

Mechanismen zur Aktivierung des Warburg-Effekts bei HPV-assoziierten
Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanbiologie
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Knuth, Jennifer
aus Siegen

Gießen 2021

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf-Halschirurgie und plastische
Operationen

Gutachter: Prof. Dr. Klußmann

Gutachter: Prof. Dr. Niepmann

Tag der Disputation: 17.05.2022

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1-1
1.1	HNSCC: Epidemiologie und Ätiologie.....	1-1
1.2	HPV und HNSCC	1-1
1.3	HPV –induzierte Karzinogenese.....	1-3
1.4	HIF-1 α und Hypoxie.....	1-4
1.5	Hypoxie in der Tumorentstehung und die Rolle von HPV	1-6
1.6	Zielsetzung.....	1-8
2	Material & Methoden.....	2-9
2.1	Material	2-9
2.1.1	Laborgeräte.....	2-9
2.1.2	Chemikalien.....	2-10
2.1.3	Verbrauchsmittel	2-11
2.1.4	Lösungen und Puffer	2-12
2.1.5	Kits	2-13
2.1.6	Antikörper.....	2-14
2.1.7	Marker	2-15
2.1.8	Primer	2-15
2.1.9	HNSCC-Zelllinien.....	2-16
2.2	Methoden	2-17
2.2.1	Zellkultur	2-17
2.2.2	Induktion des Hypoxiesignalwegs.....	2-20
2.2.3	Western Blot mit HNSCC-Zelllysaten	2-23
2.2.4	Proteasom und PHD Inhibition.....	2-25
2.2.5	Immunfluoreszenzfärbung an fixierten HNSCC-Zelllinien	2-25
2.2.6	Immunohistochemie an FFPE-Schnitten.....	2-25
2.2.7	Funktioneller Assay (Scratch Assay).....	2-30
2.2.8	siRNA-Transfektion	2-31
2.2.9	RNA-Extraktion aus Zellen	2-32
3	Ergebnisse	3-36
3.1	HPV-DNA-Nachweis in HNSCC Zelllinien.....	3-36
3.2	Aktivierung des HIF-1 Signalwegs in HPV-positiven und HPV-negativen HNSCC-Zelllinien	3-36
3.2.1	Erhöhte HIF-1 α und PHD2 Proteinlevel in HPV-positiven HNSCC Zelllinien unter Normoxie	3-37

3.2.2	Erhöhte HIF-1 α und PHD2 Proteinlevel als Antwort auf Hypoxie in HPV-positiven HNSCC-Zelllinien.....	3-38
3.2.3	Verminderte HIF-1 α Hydroxylierung in HPV-positiven HNSCC-Zelllinien.....	3-39
3.2.4	Erhöhter Anstieg des HIF-1 α Proteinlevels unter chemischer Induktion in HPV-positiven HNSCC-Zelllinien.....	3-40
3.2.5	Verminderte Migration unter chemischer Aktivierung des Hypoxie-Signalwegs in HPV-negativen Zelllinien.	3-42
3.2.6	HIF-1 α Inhibition durch siRNA in HPV-positiven und -negativen HNSCC-Zelllinien.....	3-43
3.2.7	Verminderte Migration unter HIF-1 α Inhibition in HPV-positiven HNSCC-Zelllinien durch siRNA.....	3-43
3.2.8	Wundschluss-Änderung unter chemischer Aktivierung des Hypoxie-Signalwegs und HIF-1 α Inhibition durch siRNA in HPV-positiven und -negativen HNSCC-Zelllinien.....	3-45
3.2.9	Reduzierung der membranständigen Expression von E-Cadherin unter HIF-1 α Aktivierung in HPV-positiven HNSCC-Zelllinien.....	3-46
3.3	Relative mRNA Level unter Hypoxie in HPV-positiven und -negativen Zelllinien..	3-47
3.4	Metabolische Unterschiede zwischen HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC.....	3-50
3.4.1	Patienten- und Tumor-Charakteristika des Untersuchungskollektivs	3-50
3.4.2	Gesamtüberleben der Patienten des Untersuchungskollektiv bezogen auf den HPV-Status	3-51
3.4.3	HIF-1 α in HPV-assoziierten und -negativen OPSCC.....	3-52
3.4.4	HIF-1 α <i>downstream-targets</i> in HPV-assoziierten und -negativen OPSCC.....	3-53
3.5	18F-FDG PET-CT Parameter in HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC.....	3-64
3.5.1	Patienten- und Tumor-Charakteristika von Patienten mit ausgewerteten PET-CT Daten	3-64
3.5.2	Gesamtüberleben von Patienten mit ausgewerteten PET-CT Daten	3-66
3.5.3	PET-CT Parameter in HPV-assoziierten und -negativen OPSCC	3-66
3.5.4	Gesamtüberleben von Patienten mit HPV-negativen OPSCC bezogen auf die PET-Parameter.....	3-68
3.5.5	GLUT-1 Expression in Korrelation mit dem T-Stadium.....	3-69
4	Diskussion.....	4-70
4.1	Aktivierung des HIF-1 Signalwegs in HPV-positiven und -negativen HNSCC-Zelllinien.....	4-70
4.1.1	HIF-1 α Stabilisierung in HPV-positiven HNSCC-Zelllinien unter Normoxie.....	4-70
4.1.2	HIF-1 α Stabilisierung in HPV-positiven HNSCC-Zelllinien unter Hypoxie	4-71
4.1.3	HIF-1 α Funktionalität in HNSCC-Zelllinien.....	4-71
4.1.4	HIF-1 α Expression und Einfluss auf Tumorwachstum, Migration und Proliferation in HPV-positiven HNSCC-Zelllinien.....	4-72
4.2	Relative mRNA Level unter Hypoxie in HPV-positiven und -negativen Zelllinien ..	4-73

4.3	Metabolische Unterschiede zwischen HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC.....	4-74
4.3.1	HIF-1 α	4-75
4.3.2	GLUT-1.....	4-76
4.3.3	LDHA.....	4-77
4.3.4	CA9.....	4-78
4.3.5	18F-FDG PET-CT Parameter in HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC.....	4-80
4.4	Schlussfolgerung.....	4-83
5	Zusammenfassung.....	5-84
6	Summary.....	6-85
7	Abkürzungsverzeichnis.....	7-86
8	Abbildungsverzeichnis.....	8-89
9	Tabellenverzeichnis.....	9-90
10	Literaturverzeichnis.....	10-91
11	Publikationsverzeichnis.....	11-99
12	Ehrenwörtliche Erklärung.....	12-101
13	Danksagung.....	13-102

1 Einleitung

1.1 HNSCC: Epidemiologie und Ätiologie

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs (*Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*, HNSCC) zählen zu den sechs häufigsten Tumorerkrankungen [87, 92] mit einer jährlichen, globalen Inzidenz von 650.000 Neuerkrankungen. Die Mortalitätsrate liegt bei etwa 50 % [87] mit 5-Jahres-Überlebensraten zwischen 20 bis 90 % in Abhängigkeit des Tumorstadiums und der Lokalisation des Primarius [87]. Weltweit liegt der Anteil der Männer mit HNSCC bei ca. 5 %, während dieser bei Frauen 1-2 % aller maligner Erkrankungen ausmacht. Bei Männern beträgt das mittlere Erkrankungsalter 57 Jahre, während es bei Frauen mit etwa 63 Jahren angegeben wird. In der Bundesrepublik Deutschland wurden für Mundhöhle und Rachen im Jahr 2014 insgesamt 12.830 Fälle gemeldet. Daraus ergab sich für 2018 eine Schätzung von 13.700 Fällen. Das relative 5-Jahres-Überleben der Patienten beträgt bei Männern in Deutschland ca. 50 % und bei Frauen ca. 60% [88]. Gemäß Statistiken aus den USA sowie für Westeuropa sind die Karzinome der Mundhöhle am häufigsten vertreten, gefolgt von Karzinomen des Larynx [92].

Als Risikofaktoren für die Entstehung von HNSCC gelten u.a. Alkohol- sowie Tabakkonsum, diätetische Faktoren und mangelnde Mundhygiene. Die betroffenen Patienten zählen häufig zur niedrigeren sozio-ökonomischen Schicht [83]. In den USA und vielen europäischen Ländern wird trotz rückläufigen Tabakkonsums ein Anstieg der Inzidenzen von Oropharynxkarzinomen (*Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma*, OPSCC) beobachtet. Dies wird vorrangig auf die Assoziation mit hochrisiko humanen Papillomaviren (HPV) zurückgeführt [88].

1.2 HPV und HNSCC

Entsprechend der aktuellen WHO-Klassifikationen werden Kopf-Hals-Karzinome in Virus-assoziierte (HPV) und Noxen-assoziierte Tumoren unterteilt. Während in OPSCC eine HPV-Infektion für 30-70% der Fälle ursächlich ist [1] spielt diese in HNSCC anderer Sublokalisationen eine untergeordnete Rolle (Mundhöhlenkarzinom: 4,4 %;

Larynxkarzinom: 3,5 %) [90]. HPV-assoziierte Karzinome sind im Oropharynx überwiegend im Bereich des Zungengrundes und der Tonsillen vorzufinden und mutmaßlich auf das besondere Kryptenepithel zurückzuführen. Das Epithel kann zum einen besonders leicht infiziert werden, da es sich lediglich aus ein bis zwei Schichten zusammensetzt und zum anderen die Krypten als potenzielles Reservoir die Clearance des Virus verzögern [40]. Zusätzlich könnte das im lymphoepithelialen Gewebe vorherrschende Milieu günstig für eine Infektion sein [64]. Im lymphoepithelialen Gewebe finden sich Monozyten und Makrophagen. Diese spielen eine entscheidende Rolle bei der Abwehr gegen pathogene Strukturen und der Wundheilung. Andererseits kann auch eine tumorassoziierte Makrophagenfunktion beobachtet werden, die Tumorangio-genese und –proliferation stimuliert und eine adäquate Immunantwort supprimiert [102]. Da sich HPV-assoziierte OPSCC klinisch-histologisch und auch molekular von den Noxen-assoziierten (HPV-negativen) Karzinomen unterscheiden, werden diese als eigene Tumorentität klassifiziert. Für OPSCC ist der HPV-Status jedoch einer der wichtigsten Prognosefaktoren und hat einen signifikanteren Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten als die Primariusgröße oder der Einflussfaktor Nikotin [88]. Eine Identifikation einer HPV-Assoziation durch den Nachweis des Tumorsuppressorproteins p16^{INK4a} (p16) in der Immunhistochemie als Surrogatmarker wird demnach seit der 8. Version des UICC/AJCC-Tumorstagingmanuals für OPSCC vorgegeben [88]. Zum aktuellen Zeitpunkt hat der HPV-Status jedoch keinen Einfluss auf die Wahl der Therapie in Patienten mit OPSCC. Etablierte Ansätze sind die operative Therapie mit risikoadaptierter, adjuvanter Radiochemotherapie sowie die definitive Radiochemotherapie [90]. Aufgrund des hohen Nebenwirkungsprofils sowie der guten Prognose wird eine Therapieeskalation für einzelne Subgruppen diskutiert [88]. Ansätze sind die Verminderung der Strahlendosis oder der Ersatz bzw. die Reduktion von Platin-basierter Chemotherapie. So wurden bereits therapeutische Antikörper wie Cetuximab als Ersatz für Platin-basierte Chemotherapeutika in klinischen Studien eingesetzt [61]. Jedoch sind diese Studien gescheitert. Auch aktuelle auf Immun-Checkpoints ausgerichtete palliative Therapieansätze (z.B. gegen die Immunrezeptor/-ligand Kombination PD-1/PD-L1 (*programmed death receptor 1/ligand 1*)) scheinen für Patienten mit HNSCC vielversprechend [88]. Jedoch haben zahlreiche Studien gezeigt, dass der Erfolg der Immuntherapie auf bestimmte Subgruppen beschränkt ist und die objektiven Ansprechraten bei ca. 15 % liegen [13,

15, 22]. Dies macht deutlich, dass valide Biomarker zur Risikostratifizierung dieser Patienten bis zum aktuellen Zeitpunkt fehlen.

1.3 HPV –induzierte Karzinogenese

Humane Papillomaviren sind doppelsträngige DNA-Viren, die ein 8000 Basenpaare großes, ringförmiges Genom besitzen [4]. Identifiziert wurden bereits mehr als 120 Subtypen humaner Papillomaviren (HPV), die kutane Epithelien (β -Gruppe) oder anogenitale und orale Mukosa (α -Gruppe) infizieren. Die α -Gruppe der HPV umfasst ungefähr 30–40 Typen. Unterteilt wird diese Gruppe weiterhin in die nicht-onkogenen „Low-Risk(LR)-HPV-Typen“ (z.B. HPV-6 und -11) sowie in die onkogenen „High-Risk(HR)-HPV-Typen“ (z.B. HPV-16 und -18) [89] und „intermediate HPV-Typen“ (z.B. HPV-31 und -33). LR-Typen verursachen zumeist Kondylome und Papillome. Durch HR-Typen hervorgerufene Läsionen können sich jedoch zu Dysplasien und Karzinomen entwickeln [89]. Virale Onkoproteine, die in infizierten Zellen der Basalschicht exprimiert werden, interagieren und deregulieren zelluläre Regulatorproteine, um diese für die virale Reproduktion zu nutzen. Zentrale Bedeutung haben in diesem Zusammenhang vor allem die HPV-Onkoproteine E6 und E7, die unter anderem mit dem Tumorsuppressorprotein p53 interagieren. E6 interagiert beispielsweise mit der zellulären Ubiquitinligase E6AP. Beide Proteine binden dann an p53 [89]. Es kommt zum proteolytischen Abbau von p53 und einer Verhinderung der Apoptose [88]. E6 interagiert hierbei mit der zellulären Ubiquitinligase E6AP. Zusätzlich kommt es zu einer Bindung von E7 an das Retinoblastomprotein (pRb). Diese Bindung führt zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F. E2F treibt den Zellzyklus voran und es kommt zur Akkumulation von p16^{INK4a} (p16). P16 blockiert in einer gesunden Zelle den Übergang von der G1- zur S-Phase und wirkt als Tumorsuppressorprotein. Eine Überexpression von p16 deutet demnach auf eine onkogene Aktivität der viralen Proteine hin [88]. E6 und E7 heben die Blockade des Zellzyklus durch p16 und p53 auf. Zusätzlich wird die unbegrenzte Zellteilung und somit die Karzinogenese durch transkriptionelle Aktivierung der katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase (hTERT) durch E6 ermöglicht [89]. Die Expression der viralen Onkoproteine E6 und E7 führt zu wichtigen zellulären Veränderungen, die bei Noxen-assoziierten Tumoren durch viele zufällig auftretende genetische Veränderungen erfolgen. Die Entwicklung des Karzinoms basiert auf genetischen Instabilitäten, Dysregulation des Zellzyklus, Mutationen von Onko- und

Tumorsuppressorgenen, Wachstumsfaktoren und Rezeptorkaskaden [92]. HPV-assoziierte HNSCC zeigen im Vergleich zu Noxen-induzierten HNSCC auf molekularer Ebene eine geringere Anzahl genetischer Aberrationen und Mutationen [39, 79].

1.4 HIF-1 α und Hypoxie

HIF-1 ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor, der aus einer O₂-sensitiven HIF-1 α Untereinheit und einer konstitutiv exprimierten HIF-1 β Untereinheit besteht. Die Stabilität der Untereinheiten von HIF- α (HIF-1 α und HIF-2 α) wird durch Sauerstoffsensoren der Proteinfamilie *Prolyl hydroxylase domain* (PHD) reguliert. PHDs verwenden molekularen Sauerstoff, um spezifische Prolylreste innerhalb von HIF- α zu hydroxylieren, was eine Bindungsstelle für das von Hippel-Lindau (VHL) Tumorsuppressorprotein bildet. Das VHL Tumorsuppressorprotein ist Teil eines E3-Ubiquitin-Ligasekomplexes, der den schnellen HIF-Abbau fördert [75, 76]. Es gibt drei PHDs (PHD1, 2 und 3), die HIF- α Untereinheiten mit unterschiedlichen Präferenzen hydroxylieren. PHD2 gilt jedoch als der Hauptregulator von HIF-1 α unter Normoxie [6, 37]. Unter Hypoxie wird die PHD-Aktivität vermindert und HIF stabilisiert (Abb. 1).

Normoxie

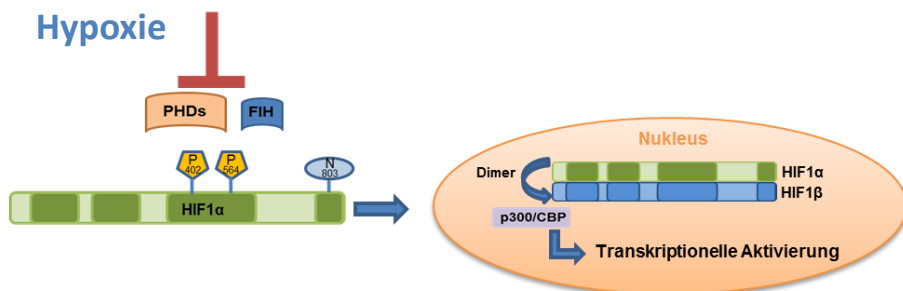
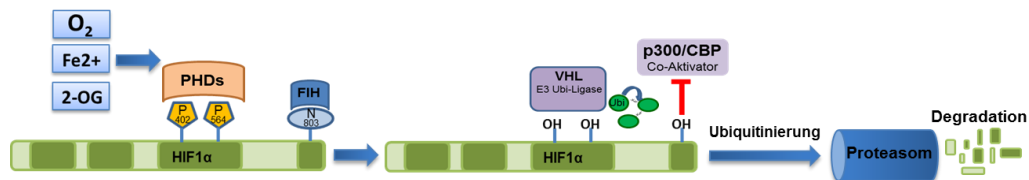


Abbildung 1: Sauerstoffabhängige HIF-Regulation.

Unter Normoxie wird HIF-1 α durch PHDs hydroxyliert. Dies führt zu Bindung durch den VHL und mittels E3-Ligase-Komplex zur Ubiquitinierung, was zum Abbau von HIF-1 α durch das Proteasom führt. Hypoxie führt zur Akkumulation von nicht-hydroxyliertem, nicht-ubiquitiniertem HIF-1 α , das mit HIF-1 β dimerisiert, den Koaktivator p300 oder CBP rekrutiert und die Transkription von Genen aktiviert.

Einleitung

HIF-1 kommen zwei essenzielle Funktionen zu. Einerseits kontrolliert HIF-1 die Sauerstoffversorgung der Zelle durch Regulation der Erythropoese und Angiogenese. Andererseits fördert HIF-1 das Zellüberleben unter hypoxischen Bedingungen, durch das Umprogrammieren des zellulären Glukose- und Energiemetabolismus [73, 74]. Letztlich reguliert HIF-1 die Expression von mehr als 1000 humanen Genen und es konnte eine essenzielle Rolle in der embryonalen Entwicklung nachgewiesen werden [75, 76].

HIF-1 α ist in vielen Tumoren, aufgrund intratumoraler Hypoxie und/oder genetischen Veränderungen (z.B. *loss-of-function mutation* des VHL) überexprimiert (Abb. 2). Eine erhöhte HIF-1 α Proteinexpression und HIF-1 α Aktivität führt zur Hochregulation von Genen, die in vielen Aspekten der Karzinogenese involviert sind, wie zum Beispiel eine metabolische Adaptation, Apoptoseresistenz, Angiogenese und Metastasierung [72]. Zu diesen zählen u.a. GLUT-1, CA9 sowie LDHA.

Der Transport von Glukose in die Zelle erfolgt mittels Glukosetransportern (GLUTs), die in allen Zelltypen vorhanden sind. GLUTs weisen eine variable Gewebeverteilung und eine variable Affinität für Glukose auf. Funktionell regulieren GLUTs die Bewegung von Glukose zwischen den extrazellulären und den intrazellulären Kompartimenten, wobei die Glukose für den Zellstoffwechsel verfügbar bleibt [99]. GLUT-1 gilt als intrinsischer Marker für Hypoxie bei malignen Tumoren [78].

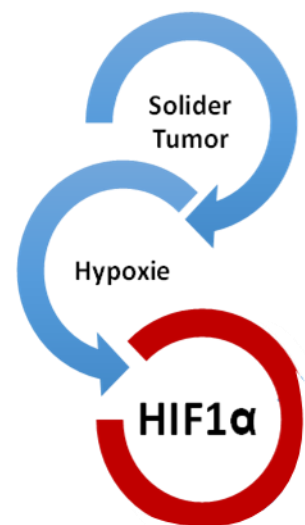


Abbildung 2: Hypoxie-induzierte HIF-1 α Aktivierung im soliden Tumor.

Carboanhydrasen sind transmembrane zinkhaltige Enzyme, die eine reversible Hydratation von Kohlendioxid in Kohlensäure katalysieren und an der Zellatmung und dem Säure-Base-Gleichgewicht beteiligt sind. CA9 ist sowohl in der Plasmamembran als auch im Nukleus der Zellen präsent und gilt ebenfalls als eines der Hauptziele von HIF-1 [65].

Die Laktatdehydrogenase (LDH) katalysiert die gegenseitige Umwandlung von Pyruvat und NADH in Laktat und NAD⁺. Wenn die Sauerstoffversorgung für die mitochondriale ATP-Produktion zu gering ist, recycelt diese Reaktion das bei der Glykolyse erzeugte NADH zu NAD⁺, das in die Glykolyse zurückkehrt. Die wichtigste Form von LDH in Muskelzellen (Skelettmuskel) ist das A (LDHA)-Isozym. Der LDHA-Promotor enthält HIF-1 α Bindungsstellen [71]. Die LDHA-Expression wird unter hypoxischen Bedingungen induziert [73,74].

1.5 Hypoxie in der Tumorentstehung und die Rolle von HPV

Während der Tumorgenese kommt es zur Entstehung eines Tumor-spezifischen Metabolismus (Tumor-Metabolom), welcher die Energieversorgung und Proliferation der Tumorzellen gewährleistet. Ein spezifisches Merkmal dieses Metabolismus-Typs ist eine gesteigerte Umsetzung von Glukose zu Laktat, welche unter aeroben Bedingungen als „Warburg-Effekt“ erstmals im Jahre 1924 beschrieben wurde. Die Umsetzung von Glukose zu Laktat liefert jedoch nur 2 Mol ATP (statt 38 Mole ATP) pro Mol Glukose, was durch eine gesteigerte Glykolyserate kompensiert wird [20, 23, 56]. Zudem ist die oxidative Phosphorylierung reduziert jedoch nicht aufgehoben, um eine ausreichende ATP-Produktion zu gewährleisten. Dieser angepasste Metabolismus des Tumors dient neben der Energiegewinnung dazu, Zellbausteine (z.B. Nukleinsäuren, Aminosäuren und Lipiden) bereitzustellen, um neue Zellen zu bilden [84].

Hypoxie ist ein häufig in soliden Tumoren vorkommendes Ereignis, welches durch die schnelle Proliferation von Tumorzellen zur Obstruktion und Kompression der Blutgefäße in der unmittelbaren Umgebung des Tumors führt. Dies resultiert in einer schlechten Sauerstoffversorgung des Tumorzentrums, an welche sich die Tumorzellen adaptieren. Dies geschieht durch Aktivierung diverser Signalwege, die das Überleben der Zellen sichern und den Glukosemetabolismus von der oxidativen Phosphorylierung auf den glykolytischen Signalweg umstellen [55]. Eine Schlüsselrolle für die zelluläre Adaptation an hypoxische Bedingungen spielt hierbei vor allem der HIF-Signalweg (HIF-1 α & HIF-1 β).

Neben der tatsächlichen Tumorhypoxie konnte in transfizierten Zelllinien nachgewiesen werden, dass HPV-Onkoproteine fähig sind HIF-1 α zu stabilisieren [8, 16, 59]. Onkogene Viren sind somit in der Lage das Tumor-Metabolom Profil durch direkte und

indirekte Interaktion mit zellulären Regulatoren, wie u.a. HIF-1 α zu beeinflussen. Die hierbei entstehenden Baustoffe fördern wiederum die virale Replikation und somit die Expression der Onkogene. Ein solcher metabolischer Phänotyp ermöglicht es den Tumorzellen trotz widriger Umstände, wie Sauerstoffmangel, zu proliferieren [60]. Diese Interaktion könnte auch die Grundlage einer gesteigerten Glykolyse und frühzeitigen Metastasierung in HPV-assoziierten HNSCC sein (Abb. 3). In vielen Tumorentitäten wird dieser Regulationsweg benutzt, um den Stoffwechsel der Zellen im Sinne des Tumorwachstums umzustellen und einen hohen Glukoseumsatz trotz Sauerstoffverfügbarkeit zu erzeugen (Warburg-Effekt). In der Regel wird dieser Phänotyp durch Mutations- und Selektionsereignisse herbeigeführt. Insbesondere für Tumoren, die stark abhängig von Glukose und aerober Glykolyse sind, könnte sich durch die Inhibition dieses Signalwegs eine neue differenzierte Möglichkeit zur Therapie ergeben [91].

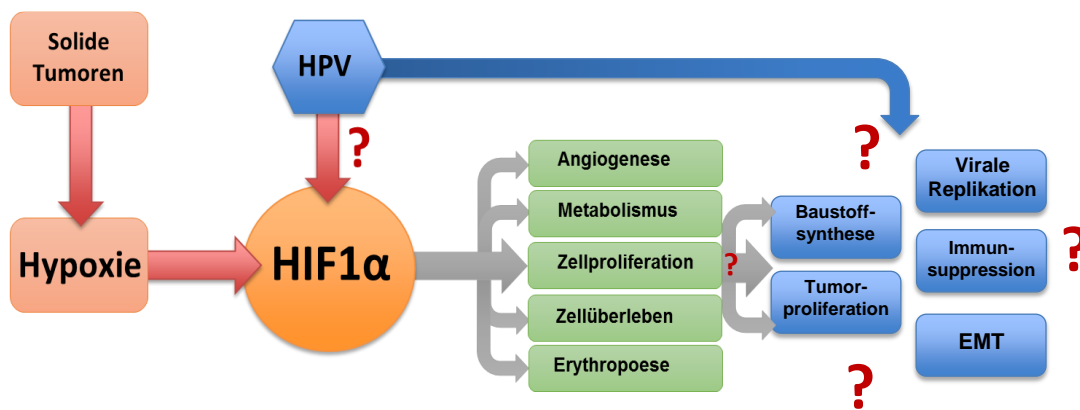


Abbildung 3: HIF-1 α und dessen potenzielle Rolle bei der HPV-induzierten Karzinogenese. Hypoxie (oder onkogene Viren) führen zur Akkumulation von nicht-hydroxyliertem, nicht-ubiquitiniertem HIF-1 α und zur Aktivierung von HIF-Zielgenen, die die Angiogenese, den Metabolismus, die Zellproliferation, das Zellüberleben und/oder die Erythropoese vorantreiben.

1.6 Zielsetzung

Fokus der folgenden Dissertation ist die Untersuchung des Einflusses von HPV-Proteinen auf die Expression von HIF-1 α . Es soll analysiert werden, ob eine HIF-1 α Stabilisierung in HPV-positiven HNSCC Zellkulturen und in Tumorproben nachweisbar ist. Im Falle der Stabilisierung wird im Folgenden überprüft, ob diese durch die viralen Onkogene in HPV-assoziierten HNSCC ausgelöst wird und Unterschiede im Tumorstoffwechsel in Abhängigkeit des HPV-Status bestehen. Zum Nachweis werden hierfür HPV-positive und -negative HNSCC-Zelllinien nach adaptiven Reaktionen auf Hypoxie mittels Western Blotting, Immunfluoreszenz (IF) Mikroskopie und Migrations-/Wundheilungs-Assays untersucht.

Des Weiteren erfolgt die Immunhistochemische Analyse HPV-assoziiierter und HPV-negativer OPSCC hinsichtlich der HIF-1 α , GLUT-1, LDHA und CA9 Expression. Abschließend werden die experimentell erhobenen Daten mit metabolischen Parametern im 18F-FDG PET/CT dieser Patienten korreliert.

2 Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Die verwendeten Geräte sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 1: Laborgeräte

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Dampfgarer	Serie S04	Tefal
Gelelektrophoresekammer	Mini-Protean Tetra Cell System	BioRad
Hypoxiekammer		Coy Laboratory Products Inc.
Inkubator	HeraCell 240i	Thermo Fisher Scientific
Mikroskop (Invers)	DMI3000B	Leica
Mikroskop (Fluoreszenz)	DM2500	Leica
Mikroskopkamera	DFC425C	Leica
Mikrotom	SM2010R	Leica
Minizentrifuge	Sprout	
Molecular Imager	Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS+ mit Image Lab Software	BioRad
NanoDrop	NanoDrop 2000c	Thermo Fisher Scientific
Platten-Spektralphotometer	Infinite M200 pro Nanoquant	Tecan
Plattenzentrifuge	Mini Plate Spinner	Labnet
qRT-PCR System	StepOne Plus Real-Time PCR-System mit StepOne Software Version 2.2.2	Applied Biosystems
Rotor (Zentrifuge)	Swing-bucket rotor A-4-81	Eppendorf
Semi-dry Blot	Trans-Blot SD Semi-dry Transfer Cell	BioRad
Schüttler	Shaker DOS-10L	neoLab
Spannungsquelle für SDS-PAGE	PowerPac Basic Power Supply	BioRad
Spannungsquelle für Western-Blotting	PowerPac HC Power Supply	BioRad
Taumelroller	RS-TR 5	Phoenix Instrument
Thermocycler	C1000 Thermal Cycler	BioRad
Tischzentrifuge	Heraeus Fresco 21	Thermo Fisher Scientific
Trockenschrank		Binder
Ultraschallgerät	VialTweeter & UIS250L	Hielscher
Vortexer	Labdancer	IKA Heathrow Scientific
Wärmeschrank	HeraTherm	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge	5810 R	Eppendorf

2.1.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 2: Chemikalien

Lösung	Hersteller
Acrylamid-Lösung (40%)	AppliChem
Albumin, bovine (BCA-Assay, Immunhistochemie)	Sigma-Aldrich
Albumin Fraction V (Western Blot)	Appllichem
Ammoniumpersulfat (APS)	Appllichem
β-Mercaptoethanol	AppliChem
Bromphenolblau	AppliChem
Clarity Western ECL Substrate	BioRad
Deferoxamine mesylate salt (DFO)	Sigma-Aldrich
Dimethyloxalylglycine (DMOG)	Sigma-Aldrich
DMSO	AppliChem
EDTA	AppliChem
Ethanol, absolut, vergällt	Otto Fischar
FCS	Biochrom
Gentamicin	Sigma-Aldrich
Glycerin	AppliChem
Glycin	AppliChem
Hämalaun	Carl Roth
H₂O₂	AppliChem
HCL	AppliChem
HPLC-H₂O	Sigma-Aldrich
Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrat	Merck Millipore
Lipofectamine® RNAiMAX Transfection Reagent	Thermo Fisher Scientific
Loading Dye (6x)	New England BioLabs
MG-132 Ready made solution	Sigma-Aldrich
Midori green	Biozym
Magermilchpulver	AppliChem
NaCl	AppliChem
NaF	AppliChem
NaOH	AppliChem
NEAA (MEM Non-essential Amino Acid Solution)	Sigma-Aldrich
Opti-MEM® Reduced Serum Medium	Thermo Fisher Scientific
Paraformaldehyd	AppliChem
PBS (1x)	Sigma-Aldrich
Ponceau S Solution	Sigma-Aldrich
Roti-Histokitt	Carl Roth
Roti®-Mount FluorCare	Carl Roth
Roti®-Mount FluorCare DAPI	Carl Roth
RPMI-1640 Medium	Sigma-Aldrich
SDS	AppliChem
Stabiles Glutamin	Sigma-Aldrich

TAE, 50x	AppliChem
Target Retrieval Solution (pH6)	DAKO (Agilent Technologies)
Tris-base	AppliChem
TEMED	AppliChem
Trypan Blue solution, 0.4 %	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA solution (1x)	Sigma-Aldrich
Tween® 20	AppliChem
Xylol (Isomere) >98 %	Carl Roth

2.1.3 Verbrauchsmittel

Die nachfolgend aufgeführte Tabelle zeigt die in der Arbeit verwendeten Verbrauchsmittel.

Tabelle 3: Verbrauchsmittel

Produkt	Hersteller
1,5-ml-Reaktionsgefäß	Eppendorf
1,5-ml-DNA-LoBind Reaktionsgefäß	Eppendorf
2-ml-Reaktionsgefäß	Eppendorf
15-ml-Reaktionsgefäß	Greiner Bio-One
50-ml-Reaktionsgefäß	BD Falcon
24-well-Platte	Sarstedt
96-well-Platte	Sarstedt
96-well-Platte (qRT-PCR)	Thermo Fisher Scientific
Cryoröhrchen	Greiner Bio-One
Deckgläser	Corning BioCoat
Fettstift	Sigma-Aldrich
Leuchstift	Diversivied Biotech
Mr. Frosty	Sigma-Aldrich
Neubauer improved-Zählkammer	LO Labor Optik Ltd
Nitrocellulosemembran	GE Healthcare Life Science
Objektträger	R. Langenbrinck Labor- u. Medizintechnik
Parafilm	Parafilm M®
Petrischale (3 cm, 6 cm, 10 cm)	Sarstedt
Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml)	Greiner Bio-One
Pipetten (25 ml)	BD Falcon
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt
Whatman-Papier	Carl Roth
Zellkulturflasche (T25, T75)	Sarstedt
Zellscraper	Sarstedt

2.1.4 Lösungen und Puffer

Die verwendeten Lösungen und Puffer sind der unten aufgeführten Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 4: Lösungen und Puffer

Puffer	Chemikalie	Menge	pH-Wert
APS, 6 %	Ammoniumpersulfat ddH ₂ O	3 g ad 50 ml	
BSA für Western Blot			
2 % in TBS	Albumin Fraktion V TBS, 1x	1 g ad 50 ml	
5 % in TBS	Albumin Fraktion V TBS, 1x	2,5 g ad 50 ml	
10 % in TBS	Albumin Fraktion V TBS, 1x	5 g ad 50 ml	
BSA für IHC			
10 % in TBS	Serum Albumin, bovin TBS, 1x	0,1 g ad 1 ml	
BSA für BCA			
10 mg/ml	Serum Albumin, bovin ddH ₂ O	100 mg ad 10 ml	
Einfriermedium	RPMI Vollmedium DMSO	45 ml 5 ml	
Formaldehyd, 4 %	Paraformaldehyd ddH ₂ O PBS, 10x NaOH, 1 M	1 g 15 ml 2,5 ml Tropfenweise titrieren	7
Glycin, Zellfixierung			
100 mM	Glycin PBS, 1x	0,4 g ad 50 ml	
Lämmli, 10x	Tris-base Glycin SDS VE-H ₂ O	30,3 g 144,13 g 10 g ad 1000 ml	
„Lämmli-Lysepuffer“	1 M Tris/HCL (pH7,5) 10 %iges SDS EDTA NaF	1 ml 20 ml 74 mg 84 mg	
MTBST, 5 %	Magermilchpulver TBST	5 g ad 100 ml	
RPMI-Vollmedium	RPMI-1640 Medium FCS NEAA Gentamicin Stabiles Glutamin	500 ml 55 ml (10 %) 5,5 ml (1 %) 5,5 ml (1 %) 5,5 ml (1 %)	
Sammelgelpuffer, 4x	Tris-base 10 %iges SDS VE-H ₂ O	15,1 g (0,5 M) 10 ml ad 250 ml	6,8
SDS, 10 %	SDS	25 g	

	ddH ₂ O	ad 250 ml	
SDS-Ladepuffer, 4x	Glycerin	150 µl (15 %)	
	10 %iges SDS	400 µl (4 %)	
	Mercaptoethanol	200 µl (20 %)	
	Sammelgelpuffer	250 µl (25 %)	
	2 %iges Bromphenolblau	40 µl	
Stripping-Lösung 1	Glycin	0,5 g (25 mM)	2
	10 %iges SDS	25 ml	
	VE-H ₂ O	ad 250 ml	
Stripping-Lösung 2	NaOH	1 g (100 mM)	
	10 %iges SDS	25 ml	
	VE-H ₂ O	ad 250 ml	
TBS, 10 x	Tris-base	24,2 g	7,4
	NaCl	80 g	
	10 %iges HCl	titrieren	
	VE-H ₂ O	ad 1 L	
TBST, 1x	VE-H ₂ O	1 L	
	TBST, 10x	100 ml	
	Tween 20	1000 µl	
Transferpuffer	Glycin	9 g	
	Tris-base	1,9 g	
	VE-H ₂ O	ad 500 ml	
	Methanol	1/5 Zugabe vor Benutzung	
Trenngelpuffer, 4x	Tris-base	90,9 g	8,8
	10 %iges SDS	20 ml	
	VE-H ₂ O	ad 500 ml	

2.1.5 Kits

In der nachfolgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten Kits aufgeführt.

Tabelle 5: Verwendete Kits

Bezeichnung	Hersteller
BCA Protein-Assay-Kit	Thermo Fisher Scientific
High-Capacity RNA-to-cDNA Kit	Thermo Fisher Scientific
L-Lactate Assay Kit, colorimetric	Abnova
NovaRed Peroxidase (HRP) Substrate Kit	Vector Labs
QIAshredder	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
SYBR Select Master Mix	Thermo Fisher Scientific
TopTaq Master Mix	Qiagen
Vectastain®ABC-Peroxidase Kits mouse IgG	Vector Laboratories
Vectastain®ABC-Peroxidase Kits rabbit IgG	Vector Laboratories

VECTOR® NovaRED™ Peroxidase (HRP) Substrate Kit	Vector Laboratories
--------------------------------------------------------	---------------------

2.1.6 Antikörper

In den zwei folgenden Tabellen sind die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper aufgeführt.

Tabelle 6: Primärantikörper

Primärantikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Alexa Fluor® 488 Mouse anti-E-Cadherin	Maus	1:200	BD Biosciences
Anti-EGLN2(PHD-1) antibody	Hase	1:1000 in 2% BSA/TBST	Sigma-Aldrich
β-Actin (8H10D10) Mouse mAb	Maus	1:10000 in 5% MTBST	Cell Signaling Technology®
CA9 Polyclonal Antibody	Hase	1:2500 in 2% BSA/TBST	proteintech™
GLUT1 / SLC2A1 (C-term) antibody	Hase	1:1000 in 2% BSA/TBST	Acris Antibodies GmbH
HIF-1α (C-Term) Polyclonal Antibody	Hase	1:200 in 2% BSA/TBST (IHC)	Cayman Chemical
Hydroxy-HIF-1α (Pro564) (D43B5) XP® Rabbit mAb	Hase	1:600 in 2% BSA/TBST	Cell Signaling Technology®
LDHA (C4B5) Rabbit mAb	Hase	1:1200 in 2% BSA/TBST	Cell Signaling Technology®
Monoclonal Anti-β-Tubulin antibody, clone TUB 2.1	Maus	1:10000 in 5% MTBST	Sigma-Aldrich
Monoclonal Antibody to GLUT1 / SLCA1 (C-term) - Purified	Maus	1:1000 (WB) 1:300 (IHC)	Acris Antibodies GmbH
PHD-2/Egln1 Antibody	Hase	1:1000 in 2% BSA/TBST	Cell Signaling Technology®
Purified Mouse Anti-β-Catenin, Clone 14/Beta-Catenin (RUO)	Maus	1:2000 (WB)	BD Biosciences
Purified Mouse Anti-Human HIF-1α, Clone 54/HIF-1α (RUO)	Maus	1:600 in 2% BSA/TBST	BD Biosciences

Tabelle 7: Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody	Pferd	1:1000 in 0,5% BSA/TBST	Cell Signaling Technology®

Anti-mouse IgG (whole molecule) Cy3 conjugate	Schaf	1:600 in 1% BSA/TBST (Histo)	Sigma-Aldrich
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	Ziege	1:1000 in 0,5% BSA/TBST	Cell Signaling Technology®
Anti-Rabbit IgG (whole molecule)- FITC antibody	Ziege	1:600 in 1% BSA/TBST (Histo)	Sigma-Aldrich

2.1.7 Marker

Den im Folgenden aufgeführten Tabellen sind die verwendeten Marker zu entnehmen.

Tabelle 8: Proteinstandard für Western Blot

Bezeichnung	Hersteller
ColorPlus Prestained Protein Marker, Broad Range (7-175 kDa)	New England BioLabs Inc.
Color Prestained Protein Standard, Broad Range (11-245 kDa)	New England BioLabs Inc.

Die Auftragsmenge beträgt 16 µl und setzt sich wie folgt zusammen: 5 µl ColorPlus Prestained Protein Marker, 7 µl des jeweiligen Zelllysepuffers (hier „Lämmli-Lysepuffer“) und 4 µl 4x SDS-Ladepuffer.

Tabelle 9: DNA-Standard für DNA-Gelelektrophorese

Bezeichnung	Hersteller
Low Molecular Weight DNA ladder (25-766 bp)	New England BioLabs Inc.

2.1.8 Primer

In der folgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten Primer aufgeführt.

Tabelle 10: Primer

Primer	Sequenz (5' - 3')	Schmelz- temperatur	Hersteller
Hif1a_a_fwd_qRT	TCTGGGTTGAAACTCAAGCAACTG	68,3°C	Sigma-
Hif1a_a_rev_qRT	CAACCGGTTTAAGGACACATTCTG	67,2°C	Aldrich
GLUT1_a_fwd_qRT	ACTGGGCAAGTCCTTTGAGAT	63,8°C	Sigma-
GLUT1_a_rev_qRT	GTCCTTGTTGCCCATGATGGA	69,2°C	Aldrich
HPRT_fwd	CACTGGCAAACAATGCAGACT	66,2°C	Sigma-
HPRT_rev	GTCTGGCTTATATCCAACACTTCGT	65,1°C	Aldrich
P0_fwd_RT	TCGACAATGGCAGCATCTAC	57,3°C	euofins
P0_rev_RT	ATCCGTCTCCACAGACAAGG	59,4°C	mwg operon

HPV16_E7_fwd_RT	CAGCTCAGAGGAGGAGGATG	61,4°C	eurofins
HPV16_E7_rev_RT	GCACAACCGAAGCGTAGAGT	59,4°C	mwg operon
HPV16_E6_fwd_RT	AGCGACCCAGAAAGTTACCA	57,3°C	eurofins
HPV16_E6_rev_RT	GCATAAATCCCGAAAAGCAA	53,2°C	mwg operon
HPV16_E6*I_fwd_RT	ACTGCGACGTGAGTATTAAGTGC	63,2°C	Sigma-
HPV16_E6*I_rev_RT	CTTGATGATCTGCAACAAGACATACAT	65,9°C	Aldrich
CDH1_Ecad_fwd	AATCCCACCACGTACAAGGG	65,7°C	Sigma-
CDH1_Ecad_rev	GGTATTGGGGGCATCAGCAT	67,9°C	Aldrich
Myko01_fwd	GGGACGAAACAGGATTAGATACCT	63,0°C	eurofins
Myko01_rev	TGCACCATCTGTCACTCCGTAAACCTC	66,5°C	mwg operon
GP5+	TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC	55,3°C	eurofins
GP6+	GAAAATAAACTGTAAATCATATTC	51,5°C	mwg operon
GAPDH_01_fwd	AATGGAAATCCCATCACC	51,4°C	eurofins
GAPDH_01_rev	CAGCCTTGGCAGCGCCAG	62,8°C	mwg operon

2.1.9 HNSCC-Zelllinien

Für die vorliegende Untersuchung wurden sechs adhärenente als Monolayer wachsende HNSCC-Zelllinien verwendet (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten HNSCC-Zelllinien

Zelllinie	HPV	TNM	Herkunft	Alter/ Geschlecht	Primärtherapie
UM-SCC-6	HPV- negativ	T2N0M0 ¹	Zunge ¹ Back of tongue	37/M ¹	unbehandelt ¹
UT-SCC-33	HPV- negativ	T2N0M0 ¹	Mundhöhle ¹ Gingiva of mandible	86/W ¹	unbehandelt ¹
93-VU-147T	HPV ₁₆ - positiv	T4N2 ²	Mundhöhle ² Floor of the mouth	58/M ²	
UM-SCC-47	HPV ₁₆ - positiv	T3N1M0 ¹	Mundhöhle/ Zunge ¹ Lateral tongue	53/M ¹	
UPCI:SCC-90	HPV ₁₆ - positiv	T2N0 ³	Zungengrund ³	46/M ³	
UPCI:SCC-152	HPV ₁₆ - positiv		Hypopharynx ³	47 ³	

¹: aus Lansford CD GR et al. 1999; ²: aus Steenbergen RD et al. 1995; ³: aus White et al.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kultivieren

Die Zelllinien wurden in RPMI-Vollmedium bei 37°C und 5% CO₂ in wassergesättigter Atmosphäre (Standard Kulturbedingungen) unter normoxischen (21% O₂), sowie hypoxischen Bedingungen (1% O₂ für 24 h in der Hypoxiekammer) kultiviert.

2.2.1.2 Passagieren

Erreichen die Zelllinien eine Konfluenz von ca. 70-80 % erfolgt das Passagieren der Zellen. Dafür wird das Medium abgesaugt und die Zellen werden mit 1x PBS gewaschen. Im Anschluss wird auf 37°C erwärmtes Trypsin/EDTA hinzugegeben. Die Menge richtet sich nach der Größe des Kulturgefäßes (ca. 1 ml Trypsin/EDTA pro 20 cm²). Bei Verwendung einer T75 Kulturflasche wurden 3 ml Trypsin/EDTA hinzugegeben. Die Zellen werden bis zum Lösen im Inkubator (bei 37°C) aufbewahrt (Inkubationsdauer ca. 5 bis 15 min, je nach Zelllinie). Die proteolytische Eigenschaft des Trypsins führt zur Spaltung der Zell-Zell- und Zell-Oberflächen-Verbindungen. Nachdem die Zellen sich gelöst haben, wird die enzymatische Reaktion durch die Zugabe von Zellkulturmedium abgestoppt, da nach längerer Inkubationszeit ein toxischer Effekt auftreten könnte. Zum Abstoppen werden bei einer T75 Kulturflasche 5 ml Zellkulturmedium verwendet. Anschließend wird die Zellsuspension in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und für 3 min bei 1100 rpm (Eppendorf 5810R-Zentrifuge) im Ausschwingrotor (Swing-bucket rotor A-4-81) zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand verworfen und das so entstandene Zellpellet durch resuspendieren in Zellkulturmedium vereinzelt. Die Zellzahl wird mit einer Neubauerzählkammer ermittelt und (s.u. 2.2.1.3 Zellzahlbestimmung) kann nun zur weiteren Kultivierung auf eine neue T75 Zellkulturflasche (Inhalt ca. 14 ml Zellkulturmedium) gegeben werden oder wird entsprechend für weiterführende Experimente genutzt.

2.2.1.3 Zellzahlbestimmung

Um die Zellzahl zu bestimmen, werden die Zellen zunächst, wie zuvor beschrieben (s.o. 2.2.1.2 Passagieren der Zellen), trypsiniert und zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das so entstandene Zellpellet in 1 ml (entsprechend der Größe die Pellets ggf. anpassen) Zellkulturmedium aufgenommen und die Zellen durch resuspendieren vereinzelt. Anschließend wird ein Teil der Zellsuspension entnommen und erneut 1:10 in der entsprechenden Menge Zellkulturmedium verdünnt. Zur Bestimmung der

Zellzahl werden 10 µl der Verdünnung entnommen und zum Zählen in die Zählkammer gegeben. Es werden vier Großquadrate ausgezählt und so die Zellzahl pro 1 ml bestimmt. Hierzu wird folgende Formel verwendet: Zellzahl / 4 (Anzahl der Großquadrate) * 10 (Verdünnungsfaktor) * 10000 (Volumen der Zählkammer).

2.2.1.4 Kryo-Konservieren (Gefrierdauerkulturen)

Für das Kryo-Konservieren der Zellen werden diese, wie zuvor beschrieben, trypsiniert, zentrifugiert und die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer bestimmt (s.o. 2.2.1.2 Passagieren und 2.2.1.3 Zellzahlbestimmung). Anschließend wird die Zellsuspension erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in Einfriermedium (gekühlt auf 4°C) aufgenommen. Je Kryoröhrchen sollte die Zellzahl zwischen ca. 1,5 – 2 x 10⁶ Zellen/ml betragen. Die genaue Zellzahl pro Kryoröhrchen richtet sich nach den Wachstumseigenschaften der jeweiligen Zelllinie. Jedes Röhrchen wird mit 1 ml der Suspension befüllt, zunächst in einem Einfrierbehälter (Mr. Frosty) bei -80°C (über Nacht; Kühlrate 1°C pro Std.) eingefroren und anschließend zwecks Lagerung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

2.2.1.5 Auftauen

Zum Auftauen der Kryo-Konservierung werden die Röhrchen zunächst aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und in lauwarmem Wasser aufgetaut. Der Prozess des Auftauens sollte dann gestoppt werden, wenn noch ein kleiner Kern der Zellsuspension gefroren ist. Zu diesem Zeitpunkt sollte die Zellsuspension aufgenommen und in ein mit 5 ml Zellkulturmedium (4°C) befülltes 15 ml Reaktionsgefäß überführt werden. Die Zellen werden anschließend zentrifugiert (s.o. 2.2.1.2 Passagieren und 2.2.1.3 Zellzahlbestimmung), der Überstand wird verworfen, das Zellpellet in maximal 1 ml vorgewärmten Zellkulturmedium (37°C) aufgenommen und in eine entsprechend vorbereitete Zellkulturflasche überführt.

2.2.1.6 Durchführung und Hintergrund der HPV-PCR

Um in den verwendeten Zelllinien HPV-DNA nachzuweisen, wurde eine hierfür spezifische PCR durchgeführt. Bei der HPV-PCR werden spezifische Teile des viralen Genoms mit Hilfe der Primer GP5+ und GP6+ amplifiziert und bilden ein Produkt von 141 Basenpaaren. Das Produkt kann anschließend mittels einer Gelelektrophorese dargestellt werden. Hierfür werden je Zelllinie circa 1 x 10⁵ Zellen in PBS aufgenommen und für 8 min bei 95°C inkubiert. Anschließend werden die Zellen bei einer Amplitude von 50 für 5 Sek. sonifiziert und abschließend 5 Sek. bei

Raumtemperatur zentrifugiert (13000 rpm / Heraeus Fresco). 1,5 µl der Lösung werden nun als Substrat (Probe) in einem Gesamtvolumen von 15 µl eingesetzt (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Pipettierschema der HPV-PCR

Reagenz	Volumen [µl]
HPLC-H₂O	5,2
Primermix (GP5+/GP6+)	0,8
Mastermix (TopTaq)	7,5
Probe	1,5

Als Kontrollen werden 1,5 µl HPLC-H₂O (Negativkontrolle) sowie 1,5 µl DNA-Lösung einer HPV-positiven Zelllinie (Positivkontrolle) verwendet. Für die HPV-PCR wird das folgende Programm verwendet (siehe Tabelle 13):

Tabelle 13: Programm der HPV-PCR

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	94	3 min	1
Denaturierung	94	30 Sek.	35
Primerhybridisierung	45	40 Sek.	35
Elongation	72	1 min	35
Finale Elongation	72	10 min	1
Abkühlung	12	halten	∞

2.2.1.7 Polyacrylamid-DNA-Gelelektrophorese

Um die PCR-Produkte zu identifizieren, wird eine Gelelektrophorese durchgeführt. Bei der Gelelektrophorese werden die Proben entsprechend ihrer Länge elektrophoretisch aufgetrennt. Es wurden 10%ige Polyacrylamidgele angefertigt (siehe Tabelle 14) und die Proben wie folgt pipettiert:

Tabelle 14: Pipettierschema Polyacrylamid-DNA-Gelelektrophorese

Reagenz	Volumen
APS (6 %)	16 µl
ddH₂O	14,4 ml
PAA (40 %)	5 ml
50 x TAE-Puffer	400 µl
TEMED	16 µl

10 µl der Proben wurden jeweils mit 2 µl 6x Gel Loading Dye Blue gemischt und auf das Gel aufgetragen. Zur Bestimmung der relativen Mobilität wurde als Standard der Low-Molecular-Weight-DNA-Ladder gewählt. Der Lauf wurde bei 150 V für 45 min durchgeführt. Anschließend erfolgt eine Midori Green Färbung (20 min) zur Visualisierung der Banden. Eine Dokumentation der Ergebnisse wurde mittels des ChemiDoc unter UV-Licht durchgeführt.

2.2.2 Induktion des Hypoxiesignalwegs

Die Zelllinien wurden im RPMI-Vollmedium (s. 2.1.2) kultiviert und bei 37°C und einer Gasatmosphäre von 5% CO₂ unter normoxischen (21% O₂) oder hypoxischen Bedingungen (Hypoxiekammer, 1% O₂ für 24 Stunden) kultiviert. Die chemische Induktion der Hypoxie erfolgte durch Zugabe von 150 µM DFO (s. 2.1.2) für 1-48 Stunden (Zeitreihenexperiment). DFO ist ein Hypoxie-Mimetikum, das zur Stabilisierung des Hypoxia Inducible Factor 1 (HIF-1) eingesetzt wird. DFO stabilisiert HIF-1 durch die Hemmung der PHDs, die HIF-1 für gewöhnlich für den Abbau markieren. Der Mechanismus, der durch DFO initiierten Inhibition, basiert auf der Chelatbildung von Fe²⁺, das an PHD gebunden ist und für die enzymatische Aktivität benötigt wird.

2.2.2.1 Erstellen von HNSCC-Zelllysaten

Zur Erstellung von Zellextrakten, wird eine definierte Zellzahl auf 3,5 cm oder 6 cm Petrischalen, je nach Versuchsaufbau, ausgesät und bei 37°C unter entsprechenden Versuchsbedingungen in Zellkulturmedium kultiviert. Nach Erreichen der gewünschten Konfluenz (ca. 70-80 %) bzw. dem Versuchsende werden die Zellen 1mal mit 1x PBS gewaschen. Es erfolgt die Zugabe von einer definierten Menge (5 µl pro cm²) des Lysepuffers und das Abschaben der Zellen mit Hilfe eines Plastikschabers (Zellscraper) von der Oberfläche der Petrischale. Das so entstandene Lysat wird in ein 1,5 ml Safe Lock Protein-low bind Reaktionsgefäß überführt, anschließend sonifiziert (Amplitude 100%, Zyklus 0,5, 15 Sek. bei RT) und ggf. bis zur Versuchsdurchführung gelagert (-20°C).

2.2.2.2 Durchführung und Hintergrund des BCA-Assay

Zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration wird ein BCA - (Bicinchoninic Acid) Assay durchgeführt. Dieser dient der photometrischen Bestimmung des Gesamtproteingehalts in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,5 µg - 1,5 mg pro ml. In dieser Reaktion reagieren zweiwertige Kupferionen quantitativ mit dem Protein zu

einwertigen Kupferionen. In Verbindung mit der Bicinchoninsäure ergeben diese einen violetten Farbstoff. Die photometrische Auswertung der Absorption erfolgt bei einer Wellenlänge von 562 nm.

Für die Durchführung des BCA-Assay wird zunächst der Standard zur Erstellung einer Eichgeraden wie folgt pipettiert (siehe Tabelle 15):

Tabelle 15: Pipettierschema Eichgerade BCA-Assay

Konzentrationsreihe [$\mu\text{g/ml}$]	Lysepuffer [μl]	BSA (in H_2O) [μl]
2000	80	20 aus 10 mg/ml-BSA-Stock
1000	180	20 aus 10 mg/ml-BSA-Stock
500	100	100 aus 1000 $\mu\text{g/ml}$
250	100	100 aus 500 $\mu\text{g/ml}$
125	100	100 aus 250 $\mu\text{g/ml}$
62,5	100	100 aus 125 $\mu\text{g/ml}$
0	100	-

Anschließend werden je 25 μl des Standards beginnend bei der Konzentration 0 $\mu\text{g/ml}$ im Doppelwert in eine 96-well Platte aufgetragen. Folgend wird die Probe mit Lysepuffer 1:10 verdünnt und ebenfalls 25 μl pro well im Doppelwert aufgetragen und je 200 μl der zuvor gemischten BCA-Reagenz (50 Teile Pierce® BCA Protein Assay Reagenz A: Bicinchoninsäure und 1 Teil Pierce® BCA Protein Assay Reagenz B: Kupfersulfat) in jedes well pipettiert. Es folgt eine Inkubationszeit von 20-30 min bei einer Temperatur von 37°C und die anschließende Messung im Platten-Spektralphotometer (Nanoquant, Infinite M200pro) bei einer Wellenlänge von 562 nm. Die Auswertung der Messung und die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt mit Hilfe des Programms Excel.

2.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

2.2.2.3.1 Probenvorbereitung

Für die Gelelektrophorese wird eine Probenmenge mit entsprechend 30 μg bzw. 40 μg Protein, je nach Versuchsaufbau, eingesetzt. Die Proben werden vor Beginn zunächst zentrifugiert (21100g für 10 min bei 20°C) und anschließend mit 4 μl 4x SDS-Ladepuffer (Endkonzentration 1 x) sowie Lämmli-Puffer (1 x) gemischt. Die einzusetzende Menge des Lämmli-Puffers richtet sich nach der verwendeten Probenmenge der jeweiligen Proteinsuspension plus der 4 μl 4 x SDS-Ladepuffer, so

dass immer ein Gesamtvolumen von 16 µl entsteht. Anschließend an das Mischen werden die Proben kurz an zentrifugiert und dann für 5 min bei 95°C schüttelnd inkubiert, kurz auf Eis gestellt, erneut an zentrifugiert und dann auf das Polyacrylamidgel aufgetragen.

2.2.2.3.2 Hintergrund und Durchführung SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Größe. Das vertikale Gel ist aufgeteilt in ein Sammelgel und ein Trenngel. Die mit SDS versetzten und somit negativ geladenen monomeren (β -Mercaptoethanol reduziert die Disulfidbrücken) und gestreckten Peptidketten wandern im elektrischen Feld Richtung Anode. Die SDS-PAGE wurde in dieser Arbeit mit Hilfe des BioRad Mini-Protean Tetra Cell System durchgeführt. Dafür werden die Apparaturen entsprechend den Herstellerangaben aufgebaut und das Trenn- bzw. Sammelgel gegossen. Begonnen wird mit dem Trenngel (siehe Tabelle 16).

Tabelle 16: Trenngel, 12 %

Reagenz	Volumen
APS (6 %)	160 µl
ddH₂O	9,8 ml
PAA (40 %)	6 ml
TEMED	16 µl
4 x Trenngelpuffer	5 ml

Das Gel wird zwischen die dafür vorgesehenen Glasplatten pipettiert und mit Ethanol (100 %) überschichtet. Nach ca. 30 min ist das Gel auspolimerisiert. Das Ethanol wird abgegossen und Rückstände mit einem Filterpapier vorsichtig entfernt. Anschließend wird das Sammelgel entsprechend gemischt (siehe Tabelle 17).

Tabelle 17: Sammelgel, 4 %

Reagenz	Volumen
APS (6 %)	115 µl
ddH₂O	6,4 ml
PAA (40 %)	1 ml
TEMED	15 µl
4 x Sammelgelpuffer	2,5 ml

Das Sammelgel wird luftblasenfrei auf das Trenngel pipettiert. Der Kamm (ggf. vorher mit APS befeuchtet) wird sofort gesetzt. Erneut lässt man das Gel ca. 30 min

auspolymerisieren. Ist das Gel vollständig auspolymerisiert wird es in die Elektrophoresekammer eingespannt, mit 1 x Lämmli-Puffer bis zur Markierung und zwischen den Platten übergossen. Der Kamm wird entfernt und die entsprechenden Proben mit der Pipette in die Taschen pipettiert. Der Gellauf, zur Auftrennung der Proteine, erfolgt bei ca. 150 V für ungefähr 70 min (je nach Geschwindigkeit) bis die Proben den Rand des Gels erreicht haben.

2.2.3 Western Blot mit HNSCC-Zelllysaten

2.2.3.1.1 *Immundetektion & „Strippen“ der Membran:*

Das Semi-Dry-Elektroblot-Verfahren wird genutzt, um die über die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran zu transferieren. Benötigt werden hierfür zwei Whatmanpapiere und eine Nitrocellulosemembran in der Größe eines Trenngels. Die Papiere und die Membran werden zuvor ungefähr 5 min in einem methanolhaltigen Transferpuffer (siehe Tabelle 4) inkubiert. Der Aufbau zum Blotten ist wie folgt: Anode – Whatmanpapier, Membran, Trenngel, Whatmanpapier – Kathode. Luftblasen sollten vermieden oder durch vorsichtiges „Herausrollen“ mit einer Glaspipette beseitigt werden, um einen gleichmäßigen Proteintransfer zu gewährleisten. Das Blotten erfolgt bei 1,5 mA/cm² oder 10 V für 50 min. Zwecks Überprüfung eines erfolgreichen Proteintransfers, wird die Membran mit Ponceau-rot-Färbelösung (Inkubation 5-10 min) gefärbt, mit VE-H₂O gewaschen und im ChemiDoc™ XRS+ Imager visualisiert. Das anschließende Entfernen der Färbung erfolgt mit VE-H₂O, welches mit 0,5 M NaOH versetzt wurde. Es erfolgt anschließend nochmals ein Waschschriff mit VE- H₂O und die Inkubation in 5 % Milchpulver in TBST (MTBST) für 60 min bei RT, um unspezifische Proteinbindestellen zu vermeiden. Zur Detektion der spezifischen Proteine wird die Membran mit einer spezifischen Antikörper-Lösung (siehe 2.2.3.1.2 Durchführung des Western Blot mit HNSCC-Zelllysaten) inkubiert. Es folgt hierzu ein Waschschriff (1 x 5 min TBST, 2 x 5 min TBS), wenn der Antikörper in BSA verdünnt wird. Die Bindung des antigenspezifischen, unmarkierten Primär-Antikörpers erfolgt (mit Ausnahme β -Tubulin/ β -Actin, Inkubation in 5% MTBST für 1-2 h) ü.N. bei 4°C auf einem „Tamelroller“. Es folgt ein Waschschriff (1 x 5 min TBST, 2 x 5 min TBS) und die Inkubation mit den entsprechenden HRP-konjugierten sekundären Antikörpern (siehe Tabelle 18) für ca. 1 h bei RT unter Schütteln. Man spricht hier von einer indirekten Markierung, da der sekundäre markierte Antikörper an den konstanten Teil des an das Protein gebundenen Primärantikörpers bindet [52].

Tabelle 18: Sekundär-Antikörper Western Blot

Sekundär-Antikörper	Verdünnung
Anti-mouse IgG-HRP	1:6000 in 0,5 % BSA-TBST
Anti-rabbit IgG-HRP	1:6000 in 0,5 % BSA-TBST

Es folgt ein Waschschrift (1 x 5 min TBST, 2 x 5 min TBS). Die Markerbanden können anschließend mit einem Leuchtstift (Diversivied Biotech) markiert werden. Je nach verwendetem Antikörper wird als Substrat zur Entwicklung entweder das BioRad-Substrat oder die Immobilon Western Reagenz verwendet. Die Substrate werden jeweils im Mischverhältnis 1:1 pipettiert und gleichmäßig auf der Membran verteilt und nach entsprechender Inkubationszeit wurden die Proteinbanden im ChemiDoc™ XRS+ Imager visualisiert. Um die Western-Blot-Membran einer weiteren Detektion mit einem anderen Antikörper zu unterziehen, wird diese dem sog. „Strippen“ unterzogen. Das „Strippen“ der Membran dient dazu, die auf der Membran gebundenen Antikörper zu lösen und ermöglicht so einen erneuten Proteinnachweis mit einem anderen Antikörper [52]. Die Membran wird hierzu kurz in TBST gewaschen und dann in „Stripping-Lösung I“ inkubiert (15 min). Erneut kurz in TBST gewaschen und mit „Stripping-Lösung II“ inkubiert (15 min). Der Nachweis eines weiteren Proteins kann dann wie zuvor beschrieben durchgeführt werden.

2.2.3.1.2 Durchführung des Western Blot mit HNSCC-Zelllysaten:

Zellextrakte wurden nach einmaligem Waschen der Zellen (mit 1x PBS) mittels Lysepuffer (1mM Tris/HCl pH 7.5, 2 % SDS, 2mM EDTA, 20mM NaF) generiert, anschließend sonifiziert (100%, cycle 0,5) und zentrifugiert (21100xG für 10 min bei 20°C). Die Proteinkonzentration wurde mittels Pierce™ BCA Protein Assay Kit bestimmt und es wurden 30 der 40 µg Protein auf 10 % und 12 % Polyacrylamid-SDS-Gelen separiert und auf Nitrocellulose Membranen transferiert. Primärantikörper gegen HIF-1α (1/600 verdünnt in 2 % BSA/TBST), die hydroxylierte Form von HIF-1α (1/600 verdünnt in 2 % BSA/TBST), PHD2/EGLN1 (1/1000 verdünnt in 2 % BSA/TBST) wurden benutzt und mit dem entsprechenden respektiv HRP-konjugierten sekundären Antikörper detektiert/inkubiert. Immun-Star™ WesternC™ Chemilumineszenzsubstrat wurde zur Visualisierung der Proteinbanden in einem ChemiDoc™ XRS+ Imager benutzt. Zur Ermittlung des Molekulargewichts der Proteinbanden wurde der ColorPlus™ Prestained protein marker (Spektrum 7-175 kDa) benutzt. Die Proteinexpression wurde für jeden Blot (jeweils n=3) quantifiziert und auf das β-

Tubulin oder β -Actin Signal normiert (monoclonal anti- β -tubulin antibody clone TUB 2.1; 1/10000 verdünnt in 5 % Milch/TBST; β -Actin (8H10D10) Mouse mAb; 1/10000 verdünnt in 5 % Milch/TBST).

2.2.4 Proteasom und PHD Inhibition

Untersuchung der hydroxylierten Form von HIF-1 α nach Inhibition der PHDs mit Dimethyloxalylglycine (DMOG) (1.5 mM) und blocken der proteasomalen Degradierung des Proteins mit MG-132 (40 μ M): Hierzu wurden die Zellen in 3,5 cm Petrischalen ausgesät und inkubiert bis diese eine Konfluenz von 60-70 % erreichten. Nach einem Wechsel des Zellkulturmediums wurden die Zellen für 10 Stunden (h) mit dem Membran-permeablen Proteasominhibitor MG-132 und oder dem PHD-Inhibitor DMOG (beide von Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) kultiviert. Die Proteinextraktion und der Western Blot erfolgten wie zuvor beschrieben. Unbehandelte Zellen wurden jeweils als Kontrolle verwendet.

2.2.5 Immunfluoreszenzfärbung an fixierten HNSCC-Zelllinien

Die Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und inkubiert bis sie eine Konfluenz von nahezu 80 % erreicht haben. Es erfolgte eine Behandlung mit und ohne DFO (150 μ M für 6 bis 48 h). Die Zellen wurden anschließend mit 4 % Formaldehyd (FA) fixiert (15min RT) und 3x mit PBS/100mM Glycin gewaschen. Nun wurden die Deckgläschen mit Primärantikörpern gegen HIF-1 α (clone 54 1/150 verdünnt in 1 % BSA/TBST) behandelt. Ein Anti-mouse IgG (whole molecule) F(ab')₂ fragment-Cy3 Antikörper (1/800 verdünnt in 1 % BSA/TBST) wurde benutzt, um den Primärantikörper zu visualisieren. Um das Transmembran-Glykoprotein E-Cadherin anzufärben, wurde ein Alexa Fluor® 488 Mouse konjugierter anti-E-cadherin Antikörper benutzt (1/150 verdünnt in 1 % BSA/TBST). Die Kernfärbung erfolgte mittels Roti®-Mount FluorCare DAPI. Die Evaluierung der Immunfluoreszenz-Färbungen wurde mit Hilfe des Mikroskops Leica DM2500, der DFC425C Kamera und dem dazugehörigen Programm Leica Application Suite X (LAS X) durchgeführt.

2.2.6 Immunhistochemie an FFPE-Schnitten

2.2.6.1 *Verwendete Gewebeproben & Auswahl des Patientenkollektivs*

Für die Immunhistochemischen Färbungen wurden retrospektive Patientenproben verwendet. Es handelt sich um Gewebeproben, die am Klinikum für HNO-Heilkunde

des Universitätsklinikums Gießen entnommen wurden. Die Gewebeproben stammen aus chirurgischen Eingriffen mit dem Zweck der Entfernung von Kopf-Hals-Tumoren. Das entnommene Gewebe wurde mittels Formalin fixiert und abschließend in Paraffin eingebettet (FFPE). In der Pathologie des Universitätsklinikums Gießen wurden die Proben diagnostischen Untersuchungen unterzogen. Es handelt sich demnach um routinemäßige Proben, die zur Diagnosesicherung bei Tumor-OPs anfallen und für die nach der Untersuchung durch die Pathologie keine Verwendung mehr besteht. Basierend auf einer Einverständniserklärung des Patienten wurden die Proben nach abschließender Diagnostik und Archivierung zu Zwecken der Forschung freigegeben. Hierzu liegt ein positives Votum der Ethikkommission vor (siehe Aktenzeichen: 151/11, 296/11 & 137/16). Einige der Patienten wurden zum Zweck der Diagnostik einer Fluoro-2-desoxy-D-glucose Positronenemissionstomographie (FDG-PET/CT) Untersuchung unterzogen. Diese liefert funktionelle Informationen über die Stoffwechselaktivität eines Tumors. FDG wird hierbei als radioaktives Nukleotid zur onkologischen Bildgebung verwendet. Maligne Tumoren gehen häufig mit einer Erhöhung des Glukosemetabolismus einher. Dies spiegelt sich in einer vermehrten FDG Metabolisierung in diesen Tumoren wider [43].

2.2.6.2 Zusammensetzung des Patientenkollektivs

In das Kollektiv wurden Patienten mit OPSCC der Tumorgröße T1 bis T4 einbezogen (n=121). Die Gruppe wurde weiter unterteilt in HPV-getriebene (n=49, davon erhielten 29 Patienten ein PET-CT) und HPV-negative OPSCC (n=72, davon erhielten 52 Patienten ein PET-CT) Entität unter Berücksichtigung eines eindeutig positiven (n=43) bzw. negativen (n=63) p16 Status (siehe Abb. 4). Diese Patientenfälle wurden weiter unterteilt nach nodulärer Metastasierung in N0 (nicht nodulär metastasiert,) und N+ (nodulär metastasiert). Die HPV-positive Gruppe umfasst 10 Patienten mit N0 Status und 33 Patienten mit N+ Status. Die HPV-negative Patientengruppe ist unterteilt in 22 Patienten mit N0 Status und 41 Patienten mit N+ Status.

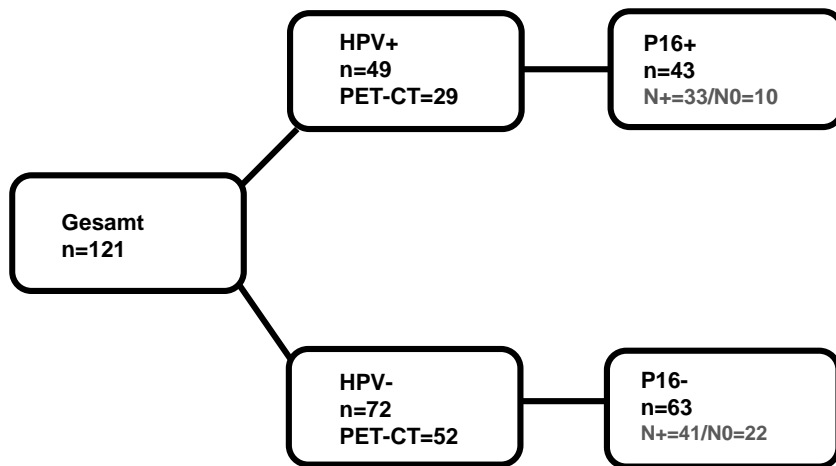


Abbildung 4: Zusammensetzung des Patientenkollektivs.

2.2.6.3 *18F-FDG PET/CT-Bildgebung und Analyse*

Die Bildgebung erfolgte mit einem Siemens Biograph 6 PET/CT-Scanner (Siemens, Forchheim, Deutschland) in der Nuklearmedizin durch zwei Nuklearmediziner. Nach einer minimalen Fastenzeit von 6 h und einem Blutzuckerspiegel von weniger als 140 mg/dl erhielten die Patienten eine gewichtsangepasste intravenöse Injektion von 3-3,5 MBq/kg ¹⁸F-FDG. ¹⁸F-FDG wurde mit einem Zyklotron bei AAA (Advanced Accelerator Applications Germany GmbH) hergestellt. Die Patienten erhielten 1 ml/kg nichtionisches intravenöses Kontrastmittel; das Kontrastmittel wurde mit einer Rate von 2-3 ml/s i.v. infundiert. Die PET-Scans wurden im dreidimensionalen (3D) Modus mit einer Erfassungszeit von 3 min für jede Bettposition aufgenommen. Die Bilder wurden mit dem echten X-Algorithmus rekonstruiert (4 iterative Schritte, 8 Teilmengen, 168 Matrix, Gaußscher Filter). Zwei Nuklearmediziner analysierten die Bilder mit Hilfe eines multimodalen Arbeitsplatzes (Siemens). Die relevanten bildgebenden Parameter, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, waren das maximale und mittlere standardisierte Aufnahmevermögen (SUV_{max}, SUV_{mean}) von ¹⁸F-Fluordesoxyglucose in einer Region of Interest (ROI) sowie die Gesamt-Läsion-Glykolyse (TLG). SUV_{max} stellt dabei nur den aktivsten Teil des Tumors dar und spiegelt nicht das Tumolvolumen wider, sondern ist ein reproduzierbarer und leicht zu bestimmender Parameter. Der SUV_{mean} hingegen kann durch interindividuelle Analysen variieren und durch den Partial-Volume Effect [80] beeinflusst werden. TLG wird durch Multiplikation von MTV (Summe des Volumens der Voxel mit SUV über einem Schwellenwert von 50 % des SUV_{max} in einem ROI) und SUV_{mean} erhalten und ist somit ein Marker, der

sowohl die Größe des Tumors als auch seine Aktivität berücksichtigt. Die PET/CT-Lymphknotenbefunde und ihre SUVmax-Werte wurden den Halsbereichen im rechten und linken Hals zugeordnet und in einem Bewertungsblatt dokumentiert, das topographisch nach der Nomenklatur der Halsdissektion definiert ist.

2.2.6.4 Immunhistochemische Färbung

Gewebeproben wurden zunächst auf das Vorhandensein von Tumorgewebe geprüft. Zu diesem Zweck erfolgte ein Abgleich mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Schnitten. Die HE-Färbung dient in der Pathologie als Übersichtsfärbung.

2.2.6.5 Anfertigung der FFPE-Schnitte

Es wurden 2,5 µm Schnitte mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms (Leica) angefertigt. Die Schnitte wurden auf Objektträger (Fa. Menzel, Superfrost Plus) aufgebracht und im Trockenschrank getrocknet (ü.N. bei 37°C).

2.2.6.6 Durchführung der Färbung

Zu Beginn der Färbung werden die Schnitte entparaffiniert und rehydriert. Dies dient der Entfernung des Einbettungsmediums. Dazu werden die Schnitte einer absteigenden Alkoholreihe unterzogen:

- 2x Xylol für je 10 min
- 2x Ethanol 100 % für je 5 min
- 2x Ethanol 96 % für je 5 min
- 1x Ethanol 70 % für 5 min
- Kurz in VE-H₂O

Anschließend werden die Schnitte zur wärmeinduzierten Antigen-Demaskierung in die Target Retrieval Lösung (DAKO pH 6, 45 min, im Dampfgerät) gegeben und wie folgt weiter verfahren:

- 30 Minuten bei RT stehen lassen
- 5 Minuten in 1:1 Mischung aus TRS und TBST stellen
- 3x waschen in einer Küvette mit VE-H₂O, je 2 min
- Hydrophobe Barriere auftragen (Fettstift, Sigma Aldrich)
- 20 min. in 3 % H₂O₂ inkubieren (Inaktivierung der endogenen Peroxidase)
- 2x2 min. mit VE-H₂O waschen in Küvette
- 5 min. mit TBST-Puffer waschen

- Blockierung unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen): 2 % BSA in TBST, für ca. 1 h

Anschließend wird der entsprechende Primärantikörper (in 1 % BSA) in der jeweiligen Verdünnung hinzugegeben. Es folgt eine Inkubation ü.N. bei 4°C in einer feuchten Kammer. Die Schnitte werden zusätzlich mit einer Folie abgedeckt. Nach der abgeschlossenen Inkubation folgen 2 Waschschrte (TBST, jeweils 5 min) und die Zugabe des entsprechenden Sekundärantikörpers (anti-mouse-Biot. AK (1:180) oder anti-rabbit-Biot. AK (1:160) in TBST) für 2 h bei RT auf dem Schüttler. Es folgen erneut 2 Waschschrte (TBST, jeweils 5 min). Während der Inkubationszeit wurde ein ABC-Mix (Avidin-Biotin-Komplex) vorbereitet. Der ABC-Mix dient der späteren Visualisierung (Inkubation 40 min, RT). Avidin besitzt Bindestellen für Biotin, so können mehrere Biotinmoleküle miteinander vernetzt werden. Eine Peroxidase ist wiederum an das Biotin gekoppelt, so dass durch eine Peroxidasereaktion die Reaktion eines löslichen Substrats zum unlöslichen Farbstoff entsteht. Bindet der Sekundärantikörper an den Primärantikörper entsteht die spezifische Färbung. Es folgen erneut 2 Waschschrte (TBST, jeweils 5 min). Für die enzymatische Detektion wird das NovaRED™ Substrat von VECTOR (8 bis 15 min, je nach AK) verwendet. Es entsteht ein rotes Reaktionsprodukt. Es folgen 2 Waschschrte (2x VE-H₂O, jeweils 5 min). Zur Kernfärbung wird Hämalaun (50 Sek. für Kernfärbung) genutzt. Das „Bläuen“ erfolgt für 10 min in leicht fließendem kalkhaltigem Wasser. Abschließend werden die gefärbten Schnitte mittels aufsteigender Alkoholreihe dehydriert

- 1x Ethanol 70 % für 1 min
- 2x Ethanol 96 % für je 2 min
- 2x Ethanol 100 % für je 2 min
- 2x Xylol für je 3 min

und eingedeckelt (Roti-Histokitt, Carl Roth). Das Aushärten erfolgt über Nacht.

2.2.6.7 Auswertung

Die immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurden mit Hilfe eines LEICA DM2500-Mikroskop 3x unabhängig voneinander ausgewertet. Hierbei wurde einerseits die Intensität der Färbung und andererseits der prozentuale Anteil gefärbter Tumorzellen ausgewertet. Die Ergebnisse der drei Wertungen wurden hierbei gemittelt. Die Färbeintensität wurde in die Kategorien ungefärbt, schwach, mittel und stark gefärbt

unterteilt und der prozentuale Anteil gefärbter Tumorzellen wie folgt unterteilt: 0 %, <33 %, 33-66 % und >66 % für HIF-1 α und GLUT-1, 0 %, <33 %, 33-59 %, \geq 60 % für CA9 sowie <25 %, 25-50 %, 50-75 %, >75 % für LDHA. Die Intensität und prozentuale Färbung wurden einerseits einzeln betrachtet als auch für diese Kategorien jeweils Punktwerte von 1 bis 4 vergeben. Aus beiden Kategorien wurde abschließend ein Produkt gebildet. Der maximal zu erreichende Punktwert beträgt somit 16. Dieses Produkt entspricht der finalen Expression des jeweiligen gefärbten Markers (HIF-1 α , GLUT-1, CA9, LDHA).

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des Programms IBM SPSS (Version 24) und dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel 2010 durchgeführt. Das Ergebnis aller Tests wurde in der vorliegenden Arbeit als statistisch signifikant gewertet, wenn der p-Wert \leq 0,05 entsprach. Die Auswertung von Kreuztabellen und des statistischen Zusammenhangs zweier Testvariablen erfolgte mit dem Chi-Quadrat Test nach Pearson. Hierfür wurde ein Erwartungswert von \geq 5 vorausgesetzt. Bei einem kleineren Erwartungswert wurde der exakte Test nach Fisher herangezogen. Analysen des Überlebens wurden mittels Logrank-Tests und nach Kaplan Meier durchgeführt. Das Gesamtüberleben wurde ab dem Diagnosezeitpunkt analysiert. Des Weiteren wurde der Mann-Whitney-U-Test zur Testung der Verschiedenartigkeit der zentralen Tendenzen zweier unabhängiger Stichproben verwendet, wenn die Voraussetzungen für einen t-Test nicht erfüllt waren.

2.2.7 Funktioneller Assay (Scratch Assay)

Das Migrations- und Proliferationspotential der verwendeten HNSCC-Zelllinien wurde mittels eines "Scratch"- (Wundheilungs-) Assays ermittelt. Dafür wurden die Zellen in 3,5 cm Petrischalen ausgesät. Nachdem diese eine Konfluenz von 100 % erreichten, wurden die Zellen mit Hilfe einer 10 μ l Pipettenspitze, in Form mehrerer Kreuze „gescratcht“ und 3x mit 1x PBS gewaschen, um gelöste Zellen zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in RPMI1640 Zellkulturmedium für 48 Stunden mit und ohne 150 μ M DFO oder 10nM HIF-1 α siRNA kultiviert. Die Wundheilung wurde mit Hilfe eines Inversmikroskops (Leica DMI3000B) bildlich zu folgenden Zeitpunkten nach dem „scratchen“ festgehalten: 0, 3, 6, 8, 10, 24 und 48 h unter DFO Behandlung oder 0, 2, 5, 7, 24 h unter siRNA Behandlung (siehe 2.2.7 siRNA-Transfektion). Die Analyse der Wundheilungsfläche wurde mit Hilfe eines Bildanalyseprogramms (ImageJ 1.49) durchgeführt. Jedes Experiment erfolgte dreimal als biologische Wiederholung

und sechs bzw. drei Bilder im Falle der siRNA Experimente wurden für jeden Zeitpunkt analysiert.

2.2.8 siRNA-Transfektion

2.2.8.1 Hintergrund

2.2.8.2 Mechanismus der RNA Interferenz (RNAi)

Eine Transfektion mit small-interfering-RNA (siRNA) führt üblicherweise zum Abbau der sequenzhomologen zellulären mRNA. Die kurzen RNAs sind die Schlüsselmoleküle für den Abbau der Ziel mRNA (hier: HIF-1 α mRNA). Die siRNA-Moleküle bilden mit verschiedenen Proteinen einen RNA-Protein-Komplex, den RNA-induced silencing complex (RISC), der für die eigentliche Spaltung der Ziel-RNA verantwortlich ist. Dies geschieht dadurch, dass durch ATP abhängiges Entwinden der doppelsträngigen siRNA aus RISC ein Komplex entsteht, der durch spezifische Basenpaarung an seine komplementäre mRNA binden kann und so deren Abbau einleitet [9, 58]. Der Nachweis der Funktionalität der siRNA kann sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene erfolgen. Der Nachweis der Funktionalität der siRNA erfolgte in dieser Arbeit durch eine quantitative RT-PCR (siehe 2.2.9.4 qRT-PCR), bei der die spezifische Reduktion auf mRNA-Ebene (hier von HIF-1 α) nachgewiesen wird. Der Nachweis der Reduktion des HIF-1 α Proteins erfolgte in dieser Arbeit im Western Blot (Durchführung siehe 2.2.3 Western Blot mit HNSCC Zelllinien) über einen HIF-1 α spezifischen Antikörper von BD [9].

2.2.8.3 Durchführung

Die HNSCC-Zelllinien wurden mit siRNA gegen HIF-1 α mRNA transfiziert (Silencer® Select Pre-Designed & Val. siRNA (Hif-1A), 5 nmol). Die siRNA wird vor Gebrauch gelöst und verdünnt. Hierzu wird das Tube zunächst anzentrifugiert und dann die 5 nmol siRNA in 50 μ l Nuklease-freiem Wasser resuspendiert. Dies entspricht einer Konzentration von 100 μ M. Daraus wird mittels 1:10 Verdünnung mit Nuklease-freiem Wasser eine „Arbeitsverdünnung“ von 10 μ M hergestellt (10 μ M „Arbeitsverdünnung“ ist equivalent zu 10 pmol/ μ l). Die Transfektion erfolgt über einen Zeitraum von zwei Tagen. Am ersten Tag werden die Zellen (diese sollten für die Transfektion 60-80 % konfluent sein) mit dem siRNA-lipid Komplex versetzt. Hierzu wird das RPMI-Vollmedium zunächst abgesaugt und durch neues ersetzt. Die siRNA-lipid Komplexe werden, wie der unten aufgeführten Tabelle zu entnehmen ist angesetzt, zu den Zellen gegeben und ü.N. (24 h) bei 5 % CO₂ und 37°C inkubiert.

Tabelle 19: Pipettierschema siRNA-lipid Komplexe

Schritte	Komponente	10nM/Well	
1.) Verdünnen von Lipofectamine RNAiMAX Reagent in Medium	Medium (Opti-MEM!)	130 µl	Lipofectamine und siRNA getrennt ansetzen!
	Lipofectamine RNAiMAX Reagent	7,8 µl	
2.) Verdünnen der siRNA in Medium	Medium (Opti-MEM!)	130 µl	Erst im 3ten Schritt zusammenführen!
	siRNA (10µM working stock)	2,6 µl (26 pmol)	
3.) Zugabe von verd. siRNA zu verd. Lipofectamine	verd. Lipofectamine	130 µl	
	verd. siRNA	130 µl	
→ Inkubieren für 5 (bis 20) Minuten bei Raumtemperatur			

Zur Transfektion wird Lipofectamine® RNAiMAX eingesetzt. Es handelt sich hierbei um eine proprietäre, RNAi-spezifische kationische Lipid-Formulierung, die für die Einführung von siRNA und miRNA in alle Zelltypen spezifisch ist. Nach einem Wechsel des Mediums werden die Zellen für weitere 24 h unter den oben genannten Bedingungen kultiviert und können dann für entsprechende Folgeexperimente (Scratch-Assays/qRT) verwendet werden.

2.2.9 RNA-Extraktion aus Zellen

2.2.9.1 Isolation

Die Zellen werden 1 x mit PBS gewaschen und in einer Mischung aus RLT-Puffer (QIAGEN RNeasy Mini Kit) mit 1%igem β -Mercaptoethanol mit Hilfe eines Zellschabers gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Das Volumen des Puffers richtet sich hierbei nach der Zellzahl (bis $5 \cdot 10^6$ Zellen entsprechen 350 µl RLT-Puffer und $5 \cdot 10^6$ bis $1 \cdot 10^7$ Zellen entsprechen 600 µl RLT-Puffer). Die Probe wird nun ca. 1 min gevortext bis keine Zellklümpchen mehr sichtbar sind. Es folgt das Homogenisieren der Probe. Hierzu wird das Lysat in ein QIAshredder Spin Column überführt und für 2 min zentrifugiert (Heraeus Fresco 21, max. rpm). Die Isolation der RNA erfolgt entsprechend der Vorgaben des RNeasy Kits von Qiagen. Die in 30-50 µl RNasen-freiem H₂O eluierte RNA kann anschließend bei -80 °C gelagert werden.

2.2.9.2 *Konzentrations- & Qualitätsbestimmung*

Die Konzentrationsmessung der isolierten RNA wird mit dem NanoDrop 2000 von ThermoFisher SCIENTIFIC durchgeführt. Es werden 1,5 µl der isolierten RNA-Probe auf die entsprechende Messvorrichtung pipettiert und analysiert. Als Referenz dient RNasen-freies H₂O. Die Bestimmung der Konzentration erfolgt über die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm und wird mittels der zum NanoDrop 200 gehörigen Software ermittelt. Um die Qualität für die isolierte RNA zu ermitteln, wird der Quotient der Absorption bei 260 und 280 nm bestimmt. Ebenfalls kann ein RNA Nano Chip von Agilent genutzt werden, um die Konzentration und die Reinheit der RNA zu ermitteln. Das Auftragen der RNA auf den Nano Chip erfolgt mittels Herstellerprotokoll. Die Analyse des Nano Chips wird mit dem Agilent 2100 Bioanalyser durchgeführt. Eine durch kapillarelektrophoretische Auftrennung ermittelte RNA-Integritäts-Nummer ermöglicht es, die Integrität der RNA zu beurteilen. Es können Werte zwischen 0 und 10 ermittelt werden, wobei 10 die höchste Qualität darstellt. Mit Hilfe dieser Methode können RNA-Isolate reproduzierbar verglichen werden.

2.2.9.3 *cDNA-Synthese*

cDNA (complementary DNA) ist ein einzelsträngiges DNA-Molekül, das sich komplementär zur Sequenz eines RNA-Moleküls verhält. Durch das Enzym Reverse Transkriptase kann mRNA in cDNA umgeschrieben werden. Es werden zunächst Verdünnungen der RNA hergestellt (Endkonzentrationen 200 ng/µl und 400 ng/µl). Benötigt wird ein 10 µl Mischung 1 µg RNA, 5 µl 2xRT-Puffer, 0,5 µl reverser Transkriptase und DNA-freiem H₂O. Es wird für jede Probe eine Negativkontrolle mitgeführt (ohne Enzym). Die cDNA-Synthese wird im Thermocycler nach unten aufgeführtem Programm durchgeführt. Die Proben können vorübergehend bei -4°C und längerfristig bei -20°C gelagert werden.

Tabelle 20: Programm der cDNA-Synthese

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3
Temperatur	37 °C	95 °C	4 °C
Zeit	60 min	5 min	∞

2.2.9.4 qRT-PCR

Die qRT-PCR bietet die Möglichkeit der Quantifizierung in Echtzeit. Diese erfolgt mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen am Ende jedes Zyklus. Die Fluoreszenz nimmt hierbei proportional zur Menge der PCR-Produkte zu. Dies macht die Quantifizierung möglich [30]. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde SYBR-green verwendet. Der Ct-Wert (cycle threshold = Schwellenwert) gibt den Zyklus an, bei dem die exponentielle Vervielfältigung der Produkte über einen spezifischen Grenzwert der Fluoreszenz angestiegen ist. Für die Durchführung der qRT-PCR wird die cDNA in einer Endkonzentration von 5 ng/μl (1:20 verdünnt in HPLC-H₂O) eingesetzt. Die Konzentration der Primer beträgt 10 pmol/μl (1:1 fwd. und rev. Primermischung). Die Proben werden in Triplikaten untersucht. Hierzu wird ein Mastermix angelegt.

Tabelle 21: Mastermix

Reagenz	Stock	Endkonzentration	Volumen [μl]
SYBR Select Master Mix (2x)	2x	1x	7,5
HPLC-H₂O	1x	1x	6
Template	5 ng/μl	0,33 ng/μl	1
Primermix	2000 nM	332 nM	0,5

Bei jedem Durchgang wird die Probe ohne Enzym und eine Negativkontrolle (ohne RNA) mitgeführt. Je well (96-well Platte) erfolgt ein Auftrag von 15 μl Probe. Abschließend wird die Platte mit einer Folie verschlossen, zentrifugiert (Plattenzentrifuge, 2500 rpm) und die qRT-PCR im StepOne Plus Real-Time PCR-System (siehe Tabelle 22) durchgeführt.

Tabelle 22: Schritte der qRT-PCR

Schritt	Temperatur °C	Zeit	Zyklen
Holding Stage	50	2 min	1
	95	2 min	1
Cycling Stage	95	15 sec.	40
Annealing Temp.:		15 sec.	
HIF1α	60		
GLUT1	60		
E-Cadherin	60	1 min	
E6	60		

Material & Methoden

E7	60		
E6 star1	58		
	72		
Melt Curve Stage	95	15 sec.	1
	70	1 min	1

3 Ergebnisse

3.1 HPV-DNA-Nachweis in HNSCC Zelllinien

Vier der verwendeten HNSCC Zelllinien (UM-SCC-47, 93-VU-147T, UPCI:SCC090 und UPCI:SCC152) sind als positiv für den HPV Typ 16 beschrieben [46, 81, 86, 97] (UM47)), während die verbleibenden zwei Zelllinien (UM-SCC-6 und UT-SCC-33) als HPV-negativ charakterisiert sind und keine virale DNA aufweisen [46, 97]. Um den beschriebenen HPV-Status zu bestätigen, wurde mit einer „HPV-PCR“ die DNA der viralen Gen-Region L1 mittels der Primer GP5+ und GP6+ amplifiziert [21]. Anschließend erfolgt die Auftrennung der Amplifikate mittels einer Gelelektrophorese (Abb.5). Die erwartete Größe eines HPV-spezifischen PCR-Produkts liegt bei 150 Basenpaaren (bp). Die HNSCC Zelllinien UM-SCC-47, 93-VU-147T, UPCI:SCC090 und UPCI:SCC152 zeigen DNA-Banden der Größe von 150 bp, was der Positivkontrolle entspricht. In Reaktionen mit DNA der HNSCC Zelllinien UM-SCC-6 und UT-SCC-33 konnte kein HPV-spezifisches PCR-Produkt amplifiziert werden.

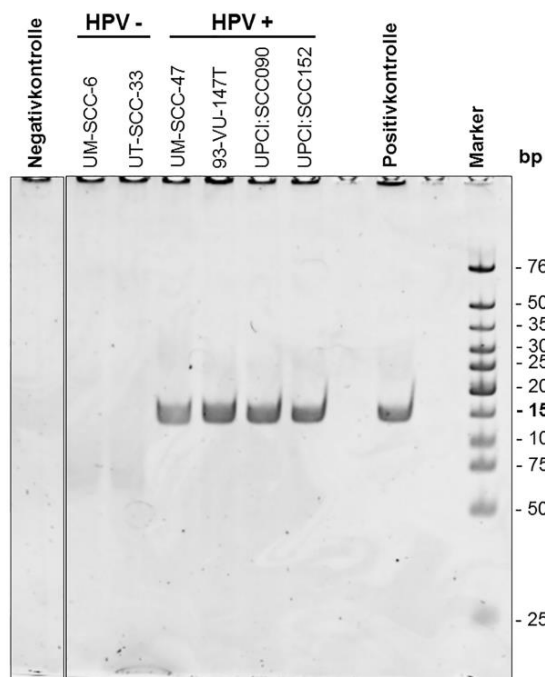


Abbildung 5: HPV-DNA-Nachweis mittels PCR.

10% PAA-Gel nach elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Amplifikate. Die für einen positiven HPV-Status erwarteten PCR Produkte für das GP5+/GP6+ Primerpaar mit einer Länge von 150 bp (siehe Positivkontrolle) sind bei den HNSCC Zelllinien UM-SCC-47, 93-VU-147T, UPCI:SCC090 und UPCI:SCC152 nachweisbar, nicht jedoch bei den Zelllinien UM-SCC-6 und UT-SCC-33.

3.2 Aktivierung des HIF-1 Signalwegs in HPV-positiven und HPV-negativen HNSCC-Zelllinien

HPV ist ursächlich für eine steigende Anzahl von Kopf- und Halskarzinomen, die sich durch eine besondere Tumorbiologie auszeichnen. HIF-1 beeinflusst die Einleitung und das Fortschreiten der Karzinogenese, wobei HIF-1 ein potenzielles „target“ für die

HPV-Onkoproteine darstellt (siehe auch 1.5). Im Folgenden wurde untersucht, ob HPV die Expression von HIF-1 α in HNSCC-Zelllinien beeinflusst.

3.2.1 Erhöhte HIF-1 α und PHD2 Proteinlevel in HPV-positiven HNSCC Zelllinien unter Normoxie

In vier HPV-positiven und zwei HPV-negativen Zelllinien wurde die HIF-1 α und PHD2 Proteinexpression unter Normoxie untersucht (Abb. 6). Die HPV-negativen HNSCC Zelllinien (UT-SCC-33 und UM-SCC-6) zeigen eine geringe HIF-1 α Proteinexpression. In den Zellextrakten der HPV-positiven Zelllinien (93-VU-147T, UM-SCC-47, UPCI:SCC090 und UPCI:SCC152) konnten hingegen starke HIF-1 α Signale detektiert werden. Die Quantifizierung des HIF-1 α Signals in den HPV-positiven Zelllinien relativ zur β -Aktin (β -actin)-Bande ergab im Vergleich zu den HPV-negativen HNSCC Zelllinien 7,2-fach höhere HIF-1 α Proteinlevel ($P=0,002$). Unter Normoxie zeigen die verwendeten HPV-positiven HNSCC-Zelllinien ebenfalls 2,7-fach erhöhte PHD2 Proteinlevel verglichen mit den HPV-negativen Zelllinien ($P=0,027$). Zusätzlich zeigen die HPV-positiven Zelllinien potenzielle PHD2 Degradationsprodukte, die mit dem Antikörper im Western-Blot reagieren und in der Gelelektrophorese schneller (unterhalb) als die Hauptbande migrieren (Abb. 6 #).

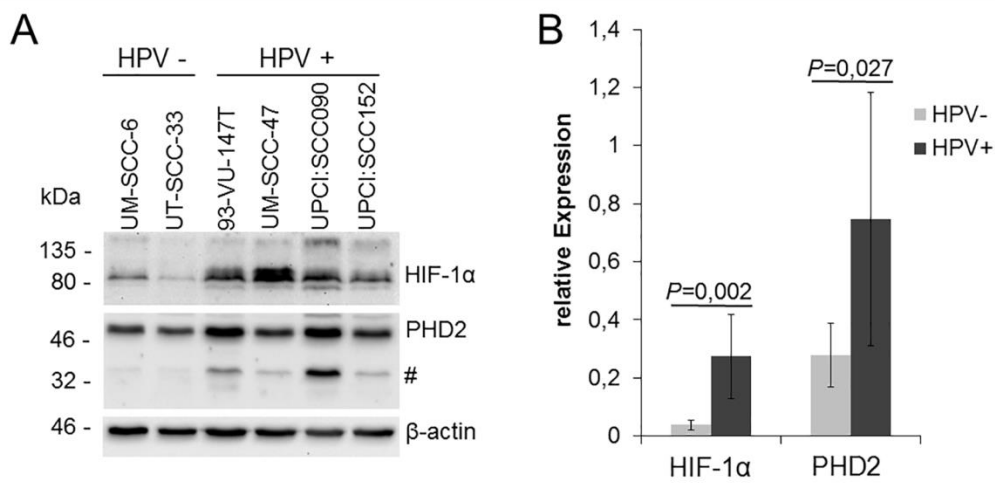


Abbildung 6: HIF-1 α und PHD2 Proteinlevel in HPV-positiven und -negativen HNSCC Zelllinien unter Normoxie.

A: Western Blot von Zellextrakten HPV-negativer (UM-SCC-6 und UT-SCC-33) und -positiver (93-VU-147T, UM-SCC-47, UPCI:SCC090 und UPCI:SCC152) HNSCC Zelllinien kultiviert unter Normoxie (21% O₂). Die HPV-positiven HNSCC-Zelllinien zeigen unterhalb der Hauptbande auffällige Proteinbanden (#), die mit dem PHD2-Antikörper reagieren. B: Quantifizierung der im Western Blot (A) detektierten HIF-1 α und PHD2 Proteinbanden. Die Daten wurden auf das β -actin Signal normiert und sind als Mittelwert +/- Standardabweichung dargestellt (n=3), P: P-Wert (T-Test) [41].

3.2.2 Erhöhte HIF-1 α und PHD2 Proteinlevel als Antwort auf Hypoxie in HPV-positiven HNSCC-Zelllinien

In vier HPV-positiven und zwei HPV-negativen Zelllinien wurde die HIF-1 α und PHD2 Proteinexpression unter Normoxie und Hypoxie untersucht (Abb. 7). HPV-positive und HPV-negative HNSCC-Zelllinien zeigen eine Akkumulation der HIF-1 α und PHD2 Proteinlevel unter Hypoxie (Abb. 7 A). Die Quantifizierung der relativen HIF-1 α Proteinexpression zeigt in den HPV-positiven HNSCC-Zelllinien unter Hypoxie einen

Anstieg auf ein höheres Niveau verglichen mit den HPV-negativen Zelllinien (Abb. 7 B; 18,0 vs. 6,3; $P=0,003$). Die absolute Zunahme der HIF-1 α Expression von Normoxie zu Hypoxie ist ebenfalls im Vergleich in den HPV-positiven HNSCC-Zelllinien höher (14,6 vs. 5,3; $P=0,008$), obwohl die relative Zunahme bezogen auf das Aktin-Signal nahezu gleich ist ($P=0,472$). Die PHD2 Proteinexpression steigt in den HPV-positiven Zelllinien im Vergleich zu den HPV-negativen Zelllinien ebenso unter Hypoxie auf ein höheres Niveau (Abb. 7C, 2,4 vs. 1,5; $P=0,013$).

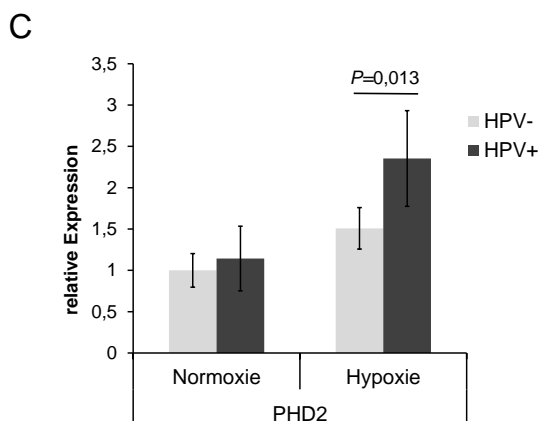
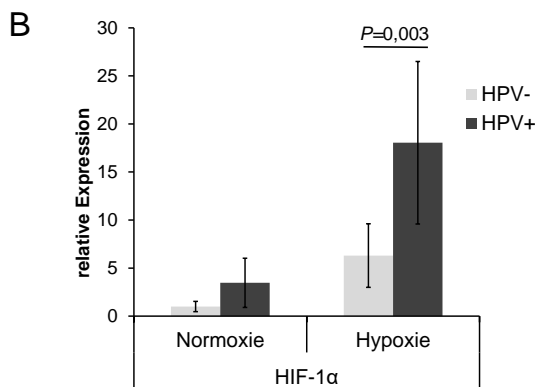
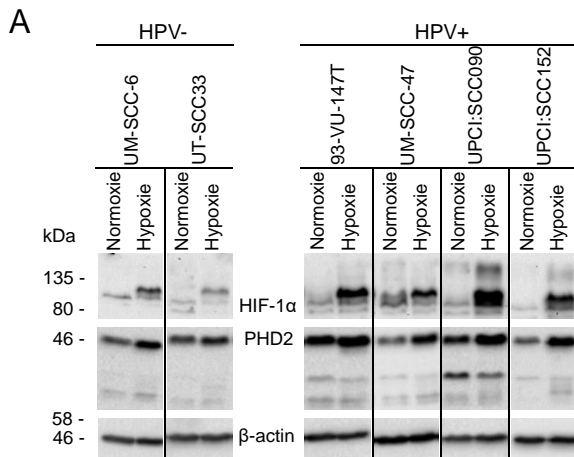


Abbildung 7: Erhöhte HIF-1 α und PHD2 Proteinlevel als Antwort auf Hypoxie in HPV-positiven HNSCC-Zelllinien.

A: Western Blot von Zellextrakten HPV-negativer (UM-SCC-6 und UT-SCC-33) und HPV-positiver (93-VU-147T, UM-SCC-47, UPCI:SCC090 und UPCI:SCC152) HNSCC Zelllinien kultiviert unter Normoxie (21% O₂) und Hypoxie (1 % O₂). **B, C:** Quantifizierung der im Western Blot detektierten basalen HIF-1 α und PHD2 Proteinlevel. Die Daten wurden auf das β -actin Signal normiert. Die niedrigsten HIF-1 α und PHD2 Werte wurden für die Darstellung auf den Wert von 1 gesetzt und sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt (n=3, P: P-Wert (T-Test) [41]).

Die absolute Zunahme der PHD2 Expression von Normoxie zu Hypoxie ist ebenfalls in den HPV-positiven höher als in den HPV-negativen HNSCC-Zelllinien (1,2 vs. 0,5; $P=0,003$). Zudem ist die relative Zunahme bezogen auf das Aktin-Signal verglichen mit den Normoxiewerten erhöht (2,1 vs. 1,5; $P=0,001$).

3.2.3 Verminderte HIF-1 α Hydroxylierung in HPV-positiven HNSCC-Zelllinien

Unter Normoxie wird HIF-1 α für gewöhnlich mittels PHDs hydroxyliert und stetig durch das Proteasom degradiert. In folgenden Experimenten wurde daher der Hydroxylierungsstatus bzw. die hydroxylierte Form von HIF-1 α untersucht. Dazu wurden dual sowohl die PHDs mittels Dimethylxalylglycine (DMOG) als auch die proteasomale Degradation mit Hilfe von MG-132 in zwei HPV-negativen und zwei HPV-positiven HNSCC-Zelllinien inhibiert (Abb. 8). Die HPV-positiven HNSCC Zelllinien (93-VU-147T und UM-SCC-47) zeigen unter diesen Versuchsbedingungen kein detektierbares Signal im Western Blot unter Verwendung des für hydroxyliertes HIF-1 α spezifischen Antikörpers (Hydroxy-HIF-1 α). In den HPV-negativen Zelllinien (UT-SCC-33 und UM-SCC-6) kann hingegen ein deutliches Signal detektiert werden. Dies steht in Einklang mit der beobachteten HIF-1 α Stabilisierung unter Normoxie (Abb. 6). Unter Inhibition des Proteasoms (MG-132) ist in den HPV-negativen HNSCC-Zelllinien ein starkes Hydroxy-HIF-1 α Proteinsignal detektierbar.

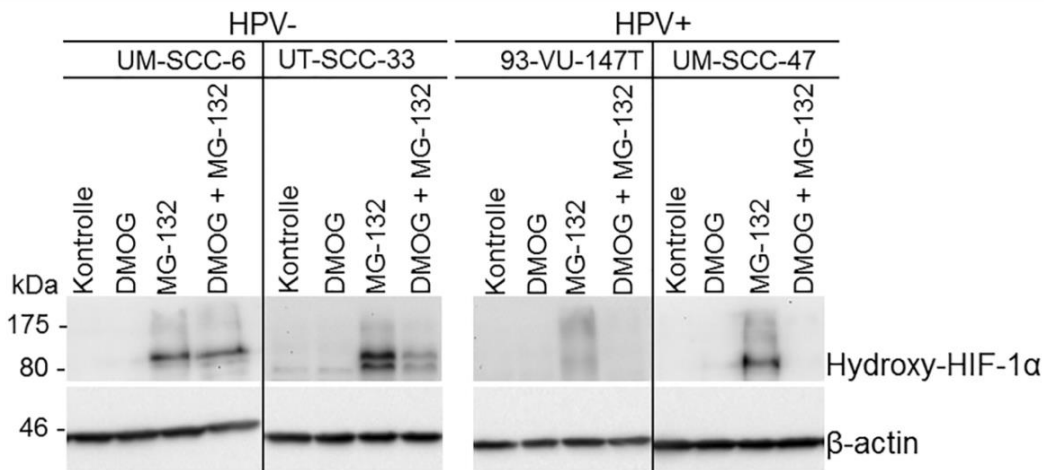


Abbildung 8: HIF-1 α Hydroxylierung in HPV-positiven und –negativen HNSCC-Zelllinien.

Western Blot HPV-negativer (UM-SCC-6 und UT-SCC-33) und HPV-positiver Zelllinien (UM-SCC-47 und 93-VU-147T) kultiviert unter Standard-Kulturbedingungen (Normoxie) und Zugabe von DMOG und MG-132, jeweils allein und in Kombination (n=3). Die unbehandelte Kontrolle und die mit DMOG behandelten Zelllinien zeigen keine Hydroxy-HIF-1 α Signale. Unter dualer Inhibition der PHDs (DMOG und MG-132) zeigen die HPV-positiven HNSCC-Zelllinien niedrige Hydroxy-HIF-1 α Signale verglichen mit den HPV-negativen Zelllinien [41].

Die HPV-positiven Zelllinien zeigen hingegen unter MG-132 eine niedrige HIF-1 α Hydroxylierung, auf die die geringere Proteinakkumulation des für hydroxyliertes HIF-1 α spezifischen Antikörpers deutet. Sowohl für HPV-positive als auch HPV-negative Zelllinien kann unter alleiniger Inhibition der PHDs und in der unbehandelten Kontrollprobe kein Hydroxy-HIF-1 α Proteinsignal nachgewiesen werden, da hier eine Degradation durch das Proteasom weiterhin erfolgt.

3.2.4 Erhöhter Anstieg des HIF-1 α Proteinlevels unter chemischer Induktion in HPV-positiven HNSCC-Zelllinien

Neben einer Hypoxie kann ebenso eine Behandlung mit dem Eisenchelator Deferoxamin (DFO: chemischer Hydroxylase-Inhibitor) eine Aktivierung des HIF-1 α Signalwegs induzieren, ohne dass hierzu hypoxische Bedingungen herrschen müssen.

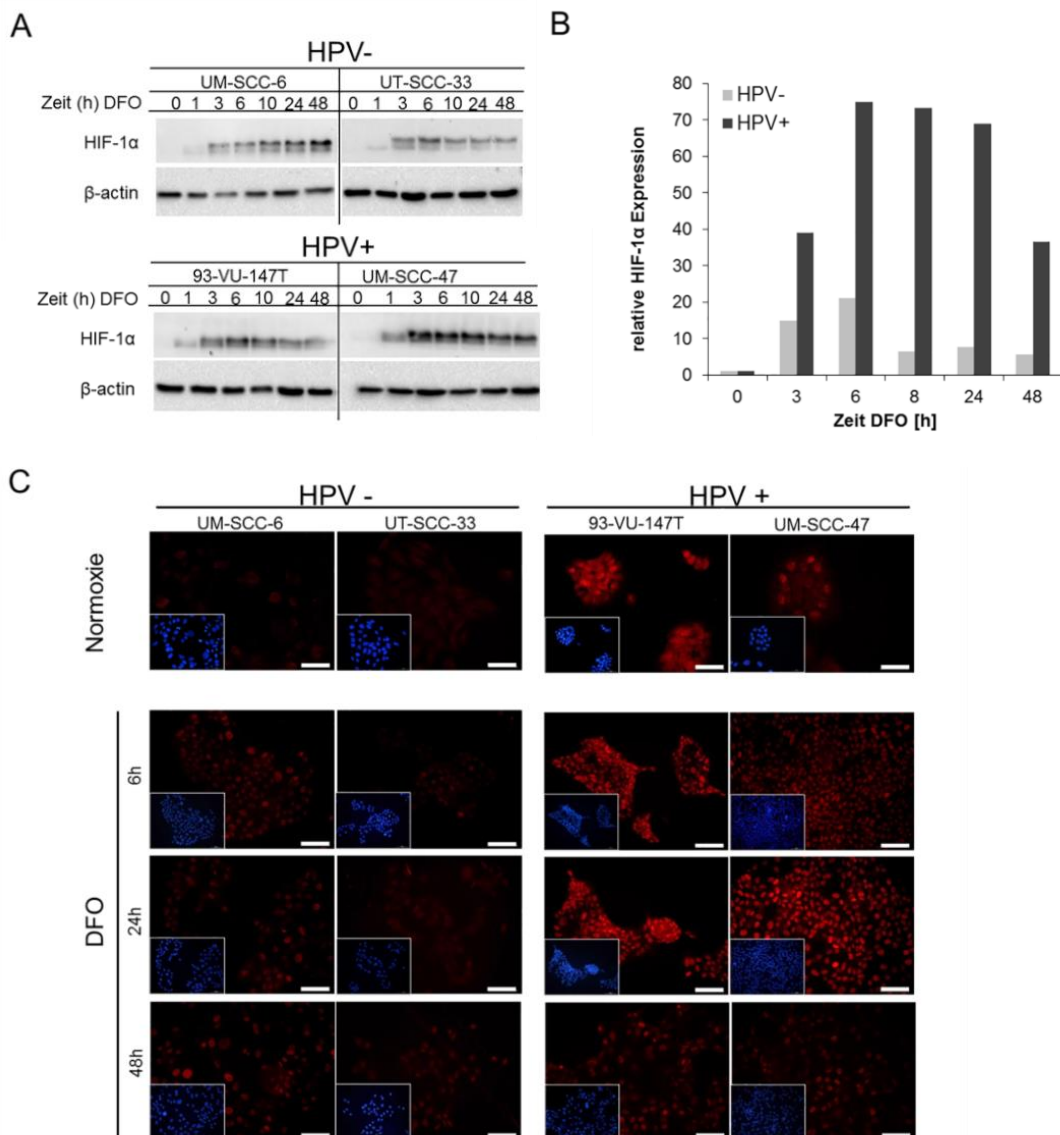


Abbildung 9: Erhöhter HIF-1 α Proteinlevel Anstieg unter chemischer Induktion (DFO) in HPV-positiven verglichen mit HPV-negativen HNSCC-Zelllinien.

Ergebnisse

A: Western Blot HPV-negativer (UM-SCC-6 und UT-SCC-33) und HPV-positiver Zelllinien (UM-SCC-47 und 93-VU-147T). Dargestellt ist die HIF-1 α Proteinexpression zu verschiedenen Zeitpunkten nach chemischer Induktion mittels DFO. **B:** Quantifizierung der im Western Blot detektierten HIF-1 α Proteinbanden. Die Daten wurden auf das β -actin Signal normiert. **C:** Immunfluoreszenz-Färbung HPV-negativer (links) und HPV-positiver (rechts) HNSCC-Zelllinien nach Inkubation mit DFO. Dargestellt ist die HIF-1 α Proteinexpression (rot). Miniaturansichten zeigen jeweils die Kernfärbung (blau) des gleichen Bildausschnitts. Im Vergleich zu den HPV-negativen zeigen die HPV-positiven Zelllinien eine erhöhte basale HIF-1 α Proteinexpression unter Normoxie, sowie einen erhöhten Anstieg des nukleären HIF-1 α Signals nach Inkubation mit DFO. Normoxie: Messbalken = 50 μ m. Hypoxie: Messbalken = 100 μ m. A, C; [41].

Für die folgenden Untersuchungen wurde zunächst die Induzierbarkeit der HIF-1 α Proteinlevel mittels DFO über einen Zeitraum von 48 h getestet. Alle vier verwendeten Zelllinien (UM-SCC-6, UT-SCC-33, 93-VU-147T und UM-SCC-47) zeigen einen Anstieg des HIF-1 α Signals als Antwort auf die Behandlung mit DFO nach sechs Stunden (Abb. 9 A, B). Um die HIF-1 α Expression und zelluläre Lokalisation genauer zu betrachten wurden Immunfluoreszenz Färbungen durchgeführt (Abb. 9 C). Die HPV-positiven Zelllinien zeigen in der Immunfluoreszenzfärbung bereits unter Normoxie ein deutliches nukleäres HIF-1 α Signal, während bei den HPV-negativen Zelllinien ein schwächeres Signal zu sehen ist. Eine stärkere Zunahme des HIF-1 α Signals kann ebenfalls in HPV-positiven HNSCC-Zelllinien verglichen mit den HPV-negativen Zelllinien unter der Behandlung mit DFO gezeigt werden.

3.2.5 Verminderte Migration unter chemischer Aktivierung des Hypoxie-Signalwegs in HPV-negativen Zelllinien.

Zur Untersuchung der zellulären Adaptation an Hypoxie und der spezifischen Unterschiede in HPV-negativen und HPV-positiven HNSCC-Zelllinien erfolgten *in vitro* „Migrations- und Proliferations-Assays“ unter chemischer HIF-1 α Induktion mittels DFO (Abb. 10 A). Die Auswertung der Assays zeigt eine durch DFO vermittelte Minderung der Migration und Proliferation in den HPV-negativen Zelllinien (Abb. 10 B, UM-SCC-6: $P < 0,001$, UT-SCC-33: $P = 0,018$).

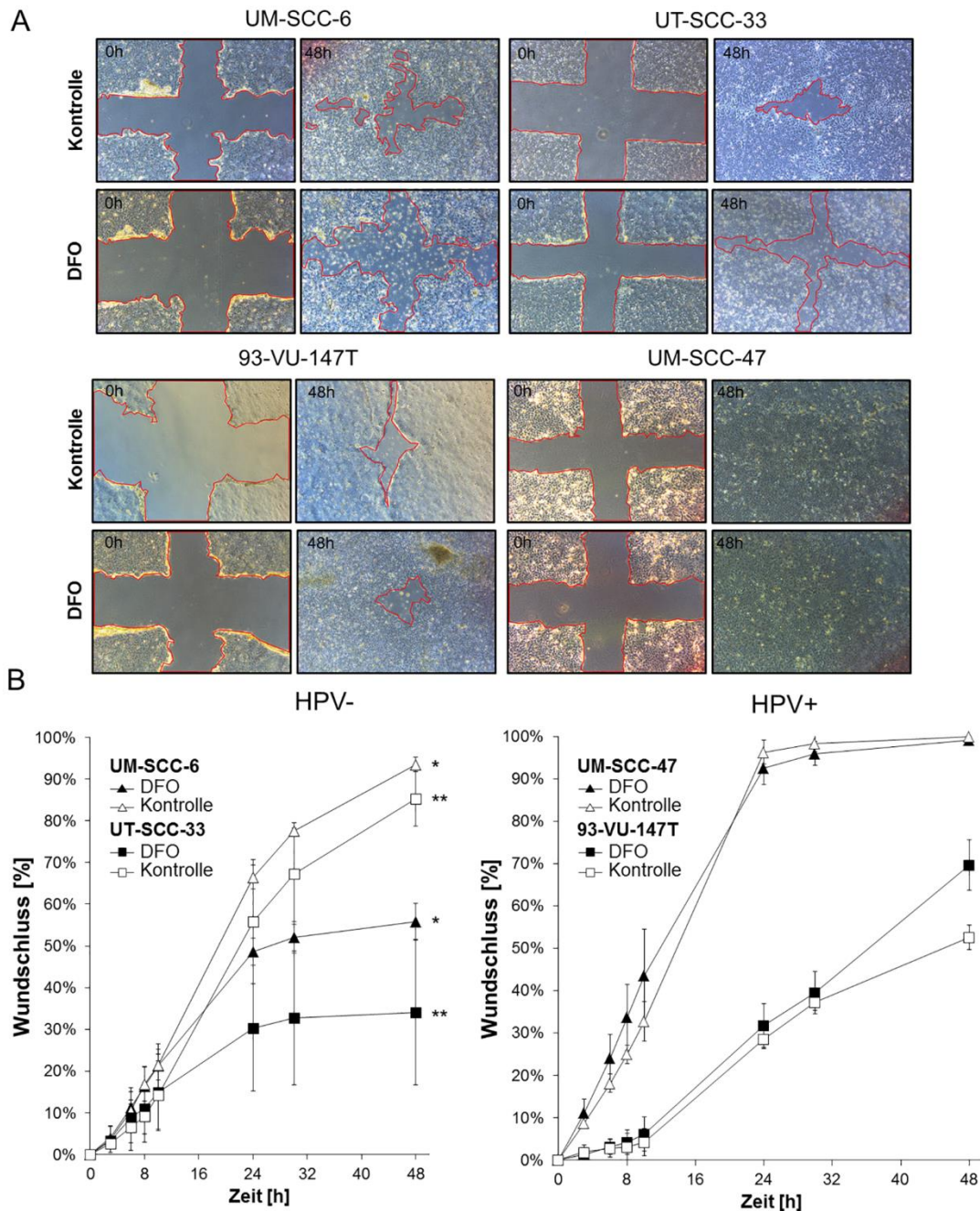


Abbildung 10: Verminderte Migration unter chemischer Aktivierung des Hypoxie-Signalwegs.

Ergebnisse

A: Migrations- und Proliferations-Assay unbehandelt (Kontrolle) und unter chemischer HIF-1 α Induktion (DFO) nach 0 und 24 Stunden. **B:** Dargestellt ist der zeitliche Verlauf des Wundschlusses. Die HPV-negativen Zelllinien (*UM-SCC-6: $P < 0,001$, ** UT-SCC-33: $P = 0,018$) zeigen eine signifikante Verminderung des Migrationspotentials, während die HPV-positiven Zelllinien nicht sichtlich unter DFO Behandlung beeinflusst werden (T-Test (48h): DFO vs. Kontrolle). Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt (n=3). B; [41].

In den HPV-positiven HNSCC-Zelllinien ist hingegen keine verminderte Migration- oder Proliferation zu beobachten.

3.2.6 HIF-1 α Inhibition durch siRNA in HPV-positiven und -negativen HNSCC-Zelllinien

Nachweis der HIF-1 α Inhibition durch siRNA im Western Blot (Abb. 11 A) und qRT-PCR-Versuchen (Abb. 11 B). Nach DFO Behandlung von Zellkulturen ist im Western Blot ein Anstieg des HIF-1 α Proteinlevels sowohl für HPV-positive als auch HPV-negative Zelllinien zu erkennen. Die siRNA Behandlung dagegen führt zu einer Verringerung der HIF-1 α Proteinlevel, was durch eine schwächere Bande im Bereich von 120 kDa zu erkennen ist (Abb. 11 A).

Die relativen HIF-1 α mRNA Level zeigen verglichen mit der Kontrolle eine deutliche Verringerung unter HIF-1 α Inhibition mittels der spezifischen siRNA (Abb. 11 B).

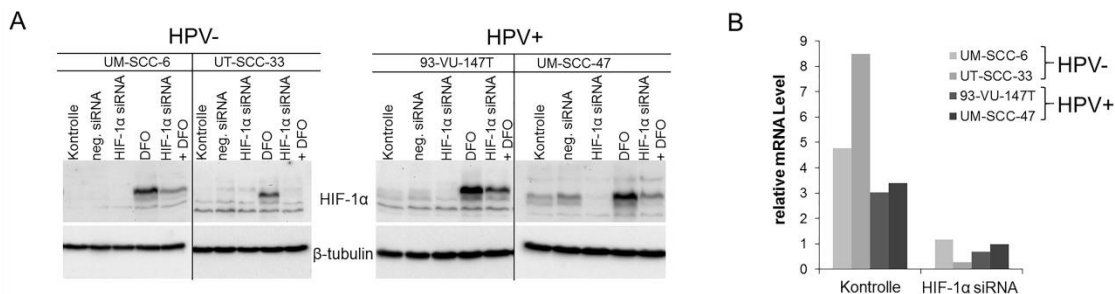


Abbildung 11: HIF-1 α Inhibition durch siRNA in HPV-positiven und -negativen HNSCC-Zelllinien.

A: Western Blot HPV-negativer (UM-SCC-6 und UT-SCC-33) und HPV-positiver Zelllinien (UM-SCC-47 und 93-VU-147T). Dargestellt ist die HIF-1 α Proteinexpression nach chemischer Induktion mittels DFO und Inhibition durch siRNA. **B:** Quantifizierung der relativen HIF-1 α mRNA Level (gemessen durch qRT-PCR). Die Daten wurden auf das HPRT Signal normiert.

3.2.7 Verminderte Migration unter HIF-1 α Inhibition in HPV-positiven HNSCC-Zelllinien durch siRNA

Zur Untersuchung der spezifischen Unterschiede in HPV-negativen und -positiven HNSCC-Zelllinien erfolgten neben DFO Aktivierung des Hypoxie-Signalwegs *in vitro* „Migrations-Assays“ unter HIF-1 α spezifischer Inhibition durch siRNA (Abb. 12 A, B). Es wurde eine Inhibition von HIF-1 α durchgeführt, um dessen Einfluss auf das

Ergebnisse

Migrations- und Proliferationsverhalten der Zelllinien zu ermitteln. Die HPV-positiven HNSCC-Zelllinien zeigen eine Inhibition der Migration und der Proliferation unter der Verwendung von HIF-1 α spezifischer siRNA (Abb. 12 B, UM-SCC-47: $P=0,012$, 93-VU-147T: $P=0,034$). Die HIF-1 α spezifische siRNA hat hingegen keinen Einfluss auf das Migrations- und Proliferationsverhalten der HPV-negativen Zelllinien.

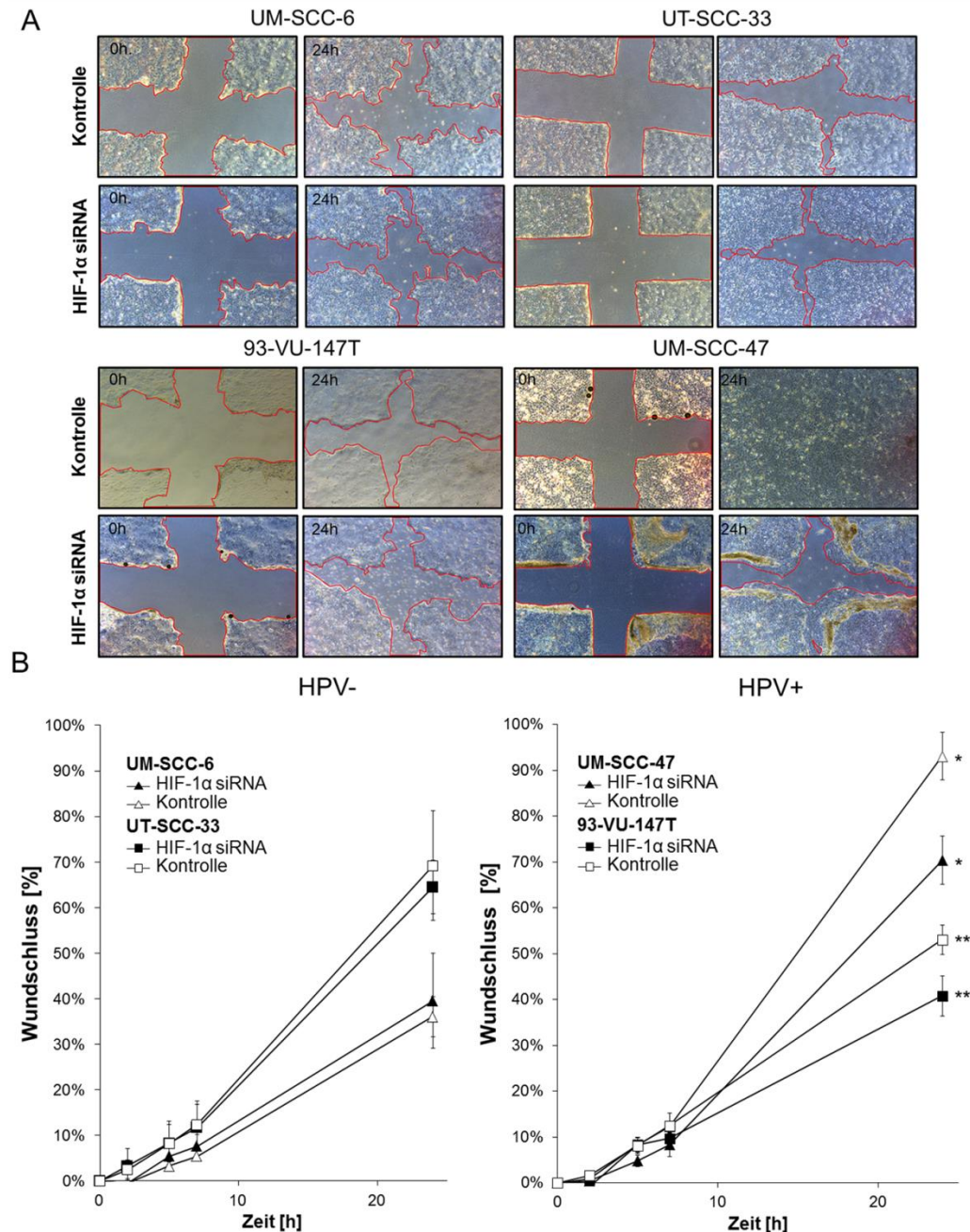


Abbildung 12: Verminderte Migration unter HIF-1 α Inhibition durch siRNA in HPV-positiven HNSCC-Zelllinien.

A: Migrations- und Proliferations-Assay unter HIF-1 α Inhibition mittels spezifischer siRNA. **B:** Dargestellt ist eine signifikante Verminderung des Migrationspotentials in den HPV-positiven Zelllinien (*UM-SCC-47: $P=0,012$, **93-VU-147T: $P=0,034$) unter siRNA Behandlung. Das Migrationspotential

Ergebnisse

in den HPV-negativen Zelllinien wird hingegen nicht negativ beeinflusst (T-Test (48h): HIF-1 α siRNA vs. Kontrolle). Die Daten sind als Mittelwert +/- Standardabweichung dargestellt (n=3). B;[41].

3.2.8 Wundschluss-Änderung unter chemischer Aktivierung des Hypoxie-Signalwegs und HIF-1 α Inhibition durch siRNA in HPV-positiven und -negativen HNSCC-Zelllinien

Im Folgenden wurde eine Analyse des prozentualen Anstiegs bzw. der prozentualen Minderung der Wundschluss-Änderung (Behandlung/Kontrolle) unter Behandlung der HNSCC-Zelllinien mit DFO und HIF-1 α Inhibition durch siRNA durchgeführt. HPV-positive und -negative HNSCC-Zelllinien zeigen hinsichtlich der Änderung des Wundschlusses gegenteilige Effekte für die DFO Behandlung (Abb. 13 A). Die HPV-positiven Zelllinien weisen im Vergleich zur Kontrolle einen unbeeinflussten oder sogar leicht verbesserten Wundschluss nach HIF-1 α Aktivierung durch DFO auf. Die HPV-negativen Zelllinien zeigen hingegen eine Verminderung des Wundschluss unter DFO (Abb. 13 A). HPV-positive und -negative HNSCC-Zelllinien zeigen hinsichtlich der Änderung des Wundschlusses ebenfalls gegenteilige Effekte nach einer siRNA Behandlung. Unter HIF-1 α Inhibition weisen die HPV-positiven Zelllinien einen verminderten Wundschluss auf, während die HIF-1 α Inhibition durch siRNA keinen Einfluss auf die HPV-negativen Zelllinien hat (Abb. 13 B).

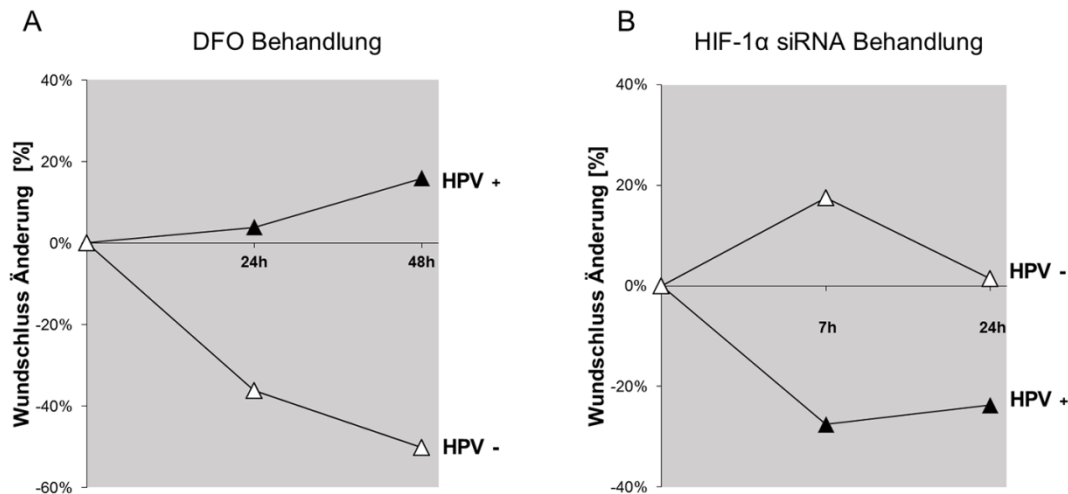


Abbildung 13: Wundschluss-Änderung unter chemischer Aktivierung des Hypoxie-Signalwegs und HIF-1 α Inhibition durch siRNA in HPV-positiven und -negativen HNSCC-Zelllinien.

A: Die Auswertung der Daten hinsichtlich des prozentualen Wundschlusses (prozentualer Anstieg oder prozentuale Minderung der Wundschluss-Änderung (Behandlung/Kontrolle)) zeigt für die HPV-positiven Zelllinien eine unbeeinflusste oder bessere Wundheilung unter HIF-1 α Aktivierung mittels DFO Behandlung, während diese Behandlung hingegen einen negativen Effekt auf die HPV-negativen Zelllinien hat. **B:** Die HPV-negativen Zelllinien zeigen eine unbeeinflusste prozentuale Wundschluss-Änderung (Behandlung/Kontrolle) unter HIF-1 α Inhibition mittels siRNA Behandlung. Diese Behandlung hat jedoch einen negativen Effekt auf die HPV-positiven Zelllinien. A, B;[41].

3.2.9 Reduzierung der membranständigen Expression von E-Cadherin unter HIF-1 α Aktivierung in HPV-positiven HNSCC-Zelllinien

Unter Normoxie zeigen alle untersuchten Zelllinien eine membranständige E-Cadherin Färbung (Abb. 14, obere Bildreihe). Unter Aktivierung des Hypoxie-Signalwegs mittels DFO (48 h) Behandlung ist eine Reduktion des membranständigen E-Cadherins in den HPV positiven HNSCC-Zelllinien zu beobachten (Abb. 14, untere Bildreihe).

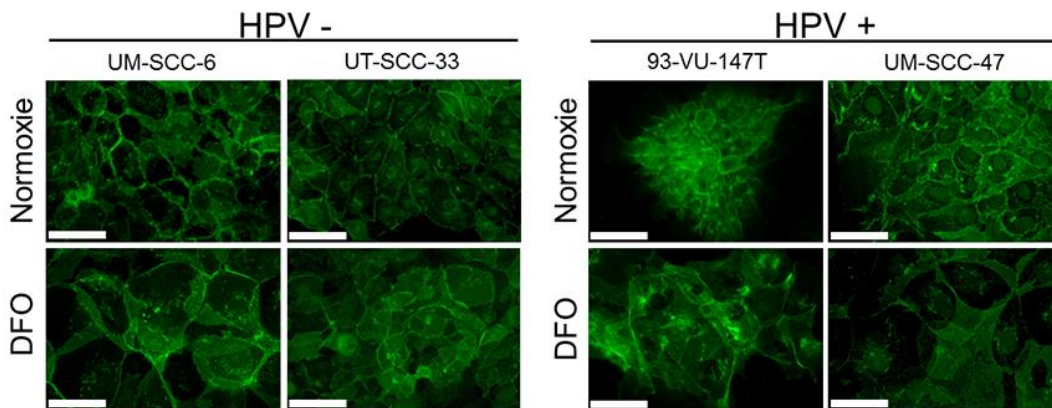


Abbildung 14: Reduzierung der membranständigen E-Cadherin Färbung unter HIF-1 α Aktivierung in HPV-positiven HNSCC-Zelllinien.

Immunfluoreszenzfärbung HPV-negativer (links) und HPV-positiver (rechts) HNSCC-Zelllinien unter Normoxie und nach Aktivierung des Hypoxie-Signalwegs mittels DFO (Inkubation für 48h). Dargestellt ist die E-Cadherin Proteinexpression (grün). Im Vergleich zu den HPV-negativen Zelllinien (UM-SCC-6 und UT-SCC-33), zeigen die HPV-positiven Zelllinien (93-VU-147T und UM-SCC-47) eine verminderte membranständige E-Cadherin Proteinexpression nach Inkubation mit DFO. Messbalken = 50 μ m [41].

3.3 Relative mRNA Level unter Hypoxie in HPV-positiven und –negativen Zelllinien

Die erhöhten HIF-1 α Proteinlevel unter Normoxie und Hypoxie in HPV-positiven verglichen mit HPV-negativen Zelllinien deuten daraufhin, dass die HPV-Onkoproteine eine erhöhte HIF-1 α Induktion initiieren. Daher wurde zum Nachweis der viralen mRNA und der Überprüfung des Einflusses von Hypoxie auf die viralen Onkoproteine eine qRT-PCR der HPV mRNA von E7, E6 und E6*1 in vier HPV-positiven Zelllinien durchgeführt. Die qRT-PCR der HPV mRNA von E7, E6 und E6*1 der HPV-positiven Zelllinien (93-VU-147T, UM-SCC-47, UPCI:SCC90, UPCI:SCC152) bestätigt das Vorhandensein viraler mRNA (Abb. 15). Zudem kann unter Hypoxie ein signifikanter Rückgang der HPV mRNA (E7: $P < 0,001$, E6: $P = 0,004$ und E6*1: $P < 0,001$) beobachtet werden.

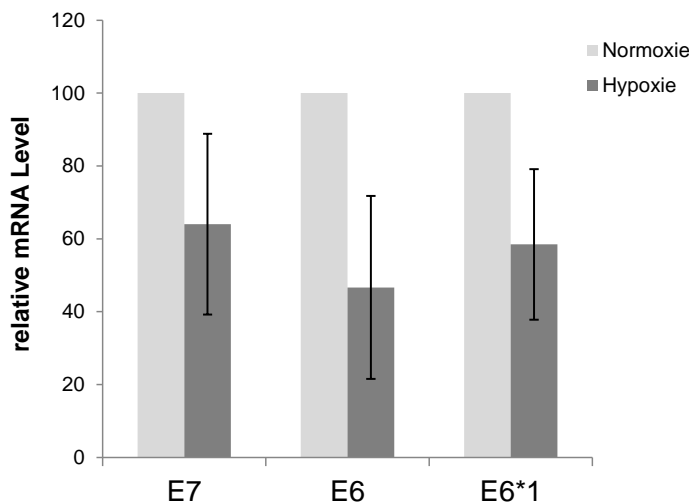


Abbildung 15: Relative mRNA Level unter Hypoxie referenziert auf Normoxie.

HPV-E6, E6*1 & E7 mRNA zeigen im Vergleich zur Normoxie eine signifikante Reduktion unter Hypoxie (93-VU-147T, UM-SCC-47, UPCI:SCC90, UPCI:SCC152). Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung aus 3 Versuchen dargestellt, P -Wert: E7: $P < 0,001$, E6: $P = 0,004$ und E6*1: $P < 0,001$ (T-Test).

Des Weiteren wurden mRNA Analysen für GLUT-1, HIF-1 α und E-Cadherin in den genannten vier HPV-positiven und zwei HPV-negativen Zelllinien (UM-SCC-6 und UT-SCC-33) durchgeführt. Die Zelllinien wurden zuvor unter Hypoxie und Normoxie kultiviert. Die mRNA Level wurden mittels qRT-PCR bestimmt. Hypoxie übt einen Einfluss auf die relativen HIF-1 α mRNA Level verglichen mit den Werten unter Normoxie aus (Abb. 16 A). Die HPV-positiven Zelllinien zeigen im Mittel höhere HIF-

Ergebnisse

1 α mRNA Level unter Hypoxie ($P=0,076$) verglichen mit den HPV-negativen Zelllinien (Abb.16 B). Insgesamt wirkt sich Hypoxie weniger negativ auf die mRNA Level der HPV-positiven Zelllinien aus.

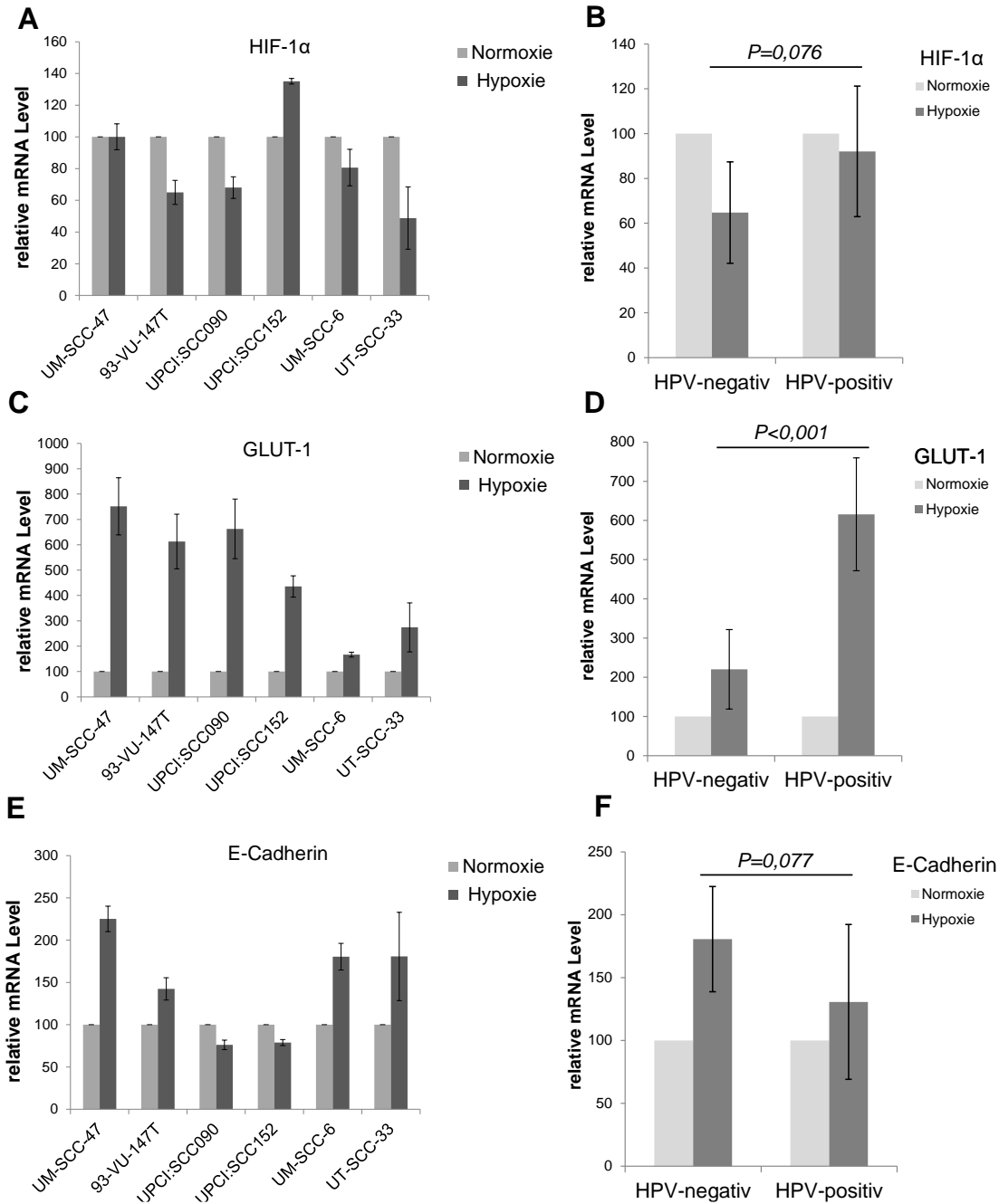


Abbildung 16: Relative mRNA Level unter Hypoxie bezogen auf Werte unter Normoxie. **A, B:** HIF-1 α . **C, D:** GLUT-1. **E, F:** E-Cadherin. Die Daten sind als Mittelwert +/- Standardabweichung aus 3 Versuchen dargestellt, P -Wert (T-Test).

Die Zelllinie UM-SCC-47 zeigt ein gleichbleibendes Level und die Zelllinie UPCI:SCC152 eine Zunahme der HIF-1 α mRNA unter Hypoxie (Abb. 16 A). Des Weiteren sind die GLUT-1 mRNA Level signifikant höher in den HPV-positiven

Ergebnisse

Zelllinien unter Hypoxie ($P < 0,001$) (Abb. 16 C, D). Gegensätzlich hierzu zeigen die HPV-negativen Zelllinien insgesamt unter Hypoxie höhere E-Cadherin mRNA Level ($P = 0,077$) im Vergleich zu den HPV-positiven Zelllinien (Abb. 16 E, F).

Die HPV-negativen Zelllinien zeigen einheitlich einen Anstieg des E-Cadherin mRNA Levels unter Hypoxie. Die HPV-positiven Zelllinien zeigen hingegen sowohl einen Anstieg als auch eine Abnahme des relativen mRNA Levels (Abb. 16 E).

3.4 Metabolische Unterschiede zwischen HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC

Zur Analyse der metabolischen Unterschiede zwischen HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC, wurden neben der zuvor durchgeführten Untersuchung im Zelllinienmodell, retrospektive Patientenproben verwendet. FFPE (Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe) Gewebeproben wurden hinsichtlich der HIF-1 α , GLUT-1, LDHA und CA9 Expression analysiert. Zudem wurde untersucht, ob eine Korrelation der jeweiligen Expression mit dem Gesamtüberleben der Patienten vorliegt.

3.4.1 Patienten- und Tumor-Charakteristika des Untersuchungskollektivs

Es wurden die Parameter Alter (bei Diagnose), Geschlecht, Tabak- und Alkoholkonsum

Tabelle 23: Patienten- und Tumor- Charakteristika des Untersuchungskollektivs

n=106	HPV-negative n=63 (59,4%)		HPV-assoziiert n=43 (40,6%)		P-Wert*	alle	
	Anz. Patienten	%	Anz. Patienten	%		Anz. Patienten	%
Geschlecht							
Männlich	50	47,2	29	27,4	0,167	79	74,5
Weiblich	13	12,3	14	13,2		27	25,5
Alter							
Jung (<60)	25	23,6	14	13,2	0,455	39	36,8
Alt (\geq 60)	38	35,8	29	27,4		67	63,2
Nikotin							
Nichtraucher	11	10,6	22	21,6	<0,001	33	30,8
Raucher	50	49	19	18,6		69	64,7
Alkoholabusus							
Ja	44	46,8	6	6,4	<0,001	50	47,2
Nein	16	17,0	28	29,8		44	41,5
T-Stadium							
T1	17	16,0	11	10,4	0,478	28	26,4
T2	18	17,0	19	17,9		37	34,9
T3	15	14,2	9	8,5		24	22,6
T4	13	12,3	4	3,8		17	16,0
T-Stadium							
T1-2	35	33,0	30	28,3	0,140	65	61,3
T \geq 3	28	26,4	13	12,3		41	38,7
N-Stadium							
N0	22	20,8	10	9,4	0,199	32	30,2
N+	41	38,7	33	31,1		74	69,8
N-Stadium							
N0	22	20,8	10	9,4	0,254	32	30,2
N1	8	7,5	13	12,3		21	19,8
N2	2	1,9	2	1,9		4	3,77
N2a	5	4,7	4	3,8		9	8,49
N2b	18	17,0	12	11,3		30	28,3
N2c	5	4,7	2	1,9		7	6,6
N3	3	2,8	0	0,0		3	2,83

*: Chi-Quadrat-Test nach Pearson (Asymptotische Signifikanz (zweiseitig))

sowie Tumor- und Metastasenstadium für HPV-assoziierte und HPV-negative OPSCC retrospektiv analysiert. Diese Parameter können potenzielle Risikofaktoren mit Einfluss auf das Überleben der Patienten sein. 106 Patienten (79 männlich und 27 weiblich) mit OPSCC wurden nach Selektion hinsichtlich der Kriterien Tumorgöße und HPV Status in diese Arbeit eingeschlossen. Für das Untersuchungskollektiv ergab die Analyse, dass Männer häufiger von OPSCC betroffen sind als Frauen. Zum Diagnosezeitpunkt sind 39 Patienten unter 60 Jahre alt und 67 Patienten über 60 Jahre alt. 43 von 106 Patienten haben HPV-assoziierte OPSCC (40,6 %). In allen HPV-assoziierten OPSCC wurde der Hochrisikotyp HPV-16 nachgewiesen. Patienten des Untersuchungskollektivs mit HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC unterscheiden sich hinsichtlich der Risikofaktoren Rauchen und Alkohol. Patienten mit HPV-negativen OPSCC sind signifikant häufiger Raucher (50 (49,0 %) vs. 19 (18,6 %)) und weisen häufiger einen Alkoholabusus (44 (46,8 %) vs. 6 (6,4 %)) auf als Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC. HPV-assoziierte Patienten des Untersuchungskollektivs zeigen klinisch und radiologisch in 31,1 % der Fälle Metastasen und zu 9,4 % einen N0-Hals. HPV-negative Patienten zeigen klinisch und radiologisch in 38,7 % der Fälle Metastasen und zu 20,8 % einen N0-Hals (Tab.23).

3.4.2 Gesamtüberleben der Patienten des Untersuchungskollektiv bezogen auf den HPV-Status

Eine HPV-Assoziation des Tumors ist mit einem besseren Gesamtüberleben für den Patienten assoziiert. Das Gesamtüberleben der Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC liegt nach 3 und 5 Jahren mit 95,3 % und 93,8 % weit über dem der Patienten mit HPV-negativen OPSCC mit 70,3 % und 65,6 % (Abb.17).

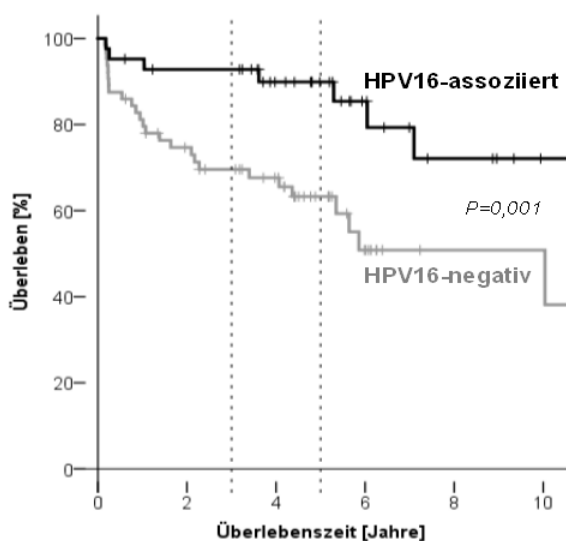


Abbildung 17: Gesamtüberleben von Patienten mit OPSCC (zwischen 2000 und 2014).

Gesamtüberleben von Patienten mit HPV-assoziierten (schwarz) und HPV-negativen (grau) OPSCC (P : Log Rank Test). JÜR: Jahresüberlebensrate.

3.4.3 HIF-1 α in HPV-assoziierten und -negativen OPSCC

HIF-1 fungiert als Schlüssel-Regulator der zellulären Reaktion auf Hypoxie, indem HIF-1 die Transkription vieler Gene aktiviert, die am Energiestoffwechsel, der Angiogenese und der Apoptose beteiligt sind. Diese wiederum erhöhen die Sauerstoffversorgung oder erleichtern die metabolische Anpassung an Hypoxie. Für gewöhnlich wird HIF-1 α im Zellkern exprimiert. Eine nukleäre Expression wurde somit in der immunhistochemischen Färbung als positive HIF-1 α Färbung gewertet (Abb. 18 A-C). Es konnte sowohl für HPV-assoziierte als auch HPV-negative Tumoren eine nukleäre HIF-1 α Expression nachgewiesen werden. Die Abbildungen 18 A-C zeigen eine positiv gewertete HIF-1 α Färbung in der Intensität schwach bis stark (von links nach rechts). Für die HIF-1 α Expression und deren Intensität lässt sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC feststellen (Abb. 18 C, D).

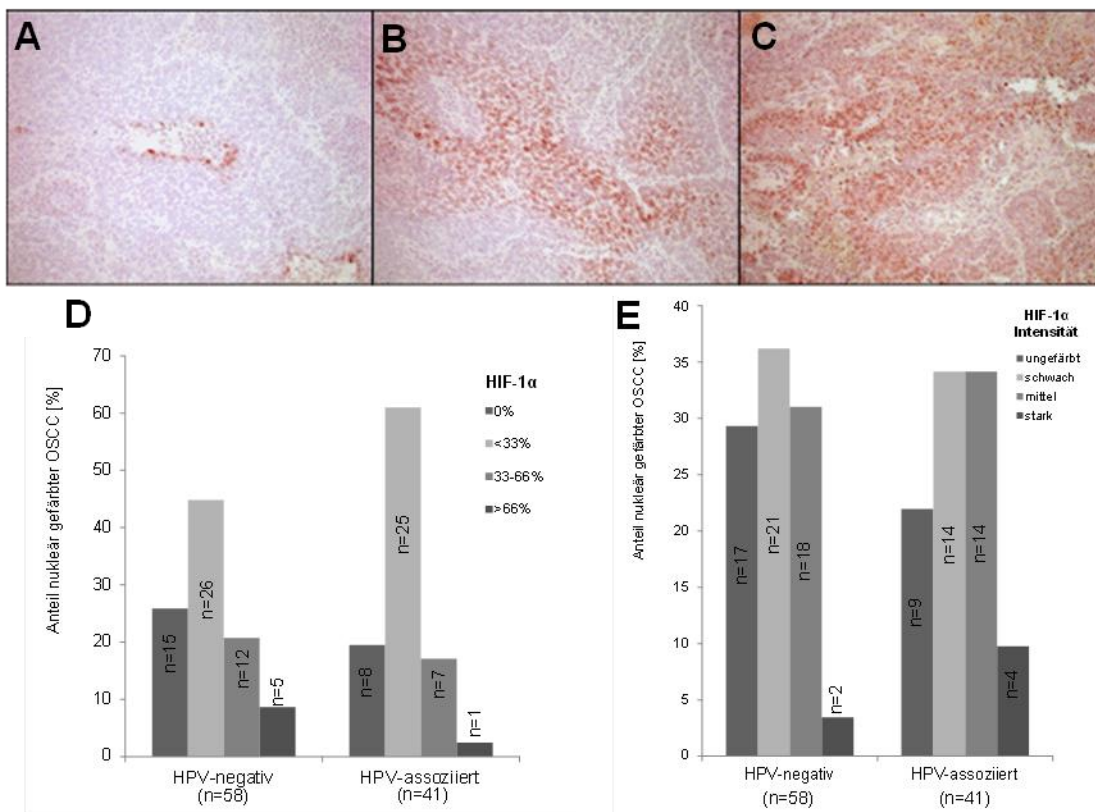


Abbildung 18: Immunhistochemische Färbung von HIF-1 α in OPSCC.

A: Schwache HIF-1 α Färbung. **B:** Mittlere Intensität. **C:** Starke, gleichmäßige HIF-1 α Färbung. **D:** Prozentualer Anteil der nukleär HIF-1 α positiv gefärbten Tumorzellen in HPV-negativen und HPV-assoziierten OPSCC ($P=0,346$). **E:** Intensität der HIF-1 α Expression in HPV-negativen und HPV-assoziierten OPSCC ($P=0,537$). (P : Chi-Quadrat nach Pearson; $n=99$).

3.4.4 HIF-1 α downstream-targets in HPV-assozierten und -negativen OPSCC

3.4.4.1 GLUT-1 Expression in HPV-assozierten und -negativen OPSCC

GLUT-1 ist ein transmembranäres Transporterprotein. Die Färbeintensität wurde in die Kategorien ungefärbt, schwach, mittel und stark gefärbt unterteilt und der prozentuale Anteil gefärbter Tumorzellen ermittelt und dann wie folgt unterteilt: 0 %, <33 %, 33-66 % und >66 %. Die Intensität und prozentuale Färbung wurden einerseits einzeln betrachtet als auch für diese Kategorien jeweils Punktwerte von 1 bis 4 vergeben. Aus beiden Kategorien wurde abschließend ein Produkt gebildet. Der maximal zu erreichende Wert beträgt somit 16. Die Abbildungen 19 A-C zeigen GLUT-1 positiv beurteilte Tumoren mit einer schwachen bis starken Färbung (von links nach rechts). Die ermittelten GLUT-1 Expressionswerte der HPV-negativen OPSCC liegen in 60 % der Fälle eher im Bereich einer hohen Expression mit einem Punktwert von 9 bis 16 (Abb. 19 D). Für die Expressionsintensität wurden die Punktwerte zu drei Gruppen zusammengefasst (hohe (12-16), mittlere (6-9) und niedrige (1-4) Expression). 50 % der HPV-negativen OPSCC weisen eine hohe GLUT-1 Expressionsintensität auf, während dieser Anteil bei den HPV-assozierten weniger als 25 % beträgt (Abb. 19 E).

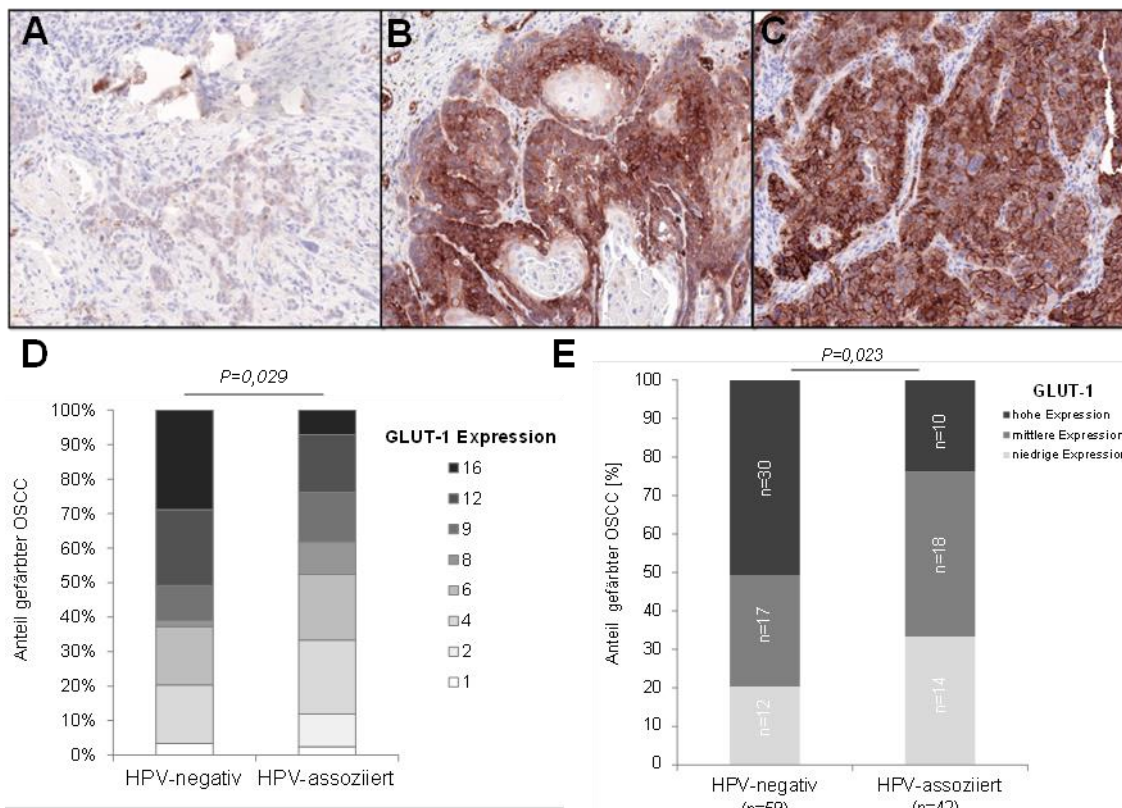


Abbildung 19: GLUT-1 Expression in OPSCC.

A-C: GLUT-1 Expressionsintensität. Schwache GLUT-1 Färbung bis starke, gleichmäßige GLUT-1 Färbung. **D:** GLUT-1 Expressionswerte. HPV-negative OPSCC weisen einen höheren Anteil mit einem hohen GLUT-1 Expressionswert auf (9, 12 und 16). **E:** GLUT-1 Expressionsintensität für HPV-negative und HPV-assozierte OPSCC. (*P*: Chi-Quadrat nach Pearson; *n*=101).

Ergebnisse

Die Untersuchung der membranständigen GLUT-1 Expression zeigt, dass die HPV-negativen OPSCC zu einem höheren Anteil mit einer Anzahl von 24 (vs. 6 bei HPV-assoziierten OPSCC) eine membranständige GLUT-1 Färbung aufweisen, die mehr als 66 % beträgt. Die HPV-negativen OPSCC unterscheiden sich hinsichtlich der membranständigen GLUT-1 Färbung signifikant von den HPV-assoziierten OPSCC (Abb. 20).

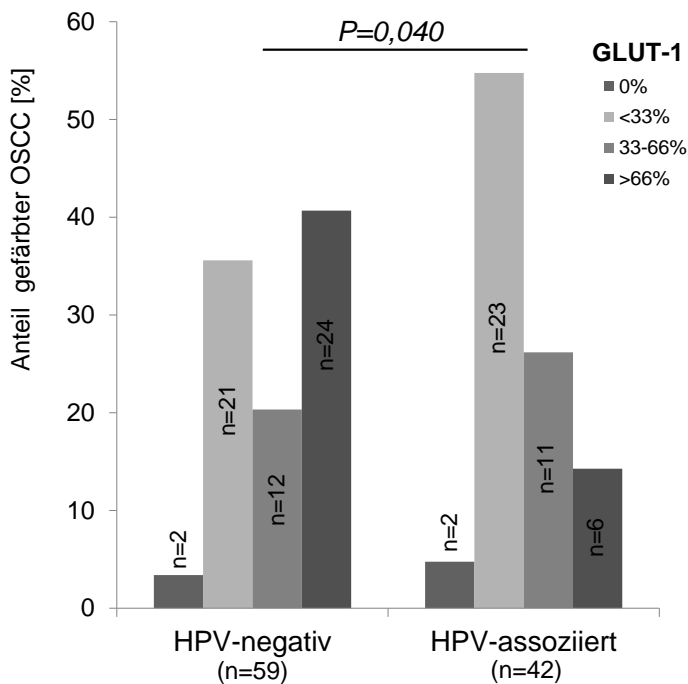


Abbildung 20: Anteil membranständig GLUT-1 positiv gefärbter Tumorzellen. HPV-negative OPSCC zeigen einen hohen prozentualen Anteil membranständiger GLUT-1 Färbung im Vergleich zu den HPV-assoziierten OPSCC (P : Chi-Quadrat nach Pearson; $n=101$).

Die Analyse zeigt, dass HPV-negative OPSCC im Vergleich zu den HPV-assoziierten OPSCC einen höheren Anteil membranständiger GLUT-1 (dichotom) gefärbter Tumorzellen im Bereich von 66-100 % (über Median) aufweisen (Abb. 21 A).

Die Auswertung der Färbeintensität von GLUT-1 zeigt zudem, dass die HPV-negativen OPSCC mit einem Verhältnis von 1:4 einen hohen Anteil an Tumorzellen mit starker GLUT-1 Färbeintensität (mittel bis stark gefärbte Tumoren) aufweisen. Bei den HPV-assoziierten OPSCC liegt das Verhältnis hingegen bei 1:2 (Abb. 21 B). Bei den HPV-assoziierten OPSCC kann somit häufiger eine schwache GLUT-1 Färbeintensität (ungefärbte bis schwach gefärbte Tumoren) nachgewiesen werden.

Ergebnisse

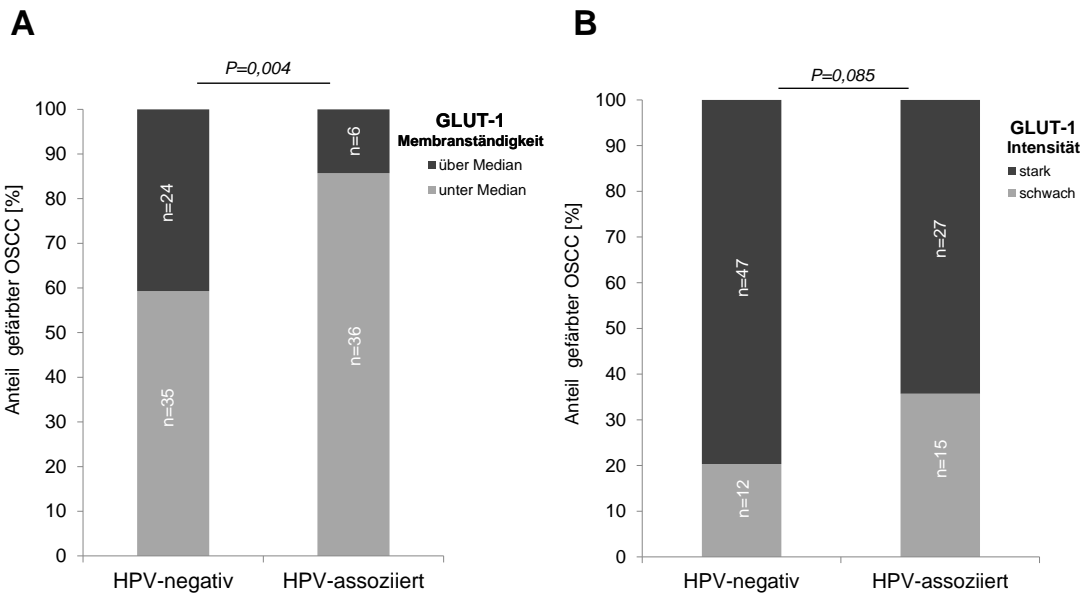


Abbildung 21: GLUT-1 Membranständigkeit und Färbeintensität in OPSCC.

A: Prozentualer Anteil membranständig GLUT-1 gefärbter Tumorzellen. HPV-negative OPSCC zeigen verglichen mit den HPV-assoziierten OPSCC einen höheren Anteil membranständiger GLUT-1 positiver Tumorzellen (über Median; 66-100 %). **B:** Färbeintensität von GLUT-1 für HPV-negative und HPV-assoziierte OPSCC. (P : Chi-Quadrat nach Pearson; $n=101$).

Die Analyse des Gesamtüberlebens von Patienten mit OPSCC bezogen auf die GLUT-1 Expression ergibt einerseits, dass das Überleben der Patienten mit HPV-negativen OPSCC mit einer schlechten Prognose assoziiert ist, wenn diese eine starke GLUT-1 Expression aufweisen. Andererseits korreliert die GLUT-1 Expression signifikant mit dem Überleben von Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC (Abb. 22).

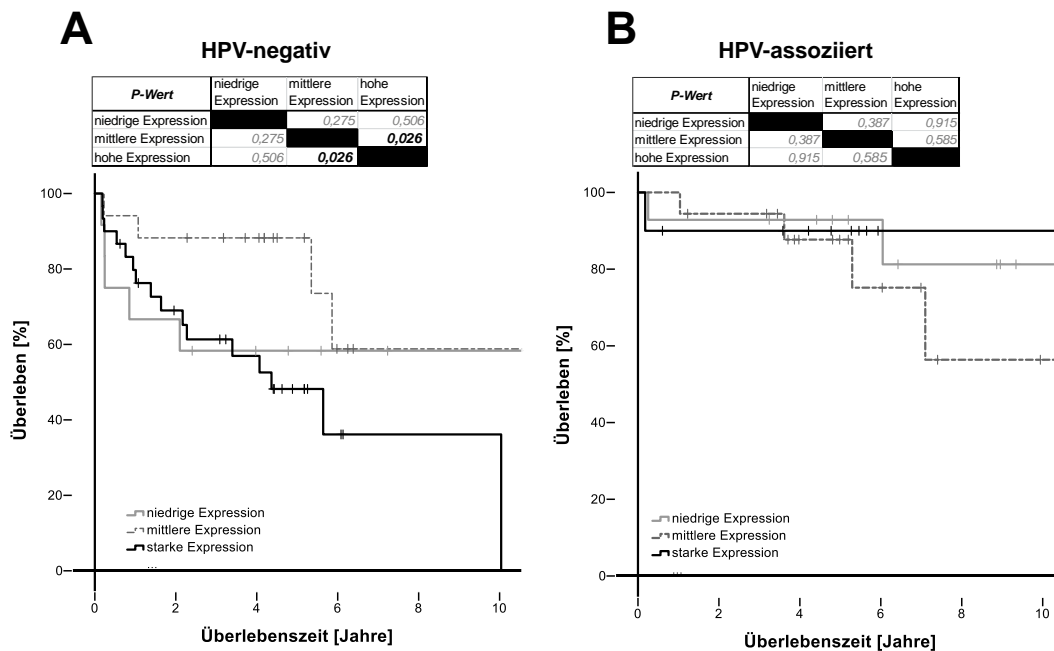
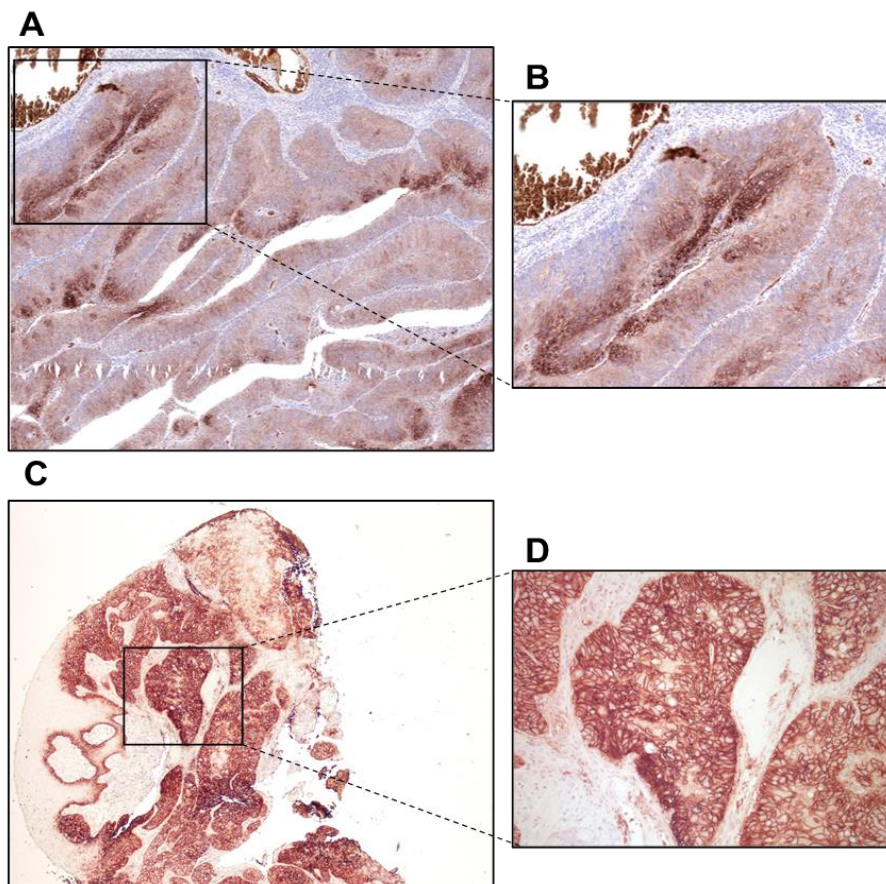


Abbildung 22: Gesamtüberleben von Patienten mit OPSCC bezogen auf die GLUT-1 Expression (P : Log Rank Test).

Ergebnisse

A: Gesamtüberleben von Patienten mit HPV-negativen OPSCC. Patienten mit einer mittleren (grau-gestrichelt) GLUT-1 Expression zeigen ein signifikant besseres Überleben verglichen mit einer starken Expression (schwarz). **B:** Gesamtüberleben von Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC. Die GLUT-1 Expression übt keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben von Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC aus.

Anschließend wurde eine Betrachtung der GLUT-1 Expressionsmuster durchgeführt. Die Expressionsmuster erlauben einen Rückschluss auf die Aktivierung des Hypoxie-Signalwegs im soliden Tumor. Eine immunhistochemische Färbung des Markerproteins GLUT-1 im zentralen Tumorbereich wurde als „Hypoxiemuster“ (Abb. 23 A, B), eine gleichmäßige Färbung des Tumors als „uniform“ (Abb. 23 C, D) gewertet. HPV-positive OPSCC zeigen signifikant häufiger ein „Hypoxiemuster“ (Abb. 23 E) verglichen mit den HPV-negativen OPSCC. Bei den HPV-negativen OPSCC überwiegt hingegen der Anteil uniform gefärbter Tumoren ($P=0,019$).



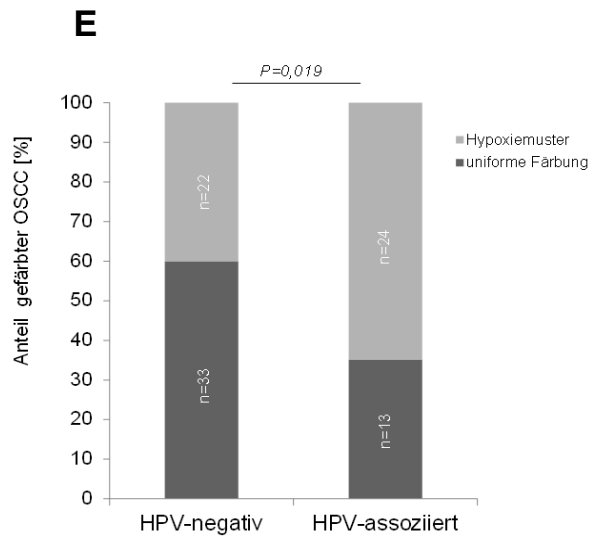
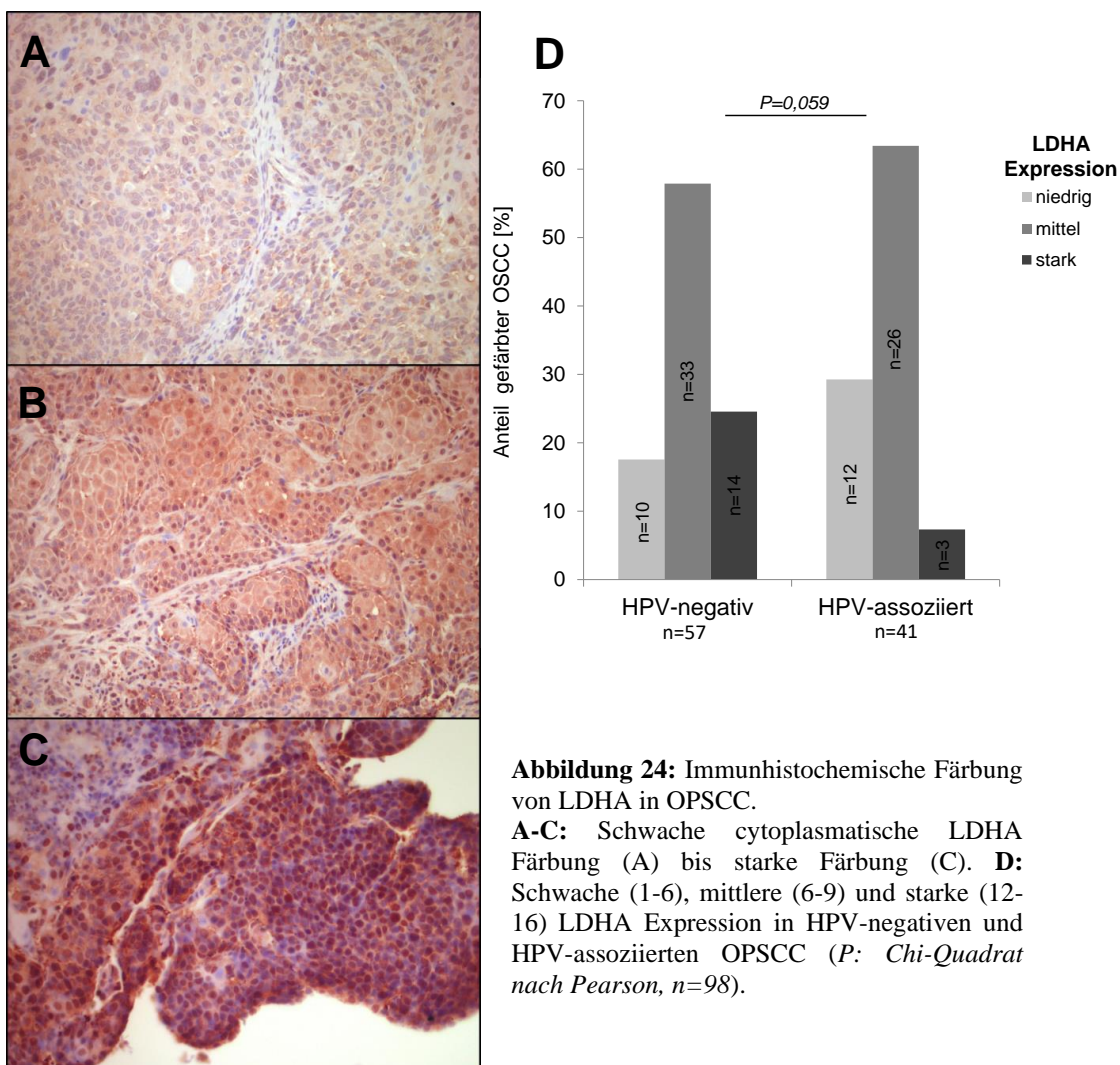


Abbildung 23: GLUT-1 Expressionsmuster

A, B: Membranständige Färbung, zentral im Tumor. Funktionelle Färbung, die hypoxische Bedingungen impliziert (vergrößerter Ausschnitt in B). **C, D:** Gleichmäßige membranständige Färbung. Funktionelle Färbung, ohne zentralen hypoxischen Bereich (vergrößerter Ausschnitt in D). **E:** HPV-assoziierte OPSCC haben einen höheren Anteil mit GLUT-1 Hypoxiemuster (grau). Die HPV-negativen OPSCC zeigen häufiger eine uniforme Färbung (dunkel-grau) (P : Chi-Quadrat nach Pearson, $n=92$).

3.4.4.2 LDHA Expression in HPV-assoziierten und –negativen OPSCC

Die wichtigste Form von LDH in Skelettmuskelzellen ist das A (LDHA)-Isozym. Der LDHA-Promotor enthält HIF-1 α Bindungsstellen [71] und die LDHA-Expression wird unter hypoxischen Bedingungen induziert [73, 74]. In der vorliegenden Arbeit wurde die LDHA Expression mit einem Expressionswert beurteilt. Dieser setzt sich aus der Färbeintensität (ungefärbt, schwach, mittel und stark gefärbt) und dem prozentualen Anteil gefärbter Tumorzellen (<25 %, 25-50 %, 50-75 %, >75 %) zusammen. Der maximale Expressionswert beträgt 16. Die Abbildungen 24 A-C zeigen LDHA positiv beurteilte Tumoren mit einer schwachen bis starken Färbung (von oben nach unten). Der Abbildung D ist die Verteilung der Fälle für HPV-assoziierte und –negative OPSCC im Hinblick auf die Färbung zu entnehmen. Die ermittelten LDHA Expressionswerte liegen für die HPV-negativen OPSCC zu rund 25 % im Bereich einer starken Expression (Expressionswert 12-16) (Abb. 24 D) und unterscheiden sich ($P=0,059$) von den HPV-assoziierten OPSCC.



Anschließend an die Untersuchung der Expression von LDHA in HPV-negativen und HPV-assoziierten OPSCC, wurde eine Betrachtung der Expressionsmuster durchgeführt. Die Expressionsmuster erlauben einen Rückschluss auf die Aktivierung des Hypoxie-Signalwegs im soliden Tumor. Eine Färbung im zentralen Bereich des Tumors legt eine tatsächliche Hypoxie nahe. Eine immunhistochemische Färbung des Markerproteins zentral im Tumor wurde somit als „Hypoxiemuster“ (Abb. 25 A), eine gleichmäßige Färbung des Tumors als „uniform“ (Abb. 25 B) gewertet. Die HPV-negativen OPSCC zeigen hauptsächlich eine uniforme LDHA Expression. HPV-positive OPSCC zeigen hingegen ein ausgewogeneres Verhältnis zwischen einer zentralen Färbung („Hypoxiemuster“) und einer uniformen Färbung (Abb. 25 C).

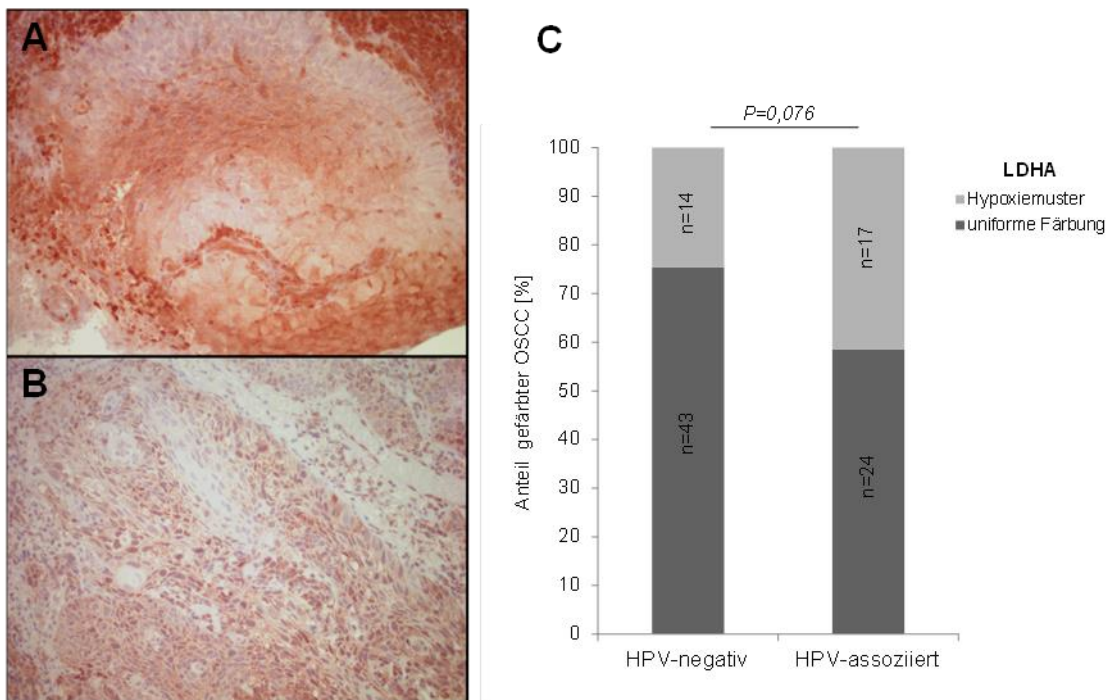


Abbildung 25: LDHA Expressionsmuster in OPSCC.

A: Hypoxiemuster. **B:** Uniforme Färbung. **C:** HPV-negative OPCC haben einen höheren Anteil mit LDHA Hypoxiemuster (hellgrau). Die HPV-assoziierten OPSCC zeigen häufiger eine uniforme Färbung (dunkelgrau) (P : Chi-Quadrat nach Pearson, $n=98$).

Die Analyse der LDHA Intensität ergibt, dass HPV-negative OPSCC mit ca. 75 % einen hohen Anteil Tumorzellen mit starker LDHA Färbeintensität (mittlere bis starke Färbung) zeigen. Der Anteil der HPV-assoziierten OPSCC mit starker LDHA Färbeintensität ist etwas geringer und liegt bei ca. 60 %. (Abb. 26 A). Anschließend wurde der Einfluss der Färbeintensität auf das Gesamtüberleben der Patienten

Ergebnisse

untersucht. Der Grad der LDHA Intensität hat keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten mit HPV-negativen OPSCC (Abb. 26 B). Eine starke Färbeintensität wirkt sich jedoch negativ auf das Überleben von Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC aus ($P=0,073$) (Abb. 26 C).

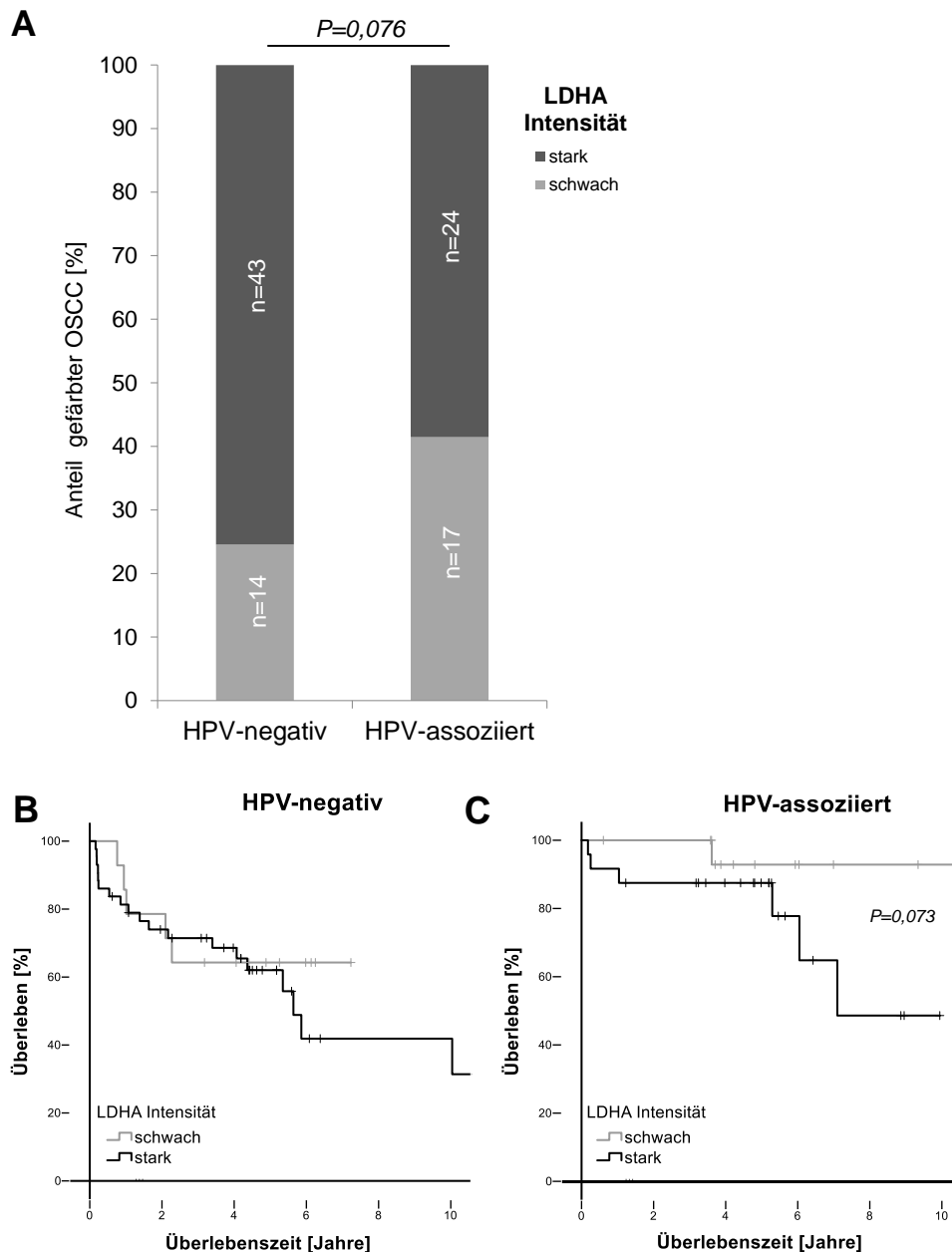


Abbildung 26: LDHA Intensität als Indikator für das Gesamtüberleben von Patienten mit OPSCC.

A: HPV-negative OPSCC weisen verglichen mit HPV-assoziierten OPSCC signifikant häufiger eine starke LDHA Intensität auf (P : Chi-Quadrat nach Pearson). **B:** Gesamtüberleben von Patienten mit HPV-negativen OPSCC. Die LDHA Intensität übt unabhängig von ihrer Stärke keinen signifikanten Einfluss auf das Überleben aus. **C:** Gesamtüberleben von Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC. Patienten mit OPSCC, die eine schwache (grau) LDHA Intensität zeigen, haben ein besseres Überleben verglichen mit einer starken Intensität (schwarz) (P : Log Rank Test).

3.4.4.3 CA9 Expression in HPV-assoziierten und -negativen OPSCC

CA9 ist ein Transmembranprotein und häufig tumor-assoziiert. CA9 ist sowohl in der Plasmamembran als auch im Nukleus der Zellen präsent. Die Abbildungen 27 A, C und E zeigen eine positiv gewertete CA9 Färbung in der Intensität schwach bis stark (von oben nach unten; vergrößerter Ausschnitt jeweils in B, D, F).

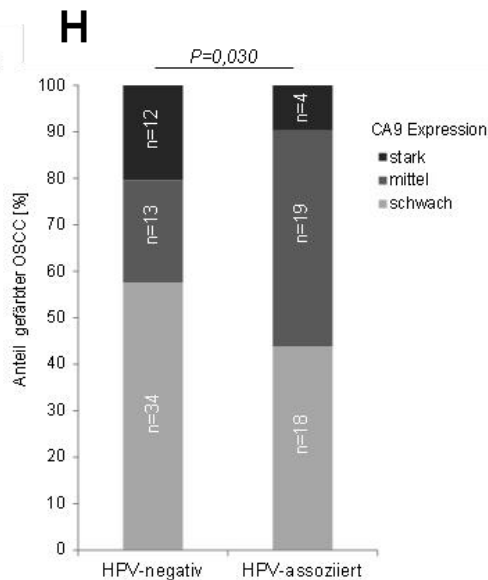
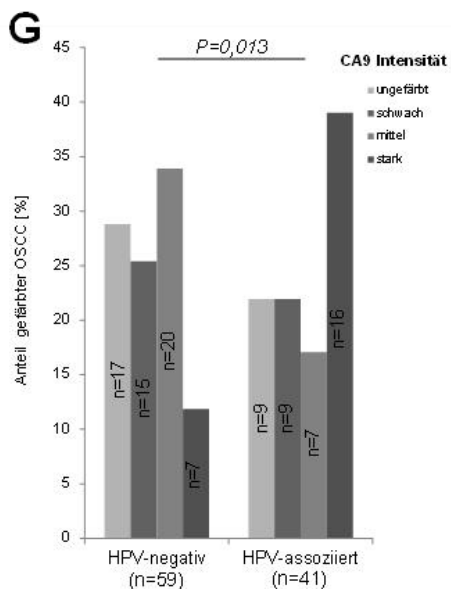
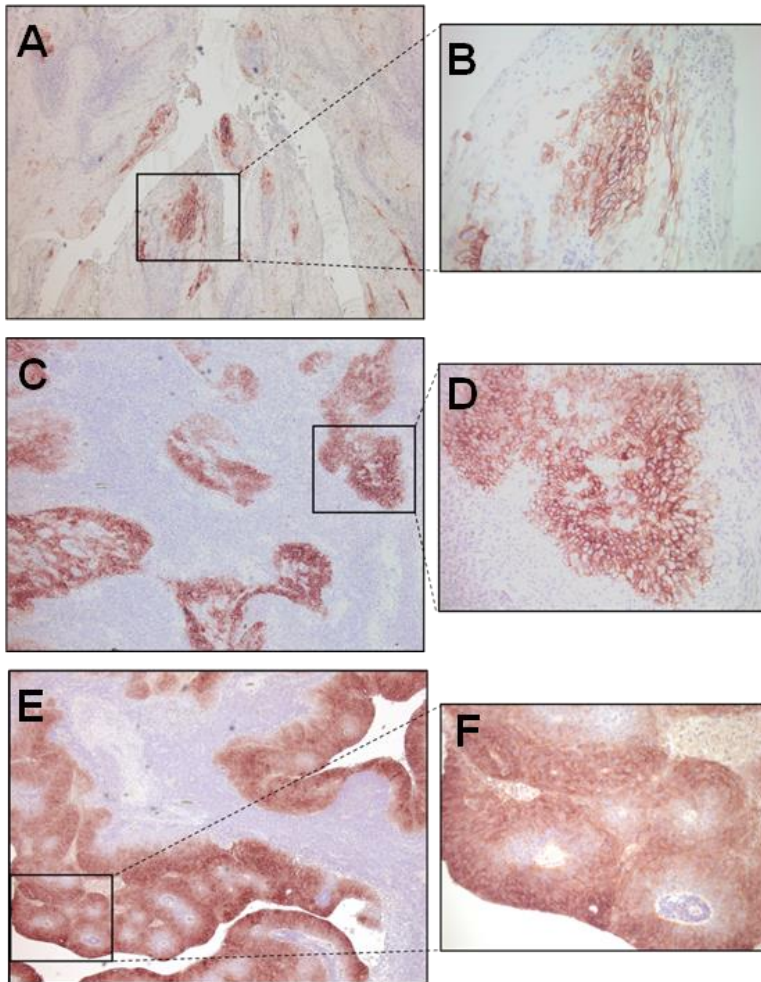


Abbildung 27: Immunhistochemische Färbung von CA9 in OPSCC.

A: Schwache CA9 Färbung (vergrößerter Ausschnitt in B). **C:** Mittlere membranständige CA9 Expression (vergrößerter Ausschnitt in D). **E:** Starke CA9 Expression (vergrößerter Ausschnitt in F). **G:** HPV-assoziierte OPSCC weisen zu einem hohen Anteil eine starke Färbeintensität auf. **H:** Hoher Anteil HPV-assoziiierter OPSCC mit mittlerer CA9 Expression (*P*: Chi-Quadrat nach Pearson, n=100).

Die CA9 Expression wurde im Folgenden mit einem Expressionswert beurteilt. Dieser setzt sich aus dem Produkt der Färbeintensität (ungefärbt, schwach, mittel und stark gefärbt) und dem prozentualen Anteil gefärbter Tumorzellen (0 %, <33 %, 33-59 %, ≥60 %) zusammen. Der maximale Expressionswert beträgt 16. HPV-assoziierte zeigen mit 39 % einen hohen Anteil Tumorzellen mit starker CA9 Färbeintensität, während der Anteil der HPV-negativen OPSCC deutlich geringer ist und bei 11,9 % liegt (Abb. 27 G). Die CA9 Expression liegt bei den HPV-positiven OPSCC mit 56,1 % im Bereich einer mittleren und starken Expression. Die HPV-negativen OPSCC weisen hingegen mit 57,6 % eine schwache Expression auf (Abb. 27 H).

Der Nachweis der Aktivierung des Hypoxie-Signalwegs im soliden Tumor über die Färbung des Markerproteins CA9 zeigt für HPV-negative OPSCC hauptsächlich in großen Tumoren (T3&T4) eine zentrale CA9 Expression (Abb. 28 A).

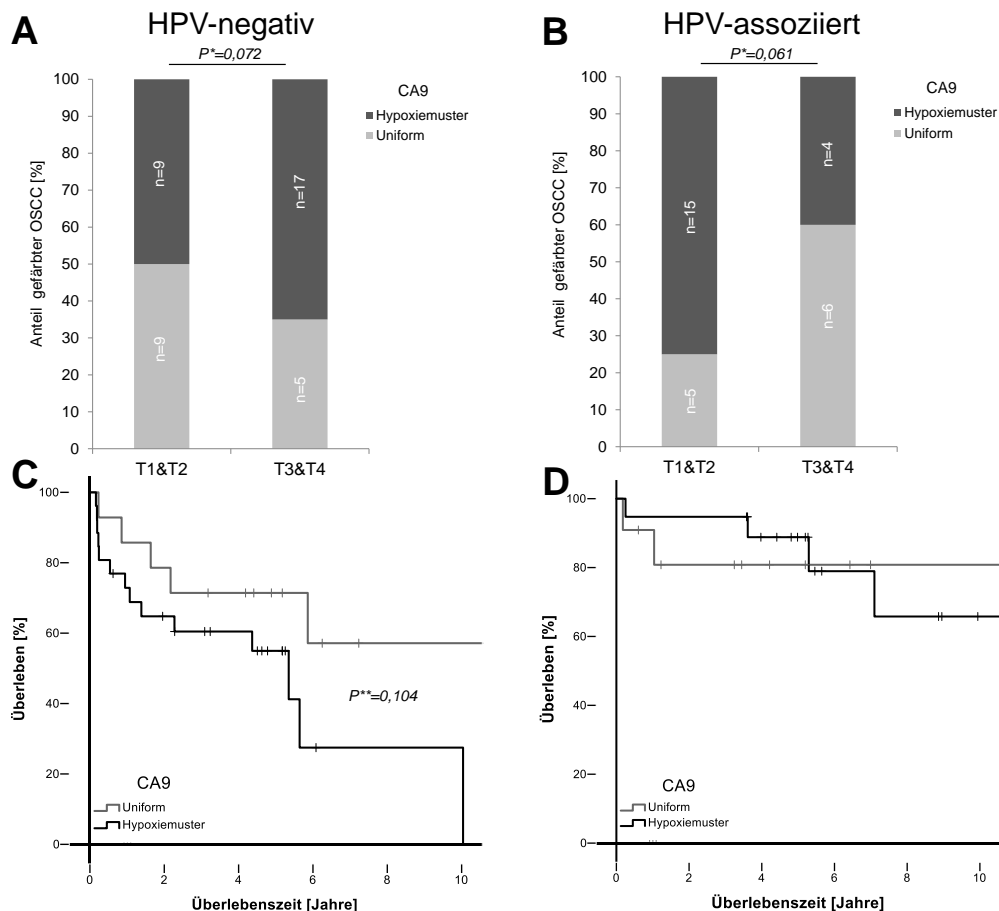


Abbildung 28: CA9 Expressionsmuster & Gesamtüberleben von Patienten mit OPSCC in Abhängigkeit der Tumorgöße.

A: CA9 Expressionsmuster in HPV-negativen und **B:** HPV-assoziierten OPSCC. In T3&T4 Tumoren HPV-assoziiierter OPSCC findet sich häufiger das Hypoxiemuster, für HPV-negative OPSCC hingegen in T1&T2 Tumoren. **C, D:** Gesamtüberleben von Patienten mit HPV-negativen und -assoziierten OPSCC. (P^* : Chi-Quadrat nach Pearson, P^{**} : Log Rank Test, HPV-neg. n=40; HPV-pos. n=30).

Gegensätzlich hierzu zeigen HPV-assoziierte OPSCC überwiegend in kleinen Tumoren (T1&T2) eine zentrale Färbung des Tumors (Abb. 28 B). Die Untersuchung der Überlebensraten ergibt für Patienten mit HPV-negativen OPSCC mit einer uniformen Färbung ein besseres Gesamtüberleben verglichen mit einer zentralen Färbung im Tumornest („Hypoxiemuster“) ($P=0,104$) (Abb. 28 C). Im Vergleich hierzu ist das Überleben von Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC nicht beeinflusst (Abb. 28 D).

Zusätzlich zur Bewertung der CA9 Färbung wurden nekrotische Bereiche in den gefärbten Arealen ausgewertet. Als Nekrosen wurden Bereiche des Tumors gewertet, bei denen mikroskopisch eine Gewebsdestruktion festgestellt werden konnte (Abb. 29 A, B). Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung zeigt eine Häufung von nekrotischen Tumoren für HPV-assoziierte OPSCC verglichen mit HPV-negativen OPSCC (Abb. 29 C).

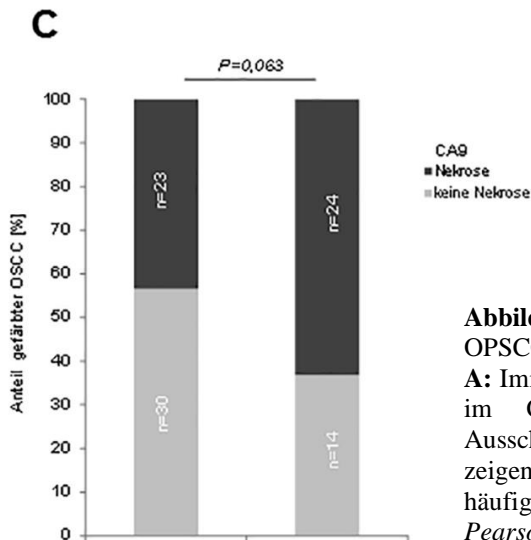
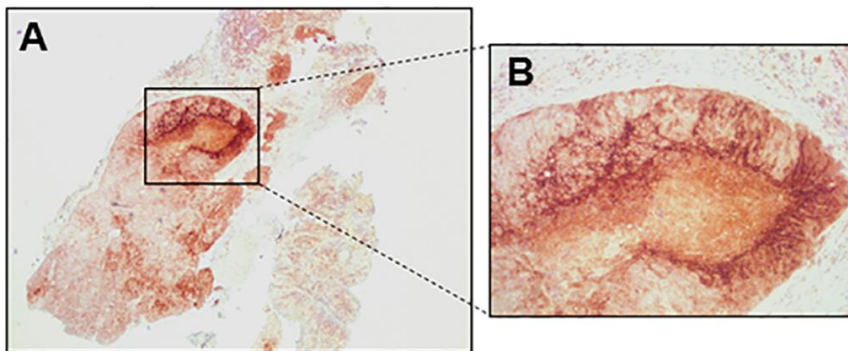


Abbildung 29: Nekrosen im CA9 gefärbten OPSCC.

A: Immunhistochemische Färbung einer Nekrose im CA9 gefärbten Tumor (vergrößerter Ausschnitt in B). **C:** HPV-assoziierte OPSCC zeigen im Vergleich zu HPV-negativen OPSCC häufiger Nekrosen ($P=$ Chi-Quadrat nach Pearson, n=91).

3.5 18F-FDG PET-CT Parameter in HPV-assozierten und HPV-negativen OPSCC

Zur Analyse der metabolischen Unterschiede zwischen HPV-assozierten und HPV-negativen OPSCC wurden, neben dem Zelllinienmodell und den retrospektiven Patientenproben, 18F-FDG PET-CT Parameter untersucht. Das 18F-FDG PET-CT (PET-CT) ist in der klinischen Onkologie weit verbreitet. Es liefert funktionelle Informationen hinsichtlich der Aktivität des Stoffwechsels eines Tumors [2]. Maligne Tumoren gehen häufig mit einer Erhöhung des Glukoseumsatzes einher. Die Erhöhung des Glukoseumsatzes verursacht wiederum eine vermehrte Metabolisierung des FDG (Fluoro-desoxy-D-glucose) im Tumor [2]. So können metabolische Parameter mittels PET-CT gemessen und zur Diagnose sowie im Hinblick auf den Behandlungserfolg genutzt werden. Einer dieser Parameter ist der Standardaufnahmewert (SUV; Tracer-Aufnahme in für Patientenkörpergewicht und injizierte Dosis). Darüber hinaus haben sich neue Funktionsparameter wie die Gesamtläsionsglykolyse (Total Lesion Glykolysis =TLG) auch bei HNSCC als prognostisch wertvoll erwiesen [49]. Onkogene Viren wie beispielsweise HPV können zu Veränderungen des Metabolismus führen, indem sie das Stoffwechselprofil des Tumors durch direkte und indirekte Wechselwirkungen, zum Beispiel mit Glukosetransportern wie GLUT-1 modulieren [60]. Deshalb wurden verschiedene metabolischen Parameter (SUVmax, SUVmean und TLG) mittels 18F-FDG PET-CT (PET-CT) in HPV-assozierten HPV-negativen OPSCC in Bezug auf die histopathologischen Befunde verglichen.

3.5.1 Patienten- und Tumor-Charakteristika von Patienten mit ausgewerteten PET-CT Daten

66 Patienten (47 männlich und 19 weiblich) wurden einem PET-CT unterzogen und hinsichtlich der Parameter Alter, Geschlecht, Tabak- und Alkoholkonsum sowie T-stadium und N-stadium für HPV-assozierte und HPV-negative OPSCC retrospektiv analysiert. Diese Parameter können potenzielle Risikofaktoren mit Einfluss auf das Überleben der Patienten sein. Männer sind häufiger von OPSCC betroffen als Frauen. Zum Diagnosezeitpunkt sind 28 Patienten unter 60 Jahre alt und 38 Patienten über 60 Jahre. HPV-assoziert sind 23 von 66 Patienten (34,8 %). In allen HPV-assozierten OPSCC wurde der Hochrisikotyp HPV-16 nachgewiesen. Patienten mit HPV-negativen OPSCC sind signifikant häufiger Raucher als Patienten mit HPV-assozierten OPSCC (52,3 % vs. 16,9 %, $P=0,006$). Patienten mit HPV-assozierten OPSCC weisen ebenfalls häufiger einen geringen Alkoholkonsum auf verglichen mit HPV-negativen OPSCC

Ergebnisse

(46,2 % vs. 4,6 %, $P < 0,001$). Das T-Stadium unterscheidet sich nicht signifikant zwischen HPV-assoziierten und HPV-negativen Patienten. Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC zeigen klinisch und radiologisch in allen Fällen (23/23) eine nodale Metastasierung der Stadien N1 bis N2c, während Patienten mit HPV-negativen OPSCC zu 19,7 % ein N0-Stadium (13/43) aufweisen (Tab. 24, $P = 0,003$).

Tabelle 24: Patienten- und Tumor-Charakteristika des PET-CT-Kollektivs.

n=66	HPV-negative		HPV-assoziiert		P-Wert*	alle	
	n=43 (65,2%)		n=23 (34,8%)			Anz. Patienten	%
	Anz. Patienten	%	Anz. Patienten	%		Anz. Patienten	%
Geschlecht							
Männlich	34	51,5	13	19,7	0,054	47	71,2
Weiblich	9	13,6	10	15,2		19	28,8
Alter							
Jung (<60)	19	28,8	9	13,6	0,692	28	42,4
Alt (≥60)	24	36,4	14	21,2		38	57,6
Nikotin							
Nichtraucher	8	12,3	12	18,5	0,006	20	30,3
Raucher	34	52,3	11	16,9		45	68,2
Alkoholabusus							
Ja	30	46,2	3	4,6	<0,001	33	50
Nein	13	20,0	19	29,2		32	48,5
T-Stadium							
T1	11	16,7	4	6,1	0,150	15	22,7
T2	8	12,1	10	15,2		18	27,3
T3	12	18,2	6	9,1		18	27,3
T4	12	18,2	3	4,5		15	22,7
T-Stadium							
T1-2	19	28,8	14	21,2	0,196	33	50
T≥3	24	36,4	9	13,6		33	50
N-Stadium							
N0	13	19,7	0	0	0,003**	13	19,7
N+	30	45,5	23	34,8		53	80,3
N-Stadium							
N0	13	19,7	0	0,0	0,035	13	19,7
N1	9	13,6	9	13,6		18	27,3
N2a	4	6,1	5	7,6		9	13,6
N2b	10	15,2	7	10,6		17	25,8
N2c	5	7,6	2	3		7	10,6
N3	2	3	0	0,0		2	3,03

*: Chi-Quadrat-Test nach Pearson (Asymptotische Signifikanz (zweiseitig))
 **Exakter Test nach Fisher (Exakte Signifikanz (2-seitig))

3.5.2 Gesamtüberleben von Patienten mit ausgewerteten PET-CT Daten

Eine HPV-Assoziation des Tumors ist mit einem besseren Gesamtüberleben für den Patienten assoziiert. Unter den Patienten, bei denen ein PET-CT durchgeführt wurde, liegt das Gesamtüberleben der Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC nach 5 Jahren mit rund 95 % im Vergleich zu 75 % signifikant über dem der Patienten mit HPV-negativen OPSCC (Abb. 30; $P=0,041$).

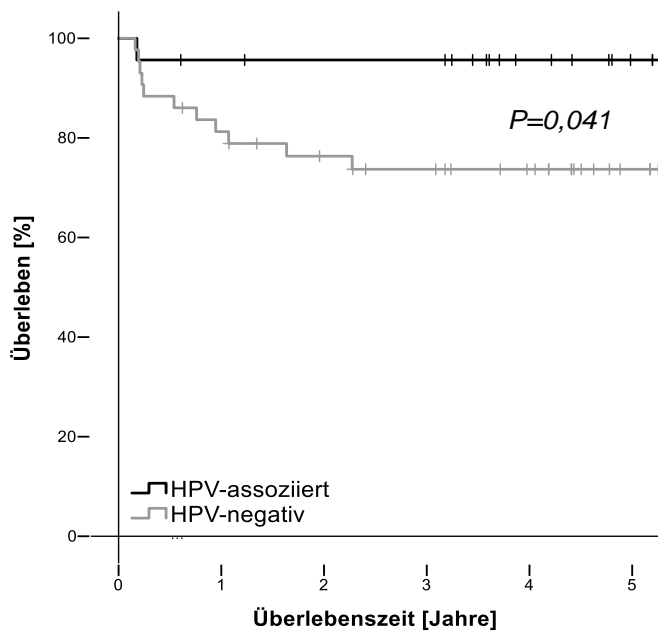


Abbildung 30: 5-Jahres-Überleben. Gesamtüberleben von Patienten mit HPV-assoziierten (schwarz) und HPV-negativen (grau) OPSCC (P : Log Rank Test).

3.5.3 PET-CT Parameter in HPV-assoziierten und –negativen OPSCC

Vergleicht man die PET-CT Parameter von HPV-assoziierten und –negativen OPSCC im Hinblick auf die Größe der Primärtumoren (T_{1-2} vs. $T_{\geq 3}$) unterscheiden sich diese hinsichtlich des SUVmax, des SUVmean und des TLG (Tab. 25). In der Gruppe der HPV-negativen OPSCC ist der SUVmax in kleinen (T_{1-2}) und großen Tumoren ($T_{\geq 3}$) signifikant unterschiedlich. Große Tumoren der HPV-negativen OPSCC weisen einen deutlich höheren SUVmax im Vergleich zu kleinen Tumoren auf (Abb. 31 A; $P=0,001$). Für die HPV-assoziierten OPSCC gibt es keinen signifikanten Unterschied für den SUVmax in Abhängigkeit zur Tumorgöße (T_{1-2} vs. $T_{\geq 3}$; $P=0,201$). Der SUVmean ist in kleinen und großen Tumoren in der Gruppe der HPV-negativen OPSCC signifikant unterschiedlich mit größeren Werten in großen Tumoren (Abb. 31 B; $P<0,001$). Für die HPV-assoziierten OPSCC ist hingegen kein signifikanter Unterschied für die Tumorgöße und den SUVmean nachweisbar ($P=0,109$). Zusammenfassend sind SUVmax und SUVmean in der Gruppe der HPV-negativen OPSCC mit der

Ergebnisse

Größenzunahme des Primärtumors somit signifikant höher. In der Gruppe der HPV-assoziierten OPSCC korreliert ein höherer SUVmax und SUVmean mit Größenzunahme des Primarius, dies ist jedoch nicht signifikant.

Auch für den TLG ist ein höherer Wert in großen Primärtumoren verglichen mit kleinen Primärtumoren feststellbar (Abb. 31 C). Für den TLG bestehen jedoch sowohl in der Gruppe der HPV-negativen OPSCC ($P < 0,001$) als auch der HPV-assoziierten OPSCC signifikante Unterschiede zwischen kleinen und großen Tumoren ($P = 0,002$). Die genauen Werte der PET-CT Parameter SUVmax, SUVmean und TLG sind der unten aufgeführten Tabelle (Tab. 25) zu entnehmen.

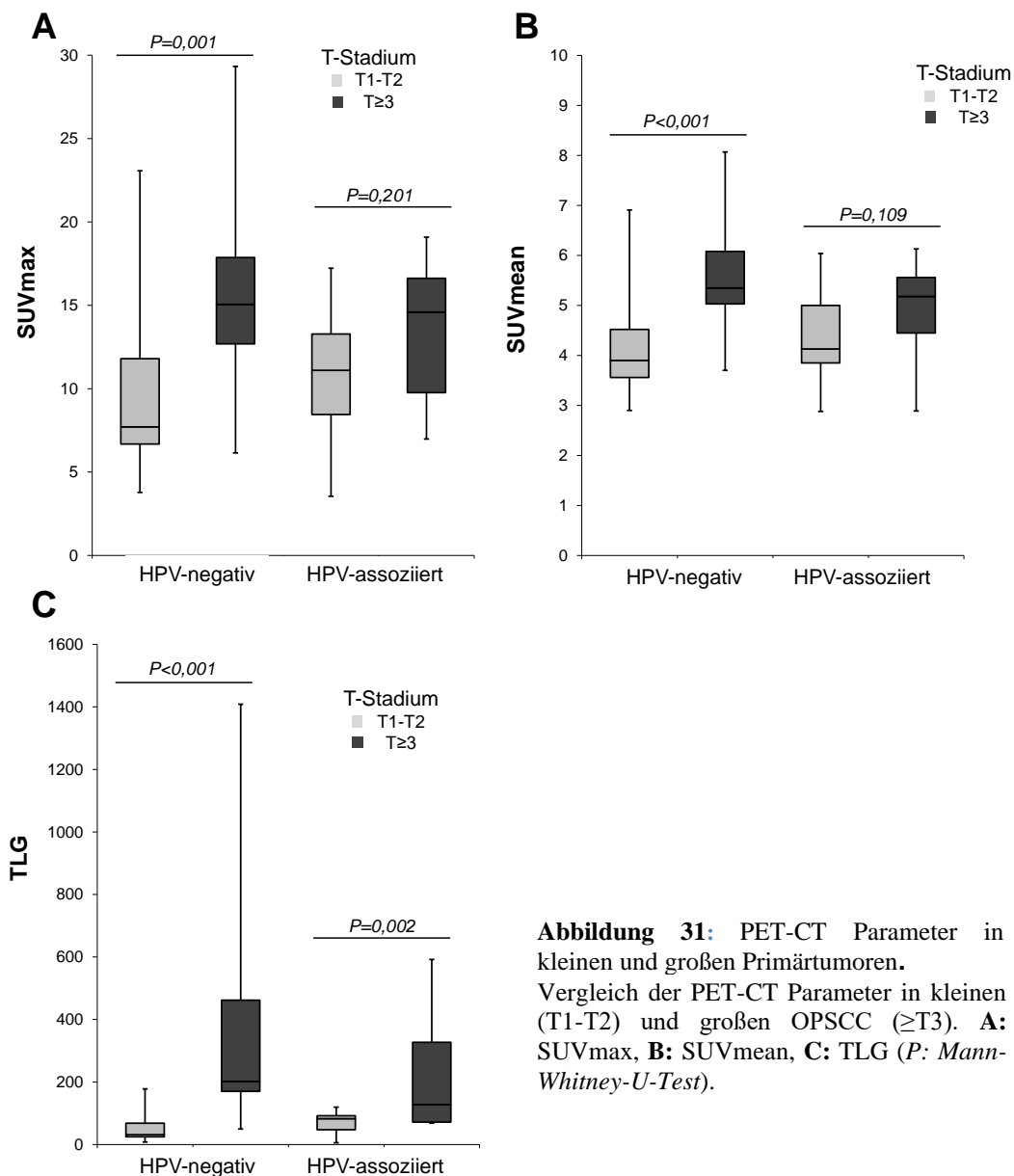


Abbildung 31: PET-CT Parameter in kleinen und großen Primärtumoren. Vergleich der PET-CT Parameter in kleinen (T1-T2) und großen OPSCC ($\geq T3$). **A:** SUVmax, **B:** SUVmean, **C:** TLG (P : Mann-Whitney-U-Test).

Tabelle 25: Übersicht PET-CT Parameter in HPV-negativen und HPV-assoziierten OPSCC.

n=66	HPV-negative n=43 (65,2%)			HPV-assoziiert n=23 (34,8%)		
	Mittlerer Rang	Mittelwert	*P-Wert Mann-Whitney-U-Test	Mittlerer Rang	Mittelwert	**P-Wert Mann-Whitney-U-Test
Primärtumor						
SUVmax				SUVmax		
T1-T2 (19)	14,79	12,6121	0,001	T1-T2 (14)	10,5	0,201
T≥3 (24)	27,71	(3,78-29,33)		T≥3 (9)	14,33	
SUVmean				SUVmean		
T1-T2 (19)	13,82	4,8821	<0,001	T1-T2 (14)	10,18	0,109
T≥3 (24)	28,48	(2,9-8,07)		T≥3 (9)	14,83	
TLG				TLG		
T1-T2 (19)	11,63	196,9533	<0,001	T1-T2 (14)	8,64	0,002
T≥3 (24)	30,21	(7,97-1408,62)		T≥3 (9)	17,22	

*: Asymptotische Signifikanz (zweiseitig) **: Exakte Signifikanz [2* (1-seitige Sig.)]

3.5.4 Gesamtüberleben von Patienten mit HPV-negativen OPSCC bezogen auf die PET-Parameter

Das Gesamtüberleben der Patienten mit HPV-negativen OPSCC für einen Zeitraum von

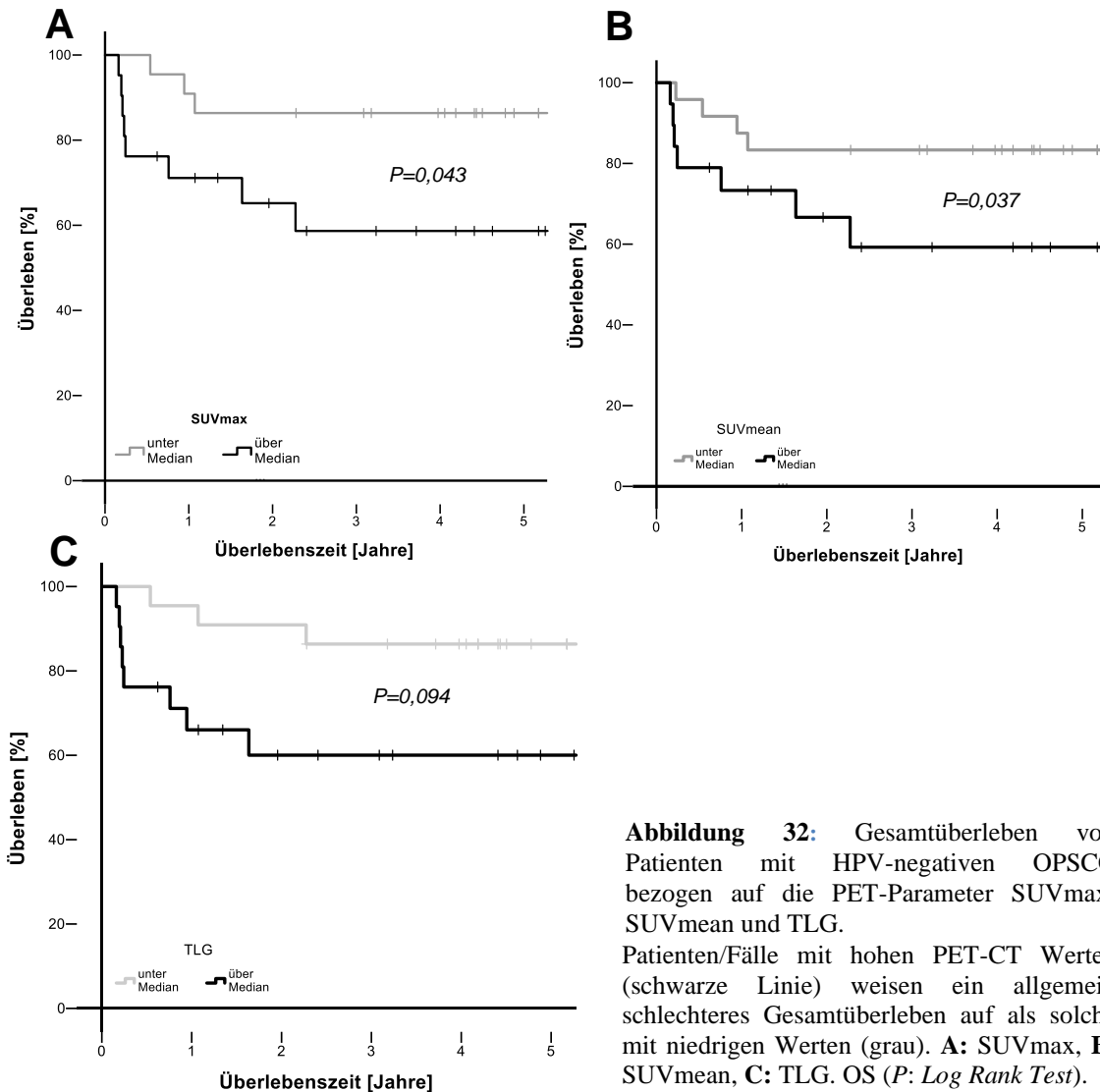


Abbildung 32: Gesamtüberleben von Patienten mit HPV-negativen OPSCC bezogen auf die PET-Parameter SUVmax, SUVmean und TLG. Patienten/Fälle mit hohen PET-CT Werten (schwarze Linie) weisen ein allgemein schlechteres Gesamtüberleben auf als solche mit niedrigen Werten (grau). **A:** SUVmax, **B:** SUVmean, **C:** TLG. OS (P : Log Rank Test).

5-Jahren wurde im Hinblick auf die PET-Parameter SUVmax, SUVmean und TLG analysiert. Hierzu wurden Fälle nach den Werten der einzelnen Parameter in dichotome Gruppen mit niedrigem und hohem Wert eingeteilt. Als Grenze wurde hierfür jeweils der Median der Gesamtgruppe gewählt. Dies ergab, dass Patienten mit HPV-negativen OPSCC und einem niedrigen SUVmax (Abb. 32 A; $P=0,043$), einem niedrigen SUVmean (Abb. 32 B; $P=0,094$) und einem niedrigen TLG (Abb. 32 C; $P=0,037$) ein signifikant besseres Gesamtüberleben, verglichen mit Patienten deren OPSCC hohe SUVmax/SUVmean/TLG-Werte, zeigen (Daten zu HPV-assoziierten OPSCC nicht signifikant, Abbildung nicht gezeigt).

3.5.5 GLUT-1 Expression in Korrelation mit dem T-Stadium

HPV Onkoproteine können das Stoffwechselprofil des Tumors modulieren (vgl. Abschnitt GLUT-1 Expression in HPV-assoziierten und -negativen OPSCC). In folgenden Analysen wurde die GLUT-1 Expression in Abhängigkeit des T-Stadiums für Patienten von denen PET-Daten vorliegen, untersucht. Dies zeigt, dass bei großen Primärtumoren (T3 & T4) eine hohe GLUT-1 Expression in HPV-negativen OPSCC

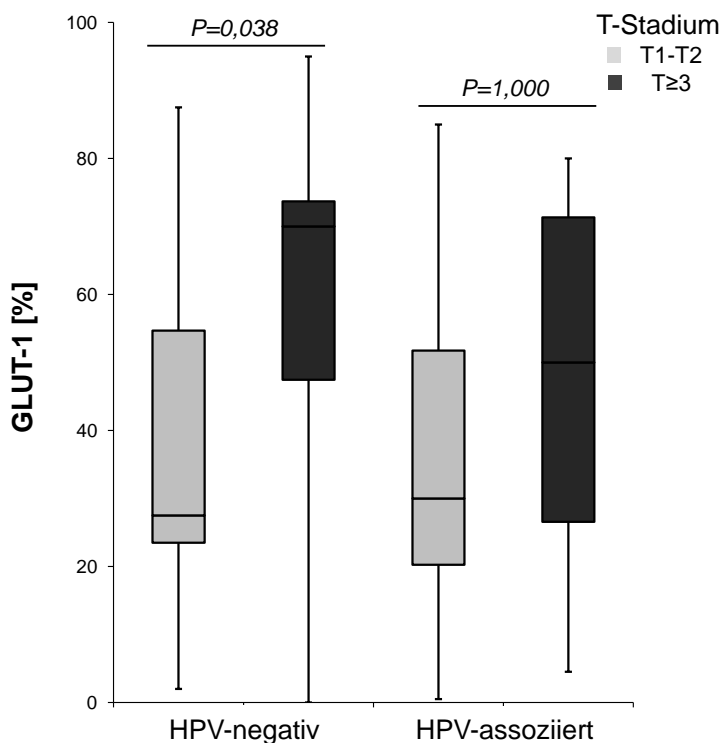


Abbildung 33: GLUT-1 Expression in Korrelation mit dem T-Stadium. Vergleich der GLUT-1 Expression in kleinen (T1-T2) und großen OPSCC ($\geq T3$) (P : Mann-Whitney-U-Test).

vorliegt. Kleine (T1-T2) Tumoren zeigen im Vergleich zu großen Tumoren ($T\geq 3$) eine niedrigere GLUT-1 Expression in HPV-negativen OPSCC ($P=0,038$), jedoch nicht in HPV-assoziierten OPSCC (Abb. 33). In der Gruppe der HPV-assoziierten OPSCC ist ebenfalls eine höhere GLUT-1 Expression in großen Primärtumoren feststellbar, diese ist jedoch nicht signifikant.

4 Diskussion

4.1 Aktivierung des HIF-1 Signalwegs in HPV-positiven und –negativen HNSCC-Zelllinien

4.1.1 HIF-1 α Stabilisierung in HPV-positiven HNSCC-Zelllinien unter Normoxie

Für die HPV-positiven HNSCC-Zelllinien konnte verglichen mit den HPV-negativen Zelllinien signifikant höhere HIF-1 α Proteinlevel unter Normoxie nachgewiesen werden (Abb.5). Eine HIF-1 α Stabilisierung auf Proteinebene unter Normoxie wurde bisher weder für Zervixkarzinom-Zelllinien noch für humane Keratinozyten gezeigt [59]. In Übereinstimmung mit den hier gezeigten Ergebnissen, konnte jedoch eine Akkumulation des HIF-1 α Proteins in HPV-16 E6 und/oder E7 transfizierten Zelllinien nachgewiesen werden, ohne direkten Nachweis einer HPV16 E6/E7 vermittelten HIF-1 α Proteinstabilisierung bzw. einer Stabilisierung der HIF-1 α mRNA. Dies suggeriert eine Regulation auf der Translationsebene *in vitro* und ein Entgegenwirken zu den durch p53 ausgelösten repressiven Effekten [47, 82]. Während zwei Studien kein Nachweis für eine Assoziation des HPV-Status und der HIF-1 α Proteinexpression in OPSCC erbrachten [31, 36], konnten eine weitere Studie eine positive Assoziation zwischen den beiden Proteinen HIF-1 α und HPV16 E7 in HPV16 DNA positiven OPSCC zeigen [67]. Letzteres ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit und deutet auf einen Zusammenhang zwischen HIF-1 α und der Expression der HPV-Onkoproteine hin. Basierend auf einer erhöhten Expression Hypoxie-assoziiierter Proteine in HNSCC wurde auch eine Aktivierung des Hypoxie-Signalwegs angenommen [14].

Einer der Hauptregulatoren des HIF-1 α Proteins sind die Prolylhydroxylasen (PHDs), insbesondere PHD2. Eine Hydroxylierung durch PHD2 führt zur proteasomalen Degradation von HIF-1 α . Um eine HIF-1 α Akkumulation auszulösen war die alleinige Inhibition von PHD2 unter Normoxie mittels siRNA in diversen Tumor- und Primärzelltypen suffizient, gegensätzlich zur PHD1 und PHD3 Inhibition [37]. Unter Normoxie konnte bisher kein Nachweis einer erhöhten HIF-1 α Protein-Akkumulation für HPV-positive Zelllinien erbracht werden [35], welches im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit steht (Abb.5). Unter Normoxie konnten hier erhöhte HIF-1 α Proteinlevel in den HPV-positiven HNSCC-Zelllinien nachgewiesen werden, welche am ehesten auf eine Reduktion der PHD2-Aktivität zurückzuführen sind (Abb.7). Die Reduktion der Aktivität wird vermutlich durch die HPV-Onkoproteine ausgelöst. Eine

Inhibition der HIF-1 α Hydroxylierung und eine daraus resultierende HIF-1 α Stabilisierung konnte für EBV-transformierte B-Zellen bereits nachgewiesen werden [19]. Dabei wurde die Inhibition der Hydroxylierung über eine Bindung der viralen Proteine an die PHDs ausgelöst und somit die proteasomale Degradation verhindert. Dies resultiert abschließend in der HIF-1 α Stabilisierung [19]. Übereinstimmend mit der Literatur zeigen die vorliegenden Daten unter experimenteller Inhibition der PHDs und des Proteasoms eine reduzierte HIF-1 α Hydroxylierung für die HPV-positiven Zelllinien (Abb.7). Die gleichzeitige Inhibition der PHDs und des Proteasoms zeigt gewissermaßen eine Art Momentaufnahme zur Bestimmung der HIF-Hydroxylierung ohne, dass ein Abbau oder eine weitere Anreicherung möglich ist.

4.1.2 HIF-1 α Stabilisierung in HPV-positiven HNSCC-Zelllinien unter Hypoxie

Die Ergebnisse unter Hypoxie zeigen erwartungsgemäß eine Erhöhung des HIF-1 α Proteinlevels in allen HNSCC-Zelllinien, unabhängig vom HPV-Status (Abb.6A), welches einen funktionellen Hypoxie-Signalweg impliziert. Obwohl alle Zelllinien eine funktionelle Antwort auf Hypoxie zeigen, fällt diese in HPV-negativen und HPV-positiven Tumorzellen unterschiedlich aus. Die HPV-positiven Zelllinien zeigen im Vergleich zu den HPV-negativen Zelllinien insgesamt eine höhere relative und absolute Zunahme des HIF-1 α Proteins (Abb.6B). In einer anderen Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass unter Hypoxie eine HIF-1 α Akkumulation in HPV-positiven und -negativen HNSCC-Zelllinien erfolgt [27]. Übereinstimmend mit den hier vorliegenden Ergebnissen konnte bereits eine durch HPV induzierte HIF-1 α Stabilisierung unter chemisch induziertem Hypoxiesignalweg in HPV E6/E7 transfizierten Zelllinien und Zervixkarzinom-Zelllinien nachgewiesen werden [8, 26, 59]. Kongruent zu bereits etablierten regulatorischen Mechanismen [18, 24, 28, 29, 54, 73, 74] sind die hier vorliegenden erhöhten HIF-1 α Proteinlevel in den HPV-positiven HNSCC-Zelllinien assoziiert mit einem signifikanten Anstieg der PHD2 Level unter Hypoxie (Abb.6C). Dies deutet darauf hin, dass eine HPV-Onkoprotein induzierte HIF-1 α Aktivierung unter Normoxie durch die Inhibition der PHD2 Aktivität induziert wird und durch eine Abnahme der Sauerstoffverfügbarkeit unter Hypoxie zusätzlich gesteigert wird.

4.1.3 HIF-1 α Funktionalität in HNSCC-Zelllinien

Zur Überprüfung der HIF-1 α Funktionalität in den Kopf-Hals-Tumor-Zelllinien erfolgten in dieser Arbeit Untersuchungen der zellulären HIF-1 α Lokalisation (Abb.8C).

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzuntersuchung zeigen unter Normoxie und verglichen mit den HPV-negativen Zelllinien ein stärkeres Fluoreszenzsignal in den Nuklei der HPV-positiven HNSCC-Zelllinien. Liegt eine nukleäre Lokalisation vor deutet dies auf ein funktionelles HIF-1 α Protein und eine Aktivierung der HIF-Zielgene hin [19]. Zusätzlich kann unter der Behandlung mit DFO ein deutlicherer Anstieg der nukleären HIF-1 α Akkumulation beobachtet werden (Abb.8A-C). Beides impliziert eine HIF-1 α Funktionalität für HPV-assoziierte HNSCC. Die HIF-1 α Aktivierung unter Normoxie könnte einen „Warburg-ähnlichen Effekt“ in HPV-assoziierten Tumoren auslösen, der das Tumorstadium positiv beeinflusst und das Zellüberleben sichert [20]. Zusätzlich kann über HIF-1 α die Angiogenese stimuliert werden [73, 74]. In HPV-assoziierten Tumoren könnte die erhöhte Sauerstoffverfügbarkeit Ursache für die höhere Radiosensitivität sein [3, 50].

4.1.4 HIF-1 α Expression und Einfluss auf Tumorwachstum, Migration und Proliferation in HPV-positiven HNSCC-Zelllinien

Sowohl eine HIF-1 α Suppression als auch eine Überexpression kann das Wachstum hypoxischer Tumoren stark beeinflussen [45, 48, 68]. In den hier durchgeführten Funktionellen-Assays konnten Unterschiede des Proliferations- und Migrationsverhaltens unter Aktivierung des Hypoxiesignalwegs (DFO) (Abb.9) und HIF-1 α Inhibition (siRNA) nachgewiesen werden (Abb.11). Die Aktivierung des Hypoxiesignalwegs führte in den HPV-negativen Zelllinien zu einer verminderter Migration (Abb.9) und einem negativen Effekt auf die Wundheilung *in vitro* (Abb.12A). Die siRNA induzierte HIF-1 α Inhibition löste hingegen in den HPV-positiven Zelllinien eine verminderte Migration (Abb.11) und einen negativen Effekt auf die Wundheilung aus (12B). Dies steht in Einklang mit den zuvor beschriebenen erhöhten HIF-1 α Proteinleveln in den HPV-positiven HNSCC-Zelllinien und impliziert veränderte phänotypische und metabolische Eigenschaften. Hypoxie ist ein bedeutender metabolischer Stressor, der die Tumorstadium beeinflusst. Einer der entscheidenden Mediatoren für die Reaktion auf physiologische Störungen und Hypoxie innerhalb der Tumormasse ist HIF-1 α . HIF-1 α fungiert als molekularer Schalter, indem es die Tumorzellen an eine sauerstoffarme Umgebung anpasst. Durch die Stabilisierung von HIF-1 α und den Import in den Zellkern werden Gene hochreguliert, die an der Angiogenese, dem Glukosetransport und der Glykolyse beteiligt sind [60]. Diese Geninduktion verbindet HIF-1 α mit dem metabolischen Phänotyp und ermöglicht Veränderungen des Wachstumsmusters von Tumorzellen mit stabiler

HIF-1 α -Expression [60]. Auf diese Weise könnte HIF-1 α eine bedeutende Rolle zwischen einer Virusinfektion und der anschließenden Transformation sein. HIF-1 α gilt daher als „*target*“ vieler virus-induzierter Tumorzellen und ermöglicht ihnen ein hypoxisches Milieu zu überleben [60].

Weiterhin konnte in dieser Arbeit ein Verlust des membranständigen E-Cadherin unter Behandlung mit DFO in den HPV-positiven Zelllinien beobachtet werden (Abb.13). Eine Steigerung der Proliferation, der Migration und des Invasionsverhaltens ist meist auf eine gestörte Cadherin vermittelte Zell-Zell-Adhäsion oder E-Cadherin-Ektodomänen-Shedding zurückzuführen [38, 66]. Unter dem Begriff Ektodomänen-Shedding versteht man eine proteolytische Abspaltung des extrazellulären Abschnitts von Membranproteinen. Hierzu zählen Rezeptoren, Wachstumsfaktoren (z.B. *epidermal growth factor* und *tumor necrosis factor*) oder Zelladhäsionsproteine. Das Abspalten der Ektodomänen kann Wachstum, Apoptose und Signaltransduktion beeinflussen [100]. Die hier gezeigten Ergebnisse deuten auf ein HIF-1 α vermitteltes E-Cadherin-Shedding in den HPV-positiven Zelllinien hin und dieses könnte *in vivo* eine Epitheliale-mesenchymalen Transition (EMT) auslösen. Während der EMT bauen Epithelzellen Zell-Zell- und zelluläre-extrazelluläre Matrixkontakte ab und wandern an andere Stellen im Körper. Im Verlauf des Tumorwachstums scheint die EMT den Tumorzellen die Fähigkeit zu verleihen, in das umgebende Gewebe einzudringen und schließlich an entfernte Stellen zu metastasieren [101]. Dies und die verminderte E-Cadherin Expression könnten den metastasierenden Phänotyp in HPV-assoziierten Kopf-Hals-Tumoren erklären [33].

4.2 Relative mRNA Level unter Hypoxie in HPV-positiven und -negativen Zelllinien

Die bisherigen Ergebnisse deuten daraufhin, dass die HPV-Onkoproteine eine erhöhte HIF-1 α Induktion initiieren. Daher wurde zur Überprüfung des Einflusses von Hypoxie auf die viralen Onkoproteine eine qRT-PCR der HPV mRNA in vier HPV-positiven Zelllinien durchgeführt. Für HPV31 E6 und E7 konnte bereits unter DFO gezeigt werden, dass diese eine erhöhte HIF-1 α Induktion initiieren [59]. In der vorliegenden Arbeit konnte unter Hypoxie ein signifikanter Rückgang der HPV mRNA beobachtet werden (Abb.14). Dies steht in Einklang mit Erkenntnissen aus der bisherigen Literatur. Hier konnte bereits nachgewiesen werden, dass Hypoxie das Potenzial besitzt, die Biologie HPV-assoziiierter Tumoren zu beeinflussen [32]. Dies geschieht durch

generelle Effekte im Tumor, aber auch durch eine Interaktion mit den viralen Onkoproteinen und deren Wirtszelle. So kann Hypoxie beispielsweise eine Art Dormanz in HPV-positiven Zellen auslösen. Dieser Zustand ist u.a. charakterisiert durch ein Herunterfahren der viralen Onkogen-Expression und einem reversiblen Wachstumsstillstand [32]. Des Weiteren wurden mRNA Analysen für GLUT-1, HIF-1 α und E-Cadherin in vier HPV-positiven und zwei HPV-negativen durchgeführt. Auch hier sind die Ergebnisse in der Literatur kontrovers. So wurde einerseits über eine Reduktion der GLUT-1 und HIF-1 α Level in HPV-assoziierte Tumoren berichtet [27], während andererseits höhere GLUT-1 mRNA Werte detektiert wurden [44]. Die hier vorliegenden Ergebnisse bestätigen erhöhte GLUT-1 mRNA Level unter Hypoxie in den HPV-positiven Zelllinien (Abb.15C, D) und deuten auf einen erhöhten glykolytischen Metabolismus hin [44]. Übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Arbeit konnte ebenfalls bereits in E6 transfizierten Keratinozyten ein erhöhter Gehalt an glykolytischen Enzymen nachgewiesen werden [17]. Darüber hinaus werden die HIF-1 α mRNA Level der HPV-positiven Zelllinien, verglichen mit den HPV-negativen Zelllinien, weniger stark durch Hypoxie beeinflusst und bleiben nahezu konstant. Dies deutet daraufhin, dass die HPV-Onkoproteine bereits einen Einfluss auf die HIF-1 α Induktion ausüben und möglicherweise einen vorbestehenden Warburg-Effekt verstärken. Zusätzlich konnte in der vorliegenden Arbeit in den HPV-positiven Zelllinien unter Hypoxie ein niedrigeres E-Cadherin mRNA Level als in HPV-negativen Zelllinien nachgewiesen werden (Abb. 15E,F). Dies steht in Einklang mit der Degradation und dem Verlust des membranständigen E-Cadherin unter Behandlung mit DFO. Die hier gezeigten Ergebnisse könnten insgesamt den metastasierenden Phänotyp in HPV-assoziierten Kopf-Hals-Tumoren erklären.

4.3 Metabolische Unterschiede zwischen HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC

Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC weisen ein verbessertes Therapieansprechen sowie Überleben im Vergleich zu Patienten mit HPV-negativen OPSCC auf, insbesondere nach ionisierender Bestrahlung [3]. Dies könnte auf eine effizientere Ionisation von Sauerstoff im Gewebe unter Strahlentherapie zurückzuführen sein, welches möglicherweise mit einer HIF-1 α Aktivierung aufgrund eines höheren pO₂-Wertes im Zusammenhang steht. Es wurde bereits gezeigt, dass HPV-Onkoproteine eine Rolle bei der Regulation der metabolischen Mechanismen spielen [57, 60]. Literaturdaten und die Ergebnisse aus Zellkulturuntersuchungen dieser Arbeit werfen

die Frage auf, wie das Expressionsniveau der am Energiestoffwechsel beteiligten zellulären Proteine bei HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC vorliegt. Hierzu erfolgten an einem Patientenkollektiv retrospektive Analysen von HIF-1 α und dessen „targets“ GLUT-1, LDHA und CA9.

4.3.1 HIF-1 α

Die Expression des HIF-1 α Proteins konnte sowohl in HPV-assoziierten als auch in HPV-negativen OPSCC immunhistochemisch nachgewiesen werden und wird hauptsächlich im Nukleus exprimiert (Abb.17A-C). Hinsichtlich des HIF-1 α Expressionsniveaus oder der Intensität ließen sich in der Immunhistochemie jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen HPV-assoziierten und -negativen OPSCC feststellen (Abb. 17 D, E). HIF-1 α gilt als ein sehr instabiles Protein mit einer Halbwertszeit von weniger als 5 Minuten unter Normoxie [5]. Die Literatur zur immunhistochemischen HIF Expression zeigt sich widersprüchlich für HNSCC [62]. Fehlende Unterschiede der HIF-1 Expression in Abhängigkeit des HPV-Status in dieser Arbeit könnten mit der geringen Halbwertszeit von HIF-1 α assoziiert und auf die Zeit für die Probenkonservierung zurückzuführen sein. Dennoch konnte bereits für Zervixkarzinome in der Literatur ein Zusammenhang zwischen der HIF-1 α Expression und der GLUT-1 Expression hergestellt werden. Dies suggeriert, dass HIF-1 α über die Regulation von GLUT-1 einen Einfluss auf die Glykolyse ausübt [12]. Für HPV transfizierte Zelllinien konnte ein erhöhtes HIF-1 α Niveau ebenfalls mit der Aktivierung weiterer „downstream targets“ wie beispielsweise CA9 in Verbindung gebracht werden [59]. Ferner wurde für HPV-assoziierte OPSCC Tumoren ein Trend zu einer erhöhten LDH Expression festgestellt [44]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass LDHA aufgrund einer E7-induzierten intrazellulären Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) vorzugsweise im Kern von HPV16-positiven zervikalen Tumoren lokalisiert wird [51]. Zelluläre Prozesse, die das Tumorwachstum fördern, begünstigen auch die Glukoseaufnahme. Viele dieser Prozesse werden durch Moleküle wie HIF-1 α gesteuert. Glukosetransporter in der Membran werden so als Reaktion auf niedrige Sauerstoffwerte hochreguliert. Durch die Beeinflussung des Glukosetransports sind onkogene Viren in der Lage, vermehrt Glukose für proliferierende Zellen verfügbar zu machen [60].

4.3.2 GLUT-1

Der Transport von Glukose in die Zelle erfolgt mittels Glukosetransporter (GLUTs), die in allen Zelltypen vorhanden sind. GLUTs weisen eine variable Gewebeverteilung und eine variable Affinität für Glukose auf. Funktionell regulieren GLUTs die Bewegung von Glukose zwischen den extrazellulären und den intrazellulären Kompartimenten, wobei die Glukose für den Zellstoffwechsel verfügbar bleibt [99]. Glukosetransporter sind in vielen Karzinomen überexprimiert [95]. Die differenzierte Tumorbiologie der HPV-assoziierten HNSCC wirft die Frage nach dem Expressionsniveau des am Energiestoffwechsel beteiligten Proteins GLUT-1 auf. In der durchgeführten immunhistochemischen Untersuchung konnte gezeigt werden, dass sowohl HPV-assoziierte als auch HPV-negative OPSCC GLUT-1 membranständig exprimieren, sich jedoch hinsichtlich des prozentualen Anteils der Membranständigkeit von GLUT-1 signifikant unterscheiden (Abb. 18-20), mit einer erhöhten Expression in HPV-negativen OPSCC (Abb. 20B). Diese zeigen zudem eine signifikant höhere Expressionsintensität von GLUT-1 (Abb. 18E). Diese Ergebnisse stimmen mit vorangegangenen Untersuchungen in HPV-positiven Zellen überein [59]. Gegensätzlich zu diesen Ergebnissen wurden zuvor höhere GLUT-1 Proteingehalte in HPV-assoziierten im Vergleich zu HPV-negativen OPSCC berichtet in der Annahme, dass HPV-positive Tumoren metabolisch hochaktiv sind und eine erhöhte Glykolyse aufweisen [44]. Möglicherweise sind Viren selbst in der Lage, Veränderungen in der Zellmembran zu bewirken, die den Glukosetransport erleichtern können [60]. Eine erhöhte Glukoseaufnahme ist ein auffälliges Merkmal vieler Virus induzierter Tumoren [60]. Wie bereits in Studien mit onkogenen Viren beobachtet, sind diese Effekte nicht immer auf eine erhöhte GLUT1-Expression zurückzuführen, sondern können auch einen veränderten GLUT1-Transport in transformierten Zellen hervorgerufen werden [60]. Dies deutet darauf hin, dass funktionelle Veränderungen im Membrantransportsystem für die virusinduzierte Onkogenese kritisch sein können [60]. Die bisherigen Daten aus der Literatur und die hier gewonnenen Daten lassen vermuten, dass HPV-Proteine einen Mechanismus zur Modulation der Intensitäten von HIF-1 α -Zielgenen auslösen. Um dies jedoch belegen zu können und die Rolle der Hypoxie und HIF-1 α Stabilisierung im HPV-assoziierten Tumor zu verstehen ist eine detailliertere Analyse weiterer HIF-Zielgene nötig.

Das GLUT-1 Expressionsniveau korreliert ebenfalls signifikant mit dem Überleben von Patienten mit HPV-negativen OPSCC, nicht jedoch bei Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC. Bei Patienten mit HPV-negativen OPSCC, korreliert eine starke GLUT-1 Expression mit einem reduzierten Überleben (Abb. 21), welches kongruent zu bisherigen Daten ist [62]. Dies legt nahe, dass die GLUT-1 Expression in HPV-negativen OPSCC vor allem auf eine tatsächliche Tumorphoxie zurückzuführen ist.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Arbeit (Abb. 22) konnte für HPV-assoziierte OPSCC bereits eine GLUT-1 Expression zentral im Tumor und eine schwächere Expression in den peripheren Bereichen nachgewiesen werden [44]. Die hier vorliegenden Ergebnisse stehen in Einklang mit der These, dass HPV-assoziierte OPSCC hauptsächlich von der Glukoseaufnahme und der anaeroben Glykolyse in zentralen, hypoxischen Tumorregionen abhängig sind. In peripheren Bereichen nutzen HPV-assoziierte OPSCC hingegen die oxidative Phosphorylierung und Metabolisierung von Milchsäure zur Energieversorgung [44]. Dies korreliert möglicherweise mit den für HNSCC beobachteten hohen Expressionsniveaus der β -F1-ATPase, die eine schnelle Proliferation auch in hypoxischen Bereichen begünstigt [34]. Ein solcher „metabolischer Phänotyp“ verschafft dem Virus-assoziierten Tumor einen Selektionsvorteil, indem auch eine Proliferation unter Nährstoffmangel und Hypoxie möglich ist [60]. Diese Signalwege und insbesondere der Glukosetransport können demnach auch als potenzielle Therapieziele dienen. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass es sich bei Glukosetransportern um ubiquitär exprimierte Proteine handelt, dessen Blockade zwangsläufig den Glukoseverbrauch im normalen Gewebe verändert [95].

4.3.3 LDHA

LDHA Proteine sind verantwortlich für die Umwandlung von Pyruvat zu Laktat [44, 65]. In der Glykolyse wird Glukose zu Pyruvat abgebaut. Eine Besonderheit ist, dass sämtliche Reaktionsschritte keinen Sauerstoff benötigen [7]. Anschließend wird im Citratzyklus das Endprodukt der Glykolyse, das Pyruvat, verstoffwechselt. Bei Sauerstoffmangel zeigt der Citratzyklus eine reduzierte Aktivität. Die Zellen wandeln dann Pyruvat in Milchsäure um. Die Umwandlung von Glukose zu Milchsäure wird als Milchsäuregärung bezeichnet. Die im Zytosol ablaufende Reaktion wird durch die Laktatdehydrogenase (LDH) insbesondere bei anaeroben Bedingungen katalysiert. Die Reduktion von Pyruvat zu Laktat liefert der Zelle auch in Hypoxie ausreichend NAD^+ für die Glykolyse und ermöglicht das Überleben der Zelle unter anaeroben Bedingungen

[7]. Eine wesentliche Auswirkung des Warburg-Effekts ist eine erhöhte Laktatproduktion der Tumorzellen. In Tumorzellen wird Laktat von Monocarboxylat-Transportern exportiert, was zu einer Übersäuerung der Mikroumgebung führt. Bei normalen Zellen führen diese Veränderungen zum Zelltod [93]. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung zeigen sowohl für HPV-assoziierte als auch HPV-negative OPSCC eine zytoplasmatische LDHA Expression (Abb. 23 A-C). Beide Tumorentitäten weisen einen hohen Anteil an Tumoren mit einer moderaten LDHA Expression auf. Die HPV-negativen OPSCC zeigen allerdings auch ein hohes Expressionsniveau von LDHA, während dieser Anteil bei den HPV-assoziierten OPSCC nur sehr gering ist (Abb. 23D). Kongruent zu diesen Ergebnissen konnte in HPV-positiven HNSCC Zelllinien bereits gezeigt werden, dass diese eine geringere LDHA Proteinexpression aufweisen, verglichen mit HPV-negativen Zelllinien [44]. Die hier untersuchten HPV-assoziierten und -negativen OPSCC unterscheiden sich ebenfalls hinsichtlich der LDHA Expressionsintensität. HPV-negative OPSCC zeigen eher eine starke Färbeintensität verglichen mit HPV-assoziierten OPSCC (Abb. 25A). Die Färbeintensität korreliert zudem negativ mit dem Gesamtüberleben von Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC. Bei einer starken Färbeintensität zeigt sich hier ein Trend für ein schlechteres krankheitsspezifisches Überleben der Patienten (Abb. 25C). Übereinstimmend zu den hier gezeigten Daten konnte bereits für klarzellige Nierenzellkarzinomen gezeigt werden, dass eine LDHA-Hochregulierung ein Indikator für eine schlechte Prognose ist [25]. Ein Mangel an Milchsäureproduktion könnte demnach bei HPV-assoziierten HNSCC auch ihr ausgezeichnetes Ansprechen auf die Strahlentherapie erklären [44].

4.3.4 CA9

Carboanhydrasen sind transmembrane zinkhaltige Enzyme, die eine reversible Hydratation von Kohlendioxid in Kohlensäure katalysieren und an der Zellatmung und dem Säure-Base-Gleichgewicht beteiligt sind. Es sind 14 Mitglieder dieser Familie bekannt, die nach ihrer Lokalisation unterteilt werden: membran-assoziiert, zytosolisch, mitochondrial und sezerniert. Die Expression von CA9 ist bereits in verschiedenen Tumortypen beschrieben worden, darunter auch für Oropharynxkarzinomen [62, 63]. CA9 gilt ebenfalls als eines der Hauptziele von HIF-1 [65]. Übereinstimmend mit der Literatur konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass HPV-assoziierte OPSCC im Vergleich zu HPV-negativen OPSCC einen hohen Anteil Tumorzellen mit

starker CA9 Färbintensität und starker Expression aufweisen (Abb. 26G, Abb. 26H). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass in den HPV-assoziierten OPSCC über HPV eine Aktivierung der HIF-1 Zielproteine wie CA9 getriggert wird. Die Analyse des Färbetyps in Verbindung mit der Tumorgroße hat ergeben, dass HPV-assoziierte verglichen mit HPV-negativen OPSCC häufiger eine zentrale Färbung des Tumors (als „Hypoxiemuster“ bezeichnet) bei T1 und T2 Tumoren aufweisen. Eine zentrale CA9 Färbung im Tumor kann bei HPV-negativen OPSCC vielfach erst in Tumoren des Stadiums T3 und T4 nachgewiesen werden (Abb. 27A, B). Erwarten würde man eine Tumorphoxie *in vivo* erst bei größeren Tumoren, wie sie bei den HPV-negativen OPSCC zu erkennen ist. Dies deutet daraufhin, dass in den HPV-assoziierten OPSCC keine echte Tumorphoxie vorliegt. Für die HPV-assoziierten OPSCC lässt sich demnach eine HPV-Onkoprotein induzierte Aktivierung des Hypoxie-Signalwegs vermuten. In Übereinstimmung mit der Literatur korreliert der Färbetyp ebenfalls mit dem Gesamtüberleben der Patienten mit HPV-negativen OPSCC. So konnte bereits gezeigt werden, dass eine hohe CA9 Expression mit einem geringeren Gesamtüberleben bei Patienten mit p16-negativen Tumoren assoziiert ist [63].

Zusätzlich zur Bewertung der CA9 Färbung wurden nekrotische Bereiche in den gefärbten Arealen ausgewertet. Die Auswertung ergab eine Häufung von nekrotischen Tumoren bei HPV-assoziierten OPSCC verglichen mit HPV-negativen OPSCC (Abb. 28). Dies ist u.U. vergleichbar mit einer Beobachtung, die man bei durch *Tissue Engineering* gewonnenen Transplantaten feststellen kann: Die Diffusion reicht hier häufig nur für eine Versorgung der Zellen in den äußeren 5 mm der Zellschicht. Aufgrund dessen kommt es in diesen Fällen häufig zu Nekrosen im zentralen Bereich [70]. Kongruent zu den hier durchgeführten Untersuchungen konnte für Gewebematerial von Kopf-Hals-Tumoren gezeigt werden, dass hauptsächlich eine CA9 Expressionen bei sehr schwach vaskularisierten Tumoren, um die Bereiche der Nekrose herum, vorzufinden ist [42] Diese Untersuchung erfolgte jedoch unabhängig vom HPV-Status. Die CA9 Expression bzw. eine zentrale oder uniforme Färbung korreliert nicht mit dem Gesamtüberleben der Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren (Abb. 27D). Im Allgemeinen kann jedoch bestätigt werden, dass vor allem für die CA9 Expression eine Häufung in nekrotischen Bereichen des Tumors vorzufinden (Abb. 28C) ist und mit dem Gesamtüberleben für Patienten mit HPV-negativen OPSCC korreliert. Dies könnte

wiederum mit der bereits in der Literatur beobachteten Radioresistenz in Zusammenhang stehen [42].

4.3.5 18F-FDG PET-CT Parameter in HPV-assoziierten und HPV-negativen OPSCC

Metabolische Parameter können mittels PET-CT zur Diagnose und Auswertung des Behandlungserfolgs ermittelt werden. Der standardisierte Aufnahmewert („*standardized uptake value*“ = SUV) von 18F-Fluordesoxyglucose (18F-FDG) ist eine semi-quantitative Messung der Traceraufnahme, wobei der SUV den Glukosestoffwechsel eines Tumors beschreibt. Es wird angenommen, dass ein hoher SUV-Wert mit einer schlechteren Prognose bei HNSCC-Patienten einhergeht [11, 53, 96]. Darüber hinaus haben sich neuere Funktionsparameter wie die Gesamtläsionsglykolyse (“*total lesion glycolysis*” = TLG) auch bei HNSCC als prognostisch wertvoll erwiesen [49, 69].

In der vorliegenden Arbeit konnten metabolische Unterschiede hinsichtlich der PET-Parameter SUV_{max}, SUV_{mean} und TLG für HPV-negative und HPV-assoziierte OPSCC nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass in der Gruppe der HPV-negativen OPSCC der SUV_{max} in kleinen (T1-T2) und großen Tumoren (T_{≥3}) signifikant unterschiedlich ist. Große Tumoren der OPSCC weisen einen deutlich höheren SUV_{max} im Vergleich zu kleinen HPV-negativen Tumoren auf (Abb.30A). Dies konnte ebenso für den PET-Parameter SUV_{mean} gezeigt werden (Abb.30B). Dieses Phänomen ist vermutlich auf eine Hypoxie, bedingt durch eine große Tumormasse, zurückzuführen [77]. Andererseits kann für HPV-assoziierte Tumore angenommen werden, dass die Glukoseaufnahme bzw. das Stoffwechselprofil des Tumors durch die onkogenen Viren durch direkte oder indirekte Wechselwirkungen mit zellulären Proteinen moduliert wird [60]. Dies ist erneut ein Hinweis auf eine HPV-induzierte Glykolyse unabhängig des Vorliegens einer wirklichen Hypoxie. In HPV-negativen OPSCC könnte hingegen der Glukosestoffwechsel dominant durch Hypoxie reguliert werden [77]. Im Einklang mit den vorliegenden Untersuchungsergebnissen wurde festgestellt, dass HPV-positive Primärtumore beim Vergleich des AUC (*Area under the curve*)-CSH (*Cumulative SUV-volume histograms*) eine höhere Homogenität aufweisen [69]. Der Bereich unter der Kurve (AUC) ist ein quantitativer Index der Heterogenität der Tumoraufnahme, wobei ein geringer Wert einem höheren Grad an Heterogenität entspricht [85]. Allerdings ist zu beachten, dass der Parameter

AUC-CSH in der Literatur diskutiert wird, da dieser unter Umständen auch durch das Tumolvolumen beeinflusst werden könnte [10]. Auch für den TLG ist ein höherer Wert in großen Primärtumoren verglichen mit kleinen Primärtumoren nachweisbar (Abb. 30C). Hier bestehen zudem in der Gruppe der HPV-negativen OPSCC als auch der HPV-assoziierten OPSCC signifikante Unterschiede zwischen kleinen und großen Tumoren. Der TLG berücksichtigt das Volumen der metabolisch aktiven Erkrankung zusätzlich zum Grad der Tumorglukoseverwertung [49]. Der TLG weist über das klinische T-Stadium hinaus einen prognostischen Wert auf und sollte für die Risikostratifizierung bei diesen Patienten in Betracht gezogen werden.

Die Analyse des Gesamtüberlebens ergab eine signifikant bessere Überlebenszeit bei Patienten mit HPV-negativen OPSCC mit niedrigen SUV_{max}, SUV_{mean}- und TLG-Werten (Abb. 31). Im Gegensatz dazu war die Gesamtüberlebensrate bei Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC unabhängig von diesen drei PET-Werten. Dies lässt bei HPV-Assoziation eine virus-induzierte Aktivierung des Hypoxiesignalwegs vermuten. Die vorliegenden Ergebnisse für Patienten mit HPV-negativen OPSCC bestätigen die Annahme, dass ein hoher SUV-Wert mit einer schlechteren Prognose bei HNSCC-Patienten einhergeht [11, 53, 96]. Ebenso konnte bereits gezeigt werden, dass hohe TLG-Werte mit einem schlechteren Gesamtüberleben bei Patienten mit Oralkarzinomen in Verbindung stehen [98], was die hier vorliegenden Ergebnisse bestätigt.

HPV Onkoproteine können das Stoffwechselprofil des Tumors modulieren [60]. Die Analyse der GLUT-1 Expression in Abhängigkeit des T-Stadiums für Patienten von denen PET-Daten vorliegen zeigt, dass bei großen Primärtumoren (T3 & T4) eine hohe GLUT-1 Expression in HPV-negativen OPSCC vorliegt (Abb. 32). In der Gruppe der HPV-assoziierten OPSCC konnte ebenfalls eine höhere GLUT-1 Expression in großen Primärtumoren festgestellt werden, jedoch ohne Signifikanz. Kongruent zu den bisher gezeigten Ergebnissen, konnte bereits nachgewiesen werden, dass die 18F-FDG-Aufnahme eng mit der Expression von GLUT-1 und HIF-1 α , der Tumorgroße und der Lymphknotenmetastasierung verbunden ist [94]. Dies lässt sich vermutlich darauf zurückführen, dass eine Tumorphoxie im Wesentlichen dann auftritt, wenn das Tumorstadium das angiogene Wachstum übersteigt. Dies spiegelt die adaptive

Diskussion

Reaktion der Zellen auf eine verminderte Sauerstoffkonzentration wider [62]. Ein Umstand der demnach vor allem in großen Tumoren beobachtet werden kann.

Insgesamt konnte auch in dieser Arbeit eine homogenere ¹⁸F-FDG-Aufnahme sowie eine homogenere GLUT-Expression in HPV-assoziierten OPSCC im Gegensatz zu HPV-negativen OPSCC nachgewiesen werden. Dies deutet auf eine unterschiedliche Biologie dieser Tumoren hin mit einer Onkoprotein-induzierten Karzinogenese in HPV-assoziierten OPSCC im Vergleich zur mutationsbedingten bei den HPV-negativen OPSCC.

Limitierend für die vorliegende Arbeit sind allerdings, der geringe Stichprobenumfang und das Fehlen von Patienten mit einem N0-Stadium in der HPV-positiven Subgruppe.

4.4 Schlussfolgerung

HPV-assoziierte Veränderungen des Tumorstoffwechsels könnten der Grund für typische Besonderheiten HPV-assoziiierter Kopf-Hals-Tumoren sein. Patienten mit einem HPV-assoziierten Kopf-Hals-Tumor weisen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose häufig kleines T-Stadium mit lymphogener Metastasierung auf. Dieses fortgeschrittene N-Stadium steht im Widerspruch zur guten Prognose von Patienten mit HPV-assoziierten HNSCC und der guten Ansprechrate auf Bestrahlung. So könnten in den kleineren HPV-assoziierten Kopf-Hals-Tumoren geringere hypoxische Bedingungen als in HPV-negativen HNSCC vorliegen, welches möglicherweise die hohe Strahlensensibilität dieser Tumoren erklärt. Zudem könnte es durch die Virus-induzierte Karzinogenese zur Aktivierung des Hypoxie-Signalwegs kommen, was wiederum das Potenzial zur Metastasierung erhöhen könnte. Die Untersuchungen ergaben, dass HPV-positive HNSCC-Zellen unter Normoxie und Hypoxie höhere HIF-1 α - und PHD2-Proteinwerte zeigten. Die Hydroxylierung von HIF-1 α war zudem in HPV-positiven HNSCC-Zelllinien unter PHD und proteasomaler Inhibition reduziert. In-vitro-Wundheilungstests zeigten eine Beeinträchtigung der Migration und Proliferation durch die Aktivierung des HIF-1 α -Signalwegs nur bei HPV-negativen Zelllinien. Im Gegensatz dazu wurde die Migration und Proliferation in HPV-positiven Zelllinien durch HIF-1 α spezifische siRNA beeinträchtigt. In immunhistochemischen Untersuchungen der HIF-1 α „*targets*“ GLUT-1, LDHA und CA9 konnte gezeigt werden, dass sich HPV-assoziierte als auch HPV-negative OPSCC hinsichtlich der Expression unterscheiden. Des Weiteren unterscheiden sich die glykolytischen Parameter, gemessen im 18F-FDG PET-CT in Abhängigkeit des HPV-Status und sind in HPV-positiven OPSCC deutlich homogener. Im Gegensatz zu HPV-negativen OPSCC korrelierten weder SUV_{max}, SUV_{mean}, noch der TLG mit dem Gesamtüberleben der Patienten mit HPV-assoziierten OPSCC. Diese Ergebnisse unterstützen die These einer homogenen, HPV-gesteuerten Karzinogenese in OPSCC, verglichen mit der mutationsbezogenen Karzinogenese in HPV-negativen OPSCC. Die onkogenen HPV scheinen über die Stabilisierung von HIF-1 α das Tumorwachstum sowie das Metastasierungspotenzial in HNSCC zu beeinflussen. Eine Wiederherstellung der HIF-1 α Degradation könnte zukünftig im Rahmen gezielter Therapieansätze genutzt werden, um die Proliferation des Tumors zu unterbinden.

5 Zusammenfassung

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches (HNSCC, Head and Neck Squamous Cell Carcinoma) zählen zu den sechs häufigsten Tumorerkrankungen weltweit. Diese können in HPV-assoziierte und Noxen-induzierte Tumoren unterteilt werden. Klinisch auffällig ist, dass HPV-assoziierte Primärtumoren bei Erstdiagnose eine geringere Primärtumorgröße, jedoch in der Mehrzahl der Fälle ausgeprägte regionäre Lymphknotenmetastasen aufweisen. Dennoch weisen Patienten mit HPV-assoziierten HNSCC ein besseres Therapieansprechen und eine bessere Gesamtprognose auf. Die beschriebenen Charakteristika lassen darauf schließen, dass bei HPV-assoziierten HNSCC eine gänzlich andere Biologie der Karzinogenese zu Grunde liegt. HIF1 ist ein aus einer α - (HIF-1 α) und β - Untereinheit bestehender heterodimerer Proteinkomplex. Die HIF-1 α Protein Degradation wird sauerstoffabhängig reguliert. Als Resultat intratumoraler Hypoxie oder genetischer Veränderungen wird HIF-1 α in vielen humanen Tumoren überexprimiert, was zur transkriptionellen Aktivierung von Schlüsselgenen der Angiogenese, des Glukosemetabolismus, des Zellüberlebens, der Zellproliferation, Invasion und Metastasierung führt. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss HPV auf die HIF-1 α -Expression in HNSCC hat. Dafür wurden HPV-positive und -negative HNSCC-Zellen nach adaptiven Reaktionen auf Hypoxie sowie retrospektive Patientenproben hinsichtlich der HIF-1 α , GLUT-1, LDHA und CA9 Expression analysiert. Des Weiteren erfolgte die Korrelation der experimentellen Ergebnisse mit metabolischen Parametern des 18F-FDG PET/CT sowie dem Gesamtüberleben. Die Untersuchungen ergaben, dass HPV-positive HNSCC-Zellen unter Normoxie und Hypoxie höhere HIF-1 α - und PHD2-Proteinwerte zeigten. Die Hydroxylierung von HIF-1 α war zudem in HPV-positiven HNSCC-Zelllinien unter PHD und proteasomaler Inhibition reduziert. In-vitro-Wundheilungstests zeigten eine Beeinträchtigung der Migration und Proliferation durch die Aktivierung des HIF-1 α -Signalwegs nur bei HPV-negativen Zelllinien. Im Gegensatz dazu wurde die Migration und Proliferation in HPV-positiven Zelllinien durch HIF-1 α spezifische siRNA beeinträchtigt. In der immunhistochemischen Untersuchung der HIF-1 α „targets“ GLUT-1, LDHA und CA9 konnte gezeigt werden, dass sich HPV-assoziierte als auch HPV-negative OPSCC hinsichtlich der Expression unterscheiden. Weiterhin unterscheiden sich die glykolytischen Parameter, gemessen im 18F-FDG PET-CT in Abhängigkeit des HPV-Status und sind in HPV-positiven OPSCC deutlich homogener. Onkogene Viren sind in der Lage im HPV-assoziierten HNSCC, durch direkte und indirekte Interaktion mit zellulären Regulatoren, wie HIF-1 α , die Karzinogenese zu beeinflussen. Aufgrund dessen stellt HIF-1 ein potenzielles Target für eine gezielte Tumorthherapie dar.

6 Summary

Squamous cell carcinomas of the head and neck (HNSCC) are among the six most common cancer diseases worldwide and can be divided into HPV-associated as well as noxen-induced tumors. It is clinically noticeable that HPV-associated primary cancers have a smaller primary tumor size at initial diagnosis, but in most cases have pronounced regional lymph node metastases. Nevertheless, patients with HPV-associated HNSCC show a better response to therapy and have a better overall prognosis. The characteristics described above lead to the conclusion that HPV-associated HNSCC is based on a completely different biology of carcinogenesis. HIF1 is a heterodimeric protein complex consisting of a α - (HIF-1 α) and β - subunit. HIF-1 α protein degradation is regulated by oxygen. As a result of intratumoral hypoxia or genetic alterations, HIF-1 α is overexpressed in many human tumors, leading to transcriptional activation of key factors of angiogenesis, glucose metabolism, cell survival, cell proliferation, invasion, and metastasis. In the present work, the influence of HPV on HIF-1 α expression in HNSCC was investigated. For this purpose, HPV-positive and -negative HNSCC cells were analyzed for adaptive responses to hypoxia as well as retrospective patient samples about HIF-1 α , GLUT-1, LDHA, and CA9 expression. Furthermore, correlation of experimental results with metabolic parameters of ¹⁸F-FDG PET/CT and overall survival was performed. The research revealed that HPV-positive HNSCC cells showed higher HIF-1 α and PHD2 protein levels under normoxia and hypoxia. Hydroxylation of HIF-1 α was also reduced in HPV-positive HNSCC cell lines under PHD and proteasomal inhibition. In vitro wound healing assays showed impairment of migration and proliferation by activation of the HIF-1 α pathway only in HPV-negative cell lines. In contrast, migration and proliferation in HPV-positive cell lines was impaired by HIF-1 α -specific siRNA. Immunohistochemistry of the HIF-1 α targets GLUT-1, LDHA, and CA9 showed that HPV-associated as well as HPV-negative OPSCC vary in expression. Furthermore, glycolytic parameters measured by ¹⁸F-FDG PET-CT were found to be different depending on HPV status and significantly more homogeneous in HPV-positive OPSCC. Oncogenic viruses are able in HPV-associated HNSCC to influence carcinogenesis through direct and indirect interaction with cellular regulators, such as HIF-1 α . Based on this, HIF-1 represents a promising candidate for targeted tumor therapy.

7 Abkürzungsverzeichnis

ABC	<i>Avidin-Biotin-Complex</i>
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	<i>Bicinchoninic Acid</i>
BSA	bovines Serumalbumin, Rinderserumalbumin
ca.	circa
CA9	Carboanhydrase 9
CBP	<i>CREB-Binding Protein</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cm	Zentimeter
Ct-wert	<i>cycle threshold</i> = Schwellenwert
DFO	<i>Deferoxamine</i>
DMOG	<i>Dimethyloxalylglycine</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> , epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
E6, E7	HPV-Onkoproteine
E6AP	zellulären Ubiquitinligase
FA	Formaldehyd
FDG-PET/CT	Fluoro-2-desoxy-D-glucose Positronenemissionstomographie
FFPE	Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GLUT	Glukosetransporter
GLUT1	Glukosetransporter-1
h	<i>hour</i> , Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIF	<i>Hypoxia inducible-factor</i>
HIF-1 α	<i>Hypoxia inducible factor-1α</i>
HIF-1 β	<i>Hypoxia inducible factor-1β</i>
HNSCC	<i>Head and neck squamous cell carcinoma</i> , Karzinome des Kopf- und Halsbereichs

Abkürzungsverzeichnis

HNO	Hals-Nasen- und Ohrenheilkunde
HPLC-H ₂ O	Hochleistungsflüssigkeitschromatografie-Wasser
HPV	Humanes Papillomvirus
HPV+	HPV-positiver Status/ HPV-assoziierter Status
HPV-	HPV-negativer Status
HR	<i>High-Risk</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
hTERT	Humane Telomerase
Hydroxy-HIF-1 α	Hydroxylierte Form von HIF-1 α
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
JÜR	Jahres-Überlebensrate
kDa	Kilodalton
LDH	Laktatdehydrogenase
LDHA	Laktatdehydrogenase A
LR	Low-Risk
μ m	Mikrometer
μ l	Mikroliter
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MG-132	<i>Membrane-permeable proteasome inhibitor</i>
MTBST	Magermilchpulver
n	Anzahl
nm	Nanometer
NaCl	Natriumchlorid
NADH, NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid

Abkürzungsverzeichnis

N0	Nicht in die regionären Lymphknoten metastasiert
N+	in die regionären Lymphknoten metastasiert
OPSCC	<i>Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma</i> , Plattenepithelkarzinom des Oropharynx
PAA	Polyacrylamide
PD-1/PD-L1	<i>programmed death receptor 1/ligand 1</i>
PHD	<i>Prolyl hydroxylase domain</i>
PHD2	<i>Prolyl hydroxylase-domain protein 2</i>
p16	p16INK4a CDK-Inhibitor 2A (<i>cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i>), Tumorsuppressorprotein
p53	Tumorsuppressorprotein
pRb	Retinoblastomprotein
p300	Histone acetyltransferase p300
RNAi	RNA Interferenz
ROI	<i>Region of Interest</i>
RT	Raumtemperatur
siRNA	<i>small-interfering-RNA</i>
Sek.	Sekunde
SUV	standardisierte Aufnahmevolumen
SUVmax, SUVmean	maximale und mittlere standardisierte Aufnahmevolumen
SPSS	Statistik- und Analyse-Software von IBM
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBST	<i>Tris buffered saline mit Tween 20</i>
TLG	Gesamt-Läsion-Glykolyse
ü.N.	über Nacht
V	Volt
VHL	von Hippel-Lindau Tumorsuppressorprotein

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Sauerstoffabhängige HIF-Regulation.....	1-4
Abbildung 2: Hypoxie-induzierte HIF-1 α Aktivierung im soliden Tumor.	1-5
Abbildung 3: HIF-1 α und dessen potenzielle Rolle bei der HPV-induzierten Karzinogenese. .	1-7
Abbildung 4: Zusammensetzung des Patientenkollektivs.	2-27
Abbildung 5: HPV-DNA-Nachweis mittels PCR.	3-36
Abbildung 6: HIF-1 α und PHD2 Proteinlevel in HPV-positiven und -negativen HNSCC Zelllinien unter Normoxie.	3-37
Abbildung 7: Erhöhte HIF-1 α und PHD2 Proteinlevel als Antwort auf Hypoxie in HPV- positiven HNSCC-Zelllinien.	3-38
Abbildung 8: HIF-1 α Hydroxylierung in HPV-positiven und -negativen HNSCC-Zelllinien.	3-39
Abbildung 9: Erhöhter HIF-1 α Proteinlevel Anstieg unter chemischer Induktion (DFO) in HPV- positiven verglichen mit HPV-negativen HNSCC-Zelllinien.	3-40
Abbildung 10: Verminderte Migration unter chemischer Aktivierung des Hypoxie-Signalwegs.	3-42
Abbildung 11: HIF-1 α Inhibition durch siRNA in HPV-positiven und -negativen HNSCC- Zelllinien.	3-43
Abbildung 12: Verminderte Migration unter HIF-1 α Inhibition durch siRNA in HPV-positiven HNSCC-Zelllinien.....	3-44
Abbildung 13: Wundschluss-Änderung unter chemischer Aktivierung des Hypoxie-Signalwegs und HIF-1 α Inhibition durch siRNA in HPV-positiven und -negativen HNSCC-Zelllinien. ...	3-45
Abbildung 14: Reduzierung der membranständigen E-Cadherin Färbung unter HIF-1 α Aktivierung in HPV-positiven HNSCC-Zelllinien.	3-46
Abbildung 15: Relative mRNA Level unter Hypoxie referenziert auf Normoxie.	3-47
Abbildung 16: Relative mRNA Level unter Hypoxie bezogen auf Werte unter Normoxie.....	3-48
Abbildung 17: Gesamtüberleben von Patienten mit OPSCC (zwischen 2000 und 2014).....	3-51
Abbildung 18: Immunhistochemische Färbung von HIF-1 α in OPSCC.....	3-52
Abbildung 19: GLUT-1 Expression in OPSCC.	3-53
Abbildung 20: Anteil membranständig GLUT-1 positiv gefärbter Tumorzellen.....	3-54
Abbildung 21: GLUT-1 Membranständigkeit und Färbintensität in OPSCC.	3-56
Abbildung 22: Gesamtüberleben von Patienten mit OPSCC bezogen auf die GLUT-1 Expression (<i>P: Log Rank Test</i>).	3-56
Abbildung 23: GLUT-1 Expressionsmuster.....	3-57
Abbildung 24: Immunhistochemische Färbung von LDHA in OPSCC.....	3-59
Abbildung 25: LDHA Expressionsmuster in OPSCC.....	3-60
Abbildung 26: LDHA Intensität als Indikator für das Gesamtüberleben von Patienten mit OPSCC.	3-61
Abbildung 27: Immunhistochemische Färbung von CA9 in OPSCC.	3-62
Abbildung 28: CA9 Expressionsmuster & Gesamtüberleben von Patienten mit OPSCC in Abhängigkeit der Tumorgröße.	3-63
Abbildung 29: Nekrosen in CA9 gefärbten OPSCC.	3-64
Abbildung 30: 5-Jahres-Überleben.....	3-67
Abbildung 31: PET-CT Parameter in kleinen und großen Primärtumoren.	3-67
Abbildung 32: Gesamtüberleben von Patienten mit HPV-negativen OPSCC bezogen auf die PET-Parameter SUVmax, SUVmean und TLG.	3-68
Abbildung 33: GLUT-1 Expression in Korrelation mit dem T-Stadium.	3-70

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Laborgeräte	2-9
Tabelle 2: Chemikalien	2-10
Tabelle 3: Verbrauchsmittel	2-11
Tabelle 4: Lösungen und Puffer	2-12
Tabelle 5: Verwendete Kits	2-13
Tabelle 6: Primärantikörper	2-14
Tabelle 7: Sekundärantikörper	2-14
Tabelle 8: Proteinstandard für Western Blot	2-15
Tabelle 9: DNA-Standard für DNA-Gelelektrophorese	2-15
Tabelle 10: Primer	2-15
Tabelle 11: Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten HNSCC-Zelllinien	2-16
Tabelle 12: Pipettierschema der HPV-PCR	2-19
Tabelle 13: Programm der HPV-PCR	2-19
Tabelle 14: Pipettierschema Polyacrylamid-DNA-Gelelektrophorese	2-19
Tabelle 15: Pipettierschema Eichgerade BCA-Assay	2-21
Tabelle 16: Trenngel, 12 %	2-22
Tabelle 17: Sammelgel, 4 %	2-22
Tabelle 18: Sekundär-Antikörper Western Blot	2-24
Tabelle 19: Pipettierschema siRNA-lipid Komplexe	2-32
Tabelle 20: Programm der cDNA-Synthese	2-33
Tabelle 21: Mastermix	2-34
Tabelle 22: Schritte der qRT-PCR	2-34
Tabelle 23: Patienten- und Tumor- Charakteristika des Untersuchungskollektivs	3-50
Tabelle 24: Patienten- und Tumor-Charakteristika des PET-CT-Kollektivs	3-65
Tabelle 25: Übersicht PET-CT Parameter in HPV-negativen und HPV-assoziierten OPSCC	3-68

10 Literaturverzeichnis

1. Agaimy, A., Weichert, W., Haller, F., & Hartmann, A. (2018). Diagnostische und prädiktive Molekularpathologie von Kopf-Hals-Tumoren. *Der Pathologe*, 39(1), 42-47
2. Antoch, G., Vogt, F. M., Bockisch, A., & Ruehm, S. G. (2004). Ganzkörpertumorstaging: MRT oder FDG-PET/CT?. *Der Radiologe*, 44(9), 882-888.
3. Arenz, A., Ziemann, F., Mayer, C., Wittig, A., Dreffke, K., Preising, S., ... & Wittekindt, C. (2014). Increased radiosensitivity of HPV-positive head and neck cancer cell lines due to cell cycle dysregulation and induction of apoptosis. *Strahlentherapie und Onkologie*, 190(9), 839-846.
4. Assmann, G., & Sotlar, K. (2011). HPV-assoziierte Plattenepithelkarzinogenese. *Der Pathologe*, 32(5), 391.
5. Bárdos, J. I., & Ashcroft, M. (2005). Negative and positive regulation of HIF-1: a complex network. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1755(2), 107-120.
6. Berra, E., Benizri, E., Ginouvès, A., Volmat, V., Roux, D., & Pouyssegur, J. (2003). HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 α in normoxia. *The EMBO journal*, 22(16), 4082-4090.
7. Biggemann, L. (2014). Untersuchungen zum antikanzerogenen Potenzial von Targetstrukturen im Stoffwechsel von Tumorzellen.
8. Bodily, J. M., Mehta, K. P., & Laimins, L. A. (2011). Human Papillomavirus E7 Enhances Hypoxia-Inducible Factor 1-Mediated Transcription by Inhibiting Binding of Histone Deacetylases. *Cancer research*, 71(3), 1187-1195.
9. Bopp, T., & Klein, M. (2012). RNA-interference. In *Gentechnische Methoden* (pp. 261-274). Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
10. Brooks, F. J. (2013). Area under the cumulative SUV-volume histogram is not a viable metric of intratumoral metabolic heterogeneity: further comments. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 40(12), 1926-1927.
11. Cheng, N. M., Chang, J. T. C., Huang, C. G., Tsan, D. L., Ng, S. H., Wang, H. M., ... & Yen, T. C. (2012). Prognostic value of pretreatment 18 F-FDG PET/CT and human papillomavirus type 16 testing in locally advanced oropharyngeal squamous cell carcinoma. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 39(11), 1673-1684.
12. Cheng, Y., Chen, G., Hong, L., Zhou, L., Hu, M., Li, B., ... & Li, C. (2013). How does hypoxia inducible factor-1 α participate in enhancing the glycolysis activity in cervical cancer?. *Annals of diagnostic pathology*, 17(3), 305-311.
13. Cohen, E. E., Soulières, D., Le Tourneau, C., Dinis, J., Licitra, L., Ahn, M. J., ... & Zandberg, D. (2019). Pembrolizumab versus methotrexate, docetaxel, or cetuximab for recurrent or metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma (KEYNOTE-040): a randomised, open-label, phase 3 study. *The Lancet*, 393(10167), 156-167.
14. Choi, H. G., Kim, J. S., Kim, K. H., Kim, K. H., Sung, M. W., Choe, J. Y., ... & Jung, Y. H. (2015). Expression of hypoxic signaling markers in head and neck squamous cell carcinoma and its clinical significance. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 272(1), 219-228.

15. Chow, L. Q., Haddad, R., Gupta, S., Mahipal, A., Mehra, R., Tahara, M., ... & Seiwert, T. Y. (2016). Antitumor activity of pembrolizumab in biomarker-unselected patients with recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma: results from the phase Ib KEYNOTE-012 expansion cohort. *Journal of Clinical Oncology*, 34(32), 3838.
16. Cuninghame, S., Jackson, R., & Zehbe, I. (2014). Hypoxia-inducible factor 1 and its role in viral carcinogenesis. *Virology*, 456, 370-383.
17. Cuninghame, S. M. (2017). Asian-American variant of human papillomavirus 16 E6 promotes the Warburg effect and hypoxia-inducible factor 1 signalling under hypoxia/by Sean Cuninghame (Doctoral dissertation)
18. D'Angelo, G., Duplan, E., Boyer, N., Vigne, P., & Frelin, C. (2003). Hypoxia Up-regulates Prolyl Hydroxylase Activity A FEEDBACK MECHANISM THAT LIMITS HIF-1 RESPONSES DURING REOXYGENATION. *Journal of Biological Chemistry*, 278(40), 38183-38187.
19. Darekar, S., Georgiou, K., Yurchenko, M., Yenamandra, S. P., Chachami, G., Simos, G., ... & Kashuba, E. (2012). Epstein-Barr virus immortalization of human B-cells leads to stabilization of hypoxia-induced factor 1 alpha, congruent with the Warburg effect. *PloS one*, 7(7), e42072.
20. Denko, N. C. (2008). Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nature Reviews Cancer*, 8(9), 705.
21. de Roda Husman, A. M., Walboomers, J. M., van den Brule, A. J., Meijer, C. J., & Snijders, P. J. (1995). The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *Journal of General Virology*, 76(4), 1057-1062
22. Ferris, R. L., Blumenschein Jr, G., Fayette, J., Guigay, J., Colevas, A. D., Licitra, L., ... & Gillison, M. L. (2016). Nivolumab for recurrent squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*, 375, 1856-1867.
23. Gatenby, R. A., & Gillies, R. J. (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis?. *Nature reviews cancer*, 4(11), 891.
24. Ginouves, A., Ilc, K., Macías, N., Pouyssegur, J., & Berra, E. (2008). PHDs overactivation during chronic hypoxia “desensitizes” HIF α and protects cells from necrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(12), 4745-4750.
25. Girgis, H., Masui, O., White, N. M., Scorilas, A., Rotondo, F., Seivwright, A., ... & Jewett, M. A. (2014). Lactate dehydrogenase A is a potential prognostic marker in clear cell renal cell carcinoma. *Molecular cancer*, 13(1), 101.
26. Guo, Y., Meng, X., Ma, J., Zheng, Y., Wang, Q., Wang, Y., & Shang, H. (2014). Human papillomavirus 16 E6 contributes HIF-1 α induced Warburg effect by attenuating the VHL-HIF-1 α interaction. *International journal of molecular sciences*, 15(5), 7974-7986.
27. Hanns, E., Job, S., Coliat, P., Wasylyk, C., Ramolu, L., Pencreach, E., ... & Abecassis, J. (2015). Human Papillomavirus-related tumours of the oropharynx display a lower tumour hypoxia signature. *Oral oncology*, 51(9), 848-856.
28. Henze, A. T., & Acker, T. (2010). Feedback regulators of hypoxia-inducible factors and their role in cancer biology. *Cell Cycle*, 9(14), 2821-2835
29. Henze, A. T., Riedel, J., Diem, T., Wenner, J., Flamme, I., Pouyssegur, J., ... & Acker, T. (2010). Prolyl hydroxylases 2 and 3 act in gliomas as protective

- negative feedback regulators of hypoxia-inducible factors. *Cancer research*, 70(1), 357-366.
30. Holzapfel, B., & Wickert, L. (2007). Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. *Biologie in unserer Zeit*, 37(2), 120-126
 31. Hong, A., Zhang, M., Veillard, A. S., Jahanbani, J., Lee, C. S., Jones, D., ... & Rose, B. (2013). The prognostic significance of hypoxia inducing factor 1- α in oropharyngeal cancer in relation to human papillomavirus status. *Oral oncology*, 49(4), 354-359.
 32. Hoppe-Seyler, K., Bossler, F., Lohrey, C., Bulkescher, J., Rösl, F., Jansen, L., ... & Hoppe-Seyler, F. (2017). Induction of dormancy in hypoxic human papillomavirus-positive cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(6), E990-E998.
 33. Huang, C. G., Lee, L. A., Tsao, K. C., Liao, C. T., Yang, L. Y., Kang, C. J., ... & Lee, L. Y. (2014). Human papillomavirus 16/18 E7 viral loads predict distant metastasis in oral cavity squamous cell carcinoma. *Journal of Clinical Virology*, 61(2), 230-236.
 34. Huebbers, C. U., Adam, A. C., Preuss, S. F., Schiffer, T., Schilder, S., Guntinas-Lichius, O., ... & Wiesner, R. J. (2015). High glucose uptake unexpectedly is accompanied by high levels of the mitochondrial β -F1-ATPase subunit in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, 6(34), 36172
 35. Jung, Y. S., Najy, A. J., Huang, W., Sethi, S., Snyder, M., Sakr, W., ... & Franceschi, S. (2017). HPV-associated differential regulation of tumor metabolism in oropharyngeal head and neck cancer. *Oncotarget*, 8(31), 51530.
 36. Jo, S., Juhasz, A., Zhang, K., Ruel, C., Loera, S., Wilczynski, S. P., ... & Paz, B. (2009). Human papillomavirus infection as a prognostic factor in oropharyngeal squamous cell carcinomas treated in a prospective phase II clinical trial. *Anticancer research*, 29(5), 1467-1474.
 37. Karuppagounder, S. S., & Ratan, R. R. (2012). Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibition: robust new target or another big bust for stroke therapeutics?. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 32(7), 1347-1361.
 38. Klucky, B., Mueller, R., Vogt, I., Teurich, S., Hartenstein, B., Breuhahn, K., ... & Hess, J. (2007). Kallikrein 6 induces E-cadherin shedding and promotes cell proliferation, migration, and invasion. *Cancer research*, 67(17), 8198-8206.
 39. Klussmann, J. P., Mooren, J. J., Lehnen, M., Claessen, S. M., Stenner, M., Huebbers, C. U., ... & Manni, J. J. (2009). Genetic signatures of HPV-related and unrelated oropharyngeal carcinoma and their prognostic implications. *Clinical Cancer Research*, 15(5), 1779-1786.
 40. Klussmann, J. P., Weissenborn, S. J., Wieland, U., Dries, V., Eckel, H. E., Pfister, H. J., & Fuchs, P. G. (2003). Human papillomavirus-positive tonsillar carcinomas: a different tumor entity?. *Medical microbiology and immunology*, 192(3), 129-132.
 41. Knuth, J., Sharma, S. J., Würdemann, N., Holler, C., Garvalov, B. K., Acker, T., ... & Klussmann, J. P. (2017). Hypoxia-inducible factor-1 α activation in HPV-positive head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Oncotarget*, 8(52), 89681.

42. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, et al. (2001) Hypoxia-regulated carbonic anhydrase-9 (CA9) relates to poor vascularization and resistance of squamous cell head and neck cancer to chemoradiotherapy Clin Cancer Res 7:3399-3403.
43. Krause, B. J., Beyer, T., Bockisch, A., Delbeke, D., Kotzerke, J., Minkov, V., ... & Willich, N. (2007). FDG-PET/CT in oncology. Nuklearmedizin, 46(06), 291-301.
44. Krupar, R., Robold, K., Gaag, D., Spanier, G., Kreutz, M., Renner, K., ... & Bosserhoff, A. K. (2014). Immunologic and metabolic characteristics of HPV-negative and HPV-positive head and neck squamous cell carcinomas are strikingly different. Virchows Archiv, 465(3), 299-312.
45. Kung, A. L., Klco, J. M., Kaelin, W. G., & Livingston, D. M. (2000). Suppression of tumor growth through disruption of hypoxia-inducible transcription. Nature medicine, 6(12), 1335.
46. Lansford, C. D., Grenman, R., Bier, H., Somers, K. D., Kim, S. Y., Whiteside, T. L., ... & Carey, T. E. (1999). Head and neck cancers. In Human cell culture (pp. 185-255). Springer, Dordrecht.
47. Li, G., He, L., Zhang, E., Shi, J., Zhang, Q., Le, A. D., ... & Tang, X. (2011). Overexpression of human papillomavirus (HPV) type 16 oncoproteins promotes angiogenesis via enhancing HIF-1 α and VEGF expression in non-small cell lung cancer cells. Cancer letters, 311(2), 160-170
48. Lim, J. H., Park, J. W., Kim, M. S., Park, S. K., Johnson, R. S., & Chun, Y. S. (2006). Bafilomycin induces the p21-mediated growth inhibition of cancer cells under hypoxic conditions by expressing hypoxia-inducible factor-1 α . Molecular pharmacology, 70(6), 1856-1865.
49. Lim, R., Eaton, A., Lee, N. Y., Setton, J., Ohri, N., Rao, S., ... & Schöder, H. (2012). 18F-FDG PET/CT metabolic tumor volume and total lesion glycolysis predict outcome in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Journal of Nuclear Medicine*, 53(10), 1506-1513.
50. Lindquist, D., Romanitan, M., Hammarstedt, L., Näsman, A., Dahlstrand, H., Lindholm, J., ... & Dalianis, T. (2007). Human papillomavirus is a favourable prognostic factor in tonsillar cancer and its oncogenic role is supported by the expression of E6 and E7. *Molecular Oncology*, 1(3), 350-355
51. Liu, Y., Guo, J. Z., Liu, Y., Wang, K., Ding, W., Wang, H., ... & Xu, C. (2018). Nuclear lactate dehydrogenase A senses ROS to produce α -hydroxybutyrate for HPV-induced cervical tumor growth. *Nature communications*, 9(1), 4429.
52. Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M., & Myrtek, D. (2014). Western-Blot. In *Der Experimentator: Immunologie* (pp. 133-150). Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg.
53. Machtay, M., Natwa, M., Andrel, J., Hyslop, T., Anne, P. R., Lavarino, J., ... & Keane, W. (2009). Pretreatment FDG-PET standardized uptake value as a prognostic factor for outcome in head and neck cancer. *Head & Neck: Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck*, 31(2), 195-201.
54. Marxsen, J. H., Stengel, P., Doege, K., Heikkinen, P., Jokilehto, T., Wagner, T., ... & Metzen, E. (2004). Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) promotes its degradation by induction of HIF- α -prolyl-4-hydroxylases. *Biochemical Journal*, 381(3), 761-767

55. Masoud, G. N., & Li, W. (2015). HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(5), 378-389
56. Mazurek, S. (2011). Pyruvate kinase type M2: a key regulator of the metabolic budget system in tumor cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 43(7), 969-980.
57. MAZUREK, S., ZWERSCHKE, W., JANSEN-DÜRR, P., & EIGENBRODT, E. (2001). Effects of the human papilloma virus HPV-16 E7 oncoprotein on glycolysis and glutaminolysis: role of pyruvate kinase type M2 and the glycolytic-enzyme complex. *Biochemical Journal*, 356(1), 247-256.
58. Micura, R. (2002). Kurze interferierende RNA und ihre chemische Synthese. *Angewandte Chemie*, 114(13), 2369-2373.
59. Nakamura, M., Bodily, J. M., Beglin, M., Kyo, S., Inoue, M., & Laimins, L. A. (2009). Hypoxia-specific stabilization of HIF-1 α by human papillomaviruses. *Virology*, 387(2), 442-448.
60. Noch, E., & Khalili, K. (2012). Oncogenic viruses and tumor glucose metabolism: like kids in a candy store. *Molecular cancer therapeutics*, 11(1), 14-23
61. Orlandi, E., & Licitra, L. (2019). The day after De-ESCALaTE and RTOG 1016 trials results.
62. Pérez-Sayáns, M., Suárez-Peñaranda, J. M., Pilar, G. D., Barros-Angueira, F., Gándara-Rey, J. M., & García-García, A. (2011). Hypoxia-inducible factors in OSCC. *Cancer letters*, 313(1), 1-8.
63. Pérez-Sayáns, M., Supuran, C. T., Pastorekova, S., Suárez-Peñaranda, J. M., Pilar, G. D., Barros-Angueira, F., ... & García-García, A. (2013). The role of carbonic anhydrase IX in hypoxia control in OSCC. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 42(1), 1-8.
64. Preuss, S. F., Klussmann, J. P., Semrau, R., & Huebbers, C. (2011). Aktuelles zu HPV-induzierten Oropharynxkarzinomen. *HNO*, 59(10), 1031.
65. Rademakers, S. E., Lok, J., van der Kogel, A. J., Bussink, J., & Kaanders, J. H. (2011). Metabolic markers in relation to hypoxia; staining patterns and colocalization of pimonidazole, HIF-1 α , CAIX, LDH-5, GLUT-1, MCT1 and MCT4. *BMC cancer*, 11(1), 167.
66. Reiss, K., Ludwig, A., & Saftig, P. (2006). Breaking up the tie: disintegrin-like metalloproteinases as regulators of cell migration in inflammation and invasion. *Pharmacology & therapeutics*, 111(3), 985-1006.
67. Rodolico, V., Arancio, W., Amato, M. C., Aragona, F., Cappello, F., Di Fede, O., ... & Campisi, G. (2011). Hypoxia inducible factor-1 alpha expression is increased in infected positive HPV16 DNA oral squamous cell carcinoma and positively associated with HPV16 E7 oncoprotein. *Infectious agents and cancer*, 6(1), 18.
68. Ryan, H. E., Poloni, M., McNulty, W., Elson, D., Gassmann, M., Arbeit, J. M., & Johnson, R. S. (2000). Hypoxia-inducible factor-1 α is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer research*, 60(15), 4010-4015.
69. Schouten, C. S., Hakim, S., Boellaard, R., Bloemena, E., Doornaert, P. A., Witte, B. I., ... & de Bree, R. (2016). Interaction of quantitative 18F-FDG-PET-CT imaging parameters and human papillomavirus status in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Head & neck*, 38(4), 529-535.
70. Schwenzer, N., & Ehrenfeld, M. (Eds.). (2008). *Chirurgische Grundlagen*. Georg Thieme Verlag.

71. Semenza, G. L., Jiang, B. H., Leung, S. W., Passantino, R., Concordet, J. P., Maire, P., & Giallongo, A. (1996). Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *Journal of Biological Chemistry*, 271(51), 32529-32537.
72. Semenza, G. L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature reviews cancer*, 3(10), 721.
73. Semenza, G. L. (2007). HIF-1 mediates the Warburg effect in clear cell renal carcinoma. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 39(3), 231-234.
74. Semenza, G. L. (2007). Oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiration by hypoxia-inducible factor 1. *Biochemical Journal*, 405(1), 1-9.
75. Semenza, G. L. (2014). Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 9, 47-71.
76. Semenza, G. L. (2014). Hypoxia-inducible factor 1 and cardiovascular disease. *Annual review of physiology*, 76, 39-56.
77. Sharma, S. J., Wittekindt, C., Knuth, J., Steiner, D., Wuerdemann, N., Laur, M., ... & Klussmann, J. P. (2017). Intraindividual homogeneity of 18F-FDG PET/CT parameters in HPV-positive OPSCC. *Oral oncology*, 73, 166-171.
78. Shen, L. F., Zhao, X., Zhou, S. H., Lu, Z. J., Zhao, K., Fan, J., & Zhou, M. L. (2017). In vivo evaluation of the effects of simultaneous inhibition of GLUT-1 and HIF-1 α by antisense oligodeoxynucleotides on the radiosensitivity of laryngeal carcinoma using micro 18F-FDG PET/CT. *Oncotarget*, 8(21), 34709.
79. Smeets, S. J., Braakhuis, B. J., Abbas, S., Snijders, P. J., Ylstra, B., van de Wiel, M. A., ... & Brakenhoff, R. H. (2006). Genome-wide DNA copy number alterations in head and neck squamous cell carcinomas with or without oncogene-expressing human papillomavirus. *Oncogene*, 25(17), 2558.
80. Soret, M., Bacharach, S. L., & Buvat, I. (2007). Partial-volume effect in PET tumor imaging. *Journal of nuclear medicine*, 48(6), 932-945.
81. Steenbergen, R. D., Hermsen, M. A., Walboomers, J. M., Joenje, H., Arwert, F., Meijer, C. J., & Snijders, P. J. (1995). Integrated human papillomavirus type 16 and loss of heterozygosity at 11q22 and 18q21 in an oral carcinoma and its derivative cell line. *Cancer research*, 55(22), 5465-5471.
82. Tang, X., Zhang, Q., Nishitani, J., Brown, J., Shi, S., & Le, A. D. (2007). Overexpression of human papillomavirus type 16 oncoproteins enhances hypoxia-inducible factor 1 α protein accumulation and vascular endothelial growth factor expression in human cervical carcinoma cells. *Clinical Cancer Research*, 13(9), 2568-2576.
83. Thönnessen, D., Hof, H., Krempien, R., Münter, M. W., Bischof, M., Herfarth, K. K., ... & Fleckenstein, K. (2006). Kopf-Hals-Tumoren. In *Strahlentherapie* (pp. 373-450). Springer, Berlin, Heidelberg.
84. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *science*, 324(5930), 1029-1033.

85. van Velden, F. H., Cheebsumon, P., Yaqub, M., Smit, E. F., Hoekstra, O. S., Lammertsma, A. A., & Boellaard, R. (2011). Evaluation of a cumulative SUV-volume histogram method for parameterizing heterogeneous intratumoural FDG uptake in non-small cell lung cancer PET studies. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 38(9), 1636-1647.
86. White, J. S., Weissfeld, J. L., Ragin, C. C., Rossie, K. M., Martin, C. L., Shuster, M., ... & Gollin, S. M. (2007). The influence of clinical and demographic risk factors on the establishment of head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Oral oncology*, 43(7), 701-712.
87. Wagner, S., Mayer, C., Wittekindt, C., & Klussmann, J. P. (2012). Humane Papillomaviren (HPV) bei Kopf-Hals-Karzinomen Human papillomavirus (HPV) and head and neck cancer. *Der Hautarzt*, 63(1), 24-29
88. Wagner, S., Reder, H., Sharma, S. J., Würdemann, N., Wittekindt, C., & Klußmann, J. P. (2018). Das HPV-getriebene Oropharynxkarzinom–Inzidenz, Trends, Diagnose und Therapie. *Der Urologe*, 57(12), 1457-1463
89. Wittekindt, C., Wagner, S., & Klussmann, J. P. (2011). Humane Papillomaviren bei Kopf-Hals-Karzinomen HPV-associated head and neck cancer. *HNO*, 59(9), 885
90. Wittekindt, C., Klussmann, J. P., & Wagner, S., (2018). Oropharynxkarzinome: Wenn humane Papillomviren die Tumorauslöser sind. *Deutsches Ärzteblatt Online*. 10.3238/PersOnko.2018.11.23.02.
91. Wittekindt, C., Wagner, S., Sharma, S. J., Würdemann, N., Knuth, J., Reder, H., & Klußmann, J. P. (2018). HPV–Das andere Kopf-Hals-Karzinom. *Laryngo-Rhino-Otologie*, 97(S 01), S48-S113
92. Wittekind, C., Weber, A., & Weidenbach, H. (2001). Pathologie und Prognosefaktoren von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches. *Der Onkologe*, 7(5), 498-504.
93. Xian, Z. Y., Liu, J. M., Chen, Q. K., Chen, H. Z., Ye, C. J., Xue, J., ... & Kuang, S. J. (2015). Inhibition of LDHA suppresses tumor progression in prostate cancer. *Tumor Biology*, 36(10), 8093-8100.
94. Xu, H., Li, B., Yu, W., Wang, H., Zhao, X., Yao, Y., & Huang, D. (2013). Correlation between 18F-FDG uptake and the expression of glucose transporter-1 and hypoxia-inducible factor-1 α in transplanted VX2 tumors. *Nuclear Medicine Communications*, 34(10), 953-958.
95. Yu, L., Chen, X., Wang, L., & Chen, S. (2016). The sweet trap in tumors: aerobic glycolysis and potential targets for therapy. *Oncotarget*, 7(25), 38908.
96. Zhang, B., Li, X., & Lu, X. (2010). Standardized uptake value is of prognostic value for outcome in head and neck squamous cell carcinoma. *Acta otolaryngologica*, 130(7), 756-762.
97. Zhao, M., Sano, D., Pickering, C. R., Jasser, S. A., Henderson, Y. C., Clayman, G. L., ... & Sacks, P. G. (2011). Assembly and initial characterization of a panel of 85 genomically validated cell lines from diverse head and neck tumor sites. *Clinical cancer research*, 17(23), 7248-7264.
98. Abd El-Hafez, Y. G., Moustafa, H. M., Khalil, H. F., Liao, C. T., & Yen, T. C. (2013). Total lesion glycolysis: a possible new prognostic parameter in oral cavity squamous cell carcinoma. *Oral oncology*, 49(3), 261-268.

99. Pereira, K. M. A., Chaves, F. N., Viana, T. S. A., Carvalho, F. S. R., Costa, F. W. G., Alves, A. P. N. N., & Sousa, F. B. (2013). Oxygen metabolism in oral cancer: HIF and GLUTs. *Oncology Letters*, 6(2), 311-316.
100. Weiß, J. (2011). Untersuchungen zur Freisetzung der Ektodomänen von Cadherin-17 und E-Cadherin und deren Nachweis im Serum von Patienten mit kolorektalem Karzinom.
101. Chen, C. L., Chu, J. S., Su, W. C., Huang, S. C., & Lee, W. Y. (2010). Hypoxia and metabolic phenotypes during breast carcinogenesis: expression of HIF-1 α , GLUT1, and CAIX. *Virchows Archiv*, 457(1), 53-61.
102. Gebhard, M. P. E. (2015). Morphologische Analyse des Tumor-Mikromilieus von Kopf-Hals-Karzinomen unter besonderer Berücksichtigung des HPV-Status (Doctoral dissertation, Lübeck, Univ., Diss., 2015).

11 Publikationsverzeichnis

Knuth, J., Sharma, S. J., Würdemann, N., Holler, C., Garvalov, B. K., Acker, T., ... & Klussmann, J. P. (2017). Hypoxia-inducible factor-1 α activation in HPV-positive head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Oncotarget*, 8(52), 89681.

Knuth, J., Sharma, J. S., Holler, C., Wagner, S., Wittekindt, C., Garvalov, B., ... & Klußmann, J. P. (2015). P30 Stabilization of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF1A)–Basis of carcinogenesis and induction of the Warburg effect in HPV-associated OSCC?. *Oral Oncology*, 51(5), e52.

Sharma, S. J., Wittekindt, C., Knuth, J., Steiner, D., Wuerdemann, N., Laur, M., ... & Klussmann, J. P. (2017). Intraindividual homogeneity of 18F-FDG PET/CT parameters in HPV-positive OPSCC. *Oral oncology*, 73, 166-171.

Wagner, S., Sharma, S. J., Wuerdemann, N., Knuth, J., Reder, H., Wittekindt, C., & Klussmann, J. P. (2017). Human papillomavirus-related head and neck Cancer. *Oncology research and treatment*, 40(6), 334-340.

Wittekindt, C., Wagner, S., Sharma, S. J., Würdemann, N., Knuth, J., Reder, H., & Klußmann, J. P. (2018). HPV–Das andere Kopf-Hals-Karzinom. *Laryngo-Rhino-Otologie*, 97(S 01), S48-S113

Tagungsbeiträge

- Knuth J, Holler C, Wagner S, Wittekindt C et al. Warburg-Effekt – Grundlage gesteigerter Glykolyse und Zellproliferation bei HPV-assoziierten Kopf-Hals-Karzinomen (HNSCC)? Vortrag 597. 85. Jahresversammlung der Deutschen HNO-Gesellschaft, Dortmund 2014.
- Sharma SJ, Holler C, Knuth J, Wagner S, Wittekindt C, Klußmann JP et al. Stabilisierung von HIF-1 α : Grundlage frühzeitiger Metastasierung und gesteigerter Glykolyse in HPV-positiven Kopf-Hals-Karzinomen? Postervortrag. Posterpreis. 23. Jahrestagung der Vereinigung Mitteldeutscher HNO-Ärzte, Chemnitz 2014.
- Holler C, Sharma SJ, Wagner S, Klußmann JP, Knuth J et al. HIF-1 α -abhängiger Verlust von E-Cadherin bei HPV-positiven Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinien. Vortrag 601. 85. Jahresversammlung der Deutschen HNO-Gesellschaft, Dortmund 2014.

- Holler C, Knuth J, Sharma SJ, Wagner S, Wittekindt C et al. Stabilization of HIF-1 α : Basis of Early Metastasis and Increased Glycolysis in HPV-associated HNSCC? Posterpräsentation. 4. Symposium zur experimentellen und klinischen Forschung in der Kopf-Hals-Onkologie, Lübeck 2014.
- Knuth J, Holler C, Sharma SJ, Wagner S, Wittekindt C et al. Stabilization of Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF1A): Basis of Carcinogenesis and Induction of the Warburg Effect in HPV-associated OSCC? Posterpräsentation. 1st International Symposium on Tumor-Host Interaction in Head and Neck Cancer, Essen 2015.
- Knuth J, Holler C, Wagner S, Wittekindt C et al. Aktivierung des Hypoxiesignalwegs in HPV-assozierten Kopf-Hals-Karzinomen (HNSCC). Vortrag. 86. Jahresversammlung der Deutschen HNO-Gesellschaft, Berlin 2015.
- Klußmann JP, Knuth J, Holler C, Wagner S, Wittekindt C et al. Hypoxia Pathway Activation in HPV-associated HNSCC. Poster. American Association for Cancer Research Annual Meeting, Philadelphia 2015.
- Knuth J, Holler C, Sharma SJ, Wagner S, Wittekindt C et al. Hypoxia Pathway Activation via stabilization of Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF1 α) in HPV-associated OSCC? Vortrag. 6. International Meeting of Experimental and Translational Head and Neck Oncology, Lübeck, 2016.
- Knuth J, Holler C, Wagner S, Garvalov B et al. Aktivierung des Hypoxie-Signalwegs in HPV assoziierten Kopf-Hals_Karzinomzellen. Vortrag. Science Day, Gießen, 2017.

12 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Datum

Unterschrift

13 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Professor Dr. Jens Peter Klußmann für die Möglichkeit diese Arbeit durchführen zu können. Ebenfalls möchte ich mich für die hervorragende Betreuung der Doktorarbeit und die Vergabe des Themas bei Herrn Professor Dr. Jens Peter Klußmann bedanken.

Ein besonderer Dank gilt dem „Verein zur Krebsforschungsförderung Gießen e.V.“ für die Förderung des Projektes.

Professor Dr. Till Acker und Dr. Boyan K. Garvalov spreche ich meinen Dank aus für die Ermöglichung der Versuche in der Hypoxiekammer, im Labor der Neuropathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen. Weiterhin gilt hier mein Dank dem Team der Neuropathologie, die einen komplikationslosen Ablauf und eine gute Zusammenarbeit ermöglichten.

Besonders bedanke ich mich bei Dr. Steffen Wagner für die engagierte Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit und die hervorragende Betreuung während meiner Forschungsarbeit in der Kopf-Hals-Tumorforschung. Ein herzlicher Dank gilt hier ebenfalls Herrn Professor Dr. Claus Wittekindt für die tatkräftige Unterstützung und Betreuung während meiner Forschungszeit in Gießen. Ebenfalls gilt mein besonders herzlicher Dank Frau Dr. Nora Würdemann, die eine sehr große Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Dissertation war.

Ein großer Dank gilt besonders Maïke Roth für die hervorragende Zusammenarbeit, ihr stetiges Engagement, ihren Rat und die immer hilfreiche Unterstützung, die zum experimentellen Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Für die experimentelle Unterstützung in Teilen der immunhistochemischen Versuche möchte ich mich auch bei Sonja Große-Grollmann und Carolin Bütow bedanken.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich herzlich bei Frau Dr. Shachi Jenny Sharma für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung des Forschungsprojekts. Ein weiterer Dank gilt hier auch Frau Dr. Claudia Holler.

Abschließend möchte ich meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung und den Rückhalt während der Erstellung dieser Arbeit danken.