



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Aus dem Institut für Pathologie der Universität zu Lübeck

Direktorin: Prof. Dr. med. Verena-Wilbeth Sailer

Bedeutung von LSD1 und dem mit LSD1 interagierenden Protein SNAIL in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs (HNSCC)

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- **Aus der Sektion Medizin** -

vorgelegt von

Justus Bottner

aus Hamburg

Lübeck 2025

1. Berichterstatterin:

Prof. Dr. rer. nat. Jutta Kirfel

Kobetreuer

PD Dr. med. Christian Idel

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Armin Steffen

Tag der mündlichen Prüfung:

09.01.2025

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 17.01.2025

Promotionskommission der Sektion Medizin

Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere an Eides statt, die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Benutzung der angegebenen Hilfsmittel sowie ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter, angefertigt zu haben. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Justus Bottner

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals Bereichs	1
1.1.1 Begriffserklärung	1
1.1.2 Epidemiologie	1
1.1.3 Pathogenese und Risikofaktoren	1
1.1.4 Klassifikation und Therapie	3
1.1.5 Prognose	5
1.1.6 Biomarker	6
1.2 LSD1 und SNAIL	6
1.2.1 Einführung Epigenetik	6
1.2.2 LSD1	7
1.2.3 SNAIL	9
1.3 Fragestellung und Hypothesen	10
2 Material	12
2.1 Geräte und Software	12
2.2 Verbrauchsmaterialien	13
2.3 Reagenzien	14
2.3.1 Kits	16
2.4 Zelllinien	16
2.5 Antikörper	17
2.6 Primer	18
2.7 Puffer und Lösungen	18
2.8 Zellkulturmedien	19
2.9 Patientenkollektiv	20
3 Methoden	23
3.1 Immunhistochemie	23
3.1.1 Immunhistochemische Färbung	23
3.1.2 Auswertung	24
3.2 Zellkultur	25
3.2.1 Kultivieren von Zellen	25

3.2.2	Einfrieren und Auftauen.....	26
3.2.3	Mycoplasmatest	26
3.2.4	Cisplatin-Resistenz.....	27
3.2.5	Ernten der Zellen	27
3.2.6	Kernproteinextraktion.....	27
3.2.7	RNA-Extraktion	28
3.3	Western Blot.....	29
3.3.1	SDS-PAGE und Transfer auf Membran.....	29
3.3.2	Blot-Analyse.....	30
3.4	Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR).....	31
3.4.1	Reverse Transkription.....	31
3.4.2	qPCR	33
3.5	Statistische Auswertung.....	36
4	Ergebnisse	38
4.1	LSD1 und SNAIL Expression	38
4.2	Expression nach Gewebetyp	39
4.3	Expression nach Primärlokalisierung.....	39
4.4	Korrelationen mit klinisch pathologischen Daten.....	40
4.5	Koexpression von LSD1 und SNAIL.....	43
4.6	Prognostische Relevanz von LSD1 und SNAIL in HNSCC.....	44
4.7	LSD1 und SNAIL Expression und Therapiesensitivität	47
4.8	LSD1 und SNAIL in HNSCC Zelllinien.....	49
5	Diskussion	51
5.1	Übersicht.....	51
5.2	Kohorte und Färbung.....	51
5.3	Korrelationen mit Patienten- und Tumorcharakteristika	52
5.4	Korrelation mit Patientenüberleben.....	57
5.5	Therapiesensitivität.....	59
5.6	Limitationen und Stärken dieser Arbeit.....	62
5.7	Ausblick	64
6	Zusammenfassung.....	66
7	Quellenverzeichnis	68
7.1	Literaturquellen	68
7.2	Bildquellen	85
8	Anhang.....	86
9	Danksagung.....	94

10	Lebenslauf	95
11	Publikation	96

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - Prinzip der Immunhistochemischen Färbung	23
Abbildung 2 - TMA Auswertung mittels QuPath	25
Abbildung 3 - Prinzip der Proteinanalyse mittels WesternBlot	29
Abbildung 4 - Prinzip der Reversen Transkription.....	31
Abbildung 5 - Prinzip der Polymerase Kettenreaktion Teil 1	33
Abbildung 6 - Prinzip der Polymerase Kettenreaktion Teil 2	34
Abbildung 7 - Beispielhafte Darstellung der immunhistochemischen LSD1 und SNAIL Färbungen	38
Abbildung 8 - LSD1 und SNAIL Expressionsunterschiede nach Gewebetyp.....	39
Abbildung 9 - LSD1 und SNAIL Expressionsunterschiede nach Primärlokalisierung	40
Abbildung 10 - LSD1 und SNAIL Ko-Expression: Beispiel-Cores	43
Abbildung 11 - Überleben nach LSD1 Expression	44
Abbildung 12 - Überleben nach SNAIL Expression	45
Abbildung 13 - Überleben nach LSD1 und SNAIL Expression	46
Abbildung 14 - Western Blot von HNSCC Zelllinien.....	49
Abbildung 15 - LSD1 und SNAIL Expression in HNSCC Zelllinien	50

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 - Geräte und Software	12
Tabelle 2 - Verbrauchsmaterialien	13
Tabelle 3 - Reagenzien	14
Tabelle 4 - Kits	16
Tabelle 5 - Zelllinien	16
Tabelle 6 - Antikörper.....	17
Tabelle 7 - Primer	18
Tabelle 8 - Kohortendaten	21
Tabelle 9 - LSD1 Expression nach Lokalisation und Tumorcharakteristika	41
Tabelle 10 - SNAIL Expression nach Lokalisation und Tumorcharakteristika.....	42
Tabelle 11 - Assoziation von LSD1 und SNAIL in primären HNSCC.....	43
Tabelle 12 - Assoziation von LSD1 und SNAIL in allen Geweben	43
Tabelle 13 - Rezidiv-freies Überleben in HNSCC mit Chemotherapie nach LSD1 und SNAIL Expression	47
Tabelle 14 - Rezidiv-freies Überleben in HNSCC mit Radiotherapie nach LSD1 und SNAIL Expression	48
Appendix 1 - Univariate und Multivariate Cox-Regression des Rezidiv-freien Überlebens nach LSD1-Expression in Hypopharynxtumoren.....	86
Appendix 2 - Univariate und Multivariate Cox-Regression des Gesamtüberlebens nach SNAIL- Expression in HNSCC	87
Appendix 3 - Univariate und Multivariate Cox-Regression des Rezidiv-freien Überlebens nach SNAIL-Expression in HNSCC.....	88
Appendix 4 - Univariate und Multivariate Cox-Regression des Rezidiv-freien Überlebens nach SNAIL-Expression in Hypopharynxtumoren	89
Appendix 5 - Univariate und Multivariate Cox-Regression in HNSCC mit Chemotherapie nach LSD1 und SNAIL Expression.....	90
Appendix 6 - Univariate und Multivariate Cox-Regression in HNSCC mit Radiotherapie nach SNAIL Expression	91
Appendix 7 - Univariate und Multivariate Cox-Regression in HNSCC mit Radiotherapie nach LSD1 und SNAIL Expression.....	92

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	DPBS	Dulbeco's phosphate buffered saline
µg	Mikrogramm	DTT	Dithiothreitol
µl	Mikroliter	E. coli	Escherichia coli
µm	Mikrometer	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
µM	Mikromolar	EGFR	Epithelial growth factor receptor
95%-Konf.	95%-iges Konfidenzintervall	ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ATP	Adenosintriphosphat	EMEM	Eagle's modified essential medium
BCA	Bicinchoninsäure	EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
BSA	Bovines Serumalbumin	ER	estrogen receptor (Östrogenrezeptor)
bzw.	beziehungsweise	FAD	Flavin-Adenin Dinukleotid
C	Kohlenstoff	FBS	Fötale Kälberserum
CBP	CREB-Binding Protein	g	Maß der Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
CC1/2	Cell Conditioning Solution 1/2	GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure	GPER	G-Protein gekoppelter Östrogenrezeptor
CER I/II	cytoplasmatic extraction reagent I/II	h	Stunde(n)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid	H ₂ O	Wasser
CoREST	REST corepressor 1	H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
CREB	Cyclic adenosine monophosphate Response Element Binding protein	HCl	Salzsäure
Ct-Wert	cycle threshold-Wert	HDAC	Histon-Deacetylase
DAB	Diaminobenzidin	HIF	Hypoxie induzierbare(r) Faktor(en)
DEPC	Diethylpyrocarbonat	HNSCC	Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs
dest.	destiliert	HPSCC	HNSCC des Hypopharynx
DMEM	Dulbeco's modified Eagle Medium	HPV	Humanes Papillomavirus
DMSO	Dimethylsulfoxid	HQ	Hydroxyquinoxalin
DNA	Desoxyribonukleinsäure	HRP	horseradish peroxidase (Meerretticheroxidase)
DNMT1	DNA-Methyltransferase 1		
dNTP	Desoxynukleinsäure-Triphosphat		

Abkürzungsverzeichnis

IHC	Immunhistochemie	PD-1	Programmed cell death protein 1
J.	Jahre		
K	Lysin	PD-L1	Programmed cell death 1 Ligand 1
kDa	kilo-Dalton	pos.	Positiv
l	Liter	PVDF	Polyvinylidenfluorid
LDS	Lithiumdodecylsulfat	qPCR	quantitative Polymerase Kettenreaktion
LK-Metastasen	Lymphknotenmetastasen		
LSCC	HNSCC des Larynx	R/M-HNSCC	rezidierte oder metastasierte HNSCC
LSD1	Lysin-spezifische Demethylase 1	RB1	retinoblastome protein 1
MET	Mesenchymal-epitheliale Transition	REST	RE1-silencing transcription factor
min	Minute(n)	RFS	Rezidiv-freies Überleben
ml	Milliliter	RNA	Ribonukleinsäure
mm	Millimeter	rpm	Umdrehungen pro Minute
mM	Millimolar		
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid	RT-qPCR	Reverse-Transkriptase quantitative Polymerase Kettenreaktion
		SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat
N	Stickstoff	sek	Sekunde
NaOH	Natriumhydroxid	siRNA	small interfering RNA
neg.	negativ	sog.	sogenannte
NER	nuclear extraction reagent	SSIV	SuperScript™ IV
		TBP	TATA-Box bindendes Protein
NES	nuclear export sequence		
ng	Nanogramm	TBS (Puffer Saline)	Tris buffered saline
NIR	near infrared (light)		
nm	Nanometer	TBS-T	Tris buffered saline (Puffer Saline) mit Tween® 20
NuRD	Nucleosome Remodeling Deacetylase	TCGA	The cancer genome atlas
OPSCC	HNSCC des Oropharynx	TCP	Tranylcypromin
OS	overall survival (Gesamtüberleben)	TMA	Tissue-Microarray
		TNM-Stadien	Einteilung von malignen Tumoren (T=Tumor, N=Nodes/Lymphknoten, M=Metastasen)
OSCC	HNSCC der Mundhöhle		
PAGE	Polyacrylamid-gelelektrophorese		
PCC	Pearsons Korrelationskoeffizient	TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

UICC-Stadien	Tumorklassifikation nach Einteilung durch die Union Internationale Contre le Cancer	V z.B. ZNF	Volt zum Beispiel Zinkfinger
--------------	---	------------------	------------------------------------

1 Einleitung

1.1 Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals Bereichs

1.1.1 Begriffserklärung

Plattenepithelkarzinome machen mehr als 90% der Tumore im Kopf-Hals Bereich aus (1). Es handelt sich hierbei um eine heterogene Tumorgruppe, die aus Schleimhautepithelzellen der Mundhöhle, des Larynx, des Oropharynx und des Hypopharynx entsteht und im Englischen mit dem Ausdruck „head and neck squamous cell carcinoma“ (HNSCC) zusammengefasst wird (2).

1.1.2 Epidemiologie

Mit rund 890.000 neuen Fällen und 450.000 Toden jährlich stellt HNSCC die weltweit sechsthäufigste Tumorentität dar und bis 2030 wird ein weiterer Anstieg der Inzidenz um 30% erwartet (2–4). Betroffen sind insbesondere ältere Patienten und Männer, welche ungefähr doppelt so häufig an HNSCC erkranken wie Frauen (2). Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei circa 63 Jahren (5).

Die Inzidenz unterliegt teilweise starken regionalen Unterschieden. Die Regionen mit den höchsten HNSCC Inzidenzen sind Südostasien, Ozeanien und Osteuropa (3). In Deutschland liegt die jährliche Inzidenz bei circa 17.000, was einer Erkrankungsrate im europäischen Durchschnitt entspricht (5). Zudem unterscheidet sich die Verteilung der verschiedenen HNSCC Sublokalisationen in Abhängigkeit der geographischen Lage. So zeigt sich in Südostasien und Ozeanien eine deutlich höhere Rate an Mundhöhlenkarzinomen, während in Westeuropa und den USA seit Jahren insbesondere der Anteil der Oropharynxtumore zu- und der Anteil der Mundhöhlen- und Larynxtumore abnimmt (6,7). Dies lässt sich am ehesten durch die unterschiedliche Exposition gegenüber verschiedenen Risikofaktoren erklären (1).

1.1.3 Pathogenese und Risikofaktoren

Diverse Risikofaktoren, welche die Entstehung von HNSCC begünstigen sind bereits bekannt. Hierzu zählen neben dem Konsum von Alkohol und Tabak auch eine Ernährung, die wenig Obst und Gemüse beinhaltet und der Konsum von Areca-Nuss Produkten, als auch Infektionen durch Viren wie dem Epstein-Bar-Virus und dem humanen Papillomavirus (HPV) (8–14). Insbesondere die Infektion mit HPV rückte hierbei in vergangenen Jahren in den Fokus der Forschung, da der Einfluss dieser auf die Krebsentstehung sich als weitgehend unabhängig von anderen Risikofaktoren zeigte (15). Die Assoziation mit HPV spielt vornehmlich in oropharyngealen HNSCC

eine Rolle (15,16). HPV-positive Tumore zeigen hier eine signifikant bessere Prognose, weswegen der HPV-Nachweis 2018 von der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) für die Klassifikation von Oropharynx Tumoren aufgenommen wurde und seither zwischen HPV-positiven und HPV-negativen Tumoren als separaten Entitäten unterschieden wird (15,17). Die günstigere Prognose von HPV-positiven gegenüber HPV-negativen Oropharynxtumoren scheint jedoch auch von dem zusätzlichen Einfluss anderer Risikofaktoren wie Tabakkonsum abhängig zu sein. So konnten Elhalawani et al. bei Patienten, welche mehr als 30 pack years vorwiesen, keinen signifikanten Unterschied zwischen HPV-positiven und HPV-negativen Oropharynxtumoren nachweisen (18).

HPV-positive HNSCC betreffen vornehmlich jüngere Patienten. Das durchschnittliche Alter bei Erkrankungsbeginn liegt bei circa 58 Jahren (19). Die HPV-Infektionen, welche zu HNSCC führen, stellen einen frühen Schritt in der Tumorgenese dar (2). Die virale DNA beinhaltet sieben frühe (*E1-7*) und 2 späte Gene (*L1-2*), welche gleichnamige Proteine kodieren (20). *E1-5* sind größtenteils für die Replikation des Virus verantwortlich und *L1-2* stellen Bestandteile der viralen Kapsel dar, während *E6* und *E7* essenziell an der onkogenen Wirkung des Virus beteiligt sind und zu einer Transformation der Wirtszelle führen. *E6* bildet hierbei einen Komplex mit dem Tumorsuppressor *p53* und fördert dessen Degradation (20,21). *E7* bindet an den Zellzyklusregulator *RB1* (retinoblastome protein 1) und führt zu dessen Destruktion und so zur Freisetzung von *E2F* Transkriptionsfaktoren, was wiederum den Zellzyklus vorantreibt (20,22). Die Beeinträchtigung von *RB1* durch *E7* hat über Feedbackzyklen eine vermehrte Expression des Tumorsuppressors *p16* zur Folge. Aufgrund dieser Erhöhung von *p16* durch HPV Proteine wird *p16* klinisch oft als Surrogatparameter für HPV-Positivität verwendet (20,23,24).

Im Gegensatz hierzu ist die Genese von HPV-negativen HNSCC deutlich heterogener. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 66 Jahren und Tabak- und Alkoholkonsum stellen die Hauptrisikofaktoren dar (2,8). Die darin enthaltenen Karzinogene führen zu lokaler Entzündungsreaktion und damit zu einer Ausschüttung von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren, welche die Proliferation und schlussendlich auch die Karzinogenese vorantreiben (2). Zudem kommt es zu einer vermehrten Formation von reaktiven Metaboliten, welche DNA-Schäden generieren (2,25). Wenn diese durch Reparaturmechanismen nicht kompensiert werden können, kommt es zu bleibenden Schäden in Form von Mutation, Deletion oder Amplifikation. Diese Schäden akkumulieren und betreffen unter anderem Tumorsuppressorgene wie *TP53* und *CDKN2A* welche für *p53* und *p16* kodieren (2).

Hinzu kommen eine Reihe von genetischen und epigenetischen Alterationen, welche zum Teil eine familiäre Häufung zeigen und die Entstehung und Progression von HNSCC begünstigen. Die am häufigsten von Mutation betroffenen Gene in HNSCC sind *TP53* und *CDKN2A*, wobei

hauptsächlich HPV-negative Tumore diese aufweisen (2,26). Das Risiko der HNSCC Entstehung bei Mutationsträgern wird insbesondere durch Tabakkonsum verstärkt. Des Weiteren zeigen sich fokale Amplifikationen von Genen die Rezeptor-Tyrosinkinasen kodieren (26). Hierzu gehört unter anderem das Epithelial growth factor receptor (*EGFR*) kodierende Gen, welches in circa 80-90% aller HNSCC überexprimiert und hier mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (27,28).

Auch auf epigenetischer Ebene zeigen sich gehäuft Veränderungen, die mit HNSCC in Verbindung stehen. Diese beinhalten die Hypermethylierung von DNA z.B. in Bereichen der Tumorsuppressorgene *CDKN2A*, *RARB* und *MGMT*, welche zu einer Herabregulation dieser führen (29,30).

1.1.4 Klassifikation und Therapie

Die Stadieneinteilung von HNSCC erfolgt nach der Klassifikation der UICC, welche auf, für die Sublokalisierungen und Tumorentitäten spezifischen Kriterien beruht und sich in der aktuell gültigen Fassung in der 8. Auflage befindet (17). Maßgeblich gehört hierzu die TNM-Klassifikation der Tumore, welche die Ausdehnung des Primärtumors (T: Tumor), sowie das Vorhandensein oder Fehlen von Lymphknotenmetastasen (N: node; lymph nodes metastasis) bzw. Fernmetastasen (M: metastasis; distant metastasis) beschreibt.

Operative Entfernung, Radiotherapie und Chemotherapie stellen die aktuelle Standardtherapie für HNSCC dar (2). Die Auswahl der jeweiligen Modalität basiert hierbei maßgeblich auf dem Stadium des Tumors, sowie dessen Lokalisation und den, durch die Therapie zu erwartenden, Nebenwirkungen (2,31). Im Allgemeinen werden Tumore, die sich in frühen Stadien befinden, in Abhängigkeit von der Zugänglichkeit des Tumors meist mittels operativen Eingriffs oder primärer Radiotherapie behandelt. Fortgeschrittene Tumore werden ebenfalls abhängig von der Größe, Lokalisation und Erreichbarkeit des Tumors primär chirurgisch und anschließend je nach Risikoprofil mittels adjuvanter Radio-, Chemo- oder kombinierter Radio-Chemotherapie behandelt. Platinbasierte Therapeutika wie Cisplatin oder Carboplatin stellen hierbei die standardmäßige Chemotherapie dar (2,31). Sollte eine operative Entfernung nicht oder nur mit erheblichen Funktionseinbußen möglich sein, ist eine primäre Radio-Chemotherapie indiziert (2,31).

Unter anderem basierend auf der 2008 veröffentlichten EXTREME-Studie, wurde mit Cetuximab ein EGFR-Inhibitor für die Therapie von rezidierten oder metastasierten HNSCC (R/M-HNSCC) zugelassen und dabei in Kombination mit platinbasierter Chemotherapie verwendet (32). Eine bessere Prognose durch Kombinationstherapie mit Cetuximab in R/M-HNSCC konnte zudem in weiteren Studien auch in anderen Therapieregimen gezeigt werden (33–36). Cetuximab erhöht

des Weiteren die Sensitivität für Radiotherapie (37). Es zeigte sich jedoch in niedrig Risiko HPV-positiven HNSCC, dass die Verwendung einer Kombination von Radiotherapie und Cetuximab, der Radio-Chemotherapie mit Cisplatin unterlegen ist, weswegen Cetuximab hier lediglich in den Fällen eine Option darstellt, in denen platinbasierte Chemotherapie nicht angewendet werden kann oder keinen Erfolg bringen konnte (38).

Die Ergebnisse der CheckMate-141 Studie zeigten, dass die Inhibition der PD-1/PD-L1 Interaktion eine weitere Therapieoption in HNSCC darstellt und führten zu der Zulassung von Nivolumab (39). Die Interaktion von PD-1 und PD-L1 ist an der Regulation der Abwehrreaktion auf den Tumor beteiligt. PD-1 ist ein Inhibitor der angeborenen und erworbenen Immunantwort und z.B. auf aktivierten T-Zellen exprimiert. Die Interaktion mit PD-L1 führt zu einer verminderten Aktivierung und Proliferation von Immunzellen. Einige Tumoren exprimieren PD-L1 auf ihrer Oberfläche und entgehen so der körpereigenen Immunantwort (40). Die Inhibition der Interaktion kann diesen Mechanismus aufheben. Erweitert wurde diese Therapieoption durch die Einführung von Pembrolizumab, einem weiteren Inhibitor der PD-1 / PD-L1 Interaktion (41). Beide Therapeutika sind als Ergänzungstherapie für Cisplatin-refraktäre Tumore zugelassen, wobei Nivolumab in Kombination mit oder nach Cisplatin-Gabe, Pembrolizumab auch in fortgeschrittenen, nicht resezierbaren und bereits metastasierten Tumoren als Monotherapie eingesetzt werden kann (39,41,42).

Ein weiterer 2020 in Japan zugelassener Therapieansatz basiert auf der Verwendung von sog. Photosensitizern, welche an EGFR-Antikörper gebunden werden (36,43). Anschließend folgt eine Bestrahlung mit Licht, dessen Wellenlänge von 690nm nahe dem Infrarotspektrum liegt und daher near infrared light (NIR) genannt wird. Durch das Zusammenspiel der Photosensitizer und dem NIR kommt es so zu vermehrtem Untergang der Tumorzellen.

Auch die Inhibition von epigenetischen Mechanismen, wie der Methylierung von DNA oder der Acetylierung von Histonen, welche an der Progression von HNSCC beteiligt sind, sind aktuell Gegenstand der Forschung und zeigen insbesondere in Kombination mit Standardtherapeutika vielversprechende Ergebnisse (44).

Hinzu kommen präventive Ansätze. Hier spielt neben der Vermeidung von Risikofaktoren wie Alkohol und Tabak insbesondere die HPV-Impfung eine Rolle und stellt einen Weg dar, der steigenden Anzahl an HPV-positiven HNSCC zu begegnen (45).

Trotz neuer Therapieansätze und der Weiterentwicklung etablierter Standardtherapien ist die moderate Verbesserung der Prognose innerhalb der letzten Jahrzehnte zu großen Teilen auf die Zunahme des Anteils von HPV-assoziierten HNSCC zurückzuführen (2,31,46).

1.1.5 Prognose

Lediglich 40-50% aller HNSCC Patienten überleben die ersten 5 Jahre nach Erstdiagnose (46). Dies liegt mitunter daran, dass Tumore oft lange unentdeckt bleiben und erst in bereits fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert werden. Rund zwei Drittel aller HNSCC präsentieren sich bei der Erstdiagnose in UICC Stadien III oder IV von denen nur rund 30% die ersten zwei Jahre nach der Diagnose überleben und circa die Hälfte ein Rezidiv entwickeln (31). Die Prognose von Patienten mit HNSCC in niedrigeren Stadien (UICC I/II) ist erheblich besser und zeigt eine 5-Jahres Überlebensrate von rund 75% (47).

Die Prognose unterscheidet sich zudem in Abhängigkeit von der Lokalisation des Tumors, wobei jene hypopharyngealen Ursprungs die schlechteste aufweisen. Bedingt ist dies dadurch, dass Hypopharynx Tumore öfter erst spät entdeckt werden und schlechter auf Radio-Chemotherapie ansprechen als andere HNSCC (48).

Neben dem Stadium des Tumors und der Sublokalisierung ließen sich Zusammenhänge zwischen weiteren klinischen Faktoren beobachten. Hierzu zählen der Tabak- und Alkoholkonsum der Patienten, das Alter bei Erkrankung und der HPV-Status (8,15,49,50). Raucher und Patienten, die Alkohol konsumieren weisen eine ungünstigere Prognose auf, wobei der negative Effekt mit der Menge korreliert und sich bei starkem Alkohol sowie gleichzeitigem Tabakkonsum gegenseitig potenziert (8). Zudem haben ältere Patienten eine schlechtere Prognose (49,50). Ang et al. zeigten, dass HPV-positive Oropharynx Tumore eine rund 60% niedrigere Wahrscheinlichkeit hatten binnen 5 Jahren zu versterben oder ein Rezidiv zu entwickeln (51). Auch nach Korrektur für andere prognostisch relevante Faktoren, wie der unterschiedlichen Exposition gegenüber Risikofaktoren, dem Erkrankungsalter, die sich zwischen HPV-positiven und HPV-negativen Tumoren unterscheiden, und dem Tumorstadium, beträgt dieser Unterschied noch rund 50%. Einige Studien legten eine prognostische Relevanz einer HPV-Assoziation neben HNSCC des Oropharynx in Tumoren anderer Primärlokalisationen nahe (52–54).

Auch jene Patienten, welche die Tumorerkrankung als solche überleben, berichten oft schwerwiegende Einschnitte in die Lebensqualität, die als Folgen und Nebenwirkungen der Krankheit und der Therapie zurückbleiben. Bedingt durch die Lokalisation des Tumors sind hier Mundtrockenheit, Dysphagie und Stimmveränderungen, sowie chronische Schmerzen und sichtbare und teils entstellende Narben häufig resultierende Beschwerden (2,16,55,56). Die Gravität dieser Einschnitte wird auch dadurch unterstrichen, dass HNSCC Patienten die zweithöchste Suizidrate unter Überlebenden von Tumorerkrankung aufweisen (57).

1.1.6 Biomarker

Die oft ungünstige Prognose und die oft erheblichen Einschränkungen der Lebensqualität, welche HNSCC Patienten aufgrund der Therapien erfahren, heben den großen Bedarf an prognostischen und prädiktiven Biomarkern hervor, die eine frühzeitige Stratifizierung und adäquate Auswahl der Therapie erlauben.

Trotz der oben beschriebenen günstigeren Prognose und dem, im Allgemeinen, besseren Ansprechen auf Therapien von HPV-positiven Tumoren, ist eine Deeskalation der Therapie bei diesen nach aktuellem Stand nicht sinnvoll. Diese führe, laut einer 2017 durchgeführten retrospektiven Studie von Cheraghlou et al., zu einem signifikant schlechteren Gesamtüberleben (58).

Eine Überexpression der Rezeptor-Tyrosinkinase EGFR konnte mit einer schlechteren Prognose in Verbindung gebracht werden (28). Zudem legen aktuelle Ergebnisse nahe, dass eine erhöhte PD-1 Expression in HNSCC ein besseres Ansprechen auf eine Inhibition der PD-1 / PD-L1 Interaktion vorhersagt (39,59).

Diverse weitere prognostische und prädiktive Marker, welche z.B. mit Metastasierung oder Stammzellcharakteristika wie Therapieresistenz assoziiert sind, werden zudem diskutiert (60). Das Spektrum der Marker, die eine Stratifizierung bezüglich der Prognose oder der Therapiesensitivität zulassen bleibt jedoch stark limitiert und eine Anwendung in der klinischen Routine blieb bisher gänzlich aus.

1.2 LSD1 und SNAIL

1.2.1 Einführung Epigenetik

Neben genetischen Veränderungen rückten in den letzten Jahren und Jahrzehnten auch epigenetische Mechanismen und Veränderungen in den Fokus der Krebsforschung. Mittlerweile sind diverse epigenetische Alterationen bekannt, die zur Tumorentstehung und -progression beitragen (47,61,62). Hierbei handelt es sich weitestgehend um Modifikation der Chromatinelemente und -struktur, welche einen Einfluss auf die Transkription betroffener Gene zur Folge hat.

Chromatin ist die kondensierte Form der DNA, deren Basiseinheit das Nukleosom darstellt. Dieses besteht aus Histonen, um die ein DNA-Abschnitt von rund 147bp Länge gewickelt ist. Histone sind Oktamerproteine, welche aus je zwei Kopien der vier Histonproteine H2A, H2B, H3, H4 bestehen (63,64).

Das Chromatin und der Nukleosomenkomplex unterliegen physiologischerweise stetig Modifikation, um das Chromatin aufzulockern und die entsprechende DNA für Transkriptionsprozesse zugänglich zu machen (64). Zu den Modifikationen der Nukleosomen und des Chromatins zählen die Methylierung von DNA, sowie die kovalente Modifikation von Histonproteine und nicht-kovalente Remodelierung von Chromatin (62).

Die Methylierung von DNA erfolgt an CpG-Dinukleotiden, spielt insbesondere in Promotorregionen eine entscheidende Rolle bei der Regulation von Transkriptionsprozessen und ist in Tumorzellen häufig verändert (44,65).

Mindestens 16 verschiedene kovalente Veränderung an Histonen sind bereits bekannt, von denen Methylierung, Acetylierung und Phosphorylierung die prominentesten und am weitesten erforschten darstellen (62). Die Bindung und Entfernung solcher Gruppen unterliegt einem stetigen Gleichgewicht und erfolgt durch Gegenspieler, die sich im Allgemeinen als Writer (binden Gruppen an Histone) und Eraser (entfernen diese) bezeichnen lassen (66).

Die kovalente Bindung einer Phosphoryl- oder Acetylgruppe neutralisiert die positive Ladung des Histons, schwächt so die Bindung zwischen DNA und dem Histon und führt daher zu einer Auflockerung der lokalen Chromatinstruktur, welche Gentranskription begünstigt (44,67). Die Methylierung von Histonen ändert deren Ladung nicht. Sie erfolgt an Lysin, Arginin oder Histidinresten, welche teilweise Mono-, Di-, oder Trimethyliert vorliegen können und entsprechend ihrer Lokalisation und ihres Methylierungsstatus zu einer Genaktivierung oder -repression führen (68). Der Modifikationsstatus der Histone kann durch sog. Reader detektiert werden, welche anschließend direkt oder indirekt Einfluss auf die Transkription oder die DNA-Reparatur nehmen (69).

Überexpressionen und Mutationen, welche Einfluss auf die Aktivität der Histon-modifizierenden Enzyme haben zeigen sich in einer Reihe von Tumorentitäten (44,70–74).

1.2.2 LSD1

Die Lysin-spezifische Demethylase 1 (LSD1) wurde erstmalig 2004 durch Shi et al. identifiziert (75). Es handelt sich hierbei um eine 852 Aminosäuren lange FAD (Flavin-Adenin Dinukleotid)-abhängige Aminoxidase mit einem spezifischen Gewicht von rund 110kDa. LSD1 besteht aus drei funktionalen Domänen: eine SWIRM Domäne (Aminosäuren 172-270), welche Teile der katalytischen Tasche bildet, einer TOWER Domäne (Aminosäuren 417-521), welche der Bindung mit etwaigen Interaktionspartnern dient und einer zweigeteilten AO Domäne (Aminosäuren 271-416 und 522-852), welche ebenfalls Teile der katalytischen Tasche bildet und die FAD Bindestelle

darstellt (76). Die N-Terminale Region ist des Weiteren wichtig, um die nukleäre Lokalisation von LSD1 mitzuregulieren (76,77).

LSD1 demethyliert spezifisch mono- oder dimethyliertes Lysin K4 oder K9 am Histon H3 (H3K4me1/2, H3K9me1/2) und führt damit kontextabhängig zu einer Genaktivierung (H3K9me1/2) oder -repression (H3K4me1/2) (78,79).

Neben der Demethylierung an Histonen konnten auch nicht-Histon Proteine als Substrat von LSD1 identifiziert werden. So führt die Demethylierung von p53, E2F1 oder DNMT1 (DNA-Methyltransferase 1) durch LSD1 z.B. zu einer Modulation der Aktivität oder einer Stabilisierung des jeweiligen Proteins (76,80–82).

Hierbei wird die demethylierende Aktivität von LSD1 an Histonen und nicht-Histon Proteinen durch die Interaktion mit anderen Proteinen oder Komplexen reguliert und scheint hierfür essenziell zu sein. Beispielsweise stellen die CoREST (REST corepressor 1) oder NuRD (Nucleosome remodeling deacetylase) Proteinkomplexe Interaktionspartner bei der Demethylierung von H3K4me1/2 dar (83,84).

Die Interaktion mit dem Androgenrezeptor verändert die Spezifität von LSD1 von H3K4me1/2 zu H3K9me1/2 und bewirkt somit eine Genaktivierung (85). Die Änderung der Spezifität basiert auf einer hormonabhängigen Phosphorylierung von Threonin 6 an Histon H3 durch die Proteinkinase β (86). Neben Androgenrezeptoren interagiert LSD1 auch mit anderen Hormonrezeptoren wie dem Östrogenrezeptor ER α und führt auf diesem Wege kontextabhängig zu einer Genaktivierung oder Genrepression (79,87).

Einen weiteren Interaktionspartner von LSD1 stellen Transkriptionsfaktoren wie TLA und SNAIL dar, die LSD1 zum jeweiligen Substrat rekrutieren (79,88).

Durch die Demethylierung von Histonen und nicht-Histon Proteinen übt die LSD1 Aktivität Einfluss auf Prozesse der Tumorentstehung und Progression aus. Hierzu gehören die Zellproliferation und Differenzierung, die Regulation von Therapieresistenz und anderer Stammzellcharakteristika, das EMT (Epithelial-mesenchymale Transition) -Geschehen, die Methylierung von DNA und die Angiogenese (76,81,89–94).

In diversen Tumorentitäten, wie Brust- und Prostatakarzinomen, Tumoren des Ösophagus, der Blase und der Lunge, sowie einigen HNSCC Subgruppen wie denen der Mundhöhle (OSCC) konnte eine Überexpression von LSD1 gezeigt werden und ist hier meist mit einem fortgeschrittenem Tumorstadium, einer erhöhten Zellproliferation, einem vermehrtem Metastasierungsgeschehen und einer schlechteren Prognose assoziiert (95–100).

Angesichts dieser weitgehenden Involvierung in maligne Prozesse liegt es nahe, dass LSD1 ein potenzielles Ziel in der Tumorthherapie darstellt. Tatsächlich zeigte die Inhibition der LSD1 Aktivität durch kovalente und nicht-kovalente Inhibitoren *in vitro* Experimenten und Mausmodellen

vielversprechende Ergebnisse. Hier zeigte sich z.B. eine verminderte Tumorzeldifferenzierung, -proliferation, -invasion und -migration als auch verbessertes Ansprechen auf Chemo- oder Immuntherapie (92,101–104).

Die Effektivität und ihre klinische Anwendbarkeit einiger LSD1 Inhibitoren werden derzeit in klinischen Studien getestet (105).

1.2.3 SNAIL

SNAIL ist ein 264 Aminosäuren langer Transkriptionsfaktor, der als Genrepressor fungiert (106). Das SNAIL Protein besteht aus einer N-terminalen SNAG Domäne, welche die Interaktion mit anderen Proteine wie HDAC1/2 (Histon Deacetylase 1/2) oder dem CoREST/LSD1 Komplex ermöglicht, einer Serin reichen (SR) Domäne, die der Stabilität des Proteins dient, einer nukleären Export Sequenz (NES) , welche den Transport des Transkriptionsfaktors in den Zellkern reguliert und einer aus 4 Zinkfingern (ZNF) bestehenden C-terminalen ZNF Domäne, die an der spezifischen Bindung an die DNA beteiligt ist (106,107).

SNAIL ist maßgeblich in die Tumorprogression involviert, indem durch SNAIL regulierte Genrepression Rezidivierung, Metastasierung und Invasivität von Tumoren vorangetrieben und die Ausbildung von Stammzellcharakteristika und Therapieresistenz gefördert werden (108). SNAIL nimmt hierbei unter anderem eine Schlüsselrolle bei der Induktion der epithelial-mesenchymalen Transition ein (109). EMT ist ein Prozess, bei dem epitheliale Zellen ihre Polarität verlieren, verstärkt mesenchymale Charakteristika annehmen und so z.B. migrieren können (110). Die Wirkweise von SNAIL im Kontext der EMT-Induktion basiert z.B. auf der Repression von Zelladhäsionsmolekülen wie Claudinen und Occludinen, insbesondere jedoch E-Cadherin (109,111). Die Repression von E-Cadherin stellt ein zentrales Merkmal des EMT Geschehens dar (112).

In Brustkrebszellen konnte gezeigt werden, dass SNAIL für das Tumorwachstum und die Ausbildung von Lymphknotenmetastasen (LK-Metastasen) notwendig ist (113). Eine Überexpression von SNAIL wurde zudem beispielsweise in Ovarial-, Brust-, Blasen- und endometrialen Karzinomen, sowie hepatozellulären Tumoren und einigen HNSCC, wie denen des Hypopharynx und des Larynx beobachtet (114–120). In diesen Tumoren besteht eine Assoziation der SNAIL Überexpression mit fortgeschrittenem Tumorstadium, Metastasierung sowie einer schlechteren Prognose in Bezug auf das Überleben und die Entwicklung von Rezidiven (114–120). Umgekehrt führt der Knockdown von SNAIL in Tumorzellen zudem zu vermindertem Tumorwachstum, Migration und einem verbesserten Therapieansprechen (121).

SNAIL übt seine Funktion als Genrepressor über die Rekrutierung von anderen Proteinen aus. Zu diesen Interaktionspartnern gehören der HDAC1/2 Komplex, der Polycomb repressive complex 2 sowie der LSD1/CoREST Komplex (88,122,123).

Das Zusammenspiel von SNAIL und LSD1 ist hierbei essenziell für Vermittlung der E-Cadherin Repression (124). Entsprechend beeinträchtigt eine Herunterregulierung der LSD1 Expression die repressive Wirkung von SNAIL (124). Die SNAG Domäne des SNAIL Proteins ähnelt strukturell dem Histon H3, ermöglicht so die Interaktion von LSD1 und SNAIL und rekrutiert LSD1 an die E-Cadherin Promotorregion (88). Die physische Interaktion wurde mittels Immunpräzipitation in Brustkrebszellen festgestellt und eine Ko-Expression beider Proteine in Patientenproben stellte sich ebenfalls in Gewebeschnitten von Brustkarzinomen dar (88).

Die Inhibition von SNAIL regulierten Prozessen stellt durch dessen zentrale Funktion in der Tumorprogression, beispielsweise als Sensitizer in Kombination mit bestehenden Therapieoptionen ein interessantes Konzept dar. Bisherige Ansätze fokussieren sich auf die Hemmung der Interaktion von SNAIL mit entsprechenden Interaktionspartnern, der Regulierung der SNAIL Expression durch Veränderung dessen post-translationaler Modifikationen oder der Inhibition der Bindung von SNAIL an die entsprechenden Promotorregionen. Entsprechende Substanzen wie CYD19, GN-25 oder Co (III)-E-box zeigen vielversprechende Ergebnisse. Jedoch bedarf es hier noch weiterer Forschung und Entwicklung in Bezug auf die klinische Anwendbarkeit solcher Substanzen (125–128).

1.3 Fragestellung und Hypothesen

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass HNSCC eine häufige Tumorerkrankung darstellen, welche eine ungünstige Prognose aufweist und die Lebensqualität betroffener Patienten stark beeinträchtigt. Tumore werden oft spät entdeckt und trotz stetiger Bemühungen besteht im Allgemeinen weiterhin der dringende Bedarf nach Biomarkern, die eine Risikostratifizierung der Tumore ermöglichen und die Auswahl der Therapiemodalität erleichtern.

Die Rolle der Histondemethylase LSD1 und des, mit LSD1 interagierenden Transkriptionsfaktors SNAIL wurde bereits in diversen Tumorentitäten untersucht und korrelieren hier meist mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium, einer ungünstigen Prognose sowie einem schlechteren Ansprechen auf verschiedenen Therapien. Obwohl teilweise auch Studien der Bedeutung von LSD1 und SNAIL in HNSCC vorliegen, beschränken sich diese auf einzelne HNSCC Subgruppen oder betrachten HNSCC gesammelt als eine Entität. Eine Untersuchung der Ko-Expression von LSD1 und SNAIL sowie der kombinierten Betrachtung beider Marker liegt in HNSCC Tumoren bisher nicht vor.

Die hier durchgeführte Arbeit soll den bisherigen Kenntnisstand bezüglich der Bedeutung von LSD1 und SNAIL in HNSCC ergänzen und erweitern und dabei folgende Fragen beantworten:

- Lassen sich die Ergebnisse bisheriger Publikationen bezüglich der Bedeutung der LSD1 und SNAIL Expression, wie deren Korrelation mit Tumorstadium und klinischen Merkmalen in HNSCC Tumoren, an der vorliegenden Kohorte bestätigen?
- Könnten LSD1 und SNAIL als prognostische Biomarker in HNSCC Tumoren dienen?
- Unterscheidet sich die Bedeutung von LSD1 und SNAIL zwischen HNSCC Subgruppen?
- Werden LSD1 und SNAIL Tumorgewebe von HNSCC Patienten ko-exprimiert?
- Bietet eine kombinierte Betrachtung von LSD1 und SNAIL einen Vorteil bezüglich der Stratifizierung von Tumoren gegenüber der isolierten Betrachtung jedes Proteins für sich?
- Besteht ein Zusammenhang der LSD1 und SNAIL Expression mit Therapieresistenz?

2 Material

2.1 Geräte und Software

Tabelle 1 - Geräte und Software

Gerät	Hersteller
Amersham™ Imager 600	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden
Centrifuge 5427 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5430 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5810	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
CK2-TR (inverses Mikroskop)	Olympus Optical Co Ltd., Shinjuku, Tokyo, Japan
CO2 Incubator ICO240	Memmert GmbH & Co. KG, Büchenbach, Deutschland
Eismaschine	Manitowoc Ice Inc., Manitowoc, WI, USA by Welbilt Inc., New Port Richey, FL, USA
HERAsafe HS 12 Sicherheitswerkbank	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Inkubationsbad / Wasserbad Typ 1004	Lauda-GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
jamovi (2.2.5)	Open source, The jamovi Project, Sydney, Australia (129)
Leica CV5030	Leica Biosystems, Deer Park, IL, USA
Leica RM2265	Leica Biosystems, Deer Park, IL, USA
LightCycler® 480	Roche Holding AG, Basel Schweiz
MagnetrührerMR-302	Heidolph International, Schwabach, Deutschland
MC 6 Centrifuge	Sarstedt AG & Co. KG Nümbrecht, Deutschland
Microsoft® Office Software Package (Word, Excel, PowerPoint) (Version 2211 15831.20190)	Microsoft®, Reond, WA, USA
Nalgene™ TM Mr. Frosty TM 1°C Freezing Container	Nalgene Nunc International by Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
NanoDrop™ 2000c Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
pH METER PCE-228	PCE Produktions- und Entwicklungsgesellschaft mbH, Meschede, Deutschland
Pipetten divers	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipetus Pipettierhilfe	Hirschmann Loborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
PLS 720-3A	KERN & SOHN GmbH, Balingen, Deutschland
PowerPac™ HC	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
QuPath (V0.2.3)	Open source, Bankhead, P. et al. (130)
Roller 10D digital	IKA, Staufen im Breisgau, Deutschland
Rotor: A-4-62	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Rotor: F35-6-30	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Rotor: F-45-30-11	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Rührer Typ RO 2	C. Gerhardt GmbH & Co. Kg, Königswinter, Deutschland
Spark™ - Miltimode Microplate Reader	Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz
Sponge Pad	Invitrogen® by Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
T-1 Thermoblock / Thermocycler	Biometra Analytik GmbH Götting, Deutschland

ThermoMixer™ compact	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
UV PCR HEPA Workstation	Analytikjena, Upland, CA, USA by Endress+Hauser, Reinach, Schweiz
Vaccum-aspiration system	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Ventana™ BenchMark ULTRA	Ventana™ by Roche Holding AG, Basel Schweiz
Ventana™ DP 200 slide scanner	Ventana™ by Roche Holding AG, Basel Schweiz
Ventana™ iScan HT scanner	Ventana™ by Roche Holding AG, Basel Schweiz
XCell II™ Blot Module	Novex® by Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
XCell™ SureLock™ Electrophoresis Cell	Novex® by Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2 - Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller	Referenz
Adhensionsobjektträger für Gewebeschnitte (Stärke 1mm)	Epredia Holdings Ltd., Portsmouth, NH, USA	J1800A MNZ
CryoTube™ Gefäße (1,8ml)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA	363401
Deckgläser (24x50mm)	Epredia Holdings Ltd., Portsmouth, NH, USA	BB02400500A113MNZ0
DNase-ExitusPlus	PanReac AppliChem, ITW Reagents Division by Panreac Quimica SLU, Barcelona, Spanien, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland, Nova Chimica Srl, Mailand, Italien	A7089
Einmalskalpel	FEATHER®, Osaka, Japan	No. 10
Kulturflasche mit Filterkappe (T25, 75, 175)	Sarstedt AG & Co. KG Nümbrecht, Deutschland	83.3910.002, 83.3911.002, 83.3912.002
LightCycler® 480 96er Multiwellplatte	Roche Holding AG, Basel Schweiz	04 729 692 001
LightCycler® 480 Multiwell Folie	Roche Holding AG, Basel Schweiz	04 729 757 001
NuPAGE™4-12% Bis-Tris Gradientgel	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA	NP0323
Pasteurpipetten	Assistent von Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim vor der Rhön, Deutschland	40567002
Pipettenspitzen (PCR rein; 20, 100, 1000µl)	Sarstedt AG & Co. KG Nümbrecht, Deutschland	70.1116.210, 70.3030.255, 70.3050.255
PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran/Filterpapier Sandwich, 0,2µm	Novex by Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA	LC2002
QIAshredder Zentrifugationssäule	QIAGEN N.V., Venlo, Niederlande	79656

Reaktionsgefäße (1,5ml,2ml,15ml, 50ml)	Sarstedt AG & Co. KG Nümbrecht, Deutschland	72.706 72.695.500 62.554.502, 62.547.254
Reaktionsgefäße (PCR rein; 0,2ml, 0,5ml)	Axygen, Inc. Union City, CA, USA	321-05-501, 321-02-051
RNase-ExitusPlus	PanReac AppliChem, ITW Reagents Division by Panreac Quimica SLU, Barcelona, Spanien, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland, Nova Chimica Srl, Mailand, Italien	A7153
Serologische Stabpipette (5, 10, 25ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland	86.1253.001, 86.1254.001, 86.1685.001

2.3 Reagenzien

Tabelle 3 - Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller	Referenz
Acutase Lösung	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland	C-41310
Albumin, Bovine (BSA)	VWR International LLC., by Avantor Inc., Radnor, PA, USA	0332
Antibody Diluent mit Casein	Ventana™ by Roche Holding AG, Basel Schweiz	06440002001
Blueing Reagent	Ventana™ by Roche Holding AG, Basel Schweiz	05266769001
Cell Conditioning Solution 1 (CC1)	Ventana™ by Roche Holding AG, Basel Schweiz	05279801001
Cell Conditioning Solution 2 (CC2)	Ventana™ by Roche Holding AG, Basel Schweiz	05279798001
Cisplatin NeoCorp® (1mg/ml)	Hexal AG, Holzkirchen, Deutschland	
Dimethyl Sulfoxid für Zellkultur (C ₂ H ₆ O _S – „DMSO“)	PanReac AppliChem, ITW Reagents Division by Panreac Quimica SLU, Barcelona, Spanien, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland, Nova Chimica Srl, Mailand, Italien	A3672
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) mit L- Glutamin und 4,5 g/l D- Glucose	Gibco® by Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA	41965-039
DPBS (Dulbecco's Phosphate buffered Saline)	Gibco® by Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA	14190-094
EMEM (ROTI Cell Eagle's MEM / Earle's)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	9044.1
Ethanol	Supelco® by Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	1.00983
EZ Prep Concentrate (10X)	Ventana™ by Roche Holding AG, Basel Schweiz	05279771001

Fetal Bovine Serum (FBS)	Biowest LLC., Riverside, MO, USA	S1810-500
Heamatoxylin II	Ventana™ by Roche Holding AG, Basel Schweiz	05277965001
L-Glutamin Lösung 200mM	Sigma Aldrich® by Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	G7513
Magermilchpulver	PanReac AppliChem, ITW Reagents Division by Panreac Quimica SLU, Barcelona, Spanien, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland, Nova Chimica Srl, Mailand, Italien	A0830
Methanol (CH ₃ OH)	J.T. Baker® by Avantor Inc., Radnor, PA, USA	UN1230
Natrium Chlorid (NaCl)	VWR International LLC., by Avantor Inc., Radnor, PA, USA	0241
Natrium Pyruvat (100mM)	Gibco® by Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA	11360-039
Natronlauge (NaOH)	Supelco® by Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	1.09136
Nuklease- und Protease-freies Wasser	Sigma Aldrich® by Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	W4502
NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen® by Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA	NP0007
NuPAGE™ Sample Reducin Agent	Invitrogen® by Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA	NP0004
NuPAGE™ Antioxidant	Invitrogen® by Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA	NP0005
NuPAGE™ MOPS SDS Running Buffer (20x)	Novex® by Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA	NP0001
NuPAGE™ Transfer Buffer (20x)	Novex® by Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA	NP0006-1
PageRuler™ Plus Prestrained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA	26619
Penicillin/Streptomycin (5.000U/ml Pen, 5.000µg/ml Strep)	Gibco® by Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA	15070-063
Phosphatase-inhibitor Cocktail C2	Sigma Aldrich® by Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	P5726
Phosphatase-inhibitor Cocktail C3	Sigma Aldrich® by Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	P0044
Pierce™ RIPA Buffer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA	89900
Pierce™ TM RIPA Buffer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA	89900
Protease-Inhibitor Cocktail	Sigma Aldrich® by Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	P8340
Salzsäure (HCl)	Supelco® by Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	1.09063
TRIS-hydrochlorid (C ₄ H ₁₁ NO ₃ -HCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	9090.3

Tween® 20 (Polysorbat)	PanReac AppliChem, ITW Reagents Division by Panreac Quimica SLU, Barcelona, Spanien, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland, Nova Chimica Srl, Mailand, Italien	A4974
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich® by Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	M6250

2.3.1 Kits

Tabelle 4 - Kits

Name	Hersteller	Referenz
LightCycler™ 480 SYBR™ Green I Master	Roche Holding AG, Basel Schweiz	04707516001
MycroStrip™ Mycoplasma Detection Kit	Ivion Gen, San Diego, CA, USA	rep-mys-20, Vers. 21E07-ED
NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA	78835
OptiView DAB IHC Detection Kit	Ventana™ by Roche Holding AG, Basel Schweiz	06396500001
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA	23225
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA	32106
RNeasy® Mini Kit	QIAGEN N.V., Venlo, Niederlande	74104
SuperScript™ IV First Strand Synthesis System	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA	18091050

2.4 Zelllinien

Tabelle 5 - Zelllinien

Zelllinie	Lokalisation	Firma	Referenz
Detroit 562	Oropharynx (Tonsille), Plattenepithelkarzinom, entnommen aus Metastase: Pleuraerguss	CLS Cell Lines Service GmbH, Eppelheim, Deutschland	Peterson et al., Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1971(131)
FaDu	Hypopharynx, Plattenepithelkarzinom, entnommen aus Primärtumor	Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, Braunschweig, Deutschland	Rangan, Cancer, 1972(132)

FaDu Cisplatin-resistent	Hypopharynx, Plattenepithelkarzinom, entnommen aus Primärtumor		Watermann et al., Clinical Cancer Research, 2021(133)
UT-SCC-60A	Oropharynx (Tonsille), Plattenepithelkarzinom, entnommen aus Primärtumor		Lansford et al. Human Cell Culture, Springer, 2002(134)

Kryokonservierte Zellen der Zelllinien FaDu und FaDu Cisplatin-resistent wurden dankenswerterweise aus der Sammlung der Arbeitsgruppe Krupar (Institut für Pathologie des UKSH Lübeck), die Zelllinie UT-SCC-60A aus der Sammlung der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde des UKSH Lübeck zur Verfügung gestellt.

2.5 Antikörper

Tabelle 6 - Antikörper

Gezeigt sind die Antikörper, welche für Analysen mittels Immunhistochemie und/oder Western Blot genutzt wurden, sowie deren Verdünnungen dieser für das jeweilige Verfahren.

Zielprotein	Referenz	Hersteller	Verdünnung IHC	Verdünnung Western Blot
Anti - Mouse	Anti Mouse IgG, HRP-linked Antibody #7076	Cell Signalig Technology, Cambridge, Großbritannien		1:5000 in 5% Milch/BSA
Anti - Rabbit	AntiRabbit IgG, HRP-linked Antibody #7074	Cell Signalig Technology, Cambridge, Großbritannien		1:5000 in 5% Milch/BSA
Histon H3	Histone H3 Antibody #9715	Cell Signalig Technology, Cambridge, Großbritannien		1:1500 in 5% Milch
LSD1	LSD1 Antibody (1B2E5) NB100-1762 (mouse)	Novus Biologicals by Bio-Techne Ltd., Abington, Großbritannien	1:350	1:1000 in 5% Milch
SNAIL	SNAIL Ab – AF6032 (rabbit)	Affinity Biosciences, Zhenjiang, Jiangsu, China	1:1000	1:500 in 5% Milch
β - Actin	Monoklonal Anti-β-Actin antibody - A5441 (mouse)	Sigma Aldrich® by Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland		1:20 000 in 5% BSA

2.6 Primer

Tabelle 7 - Primer

SNAIL	Forward: 5' - GCTGCAGGACTCTAATCCAGA - 3'
	Reverse: 5' - ATCTCCGGAGGTGGGATG - 3'
LSD1	Forward: 5' - GCCATGGTGGTSSCSGGTCT - 3'
	Reverse: 5' - TGGCCSGTTCSTSTTTTSCCTG - 3'
TBP	Forward: 5' - AGTTCTGGGATTGTACCGCA - 3'
	Reverse: 5' - TCCTCATGATTACCGCAGCA - 3'
HPRT	Forward: 5' - CAGACTTTGCTTTCCTTGGTCA - 3'
	Reverse: 5' - ACTTCGTGGGGTCCTTTTCA - 3'
GAPDH	Forward: 5' - GAAGGTGAAGGTCGGAGTCA - 3'
	Reverse: 5' - AATGAAGGGGTCATTGATGG - 3'

2.7 Puffer und Lösungen

TBS (10x, pH=7,5): 24g TRIS-HCl
 80g NaCl
 Zur Einstellung eines pHs von 7,5 HCl oder NaOH nach Bedarf
 ad. 1l H₂O dest.

TBS-T: 100ml TBS (10x, pH=7,5)
 900ml H₂O dest.
 750µl Tween® 20

Milch (5%): 2,5g Magermilchpulver
 50ml TBS-T

BSA (5%): 2,5g BSA Pulver
 50ml TBS-T

Transferpuffer: 25ml NuPAGE™ Transfer Buffer (20x)
 50ml Methanol
 500µl NuPAGE™ Antioxidant
 425ml H₂O dest.

Runningpuffer:	40ml NuPAGE™ Running Buffer (20x)
	760ml H ₂ O dest.
	500µl NuPAGE™ Antioxidant (zwischen Gele)
Buffer RLT:	10ml RLT (im RNeasy™ Kit enthalten)
	100µl β-Mercaptoethanol
RPE Puffer:	55ml RPE Buffer Konz. (im RNeasy™ Kit enthalten)
	220ml Ethanol

2.8 Zellkulturmedien

Medium zur Kultivierung von FaDu Zellen:

DMEM, high Glucose (4,5 g/l) mit L-Glutamin

10% FBS

2mM L-Glutamin

1% Penicillin/Streptomycin (entspricht 50U/ml Penicillin, 0,05µg/ml Streptomycin)

Medium zur Kultivierung von FaDu Cisplatin-resistent:

DMEM, high Glucose (4,5 g/l)

10% FBS

6mM L-Glutamin

1% Penicillin/Streptomycin (entspricht 50U/ml, 0,05µg/ml)

0,7µg/ml Cisplatin

Medium zur Kultivierung von Detroit-562:

EMEM

10% FBS

1% Penicillin/Streptomycin (entspricht 50U/ml, 0,05µg/ml)

2mM L-Glutamin

Medium zur Kultivierung von UT-SCC-60A:

DMEM, high Glucose (4,5 g/l)

10% FBS

1% Penicillin/Streptomycin (entspricht 50U/ml, 0,05µg/ml)

1mM Natriumpyruvat

Einfriermedium:

150 µl DMSO

150 µl FBS

1200 µl des jeweiligen Zellmediums

2.9 Patientenkollektiv

Alle untersuchten Proben entstammen Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs von Patienten, welche zwischen 2006 und 2015 im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, behandelt wurden.

Der Aufbau der klinisch umfangreich charakterisierten Kohorte (n=419), sowie die Erstellung der Tissue-Microarrays (TMAs) erfolgte im Rahmen des Promotionsprojektes von Patrick Kuppler am Institut für Pathologie in Lübeck (135). Die klinischen Daten wurden hierbei den Patientenakten entnommen. Auf dieser Kohorte basierende Untersuchung führten zu einer Reihe von Publikationen der Arbeitsgruppe und des Institutes (133,136–142).

Die retrospektive Studie an der Kohorte erfolgte entsprechend der Deklaration von Helsinki aus dem Jahre 1964 und das zugehörige Protokoll wurde von der Ethikkommission der Universität zu Lübeck bewilligt (Projekt-Code: AZ16-277, Appendix 8).

Die Tabelle 8 zeigt die klinisch-pathologischen Daten der untersuchten Patienten.

Tabelle 8 - Kohortendaten

Dargestellt sind die klinisch-pathologischen Daten der Kohorte. Auf den TMA Gewebeschnitten, welche für die Färbung genutzt worden sind, war in einem Teil der Cores kein Tumorgewebe enthalten. Dies liegt insbesondere an der Tatsache, dass die Tumorstanzen, welche für die TMA Erstellung genutzt wurden aufgrund der dreidimensionalen Struktur der Tumore, nicht auf jeder Höhe Tumorgewebe enthalten und die Gewebeschnitte so teilweise das Tumorgewebe verfehlen. Um den geringfügigen Unterschieden der angefärbten Tumore und den klinisch pathologischen Daten der zugehörigen Patienten zwischen der LSD1 und SNAIL gefärbten Kohorte Rechnung zu tragen, sind die Daten der jeweiligen Färbung getrennt aufgelistet.

	LSD1	SNAIL
Patienten	n=419	n=419
Verfügbares Tumorgewebe	n=334	n=332
Gewebetyp		
Primarius	334	332
Lymphknoten-Metastase	163	165
Fernmetastase	22	21
Rezidiv	59	57
Zweitkarzinom	4	6
Lokalisation des Primärtumors		
Hypopharynx	46	46
Larynx	98	95
Mundhöhle	76	76
Oropharynx	103	104
unbekannt	11	11
Geschlecht		
männlich	259	258
weiblich	74	73
unbekannt	1	1
Alter		
jung (≤ 61)	54	52
alt (> 61)	178	178
unbekannt	2	2
T-Stadium		
T1	68	69
T2	98	98
T3	96	96
T4	70	67
unbekannt	2	2
N-Stadium		
N0	147	146
N1	51	51
N2	83	83
N3	50	50
unbekannt	3	3
M-Stadium		
M0	317	315
M1	14	14
unbekannt	3	3

		LSD1	SNAIL
UICC-Stadium	I	66	69
	II	59	57
	II	59	59
	IV	149	146
	unbekannt	1	1
p16-Status	positiv	85	88
	negativ	249	244
	unbekannt	0	0
Alkoholkonsum	Ja	139	139
	Nein	183	180
	unbekannt	2	3
Nikotinkonsum	Ja	281	279
	Nein	36	35
	unbekannt	17	18
5J. Rezidiv-freies Überleben	tot oder Rezidiv	148	147
	lebend ohne Rezidiv	178	177
	unbekannt	8	8
5J. Überleben	tot	119	117
	lebend	207	207
	unbekannt	8	8
Chemotherapie	Ja	99	99
	Nein	232	230
	unbekannt	3	3
Radiotherapie	Ja	201	199
	Nein	130	130
	unbekannt	3	3

3 Methoden

3.1 Immunhistochemie

3.1.1 Immunhistochemische Färbung

3.1.1.1 Prinzip

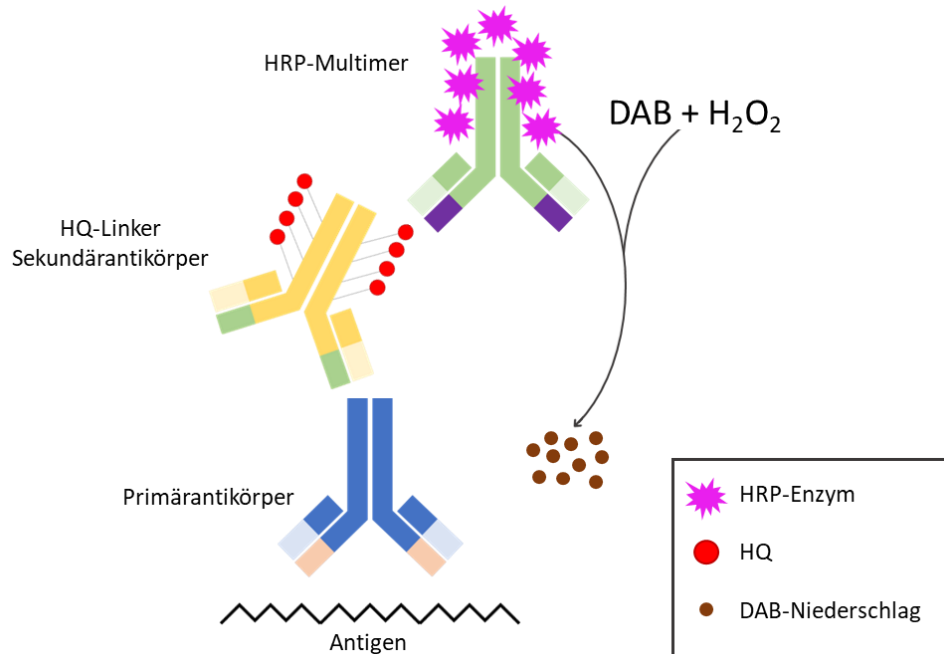


Abbildung 1 - Prinzip der Immunhistochemischen Färbung

Dargestellt ist das allgemeine Prinzip der durchgeführten immunhistochemischen Färbung.

Mittels immunhistochemischer Färbung lassen sich spezifische Antigene in Gewebeschnitten darstellen. Hierfür werden Antikörper verwendet, die das gesuchte Antigen auf den Gewebeschnitten spezifisch binden (Primärantikörper). Ein, an Hydroxyquinoxalin (HQ) gebundener Sekundärantikörper, welcher abhängig von der Spezies, in welcher der Primärantikörper generiert wurde, ausgewählt wird und so spezifisch an diesen bindet, bindet anschließend an den Primärantikörper. Das HQ dient als Bindungsstelle für eine dritten Antikörper, welcher Meerrettich-Peroxidase (HRP)-Multimere trägt. In einer, durch das HRP katalysierten, Oxidierung von Diaminobenzidin (DAB) entsteht ein brauner Niederschlag, welcher als indirekter Nachweis des Antigens und zu dessen Quantifizierung genutzt wird.

Die Freilegung der Antigene aus den Gewebeschnitten sowie die anschließende Färbung dieser erfolgt hierbei nach einem standardisierten Färbeprotokoll, welches im Rahmen der Etablierung an Positivkontrollen getestet wurde. Als Kontrollen für die SNAIL Färbung dienten hierbei Gewebeschnitte von Kolorektal- sowie Schilddrüsenkarzinomen, welche mithilfe des Human Protein Atlas als SNAIL hoch exprimierende Gewebe identifiziert wurden. Da die Spezifität des

verwendeten LSD1 Antikörpers bereits im Rahmen vorheriger Studien der Arbeitsgruppe erfolgte, wurde hier lediglich eine Titration zur Ermittlung einer passenden Verdünnung durchgeführt (95).

3.1.1.2 Färbeprotokoll

Die immunhistochemischen Färbungen wurden mit dem Ventana OptiView DAB IHC Detection Kit und dem Ventana BenchMark ultra Färbeautomaten durchgeführt.

Die Entparaffinierung der 4µm dünnen Schnitte erfolgte mit EZ Prep (10x), einer Lösung ohne Alkohol und Xylol, bei 72°C. Anschließend wurden diese zur Demaskierung der Antigene auf 92°C erhitzt und für 32min in CC1 Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer, pH 8,4) (LSD1) bzw. CC2 Puffer (Citrat-Puffer; pH 6,0) (SNAIL) inkubiert.

Die, wie in Tabelle 6 verdünnten, Primärantikörper wurden nun händisch appliziert und die Schnitte für 32min bei 37°C inkubiert.

Für den Nachweis der, an das Antigen gebundenen, Primärantikörper wurde das OptiView DAB IHC Detection Kit von Ventana genutzt.

Abschließend erfolgte eine Gegenfärbung mit Haematoxylin II und Blueing Reagent.

Die gefärbten Schnitte wurden mithilfe des Leica CV5030 Eindeckautomaten eingedeckelt.

3.1.2 Auswertung

Die gefärbten Schnitte wurden mithilfe des Ventana iScan HT Scanners (LSD1) und des Ventana DP 200 Slide Scanners (SNAIL) digitalisiert und mit mittels der Bioimaging Software QuPath ausgewertet (130).

Über den eingescannten TMAs wurde hierbei ein Raster erstellt, welches die Zuordnung der jeweiligen Probenidentifikationsnummer zum zugehörigen TMA Core ermöglichte.

Unter Anleitung erfahrener Pathologen wurden dann die Tumorareale händisch markiert und die Markierungen anschließend kontrolliert. Mittels des, in QuPath enthaltenen, Cell-Detection-Tools wurden die einzelnen Zellen und die zugehörigen Zellkerne in den gekennzeichneten Arealen detektiert und zu jedem Zellkern ein einheitenloser Messwert der optischen Dichte als Maß für die Braunfärbung ermittelt.

Nach optischem Eindruck wurden manuell Grenzwerte dieses Wertes festgelegt, nach welchen die einzelnen Zellkerne als negativ, niedrig, moderat oder stark positiv gefärbt kategorisiert wurden.

Anhand dieser Einordnung wurde dann ein H-Score berechnet, welcher sich aus dem gewichteten prozentualen Anteil der jeweiligen Färbintensität ergibt und einen Wert zwischen 0 und 300 annimmt und die Expressionsstärke widerspiegelt.

$$H - Score = 3 \times \text{stark pos. \%} + 2 \times \text{moderat pos. \%} + 1 \times \text{schwach pos. \%} + 0 \times \text{neg. \%}$$

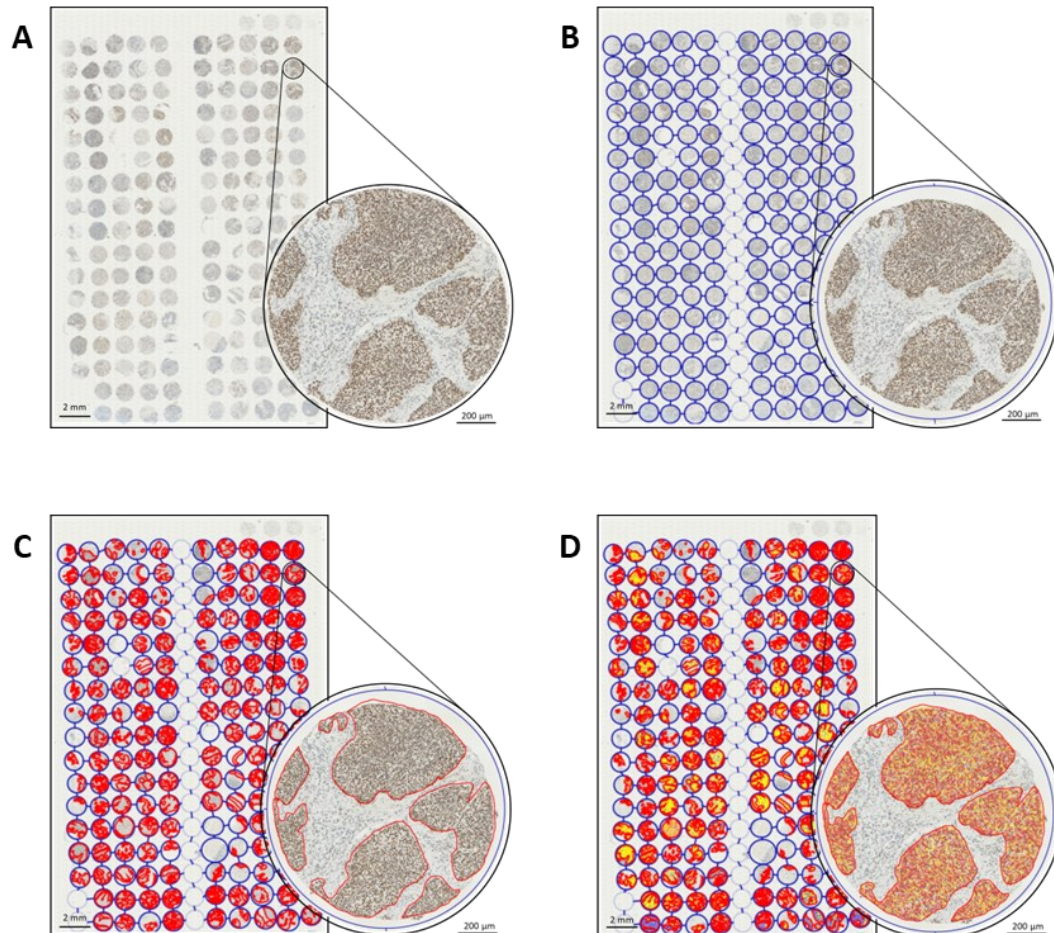


Abbildung 2 - TMA Auswertung mittels QuPath

Gezeigt sind die Schritte der TMA-Auswertung. Über den gefärbten und eingescannten TMAs (A) wird ein Raster erstellt (B). Im Anschluss erfolgt die händische Markierung der Tumoreale (C) und die Detektion der einzelnen Zellen und der zugehörigen Zellkerne mittels des Cell-Detection Tools in QuPath (D).

3.2 Zellkultur

3.2.1 Kultivieren von Zellen

Alle Zellen wurden in Kulturflaschen bei 37°C, 5% CO₂ und feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre im CO₂ Incubator ICO240 von Memmert kultiviert. Das Arbeiten mit den Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen und vertikalem Luftstrom unter der HERAsafe HS 12 Sicherheitswerkbank.

Die Kulturmedien der Zelllinien sind in Kapitel 2.8 aufgeführt.

Nach Erreichen einer Konfluenz von 80-95% wurden die Zellen passagiert. Hierfür wurde das Zellmedium abgenommen, die Zellen mit 5-10ml DPBS gewaschen und anschließend mit einer, der Kulturflaschengröße entsprechenden, Menge Acutase (T25: 1ml, T75: 2ml, T175: 4ml) abgelöst. Im Anschluss wurden die abgelösten Zellen in 5-10ml Medium aufgenommen und je nach Zelllinie 1:3 – 1:10 gesplittet und in eine neue Kulturflasche überführt.

Wenn eine entsprechende Konfluenz noch nicht erreicht war, wurde das Zellmedium nach drei Tagen oder bei Bedarf abgesaugt und durch frisches Medium ausgetauscht.

3.2.2 Einfrieren und Auftauen

Je nach Bedarf wurde ein Teil der Zellen für eventuelle spätere Nutzung kryokonserviert.

Hierfür wurden die Zellen, wie oben beschrieben mit Acutase von der Kulturflasche abgelöst, in 5ml Medium aufgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt.

Dieses wurde für 10min bei 800rpm zentrifugiert und das überstehende Medium abgesaugt. Das so entstandene Pellet wurde je nach Größe der Kulturflasche in 1-3 Cryotubes und je 1,5ml Einfriermedium überführt.

Die Cryotubes wurden mit einem Nalgene™ Mr. Frosty™ 1°C Freezing Container langsam auf -80°C abgekühlt und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

Die eingefrorenen Zellen aus dem Stickstofftank wurden mithilfe eines Inkubationsbads (37°C) zügig aufgetaut, direkt nach dem Auftauen in weiteren 5ml Medium aufgenommen und in ein 15ml Falcon Tube überführt. In diesem wurden die Zellen bei 300g für 3 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und verworfen, um so das, im Gefriermedium enthaltene, DMSO zu entfernen.

Das so entstandene Zellpellet wurde in 10ml Kulturmedium aufgenommen, in eine T25 Zellkulturflasche überführt und diese im Brutschrank gelagert.

Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt.

3.2.3 Mycoplasmatest

Mithilfe des MycoStrip Mycoplasma Detection Kits wurden alle Zelllinien mittels Antigenschnelltests auf Mykoplasmenkontamination untersucht.

Hierfür wurde nach Herstellerangaben 1ml des gebrauchten, mindestens 3 Tage alten, Zellmediums abgenommen und für 5min bei 16.000g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zentrifugat in sterilem DPBS aufgenommen. Nach Hinzufügen des im Kit enthaltenen Reaktionsmixes und -puffers wurde der Ansatz für 40min bei 65°C inkubiert.

Anschließend wurde der ebenfalls im Kit enthaltene Migrationspuffer, welcher als Trägerlösung dient, hinzupipettiert und der resultierende Ansatz auf den Teststreifen gegeben.

3.2.4 Cisplatin-Resistenz

Die Cisplatin-Resistenz der Cisplatin-resistenten FaDu Zelllinie wurde durch kontinuierlich gesteigerte Zugabe von Cisplatin über einen Zeitraum von 6 Monaten erlangt.

Dies geschah im Rahmen des Promotionsprojektes von Christian Watermann am Institut für Pathologie der Universität zu Lübeck und ist in diesem Rahmen umfassend beschrieben und veröffentlicht (133).

Die Testung der Cisplatin Resistenz im Vergleich zur parentalen Wildtyp-Zelllinie erfolgte hierbei mittels MTT-Assay nach Mosmann (143).

3.2.5 Ernten der Zellen

Um die Zellen für weitere Analyse zu ernten, wurden diese mithilfe einer entsprechenden Menge Acutase abgelöst (siehe oben), in 5-10ml Medium aufgenommen und in ein 15ml Reaktionsgefäß überführt. Dieses wurde für 10min bei 800rpm zentrifugiert, das Medium abgesaugt und anschließend zweimalig mit DPBS gewaschen. Das trockene Pellet wurde anschließend direkt weiterverwendet oder bei -80°C gelagert.

3.2.6 Kernproteinextraktion

Zur getrennten Isolierung von nukleären und zytoplasmatischen Proteinen wurde das Kit NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents nach Herstellerangaben verwendet.

Hierfür wurden die geernteten Zellen in 1ml DPBS aufgenommen, in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt, für 3min bei 500g und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Zur Isolierung der im Zytoplasma enthaltenen Proteine wurden dem Pellet eine, dem Volumen angepasste, Menge des, im Kit enthaltenen, CER I und Protease Inhibitor hinzugefügt, mittels eines Vortex-Rüttlers durchmischt und anschließend für 10min auf Eis inkubiert.

Dem Ansatz wurde dann CER II hinzugefügt, mittels Vortex-Rüttlers durchmischt und für 1min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde nun für 5min bei 16.000g und 4°C zentrifugiert und der Überstand, welcher die zytoplasmatischen Proteine enthält, verworfen.

Das überbleibende Pellet wurde ein entsprechendes Volumen NER aufgenommen, Protease-Inhibitor hinzugefügt, für 1sek mittels des Vortex-Rüttlers durchmischt und anschließend für 10 min auf Eis inkubiert. Dieser Vorgang wurde 4-mal wiederholt.

Das Lysat wurde nun für 10min bei 16.000g und 4°C zentrifugiert und der Überstand, welcher nun das nukleäre Protein enthält, bei -80°C eingefroren.

3.2.6.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mithilfe des Pierce™ BCA Protein Assay Kits nach Herstellerangaben. In alkalischem Milieu wird hierbei Cu^{2+} zu Cu^{1+} reduziert (Biuret Reaktion) und anschließend mittels Bicinchoninic Säure (BCA), welches in alkalischem Milieu stark violette Komplexe mit Cu^{1+} bildet, nachgewiesen (144). Die Intensität der Färbung wird anschließend gemessen und dient als indirektes Maß der Proteinkonzentration.

Nach Anfertigung einer Standardreihe mit, im Kit enthaltenen BSA in NER Puffer, wurden Duplikate dieser sowie Triplikate der Proteinlysate auf eine 96 Well Platte pipettiert und die, ebenfalls im Kit enthaltene, Working Reagenz hinzugefügt. Die Ansätze wurden anschließend für 30min bei 37°C inkubiert und die Färbeintensität der Proben im Vergleich zur Standardreihe mithilfe des Tecan Spark ausgewertet.

3.2.7 RNA-Extraktion

Zur Isolierung von RNA aus den geernteten Zellen wurde das RNeasy™ Mini Kit von Quiagen™ genutzt.

Auf das Lysieren der Zellen in RLT-Puffer erfolgt hierbei eine Homogenisierung des Lysats und Entfernung der genomischen DNA mittel QIAshredder™ Zentrifugationssäulen.

Dem dabei entstandenen Ansatz wird anschließend Ethanol zugefügt und die RNA unter Verwendung einer RNeasy™ Zentrifugationssäule an eine Membran gebunden.

Nach Waschen dieser Membran mit, im Kit enthaltenen, RW1- und RPE-Puffern, wird die gebundene RNA in Nuklease-freiem Wasser aufgenommen.

3.2.7.1 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels des NanoDrop™ 2000c Spectrophotometers. Dieses nutzt die, an Nukleinsäure-freiem Wasser genormten, Absorption von Licht mit einer

Wellenlänge von 200-350nm. Hierbei handelt es sich um den, für die Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäure, relevanten Bereich.

3.3 Western Blot

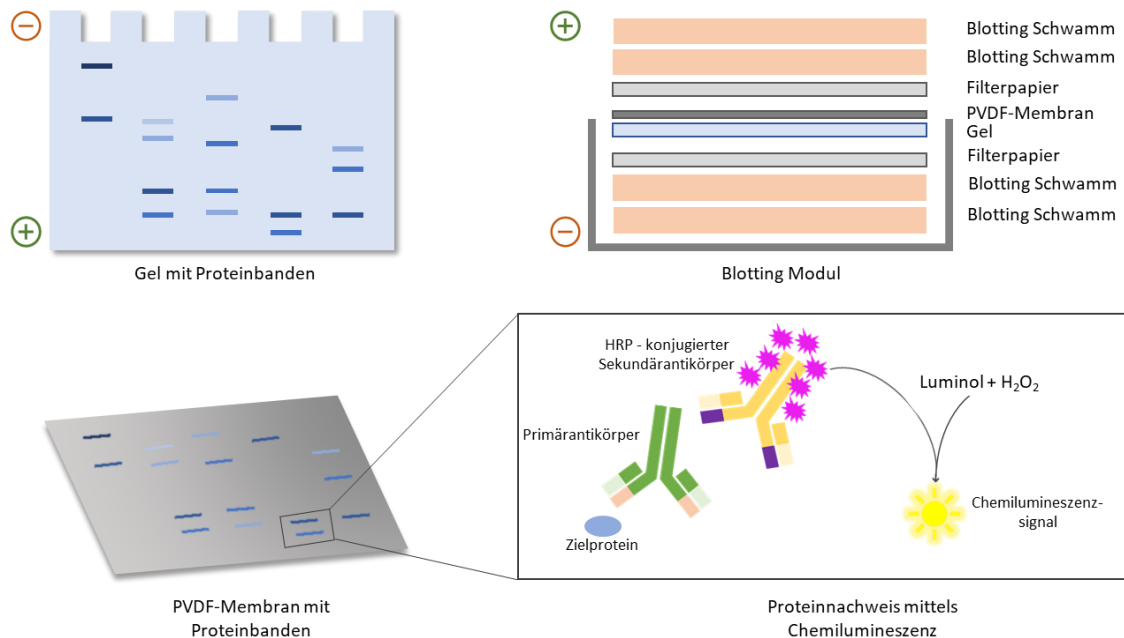


Abbildung 3 - Prinzip der Proteinanalyse mittels WesternBlot

Die mittels Gelelektrophorese nach Molekulargewicht getrennte Proteine (oben links) werden mithilfe eines Blotting Moduls auf eine PVDF-Membran übertragen (oben rechts). Hier werden diese anschließend von spezifischen Primärantikörper gebunden. An Sekundärantikörper gebundene HRP ermöglicht den Nachweis dieser durch Chemilumineszenz (unten). Teilweise modifiziert nach Stewart R. (siehe 7.2 Bildquellen)

3.3.1 SDS-PAGE und Transfer auf Membran

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht, wurden zu je 30µg des Proteins 1,5µl Reducing Agent und 3,75µl LDS hinzugegeben und mit Nuklease- und Protease-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 15µl aufgefüllt. Diese Ansätze wurde anschließend für 10min bei 70°C denaturiert, auf ein NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Gradientgels aufgetragen und mit der XCell SureLock™ Elektrophorese Zelle eine SDS-Elektrophorese durchgeführt. Die Elektrophorese wurde hierbei mit einer konstanten Spannung von 200V für 50-60min durchgeführt.

Um die Größe der aufgetrennten Proteine beurteilen zu können wurde in eine oder mehrere Taschen des Gradientgels PageRuler™ Plus Prestrained Protein Ladder als Größenstandard pipettiert.

Die aufgetrennten Proteine wurden von dem Gel mithilfe des XCell II™ Blot Modules auf eine PVDF-Membran übertragen. Dazu wurde die Membran vor dem Blot für 20sek mit Methanol

aktiviert, anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen und in Transferpuffer inkubiert wurde.

Das Blot Modul wurde hierbei, wie in Abbildung 3 (oben rechts) dargestellt mit, in Transferpuffer getränkten, Schwämmen, Filter Papier, dem Gel sowie der Membran befüllt und der Transfer gekühlt nach Herstellerangaben mit einer Spannung 30V für 1h durchgeführt.

3.3.2 Blot-Analyse

Nach dem erfolgreichen Transfer der Proteinbanden auf die PVDF-Membran wurde diese je nach Primärantikörper für 1h mit 5%-Milch TBS-T (Tris buffered saline mit Tween® 20) oder 5%-BSA TBS-T geblockt und über Nacht bei 4°C im entsprechenden Primärantikörper inkubiert (für Verdünnungen siehe Tabelle 6). Am Folgetag wurde die Membran 3-Mal für je 5min in TBS-T gewaschen und anschließend für 1h bei Raumtemperatur im jeweiligen Sekundärantikörper inkubiert (für Verdünnungen siehe Tabelle 6). Im Anschluss wurde die Membran erneut 4-mal für je 5min und TBS-T und 1-mal für 5min in TBS gewaschen.

Die Detektion der Sekundärantikörper erfolgte mittels Pierce™ ECL Wester Blotting Substrate. Dieses basiert auf der Generierung von Chemilumineszenz durch die Oxidierung von Luminol, welche durch die, an die Sekundärantikörper gebundene, Meerrettich-Peroxidase katalysiert wird. Hierfür wurden je 750µl der Entwicklungsreagenzen A und B zusammen pipettiert und gleichmäßig über die Membran verteilt. Nach einer Inkubationszeit von 5min erfolgte die Detektion der Chemilumineszenz mittels Amersham Imager 600.

Der Proteinnachweis mittels Western Blot wurde hierbei in drei Läufen mit je drei verschiedenen Passagen jeder Zelllinie wiederholt.

3.4 Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR)

3.4.1 Reverse Transkription

Reverse Transkription

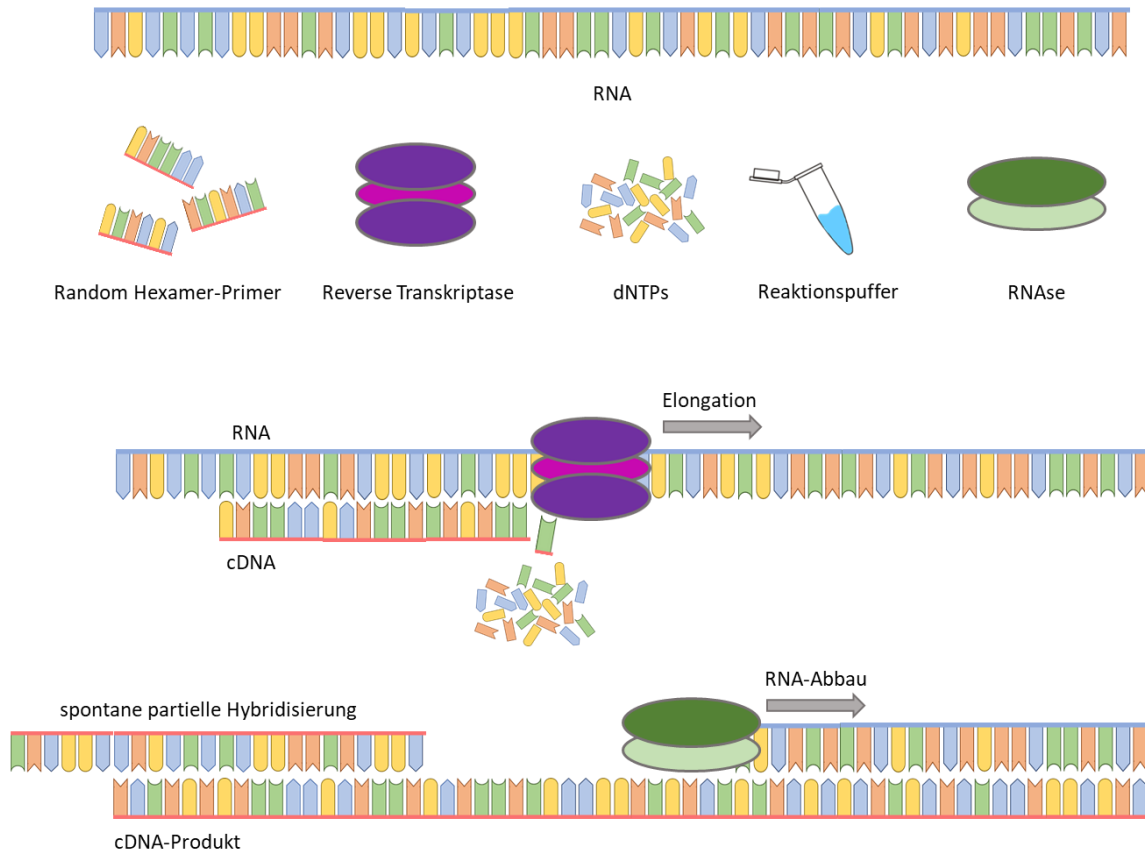


Abbildung 4 - Prinzip der Reversen Transkription

Durch Zugabe von willkürlichen Hexamer DNA-Primern, dNTP-Bausteinen, Reverser Transkriptase und Pufferlösung zur Generierung eines geeigneten Reaktionsmilieus wird die isolierte RNA der Zellen in cDNA umgeschrieben. In Teilen modifiziert nach zymoresearch (siehe 7.2 Bildquellen)

Die, aus den Zellen isolierte RNA, wurde mittels des SuperScript™ IV Kits nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben.

Hierfür wurde folgender 13µl Ansatz zusammen pipettiert:

1 µl Random Hexamer Primer (50ng/µl)

1µl dNTP Mix (10mM)

1µg RNA

DEPC-H₂O

Dieser wurde im Anschluss mithilfe des Thermocyclers wie folgt inkubiert:

5 min bei 65°C

5 min Abkühlen auf Eis

Dem Ansatz wurden dann folgende Reagenzien hinzugefügt:

4 µl 5xSSIV Puffer

1 µl DTT (100 mM)

1 µl Ribonuklease-Inhibitor

1 µl SuperScript IV

Und wie folgt inkubiert:

10 min bei 23°C

10 min bei 52°C

10 min bei 80°C

Anschließend erfolgte die Zugabe von:

1 µg E. coli RNase H

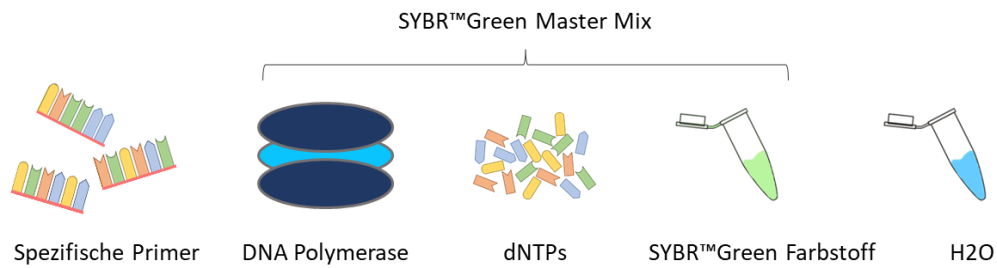
Und eine Inkubation von:

20min bei 37°C

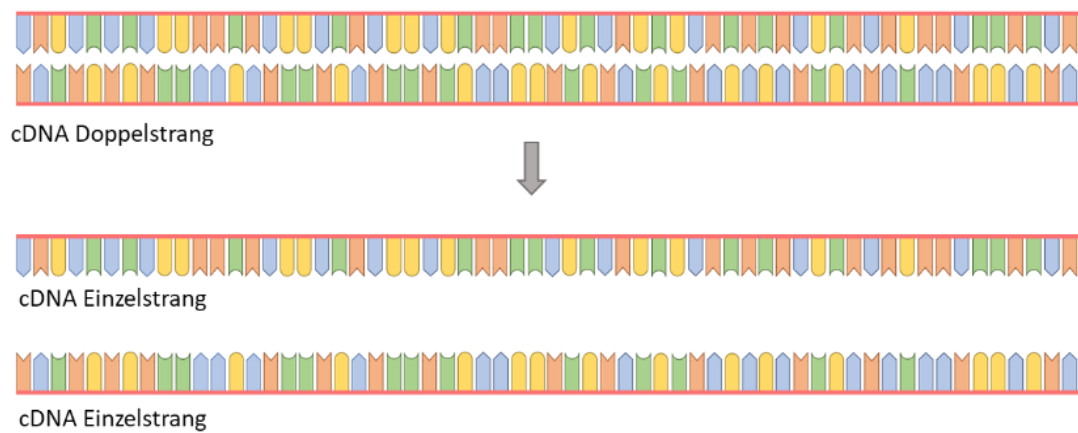
Hierbei wurden je zwei parallele Ansätze pro Probe durchgeführt und anschließend zusammengeführt. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz, in dem das RNA Extrakt durch Wasser ersetzt wurde.

3.4.2 qPCR

Polymerase Kettenreaktion



Denaturieren



Annealing



Abbildung 5 - Prinzip der Polymerase Kettenreaktion Teil 1

Die cDNA, welche spontan Doppelstränge bildet, wird zuerst mithilfe einer Temperatur von 95°C in Einzelstränge denaturiert. Anschließend wird der Ansatz auf 60°C abgekühlt und somit die Bindung der, für das Zielgen sequenzspezifischen, Primer an die cDNA ermöglicht (Annealing). In Teilen modifiziert nach zymoresearch (siehe 7.2 Bildquellen)

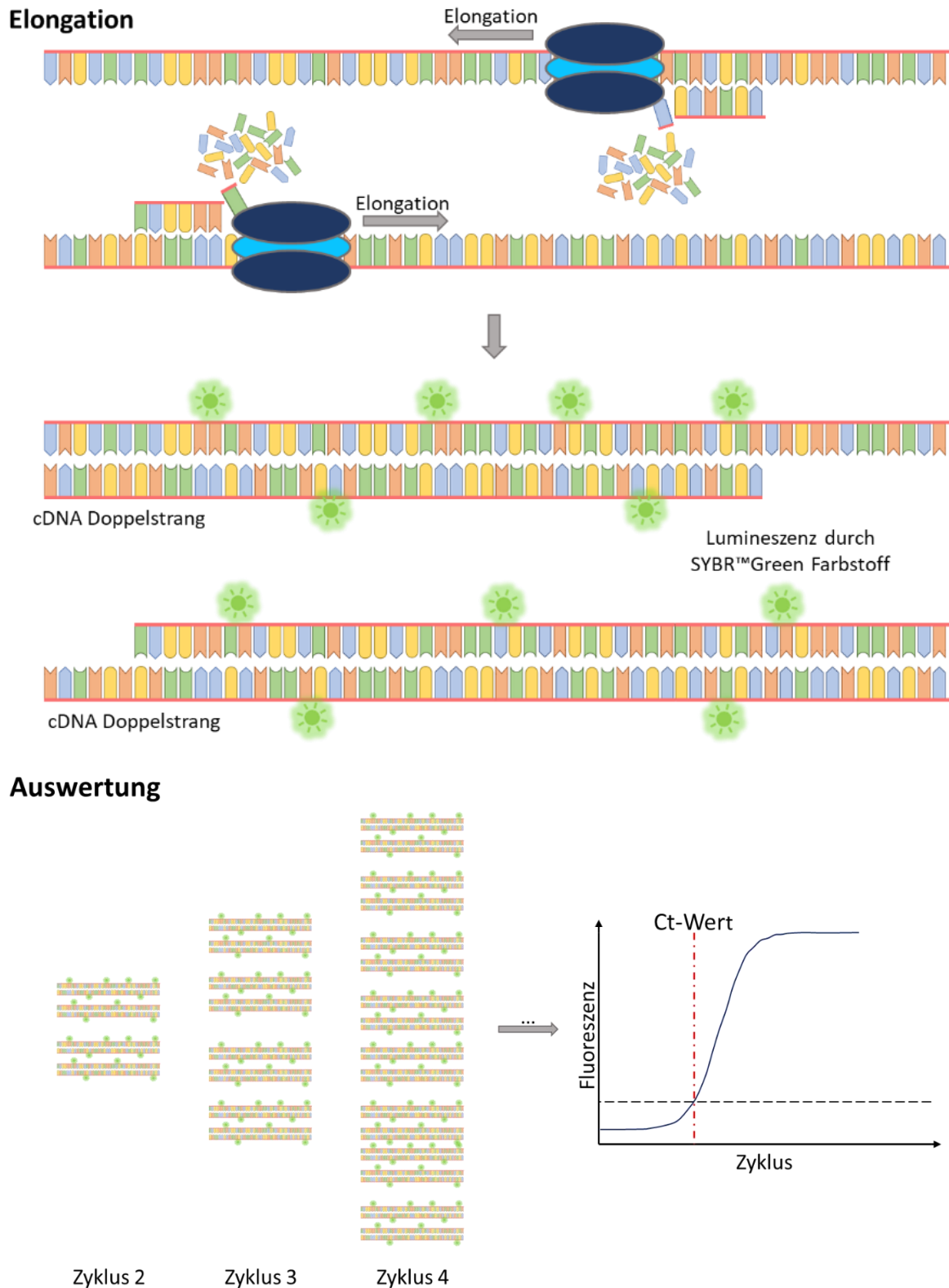


Abbildung 6 - Prinzip der Polymerase Kettenreaktion Teil 2

Die nun folgende Erhöhung der Temperatur auf 72°C führt zu einer Aktivierung der DNA-Polymerase und somit zu einer Ergänzung der cDNA-Einzelstränge zu Doppelsträngen. (Elongation) An diese bindet der SYBR™Green Farbstoff und generiert hierbei ein Fluoreszenz-Signal, dessen Intensität ein indirektes Maß der DNA-Menge darstellt und nach jedem Zyklus gemessen wird. Der errechnete Zyklus, bei dem die Fluoreszenz einen gewissen Wert übersteigt, gibt den Ct-Wert an. In Teilen modifiziert nach zymoresearch (siehe 7.2 Bildquellen)

Die cDNA wurde mithilfe des LightCycler™ 480 SYBR™ Green I Master Kits und des LightCyclers 480 analysiert.

Unter Verwendung der, in Tabelle 7 dargestellten Primer, wurden Triplikate des folgenden 20µl Ansatzes auf eine 96-Well Platte pipettiert:

10 µl 2x-SYBR™ Green MasterMix

0,5 µM Primer forward

0,5 µM Primer reverse

1 µl cDNA

7 µl H₂O

Das SYBR™ Green fungiert hierbei als Farbstoff, welcher an die, im Verlauf der qPCR entstehende, doppelsträngige DNA bindet und somit zum Nachweis dieser dient. Die Bindung von SYBR™ Green an die DNA führt zu Fluoreszenz, welche vom LightCycler™ 480 detektiert werden kann. Die Stärke der Fluoreszenz kann dann als Maß für die Menge an doppelsträngiger DNA verwendet werden.

Die pipettierte Platte wurde mit einer Folie bedeckt und für 1min bei 1500rpm zentrifugiert.

Anschließend wurde die qPCR mit folgenden Einstellungen durchgeführt:

Prä-Inkubation:

95°C 10min Denaturierung

Amplifikation (40 Zyklen):

95°C 10sek Denaturierung

60°C 20sek Annealing

72°C 30sek DNA-Elongation

➔ Messung der Fluoreszenz

Schmelzkurve:

95°C 5sek Denaturierung

65°C 1min

Kontinuierliche Erhöhung von 65°C auf 97°C mit 0,11°C/sek

➔ Messung der Fluoreszenz alle 5°C

Die Generierung der Schmelzkurven diene hierbei der Kontrolle der Spezifität der Primer bzw. des Amplifikationsproduktes im Rahmen der Methodenetablierung.

Der Ct-Wert entspricht dem Zyklus, bei welchem die Fluoreszenz einen, vom Gerät und Messsystem abhängigen, festen Wert übersteigt. Durch die Verdopplung der Menge an doppelsträngigen DNA mit jedem Zyklus entspricht ein um 1 höherer Ct-Wert der halben cDNA-Menge im Ansatz.

Es wurden Mittelwerte der Ct-Werte der Triplikate ermittelt und die extended $2^{\Delta\Delta Ct}$ -Methode verwendet, um, ausgehend von den Ct-Werten, den ursprünglichen RNA-Gehalt zu errechnen (145). Diese Methode vergleicht die Differenz der Expression zwischen dem gesuchten Gen und Referenzgenen unter den Versuchsbedingungen. GAPDH, TBP und HPRT dienten hierbei als Referenz-Gene (146).

Die RNA-Messung mittels RT-qPCR wurde hierbei in drei Ansätzen mit verschiedenen Passagen jeder Zelllinie wiederholt.

3.5 Statistische Auswertung

Für die statistische Analyse der erhobenen Daten wurde Microsoft®Excel® sowie das open source Statistikinterface jamovi (Version 2.2.5) genutzt (129). Dieses basiert auf der Statistikprogrammiersprache R (hier Version 4.0) (147). Hierbei wurden folgende R packages verwendet: *finalfit*, *survival*, *survmine* (148–150).

Die Erstellung und Bearbeitung von Abbildungen und Tabellen erfolgte mittels Jamovi, Microsoft®Word® sowie Microsoft®PowerPoint®.

Unterschiede der LSD1 und SNAIL Expression zwischen zwei unabhängigen Gruppen wurden bei normalverteilten Werten mithilfe des zweiseitigem Student's-t-Tests (bei homogener Varianz der Gruppen) oder des Welch's-t-Tests (bei inhomogener Varianz der Gruppen) auf Signifikanz untersucht. Bei nicht normalverteilten Werten wurde der Mann-Whitney-U Test genutzt. Die Analyse der LSD1 bzw. SNAIL Expression in Primarien und dem jeweils zugehörigen Metastasen- oder Rezidivgewebe wurde bei nicht normalverteilten Werten mittels Wilcoxon-signed-rank Tests bei normalverteilten mittels gepaartem t-Test durchgeführt. Die Normalverteilung wurde hierbei mittels Shapiro-Wilk Tests, die Homogenität der Varianz mittels Levene's Test geprüft.

Zur Untersuchung der Korrelation von LSD1 und SNAIL wurde der Pearson Korrelationskoeffizient bestimmt und die Signifikanz mittels Pearson Chi-squared-Test getestet.

Die Kaplan-Meier Methode sowie der Log-rank Test wurden zur Analyse des Gesamt- und Rezidivfreien 5-J. Überlebens sowie der Signifikanztestung der Unterschiede genutzt.

Unterschiede im 5-J. Rezidiv-freien Überleben im Kontext der Radio- und Chemotherapie wurden mittels der univariaten Cox proportional hazard regression untersucht und auf Signifikanz getestet.

Des Weiteren erfolgten univariate und multivariate Überlebensanalysen mittels des Cox proportional hazard regression Models zur Testung der Unabhängigkeit der prognostischen Qualität von anderen prognostisch relevanten Faktoren. Hierbei wurden lediglich jene Faktoren in der multivariaten Analyse inkludiert, die auch in der univariaten Analyse einen signifikanten Zusammenhang mit dem Überleben zeigten. Signifikanzen von $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet und das Signifikanzniveau wie folgt gekennzeichnet:

- * $p < 0,05$
- ** $p < 0,01$
- *** $p < 0,001$
- **** $p < 0,0001$

4 Ergebnisse

4.1 LSD1 und SNAIL Expression

Das Tumorgewebe der LSD1 und SNAIL gefärbten Kohorte zeigten ein Spektrum an Färbeintensitäten, welches von komplett negativ über schwach und moderat bis stark positiver Färbung reichte (Abbildung 7). Die Färbung beschränkte sich hierbei nahezu komplett auf die Zellkerne der tumorösen Zellen, während nichtmaligne Zellen und deren Nuklei nicht angefärbt wurden.

Die Intensität der LSD1 Färbung war innerhalb einer Tumorstanze sowie über die drei Stanzen, welche derselben Probe entstammen, weiterstgehend homogen, sodass der bedeutende Großteil der Zellkerne einer Probe der gleichen Intensitätskategorie zugehörte.

Bei den SNAIL gefärbten Proben war hier ein größeres Maß an Varianz der nukleären Färbeintensität zu beobachten. Viele Stanzen beinhalteten sowohl niedrig und moderat als auch stark positiv gefärbte Zellkerne, wobei der Anteil der jeweiligen Färbeintensität sich zwischen den verschiedenen Proben unterschied.

Um die Färbeintensität einer Probe, welche als Maß für die Expression dient, wiederzugeben, wurde sich daher für die Verwendung des H-Scores entschieden (3.1.2 Auswertung).

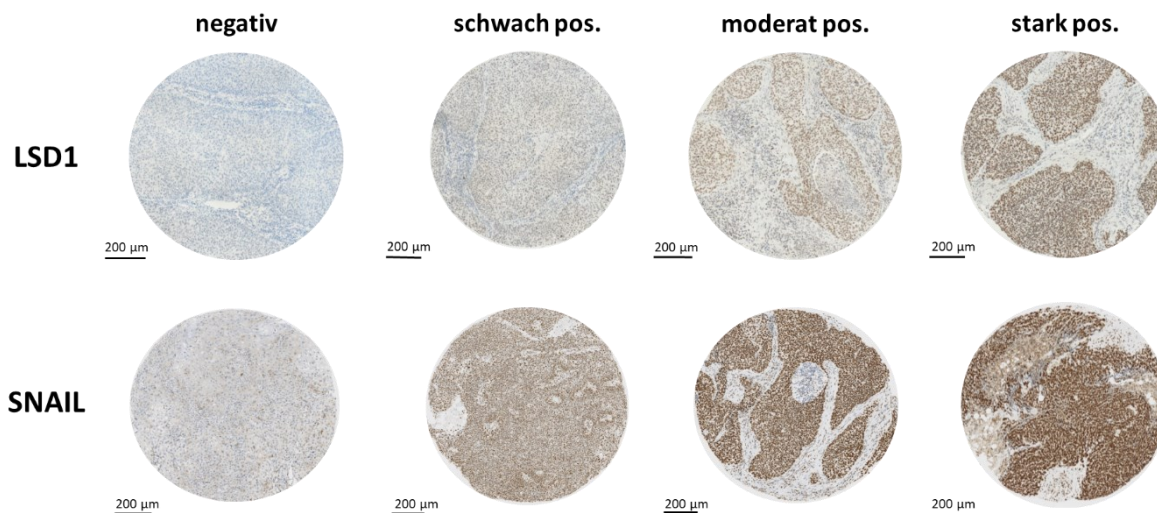


Abbildung 7 - Beispielhafte Darstellung der immunhistochemischen LSD1 und SNAIL Färbungen

Dargestellt sind Beispiele für Cores, in welchen die Färbeintensität der immunhistochemischen LSD1 (oben) bzw. SNAIL (unten) Färbung der Zellkerne im Tumorgewebe überwiegend als negativ, schwach, moderat und stark positiv eingestuft wurde (von links nach rechts).

4.2 Expression nach Gewebetyp

Die durchschnittliche LSD1 und SNAIL Expression variierte zwischen den untersuchten Gewebetypen. So war die durchschnittliche LSD1 Expression in Primarien (n=334) signifikant höher als in Lymphknotenmetastasen (LK-Metastase) (n=163) und signifikant niedriger als in Rezidiven (n=59) ($p=0,049$ und $p=5,6 \times 10^{-5}$) (Abbildung 8). Diese Unterschiede bestanden ebenfalls in der matched-pair Analyse der Primarien und jeweils zugehörigen LK-Metastase bzw. des zugehörigen Rezidivs ($p=0,024$ und $p=5,3 \times 10^{-4}$). Zudem zeigte sich tendenziell eine zunehmende LSD1 Expression von LK-Metastase über Fernmetastase zum Rezidivgewebe.

In Bezug auf die SNAIL Expression stellte sich jeweils eine signifikant höhere durchschnittliche Expression in LK-Metastasen (n=165), Fernmetastasen (n=21) und Rezidiven (n=57) im Vergleich zu Primarien (n=332) dar (LK: $p=0,014$, FM: $0,008$, Rez.: $3,0 \times 10^{-9}$) (Abbildung 8). Bei der matched-pair Analyse blieben hierbei lediglich die Unterschiede zwischen den Metastasen und den zugehörigen Primarien signifikant (LK: $p=0,008$, FM: $0,019$).

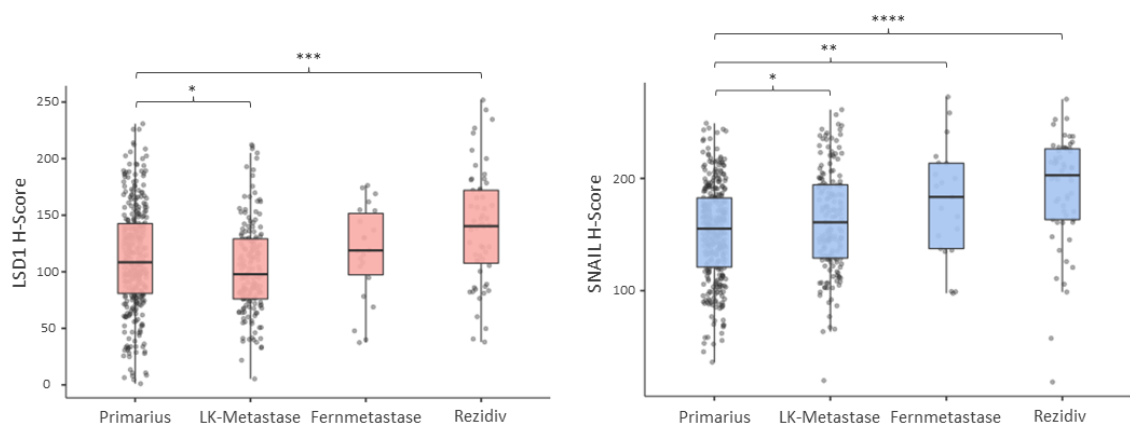


Abbildung 8 - LSD1 und SNAIL Expressionsunterschiede nach Gewebetyp

Die Box-Plots zeigen die Expressionsunterschiede von LSD1 (links) und SNAIL (rechts) zwischen den untersuchten Gewebetypen. Hierbei wurden Primarien (n=334/332), LK-Metastasen (n=163/165), Fernmetastasen (n=22/21) und Rezidive (n=59/57) untersucht. Signifikante Unterschiede wurden wie folgt gekennzeichnet: *- $p<0,05$; **- $p<0,01$; ***- $p<0,001$; ****- $p<0,0001$

4.3 Expression nach Primärlokalisation

Die Analyse der LSD1 und SNAIL Expression der Primarien in Abhängigkeit der Tumorlokalisierung ergab eine signifikant höhere LSD1 Expression in primären HNSCC des Hypopharynx (HPSCC) (n=46) als in denen des Larynx (LSCC) (n=98), der Mundhöhle (n=76) oder des Oropharynx (OPSCC) (n=98) ($p=0,046$, $p=0,008$, $p=0,049$) (Abbildung 9). Die LSD1 Expression der LSCC, OSCC und OPSCC waren hierbei nahezu gleich und zeigten keine signifikanten Unterschiede.

Die durchschnittliche SNAIL Expression wies zwischen den Primarien verschiedener Lokalisationen keine signifikanten Unterschiede auf.

Da zwischen p16 positiven und p16 negativen OPSCC weder LSD1 (p16 pos.: n=53, p16 neg. n=50) noch SNAIL (p16 pos.: n=56, p16 neg. n=48) Expressionsunterschiede bestanden, wurden sie hier als Oropharynxtumore zusammengefasst.

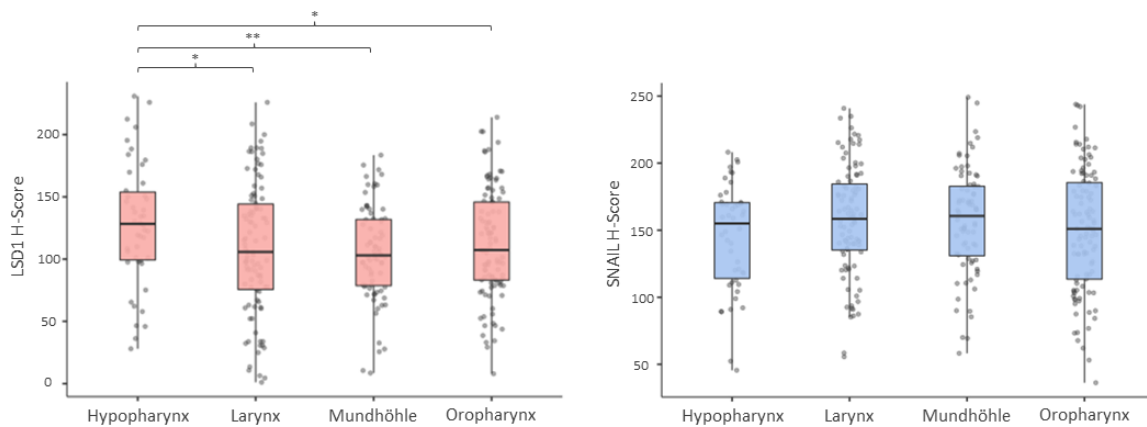


Abbildung 9 - LSD1 und SNAIL Expressionsunterschiede nach Primärlokalisation

Die dargestellten Box-Plots zeigen Unterschiede in der LSD1 (links) bzw. SNAIL (rechts) Expression zwischen den untersuchten HNSCC Primärlokalisationen des Hypopharynx (n=46/46), des Larynx (n=98/95) der Mundhöhle (n=76/76) und des Oropharynx (n=103/104). Signifikante Unterschiede wurden wie folgt gekennzeichnet: *-p<0,05; **-p<0,01.

4.4 Korrelationen mit klinisch pathologischen Daten

Bei der Betrachtung der LSD1 Expression im Kontext verschiedener Tumor- und Patientencharakteristika in HNSCC Primären stellte sich eine erhöhte LSD1 Expression in fortgeschrittenen Tumorstadien dar. Die LSD1 Expression war in Tumoren mit fortgeschrittenem T-, N- und UICC-Stadium gegenüber jenen mit einem niedrigen Stadium signifikant erhöht (T: 0,001, N: p=0,007, UICC: p=0,026) (Tabelle 9). Zudem ließ sich eine höhere LSD1 Expression in Tumoren von Patienten beobachten, die Alkohol konsumieren als in den Tumoren derer ohne Alkoholabusus (p=0,010).

Im Weiteren wurden die Primären nach ihrer Lokalisation aufgetrennt und Korrelationen mit klinisch pathologischen Eigenschaften der Patienten und der Tumore isoliert analysiert.

Hierbei zeigte sich die Korrelation mit einem fortgeschrittenem Tumorstadium mit der Ausnahme einer erhöhten LSD1 Expression in p16 positiven OPSCC mit einem fortgeschrittenem N-Stadium (p=0,005) einzig in den Tumoren des Hypopharynx. Hier ließ sich eine Korrelation der LSD1 Expression mit einem fortgeschrittenem T-, N- und UICC-Stadium beobachten (T: p=3,9 x 10⁻⁴, N: p=0,016, UICC: p=0,014).

In primären LSCC konnte eine erhöhte LSD1 Expression in Tumoren von Patienten weiblichen Geschlechts und in jenen, die kein Nikotin Konsum angaben, beobachtet werden (p=0,016 und p=0,035).

Außerdem wiesen primäre OSCC von Patienten, die Alkohol konsumieren eine signifikant höhere LSD1 Expression auf, als die jener, die kein Alkohol konsumieren ($p=0,002$).

Tabelle 9 - LSD1 Expression nach Lokalisation und Tumorcharakteristika

LSD1 Expression in primären HNSCC Tumoren nach Lokalisation und klinisch pathologischen Daten. Gezeigt sind die durchschnittlichen H-Score Werte der jeweiligen Kategorie. Sich signifikant unterscheidende Werte sind fett gedruckt und das Signifikanzniveau gekennzeichnet. *- $p<0,05$; **- $p<0,01$; ***- $p<0,001$

		HNSCC (n=334)	Hypopharynx (n=46)	Larynx (n=98)	Mundhöhle (n=76)	Oropharynx p16 pos. (n=53)	Oropharynx p16 neg. (n=50)
Geschlecht	männlich	112,4	129,6	104,2*	110,4	114,4	126,8
	weiblich	110,2	119,5	144,5*	94,9	98,6	111,6
Alter	≤ 61 J.	110,5	124,6	102,4	105,9	108,2	123,8
	> 61 J.	112,8	130,5	113,1	103,2	110,1	107,3
T-Stadium	T 1,2,3	106,8**	114,3***	104,9	103,7	106,8	111,1
	T 4	130,2**	171,7***	119,3	111,2	123,5	128,4
N-Stadium	N 0,1	105,5**	107,3*	109,2	104,0	97,6**	109,3
	N 2,3	120,0**	141,9*	105,5	106,0	132,1**	115,5
M-Stadium	M0	111,7	126,7	108,7	104,1	109,3	114,7
	M1	120,0	188,5	109,3	113,5	-	123,7
UICC-Stadium	I – III	106,6*	106,1*	111,8	102,5	103,5	113,3
	IV	118,3*	142,1*	104,5	107,9	134,4	115,8
p16	pos.	113,3	98,5	126,9	114,1	109,3	-
	neg.	111,4	130,8	105,5	103,3	-	114,9
Alkohol	Ja	119,8**	133,0	108,9	120,0**	124,8	119,8
	Nein	106,7**	117,5	108,7	92,8**	107,2	106,2
Nikotin	Ja	113,0	128,2	107,5*	105,5	114,0	116,2
	Nein	115,7	141,7	145,4*	107,7	100,7	92,8

In Bezug auf die SNAIL Expression der primären HNSCC nach klinisch pathologischen Charakteristika ließ sich eine signifikant erhöhte Expression in Tumoren mit einem niedrigen N-Stadium sowie in jenen von Patienten, die kein Nikotin konsumieren, zeigen ($p=0,006$ und $p=0,022$).

Die Tendenz einer Korrelation mit einem niedrigen N-Stadium ergab sich, wenn auch nicht signifikant, in der isolierten Betrachtung von LSCC, OSCC und OPSCC, während die Tendenz in Primarien des Hypopharynx umgekehrt war.

Die getrennte Betrachtung der einzelnen Primärlokalisationen ergab des Weiteren in LSCC eine signifikante Korrelation der SNAIL Expression mit einem niedrigen UICC-Stadium und einem

positiven p16 Status ($p=0,028$, $p=0,012$). Zudem war die SNAIL Expression in Tumoren von Nichtrauchern signifikant höher als in denen von Rauchern ($p=0,019$).

Tabelle 10 - SNAIL Expression nach Lokalisation und Tumorcharakteristika

SNAIL Expression in primären HNSCC Tumoren nach Lokalisation und klinisch pathologischen Daten. Gezeigt sind die durchschnittlichen H-Score Werte der jeweiligen Kategorie. Sich signifikant unterscheidende Werte sind fett gedruckt und das Signifikanzniveau gekennzeichnet. *- $p<0,05$; **- $p<0,01$; ***- $p<0,001$

		HNSCC (n=332)	Hypopharynx (n=46)	Larynx (n=95)	Mundhöhle (n=76)	Oropharynx p16 pos. (n=56)	Oropharynx p16 neg. (n=48)
Geschlecht	männlich	151,1	147,2	154,5	157,0	145,0	150,4
	weiblich	157,4	130,5	179,3	157,3	149,3	166,8
Alter	≤ 61 J.	151,6	143,9	154,0	154,8	149,6	157,6
	> 61 J.	153,0	145,2	159,8	160,0	144,1	150,4
T-Stadium	T 1,2	156,3	144,6	165,0	160,2	150,5	156,6
	T 3,4	148,4	144,8	151,4	154,0	137,5	150,1
N-Stadium	N 0	159,5**	138,6	159,0	161,3	163,4	171,1
	N 1,2,3	146,6**	145,9	153,5	152,9	142,2	146,8
M-Stadium	M0	152,3	143,6	157,6	158,7	146,3	153,7
	M1	148,8	192,9	154,6	134,5	-	162,1
UICC-Stadium	I - II						
	III - IV	157,0	140,9	170,3*	165,0	147,5	157,0
p16	pos.	150,2	120,8	181,6*	141,8	146,3	-
	neg.	153,2	147,0	152,9*	159,4	-	153,9
Alkohol	Ja	152,2	148,8	160,8	153,1	155,2	153,6
	Nein	151,6	133,2	156,0	159,2	144,2	154,4
Nikotin	Ja	150,1*	139,9	154,2*	154,3	146,2	155,7
	Nein	167,4*	184,8	188,2*	168,2	150,5	153,2

4.5 Koexpression von LSD1 und SNAIL

Die Untersuchung einer Korrelation von LSD1 und SNAIL ergab deren Ko-Expression in den untersuchten Patientenproben. Dieser Zusammenhang zeigte sich sowohl in der Betrachtung der Primären ($PCC=0,3237$, $p=2,067 \times 10^{-8}$)

(Tabelle 11) als auch in der gesammelten Betrachtung aller verfügbaren Gewebeproben ($PCC=0,2982$, $p=3,611 \times 10^{-13}$) (Tabelle 12).

Die Ko-Expression von LSD1 und SNAIL ist hierbei auch im mikroskopischen Bild sichtbar. Hier wiesen Tumorstanzen, die eine hohe Intensität in der einen auch eine hohe Intensität in der anderen Färbung auf (Abbildung 10).

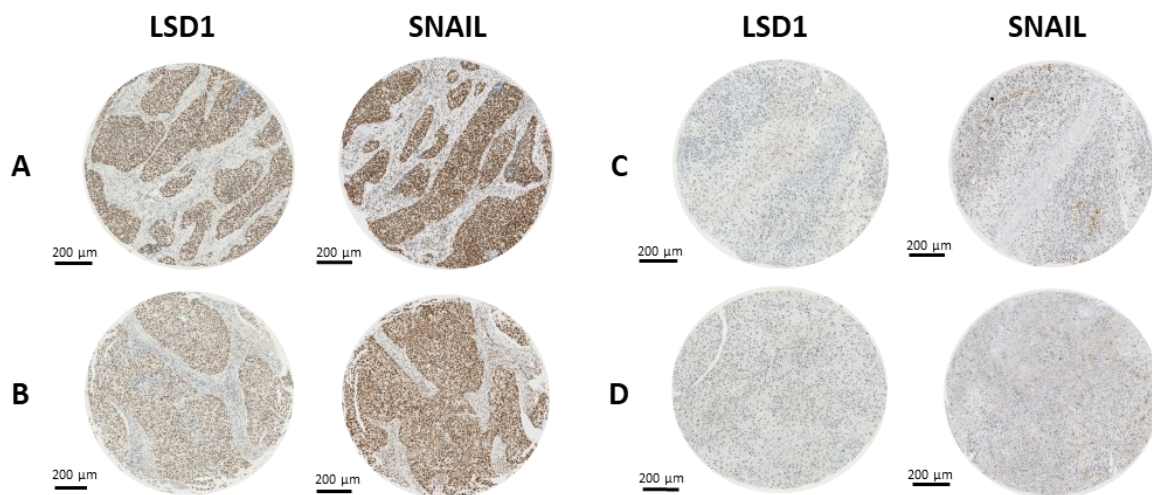


Abbildung 10 - LSD1 und SNAIL Ko-Expression: Beispiel-Cores

Beispielhaft gezeigt sind vier Paare (A-D) der jeweils gleichen Tumorstanze in der SNAIL und LSD1 Färbung. Diese geben den Eindruck wieder, dass Cores, welche eine hohe Färbeintensität aufwiesen in der einen auch in der jeweils anderen Färbung eine hohe Färbeintensität zeigten (A, B) und jene Cores mit niedrigen Färbeintensität in der einen Färbung auch in der jeweils anderen lediglich schwach angefärbt wurden (C,D).

Tabelle 11 - Assoziation von LSD1 und SNAIL in primären HNSCC

Eine hohe LSD1 Expression in Primärtumoren ist signifikant mit einer hohen SNAIL Expression assoziiert.

	SNAIL niedrig	SNAIL hoch	Signifikanz
LSD1 niedrig	104 (63,4%)	59 (36,2%)	p < 0,001
LSD1 hoch	60 (36,6%)	104 (63,8%)	

Tabelle 12 - Assoziation von LSD1 und SNAIL in allen Geweben

Eine signifikante Assoziation von LSD1 und SNAIL Expression ließ sich auch dann beobachten, wenn alle verfügbaren Proben aller Patienten betrachtet wurden.

	SNAIL niedrig	SNAIL hoch	Signifikanz
LSD1 niedrig	177 (62,1%)	111 (38,9%)	p < 0,001
LSD1 hoch	108 (37,9%)	174 (61,1%)	

4.6 Prognostische Relevanz von LSD1 und SNAIL in HNSCC

Im Weiteren wurde untersucht, ob es einen Zusammenhang der Expression von LSD1 und dem Gesamtüberleben oder dem Rezidiv-freien Überleben gibt (Abbildung 11).

Hierbei ließ sich in Bezug auf das Gesamtüberleben weder in der Gesamtkohorte noch in der getrennten Analyse der einzelnen Primärlokalisationen eine signifikante Korrelation der LSD1 Expression mit einer schlechteren Prognose beobachten. Jedoch zeigte sich insbesondere in HPSCC die Tendenz eines schlechteren Gesamtüberleben bei Tumoren, welche eine erhöhte LSD1 Expression aufwiesen (Abbildung 11C).

Bei der Analyse des Rezidiv-freien Überlebens in Abhängigkeit der LSD1 Expression ließ sich in der Gesamtkohorte ebenfalls kein signifikanter Unterschied feststellen (Abbildung 11B). Die getrennte Betrachtung der Sublokalisationen ergab einzig im Hypopharynx einen signifikanten Unterschied in Hinsicht auf das Rezidiv-freie Überleben (Abbildung 11D). Hierbei korrelierte eine erhöhte LSD1 Expression mit einer schlechteren Prognose. Die multivariate Analyse dieses Zusammenhangs ergab, eine Unabhängigkeit von anderen prognostisch relevanten Faktoren (Appendix 1).

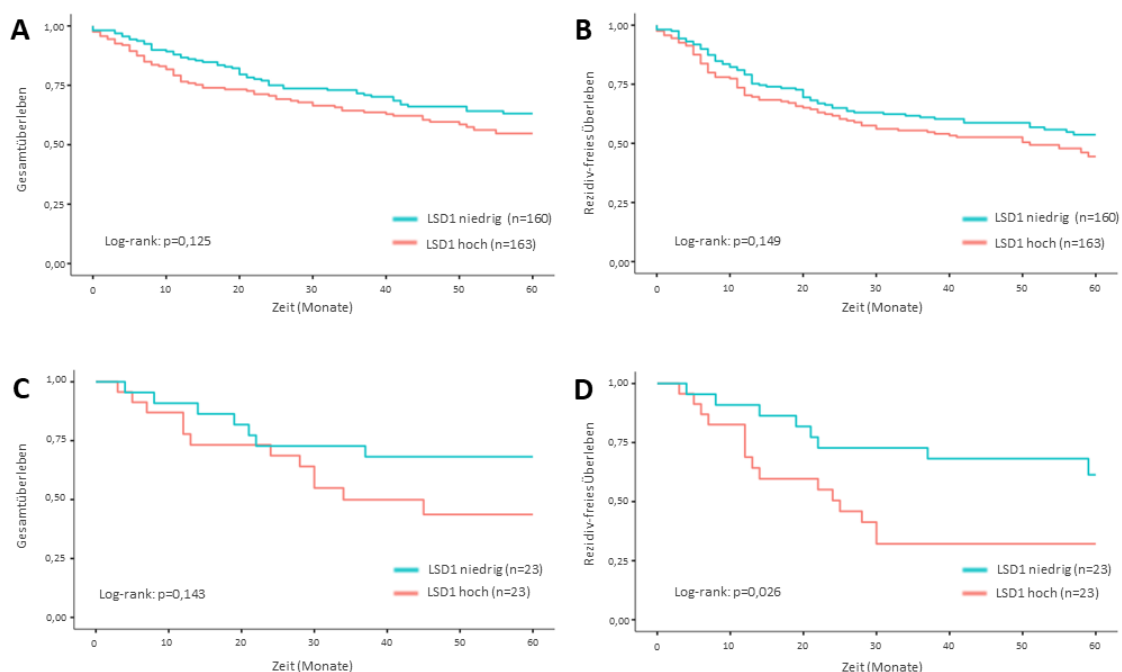


Abbildung 11 - Überleben nach LSD1 Expression

Die dargestellten Kaplan-Meier Kurven zeigen die Unterschiede zwischen LSD1 hoch und niedrig exprimierenden Tumoren in Bezug auf das Gesamtüberleben (A, C) und das Rezidiv-freie Überleben (B, D). In A und B werden hierbei alle HNSCC Primären, in C und D lediglich jene, die aus dem Hypopharynx stammen betrachtet.

Eine erhöhte SNAIL Expression korrelierte in der Gesamtkohorte sowohl in Bezug auf das Gesamt- als auch das Rezidiv-freie Überleben mit einer signifikant schlechteren Prognose (Abbildung 12A und B). Die prognostische Relevanz zeigte sich in der multivariaten Analyse als unabhängig von anderen prognostischen Faktoren (OS: Appendix 2, RFS:

Appendix 3).

Es ließ sich einzig in den Tumoren des Hypopharynx ein Zusammenhang zwischen der SNAIL Expression und der Prognose in Bezug auf das Gesamt- und das Rezidiv-freie Überleben beobachten (Abbildung 12C und D). Hierbei korrelierte eine erhöhte SNAIL Expression signifikant mit einer schlechteren Prognose in beiden Betrachtungen. Diese Korrelation mit einer schlechten Prognose in HPSCC war in der multivariaten Analyse in Bezug auf das Rezidiv-freie Überleben als unabhängig von anderen prognostisch relevanten Tumor- und Patienteneigenschaften (Appendix 4). Dies gilt nicht für das Gesamtüberleben in HPSCC.

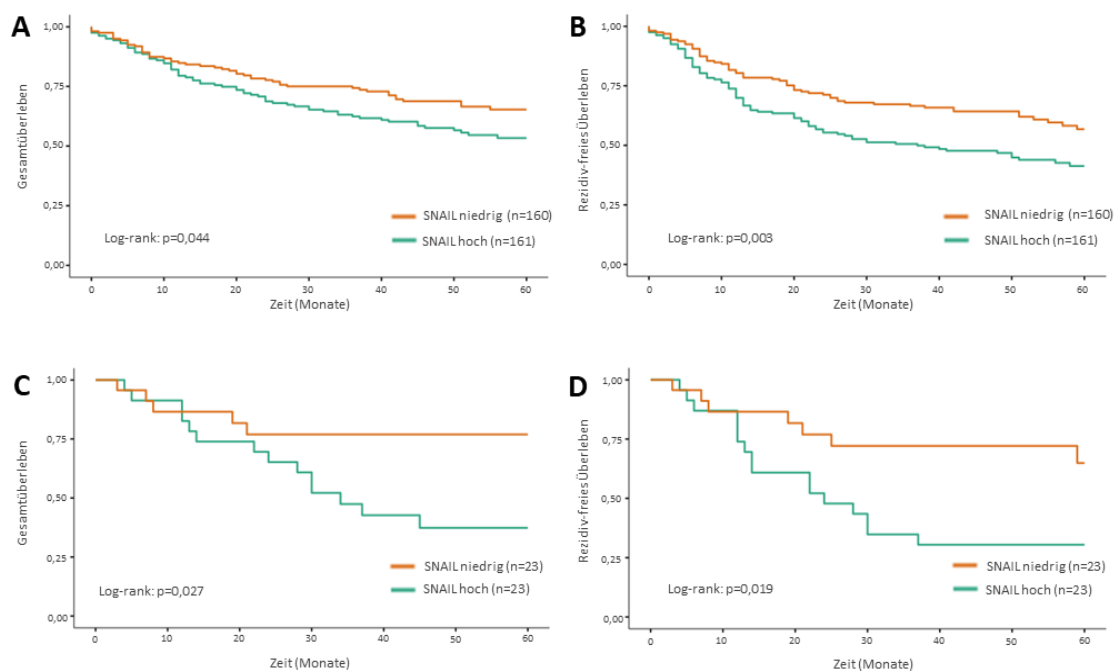


Abbildung 12 - Überleben nach SNAIL Expression

Dargestellt sind Kaplan-Meier Kurven, welche die Unterschiede im Gesamtüberleben (A, C) und Rezidiv-freien Überleben (B, D) zwischen SNAIL hoch und niedrig exprimierenden Primären zeigen. In A und B werden hierbei alle HNSCC Primären, in C und D nur Hypopharynxtumore betrachtet.

Um zu überprüfen, ob die gemeinsame Überexpression von LSD1 und SNAIL eine andere prognostische Aussagekraft hat, als die Überexpression lediglich eines der beiden Proteine, wurden im Folgenden die LSD1 und SNAIL Expressionsdaten der Tumore miteinander kombiniert und deren Korrelation mit dem Gesamt- und Rezidiv-freien Überleben analysiert (Abbildung 13). Die Tumore, die eine simultane Überexpression beider Marker aufwiesen, wurden mit denen, mit einer alleinigen Überexpression eines der beiden Marker und jenen Tumoren verglichen, die sowohl LSD1 als auch SNAIL niedrig oder nicht exprimieren.

Dabei zeigte sich ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben in den Tumoren der Gesamtkohorte, die sowohl LSD1 als auch SNAIL überexprimieren, als in denen, die beide Marker nicht oder niedrig exprimieren (Abbildung 13A). Des Weiteren ließ sich sowohl im Vergleich der

Tumore, die beide Proteine stark exprimieren als auch in jenen, die entweder LSD1 oder SNAIL hoch, das andere jedoch niedrig exprimieren mit den Tumoren, die beide Marker niedrig exprimieren, ein signifikant schlechteres Rezidiv-freie Überleben beobachten (Abbildung 13B).

Die isolierte Analyse der einzelnen Primärlokalisationen ergab keine signifikanten Unterschiede in LSCC, OSCC oder OPSCC. In HPSCC zeigte sich jedoch sowohl in Bezug auf das Gesamt- als auch das Rezidiv-freie Überleben eine signifikant schlechtere Prognose für Patienten mit LSD1 und SNAIL überexprimierenden Tumoren als in denen, die sowohl LSD1 als auch SNAIL niedrig exprimieren (Abbildung 13C und D).

Insbesondere die Betrachtung des Rezidiv-freien Überlebens in HPSCC ergab tendenziell eine schlechtere Prognose, wenn beide Marker hoch exprimiert sind, als wenn entweder LSD1 oder SNAIL hoch, das jeweils andere jedoch niedrig exprimiert ist (Abbildung 13D).

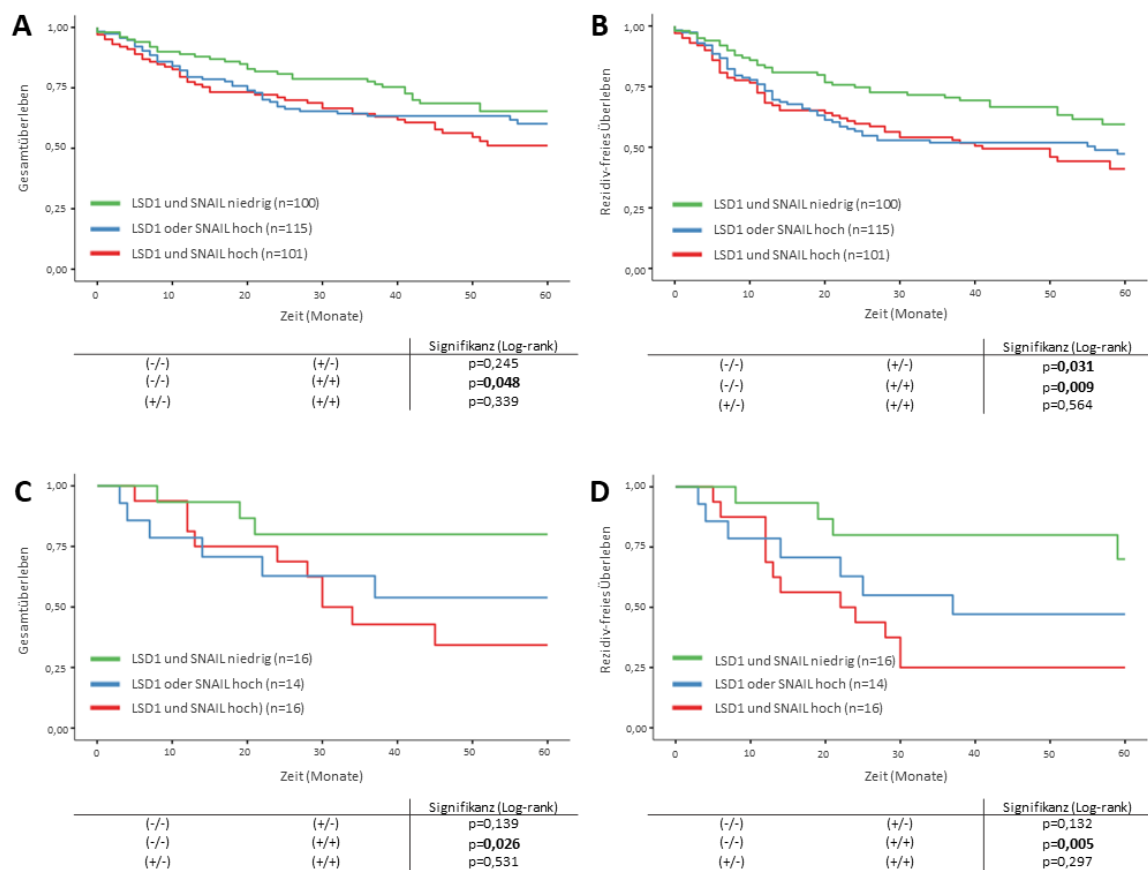


Abbildung 13 - Überleben nach LSD1 und SNAIL Expression

Gezeigt sind Kaplan-Meier Kurven in Bezug auf das Gesamtüberleben (A, C) und das Rezidiv-freie Überleben (C, D) in HNSCC Primären (A, B) und Primären des Hypopharynx in getrennter Betrachtung (C, D). Hierbei werden Tumore, die sowohl LSD1 als auch SNAIL nicht oder nur schwach exprimieren (-/-), mit jenen, die beide Proteine stark exprimieren (+/+) und jenen, die entweder LSD1 oder SNAIL stark, das jeweils andere aber nicht oder schwach exprimieren (+/-), verglichen. Die paarweise Signifikanztestung mittels Log-Rank Tests ist jeweils unterhalb der Kurven gezeigt und signifikante Ergebnisse fett hervorgehoben.

4.7 LSD1 und SNAIL Expression und Therapiesensitivität

Trotz der Entwicklung neuer Therapieoptionen, wie der Inhibition von EGFR oder der Hemmung der PD-1/PD-L1 Interaktion, nehmen Radio- und Chemotherapie bei der Behandlung von HNSCC weiterhin eine entscheidende Rolle ein (2). Zur Beurteilung der Sensitivität der HNSCC Tumore der untersuchten Kohorte auf Radio- und Chemotherapie wurden im Folgenden jeweils jene Tumore isoliert betrachtet, die mittels dieser Therapieansätze behandelt wurden. Die Sensitivität der Tumore für die jeweilige Therapie wurde anhand des 5-J. Rezidiv-freien Überlebens der Patienten beurteilt, diese Therapie bekommen habe. Eine bessere Prognose in Bezug auf das Rezidiv-freie Überleben wurde hierbei als eine höhere Sensitivität für die jeweilige Therapie interpretiert. Eventuelle Überlappungen der Gruppen (Radio-therapiert oder Chemo-therapiert) durch kombinierte oder sukzessive Behandlung mit Radio- und Chemotherapie oder die Einflüsse anderer Therapien wie z.B. der operativen Entfernung wurden hierbei nicht berücksichtigt.

Tabelle 13 – Rezidiv-freies Überleben in HNSCC mit Chemotherapie nach LSD1 und SNAIL Expression

In der gezeigten Tabelle sind die Unterschiede in Bezug auf das Rezidiv-freie Überleben zwischen den jeweiligen Gruppen anhand der Hazard Ratios aufgeführt. Hierzu wurde eine univariate Cox-Regression mit jenen HNSCC Primarien durchgeführt, die im Verlauf der Erkrankung eine Chemotherapie erhalten haben, durchgeführt. Signifikante Ergebnisse sind fett markiert.

		HR (95% -Konf.)	Signifikanz
LSD1-Expression	LSD1- (n=39)	1,25 (0,72-2,15)	p=0,423
	LSD1+ (n=58)		
SNAIL-Expression	SNAIL- (n=56)	1,67 (0,98-2,83)	p=0,059
	SNAIL+ (n=41)		
LSD1- und SNAIL-Expression	LSD1- und SNAIL- (n=32)	1,58 (0,73-3,43)	p=0,242
	LSD1+ und SNAIL- (n=23)		
	LSD1- und SNAIL- (n=32)	5,48 (2,07-14,51)	p=0,001
	LSD1- und SNAIL+ (n=6)		
LSD1- und SNAIL- (n=32)	1,77 (0,90-3,46)	p=0,097	
LSD1+ und SNAIL+ (n=35)			

Zunächst wurden jene primären HNSCC analysiert, die eine Chemotherapie erhalten haben (n=99) (Tabelle 13). Hier zeigte sich zwischen den Tumoren, die eine hohe und denen, die eine niedrige LSD1 Expression aufwiesen, kein Unterschied im Rezidiv-freie Überleben. In Bezug auf die SNAIL Expression ließ sich beobachten, dass die Tumore mit einer hohen Expression tendenziell eine schlechtere Prognose hatten. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

Des Weiteren wurde eine kombinierte Analyse des prognostischen Wertes der LSD1 und SNAIL Expression durchgeführt. Hierzu wurden jeweils die primären HNSCC, die eine hohe LSD1 aber eine niedrige SNAIL Expression, jene, die eine niedrige LSD1 aber eine hohe SNAIL Expression und die, die für beide Marker eine hohe Expression zeigten, mit den Tumoren verglichen, die sowohl eine niedrige LSD1 als auch eine niedrige SNAIL Expression aufwiesen. Es stellte sich ein signifikant schlechteres Ansprechen auf die Chemotherapie in den Tumoren dar, die SNAIL hoch, LSD1 jedoch niedrig exprimierten, als in jenen die beide Marker niedrig exprimieren. Dieser Unterschied ist zudem unabhängig von anderen prognostischen Faktoren (Appendix 5). Für die Tumore, die SNAIL niedrig, LSD1 jedoch hoch und die, die beide Marker hoch exprimieren ließ sich kein Unterschied der Chemosensitivität beobachten.

Tabelle 14 – Rezidiv-freies Überleben in HNSCC mit Radiotherapie nach LSD1 und SNAIL Expression

In der gezeigten Tabelle sind die Unterschiede in Bezug auf das Rezidiv-freie Überleben zwischen den jeweiligen Gruppen anhand der Hazard Ratios aufgeführt. Hierzu wurde eine univariate Cox-Regression mit jenen HNSCC Primarien durchgeführt, die im Verlauf der Erkrankung eine Radiotherapie erhalten haben, durchgeführt. Signifikante Ergebnisse sind fett markiert.

		HR (95% -Konf.)	Signifikanz
LSD1-Expression	LSD1- (n=88)	1,50 (0,98-2,28)	p=0,062
	LSD1+ (n=106)		
SNAIL-Expression	SNAIL- (n=101)	1,59 (1,04-2,43)	p=0,031
	SNAIL+ (n=91)		
LSD1- und SNAIL-Expression	LSD1- und SNAIL- (n=60)	1,51 (0,81-2,84)	p=0,198
	LSD1+ und SNAIL- (n=39)		
	LSD1- und SNAIL- (n=60)	1,77 (0,90-3,48)	p=0,099
	LSD1- und SNAIL+ (n=27)		
LSD1- und SNAIL- (n=60)	1,96 (1,13-3,39)	p=0,016	
LSD1+ und SNAIL+ (n=64)			

Analog zu der Betrachtung der primären HNSCC, die mittels Chemotherapie behandelt wurden, wurde eine Analyse der Unterschiede im 5-J. Rezidiv-freien Überleben nach LSD1 und SNAIL Expression in Tumoren durchgeführt, die mit Radiotherapie behandelt worden sind (n=201) (Tabelle 14).

Hierbei zeigte sich in jenen HNSCC, die, ungeachtet der LSD1 Expression, eine hohe SNAIL Expression aufweisen, ein signifikant besseres Ansprechen auf die Therapie als bei denen, die eine niedrige SNAIL Expression aufweisen. Dieser Unterschied war in der multivariaten Analyse nicht unabhängig von anderen prognostischen Faktoren (Appendix 6). Bei Tumoren mit einer niedrigen LSD1 Expression lässt sich zudem tendenziell ein besseres Rezidiv-freies Überleben beobachten.

Außerdem zeigen Tumore, die eine kombinierte LSD1 und SNAIL Überexpression aufweisen, ein schlechteres Rezidiv-freies Überleben als jene, die sowohl LSD1 und SNAIL niedrig exprimieren. Dieser Unterschied im Rezidiv-freien Überleben und somit dem Ansprechen auf die Radiotherapie zeigte sich in der multivariaten Analyse als unabhängig von anderen prognostische relevanten Tumor- und Patientencharakteristika (Appendix 7).

4.8 LSD1 und SNAIL in HNSCC Zelllinien

Um die Expression von LSD1 und SNAIL in HNSCC Zelllinien und hier auch Kontext einer Cisplatin Resistenz beurteilen zu können wurde die Expression beider Marker in ausgewählten Zelllinien (FaDu, FaDu cis., Detroit 562, UT-SCC-60A) auf Protein und auf RNA-Ebene untersucht. Die Analyse der LSD1 und SNAIL Expression auf Proteinebene mittels Western Blot ergab durchgehend eine Expression beider Proteine in den Proteinextrakten aus den Zellkernen aller Zelllinien und Passagen. Die Messung wurde drei Mal mit jeweils unterschiedlichen Passagen der Zelllinien durchgeführt. Das Histon H3 diente hierbei als Ladekontrolle, da es ubiquitär und nahezu gleicher Menge im Zellkern exprimiert wird. Abbildung 14 gibt beispielhaft die Ergebnisse dieser drei Western Blots wieder. Da sich in den Western Blots lediglich geringe Expressionsunterschiede von LSD1 und SNAIL zwischen den jeweiligen Zelllinien zeigten, wurde auf eine quantitative Analyse der Western Blot Ergebnisse verzichtet und die LSD1 und SNAIL Expression mittel RT-qPCR auf RNA-Ebene quantifiziert (Abbildung 15).

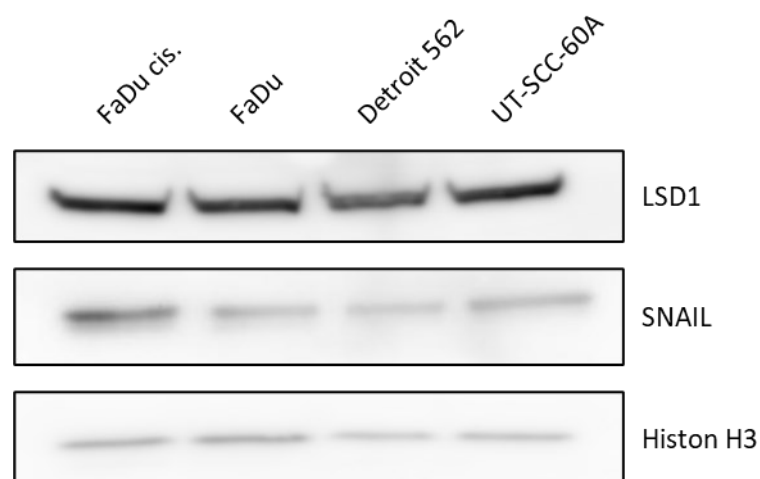


Abbildung 14 - Western Blot von HNSCC Zelllinien

Der dargestellte Western Blot gibt repräsentativ die Ergebnisse Replikate wieder. Zu sehen ist, dass sowohl LSD1 als auch SNAIL in den Zellkernen der untersuchten Zelllinien exprimiert ist.

Hierbei wurden ebenfalls drei Replikate mit jeweils verschiedenen Passagen der Zelllinien betrachtet. Bezüglich LSD1 ließ sich in UT-SCC-60A Zellen eine signifikant höhere Expression

beobachten als in den Zelllinien FaDu und FaDu cis. ($p=8,3 \times 10^{-4}$, $p=0,001$). Außerdem war die LSD1 Expression in Detroit 562 Zellen gegenüber FaDu Zellen signifikant erhöht ($p=0,037$). Ein Unterschied der LSD1 Expression zwischen den Cisplatin resistenten FaDu Zellen und der parental FaDu Zelllinien für LSD1 stellte sich nicht dar.

Bei der Betrachtung der SNAIL Expression zeigte sich in den Cisplatin resistenten FaDu Zellen gegenüber allen anderen untersuchten Zelllinien eine signifikant höhere Expression (FaDu: $p=0,007$, Detroit 562: $p=0,014$, UM-SCC-60A: $p=8,3 \times 10^{-4}$). Zudem war die SNAIL Expression im Vergleich zu den FaDu Zellen in UT-SCC-60A signifikant niedriger ($p=0,010$).

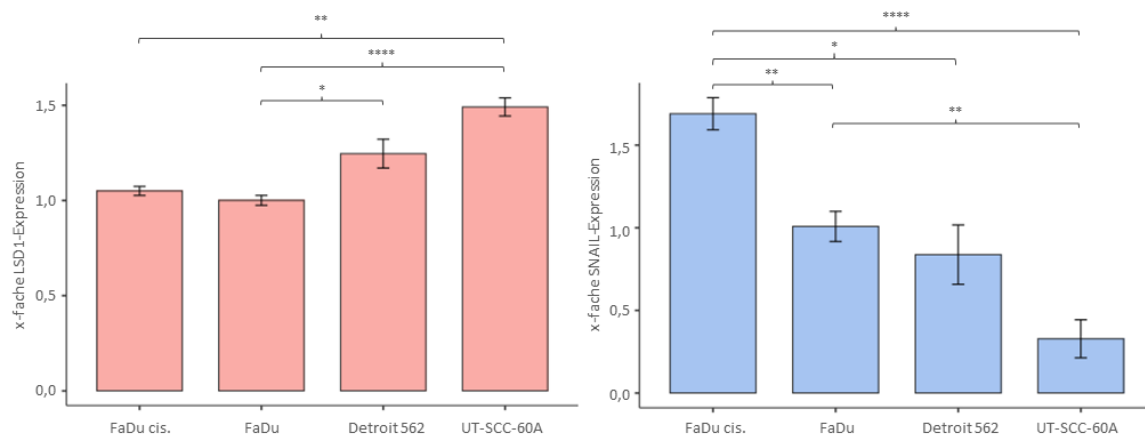


Abbildung 15 - LSD1 und SNAIL Expression in HNSCC Zelllinien

Dargestellt sind die Expressionen von LSD1 (links) und SNAIL (rechts) auf RNA-Ebene in HNSCC Zelllinien. Es wird die x-Fache Expression im Vergleich zu FaDu Zellen gezeigt. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Abweichung vom Mittelwert und signifikante Unterschiede sind wie folgt gekennzeichnet: *- $p < 0,05$; **- $p < 0,01$; ***- $p < 0,001$

5 Diskussion

5.1 Übersicht

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals Bereichs sind eine häufige Tumorerkrankung, die oft schwere Einschnitte in die Lebensqualität betroffener Patienten mit sich bringt (2). Die Etablierung neuer Biomarker sowie die Erweiterung des Forschungsstandes bezüglich der Bedeutung prognostisch relevanter Marker ist dringend notwendig, um HNSCC Tumore zu stratifizieren und die Auswahl einer adäquaten Therapie zu erleichtern. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit die LSD1 und SNAIL Expressionen in HNSCC im Kontext klinisch pathologischer Charakteristika, der Prognose für Patienten sowie der Therapieresistenz beleuchtet. Hierzu dienten die immunhistochemische Färbung einer umfassenden und klinisch gut charakterisierten HNSCC Kohorte sowie die Expressionsanalyse in ausgewählten Zelllinien mittels Western Blot und RT-qPCR. Im Nachfolgenden sollen die Ergebnisse analog zur bisherigen Darstellung für LSD1 und SNAIL dort, wo es im Sinne einer übersichtlicheren Struktur sinnvoll ist, erst getrennt voneinander und anschließend in kombinierter Betrachtung diskutiert werden.

5.2 Kohorte und Färbung

Wie in 2.9 **Patientenkollektiv** beschrieben erfolgte die Erstellung der Kohorte im Rahmen des Promotionsprojektes von Patrick Kuppler am Institut für Pathologie der Universität zu Lübeck (135). Der Aufbau und die Beschaffenheit der Kohorte wurden dort umfassend diskutiert und sollen hier daher nur punktuell erneut aufgegriffen werden.

Die TMAs bestehen aus Gewebestanzungen, welche aus den Tumorproben entnommen und in einem Raster angeordnet wurden. Durch die Schwierigkeit bei der Erstellung der TMAs die dreidimensionale Struktur des Tumors und dessen Tiefe in den Gewebeschnitten, aus denen die Stenzen entnommen werden, zu erfassen, ist hierbei nicht immer gegeben, dass auf jeder Höhe der Stenzen Tumorgewebe vorhanden ist. Daher ist teils allein aufgrund der Beschaffenheit der TMAs ein Teil der Proben in einem gegebenen Anschnitt kein Tumorgewebe enthalten. Dieser Effekt nimmt mit fortlaufender Nutzung der TMAs zu. In der vorliegenden Analyse konnten von 419 in der Kohorte inkludierte Patienten Gewebeproben von 334 (LSD1) bzw. 332 (SNAIL) Patienten angefärbt und ausgewertet werden.

Im Rahmen der Etablierung der immunhistochemischen Färbung wurden die Antikörper an Positivkontrollen getestet. Es zeigte sich eine spezifische Färbung beider Proteine, die, wie zu erwarten, nahezu ausschließlich im Nukleus der Zellen zu beobachten war.

LSD1 und SNAIL sind in diversen Tumorentitäten wie beispielsweise Brust-, Prostata- oder hepatozellulären Karzinomen im Vergleich zu gesundem Gewebe überexprimiert (95,96,114,117). Analog hierzu beschränkte sich die LSD1 als auch die SNAIL Färbung bei der durchgeführten Analyse nahezu komplett auf die Zellkerne der Tumorzellen, während die Anfärbung von Zellen des gesunden Gewebes eine seltene Ausnahme blieb und hier nur vereinzelt zu beobachten war.

5.3 Korrelationen mit Patienten- und Tumorcharakteristika

Die Analyse der LSD1 und SNAIL Expressionen im Zusammenhang mit verschiedenen Patienten- und Tumoreigenschaften ergaben teils von der Sublokalisierung abhängige Ergebnisse.

Alkohol- und Nikotinkonsum stellen Hauptrisikofaktoren für die Entstehung von HPV-negativen HNSCC Tumoren dar (2,8). Ein hoher Alkoholkonsum ist hierbei insbesondere in der Mundhöhle ein starker Risikofaktor für Entstehung eines Karzinoms und in anderen Tumorentitäten wie Brust und Darmkrebs wurde ein erhöhtes EMT-Geschehen durch Alkohol dargestellt (151,152). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine erhöhte LSD1 Expression in den Tumoren von Patienten, die Alkohol konsumieren als in jenen, ohne Alkoholkonsum. Diese Assoziation bestand bei der Betrachtung der gesamten Kohorte und bei der getrennten Analyse oraler HNSCC. Die genauen Mechanismen, die durch Alkohol beeinflusst werden und schlussendlich zur Karzinogenese beitragen sind noch nicht vollumfassend verstanden, jedoch ist bekannt, dass sich Alkoholkonsum auf den Hormonaushalt und auch auf epigenetische Prozesse auswirkt (153). Es ist hier demnach denkbar, dass Alkohol sich auf die LSD1 Expression auswirkt und diese eine Rolle bei der Vermittlung der karzinogenen Rolle des Alkohols spielt. Da Alkoholkonsum jedoch nicht ausschließlich für OSCC sondern auch für Pharynx- und Larynxtumore ein etablierter Risikofaktor ist, wäre an dieser Stelle auch eine Differenz der LSD1 Expression in Abhängigkeit des Alkoholkonsums auch in diesen Entitäten zu erwarten (154). Hier bedarf es weiterer Untersuchungen des Einflusses von Alkohol auf die LSD1 Expression in den verschiedenen HNSCC Subgruppen an Kohorten, welche, in unserer Kohorte nicht erfasste Patientengruppen (z.B. anderer Herkunft), abdecken und gegebenenfalls auch eine genauere Quantifizierung der konsumierten Menge an Alkohol zulassen. Anders, als erwartet ergab die Betrachtung der LSD1 und SNAIL Expression im Kontext des Nikotinkonsums in Larynxtumoren eine höhere Expression beider Proteine in Tumoren von Nichtrauchern. Dieser Zusammenhang konnte bezüglich der SNAIL auch in der Gesamtkohorte beobachtet werden. Bisherige Studien zeigten im Gegensatz hierzu vermehrte Invasion, Migration und ein vermehrtes EMT-Geschehen durch höhere Nikotinexposition in HNSCC als auch eine niedrigere SNAIL Expression in Pharynxtumoren von Nichtrauchern (119,155,156). Hier sind weitere Analysen notwendig, um die Einflüsse von

Nikotin und Tabakrauch auf die Progression und Entstehung der verschiedenen HNSCC Subgruppen zu erörtern. Für die differenzierte Betrachtung des Einflusses verschiedener Rauchgewohnheiten, der konsumierten Menge sowie des Zusammenspiels der Nikotinexposition, anderer Risikofaktoren und eventuell genetischer Faktoren auf die LSD1 und SNAIL Expression sowie die Tumorprogression in den verschiedenen HNSCC Subgruppen bedarf es weitere, diverse und umfassend charakterisierte Kohorten.

Der Larynx ist ein Organ, welches durch Östrogene und Androgene beeinflusst wird. Eine, durch höhere Östrogenspiegel bedingte, vermehrte Aktivierung des G-Protein gekoppelten Östrogenrezeptors 1 (GPER, GPR30), welcher auch in Larynxtumoren exprimiert wird, führte in endometrialen Tumorzellen zu einer vermehrten LSD1 Expression (89,157). Die höhere LSD1 Expression in Larynxtumoren weiblicher Patienten, die sich in unserer Betrachtung darstellte, lässt sich demnach potenziell auf einen Zusammenhang mit Hormonrezeptoren zurückführen.

Ebenfalls in Larynxtumoren war in der vorliegenden Analyse die SNAIL Expression in p16-positiven höher als in p16-negativen. Der p16 Expression als Surrogatparameter für eine HPV-Assoziation kommt insbesondere in Oropharynxtumoren eine Bedeutung zu. In anderen HNSCC wird eine prognostische Relevanz zwar diskutiert ist bisher jedoch nicht abschließend bestätigt oder von Relevanz im klinischen Alltag (15,16,52–54). Eine Analyse des Zusammenhangs der SNAIL Expression mit dem p16 Status von Cho et al. ergab eine signifikant höhere Expression in p16-positiven HNSCC, die sich bei getrennter Betrachtung der OPSCC und nicht-OPSCC jedoch auf HNSCC des Oropharynx beschränkte (158). Eine weitere Analyse einer solchen Assoziation in HNSCC zeigte keine signifikanten Ergebnisse (159). Sowohl bezüglich der Bedeutung von p16 in nicht oropharyngealen HNSCC als auch hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen p16 und SNAIL sind weitere Analysen notwendig.

Dem EMT-Prozess, bei dem Zellen epitheliale Charakteristika wie die Expression verschiedener Zelladhäsionsmoleküle verlieren und somit mobiler und invasiver werden, wird oft eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von Metastasen zugeschrieben. Auch der reverse Prozess (MET), bei dem Zellen am Ort der Metastase wieder epitheliale Charakteristika annehmen, wird als potenziell wichtiger Prozess während der Metastasenetablierung diskutiert (110). Der Transkriptionsfaktor SNAIL stellt einen häufig verwendeten Marker für ein EMT-Geschehen dar. Er führt zu einer Repression des Zelladhäsionsmoleküls E-Cadherin, dessen Verlust oder Herunterregulierung ein zentraler Prozess während der EMT ist (109). Bei dieser Repression von E-Cadherin ist das Zusammenspiel von SNAIL mit LSD1 von entscheidender Bedeutung (124). Die strikte Notwendigkeit der EMT und MET für die Metastasierung von Tumoren ist jedoch nicht durchgehend gegeben. In einigen Tumoren wie dem Pankreaskarzinom ist eine EMT beispielsweise nicht für die Ausbildung von Metastasen erforderlich (160). Hingegen konnte in

Brustkarzinomen gezeigt werden, dass Zellen E-Cadherin am Ort Metastasierung re-exprimiert wird und so zu dessen Etablierung beiträgt (161). Andere Berichte beschreiben bei Mammakarzinomen eine verminderte E-Cadherin Expression in LK-Metastasen im Vergleich zu Primarien (162). In Ovarialtumoren wurden erhöhte SNAIL und verminderte E-Cadherin Expression in Metastasengewebe gegenüber Primarien beobachtet (115). Analysen der Expression von EMT-Markern in Kolorektalkarzinomen ergaben eine Abhängigkeit von der Lokalisation innerhalb des Tumors. Hier wurde eine verminderte E-Cadherin Expression an der Tumorfront im Vergleich zur Mitte des Tumors sowie eine wieder erhöhte Expression in entstandenen Metastasen dargestellt (163). Aiello et al. fassten die bisherigen Erkenntnisse zum EMT/MET Modell zusammen, beschrieben die Bedeutung und Notwendigkeit diesbezüglich als kontextabhängig und bezogen sich dabei sowohl auf die Entität als auch die molekularbiologischen Gegebenheiten innerhalb des Tumors und dessen Umgebung (164). Die hier dargestellte erhöhte Expression von SNAIL in LK- und Fernmetastasen im Vergleich zu zugehörigen Primärtumoren steht in Einklang mit den Ergebnissen von Chen et al., die in, im Mausmodell induzierten, Metastasen von oralen HNSCC eine erhöhte Expression gegenüber den Primarien zeigten, und unterstützt damit die Hypothese, dass die EMT eine wichtige Rolle bei der Formierung von Metastasen in HNSCC einnimmt (165). Im Gegensatz hierzu wurde in unserer Kohorte eine signifikant niedrigere LSD1 Expression in Gewebe von LK-Metastasen als in zugehörigen Primarien beobachtet. Da in Fernmetastasen, wenn auch nicht signifikant, eine tendenziell höhere LSD1 Expression aufwiesen als zugehörige Primarien und angesichts der erhöhten SNAIL Expression in LK-Metastasen wäre die Schlussfolgerung, hierbei könnte es sich um ein Zeichen eines MET-Prozesses handeln eher unwahrscheinlich. Eine näherliegende Erklärung wäre eine Veränderung der LSD1 Expression in LK-Metastasen aufgrund eines veränderten Stoffwechsels oder anderer Prozesse, in die LSD1, neben der EMT, auch involviert ist.

Bisherige Untersuchung bezüglich der Expression verschiedener EMT-Marker wie E-Cadherin, Vimentin, Twist und N-Cadherin in Gewebeproben ergaben beispielsweise in Brusttumoren einen vermehrten Shift vom epithelialen zu mesenchymalen (oder einem intermediären) Phänotyp in Rezidiven im Vergleich zu zugehörigen Primarien (166). Eine erhöhte SNAIL Expression konnte zudem verglichen mit den jeweiligen Primärtumoren in Rezidiven von Ovarialtumoren gefunden werden. Diese Überexpression von EMT-Markern in Rezidivgewebe wurde im Allgemeinen mit der Tumorprogression begründet. Analog hierzu zeigten sich in der vorliegenden Betrachtung durchschnittlich signifikant höhere SNAIL Expression in Rezidiven. Die Tendenz einer Staffelung der durchschnittlichen SNAIL Expressionslevel von Primarien über Lymphknoten- und Fernmetastasen bis zu Rezidiven entspricht hierbei ebenfalls der Progression von Tumoren.

Die Tendenz einer solchen Staffelung von LK- über Fernmetastasen bis zu Rezidiven bestand ebenfalls bei der Analyse der LSD1 Expression. Hier zeigte sich zudem eine signifikant höhere Expression in Rezidiven als in zugehörigen Primärtumoren.

Die Betrachtung von LSD1 in den verschiedenen Primärlokalisationen ergab eine signifikant höhere Expression in Primarien hypopharyngealen Ursprungs als in den HNSCC anderer Lokalisationen. Es ist bereits bekannt, dass die oft zusammengefasste Tumorgruppe der HNSCC ein hohes Maß an Heterogenität aufweist. So unterschieden sich zum Beispiel die Prognose und das Ansprechen auf verschiedenen Therapiemodalitäten zwischen den Sublokalisationen (167). Hypopharynx Tumore zeigen hierbei im Allgemeinen die ungünstigste Prognose und ein schlechteres Ansprechen auf Radio- und Chemotherapie als andere HNSCC (48,168).

Bei bisherigen Analysen der LSD1 Expression in Tumoren konnte in diversen Tumorentitäten im Vergleich zu gesundem Gewebe eine Überexpression beobachtet werden (95–97). Hierbei korrelierte eine hohe LSD1 Expression oftmals mit einem fortgeschrittenem Tumorstadium. Auch in HNSCC der Mundhöhle wurde von Wang et al. eine höhere LSD1 Expression in jenen fortgeschrittenen Tumoren gezeigt (100). Bei der Betrachtung der Gesamtkohorte stellte sich in der hier untersuchten Kohorte ebenfalls eine signifikant höhere LSD1 Expression Tumoren mit einem fortgeschrittenen T-, N- und UICC-Stadium dar. Jedoch zeigte sich dieser Zusammenhang bei der getrennten Betrachtung der Primärlokalisationen mit Ausnahme des N-Stadiums in p16-positiven Oropharynx Tumoren lediglich in Tumoren des Hypopharynx, während eine solche Korrelation in p16-negativen Tumoren des Oropharynx, denen des Larynx oder der Mundhöhle nicht zu beobachten war.

Dieser Zusammenhang sowie die beobachtete erhöhte LSD1 Expression in HNSCC des Hypopharynx weist darauf hin, dass LSD1 in dieser Tumorentität eine hervorzuhebende Bedeutung zukommt.

Bezüglich der SNAIL Expression wurden keine Unterschiede zwischen den untersuchten Primärlokalisationen beobachtet. Im Gegensatz hierzu zeigten vorherige Untersuchung von SNAIL in Pharynx Tumoren eine signifikant höhere Expression in denen des Hypopharynx als in jenen des Oropharynx (119).

Wie LSD1 ist auch SNAIL in diversen Tumoren mit einem fortgeschrittenem Tumorstadium assoziiert (114–116,118). In bisherigen Studien wurde in HNSCC eine Assoziation einer erhöhte SNAIL Expression mit dem Vorhandensein von Metastasen geschildert (169). Betrachtungen, welche sich auf einzelne HNSCC Subgruppen beschränkten, ergaben in laryngealen und hypopharyngealen HNSCC ebenfalls einen solchen Zusammenhang mit fortgeschrittenem Tumorstadium und der Präsenz von Metastasen (170,171). Studien, die die SNAIL Expression ausschließlich in OSCC untersuchten, ergaben teils eine Korrelation mit fortgeschrittenem T-, N-

oder UICC-Stadium, zeigten jedoch teilweise auch keine signifikanten Assoziationen mit diesen Tumorcharakteristika (172–177). Diese variierenden Ergebnisse legen nahe, dass die Assoziation der SNAIL Expression mit dem Tumorstadium weiteren Einflussfaktoren unterliegt und sich gegebenenfalls in Abhängigkeit der geographischen Lage oder der Exposition gegenüber verschiedenen Risikofaktoren unterscheidet. Eine, wie hier bei der Analyse der Gesamtkohorte und der laryngealen HNSCC beobachtete, signifikant höhere SNAIL Expression in jenen Tumoren, die ein niedriges N- bzw. UICC-Stadium aufweisen, ist bisher jedoch nicht beschrieben. Da es sich beim Larynx um ein Organ handelt, dessen Ausdifferenzierung und Wachstum durch Sexualhormone beeinflusst wird, ist in Larynxtumoren ein Zusammenhang der beobachteten Ergebnisse mit der Expression verschiedener Östrogenrezeptoren denkbar. Im Gegensatz zum ER- α , dessen Beteiligung an einer E-Cadherin Runter- und SNAIL Hochregulierung in Tumorzellen des Ovars gezeigt wurde, senkt eine Aktivierung des ER- β die SNAIL Expression (178). Im Vergleich zu HNSCC anderer Primärlokalisationen weisen laryngeale HNSCC eine signifikant niedrigere ER- β Expression auf (179). Obwohl auch Studien vorliegen, die eine höhere ER- β Expression in Tumoren eines niedrigen TNM-Stadiums oder diesbezüglich keinen signifikanten Zusammenhang ergaben, konnte in HNSCC des Larynx eine höhere ER- β in schlecht differenzierten Tumoren und solchen mit LK-Metastasen, also fortgeschritteneren Tumoren, nachgewiesen werden (180,181).

Des Weiteren konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmalig eine Ko-Expression von LSD1 und SNAIL in Tumorgewebe von HNSCC Patienten nachgewiesen werden. Die gemeinsame Expression beider Proteine in Patientenproben wurde bisher lediglich in Gewebeschnitten von Mammakarzinomen untersucht (88). Das Zusammenspiel von LSD1 und SNAIL nimmt eine Schlüsselrolle im EMT-Geschehen ein (124). Die Interaktion beider Proteine basiert auf der SNAG-Domäne des SNAIL Proteins, welche strukturelle Ähnlichkeit mit dem Histon H3 aufweist, hiermit an LSD1 bindet und dieses an den E-Cadherin Promotor rekrutiert (88). Die zelluläre Ko-Lokalisation beider Proteine sowie dessen Assoziation mit dem EMT-Prozess wurde vor Kurzem in einer oralen HNSCC Zelllinie gezeigt (182). Trotz der hochsignifikanten Korrelation beider Proteine sowohl in Primären als auch in allen verfügbaren Proben ist der Grad der Korrelation mit einem Pearson's correlation coefficient (PCC) von 0,3237 für Primärtumore und 0,2982 für die Gesamtheit aller Proben relativ schwach. In den Kernextrakten aller untersuchten HNSCC Zelllinien stellte sich, obwohl LSD1 und SNAIL in allen Zelllinien gemeinsam exprimiert wurde, zudem die Tendenz eines inversen Zusammenhangs dar. So wies UT-SCC-60A, die Zelllinie mit dem höchsten LSD1 Level, die niedrigste SNAIL Expression auf. Dies lässt sich damit erklären, dass das Zusammenspiel von LSD1 und SNAIL zwar notwendig für deren Beteiligung am EMT-Geschehen ist, beide Proteine jedoch auch in andere Prozesse involviert sind, die nach aktuellem Stand unabhängig voneinander sind.

Dennoch unterstützt die hier gezeigte Ko-Expression beider Marker die Hypothese, dass auch in HNSCC ein bedeutsamer Zusammenhang von LSD1 und SNAIL besteht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die vorliegenden Ergebnisse hinsichtlich der Korrelation der LSD1 und SNAIL Expressionen mit klinisch pathologischen Tumor- und Patienteneigenschaften nur teilweise im Einklang mit den Ergebnissen bisheriger Betrachtungen stehen. Es bedarf hier weiterer Analysen, um das Ausmaß der Assoziation mit Alkohol- und Nikotinkonsum, Geschlecht und p16 Status zu charakterisieren. Eine Korrelation mit fortgeschrittenem Tumorstadium, wie sie in bisherigen Analysen beschrieben ist, ließ sich bezüglich der SNAIL Expression nicht beobachten und beschränkte sich hinsichtlich LSD1 Expression auf Tumore des Hypopharynx. Zudem unterscheiden sich die Korrelationen der LSD1 und SNAIL Expression mit den untersuchten Faktoren zu großen Teilen zwischen den einzelnen Primärlokalisationen, was die Heterogenität der, unter HNSCC zusammengefassten, Tumore weiter unterstreicht. Die hier erstmalig gezeigte Ko-Expression von LSD1 und SNAIL in Tumorgewebe von HNSCC Patienten unterstreicht deren Assoziation miteinander in dieser Entität.

5.4 Korrelation mit Patientenüberleben

Die Entdeckung neuer prognostischer Marker, die eine Risikostratifizierung der Tumore erlauben, sowie die weitere Erforschung bereits bekannter Proteine zur Festigung der Datenlage, stellt neben der Entwicklung neuer Therapieansätze eine wichtige Herausforderung dar. Eine Einschätzung des Rezidiv- und Metastasierungsrisikos bei Erstdiagnose könnte beispielsweise dabei helfen die Taktung von Kontrolluntersuchung anzupassen, um Rezidive und Metastasen so frühzeitig zu entdecken und behandeln zu können. Im Folgenden werden die Zusammenhänge von LSD1 und SNAIL mit der Prognose von Patienten der vorliegenden HNSCC Kohorte im Kontext bisheriger Analysen beleuchtet und deren Potenzial alleine oder in Kombination als Biomarker zu fungieren diskutiert.

LSD1 ist in zahlreichen Tumorentitäten überexprimiert und hier mit einer ungünstigen Prognose assoziiert (95–100). Auch in HNSCC Tumoren zeigten bisherige Untersuchungen des Zusammenhangs der LSD1 Expression und der Prognose der betroffenen Patienten häufig ein signifikant schlechteres Überleben, wenn LSD1 überexprimiert vorlag (100,103,183). Auf Daten des Cancer Genome Atlas (TCGA) (Kohorte GSE41613) basierende Analysen durch Zhang et al. ergaben ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben, wenn LSD1 überexprimiert wurde (184). In Patientenproben von HNSCC im Allgemeinen korrelierte eine hohe LSD1 Expression ebenfalls mit einer ungünstigen Prognose (103). Bei der isolierten Analyse der Bedeutung einer LSD1 Überexpression in oralen HNSCC wurde LSD1 hier als ein, von anderen Faktoren, wie dem

Tumorstadium, unabhängiger, prognostischer Marker identifiziert (100). Dieser Zusammenhang wurde ebenfalls bei der alleinigen Betrachtung von Zungenkarzinomen gefunden (183). Wir erwarteten bei der Untersuchung unserer Kohorte demnach ein signifikant schlechteres Überleben in HNSCC im Allgemeinen sowie in der Subgruppe der oralen Tumore. Jedoch zeigte sich in der vorliegenden Arbeit weder in Bezug auf das Gesamtüberleben noch auf das Rezidiv-freie Überleben ein signifikanter Unterschied zwischen HNSCC, die LSD1 hoch exprimieren und denen, die niedrige Expressionslevel aufweisen. Die getrennte Betrachtung der einzelnen Sublokalisationen ergab für das Gesamtüberleben ebenfalls keine signifikanten Ergebnisse, während im Rezidiv-freien Überleben einzig in Tumoren des Hypopharynx ein signifikanter Unterschied basierend auf der LSD1 Expression bestand. Dieser Unterschied war zudem unabhängig von anderen prognostisch relevanten Tumor- und Patienteneigenschaften wie dem Stadium des Tumors.

SNAIL ist ebenfalls in einer Reihe von Entitäten überexprimiert mit einer ungünstigen Prognose assoziiert (114–120). In HNSCC ist eine Überexpression in Tumoren im Vergleich zu gesundem Gewebe gezeigt und eine hohe SNAIL Expression mit der Entstehung von Metastasen assoziiert (172,174). Analysen der prognostischen Relevanz einer SNAIL Überexpression ergaben jedoch bisher teils gegensätzliche Ergebnisse. In einer nicht weiter nach Lokalisation spezifizierten Gruppe an HNSCC konnten Gasparotto et al. beispielsweise keine prognostische Relevanz feststellen und auch in isoliert betrachteten HNSCC des Larynx lag keine Korrelation vor (185,186). In OSCC zeigte sich teilweise ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben, wenn hohe SNAIL Expressionslevel vorlagen, was sich jedoch beispielsweise bei der Betrachtung von Zhao et al. nicht bestätigte (174,175,177). Auch in Zungenkarzinomen lagen bei einer alleinige Überexpression von SNAIL in mehreren Untersuchungen keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Überlebens vor, während eine erhöhte Expression von SNAIL in Endothelzellen in Pharynx Tumoren mit einem schlechteren krankheitsspezifischen Überleben assoziiert war (187,188). In der vorliegenden Betrachtung zeigte sich in der Gesamtkohorte ein signifikant besseres Gesamt- als auch Rezidiv-freies Überleben, wenn SNAIL niedrig exprimiert wurde. Dieser Unterschied war zudem unabhängig von anderen relevanten Faktoren. Bei der getrennten Analyse der einzelnen Primärlokalisationen ergab sich einzig im Hypopharynx ein signifikanter Unterschied, während ein solcher Zusammenhang in oralen, laryngealen oder oropharyngealen HNSCC nicht vorlag. Auch hier war eine niedrigere SNAIL Expression sowohl das Gesamt- als auch das Rezidiv-freie Überleben betreffend mit einer günstigeren Prognose assoziiert. Die prognostische Relevanz einer SNAIL Überexpression war hier bezüglich des Rezidiv-freien Überlebens ebenfalls unabhängig von anderen Tumorcharakteristika.

Interessanterweise ergab sich in einigen Analysen der SNAIL Expression in HNSCC Tumoren durch die kombinierte Betrachtung der SNAIL Expression und assoziierter Proteine eine signifikante prognostische Relevanz. In Zungentumoren beispielsweise war die gemeinsame Überexpression von SNAIL und SLUG (SNAIL2, SNAIL2) mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert (173). In pharyngealen Tumoren korrelierte die Ko-Expression von SNAIL, TWIST und SIP1 ebenfalls mit einer ungünstigen Prognose (189). Auch in HNSCC im Allgemeinen zeigte eine kombinierte Überexpression von SNAIL und dem assoziierten Proteinen NBS1 eine signifikant ungünstigere Prognose als die alleinige NBS1 Überexpression (169). In der vorliegenden Betrachtung war tendenziell ein schlechteres Rezidiv-freies Überleben in Hypopharynx-tumoren zu sehen, wenn sowohl LSD1 als auch SNAIL überexprimiert wurden, zeigte jedoch keine Signifikanz gegenüber der alleinigen Überexpression eines der beiden Proteine. Ein Mehrwert der kombinierten Betrachtung zur Einschätzung der Prognose wird demnach in Tumoren des Hypopharynx nahegelegt, jedoch bedarf es hier weiterer Betrachtung an umfassenderen Kohorten von Hypopharynx-Karzinomen.

Insgesamt deuten die Ergebnisse in unserer Kohorte darauf hin, dass die LSD1 und SNAIL Expressionen dazu dienen können prognostische Aussagen für HNSCC Patienten zu treffen. Dieses Potenzial als Biomarker zu fungieren, beschränkt sich in der hier durchgeführten Untersuchung jedoch auf Tumore des Hypopharynx. Hierdurch wird eine größere Bedeutung von LSD1 und SNAIL in dieser Entität als in den anderen HNSCC Subgruppen nahegelegt.

Im Kontext bisheriger Ergebnisse bezüglich der Expressionslevel von LSD1 und SNAIL in HNSCC Tumoren ist zudem davon auszugehen, dass die Rolle dieser beiden Proteine als auch deren prognostische Relevanz zwar von der Primärlokalisierung abhängt, jedoch nicht allein von dieser, sondern auch von anderen Faktoren beeinflusst wird. Hier bedarf es weiterer Analysen, bezüglich des Zusammenspiels der LSD1 und SNAIL Expressionen und anderer Tumor- und Patientencharakteristika, deren Exposition gegenüber verschiedenen Risikofaktoren sowie möglicher genetischer und epigenetischer Profile.

5.5 Therapiesensitivität

Chemotherapie und Radiotherapie stellen trotz der Entwicklung neuer Therapieansätze wie der Inhibition von EGFR oder der PD-1/PD-L1 Interaktion weiterhin die Standardtherapien für HNSCC dar und werden allein oder in Kombination als Ergänzung zur chirurgischen Entfernung eingesetzt (2). Obwohl durch diese Therapiemodalitäten ein gewisser Grad an Erfolg bei der Tumoreradikation erzielt werden kann, weisen insbesondere weiter fortgeschrittene Tumore häufig eine Resistenz gegenüber den Therapien auf oder entwickeln diese im Verlauf der Therapie

(190). Eine solche Therapieresistenz ist eine entscheidende Hürde bei der Behandlung von HNSCC. Daher ist die Entwicklung und weitere Erforschung von Markern, welche eine Vorhersage des Ansprechens auf die üblichen Tumortheraeutika ermöglichen von substanzieller Bedeutung, um einen wirkungsvollen Therapieansatz wählen zu können. Die Wichtigkeit der adäquaten Auswahl einer wirksamen Therapiemodalität wird auch angesichts der teils gravierenden Nebenwirkungen der Standardtherapeutika, welche in 1.1.5 Prognose beschrieben sind, unterstrichen.

Therapierestenz ist ein komplexer Prozess, der durch verschiedene Faktoren beeinflusst wird. Auch die EMT und eine Überexpression der EMT regulierenden Proteine LSD1 und SNAIL konnten mit einem verminderten Ansprechen auf diverse Therapeutika in Tumoren generell sowie in HNSCC in Verbindung gebracht werden (191).

In der HNSCC Zelllinie OECM-1 wurde beispielsweise durch den Knockdown von SNAIL ein vermehrtes Ansprechen auf Cisplatin, welches ein für HNSCC häufig verwendetes Chemotherapeutikum darstellt, erreicht (192). Die Transfektion von SNAIL in die niedrig exprimierenden Zelllinien SAS und HSC-4 erhöhte hingegen die Cisplatin Resistenz (193). Auch LSD1 konnte in HNSCC Zellen mit einem verminderten Ansprechen auf Chemotherapie in Verbindung gebracht werden. Der Knockdown von LSD1 steigerte die Sensitivität gegenüber Cisplatin und 5-Fluoruracil in verschiedenen oralen Tumorzelllinien (100). Vor Kurzem konnte zudem auch gezeigt werden, dass die LSD1 Inhibition in HNSCC Zellen die Sensitivität gegenüber PD-1 Inhibitoren erhöht (103).

In der vorliegenden Betrachtung wurden die LSD1 und SNAIL Expressionen isoliert in jenen Tumoren betrachtet, die eine Chemotherapie erhalten haben und das Ansprechen auf die Therapie anhand des 5-Jahres Rezidiv-freien Überlebens bewertet. Die Proben wurden hierbei im Allgemeinen vor Beginn der Chemotherapie entnommen. Entgegen der, auf den oben beschriebenen bisherigen Ergebnissen basierenden, Erwartung ergab die alleinige Betrachtung der LSD1 Expression in diesen Tumoren keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Chemosensitivität. Auch eine Überexpression von SNAIL zeigte hier keinen signifikanten Zusammenhang. Interessanterweise stellte sich jedoch bei der kombinierten Betrachtung ein signifikant schlechteres Ansprechen auf Chemotherapie in jenen Tumoren dar, die SNAIL überexprimieren, jedoch eine niedrige LSD1 Expression aufweisen, wohingegen eine gemeinsame Überexpression beider Proteine keinen signifikanten Unterschied gegenüber einer kombiniert niedrigen Expression zeigte. Zudem war diese Korrelation unabhängig von anderen prognostisch relevanten Faktoren, wie dem Tumorstadium und dem p16 Status.

Des Weiteren wurden die LSD1 und SNAIL Expression in einer Reihe von HNSCC Zelllinie nachgewiesen und quantifiziert. Hierbei war die SNAIL Expression in der Cisplatin-resistenten FaDu Zelllinie gegenüber der Expression in parentalen FaDu signifikant erhöht, während kein

Unterschied im Hinblick auf die LSD1 Expression zu beobachten war. Die SNAIL Expression war in den Cisplatin resistenten FaDu Zellen gegenüber den anderen untersuchten Zelllinien ebenfalls signifikant erhöht, wohingegen die LSD1 Expression eine gegenläufige Tendenz zeigte.

In Kombination legen diese Ergebnisse nahe, dass das beobachtete Expressionsprofil, einer erhöhten SNAIL und einer niedrigen LSD1 Expression, als Prädiktor für das Ansprechen auf Chemotherapie dienen könnte. Eine Begründung für diesen, teils im Gegensatz zu den Ergebnissen bisheriger Studien stehenden, Zusammenhang geht aus der vorliegenden Betrachtung nicht hervor.

Des Weiteren wurden analog zur Betrachtung im Kontext der Chemotherapie auch Analysen zur Bedeutung der LSD1 und SNAIL Expression bezüglich der Resistenz gegenüber Radiotherapie an der Kohorte durchgeführt. Auch hierbei wurde die Radiotherapie im Allgemeinen nach Entnahme der Proben begonnen. In einer vor Kurzem durchgeführten Studie untersuchten Wang et al. die Bedeutung von SNAIL in der Resistenz von Hypopharynx Tumoren gegenüber Radiotherapie (194). Bei der Analyse der 80 inkludierten Patienten, welche vor der Inklusion in die Studie Bestrahlung als Monotherapie erhielten, wurden die Expressionen verschiedener EMT-Marker, wie E-Cadherin und SNAIL, mittels IHC quantifiziert und im Kontext des Ansprechens auf die Radiotherapie betrachtet. Hierbei ergab sich eine signifikant höhere SNAIL Expression in jenen Tumoren, die eine Radioresistenz aufwiesen als in jenen, die auf die Therapie ansprachen. Zudem ergaben Analysen der SNAIL Expression in radioresistenten FaDu Zellen hier eine signifikant höhere SNAIL Expression als radiosensible FaDu Zellen. Die SNAIL Expression stieg zudem mit steigender Strahlendosis an. Ein Silencing von SNAIL mittels siRNA kehrte die erworbenen Radioresistenz der FaDu Zellen wieder um. Diese Ergebnisse zeigen, dass EMT als solche sowie die damit einhergehende SNAIL Überexpression Einfluss auf das Ansprechen von hypopharyngealen HNSCC auf Radiotherapie haben und legen eine entscheidende Rolle bei Entstehung dieser nahe.

In unserer Kohorte war ebenfalls ein signifikant schlechteres Ansprechen auf die Radiotherapie bei jenen Tumoren zu beobachten, die SNAIL überexprimieren. Dies zeigte sich bei der multivariaten Überlebensanalyse jedoch nicht unabhängig von anderen Tumor- und Patienteneigenschaften. Dennoch unterstützen die hier vorliegenden Ergebnisse die Hypothese, dass der SNAIL Expression eine Bedeutung bei der Radioresistenz von HNSCC Tumoren zukommt. Obwohl der Einfluss von LSD1 auf die Radioresistenz von Tumoren bisher nur wenig untersucht und verstanden ist, gibt es einige Untersuchungen, die einen solchen implizieren (195). Lee et al. konnten beispielsweise zeigen, dass die Demethylierung von HIF-1 α durch LSD1 zu dessen Stabilisierung führt (196). HIF-1 α ist ein Transkriptionsfaktor, welcher in zelluläre Antworten des Tumors auf eine mangelnde Sauerstoffversorgung, wie beispielsweise der Angiogenese, involviert ist und so eine Rolle bei der Entwicklung der Resistenz gegenüber Radiotherapie spielt (197). Auch

in HNSCC sind Hypoxie und die resultierende Überexpression von HIF-1 α mit einer ungünstigen Prognose und einem schlechteren Ansprechen insbesondere auf Radiotherapie assoziiert (198–200). Eine direkte Assoziation der LSD1 Expression mit der Radioresistenz von Tumoren wurde bisher jedoch nicht berichtet.

In der vorliegenden Betrachtung war im Hinblick auf das Ansprechen auf Radiotherapie kein signifikanter Unterschied zwischen Tumoren mit einer hohen oder niedrigen LSD1 Expression zu beobachten.

Die kombinierte Analyse der LSD1 und SNAIL Expression zeigte jedoch ein signifikant schlechteres Ansprechen, wenn beide Proteine überexprimiert wurden. Im Gegensatz zu der alleinigen SNAIL Überexpression war diese Korrelation allerdings unabhängig von anderen prognostisch relevanten Faktoren, wie dem Tumorstadium oder dem Alkoholkonsum betroffener Patienten. Eine kombinierte Betrachtung von LSD1 und SNAIL ist daher der alleinigen Betrachtung von SNAIL überlegen und deren Überexpression könnte als Biomarker für das Ansprechen auf Radiotherapie dienen.

5.6 Limitationen und Stärken dieser Arbeit

Die durchgeführte IHC-Färbung kann nicht zwischen funktionsfähigen und durch etwaige Veränderungen, wie Mutation oder posttranslationaler Modifikation, in ihrer Funktion veränderten Proteinen unterscheiden. Auch die Quantifizierung der Expression in HNSCC Zelllinien mittels qPCR erlaubt keine Aussage über die Funktionsfähigkeit des im Verlauf translatierten Proteins.

Die vorliegende Arbeit beschränkt sich auf die Analyse der Expressionen von LSD1 und SNAIL in HNSCC. Zwar wurde die Expression auch in HNSCC Zelllinien gemessen und im Kontext der Cisplatin-Resistenz betrachtet, eine funktionelle Analyse der beiden Proteine sowie deren Interaktion wurde hier jedoch nicht durchgeführt. Die dargestellten Korrelationen mit klinisch pathologischen Charakteristika sowie dem Überleben sind demnach vorrangig deskriptiver Natur. Interpretationen der Ergebnisse und Schlussfolgerungen bezüglich eines potenziellen Kausalzusammenhangs sowie der Möglichkeit LSD1 und SNAIL als Therapieziel zu verwenden sind daher spekulativ. Dennoch liefern die hier dargestellten Ergebnisse Hinweise auf bedeutende Zusammenhänge und können als Grundlage weiterer Forschung und funktioneller Analysen dienen. Von besonderem Interesse wäre hier die Etablierung einer spezifischen Hemmung der LSD1 und SNAIL Interaktion und die Überprüfung, ob diese eine eigenständige oder in Kombination mit bereits etablierten Therapieansätzen ergänzende Therapieoption für HNSCC Tumore darstellt.

Die verwendete Kohorte ist größer als jene, die in bisherigen Publikationen analysiert wurden. Hierdurch waren Analysen an Subgruppen der Kohorte möglich. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass geringfügige Unterschiede, die sich in dieser Arbeit lediglich als Tendenz abzeichneten, erst bei Analysen an größeren Kohorten Signifikanz erreichen. Bezüglich einzelner Betrachtungen stellt die durchgeführte Analyse bereits eine Validierung an einer unabhängigen Kohorte dar. Die teilweise von der Literatur abweichenden Ergebnisse unterstreichen jedoch den Bedarf weiterer Analysen. Insbesondere die, auf der Grundlage der vorliegenden Ergebnisse hervorzuhebende, Bedeutung von LSD1 und SNAIL in HNSCC des Hypopharynx erfordert weitere Untersuchungen an größeren Kohorten von Hypopharynx-Karzinomen.

Des Weiteren enthält die Kohorte im Gegensatz zu zuvor analysierten neben dem Gewebe der Primärtumore auch das Gewebe zugehöriger Metastasen und Rezidive und ließ daher Analysen auf Grundlage der Gewebeart zu.

Die Unterteilung der Kohorte in LSD1 bzw. SNAIL hoch und niedrig exprimierende Tumoren erfolgte anhand des jeweiligen gerundeten Medianwertes. Die Anwendung der IHC-Färbung als Marker im aktuellen klinischen Alltag würde jedoch von der Etablierung einer Färbung und Einteilung profitieren, die bestenfalls für Pathologen mit bloßem Auge durchführbar ist. Ein für die rein visuelle Einteilung der Tumore angemessenes Färbeprotokoll zu etablieren war nicht Gegenstand dieser Betrachtung und bedürfte weiterer Analysen.

Da die in der Kohorte enthaltenen Patienten entsprechend des üblichen Therapieschemas weitestgehend adjuvant behandelt wurden handelt es sich bei den Proben um chemo- und radionaives Gewebe. Die durchgeführten Analysen im Kontext der Therapieresistenz erlauben demnach, obwohl es sich um eine retrospektive Betrachtung handelt, prädiktive Aussagen bezüglich des Ansprechens auf die entsprechende Therapiemodalität. Die Patienten der Kohorte wurden mit einer Vielzahl an Therapiekonzepten behandelt und erhielten teils verschiedene Chemotherapeutika sowie Radiotherapie in unterschiedliche Dosen, welche in manchen Fällen als Monotherapie, in anderen als Kombinationstherapie durchgeführt wurden. Bei der vorliegenden Betrachtung wurde nicht zwischen den genauen Therapiekonzepten im Einzelnen unterschieden, sondern lediglich jene Tumore betrachtet, die im Verlauf eine Radio- bzw. Chemotherapie erhalten, ohne dabei weitere Therapien zu beachten. Zudem wurden in dieser Betrachtung HNSCC Tumore aller Lokalisationen gesammelt betrachtet. Eine getrennte Analyse einzelner Entitäten und einzelner Therapiekonzepte hätte bei der vorliegenden Kohorte eine gravierende Verkleinerung der einzelnen Stichprobengrößen bedeutet. Zwar gibt diese Herangehensweise Hinweise auf einen Zusammenhang der LSD1 bzw. SNAIL mit einer Resistenz gegenüber der jeweiligen Therapie, jedoch wäre eine weitere Betrachtung anhand Kohorten sinnvoll, die eine genauere Spezifizierung der einzelnen Therapiekonzepte und Tumorentitäten zulässt.

5.7 Ausblick

Die hier dargestellten Ergebnisse unterstreichen das Potenzial von LSD1 und SNAIL insbesondere in HNSCC des Hypopharynx als Biomarker bei der Risikostratifizierung sowie der Auswahl einer geeigneten Therapiemodalität zu dienen. Um die Grundlage für eine prädiktive Testung im Rahmen des klinischen Alltags zu schaffen, wäre zum einen die Etablierung eines Färbeprotokolls, welches die Beurteilung von Proben durch Pathologen mit dem bloßen Auge ermöglicht, denkbar. Zum anderen besteht auch in der klinischen Routine eine wachsende Präsenz automatisierter Auswertung von Tumorfärbungen, welche eine effiziente Stratifizierung der Tumore ermöglicht. Hierbei wäre es im Verlauf anzustreben Kohorten zu generieren, welche die Gesamtheit der hypopharyngealen HNSCC umfassend abbilden. Anhand dieser Kohorten könnten dann, aufbauend auf die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse, allgemeingültige Grenzwerte für die Unterteilung in LSD1 bzw. SNAIL hoch und niedrig exprimierend etabliert werden, welche als Grundlage für eine automatisierte Auswertung genutzt werden könnten.

Aufgrund der häufig beschrieben und durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigten Involvement von LSD1 und SNAIL in das Tumorgeschehen von HNSCC, stellt die Inhibition dieser zudem ein attraktives Therapieziel für diese Entität dar.

Die Inhibition von LSD1 durch niedermolekulare Substanzen führte in Tumorzellen diverser Entitäten zu einer Verminderung der Proliferation, Invasion und Migration sowie einem verbesserten Ansprechen auf verschiedene Therapiemodalitäten (100,103,105,184,201). Einige Substanzen, welche die LSD1 Aktivität irreversibel oder reversibel inhibieren befinden sich aktuell bereits in klinischen Studien, wobei der Fokus dieser auf der Behandlung verschiedener Leukämieformen und Lungenkarzinomen liegt (105). Irreversible Inhibitoren basieren hierbei meist auf Tranylcypromin (TCP), welches bereits seit den 1960ern als Antidepressivum zugelassen ist und selbst ebenfalls eine inhibierende Wirkung auf die LSD1 Aktivität hat. Sie interagieren mit dem LSD1 Ko-Faktor FAD und bilden eine kovalente Bindung mit dem Enzym. In Kolonkarzinom- und Neuroblastomzellen konnte gezeigt werden, dass TCP sich auch auf die Interaktion von LSD1 mit der SNAG Domäne auswirkt (202). *In vitro* und Mausmodell Studien in oralen SCC ergaben eine verringerte Proliferation, Migration und Invasion sowie ein verbessertes Ansprechen auf Chemotherapie durch die Behandlung mit TCP (100,184). Es wäre daher interessant das Potenzial der LSD1 Inhibition, insbesondere in Kombination mit anderen Therapeutika, in HNSCC in klinischen Studien zu ergründen. Auch angesichts der hier dargestellten Daten wäre zudem eine getrennte Analyse der einzelnen HNSCC Subgruppen von besonderem Interesse.

Durch die teilweise nichtspezifischen Auswirkungen der irreversiblen Inhibition von LSD1 durch TCP-Derivate, welche zu Nebenwirkungen wie einer Beeinträchtigung der Erythropoese und Bildung

von Granulozyten führt, rückten reversible LSD1 Inhibitoren in den letzten Jahren vermehrt in den Fokus der Forschung (105,203,204). Hiervon befinden sich ebenfalls zwei Substanzen in klinischen Studien (105). Hier gilt es daher weitere spezifische und nebenwirkungsarme Substanzen zu generieren und deren Potenzial auch in HNSCC zu testen.

Auch SNAIL stellt ein mögliches Ziel für künftige Therapieansätze dar. Jedoch stellte sich die Inhibition von SNAIL durch niedermolekulare Substanzen bisher als schwierig heraus, da dieses als Transkriptionsfaktor kein aktives Zentrum und zudem keine klar ersichtliche Domäne aufweist, welche im Allgemeinen als Bindestelle für Liganden dient (205). Als alternativer Ansatz dient hier beispielsweise die Inhibition von Enzymen, welche durch post-translationale Modifikation von SNAIL zu dessen Stabilisierung beitragen (128). Vor Kurzem wurde die Substanz CYP19 als Inhibitor der SNAIL stabilisierenden Acetylierung durch CBP/p300 entdeckt (125). Hierbei bindet dieses direkt an SNAIL und hemmt die Interaktion von diesem mit CBP/p300 ohne die enzymatische Aktivität als solche zu beeinträchtigen. Auch die Behandlung von Kolon- und Brustkarzinom Zelllinien mit Omeprazol, welches bereits als Protonenpumpeninhibitor im klinischen Alltag Verwendung findet, führt *in vitro* zu einer vermehrten Degradation SNAIL durch Inhibition der CBP/p300 vermittelten Acetylierung (206). Da die Herunterregulierung von SNAIL auch in HNSCC eine verminderte Migration und Invasion, sowie ein verbessertes Ansprechen auf Radio- und Chemotherapie zur Folge hatte, gilt es auch hier das Potenzial der SNAIL Inhibition durch niedermolekulare Substanzen als Therapieoption zu ergründen und klinisch sicher anwendbare Substanzen zu entwickeln (192,194,207).

Da die Inhibition von LSD1 als auch SNAIL die Sensitivität gegenüber Radio- und Chemotherapie erhöhen und auch durch die vorliegenden Daten teilweise eine Assoziation mit dem Ansprechen auf diese Therapiemodalitäten nahegelegt wird, sollte insbesondere die Kombination einer LSD1 und/oder SNAIL inhibierenden Therapie und diesen Therapiemodalitäten analysiert werden.

Neben Radio- und Chemotherapie gilt es hier auch beispielsweise die Kombination mit Immuntherapie in Erwägung zu ziehen. Das vielversprechende Potenzial einer Kombination von LSD1 Inhibition und Immuntherapie in HNSCC wird durch vor Kurzem von Han et al. veröffentlichten Daten einer solchen Kombination *in vitro* und im Mausmodell unterstrichen (103).

6 Zusammenfassung

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals Bereichs (HNSCC) entstehen aus dem Epithelgewebe des Larynx, des Pharynx und der Mundhöhle. Das Auftreten von Rezidiven sowie die Entwicklung einer Resistenz gegenüber Radio- und Chemotherapie sind entscheidende Hürden bei der Behandlung von HNSCC. Es mangelt an prognostischen und prädiktiven Biomarkern, die eine Stratifizierung der Tumore zulassen und die Auswahl der Therapiemodalität erleichtern.

In der vorliegenden Arbeit wurde an einer großen und klinisch umfassend charakterisierten HNSCC Kohorte (n=419) eine immunhistochemische LSD1 und SNAIL Färbung durchgeführt. Nach Auswertung mithilfe der Bioimaging Software QuPath wurde die Expression beider Proteine im Kontext diverser Tumor- und Patientencharakteristika, dem Überleben der Patienten und der, im Verlauf erhaltenen, Therapie analysiert. Des Weiteren wurde die Expression von LSD1 und SNAIL in Cisplatin sensitiven und Cisplatin resistenten HNSCC Zelllinien mittels Western Blot getestet und mittels qPCR quantifiziert.

Hierbei korrelierte LSD1 im Gegensatz zu den Ergebnissen bisheriger Publikationen nahezu ausschließlich in HNSCC des Hypopharynx (HPSCC) mit einem fortgeschrittenem Tumorstadium. Des Weiteren ließ sich erstmalig eine Ko-Expression von LSD1 und SNAIL in Tumorgewebe von HNSCC Patienten zeigen. Ebenso ließ sich in der getrennten Analyse der Sublokalisationen einzig in HPSCC ein signifikant schlechteres und statistisch unabhängiges Gesamt- und Rezidiv-freies Überleben beobachten, wenn eine hohe SNAIL Expression vorlag. Eine erhöhte LSD1 Expression korrelierte ebenfalls signifikant und statistisch unabhängig von anderen prognostisch relevanten Faktoren lediglich in HPSCC mit einem schlechteren Rezidiv-freien Überleben. Die gemeinsame Überexpression scheint bei der Betrachtung des Rezidiv-freien Überlebens in HPSCC zudem eine ungünstigere Prognose anzuzeigen als die alleinige Überexpression eines der beiden Marker. Des Weiteren ergab die Expressionsanalyse in der Kohorte ein schlechteres Ansprechen auf Chemotherapie, wenn SNAIL hoch, LSD1 jedoch niedrig exprimiert wird. Dieser Zusammenhang stellte sich auch bei der Untersuchung der LSD1 und SNAIL Expressionen im Kontext der Cisplatinresistenz in HNSCC Zelllinien dar. Eine kombinierte Überexpression beider Proteine korrelierte signifikant und von anderen Faktoren unabhängig mit einem schlechteren Ansprechen auf Radiotherapie.

In Kombination legen die vorliegenden Ergebnisse einen bedeutenden Zusammenhang von LSD1 und SNAIL in HNSCC nahe. Das Potenzial als prognostischer und prädiktiver Biomarker bei der Risikostratifizierung von Tumoren und der Auswahl geeigneter Therapien zu dienen, ergibt sich durch die vorliegende Betrachtung insbesondere für HPSCC. Zudem wird durch die gezeigten Ergebnisse die Inhibition von LSD1 und SNAIL, welche in anderen Tumorentitäten bereits klinisch

getestet wird, auch in HNSCC insbesondere in Kombination mit anderen Therapeutika als mögliche Therapieoption nahegelegt.

7 Quellenverzeichnis

7.1 Literaturquellen

1. Vigneswaran N, Williams MD. Epidemiological Trends in Head and Neck Cancer and Aids in Diagnosis. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* Mai 2014;26(2):123–41.
2. Johnson DE, Burtness B, Leemans CR, Lui VWY, Bauman JE, Grandis JR. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers.* 26. November 2020;6(1):1–22.
3. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin D m., Piñeros M, Znaor A, Bray F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer.* 2019;144(8):1941–53.
4. Cancer Tomorrow [Internet]. [zitiert 10. März 2023]. Verfügbar unter: https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/tables?cancers=1_3_5_14_4&single_unit=50000&group_cancers=1&multiple_cancers=1&years=2035&mode=population&group_populations=1&populations=903_904_905_908_909_935
5. Wienecke A, Kraywinkel K. Epidemiologie von Kopf-Hals-Tumoren in Deutschland. *Onkologe.* März 2019;25(3):190–200.
6. Sturgis EM, Cinciripini PM. Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: an emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers? *Cancer.* 1. Oktober 2007;110(7):1429–35.
7. Ramqvist T, Dalianis T. Oropharyngeal cancer epidemic and human papillomavirus. *Emerg Infect Dis.* November 2010;16(11):1671–7.
8. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg JB, Sternhagen A, Fraumeni Jr JF. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res.* 1. Juni 1988;48(11):3282–7.
9. Warnakulasuriya S, Straif K. Carcinogenicity of smokeless tobacco: Evidence from studies in humans & experimental animals. *Indian J Med Res.* Dezember 2018;148(6):681–6.
10. Freedman ND, Park Y, Subar AF, Hollenbeck AR, Leitzmann MF, Schatzkin A, Abnet CC. Fruit and vegetable intake and head and neck cancer risk in a large United States prospective cohort study. *International Journal of Cancer.* 2008;122(10):2330–6.
11. Guha N, Warnakulasuriya S, Vlaanderen J, Straif K. Betel quid chewing and the risk of oral and oropharyngeal cancers: a meta-analysis with implications for cancer control. *Int J Cancer.* 15. September 2014;135(6):1433–43.
12. Henle W, Henle G. The Epstein-Barr Virus (EBV) in Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma. *Ann Clin Lab Sci.* 1974;4(2):109–14.
13. Fung SYH, Lam JWK, Chan KCA. Clinical utility of circulating Epstein-Barr virus DNA analysis for the management of nasopharyngeal carcinoma. *Chinese Clinical Oncology.* April 2016;5(2):18–18.

14. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zahurak ML, Daniel RW, Viglione M, Symer DE, Shah KV, Sidransky D. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst.* 3. Mai 2000;92(9):709–20.
15. Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, Forastiere A, Gillison ML. Improved Survival of Patients With Human Papillomavirus–Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in a Prospective Clinical Trial. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute.* 20. Februar 2008;100(4):261–9.
16. Mehanna H, Beech T, Nicholson T, El-Hariry I, McConkey C, Paleri V, Roberts S. Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer—systematic review and meta-analysis of trends by time and region. *Head & Neck.* 2013;35(5):747–55.
17. Wittekind C. TNM Klassifikation Maligner Tumoren: Korrigierter Nachdruck 2020 Mit Allen Ergänzungen der UICC Aus Den Jahren 2017 Bis 2019. Wiley-VCH Verlag GmbH & Company KGaA; 2020. 336 S.
18. Elhalawani H, Mohamed ASR, Elgohari B, Lin TA, Sikora AG, Lai SY, Abusaif A, Phan J, Morrison WH, Gunn GB, Rosenthal DI, Garden AS, Fuller CD, Sandulache VC. exposure as a major modifier of oncologic outcomes in human papillomavirus (HPV) associated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer.* 23. September 2020;20(1):912.
19. Windon MJ, D’Souza G, Rettig EM, Westra WH, van Zante A, Wang SJ, Ryan WR, Mydlarz WK, Ha PK, Miles BA, Koch W, Gourin C, Eisele DW, Fakhry C. Increasing prevalence of human papillomavirus–positive oropharyngeal cancers among older adults. *Cancer.* 2018;124(14):2993–9.
20. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* Mai 2002;2(5):342–50.
21. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science.* 6. April 1990;248(4951):76–9.
22. Dyson N, Howley PM, Münger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science.* 17. Februar 1989;243(4893):934–7.
23. Kiyono T, Foster SA, Koop JI, McDougall JK, Galloway DA, Klingelhutz AJ. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature.* November 1998;396(6706):84–8.
24. El-Naggar AK, Westra WH. p16 expression as a surrogate marker for HPV-related oropharyngeal carcinoma: A guide for interpretative relevance and consistency. *Head Neck.* April 2012;34(4):459–61.
25. Hecht SS. Tobacco Smoke Carcinogens and Lung Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute.* 21. Juli 1999;91(14):1194–210.
26. The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature.* Januar 2015;517(7536):576–82.

27. Ozanne B, Richards CS, Hendler F, Burns D, Gusterson B. Over-expression of the EGF receptor is a hallmark of squamous cell carcinomas. *The Journal of Pathology*. 1986;149(1):9–14.
28. Chung CH, Ely K, McGavran L, Varella-Garcia M, Parker J, Parker N, Jarrett C, Carter J, Murphy BA, Nettekville J, Burkey BB, Sinard R, Cmelak A, Levy S, Yarbrough WG, Slebos RJ, Hirsch FR. Increased epidermal growth factor receptor gene copy number is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. *J Clin Oncol*. 1. September 2006;24(25):4170–6.
29. Viswanathan M, Tsuchida N, Shanmugam G. Promoter hypermethylation profile of tumor-associated genes p16, p15, hMLH1, MGMT and E-cadherin in oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Cancer*. 2003;105(1):41–6.
30. Ha PK, Califano JA. Promoter methylation and inactivation of tumour-suppressor genes in oral squamous-cell carcinoma. *The Lancet Oncology*. 1. Januar 2006;7(1):77–82.
31. Chow LQM. Head and Neck Cancer. *N Engl J Med*. 2. Januar 2020;382(1):60–72.
32. Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kawecki A, Rottey S, Erfan J, Zabolotnyy D, Kienzer HR, Cupissol D, Peyrade F, Benasso M, Vynnychenko I, De Raucourt D, Bokemeyer C, Schueler A, Amellal N, Hitt R. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med*. 11. September 2008;359(11):1116–27.
33. Guigay J, Fayette J, Dillies AF, Sire C, Kerger JN, Tennevet I, Machiels JP, Zanetta S, Pointreau Y, Bozec Le Moal L, Henry S, Schilf A, Bourhis J. Cetuximab, docetaxel, and cisplatin as first-line treatment in patients with recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma: a multicenter, phase II GORTEC study. *Ann Oncol*. September 2015;26(9):1941–7.
34. Tahara M, Kiyota N, Yokota T, Hasegawa Y, Muro K, Takahashi S, Onoe T, Homma A, Taguchi J, Suzuki M, Minato K, Yane K, Ueda S, Hara H, Saijo K, Yamanaka T. Phase II trial of combination treatment with paclitaxel, carboplatin and cetuximab (PCE) as first-line treatment in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (CSPOR-HN02). *Ann Oncol*. 1. April 2018;29(4):1004–9.
35. Hitt R, Irigoyen A, Cortes-Funes H, Grau JJ, García-Sáenz JA, Cruz-Hernandez JJ, Spanish head and Neck Cancer Cooperative Group (TTCC). Phase II study of the combination of cetuximab and weekly paclitaxel in the first-line treatment of patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of head and neck. *Ann Oncol*. April 2012;23(4):1016–22.
36. Kitamura N, Sento S, Yoshizawa Y, Sasabe E, Kudo Y, Yamamoto T. Current Trends and Future Prospects of Molecular Targeted Therapy in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci*. 29. Dezember 2020;22(1):240.
37. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, Jones CU, Sur R, Raben D, Jassem J, Ove R, Kies MS, Baselga J, Youssoufian H, Amellal N, Rowinsky EK, Ang KK. Radiotherapy plus Cetuximab for Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *New England Journal of Medicine*. 9. Februar 2006;354(6):567–78.

38. Mehanna H, Robinson M, Hartley A, Kong A, Foran B, Fulton-Lieuw T, Dalby M, Mistry P, Sen M, O'Toole L, Al Booz H, Dyker K, Moleron R, Whitaker S, Brennan S, Cook A, Griffin M, Aynsley E, Rolles M, De Winton E, Chan A, Srinivasan D, Nixon I, Grumett J, Leemans CR, Buter J, Henderson J, Harrington K, McConkey C, Gray A, Dunn J; De-ESCALaTE HPV Trial Group. Radiotherapy plus cisplatin or cetuximab in low-risk human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer (De-ESCALaTE HPV): an open-label randomised controlled phase 3 trial. *The Lancet*. 5. Januar 2019;393(10166):51–60.
39. Ferris RL, Blumenschein G, Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L, Harrington KJ, Kasper S, Vokes EE, Even C, Worden F, Saba NF, Docampo LCI, Haddad R, Rordorf T, Kiyota N, Tahara M, Lynch M, Jayaprakash V, Li L, Gillison ML. Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med*. 10. November 2016;375(19):1856–67.
40. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 17. September 2002;99(19):12293–7.
41. Seiwert TY, Burtneß B, Mehra R, Weiss J, Berger R, Eder JP, Heath K, McClanahan T, Luncford J, Gause C, Cheng JD, Chow LQ. Safety and clinical activity of pembrolizumab for treatment of recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-012): an open-label, multicentre, phase 1b trial. *The Lancet Oncology*. 1. Juli 2016;17(7):956–65.
42. Burtneß B, Harrington KJ, Greil R, Soulières D, Tahara M, Castro G de, Psyrris A, Basté N, Neupane P, Bratland Å, Fuereder T, Hughes BGM, Mesía R, Ngamphaiboon N, Rordorf T, Wan Ishak WZ, Hong RL, González Mendoza R, Roy A, Zhang Y, Gumuscu B, Cheng JD, Jin F, Rischin D Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study. *The Lancet*. 23. November 2019;394(10212):1915–28.
43. Gomes-da-Silva LC, Kepp O, Kroemer G. Regulatory approval of photoimmunotherapy: photodynamic therapy that induces immunogenic cell death. *Oncoimmunology*. 9(1):1841393.
44. Castilho RM, Squarize CH, Almeida LO. Epigenetic Modifications and Head and Neck Cancer: Implications for Tumor Progression and Resistance to Therapy. *Int J Mol Sci*. 12. Juli 2017;18(7):1506.
45. Gillison ML, Chaturvedi AK, Lowy DR. HPV prophylactic vaccines and the potential prevention of noncervical cancers in both men and women. *Cancer*. 2008;113(S10):3036–46.
46. Leemans CR, Braakhuis BJM, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. Januar 2011;11(1):9–22.
47. Chin D, Boyle GM, Porceddu S, Theile DR, Parsons PG, Coman WB. Head and neck cancer: past, present and future. *Expert Review of Anticancer Therapy*. Juli 2006;6(7):1111–8.
48. Petersen JF, Timmermans AJ, van Dijk BAC, Overbeek LIH, Smit LA, Hilgers FJM, Stuiver MM, van den Brekel MWM. Trends in treatment, incidence and survival of hypopharynx cancer: A 20-year population-based study in the Netherlands. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. Januar 2018;275(1):181–9.

49. Cadoni G, Giraldi L, Petrelli L, Pandolfini M, Giuliani M, Paludetti G, Pastorino R, Leoncini E, Arzani D, Almadori G, Boccia S. Prognostic factors in head and neck cancer: a 10-year retrospective analysis in a single-institution in Italy. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* Dezember 2017;37(6):458–66.
50. Leoncini E, Vukovic V, Cadoni G, Pastorino R, Arzani D, Bosetti C, Canova C, Garavello W, La Vecchia C, Maule M, Petrelli L, Pira E, Polesel J, Richiardi L, Serraino D, Simonato L, Ricciardi W, Boccia S. Clinical features and prognostic factors in patients with head and neck cancer: Results from a multicentric study. *Cancer Epidemiol.* Juni 2015;39(3):367–74.
51. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF, Westra WH, Chung CH, Jordan RC, Lu C, Kim H, Axelrod R, Silverman CC, Redmond KP, Gillison ML. Human Papillomavirus and Survival of Patients with Oropharyngeal Cancer. *New England Journal of Medicine.* 1. Juli 2010;363(1):24–35.
52. Bryant AK, Sojourner EJ, Vitzthum LK, Zakeri K, Shen H, Nguyen C, Murphy JD, Califano JA, Cohen EEW, Mell LK. Prognostic Role of p16 in Nonoropharyngeal Head and Neck Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 5. Juni 2018;110(12):1393–9.
53. Stephen JK, Divine G, Chen KM, Chitale D, Havard S, Worsham MJ. Significance of p16 in Site-specific HPV Positive and HPV Negative Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Clin Oncol.* 2013;2(1):51–61.
54. Shi J, Wang L, Yao N, Sun L, Hu W, Li X, Yang Y, Wang Y, Zhu W, Li B. The effect of HPV DNA and p16 status on the prognosis of patients with hypopharyngeal carcinoma: a meta-analysis. *BMC Cancer.* 15. Juni 2022;22(1):658.
55. Kraaijenga SAC, Oskam IM, van Son RJJH, Hamming-Vrieze O, Hilgers FJM, van den Brekel MWM, van der Molen L. Assessment of voice, speech, and related quality of life in advanced head and neck cancer patients 10-years+ after chemoradiotherapy. *Oral Oncology.* 1. April 2016;55:24–30.
56. Hutcheson KA, Nurgalieva Z, Zhao H, Gunn GB, Giordano SH, Bhayani MK, Lewin JS, Lewis CM. Two-year prevalence of dysphagia and related outcomes in head and neck cancer survivors: An updated SEER-Medicare analysis. *Head & Neck.* 2019;41(2):479–87.
57. Osazuwa-Peters N, Simpson MC, Zhao L, Boakye EA, Olomukoro SI, Deshields T, Loux TM, Varvares MA, Schootman M. Suicide risk among cancer survivors: Head and neck versus other cancers. *Cancer.* 2018;124(20):4072–9.
58. Cheraghlou S, Yu PK, Otremba MD, Park HS, Bhatia A, Zogg CK, Mehra S, Yarbrough WG, Judson BL. Treatment deintensification in human papillomavirus-positive oropharynx cancer: Outcomes from the National Cancer Data Base. *Cancer.* 2018;124(4):717–26.
59. Pfister DG, Spencer S, Adelstein D, Adkins D, Anzai Y, Brizel DM, Bruce JY, Busse PM, Caudell JJ, Cmelak AJ, Colevas AD, Eisele DW, Fenton M, Foote RL, Galloway T, Gillison ML, Haddad RI, Hicks WL, Hitchcock YJ, Jimeno A, Leizman D, Maghami E, Mell LK, Mittal BB, Pinto HA, Ridge JA, Rocco JW, Rodriguez CP, Shah JP, Weber RS, Weinstein G, Witek M, Worden F, Yom SS, Zhen W, Burns JL, Darlow SD. Head and Neck Cancers, Version 2.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network.* 1. Juli 2020;18(7):873–98.

60. Yu SS, Cirillo N. The molecular markers of cancer stem cells in head and neck tumors. *Journal of Cellular Physiology*. 2020;235(1):65–73.
61. Baylin SB, Jones PA. Epigenetic Determinants of Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 9. Januar 2016;8(9):a019505.
62. Dawson MA, Kouzarides T. Cancer Epigenetics: From Mechanism to Therapy. *Cell*. 6. Juli 2012;150(1):12–27.
63. Kornberg RD. Chromatin Structure: A Repeating Unit of Histones and DNA. *Science*. 24. Mai 1974;184(4139):868–71.
64. Kornberg RD, Lorch Y. Twenty-Five Years of the Nucleosome, Fundamental Particle of the Eukaryote Chromosome. *Cell*. 6. August 1999;98(3):285–94.
65. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer*. Februar 2004;4(2):143–53.
66. Biswas S, Rao CM. Epigenetic tools (The Writers, The Readers and The Erasers) and their implications in cancer therapy. *European Journal of Pharmacology*. Oktober 2018;837:8–24.
67. Heintzman ND, Stuart RK, Hon G, Fu Y, Ching CW, Hawkins RD, Barrera LO, Van Calcar S, Qu C, Ching KA, Wang W, Weng Z, Green RD, Crawford GE, Ren B. Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat Genet*. März 2007;39(3):311–8.
68. Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K. High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome. *Cell*. 18. Mai 2007;129(4):823–37.
69. Dawson MA, Kouzarides T, Huntly BJP. Targeting Epigenetic Readers in Cancer. *N Engl J Med*. 16. August 2012;367(7):647–57.
70. Dell'Aversana C, Lepore I, Altucci L. HDAC modulation and cell death in the clinic. *Experimental Cell Research*. Juli 2012;318(11):1229–44.
71. Gan L, Yang Y, Li Q, Feng Y, Liu T, Guo W. Epigenetic regulation of cancer progression by EZH2: from biological insights to therapeutic potential. *Biomark Res*. 9. März 2018;6:10.
72. Gao B, Liu X, Li Z, Zhao L, Pan Y. Overexpression of EZH2/NSD2 Histone Methyltransferase Axis Predicts Poor Prognosis and Accelerates Tumor Progression in Triple-Negative Breast Cancer. *Front Oncol*. 16. Februar 2021;10:600514.
73. Bottner J, Ribbat-Idel J, Klapper L, Jagomast T, Lemster AL, Perner S, Idel C, Kirfel J. Elevated LSD1 and SNAIL Expression Indicate Poor Prognosis in Hypopharynx Carcinoma. *Int J Mol Sci*. 3. Mai 2022;23(9):5075.
74. Schulte JH, Lim S, Schramm A, Friedrichs N, Koster J, Versteeg R, Ora I, Pajtler K, Klein-Hitpass L, Kuhfittig-Kulle S, Metzger E, Schüle R, Eggert A, Buettner R, Kirfel J. Lysine-specific demethylase 1 is strongly expressed in poorly differentiated neuroblastoma: implications for therapy. *Cancer Res*. 1. März 2009;69(5):2065–71.

75. Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstone JR, Cole PA, Casero RA, Shi Y. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*. 29. Dezember 2004;119(7):941–53.
76. Perillo B, Tramontano A, Pezone A, Migliaccio A. LSD1: more than demethylation of histone lysine residues. *Exp Mol Med*. 14. Dezember 2020;52(12):1936–47.
77. Peng B, Wang J, Hu Y, Zhao H, Hou W, Zhao H, Wang H, Liao J, Xu X. Modulation of LSD1 phosphorylation by CK2/WIP1 regulates RNF168-dependent 53BP1 recruitment in response to DNA damage. *Nucleic Acids Res*. 13. Juli 2015;43(12):5936–47.
78. Forneris F, Binda C, Vanoni MA, Mattevi A, Battaglioli E. Histone demethylation catalysed by LSD1 is a flavin-dependent oxidative process. *FEBS Lett*. 11. April 2005;579(10):2203–7.
79. Agboyibor C, Dong J, Effah CY, Drokow EK, Pervaiz W, Liu HM. LSD1 as a Biomarker and the Outcome of Its Inhibitors in the Clinical Trial: The Therapy Opportunity in Tumor. *J Oncol*. 25. März 2021;2021:5512524.
80. Kontaki H, Talianidis I. Lysine methylation regulates E2F1-induced cell death. *Mol Cell*. 9. Juli 2010;39(1):152–60.
81. Wang J, Hevi S, Kurash JK, Lei H, Gay F, Bajko J, Wang J, Hevi S, Kurash JK, Lei H, Gay F, Bajko J, Su H, Sun W, Chang H, Xu G, Gaudet F, Li E, Chen T. The lysine demethylase LSD1 (KDM1) is required for maintenance of global DNA methylation. *Nat Genet*. Januar 2009;41(1):125–9. The lysine demethylase LSD1 (KDM1) is required for maintenance of global DNA methylation. *Nat Genet*. Januar 2009;41(1):125–9.
82. Huang J, Sengupta R, Espejo AB, Lee MG, Dorsey JA, Richter M, Opravil S, Shiekhhattar R, Bedford MT, Jenuwein T, Berger SL. p53 is regulated by the lysine demethylase LSD1. *Nature*. 6. September 2007;449(7158):105–8.
83. Wang Y, Zhang H, Chen Y, Sun Y, Yang F, Yu W, Liang J, Sun L, Yang X, Shi L, Li R, Li Y, Zhang Y, Li Q, Yi X, Shang Y. LSD1 Is a Subunit of the NuRD Complex and Targets the Metastasis Programs in Breast Cancer. *Cell*. 21. August 2009;138(4):660–72.
84. Shi YJ, Matson C, Lan F, Iwase S, Baba T, Shi Y. Regulation of LSD1 Histone Demethylase Activity by Its Associated Factors. *Molecular Cell*. 16. September 2005;19(6):857–64.
85. Metzger E, Wissmann M, Yin N, Müller JM, Schneider R, Peters AHFM, Günther T, Buettner R, Schüle R. LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature*. 15. September 2005;437(7057):436–9.
86. Metzger E, Imhof A, Patel D, Kahl P, Hoffmeyer K, Friedrichs N, Müller JM, Greschik H, Kirfel J, Ji S, Kunowska N, Beisenherz-Huss C, Günther T, Buettner R, Schüle R. Phosphorylation of histone H3T6 by PKCbeta(I) controls demethylation at histone H3K4. *Nature*. 1. April 2010;464(7289):792–6.
87. Garcia-Bassets I, Kwon YS, Teles F, Prefontaine GG, Hutt KR, Cheng CS, Ju BG, Ohgi KA, Wang J, Escoubet-Lozach L, Rose DW, Glass CK, Fu XD, Rosenfeld MG. Histone Methylation-Dependent Mechanisms Impose Ligand Dependency for Gene Activation by Nuclear Receptors. *Cell*. 9. Februar 2007;128(3):505–18.

88. Lin Y, Wu Y, Li J, Dong C, Ye X, Chi YI, Evers BM, Zhou BP. The SNAG domain of Snail1 functions as a molecular hook for recruiting lysine-specific demethylase 1. *EMBO J.* 2. Juni 2010;29(11):1803–16.
89. Chen C, Wang Y, Wang S, Liu Y, Zhang J, Xu Y, Zhang Z, Bao W, Wu S. LSD1 sustains estrogen-driven endometrial carcinoma cell proliferation through the PI3K/AKT pathway via demethylating H3K9 of cyclin D1. *Int J Oncol.* März 2017;50(3):942–52.
90. Egolf S, Aubert Y, Doepner M, Anderson A, Maldonado-Lopez A, Pacella G, Lee J, Ko EK, Zou J, Lan Y, Simpson CL, Ridky T, Capell BC. LSD1 Inhibition Promotes Epithelial Differentiation through Derepression of Fate-Determining Transcription Factors. *Cell Rep.* 20. August 2019;28(8):1981-1992.e7.
91. Karakaidos P, Verigos J, Magklara A. LSD1/KDM1A, a Gate-Keeper of Cancer Stemness and a Promising Therapeutic Target. *Cancers (Basel).* 20. November 2019;11(12):1821.
92. Verigos J, Karakaidos P, Kordias D, Papoudou-Bai A, Evangelou Z, Harissis HV, Klinakis A, Magklara A. The Histone Demethylase LSD1/KDM1A Mediates Chemoresistance in Breast Cancer via Regulation of a Stem Cell Program. *Cancers (Basel).* 17. Oktober 2019;11(10):1585.
93. Han Y, Xu S, Ye W, Wang Y, Zhang X, Deng J, Zhang Z, Liu L, Liu S. Targeting LSD1 suppresses stem cell-like properties and sensitizes head and neck squamous cell carcinoma to PD-1 blockade. *Cell Death Dis.* 23. Oktober 2021;12(11):993.
94. Ambrosio S, Saccà CD, Majello B. Epigenetic regulation of epithelial to mesenchymal transition by the Lysine-specific demethylase LSD1/KDM1A. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech.* September 2017;1860(9):905–10.
95. Lim S, Janzer A, Becker A, Zimmer A, Schüle R, Buettner R, Kirfel J. Lysine-specific demethylase 1 (LSD1) is highly expressed in ER-negative breast cancers and a biomarker predicting aggressive biology. *Carcinogenesis.* März 2010;31(3):512–20.
96. Kahl P, Gullotti L, Heukamp LC, Wolf S, Friedrichs N, Vorreuther R, Solleder G, Bastian PJ, Ellinger J, Metzger E, Schüle R, Buettner R. Androgen receptor coactivators lysine-specific histone demethylase 1 and four and a half LIM domain protein 2 predict risk of prostate cancer recurrence. *Cancer Res.* 1. Dezember 2006;66(23):11341–7.
97. Chen L, Xu Y, Xu B, Deng H, Zheng X, Wu C, Jiang J. Over-expression of lysine-specific demethylase 1 predicts tumor progression and poor prognosis in human esophageal cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(12):8929–34.
98. Hayami S, Kelly JD, Cho HS, Yoshimatsu M, Unoki M, Tsunoda T, Field HI, Neal DE, Yamaue H, Ponder BA, Nakamura Y, Hamamoto R. Overexpression of LSD1 contributes to human carcinogenesis through chromatin regulation in various cancers. *International Journal of Cancer.* 2011;128(3):574–86.
99. Lv T, Yuan D, Miao X, Lv Y, Zhan P, Shen X, Song Y. Over-Expression of LSD1 Promotes Proliferation, Migration and Invasion in Non-Small Cell Lung Cancer. *PLOS ONE.* 6. April 2012;7(4):e35065.
100. Wang Y, Zhu Y, Wang Q, Hu H, Li Z, Wang D, Zhang W, Qi B, Ye J, Wu H, Jiang H, Liu L, Yang J, Cheng J. The histone demethylase LSD1 is a novel oncogene and therapeutic target in oral cancer. *Cancer Lett.* 28. April 2016;374(1):12–21.

101. Zheng YC, Duan YC, Ma JL, Xu RM, Zi X, Lv WL, Wang MM, Ye XW, Zhu S, Mobley D, Zhu YY, Wang JW, Li JF, Wang ZR, Zhao W, Liu HM. Triazole-dithiocarbamate based, selective LSD1 inactivators inhibit gastric cancer cell growth, invasion and migration. *J Med Chem.* 14. November 2013;56(21):10.1021/jm401002r.
102. Vianello P, Botrugno OA, Cappa A, Dal Zuffo R, Dessanti P, Mai A, Mai A, Marrocco B, Mattevi A, Meroni G, Minucci S, Stazi G, Thaler F, Trifiró P, Valente S, Villa M, Varasi M, Mercurio C. Discovery of a Novel Inhibitor of Histone Lysine-Specific Demethylase 1A (KDM1A/LSD1) as Orally Active Antitumor Agent. *J Med Chem.* 25. Februar 2016;59(4):1501–17.
103. Han Y, Xu S, Ye W, Wang Y, Zhang X, Deng J, Zhang Z, Liu L, Liu S. Targeting LSD1 suppresses stem cell-like properties and sensitizes head and neck squamous cell carcinoma to PD-1 blockade. *Cell Death Dis.* 23. Oktober 2021;12(11):993.
104. Lei ZJ, Wang J, Xiao HL, Guo Y, Wang T, Li Q, Liu L, Luo X, Fan LL, Lin L, Mao CY, Wang SN, Wei YL, Lan CH, Jiang J, Yang XJ, Liu PD, Chen DF, Wang B. Lysine-specific demethylase 1 promotes the stemness and chemoresistance of Lgr5(+) liver cancer initiating cells by suppressing negative regulators of β -catenin signaling. *Oncogene.* 11. Juni 2015;34(24):3188–98.
105. Noce B, Di Bello E, Fioravanti R, Mai A. LSD1 inhibitors for cancer treatment: Focus on multi-target agents and compounds in clinical trials. *Front Pharmacol.* 2. Februar 2023;14:1120911.
106. Nieto MA. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* März 2002;3(3):155–66.
107. Domínguez D, Montserrat-Sentís B, Virgós-Soler A, Guaita S, Grueso J, Porta M, Puig I, Baulida J, Francí C, García de Herreros A. Phosphorylation Regulates the Subcellular Location and Activity of the Snail Transcriptional Repressor. *Mol Cell Biol.* Juli 2003;23(14):5078–89.
108. Wang Y, Shi J, Chai K, Ying X, Zhou BP. The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis. *Curr Cancer Drug Targets.* November 2013;13(9):963–72.
109. Batlle E, Sancho E, Francí C, Domínguez D, Monfar M, Baulida J, García De Herreros A. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol.* Februar 2000;2(2):84–9.
110. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 1. Juni 2009;119(6):1420–8.
111. Georgakopoulos-Soares I, Chartoumpakis DV, Kyriazopoulou V, Zaravinos A. EMT Factors and Metabolic Pathways in Cancer. *Front Oncol.* 7. April 2020;10:499.
112. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial–mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Februar 2006;7(2):131–42.
113. Olmeda D, Moreno-Bueno G, Flores JM, Fabra A, Portillo F, Cano A. SNAI1 is required for tumor growth and lymph node metastasis of human breast carcinoma MDA-MB-231 cells. *Cancer Res.* 15. Dezember 2007;67(24):11721–31.

114. Blanco MJ, Moreno-Bueno G, Sarrio D, Locascio A, Cano A, Palacios J, Nieto MA. Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. *Oncogene*. 9. Mai 2002;21(20):3241–6.
115. Jin H, Yu Y, Zhang T, Zhou X, Zhou J, Jia L, Wu Y, Zhou BP, Feng Y. Snail is critical for tumor growth and metastasis of ovarian carcinoma. *Int J Cancer*. 1. Mai 2010;126(9):2102–11.
116. Blehenschmidt K, Kremmer E, Hollweck R, Mylonas I, Höfler H, Kremer M, Becker KF. The E-cadherin repressor snail plays a role in tumor progression of endometrioid adenocarcinomas. *Diagn Mol Pathol*. Dezember 2007;16(4):222–8.
117. Miyoshi A, Kitajima Y, Kido S, Shimonishi T, Matsuyama S, Kitahara K, Miyazaki K. Snail accelerates cancer invasion by upregulating MMP expression and is associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer*. Januar 2005;92(2):252–8.
118. Bruyere F, Namdarian B, Corcoran NM, Pedersen J, Ockrim J, Voelzke BB, Mete U, Costello AJ, Hovens CM. Snail expression is an independent predictor of tumor recurrence in superficial bladder cancers. *Urol Oncol*. 1. November 2010;28(6):591–6.
119. Jouppila-Mättö A, Närkiö-Mäkelä M, Soini Y, Pukkila M, Sironen R, Tuhkanen H, Mannermaa A, Kosma VM. Twist and snai1 expression in pharyngeal squamous cell carcinoma stroma is related to cancer progression. *BMC Cancer*. 11. August 2011;11:350.
120. Kakurina GV, Cheremisina OV, Sereda EE, Kolegova ES, Kondakova IV, Choinzonov EL. Serum levels of cytoskeleton remodeling proteins and their mRNA expression in tumor tissue of metastatic laryngeal and hypopharyngeal cancers. *Mol Biol Rep*. Juni 2021;48(6):5135–42.
121. Hojo N, Huisken AL, Wang H, Chirshev E, Kim NS, Nguyen SM, Campos H, Glackin CA, Ioffe YJ, Unternaehrer JJ. Snail knockdown reverses stemness and inhibits tumour growth in ovarian cancer. *Sci Rep*. 7. Juni 2018;8:8704.
122. Peinado H, Ballestar E, Esteller M, Cano A. Snail Mediates E-Cadherin Repression by the Recruitment of the Sin3A/Histone Deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 Complex. *Mol Cell Biol*. Januar 2004;24(1):306–19.
123. Herranz N, Pasini D, Díaz VM, Francí C, Gutierrez A, Dave N, Escrivà M, Hernandez-Muñoz I, Di Croce L, Helin K, García de Herreros A, Peiró S. Polycomb Complex 2 Is Required for E-cadherin Repression by the Snail1 Transcription Factor. *Mol Cell Biol*. August 2008;28(15):4772–81.
124. Lin T, Ponn A, Hu X, Law BK, Lu J. Requirement of the histone demethylase LSD1 in Snai1-mediated transcriptional repression during epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene*. 2. September 2010;29(35):4896–904.
125. Li HM, Bi YR, Li Y, Fu R, Lv WC, Jiang N, Xu Y, Ren BX, Chen YD, Xie H, Wang S, Lu T, Wu ZQ. A potent CBP/p300-Snail interaction inhibitor suppresses tumor growth and metastasis in wild-type p53-expressing cancer. *Sci Adv*. 22. April 2020;6(17):eaaw8500.
126. Harney AS, Meade TJ, LaBonne C. Targeted Inactivation of Snail Family EMT Regulatory Factors by a Co(III)-Ebox Conjugate. *PLoS One*. 29. Februar 2012;7(2):e32318.

127. Azmi AS, Bollig-Fischer A, Bao B, Park BJ, Lee SH, Yong-Song G, Dyson G, Reddy CK, Sarkar FH, Mohammad RM. Systems analysis reveals a transcriptional reversal of the mesenchymal phenotype induced by SNAIL-inhibitor GN-25. *BMC Syst Biol.* 3. September 2013;7:85.
128. Tang X, Sui X, Weng L, Liu Y. SNAIL1: Linking Tumor Metastasis to Immune Evasion. *Front Immunol.* 30. November 2021;12:724200.
129. jamovi - open statistical software for the desktop and cloud [Internet]. [zitiert 18. Dezember 2022]. Verfügbar unter: <https://www.jamovi.org/>
130. Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, Dombrowski Y, McArt DG, Dunne PD, McQuaid S, Gray RT, Murray LJ, Coleman HG, James JA, Salto-Tellez M, Hamilton PW. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep.* 4. Dezember 2017;7(1):16878.
131. Peterson WD, Stulberg CS, Simpson WF. A permanent heteroploid human cell line with type B glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Proc Soc Exp Biol Med.* April 1971;136(4):1187–91.
132. Rangan SR. A new human cell line (FaDu) from a hypopharyngeal carcinoma. *Cancer.* Januar 1972;29(1):117–21.
133. Watermann C, Pasternack H, Idel C, Ribbat-Idel J, Brägelmann J, Kuppler P, Offermann A, Jonigk D, Kühnel MP, Schröck A, Dreyer E, Rosero C, Nathansen J, Dubrovskaja A, Tharun L, Kirfel J, Wollenberg B, Perner S, Krupar R. Recurrent HNSCC Harbor an Immunosuppressive Tumor Immune Microenvironment Suggesting Successful Tumor Immune Evasion. *Clin Cancer Res.* 15. Januar 2021;27(2):632–44.
134. Lansford CD, Grenman R, Bier H, Somers KD, Kim SY, Whiteside TL, Clayman GL, Welkoborsky HJ, Carey TE. Head and Neck Cancers. In: Masters JRW, Palsson B, Herausgeber. *Human Cell Culture: Cancer Cell Lines Part 2.* Dordrecht: Springer Netherlands; 2002 S. 185–255. (Human Cell Culture). Verfügbar unter: https://doi.org/10.1007/0-306-46861-1_12
135. Kuppler P. Über den Aufbau einer Kopf-Hals-Karzinomgewebekohorte und ihren Nutzen am Beispiel der Beschreibung der Tumorummuninfiltration und der Rolle der EVI1 Expression. *Med. Diss. Lübeck; 2021.*
136. Ribbat-Idel J, Dressler FF, Krupar R, Watermann C, Paulsen FO, Kuppler P, Klapper L, Offermann A, Wollenberg B, Rades D, Laban S, Reischl M, Bruchhage KL, Idel C, Perner S. Performance of Different Diagnostic PD-L1 Clones in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Front Med (Lausanne).* 2021;8:640515.
137. Ribbat-Idel J, Perner S, Kuppler P, Klapper L, Krupar R, Watermann C, Paulsen FO, Offermann A, Bruchhage KL, Wollenberg B, Idel C. Immunologic „Cold“ Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck Are Associated With an Unfavorable Prognosis. *Front Med (Lausanne).* 2021;8:622330.
138. Jagomast T, Idel C, Klapper L, Kuppler P, Offermann A, Dreyer E, Bruchhage KL, Ribbat-Idel J, Perner S. CDK7 Predicts Worse Outcome in Head and Neck Squamous-Cell Cancer. *Cancers (Basel).* 19. Januar 2022;14(3):492.

139. Klapper L, Idel C, Kuppler P, Jagomast T, von Bernuth A, Bruchhage KL, Rades D, Offermann A, Kirfel J, Perner S, Ribbat-Idel J. TRIM24 Expression as an Independent Biomarker for Prognosis and Tumor Recurrence in HNSCC. *J Pers Med.* 17. Juni 2022;12(6):991.
140. Klapper L, Ribbat-Idel J, Kuppler P, Paulsen FO, Bruchhage KL, Rades D, Offermann A, Kirfel J, Wollenberg B, Idel C, Perner S. NR2F6 as a Prognostic Biomarker in HNSCC. *Int J Mol Sci.* 1. August 2020;21(15):5527.
141. Paulsen FO, Idel C, Ribbat-Idel J, Kuppler P, Klapper L, Rades D, Bruchhage KL, Wollenberg B, Brägelmann J, Perner S, Offermann A. CDK19 as a Potential HPV-Independent Biomarker for Recurrent Disease in HNSCC. *Int J Mol Sci.* 31. Juli 2020;21(15):5508.
142. Idel C, Ribbat-Idel J, Kuppler P, Krupar R, Offermann A, Vogel W, Rades D, Kirfel J, Wollenberg B, Perner S. EVI1 as a Marker for Lymph Node Metastasis in HNSCC. *Int J Mol Sci.* 28. Januar 2020;21(3):854.
143. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 16. Dezember 1983;65(1–2):55–63.
144. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* Oktober 1985;150(1):76–85.
145. Riedel G, Rüdlich U, Fekete-Drimusz N, Manns MP, Vondran FWR, Bock M. An extended Δ CT-method facilitating normalisation with multiple reference genes suited for quantitative RT-PCR analyses of human hepatocyte-like cells. *PLoS One.* 2014;9(3):e93031.
146. Lallemand B, Evrard A, Combescure C, Chapuis H, Chambon G, Raynal C, Reynaud C, Sabra O, Joubert D, Hollande F, Lallemand JG, Lumbroso S, Brouillet JP. Reference gene selection for head and neck squamous cell carcinoma gene expression studies. *BMC Mol Biol.* 3. August 2009;10:78.
147. R: The R Project for Statistical Computing [Internet]. [zitiert 18. Dezember 2022]. Verfügbar unter: <https://www.r-project.org/>
148. Harrison E, Drake T, Ots R. finalfit: Quickly Create Elegant Regression Results Tables and Plots when Modelling [Internet]. 2022 [zitiert 18. Dezember 2022]. Verfügbar unter: <https://CRAN.R-project.org/package=finalfit>
149. Therneau TM, until 2009) TL (original S >R port and R maintainer, Elizabeth A, Cynthia C. survival: Survival Analysis [Internet]. 2022 [zitiert 18. Dezember 2022]. Verfügbar unter: <https://CRAN.R-project.org/package=survival>
150. Kassambara A, Kosinski M, Biecek P, Fabian S. survminer: Drawing Survival Curves using „ggplot2“ [Internet]. 2021 [zitiert 18. Dezember 2022]. Verfügbar unter: <https://CRAN.R-project.org/package=survminer>
151. Forsyth CB, Tang Y, Shaikh M, Zhang L, Keshavarzian A. Alcohol Stimulates Activation of Snail, Epidermal Growth Factor Receptor Signaling, and Biomarkers of Epithelial-mesenchymal Transition in Colon and Breast Cancer Cells. *Alcohol Clin Exp Res.* Januar 2010;34(1):19–31.

152. Wang Y, Xu M, Ke Z ji, Luo J. Cellular and Molecular Mechanism Underlying Alcohol-induced Aggressiveness of Breast Cancer. *Pharmacol Res.* Januar 2017;115:299–308.
153. Rumgay H, Murphy N, Ferrari P, Soerjomataram I. Alcohol and Cancer: Epidemiology and Biological Mechanisms. *Nutrients.* 11. September 2021;13(9):3173.
154. Bagnardi V, Rota M, Botteri E, Tramacere I, Islami F, Fedirko V, Scotti L, Jenab M, Turati F, Pasquali E, Pelucchi C, Galeone C, Bellocco R, Negri E, Corrao G, Boffetta P, La Vecchia C. Alcohol consumption and site-specific cancer risk: a comprehensive dose–response meta-analysis. *Br J Cancer.* 3. Februar 2015;112(3):580–93.
155. Yu CC, Chang YC. Enhancement of cancer stem-like and epithelial–mesenchymal transdifferentiation property in oral epithelial cells with long-term nicotine exposure: Reversal by targeting SNAIL. *Toxicology and Applied Pharmacology.* Februar 2013;266(3):459–69.
156. Nieh S, Jao SW, Yang CY, Lin YS, Tseng YH, Liu CL, Lee TY, Liu TY, Chu YH, Chen SF. Regulation of tumor progression via the Snail-RKIP signaling pathway by nicotine exposure in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck.* Dezember 2015;37(12):1712–21.
157. Li S, Wang B, Tang Q, Liu J, Yang X. Bisphenol A triggers proliferation and migration of laryngeal squamous cell carcinoma via GPER mediated upregulation of IL-6. *Cell Biochem Funct.* Juni 2017;35(4):209–16.
158. Cho YA, Kim EK, Cho BC, Koh YW, Yoon SO. Twist and Snail/Slug Expression in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma in Correlation With Lymph Node Metastasis. *Anticancer Research.* 1. November 2019;39(11):6307–16.
159. Mendelsohn AH, Lai CK, Shintaku IP, Fishbein MC, Brugman K, Elashoff DA, Abemayor E, Dubinett SM, St John MA. Snail as a novel marker for regional metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Otolaryngol.* 2012;33(1):6–13.
160. Zheng X, Carstens JL, Kim J, Scheible M, Kaye J, Sugimoto H, Wu CC, LeBleu VS, Kalluri R. EMT Program is Dispensable for Metastasis but Induces Chemoresistance in Pancreatic Cancer. *Nature.* 26. November 2015;527(7579):525–30.
161. Tran HD, Luitel K, Kim M, Zhang K, Longmore GD, Tran DD. Transient SNAIL1 Expression is Necessary for Metastatic Competence in Breast Cancer. *Cancer Res.* 1. November 2014;74(21):6330–40.
162. Fulga V, Rudico L, Balica AR, Cimpean AM, Saptefrati L, Margan MM, Raica M. Differential expression of e-cadherin in primary breast cancer and corresponding lymph node metastases. *Anticancer Res.* Februar 2015;35(2):759–65.
163. Jang TJ. Differential membranous E-cadherin expression, cell proliferation and O-GlcNAcylation between primary and metastatic nodal lesion in colorectal cancer. *Pathology - Research and Practice.* Februar 2016;212(2):113–9.
164. Aiello NM, Kang Y. Context-dependent EMT programs in cancer metastasis. *J Exp Med.* 6. Mai 2019;216(5):1016–26.

165. Chen YQ, Hung CY, Wei MT, Kuo JC, Yang MH, Cheng HY, Chiou A. Snail Augments Nuclear Deformability to Promote Lymph Node Metastasis of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Front Cell Dev Biol.* 21. Februar 2022;10:809738.
166. Jørgensen CLT, Forsare C, Bendahl PO, Falck AK, Fernö M, Lövgren K, Aaltonen K, Rydén L. Expression of epithelial-mesenchymal transition-related markers and phenotypes during breast cancer progression. *Breast Cancer Res Treat.* 2020;181(2):369–81.
167. Gatta G, Botta L, Sánchez MJ, Anderson LA, Pierannunzio D, Licitra L, EURO CARE Working Group. Prognoses and improvement for head and neck cancers diagnosed in Europe in early 2000s: The EURO CARE-5 population-based study. *Eur J Cancer.* Oktober 2015;51(15):2130–43.
168. Du E, Mazul AL, Farquhar D, Brennan P, Anantharaman D, Abedi-Ardekani B, Weissler MC, Hayes DN, Olshan AF, Zavallos JP. Long-term Survival in Head and Neck Cancer: Impact of Site, Stage, Smoking, and Human Papillomavirus Status. *Laryngoscope.* November 2019;129(11):2506–13.
169. Yang MH, Chang SY, Chiou SH, Liu CJ, Chi CW, Chen PM, Teng SC, Wu KJ. Overexpression of NBS1 induces epithelial–mesenchymal transition and co-expression of NBS1 and Snail predicts metastasis of head and neck cancer. *Oncogene.* März 2007;26(10):1459–67.
170. Kakurina GV, Kolegova ES, Shashova EE, Velikaya VV, Startseva ZhA, Cheremisina OV, Choinzonov EL, Kondakova IV. Relationship between the Levels of mRNA Expression for Protein Phosphatase 1B and Proteins Involved in Cytoskeleton Remodeling in Squamous Cell Carcinoma of the Larynx and Hypopharynx. *Bull Exp Biol Med.* August 2020;169(4):504–7.
171. Cercelaru L, Stepan AE, Popa IC, Florescu MM, Simionescu CE. E-cadherin, β -catenin and Snail immunexpression in laryngeal squamous cell carcinoma.
172. Liu PF, Kang BH, Wu YM, Sun JH, Yen LM, Fu TY, Liou HH, Lin YS, Sie HC, Hsieh IC, Tseng YK, Shu CW, Hsieh YD, Ger LP. Vimentin is a potential prognostic factor for tongue squamous cell carcinoma among five epithelial–mesenchymal transition-related proteins. *PLoS One.* 1. Juni 2017;12(6):e0178581.
173. Zheng M, Jiang Y ping, Chen W, Li K de, Liu X, Gao S yu, Feng H, Wang SS, Jiang J, Ma XR, Cen X, Tang YJ, Chen Y, Lin YF, Tang YL, Liang XH. Snail and Slug collaborate on EMT and tumor metastasis through miR-101-mediated EZH2 axis in oral tongue squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 9. Februar 2015;6(9):6794–810.
174. Yang J, Pan Y, Peng L, Zhang L, Zhao J, Zheng Z, Zheng J, Xu X, Zeng Y. Upregulation of Synuclein- γ and Snai1 Contributes to Poor Clinical Prognosis in Oral Squamous Cell Carcinoma Patients. *Biomed Res Int.* 7. April 2022;2022:6534626.
175. Zhao D, Tang XF, Yang K, Liu JY, Ma XR. Over-expression of integrin-linked kinase correlates with aberrant expression of Snail, E-cadherin and N-cadherin in oral squamous cell carcinoma: implications in tumor progression and metastasis. *Clin Exp Metastasis.* Dezember 2012;29(8):957–69.
176. Wushou A, Pan HY, Liu W, Tian Z, Wang LZ, Shali S, Zhang ZY. Correlation of Increased Twist With Lymph Node Metastasis in Patients With Oral Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.* Juni 2012;70(6):1473–9.

177. Hong KO, Oh KY, Shin WJ, Yoon HJ, Lee JI, Hong SD. Tumor budding is associated with poor prognosis of oral squamous cell carcinoma and histologically represents an epithelial-mesenchymal transition process. *Human Pathology*. Oktober 2018;80:123–9.
178. Park SH, Cheung LWT, Wong AST, Leung PCK. Estrogen Regulates Snail and Slug in the Down-Regulation of E-Cadherin and Induces Metastatic Potential of Ovarian Cancer Cells through Estrogen Receptor α . *Molecular Endocrinology*. 1. September 2008;22(9):2085.
179. Grsic K, Opacic IL, Sitic S, Milkovic Perisa M, Suton P, Sarcevic B. The prognostic significance of estrogen receptor β in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Lett*. November 2016;12(5):3861–5.
180. Goulioumis AK, Fuxe J, Varakis J, Repanti M, Goumas P, Papadaki H. Estrogen receptor-beta expression in human laryngeal carcinoma: correlation with the expression of epithelial-mesenchymal transition specific biomarkers. *Oncol Rep*. November 2009;22(5):1063–8.
181. Atef A, El-Rashidy MA, Elzayat S, Kabel AM. The prognostic value of sex hormone receptors expression in laryngeal carcinoma. *Tissue and Cell*. April 2019;57:84–9.
182. Okuda S, Yamakado N, Higashikawa K, Uetsuki R, Ishida F, Rizqiawan A, Ono S, Mizuta K, Kamata N, Tobiume K. Dexamethasone resets stable association of nuclear Snail with LSD1 concomitant with transition from EMT to partial EMT. *Biochem Biophys Rep*. 13. Mai 2022;30:101277.
183. Yuan C, Li Z, Qi B, Zhang W, Cheng J, Wang Y. High expression of the histone demethylase LSD1 associates with cancer cell proliferation and unfavorable prognosis in tongue cancer. *J Oral Pathol Med*. Februar 2015;44(2):159–65.
184. Zhang W, Cheng J, Diao P, Wang D, Zhang W, Jiang H, Wang Y. Therapeutically targeting head and neck squamous cell carcinoma through synergistic inhibition of LSD1 and JMJD3 by TCP and GSK-J1. *Br J Cancer*. 18. Februar 2020;122(4):528–38.
185. Gasparotto D, Polesel J, Marzotto A, Colladel R, Piccinin S, Modena P, Grizzo A, Sulfaro S, Serraino D, Barzan L, Doglioni C, Maestro R. Overexpression of TWIST2 correlates with poor prognosis in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Oncotarget*. 22. Dezember 2011;2(12):1165–75.
186. Cappellesso R, Marioni G, Crescenzi M, Giacomelli L, Guzzardo V, Mussato A, Staffieri A, Martini A, Blandamura S, Fassina A. The prognostic role of the epithelial-mesenchymal transition markers E-cadherin and Slug in laryngeal squamous cell carcinoma. *Histopathology*. Oktober 2015;67(4):491–500.
187. Häyry V, Mäkinen LK, Atula T, Sariola H, Mäkitie A, Leivo I, Keski-Säntti H, Lundin J, Haglund C, Hagström J. Bmi-1 expression predicts prognosis in squamous cell carcinoma of the tongue. *Br J Cancer*. 2. März 2010;102(5):892–7.
188. Jouppila-Mättö A, Tuhkanen H, Soini Y, Pukkila M, Närkiö-Mäkelä M, Sironen R, Virtanen I, Mannermaa A, Kosma VM. Transcription factor snail1 expression and poor survival in pharyngeal squamous cell carcinoma. *Histol Histopathol*. April 2011;26(4):443-9.
189. Jouppila-Mättö A, Mannermaa A, Sironen R, Kosma VM, Soini Y, Pukkila M. SIP1 predicts progression and poor prognosis in pharyngeal squamous cell carcinoma. *Histol Histopathol*. Mai 2015;30(5):569-79.

190. Bos T, Ratti JA, Harada H. Targeting Stress-Response Pathways and Therapeutic Resistance in Head and Neck Cancer. *Front Oral Health*. 23. Juni 2021;2:676643.
191. Xu Z, Zhang Y, Dai H, Han B. Epithelial–Mesenchymal Transition-Mediated Tumor Therapeutic Resistance. *Molecules*. 25. Juli 2022;27(15):4750.
192. Hsu DSS, Lan HY, Huang CH, Tai SK, Chang SY, Tsai TL, Chang CC, Tzeng CH, Wu KJ, Kao JY, Yang MH. Regulation of Excision Repair Cross-Complementation Group 1 by Snail Contributes to Cisplatin Resistance in Head and Neck Cancer. *Clinical Cancer Research*. 14. September 2010;16(18):4561–71.
193. Masui T, Ota I, Yook JI, Mikami S, Yane K, Yamanaka T, Hosoi H. Snail-induced epithelial-mesenchymal transition promotes cancer stem cell-like phenotype in head and neck cancer cells. *International Journal of Oncology*. März 2014;44(3):693–9.
194. Wang H, Wang Z, Li Y, Lu T, Hu G. Silencing Snail Reverses Epithelial-Mesenchymal Transition and Increases Radiosensitivity in Hypopharyngeal Carcinoma. *Onco Targets Ther*. 16. Januar 2020;13:497–511.
195. Agboyibor C, Dong J, Effah CY, Drokow EK, Ampomah-Wireko M, Pervaiz W, Sangmor A, Ma X, Li J, Liu HM, Zhang P. Epigenetic compounds targeting pharmacological target lysine specific demethylase 1 and its impact on immunotherapy, chemotherapy and radiotherapy for treatment of tumor recurrence and resistance. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 1. Januar 2023;157:113934.
196. Lee JY, Park JH, Choi HJ, Won HY, Joo HS, Shin DH, Park MK, Han B, Kim KP, Lee TJ, Croce CM, Kong G. LSD1 demethylates HIF1 α to inhibit hydroxylation and ubiquitin-mediated degradation in tumor angiogenesis. *Oncogene*. 28. September 2017;36(39):5512–21.
197. Harada H. Hypoxia-inducible factor 1–mediated characteristic features of cancer cells for tumor radioresistance. *J Radiat Res*. August 2016;57(Suppl 1):i99–105.
198. Swartz JE, Pothen AJ, Van Kempen PMW, Stegeman I, Formsma FK, Cann EMV, Willems SM, Grolman W. Poor prognosis in human papillomavirus-positive oropharyngeal squamous cell carcinomas that overexpress hypoxia inducible factor-1 α : Hypoxia inducible factor-1 α as predictor of poor prognosis in HPV-positive propharyngeal SCC. *Head Neck*. September 2016;38(9):1338–46.
199. Sørensen BS, Busk M, Olthof N, Speel EJ, Horsman MR, Alsner J, Overgaard J. Radiosensitivity and effect of hypoxia in HPV positive head and neck cancer cells. *Radiotherapy and Oncology*. September 2013;108(3):500–5.
200. Göttgens EL, Ostheimer C, Span PN, Bussink J, Hammond EM. HPV, hypoxia and radiation response in head and neck cancer. *BJR*. Januar 2019;92(1093):20180047.
201. Peng W, Zhang H, Tan S, Li Y, Zhou Y, Wang L, Liu C, Li Q, Cen X, Yang S, Zhao Y. Synergistic antitumor effect of 5-fluorouracil with the novel LSD1 inhibitor ZY0511 in colorectal cancer. *Ther Adv Med Oncol*. 23. Juli 2020;12:1758835920937428.
202. Ferrari-Amorotti G, Fragliasso V, Esteki R, Prudente Z, Soliera AR, Cattelani S, Manzotti G, Grisendi G, Dominici M, Pieraccioli M, Raschellà G, Chiodoni C, Colombo MP, Calabretta B. Inhibiting interactions of lysine demethylase LSD1 with Snail/Slug blocks cancer cell invasion. *Cancer Res*. 1. Januar 2013;73(1):235–45.

203. Sprüssel A, Schulte JH, Weber S, Necke M, Händschke K, Thor T, Pajtler KW, Schramm A, König K, Diehl L, Mestdagh P, Vandesompele J, Speleman F, Jastrow H, Heukamp LC, Schüle R, Dührsen U, Buettner R, Eggert A, Göthert JR. Lysine-specific demethylase 1 restricts hematopoietic progenitor proliferation and is essential for terminal differentiation. *Leukemia*. September 2012;26(9):2039–51.
204. Yang GJ, Lei PM, Wong SY, Ma DL, Leung CH. Pharmacological Inhibition of LSD1 for Cancer Treatment. *Molecules*. Dezember 2018;23(12):3194.
205. Wu Y, Wang Y, Lin Y, Liu Y, Wang Y, Jia J, Singh P, Chi Yi, Wang C, Dong C, Li W, Tao M, Napier D, Shi Q, Deng J, Evers BM, Zhou BP. Dub3 inhibition suppresses breast cancer invasion and metastasis by promoting Snail1 degradation. *Nat Commun*. 15. Februar 2017;8:14228.
206. Li Y, Ren B xue, Li H mei, Lu T, Fu R, Wu Z qiu. Omeprazole suppresses aggressive cancer growth and metastasis in mice through promoting Snail degradation. *Acta Pharmacol Sin*. Juli 2022;43(7):1816–28.
207. Zhao X, Yu D, Yang J, Xue K, Liu Y, Jin C. Knockdown of Snail inhibits epithelial-mesenchymal transition of human laryngeal squamous cell carcinoma Hep-2 cells through the vitamin D receptor signaling pathway. *Biochem Cell Biol*. Dezember 2017;95(6):672–8.

7.2 Bildquellen

Rachel Stewart. Western Blotting [Internet]. [zitiert 26. April 2023]. Verfügbar unter: <https://www.antibodies.com/de/western-blotting>

How to Design Primers for PCR Experiments [Internet]. ZYMO RESEARCH. [zitiert 10. Oktober 2022]. Verfügbar unter: <https://www.zymoresearch.com/blogs/blog/how-to-design-primers-for-pcr-experiments>

8 Anhang

Appendix 1 - Univariate und Multivariate Cox-Regression des Rezidiv-freien Überlebens nach LSD1-Expression in Hypopharynx Tumoren

		Univariate HR (95% -Konf., p=)	Multivariate HR (95%- Konf., p=)
LSD1-Expression	LSD1 niedrig	2,53 (1,05-6,09, p=0,038)	3,72 (1,24-10,94, p=0,028)
	LSD1 hoch		
T- Stadium	T1,2,3	3,25 (1,29-8,21, p=0,013)	1,03 (0,35-3,01, p=0,924)
	T4		
N-Stadium	N0,1	4,18 (1,53-11,43, p=0,005)	0,15 (0,02-1,02, p=0,052)
	N2,3		
M-Stadium	M0	4,21 (0,53-33,28, p=0,173)	
	M1		
UICC-Stadium	UICC I,II,III	7,37 (2,16-25,15, p=0,001)	44,56 (4,18-475,45, p=0,002)
	UICC IV		
Geschlecht	männlich	0,39 (0,09-1,66, p=0,202)	
	weiblich		
Alter	≤ 61 J.	0,97 (0,42-2,22, p=0,943)	
	> 61 J.		
p16-Status	positiv	2,76 (0,37-20,51, p=0,321)	
	negativ		
Alkohol	Ja	0,71 (0,28-1,75, p=0,453)	
	Nein		
Nikotin	Ja	2,63 (0,61-11,41, p=0,197)	
	Nein		

Appendix 2 - Univariate und Multivariate Cox-Regression des Gesamtüberlebens nach SNAIL-Expression in HNSCC

		Univariate HR (95% -Konf., p=)	Multivariate HR (95%- Konf., p=)
SNAIL-Expression	SNAIL niedrig	1,45 (1,01-2,10, p=0,046)	1,57 (1,07-2,31, p=0,021)
	SNAIL hoch		
T- Stadium	T1,2	2,14 (1,47-3,11, p<0,001)	1,79 (1,08-2,99, p=0,025)
	T3,4		
N-Stadium	N0	1,67 (1,14-2,44, p=0,009)	1,49 (0,98-2,36, p=0,088)
	N1,2,3		
M-Stadium	M0	5,15 (2,74-9,67, p<0,001)	5,15 (2,64-10,03, p<0,001)
	M1		
UICC-Stadium	UICC I,II	2,32 (1,52-3,53, p<0,001)	1,19 (0,61-2,34, p=0,606)
	UICC III, IV		
Geschlecht	männlich	0,80 (0,51-1,27, p=0,345)	
	weiblich		
Alter	≤ 61 J.	1,25 (0,86-1,81, p=0,236)	
	> 61 J.		
p16-Status	positiv	1,93 (1,20-3,13, p=0,007)	1,70 (0,96-3,01, p=0,071)
	negativ		
Alkohol	Ja	0,57 (0,40-0,84, p=0,004)	0,74 (0,50-1,09, p=0,125)
	Nein		
Nikotin	Ja	0,60 (0,29-1,22, p=0,158)	
	Nein		

Appendix 3 - Univariate und Multivariate Cox-Regression des Rezidiv-freien Überlebens nach SNAIL-Expression in HNSCC

		Univariate HR (95% -Konf., p=)	Multivariate HR (95%- Konf., p=)
SNAIL-Expression	SNAIL niedrig	1,63 (1,17-2,26, p=0,004)	1,82 (1,29-2,57, p=0,001)
	SNAIL hoch		
T- Stadium	T1,2	2,10 (1,51-2,94, p<0,001)	1,79 (1,12-2,85, p=0,014)
	T3,4		
N-Stadium	N0	1,40 (1,00-1,95, p=0,051)	
	N1,2,3		
M-Stadium	M0	3,41 (1,83-6,32, p<0,001)	3,45 (1,80-6,63, p<0,001)
	M1		
UICC-Stadium	UICC I,II	2,19 (1,52-3,16, p<0,001)	1,38 (0,81-2,34, p=0,238)
	UICC III, IV		
Geschlecht	männlich	0,84 (0,56-1,26, p=0,398)	
	weiblich		
Alter	≤ 61 J.	1,22 (0,88-1,69, p=0,241)	
	> 61 J.		
p16-Status	positiv	2,20 (1,42-3,41, p<0,001)	1,79 (1,10-2,90, p=0,018)
	negativ		
Alkohol	Ja	0,63 (0,45-0,87, p=0,006)	0,81 (0,57-1,14, p=0,224)
	Nein		
Nikotin	Ja	0,76 (0,43-1,35, p=0,354)	
	Nein		

Appendix 4 - Univariate und Multivariate Cox-Regression des Rezidiv-freien Überlebens nach SNAIL-Expression in Hypopharynx Tumoren

		Univariate HR (95% -Konf., p=)	Multivariate HR (95%- Konf., p=)
SNAIL-Expression	SNAIL niedrig	2,83 (1,15-6,94, p=0,023)	3,11 (1,24-7,78, p=0,015)
	SNAIL hoch		
T- Stadium	T1,2	4,33 (1,59-11,84, p=0,004)	2,77 (0,92-8,33, p=0,070)
	T3,4		
N-Stadium	N0	2,17 (0,81-5,84, p=0,123)	
	N1,2,3		
M-Stadium	M0	4,32 (0,55-34,16, p=0,165)	
	M1		
UICC-Stadium	UICC I,II	8,83 (1,19-65,76, p=0,033)	4,51 (0,50-40,38, p=0,179)
	UICC III,IV		
Geschlecht	männlich	0,39 (0,09-1,64, p=0,197)	
	weiblich		
Alter	≤ 61 J.	0,96 (0,44-2,12, P=0,921)	
	> 61 J.		
p16-Status	positiv	3,77 (0,51-27,89, p=0,194)	
	negativ		
Alkohol	Ja	0,60 (0,25-1,47, p=0,268)	
	Nein		
Nikotin	Ja	1,33 (0,31-5,70, p=0,700)	
	Nein		

Appendix 5 - Univariate und Multivariate Cox-Regression in HNSCC mit Chemotherapie nach LSD1 und SNAIL Expression

Lediglich jene Charakteristika, welche in der univariaten Regression einen signifikanten Unterschied zeigten, wurden in der multivariaten Analyse berücksichtigt. Geringfügige Unterschiede der Ergebnisse der univariaten Analyse im Vergleich zu Tabelle 13 kommen durch Herausfallen einzelner Patienten, von denen nicht alle, in der multivariaten Analyse inkludierten Charakteristika bekannt sind, zustande.

		Univariate HR (95% -Konf., p=)	Multivariate HR (95%- Konf., p=)
LSD1- und SNAIL-Expression	LSD1- und SNAIL-	5,49 (2,07-14,53, p=0,001)	5,52 (2,06-14,83, p=0,001)
	LSD1- und SNAIL+		
T- Stadium	T1,2	1,75 (0,94-3,26, p=0,080)	
	T3,4		
N-Stadium	N0	0,92 (0,49-1,72, p=0,788)	
	N1,2,3		
M-Stadium	M0	2,15 (0,97-4,77, p=0,061)	
	M1		
UICC-Stadium	UICC I,II	3,36 (1,34-8,43, p=0,010)	1,35 (0,50-3,64, p=0,549)
	UICC III,IV		
Geschlecht	männlich	1,02 (0,57-1,84, p=0,939)	
	weiblich		
Alter	≤ 61 J.	1,18 (0,73-1,90, p=0,503)	
	> 61 J.		
p16-Status	positiv	5,88 (2,12-16,32, p=0,001)	5,14 (1,74-15,19, p=0,003)
	negativ		
Alkohol	Ja	0,66 (0,41-1,09, p=0,102)	
	Nein		
Nikotin	Ja	1,03 (0,44-2,39, p=0,949)	
	Nein		

Appendix 6 - Univariate und Multivariate Cox-Regression in HNSCC mit Radiotherapie nach SNAIL Expression

Lediglich jene Charakteristika, welche in der univariaten Regression einen signifikanten Unterschied zeigten, wurden in der multivariaten Analyse berücksichtigt. Geringfügige Unterschiede der Ergebnisse der univariaten Analyse im Vergleich zu Tabelle 14 kommen durch Herausfallen einzelner Patienten, von denen nicht alle, in der multivariaten Analyse inkludierten Charakteristika bekannt sind, zustande.

		Univariate HR (95% -Konf., p=)	Multivariate HR (95%- Konf., p=)
SNAIL-Expression	SNAIL-	1,55 (1,01-2,38, p=0,045)	1,40 (0,90-2,16, p=0,132)
	SNAIL+		
T- Stadium	T1,2	2,24 (1,40-3,60, p=0,001)	1,99 (1,15-3,43, p=0,013)
	T3,4		
N-Stadium	N0	1,25 (0,75-2,07, p=0,395)	
	N1,2,3		
M-Stadium	M0	3,02 (1,39-6,56, p=0,005)	3,05 (1,36-6,87, p=0,007)
	M1		
UICC-Stadium	UICC I,II	3,04 (1,57-5,88, p=0,001)	1,27 (0,55-2,90, p=0,577)
	UICC III,IV		
Geschlecht	männlich	0,98 (0,63-1,53, p=0,933)	
	weiblich		
Alter	≤ 61 J.	0,99 (0,68-1,45, p=0,955)	
	> 61 J.		
p16-Status	positiv	4,52 (2,26-9,04, p<0,001)	2,81 (1,28-6,18, p=0,010)
	negativ		
Alkohol	Ja	0,41 (0,27-0,65, p<0,001)	0,61 (0,38-0,97, p=0,036)
	Nein		
Nikotin	Ja	0,55 (0,27-1,14, p=0,109)	
	Nein		

Appendix 7 - Univariate und Multivariate Cox-Regression in HNSCC mit Radiotherapie nach LSD1 und SNAIL Expression

Lediglich jene Charakteristika, welche in der univariaten Regression einen signifikanten Unterschied zeigten, wurden in der multivariaten Analyse berücksichtigt. Geringfügige Unterschiede der Ergebnisse der univariaten Analyse im Vergleich zu Tabelle 14 kommen durch Herausfallen einzelner Patienten, von denen nicht alle, in der multivariaten Analyse inkludierten Charakteristika bekannt sind, zustande.

		Univariate HR (95% -Konf., p=)	Multivariate HR (95%- Konf., p=)
LSD1- und SNAIL- Expression	LSD1- und SNAIL-	1,95 (1,11-3,42, p=0,021)	1,80 (1,02-3,19, p=0,044)
	LSD1+ und SNAIL+		
T- Stadium	T1,2	2,29 (1,41-3,70, p=0,001)	2,07 (1,18-3,63, p=0,011)
	T3,4		
N-Stadium	N0	1,25 (0,75-2,07, p=0,395)	
	N1,2,3		
M-Stadium	M0	3,02 (1,39-6,58, p=0,005)	3,27 (1,44-7,44, p=0,005)
	M1		
UICC-Stadium	UICC I,II	2,94 (1,52-5,70, p=0,001)	1,23 (0,53-2,87, p=0,627)
	UICC III,IV		
Geschlecht	männlich	0,98 (0,63-1,53, p=0,933)	
	weiblich		
Alter	≤ 61 J.	0,99 (0,68-1,45, p=0,955)	
	> 61 J.		
p16-Status	positiv	4,40 (2,20-8,79, p<0,001)	2,78 (1,26-6,13, p=0,011)
	negativ		
Alkohol	Ja	0,41 (0,26-0,65, p<0,001)	0,62 (0,39-0,99, p=0,045)
	Nein		
Nikotin	Ja	0,55 (0,27-1,14, p=0,109)	
	Nein		

Appendix 8 - Ethikvotum



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Herrn
Dr. med. Idel
Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde

im Hause

per Fax vorab: 500-42014

nachrichtlich:

Frau Prof. Dr. Wollenberg
Direktorin der Klinik für HNO

Ethik-Kommission

Vorsitzender:
Herr Prof. Dr. med. Alexander Katalinic
Universität zu Lübeck
Stellv. Vorsitzender:
Herr Prof. Dr. med. Frank Gieseler
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

Sachbearbeitung: Frau Janine Erdmann
Tel.: +49 451 3101 1008
Fax: +49 451 3101 1024

ethikkommission@uni-luebeck.de

Aktenzeichen: 16-277

Datum: 08. November 2016

Sitzung der Ethik-Kommission am 03. November 2016**Antragsteller: Herr Dr. Idel**

Titel: Identifizierung und Charakterisierung von tumorspezifischen und tumorassoziierten Mutationen/Regulationsanomalien von Karzinomen der Luft- und Speisewege sowie deren Vorläuferläsionen zur Entwicklung neuer Diagnostik- und Therapieansätze. Retrospektiver Teil

Sehr geehrter Herr Dr. Idel,
der Antrag wurde unter berufsethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und berufsrechtlichen Gesichtspunkten geprüft.

Die Kommission hat nach der Berücksichtigung folgender **Hinweise** keine Bedenken: Im Studienprotokoll ist der Zeitraum festzulegen, aus dem die „historischen“ Proben stammen und ihre Anzahl ist zu konkretisieren. Der Anonymisierungsprozess ist genauer darzustellen. Eine geschlechterdifferente Auswertung sollte erfolgen.

Bei Änderung des Studiendesigns sollte der Antrag erneut vorgelegt werden.

Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, ist die Kommission umgehend zu benachrichtigen.

Die Deklaration von Helsinki in der aktuellen Fassung fordert in § 35 dazu auf, jedes medizinische Forschungsvorhaben mit Menschen zu registrieren. Daher empfiehlt die Kommission grundsätzlich die Studienregistrierung in einem öffentlichen Register (z.B. unter www.ctrks.de). Die ärztliche und juristische Verantwortung des Studienleiters und der an der Studie teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß

A. Katalinic
Prof. Dr. med. Alexander Katalinic
Vorsitzender

Herr Prof. Dr. Katalinic (Soz.med. u. Epidemiologie, Vorsitzender)
Hr. Prof. Dr. Gieseler (Medizinische Klinik I, Stellv. Vorsitzender)
Hr. PD Dr. Bausch (Chirurgie)
Hr. Prof. Dr. Borck (Medizingeschichte u. Wissenschaftsforschung)
 Fr. Farries (Amtsgericht Eutin)
 Fr. PD Dr. Jauch-Chara (Psychiatrie)
Hr. PD Dr. Lauten (Kinder- u. Jugendmedizin)

Frau Martini (Caritas)
 Hr. Prof. Dr. Moser (Neurologie)
 Hr. Prof. Dr. Raasch (Pharmakologie)
Hr. Prof. Dr. Rehmann-Sutter (MGWF)
Hr. Schneider (Landgericht Lübeck)
 Fr. Prof. em. Dr. Schrader (Plastische Chirurgie)
 Hr. Dr. Vonthein (Med. Biometrie u. Statistik)
Fr. Prof. Dr. Zühlke (Humangenetik)

9 Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei all jenen bedanken, die zu der Entstehung dieser Arbeit beigetragen und mich währenddessen unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. rer. nat. Jutta Kirfel, meiner Doktormutter, für die Überlassung des Dissertationsthemas, die Betreuung dieser Arbeit, sowie das zugewandte und konstruktive Mentoring.

Ich danke meinem Ko-Betreuer „auf den letzten Metern“ Herrn PD Dr. med. Christian Idel für anregende Gespräche und hilfreichen Input bei der Interpretation der Ergebnisse.

Mein Dank gilt außerdem der gesamten AG Kirfel, insbesondere Maryam Rezainia, Dr. rer. hum. biol. Pamela Lazar-Karsten sowie Dr. rer. nat. Helen Pasternack, für ihre Unterstützung in schwierigen Momenten im Labor. Besonders hervorheben möchte ich an dieser Stelle Dr. rer. nat. Anna-Lena Lemster, der ich für Beistand am Schreibtisch und der Laborbank sowie ein offenes Ohr, wann immer es gebraucht wurde herzlich danke.

Ebenfalls danke ich Eva Dreyer für die Durchführung der immunhistochemischen Färbungen.

Bei Dr. med. Luise Klapper und Dr. med. Tobias Jagomast bedanke ich mich für die Einarbeitung in die Auswertung der Gewebeschnitte.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. med. Julika Ribbat-Idel für die Supervision der Auswertung und die Zusammenarbeit bei der gemeinsamen Publikation.

Bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern sowie meinen Mitdoktoranden am Institut für Pathologie der Universität zu Lübeck bedanke ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ich danke zudem der Forschungskommission Medizin der Universität zu Lübeck für die Unterstützung dieses Projektes im Rahmen des Promotionsstipendiums „Lübecker Exzellenzmedizin“.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meiner Freundin für die Unterstützung, Aufmunterung und Geduld in den letzten Jahren.

10 Lebenslauf

Schule und Studium:

2004 - 2008	Grundschule Amelinghausen
2008 - 2013	Gymnasium Wilhelm-Raabe-Schule, Lüneburg
2013 - 2014	Bolingbrook High School in Illinois, USA
2014 - 2017	Gymnasium Wilhelm-Raabe-Schule, Lüneburg (Abitur)
2017 - 2024	Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
2021 - 2025	Doktorand am Institut für Pathologie des UKSH, Lübeck, gefördert durch das Promotionsstipendium „Lübecker Exzellenzmedizin“ der Universität zu Lübeck

11 Publikation

Ein Teil der Ergebnisse dieser Arbeit wurden im Mai 2022 veröffentlicht:

Bottner J, Ribbat-Idel J, Klapper L, Jagomast T, Lemster AL, Perner S, Idel C, Kirfel J. Elevated LSD1 and SNAIL Expression Indicate Poor Prognosis in Hypopharynx Carcinoma. *Int J Mol Sci.* 3. Mai 2022;23(9):5075.

Des Weiteren wurde ein Teil der Daten im Juni 2022 auf der 105. Jahrestagung der Gesellschaft für Pathologie im Rahmen des wissenschaftlichen Hauptprogrammes unter dem Titel „*Hohe LSD1 und SNAIL Expression korrelieren mit einer schlechteren Prognose in Hypopharynxkarzinomen*“ (Programmpunkt DGP07.04, Vortragender: **Justus Bottner**) vorgetragen.

Weitere Publikationen:

Alnuaimi AR, **Bottner J**, Nair VA, Ali N, Alnakhli R, Dreyer E, Talaat IM, Busch H, Perner S, Kirfel J, Hamoudi R, Abdel-Rahman WM. Immunohistochemical Expression Analysis of Caldesmon Isoforms in Colorectal Carcinoma Reveals Interesting Correlations with Tumor Characteristics. *Int J Mol Sci.* 23. Januar 2023;24(3):2275.

Lemster AL, Weingart A, **Bottner J**, Perner S, Sailer V, Offermann A, Kirfel J. Elevated PSPC1 and KDM5C expression indicates poor prognosis in prostate cancer. *Hum Pathol.* August 2023;138:1–11.