

Aus dem Institut für Pathologie
(Prof. Dr. med. P. Ströbel)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Etablierung neuer immunhistochemischer Marker zur
Unterscheidung von Plattenepithelkarzinomen der
Lunge und des HNO-Traktes

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Jasmin Joost, geb. Strecker

aus

Fulda

Göttingen 2020

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück
Referent: PD Dr. med. F. Bremmer
Ko-Referent: PD Dr. med. Dr. med. dent. P. Brockmeyer
Drittreferent: Prof. Dr. med. M. Oppermann

Datum der mündlichen Prüfung: 18.05.2021

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Etablierung neuer immunhistochemischer Marker zur Unterscheidung von Plattenepithelkarzinomen der Lunge und des HNO-Traktes" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung	1
1.1 Das Plattenepithelkarzinom der Lunge.....	1
1.2 Das Plattenepithelkarzinom des HNO-Traktes	3
1.3 Fernmetastasen und Zweitkarzinome der Lunge nach primärem Plattenepithelkarzinom des HNO-Traktes.....	6
1.4 Zielsetzung	8
2 Material und Methoden	10
2.1 Material.....	10
2.2 Zusammenstellung der Patientenkollektive.....	13
2.3 Proteomanalyse der Tumorzelllinien H2170 und PCI-13.1	14
2.3.1 Verfahren der SILAC-basierten massenspektrometrischen Untersuchung.....	14
2.3.2 Stabile Isotopenmarkierung.....	15
2.3.3 Massenspektrometrische Untersuchung	16
2.4 Auswahl der Proteine für die immunhistochemische Untersuchung	17
2.5 Immunhistochemie	17
2.6 Auswertung der immunhistochemischen Reaktion	19
2.7 Statistik.....	19
3 Ergebnisse.....	21
3.1 Klinische und pathologische Daten des SQCLC- und HNSCC-Patientenkollektivs.....	21
3.1.1 SQCLC-Kollektiv.....	22
3.1.2 HNSCC-Kollektiv	22
3.2 Auswertung der quantitativen Proteomanalyse	23
3.3 Immunhistochemische Untersuchungen.....	26
3.3.1 Expression von CAV1 in SQCLC und HNSCC.....	28
3.3.2 Expression von CAV2 in SQCLC und HNSCC.....	31
3.3.3 Expression von LGALS1 in SQCLC und HNSCC.....	34
3.3.4 Expression von LGALS7 in SQCLC und HNSCC.....	37
3.4 Diagnostische Gütekriterien der eingesetzten Antikörper	40
3.4.1 Gütekriterien der Antikörper in SQCLC und HNSCC	40
3.4.2 Kombinierte Gütekriterien von CAV1 und LGALS7 in SQCLC und HNSCC	41

3.5	Immunhistochemische Untersuchung von CAV1 und LGALS7 in Lungentumoren unklarer Herkunft nach HNSCC.....	42
3.5.1	Kollektiv der Lungentumoren nach HNSCC.....	43
3.5.2	Expression von CAV1 und LGALS7 in Lungentumoren nach HNSCC.....	43
4	Diskussion.....	46
4.1	CAV1 in SQCLC und HNSCC.....	48
4.2	CAV2 in SQCLC und HNSCC.....	51
4.3	LGALS1 in SQCLC und HNSCC.....	53
4.4	LGALS7 in SQCLC und HNSCC.....	55
4.5	Einsatz eines Antikörper-Panels aus CAV1 und LGALS7 in SQCLC und HNSCC.....	58
4.6	CAV1 und LGALS7 in Lungentumoren nach HNSCC.....	58
5	Zusammenfassung.....	61
6	Anhang.....	63
6.1	TNM-Klassifikation und Stadieneinteilung der SQCLC.....	63
6.2	TNM-Klassifikation und Stadieneinteilung der HNSCC.....	64
7	Literaturverzeichnis.....	68

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Studiendesign zur Differenzierung von SQCLC und HNSCC.	9
Abbildung 2: Schema der SILAC-basierten Massenspektrometrie	15
Abbildung 3: Immunhistochemische Färbung	18
Abbildung 4: Altersverteilung der Patienten mit einem SQCLC.....	22
Abbildung 5: Altersverteilung der Patienten mit einem HNSCC.....	23
Abbildung 6: Darstellung der \log_2 SILAC ratios H2170/PCI-13.1 und PCI-13.1/H2170.	24
Abbildung 7: Signifikanzuntersuchung der SILAC-basierten Massenspektrometrie.	25
Abbildung 8: Expression von CAV1 in SQCLC und HNSCC.....	29
Abbildung 9: Zusammenhänge zwischen der Expression von CAV1 und den pathologischen Parametern in SQCLC und HNSCC.	30
Abbildung 10: Expression von CAV2 in SQCLC und HNSCC.	32
Abbildung 11: Zusammenhänge zwischen der Expression von CAV2 und den pathologischen Parametern in SQCLC und HNSCC.	33
Abbildung 12: Expression von LGALS1 in SQCLC und HNSCC.	35
Abbildung 13: Zusammenhänge zwischen der Expression von LGALS1 und den pathologischen Parametern in HNSCC.	36
Abbildung 14: Expression von LGALS7 in SQCLC und HNSCC.	38
Abbildung 15: Zusammenhänge zwischen der Expression von LGALS7 und den pathologischen Parametern in SQCLC und HNSCC.	39
Abbildung 16: Receiver operating curves (ROC) der Marker-Kandidaten.....	40
Abbildung 17: Receiver operating curves (ROC) der Marker-Kombination aus CAV1 und LGALS7	42
Abbildung 18: Expression von CAV1 und LGALS7 in Lungentumoren nach HNSCC.....	44

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Technische Geräte	10
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	10
Tabelle 3: Molekularbiologische Agenzien	11
Tabelle 4: Verwendete primäre Antikörper	18
Tabelle 5: Kriterien des immunreaktiven Scores	19
Tabelle 6: Interpretation des immunreaktiven Scores	19
Tabelle 7: Interpretation der AUC-Werte	20
Tabelle 8: Klinische und tumorpathologische Daten der Patientenkollektive	21
Tabelle 9: Ausgewählte Proteine des SILAC-Assays	26
Tabelle 10: Expression der Marker-Kandidaten im Human Protein Atlas und Kohorte I	27
Tabelle 11: Quantitative Auswertung der CAV1-Expression in SQCLC und HNSCC	28
Tabelle 12: Quantitative Auswertung der CAV2-Expression in SQCLC und HNSCC	31
Tabelle 13: Quantitative Auswertung der LGALS1-Expression in SQCLC und HNSCC	34
Tabelle 14: Quantitative Auswertung der LGALS7-Expression in SQCLC und HNSCC	37
Tabelle 15: Positiv- und Negativstatus der HNSCC und SQCLC bei kombinierter CAV1- und LGALS7-Expression	41
Tabelle 16: Fälle der Lungentumoren unklarer Herkunft nach HNSCC mit Ergebnissen der Immunhistochemie	45
Tabelle A1: TNM-Klassifikation der Lungentumoren	63
Tabelle A2: Stadieneinteilung der Lungentumoren	64
Tabelle A3: T-Kategorie der Mundhöhlen-, Pharynx- und Larynxkarzinome	64
Tabelle A4: N- und M-Kategorie der Mundhöhlen-, Pharynx- und Larynxkarzinome	66
Tabelle A5: Stadieneinteilung der Mundhöhlen-, Oropharynx- (p16 negativ), Hypopharynx- und Larynxkarzinome	67
Tabelle A6: Stadieneinteilung der p16-positiven Oropharynxkarzinome	67

Abkürzungsverzeichnis

AUC	<i>area under curve</i>
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
bidest.	bidestilliert
CA2	<i>carbonic anhydrase II</i>
CAV1	Caveolin-1
CAV2	Caveolin-2
CK5/6	Cytokeratin 5 und 6
CK19	Cytokeratin 19
CMV	Cytomegalie-Virus
CRD	<i>carbohydrate recognition domain</i>
CSD	<i>caveolin scaffolding domain</i>
CT	Computertomographie
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
dest.	destilliert
DOI	<i>depth of invasion</i>
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat (Dinatriumsalz)
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EZM	Extrazellulärmatix
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FDG-PET	Fluordesoxyglucose-Positronenemissionstomographie
HE	Hämatoxilin-Eosin
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HNSCC	<i>head and neck squamous cell carcinoma</i>
HPA	<i>Human Protein Atlas</i>
HPV	Humane Papillomaviren
H-Ras	<i>Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IAA	Indol-3-Essigsäure
IASLC	<i>International Association for the Study of Lung Cancer</i>
IGEPAL	Octylphenoxypropylpolyethoxyethanol
IGF-1	<i>insulin like growth factor-1</i>
IRS	Immunreaktiver Score

ITGB1	Integrin beta-1
JNK-1	<i>stress-activated protein kinase JNK-1</i>
LGALS1	Galectin-1
LGALS7	Galectin-7
MAP	<i>mitogen activated protein</i>
miR-133a	MicroRNA-133a
MMP-2	Matrix Metallopeptidase 2
MMP-9	Matrix Metallopeptidase 2
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
n	Anzahl
n. b.	nicht bekannt
NSCLC	<i>non-small cell lung cancer</i>
p16	<i>cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i>
p53	Protein 53
p63	Protein 63
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PD-1	<i>programmed cell death 1 protein</i>
PET	Positronenemissionstomographie
PET-CT	Positronenemissionstomographie-Computertomographie
PIG1	p53 induziertes Gen 1
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	<i>ribonucleinacid</i>
ROC	<i>reciever operating curve</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
SD	<i>standard deviation</i>
SILAC	<i>stable isotope labeling by amino acids in cell culture</i>
SQCLC	<i>squamous cell lung carcinoma</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TMA	<i>tissue microarray</i>
TNM	Tumor, Nodus, Metastasis
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UGDH	UDP-Glucose 6-Dehydrogenase
UICC	<i>Union International Contre le Cancer</i>
VEGFR	<i>vascular endothelial growth factor receptor</i>

1 Einleitung

1.1 Das Plattenepithelkarzinom der Lunge

Das Plattenepithelkarzinom der Lunge (*squamous cell lung carcinoma*, SQCLC) wird gemeinsam mit den Adenokarzinomen und den großzelligen Karzinomen zu der Gruppe der nicht kleinzelligen Lungenkarzinome (*non-small cell lung cancer*, NSCLC) gezählt und stellt mit einem Anteil von etwa 20 – 30% die zweithäufigste maligne Neoplasie der Lunge nach dem Adenokarzinom dar (Dela Cruz et al. 2011; Travis 2011; Travis et al. 2015). Das Lungenkarzinom mit all seinen histologischen Erscheinungsformen führt mit weltweit über zwei Millionen Neuerkrankungen die Liste der häufigsten Krebserkrankungen an. Mit rund 1,7 Millionen Todesfällen ist es zudem die häufigste zum Tode führende Krebsart (Ferlay et al. 2015; Bray et al. 2018). Global zu beobachtende geografische und geschlechtsbedingte Unterschiede der Inzidenz- und Mortalitätsraten resultieren direkt aus dem Verhalten gegenüber dem inhalativen Tabakkonsum (Molina et al. 2008). In Deutschland erkrankten im Jahr 2014 hochgerechnet knapp 54.000 Menschen, hiervon 34.500 Männer, an einem Karzinom der Lunge. Plattenepithelkarzinome waren hierbei für etwa ein Viertel der Fälle verantwortlich (Kaatsch et al. 2017). Bei Betrachtung der histologischen Subtypen zeigt sich bei beiden Geschlechtern, insbesondere aber bei den Frauen, ein kontinuierlicher Anstieg des Adenokarzinoms im Vergleich zum Plattenepithelkarzinom und dem kleinzelligen Karzinom in den letzten zehn Jahren (Barnes und Kraywinkel 2016; Kaatsch et al. 2017). Die 5-Jahres-Überlebensrate der NSCLC beträgt in den lokalisierten Stadien rund 61%. Da sich der überwiegende Anteil der Patienten bei Diagnosestellung jedoch in einem bereits fortgeschrittenen Stadium der Erkrankungen befindet, liegt die über alle Tumorstadien gemittelte 5-Jahres-Überlebensrate lediglich bei 24% (Molina et al. 2008; Howlander et al. 2016).

Der aktive inhalative Tabakkonsum wird beim Plattenepithelkarzinom der Lunge für über 90% der Erkrankungsfälle als verantwortlich angesehen und ist damit der vorherrschende Risikofaktor in der Entwicklung dieser Tumorentität (Hammar et al. 2004). Verschiedene kanzerogene Stoffe wie Radongas, Asbest, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe oder eine Feinstaubbelastung spielen als Auslöser der Erkrankung eine eher untergeordnete Rolle (Parkin et al. 2004; Molina et al. 2008; Travis et al. 2015).

Plattenepithelkarzinome sind die einzigen Lungentumoren, die sich über bronchiale Präneoplasien wie Schleimhautdysplasien und das *carcinoma in situ* (CIS) entwickeln. Sie entstehen häufig als zentrale Bronchialkarzinome in den Haupt- oder Segmentbronchien und weisen

oft ein lokal aggressives und invasives Wachstum auf (Hammar et al. 2004). Periphere Plattenepithelkarzinome der Lunge treten meist als gut abgegrenzte Raumforderung in Erscheinung und stellen daher eine wichtige Differenzialdiagnose zu solitären Metastasen anderer Plattenepithelkarzinome dar (Müller und Wiethage 2004). Makroskopisch präsentiert sich das SQCLC häufig als graue oder weiße Masse, die Nekrosen oder zystische Höhlungen aufweisen kann. Histologisch erfolgt eine Unterteilung der Tumoren in verhornende, nicht verhornende und basaloide Plattenepithelkarzinome (Hammar et al. 2004). Zudem kann eine weitere histologische Klassifizierung in gut (G1), mäßig (G2), schlecht (G3) und undifferenzierte (G4) Tumoren erfolgen (Edge und Compton 2010). Bei gut differenzierten Tumoren ist eine plattenepitheliale Differenzierung, in Form von wirbel- oder zwiebelschalähnlichen Verhornungsmustern, häufig anzutreffen. Je weniger differenziert ein Tumor ist, desto häufiger finden sich zellmorphologische Veränderungen, wie eine gesteigerte Zellpleomorphie, eine verstärkte mitotische Aktivität oder eine nachlassende Keratinisierung (Hammar et al. 2004; Travis et al. 2015). Der plattenepitheliale Ursprung sehr undifferenzierter Karzinome kann häufig nur unter Nutzung von immunhistochemischen Markern, wie zum Beispiel p63, CK5/6 und CK34βE12 identifiziert werden (Rekhtman et al. 2011).

Besteht bei einem Patienten der klinische Verdacht auf ein Lungenkarzinom sollte eine Bildgebung des Thorax, idealerweise mit Hilfe einer kontrastmittelgestützten Computertomographie, durchgeführt werden. Erhärtet sich hierbei der Verdacht, so ist eine Probengewinnung anhand von transbronchialen oder transthorakalen Verfahren indiziert. Nach der Sicherung und Differenzierung eines primären Lungenkarzinoms durch die histopathologische Untersuchung sollte sich eine gezielte Ausbreitungsdiagnostik anschließen. Hierbei kommen vor allem bildgebende Verfahren, wie die Kombination aus einer Positron-Emissions-Tomographie und Computertomographie (PET-CT) des gesamten Körpers sowie, unter Berücksichtigung der neurologischen Symptomatik, eine Magnetresonanztomographie (MRT) des Schädels, zum Einsatz (Molina et al. 2008; Silvestri et al. 2013; Rivera et al. 2013). Die routinemäßige Bestimmung von Tumormarkern wird aufgrund der eingeschränkten Sensitivität und Spezifität weder in der Primär- noch in der Rezidivdiagnostik empfohlen (Thomas et al. 2000; Hirsch et al. 2004).

Die Plattenepithelkarzinome der Lunge werden, wie alle anderen Lungenkarzinome, aktuell anhand der achten Auflage der TNM-Klassifikation der UICC eingeteilt. Hierbei wird der Primärtumor (T), der Lymphknotenstatus (N) sowie eine etwaige Fernmetastasierung (M) bewertet. Mithilfe dieser Klassifikation erfolgt eine Einteilung der Erkrankung in vier Stadien, die wiederum als Grundlage für die Prognose und der daraus abgeleiteten Therapieplanung dienen (Wittekind 2014). Die aktuelle Version der UICC-Klassifikation ist am

01.01.2017 in Kraft getreten und basiert auf Daten der IASLC (*International Association for the Study of Lung Cancer*) von über 90.000 Patienten aus 16 Ländern (Wittekind 2017). Eine tabellarische Übersicht der Klassifikation und Stadieneinteilung nach UICC ist im Anhang dargestellt.

Die Therapie der Plattenepithelkarzinome der Lunge basiert auf der klinischen Stadieneinteilung unter Berücksichtigung des Allgemeinzustandes, der lungenfunktionellen Reserve sowie den Komorbiditäten des Patienten (D'Addario und Felip 2009). Die operative Therapie stellt die einzige kurative Möglichkeit in der Behandlung des Lungenkarzinoms dar, vorausgesetzt der Tumor kann im Ganzen (R0-Situation) reseziert werden (Molina et al. 2008). Das Verfahren der Wahl ist hierbei die Lobektomie mit gleichzeitiger Lymphadenektomie, gefolgt von einer adjuvanten platinbasierten Chemotherapie. Neoadjuvante Chemotherapien können in fortgeschrittenen Stadien oder bei primär nicht resektablen Tumoren in Betracht gezogen werden, um eine präoperative therapeutische Verbesserung des Tumorstagings, ein sogenanntes *downstaging*, zu erreichen (Postmus et al. 2017). Die postoperative Radiatio kann bei Patienten in fortgeschrittenen Stadien, bei nicht vollständig resezierten Tumoren oder bei einem mediastinalem Lymphknotenbefall eingesetzt werden. Die alleinige Radiatio hingegen ist häufig Patienten in einem schlechten und nicht operationsfähigen Allgemeinzustand vorbehalten. Für Patienten mit lokal fortgeschrittenen und inoperablen Tumoren, die einen guten Allgemeinzustand und eine adäquate Lungenfunktion aufweisen, stellt die kombinierte Radiochemotherapie die Therapie der Wahl dar (Molina et al. 2008; D'Addario und Felip 2009; Postmus et al. 2017). Für Patienten in einem lokal weit fortgeschrittenen, rezidierten oder metastasierten Stadium stehen zudem antikörperbasierte Therapien mit EGFR- (Ciuleanu et al. 2012) und VEGF-Inhibitoren (Sandler et al. 2005) oder PD1-Antikörpern (Ferris et al. 2016) zur Verfügung. Diese führten in Studien bereits häufig zu einer signifikanten Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit (Sandler et al. 2005; Molina et al. 2008; Ciuleanu et al. 2012; Ferris et al. 2016).

1.2 Das Plattenepithelkarzinom des HNO-Traktes

Unter dem Begriff des Plattenepithelkarzinoms des Hals-Nasen-Ohren(HNO)-Traktes (*head and neck squamous cell carcinoma*, HNSCC) werden Karzinome der Nase (einschließlich Nasennebenhöhlen), der Mundhöhle, des Pharynx und Larynx zusammengefasst (Vigneswaran und Williams 2014). Mit einem Anteil von über 90% ist es die häufigste Tumorentität im gesamten HNO-Trakt (Marur und Forastiere 2016) und stellt mit weltweit rund 650.000 Neuerkrankungen pro Jahr die sechsthäufigste maligne Tumorerkrankung dar (Ferlay et al.

2015; Bray et al. 2018). Global zu beobachtende Unterschiede der Inzidenzen sowie anatomischen Lokalisationen dieser Tumorentität werden vor allem auf soziokulturelle Varianzen im Tabak- und Alkoholkonsum zurückgeführt (Blot et al. 1988; Vigneswaran und Williams 2014). In Deutschland erkrankten im Jahr 2014 rund 12.000 Männer und 4.200 Frauen an einem malignen Tumor des HNO-Traktes. Hierbei ist die Erkrankungshäufigkeit bei den Frauen langfristig angestiegen, wohingegen die Rate bei den Männern auf deutlich höherem Niveau stabil beziehungsweise leicht rückläufig ist (Barnes und Kraywinkel 2016; Kaatsch et al. 2017).

Wesentliche Risikofaktoren für die Entwicklung der HNSCC sind, wie bereits erwähnt, der chronische Tabak- und Alkoholkonsum. So haben Raucher gegenüber Nichtrauchern, ein stark erhöhtes Risiko solch ein Karzinom zu entwickeln. Bei simultanem Alkoholkonsum, insbesondere von hochprozentigen Spirituosen, wird eine weitere Potenzierung des Erkrankungsrisikos beobachtet (Blot et al. 1988; Hashibe et al. 2009). Insgesamt können bis zu 75% der HNSCC auf diese beiden Risikofaktoren zurückgeführt werden (Johnson et al. 2005; Hashibe et al. 2009). Für den weltweit zunehmenden Anteil an oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen, insbesondere bei Nichtrauchern, konnte eine ätiologische Beziehung zu einer chronischen Infektion mit humanen Papillomaviren (HPV), führend durch den Hochrisikotyp HPV 16, nachgewiesen werden (Johnson et al. 2005; Sturgis und Cinciripini 2007; Gillison et al. 2015).

Die Entwicklung der HNSCC erfolgt in einem mehrstufigen Prozess von präkanzerösen Vorstufen wie z. B. den Leukoplakien über die *carcinomata in situ* bis hin zu den invasiven Karzinomen (Gale et al. 2005; Perez-Ordóñez et al. 2006). Das manifeste Karzinom präsentiert sich makroskopisch meist als endophytisches und knotiges sowie häufig ulzerierendes Areal (Cardesa et al. 2005; Johnson et al. 2005). Mikroskopisch zeigt sich ein invasives Wachstum unter Ausbildung von Tumorinseln oder -strängen. Histologisch präsentiert das HNSCC die gleiche Morphologie wie das SQCLC. Auch hier findet man zahlreiche Abstufungen von gut differenzierte Karzinomen, die normalem Plattenepithel ähneln und häufig typische Verhornungsmuster aufweisen bis hin zu undifferenzierten Karzinomen, welche aus vielgestaltigen Zellen mit zahlreichen atypischen Mitosen und einer minimalen Keratinisierung bestehen (Barnes et al. 2005).

Die pathologische Diagnose sollte, gemäß der WHO-Klassifikation, anhand einer chirurgisch gewonnenen Probeexzision gestellt werden (Grégoire et al. 2010). Das Routine-Staging umfasst eine gründliche körperliche Untersuchung, eine CT und/oder MRT der Region von

der Schädelbasis bis zur oberen Thoraxapertur, eine Panendoskopie des oberen aerodigestiven Traktes sowie eine Röntgenuntersuchung des Thorax. Eine CT des Thorax kann, bei begründetem Verdacht, zum Ausschluss von metastatischen Absiedlungen oder Zweitkarzinomen der Lunge durchgeführt werden. Weitere Untersuchungen, wie eine Fluoro-2-Deoxy-D-Glucose-Positron-Emissions-Tomographie (FDG-PET) oder PET-CT, richten sich nach dem Stadium der Erkrankung sowie der klinischen Symptomatik (Grégoire et al. 2010; Marur und Forastiere 2016).

Die Einteilung der malignen Tumoren in HNO-Bereich erfolgt, wie auch die der Lungenkarzinome, anhand der TNM-Klassifikation der UICC (*Union International Contre le Cancer*). In Anbetracht eines retrospektiven Überlebensvorteils der HPV-assoziierten Oropharynxkarzinome wurde 2017 eine umfangreiche achte Auflage der TNM-Klassifikation, mit einer Unterteilung in HPV-positive und -negative Oropharynxkarzinome, veröffentlicht. Neu in dieser Auflage ist zudem die Angabe einer Invasionstiefe (*depth of invasion*, DOI) in der T-Klassifikation der Mundhöhlenkarzinome sowie die Angabe einer extranodalen Ausbreitung in der N-Klassifikation (Wittekind 2017). Die aktuelle TNM-Klassifikation sowie die Stadieneinteilung nach UICC ist tabellarisch im Anhang dargestellt.

Bezüglich der primären Therapieauswahl der HNSCC spielen vor allem die Tumorklassifikation, das Tumorstadium, die chirurgischen Aspekte und die Lebensqualität der Patienten eine Rolle. Die individuelle Therapieplanung erfolgt in der Regel im Rahmen eines interdisziplinären Tumorboards. Als Therapieoptionen mit kurativen Ansatz gelten, je nach Lokalisation und Befund, die alleinige chirurgische Therapie oder Radiotherapie, die kombinierte Radiochemotherapie oder die Kombination aus chirurgischer und (neo-)adjuvanter Radio- und/oder Chemotherapie (Argiris et al. 2008; Marur und Forastiere 2008; 2016). Bei einem klinischem Nachweis oder begründetem Verdacht einer lymphogenen Metastasierung, wird zudem die elektive oder kurative Ausräumung der Halslymphknoten (*neck dissection*) empfohlen (Robbins et al. 2002; D'Cruz et al. 2015). Im palliativen Therapiesetting kommt häufig die platinbasierte Chemotherapie als Behandlungsmethode in Betracht. Bei palliativen Patienten in einem guten Allgemeinzustand gilt die Kombination aus Chemotherapeutika und dem EGFR-Inhibitor Cetuximab als Erstlinientherapie (Vermorken et al. 2008; Marur und Forastiere 2016).

1.3 Fernmetastasen und Zweitkarzinome der Lunge nach primärem Plattenepithelkarzinom des HNO-Traktes

Das Langzeitüberleben von Patienten mit einem kurativ therapierten Plattenepithelkarzinom des HNO-Traktes (HNSCC) hat sich trotz der Weiterentwicklung diagnostischer und therapeutischer Maßnahmen in den letzten drei Jahrzehnten nicht signifikant verbessert (Marur und Forastiere 2016). Dies ist, neben der hohen lymphogenen Metastasierungstendenz sowie der ausgesprochenen Lokalrezidivneigung, auch auf die Bildung von Fernmetastasen (met-HNSCC) und Zweitkarzinomen im oberen aerodigestiven Trakt und der Lunge zurückzuführen (Ferlito et al. 2001). Daher werden nach Abschluss einer kurativ ausgerichteten Therapie regelmäßige klinische und bildgebende Kontrollen dieser anatomischen Regionen empfohlen (de Bree et al. 2000; Ferlito et al. 2001).

Die Angaben zur Inzidenz von Fernmetastasen bei HNSCC variieren in der Literatur von 5% bis 15% pro Jahr (Leong et al. 1998; Ferlito et al. 2001; Vachani et al. 2007). Hierbei stellt die Lunge mit über 60% den häufigsten Lokalisationsort dar (Ferlito et al. 2001). Der Großteil der pulmonalen Fernmetastasen tritt häufig innerhalb eines Intervalls von zwei bis drei Jahren nach der Diagnose des Primärtumors auf. Die Entwicklung der Metastasen ist unter anderem von der Lokalisation des Primarius, der lokoregionären Kontrolle, dem Lymphknoten- und Tumorstadium sowie der histologischen Differenzierung abhängig (de Bree et al. 2000; Ferlito et al. 2001). In Bezug auf die Lokalisation des Primärtumors zeigen Karzinome des Hypopharynx und der Epiglottis die größte Neigung zur Bildung von pulmonalen Fernmetastasen (Leon et al. 1999; Leon et al. 2000).

Als Zweitkarzinome (*second primary tumor*, SPT) werden maligne Tumoren bezeichnet, die unabhängig vom Primärtumor entstanden sind. Generell unterscheidet man synchrone Zweitumoren, die innerhalb eines Zeitraums von sechs Monaten nach der Diagnose des Primärtumors in Erscheinung treten, von metachronen Zweittumoren, die nach einem Zeitraum von sechs Monaten entdeckt werden (Bradley und Bradley 2010). Die Inzidenz von Zweitkarzinomen aller Lokalisationen bei kurativ therapiertem HNSCC wird mit 3% bis 7% pro Jahr angegeben. Hierbei stellt die Lunge mit über 30% der Fälle den häufigsten Lokalisationsort dar (Jones et al. 1995; Leon et al. 2002). Da der inhalative Tabakkonsum den vorherrschenden Risikofaktor für die Entwicklung eines Lungenkarzinoms stellt, haben Raucher mit einem bekannten HNSCC ein deutlich erhöhtes Risiko, ein Zweitkarzinom der Lunge zu entwickeln (Schwartz et al. 1994; Lin et al. 2005). Um den hohen Prozentsatz an Zweitkarzinomen bei dieser Tumorentität zu erklären, definierte Slaughter et al. bereits 1953 den Be-

griff der *field cancerization*. Nach diesem Konzept führt die andauernde Belastung durch Karzinogene zu genetisch veränderten Arealen in der Schleimhaut des gesamten aerodigestiven Traktes, in welchen sich in Folge multifokal Karzinome entwickeln können (Slaughter et al. 1953; Perez-Ordóñez et al. 2006).

Die Unterscheidung zwischen einer pulmonalen Metastase und einem Zweitkarzinom bei vorbekanntem HNSCC wird erschwert durch die Tatsache, dass über zwei Drittel der Zweitkarzinome plattenepithelialen Ursprungs sind (Atabek et al. 1987; Leong et al. 1998). Neben dieser gemeinsamen Morphologie weisen beide Entitäten zudem ähnliche Muster von Genmutationen und molekularpathologischen Veränderungen auf (Bohnenberger et al. 2018). Da es bis dato an verlässlichen Biomarkern zur Differenzierung der beiden Entitäten mangelt, basiert die Entscheidung vor allem auf radiologischen und klinischen Kriterien. Hierbei werden die Lokalisation des Lungenbefundes, die Anzahl der Lungenherde, der Tumor- und Lymphknotenstatus sowie die Lokalrezidivneigung des Primärtumors und das zeitliche Intervall zwischen Primarius und Lungenbefund zur Entscheidungsfindung herangezogen (Finley et al. 1992; Jones et al. 1995; Leong et al. 1998). So sprechen eine solitäre Läsion sowie eine zentrale Lokalisation in der Lunge, Rezidivfreiheit des Primärtumors, ein negativer Lymphknotenstatus und ein Zeitintervall von drei oder mehr Jahren zwischen Lungenbefund und primärem HNSCC tendenziell für ein Zweitkarzinom (Leong et al. 1998). Multiple und peripher gelegene Lungenneoplasien, rezidivierende Primärtumoren, ein positiver Lymphknotenstatus und ein Zeitintervall von zwei bis drei Jahren oder weniger sprechen hingegen eher für eine Metastase (Jones et al. 1995; Braakhuis et al. 2006). Da jedoch keines dieser Kriterien absolut ist, bleibt die Entdeckung einer solitären plattenepithelialen Lungenneoplasie bei Patienten mit einem HNSCC in der Vorgeschichte häufig eine diagnostische Herausforderung (Leong et al. 1998). Diverse Studien, in welchen Analysen zum p53-Mutationsstatus oder bezüglich einer differenziellen Genexpression zur Unterscheidung beider Tumorentitäten durchgeführt wurden (Leong et al. 1998; Geurts et al. 2005; Talbot et al. 2005), lieferten bis dato leider keine eindeutigen Ergebnisse.

Eine möglichst exakte Differenzierung beider Entitäten ist klinisch jedoch von großer Bedeutung, da sie die Prognose der Erkrankung und die daraus abgeleiteten Therapiemaßnahmen maßgeblich bestimmt. Während ein resektables Zweitkarzinom der Lunge bei primärem HNSCC einen chirurgischen Ansatz mit kurativer Intention häufig rechtfertigt, wird das pulmonal metastasierte HNSCC, auf Grund der schlechten Prognose, in der Regel palliativ behandelt (Jones et al. 1995; Leong et al. 1998; Battafarano et al. 2004; Geurts et al. 2005).

1.4 Zielsetzung

Die Unterscheidung zwischen einem plattenepithelialen Zweitkarzinom der Lunge und einer pulmonalen Metastase bei vorbekanntem HNSCC ist entscheidend für die jeweilige Prognose und das daraus abgeleitete Therapieregime, bereitet jedoch, unter anderem aufgrund fehlender Biomarker, häufig Schwierigkeiten.

Das Ziel dieser Arbeit war daher die Identifikation von Proteinen, die sich in ihrer Expression signifikant zwischen Plattenepithelkarzinomen der Lunge (SQCLC) und des HNO-Traktes (HNSCC) unterscheiden und somit als immunhistochemische Marker eine Differenzierung beider Entitäten ermöglichen.

Hierfür sollten folgende Arbeitsschritte durchgeführt werden:

- (I) Analyse eines SILAC(*stable isotope labeling by amino acids in cell culture*)-basierten massenspektrometrischen Vergleichs einer SQCLC- und HNSCC-Zelllinie zur Identifikation von signifikant unterschiedlich exprimierten Proteinen.
- (II) Immunhistochemische Verifikation von ausgewählten Proteinen der SILAC-Analyse in primären Plattenepithelkarzinomen der Lunge (SQCLC) und des HNO-Traktes (HNSCC) anhand statistischer Analysen bezüglich signifikanter Unterschiede der Proteinexpression zwischen den Kollektiven. Zudem sollen Zusammenhänge zwischen der Expression der Proteine und den tumorpathologischen Parametern (Tumor- und Lymphknotenstadium, Grading, Stadieneinteilung nach UICC) statistisch überprüft werden.
- (III) Darstellung der statistischen Gütekriterien der eingesetzten Antikörper in den SQCLC und HNSCC anhand von ROC(*receiver operating characteristics*)-Analysen.
- (IV) Immunhistochemische Untersuchung der verifizierten Proteine in einem kleinen Probekollektiv, bestehend aus plattenepithelialen Lungentumoren unklarer Herkunft nach primärem HNSCC.

Die folgende Abbildung 1 zeigt das Studiendesign dieser Arbeit als graphische Übersicht.

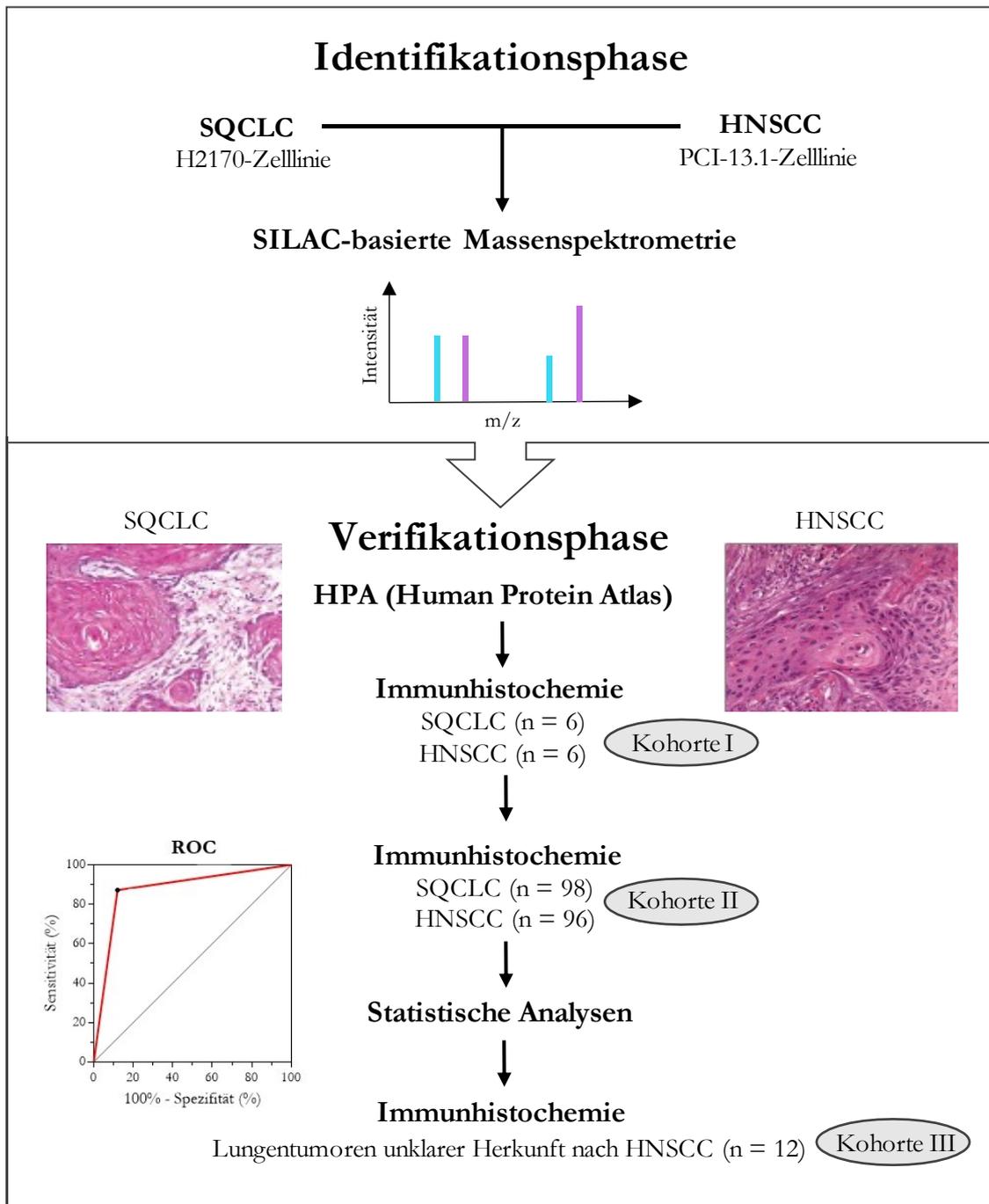


Abbildung 1: Studiendesign zur Differenzierung von SQCLC und HNSCC. Der experimentelle Studienaufbau dieser Arbeit kann in zwei Phasen unterteilt werden. Die erste Phase (Identifikationsphase) dient der Identifizierung von signifikant unterschiedlich exprimierten Proteinen in einer SQCLC- und HNSCC-Zelllinie aus einer SILAC-basierten massenspektrometrischen Untersuchung. In der zweiten Phase (Verifikationsphase) wird die Expression der ausgewählten Proteine mittels Immunhistochemie in SQCLC- und HNSCC-Geweben (Kohorte I und II) untersucht und statistisch analysiert. In einem kleinen Probekollektiv von zwölf Lungentumoren unklarer Herkunft nach primärem HNSCC (Kohorte III) werden die vielversprechendsten Markerkandidaten der Kohorte II immunhistochemisch untersucht. Abkürzungen: HPA = *Human Protein Atlas*.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Die in dieser Dissertation verwendeten technischen Geräte, Verbrauchsmaterialien und molekularbiologischen Agenzien werden in den Tabellen 1 bis 3 aufgeführt.

Tabelle 1: Technische Geräte

Gerät	Hersteller
Autostainer	Dako, Glostrup, Dänemark
Digitale Farbkamera, DP20	Olympus, Hamburg, Deutschland
Feinwaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr, Biberach, Deutschland
Gefrierschrank (-80°C)	GFL, Burgwedel, Deutschland
Inkubator, OV 5	Biometra, Göttingen, Deutschland
Kühlschrank, Silka Frost Comfort	Siemens, München, Deutschland
Kulturbank, Herasafe®	Heraeus, Düsseldorf, Deutschland
Lichtmikroskop, BX41	Olympus, Hamburg, Deutschland
Massenspektrometer, LTQ-Orbitrap XL	Thermo Fischer, Waltham, Massachusetts, USA
pH-Meter, inoLab®	WTW, Weilheim, Deutschland
PT Link (Pre-treatment Module)	Dako, Glostrup, Dänemark
Schlittenmikrotom, HN 40	Reichert & Jung, Heidelberg, Deutschland
Schüttler, Modell 3016	GFL, Burgwedel, Deutschland
Vortex, Genie 2	Bender & Hohbein, Zürich, Schweiz
Zentrifuge, Biofuge™ Stratos™	Heraeus, Düsseldorf, Deutschland

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Auslaufpipetten (5 ml, 10 ml, 15 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Deckgläser (24 x 24 mm)	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Falcon™ Röhren (50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Kanüle (50 µm)	Braun, Melsungen, Deutschland
Objektträger (67 x 26 mm)	Knittel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Kolbenhubpipetten (0,1-2,5 µl; 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1.000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
NuPAGE™ 4 -12% Bis-Tris-Gradientengel	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Pipettenspitzen (2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zählkammer	Neubauer Brand, Wertheim, Deutschland
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Tabelle 3: Molekularbiologische Agenzien

Agens	Hersteller
Antibody Diluent	Dako, Hamburg, Deutschland
Anti-CA2-Antikörper	Atlas Antibodies, Bromma, Schweden
Anti-CAV1-Antikörper	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Anti-CAV2-Antikörper	Atlas Antibodies, Bromma, Schweden
Anti-CK19-Antikörper	Dako, Hamburg, Deutschland
Anti-LGALS1-Antikörper	Santa Cruz, Dallas, USA
Anti-LGALS7-Antikörper	Santa Cruz, Dallas, USA
Anti-UGDH-Antikörper	Atlas Antibodies, Bromma, Schweden
Aqua dest.	UMG, Göttingen, Deutschland
Aqua bidest.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Aquamount Aquatex	Merck, Darmstadt, Deutschland
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, St. Louis, Missouri, USA
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen	Dako, Hamburg, Deutschland

EnVision™ FLEX biotinylierte Sekundäran-tikörperlösung	Dako, Hamburg, Deutschland
FCS, 10%	C.C. Pro, Neustadt, Deutschland
FCS, dialysiert	Thermo Fisher Scientific, Bonn, Deutsch-land
Fixierpuffer	Millipore, Billerica, Massachusetts, USA
H2170-Zelllinie	ATTC, Manassas, Virginia, USA
H ₂ O ₂ (Wasserstoffperoxid)	Merck, Darmstadt, Deutschland
HCL (Salzsäure)	Merck, Darmstadt, Deutschland
IGEPAL® CA-630 (NP40)	Sigma, St. Louis, Missouri, USA
IAA (Indol-3-Essigsäure)	Sigma, St. Louis, Missouri, USA
L-Arginin	Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA
L-Arginin ¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₄	Cambridge Isotope Laboratories, Tewsk-bury, Massachusetts, USA
L-Glutamin	Biochrom, Berlin, Deutschland
L-Lysin	Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, USA
L-Lysin ¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₂	Cambridge Isotope Laboratories, Tewsk-bury, Massachusetts, USA
Mayers Hämatoxylin	Dako, Hamburg Deutschland
NaCl (Natriumchlorid)	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaF (Natriumfluorid)	Sigma, St. Louis, Missouri, USA
Na ₃ VO ₄ (Natriumorthovanadat)	Sigma, St. Louis, Missouri, USA
NuPAGE™ Bis-Tris Gel	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien
PBS (Phosphat-gepufferte Saline)	Biochrom, Berlin, Deutschland
PCI-13.1-Zelllinie	Departement of Pathology, University of Pittsburgh Medical Center, Pennsylvania, USA
Penicillin	Sigma Aldrich, München, Deutschland
RPMI-1640-Medium	Biochrom, Berlin, Deutschland

SILAC-RPMI-1640-Medium	Thermo Fisher Scientific, Bonn, Deutschland
Substrat Puffer	Dako, Hamburg, Deutschland
Streptomycin	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Taget Retrieval Solution (3-in-1 Procedure buffer)	Dako, Hamburg, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin-EDTA Lösung 10x	Biochrom, Berlin, Deutschland
Trypsin, modifiziert	Promega, Madison, Wisconsin, USA
Tween® 20 Detergent	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Complete™ Zellyse-Puffer	Roche, Basel, Schweiz

2.2 Zusammenstellung der Patientenkollektive

Anhand einer Diagnoseliste der Klinik für Herz-Thorax- und Gefäßchirurgie der Universitätsmedizin Göttingen (UMG) wurden initial 115 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Lunge (SQCLC) ausgewählt, die in den Jahren 2002 bis 2005 operiert wurden. Aus einer weiteren Diagnoseliste der Klinik für Mund-Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universitätsmedizin Göttingen wurden 112 Patienten ausgewählt, die zwischen 2012 bis 2013 die Diagnose eines Plattenepithelkarzinoms des HNO-Traktes (HNSCC) erhielten und operativ behandelt wurden. Des Weiteren wurden 18 Lungentumoren unklarer Herkunft nach primärem HNSCC aus den Jahren 2002 bis 2012 anhand einer Diagnoseliste der Klinik für Herz-Thorax- und Gefäßchirurgie der Universitätsmedizin Göttingen selektioniert.

Aus dem Schnittarchiv des Instituts für Pathologie der Universitätsmedizin Göttingen wurden die vorhandenen HE-Schnitte der Kollektive herausgesucht, gemeinsam mit einem erfahrenen Pathologen lichtmikroskopisch begutachtet und auf ihre Verwendbarkeit hin geprüft. Hierbei wurden nur Präparate mit ausreichend intaktem Tumorgewebe in die Untersuchung eingeschlossen. Anschließend wurden die ausgewählten und vorhandenen, in Formalin-fixierten und in Paraffin-eingebetteten, Gewebelöcke dem Archiv des pathologischen Instituts entnommen. Abschließend standen noch 98 SQCLC-, 96 HNSCC- und zwölf Lungentumoren unklarer Herkunft nach primärem HNSCC für die immunhistochemische Untersuchung zur Verfügung. Zu diesen Fällen erfolgte die Erhebung der klinischen und

tumorpathologischen Daten sowie eine Re-Klassifizierung der UICC-Stadieneinteilung anhand der aktuellen achten Auflage der UICC-Klassifikation (Wittekind 2017).

Die Arbeit mit dem Patientengut wurde durch die Ethikkommission der Universitätsmedizin Göttingen (Antragsnummer: DOK_126_2015 vom 22.04.2015) ohne Bedenken oder Einwände genehmigt.

2.3 Proteomanalyse der Tumorzelllinien H2170 und PCI-13.1

Die Proteomanalyse der Tumorzelllinien H2170 und PCI-13.1 wurde mittels einer SILAC-basierten massenspektrometrischen Untersuchung durchgeführt.

2.3.1 Verfahren der SILAC-basierten massenspektrometrischen Untersuchung

Ein mögliches Verfahren, um Aussagen über relative Häufigkeitsunterschiede von Proteinen in Zellen mit Hilfe der Massenspektrometrie zu treffen ist das SILAC-Verfahren, bei welchem die zu untersuchenden Zellen mit unterschiedlich schweren Aminosäuren kultiviert werden (Ong et al. 2002). Eine Zellpopulation wird hierfür in einem Medium mit natürlichen, so genannten „leichten“ Aminosäuren, die andere in einem Medium mit „schweren“ Aminosäuren, welche mit stabilen Isotopen von Kohlenstoff (^{13}C) oder Stickstoff (^{15}N) versetzt sind, kultiviert. Durch die Inkorporation dieser unterschiedlich schweren Isotope in die essenziellen Aminosäuren Arginin und Lysin wird während der Zellproliferation ein Masseunterschied der Proteine in den Zelllinien erreicht, der sich massenspektrometrisch quantitativ erfassen lässt (Ong et al. 2002; Ong und Mann 2006) (Abb. 2A). Das Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse (MS-Analyse) kann anhand einer grafischen Darstellung abgelesen werden, bei der das Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z) auf der x-Achse und die Intensität des Peptids auf der y-Achse dokumentiert ist (Scigelova und Makarov 2006). Die Signalspitzen von korrespondierenden Peptidpaaren beider Zellpopulationen unterscheiden sich in ihrer Masse genau um den Betrag der Isotopenmarkierung. Zeigt das sich entsprechende Peptidpaar beider Zellpopulationen die gleiche Signalintensität, liegt es in beiden Proben in gleicher Menge vor. Besteht hingegen ein Unterschied in der Signalintensität, so unterscheidet sich die Menge des Peptids in den Proben (Abb. 2B).

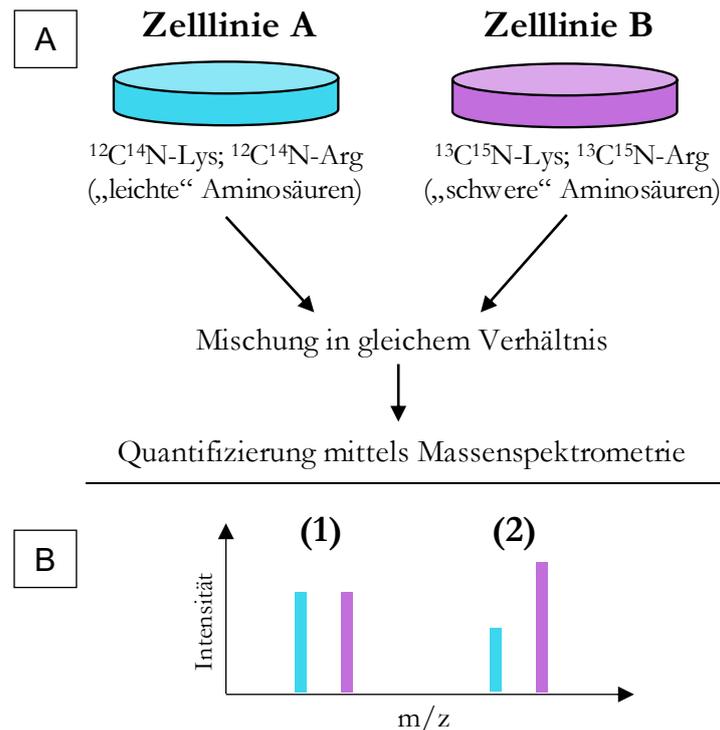


Abbildung 2: Schema der SILAC-basierten Massenspektrometrie (basierend auf Bremmer et al. 2019). Metabolische Markierung von zwei Zelllinien mit Aminosäuren unterschiedlicher Massen, Mischung der Medien in gleichem Verhältnis sowie Zuführung zur Massenspektrometrie (A). Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse: Signalintensitäten korrespondierender Peptidpaare der Zelllinien in gleicher (1) und unterschiedlicher (2) Menge (B).

2.3.2 Stabile Isotopenmarkierung

Die in diesem Abschnitt beschriebenen In-vitro-Versuche wurden von Dr. med. Hanibal Bohnenberger am Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt.

In vorliegender Arbeit wurden die Tumorzelllinien H2170 und PCI-13.1 verwendet. Die Tumorzelllinie H2170 (CRL-5928, American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA) entstammt einem Plattenepithelkarzinom der Lunge. Die hoch immunogene PCI-13.1-Zelllinie (Department of Pathology, UPMC, PA, USA) repräsentiert ein HPV-negatives, wenig differenziertes Plattenepithelkarzinom aus dem Bereich des Oropharynx.

Zur Reaktivierung wurden die initial eingefrorenen Zelllinien zunächst in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut, in 5 ml Nährmedium resuspendiert und bei Raumtemperatur für 5 min bei 1100 UpM zentrifugiert. Nach dem abpipettieren des Überschusses wurde das Zellpellet erneut in 5 ml Nährmedium resuspendiert. Für die SILAC-Analysen wurden die beiden Tumorzelllinien H2170 und PCI-13.1 in einem Arginin- und Lysin-defizientem Nährmedium, bestehend aus RPMI-1640-Medium mit 10% dialysiertem FCS, 4 mM Glutamin, 100 IU/ml

Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bei 37°C, 90% Luftfeuchtigkeit und einem Kohlenstoffdioxid (CO₂)-Gehalt von 5% kultiviert. Jeweils eine Hälfte der beiden Zellpopulationen wurde durch die Zugabe von markiertem ¹³C₆¹⁵N₂-Lysin und ¹³C₆¹⁵N₄-Arginin „schwer“ markiert, die anderen Hälften wurden jeweils mit äquimolaren Mengen von nicht markiertem ¹²C₆¹⁴N₂-Lysin und ¹²C₆¹⁴N₄-Arginin „leicht“ markiert. Für den Wechsel des Nährmediums wurde das verbrauchte Medium abpipettiert, einmalig für etwa 2 min mit 3 ml PBS gewaschen und dieses wieder entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin für 3 – 5 min bei 37°C inkubiert. Nach Ablösung der Zellen wurde der Vorgang mit Nährlösung gestoppt und die Zellzahl durchflusszytometrisch bestimmt. Jeweils 1 x 10⁶ Zellen der beiden Zelllinien wurden in neue Kulturflaschen überführt. Die Kultivierung der Zelllinien in den Medien erfolgte über mindestens sechs Passagen, um eine komplette metabolische Inkorporation der Aminosäuren zu gewährleisten. Nach der Zellyse mittels Zellyse-Puffer, bestehend aus 50 mM Tris/HCl (pH 7,8); 150 mM NaCl; 5 mM NaF; 1 mM Na₃VO₄; 0,5% NP40; 2% Protease Inhibitor Cocktail sowie 2% Laurylmaltosid, wurden mikrogrammäquivalente Mengen von „schweren“ PCI-13.1-Zellen mit „leichten“ H2170-Zellen sowie umgekehrt gemischt und der massenspektrometrischen Untersuchung zugeführt.

2.3.3 Massenspektrometrische Untersuchung

Die massenspektrometrischen Analysen wurden von der Medizinischen Klinik II, Hämatologie und Onkologie der Universitätsklinik Frankfurt (Prof. Dr. med. Thomas Oellerich) und der Forschungsgruppe Bioanalytische Massenspektrometrie am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen (Prof. Dr. Henning Urlaub) durchgeführt.

Hierzu wurden die aufgereinigten Proteine aus den H2170- und PCI-13.1-Zellen zunächst in einem 4 – 12%-haltigem Polyacrylamid-Gradienten-Gel (NuPAGE™ Bis-Tris Gel) mittels 1D-PAGE aufgetrennt. Nach einem Färbeprozess mit Coomassie-Lösung erfolgte eine Reduktion (10mM DTT; 55 min; 56°C) und Alkylierung (55 mM IAA; 20 min; 26°C) der Gelschnitte. Die Spaltung der Proteine erfolgte bei 37°C mit modifiziertem Trypsin über Nacht. Die dabei entstandenen Peptide wurden mittels Flüssigkeitschromatographie weiter aufgetrennt und in einen LTQ-Orbitrap XL Massenspektrometer (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts) überführt. In diesem erfolgte im ersten Schritt die Bestimmung von Masse zu Ladung der Peptide (MS-Modus) und im zweiten Schritt die automatische Bestimmung von Masse zu Ladung der durch Kollision dissoziierten Fragmente (MS/MS-Modus). Die vom Massenspektrometer gelieferten Daten der Peptide und deren Fragmente wurden mithilfe der MaxQuant-Software (Version 1.0.12.31) unter Nutzung von Uniprot human (Release

2013_8) als Sequenz-Datenbank zur Peptid- und Proteinidentifikation analysiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchung wurden als Roh-Daten im Excel-Format für die statistische Auswertung zur Verfügung gestellt.

2.4 Auswahl der Proteine für die immunhistochemische Untersuchung

Unter Nutzung der Perseus-Software (Version 1.5.0.9) wurden die übermittelten Roh-Daten der Proteom-Analyse ausgewertet und die signifikant unterschiedlich regulierten Proteine in den Zelllinien H2170 und PCI-13.1 detektiert. Um einen Einblick in das Expressionsverhalten dieser Proteine in primären Plattenepithelkarzinomen der Lunge und des HNO-Traktes zu erlangen, wurde die Online-Datenbank des *Human Protein Atlas* (HPA) (<https://www.proteinatlas.org/humanproteome>) (Uhlén et al. 2015) genutzt. Für die immunhistochemische Untersuchung wurden sieben Proteine ausgewählt, die größtenteils in originärem Plattenepithelgewebe exprimiert werden.

2.5 Immunhistochemie

Die in Formalin-fixierten und in Paraffin-eingebetteten Tumorgewebe wurden mit einem Schlittenmikrotom in 2 µm dicke Paraffinschnitte geschnitten und auf Objektträger aufgetragen. Die Trocknung erfolgte in einem Wärmeschrank bei 37°C.

Die Entparaffinierung, Rehydrierung und Hitze induzierte Epitopenwiederherstellung der Paraffinschnitte erfolgte in einem Schritt mittels eines 3-in-1 *procedure buffers* (Dako Target Retrieval Solution) in einem PT Link (Pre-Treatment Module, Dako). Hierzu wurden die Gewebeschnitte in das mit Aqua dest. verdünnte (Verhältnis 1:10) Reagenz eingebracht und bei 97°C für 40 min (Zitrat-Puffer, pH6) bzw. 20 min (Tris/EDTAPuffer, pH9) inkubiert. Die in allen Geweben vorkommende endogene Peroxidase wurde über 5 min mit H₂O₂ inaktiviert. Folgend wurden die Gewebeschnitte für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit den primären Antikörpern (Tab. 4) inkubiert. Die Detektion der Antikörper erfolgte unter Nutzung des Dako EnVision™ FLEX Detektionssystems. Diese polymere mit HRP-Molekülen markierte sekundäre Antikörperlösung weist unter Signalverstärkung primäre Maus- und Hasenantikörper nach. Die Visualisierung der Reaktion erfolgte mittels des Dako EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen, welches am Ort des vom primären Antikörper erkannten Zielantigens ein braunes Endprodukt erzeugt (Abb. 3). Nach der Gegenfärbung mit Mayers Hämatoxylin wurden die Schnittpräparate lichtmikroskopisch begutachtet und in Anlehnung an den immunreaktiven Score ausgewertet.

Tabelle 4: Verwendete primäre Antikörper

Antikörper	Klonalität Spezies	Zelluläre Lokalisation	Puffer	Verdünnung	Inkubation
Anti-CA2	polyklonal Kaninchen	zytoplasmatisch, nukleär	pH9	1:300	20 min
Anti-CAV1	E249 Kaninchen	zytoplasmatisch, membranös	pH6	1:500	40 min
Anti-CAV2	polyklonal Kaninchen	zytoplasmatisch, membranös	pH9	1:500	20 min
Anti-CK19	RCK108 Maus	zytoplasmatisch, membranös	pH6	<i>ready to use</i>	40 min
Anti-LGALS1	C-8 Maus	zytoplasmatisch, nukleär, extrazellulär	pH6	1:25	40 min
Anti-LGALS7	G-3 Maus	zytoplasmatisch, nukleär	pH6	1:200	40 min
Anti-UGDH	polyklonal Kaninchen	zytoplasmatisch, nukleär	pH9	1:500	20 min

Abkürzungen: Anti-CA2 = Antikörper gegen Carboanhydrase 2, Anti-CAV1 = Antikörper gegen Caveolin 1, Anti-CAV2 = Antikörper gegen Caveolin 2, Anti-CK19 = Antikörper gegen Cytokeratin 19, Anti-LGALS1 = Antikörper gegen Galectin 1, Anti-LGALS7 = Antikörper gegen Galectin 7, Anti-UGDH = Antikörper gegen UDP-Glucose 6-Dehydrogenase, pH = Maß für die Wasserstoffionenkonzentration.

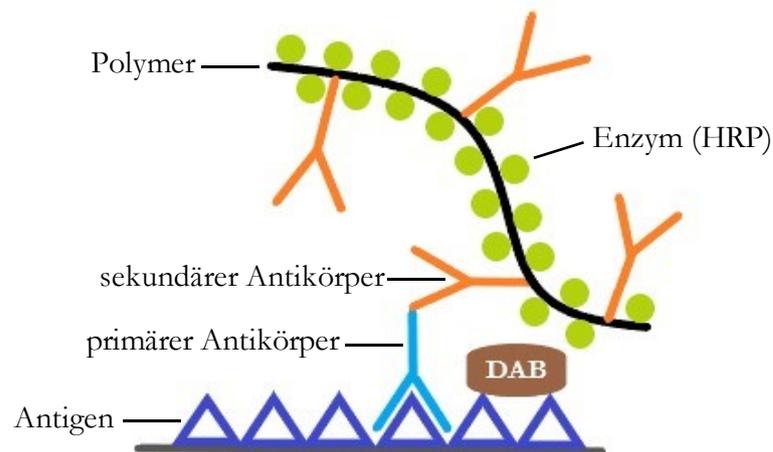


Abbildung 3: Immunhistochemische Färbung (basierend auf Wolf et al. 2015). Die Abbildung zeigt das Prinzip der immunhistochemischen Färbung mittels Polymermethode. Abkürzungen: DAB = Diaminobenzidine, HRP = *horseradish peroxidase* (Meerrettichperoxidase).

2.6 Auswertung der immunhistochemischen Reaktion

Die Auswertung der immunhistochemischen Ergebnisse wurde gemeinsam mit einem Facharzt für Pathologie, in Anlehnung an den immunreaktiven Score (IRS) von Remmele und Stegner, durchgeführt. Der IRS ist definiert als das Produkt aus der Färbeintensität (0 – 4 Punkte) sowie dem Prozentsatz positiver Zellen (0 – 3 Punkte) im Präparat und kann Werte zwischen 0 und 12 annehmen (Remmele und Stegner 1987) (Tab. 5). In vorliegender Arbeit wurde ein $\text{IRS} \geq 2$ Punkte als positive Reaktion gewertet. Um die quantitative Expression der untersuchten Proteine anschaulicher bewerten und beschreiben zu können, wurden die Werte des IRS in die Expressionsstufen „negativ“, „schwach positiv“, „mäßig positiv“ und „stark positiv“ eingeteilt (Tab. 6).

Tabelle 5: Kriterien des immunreaktiven Scores

Prozentsatz positive Zellen		Färbeintensität	
0%	0 Punkte	Negativ	0 Punkte
1 – 10%	1 Punkt	Schwach positiv	1 Punkt
11 – 50%	2 Punkte	Mäßig positiv	2 Punkte
51 – 80%	3 Punkte	Stark positiv	3 Punkte
> 80%	4 Punkte		

Tabelle 6: Interpretation des immunreaktiven Scores

IRS-Werte	Bewertung
0 – 1 Punkt	Negativ
2 – 3 Punkte	Schwach positiv
4 – 6 Punkte	Mäßig positiv
8 – 12 Punkte	Stark positiv

2.7 Statistik

Für die statistischen Untersuchungen wurde eine einmalige Beratung durch das Institut für medizinische Statistik der Universitätsmedizin Göttingen in Anspruch genommen. Die statistischen Analysen sowie die Interpretation der Ergebnisse wurden selbstständig durchgeführt.

Die Auswertung der SILAC-basierten massenspektrometrischen Analyse erfolgte unter Nutzung der Perseus Software Version 1.5.0.9 (MPIB, Martinsried, Deutschland). Signifikante

Unterschiede der Proteinexpression zwischen den beiden Zelllinien H2170 und PCI-13.1 wurden mittels der *outlier-significance* (*significance* B in Perseus) in Abhängigkeit der jeweiligen Intensitätswerte berechnet (Cox und Mann 2008).

Für die statistischen Analysen und grafischen Darstellungen der klinisch-pathologischen Daten und immunhistochemischen Versuche wurde das Programm GraphPadPRISM 8.0.1 (GraphPadSoftware, San Diego, CA, USA) genutzt. Für die statistische Auswertung der immunhistochemischen Versuche in den SQCLC und HNSCC der Kohorte II wurde der nicht parametrische Mann-Whitney-U-Test (MWU-Test), basierend auf den IRS-Werten, eingesetzt. Zur Überprüfung der diagnostischen Genauigkeit von zwei Markern, im Sinne eines Antikörper-Panels, wurde der McNemar-Test für verbundene Stichproben verwendet.

In vorliegender Arbeit wurde ein Signifikanzniveau von $*p < 0,05$ als signifikant, $**p < 0,01$ als sehr signifikant und $***p < 0,001$ als hochsignifikant bewertet.

Die Sensitivitäten und Spezifitäten der Marker-Kandidaten wurden mithilfe einer ROC (*receiver operating characteristics*)-Analyse berechnet und grafisch erstellt. Diese Analyse nutzt die Wertpaare aus Sensitivität und Spezifität, welche gemeinsam einen Punkt der ROC-Kurve bilden. Die Fläche unter der ROC-Kurve (*area under the curve*, AUC) ist ein Schätzmaß für die Unterscheidungsfähigkeit und damit der diagnostischen Güte eines Tests. Die AUC kann jeden Wert zwischen null (keine Unterscheidungsfähigkeit) und eins (exzellente Unterscheidungsfähigkeit) annehmen (Šimundić 2009) (Tab. 7). Da in der vorliegenden Arbeit die Antikörperreaktion nicht mit gesundem Gewebe, sondern zwischen zwei Karzinomentitäten verglichen wurden, wurde bei der Berechnung der Sensitivität eines Antikörpers, die häufigere Kategorie als das richtige Testergebnis gewertet.

Tabelle 7: Interpretation der AUC-Werte

AUC-Werte	Bewertung der AUC-Werte
$AUC \leq 0,5$	Keine Unterscheidungsfähigkeit
$0,5 \leq AUC < 0,6$	Schlechte Unterscheidungsfähigkeit
$0,6 \leq AUC < 0,7$	Akzeptable Unterscheidungsfähigkeit
$0,7 \leq AUC < 0,8$	Gute Unterscheidungsfähigkeit
$0,8 \leq AUC < 0,9$	Sehr gute Unterscheidungsfähigkeit
$AUC \geq 0,9$	Exzellente Unterscheidungsfähigkeit

Prozentangaben wurden größtenteils auf die erste Nachkommastelle gerundet. Dadurch sind eventuell auftretende Abweichungen zu 100% erklärt.

3 Ergebnisse

3.1 Klinische und pathologische Daten des SQCLC- und HNSCC-Patientenkollektivs

Ausgewertet wurden die klinischen und tumorpathologischen Daten von 98 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Lunge (SQCLC) und 96 Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des HNO-Traktes (HNSCC) (Tab. 8).

Tabelle 8: Klinische und tumorpathologische Daten der Patientenkollektive

Klinische und pathologische Daten		SQCLC (n = 98)	HNSCC (n = 96)
Alter	Mittelwert (\pm SD)	65,5 \pm 8,4	62,1 \pm 10,4
	Altersspanne	43 – 81	24 – 83
Geschlecht	Männlich	86 (87,8%)	71 (74,0%)
	Weiblich	12 (12,2%)	25 (26,0%)
Lokalisation	Mundhöhle	–	48 (50,0%)
	Pharynx	–	25 (26,0%)
	Larynx	–	23 (24,0%)
	Lunge	98 (100%)	–
pT-Stadium	pT1	19 (19,4%)	22 (22,9%)
	pT2	63 (64,3%)	41 (42,7%)
	pT3	12 (12,2%)	19 (19,8%)
	pT4	4 (4,1%)	14 (14,6%)
pN-Stadium	pN0	59 (60,2%)	52 (54,2%)
	pN1	22 (22,4%)	23 (24,0%)
	pN2	17 (17,3%)	21 (21,9%)
pM-Stadium	pM0	98 (100%)	95 (99,0%)
	fraglich pM1	0 (0,0%)	1 (1,0%)
UICC-Stadium (achte Auflage)	I	33 (33,7%)	16 (16,7%)
	II	43 (43,9%)	26 (27,1%)
	III	22 (22,4%)	25 (26,0%)
	IV	0 (0,0%)	29 (30,2%)
Grading	G1	0 (0,0%)	0 (0,0%)
	G2	70 (70,7%)	87 (90,6%)
	G3	28 (29,3%)	9 (9,4%)

3.1.1 SQCLC-Kollektiv

Das Kollektiv der SQCLC ($n = 98$) rekrutierte sich aus 86 Männern und 12 Frauen mit einem über beide Geschlechter gemittelten Durchschnittsalter von $65,5 \pm 8,4$ Jahren (Altersspanne: 43 – 81 Jahre) bei Diagnosestellung. Der Altersdurchschnitt der Frauen lag hierbei mit $57,3 \pm 9,0$ Jahren rund neun Jahre unter dem der Männer ($66,6 \pm 7,7$ Jahre). Bei den Männern war ein deutlicher Anstieg der Erkrankungshäufigkeit ab dem 50. Lebensjahr, bis zu einem Maximum in der siebenten Lebensdekade, erkennbar (Abb. 4).

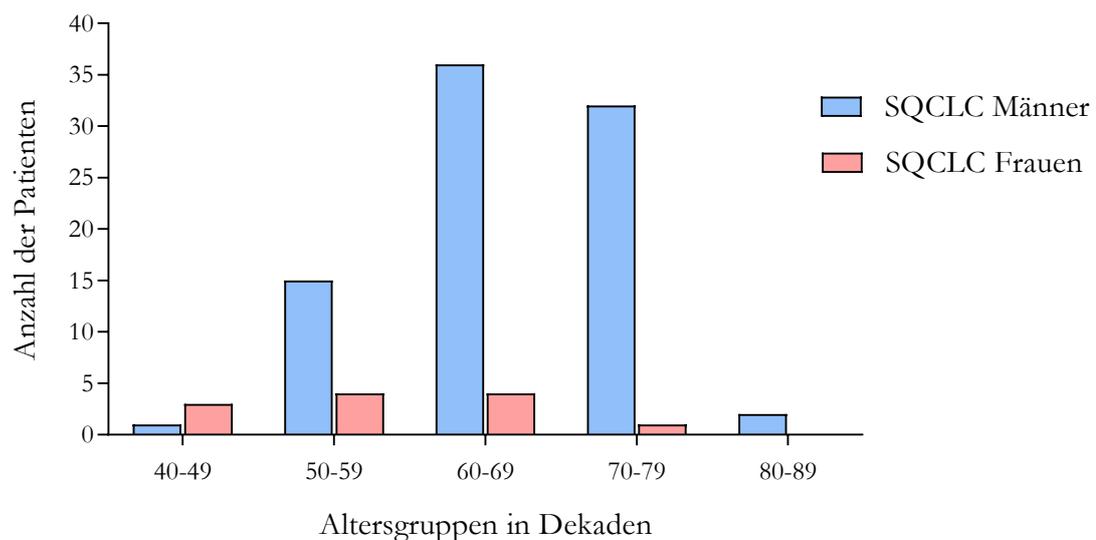


Abbildung 4: Altersverteilung der Patienten mit einem SQCLC. Das Balkendiagramm zeigt die Anzahl der Patienten verteilt auf die Altersgruppen und in Abhängigkeit vom Geschlecht.

Die Auswertung der Tumorstadien ergab, dass in 19 Fällen ein pT1-Stadium, in 63 Fällen ein pT2-Stadium, in 12 Fällen ein pT3-Stadium und in vier Fällen ein pT4-Stadium vorlag. Während 59 Patienten keinen Befall von Lymphknoten aufwiesen, war bei 22 Patienten ein pN1- und 17 Patienten ein pN2-Stadium nachweisbar. Eine Fernmetastasierung war bei keinem der Patienten zum Diagnosezeitpunkt bekannt. Insgesamt wurden 33 Fälle dem UICC-Stadium I, 43 Fälle dem UICC-Stadium II und 22 Fälle dem UICC-Stadium III zugeordnet. Als mäßig differenziert (G2) waren 70 Karzinome und als schlecht differenziert (G3) 28 Karzinome beschrieben worden.

3.1.2 HNSCC-Kollektiv

Das Kollektiv der HNSCC ($n = 96$) rekrutierte sich aus 71 Männern und 25 Frauen mit einem über beide Geschlechter gemittelten Erkrankungsalter von $62,1 \pm 10,4$ Jahren (Altersspanne: 24 bis 83 Jahre). Hierbei waren die Frauen mit einem Durchschnittsalter von $64,5 \pm 12,1$ Jahren bei Diagnosestellung im Mittel etwas über drei Jahre älter als die Männer mit

61,3 ± 9,7 Jahren. Während bei den Männern ein sprunghafter Anstieg der Erkrankungshäufigkeit in der sechsten Lebensdekade zu erkennen war, zeigte sich bei den Frauen ein eher kontinuierlicher Anstieg der Erkrankungshäufigkeit ab dem 40. Lebensjahr bis zu einem Maximum im siebenten Dezennium (Abb. 5).

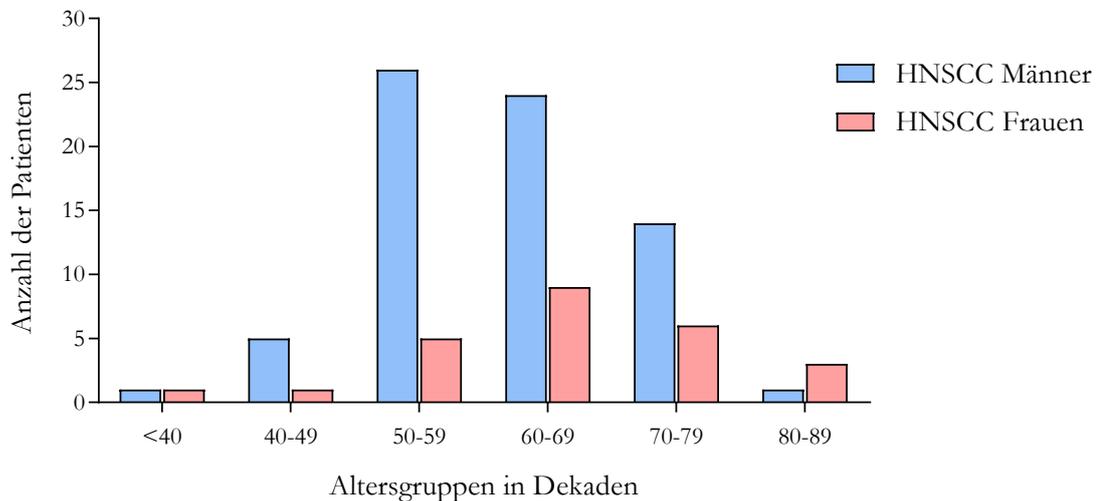


Abbildung 5: Altersverteilung der Patienten mit einem HNSCC. Das Balkendiagramm zeigt die Anzahl der Patienten verteilt auf die Altersgruppen und in Abhängigkeit vom Geschlecht.

In Bezug auf die Tumorlokalisation entstammten 48 Karzinome der Mundhöhle, 25 Karzinome dem Oro- und Hypopharynx und 23 Karzinome dem Larynx. Die pathologische Auswertung der Tumorstadien ergab, dass in 22 Fällen ein pT1-Tumor, in 41 Fällen ein pT2-Tumor, in 19 Fällen ein pT3-Tumor und in 14 Fällen ein pT4-Tumor vorlag. Während 52 Patienten keinen pathologisch bestätigten Befall von Lymphknoten (pN0) aufwiesen, präsentierten 23 Patienten ein pN1- und 21 Patienten ein pN2-Lymphknotenstadium. Eine fragliche pulmonale Fernmetastasierung lag bei einem Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose vor. Bezüglich der Klassifikation nach UICC wiesen 16 Patienten ein Stadium I, 26 Patienten ein Stadium II, 25 Patienten ein Stadium III und 29 Patienten ein Stadium IV auf. Der Großteil der Tumoren (87/96) wies ein mäßig differenziertes Tumorgewebe (G2) auf. Lediglich neun Patienten präsentierten einen schlecht differenzierten Tumor (G3).

3.2 Auswertung der quantitativen Proteomanalyse

Die Tumorzelllinien H2170 (SQCLC) und PCI-13.1 (HNSCC) wurden, wie im Methodenteil unter 2.3.2 beschrieben, in Medien mit „leichten“ und „schweren“ isotopenmarkierten Aminosäuren, kultiviert. Nach der Zellyse wurden äquimolare Mengen von „schwer“ markierten H2170-Proteinen mit „leicht“ markierten PCI-13-Proteinen (SILAC *ratio* H2170/PCI-13.1)

sowie umgekehrt (SILAC *ratio* PCI-13.1/H2170) gemischt und folgend mittels Massenspektrometrie, an den unter 2.3.3 genannten Instituten, analysiert. Aufgrund der Inkorporation der unterschiedlichen SILAC-Aminosäuren waren die Proteine den beiden Zelllinien exakt zuzuordnen. In den zwei biologischen Replikaten konnten insgesamt 5.698 Proteine identifiziert werden, von denen nach der Entfernung der unzureichenden Proteindaten, noch 3.620 quantifizierbare Proteine für die weitere statistische Analyse zur Verfügung standen (Abb. 6).

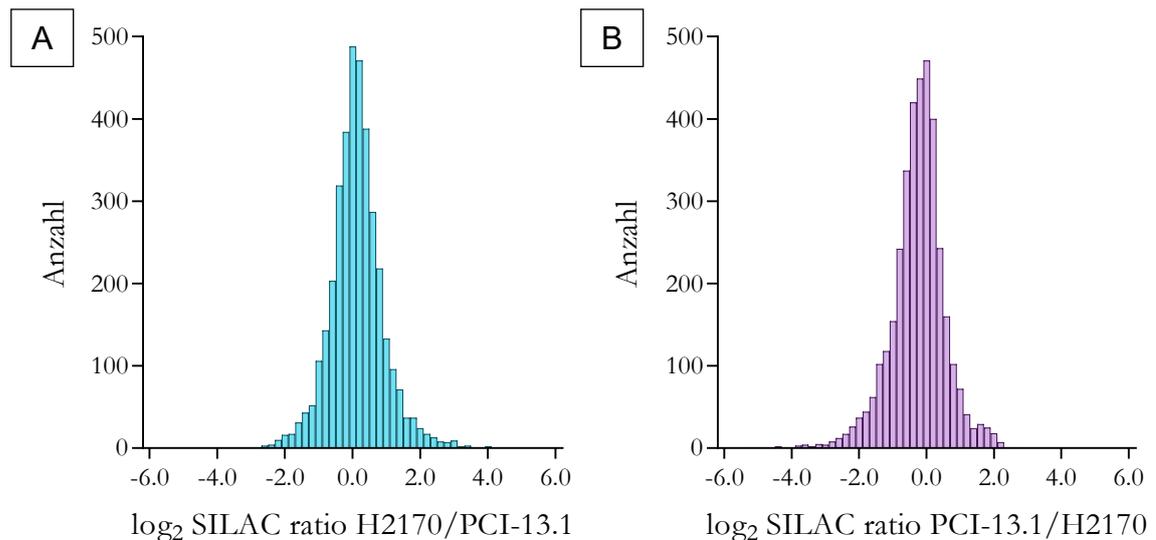


Abbildung 6: Darstellung der \log_2 SILAC ratios H2170/PCI-13.1 und PCI-13.1/H2170. Die Histogramme zeigen die Häufigkeitsverteilungen der \log_2 -transformierten Proteinverhältnisse in den Replikaten SILAC *ratio* H2170/PCI-13.1 (A) und SILAC *ratio* PCI-13.1/H2170 (B).

Folgend wurde die Expression der Proteine in beiden Zelllinien vergleichend quantifiziert. Hierfür wurde die korrespondierenden Proteinmengen beider Replikate (SILAC *ratio* H2170/PCI-13.1 und SILAC *ratio* PCI-13.1/H2170) zueinander ins Verhältnis gesetzt und die jeweiligen SILAC *ratios* (PCI-13.1/H2170) gebildet. Unter Nutzung der Perseus-Software wurde für jedes der 3.620 Proteinverhältnisse eine *outlier significance* in Abhängigkeit vom jeweiligen Intensitätswert berechnet. Hierbei zeigte sich, dass insgesamt 397 Proteine in signifikant unterschiedlichen Mengen in beiden Tumorzelllinien vorlagen. Hiervon wiesen 151 (H2170) und 190 (PCI-13.1) Proteine eine mindestens 2,5-fach unterschiedlich starke Expression auf (Abb. 7).

Nach Abgleich mit den immunhistochemischen Daten aus dem *Human Protein Atlas* wurden initial sieben der 397 Proteine für die folgende immunhistochemische Untersuchung ausge-

wählt. Hierbei waren CK19 sowie UGDH in signifikant höherer Menge in der SQCLC-Zelllinie (H2170) und CA2, CAV1, CAV2, LGALS1 und LGALS7 in signifikant höherer Menge in der HNSCC-Zelllinie (PCI-13.1) vertreten (Abb. 7 und Tab. 9).

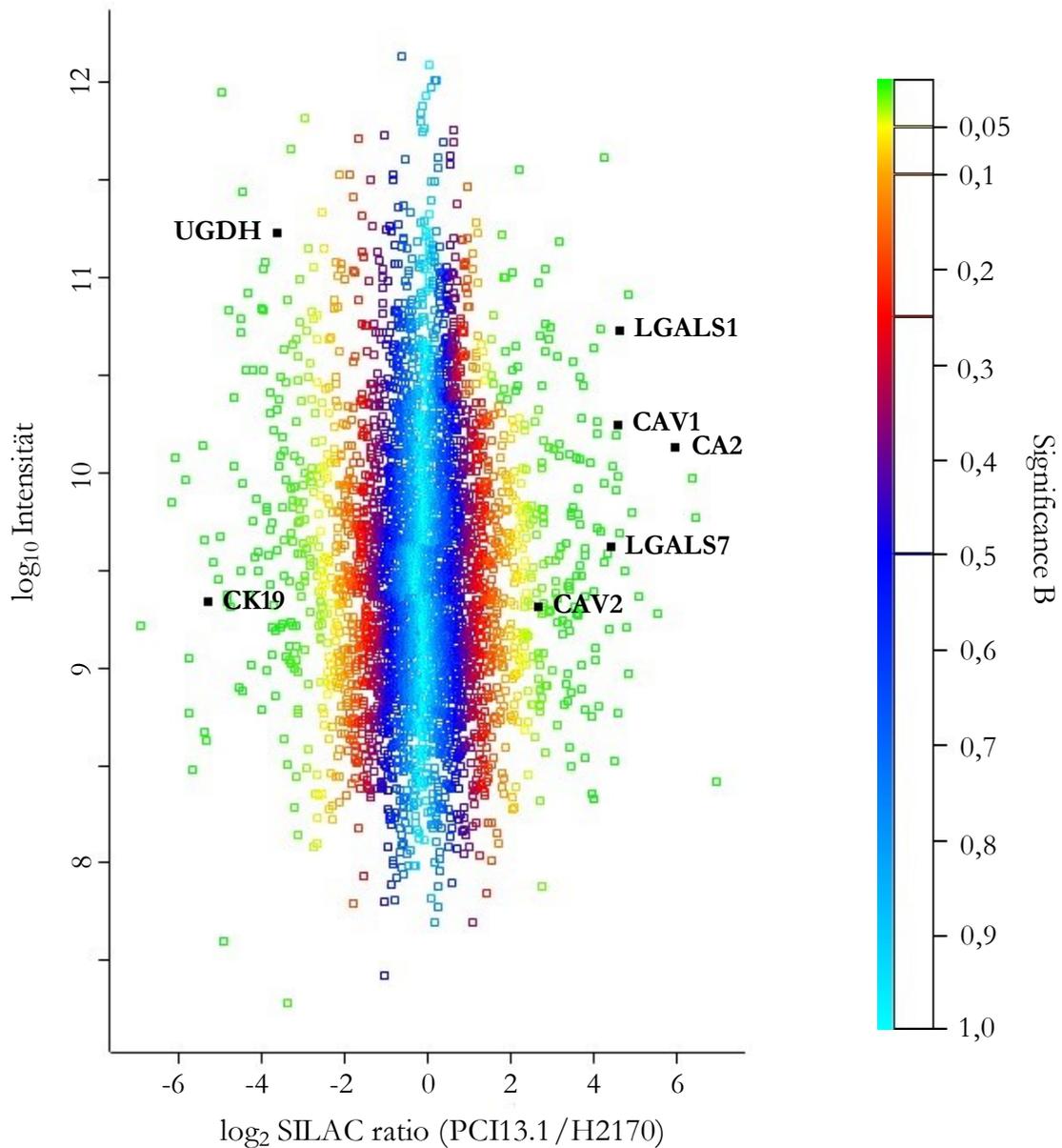


Abbildung 7: Signifikanzuntersuchung der SILAC-basierten Massenspektrometrie. Verteilung der \log_2 SILAC *ratios* (PCI-13.1/H2170) aller quantifizierten Proteine anhand ihrer relativen Expression in H2170 (SQCLC) und PCI-13.1 (HNSCC) und in Abhängigkeit der jeweiligen \log_{10} -Intensitätswerte. Die in der SQCLC-Zelllinie stärker exprimierten Proteine weisen SILAC *ratios* mit negativen, die in der HNSCC-Zelllinie stärker exprimierten Proteine SILAC *ratios* mit positiven Vorzeichen auf. Signifikant unterschiedlich exprimierte Proteine sind in grün, gemäß der Farbskala *significance B*, dargestellt. Die für die Immunhistochemie ausgewählten Proteine sind gekennzeichnet. Abkürzungen: \log_2 = Zweierlogarithmus, \log_{10} = Zehnerlogarithmus.

Tabelle 9: Ausgewählte Proteine des SILAC-Assays

Protein	Gen	log ₂ SILAC ratio (PCI-13.1/H2170)	log ₁₀ - Intensität	p-Wert	Peptide (n)
Carbonic Anhydrase II	CA2	5,953	10,132	2,17E-07	10
Caveolin 1	CAV1	4,602	10,247	5,65E-05	11
Caveolin 2	CAV2	2,648	9,311	0,0217	15
Cytokeratin 19	CK19	- 5,280	9,336	4,99E-06	44
Galectin 1	LGALS1	4,643	10,726	2,34E-11	11
Galectin 7	LGALS7	4,399	9,624	0,0004	18
UDP-Glucose 6-Dehydrogenase	UGDH	- 3,602	11,231	0,0073	35

Die Tabelle zeigt die Daten der für die immunhistochemische Untersuchung ausgewählten Proteine unter Angabe der log₂-transformierten SILAC *ratios* (PCI-13.1/H2170) und der log₁₀-transformierten Intensitätswerte sowie den daraus berechneten p-Werten mittels *significance B*. Positive Vorzeichen der log₂ SILAC *ratios* kennzeichnen eine stärkere Expression in der HNSCC-Zelllinie (PCI-13.1), negative Vorzeichen eine stärkere Expression in der SQCLC-Zelllinie (H2170).

3.3 Immunhistochemische Untersuchungen

Zur Überprüfung der Ergebnisse der Proteomanalyse von H2170 (repräsentiert ein SQCLC) und PCI-13.1 (repräsentiert ein HNSCC) und um eine Einsicht in das gewebe-ty- pische Expressionsmuster der sieben ausgewählten Proteine in entsprechenden Primärtumoren zu erlangen, wurden immunhistochemische Analysen mit den entsprechenden validierten Antikörpern in Gewebeproben, wie im Methodenteil unter 2.5 beschrieben, durchgeführt.

Zunächst wurden die sieben Antikörper in einem kleinen Probekollektiv (Kohorte I), bestehend aus jeweils sechs SQCLC- und HNSCC-Präparaten, getestet. Hierbei wiesen CAV1, CAV2, LGALS1 und LGALS7, unter Berücksichtigung der immunhistochemischen Ergebnisse aus dem *Human Protein Atlas*, die besten Resultate auf (Tab. 10). Diese vier Proteine wurden daher für die immunhistochemische Färbung in der Kohorte II, bestehend aus Gewebeproben von 98 SQCLC sowie 96 HNSCC ausgewählt. Die Präparate der Kohorte I wurden in die Kohorte II mitaufgenommen.

Tabelle 10: Expression der Marker-Kandidaten im Human Protein Atlas und Kohorte I

Marker	SILAC-MS signifikant stärker in	IHC (HPA) (n) positive	IHC (Kohorte I) (n) positive
CA2	PCI-13.1 (HNSCC)	3/3 HNSCC 0/4 SQCLC	5/6 HNSCC 3/6 SQCLC
CAV1	PCI-13.1 (HNSCC)	3/3 HNSCC 1/5 SQCLC	6/6 HNSCC 0/6 SQCLC
CAV2	PCI-13.1 (HNSCC)	3/3 HNSCC 1/4 SQCLC	6/6 HNSCC 1/6 SQCLC
CK19	H2170 (SQCLC)	1/4 HNSCC 3/4 SQCLC	2/6 HNSCC 6/6 SQCLC
LGALS1	PCI-13.1 (HNSCC)	3/4 HNSCC 1/5 SQCLC	5/6 HNSCC 1/6 SQCLC
LGALS7	PCI-13.1 (HNSCC)	3/3 HNSCC 1/4 SQCLC	6/6 HNSCC 1/6 SQCLC
UGDH	H2170 (SQCLC)	1/3 HNSCC 5/6 SQCLC	2/6 HNSCC 5/6 SQCLC

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der SILAC-basierten Massenspektrometrie (SILAC-MS) sowie die der Immunhistochemie (IHC) im *Human Protein Atlas* (HPA) und der Kohorte I. Angegeben ist jeweils die absolute Anzahl der positiven Fälle an der Gesamtzahl der Fälle. Die für die immunhistochemische Untersuchung in der Kohorte II ausgewählten Proteine sind blau hinterlegt.

In der folgenden immunhistochemischen Untersuchungen der Kohorte II wurde die Expression von CAV1, CAV2, LGALS1 und LGALS7 in den SQCLC und HNSCC quantitativ ausgewertet und anhand des Mann-Whitney-U-Tests (MWU-Test) auf statistisch signifikante Expressionsunterschiede zwischen den Kollektiven untersucht. Zudem wurde eine Analyse auf signifikante Zusammenhänge zwischen den Markerexpressionen und den tumorpathologischen Parametern mittels MWU-Tests durchgeführt. Dabei wurden die folgenden Parameter in Beziehung zu den IRS-Werten der jeweiligen Marker gesetzt: pT-Stadium (pT1/pT2 versus pT3/pT4), pN-Stadium (pN0 versus pN1/pN2), UICC-Stadien SQCLC (I versus II/III), UICC-Stadien HNSCC (I/II versus III/IV), histopathologisches Grading (G2 versus G3).

3.3.1 Expression von CAV1 in SQCLC und HNSCC

In der immunhistochemischen Untersuchung von CAV1 konnten insgesamt 92 SQCLC, und 89 HNSCC der Kohorte II anhand des immunreaktiven Scores (IRS) ausgewertet werden (Tab. 11).

Tabelle 11: Quantitative Auswertung der CAV1-Expression in SQCLC und HNSCC

Marker	Expressionsstufe	SQCLC (n = 92)	HNSCC (n = 89)
CAV1	Negativ (IRS 0 – 1)	61 (66,3%)	9 (10,1%)
	Schwach positiv (IRS 2 – 3)	17 (18,5%)	8 (9,0%)
	Mäßig positiv (IRS 4 – 6)	10 (10,9%)	35 (39,3%)
	Stark positiv (IRS 8 – 12)	4 (4,3%)	37 (41,6%)

Die Tabelle zeigt die quantitative Auswertung der Immunhistochemie von CAV1 in den SQCLC und HNSCC anhand der IRS-Expressionsstufen. Angegeben sind die absoluten sowie prozentualen Anteile an der Gesamtanzahl (n) der jeweiligen Kollektivschnitte. Abkürzung: IRS = immunreaktiver Score.

Die Tumorzellen präsentierten in allen als positiv bewerteten Präparaten eine zytoplasmatische und oft betont membranöse Anfärbung. Verhornte Tumoreale stellten sich in der Regel negativ dar. Eine starke Expression war zudem in miterfassten Adipozyten und Endothelien nachweisbar. In den SQCLC präsentierten Pneumozyten eine starke Reaktion. In den HNSCC wiesen die basalen sowie suprabasalen Keratinozyten von originärem Plattenepithelgewebe häufig eine zytoplasmatische Färbung auf.

Im Kollektiv der SQCLC dominierten die als negativ bewerteten Tumoren mit 66,3% (61/92) (Abb. 8A). In den immunhistochemisch positiven Präparaten war meist eine inhomogene Anfärbung der Tumormassen zu beobachten, bei der einzelne Tumorzellareale eine schwach bis mäßig positive meist zytoplasmatische Reaktion aufwiesen. Im Vergleich hierzu präsentierte das Kollektiv der HNSCC eine deutlich stärkere Expression von CAV1. So wurden insgesamt 80 der 89 Präparate (89,9%) als immunhistochemisch positiv bewertet. Eine starke Expression wurde hierbei in 37 Fällen (41,6%) und eine mäßige in 35 Fällen (39,3%) beobachtet (Abb. 8B-D). In der überwiegenden Anzahl der HNSCC-Präparate war ein typisch peripheres Färbemuster der Tumorzellnester zu erkennen. Hierbei zeigte sich eine meist starke, betont membranöse Reaktion in den peripher gelegenen Tumorzellen bei einer gleichzeitig schwächeren oder fehlenden Reaktion in zentralen Tumorealen (Abb. 8C+D).

Im MWU-Test wiesen die Tumoren des HNSCC-Kollektivs eine hochsignifikant stärkere Expression von CAV1 auf als die des SQCLC-Kollektivs ($p < 0,001$). Der mediane IRS kam in den SQCLC bei null und in den HNSCC bei sechs zu liegen (Abb. 8E).

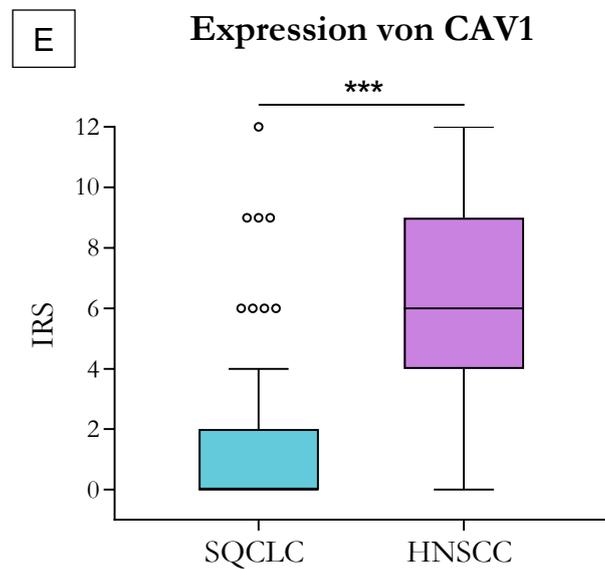
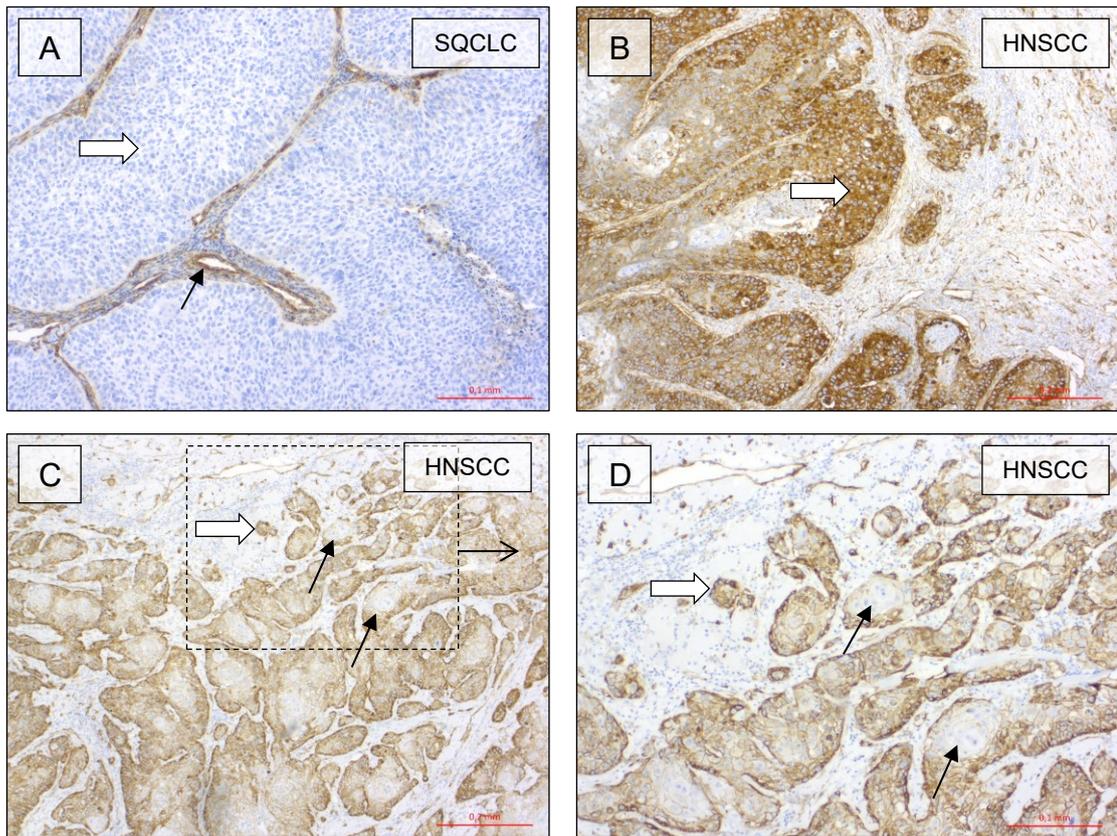


Abbildung 8: Expression von CAV1 in SQCLC und HNSCC. Die Tumorzellen eines SQCLC (\Rightarrow) zeigen keine Expression von CAV1, stark positive Endothelien (\rightarrow) als interne Positivkontrolle (A; Vergrößerung $\times 100$). Die Tumorzellen eines HNSCC (\Rightarrow) zeigen eine zytoplasmatische und starke membranöse Expression von CAV1 (B; Vergrößerung $\times 50$). Die vitalen Tumorzellen eines HNSCC (\Rightarrow) weisen eine starke, betont membranöse Expression von CAV1 auf, verhornte Areale (\rightarrow) zeigen keine immunhistochemische Reaktion (C; Vergrößerung $\times 50$ und D; Vergrößerung $\times 100$). Boxplot zur CAV1-Expression in den SQCLC und HNSCC (E; die horizontalen Linien innerhalb der Boxen repräsentieren die medianen IRS-Werte, die oberen und unteren Grenzen der Boxen entsprechen den 25%- und 75%-Quartilen; \circ = Ausreißer; $***p < 0,001$).

3.3.1.1 Einfluss der tumorpathologischen Parameter auf die CAV1-Expression

In der Untersuchung bezüglich signifikanter Zusammenhänge zwischen der Expression von CAV1 und den tumorpathologischen Parametern zeigte sich im Kollektiv der SQCLC eine signifikant stärkere Expression in den Tumoren der UICC-Stadien II/III im Vergleich zu den Tumoren des UICC-Stadiums I ($p = 0,045$) (Abb. 9A). Zudem ließen sich deutlich korrelative Tendenzen zu höheren IRS-Werten in den pT3/pT4-Tumoren im Vergleich zu den pT1/pT2-Tumoren ($p = 0,077$) sowie in den G2-Tumoren im Vergleich zu den G3-Tumoren ($p = 0,065$) nachweisen. Für das Lymphknotenstadium ergaben sich keine signifikanten Zusammenhänge zur Expression von CAV1 ($p = 0,284$).

Im Kollektiv der HNSCC wiesen die Lymphknotenmetastasen positiven Tumoren (pN1/pN2) eine signifikant stärkere Expression auf als die Lymphknotenmetastasen negativen Tumoren (pN0) ($p = 0,035$) (Abb. 9B). Des Weiteren zeigten Tumoren in den fortgeschrittenen UICC-Stadien III/IV eine deutliche Tendenz zu höheren IRS-Werten als die Tumoren der UICC-Stadien I/II ($p = 0,066$). Keine signifikanten Zusammenhänge zur Expression ergaben sich für das Tumorstadium ($p = 0,327$) oder das Grading ($p = 0,277$).

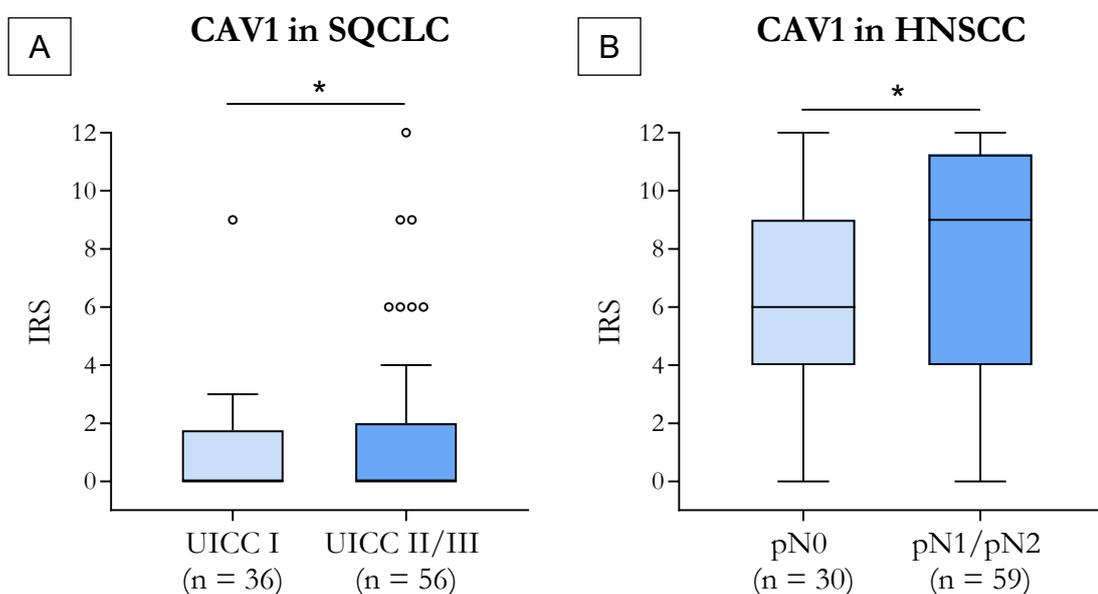


Abbildung 9: Zusammenhänge zwischen der Expression von CAV1 und den pathologischen Parametern in SQCLC und HNSCC. Die Boxplots zeigen die Ergebnisse des MWU-Tests bezüglich signifikanter Korrelationen zwischen der CAV1-Expression und der Klassifikation nach UICC in den SQCLC (A) und den Lymphknotenstadien in den HNSCC (B). Die horizontalen Linien innerhalb der Boxen repräsentieren die medianen IRS-Werte, die oberen und unteren Grenzen der Boxen entsprechen den 25%- und 75%-Quartilen; \circ = Ausreißer; $*p < 0,05$.

3.3.2 Expression von CAV2 in SQCLC und HNSCC

In der immunhistochemischen Untersuchung von CAV2 konnten 97 SQCLC-Präparate sowie 93 HNSCC-Präparate der Kohorte II anhand des IRS ausgewertet werden (Tab. 12).

Tabelle 12: Quantitative Auswertung der CAV2-Expression in SQCLC und HNSCC

Marker	Expressionsstufe	SQCLC (n = 97)	HNSCC (n = 93)
CAV2	Negativ (IRS 0 – 1)	25 (25,8%)	3 (3,2%)
	Schwach positiv (IRS 2 – 3)	25 (25,8%)	9 (9,7%)
	Mäßig positiv (IRS 4 – 6)	33 (34,0%)	43 (46,2%)
	Stark positiv (IRS 8 – 12)	14 (14,4%)	38 (40,9%)

Die Tabelle zeigt die quantitative Auswertung der Immunhistochemie von CAV2 in den SQCLC und HNSCC anhand der IRS-Expressionsstufen. Angegeben sind die absoluten sowie prozentualen Anteile an der Gesamtanzahl (n) der jeweiligen Kollektivschnitte. Abkürzung: IRS = immunreaktiver Score.

Analog zu CAV1 präsentierten die Tumorzellen in allen als positiv bewerteten Präparaten eine zytoplasmatische sowie häufig betont membranöse Anfärbung von CAV2. Verhornte Tumorareale stellten sich in der Regel negativ dar. Eine starke Expression war in miterfassten Adipozyten sowie Endothelien nachweisbar. In den SQCLC wiesen zudem Pneumozyten eine deutliche Reaktion auf. In den HNSCC präsentierten die basalen sowie suprabasalen Keratinozyten von originärem Plattenepithel eine meist schwache zytoplasmatische Färbung. Im Kollektiv der SQCLC wies der größte Anteil der Präparate (72/97; 74,2%) eine immunhistochemische Reaktion auf CAV2 auf. Insgesamt wurde die Expression in 58 Fällen (59,8%) als schwach bzw. mäßig stark befundet (Abb. 10A+B). Das Expressionsmuster innerhalb der Tumoren war häufig inhomogen mit einer über die Tumormassen verteilten schwach bis mäßig starken Anfärbung einzelner Tumorzellen oder Tumorzellverbänden. Im Kollektiv der HNSCC wurden nahezu alle Präparate (90/93; 96,8%) als immunhistochemisch positiv für CAV2 bewertet. Die Expression wurde in einem Großteil der Fälle (81/93; 87,1%) als mäßig oder stark positiv befundet (Abb. 10C+D). Analog zur Expression von CAV1 zeigte sich in vielen Fällen ein typisch peripheres Expressionsmuster in den Tumorzellnestern, mit einer mäßigen bis starken Anfärbung von peripher gelegenen Tumorzellen bei einer gleichzeitig schwächeren oder fehlenden Expression in den zentralen Kompartimenten (Abb. 10D).

Im MWU-Test ergab sich ein hochsignifikanter Unterschied bezüglich der CAV2-Expression zwischen den Entitäten ($p < 0,001$). Der mediane IRS betrug in den SQCLC drei und in den HNSCC sechs (Abb. 10E).

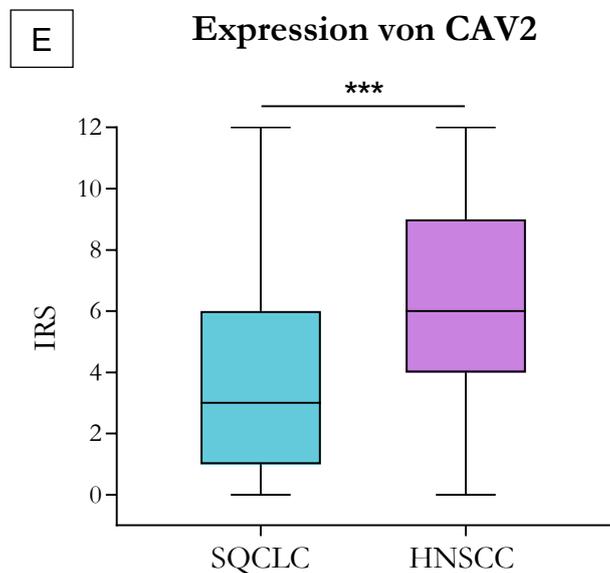
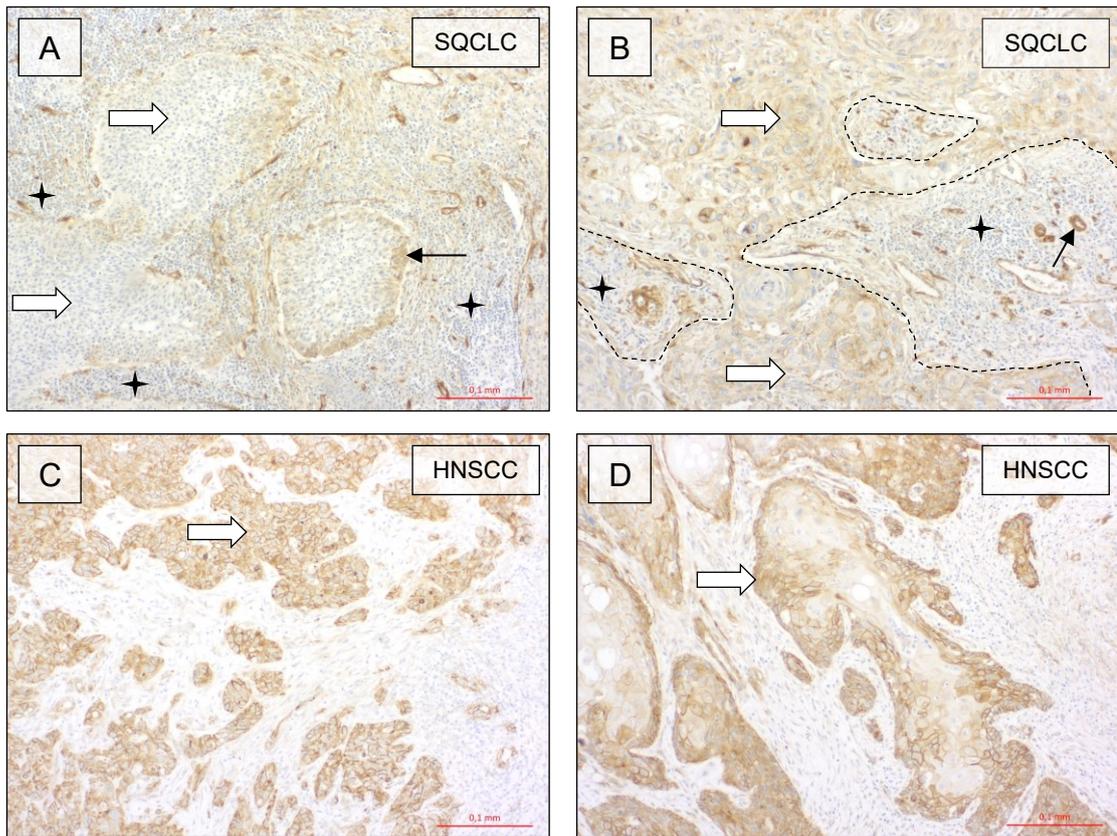


Abbildung 10: Expression von CAV2 in SQCLC und HNSCC. Die Tumorzellen eines SQCLC sind negativ (\Rightarrow) bzw. schwach positiv (\rightarrow) für CAV2, Lymphozyteninfiltration (\blackstar) (A; Vergrößerung x100). Die Tumorzellen eines SQCLC (\Rightarrow) weisen eine überwiegend schwache zytoplasmatische Expression von CAV2 auf, stark positives Endothelgewebe einer Arteriole (\rightarrow), Lymphozyteninfiltration (\blackstar) (B; Vergrößerung x100). Die Tumorzellen eines HNSCC (\Rightarrow) zeigen eine starke, betont membranöse Expression von CAV2 (C; Vergrößerung x100). Typisch peripheres Expressionsmuster von CAV2 in den Tumorinseln (\Rightarrow) eines HNSCC (D; Vergrößerung x100). Boxplot zur CAV2-Expression in den SQCLC und HNSCC (E; die horizontalen Linien innerhalb der Boxen repräsentieren die medianen IRS-Werte, die oberen und unteren Grenzen der Boxen entsprechen den 25%- und 75%-Quartilen; *** $p < 0,001$).

3.3.2.1 Einfluss der tumorpathologischen Parameter auf die CAV2-Expression

Im Kollektiv der SQCLC zeigte sich im MWU-Test eine signifikant stärkere Expression in den mäßig differenzierten Tumoren (G2) im Vergleich zu den schlecht differenzierten Tumoren (G3) ($p = 0,034$) (Abb. 11A). Keine signifikanten Ergebnisse oder korrelative Tendenzen ergaben sich für das Lymphknotenstadium ($p = 0,406$), das histopathologische Grading ($p = 0,671$) oder die Klassifikation nach UICC ($p = 0,227$).

In den HNSCC war ebenfalls eine signifikant stärkere Expression in den mäßig differenzierten Tumoren (G2) im Vergleich zu den schlecht differenzierten Tumoren (G3) nachweisbar ($p = 0,016$) (Abb. 11B). Zudem ließ sich eine deutliche Tendenz zu höheren IRS-Werten in den Tumoren mit Lymphknotenmetastasen als in denen ohne metastatische Absiedelungen, nachweisen ($p = 0,057$). In Bezug auf das Tumorstadium und die Klassifikation nach UICC ergaben sich keine signifikanten Zusammenhänge ($p = 0,441$ bzw. $p = 0,341$).

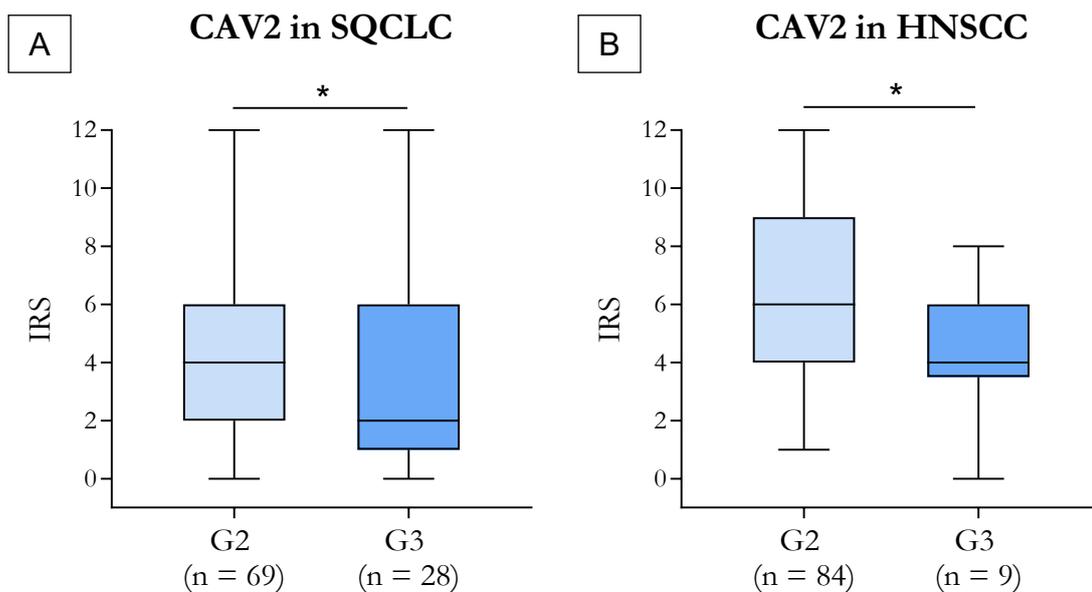


Abbildung 11: Zusammenhänge zwischen der Expression von CAV2 und den pathologischen Parametern in SQCLC und HNSCC. Die Boxplots zeigen die Ergebnisse des MWU-Tests bezüglich signifikanter Korrelationen zwischen der CAV2-Expression und dem Grading in den SQCLC (A) und dem Grading in den HNSCC (B). Die horizontalen Linien innerhalb der Boxen repräsentieren die medianen IRS-Werte, die oberen und unteren Grenzen der Boxen entsprechen den 25%- und 75%-Quartilen; * $p < 0,05$.

3.3.3 Expression von LGALS1 in SQCLC und HNSCC

In der immunhistochemischen Untersuchungen von LGALS1 konnten die Präparate von 96 SQCLC und 89 HNSCC der Kohorte II anhand des IRS ausgewertet werden (Tab. 13).

Tabelle 13: Quantitative Auswertung der LGALS1-Expression in SQCLC und HNSCC

Marker	Expressionsstufe	SQCLC (n = 96)	HNSCC (n = 89)
LGALS1	Negativ (IRS 0 – 1)	34 (35,4%)	7 (7,9%)
	Schwach positiv (IRS 2 – 3)	31 (32,3%)	20 (22,5%)
	Mäßig positiv (IRS 4 – 6)	21 (21,9%)	35 (39,3%)
	Stark positiv (IRS 8 – 12)	10 (10,4%)	27 (30,3%)

Die Tabelle zeigt die quantitative Auswertung der Immunhistochemie von LGALS1 in den SQCLC und HNSCC anhand der IRS-Expressionsstufen. Angegeben sind die absoluten sowie prozentualen Anteile an der Gesamtanzahl (n) der jeweiligen Kollektivschnitte. Abkürzung: IRS = immunreaktiver Score.

Im Falle einer positiven Reaktion auf LGALS1 zeigte sich in allen Präparaten eine überwiegend zytoplasmatische sowie teilweise nukleäre Färbung der Tumorzellen. Das Tumorstroma wies in beiden Kollektiven häufig eine starke Expression auf. Miterfasste Adipozyten sowie lymphatische Gewebe präsentierten ebenfalls eine deutliche Reaktion.

In den SQCLC war in 34 von 96 Fällen (35,4%) keine immunhistochemische Reaktion nachweisbar (Abb. 12A). Eine schwache Expression zeigte sich in 32,3% (31/96) der Fälle (Abb. 12B). Das Expressionsmuster in den immunhistochemisch positiven Tumoren war häufig diffus, mit einer über die Tumormassen verteilten, unterschiedlich starken Anfärbung von einzelnen Tumorzellen oder Tumorzellarealen. Im Kollektiv der HNSCC wies die überwiegende Anzahl der Fälle (82/89; 92,1%) eine immunhistochemische Reaktion auf LGALS1 auf. Hierbei dominierten die mäßig stark positiven Präparate (35/89; 39,3%) vor den stark positiven Präparaten (27/89; 30,3%) (Abb. 12C+D). Das Expressionsmuster war meist inhomogen, mit einer entweder peripher betonten (Abb. 12C) oder diffusen Expression (Abb. 12D) in den Tumorgeweben.

Im MWU-Test wiesen die Tumoren des HNSCC-Kollektivs eine hochsignifikant stärkere Expression von LGALS1 auf als die Tumoren des SQCLC-Kollektivs ($p < 0,001$). Der mediane IRS-Wert betrug in den SQCLC zwei und in den HNSCC sechs (Abb. 12E).

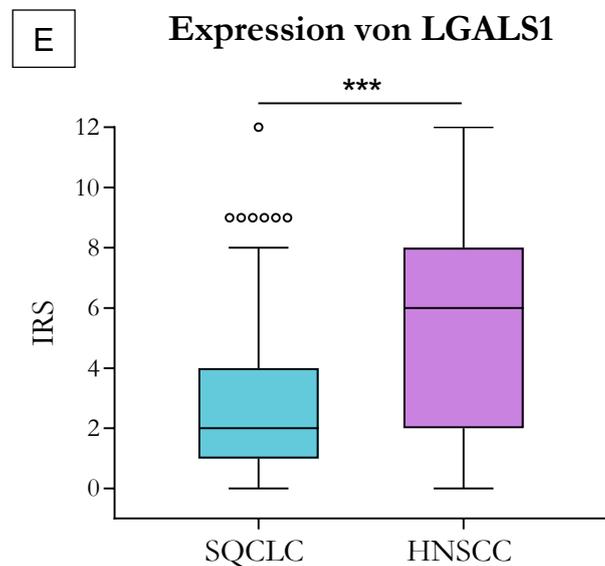
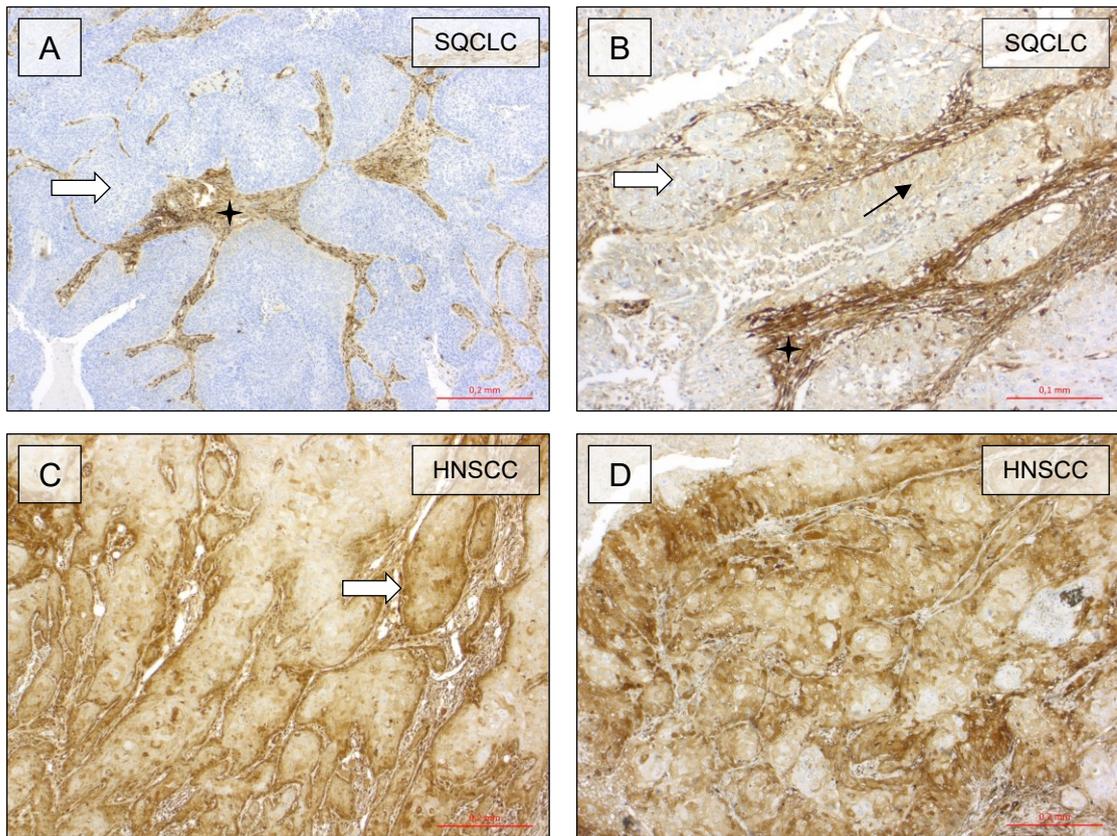


Abbildung 12: Expression von LGALS1 in SQCLC und HNSCC. Die Tumorzellen eines SQCLC (\Rightarrow) weisen keine Expression von LGALS1 auf, das Tumorstroma (\blackstar) zeigt eine starke Expression von LGALS1 (A; Vergrößerung x50). Die Tumorzellen eines SQCLC zeigen eine fehlende (\Rightarrow) bzw. schwach positive Expression (\rightarrow) von LGALS1, stark positives Tumorstroma (\blackstar) (B; Vergrößerung x100). Das Gewebe eines HNSCC (\Rightarrow) präsentiert eine inhomogene, betont periphere Expression von LGALS1 (C; Vergrößerung x50). Diffuse Expression von LGALS1 in einem HNSCC mit variabler Färbereaktion der Tumorzellen (D; Vergrößerung x50). Boxplot zur LGALS1-Expression in den SQCLC und HNSCC (E; die horizontalen Linien innerhalb der Boxen repräsentieren die medianen IRS-Werte, die oberen und unteren Grenzen der Boxen entsprechen den 25%- und 75%-Quartilen; \circ = Ausreißer; $***p < 0,001$).

3.3.3.1 Einfluss der tumorpathologischen Parameter auf die Expression von LGALS1

In der Untersuchung auf signifikante Zusammenhänge zwischen der Markerexpression und den tumorpathologischen Parametern in den SQCLC ergaben sich lediglich schwache korrelative Tendenzen zu höheren IRS-Werten in den pN0-Tumoren im Vergleich zu den pN1/pN2-Tumoren ($p = 0,112$) sowie in den mäßig differenzierten G2-Tumoren im Vergleich zu den schlecht differenzierten G3-Tumoren ($p = 0,131$). Keine signifikanten Zusammenhänge oder korrelative Trends ließen sich für das Tumorstadium ($p = 0,304$) und die UICC-Klassifikation ($p = 0,422$) darstellen.

Im Kollektiv der HNSCC zeigte sich eine signifikant stärkere Expression in den Tumoren mit Lymphknotenmetastasen (pN1/pN2) als in den Tumoren ohne Lymphknotenmetastasen (pN0) ($p = 0,037$) (Abb. 13). Zudem ließen sich schwache korrelative Tendenzen zu höheren IRS-Werten in den pT3/pT4-Tumoren im Vergleich zu den pT1/pT2-Tumoren ($p = 0,154$) sowie in den UICC-Stadien III/IV im Vergleich zu den Stadien I/II nachweisen ($p = 0,104$). Keine signifikanten Beziehungen oder korrelative Tendenzen ließen sich in Bezug auf das histopathologische Grading feststellen ($p = 0,278$).

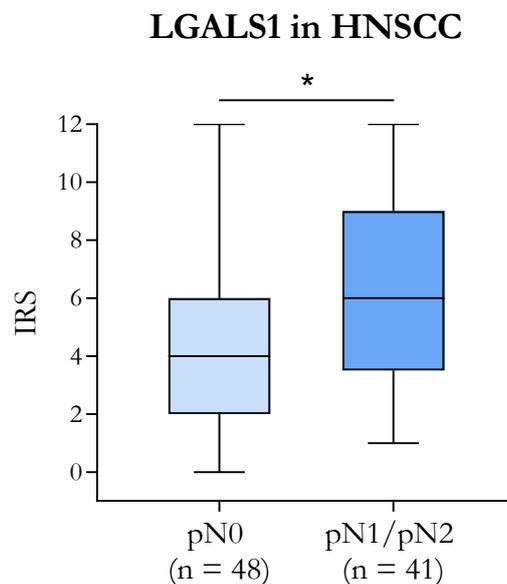


Abbildung 13: Zusammenhänge zwischen der Expression von LGALS1 und den pathologischen Parametern in HNSCC. Der Boxplot zeigt das Ergebnis des MWU-Tests bezüglich einer signifikanten Korrelation zwischen der LGALS1-Expression und den Lymphknotenstadien in den HNSCC. Die horizontalen Linien innerhalb der Boxen repräsentieren die medianen IRS-Werte, die oberen und unteren Grenzen der Boxen entsprechen den 25%- und 75%-Quartilen; * $p < 0,05$.

3.3.4 Expression von LGALS7 in SQCLC und HNSCC

In der immunhistochemischen Untersuchung von LGALS7 konnten 97 SQCLC- und 91 HNSCC-Präparate der Kohorte II anhand des IRS ausgewertet werden (Tab. 14).

Tabelle 14: Quantitative Auswertung der LGALS7-Expression in SQCLC und HNSCC

Marker	Expressionsstufe	SQCLC (n = 97)	HNSCC (n = 91)
LGALS7	Negativ (IRS 0 – 1)	64 (66,0%)	5 (5,5%)
	Schwach positiv (IRS 2 – 3)	20 (20,6%)	21 (23,1%)
	Mäßig positiv (IRS 4 – 6)	11 (11,3%)	29 (31,9%)
	Stark positiv (IRS 8 – 12)	2 (2,1%)	36 (39,6%)

Die Tabelle zeigt die quantitative Auswertung der Immunhistochemie von LGALS7 in den SQCLC und HNSCC anhand der IRS-Expressionsstufen. Angegeben sind die absoluten sowie prozentualen Anteile an der Gesamtanzahl (n) der jeweiligen Kollektivschnitte. Abkürzung: IRS = immunreaktiver Score.

Im Falle einer positiven Reaktion zeigte sich in beiden Kollektiven eine überwiegend zytoplasmatische, teils nukleäre Expression von LGALS7 in den Tumorzellen. In den HNSCC wiesen die basalen sowie suprabasalen Keratinozyten von miterfasstem originären Plattenepithelgewebe häufig eine mäßige bis starke, betont nukleäre Färbung auf.

Im Kollektiv der SQCLC wiesen 64 der 97 Präparate (66,0%) keine immunhistochemische Reaktion von LGALS7 auf (Abb. 14A). Bei den als positiv bewerteten Tumoren dominierten die schwach positiven Präparate mit 20,6% (20/97) vor den mäßig stark positiven Präparaten (11/97; 11,3%). Im Falle einer positiven Immunhistochemie zeigte sich meist ein inhomogenes Expressionsmuster mit einer schwach bis mäßig starken Färbereaktion in einzelnen Arealen des Tumorgewebes (Abb. 14B). Im Vergleich zu den SQCLC war die Expression von LGALS7 in den HNSCC deutlich stärker ausgeprägt. So wiesen 86 der 91 Fälle (94,5%) eine immunhistochemische Reaktion auf. Die überwiegende Anzahl der HNSCC (65/91; 71,5%) präsentierte eine starke oder mäßig starke Expression, die meist großflächig innerhalb der Tumormassen auftrat (Abb. 14C+D).

Im MWU-Test wiesen die Tumoren des HNSCC-Kollektivs eine hochsignifikante stärkere Expression von LGALS7 auf als die des SQCLC-Kollektivs ($p < 0,001$). Der mediane IRS betrug in den SQCLC null und in den HNSCC sechs (Abb. 14E).

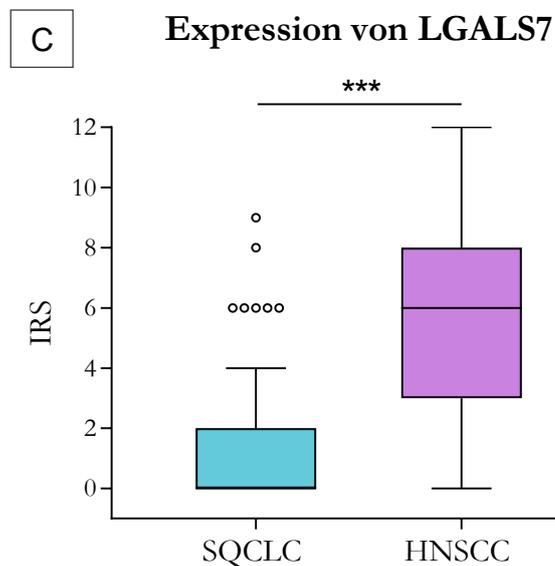
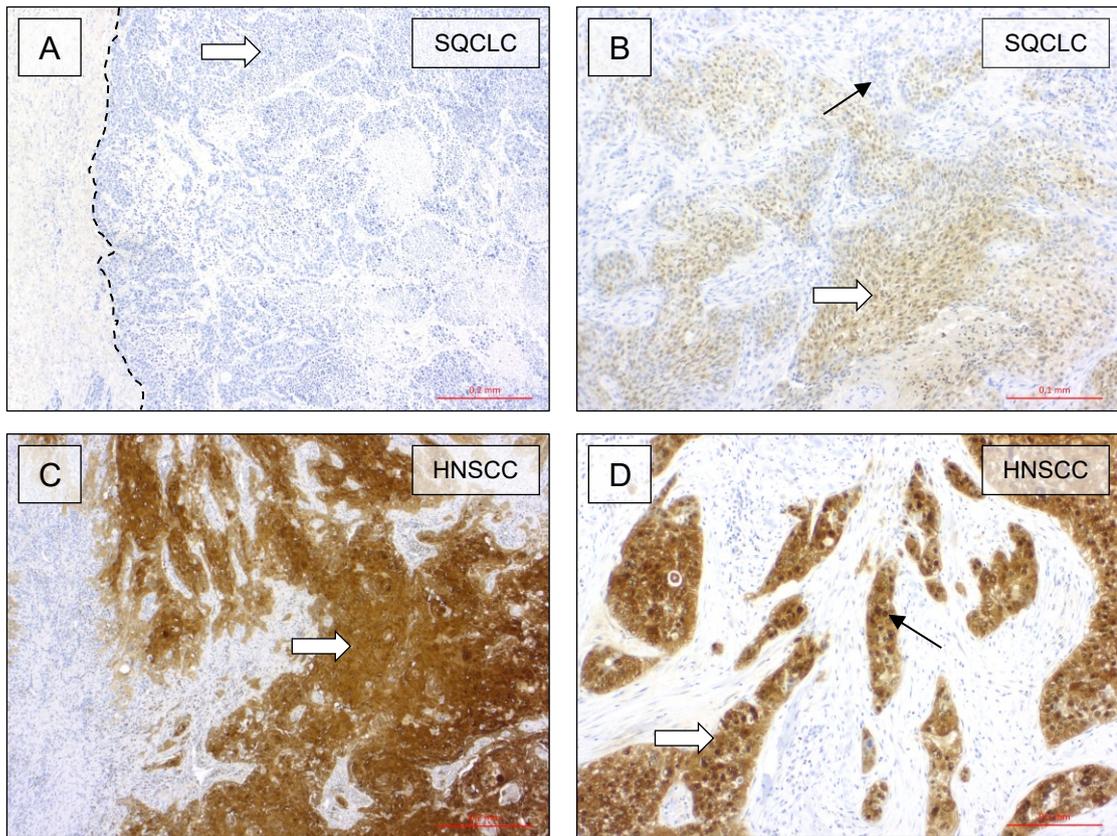


Abbildung 14: Expression von LGALS7 in SQCLC und HNSCC. Die Tumorzellen eines SQCLC (\Rightarrow) zeigen keine immunohistochemische Reaktion auf LGALS7 (A; Vergrößerung x50). Die Tumorzellen eines SQCLC zeigen eine schwache zytoplasmatische und betont nukleäre (\Rightarrow) bzw. fehlende Expression (\rightarrow) von LGALS7 (B; Vergrößerung x50). Die Tumorzellen eines HNSCC (\Rightarrow) zeigen eine starke zytoplasmatische Expression von LGALS7 (C; Vergrößerung x50). Die Tumorzellen eines HNSCC weisen eine starke zytoplasmatische (\Rightarrow) sowie nukleäre Expression (\rightarrow) von LGALS7 auf (D; Vergrößerung x100). Boxplot zur LGALS7-Expression in den SQCLC und HNSCC (E; die horizontalen Linien innerhalb der Boxen repräsentieren die medianen IRS-Werte, die oberen und unteren Grenzen der Boxen entsprechen den 25%- und 75%-Quartilen; \circ = Ausreißer; *** $p < 0,001$).

3.3.4.1 Einfluss der tumorpathologischen Parameter auf die Expression von LGALS7

In der Untersuchung auf statistische Zusammenhänge zwischen der Expression von LGALS7 und den tumorpathologischen Parametern mittels MWU-Tests, ergab sich im Kollektiv der SQCLC eine signifikant stärkere Expression in den mäßig differenzierten im Vergleich zu den schlecht differenzierten Karzinomen ($p = 0,005$) (Abb. 15A). Keine signifikanten Ergebnisse oder korrelative Tendenzen ließen sich für das Tumorstadium ($p = 0,386$), Lymphknotenstadium ($p = 0,291$) oder die Klassifikation nach UICC ($p = 0,700$) darstellen.

Im Kollektiv der HNSCC wiesen die mäßig differenzierten G2-Karzinome ebenfalls eine signifikant stärkere Expression auf als die schlecht differenzierten G3-Karzinome ($p = 0,015$) (Abb. 15B). Zudem ließ sich eine schwache korrelative Tendenz zu höheren IRS-Werten in den UICC-Stadien I/II im Vergleich zu den Stadien III/IV nachweisen ($p = 0,105$). Keine signifikanten Ergebnisse oder korrelative Tendenzen ließen sich bezüglich des Tumorstadiums ($p = 0,343$) und des Lymphknotenstadiums ($p = 0,225$) erkennen.

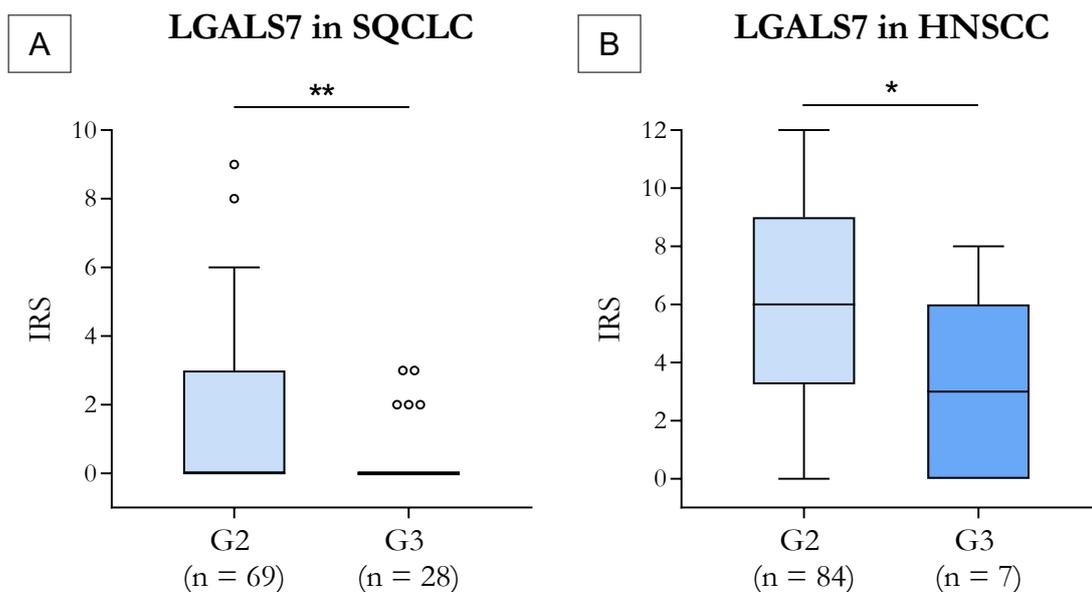


Abbildung 15: Zusammenhänge zwischen der Expression von LGALS7 und den pathologischen Parametern in SQCLC und HNSCC. Die Boxplots zeigen die Ergebnisse des MWU-Tests bezüglich signifikanter Korrelationen zwischen der LGALS7-Expression und dem Grading in den SQCLC (A) und dem Grading in den HNSCC (B). Die horizontalen Linien innerhalb der Boxen repräsentieren die medianen IRS-Werte, die oberen und unteren Grenzen der Boxen entsprechen den 25%- und 75%-Quantilen; o = Ausreißer; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

3.4 Diagnostische Gütekriterien der eingesetzten Antikörper

3.4.1 Gütekriterien der Antikörper in SQCLC und HNSCC

Anhand von ROC-Analysen wurden die jeweiligen Sensitivitäten, Spezifitäten sowie AUC-Werte der eingesetzten Antikörper in den SQCLC und HNSCC berechnet und grafisch dargestellt. Anti-LGALS7 erwies sich mit einem AUC-Wert von 0,802, einer Sensitivität von 94,5% und einer Spezifität von 66,0% als effektivster Marker zur Differenzierung der beiden Entitäten (Abb. 16D). Anti-CAV1 wies einen AUC-Wert von 0,781 sowie eine Sensitivität von 89,9% und eine Spezifität von 66,3% auf (Abb. 16A). Es folgten Anti-LGALS1 (AUC: 0,638; Sensitivität: 92,1%; Spezifität: 35,4%) (Abb. 16C) und Anti-CAV2 (AUC: 0,613; Sensitivität: 96,8%; Spezifität: 25,8%) (Abb. 16B).

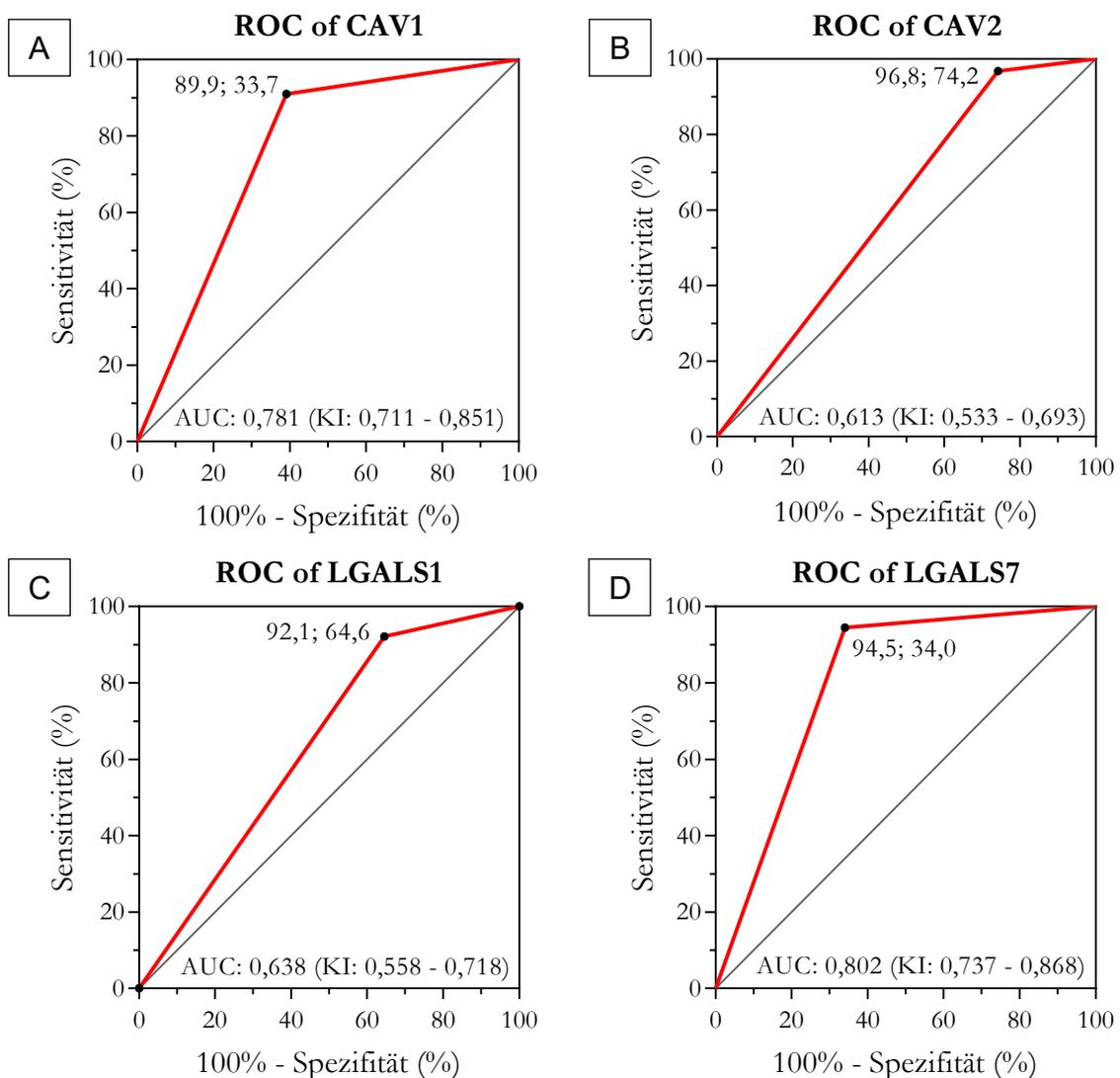


Abbildung 16: Receiver operating curves (ROC) der Marker-Kandidaten. Die ROC-Kurven (A-D) zeigen die jeweiligen Sensitivitäts- sowie 100%-Spezifitätsraten (= falsch Positivraten) der Marker-Kandidaten CAV1(A), CAV2 (B), LGALS1 (C), und LGALS7 (D) in den HNSCC und SQCLC in Prozentangaben. Abkürzungen: AUC = area under the curve, KI = 95%-Konfidenzintervall.

3.4.2 Kombinierte Gütekriterien von CAV1 und LGALS7 in SQCLC und HNSCC

Im Folgenden wurden die Sensitivitäten, Spezifitäten sowie die AUC-Werte der am vielversprechendsten Marker-Kandidaten CAV1 und LGALS7, im Sinne eines Antikörper-Panels, in 78 HNSCC und 91 SQCLC berechnet und anhand von ROC-Kurven dargestellt (Tab. 15 und Abb. 17A+B).

Tabelle 15: Positiv- und Negativstatus der HNSCC und SQCLC bei kombinierter CAV1- und LGALS7-Expression

HNSCC (n = 78)	LGALS7		SQCLC (n = 91)	LGALS7	
	positiv	negativ		positiv	negativ
CAV1 positiv	68 (87,2%)	2 (2,6%)	CAV1 positiv	11 (12,1%)	20 (22,0%)
CAV1 negativ	7 (8,9%)	1 (1,3%)	CAV1 negativ	17 (18,7%)	43 (47,3%)

Kreuztabellen mit der Anzahl der positiven und negativen Immunhistochemie in den HNSCC und SQCLC bei Kombination von CAV1 und LGALS7. Die für die Ermittlung der Sensitivitäten und Spezifitäten relevanten Prozentsätze sind fett gedruckt.

Unter der Voraussetzung, dass in den HNSCC lediglich einer der beiden Antikörper positiv sein müsste damit das Antikörper-Panel als positiv gilt, ergab sich eine Sensitivität von 98,7% (100%-1,3%) für die Erkennung der korrekt positiven HNSCC-Fälle. Die Spezifität bezüglich der Erkennung richtig negativer Fälle in den SQCLC lag bei 47,3%. Der AUC-Wert für diese Kombination lag bei 0,730 (Abb. 17A).

Für den Fall, dass beide Antikörper in den HNSCC eine Reaktion zeigen müssten damit das Panel als positiv gilt, resultierte eine Sensitivität von 87,2% für die Erkennung der korrekt positiven HNSCC-Fälle und eine Spezifität von 87,9% (100%-12,1% in SQCLC) in Bezug auf die Erkennung der richtig negativen SQCLC-Fälle. Der AUC-Wert für diese Voraussetzung betrug 0,876 (Abb. 17B).

Bezüglich der Klassifikationsgenauigkeit ergaben sich im McNemar-Test keine signifikanten Unterschiede zwischen CAV1 und LGALS7 in den HNSCC ($p=0,182$) oder SQCLC ($p=0,742$).

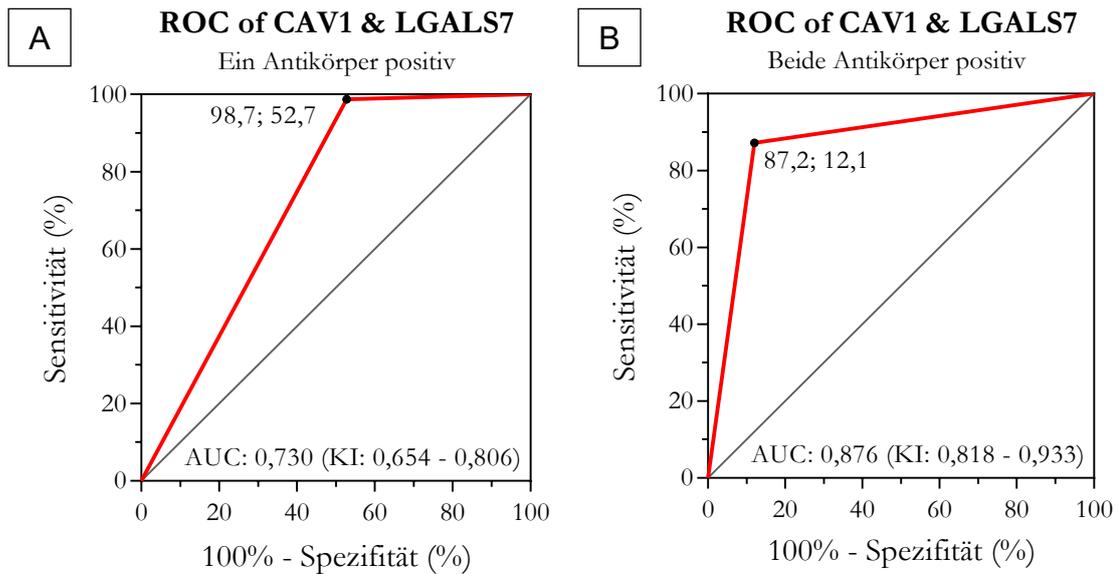


Abbildung 17: Receiver operating curves (ROC) der Marker-Kombination aus CAV1 und LGALS7. Die ROC-Kurven (A+B) zeigen die jeweiligen Sensitivitäts- sowie 100%-Spezifitätsraten (= falsch Positivrate) der Marker-Kombination in den HNSCC und SQCLC für die Voraussetzung, dass ein Antikörper positiv (A) und für den Fall, dass beide Antikörper positiv (B) sein müssten, damit das Antikörper-Panel als positiv bewertet wird. Abkürzungen: AUC = Area under the curve, KI = 95%-Konfidenzintervall.

3.5 Immunhistochemische Untersuchung von CAV1 und LGALS7 in Lungentumoren unklarer Herkunft nach HNSCC

Auf Grundlage der Ergebnisse in 3.4.2 wurde die Expression des Antikörper-Panels aus CAV1 und LGALS7 in einem kleinen Probekollektiv, bestehend aus zwölf plattenepithelialen Lungentumoren (TU-01 bis TU-12) unklarer Herkunft nach primärem HNSCC (Kohorte III), untersucht. Einer der Lungentumoren (TU-04) war einem primären HNSCC der Kohorte II zugeordnet. Die übrigen elf Lungentumoren der Kohorte III standen in keiner Beziehung zur Kohorte II. Neun der zwölf Tumoren waren zuvor klinisch als met-HNSCC und drei Tumoren als unsicher bezüglich ihrer Herkunft klassifiziert worden. Anhand der kombinierten immunhistochemischen Reaktion von CAV1 und LGALS7 erfolgte eine immunhistochemische Klassifizierung der Lungentumoren als metHNSCC, SQCLC oder unsicher. Hierbei wurde vorausgesetzt, dass beide Antikörper eine positive Reaktion ($IRS \geq 2$) zeigen müssten, um den Tumor immunhistochemisch als metHNSCC klassifizieren zu können. Eine negative Reaktion ($IRS < 2$) beider Antikörper führte zur immunhistochemischen Klassifizierung des Tumors als ein vom HNSCC unabhängiges primäres SQCLC. Bei positiver Reaktion nur eines Antikörpers des Panels wurde der Tumor als unsicher bezüglich seiner Herkunft definiert.

Eine Übersicht der erhobenen klinischen und tumorpathologischen Daten, die Ergebnisse der Immunhistochemie sowie die daraus resultierende immunhistochemische Klassifikation der zwölf Tumoren präsentiert die Tabelle 16 am Ende dieses Kapitels.

3.5.1 Kollektiv der Lungentumoren nach HNSCC

Das Kollektiv der zwölf Lungentumoren unbekannter Herkunft nach HNSCC (TU-1 bis TU-12), welches als Kohorte III im Studiendesign bezeichnet wird, setzte sich aus elf Männern und einer Frau mit einem Durchschnittsalter von $59,8 \pm 16,2$ Jahren (Altersspanne: 23 – 76 Jahre) bei Diagnosestellung zusammen. In zehn Fällen lagen solitäre und in zwei Fällen multiple Lungenherde vor. Die Auswertung der im Vorfeld der Lungentumoren aufgetretenen HNSCC ergab, dass fünf Karzinome dem Larynx, vier dem Pharynx und drei der Mundhöhle entstammten. Hiervon waren zwei Larynx- und ein Mundhöhlenkarzinom lokal rezidierte Tumoren. Jeweils zwei HNSCC sind als pT1- bzw. als pT2-Tumoren klassifiziert worden. Bei den restlichen Tumoren fanden sich hierzu keine Angaben. Vier Patienten wiesen im Rahmen des primären HNSCC einen negativen Lymphknotenstatus (pN0) und sieben Patienten einen Lymphknotenbefall (pN1/pN2) auf. Bei einem Patienten war der Lymphknotenstatus nicht bekannt. Ein mäßig differenziertes primäres HNSCC-Tumorgeewebe (G2) lag in neun Fällen, ein schlecht differenziertes (G3) in einem Fall vor.

3.5.2 Expression von CAV1 und LGALS7 in Lungentumoren nach HNSCC

In der immunhistochemischen Untersuchung wiesen zehn der zwölf Lungentumoren unbekannter Herkunft nach HNSCC eine Expression von CAV1 auf. Eine immunhistochemische Reaktion auf LGALS7 war in sieben der zwölf Präparate nachweisbar.

In sieben der zwölf Präparate wurde eine Expression beider Marker beobachtet und diese immunhistochemisch als metHNSCC klassifiziert. Die Abbildungen 18A und 18B zeigen exemplarisch einen solchen Tumor. Zwei Präparate (TU-04 und TU-06) wiesen hingegen keine Reaktion auf beide Marker auf und wurden daher immunhistochemisch als SQCLC definiert (Abb. 18C+D). Das dem TU-4 vorangegangene primäre HNSCC der Kohorte II zeigte, entgegen TU-4, eine mäßig starke Expression beider Marker. In drei Fällen (TU-2, TU-5, TU-10) lag eine positive Immunhistochemie für CAV1, bei gleichzeitig fehlender Reaktion auf LGALS7, vor (Abb. 18E+F). In diesen Fällen wurde die Herkunft der Lungentumoren als unsicher klassifiziert (Tab. 16).

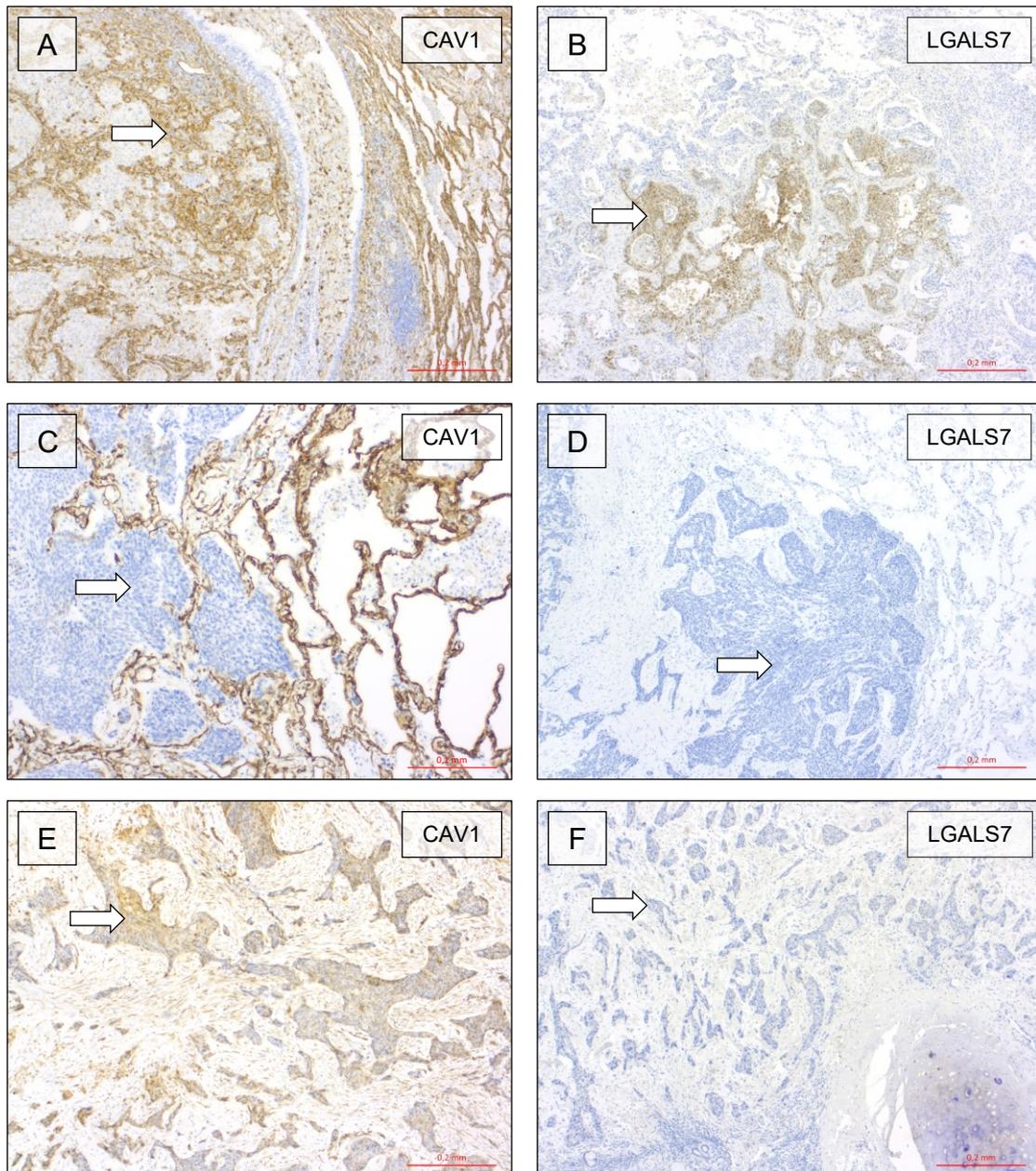


Abbildung 18: Expression von CAV1 und LGALS7 in Lungentumoren nach HNSCC. Expression von CAV1 (A) und LGALS7 (B) in Tumorzellen (\Rightarrow) eines immunhistochemisch als metHNSCC klassifizierten Lungentumors nach HNSCC (A+B; Vergrößerung x50). Fehlende Expression von CAV1 (C) und LGALS7 (D) in Tumorzellen (\Rightarrow) eines immunhistochemisch als SQCLC klassifizierten Lungentumor nach HNSCC (C; Vergrößerung x100 und D; Vergrößerung x50). Die Tumorzellen (\Rightarrow) zeigen eine schwache Expression von CAV1 (E) bei fehlender Expression von LGALS7 (F) in einem immunhistochemisch als unsicher klassifizierten Lungentumors nach HNSCC (E+F; Vergrößerung x50).

Tabelle 16: Fälle der Lungentumoren unklarer Herkunft nach HNSCC mit Ergebnissen der Immunhistochemie

Fall	Alter	Geschlecht	Lokalisation	Rezidiv	Lungenherde (n)	Zeitintervall (in Jahren)	pT	pN	Grading	CAV1	LGALS7	Klinische Klassifikation	Immunhistochemische Klassifikation
TU-01	61	m	Larynx	ja	3	< 3	1	0	G2	positiv	positiv	metHNSCC	metHNSCC
TU-02	76	m	Larynx	ja	2	≥ 3	n. b.	n. b.	G2	positiv	negativ	metHNSCC	unsicher
TU-03	62	m	Mundhöhle	ja	1	< 3	1	0	G2	positiv	positiv	unsicher	metHNSCC
TU-04	73	m	Mundhöhle	nein	1	< 3	2	0	G2	negativ	negativ	metHNSCC	SQCLC
TU-05	71	m	Larynx	nein	1	< 3	n. b.	1	G2	positiv	negativ	metHNSCC	unsicher
TU-06	66	m	Pharynx	nein	1	< 3	n. b.	2	G2	negativ	negativ	unsicher	SQCLC
TU-07	79	m	Pharynx	nein	1	< 3	n. b.	1	G2	positiv	positiv	metHNSCC	metHNSCC
TU-08	57	m	Larynx	nein	1	≥ 3	n. b.	2	G2	positiv	positiv	metHNSCC	metHNSCC
TU-09	49	m	Larynx	nein	1	< 3	n. b.	0	G2	positiv	positiv	metHNSCC	metHNSCC
TU-10	23	w	Mundhöhle	nein	1	< 3	n. b.	2	G2	positiv	negativ	metHNSCC	unsicher
TU-11	39	m	Pharynx	nein	1	< 3	2	1	G2	positiv	positiv	metHNSCC	metHNSCC
TU-12	62	m	Pharynx	nein	1	< 3	n. b.	2	G3	positiv	positiv	unsicher	metHNSCC

Die Tabelle zeigt die erhobenen Daten der zwölf Lungentumoren (TU-01 bis TU-12) unbekannter Herkunft und die der vorbekannten HNSCC (Lokalisation, Rezidiv, pT, pN, Grading) sowie die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung in den Lungentumoren. Die immunhistochemisch negativen Ergebnisse sowie die Klassifikation als SQCLC sind in türkis, die positiven Ergebnisse sowie die Klassifikation als metHNSCC in violett gekennzeichnet. Abkürzungen: m = männlich, w = weiblich, n. b. = nicht bekannt.

4 Diskussion

Aufgrund einer gemeinsamen Ätiologie entwickeln Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des HNO-Traktes (HNSCC) häufig ein zusätzliches Plattenepithelkarzinom der Lunge (SQCLC). Die Unterscheidung zwischen einem pulmonalen plattenepithelialen Zweitkarzinom und einer Metastase bei vorbekanntem HNSCC ist von fundamentaler Bedeutung in Bezug auf die Prognose des Patienten und das entsprechend gewählte Therapieregime. Beide Entitäten weisen eine gemeinsame Morphologie sowie sich überschneidende Muster von Genmutationen und molekularpathologischen Veränderungen auf (Bohnenberger et al. 2018). Aufgrund eines Mangels an zuverlässigen Biomarkern ist die Unterscheidung beider Entitäten in vielen Fällen eine große diagnostische Herausforderung und basiert aktuell vor allem auf radiologischen und klinischen Kriterien (Jones et al. 1995; Geurts et al. 2005; Talbot et al. 2005; Vachani et al. 2007). Im Hinblick auf diese diagnostische Problematik war das Ziel dieser Arbeit, immunhistochemisch einsetzbare Marker für die pathologische Routinediagnostik zu etablieren und damit die Differenzialdiagnose zwischen den Entitäten zu erleichtern.

Zur Identifizierung von signifikant unterschiedlich exprimierten Proteinen in HNSCC und SQCLC wurden in vorliegender Dissertation die Daten einer SILAC-basierte massenspektrometrische Untersuchung einer HNSCC-Zelllinie (PCI-13.1) und einer SQCLC-Zelllinie (H2170) ausgewertet (Abschnitt 3.2). Das SILAC-Verfahren konnte sich seit dessen Einführung durch Ong et al. im Jahre 2002 als herausragende Methode für quantitative Untersuchungen in proteomischen Fragestellungen sowie speziell für die Identifizierung neuer Biomarker etablieren (Ong et al. 2002; Ong und Mann 2006; Megger et al. 2013; Bremmer et al. 2019). Als große Vorteile des Verfahrens gelten die unkomplizierte Durchführung, die fehlende Interferenz in metabolische Zellprozesse sowie die quantitative Genauigkeit und Reproduzierbarkeit (Ong und Mann 2006).

Die Auswertung der SILAC-basierten Massenspektrometrie ergab, dass 397 Proteine in signifikant unterschiedlicher Menge in den beiden Tumorzelllinien vorlagen. Beeinflusst durch deren immunhistochemisches Expressionsprofil in primären SQCLC- und HNSCC-Präparaten im *Human Protein Atlas* (HPA) wurden zunächst sieben der signifikant unterschiedlich exprimierten Proteine des SILAC-Assays für eine erste immunhistochemische Untersuchung, bestehend aus jeweils sechs SQCLC- und HNSCC-Präparaten (Kohorte I), ausgewählt (Tab. 10). Aus dieser ersten immunhistochemischen Verifikationsphase wurden, in Zusammenschau mit den Ergebnissen aus dem HPA, die vier signifikant in der HNSCC-Zelllinie stärker exprimierten Proteine CAV1, CAV2, LGALS1 und LGALS7 in die zweite

immunohistochemische Verifikationsphase, bestehend aus 98 SQCLC und 96 HNSCC (Kohorte II), transferiert. Hierbei ist anzumerken, dass die Schnitte der Kohorte I in die Kohorte II inkludiert wurden.

Die Ursachen für Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen einer Proteomanalyse und denen einer immunohistochemischen Untersuchung, die wie in vorliegendem Fall zur Exklusion der Proteine CA2, KRT19, UGDH geführt haben, können vielfältiger Natur sein. So muss zum einen bedacht werden, dass in vorliegender Arbeit lediglich zwei Tumorzelllinien bezüglich ihrer Proteinausstattung miteinander verglichen und damit eventuell nur selektive Ausschnitte oder biologische Varianzen der Proteome der entsprechenden Tumorentitäten dargestellt wurden (Gillet et al. 2013; Goodspeed et al. 2016). Eine andere Ursache könnte eventuell in der Methodologie selbst liegen. Während die SILAC-basierte Massenspektrometrie eine exakte Proteinquantifizierung erlaubt, ist die Immunhistochemie eine semiquantitative Methode, bei welcher es häufig schwierig sein kann, subtile quantitative Variationen abzuschätzen – insbesondere dann – wenn die Proteine in großen Mengen vorliegen (Ong et al. 2003; Walker 2006; Padden et al. 2016).

In Bezug auf Vergleiche von immunohistochemischen Ergebnissen unterschiedlicher Studien ist zu berücksichtigen, dass beispielsweise verschiedene Methoden der Fixierung oder Antigendemaskierung, aber auch der Einsatz unterschiedlicher Antikörper mit variabler Bindungsspezifität, zu voneinander abweichenden Resultaten führen können (Walker 2006; de Matos et al. 2010; Lang 2013). Ein weiterer Aspekt hinsichtlich der häufig eingeschränkten Vergleichbarkeit von immunohistochemischen Studien liegt zudem in der vom jeweiligen Untersucher abhängigen und damit subjektiven Interpretation der immunohistochemischen Reaktion. So können zum Beispiel die Ergebnisse der Begutachtung zwischen verschiedenen Untersuchern variieren oder sich sogar bei demselben Untersucher zu unterschiedlichen Zeitpunkten voneinander unterscheiden (de Matos et al. 2010). Darüber hinaus werden häufig verschiedenartige Scores zur Bewertung der immunohistochemischen Reaktion verwendet (Walker 2006). In vorliegender Arbeit erfolgte die Auswertung der Immunhistochemie gemeinsam mit einem Facharzt für Pathologie auf der Basis eines abgewandelten immunreaktiven Scores (IRS) (Abschnitt 2.6). Dieser Score erlaubte hierbei die Verteilung und Intensität der Färbereaktion genau zu berücksichtigen. Dies war in vorliegender Arbeit sehr vorteilhaft, da eine große Anzahl von Präparaten inhomogene Färbereaktionen aufwiesen. Bei Variationen der Färbemuster und -intensitäten wurde, analog zur Bewertung von Remmele und Stegner, die dominierende Färbeintensität in die Berechnung einbezogen (Remmele und Stegner 1987). Anfärbungen nekrotischer Tumorareale wurden als unspezifisch betrachtet und nicht

mit in die Bewertung aufgenommen. Hierbei ist anzumerken, dass die Ergebnisse der Auswertung anhand eines immunreaktiven Scores als semiquantitativ zu betrachten sind. Wären zum Beispiel 10% der Tumorzellen in einem Präparat schwach gefärbt (IRS = 1), so würde das Ergebnis, nach der Einteilung in vorliegender Dissertation, als negatives Färbeergebnis bewertet. Wären hingegen 11% der Tumorzellen schwach gefärbt (IRS = 2), läge eine positive Färbereaktion vor. Eine exakte Auszählung von Tumorzellen, insbesondere bei inhomogen gefärbten Präparaten, ist jedoch im Rahmen von Arbeiten wie dieser kaum zu realisieren.

Die statistische Auswertung bezüglich signifikanter Expressionsunterschiede zwischen den Entitäten wurde mittels des nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Tests anhand der IRS-Werte durchgeführt. In der Routinediagnostik ist die reine An- oder Abwesenheit eines Markers in einem Gewebe jedoch häufig von größerem Interesse als dessen jeweilige Expressionsstärke. Hierbei ist zudem von Interesse wie gut sich ein Marker zur Differenzierung von zwei oder mehr Entitäten eignet (de Matos et al. 2010). Durch eine Gegenüberstellung der positiven und negativen Ergebnisse in den SQCLC und HNSCC wurden daher, zusätzlich zum Mann-Whitney-U-Test, die statistischen Gütekriterien Sensitivität und Spezifität sowie der AUC-Wert für jeden Marker-Kandidaten und für ein Antikörper-Panel, bestehend aus CAV1 und LGALS7 berechnet (Abschnitt 3.4).

4.1 CAV1 in SQCLC und HNSCC

Caveolin-1 (CAV1) gehört zu einer Gruppe von drei Caveolinen (CAV1, CAV2, CAV3) und ist als 22 kDa großes integrales Membranprotein an der Ausbildung der Caveolae, 50 – 100 nm großen flaschenförmige Plasmamembraneinstülpungen, beteiligt. CAV1 wird durch das entsprechende Gen auf Chromosom 7q31.2 kodiert und in vielen Zellen und Geweben exprimiert, wobei die höchsten Expressionslevels in Adipozyten, Endothelzellen, Fibroblasten und Pneumozyten beobachtet werden (Williams und Lisanti 2004; 2005). Über seine *caveolin scaffolding domain* (CSD) vernetzt CAV1 zytoskelettassoziierte Proteine, Zelladhäsionsmoleküle sowie verschiedene Signalmoleküle miteinander und greift damit in multiple malignomassoziierte Prozesse, einschließlich der Signaltransduktion, Zelltransformation und -migration sowie Metastasierung, ein (Liu et al. 2002; Razani et al. 2002; Williams und Lisanti 2005; Goetz et al. 2008). Abhängig von der jeweiligen Tumorentität werden aktuell sowohl tumorsuppressive als auch onkogene Funktionen diskutiert. Dies spiegelt sich auch in einem voneinander divergierenden Expressionsverhalten von CAV1 in verschiedenen Tumorentitäten wider (Goetz et al. 2008). So wurden zum Beispiel in Plattenepithelkarzinomen des

HNO-Traktes, des Ösophagus und der Zervix uteri sowie in Prostatakarzinomen hohe und demgegenüber in Lungen-, Pankreas-, Ovarial- und Mammakarzinomen niedrige Expressionswerte beobachtet (Wiechen et al. 2001; Kato et al. 2002; Hung et al. 2003; Yoo et al. 2003; Zhao et al. 2016; Fu et al. 2017).

In der Auswertung unserer SILAC-basierten massenspektrometrischen Untersuchung lag das CAV1-Protein in hochsignifikant größerer Menge in der PCI-13.1-Zelllinie (HNSCC) als in der H2170-Zelllinie (SQCLC) vor (Tab. 9). Dieses Ergebnis konnte durch die immunhistochemische Untersuchung verifiziert werden, in welcher CAV1 ebenfalls hochsignifikant stärker in den HNSCC- als in den SQCLC-Präparaten der Kohorte II exprimiert war (Abb. 8E). In großer Übereinstimmung hierzu zeigte sich in einer 2007 publizierten Genexpressionsstudie von Vachani et al. (2007), in welcher 18 HNSCC- und 10 SQCLC-Präparate miteinander verglichen wurden, eine signifikant stärkere Expression von *CAV1* in den HNSCC und gehörte hierbei zu den insgesamt 100 am stärksten differenziell exprimierten Genen (Vachani et al. 2007).

In vorliegender Arbeit stellten sich 89,9% (80/89) der HNSCC-Präparate der Kohorte II immunhistochemisch positiv für CAV1 dar. Insgesamt wiesen 80,9% der Fälle eine mäßige bzw. starke Expression auf, so dass der mediane IRS aller Schnitte bei sechs zu liegen kam und damit eine mäßig starke Expression kennzeichnete. Ein ähnliches Ergebnis fand sich in einer Arbeit von Jung et al. (2015) wieder, in welcher insgesamt 95,0% der 20 untersuchten HNSCC als positiv und 90,0% als mäßig oder stark positiv für CAV1 bewertet wurden (Jung et al. 2015). In weiteren Studien, in welchen die Expression von CAV1 mit korrespondierenden Normalgeweben verglichen wurde, zeigten sich Überexpressionsraten in 52,6%, 71,2% und 73,8% der jeweiligen Fälle (Xue et al. 2010; Masuelli et al. 2012; Zhao et al. 2016). Da in den zitierten Studien unterschiedliche Scoringsysteme für die Auswertung der Immunhistochemie verwendet wurden, war ein direkter Vergleich mit vorliegenden Ergebnissen eingeschränkt. Der deutliche Trend zu hohen Expressionsraten von CAV1 in den HNSCC ist jedoch in den genannten Studien durchweg erkennbar. Das in vorliegendem Kollektiv überwiegend beobachtete periphere Expressionsmuster in den Tumorinseln fand sich übereinstimmend in publizierten Arbeiten wieder und deutet auf eine hohe Aktivität des Proteins in den Invasionsbereichen der Tumoren hin (Zhang et al. 2008; Xue et al. 2010; Masuelli et al. 2012; Zhao et al. 2016). Die in diversen Studien beobachtete signifikant stärkere Expression in Tumoren mit Lymphknotenmetastasen (Hung et al. 2003; Xue et al. 2010; Masuelli et al. 2012) konnte auch in vorliegender Arbeit festgestellt werden (Abb. 9B). Interessanterweise wurde in zwei weiteren Studien signifikant schwächere Expressionswerte in den Geweben von Lymphknotenmetastasen im Vergleich zu den korrespondierenden primären HNSCC

nachgewiesen (Hung et al. 2003; Zhang et al. 2008). Zhang et al. (2008) postulierten hierzu, dass CAV1 in den HNSCC eine inhibitorische Funktion im Rahmen der Tumorgenese und der Bildung von Lungenmetastasen einnehme, in dem es die Integrin beta-1 (ITGB)- und Src-vermittelten Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen reguliere. Demgegenüber stellten Nohata et al. (2011) die Hypothese auf, dass CAV1 in den HNSCC als Onkogen fungiere, in dem es die Migration und Invasion von Tumorzellen vermittele und gegensätzliche Expressionsraten zur Mikro-RNA miR-133a, der tumorsuppressive Funktionen zugeschrieben werden, zeige (Nohata et al. 2011). Das von Hung et al. (2003) beobachtete biphasische Expressionsmuster führte zu der Theorie, dass CAV1 in den HNSCC eine duale Rolle im Rahmen der Tumorprogression einzunehmen scheint. Liscovitch et al. (2005) unterstützten diese Theorie, in dem sie postulierten, dass CAV1 in den HNSCC sowohl ein wachstumshemmendes Protein mit tumorsuppressiver als auch ein das Tumorzellüberleben stimulierendes Protein mit onkogener Wirkung sei (Liscovitch et al. 2005).

In der immunhistochemischen Untersuchung von CAV1 in den SQCLC der Kohorte II wiesen 61 der 92 Präparate (66,3%) keine immunhistochemische Reaktion auf, so dass der mediane IRS aller SQCLC bei null zu liegen kam. In vergleichbaren Studien waren Negativraten von 48,6%, 68,3% und 70,4% beobachtet worden (Yoo et al. 2003; Wikman et al. 2004; Cassoni et al. 2009). Diese voneinander abweichenden Raten können eventuell auf die Nutzung von *tissue micro arrays* (TMA) in den drei genannten Studien zurückgeführt werden. Hierbei kann es insbesondere bei inhomogen gefärbten Präparaten vorkommen, dass die selektiven Ausschnitte durch TMAs nicht das Gesamtbild des Tumors repräsentieren (Goethals et al. 2006). Zudem wurden unterschiedliche CAV1-Antikörper und voneinander differierende Scoring-Systeme für die Auswertung der immunhistochemischen Reaktionen verwendet, so dass ein Vergleich mit vorliegenden Ergebnissen nur eingeschränkt möglich war. Deutlich wird jedoch die, im Vergleich zu den HNSCC, ausgeprägt schwächere Expression von CAV1 in den SQCLC. Bezüglich der Zusammenhänge zwischen der CAV1-Expression und den tumorpathologischen Parameter zeigte sich in der Studie von Yoo et al. (2003), vergleichbar zu vorliegenden Ergebnissen, eine signifikant positive Korrelation zur Stadieneinteilung nach UICC (Abb. 9A). Auch die von Yoo et al. (2003) und Kato et al. (2004) beobachtete signifikant positive Korrelation zum Tumorstadium ließ sich in als deutlicher Trend in unserem Kollektiv feststellen (Yoo et al. 2003; Kato et al. 2004).

Die eigenen Resultate sowie die Ergebnisse aus den zitierten Studien legen nahe, dass CAV1 in fortgeschrittenen Tumoren allgemein stärker exprimiert zu sein scheint. Da sich im HNSCC-Kollektiv, im Vergleich zum SQCLC-Kollektiv, deutlich mehr T3/T4-Tumoren

(34,4% versus 16,3%) sowie gering mehr pN1/pN2 (46,9% versus 39,8%) Tumoren befanden, stellte sich die Frage, ob diese Tatsache einen Einfluss auf die allgemeinen Expressionsraten und damit die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung hatte. Eine Verzerrung der Resultate konnte jedoch durch eine statistische Analyse der Expression in gleichgroßen und bezüglich der tumorpathologischen Daten gleichartig gestalteten HNSCC- und SQCLC-Kollektiven ausgeschlossen werden.

Betrachtet man abschließend die statistischen Gütekriterien für Anti-CAV1, so lässt sich postulieren, dass der eingesetzte Antikörper ein relativ vielversprechender Marker bezüglich einer Differenzierung von SQCLC und HNSCC darstellt. In der Kohorte II präsentiert Anti-CAV1 eine sehr gute Sensitivität von 89,9% bezüglich einer korrekten Erkennung eines HNSCC sowie eine akzeptable Spezifität von 66,3%. Der AUC-Wert deutet mit 0,781 zudem auf eine gute Unterscheidungsfähigkeit von Anti-CAV1 hin (Abb. 16A).

4.2 CAV2 in SQCLC und HNSCC

Caveolin-2 (CAV2) ist ein 20 kDa großes integrales Membranprotein, welches gemeinsam mit CAV1 stabile heterooligomere Komplexe innerhalb der Caveolae bildet und dessen Gen in der gleichen Chromosomenregion (6A2/7q31.2) wie das von CAV1 liegt. Unter physiologischen Bedingungen wird es in den gleichen Zellen und Geweben wie CAV1 exprimiert und benötigt dieses für einen gerichteten Transport zur Zellmembran (Scherer et al. 1997; Engelman et al. 1998; Parolini et al. 1999; Williams und Lisanti 2004). Während für CAV1 multiple Funktionen im Rahmen der Signaltransduktion nachgewiesen wurden, gibt es für CAV2 hierfür bis dato keine eindeutigen Hinweise (Williams und Lisanti 2004). Je nach Tumorentität weist CAV2, wie auch CAV1, ein unterschiedliches Expressionsverhalten auf. So wurden zum Beispiel in Urothel- und Nierenzellkarzinomen sowie kastrationsresistenten Prostatakarzinomen hohe und demgegenüber in Mamma-, Lungen- sowie follikulären Schilddrüsenkarzinomen niedrige Expressionswerte beobachtet (Aldred et al. 2003; Fong et al. 2003; Sagara et al. 2004; Wikman et al. 2004; Elsheikh et al. 2008; Sugie et al. 2015; Liu et al. 2018).

Sowohl in der Auswertung der proteombasierten massenspektrometrischen Untersuchung (Tab. 9) als auch in der folgenden immunhistochemischen Untersuchung der Kohorte II (Abb. 10E) war eine signifikant stärkere Expression von CAV2 in den HNSCC im Vergleich zu den SQCLC nachweisbar. In Übereinstimmung zu unseren Beobachtungen konnte in der Genexpressionsstudie von Vachani et al. (2007) eine ebenfalls signifikant stärkere Expression von *CAV2* in den HNSCC- als in den SQCLC-Geweben nachgewiesen werden.

In der quantitativen Auswertung der Expression von CAV2 in unserem HNSCC-Kollektiv der Kohorte II präsentierten 90 der 93 Präparate (96,8%) eine immunhistochemische Reaktion. Hierbei wiesen 87,1% der Fälle eine mäßige bis starke Expression auf, so dass der mediane IRS bei sechs zu liegen kam und damit eine mäßig starke Expression kennzeichnete. Nach bisherigem Kenntnisstand liegen keine publizierten Studien zu immunhistochemischen Untersuchungen von CAV2 in HNSCC-Geweben vor, so dass entsprechende Vergleiche nicht durchgeführt werden konnten. Bei vergleichender Betrachtung der Expression von CAV2 mit der von CAV1 in den HNSCC fiel jedoch auf, dass sich neben der Gesamtanzahl der für positiv befundenen Tumoren und einer ähnlichen Verteilung der Präparate auf die unterschiedlichen Expressionsstufen auch das Expressionsmuster, im Sinne einer betont peripheren Anfärbung der Tumorzellnester, glich. Analog zu CAV1 wies CAV2 zudem eine stärkere Expression in den Lymphknotenmetastasen positiven Tumoren auf, die jedoch für CAV2 nicht signifikant war. Zusätzlich zeigte sich für CAV2 eine signifikant stärkere Expression in den mäßig differenzierten, im Vergleich zu den schlecht differenzierten, Tumoren (Abb. 11B). Letzteres Ergebnis ist allerdings durch die geringe Anzahl von lediglich acht G3-Tumoren, im Vergleich zu 85 G2-Tumoren, mit Vorsicht zu interpretieren. Aus diesen Beobachtungen lässt sich schlussfolgern, dass CAV1 und CAV2 in den HNSCC einer gewissen Ko-regulation unterliegen.

In der immunhistochemischen Untersuchung in den SQCLC der Kohorte II wies CAV2 in 72 der 97 Fälle (74,2%) eine immunhistochemische Reaktion auf, die jedoch mit einem medianen IRS von drei deutlich schwächer ausgeprägt war als in den HNSCC. Zur immunhistochemischen Expression von CAV2 in SQCLC fand sich lediglich eine vergleichbare Studie von Wikman et al. aus dem Jahr 2004, in welcher rund 79,2% der 72 untersuchten Präparate eine positive Färbereaktion aufwiesen. Das in unserem HNSCC-Kollektiv beobachtete sich ähnelnde Expressionsverhalten von CAV1 und CAV2 war in den SQCLC hingegen nicht zu erkennen. So war die Anzahl der als CAV2 positiv befundenen SQCLC deutlich größer als die der für CAV1 (74,2% vs. 43,7%). Diese Beobachtung fand sich in ähnlicher Ausprägung in der Studie von Wikman et al. (2004) wieder, in welcher sich ebenfalls mehr SQCLC positiv für CAV2 als für CAV1 präsentierten (79,2% vs. 66,3%). Auch in anderen Studien ist das voneinander differierende Expressionsverhalten beider Proteine innerhalb der gleichen Gewebe- oder Tumorentität bereits beschrieben worden (Koleske et al. 1995; Scherer et al. 1997; Galbiati et al. 1998; Racine et al. 1999; Woodman et al. 2003; Capozza et al. 2012). Einen Grund hierfür könnte in der von Koleske et al. (1995) in Fibroblasten beobachtete Entkopplung der Ko-expression von CAV1 und CAV2 durch aktivierte Onkogene wie v-Abl und H-Ras liegen. Es kann jedoch auch sein, dass der von uns gewählte polyklonale

Antikörper gegen CAV2, im Vergleich zum monoklonalen Antikörper gegen CAV1, zu unerwünschten Kreuzreaktionen und damit zu der großen Anzahl an CAV2 positiven Präparaten in den SQCLC geführt hat. Analog zur Expression in den HNSCC, wies CAV2 eine signifikant stärkere Expression in den mäßig differenzierten Tumoren im Vergleich zu den schlecht differenzierten Tumoren auf (Abb. 11A).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich Anti-CAV2, trotz des hochsignifikanten Expressionsunterschiedes zwischen den SQCLC und HNSCC der Kohorte II im MWU-Test und der hervorragenden Sensitivität von 96,8% für die richtige Erkennung eines HNSCC, nicht zur Differenzierung beider Entitäten eignet. Begründet werden kann dies mit einer sehr geringen Spezifität von 25,8%, die es im Falle einer positiven immunhistochemischen Reaktion im Tumorgewebe nahezu unmöglich macht, zwischen einem SQCLC und einem HNSCC zu unterscheiden. Auch der AUC-Wert wies mit 0,613 lediglich auf eine schwache Differenzierungsfähigkeit von Anti-CAV2 hin (Abb. 16B).

4.3 LGALS1 in SQCLC und HNSCC

Galectin-1 (LGALS1) gehört zur Gruppe von 14 Galectinen, wird durch das LGALS1-Gen auf Chromosom 22q12 kodiert und kann über eine sogenannte *carbohydrate recognition domain* (CRD) eine Vielzahl von Glykolipiden und -proteinen binden (Barondes et al. 1994a; Camby et al. 2006). LGALS1 wird in zahlreichen normalen wie auch pathologisch veränderten Geweben intra- und extrazellulär exprimiert. Die höchsten Expressionswerte werden in Adipozyten, glatten Muskelzellen, Fibroblasten und lymphatischen Geweben beobachtet (Danguy et al. 2002; Camby et al. 2006). Es ist in multiple zellbiologische Prozesse, wie zum Beispiel das Zellwachstum, die Zelladhäsion und -migration, Angiogenese und Apoptose, involviert und nimmt daher vielfältige Funktionen in der Tumorentstehung und -progression ein (Barondes et al. 1994a; Ebrahim et al. 2014). Beispielsweise vermittelt die Steigerung der Tumorzellaggregation durch Interaktionen mit Glykokonjugaten der Zelloberflächen oder eine Adhäsion von Tumorzellen an die extrazelluläre Matrix (Hughes 2001; Hood und Chesh 2002; Elola et al. 2007). Des Weiteren bindet es an das onkogene H-Ras Protein und vermittelt über dessen Bindung an die Zellmembran eine maligne Zelltransformation (Paz et al. 2001; Camby et al. 2006). Gesteigerte Expressionswerte wurden bereits in Adenokarzinomen des Colons, Pankreas und Uterus sowie in Urothel- und Prostatakarzinomen, Glioblastomen und Plattenepithelkarzinomen des HNO-Traktes beobachtet (Gillenwater et al. 1996; Sanjuan et al. 1997; Shen et al. 2004; Camby et al. 2006; Saussez et al. 2008).

Nach aktuellem Kenntnisstand liegen keine publizierten Studien vor, in welchen die Expression von LGALS1 in SQCLC und HNSCC miteinander verglichen wurden. In unserer SILAC-basierten massenspektrometrischen Untersuchung war LGALS1, wie bereits CAV1 und CAV2, in einer hochsignifikant größeren Menge in der PCI-13.1-Zelllinie (HNSCC) als in der H2170-Zelllinie (SQCLC) vertreten (Tab. 9). Bestätigend hierzu präsentierte LGALS1 in der immunhistochemischen Untersuchung eine ebenfalls hochsignifikant stärkere Expression in den primären HNSCC im Vergleich zu den SQCLC (Abb. 12E).

In der quantitativen Auswertung der Expression in den HNSCC der Kohorte II wiesen 82 der 89 Fälle (92,1%) eine immunhistochemische Reaktion auf LGALS1 auf. Der Zentralwert aller HNSCC-Schnitte kam bei sechs zu liegen und kennzeichnete damit eine insgesamt mäßig starke Expression. In vergleichbaren Studien lagen die Positivraten bei 87,7% und 84,2% der untersuchten HNSCC (Le et al. 2005; Alves et al. 2011). Auch Arbeiten in denen die Expression von LGALS1 in HNSCC mit korrespondierenden Normalgeweben auf Gen- und Proteinbasis verglichen wurde, treffen übereinstimmend Aussagen über eine ausgeprägt stärkere Expression von LGALS1 in den tumorösen Geweben (Gillenwater et al. 1996; Saussez et al. 2008; Ding et al. 2009). Eine mögliche Erklärung für die überwiegend starke Expression des Proteins in den HNSCC lieferte die Studie von Le et al. aus dem Jahr 2005. In ihrer immunhistochemischen Untersuchung von 101 HNSCC wies LGALS1 eine signifikant positive Korrelation zu dem Hypoxie Marker CA IX (*carbonic anhydrase IX*) sowie eine signifikant negative Korrelation zu dem T-Zell-Marker CD3 auf. Sie entwickelten die These, dass die starke Expression von CA IX, hervorgerufen durch die vielen hypoxischen Regionen in den HNSCC, zu einer Steigerung und Produktion von LGALS1 führe, welches in Folge die Apoptose von T-Zellen fördere und eine T-Zell-Aktivierung blockiere. Dieser Umstand erlaube den Tumorzellen, unter Umgehung des Immunsystems, ungehindert überleben und proliferieren zu können (Le et al. 2005). Das von einigen Autoren festgestellte Expressionsmuster in den HNSCC, mit einer oft betont peripheren Anfärbung der Tumorstränge oder -inseln und einer häufig ausgeprägten Reaktion in den extrazellulären Matrices (Gillenwater et al. 1996; Saussez et al. 2008; Kindt et al. 2017), konnte auch in vorliegender Arbeit beobachtet werden. Die in dieser Arbeit festgestellte signifikant stärkere Expression in Tumoren mit Lymphknotenmetastasen als in denen ohne metastatische Absiedelungen (Abb. 13) wurde in Studien von Alves et al. (2011) und Li et al. (2018) ebenfalls beobachtet. Auch die von Alves et al. (2011) nachgewiesene signifikant positive Korrelation zum UICC-Stadium ließ sich als schwache Tendenz in dieser Arbeit feststellen (Alves et al. 2011; Li et al. 2018).

In der quantitativen Auswertung der immunhistochemischen Analyse von LGALS1 in den SQCLC der Kohorte II präsentierte ebenfalls die überwiegende Anzahl der Tumoren (62/96;

64,6%) eine immunhistochemische Reaktion. Diese war jedoch im Vergleich zu den HNSCC deutlich schwächer ausgeprägt, so dass der mediane IRS aller Präparate bei zwei zu liegen kam und damit eine insgesamt schwach positive Reaktion kennzeichnete. Das Tumorstroma präsentierte, wie auch in den HNSCC, eine oft starke Expression von LGALS1. Zur Expression von LGALS1 in SQCLC fand sich lediglich eine in 2016 publizierte Studie von Zhou et al., in welcher 43,8% der 73 untersuchten primären SQCLC eine immunhistochemische Reaktion aufwiesen. Dieser, im Vergleich zu vorliegendem Ergebnis, deutlich niedrigere Wert der Positivrate könnte eventuell auf die Tatsachen zurückzuführen sein, dass Zhou et al. (2016) einen anderen Antikörper sowie eine stärkere Antikörperverdünnung eingesetzt haben. In ihrer Studie stellten sie zudem eine signifikant positive Korrelation zwischen der Proteinexpression von LGALS1 und dem Tumorstadium, Lymphknotenstadium sowie der UICC-Klassifikation fest (Zhou et al. 2016). Diese Beobachtungen konnten, bis auf eine schwache Tendenz zu höheren IRS-Werten in den lymphknotenpositiven Tumoren, in vorliegender Arbeit nicht festgestellt werden.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass sich der in dieser Arbeit eingesetzte Antikörper gegen LGALS1, trotz des hochsignifikanten Expressionsunterschiedes zwischen SQCLC und HNSCC der Kohorte II im MWU-Test, nicht zur Differenzierung von HNSCC und SQCLC eignet. So weist Anti-LGALS1 mit 92,1% zwar eine hervorragende Sensitivität für die korrekte Erkennung eines HNSCC auf, die Spezifität von 35,4% ist jedoch nicht ausreichend, um im Falle einer positiven Immunhistochemie zwischen einem SQCLC und einem HNSCC unterscheiden zu können. Auch der AUC-Wert von 0,683 deutet auf eine lediglich akzeptable Differenzierungsfähigkeit von Anti-LGALS1 hin (Abb. 16C).

4.4 LGALS7 in SQCLC und HNSCC

Galectin-7 (LGALS7) ist ein 14 kDa großes Protein, welches durch das entsprechende Gen auf Chromosom 19q13.2 codiert wird. Es gehört wie LGALS1 zur Gruppe Prototyp-Galectine und besitzt eine *carbohydrate recognition domain* (CRD) über welche es Glykolipide und -proteine binden kann (Madsen et al. 1995; Chiariotti et al. 2002). Da es eine hohe Gewebespezifität für Plattenepithelien aufweist, findet sich eine physiologische Expression in allen originären Plattenepithelgeweben sowie in Myoepithelzellen der Mamma (Magnaldo et al. 1998). LGALS7 beteiligt sich an der Differenzierung und Entwicklung von Epithelien inklusive der epithelialen Wundheilung, der Regulation von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen sowie apoptotischen Prozessen (Barondes et al. 1994b; Liu und Rabinovich 2005). In malignen Tumoren ist es in multiple Prozesse der Tumorgenese eingebunden und wird als

Modulator der Tumorentwicklung betrachtet. So fördert es zum Beispiel, als ausgewiesenes Produkt des p53-induzierten Gens 1 (*PIG1*), apoptotische Prozesse über eine Aktivierung der JNK-1 und eine Freisetzung des mitochondrialen Cytochrom C (Kuwabara et al. 2002; Saussez et al. 2007). In Bezug auf die Tumorentwicklung weist Galectin 7, abhängig von der Tumorentität, sowohl positive als auch negative regulative Funktionen auf, was sich auch in einem voneinander divergierenden Expressionsverhalten widerspiegelt (Kaur et al. 2016). So wurden in Plattenepithelkarzinomen der Zervix uteri, Adenokarzinomen des Magens und Urothelkarzinomen der Blase, eine verminderte oder gar fehlende Expression beschrieben, während in Plattenepithelkarzinom des HNO-Traktes und des Ösophagus regelmäßig Überexpressionen beobachtet wurden (Matsui et al. 2007; Saussez et al. 2007; Saussez et al. 2008; Zhu et al. 2010; Kim et al. 2013; Zhu et al. 2013).

LGALS7 ist ein weiteres Protein, welches in der SILAC-basierten massenspektrometrischen Untersuchung eine hochsignifikant stärkere Expression in den HNSCC im Vergleich zu den SQCLC aufwies (Tab. 9). Durch die folgende immunhistochemische Untersuchung in den SQCLC und HNSCC der Kohorte II, in der sich ebenfalls eine hochsignifikant stärkere Expression von LGALS7 in den HNSCC zeigte (Abb. 14C), konnte dieses Ergebnis verifiziert werden. Entsprechende Resultate zeigten sich in einer Studie von Bohnenberger et al. aus dem Jahr 2018. In dieser zeigten sich, sowohl in einer SILAC-basierten massenspektrometrischen Analyse der Gewebe von 44 SQCLC und 30 HNSCC als auch in der immunhistochemischen Untersuchung von 212 SQCLC und 343 HNSCC, signifikant stärkere Expressionswerte von LGALS7 in den HNSCC (Bohnenberger et al. 2018). Auch auf genetischer Ebene konnte durch Vachani et al. (2007) eine signifikant stärkere Expression von *LGALS7* in HNSCC im Vergleich zu SQCLC nachgewiesen werden.

In der quantitativen Auswertung der LGALS7-Expression in den HNSCC der Kohorte II wiesen 86 der 92 Fälle (94,5%) eine immunhistochemische Reaktion für LGALS7 auf. Diese war in 39,6% der Fälle als stark und in 31,9% als mäßig stark befundet worden. Der mediane IRS kam bei sechs zu liegen und kennzeichnete damit eine insgesamt mäßig starke Expression. Ein ähnliches Ergebnis fand sich in einer 2016 veröffentlichten Studie von Mesquita et al., in welcher insgesamt 96,9% der 32 untersuchten Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle als positiv und 58,0% der Tumoren als stark positiv für LGALS7 bewertet wurden. Auch in einer Studie von Alves et al. (2011) und mehreren Arbeiten von Saussez et al. (2006, 2008, 2009), die einen gänzlich anderen Score zur Auswertung der immunhistochemischen Reaktion verwendeten, war in den untersuchten HNSCC der deutliche Trend zu einer überdurchschnittlich starken Expression von LGALS7 im Vergleich zu korrespondierenden Normalgeweben festgestellt worden (Saussez et al. 2006; Saussez et al. 2008; Saussez et al. 2009;

Alves et al. 2011). Die in vorliegender Arbeit beobachtete signifikant negative Korrelation der LGALS7-Expression zum histopathologischen Grading (Abb. 15B) war ebenfalls in mehreren Studien beschrieben worden (Saussez et al. 2008; Alves et al. 2011; Mesquita et al. 2016). Diese Beobachtung, gemeinsam mit der von Saussez et al. (2008) festgestellten signifikant negativen Korrelation der Expression zum Lymphknotenstadium, sowie die in vorliegender Dissertation zusätzlich festgestellte Tendenz zu einer schwächeren Expression in den fortgeschrittenen Tumorstadien nach UICC legen nahe, dass LGALS7 vor allem in der frühen Karzinogenese der HNSCC eine tumormodulierende Rolle zu spielen scheint (Mesquita et al. 2016) und deuten auf eine allgemeine Expressionsannahme im Verlauf der fortschreitenden Tumorerkrankung hin. Interessanterweise zeigte sich in einer weiteren Studie von Saussez und Kiss (2006) eine hochsignifikant positive Korrelation zwischen einer starken LGALS7-Expression und rasch auftretenden Lokalrezidiven sowie einer schlechten Prognose in fortgeschrittenen Hypopharynxkarzinomen. In 2009 wiesen Saussez et al. zudem eine signifikant positive Korrelation zwischen der LGALS7-Expression und der Expression der Matrixmetallopeptidase-9 (MMP-9) in Larynxkarzinomen nach. Sie postulierten, dass LGALS7 zu einer Induktion der MMP-9 in vivo führe, welche ihrerseits durch die Degradierung der extrazellulären Matrix die Invasivität und das Metastasierungspotentials von Tumoren steigere (Saussez et al. 2009). Bestätigend hierzu zeigte sich in einer 2017 erschienen Arbeit von Guo und Li, dass eine Überexpression von LGALS7 in einer Steigerung von sowohl MMP-9 als auch MMP-2 in zwei Karzinomzelllinien der Mundhöhle resultierte und dies zu einer zunehmenden Migration und Invasion der Zelllinien führte (Guo und Li 2017). Betrachtet man diese tumorfördernde Funktion von LGALS7 in Kombination mit seinen bekannten regulativen und pro-apoptotischen Funktionen, die unter anderem durch p53 induziert werden, so scheint LGALS7 eine duale Rolle in den HNSCC, abhängig vom Stadium der Erkrankung, einzunehmen (Kuwabara et al. 2002; Saussez und Kiss 2006; Saussez et al. 2008).

In der immunhistochemischen Untersuchung der SQCLC der Kohorte II wiesen 64 der 97 Fälle (66%) keine immunhistochemische Reaktion für LGALS7 auf, so dass der mediane IRS der SQCLC bei null zu liegen kam. In Bezug auf Zusammenhänge zwischen der Expression des Proteins und den tumorpathologischen Parametern ließ sich in dieser Arbeit, analog zu der Fallserie der HNSCC, eine signifikant schwächere Expression in den schlecht differenzierten gegenüber den mäßig differenzierten Karzinomen nachweisen (Abb. 15A). Untersuchungen, in denen die Expression von LGALS7 im Zusammenhang mit den tumorpathologischen Parametern statistisch analysiert wurde, sind nach bisherigem Kenntnisstand nicht durchgeführt worden, so dass entsprechende Vergleiche nicht möglich waren.

Betrachtet man abschließend die statistischen Gütekriterien für Anti-LGALS7, so lässt sich feststellen, dass sich der eingesetzte Antikörper gut für eine Unterscheidung von SQCLC und HNSCC eignet. In der Kohorte II präsentiert Anti-LGALS7 eine sehr gute Sensitivität von 94,5% bezüglich der korrekten Erkennung eines HNSCC und eine akzeptable Spezifität von 66,0%. Der AUC-Wert wies zudem mit 0,802 auf eine gute Unterscheidungsfähigkeit des Markers hin (Abb. 16D).

4.5 Einsatz eines Antikörper-Panels aus CAV1 und LGALS7 in SQCLC und HNSCC

Da die Kombination von Antikörpern in Form eines Biomarker-Panels die diagnostischen Gütekriterien häufig verbessern kann (Padden et al. 2016), wurden die zwei am vielversprechendsten Antikörper Anti-CAV1 und Anti-LGALS7 kombiniert, im Sinne eines Antikörper-Panels, in den SQCLC und HNSCC der Kohorte II untersucht (Abschnitt 3.4.2).

Hierbei zeigte sich für den Fall, dass beide Antikörper eine immunhistochemische Reaktion zeigen müssten, damit das Antikörper-Panel als positiv gilt, eine Verbesserung der statistischen Gütekriterien. Im Vergleich zum alleinigen Einsatz von Anti-CAV1 und Anti-LGALS7 stieg die Spezifität deutlich von 66,3% (Anti-CAV1) und 66,0% (Anti-LGALS7) auf 87,9 (Anti-CAV1 + Anti-LGALS7), während die Sensitivität insgesamt nur wenig von 89,9% (Anti-CAV1) und 94,5% (Anti-LGALS7) auf 87,2% (Anti-CAV1 + Anti-LGALS7) sank. Auch der AUC-Wert des Antikörper-Panels wies mit 0,876 einen höheren Wert auf als die AUC-Werte der Einzelmarker (Anti-CAV1: 0,781; Anti-LGALS7: 0,802) und kennzeichnete die Kombination damit als sehr gut geeignet, um zwischen SQCLC und HNSCC zu differenzieren (Abb. 17B)

4.6 CAV1 und LGALS7 in Lungentumoren nach HNSCC

Da sich das Antikörperpanel aus CAV1 und LGALS7 als effektive Markerkombination zur Differenzierung von SQCLC und HNSCC erwiesen hat, wurde es in einem kleinen Probenkollektiv (Kohorte III), bestehend aus zwölf Lungentumoren (TU-1 bis TU-12) unbekannter Herkunft nach primärem HNSCC eingesetzt (Abschnitt 3.5). Mittels des IRS erfolgte eine Einteilung in positive ($IRS \geq 2$) und negative ($IRS < 2$) Fälle. Anhand der immunhistochemischen Reaktionen für CAV1 und LGALS7 erfolgte, unter Beachtung der zuvor errechneten statistischen Gütekriterien für die Kombination beider Antikörper, eine immunhistochemische Klassifizierung der Tumoren (Tab. 16). Hierbei führte eine positive Reaktion beider

Antikörper zur Diagnose eines metHNSCC, während eine fehlende Expression beider Antikörper in der Diagnose eines vom primären HNSCC unabhängigen SQCLC resultierte. Für den Fall, dass lediglich ein Antikörper eine Expression aufwies, wurde das Ergebnis als unsicher bezüglich der Herkunft bewertet.

Bei fünf zuvor als klinisch als metHNSCC klassifizierten Lungenneoplasien (TU-01, TU-07, TU-08, TU-09, TU-11) fand sich eine positive Reaktion beider Marker, so dass diese Tumoren immunhistochemisch als metHNSCC klassifiziert wurden. Insbesondere bei TU-01 ist die Diagnose einer pulmonalen metastatischen Absiedelung sehr wahrscheinlich, da hier drei Lungenrundherde vorlagen. Bei TU-07, TU-08 und TU-11 lagen zuvor lymphatisch metastasierte HNSCC vor, so dass auch in diesen Fällen die immunhistochemische Diagnose als metHNSCC sicher zu sein scheint.

Bei drei Lungenneoplasien (TU-03, TU-06, TU-12) wurde die Herkunft klinisch als unsicher bewertet. In der immunhistochemischen Untersuchung wiesen TU-03 und TU-12 eine Expression von CAV1 und LGALS7 auf, so dass diese immunhistochemisch als metHNSCC klassifiziert wurden. Für eine metastatische Absiedelung spricht bei TU-03, dass es sich bei dem vorgegangenen primäre HNSCC um ein Tumorrezidiv handelte. Dagegen spricht jedoch, dass der Primärtumor ein pT1-Stadium sowie keine lymphatischen Absiedelungen aufwies. Bei TU-12 lag ein lymphatisch metastasierter HNSCC vor, was die immunhistochemische Diagnose eines metHNSCC untermauert. TU-06 wies eine negative Immunhistochemie für beide Marker auf, so dass dieser Tumor immunhistochemisch als SQCLC definiert wurde.

TU-04 war ein klinisch als metHNSCC definierter Tumor, der eine fehlende Expression beider Marker aufwies, so dass dieser, abweichend von der klinischen Klassifikation, immunhistochemisch als SQCLC eingeordnet wurde. Das TU-04 zugeordnete primäre HNSCC der Kohorte II wies hingegen eine mäßig starke Expression von CAV1 und LGALS7 auf. Dieser Umstand, sowie die tumorpathologischen Parameter von TU-04 (solitärer Lungenrundherd, kein Rezidiv, pN0), untermauerten hierbei die immunhistochemische Diagnose eines SQCLC.

Bei drei Lungenneoplasien (TU-02, TU-5, TU-10), die klinisch als metHNSCC klassifiziert worden sind, konnte keine eindeutige immunhistochemische Klassifikation erfolgen, da alle drei Tumoren lediglich eine Expression von CAV1 aufwiesen. Unter Berücksichtigung der tumorpathologischen Parameter scheint jedoch die Diagnose eines metHNSCC für alle drei Fälle eher wahrscheinlich. So lagen bei TU-02 zwei Lungenrundherde sowie ein rezidivierender

Primärtumor und bei TU-05 sowie TU-10 jeweils eine Primärtumorerkrankung mit pathologisch gesichertem Lymphknotenbefall vor. Die in diesen drei Tumoren fehlende Expression von LGALS7 könnte, sollte es sich bei den Tumoren tatsächlich um metHNSCC gehandelt haben, eventuell mit der in vorliegender Arbeit sowie der von Saussez (2008), Alvez (2011) und Mesquita (2016) festgestellten schwächeren Expression von LGALS7 in fortgeschrittenen HNSCC erklärt werden. Interessant wäre in diesem Zusammenhang die Expression von LGALS7 in den drei zugeordneten primären HNSCC, die in dieser Arbeit jedoch nicht untersucht wurde. Würde sich für LGALS7 herausstellen, dass die Expression in met-HNSCC im Allgemeinen schwächer ist als in zugeordneten primären HNSCC, wäre dies, neben den sehr guten statistischen Gütekriterien des Antikörper-Panels, eine zusätzliche Begründung für den kombinierten Einsatz von CAV1 und LGALS7. Eine immunhistochemische Klassifikation eines Lungentumors unklarer Herkunft als SQCLC sollte dann folglich nur bei fehlender Expression beider Marker, wie auch in dieser Arbeit durchgeführt, erfolgen.

Abschließend lässt sich formulieren, dass ein Antikörper-Panel aus CAV1 und LGALS7 auch zur Differenzialdiagnose von metHNSCC und SQCLC nach primärem HNSCC geeignet scheint. Dies müsste jedoch in größeren Kollektiven von Lungentumoren mit plattenepithelialer Histologie nach primären HNSCC, idealerweise unter Hinzunahme der potenziellen Primärtumoren und unter Berücksichtigung der jeweiligen klinischen und tumorpathologischen Parameter, überprüft werden. Interessant wäre diesem Zusammenhang eine zusätzliche Erfassung des inhalativen Tabakkonsums der Patienten, da Personen mit einer positiven Raucheranamnese ein deutlich höheres Risiko für die Entwicklung eines zusätzlichen Plattenepithelkarzinoms der Lunge haben als Nichtraucher (Schwartz et al. 1994; Lin et al. 2005).

5 Zusammenfassung

Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des HNO-Traktes können im Verlauf ihrer Erkrankung sowohl pulmonale Metastasen als auch ein plattenepitheliales Zweitkarzinom der Lunge entwickeln. Aufgrund der sehr ähnlichen Morphologie und dem Mangel an zuverlässigen Biomarkern ist eine Differenzialdiagnose der beiden Entitäten in vielen Fällen eine große diagnostische Herausforderung. Die Entdeckung von Biomarkern mit einer hohen Sensitivität und Spezifität bezüglich einer Differenzierung der beiden Entitäten wäre daher, insbesondere aufgrund der immensen Bedeutung für den Patienten, ein großer diagnostischer Zugewinn.

Im Hinblick auf diese Problematik war das Ziel vorliegender Dissertation die Etablierung von immunhistochemisch einsetzbaren Markern, die eine Differenzierung zwischen Plattenepithelkarzinomen der Lunge (SQCLC) und des HNO-Traktes (HNSCC) und damit auch deren pulmonalen Metastasen (metHNSCC) ermöglichen. Hierzu wurden zunächst die Proteinexpressionsprofile einer SQCLC- und HNSCC-Zelllinie anhand einer SILAC-basierten massenspektrometrischen Untersuchung quantitativ miteinander verglichen und auf signifikant unterschiedlich regulierte Proteine hin untersucht. In dieser Analyse konnten insgesamt 397 signifikant unterschiedlich in den Zelllinien exprimierte Proteine nachgewiesen werden, von denen CAV1, CAV2, LGALS1 und LGALS7 vielversprechende Werte aufwiesen und daher in einer immunhistochemischen Verifikationsuntersuchung, bestehend aus 98 SQCLC 96 HNSCC, eingesetzt wurden.

In der statistischen Auswertung der immunhistochemischen Untersuchung anhand des immunreaktiven Scores wiesen alle vier Proteine, analog zum Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse, hochsignifikant stärkere Expressionswerte in den primären HNSCC auf. Unter zusätzlicher Betrachtung der statistischen Gütekriterien erwiesen sich CAV1 (Sensitivität: 89,9%; Spezifität: 66,3%) und LGALS7 (Sensitivität: 94,5%; Spezifität: 66,0%) als die geeignetsten Marker-Kandidaten bezüglich einer Differenzierung von SQCLC und HNSCC. Die Kombination von CAV1 und LGALS7, im Sinne eines Antikörper-Panels, erreichte eine Sensitivität von 87,2% und Spezifität von 87,9% und führte somit zu einer weiteren Verbesserung der statistischen Gütekriterien.

Zusammengefasst lässt sich folgern, dass CAV1 und LGALS7, insbesondere in Kombination als Antikörper-Panel, vielversprechende Marker-Kandidaten zur Unterscheidung von SQCLC und HNSCC darstellen.

Nach dem Einsatz beider Marker in einem kleinen Probekollektiv, bestehend aus zwölf plattenepithelialen Lungentumoren unklarer Herkunft nach primärem HNSCC, scheint es so, dass sich das Antikörper-Panel aus CAV1 und LGALS7 auch zur Unterscheidung von SQCLC und pulmonalen Metastasen (metHNSCC) bei vorbekanntem HNSCC eignet.

Durch den zusätzlichen Einsatz von Antikörpern mit entsprechenden Gütekriterien für die korrekte Erkennung von SQCLC könnte die Diagnosesicherheit weiter gesteigert werden und somit eine zuverlässige immunhistochemische Unterscheidung zwischen beiden Entitäten ermöglicht werden.

Zudem hat sich durch diese Arbeit gezeigt, dass die SILAC-basierte Massenspektrometrie als wertvolle Methode zur Identifizierung neuer Biomarker angesehen werden kann.

6 Anhang

6.1 TNM-Klassifikation und Stadieneinteilung der SQCLC (nach Wittekind 2017)

Tabelle A1: TNM-Klassifikation der Lungentumoren

T-Kategorie	
TX	Keine Beurteilung möglich oder positive Zytologie
T1a	Tumor ≤ 1 cm
T1b	Tumor > 1 aber ≤ 2 cm
T1c	Tumor 2 – 3 cm
T2	Hauptbronchus ohne direkte Infiltration der Carina, viszerale Pleura, partielle Atelektase
T2a	$> 3 - 4$ cm
T2b	$> 4 - 5$ cm
T3	$> 5 - 7$ cm, Thoraxwand (inklusive parietale Pleura und Sulcus superior), N. phrenicus, separate(r) Tumorherd(e) im selben Lungenlappen
T4	> 7 cm, Diaphragma, Mediastinum, Herz, große Gefäße, Carina, N. laryngeus recurrens, Trachea, Ösophagus, Wirbelkörper, Tumorherd(e) in ipsilateralem anderen Lungenlappen
N-Kategorie	
N0	Kein Befall von Lymphknoten
N1	Metastase(n) in ipsilateralen, peribronchialen und/oder ipsilateralen hilären Lymphknoten und/oder intrapulmonalen Lymphknoten oder direkte Invasion dieser Lymphknoten
N2	Metastase(n) in ipsilateralen mediastinalen und/oder subkarinalen Lymphknoten
N3	Metastase(n) in kontralateralen mediastinalen, kontralateralen hilären, ipsi- oder kontralateral tief zervikalen, supraklavikulären Lymphknoten
M-Kategorie	
M0	Keine Metastase(n)
M1	Metastase(n)
M1a	Tumorherd(e) in einem kontralateralen Lungenlappen, Pleurametastasen, maligner Pleura- oder Perikarderguss
M1b	Eine solitäre Fernmetastase in einem solitären extrathorakalen Organ
M1c	Mehrere Fernmetastasen (> 1 cm) in einem oder mehreren Organen

Tabelle A2: Stadieneinteilung der Lungentumoren

Stadium	T-Kategorie	N-Kategorie	M-Kategorie
Okkultes Karzinom	TX	N0	M0
IA1	T1a	N0	M0
IA2	T1b	N0	M0
IA3	T1c	N0	M0
IB	T2a	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0
IIB	T1a – c, T2a, T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T1a – c, T2a, T2b	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0, N1	M0
IIIB	T1a – c, T2a, T2b	N3	M0
	T3, T4	N2	M0
IIIC	T3, T4	N3	M0
IVa	Jedes T	Jedes N	M1a, M1b
IVb	Jedes T	Jedes N	M1c

6.2 TNM-Klassifikation und Stadieneinteilung der HNSCC (nach Wittekind 2017)

Tabelle A3: T-Kategorie der Mundhöhlen-, Pharynx- und Larynxkarzinome

Mundhöhle	
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
T1	Tumor ≤ 2 cm und DOI (<i>depth of invasion</i>) ≤ 5 mm
T2	Tumor ≤ 2 cm und DOI 5 – 10 mm oder Tumor 2 – 4 cm und DOI ≤ 10 mm
T3	Tumor > 4 cm oder DOI ≥ 10 mm
T4a	Durch kortikalen Knochen, äußere Zungenmuskulatur, Kiefernhöhle, Gesichtshaut
T4b	Spatium masticatorium, Processus pterygoideus, Schädelbasis, A. carotis interna

Oropharynx (p16 negativ)		Oropharynx (p16 positiv)
T0	Kein Anhalt für Primärtumor	
T1	Tumor ≤ 2 cm	
T2	Tumor > 2 – 4 cm	
T3	Tumor > 4 cm oder Ausbreitung auf linguale Epiglottisoberfläche	
T4a	Larynx, äußere Muskulatur der Zunge, Lamina medialis des Processus pterygoideus, harter Gaumen, Unterkiefer	T4: Larynx, äußere Zungenmuskulatur, Lamina medialis des Processus pterygoideus, harter Gaumen, Unterkiefer, M. pterygoideus lateralis, Lamina lateralis des Processus pterygoideus, Nasopharynx, Schädelbasis, A. carotis int.
T4b	M. pterygoideus lat., Lamina lateralis des Processus pterygoideus, Nasopharynx, Schädelbasis, A. carotis interna	
Hypopharynxkarzinome		
T0	Kein Anhalt für Primärtumor	
T1	Tumor ≤ 2 cm und auf einen Unterbezirk des Hypopharynx begrenzt	
T2	Tumor > 2 – 4 cm oder infiltriert mehr als einen Unterbezirk, ohne Fixation des Hemilarynx	
T3	Tumor > 4 cm oder Fixation des Hemilarynx	
T4a	Tumor infiltriert Schild- oder Ringknorpel, Schilddrüse oder zentrale Halsweichteile	
T4b	Prävertebrale Faszie, mediastinale Strukturen, A. carotis interna	
Larynx – Supraglottis		
T1	Ein Unterbezirk, normal bewegliche Stimmlippen	
T2	Schleimhaut von mehr als einem Unterbezirk von Supraglottis/ Glottis oder Schleimhaut eines Areals außerhalb Supraglottis, keine Larynxfixation	
T3	Begrenzt auf Larynx, mit Stimmlippenfixation und/oder Invasion der Postkrikoidgegend, der präepiglottischen Gegend, paraglottischem Raum, geringgradige Schildknorpelerosion	
T4a	Ausbreitung durch Schildknorpel: Trachea, Halsweichteile, äußere Muskulatur der Zunge, gerade Halsmuskulatur, Schilddrüse/Ösophagus	
T4b	Prävertebralraum, mediastinale Strukturen, A. carotis interna	
Larynx – Glottis		
T1	Auf Stimmlippe(n) begrenzt, normale Beweglichkeit <ul style="list-style-type: none"> a) Eine Stimmlippe b) Zwei Stimmlippen 	

T2	Ausbreitung auf Supra-/Subglottis, eingeschränkte Stimmlippenbeweglichkeit
T3	Stimmlippenfixation, Ausbreitung auf präepiglottischen Raum, geringgradige Erosion des Schildknorpels
T4a	Ausbreitung durch Schildknorpel: Trachea, Halsweichteile, äußere Muskulatur der Zunge, gerade Halsmuskulatur, Schilddrüse/Ösophagus
T4b	Prävertebralraum, mediastinale Strukturen, A. carotis interna
Larynx – Subglottis	
T1	Begrenzt auf Subglottis
T2	Ausbreitung auf Stimmlippe(n), normale oder eingeschränkter Stimmlippenbeweglichkeit
T3	Stimmlippenfixation
T4a	Ausbreitung durch Schildknorpel: Trachea, Halsweichteile, äußere Muskulatur der Zunge, gerade Halsmuskulatur, Schilddrüse/Ösophagus
T4b	Prävertebralraum, mediastinale Strukturen, A. carotis interna

Tabelle A4: N- und M-Kategorie der Mundhöhlen-, Pharynx- und Larynxkarzinome

Mundhöhle, Oro- und Hypopharynx, Larynx		Oropharynx (p16 positiv)
N0	Keine Lymphknotenmetastasen	Keine Lymphknotenmetastasen
N1	Ipsilateral solitär ≤ 3 cm, keine extranodale Ausbreitung	Ipsilateral solitär/multipel, alle ≤ 6 cm
N2a	Ipsilateral solitär 3 – 6 cm, keine extranodale Ausbreitung	N2: Kontralateral oder bilateral solitär/multipel, alle ≤ 6 cm
N2b	Ipsilateral multipel, alle ≤ 6 cm, keine extranodale Ausbreitung	
N2c	Bilateral oder kontralateral, alle ≤ 6 cm, keine extranodale Ausbreitung	
N3a	> 6 cm ohne extranodale Ausbreitung	N3: Alle > 6 cm
N3b	extranodale Ausbreitung	
Mundhöhle, Oro- und Hypopharynx, Larynx		
M0	Keine Fernmetastasen	
M1	Fernmetastase(n)	

Tabelle A5: Stadieneinteilung der Mundhöhlen-, Oropharynx- (p16 negativ), Hypopharynx- und Larynxkarzinome

Stadium	T	N	M
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T1, T2, T3	N1	M0
	T3	N0	M0
IVA	T1, T2, T3	N2a – c	M0
	T4a	N0, N1, N2	M0
IVB	T4b	Jedes N	M0
	Jedes T	N3	M0
IVC	Jedes T	Jedes N	M1

Tabelle A6: Stadieneinteilung der p16-positiven Oropharynxkarzinome

Stadium	T-Kategorie	N-Kategorie	M-Kategorie
I	T1, T2	N0, N1	M0
II	T1, T2	N2	M0
	T3	N0, N1, N2	
III	T1 – T3	N3	M0
	T4	Jedes N	
IV	Jedes T	Jedes N	M1

7 Literaturverzeichnis

- Aldred MA, Ginn-Pease ME, Morrison CD, Popkie AP, Gimm O, Hoang-Vu C, Krause U, Dralle H, Jhiang SM, Plass C et al. (2003): Caveolin-1 and caveolin-2, together with three bone morphogenetic protein-related genes, may encode novel tumor suppressors down-regulated in sporadic follicular thyroid carcinogenesis. *Cancer Res* 63, 2864–2871
- Alves PM, Godoy GP, Gomes DQ, Medeiros AMC, de Souza LB, da Silveira EJD, Vasconcelos MG, Queiroz LMG (2011): Significance of galectins-1, -3, -4 and -7 in the progression of squamous cell carcinoma of the tongue. *Pathol Res Pract* 207, 236–240
- Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL (2008): Head and neck cancer. *Lancet* 371, 1695–1709
- Atabek U, Mohit-Tabatabai MA, Raina S, Rush BF, Dasmahapatra KS (1987): Lung cancer in patients with head and neck cancer. *Am J Surg* 154, 434–438
- Barnes B, Kraywinkel K: Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Robert Koch-Institut, Berlin 2016
- Barnes L, Tse LL, Hunt JL, Brandwein-Gensler M, Urken M, Slootweg P, Gale N, Cardesa A, Zidar N, Boffetta P: Tumors of the Hypopharynx, Larynx and Trachea. In: Barnes L, Eveson J, Reichart P, Sidransky D (Hrsg.): World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. IARC Press, Lyon 2005, 111–120
- Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, Gitt MA, Hirabayashi J, Hughes C, Kasai K (1994a): Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell* 76, 597–598
- Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, Leffler H (1994b): Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem* 269, 20807–20810
- Battafarano RJ, Force SD, Meyers BF, Bell J, Guthrie TJ, Cooper JD, Patterson GA (2004): Benefits of resection for metachronous lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 127, 836–842
- Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg JB, Stemhagen A, Fraumeni JF (1988): Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 48, 3282–3287
- Bohnenberger H, Kaderali L, Ströbel P, Yepes D, Plessmann U, Dharia NV, Yao S, Heydt C, Merkelbach-Bruse S, Emmert A et al. (2018): Comparative proteomics reveals a diagnostic signature for pulmonary head and neck cancer metastasis. *EMBO Mol Med* 10, e8428
- Braakhuis BJM, Senft A, de Bree R, de Vries J, Ylstra B, Cloos J, Kuik DJ, Leemans CR, Brakenhoff RH (2006): Expression profiling and prediction of distant metastases in head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol* 59, 1254–1260
- Bradley PJ, Bradley PT (2010): Searching for metachronous tumours in patients with head and neck cancer: the ideal protocol! *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 18, 124–133
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A (2018): Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 68, 394–424

- Bremmer F, Bohnenberger H, Küffer S, Oellerich T, Serve H, Urlaub H, Strauss A, Maatoug Y, Behnes CL, Oing C et al. (2019): Proteomic comparison of malignant human germ cell tumor cell lines. *Dis Markers* 2019, 8298524
- Camby I, Le Mercier M, Lefranc F, Kiss R (2006): Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology* 16, 137R-157R
- Capozza F, Trimmer C, Castello-Cros R, Katiyar S, Whitaker-Menezes D, Follenzi A, Crosariol M, Llaverias G, Sotgia F, Pestell RG et al. (2012): Genetic ablation of Cav1 differentially affects melanoma tumor growth and metastasis in mice: role of Cav1 in Shh heterotypic signaling and transendothelial migration. *Cancer Res* 72, 2262–2274
- Cardesa A, Gale N, Nadal A, Zidar N: Squamous cell carcinoma. In: Barnes L, Eveson J, Reichart P, Sidransky D (Hrsg.): *World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*. IARC Press, Lyon 2005, 118–121
- Cassoni P, Daniele L, Maldi E, Righi L, Tavaglione V, Novello S, Volante M, Scagliotti GV, Papotti M (2009): Caveolin-1 expression in lung carcinoma varies according to tumour histotype and is acquired de novo in brain metastases. *Histopathology* 55, 20–27
- Chiariotti L, Salvatore P, Frunzio R, Bruni CB (2002): Galectin genes: regulation of expression. *Glycoconj J* 19, 441–449
- Ciuleanu T, Stelmakh L, Cicenias S, Miliauskas S, Grigorescu AC, Hillenbach C, Johannsdottir HK, Klughammer B, Gonzalez EE (2012): Efficacy and safety of erlotinib versus chemotherapy in second-line treatment of patients with advanced, non-small cell lung cancer with poor prognosis (ITTAN): A randomised multicentre, open-label, phase 3 study. *Lancet Oncol* 13, 300–308
- Cox J, Mann M (2008): MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* 26, 1367–1372
- D'Addario G, Felip E (2009): Non-small cell lung cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 20 Suppl 4, 68–70
- Danguy A, Camby I, Kiss R (2002): Galectins and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1572, 285–293
- D'Cruz AK, Vaish R, Kapre N, Dandekar M, Gupta S, Hawaldar R, Agarwal JP, Pantvaidya G, Chaukar D, Deshmukh A et al. (2015): Elective versus therapeutic neck dissection in node-negative oral cancer. *N Engl J Med* 373, 521–529
- de Bree R, Deurloo EE, Snow GB, Leemans CR (2000): Screening for distant metastases in patients with head and neck cancer. *Laryngoscope* 110, 397–401
- de Matos LL, Trufelli DC, de Matos MGL, da Silva Pinhal MA (2010): Immunohistochemistry as an important tool in biomarkers detection and clinical practice. *Biomark Insights* 5, 9–20
- Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA (2011): Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention. *Clin Chest Med* 32, 605–644
- Ding YM, Dong JH, Chen LL, Zhang HD (2009): Increased expression of galectin-1 is associated with human oral squamous cell carcinoma development. *Oncol Rep* 21, 983–987
- Ebrahim AH, Alalawi Z, Mirandola L, Rakhshanda R, Dahlbeck S, Nguyen D, Jenkins M, Grizzi F, Cobos E, Figueroa JA et al. (2014): Galectins in cancer: carcinogenesis, diagnosis and therapy. *Ann Transl Med* 2, 88

- Edge SB, Compton CC (2010): The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol* **17**, 1471–1474
- Elola MT, Wolfenstein-Todel C, Troncoso MF, Vasta GR, Rabinovich GA (2007): Galectins: matricellular glycan-binding proteins linking cell adhesion, migration, and survival. *Cell Mol Life Sci* **64**, 1679–1700
- Elsheikh SE, Green AR, Rakha EA, Samaka RM, Ammar AA, Powe D, Reis-Filho JS, Ellis IO (2008): Caveolin 1 and Caveolin 2 are associated with breast cancer basal-like and triple-negative immunophenotype. *Br J Cancer* **99**, 327–334
- Engelman JA, Zhang XL, Galbiati F, Lisanti MP (1998): Chromosomal localization, genomic organization, and developmental expression of the murine caveolin gene family (Cav-1, -2, and -3). Cav-1 and Cav-2 genes map to a known tumor suppressor locus (6-A2/7q31). *FEBS Lett* **429**, 330–336
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F (2015): Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* **136**, E359–E386
- Ferlito A, Shaha AR, Silver CE, Rinaldo A, Mondin V (2001): Incidence and sites of distant metastases from head and neck cancer. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* **63**, 202–207
- Ferris RL, Blumenschein G, Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L, Harrington K, Kasper S, Vokes EE, Even C et al. (2016): Nivolumab for recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* **375**, 1856–1867
- Finley RK, Verazin GT, Driscoll DL, Blumenson LE, Takita H, Vahram B, Sako K, Hicks W, Petrelli NJ, Shedd DP (1992): Results of surgical resection of pulmonary metastases of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Am J Surg* **164**, 594–598
- Fong A, Garcia E, Gwynn L, Lisanti MP, Fazzari MJ, Li M (2003): Expression of caveolin-1 and caveolin-2 in urothelial carcinoma of the urinary bladder correlates with tumor grade and squamous differentiation. *Am J Clin Pathol* **120**, 93–100
- Fu P, Chen F, Pan Q, Zhao X, Zhao C, Cho WCS, Chen H (2017): The different functions and clinical significances of caveolin-1 in human adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Onco Targets Ther* **10**, 819–835
- Galbiati F, Volonte D, Engelman JA, Watanabe G, Burk R, Pestell RG, Lisanti MP (1998): Targeted downregulation of caveolin-1 is sufficient to drive cell transformation and hyperactivate the p42/44 MAP kinase cascade. *EMBO J* **17**, 6633–6648
- Gale N, Pilch BZ, Sidransky D, Westra WH, Califano J: Epithelial precursor lesions. In: Barnes L, Eveson J, Reichart P, Sidransky D (Hrsg.): *World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*. IARC Press, Lyon 2005, 140–143
- Geurts TW, Nederlof PM, van den Brekel MWM, van't Veer LJ, de Jong D, Hart AAM, van Zandwijk N, Klomp H, Balm AJM, van Velthuysen MLF (2005): Pulmonary squamous cell carcinoma following head and neck squamous cell carcinoma: metastasis or second primary? *Clin Cancer Res* **11**, 6608–6614
- Gillenwater A, Xu XC, El-Naggar AK, Clayman GL, Lotan R (1996): Expression of galectins in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* **18**, 422–432

- Gillet JP, Varma S, Gottesman MM (2013): The clinical relevance of cancer cell lines. *J Natl Cancer Inst* 105, 452–458
- Gillison ML, Chaturvedi AK, Anderson WF, Fakhry C (2015): Epidemiology of human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 33, 3235–3242
- Goethals L, Perneel C, Debucquoy A, de Schutter H, Borghys D, Ectors N, Geboes K, McBride WH, Haustermans KM (2006): A new approach to the validation of tissue microarrays. *J Pathol* 208, 607–614
- Goetz JG, Lajoie P, Wiseman SM, Nabi IR (2008): Caveolin-1 in tumor progression: the good, the bad and the ugly. *Cancer Metastasis Rev* 27, 715–735
- Goodspeed A, Heiser LM, Gray JW, Costello JC (2016): Tumor-derived cell lines as molecular models of cancer pharmacogenomics. *Mol Cancer Res* 14, 3–13
- Grégoire V, Lefebvre JL, Licitra L, Felip E (2010): Squamous cell carcinoma of the head and neck: EHNS-ESMO-ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 21 Suppl 5, v184-v186
- Guo JP, Li XG (2017): Galectin-7 promotes the invasiveness of human oral squamous cell carcinoma cells via activation of ERK and JNK signaling. *Oncol Lett* 13, 1919–1924
- Hammar SP, Brambilla C, Pugatch B, Geisinger K, Fernandez EA, Vogt P, Petrovitchev N, Matsuno Y, Aisner S, Rami-Porta R et al.: Squamous cell carcinoma. In: Travis W, Brambilla E, Müller-Hermelink H, Harris C (Hrsg.): *World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. IARC Press, Lyon 2004, 26–30
- Hashibe M, Brennan P, Chuang SC, Boccia S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, Dal Maso L, Daudt AW, Fabianova E et al. (2009): Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18, 541–550
- Hirsch FR, Corrin B, Colby TV: Clinical features and staging. In: Travis W, Brambilla E, Müller-Hermelink H, Harris C (Hrsg.): *World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. IARC Press, Lyon 2004, 16–19
- Hood JD, Cheresh DA (2002): Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer* 2, 91–100
- Howlander N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR et al. (2016): *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016*, Bethesda 2016; https://seer.cancer.gov/csr/1975_2016/; abgerufen am: 05.07.2019
- Hughes RC (2001): Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie* 83, 667–676
- Hung KF, Lin SC, Liu CJ, Chang CS, Chang KW, Kao SY (2003): The biphasic differential expression of the cellular membrane protein, caveolin-1, in oral carcinogenesis. *J Oral Pathol Med* 32, 461–467
- Johnson N, Franceschi S, Ferlay J, Ramadas N, Schmid S, MacDonald DG, Bouquot JE, Slootweg PJ: Squamous cell carcinoma. In: Barnes L, Eveson J, Reichart P, Sidransky D (Hrsg.): *World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*. IARC Press, Lyon 2005, 168-177

- Jones AS, Morar P, Phillips DE, Field JK, Husband D, Helliwell TR (1995): Second primary tumors in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 75, 1343–1353
- Jung AC, Ray AM, Ramolu L, Macabre C, Simon F, Noulet F, Blandin AF, Renner G, Lehmann M, Choulier L et al. (2015): Caveolin-1-negative head and neck squamous cell carcinoma primary tumors display increased epithelial to mesenchymal transition and prometastatic properties. *Oncotarget* 6, 41884–41901
- Kaatsch P, Spix C, Katalinic A, Meisegeier S, Franke M, Werth K: Krebs in Deutschland für 2013/2014. Robert Koch-Institut, Berlin 2017
- Kato K, Hida Y, Miyamoto M, Hashida H, Shinohara T, Itoh T, Okushiba S, Kondo S, Katoh H (2002): Overexpression of caveolin-1 in esophageal squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis and pathologic stage. *Cancer* 94, 929–933
- Kato T, Miyamoto M, Kato K, Cho Y, Itoh T, Morikawa T, Okushiba S, Kondo S, Ohbuchi T, Katoh H (2004): Difference of caveolin-1 expression pattern in human lung neoplastic tissue. Atypical adenomatous hyperplasia, adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Cancer Lett* 214, 121–128
- Kaur M, Kaur T, Kamboj SS, Singh J (2016): Roles of Galectin-7 in cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 17, 455–461
- Kim SJ, Hwang JA, Ro JY, Lee YS, Chun KH (2013): Galectin-7 is epigenetically-regulated tumor suppressor in gastric cancer. *Oncotarget* 4, 1461–1471
- Kindt N, Journe F, Ghanem GE, Saussez S (2017): Galectins and carcinogenesis: their role in head and neck carcinomas and thyroid carcinomas. *Int J Mol Sci* 18, 2745
- Koleske AJ, Baltimore D, Lisanti MP (1995): Reduction of caveolin and caveolae in oncogenically transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1381–1385
- Kuwabara I, Kuwabara Y, Yang RY, Schuler M, Green DR, Zuraw BL, Hsu DK, Liu FT (2002): Galectin-7 (PIG1) exhibits pro-apoptotic function through JNK activation and mitochondrial cytochrome c release. *J Biol Chem* 277, 3487–3497
- Lang G: Histotechnik: Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik. 2. Auflage. Springer, Wien 2013
- Le QT, Shi G, Cao H, Nelson DW, Wang Y, Chen EY, Zhao S, Kong C, Richardson D, O'Byrne KJ et al. (2005): Galectin-1: a link between tumor hypoxia and tumor immune privilege. *J Clin Oncol* 23, 8932–8941
- Leon X, Ferlito A, Myer CM, Saffiotti U, Shaha AR, Bradley PJ, Brandwein MS, Anniko M, Elluru RG, Rinaldo A (2002): Second primary tumors in head and neck cancer patients. *Acta Otolaryngol* 122, 765–778
- Leon X, Quer M, Diez S, Orus C, Lopez-Pousa A, Burgues J (1999): Second neoplasm in patients with head and neck cancer. *Head Neck* 21, 204–210
- Leon X, Quer M, Orus C, del Prado Venegas M, Lopez M (2000): Distant metastases in head and neck cancer patients who achieved loco-regional control. *Head Neck* 22, 680–686
- Leong PP, Rezai B, Koch WM, Reed A, Eisele D, Lee DJ, Sidransky D, Jen J, Westra WH (1998): Distinguishing second primary tumors from lung metastases in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 90, 972–977

- Li JM, Tseng CW, Lin CC, Law CH, Chien YA, Kuo WH, Chou HC, Wang WC, Chan HL (2018): Upregulation of LGALS1 is associated with oral cancer metastasis. *Ther Adv Med Oncol* 10, 1758835918794622
- Lin K, Patel SG, Chu PY, Matsuo JMS, Singh B, Wong RJ, Kraus DH, Shaha AR, Shah JP, Boyle JO (2005): Second primary malignancy of the aerodigestive tract in patients treated for cancer of the oral cavity and larynx. *Head Neck* 27, 1042–1048
- Liscovitch M, Burgermeister E, Jain N, Ravid D, Shatz M, Tencer L: Caveolin and cancer: a complex relationship. In: Mattson M (Hrsg.): *Membrane microdomain signaling lipid rafts in biology and medicine*. Humana Press, Totowa 2005, 161–190
- Liu F, Shangli Z, Hu Z (2018): CAV2 promotes the growth of renal cell carcinoma through the EGFR/PI3K/Akt pathway. *Onco Targets Ther* 11, 6209–6216
- Liu FT, Rabinovich GA (2005): Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer* 5, 29–41
- Liu P, Rudick M, Anderson RGW (2002): Multiple functions of Caveolin-1. *J Biol Chem* 277, 41295–41298
- Madsen P, Rasmussen HH, Flint T, Gromov P, Kruse TA, Honoré B, Vorum H, Celis JE (1995): Cloning, expression, and chromosome mapping of human galectin-7. *J Biol Chem* 270, 5823–5829
- Magnaldo T, Fowles D, Darmon M (1998): Galectin-7, a marker of all types of stratified epithelia. *Differentiation* 63, 159–168
- Marur S, Forastiere AA (2008): Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment. *Mayo Clin Proc* 83, 489–501
- Marur S, Forastiere AA (2016): Head and neck squamous cell carcinoma: update on epidemiology, diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc* 91, 386–396
- Masuelli L, Budillon A, Marzocchella L, Mrozek MA, Vitolo D, Di Gennaro E, Losito S, Sale P, Longo F, Ionna F et al. (2012): Caveolin-1 overexpression is associated with simultaneous abnormal expression of the E-cadherin/alpha-beta catenins complex and multiple ErbB receptors and with lymph nodes metastasis in head and neck squamous cell carcinomas. *J Cell Physiol* 227, 3344–3353
- Matsui Y, Ueda S, Watanabe J, Kuwabara I, Ogawa O, Nishiyama H (2007): Sensitizing effect of galectin-7 in urothelial cancer to cisplatin through the accumulation of intracellular reactive oxygen species. *Cancer Res* 67, 1212–1220
- Megger DA, Bracht T, Kohl M, Ahrens M, Naboulsi W, Weber F, Hoffmann AC, Stephan C, Kuhlmann K, Eisenacher M et al. (2013): Proteomic differences between hepatocellular carcinoma and nontumorous liver tissue investigated by a combined gel-based and label-free quantitative proteomics study. *Mol Cell Proteomics* 12, 2006–2020
- Mesquita JA, Queiroz LMG, Silveira ÉJD, Gordon-Nunez MA, Godoy GP, Nonaka CFW, Alves PM (2016): Association of immunoexpression of the galectins-3 and -7 with histopathological and clinical parameters in oral squamous cell carcinoma in young patients. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 273, 237–243
- Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA (2008): Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc* 83, 584–594

- Müller KM, Wiethage T (2004): Pathologie, Klassifikation und Stadieneinteilung bösartiger Lungentumoren. *Radiologe* **44**, 415–426
- Nohata N, Hanazawa T, Kikkawa N, Mutallip M, Fujimura L, Yoshino H, Kawakami K, Chiyo-
maru T, Enokida H, Nakagawa M et al. (2011): Caveolin-1 mediates tumor cell migration
and invasion and its regulation by miR-133a in head and neck squamous cell carcinoma. *Int
J Oncol* **38**, 209–217
- Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, Mann M (2002): Stable
isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to
expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* **1**, 376–386
- Ong SE, Kratchmarova I, Mann M (2003): Properties of ¹³C-substituted arginine in stable isotope
labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *J Proteome Res* **2**, 173–181
- Ong SE, Mann M (2006): A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture
(SILAC). *Nat Protoc* **1**, 2650–2660
- Padden J, Ahrens M, Kältsch J, Bertram S, Megger DA, Bracht T, Eisenacher M, Kocabayoglu P,
Meyer HE, Sipos B et al. (2016): Immunohistochemical markers distinguishing cholangio-
cellular carcinoma (CCC) from pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) Discovered by
Proteomic Analysis of Microdissected Cells. *Mol Cell Proteomics* **15**, 1072–1082
- Parkin M, Tyczynski JE, Boffetta P, Samet J, Shields P, Caporaso N: Lung cancer epidemiology and
etiology. In: Travis W, Brambilla E, Müller-Hermelink H, Harris C (Hrsg.): *World Health
Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of the Lung,
Pleura, Thymus and Heart*. IARC Press, Lyon 2004, 12–15
- Parolini I, Sargiacomo M, Galbiati F, Rizzo G, Grignani F, Engelman JA, Okamoto T, Ikezu T,
Scherer PE, Mora R et al. (1999): Expression of caveolin-1 is required for the transport of
caveolin-2 to the plasma membrane. Retention of caveolin-2 at the level of the golgi com-
plex. *J Biol Chem* **274**, 25718–25725
- Paz A, Haklai R, Elad-Sfadia G, Ballan E, Kloog Y (2001): Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to
mediate Ras membrane anchorage and cell transformation. *Oncogene* **20**, 7486–7493
- Perez-Ordóñez B, Beauchemin M, Jordan RCK (2006): Molecular biology of squamous cell carci-
noma of the head and neck. *J Clin Pathol* **59**, 445–453
- Postmus PE, Kerr KM, Oudkerk M, Senan S, Waller DA, Vansteenkiste J, Escriu C, Peters S
(2017): Early and locally advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical
Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* **28**, iv1–iv21
- Racine C, Bélanger M, Hirabayashi H, Boucher M, Chakir J, Couet J (1999): Reduction of caveolin
1 gene expression in lung carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* **255**, 580–
586
- Razani B, Woodman SE, Lisanti MP (2002): Caveolae: from cell biology to animal physiology.
Pharmacol Rev **54**, 431–467
- Rekhtman N, Ang DC, Sima CS, Travis WD, Moreira AL (2011): Immunohistochemical algorithm
for differentiation of lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma based on large se-
ries of whole-tissue sections with validation in small specimens. *Mod Pathol* **24**, 1348–1359

- Remmele W, Stegner HE (1987): Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe. *Pathologie* **8**, 138–140
- Rivera MP, Mehta AC, Wahidi MM (2013): Establishing the diagnosis of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* **143**, e142S-e165S
- Robbins KT, Clayman G, Levine PA, Medina J, Sessions R, Shaha A, Som P, Wolf GT (2002): Neck dissection classification update: revisions proposed by the American Head and Neck Society and the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **128**, 751–758
- Sagara Y, Mimori K, Yoshinaga K, Tanaka F, Nishida K, Ohno S, Inoue H, Mori M (2004): Clinical significance of Caveolin-1, Caveolin-2 and HER2/neu mRNA expression in human breast cancer. *Br J Cancer* **91**, 959–965
- Sandler AB, Gray R, Brahmer J, Dowlati A, Schiller JH, Perry MC, Johnson DH (2005): Randomized phase II/III trial of paclitaxel (P) plus carboplatin (C) with or without bevacizumab (NSC #704865) in patients with advanced non-squamous non-small cell lung cancer (NSCLC): An Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Trial - E4599. *J Clin Oncol* **23**, LBA4-LBA4
- Sanjuan X, Fernandez PL, Castells A, Castronovo V, van den Brule F, Liu FT, Cardesa A, Campo E (1997): Differential expression of galectin 3 and galectin 1 in colorectal cancer progression. *Gastroenterology* **113**, 1906–1915
- Saussez S, Camby I, Toubeau G, Kiss R (2007): Galectins as modulators of tumor progression in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck* **29**, 874–884
- Saussez S, Cludts S, Capouillez A, Mortuaire G, Smetana K, Kaltner H, André S, Leroy X, Gabius HJ, Decaestecker C (2009): Identification of matrix metalloproteinase-9 as an independent prognostic marker in laryngeal and hypopharyngeal cancer with opposite correlations to adhesion/growth-regulatory galectins-1 and -7. *Int J Oncol* **34**, 433–439
- Saussez S, Cucu DR, Decaestecker C, Chevalier D, Kaltner H, Andre S, Wacreniez A, Toubeau G, Camby I, Gabius HJ et al. (2006): Galectin 7 (p53-induced gene 1): a new prognostic predictor of recurrence and survival in stage IV hypopharyngeal cancer. *Ann Surg Oncol* **13**, 999–1009
- Saussez S, Decaestecker C, Lorfèvre F, Chevalier D, Mortuaire G, Kaltner H, Andre S, Toubeau G, Gabius HJ, Leroy X (2008): Increased expression and altered intracellular distribution of adhesion/growth-regulatory lectins galectins-1 and -7 during tumour progression in hypopharyngeal and laryngeal squamous cell carcinomas. *Histopathology* **52**, 483–493
- Saussez S, Kiss R (2006): Galectin-7. *Cell Mol Life Sci* **63**, 686–697
- Scherer PE, Lewis RY, Volonte D, Engelman JA, Galbiati F, Couet J, Kohtz DS, van Donselaar E, Peters P, Lisanti MP (1997): Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo. *J Biol Chem* **272**, 29337–29346
- Schwartz LH, Ozsahin M, Zhang GN, Touboul E, de Vataire F, Andolenko P, Lacau-Saint-Guilj J, Laugier A, Schlienger M (1994): Synchronous and metachronous head and neck carcinomas. *Cancer* **74**, 1933–1938

- Scigelova M, Makarov A (2006): Orbitrap mass analyzer - overview and applications in proteomics. *Proteomics* 6 Suppl 2, 16–21
- Shen J, Person MD, Zhu J, Abbruzzese JL, Li D (2004): Protein expression profiles in pancreatic adenocarcinoma compared with normal pancreatic tissue and tissue affected by pancreatitis as detected by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Cancer Res* 64, 9018–9026
- Silvestri GA, Gonzalez AV, Jantz MA, Margolis ML, Gould MK, Tanoue LT, Harris LJ, Detterbeck FC (2013): Methods for staging non-small cell lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 143, e211S-e250S
- Šimundić AM (2009): Measures of diagnostic accuracy: basic definitions. *EJIFCC* 19, 203–211
- Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W (1953): “Field cancerization” in oral stratified squamous epithelium. Clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 6, 963–968
- Sturgis EM, Cinciripini PM (2007): Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: an emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers? *Cancer* 110, 1429–1435
- Sugie S, Mukai S, Yamasaki K, Kamibeppu T, Tsukino H, Kamoto T (2015): Significant association of Caveolin-1 and Caveolin-2 with prostate cancer progression. *Cancer Genomics Proteomics* 12, 391–396
- Talbot SG, Estilo C, Maghami E, Sarkaria IS, Pham DK, O-charoenrat P, Socci ND, Ngai I, Carlson D, Ghossein R et al. (2005): Gene expression profiling allows distinction between primary and metastatic squamous cell carcinomas in the lung. *Cancer Res* 65, 3063–3071
- Thomas M, Gatzemeier U, Goerg R, Matthiessen W, Morr H, Schönfeld N, Ukena D, Stamatis G (2000): Empfehlungen zur Diagnostik des Bronchialkarzinoms. Deutsche Gesellschaft für Pneumologie. *Pneumologie* 54, 361–371
- Travis WD (2011): Pathology of lung cancer. *Clin Chest Med* 32, 669–692
- Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, Chirieac LR, Dacic S, Duhig E, Flieder DB et al. (2015): The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol* 10, 1243–1260
- Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson Å, Kampf C, Sjöstedt E, Asplund A et al. (2015): Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 347, 1260419
- Vachani A, Nebozhyn M, Singhal S, Alila L, Wakeam E, Muschel R, Powell CA, Gaffney P, Singh B, Brose MS et al. (2007): A 10-gene classifier for distinguishing head and neck squamous cell carcinoma and lung squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 13, 2905–2915
- Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kaweckki A, Rottey S, Erfan J, Zabolotnyy D, Kienzer HR, Cupissol D et al. (2008): Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med* 359, 1116–1127
- Vigneswaran N, Williams MD (2014): Epidemiologic trends in head and neck cancer and aids in diagnosis. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 26, 123–141

- Walker RA (2006): Quantification of immunohistochemistry - issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment I. *Histopathology* 49, 406–410
- Wiechen K, Diatchenko L, AgoulNIK A, Scharff KM, Schober H, Arlt K, Zhumabayeva B, Siebert PD, Dietel M, Schäfer R et al. (2001): Caveolin-1 is down-regulated in human ovarian carcinoma and acts as a candidate tumor suppressor gene. *Am J Pathol* 159, 1635–1643
- Wikman H, Seppanen JK, Sarhadi VK, Kettunen E, Salmenkivi K, Kuosma E, Vainio-Siukola K, Nagy B, Karjalainen A, Sioris T et al. (2004): Caveolins as tumour markers in lung cancer detected by combined use of cDNA and tissue microarrays. *J Pathol* 203, 584–593
- Williams TM, Lisanti MP (2004): The caveolin proteins. *Genome Biol* 5, 214
- Williams TM, Lisanti MP (2005): Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis. *Am J Physiol Cell Physiol* 288, C494-506
- Wittekind C (2014): Neue TNM-Klassifikation der Lungentumoren. *Pathologe* 35, 578–585
- Wittekind C: TNM-Klassifikation maligner Tumoren. 8. Auflage. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 2017
- Wolf FF, Bublitz GS, Frigeri HR (2015): Correlation and comparison of immunohistochemistry for HER2/neu, using the antibody SP3 and chromogenic in situ hybridization in breast carcinomas samples. *J Bras Patol Med Lab* 51, 407–414
- Woodman SE, Ashton AW, Schubert W, Lee H, Williams TM, Medina FA, Wyckoff JB, Combs TP, Lisanti MP (2003): Caveolin-1 knockout mice show an impaired angiogenic response to exogenous stimuli. *Am J Pathol* 162, 2059–2068
- Xue J, Chen H, Diao L, Chen X, Xia D (2010): Expression of Caveolin-1 in tongue squamous cell carcinoma by quantum dots. *Eur J Histochem* 54, 99–103
- Yoo SH, Park YS, Kim HR, Sung SW, Kim JH, Shim YS, Lee SD, Choi YL, Kim MK, Chung DH (2003): Expression of caveolin-1 is associated with poor prognosis of patients with squamous cell carcinoma of the lung. *Lung Cancer* 42, 195–202
- Zhang H, Su L, Muller S, Tighiouart M, Xu Z, Zhang X, Shin HJC, Hunt J, Sun SY, Shin DM et al. (2008): Restoration of caveolin-1 expression suppresses growth and metastasis of head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 99, 1684–1694
- Zhao X, Yu G, Yu X, Wang J, Pan X (2016): Caveolin-1 is overexpressed in hypopharyngeal squamous cell carcinoma and correlates with clinical parameters. *Oncol Lett* 12, 2371–2374
- Zhou P, Yu H, Li Weimin (2016): Overexpression of galectin-1 indicates poor prognosis in resected non-small cell lung cancer patients. *Int J Clin Exp Pathology* 12, 12519–12526
- Zhu H, Wu TC, Chen WQ, Zhou LJ, Wu Y, Zeng L, Pei HP (2013): Roles of galectin-7 and S100A9 in cervical squamous carcinoma: clinicopathological and in vitro evidence. *Int J Cancer* 132, 1051–1059
- Zhu X, Ding M, Yu ML, Feng MX, Tan LJ, Zhao FK (2010): Identification of galectin-7 as a potential biomarker for esophageal squamous cell carcinoma by proteomic analysis. *BMC Cancer* 10, 290

Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt Herrn PD Dr. med. Felix Bremmer, der neben der Rolle des Doktorvaters auch die des Betreuers in vorliegender Arbeit übernommen hat. Sein motivierendes Feedback, die kontinuierliche und geduldige Unterstützung und die stets freundliche Zusammenarbeit haben ganz wesentlich zu dem Gelingen der Dissertation beigetragen.

Ein ebenfalls großes Dankeschön geht an Dr. med. Hanibal Bohnenberger für seine tatkräftige Betreuung und Unterstützung im Rahmen der In-vitro-Versuche sowie die stets wertvollen Hinweise und Ratschläge.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Philipp Ströbel, der es mir ermöglicht hat, diese Arbeit in seiner Abteilung durchzuführen.

Für die freundliche Unterstützung in einer sehr angenehmen Atmosphäre danke ich zudem allen beteiligten Mitarbeitern des Zentrums Pathologie der Universitätsmedizin Göttingen.

Zudem bedanke ich mich bei den Mitarbeitern der Medizinischen Klinik II, Hämatologie und Onkologie der Universitätsklinik Frankfurt (Prof. Dr. med. Thomas Oellerich) und denen der „Bioanalytical Mass Spectrometry“ Gruppe am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen (Prof. Dr. Henning Urlaub) für die Durchführung der massenspektrometrischen Versuche.