden durch ein positives Votum der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes gestattet (Kennziffer 218/10).

Das Kollektiv lässt sich weiter in zwei Teilkollektive unterteilen, je nachdem ob bei den untersuchten Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eine ausreichende Vitamin D-Versorgung (25-(OH)₂-Spiegel ≥ 10 ng/ml; n = 49) oder aber ein Vitamin-D-Mangelzustand (25-(OH)₂-Spiegel < 10 ng/ml; n = 49) vorlag.

3.1.2 Geräte, Software und Verbrauchsmaterialien

In Tabelle 2 sind die für diese Arbeit verwendeten Geräte sowie die genutzte Software aufgeführt. Tabelle 3 enthält die benötigten Verbrauchsmaterialien.

Tabelle 2: Für immunhistochemische Analysen verwendete Geräte und Software mit Herstellerangaben

Hersteller	Produktbeschreibung
MMM, Medcenter Einrichtungen GmbH, Planegg, Deutschland	Wärmeschrank, Incucell
Tefal S.A.S., Rumilly, Frankreich	Reiskocher
Sartorius, Göttingen, Deutschland	Feinwaage BP61, BP4100

Panasonic, Hamburg, Deutschland	Mikrowelle, Dimension 4
Eppendorf, Hamburg, Deutschland	Tischzentrifuge
Scientific Industries, New York, USA	Vortexer (Vortex-Genie 2)
IKA, Staufen, Deutschland	Magnetrührer Combimag RCT
Abimed, Düsseldorf, Deutschland	Gilson-Pipetten
Integra Biosciences, Biebertal, Deutschland	Pipetboy acu
WTW, Weilheim, Deutschland	pH-Meter, pH 197
Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, Weilheim, Deutschland	Ebro Electronic™ TTX 100 Core Thermometer Thermocouple Type T
Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland	Durchlichtmikroskop, 4316184
Olympus K.K., Tokyo, Japan	BX61 Fluoreszenzmikroskop
Olympus K.K., Tokyo, Japan	CellSens Standard Software
Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland	Rotationsmikrotom

Tabelle 3: Für immunhistochemische Analysen erforderliche Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangaben

Hersteller	Produktbeschreibung
Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland	Superfrost Plus Objektträger Superfrost UltraPlus Objektträger
R. Langenbrück, Emmendingen, Deutschland	Deckgläser
Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	Pipettenspitzen Reaktionsgefäße (1,5mL; 2mL)
Schleicher und Schüll, Dassel, Deutschland	Filterpapier, DE81
Dako GmbH, Glostrup, Dänemark	REAL™ DetectionSystemAlkalinePhosphatase/RED

3.1.3 Puffer, Lösungen und weitere Chemikalien

In Tabelle 4 findet sich eine Auflistung der für die immunhistochemischen Analysen verwendeten Puffer, Lösungen und sonstigen Chemikalien. Nicht hier aufgeführte Reagenzien wurden von den Firmen Sigma Aldrich und Merck KGaA bezogen. In Tabelle 5 sind die Primärantikörper mit ihren jeweiligen Verdünnungen aufgeführt.

Tabelle 4: Für immunhistochemische Untersuchungen verwendete Puffer, Lösungen und Chemikalien

Lösungen, Puffer und Chemikalien	Zusammensetzung / Ansatz bzw. Herkunft
PBS (pH 7,2-7,4)	Phosphat-gepufferte Salzlösung
3% BSA in PBS (pH 7,2)	6g BSA 190mL PBS

1% BSA in PBS (pH 7,2)	2g BSA 195 mL PBS
Citratpuffer (pH 6)	4,5mL Citronensäure (0,1 M) 20,5mL Trinatriumcitratdihydrat (0,1M) 225mL Aqua dest.
Dako GmbH, Glostrup, Dänemark	REAL™ DetectionSystemAlkalinePhosphatase/RED
Aqua dest.	B. Braun, Melsungen, Deutschland; Art. 0082479E
Xylol	Otto Fischer GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland; Art. 09208831
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland; Art. 8187601000
Citronensäure Monohydrat	Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Deutschland Art. 2021
Trinatriumcitratdihydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland Art. 35801
PBS pH 7,2-7,4	Apotheke des Universitätsklinikums des Saarlandes
HCl	Merck, Darmstadt, Deutschland; Art. 109057
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland; Art. 106467
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA; Art. A9418
Hämatoxylin	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA; Art. MHS32-1L
Entellan	Merck, Darmstadt, Deutschland; Art. 1.07961.0500

Tabelle 5: Antikörper und ihre Verdünnungen

Antikörper	Beschreibung	Herkunft	Verdünnung
Anti Sec62	Polyklonaler Peptidantikörper	von Herrn Prof. Dr. M. Jung aus dem Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie des Universitätsklinikums des Saarlandes in Homburg / Saar Immunogen: Peptid des C-Terminus des humanen Sec62-Proteins Wirtsspezies: Kaninchen	1:400 (IHC)

Anti Survivin	Polyklonaler Peptidantikörper	Abcam, England Art. ab469 Immunogen: rekombinantes vollständiges Survivin-Protein Wirtsspezies: Kaninchen	1:500 (IHC)
------------------	-------------------------------	--	-------------

3.2 Immunhistochemische Untersuchungen

3.2.1 Funktionsweise immunhistochemischer Analysen

Die Immunhistochemie beruht auf dem Funktionsprinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion, bei der ein Antikörper in wässriger Lösung spezifisch und reversibel an Bestandteile eines Antigens bindet, welche als Epitope bezeichnet werden. Das Epitop, welches lediglich aus rund 20 bis 30 Aminosäuren besteht, stellt demnach die eigentliche antigene Determinante dar. Antikörper werden auch Immunglobuline genannt und setzen sich aus insgesamt vier Polypeptidketten zusammen, von denen jeweils zwei in ihrer molekularen Struktur identisch sind. Die beiden schweren (*H-heavy*) Ketten und die beiden leichten (*L-light*) Ketten lagern sich zu einem Y-förmigen Protein zusammen, wobei die Verbindung zwischen den einzelnen Ketten u.a. durch Disulfidbrücken vermittelt wird. Die spezifische Antigen-Bindungsstelle des Antikörpers wird auch Paratop genannt. Durch die Anwendung von Papain gelingt eine Auftrennung des Antikörpers in zwei Fragmente: einerseits das Antigen-bindende Fragment F_{ab} und andererseits das zur Kristallisierung neigende F_c -Fragment (Thomas, 2008).

In dieser Arbeit wird das Prinzip der indirekten Immunhistochemie mit enzymatischem Nachweis angewendet. Hierbei wird nach Bindung des Primärantikörpers an sein Antigen ein gegen das F_c -Fragment des Primärantikörpers gerichteter und mit Biotin konjugierter („biotinylierter“) Sekundärantikörper hinzugegeben. Durch den anschließenden Zusatz von mit Streptavidin konjugierter alkalischer Phosphatase gelingt eine Kopplung des Enzyms an den Sekundärantikörper. Bietet man dem Enzym sein entsprechendes Substrat (Chromogen) an, wird letzteres in ein unlösliches, farbiges Produkt umgesetzt, welches unter dem Lichtmikroskop visualisiert werden kann (siehe Abbildung 4). Auf diese Weise wird sowohl ein qualitativer als auch ein quantitativer histologischer Nachweis von Zellbestandteilen bzw. Markerproteinen ermöglicht.

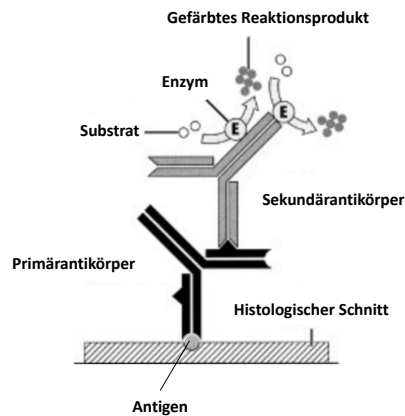


Abbildung 4: Allgemeines Prinzip der indirekten Immunhistochemie mit Enzymnachweis (modifiziert nach <https://www.spektrum.de/lexikon/neurowissenschaft/immunhistochemie/5998>)

3.2.2 Adaptierung des Versuchsprotokolls an das zu untersuchende Gewebe

Den standardmäßig durchgeführten immunhistochemischen Analysen dieser Arbeit liegt ein vom HNO-Forschungslabor des Universitätsklinikums des Saarlandes etabliertes Färbeprotokoll zugrunde, welches durch eine von mir durchgeführte Modifizierung einzelner Schritte an die Fragestellung sowie das Probenmaterial angepasst wurde. So musste zunächst im Rahmen von Vorversuchen eine an die Gewebeschnitte adaptierte Demaskierungszeit ermittelt werden. Während des Fixierungs- und Einbettungsprozesses des Tumorgewebes kommt es u.a. durch Proteinquervernetzungen zu strukturellen Veränderungen antigener Gewebeelemente, woraus eine reduzierte Antikörperbindekapazität resultiert. Durch den Prozess der Demaskierung (Inkubation des Probenmaterials im Retrieval-Puffer) lassen sich solche Modifikationen zum Teil beheben. Somit kann durch diesen Schritt eine Steigerung der Immunreaktivität des untersuchten Gewebes erzielt werden. In der vorliegenden Arbeit lieferte eine 30-minütige Inkubation der Proben im Retrieval-Puffer die besten Ergebnisse. Anschließend wurden unterschiedliche Verdünnungen des Primärantikörpers getestet, um eine möglichst genaue Abstufung der Färbeintensitäten vornehmen zu können. Für den gegen Sec62 gerichteten Primärantikörper erwies sich eine Verdünnung von 1:400 in 1% BSA in PBS als optimal. Beim Anti-Survivin-Antikörper wurde eine Verdünnung von 1:500 in 1% BSA in PBS gewählt.

3.2.3 Kontrollen

Bei allen Immunfärbungen werden parallel zu den untersuchten Gewebeproben Negativkontrollen der gleichen Schnitte ohne Zusatz des Primärantikörpers mitgeführt. Auf diese Weise lassen sich unspezifische Anfärbungen des Tumorgewebes ausschließen. Außerdem wird bei jedem Lauf ein

Tonsillen- bzw. HNSCC-Präparat im Sinne einer Positivkontrolle mitgeführt, welches über alle Färbungen hinweg eine identische Farbintensität aufweisen muss. Hierdurch können methodische bzw. technische Fehler ausgeschlossen werden.

3.2.4 Versuchsprotokoll für immunhistochemische Färbungen an FFPE-Gewebeschnitten

Mit dem Ziel einer stabilen Fixierung der histologischen Schnitte auf dem Objektträger erfolgt über Nacht eine Inkubation der FFPE-Schnitte im Wärmeschrank bei einer Temperatur von 37°C. Am Folgetag werden die Gewebeschnitte zunächst durch 10-minütiges Eintauchen in Xylol, gefolgt von 3 weiteren Xylolbädern von je 30 Sekunden, entparaffiniert. Anschließend werden die Gewebeproben zum Spülen und Überführen ins hydrophile Milieu, im Sinne einer absteigenden Alkoholreihe, nacheinander für ca. 30 Sekunden in 99%-iges Ethanol (3-mal), 70%-iges Ethanol (3-mal) und schließlich Aqua dest. (2-mal) getaucht. Der frisch angesetzte und in eine Kunststoffküvette gefüllte Citratpuffer (pH 6) wird in der Mikrowelle bei 900W während 3 Minuten auf eine Mindesttemperatur von 95°C erhitzt. Unmittelbar anschließend an die Entparaffinierungs- und Spülschritte werden die Gewebeschnitte zur Demaskierung in den erwärmten Retrievalpuffer überführt und für 30 Minuten im Reiskocher bei mindestens 95°C inkubiert. Danach wird die Plastikküvette samt Gewebeproben aus dem Wasserbad entfernt und zum Abkühlen für ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur gelagert. Sobald der Citratpuffer eine Temperatur von unter 50°C erreicht hat, können die Schnitte 3-mal für jeweils 5 Minuten im Waschpuffer (PBS pH 7,2) gespült werden. Mit dem Ziel der Blockierung unspezifischer Proteinbindungen erfolgt daraufhin eine 30-minütige Inkubation der Proben in 3% BSA in PBS. Ohne zu spülen wird nach dem Abtropfen der Blockierlösung der in 1% BSA in PBS verdünnte Primärantikörper (Verdünnung: siehe Tab. 6) auf die Gewebeschnitte gegeben. Für die Negativkontrollen wird statt des verdünnten Antikörpers als Reagenz 1% BSA in PBS verwendet. Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten bei Raumtemperatur erfolgen erneut 3 Spülschritte von jeweils 5 Minuten im Waschpuffer (PBS pH 7,2). Zur Visualisierung der Antigen-Antikörper-Reaktion bedienen wir uns des Dako REAL™ Detektionssystems, welches eine Stunde vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht wird. Gemäß Herstellerangaben werden die Gewebeschnitte zunächst 30 Minuten mit einem biotinylierten Sekundärantikörper inkubiert und im Anschluss weiteren 3 Waschschritten von jeweils 5 Minuten in PBS (pH 7,2) unterzogen. Es folgt die 30-minütige Inkubation der Proben mit einer Streptavidin-gekoppelten alkalischen Phosphatase mit anschließendem Waschschriff nach beschriebenem Schema. Der letzte Schritt zur Detektion besteht in der 15-minütigen Inkubation der Schnitte mit einer frisch angesetzten Substrat-Chromogen-Lösung (Fast Red). Anschließend erfolgt ein 5-minütiges Spülen der Proben mit Aqua dest. sowie das Gegenfärben mit filtrierte Hämatoxylin für 7 Minuten, gefolgt von einem 10-minütigen

Wässerungsschritt mit Leitungswasser („Bläuen“). Mit dem Ziel der Dehydrierung der Gewebeproben werden die Schnitte nacheinander für ca. 30 Sekunden in 70%-iges Ethanol (3-mal), 99%-iges Ethanol (3-mal) und schließlich Xylol (3-mal) getaucht und mit Entellan eingedeckt.

3.2.5 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Sec62

Die histologische Beurteilung der Sec62-Immunreaktivität erfolgt nach einem von Remmele und Stegner entwickelten immunreaktiven Score (IRS), welcher neben der Farbintensität auch die Anzahl an immunpositiven Zellen berücksichtigt (Remmele & Stegner, 1987). Wenngleich dieser Score ursprünglich zur Evaluation der Hormonrezeptor-Expression bei Mammakarzinomen etabliert wurde, erwies er sich durch seine leichte Nachvollziehbarkeit auch bei anderen histopathologischen Fragestellungen und Tumorentitäten als hilfreiches Werkzeug. Zur Bestimmung des IRS muss im vorliegenden Fall zunächst die Intensität der zytoplasmatischen Sec62-Expression evaluiert werden, welche man mithilfe eines Zahlenwertes nach folgendem Schema beschreibt: 0 = keine Reaktion, 1 = schwache Reaktion, 2 = moderate Reaktion, 3 = starke Reaktion. Als Nächstes gibt man den prozentualen Anteil an Zellen an, welche die zuvor beschriebene Intensität aufweisen. Dies erfolgt wiederum durch Zuhilfenahme eines Zahlenwertes nach folgendem Schlüssel: 0 = keine positiven Zellen, 1 = < 10% positive Zellen, 2 = 10-50% positive Zellen, 3 = 51-80% positive Zellen, 4 = > 80% positive Zellen. Der IRS entspricht dem Produkt aus beiden Zahlenwerten und kann demnach Werte zwischen 0 und 12 annehmen. Es muss angemerkt werden, dass für diese Arbeit ausschließlich morphologisch vitale Tumorzellen mithilfe des IRS bewertet werden. Verhornende bzw. avitale Tumorzellen sind für die hier durchgeführten immunhistochemischen Färbungen schwer zugänglich oder können abgeschwächte Immunreaktivitäten im Sinne falsch-negativer Ergebnisse aufweisen, weshalb sie nicht in die histologische Auswertung einfließen.

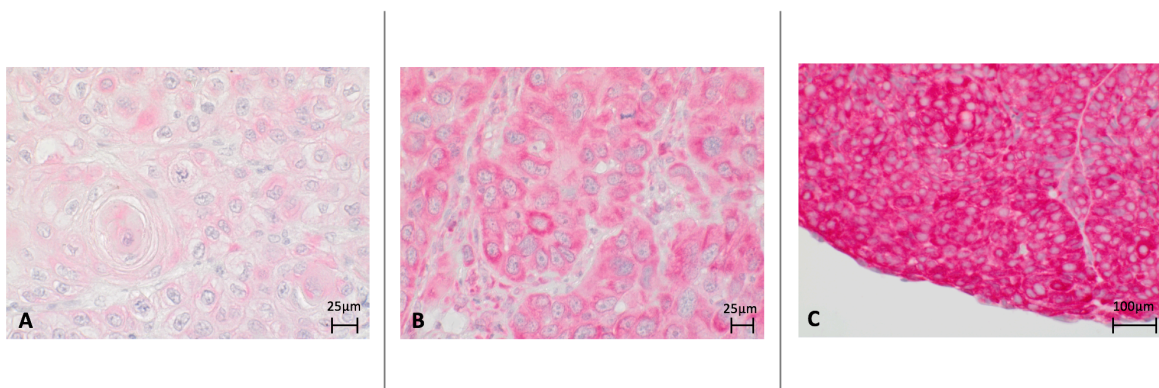


Abbildung 5: Beispielhafte Darstellung immunhistochemisch gefärbter HNSCC-Schnittpräparate mit unterschiedlicher Sec62-Expression (A: schwache Sec62-Expression, B: mäßige bis starke Sec62-Expression, C: starke Sec62-Expression)

Tabelle 6: Immunreaktiver Score (IRS) nach Remmele und Stegner

Färbeintensität				Positive Tumorzellen
Keine (0 Punkte)	Schwach (1 Punkt)	Mäßig (2 Punkte)	Stark (3 Punkte)	
IRS = 0	IRS = 0	IRS = 0	IRS = 0	0% (0 Punkte)
IRS = 0	IRS = 1	IRS = 2	IRS = 3	<10% (1 Punkt)
IRS = 0	IRS = 2	IRS = 4	IRS = 6	10-50% (2 Punkte)
IRS = 0	IRS = 3	IRS = 6	IRS = 9	51-80% (3 Punkte)
IRS = 0	IRS = 4	IRS = 8	IRS = 12	>80% (4 Punkte)

Für die statistische Auswertung erfolgt eine Unterteilung der Gewebeproben in zwei Gruppen, je nachdem ob sie eine starke (*Sec62 high*) oder eine schwache (*Sec62 low*) Sec62-Expression aufweisen. Als Grenzwert zwischen beiden Gruppen fungiert der arithmetische Mittelwert aller ermittelten IRS-Scores des Kollektivs, welcher selbst der *Sec62-high*-Gruppe zugeordnet wird.

Survivin

Im Unterschied zu Sec62 wird Survivin nicht nur im Zytoplasma, sondern auch im Zellkern von Tumorzellen exprimiert, weshalb in diesem Fall beide Zellkompartimente gesondert betrachtet werden müssen. Zu diesem Zweck werden für jeden Gewebeschnitt mindestens vier repräsentative Tumorareale ausgesucht, welche unter dem Durchlicht-Mikroskop in einer 40-fachen Vergrößerung dargestellt werden. Mithilfe der Computersoftware „CellSens Standard“ können pro gefärbtem Schnittpräparat 100 Zellen bezüglich ihrer nukleären und zytoplasmatischen Farbintensität (0 = negativ, 1 = schwach, 2 = moderat, 3 = stark) evaluiert werden. Auf diese Weise lässt sich die Häufigkeitsverteilung der Farbintensitäten beider Zellkompartimente innerhalb eines Tumorpräparates darstellen. Wie für Sec62 muss auch hier für die statistische Auswertung eine dichotomisierte Unterteilung der Gewebeproben in solche mit hoher (*Survivin high*) und solche mit niedriger (*Survivin low*) Survivin-Expression erfolgen. Eine hohe Survivin-Expression liegt vor, wenn die Summe aller Zellen mit moderat und stark gefärbten Zellkernen bzw. Zytoplasmen eines Präparates mehr als 10% aller Tumorzellen desselben Präparates ausmachen (Wemmert et al., 2016).

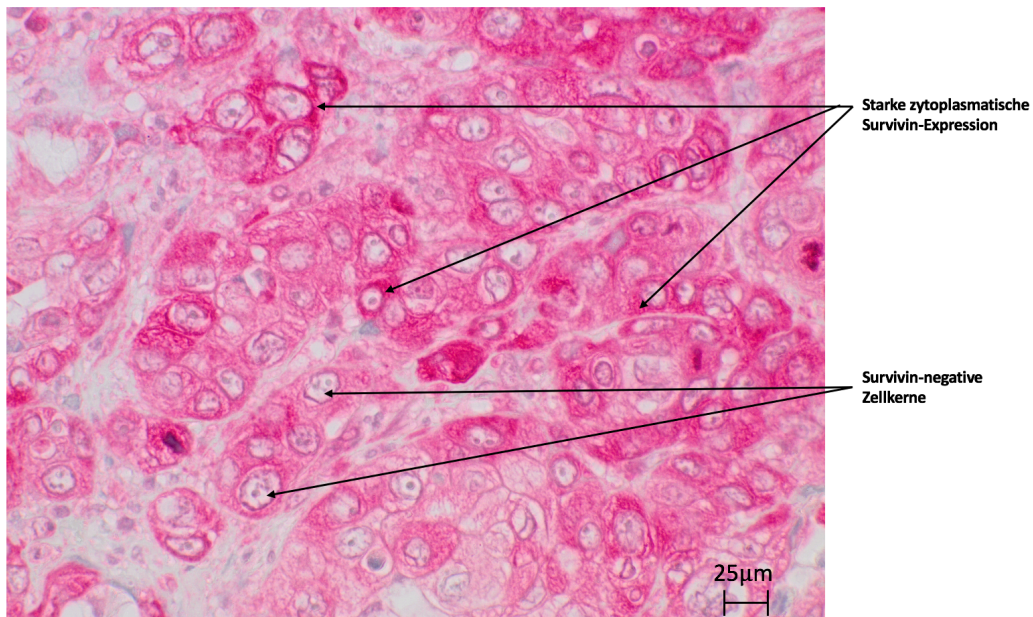


Abbildung 6: Survivin-Immunreaktivität eines HNSCC-Präparates (1). In diesem Beispiel zeigen die Tumorzellen eine moderate bis starke zytoplasmatische, jedoch keine nukleäre Survivin-Expression.

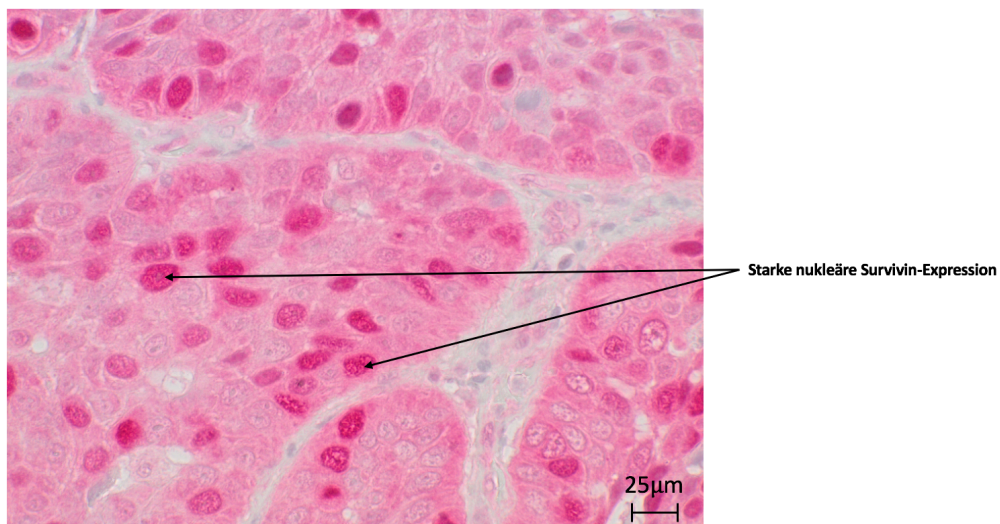


Abbildung 7: Survivin-Immunreaktivität eines HNSCC-Präparates (2). In diesem Beispiel zeigen einige Tumorzellen eine starke nukleäre Survivin-Expression. Die Zytoplasmen weisen eine einheitliche mäßige Survivin-Expression auf.

3.3 Untersuchungsmaterialien für miRNA-Analysen

3.3.1 Blutproben

Für die vorliegende Arbeit erfolgt eine Isolierung von miRNA aus Blutproben von HNSCC-Patienten, welche in der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums des Saarlandes behandelt wurden. Die Verwendung des Patientenmaterials zu Forschungszwecken wurde nach Aufklärung der Spender durch einen Facharzt für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde durch deren schriftliche Einverständniserklärung gestattet. Zur Kontrolle werden Blutproben von gesunden Probanden untersucht, welche ihr Blut allesamt freiwillig für wissenschaftliche Zwecke zur Verfügung gestellt haben. Die Auswahl der Blutproben erfolgt anhand des bereits im Rahmen der immunhistochemischen Analysen untersuchten Patientenkollektivs. Da das Labor der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde jedoch nicht über Blutproben aller zum Kollektiv gehörigen Patienten verfügt, werden die im Folgenden beschriebenen molekularbiologischen Analysen an einem Teilkollektiv von lediglich 29 Patienten durchgeführt.

Die Entnahme der Blutproben erfolgte sowohl bei den HNSCC-Patienten als auch bei den gesunden Probanden in PAXgene™ Blood RNA Tubes. Letztere können mit maximal 2,5mL Blut befüllt werden und enthalten ein spezielles Reagenz, das die entnommene RNA vor Degradierung schützt. Laut Hersteller bleibt die gewonnene RNA durch dieses Vorgehen bei einer Temperatur von 18°C bis 25°C für 3 Tage, bei 2°C bis 8°C für 5 Tage und bei -20°C bis -80°C für mindestens 50 Monate stabil. Die für diese Arbeit verwendeten Blutproben wurden nach deren Entnahme bei einer Temperatur von -80°C gelagert. Vor der Isolierung von RNA inklusive miRNA müssen die Blutproben aufgetaut und anschließend zur vollständigen Lyse der Blutzellen für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert werden.

3.3.2 Geräte und Software

In Tabelle 7 findet sich eine Auflistung der für die molekularbiologischen Analysen verwendeten Geräte und Software.

Tabelle 7: Für molekularbiologische Untersuchungen verwendete Geräte und Software

Geräte / Software	Bezeichnung	Hersteller
Real-Time PCR plus Software	StepOne Plus™ Real-Time PCR System	Applied Biosystems® Life Technologies, Darmstadt
	StepOne Software v2.3	

PCR-Gerät	peqSTAR96X Universal Gradient	PEQLAB VWR International GmbH, Erlangen
Spektrometer plus Software	NanoDrop ND-1000	NanoDrop Technologies Inc Wilmington, DC, USA
	ND-1000 Software V3.8.1	
Thermomixer	comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge	Minispin	Eppendorf AG, Hamburg
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, USA
Zentrifuge	Centrifuge 5804R	Eppendorf AG, Hamburg

3.3.3 Chemikalien, Enzyme, Verbrauchsmaterialien und Kits

In Tabelle 8 sind die im Rahmen der molekularbiologischen Analysen verwendeten Chemikalien, Enzyme, Verbrauchsmaterialien und Kits aufgeführt.

Tabelle 8: Für molekularbiologische Untersuchungen verwendete Chemikalien, Enzyme, Verbrauchsmaterialien und Kits

Chemikalien, Enzyme, Verbrauchsmaterialien, Kits	Hersteller
Isopropanol 100%	Aug. Hedinger GmbH & Co.KG, Stuttgart
MicroAmp Fast 96-well Reaction Plate (0,1mL)	Applied Biosystems® Life Technologies, Darmstadt
MicroAmp Optical Adhesive Film	Applied Biosystems® Life Technologies, Darmstadt
RNase-freies Wasser	Life Technologies, Darmstadt
PAXgene™ Blood miRNA Kit	PreAnalytiX, Hombrechtikon, Schweiz
PAXgene™ Blood RNA Tubes	PreAnalytiX, Hombrechtikon, Schweiz
TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit	Applied Biosystems® Life Technologies, Darmstadt
TaqMan® Fast Advanced Master Mix	Applied Biosystems® Life Technologies, Darmstadt
TaqMan® miRNA Assays: <ul style="list-style-type: none"> • hsa-miR-16 (Kontrolle) • hsa-miR-191 (Kontrolle) • hsa-miR-101 • hsa-miR-203a • hsa-miR-218 • hsa-miR-455 	Applied Biosystems® Life Technologies, Darmstadt

3.4 Molekularbiologische Methoden zur Analyse des miRNA-Profiles von HNSCC-Patienten

3.4.1 RNA-Isolierung inklusive miRNA aus Vollblut

Die Isolierung von RNA inklusive miRNA aus PAXgene™ RNA Blood Tubes erfolgt unter Zuhilfenahme eines speziellen PAXgene™ Blood miRNA Kits, entsprechend den Herstellerangaben. Mit dem Ziel einer kompletten Lyse der Blutzellen werden die PAXgene™ RNA Blood Tubes zunächst für 2 Stunden

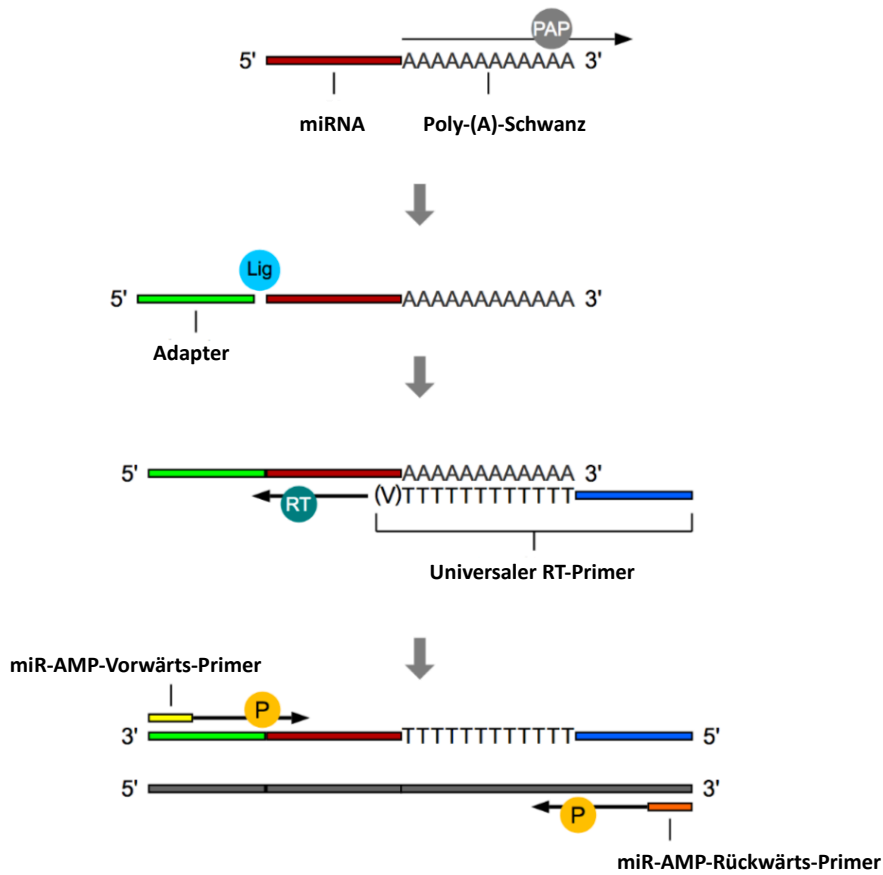
bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die PAXgene™ RNA Blood Tubes für 10 Minuten bei 4000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Als Nächstes wird das Pellet in 4mL RNase-freiem Wasser durch Vortexen gelöst und erneut für 10 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert. Auch hier wird der Überstand verworfen. Im Anschluss wird das Pellet in 350µL BM1-Puffer durch Vortexen gelöst und anschließend in ein 1,5mL-Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Es folgt die Zugabe von 300µL BM2-Puffer sowie 40µL Proteinase K. Nach 5-sekündigem Vortexen wird die Probe für 10 Minuten bei 55°C mit 1220 rpm im Thermomixer inkubiert. Daraufhin wird die Probe in das PAXgene™ Shredder Spin Column (lila) in einem 2mL-Processing Tube überführt und für 3 Minuten bei 13000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der gesamte Durchfluss (Überstand) wird nun in ein neues 1,5mL-Mikrozentrifugenröhrchen gefüllt, das Pellet verworfen. Anschließend werden 700µL 100%-iges Isopropanol hinzugegeben und die Probe kurz gevortext. Im nächsten Schritt werden 700µL der Probe in das PAXgene™ Shredder Spin Column (rot) in einem 2mL-Processing Tube überführt und für 1 Minute bei 13000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Auf diese Weise wird die RNA inklusive miRNA an die Membran des Säulenröhrchens gebunden, sodass der Durchfluss verworfen werden kann. Der Rest der Probe wird auf die gleiche Weise ins PAXgene™ Shredder Spin Column (rot) gegeben und zentrifugiert, der Durchfluss wiederum verworfen. Zum Waschen werden daraufhin 350µL vom BM3-Puffer hinzugegeben, für 15 Sekunden bei 13000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Es folgt das Ansetzen des DNase-I-Inkubationsmixes durch Mischen von 10µL DNase und 70µL RDD-Puffer in einem neuen 1,5mL-Mikrozentrifugenröhrchen. Zum Verdauen der DNA wird dieser direkt auf die Membran des PAXgene™ Shredder Spin Column pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur werden zum Waschen erneut 350µL des BM3-Puffers hinzugegeben und die Probe für 15 Sekunden bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Es folgen zwei weitere Waschschrte mit jeweils 500µL des BM4-Puffers, wobei nach den ersten 500µL für 15 Sekunden bei 13000 rpm, nach den zweiten 500µL jedoch für 2 Minuten bei gleicher Umdrehungszahl zentrifugiert wird. Nach erneuter Zentrifugation für 1 Minute bei 13000 rpm in einem neuen Processing Tube erfolgt die zweimalige Elution mit 40µL BM5-Puffer bei einer Zentrifugation von 1 Minute bei 13000 rpm in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen. Schlussendlich wird das Eluat, welches die isolierte RNA inklusive miRNA enthält, für 5 Minuten bei 65°C im Thermomixer inkubiert. Vor dem Lagern der RNA bei -80°C wird die RNA-Konzentration mithilfe eines Spektrophotometers gemessen und das Ergebnis notiert.

3.4.2 Bestimmung des miRNA-Profiles durch quantitative Real-Time PCR

Kary B. Mullis entwickelte im Jahre 1987 ein Verfahren, welches eine gezielte Amplifikation von definierten Nukleotidsequenzen *in vitro* ermöglicht. Diese als Polymerasekettenreaktion (PCR) bezeichnete Methode hat sich heute als eine der wichtigsten Standardmethoden der Molekularbiologie etabliert und beruht auf einer sich in Zyklen wiederholenden Abfolge von Reaktionsschritten, die zu einer exponentiellen Zunahme von DNA-Molekülen führen. Der erste Schritt besteht in der Auftrennung der DNA, welche die zu amplifizierende Sequenz enthält, in zwei Einzelstränge (Denaturierung). Dies wird durch eine Erwärmung der DNA-Probe auf ca. 90°C ermöglicht. Anschließend erfolgt der Zusatz von zwei Oligonukleotid-Primern, welche komplementär zu den 3'-Enden der DNA-Einzelstränge sind und sich durch Abkühlung der Probe auf etwa 50-60°C an ihre komplementären Sequenzen anlagern (*Annealing*). Schließlich erfolgt durch die Zugabe einer thermostabilen DNA-Polymerase sowie der vier Desoxyribonukleosidtriphosphate dATP, dTTP, dCTP und dGTP die Synthese der zu den Einzelsträngen komplementären DNA-Stränge (Strangverlängerung). Die Effektivität der PCR wird deutlich, wenn man sich vor Augen führt, dass die Zielsequenz nach nur 20 solcher Reaktionszyklen bereits um das 10⁶-fache vervielfältigt worden ist. Da in dieser Arbeit aus Vollblut isolierte RNA inklusive miRNA als Ausgangsmaterial verwendet wird, muss zunächst eine reverse Transkription der RNA in doppelsträngige cDNA erfolgen, welche als Matrize für die PCR dient.

Reverse Transkription der isolierten miRNAs

Das Umschreiben der aus Vollblut isolierten miRNA in cDNA erfolgt unter Verwendung des TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kits entsprechend den Herstellerangaben. Das Verfahren erfordert zunächst eine strukturelle Modifikation der miRNAs durch Anhängen eines Poly-A-Schwanzes an deren 3'-Ende und einer Adaptersequenz an deren 5'-Ende. Auf diese Weise lässt sich die miRNA in nur einem Schritt mithilfe der reversen Transkriptase (RT) in cDNA umschreiben, da die modifizierten miRNA-Moleküle mit dem angehängten Poly-A-Schwanz nun alle über die gleiche Startsequenz für den RT-Primer verfügen. Aus dem gleichen Grund ist auch die nachfolgende Amplifikation der cDNA durch die DNA-Polymerase in nur einer Reaktion möglich.



- PAP Poly-(A)-Polymerase
- Lig Ligase
- RT Reverse Transkriptase
- P DNA-Polymerase

Abbildung 8: Strukturelle Modifikation und reverse Transkription der isolierten miRNA (modifiziert nach TaqMan® Advanced miRNA User Guide [Single tube Assays], Applied Biosystems® Life Technologies, Darmstadt)

Zunächst wird aus der isolierten RNA inklusive miRNA ein Reaktionsansatz mit 1-10ng/μL in einem Probenvolumen von 2μL hergestellt. Anschließend erfolgt der Ansatz des Mastermixes für die Polyadenylierungsreaktion in einem 1,5mL-Tube nach dem in Tabelle 9 aufgeführten Schema mit anschließendem Vortexen und Zentrifugieren des Mastermixes.

Tabelle 9: Mastermix für die Polyadenylierungsreaktion

Komponente	Volumen für 1 Probe
10X-Poly(A)-Puffer	0,5 µL
ATP	0,5 µL
Poly(A)-Enzym	0,3 µL
RNase-freies Wasser	1,7 µL
Total	3,0 µL

Im nächsten Schritt werden 2µL der RNA-Probe mit 3µL des Mastermixes gemischt, woraufhin die Polyadenylierung im PCR-Gerät mit den in Tabelle 10 aufgeführten Zyklus-Bedingungen gestartet werden kann.

Tabelle 10: Zyklusbedingungen für die Polyadenylierungsreaktion

Schritt	Zeit in min	Temperatur in °C
Polyadenylierung	45	37
Reaktionsstopp	10	65
Lagerung	∞	4

Anschließend wird der Mastermix für die Ligation der Adaptersequenz in einem 1,5mL-Tube aus den in Tabelle 11 aufgelisteten Komponenten angesetzt und nachfolgend gevortext und abzentrifugiert.

Tabelle 11: Mastermix für die Ligation der Adaptersequenz

Komponente	Volumen für 1 Probe
5X DNA-Ligase-Puffer	3,0 µL
50% PEC 8000	4,5 µL
25X Ligations-Adapter	0,6 µL
RNA-Ligase	1,5 µL
RNase-freies Wasser	0,4 µL
Total	10,0 µL

Als Nächstes werden 5µL der Poly-A-miRNA-Lösung mit 10µL des Adapter-Ligations-Mastermixes gemischt, woraufhin die Ligation bei 16°C für 60 Minuten und anschließender Lagerung bei 4°C im PCR-Gerät erfolgt (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Zyklusbedingungen für die Adapter-Ligationsreaktion

Schritt	Zeit in min	Temperatur in °C
Ligation	60	16
Lagerung	∞	4

Auch für die nun folgende reverse Transkription ist das Ansetzen eines Mastermixes erforderlich, der entsprechend der Tabelle 13 in einem 1,5mL-Tube zusammengemischt und analog zu den beiden vorherigen gevortext und zentrifugiert wird.

Tabelle 13: Mastermix für die reverse Transkription

Komponente	Volumen für 1 Probe
5X RT-Puffer	6,0 µL
dNTP Mix (jeweils 25mM)	1,2 µL
20X Universal-RT-Primer	1,5 µL
10X RT-Enzym-Mix	3,0 µL
RNase-freies Wasser	3,3 µL
Total	15,0 µL

Anschließend werden 15µL der Adapter-Ligations-miRNA-Probe zu 15µL des Mastermixes für die reverse Transkription gegeben und das Ganze anschließend ins PCR-Gerät überführt. Die reverse Transkription findet bei 42°C für 15 Minuten statt, gefolgt von einem 5-minütigen Reaktionsstopp bei 85°C. Die Probe wird bis zum nächsten Schritt bei 4°C gelagert (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: Zyklusbedingungen für die reverse Transkription

Schritt	Zeit in min	Temperatur in °C
Reverse Transkription	15	42
Reaktionsstopp	5	85
Lagerung	∞	4

Der letzte Schritt besteht in einer Amplifikation der entstandenen cDNA (miR-Amp-Reaktion). Die Komponenten des entsprechenden Mastermixes finden sich in Tabelle 15. Das Ansetzen erfolgt erneut in einem 1,5mL-Tube und das Reaktionsgemisch wird wie in den vorherigen Schritten gevortext und abzentrifugiert.

Tabelle 15: Mastermix für die Amplifikation der cDNA (miR-Amp-Reaktion)

Komponente	Volumen für 1 Probe
2X miR Amp Master Mix	25,0 µL
20X miR Amp Primer Mix	2,5 µL
RNase-freies Wasser	17,5 µL
Total	45,0 µL

5µL des RT-Reaktionsprodukts werden mit 45µL des miR-Amp-Mastermixes gemischt. Darauf folgt die Amplifikation im PCR-Gerät mit den in Tabelle 17 aufgeführten Zyklusbedingungen.

Tabelle 17: Zyklusbedingungen für die miR-Amp-Reaktion

Schritt	Zeit	Temperatur in °C	Zyklen
Enzymaktivierung	5 min	95	1
Denaturierung	3 s	95	14
Annealing/Extension	30 s	60	14
Reaktionsstopp	10 min	99	1
Lagerung	∞	4	1

Das unverdünnte miR-Amp-Produkt entspricht der amplifizierten cDNA und ist für bis zu 2 Monate bei -20°C haltbar.

Quantitative Real-Time PCR

Die Methode der quantitativen Real-Time PCR ermöglicht eine kontinuierliche Überwachung des Fortschritts der Polymerasekettenreaktion in Echtzeit. Die Reaktionen werden hier nicht wie bei der konventionellen PCR anhand der nach einer bestimmten Anzahl an Zyklen angereicherten Nukleinsäurekopien beurteilt, sondern vielmehr anhand des Zeitpunkts, bei dem erstmals eine Vervielfältigung des Zielgens nachgewiesen werden kann. Zur Durchführung der quantitativen Real-Time PCR werden der TaqMan™ Fast Advanced Mastermix sowie die für die zu untersuchenden miRNAs spezifischen Primer und Sonden des TaqMan™ miRNA Assays verwendet. Die im Assay enthaltene Oligonukleotidsonde bindet an ihre komplementäre Nukleinsäuresequenz innerhalb des Zielgens und zeichnet sich durch den Reporter-Fluoreszenz-Farbstoff 6-Carboxy-Fluorescein (F) an ihrem 5'-Ende und den nicht-fluoreszierenden Quencher-Farbstoff (Q) sowie den Minor-Groove-Binder am 3'-Ende aus (siehe Abbildung 9). Solange die Sonde intakt innerhalb der Sequenz liegt, wird die Emission des Reporters durch einen Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer unterdrückt, welcher durch die räumliche Nähe des Reporters zum Quencher zustande kommt. Die ebenfalls im Assay enthaltenen Primer binden wie die Sonde an den Matrizenstrang und stellen den Ausgangspunkt der Elongation durch die AmpliTaq Gold® DNA-Polymerase UP des TaqMan™ Fast Advanced Mastermixes dar. Trifft die DNA-Polymerase auf die Sonde, wird letztere verdrängt und durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase vollständig hydrolysiert. Es kommt zur Freisetzung des Reporters und somit zu dessen räumlicher Trennung vom Quencher, wodurch letztlich das Signal des Reporters enthemmt wird und die Emission (520nm) gemessen werden kann. Die Fluoreszenz ist direkt proportional zur Menge der entstehenden PCR-Produkte und steigt dementsprechend mit jedem PCR-Zyklus an. Damit die Fluoreszenz gemessen werden kann, müssen die Sonden während des PCR-Vorgangs mit einer spezifischen Wellenlänge von 488 nm angeregt werden.

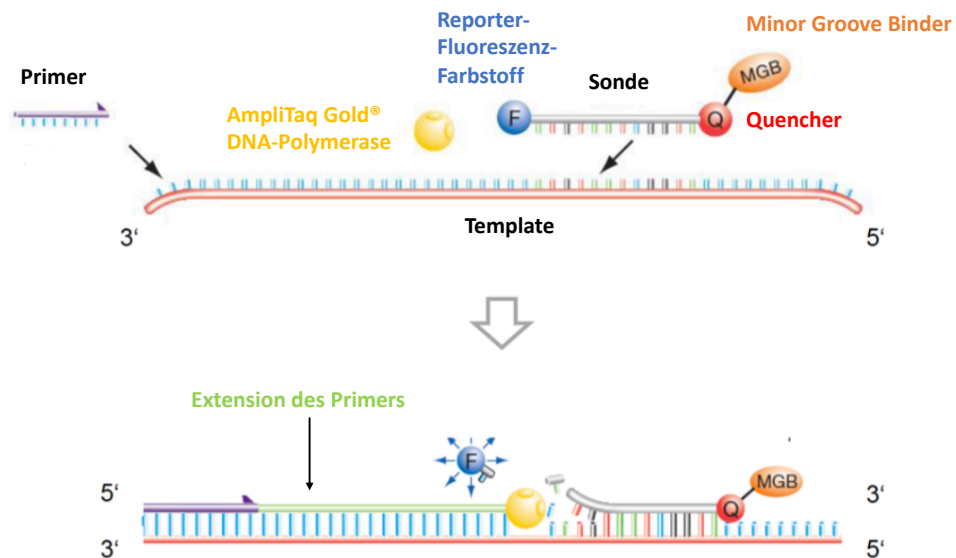


Abbildung 9: Funktionsweise der TaqMan®-Sonde (modifiziert nach Applied Biosystems® StepOne und StepOnePlus von Applied Biosystems® Life Technologies, Darmstadt)

In dieser Arbeit erfolgt die Real-Time PCR im 96-Well Format. Jede miRNA-cDNA-Probe wird dabei in vierfacher Ausführung mitgeführt. Weiterhin läuft pro Versuch für jede eingesetzte Sonde eine Negativkontrolle ohne Template als Duplikat mit. Die cDNA-Probe wird in einem Verhältnis von 1:10 im 0,1X-TE-Puffer verdünnt und auf Eis gelagert. Anschließend erfolgt der Ansatz des PCR-Mastermixes in einem 1,5mL-Tube nach dem in Tabelle 18 aufgeführten Schema mit nachfolgendem Vortexen und Zentrifugieren des Mastermixes.

Tabelle 18: Mastermix für die PCR

Komponente	Volumen für 1 Probe	Volumen für 10 Proben (+10% Überschuss)
TaqMan™ Fast Advanced Mastermix (2X)	5 µL	55 µL
TaqMan miRNA Assay (20X)	0,5 µL	5,5 µL
Nuklease-freies Wasser	2 µL	22 µL
Total	7,5 µL	82,5 µL

In jedes Well werden nun 7,5µL des PCR-Mastermixes und 2,5µL der miRNA-cDNA-Probe gegeben, sodass ein Ansatz von insgesamt 10µL pro Well entsteht. Schließlich wird die Platte mit einer Folie luftdicht verschlossen und für 1 Minute bei 1000 U/min zentrifugiert. Die Messungen erfolgen

mithilfe des StepOnePlus™ Real-Time PCR-Systems nach den in Tabelle 19 aufgeführten Zyklus-Bedingungen. Für die Auswertung wird die StepOne Software v2.3 verwendet.

Tabelle 19: Zyklus-Bedingungen der Real-Time PCR

Schritt	Temperatur in °C	Zeit in Sekunden	Zyklen
Enzymaktivierung	95	20	1
Denaturierung	95	1	40
Annealing + Extension	60	20	40

3.4.3 Relative Quantifizierung

Generell stehen mit der absoluten und der relativen Quantifizierung zwei Möglichkeiten zur Auswertung der Real-Time PCR-Daten zur Verfügung. In der vorliegenden Arbeit wird eine relative Quantifizierung mit Normalisierung auf ein Referenzgen (*housekeeping gene*) ohne Real-Time PCR-Effizienz-Korrektur (sog. $\Delta\Delta C_T$ -Methode) durchgeführt.

Die Real-Time PCR liefert eine typische Kurve, welche die exponentielle Amplifikation der Zielsequenz widerspiegelt und sich in drei Abschnitte unterteilen lässt. Am Anfang der Polymerasekettenreaktion (Startphase) dominiert aufgrund der geringen DNA-Menge die Hintergrundfluoreszenz. An die Startphase schließt sich die exponentielle Phase an, bei der es in jedem Zyklus theoretisch zu einer Verdoppelung der Zielsequenz kommt. Da die Effizienz der Real-Time PCR in der Praxis jedoch nicht exakt bei 100% liegt, ist eher von einer Amplifikation der Ausgangs-DNA um das 1,7-1,9-fache auszugehen. Die gemessene Fluoreszenz ist direkt proportional zur Menge der DNA-Kopien. Der Eintritt in die exponentielle Phase findet demnach umso früher statt, je mehr DNA-Kopien in der initialen Probe enthalten sind. Nach einer gewissen Zeit erreicht die Kurve ein Plateau, welches dadurch zustande kommt, dass die PCR durch eine zunehmende Menge an hybridisierenden DNA-Produkten gehemmt wird.

Für die Analyse einer Real-Time-PCR-Kurve müssen insbesondere drei Kenngrößen berücksichtigt werden. Als *Baseline* wird das schwache Fluoreszenzsignal der ersten 3 bis 15 Zyklen bezeichnet, welches keine nennenswerten Schwankungen aufweist und auch als „Hintergrundrauschen“ bezeichnet wird. Hebt sich das Fluoreszenzsignal erstmalig signifikant von der *Baseline* ab, bezeichnet man dieses bestimmte Signal als *Threshold*. Das wichtigste Maß für die relative Quantifizierung ist der sog. C_T -Wert (*Threshold cycle*), welcher der Anzahl an Zyklen entspricht, bei der das Signal den *Threshold* passiert. Der C_T -Wert wird demnach definiert als die Anzahl an PCR-Zyklen, bei der das Fluoreszenzsignal zum ersten Mal signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. C_T -Werte ab

35 werden oftmals nicht mehr berücksichtigt, da in den entsprechenden Proben nur sehr wenig miRNA enthalten ist und deswegen mit ungenauen Messergebnissen gerechnet werden muss.

Die $\Delta\Delta C_T$ -Methode ist eine komparative Quantifikationsmethode und zeichnet sich dadurch aus, dass die Patientenproben zum einen mit Proben von gesunden Versuchspersonen (Kalibrator-Proben) und zum anderen mit einer endogenen Kontrolle (Referenzgen bzw. *housekeeping gene*) verglichen werden. Zu diesem Zweck berechnet man zunächst die Differenz der C_T -Werte von Zielgen und Referenzgen. Dies erfolgt sowohl für die Patientenproben als auch für die Kalibratorproben.

$$C_{T \text{ Zielgen}} (\text{Patientenprobe}) - C_{T \text{ Referenzgen}} (\text{Patientenprobe}) = \Delta C_T (\text{Patientenprobe})$$

$$C_{T \text{ Zielgen}} (\text{Kalibratorprobe}) - C_{T \text{ Referenzgen}} (\text{Kalibratorprobe}) = \Delta C_T (\text{Kalibratorprobe})$$

Anschließend wird die Differenz beider ΔC_T -Werte ermittelt, woraus der $\Delta\Delta C_T$ -Wert resultiert.

$$\Delta C_T (\text{Patientenprobe}) - \Delta C_T (\text{Kalibratorprobe}) = \Delta\Delta C_T$$

Mithilfe dieses Wertes lässt sich bestimmen, um welchen Faktor sich die Expression des Zielgens in den Patientenproben von der Expression des Zielgens in Proben von gesunden Versuchspersonen unterscheidet.

$\text{relative Expression} = n\text{-fache Expression des Zielgens (Patientenprobe zu Kalibratorprobe)} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$

Das Einführen einer endogenen Kontrolle ist erforderlich, um Schwankungen in der Ausgangsmenge der RNA-Proben auszugleichen. Ein ideales Referenzgen wird in gesundem und in Tumorgewebe gleichermaßen stabil und unabhängig von äußeren Einflüssen wie Medikamenten oder Stress exprimiert. Die Herstellerfirma der verwendeten Assays schlägt mit miR-16 und miR-191 zwei miRNAs vor, welche im Rahmen dieser Arbeit als endogene Kontrolle eingesetzt werden können. Da innerhalb der analysierten Blutproben sowohl bei den Kontrollen als auch bei den HNSCC-Patienten für beide miRNAs eine stabile Expression nachgewiesen werden konnte, kommen theoretisch sowohl miR-16 als auch miR-191 als Referenzgen infrage (siehe Abbildungen 10 und 11). Aufgrund des Vorhandenseins zweier Ausreißer in der miR-191-Expression von HNSCC-Patienten wurde miR-16 als endogene Kontrolle ausgewählt. Die graphische Darstellung der C_T -Werte beider miRNAs bei HNSCC-

Patienten und Kontrollen in Form von Boxplot-Diagrammen sowie das statistische Testen mittels Mann-Whitney-U-Test wurden mithilfe der Software SPSS Statistics Version 25 durchgeführt.

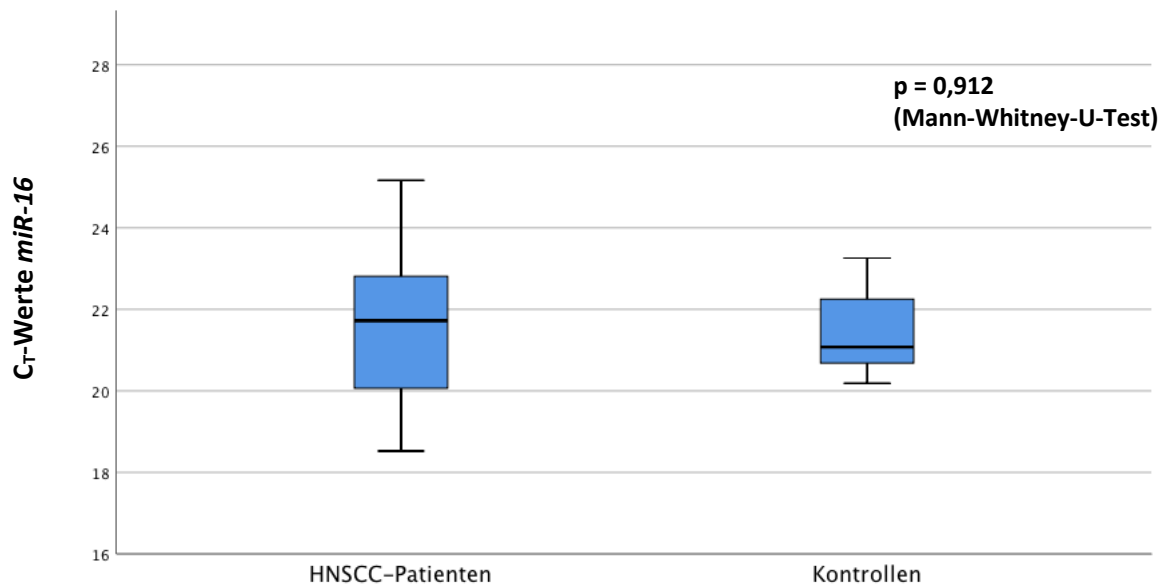


Abbildung 10: Boxplots zur Überprüfung der Stabilität der endogenen Kontrolle (*housekeeping gene*) miR-16 innerhalb der untersuchten Blutproben von gesunden Patienten (Kontrollen) und von HNSCC-Patienten. miR-16 zeigte für alle untersuchten Proben eine stabile Expression und wurde daher als endogene Kontrolle für die folgenden Real-Time PCR-Analysen ausgewählt.

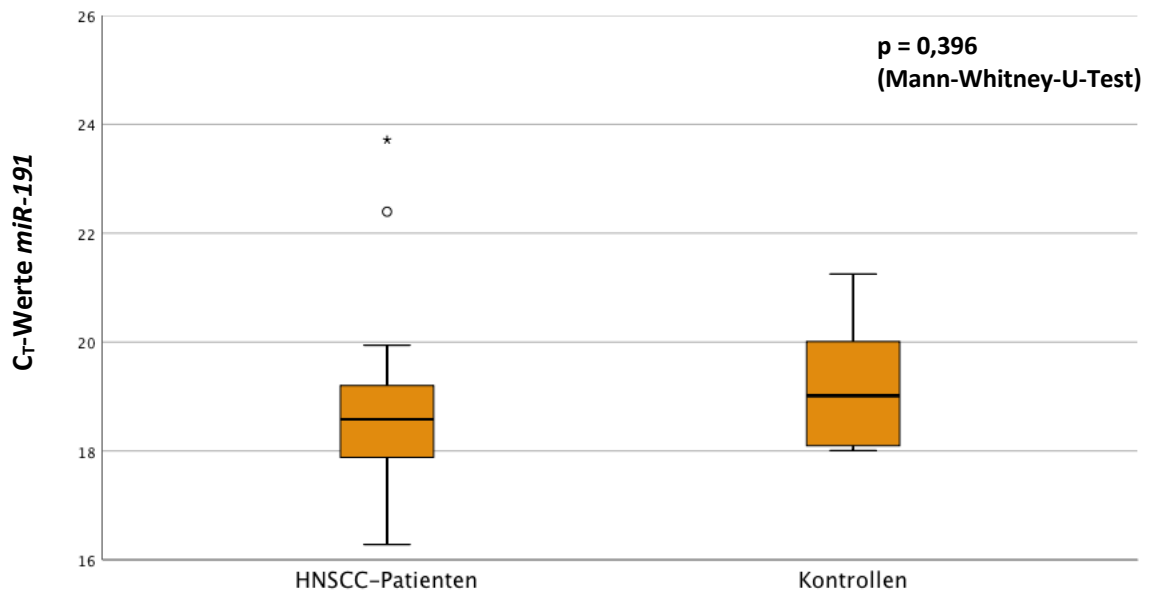


Abbildung 11: Boxplots zur Überprüfung der Stabilität der endogenen Kontrolle (*housekeeping gene*) miR-191 innerhalb der untersuchten Blutproben von gesunden Patienten (Kontrollen) und von HNSCC-Patienten. miR-191 zeigte eine stabile Expression bei HNSCC-Patienten und Kontrollen, wurde jedoch aufgrund des Vorliegens zweier Ausreißer nicht als endogene Kontrolle ausgewählt.

4. Ergebnisse

4.1 Beschreibung des Patientenkollektivs

Ziel dieser Arbeit ist es, die Rolle von Sec62 und Survivin als diagnostische bzw. prognostische Biomarker bei Patienten mit einem diagnostizierten Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region näher zu beleuchten, indem erstmalig definierte Untergruppen eines Gesamtkollektivs, welche sich durch ein bestimmtes gemeinsames Merkmal (bspw. einen Vitamin D-Mangel) auszeichnen, getrennt voneinander betrachtet werden. Weiterhin soll überprüft werden, ob bisherige Erkenntnisse zu den genannten Proteinen reproduzierbar sind. In einem zweiten Teil dieser Arbeit liegt das Interesse in der Identifizierung und Charakterisierung von miRNAs im Vollblut von HNSCC-Patienten, von denen angenommen wird, dass sie sich durch eine dysregulierte Expression bei Tumorpatienten auszeichnen und gleichzeitig die Expression von Sec62 bzw. Survivin beeinflussen können. Durch die Korrelation der miRNA-Expression mit klinischen, histopathologischen und immunhistochemischen Daten soll untersucht werden, ob die interessierenden miRNAs als neue Biomarker bei HNSCC-Patienten eingesetzt werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurde Probenmaterial von insgesamt 98 Patienten mit einem diagnostizierten Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region untersucht. Dabei wurde für jeden Patienten des Kollektivs (n = 98) eine Tumorgewebeprobe im Rahmen von immunhistochemischen Analysen hinsichtlich ihrer Sec62- und Survivin-Expression beurteilt und die Ergebnisse anschließend mit klinisch-pathologischen Patientendaten (siehe Tabelle 20) korreliert. Des Weiteren erfolgte eine Isolierung von RNA inklusive miRNA aus Vollblutproben von insgesamt 29 der 98 HNSCC-Patienten des Gesamtkollektivs mit dem Ziel, ausgewählte miRNAs, welche möglicherweise einen Einfluss auf den Sec62- bzw. Survivin-Status der Kopf-Hals-Tumoren nehmen, im Hinblick auf ihre Expression im Blut zu untersuchen. Das Expressionsmuster der analysierten miRNAs wurde anschließend mit den Ergebnissen aus den immunhistochemischen Analysen sowie den klinisch-pathologischen Patientendaten korreliert. Die unterschiedlichen Fallzahlen für das Gesamt- und das Teilkollektiv lassen sich darauf zurückführen, dass das Forschungslabor der Klinik für Hals, Nasen- und Ohrenheilkunde am Universitätsklinikum des Saarlandes nicht in allen Fällen über beide Probenmaterialien (Gewebeprobe und Vollblut) gleichzeitig verfügte.

In der nachfolgenden Tabelle 20 wurden die klinischen und histopathologischen Daten der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patienten zusammengefasst und für das Gesamtkollektiv (Gewebeprobekollektiv für immunhistochemische Untersuchungen; n = 98) sowie das Teilkollektiv (Blutprobekollektiv für miRNA-Analysen; n = 29) getrennt dargestellt. Gesamt- und Teilkollektiv

weisen mit 65 bzw. 67 Jahren ein annähernd identisches Durchschnittsalter der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung auf. Auch unterscheiden sich beide Kollektive nur unwesentlich in der Geschlechterverteilung der Patienten, dem Verhältnis von HPV-positiven zu HPV-negativen Plattenepithelkarzinomen, dem TNM-Stadium sowie dem Differenzierungsgrad (*Grading*) der Kopf-Hals-Tumoren. Während die Patienten des Gesamtkollektivs zur Hälfte (n = 49) einen Vitamin D-Mangel aufweisen, trifft dies im Blutprobenkollektiv lediglich auf 9 der insgesamt 29 Patienten zu.

Tabelle 20: Klinische und histopathologische Patientendaten

Klinische und histopathologische Daten		Gewebeproben-Kollektiv (n = 98)	Blutproben-Kollektiv (n = 29)
Durchschnittliches Alter bei Erstdiagnose in Jahren (Altersspanne)		65 (33-87)	67 (51-87)
Geschlecht	männlich	79 (80,6%)	23 (79,3%)
	weiblich	19 (19,4%)	6 (20,7%)
Vitamin D - Status	Vitamin D - Mangel	49 (50,0%)	9 (31,0%)
	ausreichende Vitamin D - Versorgung	49 (50,0%)	20 (69,0%)
HPV-Status (Nachweis von p16 und HPV-DNA-PCR)	positiv	15 (15,3%)	6 (20,7%)
	negativ	83 (84,7%)	23 (79,3%)
T-Stadium	T1	15 (15,3%)	5 (17,2%)
	T2	40 (40,8%)	10 (34,5%)
	T3	22 (22,4%)	6 (20,7%)
	T4	21 (21,4%)	8 (27,6%)
N-Stadium	N0	30 (30,6%)	9 (31,0%)
	N1	15 (15,3%)	3 (10,3%)
	N2	46 (46,9%)	16 (55,2%)
	N3	7 (7,1%)	1 (3,4%)
M-Stadium	M0	92 (93,9%)	27 (93,1%)
	M1	6 (6,1%)	2 (6,9%)
Grading	G1	2 (2,0%)	0 (0,0%)
	G2	49 (50,0%)	15 (51,7%)
	G3	47 (48,0%)	14 (48,3%)

Zum untersuchten Gesamtkollektiv gehören 19 Frauen und 79 Männer. Das früheste Erkrankungsalter liegt in diesem Kollektiv bei 33 Jahren, das späteste bei 87 Jahren, wobei die meisten Kopf-Hals-Tumoren in einem Patientenalter zwischen 60 und 69 Jahren diagnostiziert

wurden (siehe Abbildung 12). Abbildung 13 zeigt eine Aufteilung der Plattenepithelkarzinome des Untersuchungskollektivs anhand ihrer Lokalisation innerhalb der Kopf-Hals-Region. Das Gesamtkollektiv setzt sich aus 34 Mundhöhlenkarzinomen (34,7%), 23 Oropharynxkarzinomen (23,5%), 8 Hypopharynxkarzinomen (8,2%) sowie aus 23 Larynxkarzinomen (23,5%) zusammen. Die übrigen 10 (10,2%) Plattenepithelkarzinome des Gesamtkollektivs zeichnen sich dadurch aus, dass sie sich über mehr als nur eine Etage der Kopf-Hals-Region ausbreiten, und werden im Folgenden als „Mehretagentumoren“ bezeichnet. Als Mundhöhlenkarzinome werden in dieser Arbeit Plattenepithelkarzinome des Mundbodens, des Zungenrandes, des Weichgaumens und der Wange zusammengefasst. Tonsillenkarzinome werden den Oropharynxkarzinomen zugeordnet.

Das Blutprobenkollektiv setzt sich aus 6 Frauen und 23 Männern zusammen. Das früheste Erkrankungsalter liegt bei 51 Jahren, das späteste bei 87 Jahren. Analog zum Gesamtkollektiv wurden auch im vorliegenden Teilkollektiv die meisten Kopf-Hals-Tumoren in einem Alter von 60 bis 69 Jahren diagnostiziert. Aufgrund der geringeren Fallzahlen unterscheiden sich die einzelnen Altersgruppen jedoch nur unwesentlich bezüglich der Erkrankungsfälle (siehe Abbildung 14). Zum Blutprobenkollektiv gehören 9 Mundhöhlenkarzinome (31,03%), 10 Oropharynxkarzinome (34,48%), 5 Larynxkarzinome (17,24%) sowie 5 Mehretagentumoren (17,24%). Plattenepithelkarzinome der Lokalisation Hypopharynx sind im vorliegenden Teilkollektiv nicht vertreten (siehe Abbildung 15).

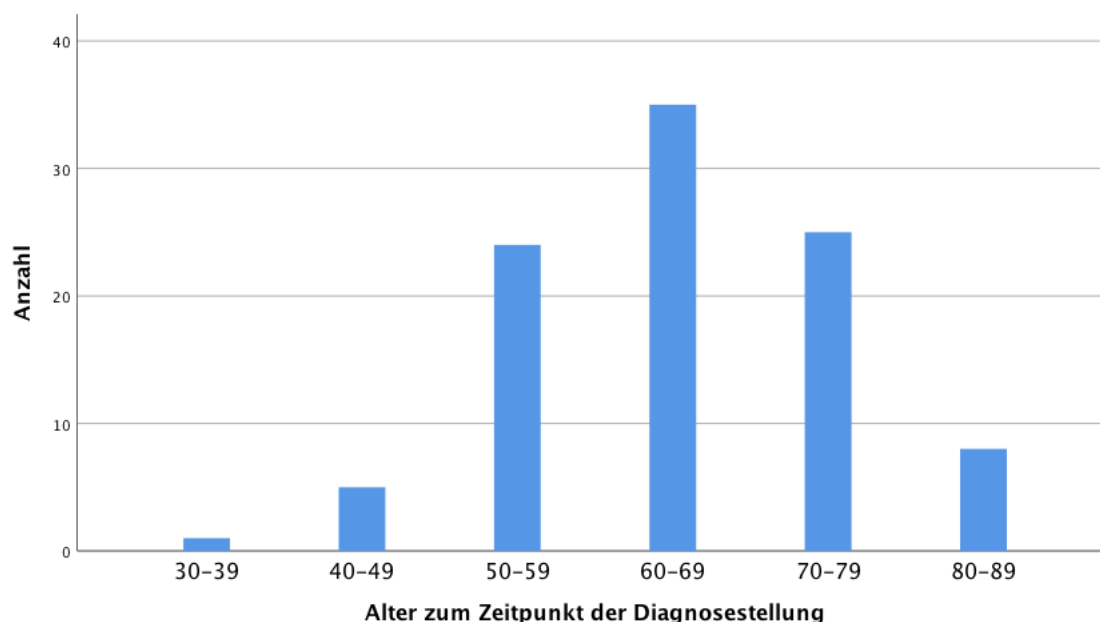


Abbildung 12: Altersverteilung der HNSCC-Patienten des Gesamtkollektivs (n = 98) zum Zeitpunkt der Diagnosestellung.

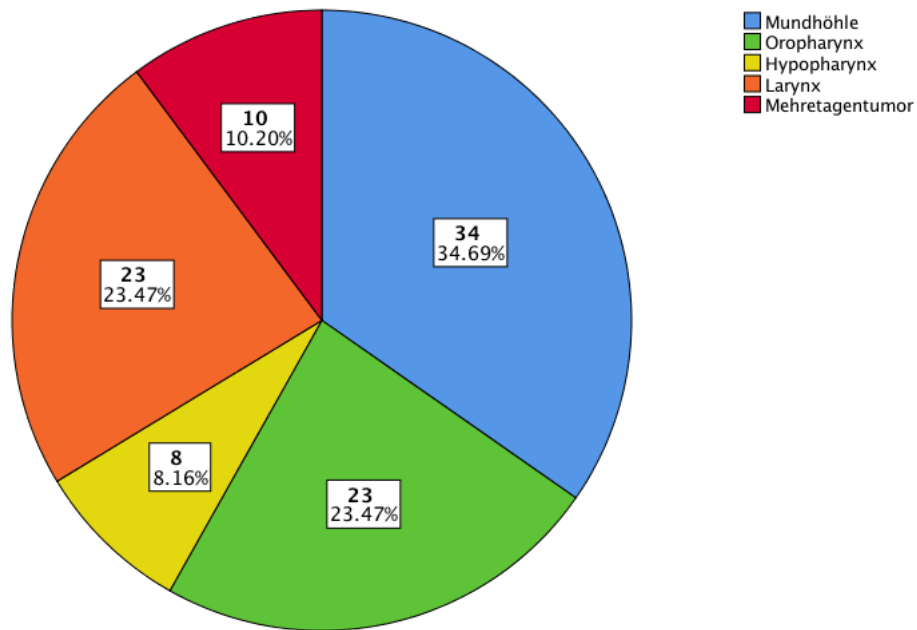


Abbildung 13: Lokalisation der Kopf-Hals-Tumoren des Gesamtkollektivs innerhalb der Kopf-Hals-Region. Die fett gedruckten Zahlen entsprechen der absoluten Anzahl an Plattenepithelkarzinomen der jeweiligen Lokalisation. Für jede Fraktion wurden zusätzlich die relativen Häufigkeiten in Prozent angegeben.

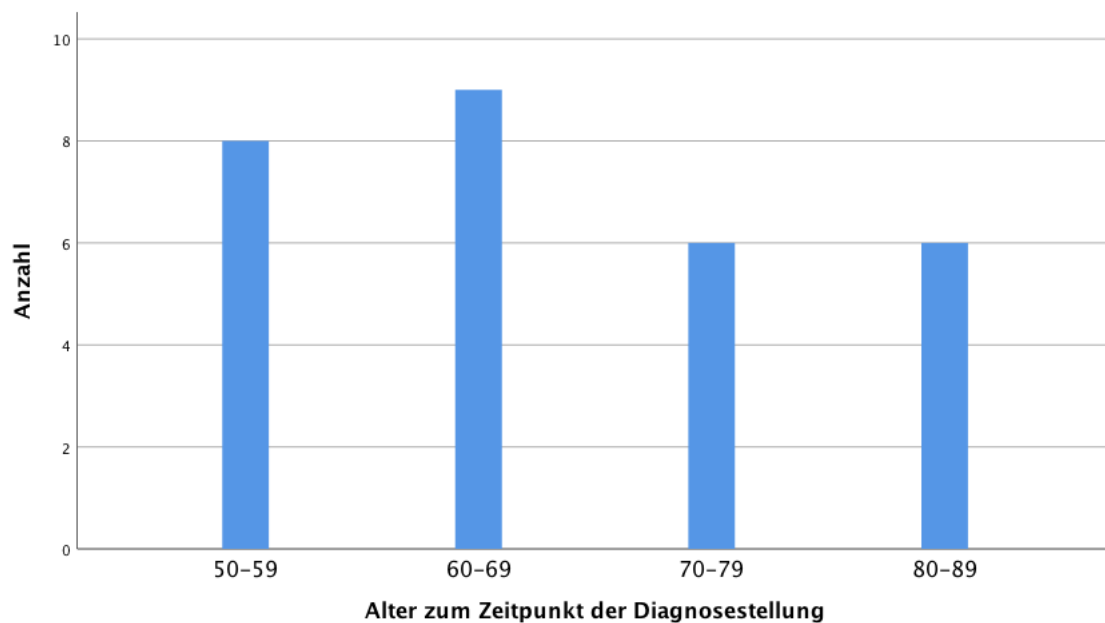


Abbildung 14: Altersverteilung der HNSCC-Patienten des Blutprobenkollektivs (n = 29) zum Zeitpunkt der Diagnosestellung.

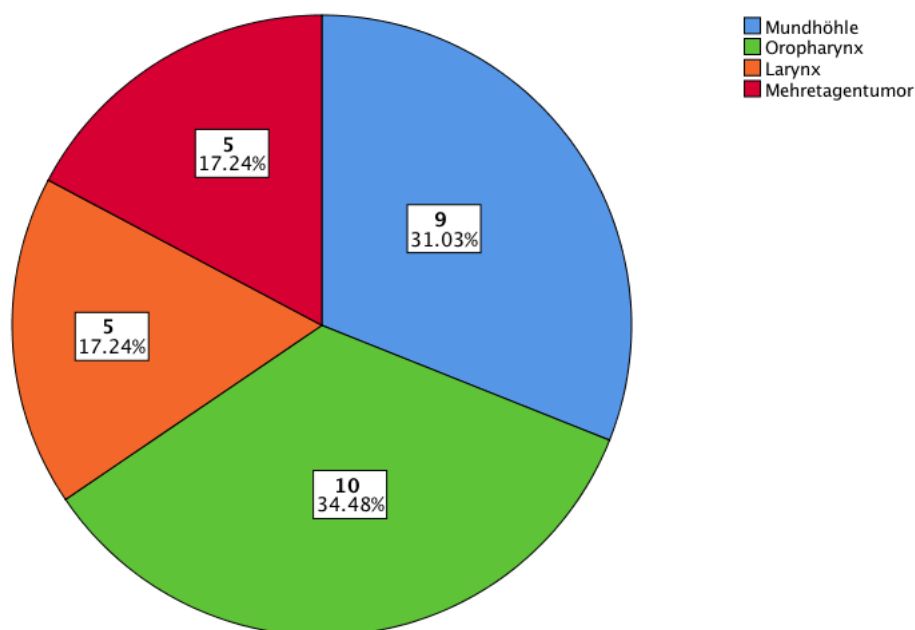


Abbildung 15: Lokalisation der Kopf-Hals-Tumoren des Blutprobenkollektivs innerhalb der Kopf-Hals-Region. Die fett gedruckten Zahlen entsprechen der absoluten Anzahl an Plattenepithelkarzinomen der jeweiligen Lokalisation. Für jede Fraktion wurden zusätzlich die relativen Häufigkeiten in Prozent angegeben.

4.2 Analyse der klinischen Parameter „HPV-Status“ und „Vitamin D-Versorgung“

4.2.1 HPV-Status

Das untersuchte Patientenkollektiv ($n = 98$) beinhaltet insgesamt 15 HPV-positive und 83 HPV-negative Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region, wobei die überwiegende Mehrheit der HPV-positiven Tumore im Oropharynx lokalisiert sind ($10/15 = 66,7\%$). Weiterhin zeigen 3 Mundhöhlenkarzinome ($3/15 = 20\%$), ein Larynxkarzinom ($1/15 = 6,7\%$), sowie ein Mehretagentumor ($1/15 = 6,7\%$) einen positiven HPV-Status. In der Fraktion der Hypopharynxkarzinome sind im vorliegenden Kollektiv hingegen alle Tumoren HPV-negativ (siehe Abbildung 16).

Patienten, deren Kopf-Hals-Tumoren einen positiven HPV-Status aufweisen, zeigen ein besseres Gesamtüberleben als Patienten mit HPV-negativen HNSCCs ($p = 0,055$ im log-rank-Test; siehe Abbildung 17). Die als HPV-positiv charakterisierten Plattenepithelkarzinome des Untersuchungskollektivs weisen maximal ein T3-Stadium auf, d.h. alle Malignome im Stadium T4 besitzen einen negativen HPV-Status ($p = 0,036$ im Chi-Quadrat-Test; siehe Abbildung 18). Darüber hinaus weisen HPV-positive HNSCCs in 13 von 15 Fällen ($86,7\%$) eine schlechte Differenzierung (G3) auf und das Verhältnis von HPV-positiven zu HPV-negativen Tumoren unterscheidet sich signifikant

zwischen gut / mäßig (G1 + G2) und schlecht differenzierten (G3) Malignomen ($p = 0,001$ im Chi-Quadrat-Test; siehe Abbildung 19).

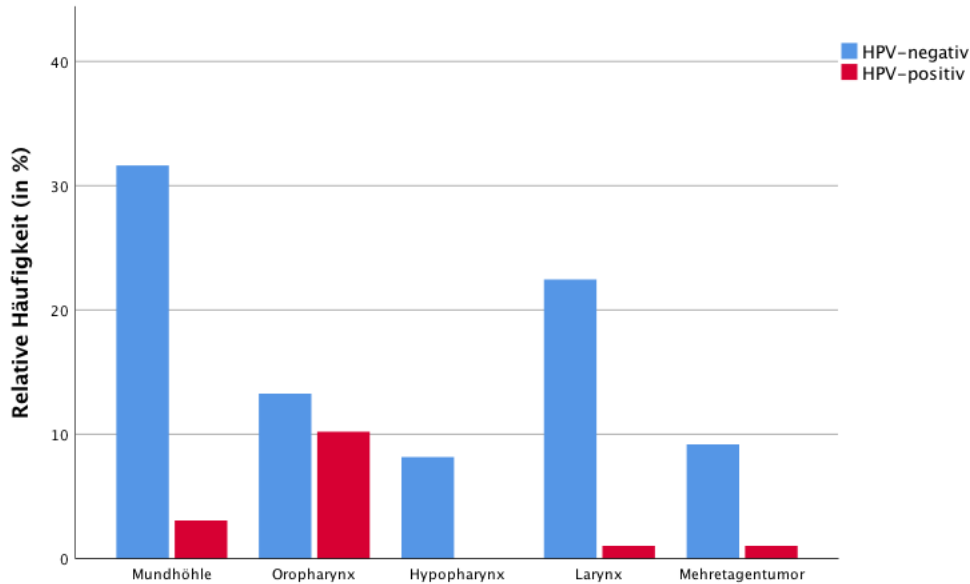


Abbildung 16: HPV-Status bei Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region. Die überwiegende Mehrheit der Kopf-Hals-Tumoren des Untersuchungskollektivs weist einen negativen HPV-Status auf ($83/98 = 84,7\%$). Von den 15 HPV-positiven HNSCCs ($15/98 = 15,3\%$) ist die Mehrzahl ($10/15 = 66,7\%$) im Oropharynx lokalisiert.

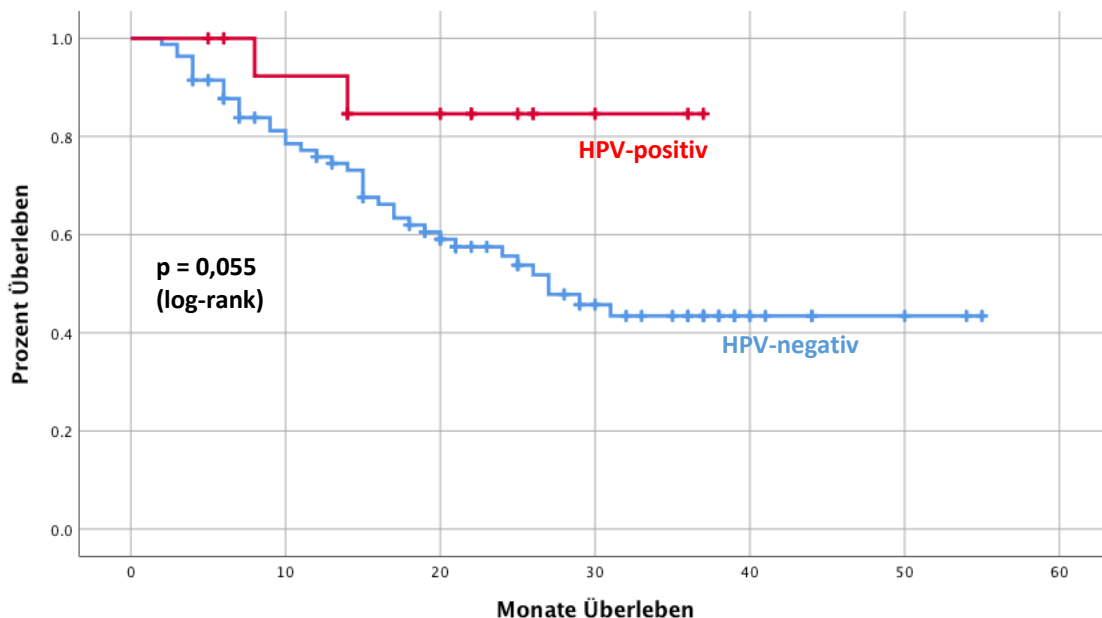


Abbildung 17: Gesamtüberleben von Patienten mit HPV-positiven und HPV-negativen HNSCCs. Der Kaplan-Meier-Analyse ist zu entnehmen, dass HNSCCs mit positivem HPV-Status mit einer besseren Prognose einhergehen als solche mit negativem HPV-Status ($p = 0,055$ im log-rank-Test). Die Kreuze stehen für Patienten, welche zum Ende der Nachbeobachtungszeit am Leben waren (zensierte Beobachtungen).

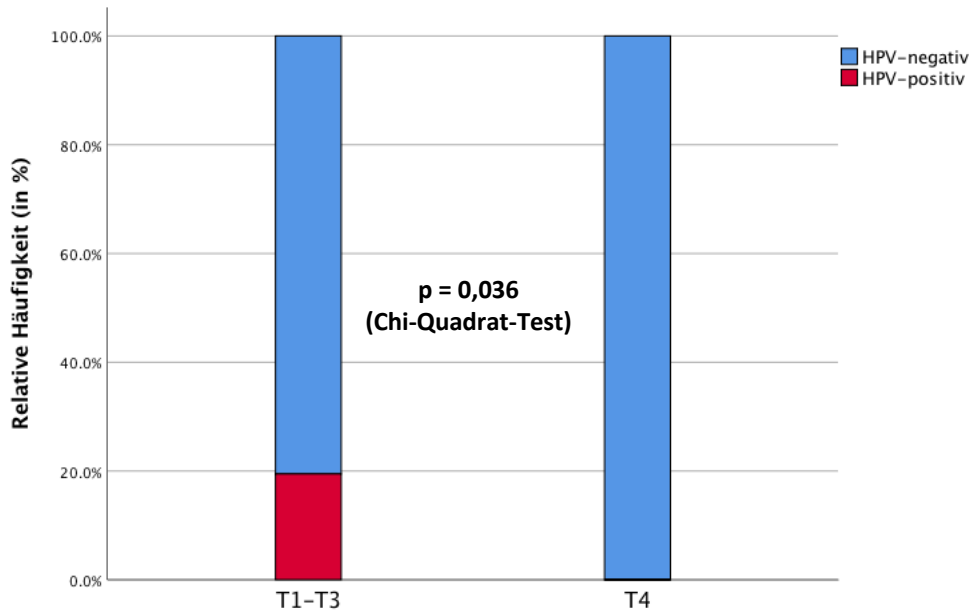


Abbildung 18: HPV-Status von HNSCCs unterschiedlicher Tumorstadien (T). Die HPV-positiven Kopf-Hals-Tumoren des Kollektivs weisen maximal ein T3-Stadium auf.

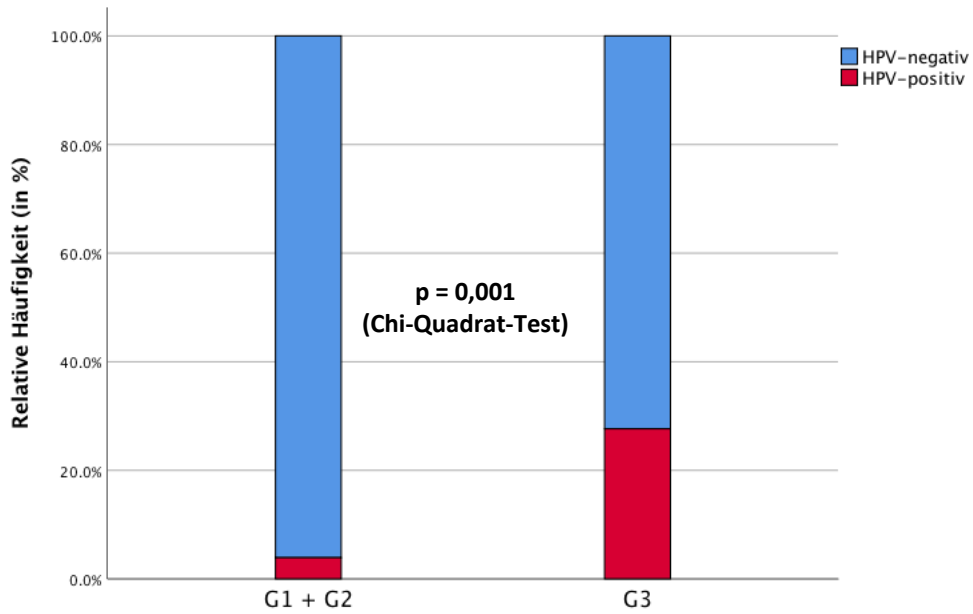


Abbildung 19: HPV-Status von HNSCCs unterschiedlicher Differenzierung (G-Status). Von den schlecht differenzierten HNSCCs des Kollektivs weisen 27,7% einen positiven HPV-Status auf. Von den gut bzw. mäßig differenzierten Tumoren sind hingegen nur 3,9% HPV-positiv.

4.2.2 Vitamin D-Versorgung der Patienten

Das Patientenkollektiv (n = 98) lässt sich in zwei gleich große Teilkollektive unterteilen, je nachdem ob die Patienten eine ausreichende Vitamin D-Versorgung aufweisen (25-(OH)₂-Spiegel ≥ 10 ng/ml; Vitamin D *high*; n = 49) oder ob bei ihnen ein Vitamin D-Mangelzustand vorliegt (25-(OH)₂-Spiegel < 10 ng/ml; Vitamin D *low*; n = 49). Die Patienten mit einem Vitamin D-Mangel zeigen ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben als die Patienten, bei denen ausreichende Vitamin D-Spiegel vorliegen (p = 0,016; siehe Abbildung 20). Weiterhin unterscheiden sich die beiden Teilkollektive im Hinblick auf den HPV-Status der zugehörigen Kopf-Hals-Tumoren. In der Vitamin D-*high*-Gruppe weisen die Plattenepithelkarzinome im Vergleich zur Vitamin D-*low*-Gruppe signifikant häufiger einen positiven HPV-Status auf (p = 0,004 im Chi-Quadrat-Test; siehe Abbildung 21).

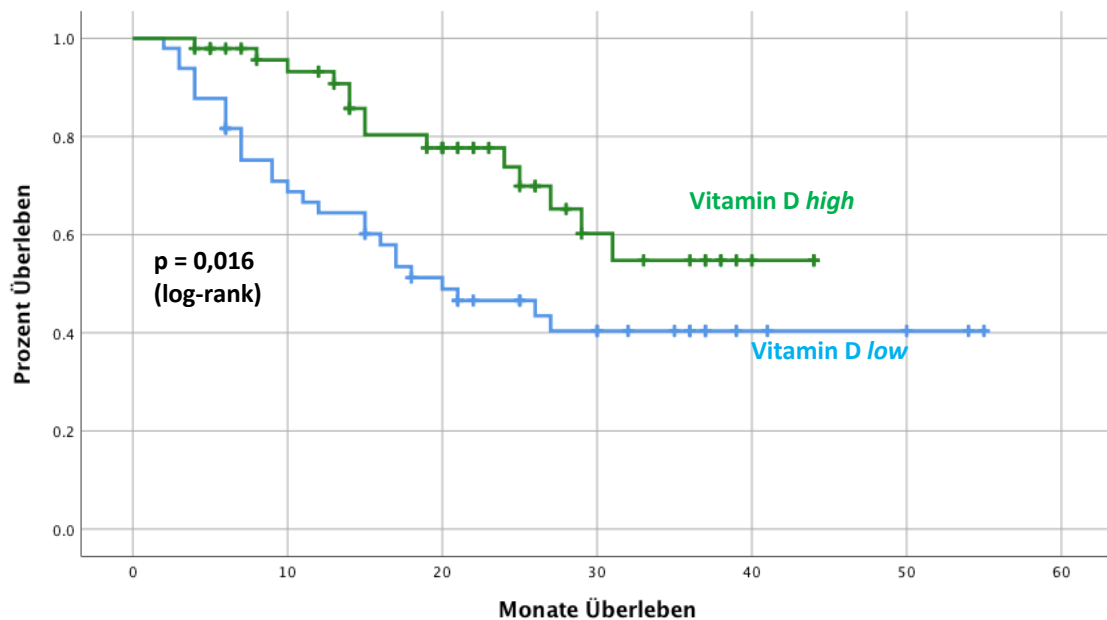


Abbildung 20: Gesamtüberleben von HNSCC-Patienten in Abhängigkeit von ihrer Vitamin D-Versorgung. Der Kaplan-Meier-Analyse ist zu entnehmen, dass Patienten mit einer ausreichenden Vitamin D-Versorgung ein signifikant besseres Gesamtüberleben aufweisen als Patienten mit einem Vitamin D-Mangel. Die Kreuze stehen für Patienten, welche zum Ende der Nachbeobachtungszeit am Leben waren (zensierte Beobachtungen).

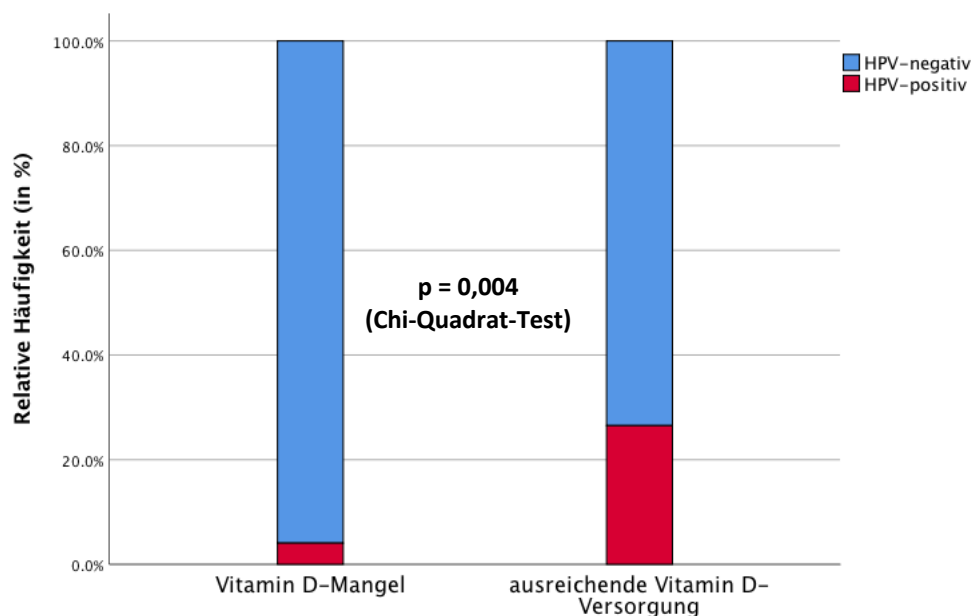


Abbildung 21: Darstellung des Verhältnisses von HPV-positiven zu HPV-negativen HNSCCs bei Patienten mit unterschiedlicher Vitamin D-Versorgung. In der Gruppe der Patienten mit unzureichenden Vitamin D-Spiegeln weisen nur 2 von 49 (4,1%) Tumoren einen positiven HPV-Status auf. Bei den Patienten mit einer guten Vitamin D- Versorgung sind hingegen 13 der insgesamt 49 (26,5%) Malignome HPV-positiv.

4.3 Immunhistochemische Analyse der Sec62-Expression in Kopf-Hals-Tumoren

Mit dem Ziel, die Sec62-Expression im Tumorgewebe von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region zu bestimmen und die Ergebnisse anschließend mit klinisch-pathologischen Patientendaten zu korrelieren, wurde für jeden HNSCC-Patienten des Gesamtkollektivs ($n = 98$) eine immunhistochemische Färbung von Schnittpräparaten des zur Verfügung stehenden Tumorgewebes durchgeführt. Parallel zum Tumorgewebe wurde für jeden Versuch ein Tonsillen-Schnittpräparat im Sinne einer Positivkontrolle mitgeführt. Letztere wies für jede durchgeführte Versuchsreihe ein identisches Färbeverhalten auf. Als zusätzliche „interne“ Positivkontrolle fungierten die in peritumoralen Entzündungsinfiltraten vorkommenden reaktiven Plasmazellen. Letztere weisen aufgrund ihres hohen Gehalts an rauem endoplasmatischem Retikulum physiologischerweise eine hohe Sec62-Expression auf.

Unter Zuhilfenahme des immunreaktiven Scores nach Remmele und Stegner ließ sich die immunhistochemisch bestimmte Sec62-Expression quantifizieren. Abbildung 22 zeigt die Häufigkeitsverteilung der im Zuge dieser Auswertung bestimmten IRS-Werte. Diese bilden die Grundlage für die in Abbildung 23 dargestellte dichotomisierte Unterteilung der Tumoren in solche mit hoher (Sec62 *high*) und solche mit niedriger Sec62-Expression (Sec62 *low*). Im untersuchten Patientenkollektiv ($n = 98$) wurde für 5 Tumoren (5,1%) ein IRS von 0, für 13 Tumoren (13,3%) ein IRS

von 3, für 16 Tumoren (16,3%) ein IRS von 4, für 2 Tumoren (2,0%) ein IRS von 6, für 17 Tumoren (17,3%) ein IRS von 8, für 24 Tumoren (24,5%) ein IRS von 9 und für 21 Tumoren (21,4%) ein IRS von 12 ermittelt (siehe Abbildung 22). Der Mittelwert aller erhobenen IRS-Werte liegt bei 7,34. Als HNSCCs mit hoher Sec62-Expression (*Sec62 high*) werden in dieser Arbeit solche Tumoren definiert, deren IRS-Wert mindestens dem (abgerundeten) Mittelwert aller ermittelten IRS-Werte entspricht (hier: IRS = 7). Liegt der erhobene IRS-Wert dagegen unterhalb des Mittelwerts, wird von einer schwachen Sec62-Expression (*Sec62 low*) gesprochen. Demzufolge setzt sich das Kollektiv aus 62 Tumoren (63,27%) mit hoher Sec62-Expression und 36 Tumoren (36,73%) mit geringer Sec62-Expression zusammen (siehe Abbildung 23).

In der nachfolgenden Abbildung 24 wurde zusätzlich zur Sec62-Expression der Plattenepithelkarzinome auch deren Lokalisation innerhalb der Kopf-Hals-Region berücksichtigt. Die überwiegende Mehrheit der Tumoren mit hoher Sec62-Expression hat ihren Ursprung im Plattenepithel der Mundhöhle (23/62). Hier beträgt das Verhältnis von Tumoren mit hoher Sec62-Expression zu solchen mit niedriger Sec62-Expression etwa 2:1. Bei den Karzinomen des Oropharynx und des Larynx halten sich *Sec62-high*- (jeweils 12/62) und *Sec62-low*-Tumoren (jeweils 11/36) nahezu die Waage. Von den insgesamt 8 zum Kollektiv gehörigen Hypopharynxkarzinomen zeigen insgesamt 7 eine hohe Sec62-Expression. Ähnlich verhält es sich bei den Mehretagentumoren, bei denen 8 von insgesamt 10 Tumoren der *Sec62-high*-Gruppe zugeordnet worden sind (siehe Abbildung 24).

Mithilfe der in Abbildung 25 dargestellten Kaplan-Meier-Analyse wurde der Einfluss der immunhistochemisch ermittelten Sec62-Expression auf das Gesamtüberleben der Patienten untersucht. Kopf-Hals-Tumoren, welche eine hohe Sec62-Expression aufweisen (*Sec62 high*), gehen mit einer signifikant schlechteren Prognose einher als solche mit einer schwachen Sec62-Expression (*Sec62 low*) ($p = 0,047$ im log-rank-Test, siehe Abbildung 25).

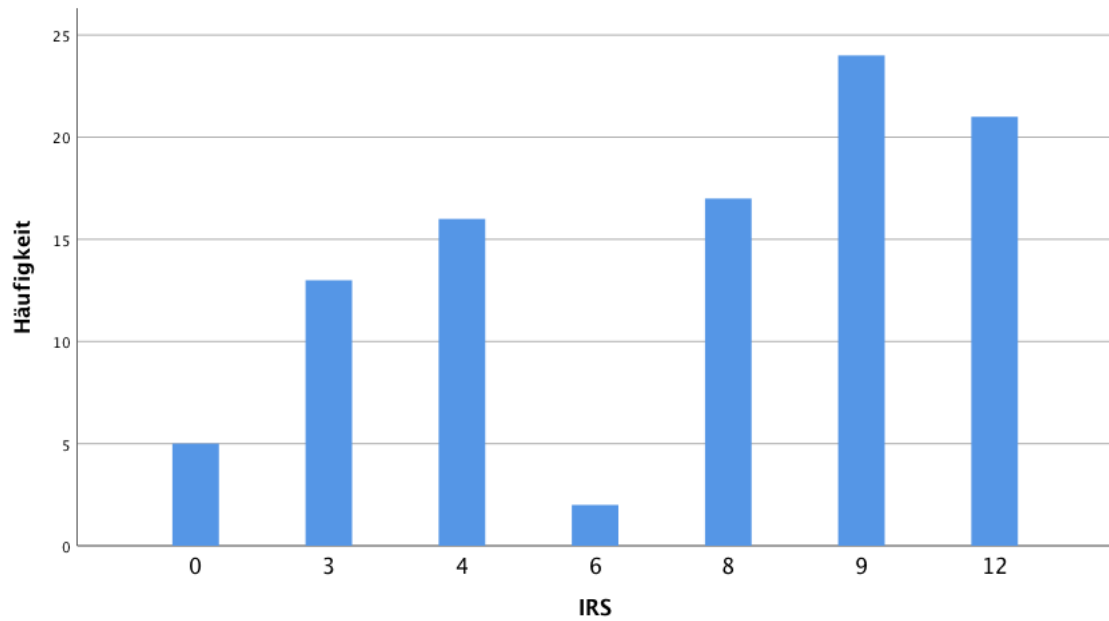


Abbildung 22: Absolute Häufigkeitsverteilung der immunhistochemisch vergebenen IRS-Werte.

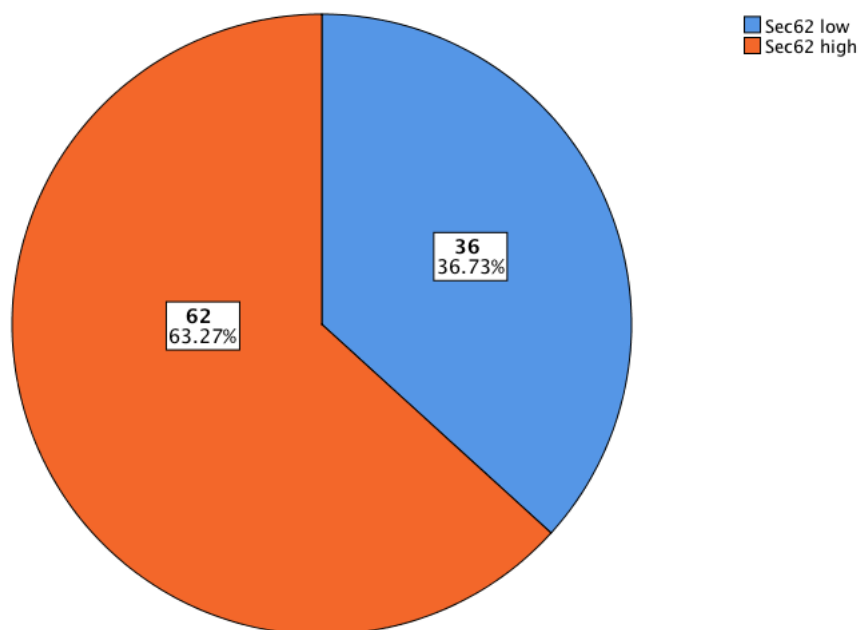


Abbildung 23: Verhältnis von HNSCCs mit hoher Sec62-Expression (**Sec62 high**) zu solchen mit niedriger Sec62-Expression (**Sec62 low**). Das Kollektiv besteht aus insgesamt 62 HNSCCs mit hoher Sec62-Expression (63,27%) und 36 HNSCCs mit niedriger Sec62-Expression (36,73%). Als Grenzwert beider Gruppen fungiert der Mittelwert aller vergebenen IRS-Werte, welcher selbst der Sec62-high-Gruppe zugeordnet wird.

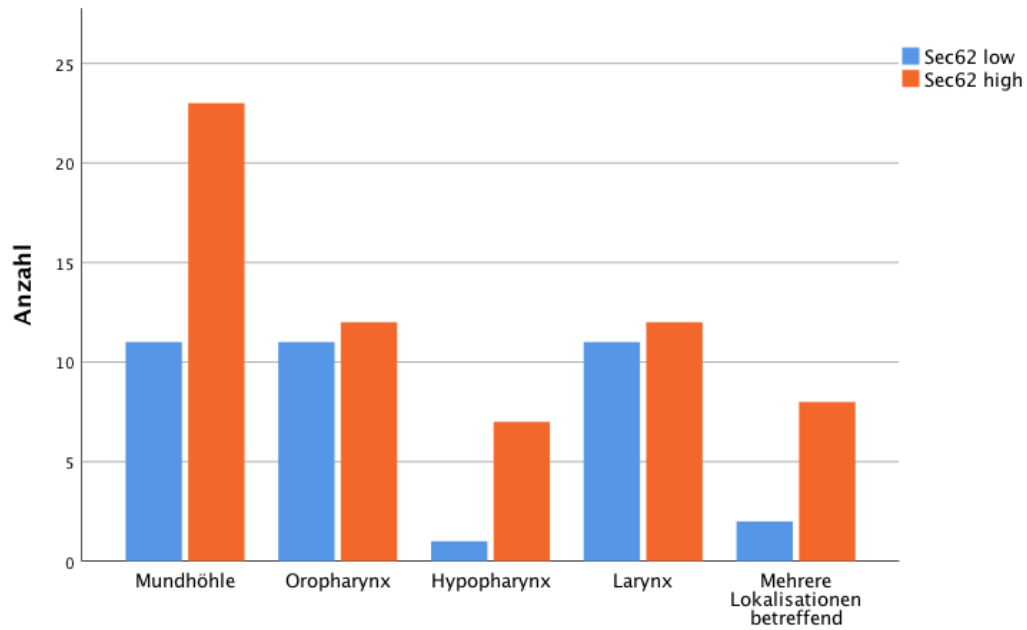


Abbildung 24: Sec62-Expression der untersuchten Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region.

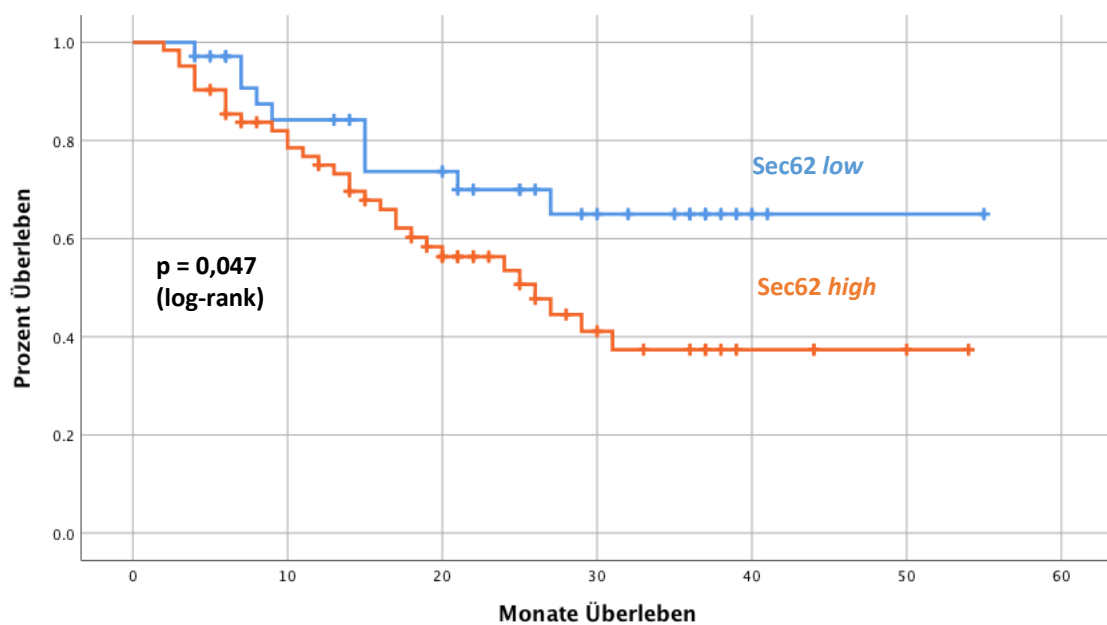


Abbildung 25: Gesamtüberleben von Sec62-high- und Sec62-low-Patienten. Aus der Kaplan-Meier-Analyse geht hervor, dass HNSCCs mit hoher Sec62-Expression mit einer signifikant schlechteren Prognose einhergehen als solche mit schwacher Sec62-Expression ($p = 0,047$; log-rank-Test). Die Kreuze stehen für Patienten, welche zum Ende der Nachbeobachtungszeit am Leben waren (zensierte Beobachtungen).

Im Rahmen der durchgeführten Korrelationsanalysen ließ sich ein Zusammenhang zwischen der Sec62-Expression und dem T-Stadium des Tumorgewebes feststellen. Während bei Tumoren in den Stadien T1 bis T3 (n = 77) insgesamt 42,9% der HNSCCs eine niedrige Sec62-Expression aufweisen, trifft dies in der Gruppe der als T4 eingestuften Malignome (n = 21) nur noch auf 14,3% der Plattenepithelkarzinome zu. Folglich gehören die Kopf-Hals-Tumoren des untersuchten Kollektivs im Stadium T4 überwiegend der Sec62-high-Gruppe an (p = 0,021 im Chi-Quadrat-Test; siehe Abbildung 26). Im Kollektiv der vorliegenden Arbeit korreliert der Sec62-Status der Kopf-Hals-Tumoren weder mit dem Vorliegen von Lymphknotenmetastasen (N-Stadium) noch mit dem Vorhandensein von Fernmetastasen (M-Stadium). Betrachtet man die Differenzierung des Tumorgewebes (*Grading*), weisen G3-Tumoren (n = 47) im Vergleich zu G1- und G2-Tumoren (n = 51) vermehrt eine niedrige Sec62-Expression auf (p = 0,06 im Chi-Quadrat-Test; siehe Abbildung 27). Es lässt sich kein Unterschied in der tumoralen Sec62-Expression bei Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel im Vergleich zu Patienten mit einer ausreichenden Vitamin D-Versorgung nachweisen. Allerdings weisen HPV-negative Tumoren im Gegensatz zu solchen mit einem positiven HPV-Status tendenziell häufiger eine hohe Sec62-Expression auf (p = 0,078 im Chi-Quadrat-Test; siehe Abbildung 28).

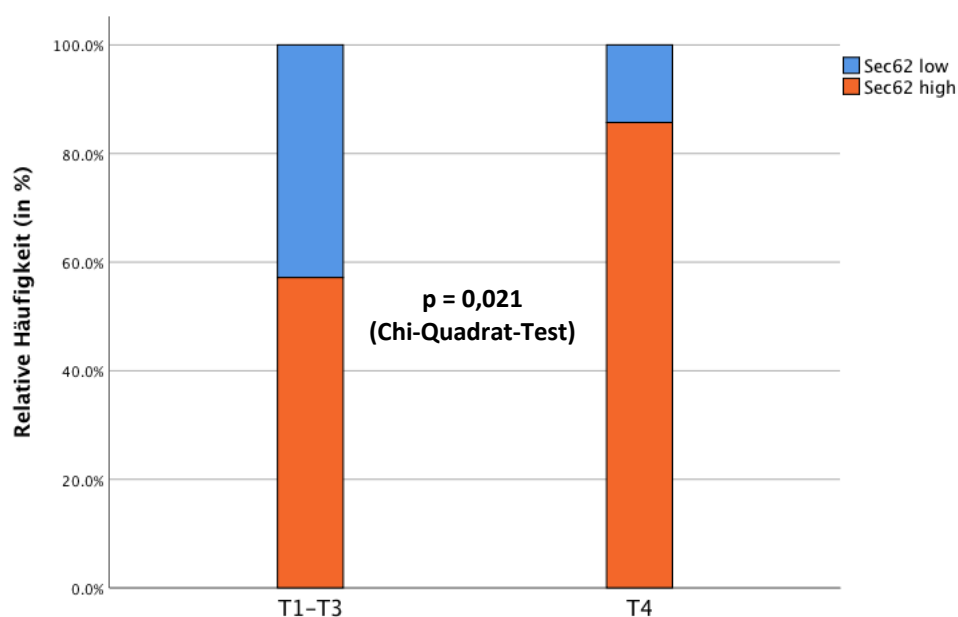


Abbildung 26: Sec62-Expression in Abhängigkeit vom T-Stadium des Tumorgewebes. Während bei Kopf-Hals-Tumoren im Stadium T1-T3 insgesamt 42,9% der Malignome eine niedrige Sec62-Expression aufweisen, trifft dies bei HNSCCs im Stadium T4 nur noch für 14,3% der Tumore zu (p = 0,021 im Chi-Quadrat-Test).

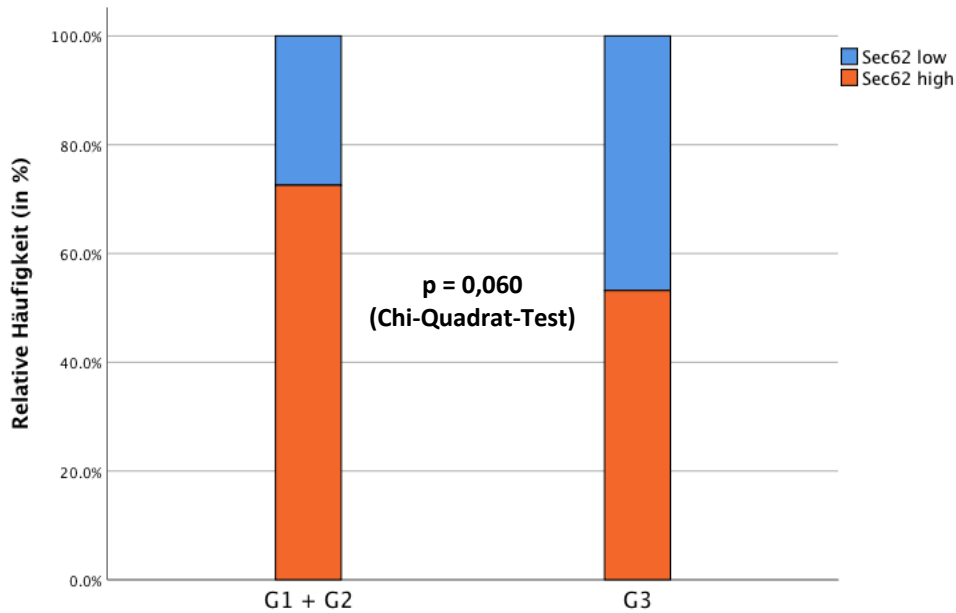


Abbildung 27: Sec62-Expression in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad (*Grading*) des Tumorgewebes. Während bei gut (G1) und mäßig differenzierten (G2) Kopf-Hals-Tumoren des untersuchten Kollektivs insgesamt 27,5% der Malignome eine niedrige Sec62-Expression aufweisen, trifft dies bei schlecht differenzierten HNSCCs (G3) für 46,8% der Tumore zu ($p = 0,06$ im Chi-Quadrat-Test).

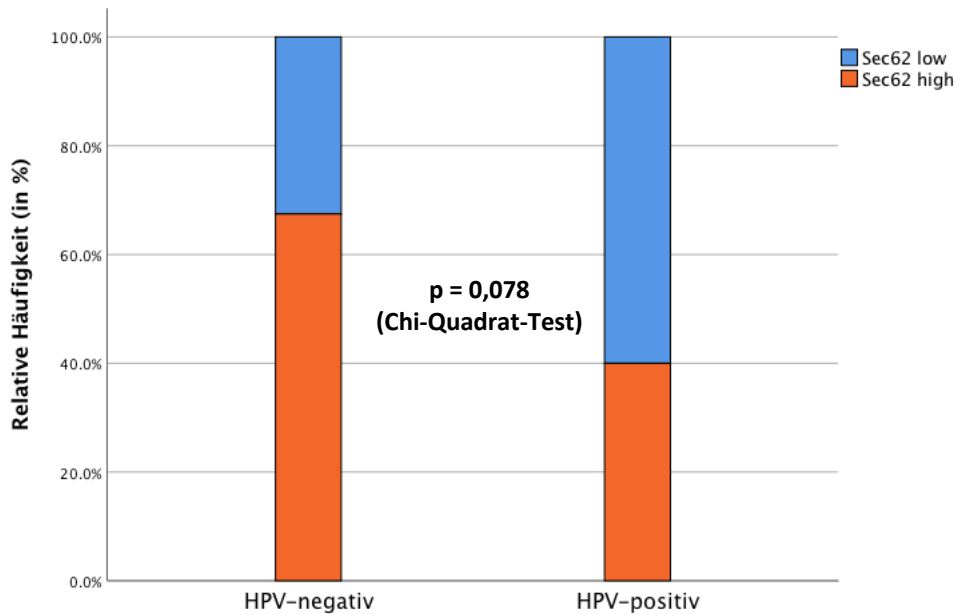


Abbildung 28: Sec62-Expression in Abhängigkeit vom HPV-Status des Tumorgewebes. Bei den HPV-negativen Tumoren zeigen 67,5% der Tumoren eine hohe Sec62-Expression während dies bei den HPV-positiven Tumoren nur für 40% der HNSCCs zutrifft ($p = 0,078$ im Chi-Quadrat-Test).

4.4 Immunhistochemische Analyse der Survivin-Expression in Kopf-Hals-Tumoren

Analog zur Bestimmung der tumoralen Sec62-Expression wurde zur Beurteilung der nukleären und zytoplasmatischen Survivin-Expression in Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region für jeden HNSCC-Patienten des Gesamtkollektivs ($n = 98$) eine immunhistochemische Färbung der entsprechenden Tumorschnittpräparate durchgeführt. Das Ziel dieser Untersuchungen bestand darin, nach möglichen Zusammenhängen zwischen der ermittelten Survivin-Expression und den klinischen bzw. histopathologischen Patientendaten zu suchen und diese im Kontext des derzeit aktuellen Wissensstandes zu beurteilen. Als Positivkontrolle wurde ein im Rahmen der Etablierung ausgewähltes HNSCC-Gewebepräparat mitgeführt, welches sich in jedem Versuchsdurchgang durch ein einheitliches Färbeverhalten auszeichnete. In der nachfolgenden Tabelle 21 findet sich eine Übersicht über die Ergebnisse der immunhistochemischen Analysen.

Tabelle 21: Immunhistochemisch bestimmte Survivin-Expression der untersuchten Kopf-Hals-Tumoren

Survivin-Expression	Anzahl an Tumoren unterschiedlicher Lokalisation					Gesamt n = 98
	Mundhöhle (n = 34)	Oropharynx (n = 23)	Hypopharynx (n = 8)	Larynx (n = 23)	Mehretagentumor (n = 10)	
nukleär <i>high</i>	20	20	6	16	8	70
nukleär <i>low</i>	14	3	2	7	2	28
zytoplasmatisch <i>high</i>	24	13	4	13	9	63
zytoplasmatisch <i>low</i>	10	10	4	10	1	35
nukleär <i>high</i> + zytoplasmatisch <i>high</i>	14	11	3	9	7	44
nukleär <i>low</i> + zytoplasmatisch <i>low</i>	4	1	1	3	0	9
nukleär <i>high</i> + zytoplasmatisch <i>low</i>	6	9	3	7	1	26
nukleär <i>low</i> + zytoplasmatisch <i>high</i>	10	2	1	4	2	19

Von den 98 zum Kollektiv gehörigen Kopf-Hals-Tumoren zeigen insgesamt 70 (71,4%) eine starke nukleäre und 63 (64,2%) eine starke zytoplasmatische Survivin-Expression. Bei 44 HNSCCs liegen gleichzeitig eine starke nukleäre und eine starke zytoplasmatische Survivin-Expression vor. Lediglich 9 Plattenepithelkarzinome weisen sowohl eine schwache nukleäre als auch eine schwache zytoplasmatische Survivin-Expression auf. In 26 Fällen liegt gleichzeitig eine starke nukleäre und eine schwache zytoplasmatische Survivin-Expression vor. 19 HNSCCs zeichnen sich durch eine schwache nukleäre und eine starke zytoplasmatische Survivin-Expression aus (siehe Tabelle 21).

Im Rahmen von Kaplan-Meier-Analysen wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der nukleären bzw. zytoplasmatischen Survivin-Expression der untersuchten Tumoren und dem Gesamtüberleben der HNSCC-Patienten besteht (siehe Abbildungen 29-31).

Aus der in Abbildung 29 dargestellten Kaplan-Meier-Analyse geht hervor, dass sich HNSCCs mit unterschiedlichen nukleären Survivin-Expressionen nicht signifikant hinsichtlich ihrer Prognose unterscheiden ($p = 0,55$ im log-rank-Test). Ab einer Nachbeobachtungszeit von ca. 28 Monaten zeigt sich jedoch eine beginnende, wenn auch schwache Tendenz in Richtung einer besseren Prognose von Tumoren mit einer ausgeprägten nukleären Survivin-Expression im Vergleich zu Tumoren mit einer schwachen nukleären Survivin-Expression: während in der Gruppe der Survivin-negativen Tumore nach 50 Monaten noch etwa 35% der Patienten am Leben sind, trifft dies in der Gruppe der Survivin-positiven Tumore zum gleichen Zeitpunkt immerhin noch für etwa 55% der Patienten zu (siehe Abbildung 29). Vor diesem Hintergrund wurde in einem nächsten Schritt untersucht, ob sich die beschriebene Tendenz für bestimmte Tumorlokalisationen deutlicher darstellen lässt. In der Tat scheint in der Gruppe der Larynxkarzinome eine starke nukleäre Survivin-Expression mit einer tendenziell besseren Prognose einherzugehen, wenngleich sich auch hier in der Kaplan-Meier-Analyse kein signifikanter Unterschied zwischen den Überlebenskurven beider Gruppen nachweisen lässt ($p = 0,13$ im log-rank-Test; siehe Abbildung 30): von den Patienten mit Survivin-positiven Tumorzellkernen sind nach 40 Monaten noch etwa 75% am Leben, während dies bei den Patienten mit Survivin-negativen Tumorzellkernen zum gleichen Zeitpunkt nur noch für ca. 30% der Patienten der Fall ist (siehe Abbildung 30). Für andere Tumorlokalisationen konnten keine vergleichbaren Beobachtungen gemacht werden.

Die in der nachfolgenden Abbildung 31 dargestellte Kaplan-Meier-Analyse belegt, dass kein Zusammenhang zwischen der zytoplasmatischen Survivin-Expression der untersuchten HNSCCs und dem Gesamtüberleben der Tumorpatienten besteht ($p = 0,738$ im log-rank-Test). Die getrennte Betrachtung der unterschiedlichen Tumorlokalisationen führt zum gleichen Ergebnis.

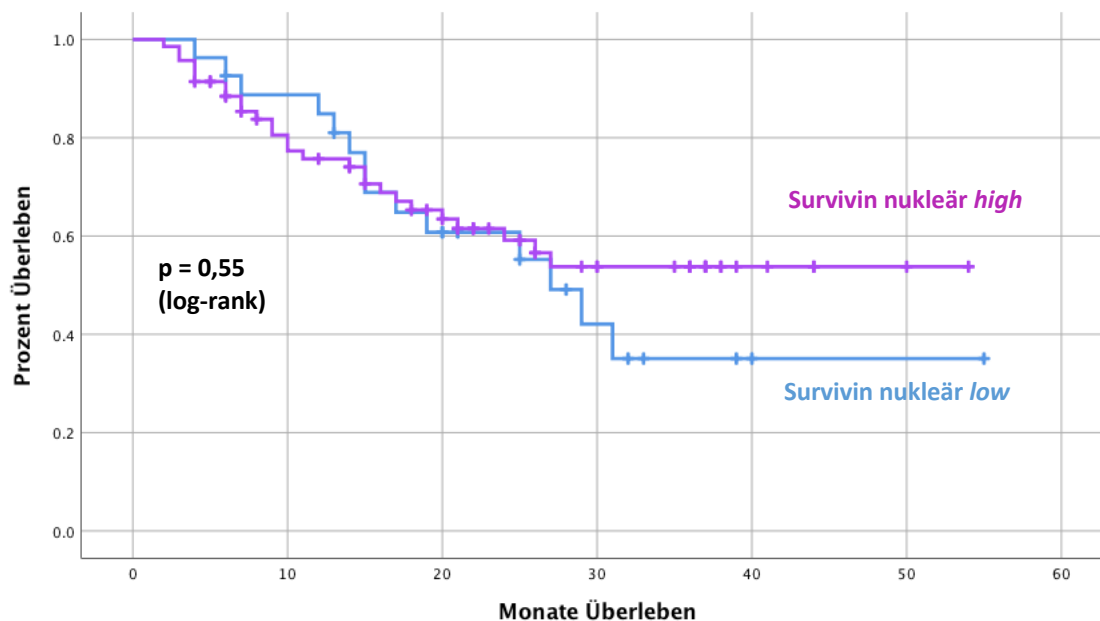


Abbildung 29: Gesamtüberleben von HNSCC-Patienten in Abhängigkeit von der Survivin-Expression der Tumorzellkerne.

Die Kaplan-Meier-Analyse zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Überlebenskurven beider Gruppen ($p = 0,55$ im log-rank-Test). Nach ca. 28 Monaten lässt sich jedoch eine schwache Tendenz in Richtung einer besseren Prognose von Tumoren mit starker nukleärer Survivin-Expression erkennen. Die Kreuze stehen für Patienten, welche zum Ende der Nachbeobachtungszeit am Leben waren (zensierte Beobachtungen).

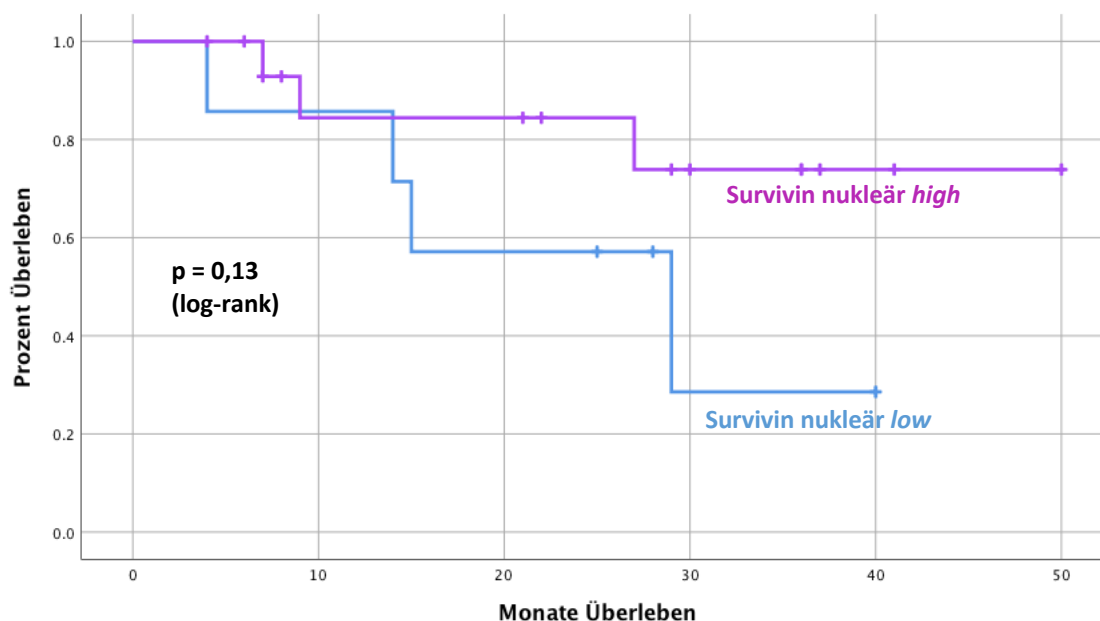


Abbildung 30: Gesamtüberleben von Larynxkarzinom-Patienten in Abhängigkeit von der Survivin-Expression der Tumorzellkerne.

Die Kaplan-Meier-Analyse zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Überlebenskurven beider Gruppen ($p = 0,13$ im log-rank-Test). Ab einer Nachbeobachtungszeit von ca. 15 Monaten lässt sich jedoch eine Tendenz in Richtung einer besseren Prognose von Larynxkarzinomen mit starker nukleärer Survivin-Expression erkennen. Die Kreuze stehen für Patienten, welche zum Ende der Nachbeobachtungszeit am Leben waren (zensierte Beobachtungen).

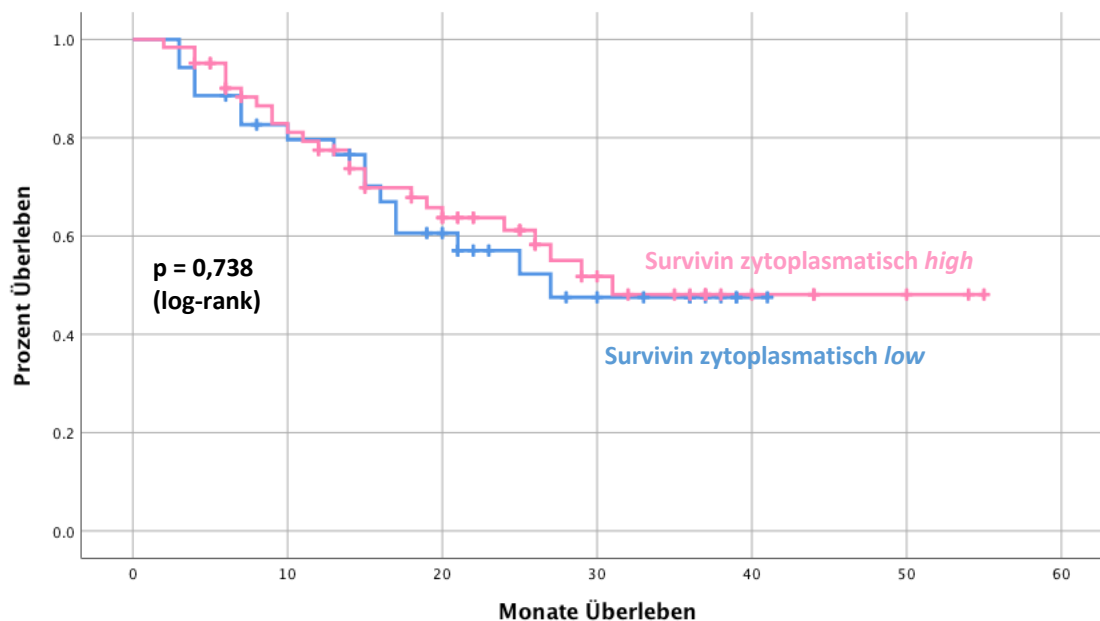


Abbildung 31: Gesamtüberleben von HNSCC-Patienten in Abhängigkeit von der zytoplasmatischen Survivin-Expression der Tumorzellen. Die Kaplan-Meier-Analyse zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Überlebenskurven beider Gruppen ($p = 0,738$ im log-rank-Test). Die Kreuze stehen für Patienten, welche zum Ende der Nachbeobachtungszeit am Leben waren (zensierte Beobachtungen).

Wie die Sec62-Expression korreliert auch die nukleäre Survivin-Expression mit dem T-Stadium der Kopf-Hals-Tumore. Plattenepithelkarzinome, welche sich in frühen T-Stadien befinden (T1 oder T2; $n = 55$) weisen in 80% der Fälle eine starke nukleäre Survivin-Expression auf. Bei Tumoren im Stadium T3 oder T4 ($n = 43$) gilt dies hingegen nur für 60,5% der Malignome ($p = 0,043$ im Chi-Quadrat-Test; siehe Abbildung 32). Die Korrelation der nukleären Survivin-Expression mit weiteren klinisch-pathologischen Daten (N-Stadium, M-Stadium, *Grading*, HPV-Status, Vitamin D-Versorgung der Patienten, Sec62-Expression) ergab keine vergleichbaren Zusammenhänge. Die immunhistochemisch bestimmte zytoplasmatische Survivin-Expression der Kopf-Hals-Tumore korrelierte bei Betrachtung des Gesamtkollektivs ($n = 98$) mit keinem der untersuchten klinisch-pathologischen Parameter.

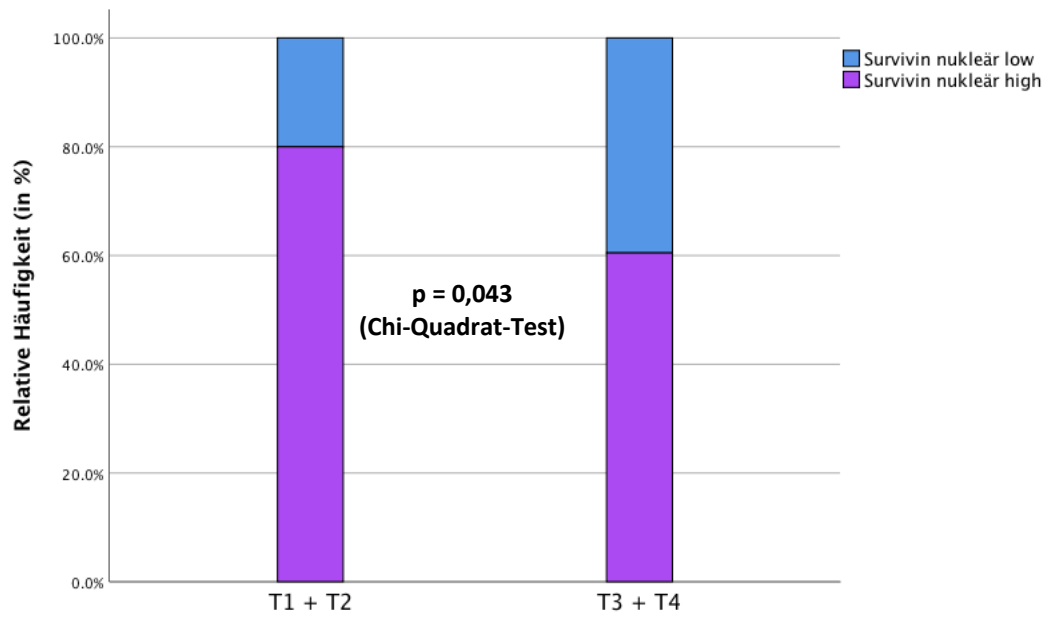


Abbildung 32: Nukleäre Survivin-Expression in Abhängigkeit vom T-Stadium des Tumorgewebes. Während bei Kopf-Hals-Tumoren im Stadium T1-T2 insgesamt 80% der Malignome eine hohe nukleäre Survivin-Expression aufweisen, trifft dies bei HNSCCs im Stadium T3-T4 nur noch für 60,5% der Tumore zu ($p = 0,043$ im Chi-Quadrat-Test).

4.5 Kombinierte Betrachtung der Sec62- und nukleären Survivin-Expression und Analyse ihres Einflusses auf das Gesamtüberleben der untersuchten HNSCC-Patienten

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob sich die unter Punkt 3 und 4 beschriebenen Einflüsse der Sec62- bzw. der nukleären Survivin-Expression auf das Gesamtüberleben der Patienten durch eine Kombination beider Marker deutlicher darstellen lassen bzw. ob sich durch diese Betrachtungsweise neue Zusammenhänge ergeben. Die entsprechende Kaplan-Meier-Analyse ist in Abbildung 33 dargestellt. Patienten, deren Kopf-Hals-Tumore sich gleichzeitig durch eine hohe Sec62-Expression und eine niedrige nukleäre Survivin-Expression auszeichnen, scheinen im Vergleich zu den anderen Gruppen mit einer besonders schlechten Prognose einherzugehen. Das Gesamtüberleben von HNSCC-Patienten mit Sec62- und Survivin (nukleär)-positiven Tumoren ist zwar initial schlechter als in der zuletzt beschriebenen Gruppe, verbessert sich jedoch nach einer Nachbeobachtungszeit von 28 Monaten. Zwischen Tumoren mit gleichzeitig niedrigen Sec62- und nukleären Survivin-Expressionen und solchen mit einer geringen Sec62- und einer gleichzeitig stark ausgeprägten nukleären Survivin-Expression bestehen keine nennenswerten prognostischen Unterschiede. Allerdings haben die Kopf-Hals-Tumore dieser Gruppen im vorliegenden Kollektiv insgesamt die günstigste Prognose. Da die Unterschiede im Gesamtüberleben der einzelnen Gruppen mit einem p-Wert von 0,241 im log-rank-Test nicht signifikant sind, handelt es sich bei dem Beschriebenen jedoch lediglich um Tendenzen.

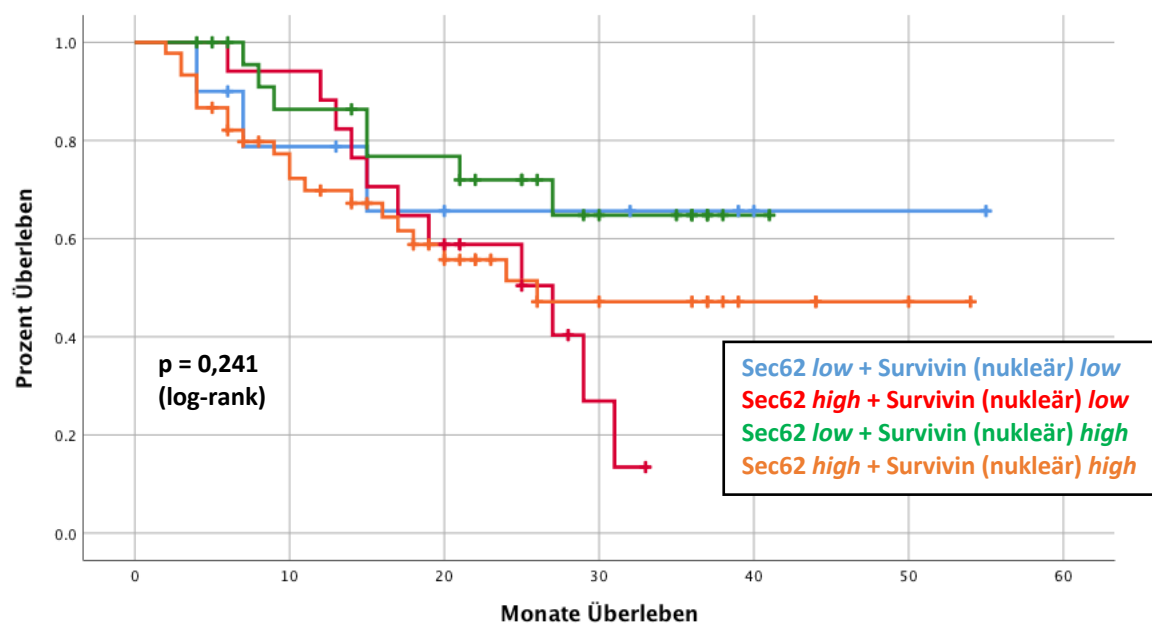


Abbildung 33: Gesamtüberleben von HNSCC-Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren unterschiedlicher Sec62- und nukleärer Survivin-Expression.

4.6 Analyse von HNSCC-Patienten mit unterschiedlicher Vitamin D-Versorgung

Im Folgenden werden analoge Korrelationsanalysen für definierte Untergruppen des Gesamtkollektivs vorgenommen. In einem ersten Schritt werden die Kollektivpatienten in Abhängigkeit von ihrer Vitamin D-Versorgung in zwei Gruppen eingeteilt und gesondert betrachtet. Es muss betont werden, dass ausschließlich relevante Tendenzen und signifikante Zusammenhänge bzw. Unterschiede zwischen den jeweiligen klinischen, histopathologischen und immunhistochemischen Patientendaten aufgeführt werden.

4.6.1 Betrachtung der Patienten mit einem Vitamin D-Mangel

Wie für das Gesamtkollektiv wurde in der Gruppe der Patienten mit einem Vitamin D-Mangel zunächst in Kaplan-Meier-Analysen der Einfluss der immunhistochemisch bestimmten tumoralen Sec62- bzw. Survivin-Expression auf das Gesamtüberleben der Patienten untersucht. Wenngleich nicht signifikant, ist auch in diesem Teilkollektiv ein ungünstiger Einfluss einer hohen Sec62-Expression auf das Gesamtüberleben der HNSCC-Patienten zu beobachten ($p = 0,169$ im log-rank-Test; siehe Abbildung 34). Demgegenüber lässt sich bei Patienten mit einem Vitamin D-Mangelzustand kein Einfluss der nukleären Survivin-Expression auf das Gesamtüberleben feststellen (p -Wert = $0,969$ im log-rank-Test). Im Unterschied zum Gesamtkollektiv zeigt sich im vorliegenden Teilkollektiv für HNSCC-Patienten mit einer hohen zytoplasmatischen Survivin-Expression im Tumorgewebe ein tendenziell besseres Gesamtüberleben als für HNSCC-Patienten mit einer geringen zytoplasmatischen Survivin-Expression des Tumors ($p = 0,266$ im log-rank-Test; siehe Abbildung 35). Dieser Zusammenhang kann vornehmlich ab einer Nachbeobachtungszeit von etwa 15 Monaten beobachtet werden.

Im Rahmen von Korrelationsanalysen mit histopathologischen Daten fällt auf, dass sich bei Patienten mit einem Vitamin D-Mangel der Anteil an Tumoren mit einer hohen nukleären Survivin-Expression signifikant in Abhängigkeit vom Tumorstadium unterscheidet. Während in frühen Tumorstadien (T1 + T2) mit einem Anteil von 92% nahezu alle Malignome eine hohe nukleäre Survivin-Expression aufweisen, trifft dies in fortgeschrittenen Tumorstadien (T3 + T4) nur noch auf 66,7% der Tumoren zu ($p = 0,037$ im Chi-Quadrat-Test; siehe Abbildung 36). Vergleicht man Tumoren in den Stadien T1 bis T3 mit solchen im Stadium T4, stellt sich der beschriebene Unterschied noch deutlicher dar: In den Stadien T1-T3 zeigen 88,6% der Malignome eine hohe nukleäre Survivin-Expression, im Stadium T4 hingegen nur noch 57,1% der Tumoren (p -Wert = $0,022$ im Chi-Quadrat-Test; siehe Abbildung 37).

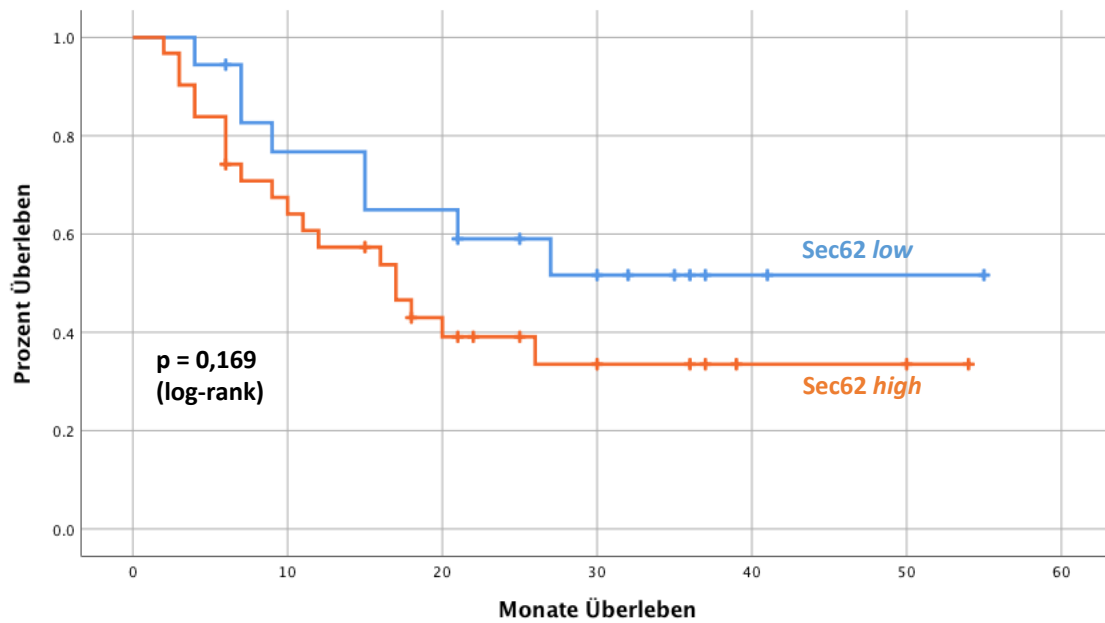


Abbildung 34: Gesamtüberleben von HNSCC-Patienten mit einem Vitamin D-Mangel in Abhängigkeit von der tumoralem Sec62-Expression. Aus der Kaplan-Meier-Analyse geht hervor, dass HNSCCs mit hoher Sec62-Expression mit einer tendenziell schlechteren Prognose einhergehen als solche mit schwacher Sec62-Expression ($p = 0,169$ im log-rank-Test). Die Kreuze stehen für Patienten, welche zum Ende der Nachbeobachtungszeit am Leben waren (zensierte Beobachtungen).

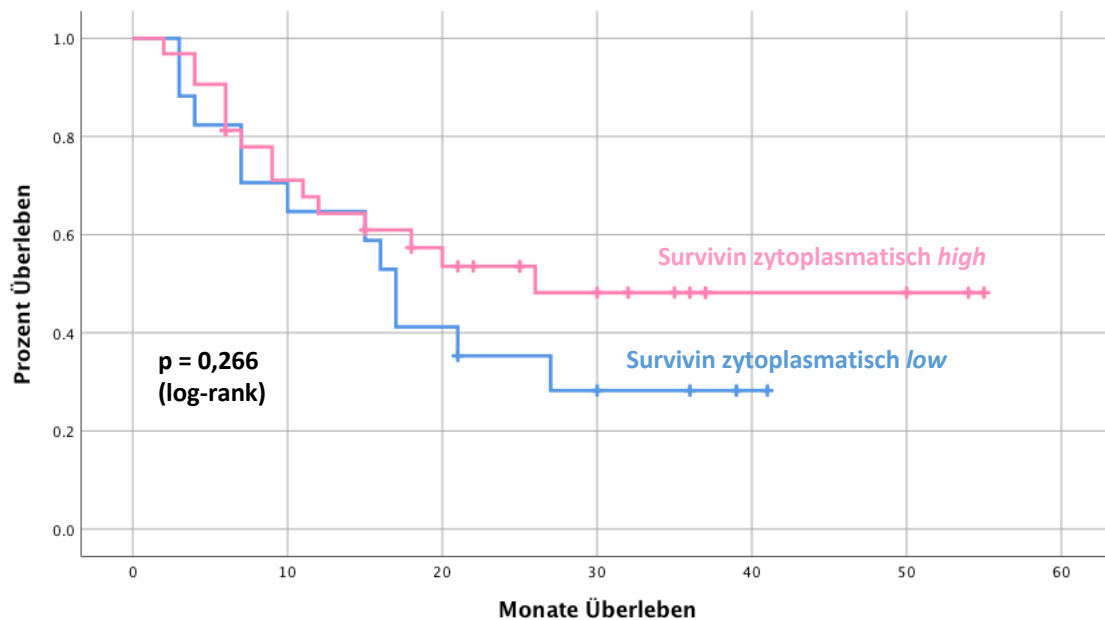


Abbildung 35: Gesamtüberleben von HNSCC-Patienten mit einem Vitamin D-Mangel in Abhängigkeit von der zytoplasmatischen Survivin-Expression der Tumorzellen. Die Kaplan-Meier-Analyse zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Überlebenskurven beider Gruppen ($p = 0,266$ im log-rank-Test). Allerdings ist eine Tendenz in Richtung eines besseren Gesamtüberlebens von Patienten mit einer hohen zytoplasmatischen Survivin-Expression zu erkennen. Die Kreuze stehen für Patienten, welche zum Ende der Nachbeobachtungszeit am Leben waren (zensierte Beobachtungen).

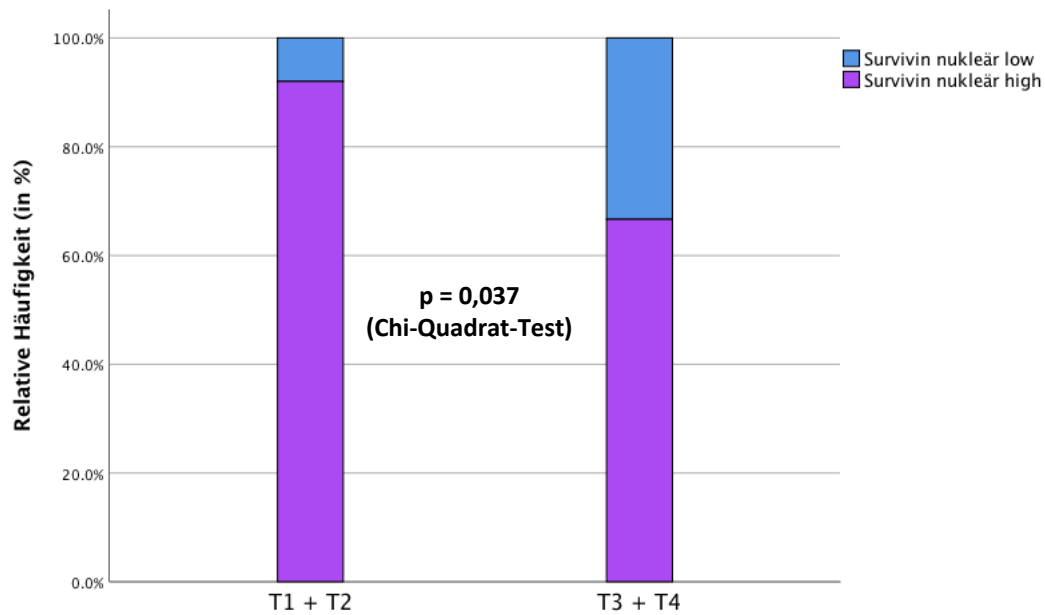


Abbildung 36: Nukleäre Survivin-Expression in Abhängigkeit vom T-Stadium des Tumorgewebes von Vitamin D-Mangel-Patienten (1). Der Anteil an Tumoren mit einer hohen nukleären Survivin-Expression unterscheidet sich signifikant zwischen HNSCCs unterschiedlicher T-Stadien ($p = 0,037$ im Chi-Quadrat-Test).

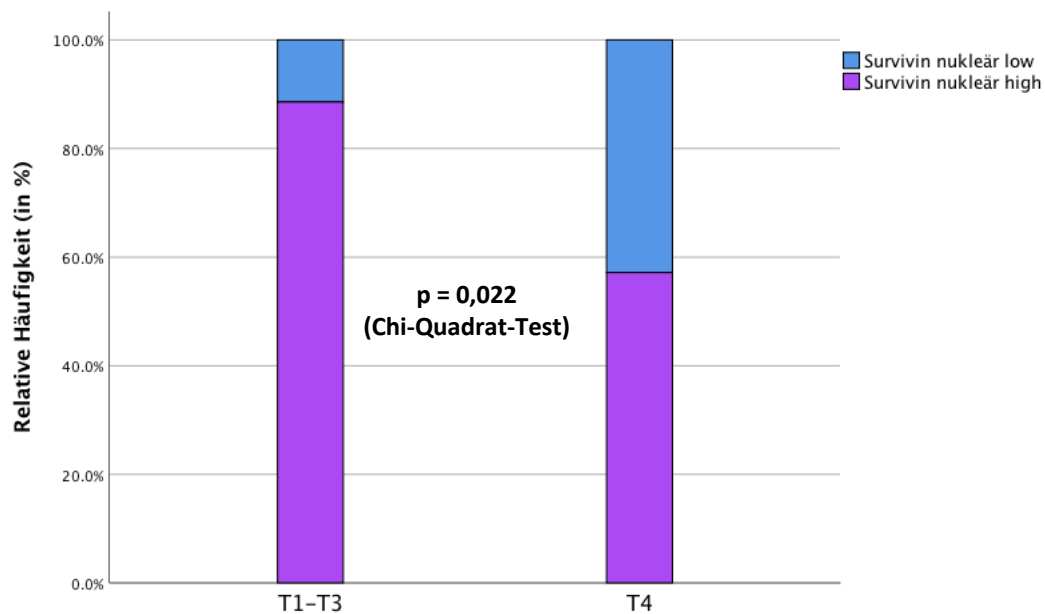


Abbildung 37: Nukleäre Survivin-Expression in Abhängigkeit vom T-Stadium des Tumorgewebes von Vitamin D-Mangel-Patienten (2). Der Anteil an Tumoren mit einer hohen nukleären Survivin-Expression unterscheidet sich signifikant zwischen HNSCCs unterschiedlicher T-Stadien ($p = 0,022$ im Chi-Quadrat-Test).

4.6.2 Betrachtung der Patienten mit einer ausreichenden Vitamin D-Versorgung

Bei den Patienten des Kollektivs, die ausreichende Vitamin D-Spiegel im Blut aufweisen, zeigen die Kopf-Hals-Tumoren mit einer hohen Sec62-Expression eine schlechtere Prognose als solche mit einer geringen Sec62-Expression ($p = 0,076$ im log-rank-Test; siehe Abbildung 38). Während sich in den ersten 20-25 Monaten der Nachbeobachtungszeit keine wesentlichen Unterschiede in den Überlebenskurven beider Gruppen darstellen, verschlechtert sich das Gesamtüberleben der Patienten mit Sec62-positiven Tumoren ab einer Nachbeobachtungszeit von etwa 25 Monaten deutlich: in der Sec62-*low*-Gruppe sind nach 40 Monaten noch mehr als 80% der Patienten am Leben, während es in der Sec62-*high*-Gruppe mit knapp 40% zum gleichen Zeitpunkt nur noch halb so viele sind.

Die insgesamt 7 HNSCCs des Teilkollektivs, welche als Plattenepithelkarzinome im Stadium T4 klassifiziert wurden, zeigen allesamt eine hohe Sec62-Expression. Im Gegensatz dazu weisen lediglich 57,1% der Malignome früherer Tumorstadien (T1 bis T3) eine hohe Sec62-Expression auf ($p = 0,038$ im Chi-Quadrat-Test; siehe Abbildung 39).

In der Vitamin D-*high*-Gruppe zeigt sich ab einer Nachbeobachtungszeit von etwa 15 Monaten ein besseres Gesamtüberleben von Patienten, deren Tumoren eine hohe nukleäre Survivin-Expression aufweisen ($p = 0,078$ im log-rank-Test; siehe Abbildung 40). Insbesondere ab einer Nachbeobachtungszeit von 25 Monaten ist eine deutliche Verschlechterung des Gesamtüberlebens von Patienten mit einer geringen Survivin-Expression der Tumorzellkerne zu verzeichnen: während nach 40 Monaten noch annähernd 80% der Survivin (nukleär)-*high*-Patienten am Leben sind, trifft dies in der Survivin (nukleär)-*low*-Gruppe zum gleichen Zeitpunkt auf lediglich 30% der Patienten zu. Ein Einfluss der zytoplasmatischen Survivin-Expression auf das Gesamtüberleben ließ sich in diesem Teilkollektiv hingegen nicht feststellen (p -Wert = 0,417 im log-rank-Test).

Vergleicht man innerhalb des vorliegenden Teilkollektivs die HPV-positiven mit den HPV-negativen HNSCCs, so fällt auf, dass Kopf-Hals-Tumoren mit einem positiven HPV-Status im Vergleich zu solchen ohne HPV-Genese häufiger eine hohe nukleäre Survivin-Expression aufweisen ($p = 0,095$ im Chi-Quadrat-Test; siehe Abbildung 41).

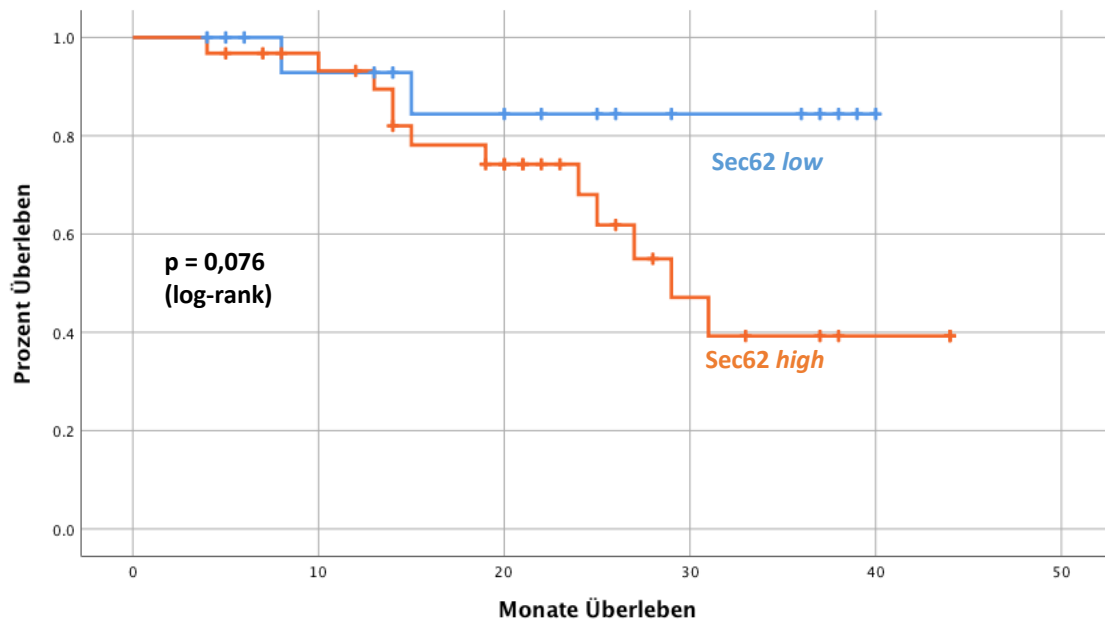


Abbildung 38: Gesamtüberleben von HNSCC-Patienten mit ausreichender Vitamin D-Versorgung in Abhängigkeit von der Sec62-Expression der Tumoren. Wenngleich nicht signifikant, gehen HNSCCs mit einer hohen Sec62-Expression bei Patienten mit einer ausreichenden Vitamin D-Versorgung mit einer schlechteren Prognose einher ($p = 0,076$ im log-rank-Test). Die Kreuze stehen für Patienten, welche zum Ende der Nachbeobachtungszeit am Leben waren (zensierte Beobachtungen).

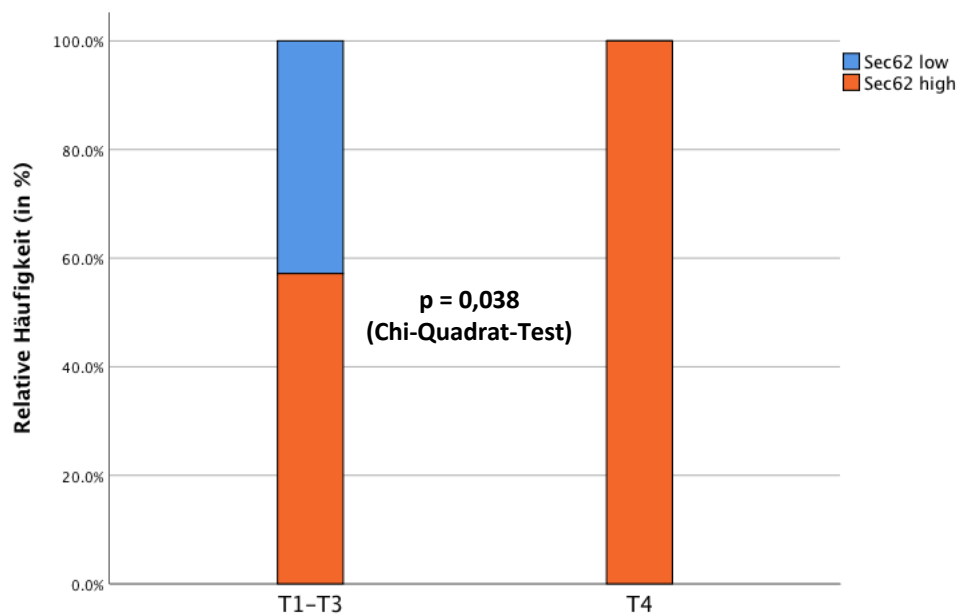


Abbildung 39: Sec62-Expression in Abhängigkeit vom T-Stadium des Tumorgewebes. Während bei Kopf-Hals-Tumoren im Stadium T1-T3 lediglich 57,1% der Malignome eine hohe Sec62-Expression aufweisen, trifft dies bei HNSCCs im Stadium T4 für alle Tumore zu ($p = 0,038$ im Chi-Quadrat-Test).

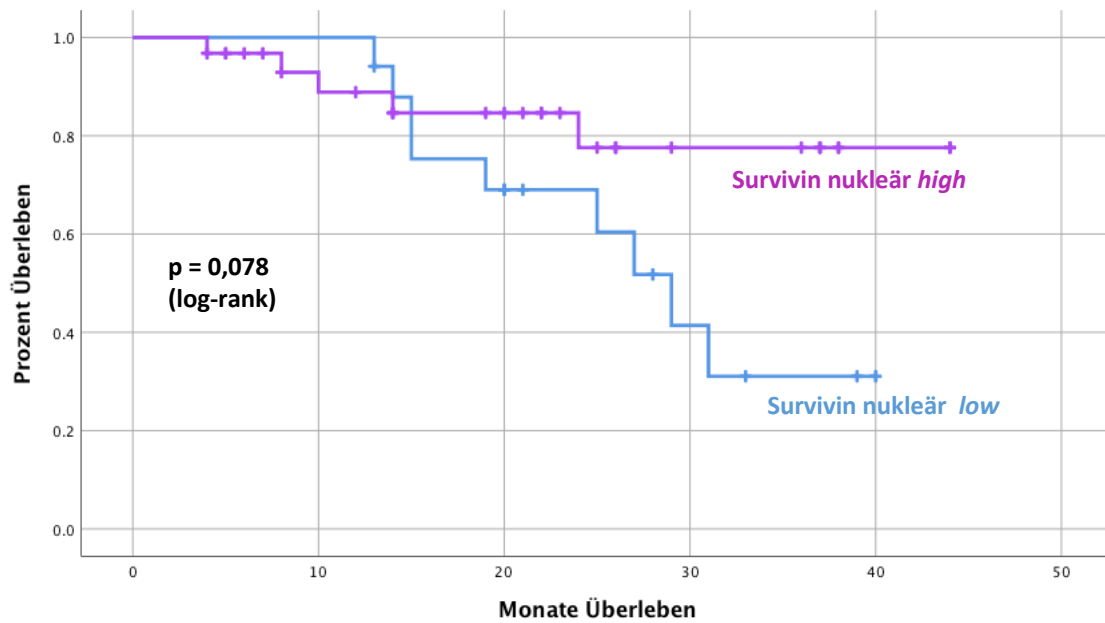


Abbildung 40: Gesamtüberleben von HNSCC-Patienten mit ausreichender Vitamin D-Versorgung in Abhängigkeit von der nukleären Survivin-Expression der Tumore. Die Prognose von HNSCCs mit einer geringen nukleären Survivin-Expression verschlechtert sich ab einer Nachbeobachtungszeit von etwa 25 Monaten deutlich ($p = 0,078$ im log-rank-Test). Die Kreuze stehen für Patienten, welche zum Ende der Nachbeobachtungszeit am Leben waren (zensierte Beobachtungen).

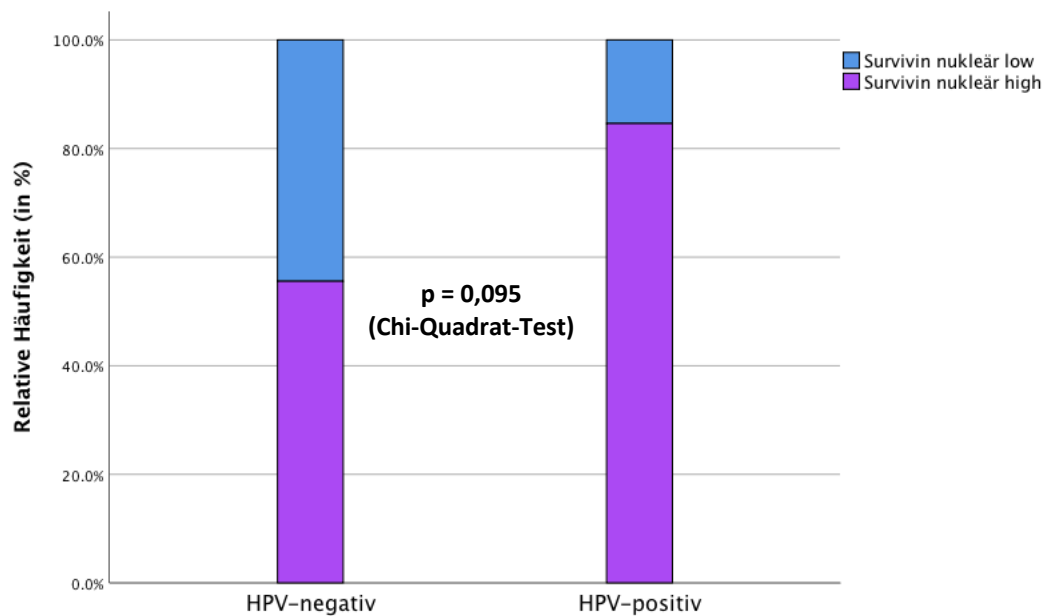


Abbildung 41: Nukleäre Survivin-Expression in Abhängigkeit vom HPV-Status des Tumorgewebes. Bei den HPV-positiven Tumoren zeigen 84,6% der Tumore eine hohe nukleäre Survivin-Expression, während dies bei den HPV-negativen Tumoren nur für 55,6% der HNSCCs zutrifft ($p = 0,095$ im Chi-Quadrat-Test).

4.7 Analyse von HNSCC-Patienten mit unterschiedlicher tumoraler Sec62-Expression

Analog der Unterteilung des Untersuchungskollektivs ($n = 98$) nach Vitamin D-Gesichtspunkten, erfolgt in einem nächsten Schritt die separate Analyse von Patienten mit Sec62-positiven ($n = 62$) und Sec62-negativen Tumoren ($n = 36$). Im Folgenden sind die Ergebnisse der für beide Gruppen getrennt durchgeführten Korrelationsanalysen aufgeführt.

4.7.1 Betrachtung der Patienten mit einer geringen tumoralen Sec62-Expression

Bei HNSCC-Patienten mit einer geringen tumoralen Sec62-Expression nehmen in Kaplan-Meier-Analysen weder die nukleäre ($p = 0,748$ im log-rank-Test) noch die zytoplasmatische Survivin-Expression ($p = 0,472$ im log-rank-Test) der Malignome einen Einfluss auf das Gesamtüberleben.

Den insgesamt 3 zum vorliegenden Teilkollektiv gehörigen Plattenepithelkarzinomen im Stadium N3 mit einer niedrigen zytoplasmatischen Survivin-Expression stehen 33 HNSCCs der Stadien N0 bis N2 mit überwiegend hoher zytoplasmatischer Survivin-Expression (69,7% der Fälle) gegenüber (siehe Abbildung 42). Trotz der geringen Fallzahl in der Fraktion der N3-Tumoren gilt der Unterschied zwischen beiden Gruppen mit einem p-Wert von 0,04 im Chi-Quadrat-Test als signifikant.

Darüber hinaus unterscheiden sich im vorliegenden Sec62-*low*-Teilkollektiv die Patienten von HPV-positiven und HPV-negativen Plattenepithelkarzinomen bezüglich ihrer Vitamin D-Spiegel im Blut: Patienten mit HPV-negativen Tumoren weisen in 63,0% der Fälle einen Vitamin D-Mangel auf, während 88,9% der Patienten mit HPV-positiven Malignomen eine gute Vitamin D-Versorgung zeigen ($p = 0,018$ im Chi Quadrat-Test; siehe Abbildung 43).

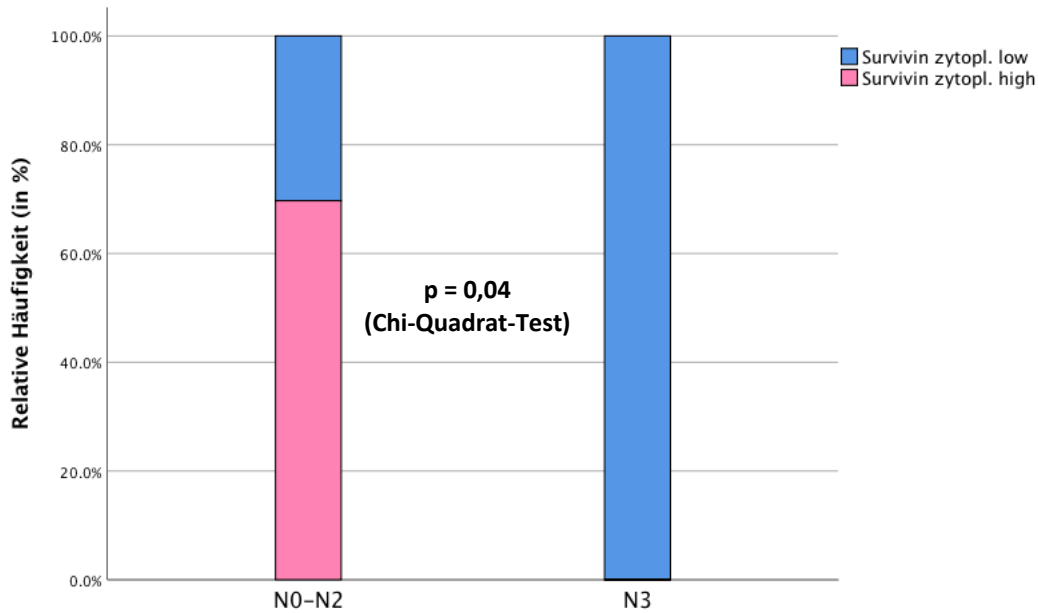


Abbildung 42: Zytoplasmatische Survivin-Expression in Abhängigkeit vom N-Status des Tumorgewebes. Die Tumoren im Stadium N3 (n = 3) zeichnen sich allesamt durch eine schwache zytoplasmatische Survivin-Expression aus. Im Gegensatz dazu überwiegen bei den HNSCCs der Stadien N0-N2 (n = 33) Tumoren mit einer hohen zytoplasmatischen Survivin-Expression (69,6% der Fälle) (p = 0,04 im Chi-Quadrat-Test).

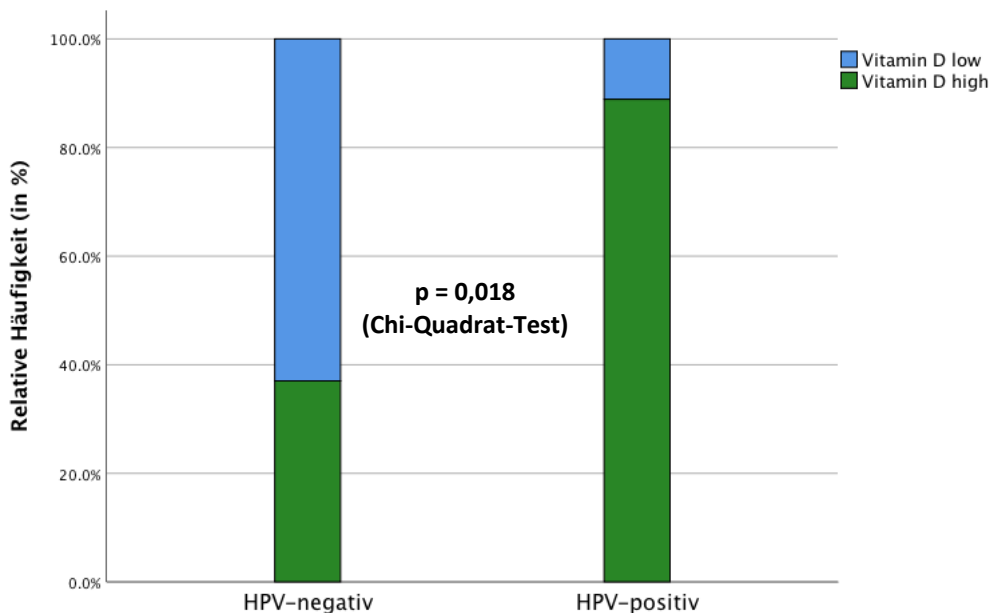


Abbildung 43: Unterschiedliche Vitamin D-Versorgung von Patienten mit HPV-positiven und HPV-negativen HNSCCs. Während im Sec62-low-Teilkollektiv Patienten mit HPV-negativen Tumoren überwiegend einen Vitamin D-Mangel aufweisen (63,0%), zeigen Patienten mit HPV-positiven HNSCCs in großer Mehrzahl einen guten Vitamin D-Status (88,9%) (p = 0,018 im Chi-Quadrat-Test).

4.7.2 Betrachtung der Patienten mit einer ausgeprägten tumoralen Sec62-Expression

Das Gesamtüberleben von Patienten mit einer hohen tumoralen Sec62-Expression wird weder von der nukleären noch von der zytoplasmatischen Survivin-Expression der Malignome beeinflusst. Allerdings unterscheidet sich das Verhältnis von Tumoren mit einer hohen nukleären Survivin-Expression zu solchen mit einer niedrigen nukleären Survivin-Expression, je nachdem in welchem Tumorstadium (T) sich die Sec62-positiven Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region befinden: HNSCCs der Stadien T1 und T2 (n = 33) zeigen in 81,8% der Fälle eine ausgeprägte nukleäre Survivin-Expression, Tumoren der Stadien T3 und T4 (n = 29) hingegen nur in 62,1% der Fälle ($p = 0,096$ im Chi-Quadrat-Test; siehe Abbildung 44). Mit 79,5% Survivin (nukleär)-*high*-Tumoren in den Stadien T1 bis T3 (n = 44) und 55,6% im Stadium T4 (n = 18) stellt sich der beschriebene Unterschied in diesen beiden Gruppen noch deutlicher dar ($p = 0,067$ im Chi-Quadrat-Test; siehe Abbildung 45).

Bei Vitamin D-Mangel-Patienten mit einer hohen tumoralen Sec62-Expression (n = 31) liegt in 83,9% der Fälle im Tumorgewebe gleichzeitig eine hohe nukleäre Survivin-Expression vor. Im Falle von Patienten mit ausreichenden Vitamin D-Spiegeln (n = 31) weisen im vorliegenden Teilkollektiv hingegen nur 61,3% der Tumore eine hohe nukleäre Survivin-Expression auf ($p = 0,086$ im Chi-Quadrat-Test; siehe Abbildung 46).

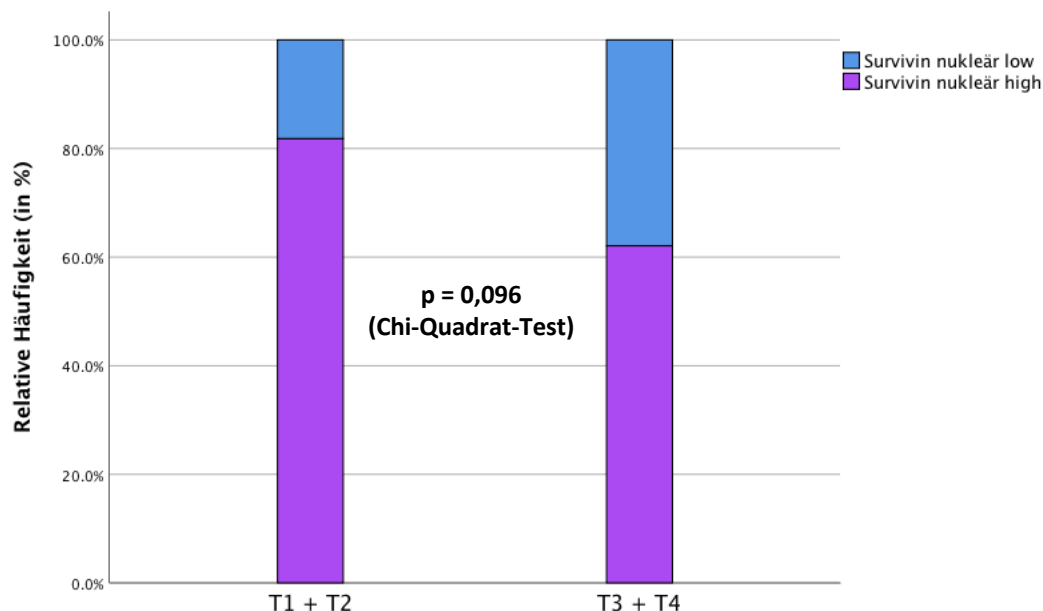


Abbildung 44: Nukleäre Survivin-Expression in Abhängigkeit vom T-Stadium des Tumorgewebes von Sec62-high-Patienten (1). Während bei Sec62-positiven Kopf-Hals-Tumoren im Stadium T1-T2 insgesamt 81,8% der Malignome eine hohe nukleäre Survivin-Expression aufweisen, trifft dies bei HNSCCs im Stadium T3-T4 nur noch für 62,1% der Tumore zu ($p = 0,096$ im Chi-Quadrat-Test).

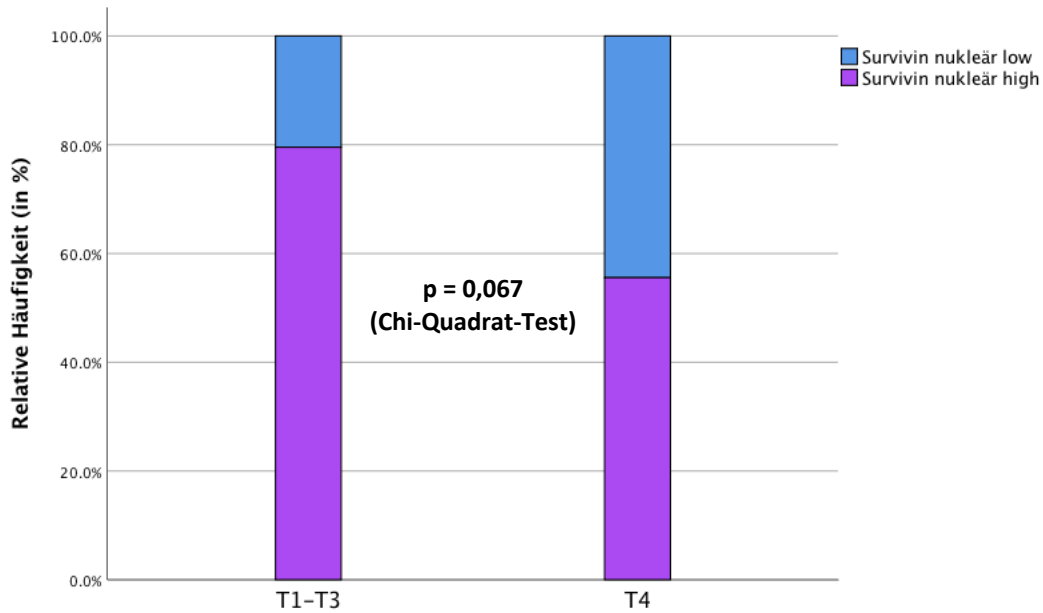


Abbildung 45: Nukleäre Survivin-Expression in Abhängigkeit vom T-Stadium des Tumorgewebes von Sec62-high-Patienten (2). Während bei Kopf-Hals-Tumoren im Stadium T1-T3 insgesamt 79,5% der Malignome eine hohe nukleäre Survivin-Expression aufweisen, trifft dies bei HNSCCs im Stadium T4 nur noch für 55,6% der Tumore zu ($p = 0,067$ im Chi-Quadrat-Test).

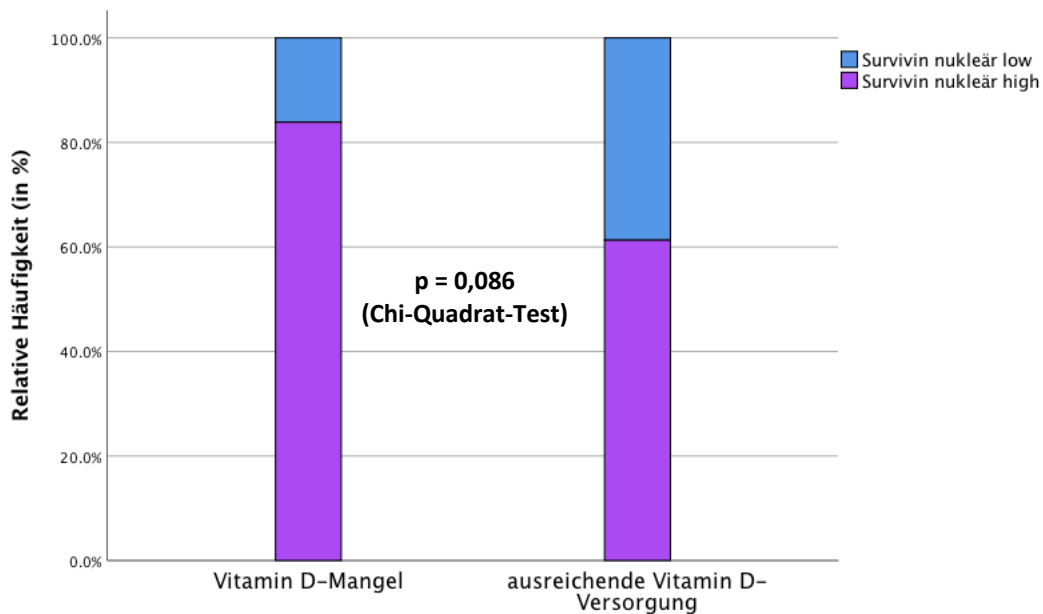


Abbildung 46: Nukleäre Survivin-Expression in Abhängigkeit von der Vitamin D-Versorgung der Sec62-high-Patienten. 83,9% der Patienten mit einem Vitamin D-Mangel weisen parallel zu einer hohen tumoralen Sec62-Expression ebenfalls eine ausgeprägte nukleäre Survivin-Expression auf. Liegt bei den Patienten hingegen eine ausreichende Vitamin D-Versorgung vor, zeigt sich nur noch in 61,3% der Fälle eine hohe nukleäre Survivin-Expression ($p = 0,086$ im Chi-Quadrat-Test).

4.8 Analyse von HNSCC-Patienten mit unterschiedlicher nukleärer Survivin-Expression des Tumorgewebes

In einem nächsten Schritt wird das Gesamtkollektiv anhand der nukleären Survivin-Expression des Tumorgewebes in zwei Teilkollektive unterteilt und im Rahmen von Korrelationsanalysen mit klinischen und histopathologischen Patientendaten näher charakterisiert.

4.8.1 Betrachtung der Patienten mit einer geringen Survivin-Expression der Tumorzellkerne

Bei Patienten, deren Kopf-Hals-Tumoren eine geringe nukleäre Survivin-Expression aufweisen, zeigt sich ab einer Nachbeobachtungszeit von etwa 25 Monaten ein besseres Gesamtüberleben von Sec62-negativen Tumoren im Vergleich zu Sec62-positiven Tumoren ($p = 0,200$ im log-rank-Test; siehe Abbildung 47). Die zytoplasmatische Survivin-Expression nimmt in dieser Untergruppe keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben der HNSCC-Patienten ($p = 0,889$ im log-rank-Test).

Kopf-Hals-Tumoren mit einer schwachen nukleären Survivin-Expression, die histopathologisch dem Stadium T4 zugeordnet werden ($n = 9$), zeichnen sich in 88,9% der Fälle durch eine hohe Sec62-Expression aus. HNSCCs früherer Tumorstadien ($n = 19$) zeigen hingegen nur in 47,4% der Fälle eine starke Sec62-Expression ($p = 0,049$ im Chi-Quadrat-Test; siehe Abbildung 48).

Im vorliegenden Teilkollektiv unterscheiden sich HNSCCs verschiedener Tumorstadien nicht nur bezüglich ihrer Sec62-Expression, sondern auch im Hinblick auf die Vitamin D-Versorgung der zugehörigen Patienten. Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom im Stadium T1 bis T3 ($n = 19$) weisen in 78,9% der Fälle eine ausreichende Vitamin D-Versorgung auf. Bei HNSCCs im Stadium T4 ($n = 9$) liegt jedoch in 66,7% der Fälle mehrheitlich ein Vitamin D-Mangelzustand bei den zugehörigen Patienten vor ($p = 0,035$ im Chi-Quadrat-Test; siehe Abbildung 49).

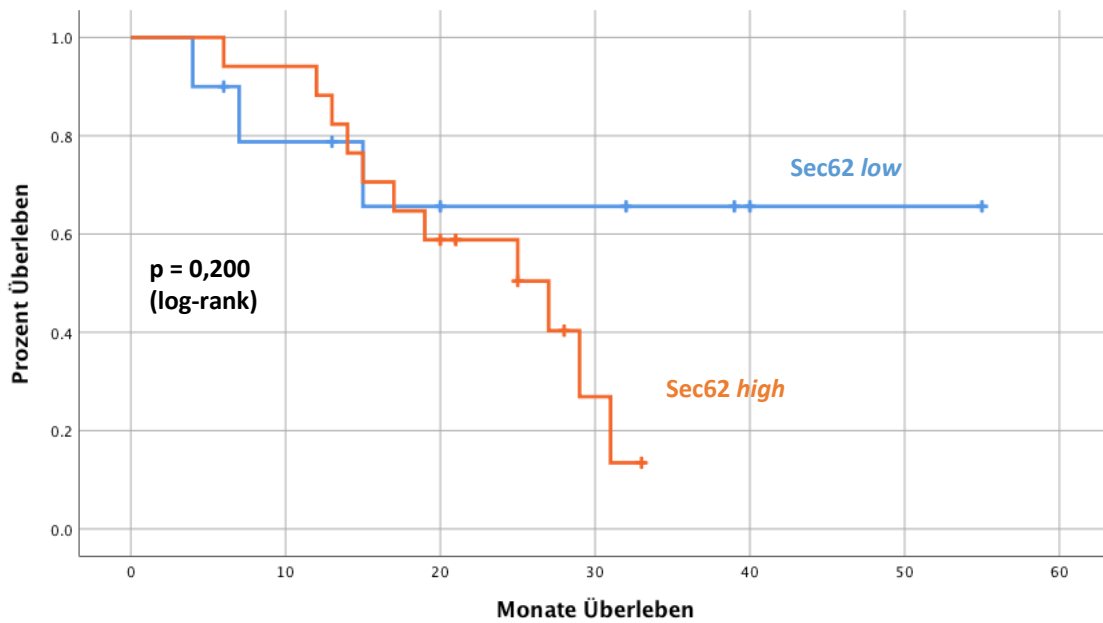


Abbildung 47: Gesamtüberleben von HNSCC-Patienten mit einer niedrigen tumoralen Survivin-Expression der Zellkerne in Abhängigkeit von der Sec62-Expression der Tumore. Aus der Kaplan-Meier-Analyse geht hervor, dass sich die Prognose von Sec62-positiven HNSCCs im Gegensatz zu solchen mit einer niedrigen Sec62-Expression ab einer Nachbeobachtungszeit von etwa 25 Monaten deutlich verschlechtert ($p = 0,200$ im log-rank-Test). Die Kreuze stehen für Patienten, welche zum Ende der Nachbeobachtungszeit am Leben waren (zensierte Beobachtungen).

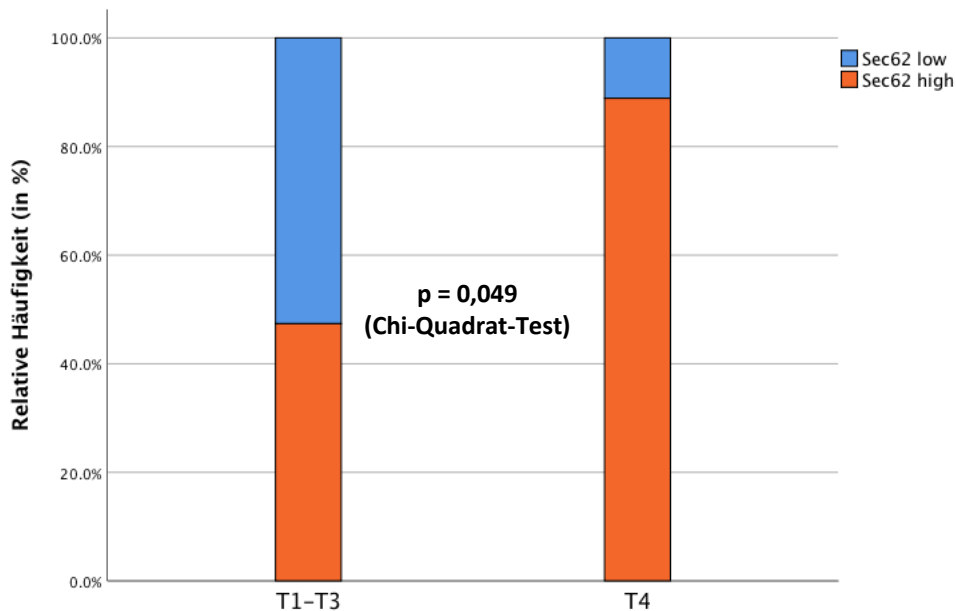


Abbildung 48: Sec62-Expression in Abhängigkeit vom T-Stadium des Tumorgewebes. Während bei Kopf-Hals-Tumoren mit einer schwachen nukleären Survivin-Expression im Stadium T1-T3 lediglich 47,4% der Malignome eine hohe Sec62-Expression aufweisen, trifft dies bei HNSCCs im Stadium T4 für 88,9% der Tumore zu ($p = 0,049$ im Chi-Quadrat-Test).

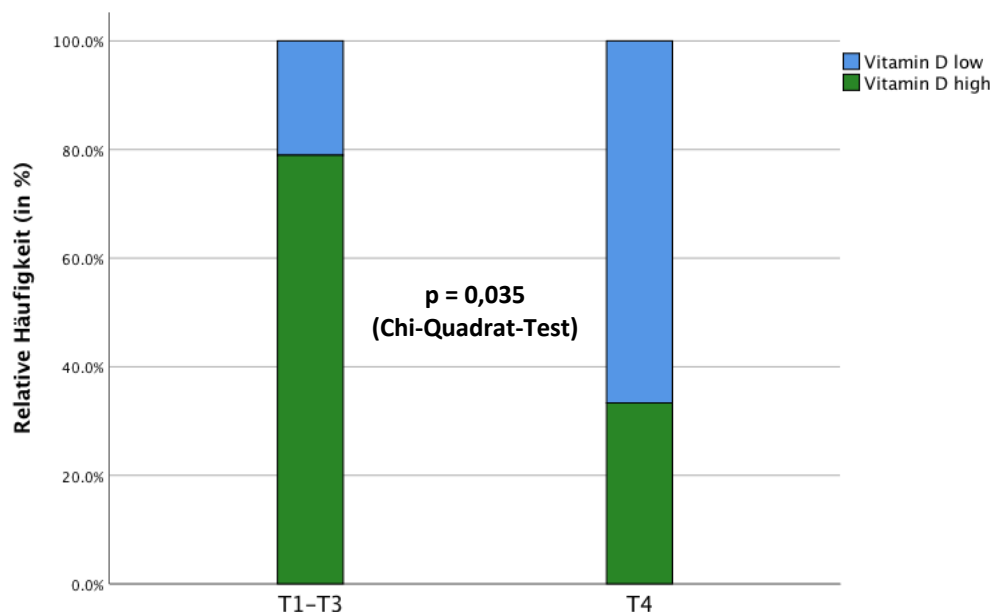


Abbildung 49: Vitamin D-Status von HNSCC-Patienten mit einer geringen Survivin-Expression der Tumorzellkerne in Abhängigkeit vom Tumorstadium (T). Während Patienten mit Tumoren der Stadien T1 bis T3 in 78,9% der Fälle eine ausreichende Vitamin D-Versorgung aufweisen, trifft dies für Patienten mit HNSCCs im Stadium T4 nur noch auf 33,3% der Fälle zu ($p = 0,035$ im Chi-Quadrat-Test).

4.8.2 Betrachtung der Patienten mit einer hohen Survivin-Expression der Tumorzellkerne

Bei Patienten, deren Kopf-Hals-Tumoren eine ausgeprägte nukleäre Survivin-Expression aufweisen, zeigt sich ein schlechteres Gesamtüberleben von Patienten mit Sec62-positiven Tumoren im Vergleich zu Sec62-negativen Tumoren ($p = 0,119$ im log-rank-Test; siehe Abbildung 50). Die zytoplasmatische Survivin-Expression nimmt im vorliegenden Teilkollektiv keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten ($p = 0,724$ im log-rank-Test). Darüber hinaus sind im vorliegenden Teilkollektiv HPV-negative Tumoren im Gegensatz zu solchen mit einem positiven HPV-Status häufiger mit einer starken Sec62-Expression vergesellschaftet ($p = 0,052$ im Chi-Quadrat-Test; siehe Abbildung 51).

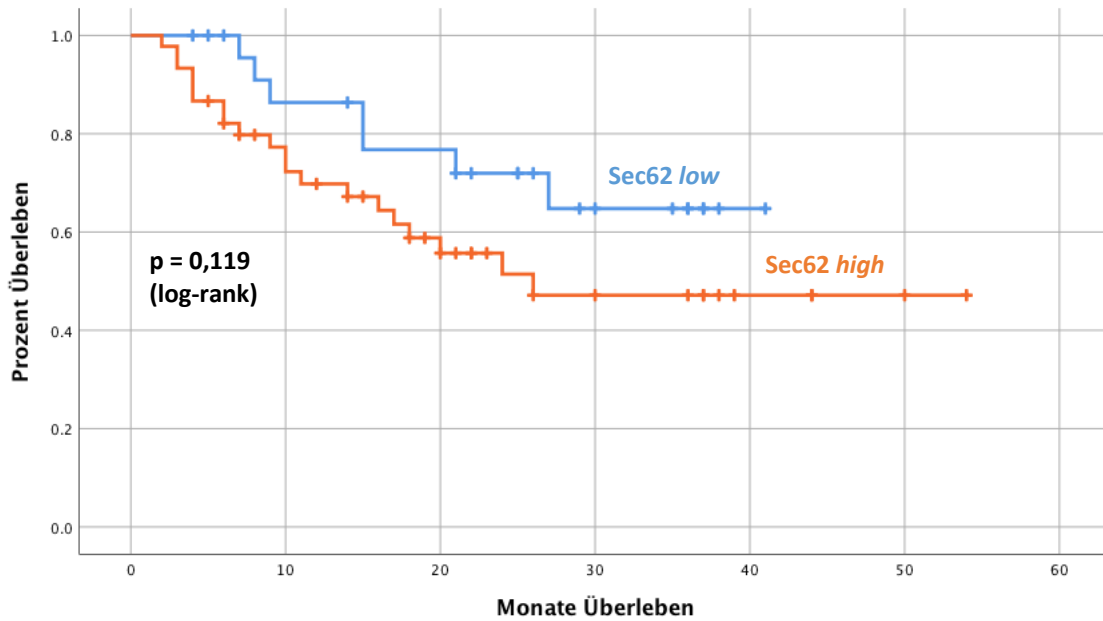


Abbildung 50: Gesamtüberleben von HNSCC-Patienten mit einer starken nukleären Survivin-Expression in Abhängigkeit von der tumoralen Sec62-Expression. Aus der Kaplan-Meier-Analyse geht hervor, dass HNSCCs mit hoher Sec62-Expression mit einer schlechteren Prognose einhergehen als solche mit schwacher Sec62-Expression ($p = 0,119$ im log-rank-Test). Die Kreuze stehen für Patienten, welche zum Ende der Nachbeobachtungszeit am Leben waren (zensierte Beobachtungen).

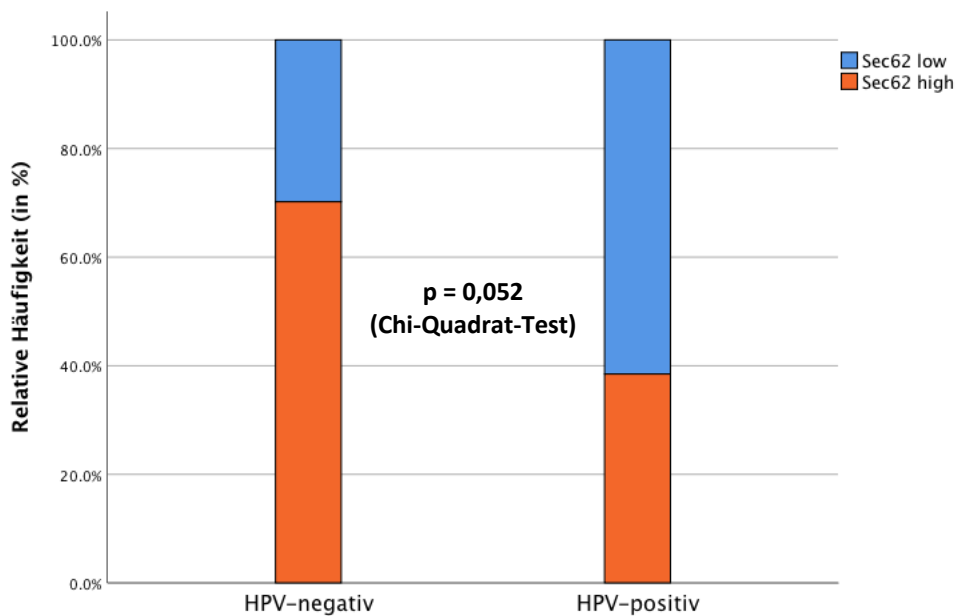


Abbildung 51: Sec62-Expression in Abhängigkeit vom HPV-Status von HNSCCs mit einer starken nukleären Survivin-Expression. Bei den HPV-negativen Tumoren zeigen 70,2% der Tumore eine hohe Sec62-Expression, während dies bei den HPV-positiven Tumoren nur für 38,5% der HNSCCs zutrifft ($p = 0,052$ im Chi-Quadrat-Test).

4.9 Analyse von HNSCC-Patienten mit unterschiedlicher zytoplasmatischer Survivin-Expression des Tumorgewebes

4.9.1 Betrachtung der Patienten mit einer geringen zytoplasmatischen Survivin-Expression der Tumore

Das Gesamtüberleben von Patienten, deren Kopf-Hals-Tumoren eine schwache zytoplasmatische Survivin-Expression aufweisen, wird weder von der tumoralen Sec62- ($p = 0,399$ im log-rank-Test) noch von der nukleären Survivin-Expression ($p = 0,763$ im log-rank-Test) wesentlich beeinflusst. Auch die im vorliegenden Teilkollektiv durchgeführten Korrelationsanalysen mit weiteren klinischen und histopathologischen Patientendaten lieferten keine wegweisenden Ergebnisse.

4.9.2 Betrachtung der Patienten mit einer hohen zytoplasmatischen Survivin-Expression der Tumore

Bei Patienten, deren Kopf-Hals-Tumoren eine ausgeprägte zytoplasmatische Survivin-Expression aufweisen, geht eine hohe tumorale Sec62-Expression mit einer schlechteren Prognose einher ($p = 0,061$ im log-rank-Test). Besonders deutlich stellt sich dieser Sachverhalt ab einer Nachbeobachtungszeit von etwa 20-25 Monaten dar (siehe Abbildung 52).

Plattenepithelkarzinome des vorliegenden Teilkollektivs, die histopathologisch dem Stadium T4 zugeordnet werden ($n = 15$), zeichnen sich in 93,3% der Fälle durch eine ausgeprägte Sec62-Expression aus. In früheren Tumorstadien (T1 bis T3; $n = 48$) sind dagegen nur 54,2% der Plattenepithelkarzinome Sec62-positiv ($p = 0,012$ im Chi-Quadrat-Test; siehe Abbildung 53). Die HPV-negativen Tumoren mit einer hohen zytoplasmatischen Survivin-Expression ($n = 54$) weisen im Gegensatz zu den HPV-positiven Malignomen ($n = 9$) mehrheitlich eine ausgeprägte Sec62-Expression auf ($p = 0,063$ im Chi-Quadrat-Test; siehe Abbildung 54).

Die nukleäre Survivin-Expression nimmt im Gegensatz zur tumoralen Sec62-Expression keinen signifikanten Einfluss auf die Prognose von HNSCC-Patienten mit einer starken zytoplasmatischen Survivin-Expression des Tumorgewebes ($p = 0,600$ im log-rank-Test). Ab einer Nachbeobachtungszeit von etwa 28 Monaten lässt sich jedoch eine Tendenz in Richtung eines besseren Gesamtüberlebens von Kopf-Hals-Tumoren mit einer ausgeprägten nukleären Survivin-Expression feststellen (siehe Abbildung 55).

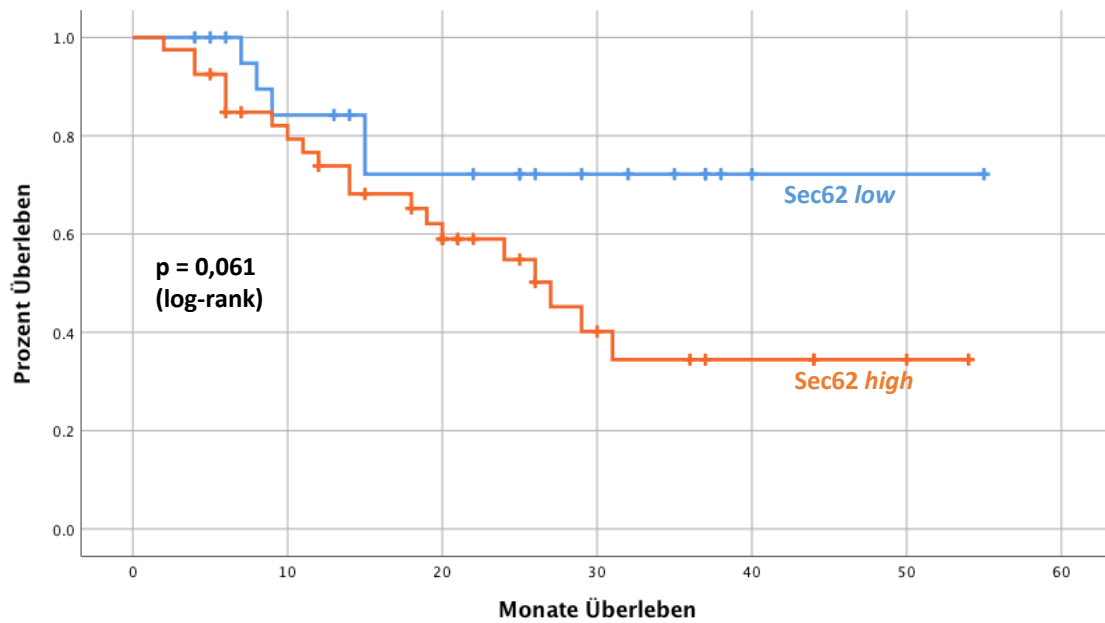


Abbildung 52: Gesamtüberleben von HNSCC-Patienten mit einer starken zytoplasmatischen Survivin-Expression in Abhängigkeit von der tumoralen Sec62-Expression. Aus der Kaplan-Meier-Analyse geht hervor, dass HNSCCs mit hoher Sec62-Expression mit einer schlechteren Prognose einhergehen als solche mit schwacher Sec62-Expression ($p = 0,061$ im log-rank-Test). Die Kreuze stehen für Patienten, welche zum Ende der Nachbeobachtungszeit am Leben waren (zensierte Beobachtungen).

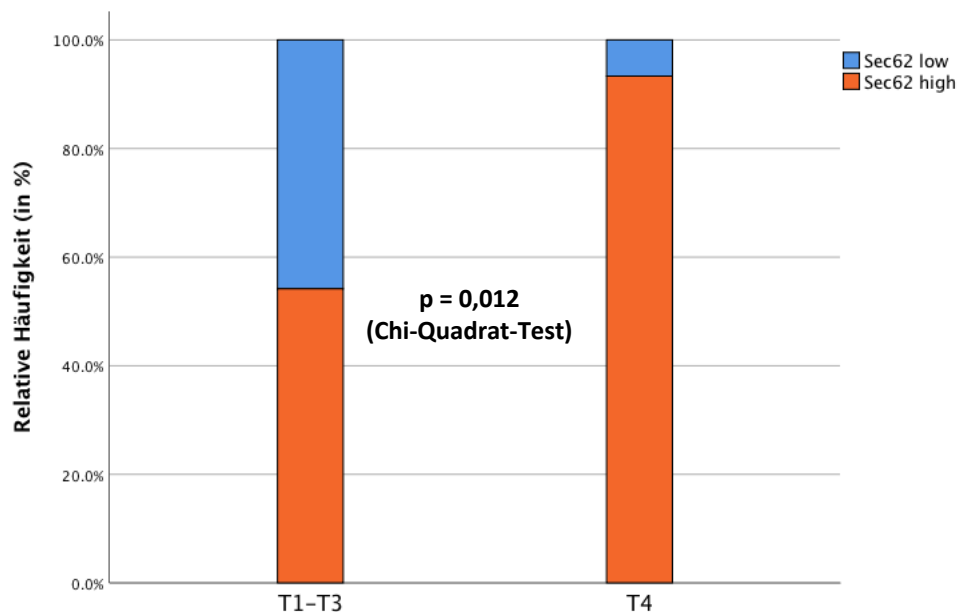


Abbildung 53: Sec62-Expression in Abhängigkeit vom T-Stadium des Tumorgewebes. Während bei Kopf-Hals-Tumoren mit einer starken zytoplasmatischen Survivin-Expression in den Stadien T1 bis T3 lediglich 54,2% der Malignome eine hohe Sec62-Expression aufweisen, trifft dies bei HNSCCs im Stadium T4 auf 93,3% der Tumoren zu ($p = 0,012$).

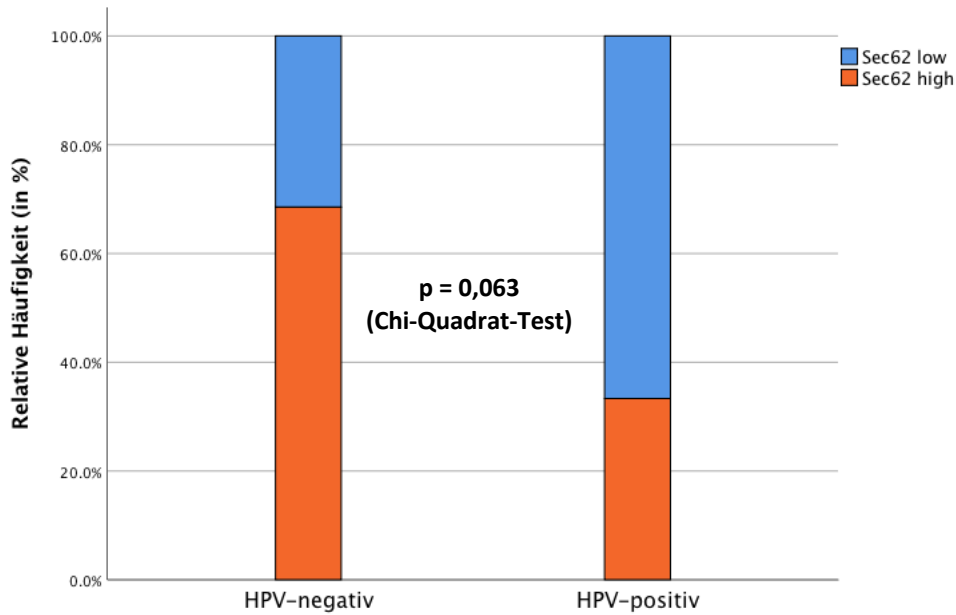


Abbildung 54: Sec62-Expression in Abhängigkeit vom HPV-Status von HNSCCs mit einer starken zytoplasmatischen Survivin-Expression. Bei den HPV-negativen Tumoren zeigen 68,5% der Tumoren eine hohe Sec62-Expression, bei den HPV-positiven Tumoren dagegen nur 33,3% ($p = 0,063$ im Chi-Quadrat-Test).

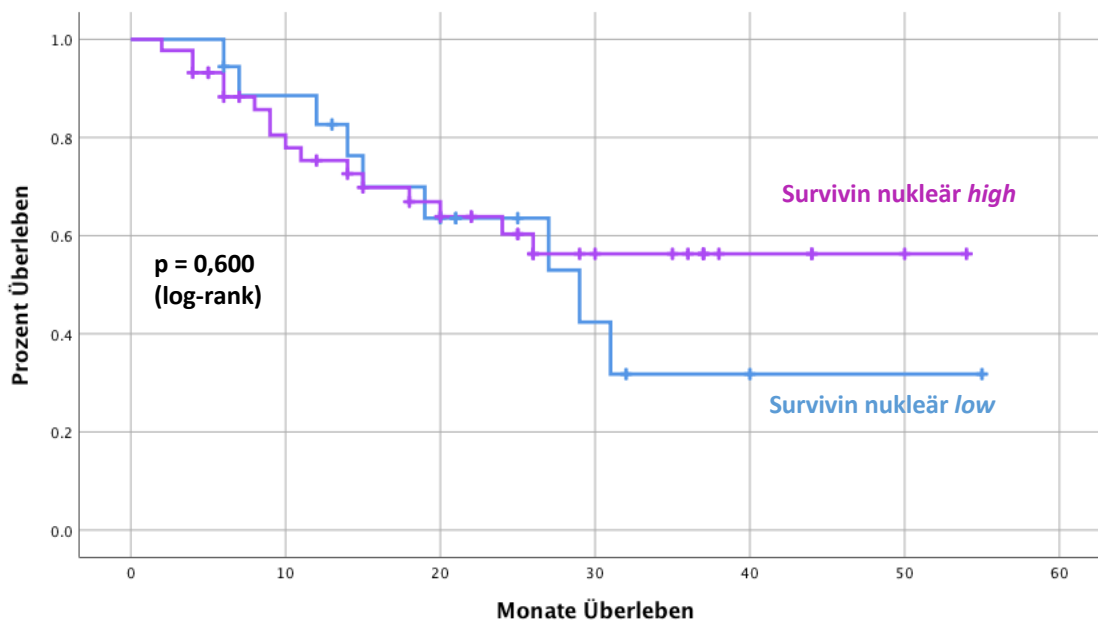


Abbildung 55: Gesamtüberleben von HNSCC-Patienten mit einer hohen zytoplasmatischen Survivin-Expression in Abhängigkeit von der nukleären Survivin-Expression des Tumorgewebes. Die Kaplan-Meier-Analyse zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Überlebenskurven beider Gruppen ($p = 0,600$ im log-rank-Test). Nach ca. 28 Monaten lässt sich jedoch eine schwache Tendenz in Richtung einer besseren Prognose von Tumoren mit starker nukleärer Survivin-Expression erkennen. Die Kreuze stehen für Patienten, welche zum Ende der Nachbeobachtungszeit am Leben waren (zensierte Beobachtungen).

4.10 Untersuchung der Expression miRNA-codierender Gene im Blut von HNSCC-Patienten

In einem zweiten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Expression definierter miRNAs im Vollblut von HNSCC-Patienten und der immunhistochemisch bestimmten Sec62- bzw. Survivin-Expression des Tumorgewebes der entsprechenden Patienten besteht. Weiterhin sollten auch die klinischen und pathologischen Patientendaten mit dem miRNA-Profil der Patienten korreliert werden. Das Ziel dieser Untersuchungen bestand darin, dysregulierte miRNAs als neue diagnostische und prognostische Marker bei Patienten mit einem diagnostizierten Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region ausfindig zu machen. Hierfür müssen zunächst solche miRNAs identifiziert werden, welche durch Interaktion mit der mRNA der interessierenden Gene *SEC62* und *BIRC5* einen Einfluss auf die Proteinexpression von Sec62 bzw. Survivin nehmen könnten. Im Rahmen einer Datenbank-basierten Recherche wurden mit miR-101, miR-203a, miR-218 und miR-455 vier miRNAs ausgesucht, welche aufgrund ihrer Sequenz eine regulatorische Funktion auf die Expression eines oder beider genannter Gene ausüben könnten (siehe Tabelle 22). Zur wissenschaftlichen Validierung dieser Vorhersagen wurde die vollständige RNA inklusive miRNA aus dem Vollblut von insgesamt 29 HNSCC-Patienten und 8 gesunden Probanden isoliert und anschließend in cDNA umgeschrieben. Die Quantifizierung der zu untersuchenden miRNAs erfolgte anhand von quantitativen Real-Time PCR-Analysen unter Zuhilfenahme von miRNA-spezifischen Sonden.

Tabelle 22: Im Rahmen dieser Arbeit untersuchte miRNAs.

miRNA	mögliche Zielgene
hsa-miR-101	<i>SEC62, BIRC5</i>
hsa-miR-203a	<i>BIRC5</i>
hsa-miR-218	<i>BIRC5</i>
hsa-miR-455	<i>SEC62</i>

Die Auswertung der durchgeführten Real-Time PCRs erfolgte anhand einer relativen Quantifizierung nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Nach der Normalisierung der in der qPCR ermittelten Ct-Werte auf ein Referenzgen (im vorliegenden Fall *miR-16*; siehe auch *Material und Methoden*) kann mit dieser Methode die relative Expression des interessierenden Gens bei Tumorpatienten im Vergleich zu gesunden Personen ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) bestimmt werden. Als Bezugsgröße gilt eine Expression von 1. Berechnet sich für die Tumorpatienten beispielsweise eine relative Expression von 2, bedeutet dies, dass Tumorzellen das untersuchte Gen doppelt so stark exprimieren wie gesunde Zellen. Analog besagt eine relative Expression von 0,5, dass das analysierte Gen im Tumor nur noch eine halb so starke

Expression wie im gesunden Gewebe aufweist und die Genexpression somit herunterreguliert ist. Obwohl es sich bei den eben angeführten Beispielen um biologisch gleichbedeutende Effekte handelt, stellt sich eine Überexpression von Genen im Gegensatz zu einer herunterregulierten Genexpression graphisch oftmals eindrücklicher dar. Dies liegt darin begründet, dass in dieser Darstellungsweise bei unterexprimierten Genen für die relative Expression lediglich Zahlenwerte zwischen 0 und 1 möglich sind, während die Skala für überexprimierte Gene nach oben hin theoretisch unbegrenzt ist. Ein möglicher Lösungsansatz besteht in der Logarithmierung der Zahlenwerte für die relative Expression zur Basis 2 ($\log_2(x)$), da hieraus eine Bezugsgröße von 0 resultiert ($\log_2(1) = 0$). Bei dieser Skalierung entsprechen positive Zahlenwerte einer Überexpression, negative Werte hingegen einer Unterexpression von Genen. Sind zwei Gene um den jeweils gleichen Faktor hoch- bzw. herunterreguliert, unterscheiden sich die Zahlenwerte lediglich durch ihr Vorzeichen. Zur Unterscheidung beider Skalen, wird die logarithmierte relative Expression ($\log_2(2^{-\Delta\Delta Ct})$) im Folgenden als „Änderung der Expression“ (*Fold Change*) bezeichnet.

4.10.1 Untersuchung der *miR-101*-Expression im Vollblut von HNSCC-Patienten

Mithilfe der spezifischen TaqMan[®]-Sonde für die Analyse der *miR-101*-Expression im Blut von HNSCC-Patienten und gesunden Probanden konnte in der quantitativen Real-Time PCR für jede Probe ein Ct-Wert bestimmt werden, welcher als Ausgangspunkt für die relative Quantifizierung nach der $\Delta\Delta Ct$ -Methode diente. Zunächst erfolgte ein Vergleich der Expressionsmuster zwischen Patienten- und Kontrollblutproben. Abbildung 56 zeigt eine Gegenüberstellung der Mittelwerte der auf das Referenzgen *miR-16* normalisierten Ct-Werte (ΔCt) für HNSCC-Patienten und Kontrollen. Die Änderung der Expression für beide Gruppen (*Fold Change*) ist in Abbildung 57 dargestellt.

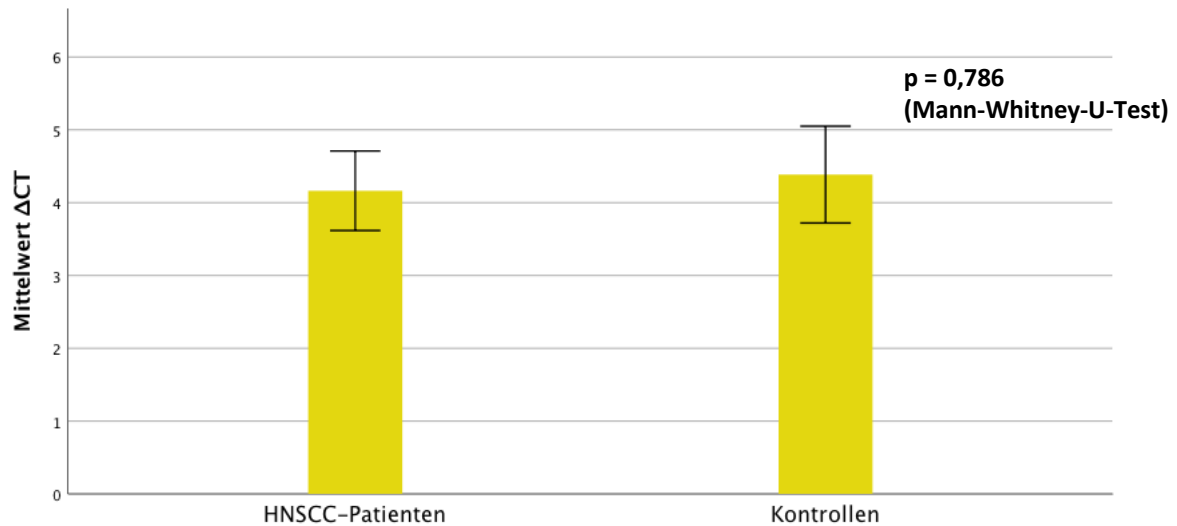


Abbildung 56: Gegenüberstellung der auf das Referenzgen *miR-16* normalisierten Ct-Werte (ΔCt) für *miR-101* von Patienten- und Kontrollproben. Dargestellt sind die Mittelwerte der in der qPCR ermittelten und normalisierten Ct-Werte. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler für beide Gruppen dar. Bei einem berechneten p-Wert im Mann-Whitney-U-Test von 0,786 liegt kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen hinsichtlich der mittleren ΔCt -Werte vor ($p > 0,005$).

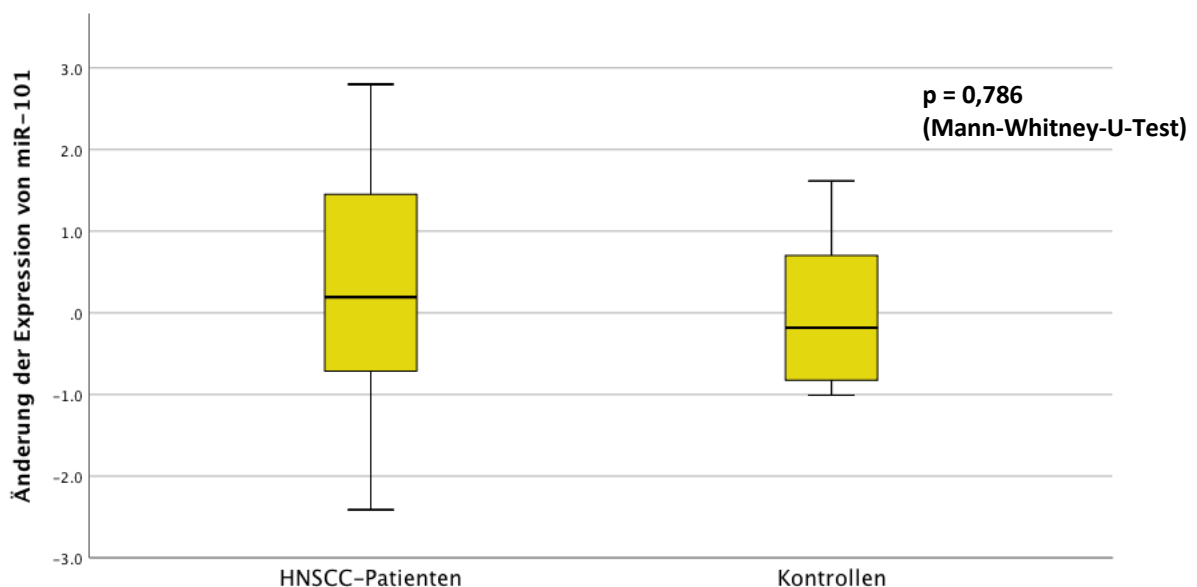


Abbildung 57: Änderung der Expression (*Fold Change*) von *miR-101* bei HNSCC-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden. Die relative Genexpression von *miR-101* ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) im Blut von HNSCC-Patienten ($n=29$) und Kontrollen ($n=8$) wurde mittels quantitativer Real-Time PCR anhand einer relativen Quantifizierung nach der $\Delta\Delta Ct$ -Methode ermittelt. Die Änderung der Expression (*Fold Change*) berechnet sich aus dem Logarithmus der Basis 2 von der relativen Expression ($\log_2(2^{-\Delta\Delta Ct})$). Die Änderung der *miR-101*-Expression gilt als signifikant, wenn der unter Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests ermittelte p-Wert kleiner als 5% ist ($p < 0,005$). Demnach liegt hier kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen vor ($p = 0,786$).

Aus der Abbildung 57 geht hervor, dass die Transkriptlevel von *miR-101* im Blut von HNSCC-Patienten und Kontrollen keinen signifikanten Unterschied aufweisen (p-Wert = 0,786 im Mann-Whitney-U-Test).

In einem nächsten Schritt wurden Korrelationsanalysen zwischen dem *miR-101*-Expressionsmuster und den histopathologischen bzw. klinischen Daten der untersuchten HNSCC-Patienten (TNM-Stadium, Grading, HPV-Status, Vitamin D-Versorgung) durchgeführt. Analog wurde auch nach Zusammenhängen zwischen der *miR-101*-Expression im Blut und der immunhistochemisch bestimmten Sec62- und Survivin-Expression gesucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass HNSCC-Patienten, bei denen Fernmetastasen vorliegen, eine signifikant verminderte *miR-101*-Expression im Blut aufweisen als die Patienten, bei denen keine Fernmetastasen nachgewiesen werden können (siehe Abbildung 58).

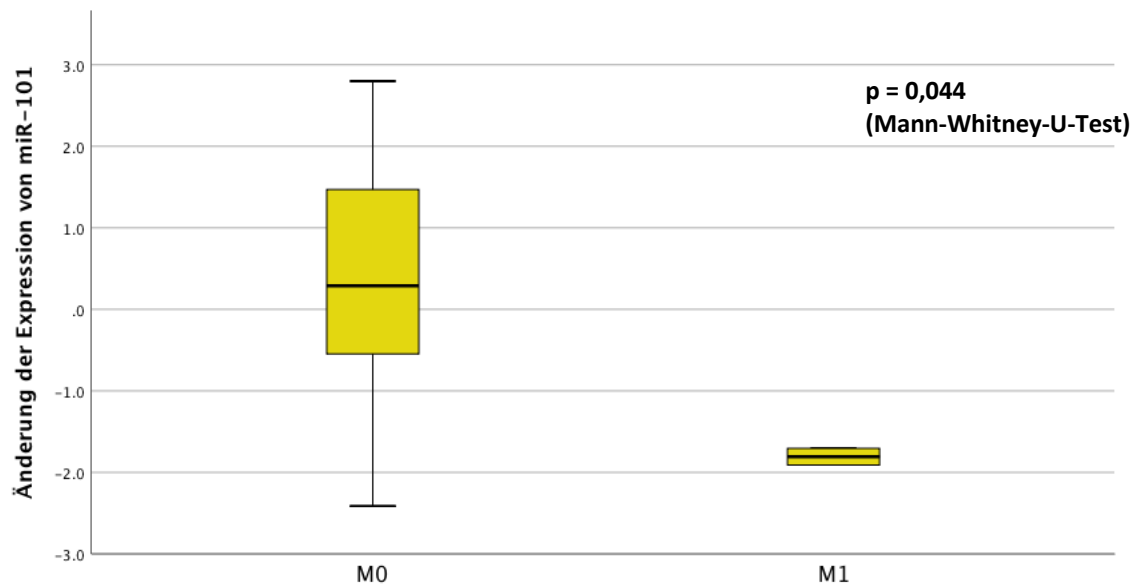


Abbildung 58: *miR-101*-Expression in Abhängigkeit vom M-Status. Im Vergleich zu HNSCC-Patienten ohne nachweisbare Fernmetastasen (M0) zeigt sich eine signifikant verminderte Expression von *miR-101* im Vollblut von HNSCC-Patienten, bei denen Fernmetastasen detektiert werden konnten (M1) (p-Wert = 0,044 im Mann-Whitney-U Test).

4.10.2 Untersuchung der *miR-218*-Expression im Vollblut von HNSCC-Patienten

Unter Verwendung der spezifischen TaqMan®-Sonde für die Analyse der *miR-218*-Expression konnte in der qPCR-Analyse lediglich für 5 der insgesamt 29 Patientenproben sowie für eine Kontrollprobe ein Signal detektiert und folglich ein Ct-Wert bestimmt werden. Die Ct-Werte dieser 6 positiven Proben sind in Tabelle 23 aufgeführt. Um in der beschriebenen Situation dennoch eine mathematische bzw. statistische Analyse vornehmen zu können, wurde bei einer fehlenden Reaktion in der qPCR für die entsprechende Probe ein höchstmöglicher Ct-Wert von 40 vergeben. In Abbildung 59 sind die auf das Referenzgen *miR-16* normalisierten (Δ Ct) und gemittelten Ct-Werte für Tumor- und Kontrollproben dargestellt.

Tabelle 23: Ct-Werte der Proben mit einem positiven Signal für *miR-218* in der qPCR.

Probennummer	Ct-Wert
1291	26,88579
1300	27,91092
1558	30,807973
1567	35,26686
1594	30,41619
1170 (Kontrolle)	36,07973

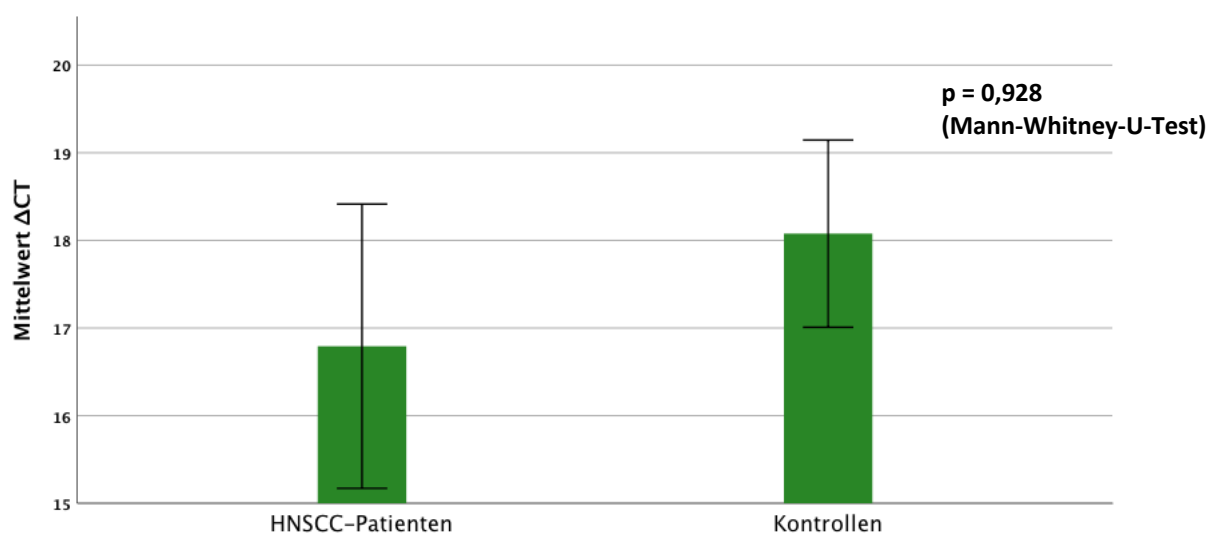


Abbildung 59: Gegenüberstellung der auf das Referenzgen *miR-16* normalisierten Ct-Werte (Δ Ct) für *miR-218* von Patienten- und Kontrollproben. Dargestellt sind die Mittelwerte der in der qPCR ermittelten und normalisierten Ct-Werte. Bei fehlendem Signal in der qPCR wurde ein maximal möglicher Ct-Wert von 40 vergeben. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler für beide Gruppen dar. Bei einem berechneten p-Wert im Mann-Whitney-U-Test von 0,928 liegt kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen hinsichtlich der mittleren Δ Ct-Werte vor ($p > 0,005$).

Die nachfolgende Abbildung 60 zeigt die Änderung der Expression (*Fold Change*) von *miR-218* bei den untersuchten Tumorpatienten und den Kontrollen im Vergleich.

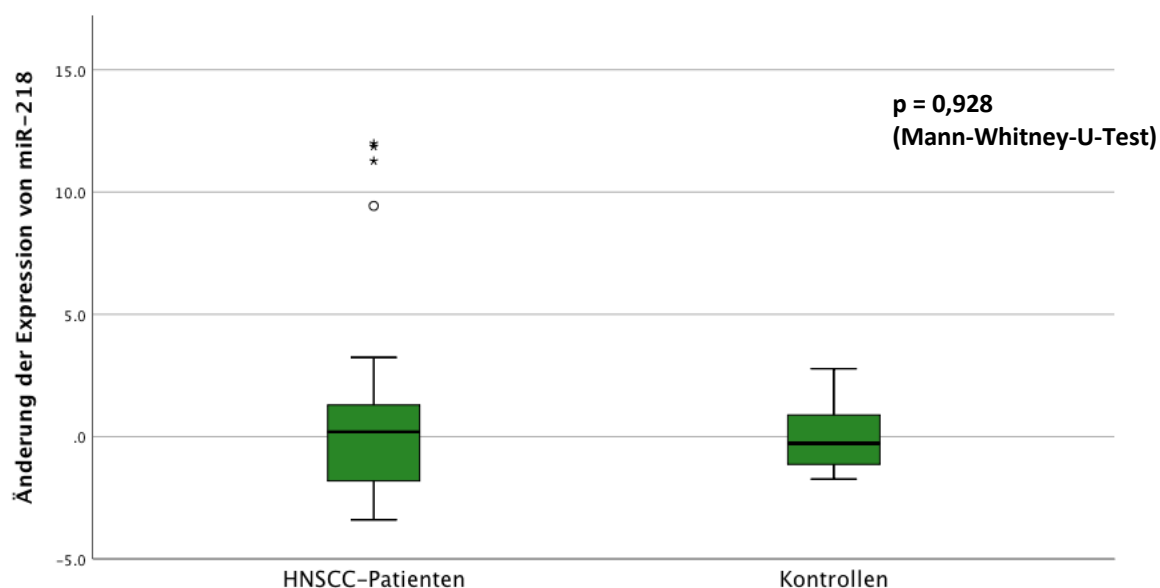


Abbildung 60: Änderung der Expression (*Fold Change*) von *miR-218* bei HNSCC-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden. Die relative Genexpression von *miR-218* ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) im Blut von HNSCC-Patienten (n=29) und Kontrollen (n=8) wurde mittels quantitativer Real-Time PCR anhand einer relativen Quantifizierung nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode ermittelt. Die Änderung der Expression (*Fold Change*) berechnet sich aus dem Logarithmus der Basis 2 von der relativen Expression ($\log_2(2^{-\Delta\Delta C_t})$). Die Änderung der *miR-218*-Expression gilt als signifikant, wenn der unter Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests ermittelte p-Wert kleiner als 5% ist ($p < 0,005$). Demnach liegt hier kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen vor ($p = 0,928$).

Wenngleich sich anhand der Boxplots kein Unterschied hinsichtlich der Expressionsänderung des untersuchten Gens in beiden Gruppen darstellen lässt, fallen jedoch drei Fernpunkte (Sterne) sowie ein Ausreißer (Kreis) innerhalb der Gruppe der HNSCC-Patienten ins Auge, bei denen sich die Expressionsänderung von *miR-218* erheblich von derjenigen der anderen untersuchten Proben unterscheidet (siehe Abbildung 60). Bemerkenswerterweise handelt es sich hierbei um 4 der insgesamt 5 Patientenproben, welche ein positives Signal in der qPCR aufweisen (siehe Tabelle 23). Aufgrund dieser Beobachtung wird im Folgenden eine Gegenüberstellung jener 5 Patientenproben und der Kontrollproben vorgenommen. Abbildung 61 zeigt die auf das Referenzgen *miR-16* normalisierten (ΔC_t) und gemittelten C_t -Werte für die 5 interessierenden Patientenproben und die Kontrollen im Vergleich.

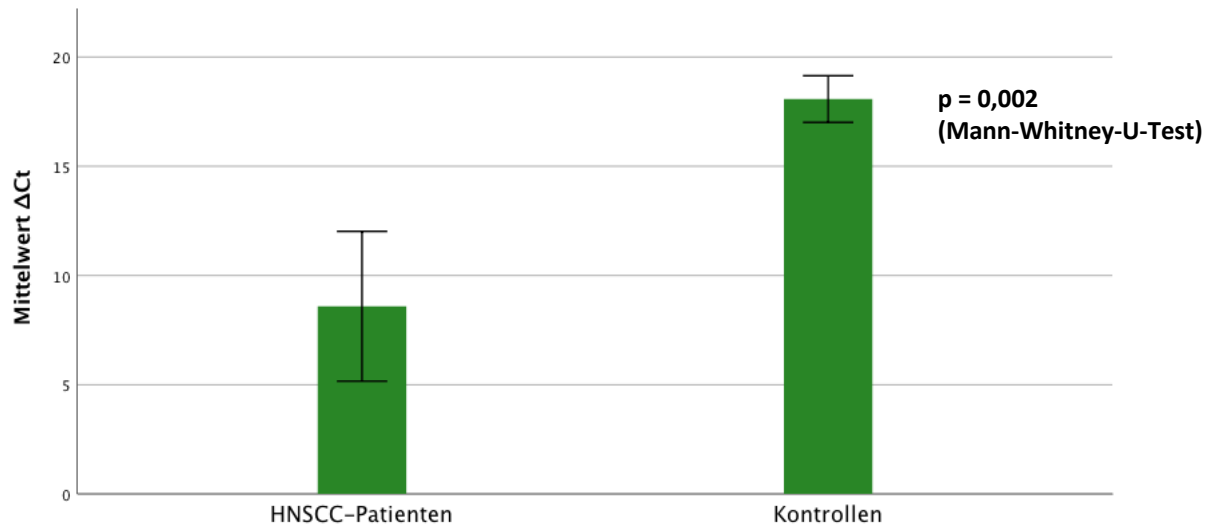


Abbildung 61: Gegenüberstellung der auf das Referenzgen *miR-16* normalisierten Ct-Werte (ΔCt) für die 5 positiven Patientenproben und die Kontrollproben. Dargestellt sind die Mittelwerte der in der qPCR ermittelten und normalisierten Ct-Werte. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler für beide Gruppen dar. Der statistische Vergleich beider Gruppen im Mann-Whitney-U-Test liefert einen p-Wert von 0,002. Demnach besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den mittleren ΔCt -Werten von Patienten- und Kontrollproben ($p < 0,005$).

Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den mittleren normalisierten Ct-Werten (Mittelwert ΔCt) der fünf Patientenproben mit positivem Signal in der qPCR und jenen der Kontrollproben ($p = 0,002$; Mann-Whitney-U-Test). In der nachfolgenden Abbildung 62 ist die Änderung der Expression (*Fold Change*) für beide Gruppen dargestellt.

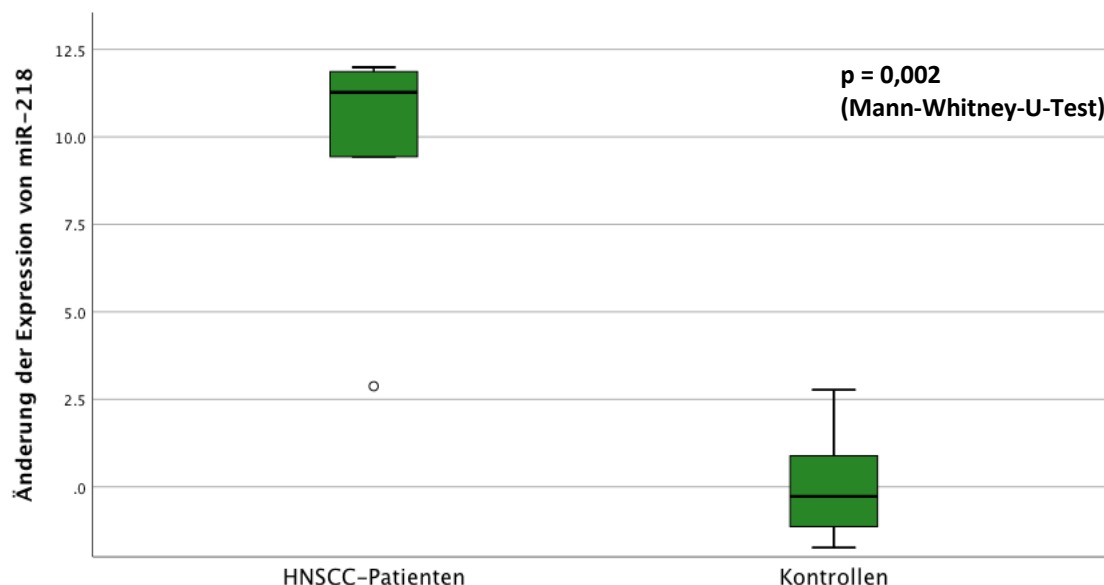


Abbildung 62: Änderung der Expression (Fold Change) von *miR-218* bei HNSCC-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden. Es werden nur die fünf Patientenproben des Kollektivs betrachtet, bei denen in der qPCR ein Ct-Wert ermittelt werden konnte. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied in der Änderung der Expression zwischen beiden Gruppen ($p = 0,002$; Mann-Whitney-U-Test).

Aus den statistischen Analysen lässt sich schließen, dass *miR-218* im Blut von bestimmten HNSCC-Patienten im Vergleich zu gesunden Personen stark überexprimiert wird (siehe Abbildung 62).

In einem nächsten Schritt wurde das *miR-218*-Expressionsmuster der untersuchten HNSCC-Patienten mit den histopathologischen bzw. klinischen Daten „TNM-Stadium“, „Grading“, „HPV-Status“ und „Vitamin D-Versorgung der Patienten“ sowie den Ergebnissen der in dieser Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Analysen korreliert. Dabei zeigte sich eine signifikant verminderte Expression von *miR-218* im Vollblut von HNSCC-Patienten mit einem nachgewiesenen Vitamin-D-Mangel ($25\text{-}(\text{OH})_2\text{-Spiegel} < 10 \text{ ng/ml}$; $n = 9$) im Gegensatz zu HNSCC-Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung ($25\text{-}(\text{OH})_2\text{-Spiegel} \geq 10 \text{ ng/ml}$; $n = 20$) ($p\text{-Wert} = 0,044$ im Mann-Whitney-U-Test). Diese Beobachtung wird in der Abbildung 63 veranschaulicht, in der die Ausreißer erneut den fünf Patientenproben entsprechen, für die ein Ct-Wert in der qPCR ermittelt werden konnte. Um die Proben mit einem positiven Signal in der qPCR getrennt bewerten zu können, wird in der Abbildung 64 die *miR-218*-Expression in Abhängigkeit von der Vitamin D-Versorgung eben jener 5 HNSCC-Patienten aufgetragen.

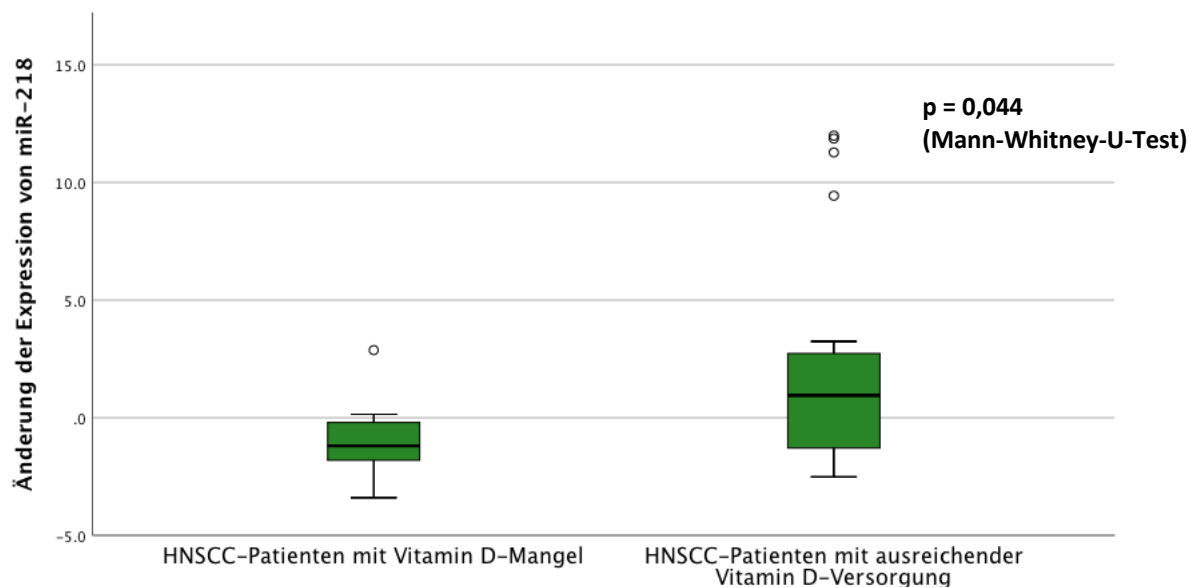


Abbildung 63: *miR-218*-Expression in Abhängigkeit von der Vitamin D-Versorgung der HNSCC-Patienten. Es zeigt sich eine signifikant verminderte Expression von *miR-218* im Vollblut von HNSCC-Patienten mit einem Vitamin-D-Mangel (25-(OH)₂-Spiegel < 10 ng/ml; n = 9) im Gegensatz zu HNSCC-Patienten mit einer ausreichenden Vitamin-D-Versorgung (25-(OH)₂-Spiegel < 10 ng/ml; n = 20) (p-Wert = 0,044 im Mann-Whitney-U-Test). Die Ausreißer entsprechen den Patientenproben, für die in der qPCR ein Ct-Wert bestimmt werden konnte.

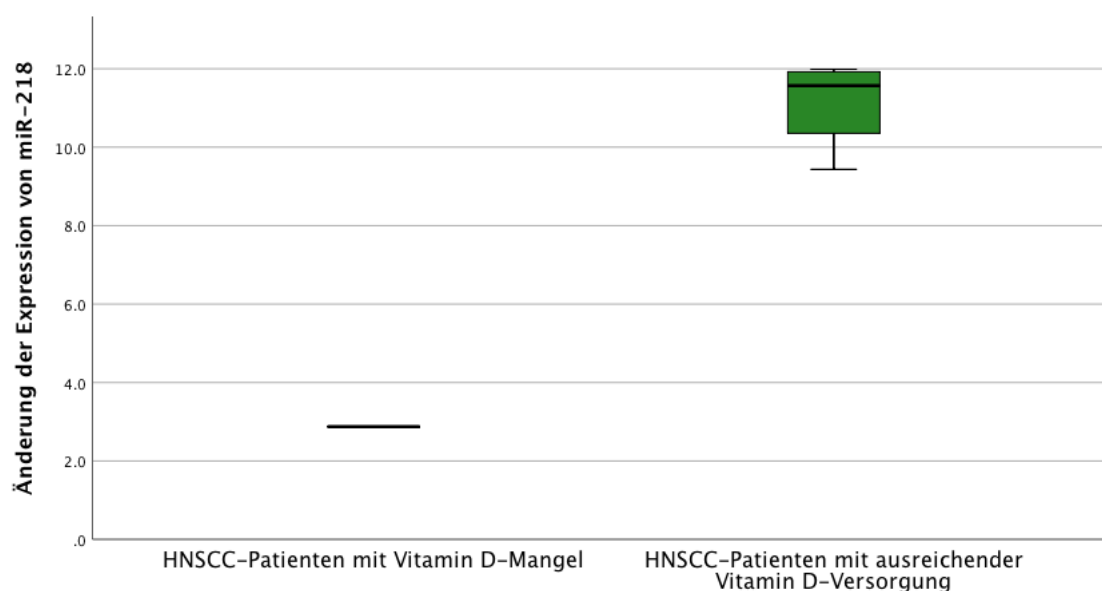


Abbildung 64: *miR-218*-Expression in Abhängigkeit von der Vitamin D-Versorgung der 5 HNSCC-Patienten mit einem positiven Signal in der qPCR. Der eine Patient mit einem manifesten Vitamin D-Mangel weist im Vergleich zu den restlichen 4 Patienten mit einer ausreichenden Vitamin D-Versorgung eine stark verminderte *miR-218*-Expression im Blut auf.

Für die anderen untersuchten klinischen Daten konnte kein vergleichbarer Zusammenhang nachgewiesen werden. Auch die Korrelation der *miR-218*-Expression mit der immunhistochemisch bestimmten Sec62- und Survivin-Expression des Tumorgewebes lieferte keine signifikanten Ergebnisse. Allerdings weisen die fünf näher untersuchten Patienten in der Kaplan-Meier-Analyse ein signifikant besseres Gesamtüberleben auf als die Patienten, bei denen in der qPCR keine Reaktion nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 65). Bei Patienten mit einem diagnostizierten Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region scheint demnach eine Überexpression von *miR-218* im Blut mit einer signifikant besseren Prognose einherzugehen.

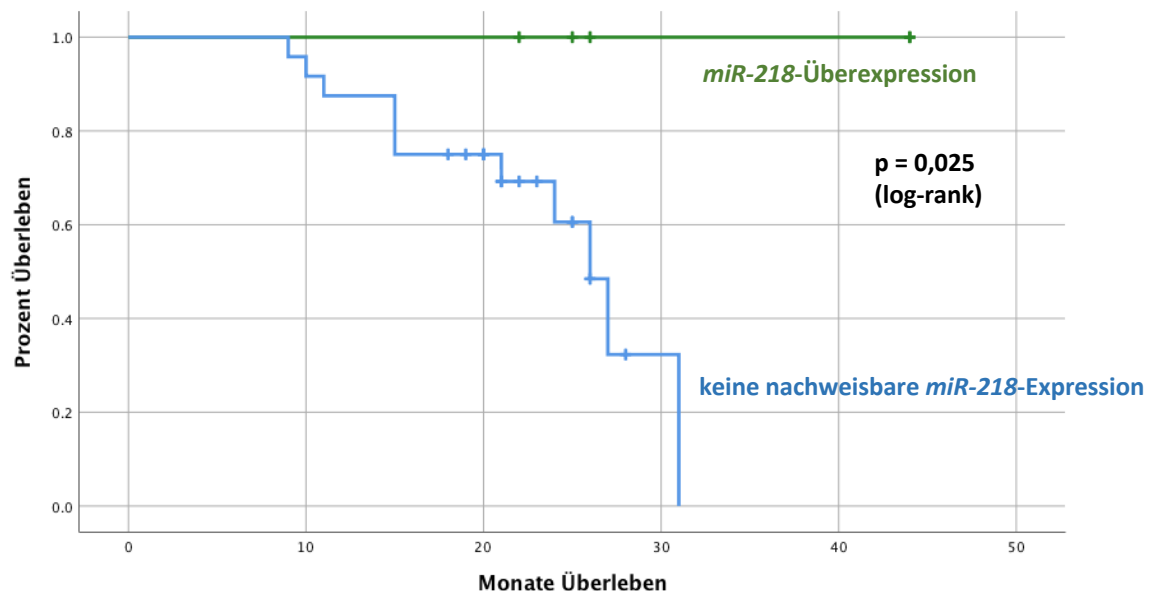


Abbildung 65: Gesamtüberleben von HNSCC-Patienten in Abhängigkeit von der *miR-218*-Expression im Blut. Die Kaplan-Meier-Analyse zeigt ein signifikant besseres Gesamtüberleben der HNSCC-Patienten, welche *miR-218* im Blut überexprimieren ($p = 0,002$ im log-rank-Test). Die Kreuze stehen für Patienten, welche zum Ende der Nachbeobachtungszeit am Leben waren (zensierte Beobachtungen).

4.10.3 Untersuchung der *miR-203a*- und *miR-455*-Expression im Vollblut von HNSCC-Patienten

In den durchgeführten quantitativen Real-Time-PCR-Analysen gelang es weder für *miR-203a* noch für *miR-455* ein Signal zu detektieren, welches die Bestimmung eines Ct-Wertes und die nachfolgende Quantifizierung der genannten miRNAs ermöglicht. Anhand von Positivkontrollen wurden technische Gründe ausgeschlossen. Folglich konnten in diesen Fällen auch keine Korrelationsanalysen vorgenommen werden.

5. Diskussion

Mit jährlich über 600.000 Neuerkrankungen belegen Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region zurzeit den sechsten Platz der häufigsten Tumorerkrankungen weltweit (Leemans *et al.*, 2011). Pro Jahr versterben ca. 350.000 HNSCC-Patienten an dieser malignen Erkrankung (Ferlay J. *et al.*, 2014). Ausgangsgewebe besagter Malignome sind die Schleimhäute des oberen Aerodigestivtraktes (Mundhöhle, Oropharynx, Hypopharynx, Larynx). Anders als die in der Fachliteratur etablierte, übergeordnete Bezeichnung *head and neck squamous cell carcinoma* (HNSCC) suggeriert, stellen Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches eine biologisch äußerst heterogene Gruppe von Malignomen dar. Während beispielsweise die Pathogenese von Oropharynxkarzinomen oftmals auf einer Infektion mit *high-risk* humanen Papillomaviren (HPV) beruht, sind HNSCCs anderer Lokalisationen insbesondere auf Nikotin- und Alkoholabusus zurückzuführen. Im Gegensatz zu anderen Tumorentitäten hat sich die Prognose der Kopf-Hals-Tumoren in den letzten Jahrzehnten trotz großer Fortschritte in der Tumorthherapie nur unwesentlich verbessert: die 5-Jahresüberlebensrate liegt nahezu unverändert zwischen 40 und 50% (Vokes *et al.*, 1993; Leemans *et al.*, 2011). Auch die Erweiterung bisheriger Therapiekonzepte durch neue Therapeutika wie beispielsweise den EGFR-Antikörper Cetuximab erbrachte nicht den gewünschten Erfolg. Problematisch sind insbesondere eine späte Diagnosestellung und das häufige Vorliegen von Lymphknoten- und/oder Fernmetastasen zu diesem Zeitpunkt. Ein wesentlicher Forschungsschwerpunkt liegt demnach in der Identifizierung biologischer Diagnose- und Prognosemarker für Kopf-Hals-Tumoren.

Erkenntnisse der letzten Jahre legen nahe, dass der Tumorgenese von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region weniger ein einzelner, fehlerhafter Zelltyp als vielmehr ein komplexes Zusammenspiel unterschiedlicher molekularbiologischer und immunologischer Faktoren zugrundeliegt (Leemans *et al.*, 2018). Es bietet sich demnach an, das interessierende Patientenkollektiv nicht ausschließlich hinsichtlich der Bedeutung eines einzelnen potentiellen Treiber-Onkogens oder eines bekannten Risikofaktors zu untersuchen, sondern vielmehr eine multifaktorielle Analyse vorzunehmen, welche der Komplexität der Tumorbiologie Rechnung trägt. Das Verständnis molekularer Funktionen möglicher Biomarker sowohl in gesundem als auch in entartetem Gewebe stellt jedoch auch weiterhin einen zentralen Baustein der Krebsforschung dar, da nur auf diesem Weg Einblicke in für die Tumorgenese wesentliche Signalwege gewonnen werden können, welche wiederum die Grundlage für die Entwicklung zielgerichteter Therapieformen darstellen. In der vorliegenden Arbeit wurde mithilfe von immunhistochemischen Analysen die Expression zweier vielversprechender Biomarker - Sec62 und Survivin - in Tumorgewebe von HNSCC-Patienten untersucht und diese anschließend mit klinischen Patientendaten korreliert. Uns

beschäftigte insbesondere die Frage, ob sich aus der Kenntnis des Expressionsprofils von Kopf-Hals-Tumoren eine Aussage hinsichtlich der Prognose von HNSCC-Patienten treffen lässt.

5.1 Kritische Beurteilung des Patientenkollektivs für immunhistochemische Analysen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden immunhistochemische Untersuchungen an FFPE-Tumorproben von HNSCC-Patienten vorgenommen. Insgesamt konnten 98 Tumorgewebeprobe hinsichtlich ihrer Sec62- und Survivin-Expression analysiert werden. Das Patientenkollektiv setzt sich aus insgesamt 19 Frauen und 79 Männern zusammen; das Geschlechterverhältnis Männer zu Frauen beträgt demnach etwa 4:1. Das durchschnittliche Patientenalter liegt bei 65 Jahren mit einem Erkrankungsgipfel in der Altersgruppe der 60- bis 69-Jährigen. Nach aktueller Datenlage entspricht das in dieser Arbeit untersuchte Patientenkollektiv somit der gegenwärtigen epidemiologischen Situation in der westlichen Bevölkerung (GLOBOCAN 2018).

Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle stellen mit rund 35% die häufigste Tumorentität des Kollektivs dar, gefolgt von Oropharynxkarzinomen und Larynxkarzinomen, welche jeweils ca. 23% der untersuchten Malignome ausmachen. 10% der Tumore lassen sich nicht streng einer Lokalisation zuordnen, da sie sich über mehr als nur eine Etage der Kopf-Hals-Region erstrecken. Mit etwa 8% bilden Hypopharynxkarzinome die kleinste HNSCC-Fraktion des Untersuchungskollektivs. Die Häufigkeitsverteilung der Tumorlokalisationen im vorliegenden Kollektiv stimmt demnach mit den aus der Literatur bekannten Daten überein (Leemans *et al.*, 2011).

Der Literatur ist zu entnehmen, dass bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region oftmals ein Vitamin D-Mangel vorliegt, welcher darüber hinaus mit dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen und einem signifikant schlechteren Überleben assoziiert ist (Bochen *et al.*, 2018). Neben der Absicht, im Patientenkollektiv eine möglichst wahrheitsgetreue Stichprobe der Gesamtbevölkerung abzubilden, bemühten wir uns, das Kollektiv zusätzlich anhand der Versorgung der zugehörigen Patienten mit Vitamin D in zwei gleich große Untergruppen (ausreichende Vitamin D-Versorgung versus Vitamin D-Mangel) zu teilen um auf diese Weise den Vitamin D-Status der Patienten als weiteren Parameter in die multifaktorielle Analyse dieser Arbeit aufzunehmen. Als weitere klinische Patientendaten wurden der HPV-Status, das TNM-Stadium sowie das Grading der Malignome berücksichtigt. Kritisch anzumerken ist, dass das Kollektiv im Hinblick auf letztgenannte Patientendaten eine große Heterogenität aufweist. So wurden beispielsweise 46 von insgesamt 98 Plattenepithelkarzinomen dem Stadium N2 zugeordnet, während lediglich 15 Malignome als N1 und 7 Tumore als N3 klassifiziert werden. Ferner wurden nur bei 6 Patienten des Kollektivs Fernmetastasen (M1) nachgewiesen. Die histologische Bestimmung des Differenzierungsgrades von Tumoren (Grading) stellt selbst für den erfahrenen Pathologen oftmals eine Herausforderung dar und unterliegt trotz strenger Definitionen nicht selten einer subjektiven Bewertung. Vor diesem

Hintergrund sollten mögliche statistisch signifikante Zusammenhänge mit dem tumoralen Differenzierungsgrad stets hinterfragt werden.

5.2 Relevanz von Sec62 als Biomarker bei HNSCCs

Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region zeichnen sich durch eine beachtliche Heterogenität in Bezug auf ihre genetischen Eigenschaften und das Ansprechen auf verschiedene Therapieformen aus. Ein wesentliches Ziel gegenwärtiger Forschungsbemühungen besteht darin, geeignete, möglichst tumorspezifische Biomarker zu identifizieren, welche u.a. eine Aussage über die Prognose dieser malignen Erkrankung ermöglichen.

Die Amplifikation des langen Arms von Chromosom 3 (3q) stellt eine häufige genetische Auffälligkeit bei Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region dar. Auf besagtem Chromosomenabschnitt sind eine Reihe von Genen lokalisiert, von denen insbesondere *SEC62* bei HNSCCs häufig überexprimiert wird. *SEC62* codiert für ein Transmembranprotein des endoplasmatischen Retikulums, welches zum einen über die Interaktion mit dem Sec61-Protein am intrazellulären Transport von Proteinen und zum anderen an der Regulation der zellulären Calciumhomöostase beteiligt zu sein scheint (Linxweiler *et al.*, 2017).

In einer Studie von Greiner *et al.* wurde die Sec62-Expression in Gewebeproben von Prostatakarzinomen mit derjenigen in gesundem Prostatagewebe verglichen. Dabei fiel auf, dass die Sec62-Proteinexpression von gesundem Prostatagewebe über histologisch tumorfreies Prostatagewebe von Patienten mit diagnostiziertem Prostatakarzinom bis hin zu malignen Prostatakarzinomzellen stetig zunimmt (Greiner *et al.*, 2011). Analoge Beobachtungen konnten auch für nicht-kleinzellige Lungenkarzinome (NSCLCs) gemacht werden (Linxweiler *et al.*, 2012). Die gesunden Schleimhäute des Kopf-Hals-Bereichs zeichnen sich durch eine auf das regenerative *Stratum germinativum* beschränkte Sec62-Expression aus, während hingegen Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region (HNSCCs) in vielen Fällen eine allgemeine, starke Sec62-Expression aufweisen (Wemmert *et al.*, 2016). Wenngleich seine genaue molekulare Funktion noch weitgehend ungeklärt ist, legen die genannten Erkenntnisse nahe, dass dem Sec62-Protein eine entscheidende Rolle in der Tumorgenese diverser Malignome zukommt.

Einige Studien der letzten Jahre suggerieren einen Zusammenhang zwischen einer hohen Sec62-Expression und einem gering differenzierten und invasiven Tumorphänotyp. So weisen beispielsweise schlecht differenzierte (G3) nicht-kleinzellige Lungenkarzinome im Vergleich zu mäßig differenzierten (G2) NSCLCs eine signifikant höhere Sec62-Expression auf (Linxweiler *et al.*, 2012). Auch Prostatakarzinome mit schlecht differenzierter Drüsenmorphologie (Gleason-Score ≥ 7) sind signifikant häufiger durch eine hohe Sec62-Expression charakterisiert als solche mit geringerem Gleason-Score (<7). Wenngleich nicht statistisch signifikant, konnte für Prostatakarzinome zudem

gezeigt werden, dass sich Tumore des Stadiums T3b im Vergleich zu solchen der Stadien T2c und T3a durch eine tendenziell höhere Sec62-Expression auszeichnen (Greiner *et al.*, 2011). Im untersuchten Patientenkollektiv der vorliegenden Arbeit weisen die Kopf-Hals-Tumoren des Stadiums T4 im Vergleich zu denjenigen der Stadien T1-T3 signifikant häufiger eine hohe Sec62-Expression auf (siehe Abbildung 26). Allerdings zeichnen sich Plattenepithelkarzinome des Stadiums G3 im Vergleich zu solchen der Stadien G1 und G2 durch eine tendenziell niedrigere Sec62-Expression aus (siehe Abbildung 27). Möglicherweise beruht diese Beobachtung auf einer histologisch falsch zu niedrig bestimmten Sec62-Expression in Schnittpräparaten schlecht differenzierter Kopf-Hals-Tumore. In der Tat steigt mit dem Grad der Entdifferenzierung auch der Grad der Verhornung in den Präparaten des untersuchten Kollektivs. Verhornende Tumoranteile sind wiederum nur schlecht zugänglich für immunhistochemische Färbungen und erscheinen daher oftmals als nur schwach Sec62-positiv.

In einer Arbeit von Bochen *et al.* wurde der Zusammenhang zwischen Sec62 und dem Migrationspotential von HNSCC-Tumorzellen untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass mit zunehmendem Lymphknotenbefall (N-Stadium) auch die immunhistochemisch bestimmte Sec62-Expression der Malignome ansteigt. Des Weiteren wiesen Lymphknotenmetastasen tendenziell eine höhere Sec62-Expression als die jeweiligen Primärtumoren auf. Schließlich ging die Überexpression von Sec62 in der HNSCC-Zelllinie UM-SCC1 mit einem gesteigerten Migrationspotential dieser Zellen einher, während ein *silencing* des SEC62-Gens keinen Einfluss auf die Proliferationskapazität der untersuchten Zellreihe nahm (Bochen *et al.*, 2017). Bereits zuvor wurde im Rahmen analoger *in-vitro*-Analysen an Zellreihen anderer Tumorentitäten (Prostatakarzinome, NSCLCs und Schilddrüsenkarzinome) ein Einfluss von Sec62 auf das Migrationspotential von Tumorzellen postuliert (Greiner *et al.*, 2011; Linxweiler *et al.*, 2012). Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen ließ sich für das Kollektiv der vorliegenden Arbeit jedoch kein Zusammenhang zwischen der Sec62-Expression und dem Lymphknotenstatus der untersuchten Plattenepithelkarzinome feststellen. Eine mögliche Ursache für diesen Widerspruch könnte darin begründet sein, dass die Fraktion der als N2 klassifizierten Tumore mit einem Anteil von 46,9% aller untersuchten Malignome deutlich überrepräsentiert ist.

In einer Studie von Wemmert *et al.* konnte für ein Kollektiv von 35 HNSCC-Patienten gezeigt werden, dass eine hohe Sec62-Expression im Tumorgewebe dieser Patienten mit einem signifikant schlechteren Gesamtüberleben assoziiert ist (Wemmert *et al.*, 2016). Im Untersuchungskollektiv der vorliegenden Arbeit weisen 62 von insgesamt 98 Patienten eine hohe tumorale Sec62-Expression auf, wobei auch hier HNSCCs mit einer hohen Sec62-Expression (Sec62 *high*) im Vergleich zu solchen mit einer niedrigen Sec62-Expression (Sec62 *low*) mit einem signifikant schlechteren Gesamtüberleben einhergehen (Abbildung 25). Diese Ergebnisse machen Sec62 zu einem vielversprechenden

Kandidaten für einen zukünftig anwendbaren, prognostischen Biomarker bei Kopf-Hals-Tumoren. Auffällig ist weiterhin, dass die meisten HNSCCs mit einer hohen Sec62-Expression in der Fraktion der Mundhöhlenkarzinome zu finden sind: das Verhältnis Sec62 *high*/Sec62 *low* beträgt hier etwa 2:1. In der Gruppe der Oropharynx- und Larynxkarzinome befinden sich hingegen etwa genau so viele Karzinome mit einer hohen als solche mit einer niedrigen Sec62-Expression. Hieraus lässt sich schließen, dass die Entstehung von Mundhöhlenkarzinomen im Gegensatz zu der von Kopf-Hals-Tumoren anderer Lokalisationen öfter auf Sec62-vermittelten Signalwegen beruhen könnte. Diese Hypothese ist insofern interessant, da sie in Analogie zur bereits seit längerer Zeit bekannten führend HPV-vermittelten Karzinogenese von Oropharynxkarzinomen steht. Bei den Hypopharynxkarzinomen weisen mit 7 von insgesamt 8 Malignomen fast alle Tumore dieser Gruppe eine hohe Sec62-Expression auf. Aufgrund der geringen Fallzahl kann der Stellenwert einer Sec62-Überexpression in dieser Untergruppe jedoch nicht abschließend beurteilt werden. Das Nebeneinander von Kopf-Hals-Tumoren unterschiedlicher Stadien und Lokalisation mit hoher und niedriger Sec62-Expression stützt darüber hinaus die These einer multifaktoriellen Tumorgenese.

5.3 Relevanz von Survivin als Biomarker bei HNSCCs

In den 1990er Jahren wurde Survivin als Vertreter menschlicher *Inhibitors of Apoptosis* (IAPs) mit einzigartigen strukturellen Eigenschaften erstmals beschrieben. Besonderes Interesse erlangte dieses Protein aufgrund der Erkenntnis, dass es sowohl in fetalem als auch in entartetem Gewebe, jedoch nicht in gesundem, ausdifferenziertem, adultem Gewebe exprimiert wird. Analog zu den bereits aus bestimmten Virusarten (*Baculoviridae* u.a.) bekannten IAPs wirkt Survivin im menschlichen Organismus antiapoptotisch und folglich zytoprotektiv. Die Kombination aus einer tumorpezifischen Expression und einer hemmenden Wirkung auf den programmierten Zelltod weckte das allgemeine wissenschaftlich-onkologische Interesse an diesem vom *BIRC5*-Gen auf Chromosom 17q25 codierten Protein. Während für Sec62 in der Literatur weitgehend Einigkeit in Bezug auf seine zentrale Rolle in der Pathogenese bestimmter maligner Erkrankungen herrscht, ist der Stellenwert von Survivin als onkologischer Biomarker und Prognosefaktor weiterhin nicht abschließend geklärt. Dies liegt vor allem darin begründet, dass entsprechende Studien teils widersprüchliche Ergebnisse liefern: so sehen manche Autoren in einer hohen tumoralen Survivin-Expression einen günstigen, andere wiederum einen infausten prognostischen Parameter (Li *et al.*; 2005).

In einer Studie von Farnebo *et al.* wurde anhand von immunohistochemischen Analysen sowohl die nukleäre als auch die zytoplasmatische Survivin-Expression in präoperativ gewonnenen Biopsie-Präparaten von Kopf-Hals-Tumoren unterschiedlicher Lokalisationen bestimmt. Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer hohen nukleären Survivin-Expression und einem

längeren Gesamtüberleben sowie einem besseren Ansprechen der Tumoren auf Bestrahlung (Farnebo *et al.*; 2013). Vergleichbare Ergebnisse lieferte eine Arbeit von Freier *et al.*, bei der eine hohe Survivin-Expression in OSCC-Präparaten mit einem besseren Gesamtüberleben einherging. Während sich für einen Beobachtungszeitraum von 5 Jahren lediglich eine Tendenz in Richtung eines besseren Gesamtüberlebens zeigte, ließ sich bei einer Nachbeobachtungszeit von 10 Jahren ein signifikanter Zusammenhang darstellen. In der Subgruppe der Patienten, welche eine adjuvante Radiotherapie erhalten haben, war sowohl nach 5 als auch nach 10 Jahren ein signifikant besseres Gesamtüberleben bei Mundhöhlenkarzinomen mit hoher Survivin-Expression zu beobachten (Freier *et al.*; 2007). Analog konnte im Rahmen weiterer Studien auch für Tumoren anderer Lokalisationen, wie bspw. Magenkarzinome und Mammakarzinome, ein günstiger Einfluss einer hohen nukleären Survivin-Expression auf das Gesamtüberleben der untersuchten Patienten gezeigt werden (Okada *et al.*; 2001; Kennedy *et al.*; 2003).

Im Gegensatz zu den oben erwähnten Arbeiten verbinden manche Autoren eine hohe tumorale Survivin-Expression hingegen mit einer ungünstigen Prognose für die Patienten. So zeigten Lu *et al.* für Patienten mit einem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) einen signifikanten Zusammenhang zwischen einer hohen nukleären Survivin-Expression des Tumorgewebes und einem schlechten Gesamtüberleben (Lu *et al.*; 2004). Darüber hinaus scheint eine Expression von Survivin entscheidend zum Übergang von präkanzerösen Läsionen der Mundhöhle in invasive Mundhöhlenkarzinome beizutragen (Lo Muzio *et al.*; 2003). Diese Beobachtung wird durch eine Arbeit von Preuss *et al.* bekräftigt, in der wiederum ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer hohen nukleären Survivin-Expression in Präparaten von Mundhöhlenkarzinomen und einem schlechten Gesamtüberleben der zugehörigen Patienten hergestellt werden konnte (Preuss *et al.*; 2008). Wenngleich nicht signifikant, zeigt sich in einer Studie von Wemmert *et al.*, welche an HNSCC-Präparaten unterschiedlicher Lokalisationen durchgeführt wurde, eine tendenziell schlechtere Prognose von Patienten mit einer hohen nukleären Survivin-Expression im Vergleich zu solchen mit einer niedrigen nukleären Survivin-Expression, während die zytoplasmatische Survivin-Expression, wie bereits in anderen Arbeiten beschrieben, keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben nimmt (Wemmert *et al.*, 2016).

In der vorliegenden Arbeit wurden 98 HNSCC-Präparate sowohl hinsichtlich ihrer nukleären als auch ihrer zytoplasmatischen Survivin-Expression beurteilt. Insgesamt liegen bei 70 Tumoren eine starke nukleäre und bei 63 Tumoren eine starke zytoplasmatische Survivin-Expression vor. 44 Präparate zeichnen sich durch das gleichzeitige Vorliegen einer starken Survivin-Expression in beiden Zellkompartimenten aus. Im Gegensatz zu den oben angeführten Studien lässt sich für diese Arbeit weder für die nukleäre noch für die zytoplasmatische Survivin-Fraktion ein signifikanter Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben der Patienten des untersuchten Kollektivs feststellen

(siehe Abbildungen 29 und 31). Ab einer Nachbeobachtungszeit von ca. 28 Monaten entwickelt sich jedoch eine schwach ausgeprägte Tendenz in Richtung eines besseren Gesamtüberlebens von Tumoren mit einer hohen nukleären Survivinexpression im Vergleich zu solchen mit einer niedrigen nukleären Expression. In der Subgruppe der Larynxkarzinome ist die beschriebene Tendenz noch ausgeprägter, jedoch ebenfalls nicht statistisch signifikant. Interessanterweise zeigen Kopf-Hals-Tumore in frühen Stadien (T1 und T2) signifikant häufiger eine hohe nukleäre Survivinexpression als solche in fortgeschrittenen Stadien (T3 und T4) (siehe Abbildung 32).

Die breite Uneinstimmigkeit in Bezug auf die pathophysiologische Funktion von Survivin und seine Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf von Tumorpatienten bedarf zunächst einer Reevaluation methodischer Aspekte der genannten Studien. Es fällt auf, dass zur Auswertung von immunhistochemisch gefärbten Tumorpräparaten unterschiedliche Verfahren herangezogen wurden. Zum einen wurde nicht immer eine Differenzierung zwischen der nukleären und der zytoplasmatischen Survivin-Fraktion vorgenommen, zum anderen wurden Grenzwerte für schwache und starke Expressionen uneinheitlich definiert. Freier *et al.* haben beispielsweise einen willkürlich erstellten Score angewendet, welcher zwar sehr wohl zwischen einer nukleären und einer zytoplasmatischen Survivin-Expression unterscheidet, jedoch nur durch die kombinierte Betrachtung beider Fraktionen eine Einteilung in negative, schwache, moderate oder starke Expression vorzunehmen vermag. So wurde beispielsweise die Kombination aus einem Anteil von <50% Zellen mit hoher zytoplasmatischer und einem Anteil von <20% Zellen mit hoher nukleärer Survivin-Expression als „schwache Expression“ definiert (Freier *et al.*, 2007). Für die vorliegende Arbeit bedienten wir uns einer bereits von Wemmert *et al.* angewandten Herangehensweise, bei der durch die Analyse mehrerer repräsentativer Tumorareale insgesamt 100 Zellen desselben Präparats anhand ihrer Farbintensität evaluiert wurden. Auch hier wurden die nukleäre und die zytoplasmatische Survivin-Expression separat beurteilt. Von einer hohen Survivin-Expression wurde in dieser Arbeit ausgegangen, wenn die Summe aller Zellen mit moderat und stark gefärbten Zellkernen bzw. Zytoplasmen in einem Präparat mehr als 10% aller Zellen desselben Präparats ausmacht. Auf diese Weise wird auch eine getrennte statistische Analyse der beiden Survivin-Fraktionen ermöglicht. Gerade bei führend qualitativen Auswertungen ist es jedoch sinnvoll, einheitliche Scoring-Systeme zu etablieren, welche zu einer besseren Vergleichbarkeit der statistischen Ergebnisse beitragen.

Des Weiteren unterscheiden sich die Untersuchungskollektive der genannten Studien sowohl in Bezug auf die untersuchten Tumorentitäten als auch auf bestimmte patientenbezogene Charakteristika. In dieser Arbeit wurden Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle, des Oropharynx, des Hypopharynx und des Larynx betrachtet, während in einer ähnlichen Studie von Wemmert *et al.* zusätzlich Patienten mit einem Nasopharynxkarzinom eingeschlossen wurden. Lo Muzio *et al.* beschränkten sich für ihre Analysen dagegen lediglich auf Mundhöhlenkarzinome. Es muss zudem

kritisch angemerkt werden, dass in der vorliegenden Arbeit im Gegensatz zu anderen Studien keine Daten zu bereits erfolgten therapeutischen Maßnahmen (Radiatio, Chemotherapie u.a.) erhoben wurden. Wie bereits oben erwähnt, bestehen jedoch Hinweise, dass insbesondere Patienten mit einer hohen tumoralen Survivin-Expression von einer Radiatio profitieren könnten und so eine bessere Prognose aufweisen. Das neutrale Ergebnis hinsichtlich des Gesamtüberlebens in dieser Arbeit könnte so zumindest teilweise auf die Unkenntnis bestimmter Untergruppen des Kollektivs zurückzuführen sein.

Die Existenz verschiedener Splice-Varianten des Survivin-Moleküls erschwert das Verständnis seiner ohnehin sehr komplexen funktionellen Eigenschaften zusätzlich, zumal sich diese Varianten hinsichtlich ihrer antiapoptotischen Eigenschaften unterscheiden. Dies gilt insbesondere für survivin-2B, welches im Gegensatz zu anderen Isoformen wie bspw. survivin- Δ Ex3, seine antiapoptotische Funktion verliert und so als natürlicher Gegenspieler des Survivins agiert. Die Expression von survivin-2B nimmt bei Magenkarzinomen in fortgeschrittenen Stadien ab, was zu einem Überwiegen antiapoptotischer Eigenschaften anderer Splice-Varianten führen und letztlich die Tumorprogression begünstigen könnte (Krieg A *et al.*; 2002). Da die gängigen Survivin-Antikörper für immunhistochemische Untersuchungen nicht zwischen diesen Varianten unterscheiden können, lassen sich solche Zusammenhänge für die vorliegende Arbeit zwar nicht nachvollziehen, liefern jedoch eine mögliche Erklärung für scheinbar gegensätzliche Ergebnisse in diversen Studien. Insbesondere für die zytoplasmatische Survivin-Fraktion könnte im parallelen Vorhandensein verschiedener Splice-Varianten mit entgegengesetzten Funktionen eine Erklärung für fehlende statistische Korrelationen gesehen werden.

Schließlich muss neben der antiapoptotischen Wirkung von Survivin auch seine regulatorische Funktion auf die Zellteilung berücksichtigt werden. In der Tat sind sowohl die Synthese als auch der Abbau von Survivin zellzyklusabhängig. Die Transkription des Survivin-Proteins steigt während der G1-Phase um in der G2-M-Phase ihr Maximum zu erreichen. Die Regulation der Survivin-Expression ist jedoch noch weit komplexer, da sie durch zahlreiche weitere Signalwege und zelleigene Moleküle (z.B. NF κ B, p53 oder insulin-like-growth-factor I/mTOR) beeinflusst werden kann (Mita *et al.*; 2008). In der Literatur wird ein Modell beschrieben, laut dem Survivin eine zentrale Rolle in der Ausbildung des Spindelapparates einnehmen soll. Zum einen lässt sich Survivin in Verbindung mit polymerisiertem Tubulin nachweisen, welches für eine Regulation der Mikrotubuli-Dynamik spricht. Zum anderen vereint Survivin die Proteine des *chromosomal passenger complex* im Bereich des Kinetochors und stabilisiert dort die Mikrotubuli während der Mitose. Der *chromosomal passenger complex* selbst ist für eine korrekte Chromosomensegregation und Zytokinese verantwortlich (Altieri *et al.*; 2006; Mita *et al.*; 2008). Es scheint offensichtlich, dass pathogenetische Erklärungsmodelle,

welche ausschließlich auf die antiapoptotische Funktion von Survivin eingehen, zu kurz greifen und die Rolle von Survivin in der Tumorbilogie noch nicht vollständig aufgedeckt werden konnte. Es kann jedoch angenommen werden, dass eine hohe nukleäre Survivin-Expression für eine erhöhte Mitoserate und folglich Tumorprogression steht (Qi et al.; 2010).

Eine genaue Beurteilung der Relevanz von Survivin als prognostischer Marker bei HNSCCs setzt weitere Erkenntnisse hinsichtlich der biologischen Funktion des Survivin-Moleküls voraus. Zudem erscheint das Etablieren einer international einheitlichen Auswertungsmethode für immunhistochemische Untersuchungen sinnvoll.

5.4 Statistische Analyse von Subgruppen des Kollektivs

Wie bereits eingangs erwähnt, lässt sich die Pathogenese von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region weniger auf einen initialen fehlerhaften zellulären Signalweg zurückführen, sondern scheint auf der Kombination von unterschiedlichen Risikofaktoren und Treibermutationen zu beruhen, weshalb im Rahmen dieser Arbeit neben der Beurteilung einzelner Biomarker auch eine statistische Analyse verschiedener Subgruppen des Kollektivs vorgenommen wurde, mit dem Ziel, besonders günstige bzw. ungünstige Konstellationen zu identifizieren.

Wemmert *et al.* haben als erste Arbeitsgruppe eine kombinierte Betrachtung der Expression von Sec62 und Survivin in HNSCC-Präparaten vorgenommen und diese hinsichtlich der Prognose der Patienten untersucht. Hierbei stellte sich die Kombination aus einer hohen Sec62-Expression und einer hohen nukleären Survivin-Expression als prognostisch besonders ungünstig heraus. Die beste Prognose wiesen HNSCCs mit einer niedrigen Sec62- und nukleären Survivin-Expression auf. Allerdings waren die Unterschiede in den einzelnen Untergruppen nicht statistisch signifikant. Zudem war das Untersuchungskollektiv dieser Arbeit mit 35 Patienten vergleichsweise klein und schließt im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit auch Patienten mit Nasopharynxkarzinomen mit ein (Wemmert *et al.*, 2016). Uns interessierte die Frage, ob sich die von Wemmert *et al.* beschriebene Tendenz am größeren Kollektiv dieser Arbeit reproduzieren lässt. Auch hier zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Untergruppen. Es besteht jedoch eine Tendenz in Richtung eines schlechteren Gesamtüberlebens von Patienten mit einer Kombination aus einer hohen tumoralen Sec62-Expression und einer niedrigen nukleären Survivin-Expression. Trotz identischer Auswertungsmethoden zeigte sich demnach für Survivin ein entgegengesetzter Trend. Im Folgenden werden weitere Untergruppen des Kollektivs näher beleuchtet.

5.4.1 Betrachtung von Patienten mit unterschiedlicher Vitamin D-Versorgung

Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs leiden überdurchschnittlich oft an einem Vitamin D-Mangel, welcher über eine Störung der körpereigenen immunologischen Aktivität die Entstehung von HNSCCs begünstigt und sich zudem ungünstig auf die Prognose der Patienten auswirkt. In der Tat ist eine unzureichende Vitamin D-Versorgung bei diesen Patienten mit dem Vorliegen von Lymphknotenmetastasen und einem geringeren Gesamtüberleben assoziiert. Diese Erkenntnisse machen den Vitamin D-Status zu einem eigenständigen und vergleichbar einfach zu bestimmenden Biomarker, welcher zudem über eine Vitamin-D-Substitution kostengünstig behandelt werden kann. Auch in der vorliegenden Arbeit zeigten die Patienten mit einer Vitamin-D-Mangelsituation ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben als solche mit einer ausreichenden Vitamin D-Versorgung (siehe Abbildung 20).

In der Untergruppe der Patienten mit einem Vitamin D-Mangel zeichneten sich die Tumoren früherer Stadien im Vergleich zu solchen fortgeschrittenerer Stadien durch eine signifikant häufiger vorliegende hohe nukleäre Survivin-Expression aus. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass sich eine hohe nukleäre Survivin-Expression in dieser Gruppe tendenziell günstig auf die maligne Grunderkrankung auswirkt und dass ein Verlust dieses möglicherweise protektiven Einflusses mit einer Tumorprogression einhergeht. Dabei bleibt jedoch offen, welche Umstände zu diesem Verlust beitragen. Interessanterweise wird in einer Studie von Liu *et al.* ein Zusammenhang zwischen Vitamin D und Survivin bei Patienten mit einem Kolonkarzinom hergestellt. Die Autoren gehen davon aus, dass Vitamin D die Expression von Survivin herunterregulieren kann und so ein vermehrtes Ansprechen auf eine Behandlung mit 5-Fluoruracil (5-FU) ermöglicht (Liu *et al.*, 2010). Dieses Konzept setzt jedoch einen ungünstigen Einfluss von Survivin voraus, welcher vor allem auf eine ausgeprägte Chemoresistenz gegenüber 5-FU zurückzuführen sei. Wenngleich es sich hierbei um ein nachvollziehbares Konzept handelt, widerspricht dieses jedoch der oben geschilderten Hypothese aufgrund der unterschiedlichen Bewertung des Stellenwerts einer hohen Survivin-Expression. Nichtsdestotrotz ist auch bei HNSCCs eine Vitamin D-bedingte Regulierung der Survivin-Expression denkbar. Für die Subgruppe der Patienten mit einer ausreichenden Vitamin D-Versorgung war in unseren Untersuchungen eine hohe nukleäre Survivin-Expression mit einem tendenziell besseren Gesamtüberleben assoziiert. Es fällt auf, dass die Kopf-Hals-Tumoren in dieser Gruppe zudem mehrheitlich einen positiven HPV-Status zeigen (siehe Abbildung 41). Bochen *et al.* belegten, dass HPV-positive HNSCCs höhere Vitamin D-Spiegel und bessere Überlebensraten als HPV-negative HNSCCs aufweisen (Bochen *et al.*, 2018). Durch Untersuchungen an Präkanzerosen und invasiven Karzinomen der Zervix wurde bereits früh ein Zusammenhang zwischen einer HPV-Infektion und einer hohen Survivin-Expression postuliert.

In der Tat weisen Zellen mit morphologischen Hinweisen auf eine HPV-Infektion häufiger eine hohe

Survivin-Expression auf. Es wird demnach angenommen, dass das HP-Virus durch Beeinflussung der Survivin-Expression und folglich Dysregulierung des programmierten Zelltods eine normale Entwicklung der zervikalen Mukosa verhindert und somit entscheidend an der Entstehung von Zervixkarzinomen beteiligt ist (Frost *et al.*; 2002). Da auch Oropharynxkarzinome häufig einen positiven HPV-Status aufweisen, ist hier eine analoge Pathogenese denkbar. Interessanterweise zeichnen sich HPV-positive HNSCCs durch eine bessere Prognose als solche mit negativem HPV-Status aus, wobei der Grund für diese Beobachtung noch aufgedeckt werden muss. Auch in dieser Arbeit erreichte dieser Zusammenhang annähernd Signifikanz ($p = 0,055$; siehe Abbildung 17).

Bei Vorliegen einer Vitamin D-Mangelsituation ließ sich in der vorliegenden Arbeit eine Tendenz in Richtung eines besseren Gesamtüberlebens von Patienten mit einer hohen zytoplasmatischen Survivin-Expression erahnen. Aufgrund der fehlenden statistischen Signifikanz und eines relativ kurzen Nachbeobachtungszeitraums von etwa 55 Monaten sollte man diesem scheinbaren Zusammenhang jedoch mit Vorsicht begegnen.

Neben Survivin wurden beide Untergruppen auch hinsichtlich der tumoralen Sec62-Expression untersucht. Wie für das gesamte Kollektiv beschrieben, zeigen Patienten mit einer hohen tumoralen Sec62-Expression ein schlechteres Gesamtüberleben, bemerkenswerterweise lässt sich jedoch für beide Untergruppen keine statistische Signifikanz erzielen. Während in der Gruppe der Patienten mit einem Vitamin D-Mangel die Überlebenskurve für Sec62-high-Tumore stets unter derjenigen von Sec62-low-Tumoren lag, trennten sich die Kurven bei Patienten mit ausreichender Vitamin D-Versorgung erst nach einigen Monaten. Insbesondere ab einer Nachbeobachtungszeit von ca. 25 Monaten verschlechterte sich die Prognose der Sec62-high-Tumore in letztgenannter Gruppe erheblich (siehe Abbildungen 34 und 38). Der hohe Vitamin D-Status scheint demnach für eine Zeit von wenigen Monaten den negativen Einfluss einer Sec62-Überexpression der Malignome zu kompensieren.

5.4.2 Betrachtung von Patienten mit unterschiedlicher tumoraler Sec62-Expression

In der Subgruppe der Patienten mit niedriger tumoraler Sec62-Expression lag in dieser Arbeit signifikant häufiger eine ausreichende Vitamin D-Versorgung in der Fraktion der HPV-positiven Malignome vor. Der in der Literatur beschriebene prognostisch günstige Einfluss einer HPV-induzierten Pathogenese könnte demnach zumindest teilweise auf einer Wechselwirkung mit dem hinreichend vorhandenen Vitamin D beruhen. Denkbar wäre zum Beispiel eine Funktion von Vitamin D als Transkriptionsfaktor bestimmter zellulärer oder viraler Proteine. Bei Kopf-Hals-Tumoren mit niedriger Sec62-Expression könnte HP-Viren eine größere Rolle in der Tumorgenese zukommen als bei anderen Risikokonstellationen.

Lediglich drei Malignome mit niedriger Sec62-Expression wurden dem Stadium N3 zugeordnet. Während diese allesamt eine niedrige zytoplasmatische Survivin-Expression aufwiesen, zeichneten sich in der Fraktion der N0 bis N2-Tumore (n=33) 69,7% der Plattenepithelkarzinome durch eine hohe zytoplasmatische Survivin-Expression aus. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen erreichte statistische Signifikanz, welche jedoch aufgrund der kleinen Fallzahl in der Gruppe der N3-Tumore nur von untergeordneter Bedeutung ist. Ein Einfluss einer hohen zytoplasmatischen Survivin-Expression auf das Migrationsverhalten von Tumorzellen kann hierdurch nicht postuliert werden. Das Konzept ist jedoch nicht abwegig, da die Zellbewegung unter anderem mithilfe von Mikrotubuli stattfindet, welche zu einer Interaktion mit Survivin befähigt sind.

Plattenepithelkarzinome mit einer hohen Sec62-Expression zeigten in früheren Tumorstadien häufiger eine hohe nukleäre Survivin-Expression (siehe Abbildungen 44 und 45). Dies könnte auf einen protektiven Einfluss des nukleären Survivins in dieser Untergruppe hindeuten. Lag ein Vitamin D-Mangel bei Sec62-*low*-Patienten vor, so zeichneten sich die entsprechenden Tumore häufiger durch eine hohe nukleäre Survivin-Expression aus als es bei Patienten mit einer ausreichenden Vitamin D-Versorgung der Fall war (siehe Abbildung 46). Diese Beobachtung ist insofern interessant, da dies für die oben erwähnte These von Liu *et al.* sprechen könnte, welche eine Herunterregulierung von Survivin durch Vitamin D postuliert (Liu *et al.*, 2010).

5.4.3 Betrachtung von Patienten mit unterschiedlicher tumoraler Survivin-Expression der Zellkerne

Bei der Betrachtung von Kopf-Hals-Tumoren mit einer niedrigen nukleären Survivin-Expression zeigte sich ab einer Nachbeobachtungszeit von ca. 25 Monaten ein tendenziell besseres Gesamtüberleben von Patienten mit Sec62-negativen Tumoren im Vergleich zu solchen mit Sec62-positiven Tumoren (siehe Abbildung 47). Das Gesamtüberleben der Patienten mit einer hohen tumoralem Sec62-Expression sinkt dabei drastisch innerhalb weniger Monate. In der Gruppe der Patienten mit einer hohen nukleären Survivin-Expression verlaufen die Überlebenskurven dagegen weitgehend parallel zueinander mit einer weiterhin tendenziell schlechteren Prognose der Sec62-positiven Tumore (siehe Abbildung 50). Das Gesamtüberleben sinkt in dieser Untergruppe jedoch deutlich langsamer ab als in der Gruppe der Tumore mit niedriger nukleärer Survivin-Expression. Wenngleich es sich nicht um statistisch signifikante Zusammenhänge handelt, ist dennoch ein dämpfender Einfluss einer hohen nukleären Survivin-Expression auf die tumorbiologische Wirkung von Sec62 denkbar, welche die Prognose der Patienten zumindest kurzfristig verbessert. Es wäre zu begrüßen, wenn eine solche Interaktion auf molekularer Ebene bestätigt würde, wozu weitere Untersuchungen und in vitro Experimente erforderlich sind. In der Subgruppe der Tumore mit niedriger nukleärer Survivin-Expression zeigten T4-Tumore signifikant häufiger eine hohe Sec62-Expression als solche früherer Tumorstadien (T1-T3; siehe Abbildung 48).

Eine hohe Sec62-Expression ist demnach auch in dieser Untergruppe mit einer erhöhten Invasivität und folglich einem aggressiveren Phänotyp der Kopf-Hals-Tumore assoziiert. Hinzu kommt eine Vitamin D-Unterversorgung der Patienten mit T4-Tumoren, welche die bereits beschriebenen positiven Einflüsse einer ausreichenden Vitamin D-Versorgung auf die Tumorabwehr unterstreicht (siehe Abbildung 49).

5.4.4 Betrachtung von Patienten mit unterschiedlicher tumoraler Survivin-Expression des Zytoplasmas

Bei isolierter Betrachtung der Kopf-Hals-Tumore mit hoher zytoplasmatischer Survivin-Expression ließ sich ein schlechteres Gesamtüberleben von Tumoren mit hoher Sec62-Expression feststellen. Besonders rasch sinkt das Gesamtüberleben ab einer Nachbeobachtungszeit von etwa 20 Monaten. Nahezu alle Tumoren dieser Untergruppe weisen im Stadium T4 eine hohe Sec62-Expression auf. Zudem überwiegen auch bei den Tumoren mit hoher zytoplasmatischer Survivin-Expression solche mit einem negativen HPV-Status und einer gleichzeitig starken Sec62-Expression. Der negative prognostische Einfluss von Sec62 kommt demnach unabhängig von der hohen zytoplasmatischen Survivin-Expression zum Tragen. Dies entspricht bisherigen Annahmen, wonach die zytoplasmatische Survivin-Expression keinen messbaren Einfluss auf die Prognose bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren nimmt.

5.5 Kritische Beurteilung des Patientenkollektivs und der Methodik für molekularbiologische Analysen

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde das Vollblut von HNSCC-Patienten hinsichtlich der Expression selektierter miRNAs untersucht. Als Kontrollen für die Analysen diente Vollblut von gesunden Probanden ($n = 8$), welche im Anschluss an eine ausführliche Aufklärung freiwillig eine Blutspende für dieses Projekt zur Verfügung gestellt haben. Dabei galten solche Probanden als gesund, welche wissentlich zum Zeitpunkt der Blutentnahme weder an einer akuten noch an einer chronischen Erkrankung litten und bei denen in der Vergangenheit keine Tumorerkrankung festgestellt wurde. In der Tat scheinen diverse Pathologien, wie bspw. ein Diabetes mellitus Typ 2 oder rheumatische Erkrankungen und bestimmte Risikofaktoren wie Adipositas das miRNOME zu beeinflussen. Für wissenschaftliche Untersuchungen freigegebene Vollblutproben von HNSCC-Patienten stellen ein rares Gut dar. Als Basis für die Patientenselektion diente das Kollektiv für die durchgeführten immunhistochemischen Analysen (Hauptkollektiv). Von den insgesamt 98 HNSCC-Patienten dieses Untersuchungskollektivs standen lediglich für 29 dieser Patienten Vollblutproben zur Verfügung, welche den angestrebten molekularbiologischen Analysen unterzogen werden konnten. Das Durchschnittsalter des Blutproben-Kollektivs lag bei 67 Jahren, die Geschlechterverteilung war nahezu identisch mit derjenigen des Hauptkollektivs. Auch hinsichtlich der Parameter TNM-Stadium, Grading und HPV-Status bestehen ähnliche Verhältnisse in beiden Kollektiven. Sie unterscheiden sich jedoch in Bezug auf den Vitamin D-Status der Patienten: im Hauptkollektiv befinden sich genau so viele Patienten mit einer ausreichenden Vitamin D-Versorgung ($n = 49$) als solche mit einem Vitamin D-Mangel ($n = 49$). Im Blutprobenkollektiv weisen lediglich 9 der 29 Patienten einen Vitamin D-Mangel auf.

Dieser Unterschied könnte einen entscheidenden Einfluss auf das miRNA-Expressionsmuster nehmen. Weiterhin bestehen Unterschiede hinsichtlich der Lokalisation der Plattenepithelkarzinome innerhalb der Kopf-Hals-Region. Hypopharynxkarzinome kommen im Blutprobenkollektiv nicht vor. Die größte Fraktion stellen Oropharynxkarzinome dar ($n = 10$), welche allerdings nur knapp vor den Mundhöhlenkarzinomen ($n = 9$) liegen, die wiederum im Hauptkollektiv die Mehrheit bilden. Während Larynxkarzinome zusammen mit den Oropharynxkarzinomen im Hauptkollektiv mit jeweils 23 Malignomen die zweithäufigste Fraktion bilden, sind diese im Blutprobenkollektiv mit 5 Tumoren vergleichsweise seltener vertreten. Letztlich sind die beschriebenen Unterschiede auf die begrenzte Verfügbarkeit von Vollblutproben zurückzuführen. Kritisch anzumerken ist, dass die Kontrollen und HNSCC-Blutproben nicht alters- oder geschlechtsgepaart werden konnten, zumal das durchschnittliche Erkrankungsalter für Kopf-Hals-Tumoren hoch ist und sich in dieser Altersgruppe nur selten vollkommen gesunde Menschen ohne Grunderkrankungen oder Risikofaktoren finden.

Die quantitative, fluoreszenzbasierte *real-time*-PCR stellt den methodischen Goldstandard für molekularbiologische Untersuchungen dar. Sie ermöglicht den Nachweis und die Quantifizierung kleinster Mengen von Nukleinsäuren aus diversen biologischen Materialien in vergleichsweise kurzer Zeit und mit hoher Sensitivität und Spezifität. Es ist somit nicht verwunderlich, dass sich diese Labormethode in der Biowissenschaft großer Beliebtheit erfreut. Trotz ihres breiten Einsatzes besteht jedoch in der Literatur kein Konsens darüber, wie man RT-qPCR-Experimente bestmöglich durchführt und auswertet. Ungenauigkeiten in Nomenklatur, Beschreibung des methodischen Vorgehens und statistischer Auswertung verhindern nicht selten ein umfassendes Verständnis oder gar eine kritische Evaluierung der beschriebenen Zusammenhänge (Bustin *et al.*, 2009).

Bei der Auswertung von RT-qPCR-Ergebnissen muss beachtet werden, dass es sich in den meisten Fällen nicht um absolute, sondern um relative Daten handelt. Aus diesem Grund werden die erhaltenen Werte in der Literatur oft in Relation zur Expression sog. Referenzgene („*housekeeping genes*“) gesetzt, von denen man annimmt, dass sie unabhängig von äußeren Einflüssen stets in gleichem Maße exprimiert werden.

Für diese Arbeit wurde miR-16 als Referenzgen ausgewählt, welches in gesundem und in Tumorgewebe gleichermaßen exprimiert wird (siehe *Material und Methoden*, Abbildung 10). Es ist jedoch sinnvoll, infrage kommende Referenzgene im Hinblick auf die eigene Fragestellung und die eingesetzte Methodik stets neu zu evaluieren und ihre Expression zu prüfen anstatt scheinbar bewährte Referenzgene blind zu übernehmen. Dies gilt umso mehr als Untersuchungen an Vollblut bisher nur selten durchgeführt wurden.

Im Anschluss an die miRNA-Isolierung erfolgte eine Quantifizierung dieser mittels Spektrophotometer (NanoDrop; Thermo Scientific). Dieser Schritt ist essenziell, damit im Folgenden gleiche Mengen an miRNA verglichen werden. Kritisch anzumerken ist, dass für die vorliegende Arbeit keine Beurteilung einer möglichen DNA-Kontamination der Probe erfolgte.

5.6 Stellenwert von miR-101 bei Krebserkrankungen

Studien der letzten Jahre interessierten sich zunehmend für sog. *long-non-coding RNAs* (LncRNA), welche bei vielen Tumoren überexprimiert werden und direkt mit miRNAs interagieren können. So zeigt sich beispielsweise für Blasenkarzinome eine Überexpression der LncRNA SPRY4-IT1, welche insbesondere mit dem Vorliegen von Lymphknoten- und Fernmetastasen assoziiert ist. Ein *knockdown* von SPRY4-IT1 führte zu einer Hemmung der Zellproliferation, Zellmigration und Invasion sowie zu einer erhöhten Apoptoserate. Interessanterweise konnte für bestimmte Zelllinien (UMUC3 und T24T) gezeigt werden, dass SPRY4-IT1 die Expression von miR-101-3p herunterreguliert. MiR-101-3p wiederum vermag die Expression des Onkogens EZH2 auf posttranskriptionaler Ebene zu inhibieren. Unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse ergibt sich demnach folgendes Modell: das Tumorsuppressorgen miR-101-3p inhibiert die Expression des Onkogens EZH2. SPRY4-IT1 hemmt wiederum die Expression von miR-101-3p und reguliert somit auf positive Weise die EZH2-Expression (Liu *et al.*; 2017). Für Mundhöhlenkarzinome konnte mit RC3H2 eine weitere LncRNA identifiziert werden, welche analog zu SPRY4-IT1 mit miR-101-3p interagiert und ebenfalls auf indirekte Weise die Expression von EZH2 hochreguliert (Wu *et al.*, 2020).

Untersuchungen an Leberkrebszellen zeigen, dass miR-101 dort im Vergleich zum umliegenden gesunden Lebergewebe erniedrigt exprimiert vorliegt. Eine miR-101-Überexpression führte zu einer Hemmung von DNA-Replikation und Zellteilung bei Leberzellen (Meng *et al.*, 2020). Auch in Tumorgewebe und Zelllinien von nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen wird miR-101 erniedrigt exprimiert (Han *et al.*; 2018). Diese Erkenntnisse stehen im Einklang mit der These, dass es sich bei miR-101 um ein Tumorsuppressorgen handelt. In der vorliegenden Arbeit konnte keine veränderte miR-101-Expression im Blut von HNSCC-Patienten im Vergleich zu dem gesunder Probanden (Kontrollen) nachgewiesen werden. Allerdings wiesen HNSCC-Patienten, bei denen Fernmetastasen vorliegen, eine signifikant niedrigere miR-101-3p-Expression als solche mit einer M0-Situation auf (siehe Abbildung 58). Folglich ist anzunehmen, dass miR-101-3p unter Berücksichtigung der in der Literatur beschriebenen Signalwege eine zentrale Rolle als Tumorsuppressorgen in der Pathogenese

von HNSCCs spielt. Es wäre interessant zu überprüfen, ob sich der beschriebene Zusammenhang zwischen einer erniedrigten miR-101-Expression und dem Vorliegen von Fernmetastasen an einem größeren Kollektiv bestätigen lässt. Es gilt zu beachten, dass in der folgenden Arbeit, anders als für die oben erwähnten Studien, die miR-Expression im Blut und nicht im Gewebe bestimmt wurde, sodass sich die Ergebnisse nicht eins-zu-eins übertragen lassen.

In der vorliegenden Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen der Expression von zirkulierendem miR-101 und der immunhistochemisch bestimmten tumoralen Survivin- bzw. Sec62-Expression festgestellt werden, obwohl laut den Angaben der konsultierten Datenbanken sowohl *BIRC5* als auch *SEC62* aufgrund bestimmter Sequenzen als mögliche Zielgene infrage kämen. In der Literatur gibt es jedoch erste Hinweise auf eine miR-101/Survivin-Achse, welche bei bestimmten Malignomen zur Tumorgenese bzw. Resistenzentwicklung gegen bestimmte Medikamente beitragen könnte. So konnten Abdi *et al.* zeigen, dass die Chemoresistenz bei multiplen Myelomen u.a. mit einer verstärkten Survivin-Expression und einer Herunterregulierung von miR-101 assoziiert ist, wobei auch in diesem Modell miR-101 als Tumorsuppressor fungiert (Abdi *et al.*, 2019). Auch bei Nasopharynxkarzinomen scheint eine Verbindung zwischen miR-101 und Survivin zu bestehen (Wu *et al.*, 2018). Es wäre wünschenswert, dass dieser Zusammenhang im Rahmen zukünftiger Studien näher untersucht wird, da auf diesem Wege neue Erkenntnisse bezüglich der Funktion von Survivin gewonnen werden könnten, welche die widersprüchlichen Erkenntnisse in der Literatur überbrücken könnten. Des Weiteren könnten sich neue molekulare *targets* für zielgerichtete Therapien ergeben.

5.7 Stellenwert von miR-218 bei Krebserkrankungen

Bei einer Vielzahl von Tumorentitäten (HNSCCs, Magenkarzinome, NSCLCs u.a.) lässt sich eine verminderte miR-218-Expression nachweisen, welche einen prognostisch ungünstigen Faktor darstellt. In einer Arbeit von Liu *et al.* wurde die Expression von miR-218 in gesundem Gewebe, präkanzerösem Gewebe, Tumorgewebe und Plasma von Patientinnen mit einem Zervixkarzinom bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die miR-218-Expression sowohl in intraepithelialen Neoplasien Grad 2-3 (*high-grade-squamous intraepithelial lesions*, HSIL), als auch in Zervixkarzinomen und sogar im Plasma herunterreguliert ist und dass ferner eine niedrige miR-218-Expression mit einem aggressiveren Tumorphänotyp assoziiert ist (Liu *et al.*, 2020). Es liegen Hinweise vor, dass miR-218 die Progression von bestimmten Tumorerkrankungen wie hepatozellulären Karzinomen, Zervixkarzinomen oder Nasopharynxkarzinomen durch Inhibierung der Expression von *roundabout guidance receptor 1* (ROBO1) verhindert, also als Tumorsuppressor fungiert (Wang *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2020; Alajez *et al.*, 2011). Eine verminderte miR-218-Expression

im Serum von Patienten mit einem Prostatakarzinom wurde als Biomarker für das Vorliegen von Knochenmetastasen vorgeschlagen (Peng *et al.*, 2019).

In der vorliegenden Arbeit konnte für miR-218 nur bei insgesamt 5 HNSCC-Patienten und einer Kontrolle ein Signal in der qPCR detektiert werden. Um trotzdem eine statistische Auswertung vornehmen zu können, wurden alle negativen Proben mit einem maximalen Ct-Wert von 40 versehen. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen der miR-218-Expression von HNSCC-Patienten und derjenigen von gesunden Kontrollpatienten. Es stechen jedoch 4 Ausreißer ins Auge, welche interessanterweise 4 der insgesamt 5 positiven Patientenproben darstellen. Die Gegenüberstellung dieser Proben mit den Kontrollen zeigte nun eine signifikant höhere miR-218-Expression dieser selektierten HNSCC-Patienten. Uns interessierte die Frage, ob es bestimmte Patienteneigenschaften gibt, welche diesen Zusammenhang erklären könnten. Beim Vergleich von Patienten mit einem unterschiedlichen Vitamin D-Status fällt auf, dass von den 5 HNSCC-Patienten mit einem positiven qPCR-Signal insgesamt 4 eine ausreichende Vitamin D-Versorgung aufweisen und bei einem Patienten ein Vitamin D-Mangel vorliegt. Interessanterweise unterscheiden sich die 4 Patienten mit einer ausreichenden Vitamin D-Versorgung von demjenigen mit einem Vitamin D-Mangel durch eine um ein Vielfaches höhere miR-218-Expression. Aufgrund der geringen Fallzahlen lassen sich weder statistische Analysen durchführen noch allgemein gültige Zusammenhänge ableiten. Allerdings wäre es hochinteressant zu prüfen, ob sich diese Beobachtung an einem zahlenmäßig größeren Kollektiv reproduzieren lässt. Es ist nämlich durchaus denkbar, dass Vitamin D einen positiven Einfluss auf die Expression von miR-218 nimmt und somit die oben ausgeführte tumorsuppressive Funktion von miR-218 stabilisiert. Verstärkt wird diese These durch die Beobachtung, dass die Patienten mit einer hohen miR-218-Expression im Vergleich zu denjenigen ohne nachweisbare miR-218-Expression ein signifikant besseres Gesamtüberleben aufweisen (siehe Abbildung 65).

Die Ct-Werte entsprechen der Anzahl an PCR-Zyklen, bei der das Fluoreszenzsignal zum ersten Mal signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Je höher der Ct-Wert, umso weniger miRNA ist in der Probe enthalten und umso fehleranfälliger ist das Ergebnis. Die ermittelten Ct-Werte für miR-218 sind mit Werten um 30 Zyklen recht hoch, weshalb die beschriebenen Zusammenhänge lediglich eine Tendenz darstellen. Laut Herstellerangaben bleibt RNA in den PAXgene™ Blood RNA Tubes bei korrekter Lagerung für etwa 50 Monate stabil. Die verwendeten Blutproben entsprachen zwar allesamt diesen Kriterien, allerdings befanden sie sich zeitlich bereits recht nahe an der als kritisch angegebenen Lagerungszeit, weshalb eine geringfügige Degradierung der miRNA nicht auszuschließen ist. Nicht zuletzt aufgrund der geringen Anzahl an Proben mit einem positiven qPCR-Signal konnte kein Zusammenhang zwischen der Expression von zirkulierendem miR-218 und der immunhistochemisch bestimmten Survivin-Expression der Tumore nachgewiesen werden.

In der Literatur wird jedoch eine miR-218/Survivin-Achse beschrieben, welche neue Einblicke in funktionelle Eigenschaften des Survivin-Moleküls liefern könnte (Kogo *et al.*, 2015). Es wäre wünschenswert, dass sich zukünftige Studien mit größeren Kollektiven diesem Zusammenhang widmen.

5.8 Stellenwert von miR-203a und miR-455 bei Krebserkrankungen

In der vorliegenden Arbeit konnte weder für miR-203a noch für miR-455 ein Signal in der qPCR detektiert werden. MiR-203 spielt bei vielen malignen Erkrankungen eine Rolle als Tumorsuppressorgen. So liegt bei Ösophaguskarzinomen oftmals eine verminderte miR-203-Expression vor. Eine Überexpression von miR-203 hingegen führt zu verstärkter Apoptose und hemmt Zellproliferation, -invasion und -migration. Zong *et al.* gelang es, die Serin/Threonin-Kinase MAP3K1 als ein Zielprotein von miR-203 zu identifizieren, welche entscheidend in zellphysiologische Prozesse wie Proliferation und Migration eingreift und somit zur Entstehung diverser maligner Erkrankungen beiträgt (Zong *et al.*; 2020). In Analogie zu miR-203 fungiert auch miR-203a als Tumorsuppressorgen, welches beispielsweise bei kolorektalen Karzinomen herunterreguliert ist und somit nicht mehr hemmend auf die Expression des Ringfingerproteins 6 einwirkt. Letzteres greift über die Ubiquitinierung von diversen Zielmolekülen in Vorgänge wie die Zellproliferation ein und gilt als wichtiges Onkogen u.a. für die Entstehung von Adenokarzinomen der Lunge, Prostatakarzinomen oder Ösophaguskarzinomen (Miao *et al.*, 2020). Interessanterweise lieferte eine Arbeit von Chen *et al.* gegenteilige Ergebnisse: in dieser Studie war die Expression von miR-203a im Tumorgewebe höher als im umliegenden Gewebe und eine miR-203a-Überexpression begünstigte Zellproliferation, -invasion und -migration. Als Zielstruktur von miR-203a wurde hier PDE4D genannt (Chen *et al.*, 2018). Das miR-203a-Profil von HNSCCs wurde bisher nach bestem Wissen noch nicht untersucht. Weiterführende Untersuchungen könnten jedoch durchaus interessant sein, da auch *BIRC5* ein Zielgen von miR-203a darstellt. In der Tat vermag miR-203a durch Hemmung der Survivin-Expression die Apoptose bei Lungenkarzinomen zu induzieren (Yang *et al.*, 2020).

MiR-455 hemmt die Zellproliferation, indem es z.B. die Expression von CDK14 inhibiert. Bei Mammakarzinomen liegt miR-455 oft herunterreguliert vor, was zu einer erhöhten Proliferationsrate der Tumorzellen führt (Wang *et al.*, 2017). Bei kolorektalen Karzinomen ist eine niedrige miR-455-Expression mit einem schlechten Gesamtüberleben assoziiert. In diesem Fall stellt *GATA-binding protein 6* (GATA6) das entscheidende Ziel des Tumorsuppressors miR-455 dar (Yunqi *et al.*; 2019). Den Angaben der konsultierten Datenbanken zufolge kommt auch *SEC62* als Zielgen von miR-455 infrage. In der Literatur wird zum gegenwärtigen Zeitpunkt jedoch noch keine miR-455/*SEC62*-Achse beschrieben.

5.9 Schlussfolgerungen und Ausblick

Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region stellen auch nach jahrzehntelangen Forschungsbemühungen weiterhin eine herausfordernde Erkrankung dar, bei der trotz Einführung neuer Therapiekonzepte keine nennenswerte Verbesserung der 5-Jahresüberlebensrate erzielt werden konnte. Als Basis für Therapieentscheidungen gelten unverändert klinisch-pathologische Parameter wie das TNM-Stadium, welche jedoch keine befriedigende Aussage über die biologischen Eigenschaften des Tumors ermöglichen. Um dem Patienten eine möglichst individuelle und auf seine Erkrankung angepasste Therapieform anbieten zu können, sind weitere Erkenntnisse über die Tumorgenese erforderlich. Ziel muss es sein, biologische Marker zu identifizieren, welche eine Aussage hinsichtlich Prognose und Therapieansprechen ermöglichen. In der Literatur wird eine Vielzahl solcher potentieller Biomarker vorgestellt, welche auf unterschiedlichen Wegen an der Tumorentstehung beteiligt zu sein scheinen. Es wird deutlich, dass die Genese von HNSCCs einen multifaktoriellen Vorgang darstellt und dass es durchaus sinnvoll ist, verschiedene Risikofaktoren und Biomarker zusammen zu betrachten. Diese Arbeit stellt den Versuch einer solchen multifaktoriellen Analyse dar. Problematisch an einer solchen Herangehensweise ist jedoch, dass zwischen vielen der untersuchten Parameter keine offensichtlichen oder bisher entdeckten funktionellen Verbindungen bestehen und somit lediglich eine qualitative Beschreibung bestimmter Risikokonstellationen möglich ist. Eine Herausforderung stellen besonders die uneinheitlichen Sichtweisen auf den Stellenwert von Survivin als Prognosefaktor dar. Bei Betrachtung der jeweiligen Studien fallen besonders die unterschiedlichen methodischen Herangehensweisen und Auswertungstechniken auf, welche einen entscheidenden Einfluss auf diese Uneinstimmigkeit haben könnten. Zudem bleiben immunhistochemische Untersuchungen trotz der Bemühung um eine möglichst große Objektivität stets qualitative Analysen mit einem Untersucher-abhängigen Fehlerpotential. Die Untersuchung des Expressionsmusters von bestimmten miRNAs stellt einen neuartigen, vielversprechenden Ansatz dar. Bei qPCR-Analysen, wie sie auch im Rahmen dieser Arbeit zur Anwendung kamen, muss auf ein technisch korrektes und nachvollziehbares Arbeiten geachtet werden, am besten unter Verwendung von Richtlinien erfahrener Arbeitsgruppen. Die meisten Studien untersuchen die miR-Expression im Gewebe; die Untersuchung zirkulierender miRNAs ist jedoch mindestens genau so interessant, da sich mögliche Veränderungen des miRNA-Profiles vergleichbar einfach und wenig invasiv durch eine Blutentnahme detektieren lassen. Es wäre begrüßenswert, wenn durch groß angelegte multifaktorielle Studien ein besseres Verständnis der komplexen Tumorbiologie von HNSCCs ermöglicht würde, welches die Entwicklung neuartiger zielgerichteter Therapieformen erlaubt.

6. Literaturverzeichnis (alphabetisch geordnet)

Abbe R. Cancer of the mouth. *NY Med. J.* 1915; 102: 1-2.

Abdi J, Rastgoo N, Chen Y, Chen GA, Chang H. Ectopic expression of BIRC5-targeting miR-101-3p overcomes bone marrow stroma-mediated drug resistance in multiple myeloma cells. *BMC Cancer.* 2019; 19(1): 975.

Abou-Elhamd KE, Habib TN. The role of chromosomal aberrations in premalignant and malignant lesions in head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2008; 265: 203-207.

Alajez NM, Lenarduzzi M, Ito E, Hui AB, Shi W, Bruce J, Yue S, Huang SH, Xu W, Walsron J, et al. MiR-218 suppresses nasopharyngeal cancer progression through downregulation of survivin and the SLIT2-ROBO1 pathway. *Cancer Res.* 2011; 71: 2381-2391.

Alder NN, Shen Y, Brodsky JL, Hendershot LM, Johnson AE. The molecular mechanisms underlying BiP-mediated gating of the Sec61 translocon of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* 2005; 168: 389-399.

Altieri A, Bosetti C, Talamini R, Gallus S, Franceschi S, Levi F, Dal Maso L, Negri E, La Vecchia C. Cessation of smoking and drinking and the risk of laryngeal cancer. *Br J Cancer.* 2002; 87: 1227-1229.

Altieri DC. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. *Nat Rev Cancer.* 2008; 8: 61-70.

Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene.* 2003; 22: 8581-8589.

Altieri DC. The case for survivin as a regulator of microtubule dynamics and cell death decisions. *Curr Opin Cell Biol.* 2006; 18: 609-615.

Ambros V, Bartel B, Bateil DP, Burge CB, Carrinton JC, Chen X, Dreyfuss G, Eddy SR, Griffiths-Jones S, Marshall M, Matzke M, Ruvkun G, Tuschl T. A uniform system for microRNA annotation. *RNA.* 2003; 9: 277-279.

Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, *survivin*, expressed in cancer and lymphoma. *Nature Med.* 1997; 3: 917-921.

Apperly FL. The relation of solar radiation to cancer mortality in North America. *Cancer Res.* 1941; 1: 191-195.

Avissar M, Christensen BC, Kelsey KT, Marsit CJ. MicroRNA expression ratio is predictive of head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 2850-2855.

Ayres MD, Howard SC, Kuzio J, Lopez-Ferber M, Possee RD. The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology.* 1994; 202: 586-605.

Badran A, Yoshida A, Ishikawa K *et al.* Identification of a novel splice variant of the human anti-apoptosis gene *survivin*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 314: 902-907.

Banks DP, Plescia J, Altieri DC *et al.* *Survivin* does not inhibit caspase-3 activity. *Blood.* 2000; 96: 4002-4003.

Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. Pathology and genetics of head and neck tumors. World Health Organization Classification of Tumors. Lyon, France: IARC Press; 2005.

Bauer C, Brass N, Diesinger I, Kayser K, Grasser FA, Meese E. Overexpression of the eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G-1) in squamous cell lung carcinoma. *Int J Cancer.* 2002; 98: 181-185.

Berthelet J, Dubrez L. Regulation of Apoptosis by Inhibitors of Apoptosis (IAPs). *Cells.* 2013; 2: 163-187.

Betioli J, Villa LL, Sichero L. Impact of HPV infection on the development of head and neck cancer. *Braz J Med Biol Res.* 2013; 46: 217-226.

Birgisdottir AB, Lamark T, Johansen T. The LIR motif-crucial for selective autophagy. *J Cell Sci.* 2013; 126: 3237-3247.

Birnbaum MJ, Clem RJ, Miller LK. An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a peptide with Cys/His sequence motifs. *J Virol.* 1994; 68: 2521-2528.

Blobel G, Dobberstein B. Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J Cell Biol.* 1975; 67: 835-851.

Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg JB, Stemhagen A, Fraumeni JF. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res.* 1988; 48: 3282-3287.

Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol.* 2003; 6: 725-731.

Bochen F, Adisurya H, Wemmert S, Lerner C, Greiner M, Zimmermann R, Hasenfus A, Wagner M, Smola S, Pfuhl T, Bozzato A, Al Kadah B, Schick B, Linxweiler M. Effect of 3q oncogenes SEC62 and SOX2 on lymphatic metastasis and clinical outcome of head and neck squamous cell carcinomas. *Oncotarget.* 2017; 8: 4922-4934.

Bochen F, Balensiefer B, Körner S, Bittenbring JT, Neumann F, Koch A, Bumm K, Marx A, Wemmert S, Papaspyrou G, Zuschlag D, Kühn JP, Al Kadah B, Schick B, Linxweiler M. Vitamin D deficiency in head and neck cancer patients - prevalence, prognostic value and impact on immune function. *Oncoimmunology.* 2018; 7 (9).

Bockmühl U, Schwendel A, Dietel M, Petersen I: Distinct patterns of chromosomal alterations in high- and low-grade head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Res.* 1996; 56: 5325-5329.

Bohnsack MT, Czapinski K, Görlich D. Exportin 5 is a RANGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA.* 2004; 10: 185-191.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018; 68(6): 394-424.

Brodsky JL, Goeckeler J, Schekman R. BiP and Sec63p are required for both co- and posttranslational protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92: 9643-9646.

Broe KE, Chen TC, Weinberg J, Bischoff-Ferrari HA, Hollick MF, Kiel DP. A higher dose of vitamin d reduces the risk of falls in nursing home residents: a randomized, multiple-dose study. *J Am Geriatr Soc*. 2007; 55 (2): 234-239.

Bucur O, Nat R, Cretoiu D, Popescu LM. Phagocytosis of apoptotic cells by microglia in vitro. *J Cell Mol Med*. 2001; 5: 438-441.

Burri RJ, Lee NY. Concurrent chemotherapy and radiotherapy for head and neck cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2009; 9: 293-302.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009; 55(4): 611-22.

Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*. 2004; 10: 1957-1966.

Caldas H, Honsey LE, Altura RA. Survivin 2alpha: a novel Survivin splice variant expressed in human malignancies. *Mol Cancer*. 2005; 4: 11.

Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 857-866.

Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 15524-29.

Caraway NP, Khanna A, Dawlett M, Guo M, Guo N, Lin E, Katz RL. Gain of the 3q26 region in cervicovaginal liquid-based pap preparations is associated with squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2008; 110: 37-42.

Carmena M, Wheelock M, Funabiki H, Earnshaw WC. The Chromosomal Passenger Complex (CPC): From Easy Rider to the Godfather of Mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012; 13 (12): 789-803.

Cervigne NK, Reis PP, Machado J, Sadikovic B, Brandley G, Galloni NN, Pintilie M, Jurisica I, Perez-Ordonez B, Gilbert R, Gullane P, Irish J, Kamel-Reid S. Identification of a microRNA signature associated with progression of leukoplakia to oral carcinoma. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 4818-4829.

Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res.* 2005; 65: 6029-6033.

Chang SS, Jiang WW, Smith I, Poeta LM, Begum S, Glazer C, Shan S, Westra W, Sidransky D, Califano JA.

Chen L, Gao H, Liang J, Qiao J, Duan J, Shi H, Zhen T, Li H, Zhang F, Zhu Z, Han A. miR-203a-3p promotes colorectal cancer proliferation and migration by targeting PDE4D. *Am J Cancer Res.* 2018; 8(12):2387-2401.

Chujo M, Noguchi T, Miura T, Arinaga M, Uchida Y, Tagawa Y. Comparative genomic hybridization analysis detected frequent overrepresentation of chromosome 3q in squamous cell carcinoma of the lung. *Lung cancer.* 2002; 38: 23-29.

Clem RJ, Miller LK. Apoptosis reduces both the *in vitro* replication and the *in vivo* infectivity of a baculovirus. *J Virol.* 1993; 67: 3730-3738.

Comtesse N, Keller A, Diesinger I, Bauer C, Kayser K, Huwer H, Lenhof HP, Meese E. Frequent overexpression of the genes FXR1, CLAPM1 and EIF4G located on amplicon 3q26-27 in squamous cell carcinoma of the lung. *Int J Cancer.* 2007; 120: 2538-2544.

Crowley KS, Liao S, Worrell VE, Reinhart GD, Johnson AE. Secretory proteins move through the endoplasmic reticulum membrane via an aqueous, gated pore. *Cell.* 1994; 78: 461-471.

D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, Westra WH, Gillison ML. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med.* 2007; 356: 1944-1956.

Dawson-Hughes, Harris SS, Krall EA, Dallal GE. Effect of calcium and vitamin D supplementation on bone density in men and women 65 years of age or older. *N Engl J Med.* 1997; 337 (10): 670-676.

Degterev A, Boyce M, Yuan JY. A decade of caspases. *Oncogene.* 2003; 22: 8543-8567.

Denli AM, Tops BBJ, Plasterk RHA, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the microprocessor complex. *Nature.* 2004; 432: 231-235.

Deshaies RJ, Schekman R. Structural and functional dissection of Sec62p, a membrane-bound component of the yeast endoplasmic reticulum protein import machinery. *Mol Cell Biol.* 1990; 10: 6024-6035.

Deshaies RJ, Shekman R. SEC62 encodes a putative membrane protein required for protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* 1989; 109: 2653-2664.

Dohi T, Beltrami E, Wall NR, Plescia J, Altieri DC. Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. *J Clin Invest.* 2004; 114: 1117-1127.

Erdmann F, Schäuble N, Lang S, Jung M, Honigsmann A, Ahmad M et al. Interaction of calmodulin with Sec61 α limits Ca²⁺ leakage from the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 2011; 30: 17-31.

Esquela-Kerschner A, Slack FJ. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006; 6: 259-269.

Farnebo L, Tiefenböck K, Ansell A, Thunell LK, Garvin S and Roberg K: Strong expression of survivin is associated with positive response to radiotherapy and improved overall survival in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Int J Cancer* 2013; 133: 1994-2003.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer.* 2010; 127: 2893-2917.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int.J.Cancer.* 2015; 136 (5): E359-386.

Feskanich D, Ma J, Fuchs CS, Kirkner GJ, Hankinson SE, Hollis BW, Giovanucci E. Plasma vitamin D metabolites and risk of colorectal cancer in women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004; 13 (9): 1502-1508.

Fletcher AM, Heaford AC, Trask DK. Detection of metastatic head and neck squamous cell carcinoma using the relative expression of tissue-specific miR-205. *Transl Oncol* 2008; 1: 202-208.

Flourakis M, Van Coppenrolle F, Lehen'kyi V, Beck B, Skryma R. Passive calcium leak via translocon is a first step for iPLA2-pathway regulated store operated channels activation. *FASEB J.* 2006; 20: 1215-1217.

Freier K, Pungs S, Sticht C, Flechtenmacher C, Lichter P, Joos S and Hofele C: High survivin expression is associated with favorable outcome in advanced primary oral squamous cell carcinoma after radiation therapy. *Int J Cancer.* 2007; 120: 942-946.

Frost M, Jarboe EA, Orlicky D, Gianani R, Thompson LC, Enomoto T, Shroyer KR. Immunohistochemical Localization of Survivin in Benign Cervical Mucosa, Cervical Dysplasia and Invasive Squamous Cell Carcinoma. *Am J Clin Pathol.* 2002; 117: 738-744.

Fuchs Y, Steller H. Programmed cell death in animal development and disease. *Cell.* 2011; 147; 742-758.

Fukuda S, Pelus LM. Regulation of the inhibitor-of-apoptosis family member survivin in normal cord blood and bone marrow CD34(+) cells by hematopoietic growth factors: implication of survivin expression in normal hematopoiesis. *Blood.* 2001; 98: 2091-2100.

Fulda S. Tumor resistance to apoptosis. *Int J Cancer.* 2009; 124: 511-515.

Fumagalli F, Noack J, Bergmann TJ, Cebollero E, Pisoni GB, Fasana E et al. Translocon component Sec62 acts in endoplasmic reticulum turnover during stress recovery. 2016. *Nat Cell Biol.* 18: 1173-1184.

Garland CF, Garland FC, Gorham ED, Lipkin M, Newmark H, Mohr SB, Holick MF. The role of vitamin D in cancer prevention. *Am J Public Health.* 2006; 96 (2): 252-261.

Giovanucci E, Liu Y, Rimm EB, Hollis BW, Fuchs CS, Stampfer MJ, Willett WC. Prospective study of predictors of vitamin D status and cancer incidence and mortality in men. *J Natl Cancer Inst.* 2006; 98 (7): 451-459.

Giunti R, Gamberucci A, Fulceri R, Banhegyi G. Both translocon and a cation channel are involved in the passive Ca²⁺ leak from the endoplasmic reticulum: a mechanistic study on rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys.* 2007; 462: 115-121.

Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science.* 2004; 305: 626-629.

Gregory RI, Yan K, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R. The microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature.* 2004; 432: 235-240.

Greiner M, Kreutzer B, Jung V, Grobholz R, Hasenfus A, Stöhr RF, Tornillo L, Dudek J, Stöckle M, Unteregger G, Kamradt J, Wullich B, Zimmermann R. Silencing of the SEC62 gene inhibits migratory and invasive potential of various tumor cells. *Int J Cancer.* 2011; 128: 2284-2295.

Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. MiRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res.* 2006; 34: 140-144.

Guerriero CJ, Brodsky JL. The delicate balance between secreted protein folding and endoplasmic reticulum-associated degradation in human physiology. *Physiol Rev.* 2012; 92: 537-576.

Guicciardi ME, Gores GJ. Life and death by death receptors. *FASEB J.* 2009; 23: 1625-1637.

Hacker G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.* 2000; 301: 5-17.

Han J, Lee Y, Yeom K, Kim Y, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* 2004; 18: 3016-3027.

Han L, Chen W, Xia Y, Song Y, Zhao Z, Cheng H, Jiang T. MiR-101 inhibits the proliferation and metastasis of lung cancer by targeting zinc finger E-box binding homebox 1. *Am J Transl Res.* 2018; 10(4): 1172-1183.

Hansen W, Garcia PD, Walter P. In vitro protein translocation across the yeast endoplasmic reticulum: ATP-dependent posttranslational translocation of the prepro- α -factor. *Cell*. 1986; 45: 397-406.

Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, Dal Maso L, Daudt AW, Fabianovan E, Wünsch-Filho V, Franceschi S, Hayes RB, Herrero R, Koifman S, La Vecchia C, Lazarus P, Levi F, Mates D, Matos E, Menezes A, Muscat J, Eluf-Neto J, Olshan AF, Rudnai P, Schwartz SM, Smith E, Sturgis EM, Szeszenia-Dabrowska N, Talamini R, Wei Q, Winn DM, Zaridze D, Zatonski W, Zhang ZF, Berthiller J, Boffetta P. 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. *J Natl Cancer Inst*. 2007; 99: 777-789.

Hay BA, Wassarman DA, Rubin GM. Drosophila Homologs of Baculovirus Inhibitor of Apoptosis Proteins Function to Block Cell Death. *Cell*. 1995; 83: 1253-1262.

He H, Jazdzewski K, Li W, Liyanarachchi S, Nagy R, Volinia S, Calin GA, Liu CG, Franssila K, Suster S, Kloos RT, Croce CM, de la Chapelle A. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad USA*. 2005; 102: 19075-19080.

Heinrich PC, Müller M, Graeve L. Löffler-Petrides: Biochemie und Pathobiochemie: 9. Auflage. 2014. Springer Medizin Verlag, Heidelberg.

Heneghan HM, Miller N, Lowery AJ, Sweeney KJ, Newell J, Kerin MJ. Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer. *Ann Surg* 2010; 251: 499-505.

Huang JB, Kindzelskii AL, Clark AJ, Petty HR. Identification of channels promoting calcium spikes and waves in HT1080 tumor cells: their apparent roles in cell motility and invasion. *Cancer Res*. 2004; 64: 2482-2489.

Huppi K, Volfovsky N, Mackiewicz M et al. MicroRNAs and genomic instability. *Semin Cancer Biol* 2007; 17: 65-73.

Hutvágner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme dicer in the maturation of *the let-7d* small temporal RNA. *Science*. 2001; 293: 834-838.

Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*. 2002; 297: 2056-2060.

Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Ménard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Querzoli P, Negrini M, Croce CM. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*. 2005; 65: 7065-7700.

Jung V, Kindich R, Kamradt J, Jung M, Müller M, Schulz WA, Engers R, Unteregger G, Stöckle M, Zimmermann R, Wullich B: Genomic and expression analysis of the 3q25-26 amplification unit reveals TLOC1/SEC62 as a probable target gene in prostate cancer. *Mol Cancer Res*. 2006, 4: 169-176.

Kennedy SM, O'Driscoll L, Purcell R, Fitz-Simons N, McDermott EW, Hill A D, O'Higgins NJ, Parkinson M, Linehan R and Clynes M: Prognostic importance of survivin in breast cancer. *Br J Cancer*. 2003; 88: 1077-1083.

Ketting RF, Fischer SEJ, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RHA. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev*. 2001; 15: 2654-2659.

Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*. 2003; 115: 209-216.

Kimura S, Naganuma S, Susuki D, Hiromo Y, Yamaguchi A, Fujieda S, Sano K, Itoh H. Expression of microRNAs in squamous cell carcinoma of human head and neck and the esophagus: miR-205 and miR-21 are specific markers in HNSCC and ESCC. *Oncol Rep* 2010; 23: 1625-1633.

Knight SW, Bass BL. A role for the RNase III enzyme *DCR-1* in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001; 293: 2269-2271.

Kogo R, How C, Chaudary N, Bruce J, Shi W, Hill RP, Zahedi P, Yip KW, Liu FF. The microRNA-218~Survivin axis regulates migration, invasion and lymph node metastasis in cervical cancer. *Oncotarget*. 2015; 6(2): 1090-1100.

Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Hagiwara K, Takeshita F, Ochiya T. Competitive interactions of cancer cells and normal cells via secretory microRNAs. *J Biol Chem* 2012; 287: 1397-1405.

Kreimer AR, Gary MC, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005; 14: 467-75.

Krieg A, Mahotka C, Krieg T, Grabsch H, Müller W, Takeno S, Suschek CV, Heydthausen M, Gabbert HE, Gerharz CD. Expression of different survivin variants in gastric carcinomas: first clues to a role of survivin-2B in tumor progression. *British Journal of Cancer.* 2002; 86: 737-743.

Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C: Mitochondrial membrane permeabilisation in cell death. *Physiol Rev.* 2007; 87: 99-163.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschli T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science.* 2001; 294: 853-858.

Lakkaraju AK, Thankappan R, Mary C, Garrison JL, Taunton J, Strub K. Efficient secretion of small proteins in mammalian cells relies on Sec62-dependent posttranslational translocation. *Mol Biol Cell.* 2012; 23: 2712-2722.

Lang S, Benedix J, Fedeles SV, Schorr S, Schirra C, Schäuble N et al. Different effects of Sec61 α , Sec62 and Sec63 depletion on transport of polypeptides into the endoplasmic reticulum of mammalian cells. *J Cell Sci.* 2012; 125: 1958-1969.

Lang S, Erdmann F, Jung M, Wagner R, Cavaliè A, Zimmermann R. Sec61 complexes form ubiquitous ER Ca²⁺ leak channels. *Channels.* 2011; 5: 228-235.

Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science.* 2001; 294: 862-864.

Lee RC, Feinbaum, RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993; 75: 843-854.

Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Provost P, Rådmark O, Kim S, Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003; 425: 415-419.

Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 2004; 23: 4051-4060.

Leemans CR, Braakhuis BJM, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nature Reviews. Cancer*. 2011; 11 (1): 9-22.

Leemans CR, Snijders PJF, Brakenhoff RH. The molecular landscape of head and neck cancer. *Nature reviews. Cancer*. 2018; 18 (5): 269-282.

Lens SM, Vader G, Medema RH. The case for Survivin as mitotic regulator. *Curr Opin Cell Biol*. 2006; 18: 616-622.

Lerner C, Wemmert S, Bochen F, Kulas P, Linxweiler M, Hasenfus A, Heinzelmann J, Leidinger P, Backes C, Meese E, Urbchat S, Schick B. 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. *J Cancer Res Clin Oncol* 2016; 142: 757-766.

Li F, Yang J, Ramnath N, Javle MM, Tran D. Nuclear or cytoplasmic expression of survivin: What is the significance? *Int J Cancer* 2005; 114: 509-512.

Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*. 2008; 27: 6194-6206.

Linxweiler M, Bochen F, Schick B, Wemmert S, Al Kadah B, Greiner M et al. Identification of SEC62 as a potential marker for 3q amplification and cellular migration in dysplastic cervical lesions. *BMC Cancer*. 2016; 16: 676.

Linxweiler M, Linxweiler J, Barth M, Benedix J, Jung V, Kim YJ et al. Sec62 bridges the gap from 3q amplification to molecular cell biology in non-small cell lung cancer. *Am J Pathol*. 2012; 180: 473-483.

Linxweiler M, Schick B, Zimmermann R. Let's talk about Secs: Sec61, Sec62 and Sec63 in signal transduction, oncology and personalized medicine. *Signal Transduct Target Ther*. 2017; 2: 17002.

Linxweiler M, Schorr S, Schäuble N, Jung M, Linxweiler J, Langer F et al. 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*. 2013; 13: 574.

Liu CJ, Kao SY, Tu HF, Tsai MM, Chang KW, Lin SC. Increase of microRNA miR-31 level in plasma could be a potential marker of oral cancer. *Oral Dis* 2010; 16: 360-364.

Liu D, Li Y, Luo G, Xiao X, Tao D, Wu X, Wang M, Huang C, Wang L, Zeng F, Jiang G. LncRNA SPRY4-IT1 sponges miR-101-3p to promote proliferation and metastasis of bladder cancer cells through up-regulating EZH2. *Cancer Lett*. 2017; 388: 281-291.

Liu G, Hu X, Chakrabarty S. Vitamin D mediates its action in human colon carcinoma cells in a calcium-sensing receptor-dependent manner: downregulates malignant cell behavior and the expression of thymidylate synthase and survivin and promotes cellular sensitivity to 5-FU. *International Journal of Cancer*. 2010; 126: 631-639.

Liu Z, Mao L, Wang L, Zhang H, Hu X. miR-218 functions as a tumor suppressor gene in cervical cancer. *Mol Med Rep*. 2020; 21(1):209-219.

Lo Muzio L, Pannone G, Leonardi R, Staibano S, Mignogna MD, De Rosa G, Kudo Y, Takata T and Altieri DC: Survivin, a potential early predictor of tumor progression in the oral mucosa. *J Dent Res*. 2003; 82: 923-928.

Lomax RB, Camello C, Van Coppenrolle F, Petersen OH. Basal and physiological Ca²⁺ leak from the endoplasmic reticulum of pancreatic acinar cells. Second messenger-activated channels and translocons. *J Biol Chem*. 2002; 277: 26479-26485.

Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004; 68: 362-372.

Lu B, Gonzalez A, Massion PP, Shyr Y, Shaktour B, Carbone DP, Hallahan DE. Nuclear survivin as a biomarker for non-small-cell lung cancer. *British journal of Cancer*. 2004; 91: 537-540.

Lu Z, Lin Y, Jiang L, Chen L, Luo X, Song X, Chen S, Zhang S. Micro-ribonucleic acid expression profiling and bioinformatic target gene analysis in laryngeal carcinoma. *Onco Targets Ther* 2014; 7: 525-533.

Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*. 2004; 303: 95-98.

Magnano M, Bongioannini G, Lerda W, Canale G, Tondolo E, Bona M, Viora L, Gabini A, Gabriele P. Lymphnode metastasis in head and neck squamous cells carcinoma: multivariate analysis of prognostic variables. *J Exp Clin Cancer Res*. 1999; 18: 79-83.

Mahotka C, Wenzel M, Springer E, Gabbert HE, Gerharz CD. Survivin-deltaEx3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties. *Cancer Res*. 1999; 59: 6097-6102.

Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol*. 2010; 11:781-789.

Marusawa H, Matsuzawa S, Welsh K et al. HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. *EMBO J*. 2003; 22: 2729-2740.

Massion PP, Taflan PM, Jamshedur Rahman SM, Yldiz P, Shyr Y, Edgerton ME, Westfall MD, Roberts JR, Pietenpol JA, Carbone DP, Gonzalez AL. Significance of p63 amplification and overexpression in lung cancer development and prognosis. *Cancer Res*. 2003; 63: 7113-7121.

Meng F, Henson R, Lang M, Wehbe H, Maheshwari S, Mendell JT, Jiang J, Schmittgen TD, Patel T. Involvement of human microRNAs in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology* 2006; 130: 2113-2129.

Meng X, Shi Y, Xiang X, Li C, Ge X, Pan K, Liang Y. Influence of miR-101 on proliferation of liver cancer cells through the MAPK/ERK signaling pathway. *Oncol Lett*. 2020; 19(2): 1310-1316.

Miao J, Hou N, Yang W, Jiang Q, Xue W, Wang X, Zhang H, Xiong X, Wang L, Zhao L, Huang C. miR-203a suppresses cell proliferation by targeting RING-finger protein 6 in colorectal cancer. *Anticancer Drugs*. 2020; 31(6):583-591.

Michael MZ, O'Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res*. 2003; 1: 882-891.

MicroRNA alterations in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2008; 123: 2791-2797.

Mita AC, Mita MM, Nawrocki ST and Giles FJ: Survivin: Key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. *Clin Cancer Res.* 2008; 14: 5000-5005.

Müller L, de Escauriaza MD, Lajoie P, Theis M, Jung M, Müller A et al. Evolutionary gain of function for the ER membrane protein Sec62 from yeast to humans. *Mol Biol Cell.* 2010; 21: 891-903.

Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, Urashima T, Toyoda H, Okanoue T, Shimotohno K. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene.* 2006; 25: 2537-2545.

Ng DT, Brown JD, Walter P. Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol.* 1996; 134: 169-178.

Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Diff.* 1999; 6: 1028-1042.

Okada E, Murai Y, Matsui K, Isizawa S, Cheng C, Masuda M and Takano Y: Survivin expression in tumor cell nuclei is predictive of a favorable prognosis in gastric cancer patients. *Cancer Lett.* 2001; 163: 109-116.

Orell-Kotikangas H, Schwab U, Österlund P, Saarilahti K, Mäkitie O, Mäkitie AA. High prevalence of vitamin D insufficiency in patients with head and neck cancer at diagnosis. *Head Neck.* 2012; 34 (10): 1450-1455.

Orme M, Meier P. Inhibitor of apoptosis proteins in *Drosophila*: Gatekeepers of death. *Apoptosis.* 2009; 14: 950-960.

Peller S, Stephenson CS. Skin irritation and cancer in the United states navy. *AM J M Sc.* 1937; 194: 326-333.

Peng P, Chen T, Wang Q, Zhang Y, Zheng F, Huang S, Tang Y, Yang C, Ding W, Ren D, Huang Z, Guo Y. Decreased miR-218-5p Levels as a Serum Biomarker in Bone Metastasis of Prostate Cancer. *Oncol Res Treat.* 2019; 42(4): 165-185.

Pisoni G, Molinari M. Five questions (with their answers) on ER-associated degradation. *Traffic*. 2016; 17: 341-350.

Pistretto G, Trisciuglio D, Ceci C, Garufi A, D'Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging*. 2016; 8 (4): 603-619.

Plati J, Bucur O, Khosravi-Far R. Dysregulation of apoptotic signaling in cancer. Molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *J Cell Biochem*. 2008; 104: 1124-1149.

Preuss SF, Weinell A, Molitor M, Semrau R, Stenner M, Drebber U, Wedemeyer I, Hoffmann TK, Guntinas-Lichius O and Klussmann JP: Survivin and epidermal growth factor receptor expression in surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2008; 30: 1318-1324.

Qi G, Kudo Y, Ando T, Tsunematsu T, Shimizu N, Siriwardena SB, Yoshida M, Keikhaee MR, Ogawa I and Takata T: Nuclear Survivin expression is correlated with malignant behaviors of head and neck cancer together with Aurora-B. *Oral Oncol*. 2010; 46: 263-270.

Ramdas L, Giri U, Ashorn CL, Coombes KR, El-Naggar A, Ang KK, Story MD. miRNA expression profiles in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent normal tissue. *Head Neck* 2009; 31: 642-654.

Rapiejko PJ, Gilmore R. Empty site forms of the SRP54 and SR alpha GTPases mediate targeting of ribosome-nascent chain complexes to the endoplasmic reticulum. *Cell*. 1997; 89: 703-713.

Remmele W, Stegner HE. Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologie*. 1987; 8: 138-140.

Ries J, Vairaktaris E, Agaimy A, Kintopp R, Baran C, Neukam FW, Nkenke E. miR-186, miR-3651 and miR-494: potential biomarkers for oral squamous cell carcinoma extracted from whole blood. *Oncol Rep* 2014; 31: 1429-1436.

Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Krebs in Deutschland. 2013. Kapitel 3.

Römisch K, Webb J, Herz J, Prehn S, Frank R, Vingron M et al. Homology of 54 K protein of signal recognition particle, docking protein and two E. coli proteins with putative GTP-binding domains. *Nature*. 1989; 340: 478-482.

Rothblatt JA, Deshaies RJ, Sanders SL, Daum G, Schekman R. Multiple genes are required for proper insertion of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in yeast. *J Cell Biol*. 1989; 109: 2641-2652.

Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res*. 2000; 45: 528-537.

Sato Y, Iwamoto J, Kanoko T, Satoh K. Amelioration of osteoporosis and hypovitaminosis D by sunlight exposure in hospitalised, elderly women with Alzheimer's disease: a randomized controlled trial. *J Bone Miner Res*. 2005; 20(8): 1327-1333.

Sattler HP, Lensch R, Rohde V, et al. Novel amplification unit at chromosome 3q25-27 in human prostate cancer. *Prostate*. 2000; 45: 207–15.

Schäuble N, Lang S, Jung M, Cappel S, Schorr S, Ulucan Ö et al. BiP-mediated closing of the Sec61 channel limits Ca²⁺ leakage from the ER. *EMBO J*. 2012; 31:3282-3296.

Schlenstedt G, Gudmundsson GH, Boman HG, Zimmermann R. A large pre-secretory protein translocates both cotranslationally, using signal recognition particle and ribosome, and post-translationally, without these ribonucleoparticles, when synthesized in the presence of mammalian microsomes. *J Biol Chem*. 1990; 265: 13960-13968.

Schwarz DS, Hutvágner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*. 2003; 115: 199-208.

Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, Cheng EH, Sorcinelli MD, Pozzan T et al. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science*. 2003; 300: 135-139.

Shen Y, Shenk TE. Viruses and apoptosis. *Curr Opin Genet Dev*. 1995; 5: 105-111.

Slee EA, Adrian C, Martin SJ. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Diff.* 1999; 6: 1067-1074.

Sun C, Nettesheim D, Liu Z, Olejniczak ET. Solution structure of human survivin and its binding interface with Smac/Diablo. *Biochemistry.* 2005; 44: 11-17.

Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y, Mitsudomi T, Takahashi T. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res.* 2004; 64: 3753-3756.

Thomas L. *Labor und Diagnose: Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik.* 7. Auflage. 2008. Th-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt am Main.

Tran J, Master Z, Yu JL, Rak J, Dumont DJ, Kerbel RS. A role for survivin in chemoresistance of endothelial cells mediated by VEGF. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99 (7): 4349-4354.

Tran N, McLean T, Zhang X, Zhao CJ, Thomson JM, O'Brien C, Rose B. MicroRNA expression profiles in head and neck cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 358: 12-17.

Tyedmers J, Lerner M, Bies C, Dudek J, Skowronek MH, Haas IG et al. Homologues of the yeast Sec complex subunits Sec62p and Sec63p are abundant proteins in dog pancreas microsomes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97: 7214-7219.

Tyedmers J, Lerner M, Wiedmann M, Volkmer J, Zimmermann R. Polypeptide-binding proteins mediate completion of co-translational protein translocation into the mammalian endoplasmic reticulum. *EMBO Rep.* 2003; 4: 505-510.

Van Coppenrolle F, Vanden Abeele F, Slomianny C, Flourakis M, Hesketh J, Dewailly E et al. Ribosome-translocon complex mediates calcium leakage from endoplasmic reticulum stores. *J Cell Sci.* 2004; 117: 4135-4142.

Vineis P, Alavanja M, Buffler P, Fontham E, Franceschi S, Gao YT, Gupta PC, Hackshaw A, Matos E, Samet J, Sitas F, Smith J, Stayner L, Straif K, Thun MJ, Wichmann HE, Wu AH, Zaridze D, Peto R, Doll R. Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence. *J Natl Cancer Inst.* 2004; 96: 99-106.

Violinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006; 103:3687-3692.

Vokes EE et al. Head and Neck Cancer. *New England Journal of Medicine*. 1993; 328 (3): 184-194.

Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103: 2257-2261.

Walter P, Blobel G. Purification of a membrane-associated protein complex required for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980; 77: 7112-7116.

Walter P, Ibrahimi I, Blobel G. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J Cell Biol*. 1981; 91: 545-550.

Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*. 2011; 33: 1081-1086.

Wang B, Zou A, Ma L, Chen X, Wang L, Zeng X, Tan T. miR-455 inhibits breast cancer cell proliferation through targeting CDK14. *Eur J Pharmacol*. 2017; 807: 138-143.

Wang J, Zhou Y, Fei X, Chen X, Chen R, Zhu Z, Chen Y. Integrative bioinformatics analysis identifies ROBO1 as a potential therapeutic target modified by miR-218 in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 2017; 8: 61327-61337.

Weitzmann A, Baldes C, Dudek J, Zimmermann R. The heat shock protein 70 molecular chaperone network in the pancreatic endoplasmic reticulum - a quantitative approach. *FEBS J*. 2007; 274: 5175-5187.

Wemmert S, Lindner Y, Linxweiler J, Wagenpfeil S, Bohle RM, Niewald M, Schick B. Sec62 as a new biomarker for poor prognosis in advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Lett.* 2016; 11:1661-1670.

Wiech H, Stuart R, Zimmermann R. Role of cytosolic factors in the transport of proteins across membranes. *Semin Cell Biol.* 1990; 1: 55-63.

Wittekind C, Klimpfinger M, Sobin LH. TNM-Atlas. 5. Auflage. 2005. Springer Medizin Verlag, Heidelberg.

Wittekind C, Weber A, Weidenbach H. Pathologie und Prognosefaktoren von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches. *Onkologe.* 2001; 7: 498-504.

Wonderlin WF. Constitutive, translation-independent opening of the protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum. *Pflugers Arch.* 2009; 457: 917-930.

Wu K, Jiang Y, Zhou W, Zhang B, Li Y, Xie F, Zhang J, Wang X, Yan M, Xu Q, Ren Z, Chen W, Cao W. Long Noncoding Micro-RNA-101-3p/EZH2 Axis in OSCC. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2020; 20: 97-110.

Wu RS, Qiu EH, Zhu JJ, Wang JR Lin HL. MiR-101 promotes nasopharyngeal carcinoma cell apoptosis through inhibiting Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2018; 22(1): 150-157.

Wuytack F, Racymackers L, Missiaen L. Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. *Cell Calcium.* 2002; 32: 279-305.

Wynder EL, Bross IJ, Feldman RM. A study of the etiological factors in cancer of the mouth. *Cancer.* 1957; 10: 1300-1323.

Yamamoto H, Shigematsu H, Nomura M, Lockwood WW, Sato M, Okumura N, Soh J, Suzuki M, Wistuba II, Fong KM, Lee H, Toyooka S, Date H. et al. PIK3CA mutations and copy number gains in human lung cancers. *Cancer Res.* 2008; 68: 6913-6921.

Yang CC, Hung PS, Wang PW, Liu CJ, Chu TH, Cheng HW, Lin SC. miR-181 as a putative biomarker for lymph-node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2011; 40: 397-404.

Yang Y, Li D, Li Y, Jiang Q, Sun R, Liu J, Wu F, Miao J, Ni L, Shi X, Huang C. Low-Temperature Plasma Suppresses Proliferation and Induces Apoptosis in Lung Cancer Cells by Regulating the miR-203a/BIRC5 Axis. *Onco Targets Ther.* 2020; 13: 5145-5153.

Yen CC, Chen YJ, Pan CC, Lu KH, Chen PC, Hsia JY, Chen JT, Wu YC, Hsu WH, Wang LS, Huang MH, Huang BS, Hu CP et al. Copy number changes of target genes in chromosome 3q25.3-qter of esophageal squamous cell carcinoma: TP63 is amplified in early carcinogenesis but down-regulated as disease progressed. *World J Gastroenterol.* 2005; 11: 1267-1272.

Yunqi H, Fangrui Y, Yongyan Y, Yunjian J, Wenhui Z, Kun C, Min L, Xianfeng L, Caixia B. miR-455 Functions as a Tumor Suppressor Through Targeting GATA6 in Colorectal Cancer. *Oncol Res.* 2019; 27(3): 311-316.

Zeng Y, Yi R, Cullen BR. MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *PNAS.* 2003; 100: 9779-9784.

Zhang T, Otevrel T, Gao Z, Ehrlich SM, Fields JZ, Boman BM. Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer. *Cancer Res.* 2001; 61: 8664-8667.

Zhu S, Si ML, Wu H, Mo YY. MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *J Biol Chem* 2007; 282 (19): 14328-14336.

Zhu S, Wu H, Wu F, Nie D, Sheng S, Mo YY. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Res.* 2008; 18 (3): 350-359.

Zimmermann R, Eyrisch S, Ahmad M, Helms V. Protein translocation across the ER membrane. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1808: 912-924.

Zong M, Feng W, Wan L, Yu X, Yu W. miR-203 affects esophageal cancer cell proliferation, apoptosis and invasion by targeting MAP3K1. *Oncol Lett.* 2020; 20(1): 751-757.

7. Danksagung

Die vorliegende wissenschaftliche Arbeit wäre ohne die Unterstützung zahlreicher Menschen nicht zustande gekommen.

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Bernhard Schick für die Möglichkeit, meine wissenschaftliche Arbeit an der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums des Saarlandes schreiben zu dürfen. Besonders danken möchte ich meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. med. Maximilian Linxweiler (Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum des Saarlandes) für seine wohlwollende Begleitung, seine wertvollen Ratschläge und seine kritischen Anmerkungen.

Ein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin, Frau Dr. rer. nat. Silke Wemmert (Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum des Saarlandes) für die bereitwillige Aufnahme in das Team der experimentellen HNO. Ich bedanke mich insbesondere für die sachkundige wissenschaftliche Beratung, die tatkräftige Unterstützung bei der Beschaffung erforderlicher Reagenzien und Kits, die stetige Bereitschaft zur Diskussion und kritischen Evaluation von Zwischenergebnissen sowie das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Ein großes Dankeschön gilt Herrn Dr. rer. nat. Florian Bochen (Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Universitätsklinikum des Saarlandes) für das Heranführen an komplexe molekularbiologische Sachverhalte, seine Anregungen bezüglich eines saubereren wissenschaftlichen Arbeitens sowie die Beratung in statistischen Fragen. Trotz seiner vielfältigen Verpflichtungen konnte ich stets auf seine kompetenten und ehrlichen Ratschläge zählen.

Ein ganz besonderer Dank gilt allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Forschungslabors der Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde für die überaus angenehme Arbeitsatmosphäre. Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Monika Hoffmann, Frau Ulrike Bechtel und Frau Carolin Bick für Ihre überaus großzügige Hilfsbereitschaft. Durch ihre langjährige wissenschaftlich-praktische Erfahrung wurde ich mit Geduld und Sachkompetenz an die für meine Arbeit erforderlichen methodischen Aspekte herangeführt und war daher schneller in der Lage, eigenständig zu arbeiten.

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Rainer Bohle und seinen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Pathologie der Universität des Saarlandes für die Bereitstellung der Tumorgewebeblöcke und die gelungene Kooperation bedanken.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Frau Dipl.-Stat. Gudrun Wagenpfeil für die kompetente biometrische Beratung und die Einweisung in das Statistik-Programm SPSS Statistics.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder, die mich während meiner wissenschaftlichen Tätigkeit stets wohlwollend unterstützt und in meinem Arbeitswillen bestärkt haben.