

Technische Universität München

Hals-Nasen-Ohrenklinik und Poliklinik

Klinikum rechts der Isar

Einfluss des AurkA Phe₃₁Ile-Polymorphismus auf das Ansprechen von Cetuximab bei HNSCC Patienten

Julia Theresa Muth

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzende/-r: Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Prüfende/-r der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. Anja C. Pickhard
2. apl. Prof. Dr. Philipp J. Jost

Die Dissertation wurde am 27.01.2020 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.08.2020 angenommen.

Gewidmet meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	6
2	Einleitung	10
2.1	Das Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches	10
2.1.1	Begriffserklärung	10
2.1.2	Epidemiologie	10
2.1.3	Klassifikation	11
2.1.4	Ätiologie	13
2.1.5	Pathologie	14
2.1.6	Molekularpathologie	14
2.1.7	Therapie	16
2.1.8	Prognose	19
2.2	Molekulare Grundlagen	21
2.2.1	Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)	21
2.2.2	Cetuximab (Erbix®)	22
2.2.3	Aurora-Kinasen	24
2.2.3.1	Aurora-Kinase A	26
2.2.3.2	Aurora-Kinase B	29
2.2.4	Histon H3	30
2.2.5	Survivin	32
2.2.6	Protein-Kinase B (Akt)	33
2.3	Zielsetzung der Arbeit	36
3	Material und Methoden	37
3.1	Material	37
3.1.1	Patientenkollektiv	37
3.1.2	Zelllinien	38
3.1.3	Medien und Supplemente für die Zellkultur	39
3.1.4	Inhibitoren	39
3.1.5	Primärantikörper (Western-Blot, WB)	39
3.1.6	Sekundärantikörper	40
3.1.7	Antikörper (Immunhistochemie)	40
3.1.8	Reagenzien und Enzyme	40
3.1.9	Gemischte Reagenzien, Puffer und Gele	42
3.1.10	Geräte	43

3.1.11 Verbrauchsmaterialien	45
3.1.12 Computersoftware	45
3.2 Methoden	46
3.2.1 Experimentelle, molekularbiologische Methoden	46
3.2.1.1 DNA-Isolierung aus FFPE-Material	46
3.2.1.2 Real-Time semiquantitative Polymerase Chain Reaction (PCR)	46
3.2.1.3 Apol-Restriktions-Verdau	48
3.2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese	48
3.2.1.5 Sequenzierung	49
3.2.1.6 Immunhistochemie	49
3.2.2 Experimentelle, zellbiologische Methoden	51
3.2.2.1 Zellkultur	51
3.2.2.2 Einfrieren der Zellen	51
3.2.2.3 Auftauen der Zellen	51
3.2.2.4 Splitten der Zellen und Mediumwechsel	52
3.2.2.5 Crystal-Violett Proliferations-Assay	52
3.2.2.6 Colony-Formations-Assay	54
3.2.2.7 Proteinisolierung	54
3.2.2.8 Bradford-Assay	54
3.2.2.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	55
3.2.2.10 Western-Blot: Semidry-Blot Methode	56
3.2.2.11 Immundetektion	57
3.2.2.12 Durchflusszytometrie (FACS)	58
3.2.3 Statistische Methoden	58
3.2.3.1 Wilcoxon-Mann-Whitney-Test	58
3.2.3.2 Korrelationsanalyse	59
3.2.3.3 Kreuz-Tabellen	59
3.2.3.4 Kaplan-Meier Methode und Log-Rank-Test	59
3.2.3.5 Cox-Regressions-Modell	60
3.2.3.6 Ungepaarter t-Test	60
4 Ergebnisse	61
4.1 Charakterisierung des Patientenkollektivs	61
4.2 Experimentelle Auswertung	62
4.2.1 Aurora-Kinase A Polymorphismus	62
4.2.2 Crystal-Violett Proliferations-Assay	64

4.2.3	Colony-Formations-Assay	70
4.2.4	Western-Blot: Semidry-Blot Methode	75
4.2.5	Durchflusszytometrie (FACS)	77
4.3	Auswertung der Immunhistochemie	78
4.4	Statistische Auswertung	80
4.4.1	Wilcoxon-Mann-Whitney-Test	80
4.4.2	Korrelationsanalyse	80
4.4.3	Vier-Felder-Tafeln	81
4.4.4	Überlebenskurven	83
4.4.5	Cox-Regressions-Modell	91
5	Diskussion	93
5.1	Diskussion der Methoden	94
5.1.1	Ermittlung des Aurora-Kinase A Polymorphismus	94
5.1.2	Immunhistochemie	94
5.1.3	Crystal-Violett-Assay	95
5.1.4	Colony-Formations-Assay	96
5.2	Diskussion des Kollektivs	97
5.3	Vergleich der Ergebnisse <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	98
5.3.1	Vergleich der Expression von Aurora-Kinasen, p-Akt Ser473 und Survivin	98
5.3.2	Zusammenhang zwischen AurkA-Polymorphismus und Aneuploidie	99
5.3.3	Einfluss des HPV auf das Gesamtüberleben	100
5.3.4	Einfluss des AurkA-Polymorphismus auf das Gesamtüberleben	101
5.3.5	Vergleich Monotherapie mit Kombinationstherapie	104
6	Ausblick	106
7	Zusammenfassung	107
8	Anhang	108
8.1	Abbildungsverzeichnis	108
8.2	Tabellenverzeichnis	111
8.3	Literaturverzeichnis	113
8.4	Ergebnisübersicht - Anhang	132
8.4.1	Spearman-Korrelation	132
8.4.2	Western-Blot: Semidry-Blot Methode	133
9	Danksagung	134

1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
5-FU	5-Fluoruracil
Abb.	Abbildung
Akt	Protein-Kinase B
APC	Adenomatous polyposis coli
APC/C	Anaphase promoting complex/cyclosome
AR	Amphiregulin
AurkA	Aurora-Kinase A
BAD	Bcl2-associated agonist of cell death
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
BIR	Baculovirus IAP repeat
bp	Basenpaare
BRAF	Rat Fibrosarcoma Protein B
BSA	Bovine Serum Albumin
BTAK	Breast tumor amplified kinase
BTC	Betacellulin
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
CA	Kalifornien
ca.	circa
CAMK	Calmodulin-Dependent-Protein-Kinase
Cdh1	Cadherin 1
Cis	Carcinoma in situ
cm	Zentimeter
CPC	Chromosomalen Passenger Komplexes
ctrl	Kontrolle
CTx	Chemotherapie
dest.	destilliert
DNA	Deoxyribonucleic acid

DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
EBV	Epstein-Barr-Virus
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EPR	Epiregulin
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FBS	Fetales Kälberserum
FFPE	Formalin-fixed, paraffin-embedded
FOXO	Forkhead Box O1
GSK3	Glycogen-Synthase-Kinase-3
HATs	Histon-Acetyltransferasen
HB-EGF	Heparin-binding EGF
HBXIP	Hepatitis B X-interacting protein
HDACs	Histon-Deacetylasen
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma
HPV	Humanes Papillomavirus
IAP	Inhibitor of apoptosis protein
Ile	Isoleucin
INCENP	Inner centromere protein
IRS	Immunreaktiver Score
kDa	Kilodalton
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Protein
M	Molar
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MEK	Mitogen/extracellular signal-regulated kinase
µg	Mikrogramm

mg	Milligramm
μM	Mikromolar
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mTOR	Mammalian target of Rapamycin
nm	Nanometer
ND	Neck dissection
NRG	Neuregulin
Op	Operation
OS	Overall survival
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDK1	3-Phosphoinositide dependent kinase
PH	Pleckstrin-Homologie
Phe	Phenylalanin
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP2	Phosphoinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphoinositol-3,4,5-triphosphat
PKC	Protein-Kinase C
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP	Percentage points
PP1	Proteinphosphatase 1
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAF	Rat Fibrosarcoma Protein
RAS	Rat Sarcoma Protein
RCTx	Radiochemotherapie
RING	Really Interesting New Gene
RNA	Ribonucleic acid
rpm	revolutions per minute

RTx	Radiotherapie
Ser	Serin
SI	Staining intensity
SNSCC	Sinonasal squamous cell cancer
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N'N'-Tetramethylethyldiamin
TGF α	Transforming Growth Factor- α
Thr288	Threonin 288
TPX2	Target protein für Xenopus kinesin-like protein 2
UICC	Union internationale contre le cancer
vs.	versus
WHO	World Health Organization
wt	Wildtyp
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein

2 Einleitung

2.1 Das Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches

2.1.1 Begriffserklärung

In dieser Arbeit werden Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches untersucht. Unter dem Begriff Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches (head and neck squamous cell cancer, HNSCC) im eigentlichen Sinne werden Karzinome der Mundhöhle, des Larynx, des Hypo- und des Oropharynx zusammengefasst (Hunter et al., 2005). Daneben umfassen die Plattenepithelkarzinome der Nasenhaut- und Nasennebenhöhlen (sinonasal squamous cell cancer, SNSCC) Karzinome der Nasenhaupthöhle, der Kiefer-, Keilbein- und Stirnhöhlen, sowie der Siebbeinzellen.

2.1.2 Epidemiologie

Das Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches ist der sechsthäufigste maligne Tumor weltweit und ist mit 90 % die häufigste Tumorentität unter den Kopf-Hals-Tumoren (Hunt et al., 2014; Hunter et al., 2005; V. Patel et al., 2001). Es steht auf Platz sieben der tumorabhängigen Todesursachen (Ferlay et al., 2013). Das Erkrankungsalter liegt im Mittel bei 63 Jahren (Ragin et al., 2007).

Jährlich kommt es zu ca. 630.000 HNSCC-Neuerkrankungen weltweit, von denen ca. 350.000 letal enden (Ferlay et al., 2010). In den USA belaufen sich die Zahlen der Neuerkrankungen auf etwa 60.000, in Europa auf ca. 250.000 jährlich, in Deutschland sind es jährlich etwa 13.000 Neuerkrankungen (Dok & Nuyts, 2016; Robert Koch-Institut, 2017; Siegel et al., 2018). Dabei sind Männer etwa viermal so häufig betroffen wie Frauen (Siegel et al., 2018). Trotz großer Fortschritte in der Chirurgie und adjuvanten Behandlung bleibt das HNSCC eine schwerwiegende Erkrankung (Han & Von Hoff, 2006). In den letzten 30 Jahren konnte die 5-Jahres-Überlebensrate nicht wesentlich verbessert werden (Hoellein et al., 2011). Sie beträgt derzeit weiterhin nur etwa 50-60 % (Hoellein et al., 2011; Jemal et al., 2010).

Am häufigsten tritt das HNSCC im Bereich der Mundhöhle auf, gefolgt von Oropharynx, Larynx und Pharynx. In den letzten zwanzig Jahren zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Karzinome im Oropharynx- und Mundhöhlenbereich, besonders bei jungen Erwachsenen, wobei die Inzidenz der Larynxkarzinome gleichblieb bzw. sogar leicht abnahm (Descamps et al., 2016). Wie sich weltweit beobachten lässt, sind Männer häufiger betroffen als Frauen,

jedoch ist dieser geschlechtsspezifische Unterschied regressiv (Ragin et al., 2007). Des Weiteren bestehen deutliche regionale Unterschiede in der Verteilung des HNSCC. So werden in der afroamerikanischen Bevölkerung höhere Inzidenzen beschrieben als beispielweise bei Kaukasiern (Ragin et al., 2007).

2.1.3 Klassifikation

Die TNM-Klassifikation ist eine international verwendete Einteilung des Ausmaßes einer Tumorerkrankung und ist ein Hauptmarker zur Einschätzung der Prognose von Patienten (Gospodarowicz et al., 2004). Die Kriterien zur Tumoreinschätzung wurden von der International Union Against Cancer (UICC) definiert (Gospodarowicz et al., 2004). Die Einteilung besteht aus T, der Ausdehnung des Primarius, aus dem Befall der regionalen Lymphknoten als N und dem Vorhandensein von Fernmetastasen als M. Zusätzlich kann die Malignität eines Tumors anhand des histopathologischen Gradings als G angegeben und das Ausmaß eines Residualtumors nach Therapie durch R vermerkt werden. Die Einteilung ist entscheidend für das weitere therapeutische Vorgehen und ist prognostisch relevant.

Mittels Vorsilben wird der Zeitpunkt der Klassifizierung angegeben. Das Präfix „c“ beschreibt den klinischen Befund. Als Basis dient hierzu der palpatorische, radiologische, sonographische oder endoskopische Befund (Reiß, 2009). Das Präfix „p“ beschreibt die pathologische, postoperative Einteilung in der TNM-Klassifikation. Durch makroskopische sowie histopathologische Befunde des Resektionspräparates bzw. der explorierten Lymphknoten wird die klinische Einteilung ergänzt (Reiß, 2009).

Bei Kopf-Hals-Tumoren wird das T-Stadium je nach Lokalisationen unterschiedlich eingeteilt, wobei das N-Stadium für alle Tumorlokalisationen außer dem Nasopharynxkarzinom gleich ist. Das N-Stadium bezieht sich dabei auf Metastasierung in die regionären Halslymphknoten. Auch das M-Stadium, sowie R- und G-Faktor werden bei allen Lokalisationen des Kopf-Hals-Bereiches einheitlich klassifiziert. In Tab. 1 ist die TNM-Klassifikation der 7. Auflage aufgeführt (Sobin et al., 2010).

pT-Stadium	
pTX	Keine histologische Beurteilung des Primärtumors möglich
pTis	Carcinoma in situ
pT0	Kein histologischer Anhalt für einen Primärtumor
pT1-4	Zunehmende Größe und/oder lokale Ausdehnung des Primärtumors
pN-Stadium	
pNX	Keine histologische Beurteilung der regionären Lymphknoten möglich
pN0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
pN1	Metastase in solitärem ipsilateralem Lymphknoten, ≤ 3 cm
pN2a	Metastase in solitärem ipsilateralem Lymphknoten, > 3 cm und < 6 cm
pN2b	Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, alle ≤ 6 cm
pN2c	Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, alle ≤ 6 cm
pN3	Metastasen > 6 cm
pM-Stadium	
pMX	Keine histologische Beurteilung der Fernmetastasen möglich
pM0	Histologisch keine Fernmetastasen
pM1	Histologisch gesicherte Fernmetastase(n)
R-Stadium	
RX	Keine Beurteilung des Vorhandenseins eines Residualtumors möglich
R0	Keine Residualtumor
R1	Mikroskopisch nachweisbarer Residualtumor
R2	Makroskopisch nachweisbarer Residualtumor
Grading	
GX	Kein Grading der Differenzierung möglich
G1	Hoch differenziert
G2	Mäßig differenziert
G3	Niedrig differenziert
G4	Entdifferenziert

Tab. 1: TNM-Klassifikation der HNSCC (Sobin et al., 2010)

Die Stadieneinteilung der UICC für Kopf-Hals-Tumore wird für alle Lokalisationen mit Ausnahme des Nasopharynxkarzinoms gleichermaßen vorgenommen. Die Stadieneinteilung wird in Tab. 2 dargestellt.

Stadium	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T1, T2, T3 T3	N1 N0	M0
IV a	T1, T2, T3, T4a T4a	N2 N0, N1	M0 M0
IV b	T4b Jedes T	Jedes N N3	M0 M0
IV c	Jedes T	Jedes N	M1

Tab. 2: Stadieneinteilung der HNSCC (Sobin et al., 2010)

2.1.4 Ätiologie

Die Ursache für die Entstehung eines Kopf-Hals-Karzinoms ist noch nicht im Einzelnen geklärt. Es sind jedoch für das HNSCC mehrere Risikofaktoren bekannt. Neben Alkohol- und Nikotinabusus zählen auch virale Onkogene zu den Risikofaktoren der Kopf-Hals-Tumore (Barnes et al., 2007). So besteht für starke Raucher ein 20-fach erhöhtes Risiko ein Plattenepithelkarzinom zu entwickeln verglichen mit der Normalbevölkerung, für starke Trinker ein 5-fach erhöhtes Risiko (Hunter et al., 2005). Bei der Kombination aus starkem Alkohol-, als auch Tabakkonsum steigt das Erkrankungsrisiko sogar auf das 50-fache und zeigt damit einen synergistischen Effekt (Rodriguez et al., 2004). Mundhöhlenkarzinome werden insbesondere aufgrund der hauptsächlich basischen Bestandteile des Zigarrenrauches induziert.

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass vor allem bei jungen Erwachsenen ein geringer Konsum von Obst und Gemüse mit einer höheren Inzidenz an HNSCC assoziiert ist (Llewellyn et al., 2003; Llewellyn et al., 2004; Mackenzie et al., 2000).

Obwohl die Verwendung von Betelnüssen im südasiatischen Kulturkreis als Heilmittel zahlreicher Krankheiten weit verbreitet ist, wird das Kauen dieser Nüsse aber ebenso als Risikofaktor für HNSCC angesehen (Warnakulasuriya et al., 2002; Zain et al., 1997).

Marihuana ist die zweithäufigste gerauchte Substanz nach Tabak (Stadler et al., 2008). Die Studienlage zu Marihuana-Konsum als Risikofaktor für HNSCC ist bislang uneinheitlich (Hashibe et al., 2002; Hashibe et al., 2005).

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) kann dagegen häufig bei Patienten mit Nasopharynxkarzinom nachgewiesen werden (Pathmanathan et al., 1995). Es konnte gezeigt werden, dass eine

EBV-Infektion ein frühes, evtl. sogar induzierendes Geschehen in der Entstehung von Nasopharynxkarzinomen darstellt (Pathmanathan et al., 1995). Hierbei zeigt sich besonders eine Häufung im asiatischen Lebensraum (Pathmanathan et al., 1995).

Das humane Papillomavirus (HPV) hat ebenfalls onkogenes Potential und kann mittels seiner Onkoproteine E6 und E7 zur Tumorentstehung beitragen (Chung & Gillison, 2009). Obwohl HPV schon lange in vielen Tumorentitäten als Risikofaktor bekannt ist, konnte eine Assoziation bei HNSCC erst vor einigen Jahren gezeigt werden (Michl et al., 2010). Der Nachweis von HPV war vor allem in oralen und oropharyngealen Tumorlokalisationen relevant (Chung & Gillison, 2009; Michl et al., 2010). Hierbei hat allen voran der HPV-Typ 16 eine besondere Bedeutung für die Tumorentstehung (Furniss et al., 2007; Kreimer et al., 2005; Ringstrom et al., 2002). Daneben finden sich in HNSCC gehäuft HPV-Infektionen mit den Hochrisikotypen 18, 31 und 33 (Michaud et al., 2014).

2.1.5 Pathologie

Plattenepithelkarzinome sind maligne Tumore epithelialen Ursprungs und können mit oder ohne Verhornung auftreten. Die makroskopische Wuchsform ist meist endophytisch, knotig und oberflächlich ulzerierend. Seltener lässt sich auch eine exophytisch-papilläre Wucherung beobachten (Böcker & Aigner, 2012).

Liegt eine Verhornung vor, zeigt sich diese mikroskopisch in Form konzentrischer Hornperlen oder als Einzelzellverhornung (Böcker & Aigner, 2012).

Histologisch zeichnen sich Plattenepithelkarzinome durch große, polygonale oder spindelzellige Tumorzellen mit Kernatypien und atypischen Mitosefiguren aus (Böcker & Aigner, 2012). Daraus lassen sich drei Differenzierungsstufen des Tumors ableiten. Je ausgeprägter die Zellkernpleomorphie und mitotische Aktivität, desto niedriger ist die Tumordifferenzierung. Bei einem invasiven Wachstum ist eine Durchbrechung der Basalmembran sowie die Bildung von Tumorzellen und -strängen beobachtbar (Böcker & Aigner, 2012).

2.1.6 Molekularpathologie

Obwohl es sich bei Kopf-Hals-Tumoren in ca. 95 % um Plattenepithelkarzinome handelt, sodass sich diese im Vergleich zu anderen Tumorerkrankungen als relativ homogen präsentieren, weisen sie jedoch auf molekularer Ebene eine hohe Heterogenität auf. Daraus resultieren viele verschiedene Subklassen von HNSCC (Leemans et al., 2011). Das HNSCC ist letztendlich das finale Stadium eines multifaktoriellen Prozesses, der von einer normalen Histologie über eine Hyperplasie, eine Dysplasie bis in ein Carcinoma in situ und schließlich

in ein invasives Karzinom übergeht (Califano et al., 1996; Stadler et al., 2008). Den Prozess der Karzinogenese soll Abbildung 1 noch einmal veranschaulichen.

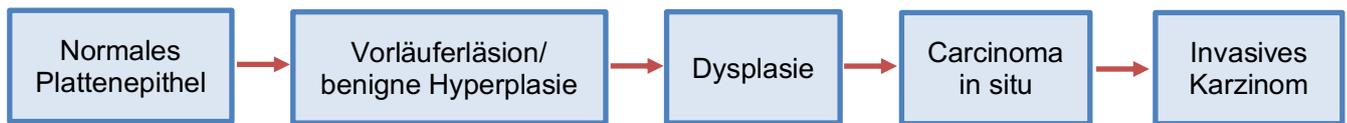


Abb. 1: Modell zur Entstehung eines HNSCC; modifiziert nach Califano, van der Riet et al., 1996

Damit ein Tumor entsteht, muss es bei diesem Prozess zu einer stufenweisen Anhäufung von genetischen Veränderungen gekommen sein (Stadler et al., 2008). Daher ist es von enormer Bedeutung die Molekularpathologie weiter zu erforschen und zu verstehen, um die Erkrankung des einzelnen Patienten und damit auch seine Prognose besser abschätzen zu können.

Eine wichtige Unterscheidung erfolgt in der Ermittlung des jeweiligen HPV-Status. Etwa 70 bis 80 % der HNSCC sind HPV negativ, wobei aber die Zahl der HPV positiven HNSCC-Fälle in den letzten Jahren stark zunimmt (Betioli et al., 2013; Blitzer et al., 2014; Cancer Genome Atlas, 2015; Leemans et al., 2011; Sepiashvili et al., 2015). Es wird angenommen, dass durch verschiedene Mutationen, wie Deletion, Promotormethylierung und Genamplifikation einerseits Tumorsuppressorgene inaktiviert, andererseits Protoonkogene aktiviert werden (Campo-Trapero et al., 2008). Hiervon häufig betroffen sind die Tumorsuppressorgene p16^{INK4a}, p14^{ARF}, das Tumorprotein 53 (p53), sowie das Protoonkogen Cyclin D1 (Campo-Trapero et al., 2008).

HPV positive HNSCC haben laut einer Metaanalyse mit 35,6 % die höchste Prävalenz im Oropharynx (Kreimer et al., 2005). In 90 % der HPV-assoziierten HNSCC lag der Hochrisikotyp HPV-16 vor (Gillison et al., 2000). Es konnte zudem beobachtet werden, dass in HPV positiven Karzinomen p53 sogar meist als Wildtyp vorliegt, jedoch auch hier die p53-Aktivität durch Inaktivierung mittels des viralen Onkogens E6 vermindert ist (Leemans et al., 2011).

Als weiterer wichtiger molekularer Marker hat sich der Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) etabliert. Er ist in etwa 90 % der HNSCC Fälle überexprimiert (Grandis & Tweardy, 1993; Ke et al., 1998; Stadler et al., 2008). Die abnormale Aktivität wird in 10-17 % der HNSCC Fälle durch Genamplifikation verursacht (Freier et al., 2003; Koynova et al., 2005; Sharafinski et al., 2010; Temam et al., 2007). Die EGFR-Expression war in Studien allerdings in den verschiedenen Lokalisationen nicht homogen, sondern in Karzinomen der Mundhöhle und des Oropharynx deutlich höher als bei Larynxkarzinomen (Stadler et al., 2008). Zusätzlich können Mutationen des EGFR auftreten. Eine Mutation, die sich

beobachten lässt, ist eine Deletion in der extrazellulären Bindedomäne des Rezeptors, die EGFR variant III (EGFRvIII), welche ausschließlich im Tumorgewebe vorkommt (Stadler et al., 2008). Aufgrund des Fehlens von Exon 2-7 soll EGFRvIII konsekutiv ligandenunabhängig aktiviert sein (Voldborg et al., 1997). Die Detektionsrate von EGFRvIII in HNSCC ist uneinheitlich, aktuellere Publikationen zeigen eine geringe Prävalenz (Sok et al., 2006; Stadler et al., 2008; Thomas Koch et al., 2017). Es wurden bereits weitere, jedoch äußerst seltene EGFR-Mutationen entdeckt, beispielweise in der Kinasedomäne des EGFR (Lee et al., 2005).

Auch Proteine der nachgeschalteten EGFR-Signalkaskade zeigen Mutationen. Diese sind allerdings weitaus weniger häufig (De Carvalho et al., 2013). So wurde in weiteren Studien an HNSCC-Patienten in 3 % eine das Rat Fibrosarcoma Protein B (BRAF) aktivierende Mutation gefunden. Bei 6 % konnten Genmutationen im Kirsten Rat Sarcoma Protein (KRAS) und in 11 % Mutationen der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) nachgewiesen werden (Qiu et al., 2006; Weber et al., 2003).

2.1.7 Therapie

Aufgrund der Komplexität von Kopf-Hals-Tumoren ist ein multidisziplinäres Vorgehen unerlässlich, um eine hochqualitative Behandlung zu ermöglichen (Ramos et al., 2010). Inzwischen sind mehrere Therapieoptionen für HNSCC etabliert. Hierfür stehen drei Modalitäten zur Verfügung: Die chirurgische Resektion, Strahlentherapie und Chemotherapie, welche in der Regel zu einem therapeutischen Konzept kombiniert eingesetzt werden. Additiv kann eine ergänzende Antikörpertherapie verwendet werden. Welche Therapieform letztendlich verwendet wird, hängt von klinischen sowie pathologischen Parametern der Tumorerkrankung und auch vom Patientenwunsch ab (Reiter et al., 2006).

Nur etwa 40 % der Patienten werden in den frühen Tumorstadien I und II diagnostiziert (Vermorken & Specenier, 2010). Die restlichen 60 % der Patienten stellen sich erst in den Tumorstadien III und IV vor (Vermorken & Specenier, 2010). Im frühen Tumorstadium kann als primäre Therapie die alleinige chirurgische Resektion oder eine primäre Strahlentherapie gewählt werden (Marur & Forastiere, 2016). Hierbei ist es besonders wichtig eine komplette Resektion, also eine so genannte R0-Resektion des Tumorgewebes zu erreichen (Dietz et al., 2014). Dies wird durch eine intraoperative histologische Schnellschnittdiagnostik kontrolliert. Da im Kopf-Hals-Bereich sowohl die Erhaltung der Funktionalität als auch der Versuch einer angemessenen ästhetischen Rekonstruktion für

die Lebensqualität des Patienten entscheidend ist, muss beides in hohem Maß berücksichtigt werden.

Um eine präoperativ festgestellte lymphogene Metastasierung zu therapieren wird eine Neck Dissection (ND) durchgeführt. Sowohl die Ausdehnung des Tumors, wie beispielsweise das Überschreiten der Mittellinie, als auch das Risiko für eine kontralaterale Metastasierung, u.a. bei Karzinomen des Zungengrunds oder des Mundbodens, entscheiden über eine einseitige oder sogar beidseitige Durchführung der ND (Kaschke, 2012). Abhängig vom Befall muss der Umfang der ND erweitert werden. Das Ausmaß der ND wird bereits präoperativ festgelegt.

Diese klassische Standardmethode bei vorhandenen Lymphknotenmetastasen besteht heutzutage aus einer funktionellen ND. Sind weitere benachbarte Strukturen betroffen, wie z.B. Muskulatur, wird eine radikale ND vorgenommen. Hier wird neben der Ausräumung aller Lymphknoten im Level I–V simultan die Entfernung des Musculus sternocleidomastoideus, der Vena jugularis interna und des Nervus accessorius durchgeführt. Möglicherweise müssen zusätzlich auch weitere Teile der Halsmuskulatur (Musculus omohyoideus), Nervengeflechte wie der Plexus cervicalis oder befallene Speicheldrüsen (Glandula submandibularis) mitreseziert werden (Kaschke, 2012).

Bei klinisch unauffälligen Verhältnissen wird eine selektive ND durchgeführt, um mögliche Mikrometastasen zu entdecken. Hierbei wird mindestens eine der sechs Lymphknotenregionen ausgeräumt, nicht lymphatische Strukturen werden erhalten (Kaschke, 2012).

Bei lokal fortgeschrittenen Tumoren (Stadium III-IV) und/oder bei Vorliegen von Lymphknotenmetastasen wird ein multimodales Therapiekonzept mit adjuvanter Strahlentherapie empfohlen (Bernier et al., 2004; Marur & Forastiere, 2016). Eine adjuvante Radiochemotherapie wird bei einem R1-Resektionsstatus oder extrakapsulärem Wachstum der Lymphknotenmetastasen empfohlen (Bernier et al., 2004; Gregoire et al., 2010). Für Tumore im fortgeschrittenen Stadium ist seit einigen Jahren der monoklonale Antikörper Cetuximab (Erbix®[®], Merck) zugelassen. Die erste Studie von Bonner et al. konnte in einem Kollektiv an lokal fortgeschrittenen inoperablen HNSCC-Fällen zeigen, dass durch die Zugabe von Cetuximab zur Strahlentherapie sowohl das Gesamtüberleben, als auch das progressionsfreie Überleben deutlich verbessert werden konnte, verglichen mit einer alleinigen Strahlentherapie (Bonner et al., 2006). Das Nebenwirkungsprofil von Cetuximab ist im Vergleich zur konventionellen Chemotherapie als positiv einzuschätzen (A. N. Patel et al., 2012).

Sollte der Tumor als nicht resektabel eingeschätzt werden, bleibt als primäre Standardbehandlung die alleinige Radiochemotherapie (Gregoire et al., 2010; Ramos et al., 2010).

Eine Induktionschemotherapie, typischerweise gefolgt von einer Strahlentherapie, konnte bei HNSCC bisher in den Studien keine Vorteile zeigen und wird daher nur selten angewendet (T. K. Hoffmann, 2012; Marur & Forastiere, 2016).

Lokalrezidive und/oder Fernmetastasen treten bei 40-60 % der HNSCC-Patienten auf (Chang et al., 2017; Posner et al., 2007; Sacco & Cohen, 2015). Bis zu 40 % der HNSCC-Patienten entwickeln Fernmetastasen, am häufigsten ist hiervon die Lunge betroffen (Young et al., 2015). Nur bei wenigen ist eine erneute Operation oder Strahlentherapie indiziert, die meisten sind nicht kurabel (A. N. Patel et al., 2012). In der palliativen Situation steht neben der alleinigen bestmöglichen Versorgung eine platinhaltige Chemotherapie mit oder ohne Zugabe einer zielgerichteten Antikörpertherapie (Targeted Therapy) zur Verfügung (A. N. Patel et al., 2012; Vermorken & Specenier, 2010). Aktuell zeigen auch neue, jetzt eingesetzte Immun-Checkpoint-Inhibitoren bei fortgeschrittenem Tumorleiden gute Ergebnisse (Bauml et al., 2016; Ferris et al., 2018; Forster & Devlin, 2018; Hochst & Knolle, 2017; Samra et al., 2018). Bei inoperablen Rezidiven, sowie bei Vorliegen von Fernmetastasen konnte die Wirksamkeit von Cetuximab bereits bestätigt werden: In der EXTREME Studie wurde die alleinige Chemotherapie mit Cisplatin und 5-Fluoruracil (5-FU) mit der Kombination aus der platinbasierten Chemotherapie mit Cetuximab verglichen. Das Ergebnis zeigte einen Benefit im medianen Überleben der Kombinationstherapie mit Cetuximab (Licitra et al., 2013; Vermorken et al., 2008). Patienten in schlechtem Allgemeinzustand sollten eine Monochemotherapie mit beispielsweise Methotrexat erhalten (Gregoire et al., 2010).

Trotz dieser spezifischen EGFR-Inhibition mittels Cetuximab konnte die molekular-basierte Therapie bisher jedoch nicht den erhofften Durchbruch erzielen. Ein Grund hierfür ist, dass die Ansprechrate auf eine Cetuximab-Behandlung nur bei ca. 20 % der Patienten liegt (Sharafinski et al., 2010). Zum anderen sind vor allem schwere Hautreaktionen die häufigsten Nebenwirkungen von Cetuximab (Segaert & Van Cutsem, 2005). Akneiforme Eruptionen treten in ca. 15 % der Fälle auf, bei Hitt et al. zeigten sogar 24 % eine Grad 3/4 Hauttoxizität (Bonner et al., 2006; Hitt et al., 2012; Klinghammer et al., 2010). Des Weiteren belaufen sich die Therapiekosten auf ca. 5.000 Euro pro Monat/Patient (Bonner et al., 2006; Klinghammer et al., 2010).

Die Kenntnis von Therapieprädiktoren könnte den Patienten eine belastende Behandlung ersparen, die Kosten-Nutzen-Relation verbessern und bei den ausgewählten Patienten zu einer rational begründeten, frühzeitigen Anwendung der Antikörpertherapie führen.

Bisher konnte lediglich beobachtet werden, dass eine auftretende Hautreaktion auf ein gutes Ansprechen auf eine Cetuximab-Therapie hinweist (Cunningham et al., 2004).

2.1.8 Prognose

Die Prognose von Kopf-Hals-Tumoren ist in erster Linie abhängig von der Lokalisation des Primärtumors, der Stadieneinteilung nach der TNM-Klassifikation und vom Grading des Malignoms (Lehnerdt et al., 2010; Licitra et al., 2004). Bei HNSCC haben Karzinome des Hypopharynx die schlechteste, Karzinome der Mundhöhle, insbesondere der Lippen, die beste Prognose (Reiß, 2009; Wittekindt et al., 2012). Eine besonders wichtige Rolle spielt dabei das Vorhandensein von Fernmetastasen, da diese das mittlere Überleben auf unter ein Jahr senken (Vermorken, 2005). Auch der Operateur ist maßgeblich an der Prognose des Patienten beteiligt: Resektionsgrenzen unter 5 mm gelten ebenso wie eine R1-Resektion als ungünstige prognostische Parameter (Lehnerdt et al., 2010). Das männliche Geschlecht und ein hohes Alter zum Erkrankungszeitpunkt zählen ebenso zu den negativen Prognosefaktoren (Lehnerdt et al., 2010) wie die Hypoxie im Tumorgewebe und die daraus resultierende Azidose, die mit einem aggressiveren Tumorverhalten assoziiert wird (Bose et al., 2013). Bereits viele Studien konnten zeigen, dass die Komorbiditäten eines Patienten einen großen Einfluss auf dessen Prognose haben (Boje, 2014). Im Speziellen gehören dazu Erkrankungen wie Herzinsuffizienz, chronische Lungenerkrankungen, zerebrovaskuläre Erkrankungen, Diabetes mellitus, sowie das peptische Ulkus (Boje, 2014; Zaoui et al., 2016). Neben den patientenbezogenen Faktoren gelten auch die viralen Onkoproteine als Prognosefaktoren. So spielt der HPV-Status mittlerweile eine große Rolle. HPV positive Tumoren zeigen ein besseres Ansprechen auf die Therapie als HPV negative HNSCC und gelten somit als prognostisch günstiger (Lajer & von Buchwald, 2010). Patienten mit HPV positiven Tumoren sind in der Regel auch jünger, oft Nichtraucher und weisen weniger Komorbiditäten auf verglichen mit den typischen HNSCC-Patienten (Ang et al., 2010; Fakhry & Gillison, 2006; Gillison et al., 2008).

Neben den viralen Onkoproteinen beschreiben Lehnerdt et al. weitere molekulare Marker, die für eine Prognoseeinschätzung in Zukunft geeignet sein könnten. So gibt es Studien zum p53-Status, dem Zellzyklusderegulationsprotein p16^{INK4}, sowie zur Überexpression von Cyclin D1 und weiteren Signaltransduktionsmolekülen als potentielle Prognosemarker (Lehnerdt et al., 2010). Die Studienlage zum prognostischen Wert der einzelnen Biomarker

ist allerdings kontrovers (Lehnerdt et al., 2010). Auch die Expression des EGFR zeigt eine mögliche prognostische Relevanz (Bossi et al., 2016). Eine hohe Expression scheint dabei mit einer schlechteren Prognose einherzugehen (Maurizi et al., 1996; D. Patel et al., 2007). Jedoch ist auch hier die Datenlage noch sehr heterogen (Bossi et al., 2016). In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte eine Assoziation von erniedrigtem Gesamtüberleben der Patienten und der Überexpression von Survivin und der phosphorylierten Protein-Kinase B (p-Akt Ser473) beobachtet werden (Pickhard et al., 2014a).

Essentiell für eine individuelle Prognoseeinschätzung ist weiterhin das bessere Verständnis der Molekularpathologie von HNSCC.

2.2 Molekulare Grundlagen

2.2.1 Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)

Der EGF-Rezeptor wurde vor etwa 40 Jahren entdeckt und gehört zu den Rezeptor-Tyrosinkinasen der ErbB-Familie (Cohen, 1983; Sheikh Ali et al., 2008). Das 170 kDalton (kDa) schwere Protein besteht aus einer extrazellulären, einer transmembranösen und einer intrazellulären Domäne (Dhar et al., 2005; Morgan & Grandis, 2009). Insgesamt setzt sich die ErbB-Familie aus vier verschiedenen Proteinen zusammen: ErbB-1 (EGFR, HER1), ErbB-2 (HER2, Neu), ErbB-3 (HER3) und ErbB-4 (HER4) (Hynes et al., 2001). Die Rezeptoren zeigen eine hohe Homogenität ihrer Domänen mit Ausnahme der extrazellulären Bindedomäne (Lindsey & Langhans, 2015; A. N. Patel et al., 2012). Dies ermöglicht die Bindung diverser Liganden, welche zusammengefasst in Abbildung 2 dargestellt sind (Hynes et al., 2001).

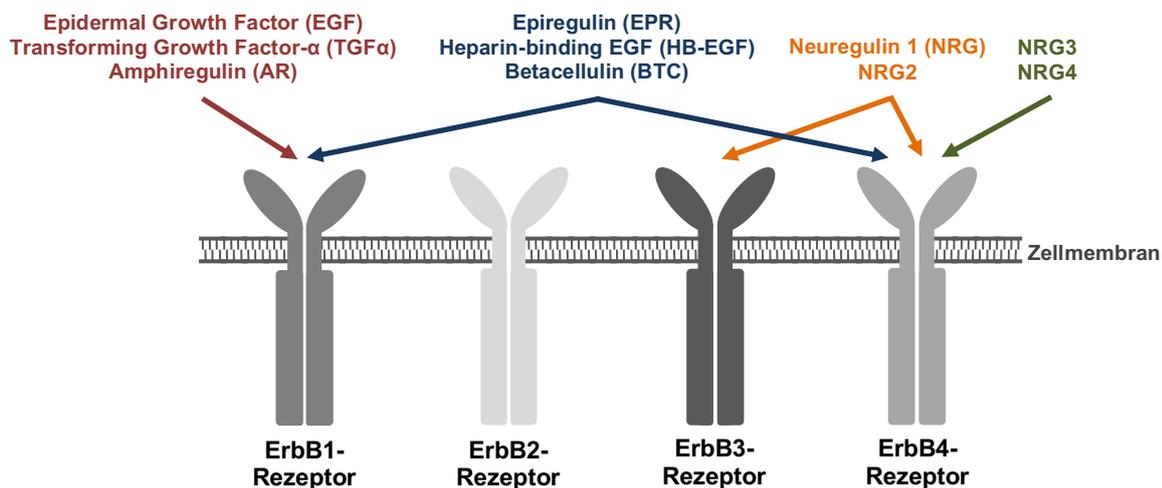


Abb. 2: Schematische Übersicht der Liganden der einzelnen ErbB-Rezeptoren; nach Hynes, Horsch et al., 2001

Bindet ein Ligand an die extrazelluläre Domäne des EGF-Rezeptors, so führt dies zu einer Homo- oder Heterodimerisierung des Rezeptors, was eine intermolekulare Transphosphorylierung der intrazellulären Tyrosinreste zur Folge hat (van der Geer et al., 1994). Dadurch werden katalytisch aktive Zentren der Rezeptoren freigelegt und können so eine Reihe von Signalwegen aktivieren (Reuter et al., 2007). Die Hauptsignalwege, die hierdurch aktiviert werden, sind der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K)/ Protein-Kinase B (Akt) -Signalweg, die RAS/ RAF/ Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) -Kaskade, sowie der Phospholipase C (PLC)/ Protein-Kinase C (PKC)/ Calmodulin-Dependent-Protein-Kinase (CAMK) -Signalweg (Abb. 3) (Choudhary et al., 2016; Morgan & Grandis, 2009). Die Signalwege führen zu einer Änderung der Transkription im Zellkern und beeinflussen so

zentrale zelluläre Funktionen wie Zellwachstum, Differenzierung, sowie Apoptose oder programmierten Zelltod (Dhar et al., 2005).

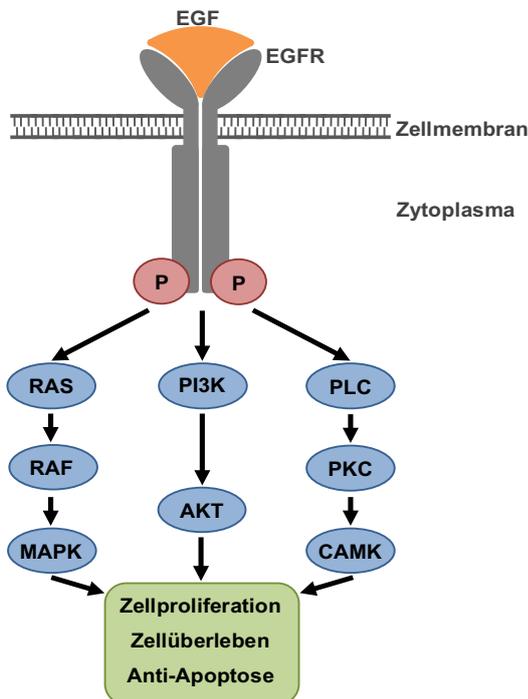


Abb. 3: Schematische Darstellung des EGFR-Signalwegs; nach Choudhary, Rohatgi et al., 2016

Fehlregulationen des EGFR-Signalwegs konnten mit der Entstehung und dem Fortschreiten von Tumorerkrankungen assoziiert werden, dazu gehören Zellproliferation, Angiogenese, Invasion bzw. Metastasierung, sowie Resistenz gegenüber Chemo- und/ oder Strahlentherapie (Diasio & Fourie, 2006). Aufgrund der EGFR-Überexpression und den EGFR-Mutationen in vielen epithelialen Tumoren, wie auch dem HNSCC, spielt der EGF-Rezeptor in der Tumorforschung weiterhin eine wichtige Rolle. Zum weiteren Verständnis der Signalwege und damit neuer therapeutischer Möglichkeiten werden weitere molekulare Untersuchungen von Nöten sein.

2.2.2 Cetuximab (Erbix®)

Cetuximab ist ein chimärer (65 % Mensch und 35 % Maus) monoklonaler IgG1-Antikörper, welcher gegen die extrazelluläre Bindedomäne des EGF-Rezeptors gerichtet ist (Diasio & Fourie, 2006).

Es kommt zur Blockade der Ligandenbindung. Dies führt zu einer Internalisierung und Degradierung des Rezeptors, was eine Herunterregulierung der Expression des EGFR zur Folge hat (Ciardiello & Tortora, 2001; N. Zhang et al., 2009).

Ursprünglich wurde Cetuximab bei der Therapie des Kolonkarzinoms eingesetzt. Mehrere Studien konnten jedoch zeigen, dass Patienten mit einer aktivierenden KRAS-Mutation (ca. 35-45 % der kolorektalen Karzinome) nicht von einer Cetuximab-Gabe profitieren (Bardelli & Siena, 2010). KRAS-Mutationen dienen daher als stärkster negativer Prädiktor für den Erfolg einer Cetuximab-Therapie. Aus diesem Grund wird heutzutage jeder Patient vor einer Cetuximab-Behandlung routinemäßig auf eine KRAS-Mutation untersucht (Bardelli & Siena, 2010).

Da bei HNSCC nur in < 5 % aktivierende KRAS-Mutationen gefunden werden (Bissada et al., 2013; Langer, 2012), scheidet KRAS als geeigneter Prädiktor für das Ansprechen auf Cetuximab bei HNSCC aus.

Es existieren bereits Studien u.a. bei HNSCC-Patienten, welche das Ansprechen auf eine Cetuximab-Therapie bei Vorliegen bzw. Hochregulation der EGFRvIII-Variante und von Amphiregulin untersuchen:

In einer Studie von Tinhofer et al. an HNSCC Patienten wurde bei 17 % eine Expression der EGFRvIII-Variante und bei 45 % eine Hochregulation von Amphiregulin im Tumor detektiert. Die erhöhten Expressionslevel von EGFRvIII bzw. Amphiregulin korrelierten jeweils mit einem verkürzten progressionsfreien Überleben unter der Kombinationstherapie mit Cetuximab und Docetaxel. Die Hochregulation von Amphiregulin zeigte dabei zudem ein signifikant verkürztes Gesamtüberleben (Tinhofer et al., 2011).

In einer anderen Arbeit mit 29 HNSCC-Patienten, die mit Cetuximab- und kombinierter Strahlentherapie behandelt wurden, konnte wiederum keine Assoziation der EGFRvIII-Variante mit dem Therapieansprechen beobachtet werden. EGFRvIII wurde hier bei 20 % der Patienten identifiziert (Smilek et al., 2012). In einer Kohorte von Patienten mit Mundhöhlenplattenepithelkarzinomen wurde die EGFRvIII-Variante jedoch nur in 2 % nachgewiesen (McIntyre et al., 2012).

Da die Ergebnisse zur Korrelation des Ansprechens auf eine Cetuximab-Therapie für die EGFRvIII-Variante und die Amphiregulin-Expression nicht einheitlich sind, werden weitere Untersuchungen gefordert. Andere etablierte Responsemarker für das Ansprechen auf die anti-EGFR-Therapie mit Cetuximab existieren bisher beim HNSCC ebenfalls nicht.

In eigenen Vorarbeiten konnte unsere Arbeitsgruppe nachweisen, dass nur HNSCC-Zelllinien mit homozygoten Phe/Phe Genotyp der Aurora-Kinase A (AurKA) auf die Therapie mit Cetuximab ansprechen. Zelllinien mit dem heterozygoten Aurora-Kinase A Phe₃₁Ile Allel zeigten sich resistent gegenüber einer Cetuximab-Behandlung (Pickhard et al., 2014b).

2.2.3 Aurora-Kinasen

Die Aurora-Kinasen wurden 1995 von David Glover et al. bei Forschungsarbeiten an *Drosophila melanogaster* entdeckt (Glover et al., 1995; Kollareddy et al., 2012). Sie gehören zur Enzymfamilie der Zellzyklus regulierenden Serin-Threonin-Kinasen. Beim Menschen beinhaltet diese Familie von Proteinkinasen drei Mitglieder: Aurora-Kinase A, Aurora-Kinase B und Aurora-Kinase C (Marumoto et al., 2005). Aurora-Kinasen haben eine hoch konservierte C-terminale Region (Aurora-Kinasen A und B zu etwa 70 % identisch), wohingegen der stark divergente N-Terminus für die unterschiedliche Lokalisation und Funktion der Kinasen verantwortlich ist (Hochegger et al., 2013). Die Aktivierung sowohl von Aurora-Kinase A, als auch Aurora-Kinase B wird durch deren Phosphorylierung reguliert, wobei die Autophosphorylierung von entscheidender Bedeutung ist (Andrews et al., 2003). Die Aurora-Kinase A und B spielen eine wichtige Rolle in der Zellteilung, besonders beim Eintritt in die Mitose, bei der Bildung eines funktionsfähigen Spindelapparats aus Mikrotubuli und bei der Vollendung der Zytokinese (Mehra et al., 2013).

Während der Mitose ist die Aurora-Kinase A hauptsächlich am Zentrosom, Aurora-Kinase B dagegen am Kinetochor lokalisiert. Während der Zytokinese sind beide Kinasen von großer Bedeutung und deshalb an der Äquatorialebene zu finden (Nikonova et al., 2013). In der G1-Phase nimmt die Konzentration an aktiver Aurora-Kinase in der Zelle stark ab (Carmena & Earnshaw, 2003). Abbildung 4 soll die Lokalisationen und die Hauptfunktionen der Aurora-Kinasen A und B im Zellzyklus noch einmal schematisch verdeutlichen.

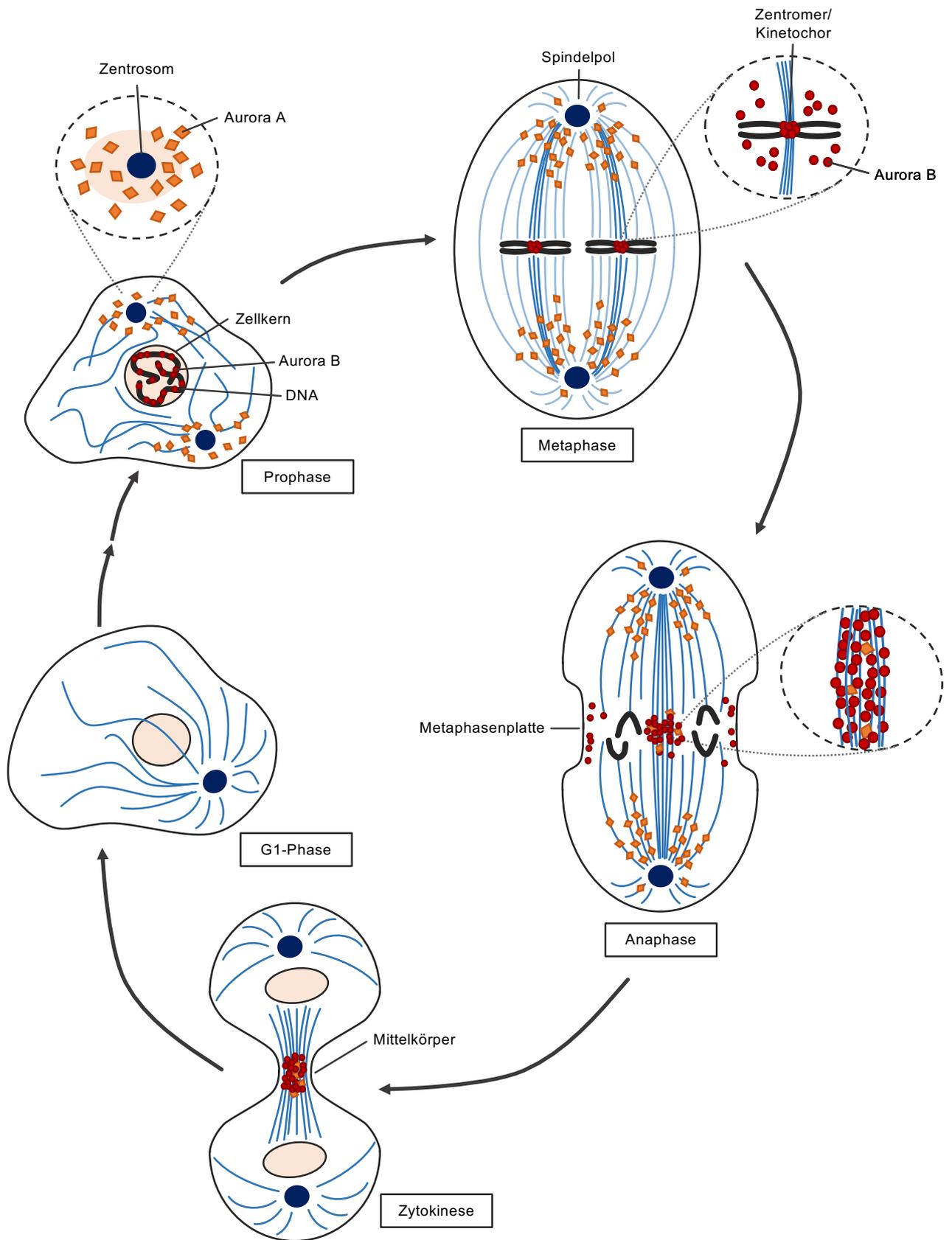


Abb. 4: Lokalisation von Aurora-Kinase A und Aurora-Kinase B im Zellzyklus; modifiziert nach Carmena, Earnshaw, 2003

Der Vorgang der Chromosomentrennung wird von der Mitosespindel ausgeführt und kann nur regelgerecht ablaufen, wenn alle Schwesterchromosomen in der Äquatorialebene korrekt ausgerichtet sind. Die Aurora-Kinasen sind damit wichtige Schlüsselenzyme um eine Fehlverteilung der Chromosomen während der Zellteilung zu verhindern (Andrews et al., 2003). Unter diesem Aspekt ist es daher leicht nachzuvollziehen, dass eine Überexpression der Kinasen zu einer abnormalen Chromosomenzahl und damit zur Aneuploidie führt (Zhou et al., 1998). Aneuploidie zählt zu den am meisten beobachteten Veränderungen in soliden Tumoren und wird auch regelmäßig bei HNSCC in bis zu 90 % gefunden (Bockmuhl & Petersen, 2002; Kops et al., 2005; Reiter et al., 2006).

Zudem können beide, Aurora-Kinase A und Aurora-Kinase B, über die Interaktion mit dem Tumorsuppressor p53 zur Tumorentstehung beitragen (Mehra et al., 2013). Aurora-Kinase A führt über die Phosphorylierung von p53 am Serin 315 zu einer Erhöhung des Mouse double minute 2 (MDM2)-abhängigen Abbaus von p53 (Katayama et al., 2004). Umgekehrt bewirkt die Bindung von p53 an Aurora-Kinase A eine Inhibierung der Aurora-Kinase A-Aktivierung (Chen et al., 2002; Nikonova et al., 2013). Zusätzlich kann auch Aurora-Kinase B p53 an Serin 183, Threonin 211 und Serin 215 phosphorylieren, was zur p53-Degradation durch das Ubiquitin-Proteasom-System führt (Mehra et al., 2013).

Der Fokus dieser Arbeit liegt primär auf den Aurora-Kinasen A und B, da sie für die oben genannten Hauptfunktionen im Zellzyklus maßgeblich zuständig sind und somit im Mittelpunkt der aktuellen Forschung stehen.

Über Aurora-Kinase C ist bislang weitaus weniger bekannt. Aurora-Kinase C hat ähnliche Substrate und Funktionen wie Aurora-Kinase B (Mehra et al., 2013). Es wird vermutet, dass sich beide evtl. sogar gegenseitig ergänzen (Mehra et al., 2013). Aurora-Kinase C wird hauptsächlich in den Hoden exprimiert und ist im Großen und Ganzen auf meiotisch aktive Keimzellen beschränkt (K. T. Yang et al., 2015). Aurora-Kinase C scheint daher vor allem in der Meiose eine wichtige Rolle zu spielen (Hochegger et al., 2013). Aufgrund der vernachlässigbaren Rolle bei der Teilung von somatischen Zellen (Hochegger et al., 2013) wird in dieser Arbeit nicht weiter auf Aurora-Kinase C eingegangen.

2.2.3.1 Aurora-Kinase A

Seit die humane Aurora-Kinase A, ursprünglich BTAK (breast tumor amplified kinase), heute u. a. auch STK15 genannt, in den späten 1990er identifiziert wurde, spielt sie eine wichtige Rolle in der Tumorforschung (Bischoff et al., 1998; Han & Von Hoff, 2006). Es ist das bisher am besten untersuchteste Mitglied der Aurora-Familie (Dar et al., 2010; Nikonova et al.,

2013). Das Protein besteht aus 403 Aminosäuren, woraus ein molekulares Gewicht von 45,8 kDa resultiert (Science, 2016).

Die Aurora-Kinase A akkumuliert an den Spindelpolen während der Prophase, sowie Metaphase und ist dort für die Ausbildung der Mitosespindel verantwortlich (Giet & Prigent, 1999; Gu et al., 2007; Marumoto et al., 2003). Sowohl die Proteinexpression, als auch die Aktivität nehmen ab der späten S-Phase zu mit der höchsten Expression zwischen der G2- und M-Phase (M. Tanaka et al., 2002). Während des gesamten Zellzyklus wird die Kinaseaktivität mittels Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung streng reguliert (Dar et al., 2010). Eine Aktivierung von Aurora-Kinase A erfolgt mit Hilfe des Aktivierungsproteins Targeting protein for Xenopus kinesin-like protein 2 (TPX2) (Eyers et al., 2003). Dabei sorgt die GTPase Ran zur Ablösung von TPX2 vom Importin- α/β -Komplex (Carmena & Earnshaw, 2003). Das frei gewordene TPX2 kann so an Aurora-Kinase A binden und die Kinase zum einen über Loop-Bildung und damit Autophosphorylierung an Threonin 288 (Thr288) und zum anderen durch Schutz vor der inaktivierenden Proteinphosphatase 1 (PP1) aktivieren (Carmena & Earnshaw, 2003).

In Abbildung 5 ist der Aktivierungsvorgang noch einmal zur Veranschaulichung dargestellt.

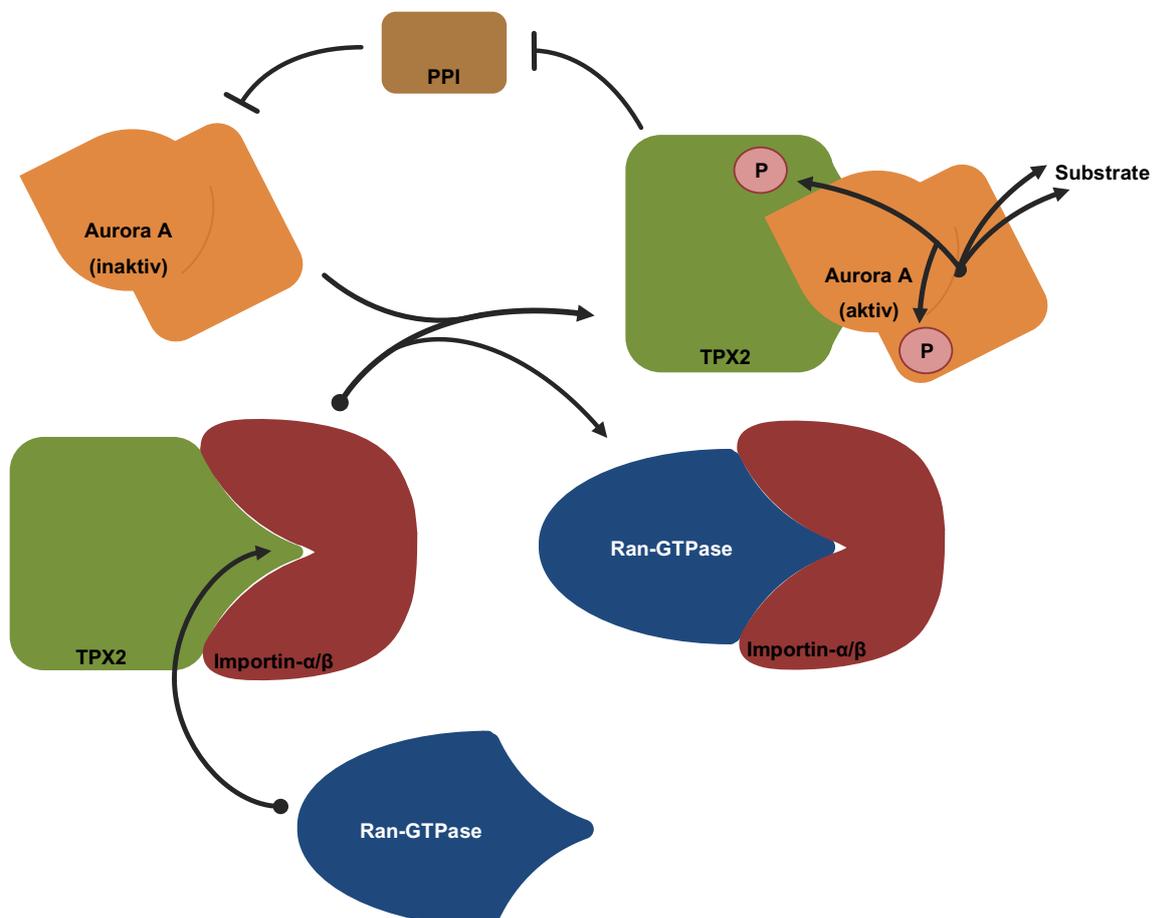


Abb. 5: Schematische Darstellung der Aktivierung von Aurora-Kinase A; modifiziert nach Carmena, Earnshaw, 2003

Die aktivierte Aurora-Kinase A sorgt neben der Ausbildung des Zentrosoms auch für den Eintritt der Zelle in die Mitose, indem sie zur Aktivierung des CDK1/Cyclin-B-Komplexes beiträgt (Nikonova et al., 2013). Während der Zellteilung spielt die Aurora-Kinase A zusammen mit der Aurora-Kinase B eine entscheidende Rolle bei der korrekten Anlagerung der Chromosomen in der Äquatorialebene und bei der Bildung der Mitosespindel (Nikonova et al., 2013). Aurora-Kinase A interagiert mit einer Vielzahl an Substraten, u.a. AKT1, Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B (NFK β), p53 oder Centrosomin (Mehra et al., 2013). Diese komplexen Interaktionen sind jedoch bis heute noch nicht vollständig entschlüsselt (Hochegger et al., 2013). Am Ende der Mitose wird die Aurora-Kinase A durch das Proteasom abgebaut (Fukuda et al., 2005). Die hierfür benötigte Ubiquitinylierung wird durch den Anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C) und seinen Aktivator, Cadherin 1 (Cdh1), vermittelt (Fukuda et al., 2005; Honda et al., 2000; Walter et al., 2000).

Eine Überexpression der Aurora-Kinase A existiert in Geweben mit hohem Mitoseindex, wie z.B. im Thymus oder im Embryo, ebenso konnte sie bereits in vielen Tumorentitäten nachgewiesen werden, unter anderem in Karzinomen von Kolon, Mamma, Magen, Ovar, Nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom, sowie auch in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches (Andrews et al., 2003; Bischoff et al., 1998; Landen et al., 2007; Mehra et al., 2013; Miao et al., 2004; Ogawa et al., 2008; E. Tanaka et al., 2005). Die Überexpression in Tumorgewebe wird meist durch Amplifikation des AurkA-Gens hervorgerufen (Meraldi et al., 2002).

Inzwischen konnte die Amplifikation von Chromosom 20q in einer großen Vielzahl an Tumorentitäten beobachtet werden (Gu et al., 2007; Mazumdar et al., 2009). Dies scheint klinisch mit einer aggressiveren Tumorerkrankung assoziiert zu sein (Reiter et al., 2006; E. Tanaka et al., 2005). Da die humane Aurora-Kinase A auf Chromosom 20q13.2 lokalisiert ist, kann von einem Zusammenhang ausgegangen werden (Lengauer et al., 1998; Marumoto et al., 2005; Sen et al., 1997). Aufgrund der durch die erhöhten Aurora-Kinase A-Expressionslevel verursachten Aneuploidie und erhöhten Aktivität von Downstream-Signalen des EGF-Rezeptors wird das Überleben von Tumorzellen erhöht. Dies intensiviert die Zellmigration und -invasion (Mehra et al., 2013). Mehrere Studien konnten mittlerweile zeigen, dass eine erhöhte Expression von Aurora-Kinase A mit einem verkürzten Gesamt-, sowie progressionsfreien Überleben korreliert (Mehra et al., 2013).

2003 konnte eine Arbeitsgruppe zudem einen genetischen Polymorphismus der Aurora-Kinase A aufzeigen, bei dem auf Codon 91 auf Position 31 die Aminosäure Phenylalanin (Phe) gegen Isoleucin (Ile) ausgetauscht ist (Ewart-Toland et al., 2003). Beim

Ösophaguskarzinom konnte der Phe₃₁Ile-Polymorphismus als Risikofaktor für das Auftreten, als auch für die Progression des Tumors eingestuft werden (Miao et al., 2004). Diese Korrelation konnte in weiteren Studien auch für andere Tumorentitäten, wie z.B. für das Kolon- oder Mammakarzinom aufgezeigt werden (Andrews et al., 2003).

2.2.3.2 Aurora-Kinase B

Aurora-Kinase B ist auf Chromosom 17p13 lokalisiert und kommt mit ihren 344 Aminosäuren auf ein Molekulargewicht von 39,3 kDa (Science, 2016). Aurora-Kinase B trägt als Protein des Chromosomalen Passenger Komplexes (CPC) zur korrekten Chromosomentrennung während der Mitose bei (Hauf et al., 2003). Der Komplex wird durch die Proteine Survivin, Borealin und Inner centromere protein (INCENP) vervollständigt und ist notwendig, um die Autophosphorylierung und somit die Aktivierung der Kinase einzuleiten (Dar et al., 2010). *In vitro* wird nach der Komplexbildung INCENP von Aurora-Kinase B direkt phosphoryliert, was durch ein positives Feedback wiederum mittels Autophosphorylierung die Kinase aktiviert (Dar et al., 2010). Abbildung 6 soll die Aktivierung von Aurora-Kinase B noch einmal schematisch darstellen.

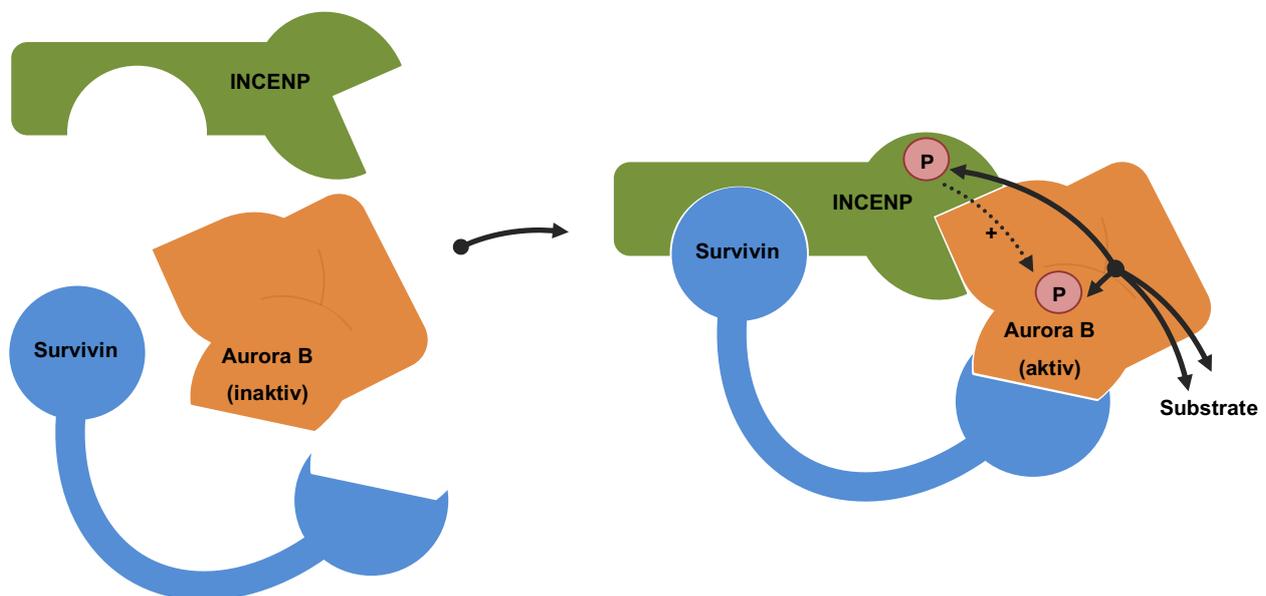


Abb. 6: Schematische Darstellung der Aktivierung von Aurora B; nach Carmena, Earnshaw, 2003

Aurora-Kinase B ist von der Prophase bis zum Übergang von Metaphase zu Anaphase am Kinetochor lokalisiert woraufhin sie sich während der Anaphase an die Mikrotubuli in der Mittelzone der Spindel verlagert und sich letztendlich im Mittelkörper während der Zytokinese anreichert (Kitagawa & Lee, 2015). Aurora-Kinase B akkumuliert beginnend in der G2-Phase bis zur maximalen Expression während der Metaphase (Dar et al., 2010).

Die Hauptaufgabe der Aurora-Kinase B besteht in der richtigen Ausrichtung der Chromosomen und der korrekten Anhaftung der Mikrotubuli des Spindelapparates am Kinetochor ausgehend von den jeweils gegenüberliegenden Spindelpolen (Hauf et al., 2003; Hohegger et al., 2013). Die Chromosomentrennung muss exakt reguliert sein, da es ansonsten zu fehlerhaften Verbindungen der Mikrotubuli und so zur Fehlverteilung der Chromosomen kommt. Bereits 1969 konnten Nicklas et al. zeigen, dass die Spannung am Zentromer, welche durch den Zug der Mitosespindel am Kinetochor entsteht, entscheidend für die korrekte Verbindung von Mitosespindel und Chromosom ist (Nicklas & Koch, 1969; Nicklas & Ward, 1994). Es wird angenommen, dass die Aurora-Kinase B bei mangelnder Spannung aufgrund fehlerhafter Verknüpfungen Substrate am Kinetochor phosphoryliert und somit falsche Anhaftungen der Mitosespindel destabilisiert, wodurch eine inkorrekte Chromosomentrennung verhindert wird (Lampson & Cheeseman, 2011). Der genaue Vorgang der Erkennung von falschen Verbindungen durch Aurora-Kinase B ist jedoch bis heute unklar. Erst wenn alle Chromosomen richtig orientiert sind, kann die Mitose voranschreiten (Carmena & Earnshaw, 2003).

Für HNSCC konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Aurora-Kinase B Expression mit einem schlecht differenzierten Phänotyp, vermehrten multinukleären Zellen, Lymphknotenmetastasen und Zellproliferation einhergeht (Mehra et al., 2013). Zudem ist eine Überexpression mit einem schlechteren Outcome bei Kolonkarzinomen, anaplastischem Schilddrüsenkarzinom und bei Glioblastomen assoziiert (Mehra et al., 2013).

2.2.4 Histon H3

Histon H3 gehört neben Histon H1, H2A, H2B und Histon H4 zur Familie der hoch konservierten basischen Histon-Proteine (Sawicka & Seiser, 2012). Je zwei der Histon-Proteine H2A, H2B, H3 und H4 bilden in eukaryotischen Zellen ein Oktamer (H3/H3/H4/H4-Tetramer und zwei H2A/H2B-Dimere), um welches 147 Basenpaare des DNA-Strangs linksgängig gewickelt sind (Sawicka & Seiser, 2012). Im Histonoktamer liegen H3 und H4 zentral, die etwas größeren H2A und H2B peripher. Diese Einheit bildet zusammen den Nukleosomenkern (Core Partikel) (Luger et al., 1997). Die Interaktion zwischen DNA und den Histon-Proteinen ist sehr komplex und lässt sich am ehesten durch elektrostatische Wechselwirkungen der negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA und positiv geladenen Aminosäuren der Histone erklären (Mahlknecht & Hoelzer, 2000). Die aufeinanderfolgenden Core Partikel lagern sich zu übergeordneten Proteinstrukturen zusammen, stabilisiert durch das sogenannte „Linker“ Histon H1 (Luger et al., 1997). Das

Nukleosom, bestehend aus Nukleosomenkern, DNA-Verbindungsstück (Linker-DNA) und Histon H1, stellt die erste Verpackungsstufe der DNA im Zellkern dar und bestimmt deren Zugänglichkeit (Luger et al., 1997). Histon-Proteine bestehen aus einer globulären Hauptdomäne, welche die Interaktion der Histonproteine untereinander vermittelt, sowie aus einem langen, flexiblen N-terminalen Ende, das aus dem Nukleosomenkern herausragt (Sawicka & Seiser, 2012). Die N-terminalen Enden können durch eine Vielzahl posttranslationaler Modifikationen verändert werden (Grant, 2001). Dazu gehören u.a. Methyl- bzw. Acetylierung an den Aminosäuren Lysin und Arginin, Phosphorylierung an Serin oder Threonin, sowie Ubiquitinylierung (Kouzarides, 2007; Mersfelder & Parthun, 2006). Diese Veränderungen sind an der Regulation einer Vielzahl von biologischen Prozessen beteiligt, u.a. an der Transkription und DNA-Replikationsreparatur (Dawson & Kouzarides, 2012; Kouzarides, 2007). Folglich können abnormale Expressionslevel oder genomische Alterationen dieser Chromatin-Regulatoren zur Tumorentstehung beitragen (Dawson & Kouzarides, 2012).

Histon H3 ist auf Chromosom 1q42.12 lokalisiert und hat ein Molekulargewicht von 15,3 kDa (Science, 2016). Die Acetylierung von Lysin (K)-9 im Histon H3 (H3K9ac) ist mit einem transkriptionell aktiven Chromatin assoziiert (Kuroishi et al., 2011). Die Acetylierung stellt einen hoch dynamischen Prozess dar, reguliert durch die konkurrierende Aktivität zweier Enzymfamilien, zum einen die Histon-Acetyltransferasen (HATs) und zum anderen die Histon-Deacetylasen (HDACs) (Dawson & Kouzarides, 2012). Die Acetylierung führt zur Neutralisierung der positiven Ladung der Lysin-Reste und kann so die elektrostatischen Interaktionen zwischen den Histonen und dem negativ geladenen DNA-Strang schwächen. Dies resultiert in einer offeneren Chromatin-Struktur (Euchromatin). Auch die Methylierung von K4 des Histons H3 ist mit einer Euchromatinstruktur und damit aktiven Transkription assoziiert (Le et al., 2014). Im Gegensatz dazu führt die Di- und Trimethylierung von K9 (H3K9me₂, H3K9me₃) zu einer Kondensierung der Chromatinstruktur in diesem Bereich, was eine Inaktivierung der Genexpression des auf diesem Abschnitt liegenden Gens zur Folge hat (Kuroishi et al., 2011). Auch die bereits oben beschriebene Aurora-Kinase B hat Einfluss auf die Struktur von Histon H3. Über ihre Phosphorylierung des Histons am Serin 11 (H3S10ph) ist sie entscheidend für die Chromosomenkondensation und das Voranschreiten des Zellzyklus während der Mitose und Meiose (Garcia et al., 2005; Science, 2016).

Sowohl Mutationen der chromatin-modifizierenden Enzyme, als auch Veränderungen der Histon-Modifikation durch direkte Histon-Mutationen werden mit genomischer Instabilität,

Fehlern in der Chromosomenteilung, sowie mit Tumorentstehung assoziiert (Bannister & Kouzarides, 2011; Kallappagoudar et al., 2015). Eine Dysregulation der Acetylierung bzw. Deacetylierung ist an Tumorentstehung, sowie an einen Progress der Erkrankung gekoppelt (Le et al., 2014). Auch eine verminderte Aktivität der HATs oder Überexpression von HDACs korreliert mit Tumorprogress sowie Voranschreiten in der Karzinogenese (Martins & Castilho, 2013).

Auch bei HNSCC konnten bereits verschiedene epigenetische Veränderungen festgestellt werden. Studien konnten zeigen, dass in Tumorgeweben von Mundhöhlenkarzinomen eine gesteigerte Dimethylierung an K4, sowie eine verminderte Trimethylierung von K9 zu beobachten ist (Mancuso et al., 2009). Des Weiteren scheint die Histon-Acetylierung in Tumorzellen erhöht zu sein, was mit einer vermehrten Invasivität der Tumorzellen einhergeht (Le et al., 2014; Martins & Castilho, 2013). Daneben finden sich einige hypermethylierte Genabschnitte, z.B. von den Tumorsuppressorgenen Adenomatous polyposis coli (APC) (häufigstes methyliertes Gen in HNSCC), p16^{INK4} und p14^{ARF} (Demokan & Dalay, 2011; Le et al., 2014).

2.2.5 Survivin

Survivin, auch BIRC5 oder API4 genannt, gehört zur Familie der humanen Apoptose-hemmenden Proteine (inhibitor of apoptosis protein, IAP) (Tamm et al., 1998). Das Gen liegt auf Chromosom 17q25.3 und hat mit seinen 142 Aminosäuren ein molekulares Gewicht von 16,4 kDa (Science, 2016). Die Mitglieder der IAP-Familie beinhalten alle ein bis drei Kopien der 70 Aminosäure langen Baculovirus IAP repeat (BIR)-Domäne, sowie eine RING (Really Interesting New Gene)-Finger-Domäne (strukturell verwandt zu Zink-Finger-Motiven, zuständig für Protein-Protein-Kontakte) am C-Terminus des Proteins (F. Li, 2003; Zhao et al., 2000). Survivin stellt das kleinste Mitglied mit nur einer BIR-Domäne und keinem RING-Motiv am C-terminalen Ende dar (F. Li, 2003; Zhao et al., 2000). Die Genexpression ist während der Fetal-Periode sehr hoch, jedoch im ausdifferenzierten adulten Gewebe kaum detektierbar (Ambrosini et al., 1997). Die Hauptaufgaben liegen im Schutz der Zellen vor Apoptose, sowie in der Regulation der Mitose (Dohi et al., 2004). Als ein Bestandteil des CPC ist Survivin mit verantwortlich für die korrekte Ausrichtung und Stabilität der Mikrotubuli während der Meta- und Anaphase (Dohi et al., 2004). Daneben sorgt Survivin vor allem für die richtige Lokalisation des Komplexes: vom Kinetochor während der Prometaphase zur Mittelzone bzw. zum Mittelkörper während der Zytokinese (Science, 2016). Die Gen-Expression ist daher Zellzyklus-reguliert. Sie steigt während der G1-Phase an und erreicht das Maximum in der G2-/M-Phase (Pickhard et al., 2014a). Anschließend wird Survivin über

den Ubiquitin-Proteasomen-Weg abgebaut (Zhao et al., 2000). Dies führt dazu, dass Survivin ein Protein mit sehr kurzer Halbwertszeit von nur 30 Minuten darstellt und bis zu seinem Abbau von Proteasomen-Inhibitoren stabilisiert wird (Zhao et al., 2000).

Seine anti-apoptotische Wirkung entfaltet Survivin über die Bindung an Caspase 3 und 7, zwei Effektor-Proteasen der Apoptose (Tamm et al., 1998). Diese direkte Bindung von Survivin an die Proteasen ist jedoch in der Literatur umstritten und konnte nicht regelmäßig nachgewiesen werden (Marusawa et al., 2003). Zusätzlich bildet Survivin zusammen mit X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP), einem weiteren Mitglied der IAP-Familie, einen Komplex. Dieser verstärkt zum einen die XIAP-Stabilität gegenüber einer Ubiquitylierung und damit verbundenen proteasomalen Abbau. Zum anderen führt der Komplex zu einer synergistischen Hemmung der Caspase-9-Aktivierung (Dohi et al., 2004). Auch mittels Komplexbildung mit dem Co-Faktor Hepatitis B X-interacting protein (HBXIP) kann Survivin die Caspase 9 hemmen (Marusawa et al., 2003).

Die Hemmung der Apoptose trägt nicht nur zur Karzinogenese bei, sondern spielt auch eine wichtige Rolle bei der Resistenz gegenüber Strahlen- oder Chemotherapie (Tamm et al., 1998).

Mehrere Studien konnten eine Überexpression von Survivin in Tumorgewebe feststellen, unter anderem auch in HNSCC (Khan et al., 2009; Kim et al., 2010; Marioni et al., 2010). Es konnte gezeigt werden, dass die Survivin-Überexpression mit einem aggressiveren Tumorstadium und dadurch bedingt mit verkürztem Gesamtüberleben und somit einer schlechteren Prognose der Patienten einhergeht (Khan et al., 2009; Kim et al., 2010; Marioni et al., 2010). Auch ein schlechteres Ansprechen auf eine Chemo- oder Strahlentherapie wurde mit einer erhöhten Expression von Survivin assoziiert (Pickhard et al., 2014a). Aufgrund der prognostischen Relevanz, sowie möglichen therapeutischen Optionen, bleibt Survivin auch in Zukunft ein wichtiges Protein in der Tumorforschung.

2.2.6 Protein-Kinase B (Akt)

Die Protein-Kinase B (Akt) gehört zu den Serin-Threonin-Kinasen mit ihren drei Isoformen Akt-1, Akt-2 und Akt-3 (Y. Li et al., 2013). Das Gen ist auf Chromosom 14q32.33 lokalisiert, besteht aus 480 Aminosäuren und kommt damit auf ein Molekulargewicht von 55,7 kDa (Science, 2016). Akt spielt eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation, beim Zellwachstum, sowie bei der Hemmung der Apoptose (Ongkeko et al., 2005). Alle drei Isoformen bestehen aus drei funktionell unterschiedlichen Domänen: einer N-terminalen Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH-Domäne), einer zentralen katalytischen Domäne und aus einem hydrophoben Motiv (HM) am C-terminalen Ende (Scheid & Woodgett, 2003).

Akt ist nur im phosphorylierten Zustand aktiv. Als erstes wird Akt hierfür mittels der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) an die Innenseite der Plasmamembran rekrutiert, indem PI3K ihr Substrat Phosphoinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Phosphoinositol-3,4,5-triphosphat (PIP₃) phosphoryliert (Scheid & Woodgett, 2003). Die PH-Domäne ermöglicht Akt an PIP₃ zu binden und vermittelt damit einen wesentlichen Schritt im Aktivierungsprozess (Cantley, 2002). Für eine komplette Aktivierung muss die Kinase an zwei Stellen phosphoryliert werden, einmal an Threonin 308 (Thr308) in der Aktivierungsdomäne und einmal an Serin 473 (Ser473) im hydrophoben Motiv des C-terminalen Endes (West et al., 2003). Die HM-Domäne am C-Terminus ermöglicht die Phosphorylierung von T308 durch die aktivierende 3-Phosphoinositide dependent kinase 1 (PDK1) (Scheid & Woodgett, 2003). Wie die Phosphorylierung am Serin von statten geht, ist bis heute unklar. Es wird angenommen, dass es sich entweder um eine Auto- oder Transphosphorylierung durch eine eigene S473-Kinase (PDK2) handelt, wobei vor allem die Lokalisation von Akt an der Plasmamembran wohl eine entscheidende Rolle zu spielen scheint (Fresno Vara et al., 2004; Scheid & Woodgett, 2003).

Sobald Akt aktiviert wurde, dient sie als Phosphatase und kann ihre vielfältigen Funktionen ausüben.

Über die Phosphorylierung und Inaktivierung des pro-apoptotischen Proteins Bcl2-associated agonist of cell death (BAD) kann Akt die Bindung von BAD an B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) hemmen, wodurch die Expression pro-apoptotischer Faktoren und folglich die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien verhindert wird (Fresno Vara et al., 2004).

Als weitere wichtige Funktion aktiviert Akt über die Phosphorylierung der Kinase Mammalian target of Rapamycin (mTOR) für das Zellwachstum benötigte Transkriptionsfaktoren. Akt stabilisiert des Weiteren die Zellzyklus-Inhibitoren p21 und p27 und verhindert so ihren Transport in den Zellkern (Grille et al., 2003). Über diese und weitere Mechanismen, wie z.B. auch die Inhibition der Glycogen-Synthase-Kinase-3 (GSK3) sorgt Akt für das Voranschreiten im Zellzyklus und für die Zellproliferation.

Der Gegenspieler von PI3K ist das Tumorsuppressorgen Phosphatase and tensin homolog (PTEN), welches Phosphoinositol-3,4,5-triphosphat zu Phosphoinositol-4,5-bisphosphat dephosphoryliert und damit die Aktivierung von Akt verhindert.

Akt und ihre phosphorylierte Form sind in vielen Tumoren, wie z.B. im Ovarialkarzinom, im Mamma-, sowie in kolorektalen Karzinomen und auch in HNSCC überexprimiert (Ongkeko et al., 2005; P. L. Zhang et al., 2005). Obwohl Gen-Amplifikation und Mutationen von Akt

geläufig sind, wird Akt in Tumorzellen gewöhnlich durch eine EGF-Rezeptor-Aktivierung, durch das G-Protein Ras oder die Inaktivierung von PTEN aktiviert (West et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass die Akt-Aktivierung eine frühe zelluläre Reaktion auf die Exposition von Karzinogenen darstellt und somit ein wichtiger Schritt in der Karzinogenese sein könnte (Amornphimoltham et al., 2004). Zudem führt eine durch Nikotin und weitere karzinogene Bestandteile des Tabakrauchs aktivierte Protein-Kinase B zur Deregulation des Zellwachstums und zur Apoptose (West et al., 2003).

Eine Akt-Aktivierung wird mit einer erhöhten Invasivität der Tumorzellen assoziiert, sowie für eine Resistenz gegenüber Strahlen- und Chemotherapie verantwortlich gemacht (Grille et al., 2003; West et al., 2003). Die Datenlage, ob eine erhöhte p-Akt Ser473-Expression auch mit einem verminderten Gesamtüberleben korreliert, ist jedoch sehr heterogen. Während viele Studien, unter anderem auch unserer Arbeitsgruppe, eine signifikante Reduktion des Gesamtüberlebens bei erhöhten p-Akt Ser473-Leveln und damit eine schlechtere Prognose der HNSCC-Patienten feststellen konnten (Y. Li et al., 2013; Massarelli et al., 2005; Pickhard et al., 2014a), war diese Assoziation bei anderen Studien nicht zu beobachten (Ongkeko et al., 2005; P. L. Zhang et al., 2005).

Zusätzlich konnten andere Autoren zeigen, dass p-Akt Ser473, als auch p-Akt Thr308 mit dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen, sowie dem klinischen Status bei Plattenepithelkarzinomen im Mundhöhlenbereich korreliert (Y. Li et al., 2013; Lim et al., 2005).

Da Akt prognostische Relevanz zeigt und eine mögliche therapeutische Option in der Tumorbehandlung darstellt, ist es von großer Bedeutung, die Protein-Kinase B weiter zu erforschen, um das Potential neuer therapeutischer und prognostischer Möglichkeiten zu erfassen.

2.3 Zielsetzung der Arbeit

Bereits seit 2004 kommt der monoklonale Antikörper Cetuximab bevorzugt bei Patienten mit fortgeschrittenem HNSCC zum Einsatz. Jedoch beträgt die Ansprechrate der Behandlung nur etwa 20 %. Bisher konnten für die Patienten mit Cetuximab-Therapie weder prognostische, noch prädiktive Biomarker ausfindig gemacht werden.

Aus diesem Grund bestand das Ziel der vorliegenden Arbeit darin, den HPV-Status und besonders den Aurora-Kinase A Polymorphismus hinsichtlich ihrer prädiktiven als auch prognostischen Eigenschaft bei Patienten mit Cetuximab-Therapie bei Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich zu untersuchen.

Hierbei sollte als erstes das Auftreten einer HPV-Infektion, sowie des Aurora-Kinase A Phe₃₁Ile-Polymorphismus bei dem verwendeten HNSCC-Patientenkollektiv untersucht und anschließend ein möglicher Zusammenhang bezüglich des Therapieansprechens auf eine Behandlung mit Cetuximab und des Gesamtüberlebens der Patienten ermittelt werden.

Neben den Untersuchungen *in vivo*, sollten auch Zellkulturversuche mit passenden Zelllinien erfolgen, um die biochemischen Vorgänge besser verstehen zu können. Es wurden zum einen das klonogene Überleben, zum anderen Proliferationsanalysen durchgeführt. Dabei fand eine Behandlung der Zelllinien mit Cetuximab alleine oder in Kombination mit Docetaxel statt.

Durch das Auffinden potentieller prognostischer und vor allem auch prädiktiver Biomarker könnte in Zukunft eine zielgerichtete Therapie möglich werden. Dies erspart nicht nur hohe Therapiekosten und oft sehr schwerwiegende Nebenwirkungen, sondern deckt neue Perspektiven zur verbesserten Prognose von Patienten mit HNSCC auf.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Patientenkollektiv

Tabelle 3 zeigt eine Übersicht über das verwendete Patientenkollektiv der HNSCC-Fälle. Es wurden Gewebe von Patienten mit Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle, des Oro-, des Hypopharynx und des Larynx verwendet. Hierbei wurde sowohl Tumorgewebe als auch korrespondierendes Normalgewebe untersucht. Bei immunhistologischen Färbungen wurde als Kontrolle das korrespondierende Normalgewebe der Tumorpräparate herangezogen. Es wurden insgesamt Patienten aus drei Kollektiven zusammen untersucht. Die Patienten aus dem ersten Kollektiv wurden im Rahmen einer palliativen Chemotherapie in Kombination mit Cetuximab (Erbix®) im Zeitraum von 1988-2015 am Klinikum rechts der Isar, TU München behandelt. Der durchschnittliche Nachbeobachtungszeitraum des Kollektivs betrug 4,60 Jahre.

Die Gewebeproben bei den primär operierten Patienten des zweiten Kollektivs stammen aus einer Studie von 1993-1997 der Kliniken und Polikliniken für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der TU München, Klinikum rechts der Isar sowie der Universitätsklinik Regensburg, gefördert durch die Wilhelm-Sander-Stiftung und das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) (Steuer-Vogt et al., 2001; Steuer-Vogt et al., 2006). Zudem besteht das zweite Kollektiv aus primär radiochemotherapierten Patienten die im Zeitraum 2001-2006 am Klinikum rechts der Isar, TU München in Behandlung waren. Es ergab sich ein mittleres krankheitsfreies Überleben von 5,13 Jahren.

Das dritte Kollektiv besteht aus Gewebeproben welche im Zeitraum von 2006-2009 in der Pathologie des Universitätsklinikums in Heidelberg rekrutiert wurden. Diese Patienten wurden in der Regel primär operiert, radiochemotherapiert oder hatten eine primäre Radiatio erhalten. Die Primärtherapie wurde teilweise bereits mit Cetuximab kombiniert. Wenige Patienten hatten bereits primär eine Monotherapie mit Cetuximab erhalten. Bei diesem Kollektiv hatten die Patienten ein mittleres progressionsfreies Überleben von 13,12 Jahren. Somit wurden insgesamt die Daten von 434 Patienten retrospektiv analysiert.

Histologische und klinische Daten wurden aus den medizinischen Aufzeichnungen erhoben. Für die Überlebenszeiten wurden zusätzlich die Informationen aus dem Tumorregister München verwendet. Alle Tumore wurden gemäß der International Union Against Cancer (UICC) TNM Klassifikationsystems von 2002 nachklassifiziert.

Die Durchführung der Studie wurde durch die Ethikkommission des Klinikums rechts der Isar, Technische Universität München genehmigt (Projektnummer 1420/05).

Kollektiv	Tumorlokalisation	Therapie	Herkunft	Anzahl
HNSCC	Mundhöhle, Oropharynx, Hypopharynx, Larynx	Palliative CTx	HNO-Klinik des Klinikums rechts der Isar	75
HNSCC		Primäre Op, Primäre RCTx	Steuer-Vogt, Bonkowsky et al. 2001 und 2006 (Steuer-Vogt et al., 2001; Steuer-Vogt et al., 2006) HNO-Klinik des Klinikums rechts der Isar, Universitätsklinikum Regensburg	269
HNSCC		Primäre Op, Primäre RTx Primäre RCTx, Primär Cetuximab	Pathologie des Klinikums Heidelberg	90

Tab. 3: Patientenkollektiv

3.1.2 Zelllinien

Tabelle 4 beinhaltet die verwendeten Zelllinien mit entsprechender Tumorlokalisation, Grading, Alter und Geschlecht des jeweiligen Patienten. Die Zelllinien SAS und UP-SCC-154 stammen von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) mit Firmensitz in Braunschweig, die Zelllinien UD-SCC-2 und UD-SCC-5 von der Hals-Nasen-Ohren-Klinik des Universitätsklinikums Düsseldorf.

Zelllinie	Tumorlokalisation	TNM/Grading	Alter	Geschlecht
UD-SCC-5	Supraglottis	T1N1M0 / G3	44	M
SAS	Zunge	?	?	F
UP-SCC-154	Zunge	T4N2 / G3	54	M
UD-SCC-2	Hypopharynx	pT1pN3 / G3	58	M

Tab. 4: Verwendete Zelllinien

3.1.3 Medien und Supplemente für die Zellkultur

In der folgenden Tabelle sind die Medien und Supplemente aufgelistet, welche für die Zellkulturen verwendet wurden.

Medien und Supplemente	Hersteller
DMEM – Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium	GIBCO®, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
DMSO – Dimethylsulfoxid ≥ 99,5 %	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
DPBS – Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	GIBCO®, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
FBS – Fetal Bovine Serum	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
L-Glutamine 200 mM	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml Penicillin und 10000 µg/ml Streptomycin)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
TrypLE™ Express (1x) Stable Trypsin	GIBCO®, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
MEM	GIBCO®, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

Tab. 5: Medien und Supplemente für die Zellkultur

3.1.4 Inhibitoren

Tabelle 6 zeigt die verwendeten Inhibitoren im Rahmen der Zellkultur.

Inhibitor	Wirkmechanismus	Konzentration	Hersteller
Docetaxel	Mikrotubuli-Stabilisator	0,25 nM	Selleckchem, Houston, TX, USA
Cetuximab (Erbix®)	Monoklonaler Antikörper gegen EGF-Rezeptor	50 nM	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Tab. 6: Inhibitoren

3.1.5 Primärantikörper (Western-Blot, WB)

Die folgende Tabelle beinhaltet die beim Western-Blot verwendeten Primärantikörper.

Primärantikörper	Verdünnung	Molekulargewicht	Hersteller
Aurora-Kinase A (WB)	1:500	48 kDa	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
Aurora-Kinase B (WB)	1:500	40 kDa	
p-Akt Ser473 (WB)	1:500	60 kDa	
Survivin (WB)	1:1000	16 kDa	

Tab. 7: Primärantikörper für Western-Blot

3.1.6 Sekundärantikörper

Tabelle 8 zeigt die in der Arbeit verwendeten Sekundärantikörper.

Sekundärantikörper	Verdünnung	Hersteller
Anti-Mouse IgG HRP- linked	1:10000	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
Anti-Rabbit IgG HRP- linked	1:5000	

Tab. 8: Sekundärantikörper

3.1.7 Antikörper (Immunhistochemie)

Tabelle 9 zeigt die in der Immunhistochemie zum Einsatz gekommenen Antikörper.

Primärantikörper	Verdünnung	Molekulargewicht	Hersteller
Aurora-Kinase A (1F8)	1:400	48 kDa	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
Aurora-Kinase B	1:100	40 kDa	
p-Histon H3 Ser10 (D2C8)	1:400	17 kDa	
p-Akt Ser473	1:20	60 kDa	
Survivin	1:200	16 kDa	
p16 ^{INK4} , Klon E6H4	Ready-to use	16,5 kDa	Roche-CINtec, Mannheim, Deutschland

Tab. 9: Antikörper für Immunhistochemie

3.1.8 Reagenzien und Enzyme

In Tabelle 10 sind alle verwendeten Reagenzien und Enzyme aufgeführt.

Reagenzien und Enzyme	Hersteller
1 % Bromphenol Blau	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
1,4 Dithiotreitol (DTT) ≥ 99,9 % p.a.	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ammoniumperoxidsulfat (APS) ≥ 98 %	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Antibody Diluent	Zytomed Systems GmbH, Berlin
ApoI Restriktionsenzym	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Bond Dewax Solution	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Bond Epitope Retrieval Solution 1	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Bond Epitope Retrieval Solution 2	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Bond Polymer Refinde Detection Kit	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Bond Wash Solution 10x	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar

Bovine Serum Albumin 2 mg/ml	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Bradford 1x Dye Reagent	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Cell Lysis Buffer (10x)	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
Crystal Violet	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Demineralisiertes Wasser	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn
DNA Polymerization Mix dNTP Set (20 mM each A,C,G,T)	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
DNase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DPBS – Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	GIBCO®, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
e-amino-n-caproic acid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ethanol ≥ 99,5 % p.a.	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
FluoDNA Gel Stain	PromoCell GmbH, Heidelberg
Formaldehyd-Lösung ≥ 37 % säurefrei	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Glycerol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Glycin ≥ 99 %	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Hexanucleotid Mix (10x)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
KAPPA SYBR fast PCR Universal Mastermix	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Magermilchpulver	Biomol GmbH, Hamburg
Maxima® reverse Transkriptase	Fermentas / Thermo Scientific, Waltham
Methanol 70 %	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Methanol ≥ 99,5 % p.a.	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
N,N,N'N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumchlorid ≥ 99,8 %	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Protease Inhibitory Cocktail (10x)	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
Proteinase K	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Reaction Buffer (5x)	Fermentas / Thermo Scientific, Waltham
Restriktionspuffer 5x	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
RNase 0,01 mg/ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Roti®-Histokitt II	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Roti®-Stock 20 % SDS	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Rotiphorese® Gel - Acrylamidstammllösung 30 % mit 0,8 % Bisacrylamide	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
STK15 (AurkA) Primer for und rev	MWG Eurofins, Ebersberg
Tissue Lysis Buffer	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE) (10x)	Life technologies AG, Carlsbad
Tris Pufferan® ≥ 99,9 % p.a.	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Tween-20	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Vectashield® Mounting Medium	Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA
Xylol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ziegenserum	Dako, Golstrup, Dänemark
ZytoLight SPEC 13/CEN 18/SPEC 21 Triple Color Probe	ZytoVision GbmH, Bremerhaven

Tab. 10: Verwendete Reagenzien und Enzyme

3.1.9 Gemischte Reagenzien, Puffer und Gele

In Tabelle 11 sind die für die Arbeit selbst hergestellten Reagenzien, Puffer und Gele samt Rezept aufgelistet.

Reagenzien und Puffer	Rezept
1 M Tris-Cl pH 6,8	12,1 g Tris ad 100 ml destilliertem Wasser + Essigsäure zur pH Einstellung
1 M Tris-Cl pH 8,8	12,1 g Tris ad 100 ml destilliertem Wasser + Essigsäure zur pH Einstellung
10 % Tween	10 ml Tween-20 ad 100 ml DPBS
10 % APS	1 g APS ad 10 ml destilliertem Wasser
Anodenpuffer I pH 10,5	18,16 g Tris + 100 ml Methanol ad 500 ml destilliertes Wasser
Anodenpuffer II pH 10,4	1,51 g Tris + 100 ml Methanol ad 500 ml destilliertes Wasser
Antikörperverdünnungs- und Blockingpuffer für 1 Liter	100 ml 10x TBS + 10 ml 10 % Tween + 50 g Magermilchpulver + 890 ml destilliertes Wasser
Bovine Serum Albumin 0,2 mg/ml	0,2 µl BSA+ 0,01 % Triton X-100 ad 1 ml
Cell Lysis Buffer (10x)	Zusammensetzung nach Herstellerangaben

Crystal Violett 0,4 %	40 mg Crystal Violett + 100 ml 4 % Ethanol
DPBS/5 % Normal Goat Serum	500 µl Normal Goat Serum ad 10 ml DPBS
DPBS/50 nM NH ₄ Cl	1 ml 500 nM NH ₄ Cl ad 10 ml DPBS
Kathodenpuffer pH 7,5	1,51 g Tris + 100 ml Methanol + 2,62 g e-amino-n-caproic acid ad 500 ml destilliertem Wasser
SDS 1 %	25 ml SDS 20 % ad 500 ml destilliertem Wasser
SDS Laufpuffer für 1 Liter (10x)	30,3 g Tris + 140,42 g Glycin + 50 ml 20 % SDS ad 1000 ml destilliertem Wasser
SDS Sample Buffer (5x)	3,125 ml Tris pH 6,8 + 386 mg DTT + 1 g SDS + 0,5 ml 1 % Bromphenol Blau + 5 ml Glycerol + 1,375 ml destilliertes Wasser
Stripping Buffer für 1 Liter	100 ml Methanol + 100 ml Essigsäure + 800 ml destilliertes Wasser
10x TBS für 1 Liter	24,2 g Tris + 80 g NaCl ad 1000 ml destilliertem Wasser + Essigsäure zu Einstellung des pH auf 7,6
Waschpuffer für 1 Liter	100 ml 10x TBS + 10 ml 10 % Tween + 890 ml destilliertes Wasser

Tab. 11: Verwendete selbst hergestellte Reagenzien und Puffer

3.1.10 Geräte

In Tabelle 12 sind die verwendeten Geräte aufgelistet.

Geräte	Hersteller
Absaugpumpe Vacuubrand ME2	Vacuubrand GmbH, Wertheim
Accu-Jet® pro	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Axio-Imager-Z1	Zeiss, Göttingen
BD FACSCanto-II flow cytometer	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Blotting System Mini-PROTEAN® Tetra System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Bond-Max Färbeautomat	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Brutschrank HeraCell 150i CO ₂ Inkubator	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
C1000 Thermo Cycler + CFX96 qPCR Real Time System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Cellometer™ Auto T4	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
DNA Engine	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
E-Box VX2	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Elektrophoresekammer	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
ELISA Reader Multiscan FC	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Eppendorf Research Pipetten 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl	Eppendorf AG, Hamburg

Gefrierschrank Premium No frost	Liebherr, Biberach an der Riss
Kühlplatte	Medite Medizintechnik GmbH, Burgdorf
Kühlschrank comfort	Liebherr, Biberach an der Riss
Laborabzug	Köttermann GmbH & Co. KG, Uetze
Leica Mikroskop DMI6000 B	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Leica Mikroskopkamera DFC425 C	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Magnetrührer RCT basic	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Mikrotom Microm HM 355 S	Microm International GmbH, Walldorf
Minishaker MS2	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Molecular Imager ChemiDoc™ XRS+	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
NanoDrop 1000	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Objektträgerstrecktisch OTS 40	Medite Medizintechnik GmbH, Burgdorf
PCR Elektrophorese Powersupply	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Peqette® 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
pH-Meter 766 Calimatic	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin
Pipetman® 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl	Gilson, Inc., Middleton
PowerPac 300 Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
PowerPac™ HC Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Präzisionswaage SBC 32	Scaltec, Heiligenstadt
Ready Gel Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Rüttler Vibrax VXR	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Sterilbank HeraSafe KS	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Stickstofftank LS 4800	Taylor-Wharton Germany GmbH, Husum
Taumel-Rollenmischer	A. Hartenstein Laborbedarf GmbH, Würzburg
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Trans-Blot® SD Semi Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Trockenschrank	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Wärmeschrank	Binder, Tuttlingen
Wasserbad Typ 1003	GFL, Burgwedel
Zentrifuge 5430R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge PerfectSpin Mini	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen

Tab. 12: Verwendete Geräte

3.1.11 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 13 zeigt alle verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Produkt	Hersteller
Biosphere Micro Tubes 1,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Deckgläser 24x60 mm	Thermo Scientific, Waltham
Kryoröhrchen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Mikrotomklingen Blade S35	Novoglas Labortechnik, Bern, Schweiz
Objektträger Superfrost Plus	Thermo Scientific, Waltham
Parafilm®	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Pasteurpipetten aus Glas	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipetten-Spitzen 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran	Merck Millipore GmbH, Darmstadt
Serologische Pipetten 25 ml, 10 ml, 5 ml	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Reaktionsgefäße (Tubes) 15 ml, 50 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Tissue Culture Dish 100x20 mm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Tissue Culture Plate 6-well	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Tissue Culture Plate 96-well	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Toppits Frischhaltefolie	Cofresco Frischhalteprodukte, Minden
Whatmann Gel Blotting Papier	Sartorius stedim biotech, Göttingen
Zellschaber	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Tab. 13: Verwendete Verbrauchsmaterialien

3.1.12 Computersoftware

In Tabelle 14 sind alle verwendeten Computerprogramme zu finden.

Computersoftware	Hersteller
FACSDiva Software Version 6.1.1	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Image Lab Software 6.0.	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Leica Application Suite LAS V3.8.	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Microsoft® Office 16	Microsoft Corporation, Redmond
ModFit LT 3.2 Software	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Prism GraphPad 7.0d	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA
Quantity One Software 4.6.9	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Software Cellometer Auto T4	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
SPSS Statistics Version 25	IBM GmbH, Ehningen, Deutschland

Tab. 14: Verwendete Computersoftware

3.2 Methoden

3.2.1 Experimentelle, molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 DNA-Isolierung aus FFPE-Material

Um Mutationsanalysen durchführen zu können, musste aus den Patientenproben DNA isoliert werden. Als erstes wurden hierfür je nach Menge des Materials 3-5 Schnitte à 10 µm von den Paraffinblöcken angefertigt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Um die Probe zu homogenisieren, erfolgte anschließend die Zugabe von 1 ml Xylol. Im nächsten Schritt wurden 250 µl 70 %-iges Ethanol hinzugefügt, die Probe erneut homogenisiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur bei 14000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand konnte im Anschluss dekantiert werden. Der folgende Arbeitsschritt umfasste die Trocknung des Pellets für ca. 1 Stunde bei 55 °C im Heizblock und anschließende Resuspension in 200-600 µl PK-Puffer und 0,1 % Tween-20. Dabei wurde das Pellet mit einer Pipetten-Spitze mechanisch zerkleinert. Nach Zugabe von 50 µl Proteinase K wurde die Probe danach über Nacht bei 55 °C und einer Schüttelfrequenz von 550 rpm inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Durchführung eines Nachverdaus unter Zugabe von 10 µl Proteinase K und die Inaktivierung des Enzyms durch Kochen für 10 Minuten bei 95 °C. Als letzter Schritt wurde die Stammlösung auf 20 ng/µl verdünnt und konnte hiernach bei 4 °C im Kühlschrank gelagert werden.

3.2.1.2 Real-Time semiquantitative Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die Polymerase Chain Reaction (PCR) ist an sich eine relativ einfache Methode, um einen bestimmten DNA-Abschnitt außerhalb lebender Zellen zu amplifizieren. 1985 wurde dieses Verfahren erstmals beschrieben (Saiki et al., 1985).

Für eine PCR werden zunächst zwei Oligonucleotidprimer, eine thermostabile Polymerase (z.B. Taq Polymerase) und eine geringe Menge an Ausgangs-DNA benötigt.

Die Reaktion besteht aus drei aufeinander folgenden Schritten:

1. Denaturierung bei 95 °C
2. Annealing bei ca. 55 °C
3. Elongation bei 72 °C

Die Phase der Denaturierung dient dazu, die doppelsträngige DNA in zwei Einzelstränge aufzutrennen, an die sich während des Annealings die Primer anlagern können. Im letzten Schritt, der Elongation, werden dann, von den Primern ausgehend, komplementäre Basen

aufgefüllt. Diese drei Schritte werden so oft wiederholt, bis eine ausreichende Menge an Fragmenten amplifiziert werden konnte.

Die Real-Time PCR stellt dabei eine Methode dar, um den Anstieg des PCR-Produkts während des Vorgangs zu kontrollieren und anschließend die synthetisierte Menge zu quantifizieren. Dieses Verfahren wurde zum ersten Mal 1992 publiziert (Higuchi et al., 1992). Der PCR-Ansatz wird bei der Real-Time PCR mit einem Fluoreszenzfarbstoff versetzt, dessen Intensität mit der Amplifikation des PCR-Produkts steigt. Die dabei erzeugte Kurve steigt exponentiell an und erreicht schließlich ein Plateau. Da dieses bei einer normalen Real-Time PCR für alle Proben gleich ist, zeigt eine Endpunktmessung lediglich, ob die Reaktion positiv oder negativ war.

Aufgrund der Einführung des CT-Werts ist es möglich, eine Aussage über die Menge des Ausgangsmaterials zu treffen. Der Wert gibt die Menge an Amplifikationszyklen an, die eine Probe gebraucht hat, um einen festgelegten Fluoreszenzschwellenwert zu erreichen. Das Verhältnis der CT-Werte der gemessenen Proben ermöglicht so die Ermittlung der unterschiedlichen Expression des fraglichen Gens. Da das Verwenden einer exakt gleichen Menge template in jeder Probe kaum möglich ist, muss die Probe normalisiert werden. Hierfür wird ein Referenzgen eingesetzt mit der Voraussetzung, dass dieses Gen in allen Zellen des Körpers gleichermaßen exprimiert sein muss (Kubista et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde auf eine Quantifizierung verzichtet und die Methode lediglich für einen semiquantitativen Nachweis über das Vorliegen des Amplifikats verwendet.

Hierfür wurde ein Primer gewählt, der spezifisch an dem zu analysierenden Aurka/ STK15 Genabschnitt am Codon 91 bindet, um die Patientenproben auf den Aurora-Kinase A Polymorphismus zu untersuchen. In der folgenden Tabelle ist die Primersequenz abgebildet.

Aurka/ STK15	Primersequenz
Primer forward:	CTTTCATGAATGCCAGAAAGTT
Primer revers:	CTGGGAAGAATTTGAAGGACA

Tab. 15: Primersequenzen Real-Time PCR

Für die Real-Time PCR wurde folgender Master-Mix angesetzt:

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
2x KAPA SYBR FAST Universal	12,5 µl	1x
20 pmol forward Primer	0,5 µl	0,4 pmol
20 pmol reverse Primer	0,5 µl	0,4 pmol
Aqua dest.	6,5 µl	-

Tab. 16: Reagenzien für Mastermix der Real-Time PCR

Als Reaktionsgefäß für den Master-Mix diente ein 1,5 ml großes Eppendorf-Gefäß. Nach dem Pipettieren der Reagenzien wurde der Master-Mix gut durchgemischt. Anschließend wurde in jedes well einer 96-well plate 20 µl Master-Mix und 5 µl DNA-template pipettiert. Das qPCR System CFX96 von Bio-Rad wurde wie folgt programmiert:

1. 95 °C 10 Minuten
2. 95 °C 30 Sekunden
3. 60 °C 30 Sekunden
4. 72 °C 90 Sekunden
5. 75 °C – 95 °C in 0,5 °C-Schritten, jeweils 5 Sekunden

Die Schritte 2-5 wurden 39-mal wiederholt. Die Darstellung und Analyse der Ergebnisse erfolgten abschließend mit der Bio-Rad-Software.

3.2.1.3 Apol-Restriktions-Verdau

Nach der Real-Time PCR erfolgte anschließend der Restriktionsverdau des 165 bp großen Fragments mit dem Enzym Apol. Dazu musste folgender Master-Mix zusammen pipettiert werden:

Reagenz	Volumen	Endkonzentration
Reaktionspuffer	5 µl	1x
Apol	1 µl	1000 units/µl
Aqua dest.	19 µl	-

Tab. 17: Master-Mix für Restriktionsverdau

Als Reaktionsgefäß für den Master-Mix diente wiederum ein 1,5 ml großes Eppendorf-Gefäß. Nach gutem Durchmischen des Master-Mix wurde anschließend zu dem jeweils 25 µl PCR-Amplifikat 25 µl des Master-Mix pipettiert.

Der Verdau erfolgte bei 50 °C über Nacht (18 Stunden) im Thermoblock. Nach der Inaktivierung des Enzyms bei 80 °C für 20 Minuten konnten die Fragmente in einem 2 %-igen Agarosegel aufgetrennt werden.

3.2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Elektrophorese können Nukleinsäure-Fragmente nach ihren unterschiedlichen Größen aufgetrennt werden. Das Prinzip ist hierbei, dass Agarose netzartige Strukturen in dem Gel ausbildet, an welchem die DNA-Fragmente entlangwandern, sobald eine

Spannung an das Gel angelegt wird. Hierbei wandern die negativ geladenen DNA-Fragmente zum positiv geladenen Pol, je kleiner das DNA-Stück, desto schneller.

Die Elektrophorese wurde in dieser Arbeit in 2 %-igem Agarosegel durchgeführt. Hierzu wurde 2 g Agarose in 100 ml 1x TBE-Puffer gelöst und erhitzt, bis keine Schlieren mehr zu erkennen waren. Nach Abkühlen der Agarose konnte das Gel gegossen werden.

Je 10 µl der Proben wurden mit 2 µl FluoDNA Gel Stain versetzt und in das Gel beladen. Bei einer angelegten Spannung von 90 mV liefen die Samples für 50 Minuten im Gel. Die Darstellung und Dokumentation erfolgten mittels E-Box. Durch Auftrennung der Fragmente ergaben sich daraus die Bandenmuster für die Allele des Polymorphismus:

31Phe – 153 bp, 12 bp, sowie 31Ile – 89 bp, 64 bp, 12 bp.

3.2.1.5 Sequenzierung

Zur Kontrolle der Ergebnisse des AurkA-Polymorphismus mittels PCR und anschließender Agarose-Gelelektrophorese wurden die DNA-Proben zusätzlich zur Sequenzierung an MWG Eurofins Genomics geschickt. Durch Verwendung der Kettenabbruch-Synthese nach Sanger kann die genaue Basenabfolge des DNA-Stücks ermittelt werden. Zur Darstellung der DNA-Sequenz werden mit Fluoreszenz-Farbstoffen markierte Didesoxynukleosidtriphosphate eingesetzt. Jede der vier DNA-Basen wird mit einem unterschiedlichen Farbstoff gekoppelt und kann so von einem Detektor erkannt werden. Das Ergebnis erscheint als Elektropherogramm, welches die Abfolge der Farbsignale, die am Detektor erscheinen, widerspiegelt und gibt so direkt die Sequenz der Basen des sequenzierten DNA-Stranges wieder.

3.2.1.6 Immunhistochemie

Das Patientenmaterial wurde nach der Fixierung in Paraffin eingebettet. Aus diesen Blöcken wurden im ersten Schritt 1,5 µm dicke Schnitte erstellt. Nach dem Aufziehen auf die Objektträger wurden die Schnitte über Nacht bei 58 °C getrocknet. Zur anschließenden Färbung der Schnitte wurde der Leica Bond-Max Färbeautomat unter Zugabe verschiedener Primärantikörper angewendet. Dem Ganzen liegt das Prinzip der Polymerisation zugrunde, das sich sogenannte polymere Antikörperkonjugate zu Nutze macht. Die folgenden Schritte wurden von dem Färbeautomaten durchgeführt:

1. Entparaffinieren durch die Bond Dewax Solution
2. Waschungen mit 100 % Ethanol
3. Epitop-Demaskierung mit Hilfe der Bond Epitope Retrieval Solution

4. Inkubation mit Wasserstoffperoxid
5. Zugabe des Primärantikörpers in korrekter Verdünnung
6. Inkubation mit dem Polymer Refine Detection Kit
7. DAB-Chromogen zur Induktion der Farbreaktion und damit Sichtbarmachung
8. Gegenfärbung mittels Hämatoxylin

Das gefärbte Gewebe wurde im letzten Schritt in einer aufsteigenden Alkoholreihe aus 70 % Ethanol, 96 % Ethanol, beide jeweils 5 Minuten, Isopropanol (2 Mal für je 5 Minuten) und Xylol (3 Mal für je 10 Minuten) dehydriert und somit haltbar gemacht. Vor dem Auflegen der Deckgläser musste ein synthetisches Einschussmittel (Roti®-Histokitt II) als Eindeckmittel aufgetragen werden. Bei jeder Färbereihe wurde eine Positivkontrolle mit angefertigt.

Die Auswertung der gefärbten Schnitte wurde in dieser Arbeit durch zwei unabhängige Untersucher vorgenommen. Hierbei wurde, mittels einer Modifikation des von Schauer et al. beschriebenen Immunreaktiven Score (IRS), ein Wert aus dem Prozentsatz positiv gefärbter Zellen (PP = percentage points) und der Intensität der Färbung (SI = staining intensity) ermittelt.

In unserer Arbeit wurde der IRS durch Addition dieser beiden Werte gebildet, was so zu einem Score zwischen 0 und 7 Punkten führte (Schauer et al., 1988). Zur statistischen Auswertung wurde ein Cut-off Wert bestimmt, durch welchen es möglich war, die Proben in negativ und positiv einzuteilen.

SI		PP		IRS	
Negativ	0	Negativ	0	Negativ	0
Schwach positiv	1	< 10 %	1	Schwach positiv	2-3
Mäßig positiv	2	11 – 30 %	2	Mäßig positiv	4-5
Stark positiv	3	31 – 60 %	3	Stark positiv	6-7
		> 60 %	4		

Tab. 18: Immunreaktive Scores (IRS=SI+PP)

3.2.2 Experimentelle, zellbiologische Methoden

3.2.2.1 Zellkultur

Die Arbeit an den verschiedenen Zelllinien erfolgte nach genau festgelegten Standardkultivierungsmethoden. Hierfür wurden im ersten Schritt alle Medien und Supplemente, die zur Zellkultivierung verwendet wurden, im vorgeheizten Wasserbad (37 °C) angewärmt und anschließend mit 70 % Ethanol desinfiziert. Als Medium diente Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM), ergänzt mit 10 % fetalem Kälberserum (FBS) und 2 mM L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin (100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin). Die Kultivierung im Brutschrank erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ bei einer Luftfeuchtigkeit von 95 %.

3.2.2.2 Einfrieren der Zellen

Das Einfrieren von Zelllinien ermöglicht im Bedarfsfall auf Reserven zurückgreifen zu können.

Für die Kryokonservierung wurden die Zellen im ersten Schritt resuspendiert mit einem Freezing-Medium, welches aus 20 % FCS zu je 47,5 ml und aus 5 % DMSO zu je 2,5 % besteht. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit 4 ml PBS gewaschen, um sie anschließend zu trypsinieren. Nach Ablösen der Zellen konnte die Zellsuspension in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 1500 rpm in der Zentrifuge 2 Minuten lang abzentrifugiert werden. Der Überstand konnte anschließend abpipettiert, das Zellpellet in einer speziellen Mischung aus FCS und 5 % DMSO (Freezing Medium) resuspendiert werden. Nach dem Abfüllen der Zellsuspension zu 1 ml in Kryoröhrchen konnten die Röhrchen bei -20 °C eingefroren werden. Zur Langzeitkonservierung ist hierfür ein Stickstofftank mit einer Temperatur von -196 °C erforderlich.

3.2.2.3 Auftauen der Zellen

Die Lagerung der eingefrorenen Zellen erfolgte in Kryoröhrchen in einem Stickstofftank bei -196 °C. Nach dem Antauen der Röhrchen wurde die verflüssigte Zellsuspension mit 15 ml Medium in ein großes Reaktionsgefäß gefüllt. Währenddessen wurde die Kulturschale mit 5 ml frischem Medium versetzt und vorbereitet. Die Zellen konnten im letzten Schritt mit der Pipette in die vorbereitete Kulturschale überführt und im Brutschrank unter den oben genannten Voraussetzungen kultiviert werden.

3.2.2.4 Splitten der Zellen und Mediumwechsel

Um eine Inhibition des Zellwachstums zu verhindern, sollten Zellen regelmäßig gesplittet werden. Dies geschieht optimalerweise bei einer Konfluenz der Zellen von 80 %. Es ist daher essentiell, sich mit der jeweiligen Proliferationsrate der verschiedenen Zelllinien auseinander zu setzen, indem man die Zellen in unterschiedlichen Stadien des Wachstums unter dem Mikroskop regelmäßig betrachtet.

Im ersten Schritt wurde das in der Kulturschale befindliche Medium abgesaugt und die am Boden anhaftenden Zellen wurden mit 6 ml 1x DPBS einmalig gespült. Anschließend erfolgte das Ablösen der Zellen mittels 2 ml Trypsin/EDTA. Zur Beschleunigung des Ablösevorgangs der Zellen konnten für das verantwortliche Enzym Trypsin die bestmöglichen Wachstumsbedingungen geschaffen werden, indem die Kulturschale 5 Minuten in den Brutschrank gestellt wurde. In der Zwischenzeit musste die neue Kulturschale beschriftet und mit 7 ml Medium aufgefüllt werden.

Im nächsten Schritt wurden die abgelösten Zellen mittels 5 ml Medium in ein 50 ml Reaktionsgefäß gefüllt. Es folgte die Resuspendierung und das Überführen von 1 ml der Lösung in die neue Kulturschale. Diese konnte anschließend im Brutschrank weiter kultiviert werden.

Nach 2-3 Tagen sollte ein Mediumwechsel erfolgen, bei dem das alte Medium abgesaugt und durch 7 ml frisches erwärmtes Medium ersetzt wird. So werden optimale Zellkulturbedingungen ermöglicht.

3.2.2.5 Crystal-Violett Proliferations-Assay

Die für den Proliferations-Assay benötigten Zellen mussten bereits einen Tag vor Zugabe der Inhibitoren ausgesät werden. Hierfür löste man als erstes die Zellen einer 80 % konfluenten Kulturschale ab, ermittelte anschließend die Zellzahl und errechnete die nötige Verdünnung, um 5×10^4 Zellen pro ml zu erhalten.

Der nächste Arbeitsschritt beinhaltete das Pipettieren von 100 μ l dieser Zellsuspension in die mit je 5 ml Medium befüllten 6-wells (insgesamt 5×10^3 Zellen pro well) und im Folgenden das Kultivieren der 6-wells im Brutschrank für 24 Stunden. Am nächsten Tag erfolgte die Behandlung mit den ausgewählten Konzentrationen der Inhibitoren (50 nM Cetuximab und 0,25 nM Docetaxel).

Anschließend wurden die Zellen im Brutschrank für 10 Tage ohne Mediumwechsel weiterkultiviert.

Die folgende Abbildung veranschaulicht den Crystal-Violett Proliferations-Assay:

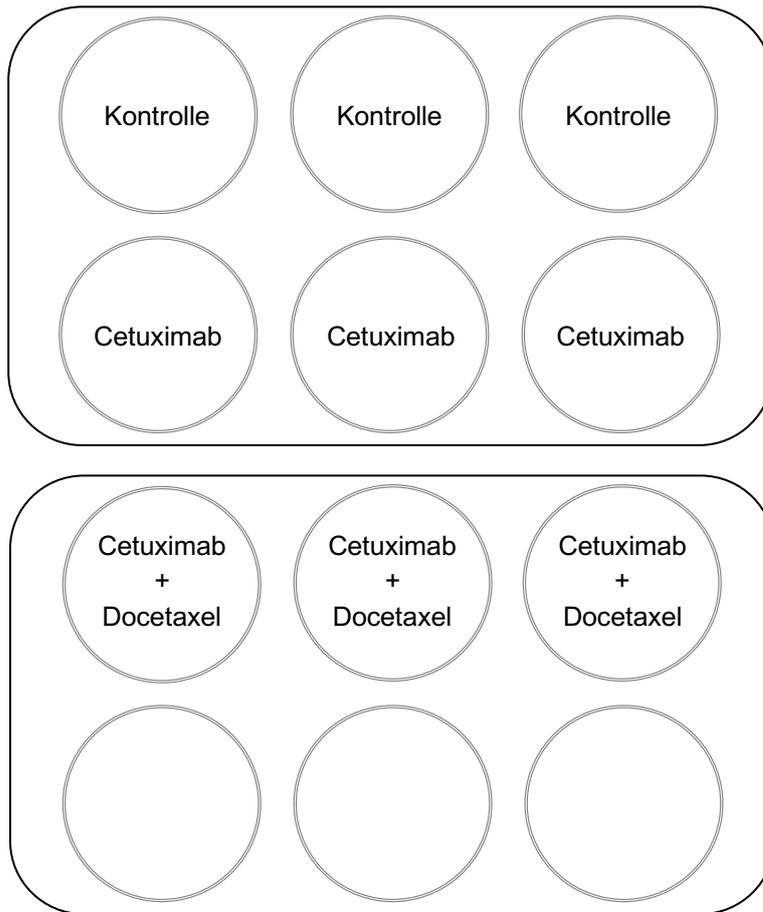


Abb. 7: Versuchsaufbau des Crystal-Violett Proliferations-Assay

Nach der 10-tägigen Kultivierung konnte die Auswertung des Proliferations-Assays erfolgen. Diese basiert auf der Extinktionsmessung bei 595 nm mittels ELISA. Zur Vorbereitung musste zuerst das Medium abgesaugt und die Zellen mussten mit je 2 ml 4 % Formaldehyd/0,4 % Ethanol für 20 Minuten fixiert werden. Im nächsten Schritt wurden die noch anhaftenden Zellen mit 2 ml eines Reagenzgemisches aus 1x DPBS und 0,1 % Triton und 2 ml destilliertem Wasser gewaschen. Für das Anfärben der Zellen waren die Zugabe von 2 ml 0,4 % Crystal-Violett-Lösung und die 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur erforderlich. Die Farbreste wurden anschließend mit 2 ml Aqua dest. entfernt. Es folgte das Lysieren der Zellen mit Hilfe von 2 ml 1 % SDS-Lösung und einer Stunde auf dem Rüttler. Die Extinktionsmessung im ELISA wurde in einem 96-well durchgeführt. Hierfür war zur Messung das Umpipettieren von 100 µl der Lösung in Form von Triplets untereinander in einen 96-well notwendig. Der jeweilige Farbumschlag in den einzelnen wells im Vergleich zu einer Referenzmessung resultierte in unterschiedlich hohen Extinktionswerten, wodurch ermöglicht wurde, Aussagen über die Proliferationshemmung treffen zu können.

3.2.2.6 Colony-Formations-Assay

Um den Effekt einer zytotoxischen Substanz auf Tumorzellen *in vitro* darzustellen, hat sich der Colony-Formations-Assay als Standard etabliert (Katz et al., 2008). Im ersten Schritt wurden hierfür pro well je 5×10^2 Zellen einer 80 % konfluenten Kulturschale in 5 ml Medium ausgesät. Anschließend folgte eine 24 stündige Wachstumsphase bei 37 °C im Brutschrank. An Tag 2 wurden die Behandlungen der Zellen durchgeführt. Es wurden die Inhibitoren Cetuximab und Cetuximab in Kombination mit Docetaxel verwendet. Im nächsten Schritt wurde die Kultivierung der behandelten Zellen für weitere 10 Tage bei 37 °C ohne Mediumwechsel durchgeführt. Die Tumorzellen bildeten Kolonien, die darauffolgend mit Hilfe des Farbstoffes Crystal-Violett dargestellt werden konnten, um den Effekt der Inhibitoren zu messen. Analog zu den Schritten des Proliferations-Assays erfolgte die Fixierung mittels 4 %-igem Formaldehyd sowie das Waschen mit PBS/ Triton und destilliertem Wasser. Nach dem Anfärben der Zellen durch die Crystal-Violett-Lösung wurden diese mit Leitungswasser ausgewaschen. Nach dem Trocknen konnten letztendlich die Kolonien, die sich nach den 10 Tagen ausgebildet hatten, mit dem Molecular Imager ChemiDoc™ XRS+ digitalisiert und mit Hilfe der Software Quantity One der Firma BioRad ausgezählt werden.

3.2.2.7 Proteinisolierung

Für die Proteinisolierung wurden die Zellen mit den bekannten Inhibitoren behandelt und 48 Stunden inkubiert. Im darauffolgenden Schritt wurde eine 80 % konfluente Kulturschale ausgewählt, das Medium abgesaugt und die Zellen mit kaltem DPBS gespült. Anschließend wurden in die Schale 4,5 ml destilliertes Wasser, 500 µl Cell Lysis Buffer, 100 µl PMSF und 100 µl Protease Inhibitory Cocktail pipettiert. Das Gemisch musste gut vermengt und auf Eis gekühlt werden. Puffer sowie PMSF sollten erst kurz vor der Isolation angesetzt werden. Nach einer 10-minütigen Inkubationsphase folgte das Ablösen der Zellen mittels Zellschaber und das Pipettieren in ein 1,5 ml Tube. Im Anschluss wurde das Gemisch erneut für 15 Minuten auf Eis gelegt. Danach wurden die Zelllysate bei 4 °C für 15 Minuten bei 10.000 rpm abzentrifugiert. Im letzten Schritt konnte der Überstand mit den gelösten Proteinen mit der Pipette entfernt, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C eingefroren werden.

3.2.2.8 Bradford-Assay

Für eine quantitative Bestimmung von Proteinen in den vorher angefertigten Isolaten dient der Bradford-Assay. Die Methode wurde 1976 erstmals von dem amerikanischen

Biochemiker Marion Bradford beschrieben und nutzt eine photometrische Methode zur Bestimmung der Proteinmenge (Bradford, 1976).

Als erstes erfolgte die Verdünnung der Proteinlysate mit DPBS 1:10. Zur Herstellung der Probelösungen wurden anschließend 20 µl dieses verdünnten Lysats, 180 µl DPBS und 200 µl 0,01 % Triton X-100 zusammengemischt. Im nächsten Schritt musste das Bradford Reagenz 1:4 mit DPBS verdünnt werden. Für die Auswertung wurden als erstes für die Kalibrationskurve die Standardlösungen aus 0,2 mg/ml BSA und 0,01 % Triton X-100 hergestellt. Im folgenden Schritt wurde 600 µl der Bradford Reagenz zu den Standard- und Probelösungen zugegeben, kurz durchmischt und schließlich 5 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Als nächstes war die photometrische Messung der Extinktion in einem 96-well im ELISA Reader Multiscan FC bei 595 nm möglich. Anhand der erstellten Kalibrierungskurve und der gemessenen Extinktionswerte konnte die Proteinmenge jeder einzelnen Probe in Microsoft Excel berechnet werden.

3.2.2.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ermöglicht Proteine der Größe nach aufzutrennen. Die SDS-Gelelektrophorese dient als Vorbereitung zum Western-Blot (Laemmli, 1970).

Für diese biochemische Methode sind zwei Gele notwendig, nämlich ein Laufgel sowie ein Sammelgel. In der folgenden Tabelle ist die Zusammensetzung des in dieser Arbeit verwendeten Laufgels mit den jeweils unterschiedlichen Dichten dargestellt. Der Grund für diese Unterschiede liegt im Größenunterschied der verschiedenen Proteine. Folglich werden Gele höherer Dichte zur Detektion kleinerer Proteine verwendet und umgekehrt.

Laufgel-Dichte	7,5 %	10 %	12 %
Destilliertes Wasser	5,72 ml	6,64 ml	4 ml
30 % Acrylamidstammlösung + 0,8 % Bisacrylamide	5,08 ml	5,32 ml	8,4 ml
1 M Tris pH 8,8	7,48 ml	4 ml	7,48 ml
20 % SDS-Lösung	100 µl	100 µl	100 µl
10 % APS	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	25 µl	25 µl	25 µl

Tab. 19: Zusammensetzung der Laufgele

Für die Gelelektrophorese erfolgte die Befüllung der Gelkammern zu ca. 2/3, anschließend wurde das Gel mit Propanol überschichtet und zur Polymerisierung für 45 Minuten stehen gelassen. Das restliche Drittel der Gelkammer wurde schließlich mit dem Sammelgel befüllt und die Kammschablone eingesetzt, welche die Ladekammern für die Proteinlösungen

bildete. Nach einer weiteren 15-minütigen Wartezeit konnte das Gel mit den Proteinen beladen werden.

Die Zusammensetzung des Sammelgels zeigt die folgende Tabelle.

Sammelgel	5 %
Destilliertes Wasser	7 ml
30 % Acrylamidstammlösung + 0,8 % Bisacrylamide	1,672 ml
1 M Tris pH 8,8	1,252 ml
20 % SDS-Lösung	50 µl
10 % APS	100 µl
TEMED	25 µl

Tab. 20: Zusammensetzung des Sammelgels

Nach der Polymerisation konnten die eingefrorenen Proteinlysate nach dem Auftauen im Verhältnis 5:1 mit 5x SDS Sample Buffer gemischt und für 5 Minuten bei 98 °C im Thermomixer denaturiert werden. Nach einem kurzen Abzentrifugieren wurden die Proben schließlich auf das Gel aufgetragen. In die letzte Tasche wurden 4 µl PageRuler™ Prestained Protein Ladder als Größenstandard pipettiert und Spannung angelegt. Je nach Proteingröße variierte die Laufzeit mittels des Systems Mini-PROTEAN® Tetra System bei 120 V zwischen 3 und 4 Stunden.

3.2.2.10 Western-Blot: Semidry-Blot Methode

Nach der Semidry-Blot Methode können Western-Blot Analysen durchgeführt werden. Der Western-Blot dient zum Nachweis von Proteinen, indem diese auf eine Trägermembran übertragen werden, das sogenannte Blotting.

Die hierfür verwendete 9 cm x 4,5 cm große PVDF-Membran wurde zuerst 5 Minuten in Methanol eingelegt, mit destilliertem Wasser gespült und weitere 5 Minuten in Anodenpuffer II inkubiert. Zur weiteren Vorbereitung mussten für etwa 5 Minuten 6 Stück des Blotting-Papiers in Anodenpuffer I, 3 Papiere in Anodenpuffer II und schließlich 9 Stück in Kathodenpuffer getränkt werden. Der Proteintransfer dauerte etwa 80 Minuten und erfolgte im Trans-Blot® SD Semi Dry Transfer Cell bei 225 mA. Die folgende Darstellung veranschaulicht den Aufbau der Semidry-Blot Methode.

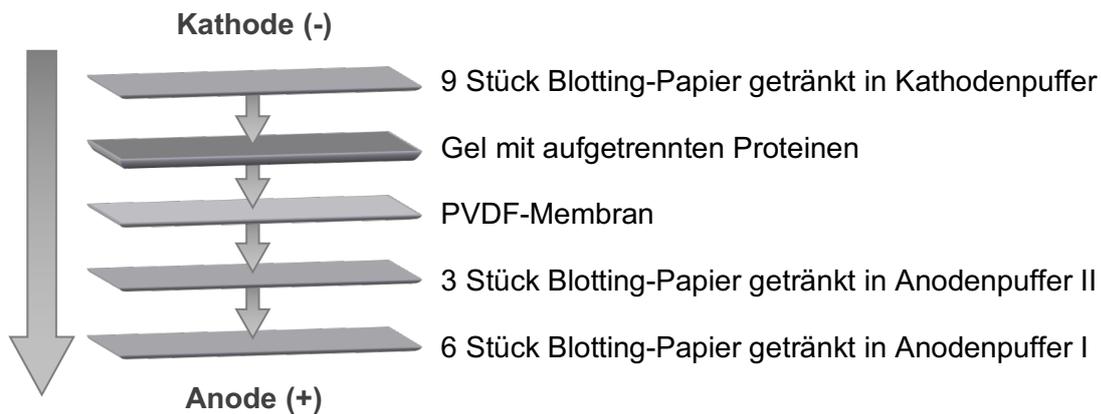


Abb. 8: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus des Western-Blot

3.2.2.11 Immundetektion

Um die gewünschten Banden detektierbar zu machen, verwendet man die Immundetektion, ein Antigen-Antikörper-Bindungsprinzip, und die Chemilumineszenz zur Visualisierung. Durch die Bindung von Primär- und Sekundärantikörper können spezifische Proteine erkannt und mittels Chemilumineszenz sichtbar gemacht werden.

Zur Vorbereitung musste die Membran nach erfolgreichem Western-Blot bei 4 °C über Nacht auf einem Rollenmischer inkubiert werden. Hierfür wurde diese mit 10 ml Antikörperverdünnungspuffer und dem jeweiligen Primärantikörper in ein 50 ml Reaktionsgefäß gegeben und auf den Rollenmischer gelegt. Nach 24 Stunden erfolgte im nächsten Schritt ein dreimaliger Waschvorgang für je 7 Minuten in Waschpuffer und anschließend eine erneute Inkubation auf dem Rollenmischer mit 10 ml Antikörperverdünnungspuffer und dem eingesetzten Sekundärantikörper für eine Stunde. Die Membran durchlief ein zweites Mal den dreimaligen Waschvorgang für je 7 Minuten in Waschpuffer. Danach konnte die PVDF-Membran für eine Minute in 10 ml SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate eingelegt, mit Frischhaltefolie bedeckt und im Molecular Imager ChemiDoc™ XRS+ entwickelt werden. Durch die Reaktion der mit Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper (Chemilumineszenz-Reaktion) und der immunfluoreszierenden Lösung wurden die Banden sichtbar und konnten mit der ImageLab Software 6.0. verarbeitet werden.

3.2.2.12 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie, auch FACS (fluorescence-activated cell sorting) genannt, stellt eine wissenschaftliche Methode dar, um verschiedene Zelleigenschaften zu ermitteln. So ist es beispielsweise mittels Durchflusszytometrie möglich, den DNA-Gehalt von Zellen zu bestimmen, wofür die Methode auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. Dies soll helfen, eine Aussage über eine eventuelle Zunahme der Aneuploidie treffen zu können.

Die Durchflusszytometrie erfolgte im BD FACSCanto-II flow cytometer. Für die Datenauswertung wurde die FACSDiva Software Version 6.1.1 verwendet.

Zur Vorbereitung des nachfolgenden Aneuploidie Assays mussten die unbehandelten Zellen über Nacht mit 70 %-igem Methanol fixiert werden. Schließlich erfolgte die Resuspension von DPBS mit 0,01 mg/ml RNAse. Nach einer 30-minütigen Inkubation wurde im nächsten Schritt das fluoreszierende Reagenz 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) in einer Konzentration von 1 µg/ml zugegeben. Die anschließende Auswertung der Durchflusszytometrie erfolgt mittels eines multizyklischen Algorithmus der ModFit LT 3.2 Software.

3.2.3 Statistische Methoden

Für die statistische Auswertung der *in vivo* Ergebnisse wurde die SPSS Version 25 (IBM, Ehningen) verwendet. Die erhobenen Daten wurden hierfür zuerst in Microsoft Excel gesammelt und aufbereitet. Für alle statistischen Tests wurde ein Signifikanzniveau von 5 % festgelegt.

3.2.3.1 Wilcoxon-Mann-Whitney-Test

Mit dem nicht-parametrischen Wilcoxon-Mann-Whitney-Test kann der Median des Expressionsscores eines Markers in einem Gewebe bestimmt und in zwei Gewebearten miteinander verglichen werden. Eine Überexpression liegt vor, wenn der Median des Expressionsscores im Tumorgewebe statistisch signifikant höher ist als der Median des entsprechenden Normalgewebes. Liegt der Expressionsscore im Tumorgewebe statistisch signifikant darunter, wird dies als verminderte Expression bezeichnet.

Für diejenigen Marker, bei denen eine Färbung an mehreren intrazellulären Lokalisationen vorlag, wurde der überwiegende Lokalisationsort als Grundlage für die Auswertung verwendet. Für Aurora-Kinase A und Aurora-Kinase B wurde die Färbung des Zellkernes gewertet.

3.2.3.2 Korrelationsanalyse

Mittels der Spearman-Korrelation können die jeweiligen Expressionsprofile der Marker untereinander bezüglich einer Korrelation (bivariant) verglichen werden.

3.2.3.3 Kreuz-Tabellen

Mit Hilfe von Kreuz-Tabellen-Analysen lassen sich Zusammenhänge zwischen Marker-Expression und klinischen Daten der Kollektive untersuchen. Die angewendeten Tests waren hierfür der Chi-Quadrat-Test, sowie für geringere Fallzahlen der exakte Test nach Fisher.

3.2.3.4 Kaplan-Meier Methode und Log-Rank-Test

Die Kaplan-Meier Methode dient zur Darstellung von Überlebenszeitanalysen. Überlebenszeitanalysen ermöglichen die Berechnung der Wahrscheinlichkeit, dass ein Ereignis bis zu einem bestimmten Zeitpunkt eintritt. So lassen sich Überlebenszeiten, wie das Gesamtüberleben oder das progressionsfreie Überleben, also die Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs innerhalb einer Beobachtungsgruppe hinsichtlich eines Merkmals oder zwischen zwei Beobachtungsgruppen, die sich in einem Merkmal unterscheiden, beschreiben.

Hierfür wird der Tod durch die Tumorerkrankung bei Beurteilung des Gesamtüberlebens bzw. das Eintreten eines Rezidivs bei Betrachtung des progressionsfreien Überlebens als Ereignis definiert. Tritt dieses definierte Ereignis bei einem Fall im Beobachtungszeitraum nicht ein, oder ein Patient scheidet durch einen tumorunabhängigen Tod aus, wird dieser Fall zensiert und geht somit ab diesem Zeitpunkt nicht mehr in die statistische Berechnung ein (Ziegler et al., 2007b).

Der Log-Rank-Test ist das Standardverfahren in der Überlebenszeitanalyse für Gruppenvergleiche. Er dient zur Überprüfung, ob das Eintreten der Ereignisse in zufälliger Reihenfolge, unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit geschieht (Nullhypothese) oder eine Gruppe der anderen überlegen ist. Die größte Power besitzt der Log-Rank-Test für Gruppen, in denen die Ereignisraten proportional zueinander sind. Ist dies nicht der Fall, beispielsweise an einer Überkreuzung der Kaplan-Meier-Kurven, eignet sich eher der generalisierte Wilcoxon-Test zur Ermittlung eines Unterschieds zwischen den Gruppen (Ziegler et al., 2007a).

3.2.3.5 Cox-Regressions-Modell

Multivariant-Analysen mittels Cox-Regressions-Modellen dienen zur Verifizierung und zur weiteren Beurteilung der Ergebnisse der Überlebenszeitanalyse. In dieser Arbeit wurden hierfür Multivariant-Analysen in Form von Cox-Regressions-Modellen verwendet.

3.2.3.6 Ungepaarter t-Test

Die statistische Auswertung der Zellkulturdaten erfolgte mittels der Statistik-Software Prism GraphPad 7.0d. Mit diesem Programm war es möglich, neben der Auswertung der Ergebnisse auch die Darstellung derselben in Form von Graphen durchzuführen und die entsprechenden p-Werte zu berechnen. Um eine statistische Aussage treffen zu können, wurden die Zellkulturversuche jeweils drei Mal durchgeführt. Der ungepaarte t-Test mit einem 95 % Konfidenzintervall gab Rückschlüsse auf die Signifikanz der unterschiedlichen Behandlungen in Bezug auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle der entsprechenden Wildtyp Zelllinie.

Die folgende Tabelle zeigt die Definition der einzelnen Signifikanzniveaus.

Signifikanzniveau	Darstellung
p < 0,05	* (signifikant)
p < 0,01	** (sehr signifikant)
p < 0,001	*** (hoch signifikant)
p < 0,0001	**** (höchst signifikant)

Tab. 21: Definition der Signifikanzniveaus

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung des Patientenkollektivs

Charakteristik	HNSCC (N=434)	
Alter – Jahre		
Median	73	
Range	56 – 90	
Geschlecht		
Männer	362	83,4 %
Frauen	72	16,6 %
T-Stadium		
T1	42	9,7 %
T2	114	26,3 %
T3	100	23,0 %
T4a	124	28,6 %
T4b	1	0,2 %
Tx	1	0,2 %
Unbekannt	52	12,0 %
N-Stadium		
N0	132	30,4 %
N1	41	9,4 %
N2a	9	2,1 %
N2b	93	21,4 %
N2c	92	21,2 %
N3	10	2,3 %
Nx	3	0,7 %
Unbekannt	54	12,4 %
M-Stadium		
M0	348	80,2 %
M1	13	3,0 %
Mx	20	4,6 %
Unbekannt	53	12,2 %
Grading		
G1	21	4,8 %

G2	185	42,6 %
G3	130	30,0 %
Gx	7	1,6 %
Unbekannt	91	21,0 %
Stadium		
Stadium I	29	6,7 %
Stadium II	55	12,7 %
Stadium III	58	13,4 %
Stadium IVA	213	49,1 %
Stadium IVB	17	3,9 %
Stadium IVC	6	1,4 %
Unbekannt	51	11,8 %
Lokalisation		
Mundhöhle	85	19,6 %
Oropharynx	151	34,9 %
Hypopharynx	94	21,7 %
Larynx	99	22,9 %
Andere	4	0,9 %
Alkoholkonsum		
Regelmäßig	183	42,2 %
Unregelmäßig	80	18,4 %
Unbekannt	171	39,4 %
Tabakkonsum		
Raucher	208	47,9 %
Nicht-/ Ex-Raucher	80	18,4 %
Unbekannt	146	33,6 %

Tab. 22: Charakterisierung des Patientenkollektivs

4.2 Experimentelle Auswertung

4.2.1 Aurora-Kinase A Polymorphismus

Der Aurora-Kinase A Polymorphismus konnte mittels DNA-Isolierung aus FFPE-Material und PCR nachgewiesen werden. Zuerst wurde die DNA der Zelllinien extrahiert und anschließend eine semiquantitative Realtime-PCR für die Aurora-Kinase A am Genlocus Phe₃₁₁Ile durchgeführt. Die Gewebeproben konnten anschließend mittels eines

Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) betreffend des Aurora-Kinase A Polymorphismus in homozygot für Phenylalanin (Phe/Phe), heterozygot (Phe/Ile) und homozygot für Isoleucin (Ile/Ile) eingeteilt werden. Das 165 Basenpaar lange PCR-Produkt, welches die Aurora-Kinase A kodiert, wurde mit dem Enzym Apol verdaut.

Bei dem untersuchten Kollektiv fand sich im Tumorgewebe eine Verteilung von Phe/Phe, Phe/Ile zu Ile/Ile von 52,2 %, 44,2 % zu 3,6 %. Im Normalwebe von 58,5 %, 41,5 % zu 0 %. Die unten angeführte Abbildung veranschaulicht den Verlauf der Amplifikations- bzw. Schmelzkurve der durchgeführten semiquantitativen RT-PCR. Die roten Kurven zeigen dabei den Verlauf der beiden Positivkontrollen, die grünen Kurven den der DNA-Proben.

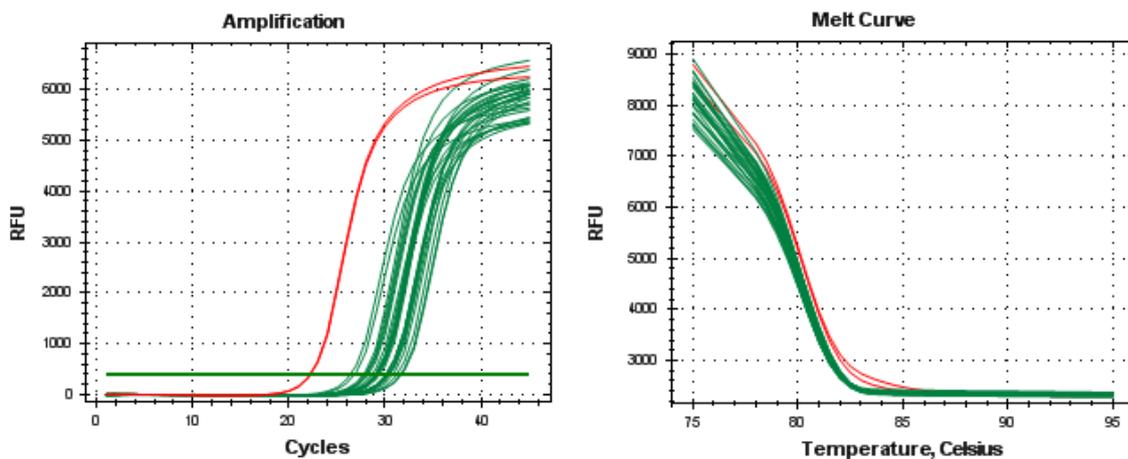


Abb. 9: Beispiel einer Amplifikations- (links) und Schmelzkurve (rechts) der semiquantitativen RT-PCR

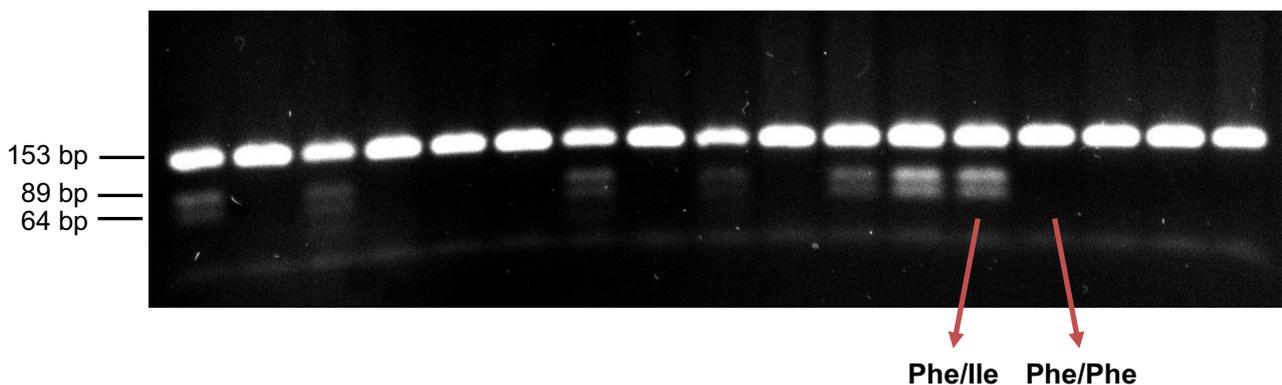


Abb. 10: Beispiel einer Gelelektrophorese zur Ermittlung des Aurora-Kinase A Polymorphismus

Die Sequenzierung bestätigte die Ergebnisse des Aurora-Kinase A Polymorphismus aus der PCR und der Gelelektrophorese. Die folgenden Abbildungen zeigen exemplarisch das Elektropherogramm für die drei Varianten des Aurora-Kinase A Polymorphismus.

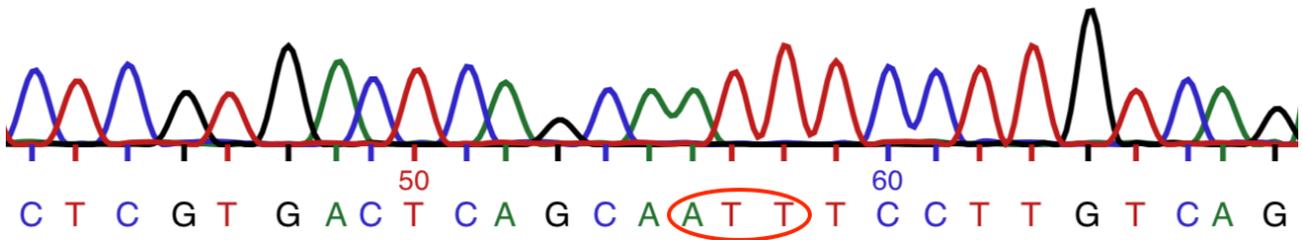


Abb. 11: Elektropherogramm: Beispiel für Aurora-Kinase A Polymorphismus homozygot Phe/Phe

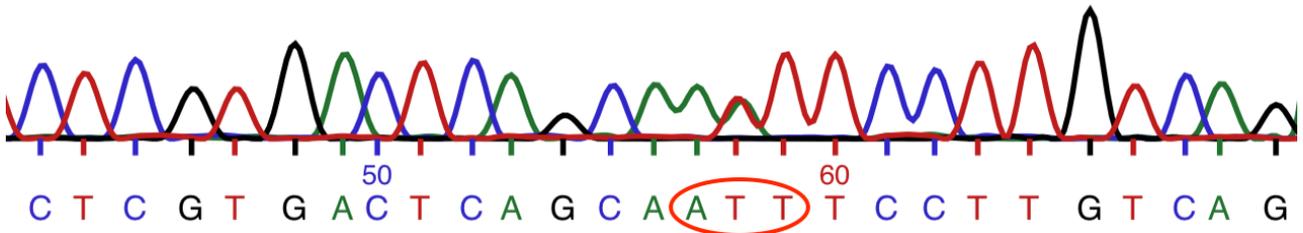


Abb. 12: Elektropherogramm: Beispiel für Aurora-Kinase A Polymorphismus heterozygot Phe/Ile

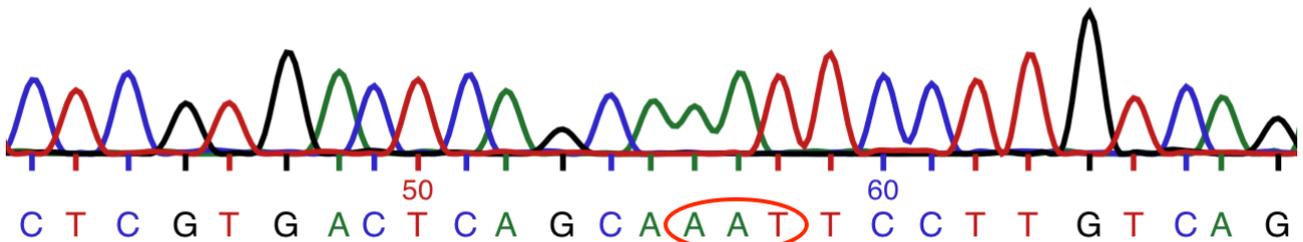


Abb. 13: Elektropherogramm: Beispiel für Aurora-Kinase A Polymorphismus homozygot Ile/Ile

4.2.2 Crystal-Violett Proliferations-Assay

Zur Untersuchung des Einflusses des Aurora-Kinase A Polymorphismus und des HPV-Status *in vitro* wurden entsprechend passende vier Zelllinien für die Proliferationsanalysen verwendet: UD-SCC-2 (AurkA Phe/Phe, HPV positiv), UD-SCC-5 (AurkA Phe/Phe, HPV negativ), UP-SCC-154 (AurkA Phe/Ile, HPV positiv), SAS (AurkA Phe/Ile, HPV negativ). Der Crystal-Violett Proliferations-Assay erlaubt die Bestimmung der Zellproliferation nach Anwendung der Inhibitoren Cetuximab sowie Cetuximab in Kombination mit Docetaxel. Die Zellen wurden hierbei mit den unter 3.2.2.5 angegebenen Konzentrationen behandelt und anschließend protokollgemäß ausgewertet.

Beide HPV positiven Zelllinien präsentierten ein sehr gutes Ansprechen auf die Behandlung. Die stärkste antiproliferative Wirkung durch die Mono-, als auch durch die Kombinationstherapie zeigte sich bei der HPV positiven und AurkA heterozygoten Zelllinie UP-SCC-154. Der kombinierte Einsatz aus Cetuximab und Docetaxel konnte die Proliferation im Vergleich zur alleinigen Verwendung von Cetuximab nochmals statistisch hoch signifikant hemmen (p-Wert = 0,0017). Dieser Trend lässt sich auch für die zweite Aurora-Kinase A heterozygote Zelllinie SAS verzeichnen.

Weder die Behandlung mit Cetuximab alleine noch in Kombination mit Docetaxel konnte bei der HPV negativen AurkA homozygoten Zelllinie UD-SCC-5 einen Effekt erzielen. Die Cetuximab-Therapie ermöglichte bei der Zelllinie SAS eine signifikante Verminderung des Überlebens.

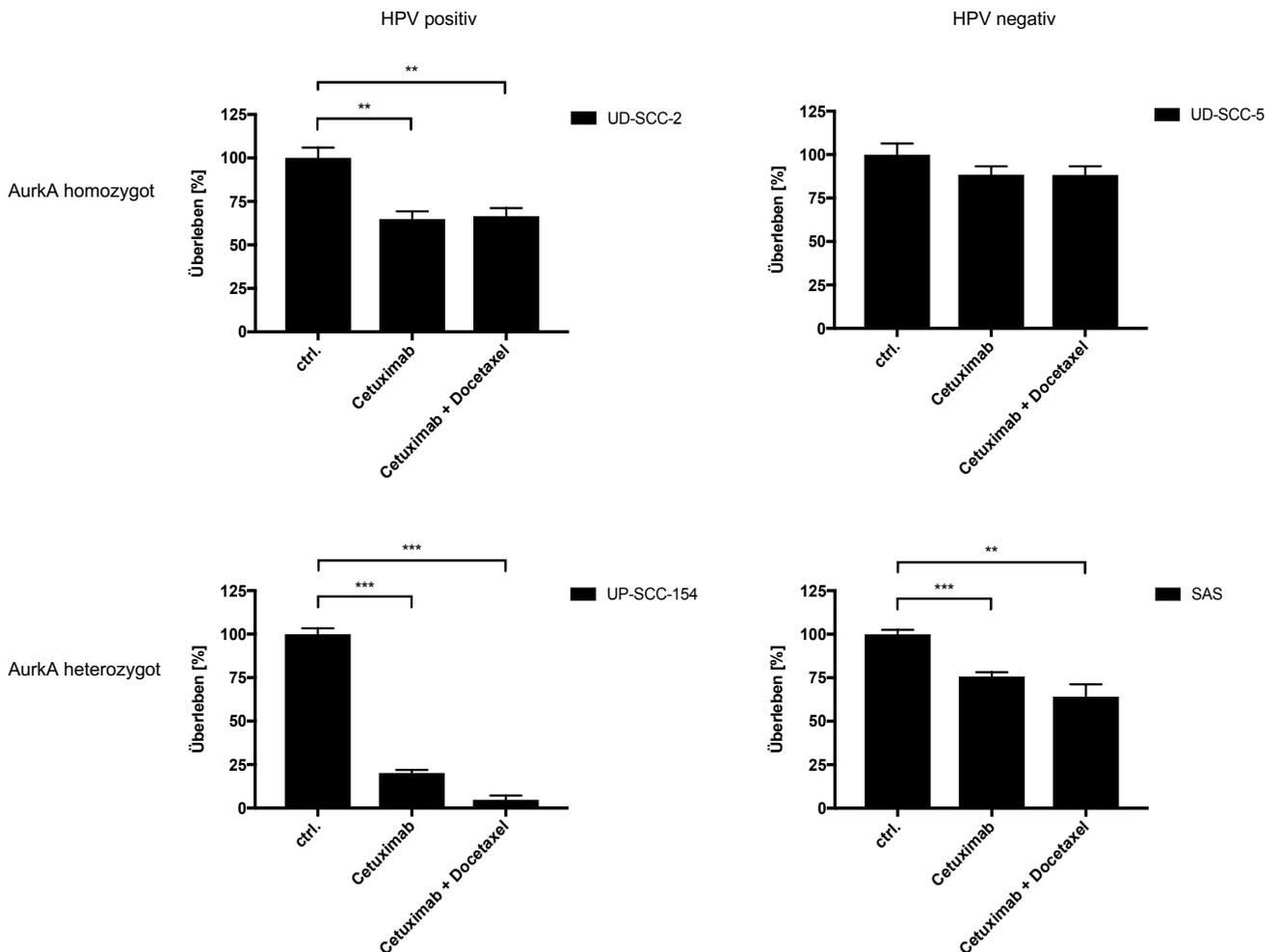


Abb. 14: Proliferations-Analysen der verwendeten Zelllinien UD-SCC-2, UD-SCC-5, UP-SCC-154 und SAS

Zelllinie	Behandlung	p-Wert
UD-SCC-2 (HPV positiv / AurkA homozygot)	Cetuximab	0,0022 (**)
	Cetuximab + Docetaxel	0,0020 (**)
UP-SCC-154 (HPV positiv / AurkA heterozygot)	Cetuximab	< 0,001 (***)
	Cetuximab + Docetaxel	< 0,001 (***)
UD-SCC-5 (HPV negativ / AurkA homozygot)	Cetuximab	0,07
	Cetuximab + Docetaxel	0,078
SAS (HPV negativ / AurkA heterozygot)	Cetuximab	< 0,001 (***)
	Cetuximab + Docetaxel	0,007 (**)

Tab. 23: p-Werte der Proliferationsanalysen nach Einzel- bzw. Kombinationsbehandlung der Zelllinien; Signifikanz bezieht sich jeweils auf die unbehandelte Kontrolle

Um den Einfluss der zu untersuchenden Merkmale auf die Proliferation besser auswerten zu können, wurden die Ergebnisse der Zelllinien je nach Eigenschaft in Gruppen zusammengefasst und ausgewertet.

Wie die folgenden Graphen zeigen, ergab die Proliferationsanalyse nach Behandlung mit dem Inhibitor Cetuximab ein statistisch signifikant besseres Ansprechen der HPV positiven Zelllinien im Vergleich zu den HPV negativen Zelllinien.

Dieser antiproliferative Effekt zeigte sich auch für die AurkA heterozygoten Zelllinien verstärkt gegenüber den AurkA homozygoten.

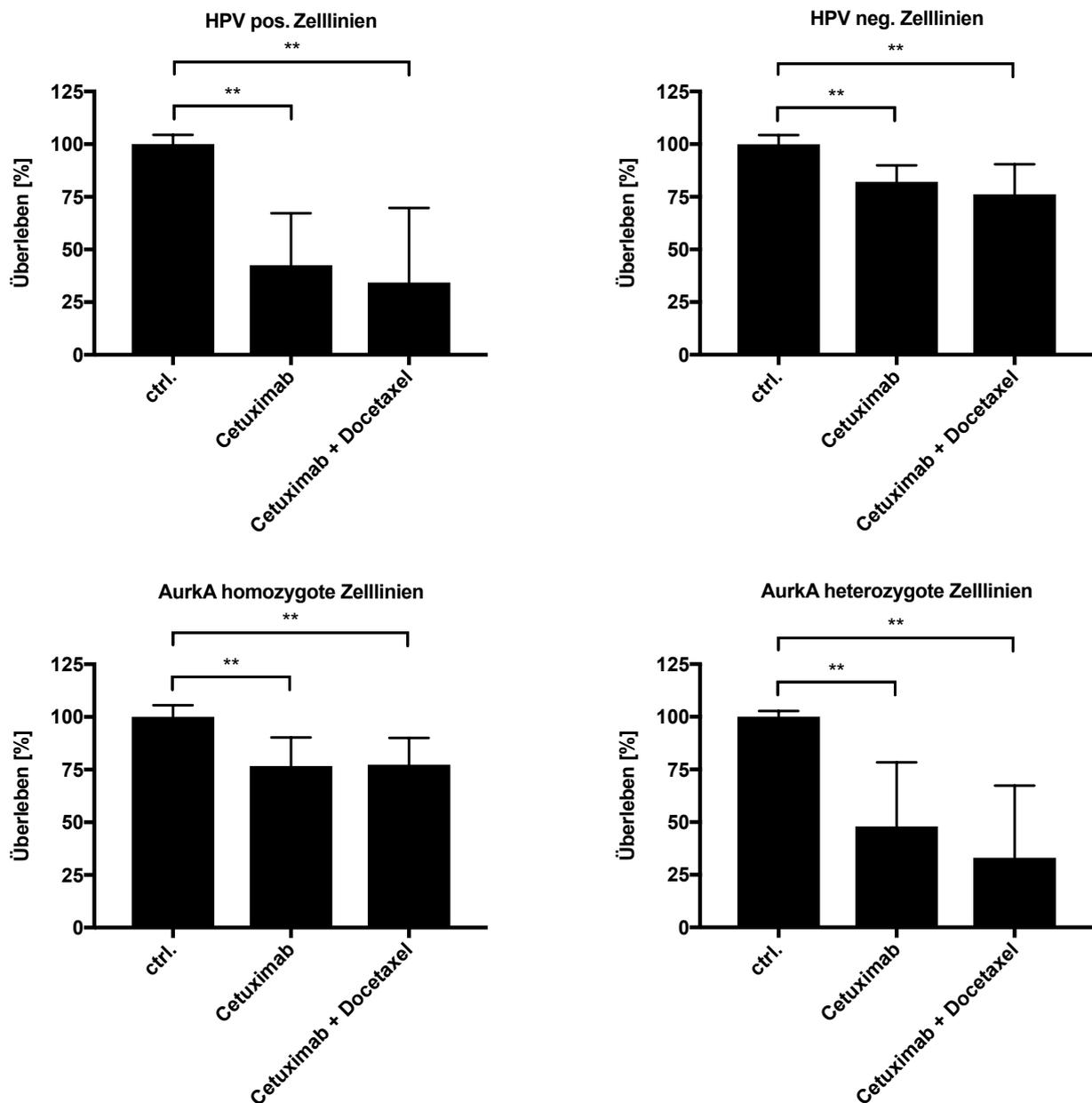


Abb. 15: Einfluss der Einzel- bzw. Kombinationsbehandlung auf die Proliferation in Abhängigkeit von HPV-Status bzw. Aurora-Kinase A Polymorphismus

Zelllinien	Behandlung	p-Wert
HPV positiv	Cetuximab	0,002 (**)
	Cetuximab + Docetaxel	0,0054 (**)
HPV negativ	Cetuximab	0,0013 (**)
	Cetuximab + Docetaxel	0,0083 (**)
AurkA homozygot	Cetuximab	0,0067 (**)
	Cetuximab + Docetaxel	0,0054 (**)
AurkA heterozygot	Cetuximab	0,084 (**)
	Cetuximab + Docetaxel	0,0044 (**)

Tab. 24: p-Werte der Proliferationsanalysen nach Einzel- bzw. Kombinationsbehandlung in Abhängigkeit von HPV-Status bzw. Aurora-Kinase A Polymorphismus; Signifikanz bezieht sich jeweils auf die unbehandelte Kontrolle

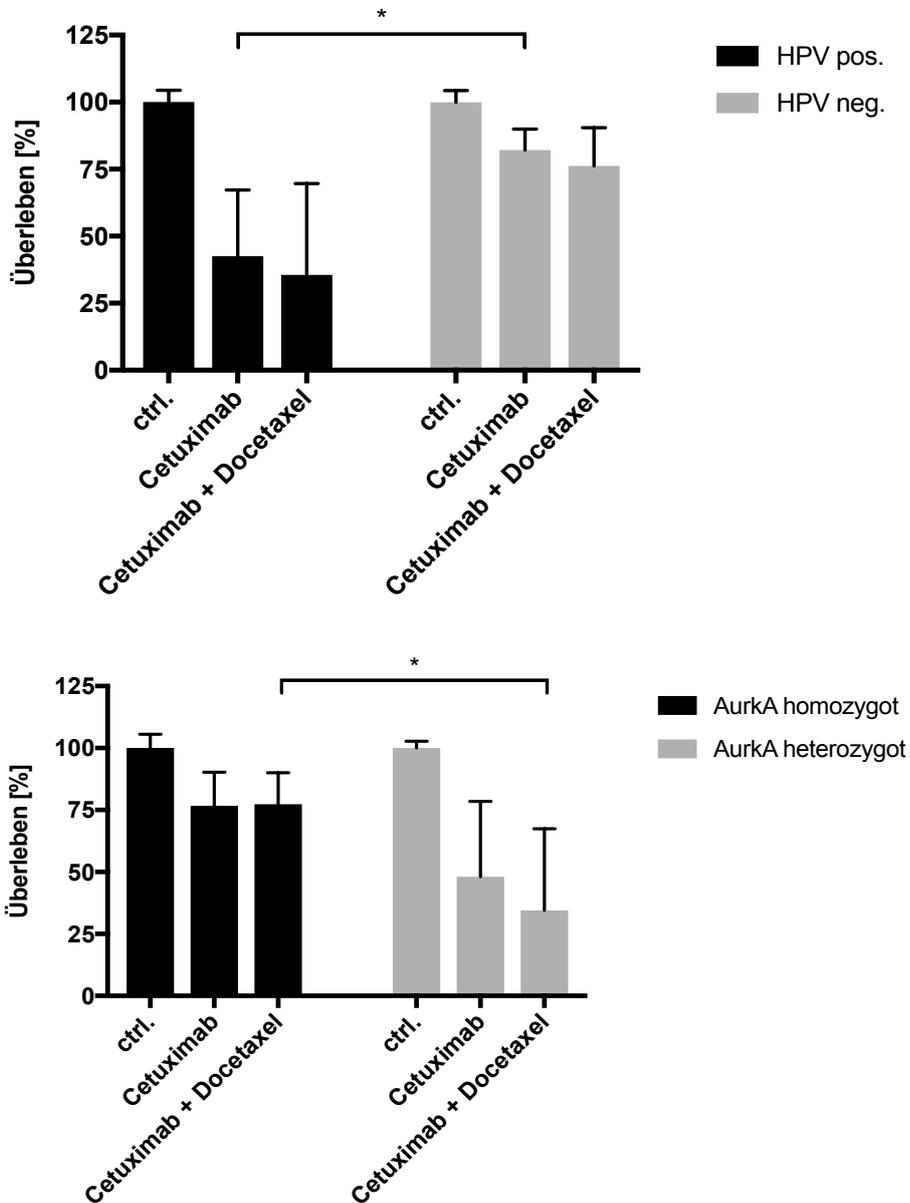


Abb. 16: Gruppenvergleich des Einflusses der Einzel- bzw. Kombinationsbehandlung auf die Proliferation in Abhängigkeit von HPV-Status bzw. Aurora-Kinase A Polymorphismus

Gruppe	Behandlung	p-Wert
HPV positiv vs. HPV negativ	Cetuximab	0,011 (*)
	Cetuximab + Docetaxel	0,067
AurkA homozygot vs. AurkA heterozygot	Cetuximab	0,062
	Cetuximab + Docetaxel	0,041 (*)

Tab. 25: p-Werte der Gruppenvergleiche des Einflusses der Einzel- bzw. Kombinationsbehandlung auf die Proliferation in Abhängigkeit von HPV-Status bzw. Aurora-Kinase A Polymorphismus

Die stärkste Proliferationshemmung ergab sich für die Kombination aus heterozygotem AurkA-Polymorphismus und HPV positiven Status, sowohl für die Einzel- als auch für die Kombinationsbehandlung.

Dabei konnte die Kombinationsbehandlung aus Cetuximab und Docetaxel die Proliferation der AurkA heterozygoten Zelllinien mit HPV-Positivität im Vergleich zur alleinigen Cetuximab-Verabreichung nochmals signifikant reduzieren (p-Wert = 0,0017 (**)). Dieser Trend ließ sich auch für die AurkA heterozygoten Zelllinien mit HPV negativem Status beobachten (p-Wert = 0,0929). Dahingegen zeigte sich bei den Zellen mit homozygotem AurkA-Polymorphismus, unabhängig vom HPV-Status, keine verstärkte Proliferationshemmung durch den zusätzlichen Einsatz von Docetaxel.

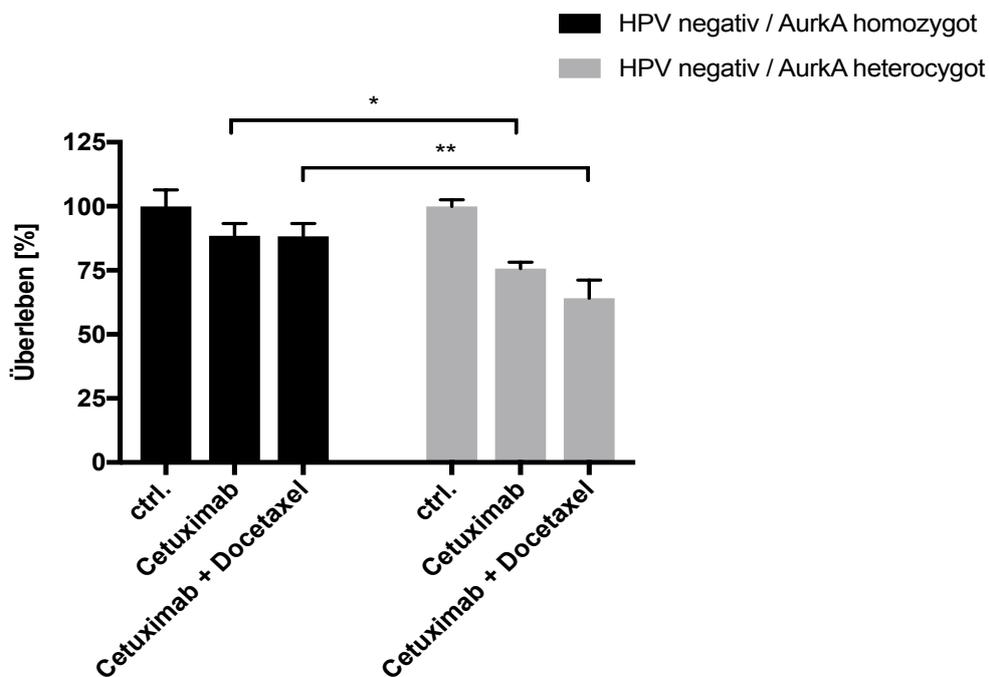
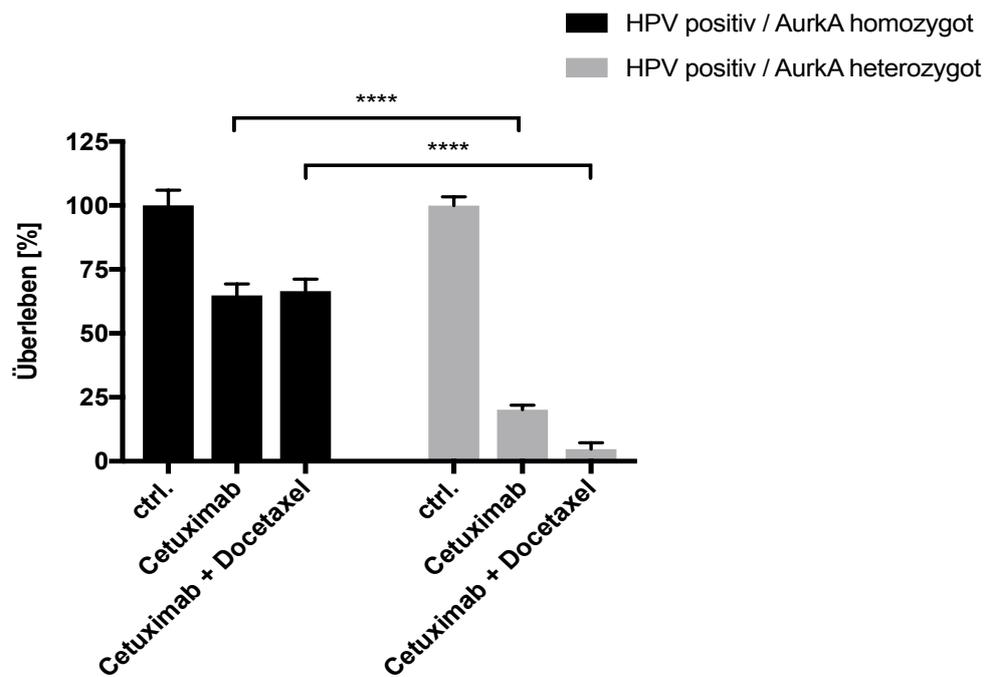


Abb. 17: Gruppenvergleich des Einflusses der Einzel- bzw. Kombinationsbehandlung auf die Proliferation in Abhängigkeit von HPV-Status und Aurora-Kinase A Polymorphismus

Gruppe	Behandlung	p-Wert
HPV positiv / Aurka homozygot vs. HPV positiv / Aurka heterozygot	Cetuximab	< 0,0001 (****)
	Cetuximab + Docetaxel	< 0,0001 (****)
HPV negativ / Aurka homozygot vs. HPV negativ / Aurka heterozygot	Cetuximab	0,014 (*)
	Cetuximab + Docetaxel	0,0084 (**)

Tab. 26: p-Werte der Gruppenvergleiche des Einflusses der Einzel- bzw. Kombinationsbehandlung auf die Proliferation in Abhängigkeit von HPV-Status und Aurora-Kinase A Polymorphismus

4.2.3 Colony-Formations-Assay

Der Colony-Formations-Assay dient der Beobachtung des klonogenen Überlebens der jeweiligen Zelllinien über einen längeren Zeitraum hinweg. Jede der vier Zelllinien wurde mit Cetuximab bzw. mit der Kombination aus Cetuximab und Docetaxel behandelt. Die Ergebnisse sind in den unten folgenden Abbildungen (Abb. 18–21) veranschaulicht.

Bei beiden HPV positiven Zelllinien UD-SCC-2 und UP-SCC-154 konnte das klonogene Überleben durch den Einsatz von Cetuximab alleine oder der Kombination beider Substanzen statistisch hoch signifikant reduziert werden, unabhängig vom Aurora-Kinase A Polymorphismus.

Bei den HPV negativen Zelllinien präsentierte sich die antiproliferative Hemmung deutlich geringer. So konnte bei UD-SCC-5 kein Effekt der Behandlung festgestellt werden.

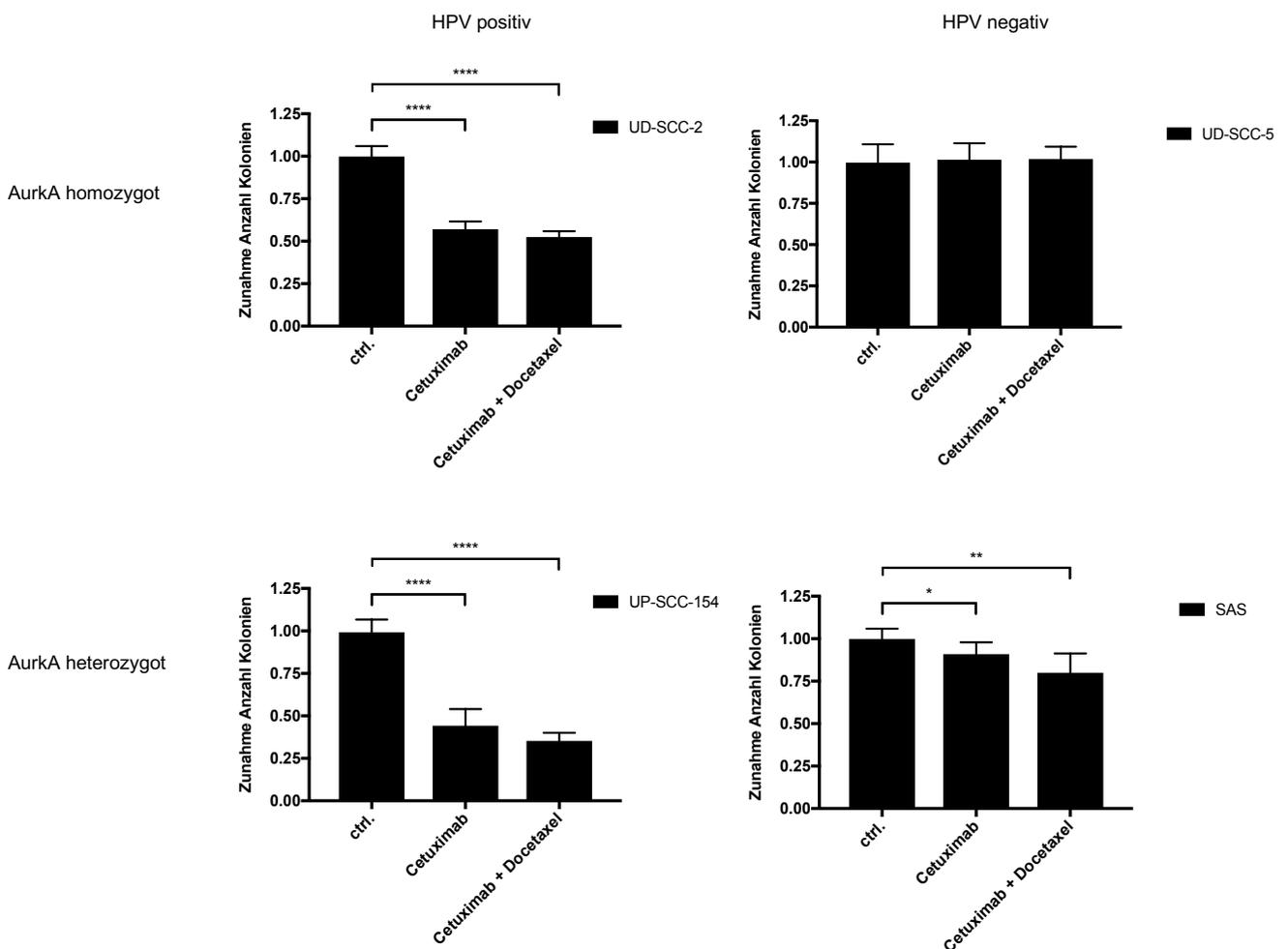


Abb. 18: Einfluss der Einzel- bzw. Kombinationsbehandlung auf das klonogene Überleben der verwendeten Zelllinien UD-SCC-2, UD-SCC-5, UP-SCC-154 und SAS

Zelllinie	Behandlung	p-Wert
UD-SCC-2 (HPV positiv / AurkA homozygot)	Cetuximab	< 0,0001 (****)
	Cetuximab + Docetaxel	< 0,0001 (****)
UP-SCC-154 (HPV positiv / AurkA heterozygot)	Cetuximab	< 0,0001 (****)
	Cetuximab + Docetaxel	< 0,0001 (****)
UD-SCC-5 (HPV negativ / AurkA homozygot)	Cetuximab	0,7726
	Cetuximab + Docetaxel	0,7011
SAS (HPV negativ / AurkA heterozygot)	Cetuximab	0,0397 (*)
	Cetuximab + Docetaxel	0,0057 (**)

Tab. 27: p-Werte des Colony-Formations-Assays nach Einzel- bzw. Kombinationsbehandlung der Zelllinien; Signifikanz bezieht sich jeweils auf die unbehandelte Kontrolle

Um den Einfluss der zu untersuchenden Merkmale auf das klonogene Überleben besser auswerten zu können, wurden die Ergebnisse der Zelllinien auch hier je nach Eigenschaft in Gruppen zusammengefasst und ausgewertet.

Wie die nachfolgenden Abbildungen zeigen, ergab sich bei den HPV positiven Zelllinien ein statistisch hoch signifikant besseres Ansprechen auf die Behandlung.

Bei den HPV negativen Zelllinien hingegen hatte der Einsatz sowohl von Cetuximab alleine, als auch in Kombination mit Docetaxel, keinen Einfluss auf das klonogene Überleben.

Sowohl die Cetuximab-Monotherapie als auch die Kombinationsbehandlung konnte bei den AurkA homozygoten und AurkA heterozygoten Zelllinien das klonogene Überleben jeweils signifikant reduzieren. Im Gruppenvergleich zeigte sich beim Aurora-Kinase A Polymorphismus allerdings kein statistisch signifikanter Unterschied.

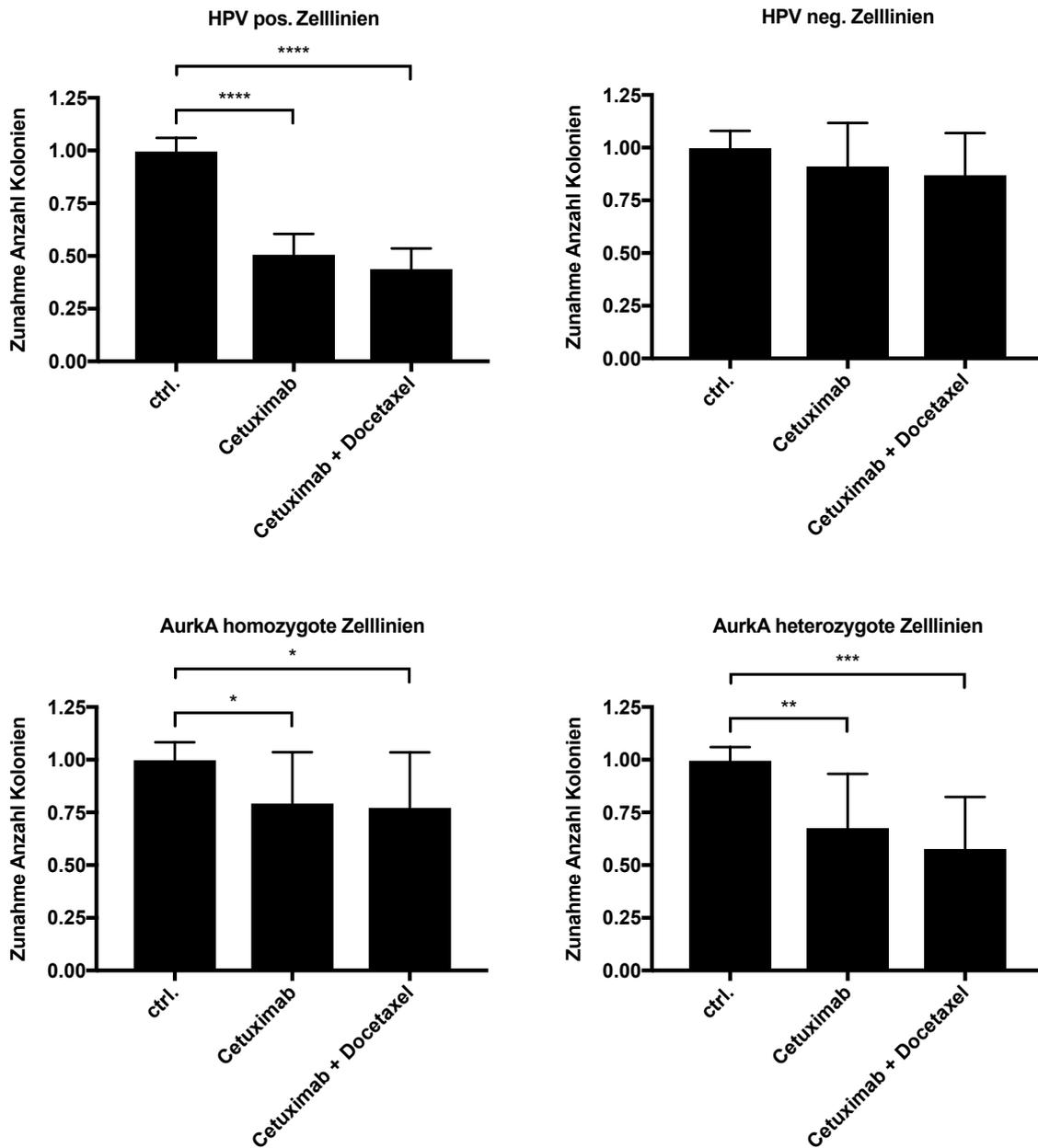


Abb. 19: Einfluss der Einzel- bzw. Kombinationsbehandlung auf das klonogene Überleben in Abhängigkeit von HPV-Status bzw. Aurora-Kinase A Polymorphismus

Zelllinien	Behandlung	p-Wert
HPV positiv	Cetuximab	< 0,0001 (****)
	Cetuximab + Docetaxel	< 0,0001 (****)
HPV negativ	Cetuximab	0,3559
	Cetuximab + Docetaxel	0,0874
AurkA homozygot	Cetuximab	0,016 (*)
	Cetuximab + Docetaxel	0,0142 (*)
AurkA heterozygot	Cetuximab	0,0012 (**)
	Cetuximab + Docetaxel	< 0,001 (***)

Tab. 28: p-Werte des Colony-Formations-Assays nach Einzel- bzw. Kombinationsbehandlung in Abhängigkeit von HPV-Status bzw. Aurora-Kinase A Polymorphismus; Signifikanz bezieht sich jeweils auf die unbehandelte Kontrolle

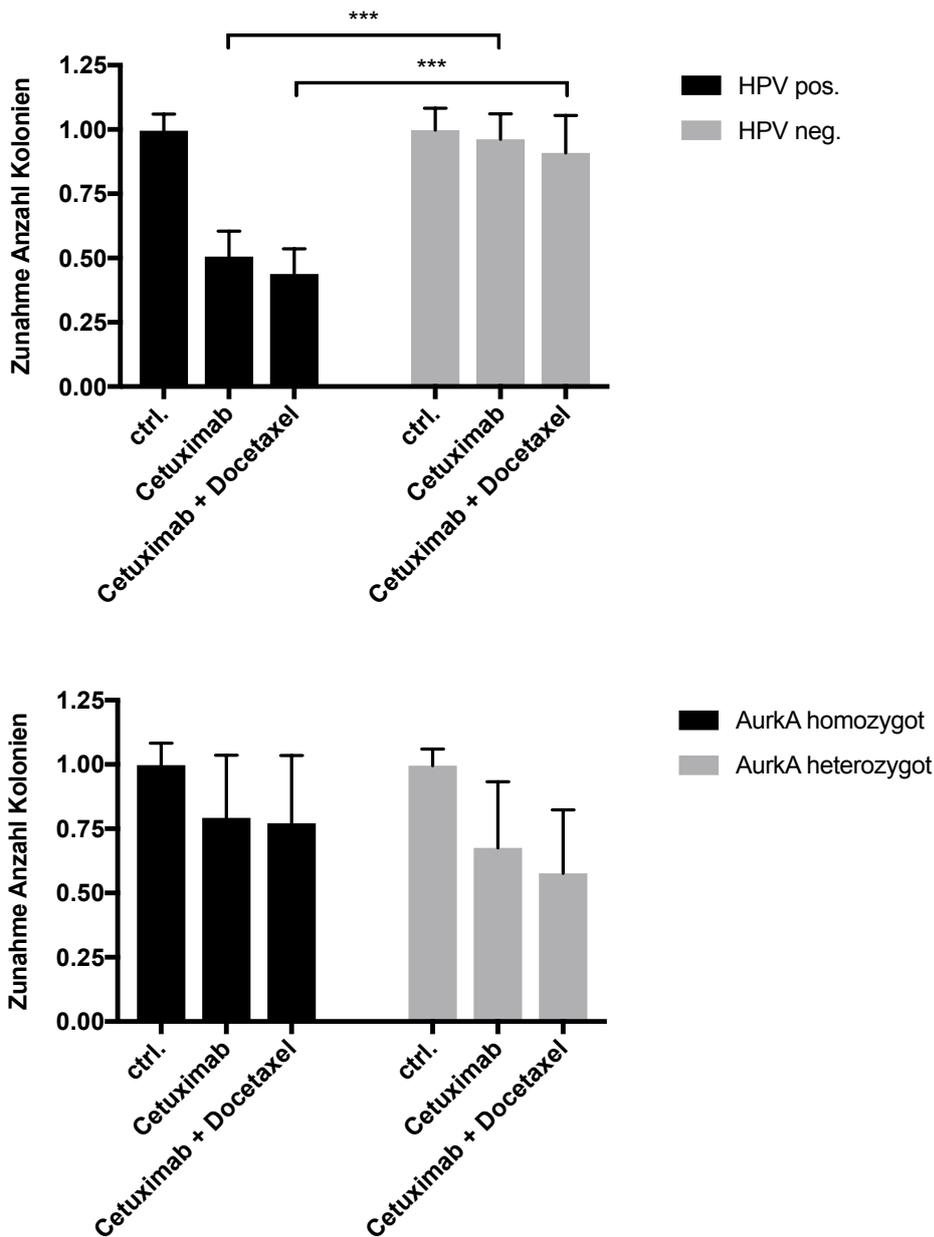


Abb. 20: Gruppenvergleich des Einflusses der Einzel- bzw. Kombinationsbehandlung auf das klonogene Überleben in Abhängigkeit von HPV-Status und Aurora-Kinase A Polymorphismus

Gruppe	Behandlung	p-Wert
HPV positiv vs. HPV negativ	Cetuximab	< 0,001 (***)
	Cetuximab + Docetaxel	< 0,001 (***)
Aurka homozygot vs. Aurka heterozygot	Cetuximab	0,2664
	Cetuximab + Docetaxel	0,0756

Tab. 29: p-Werte der Gruppenvergleiche des Einflusses der Einzel- bzw. Kombinationsbehandlung auf das klonogene Überleben in Abhängigkeit von HPV-Status und Aurora-Kinase A Polymorphismus

Auch bei der Inhibition des klonogenen Überlebens zeigte sich der deutlichste Behandlungseffekt bei der Kombination aus heterozygotem Aurora-Kinase A Polymorphismus und positivem HPV-Status.

Ebenfalls ließ sich auch bei diesem Versuch bei den heterozygoten Zelllinien eine nochmals zusätzlich verstärkte Hemmung des klonogenen Überlebens bei der kombinierten Verwendung von Cetuximab und Docetaxel im Vergleich zur Cetuximab-Monobehandlung beobachten (AurkA heterozygot und HPV positiv p-Wert = 0,0852; AurkA heterozygot und HPV negativ p-Wert = 0,0765).

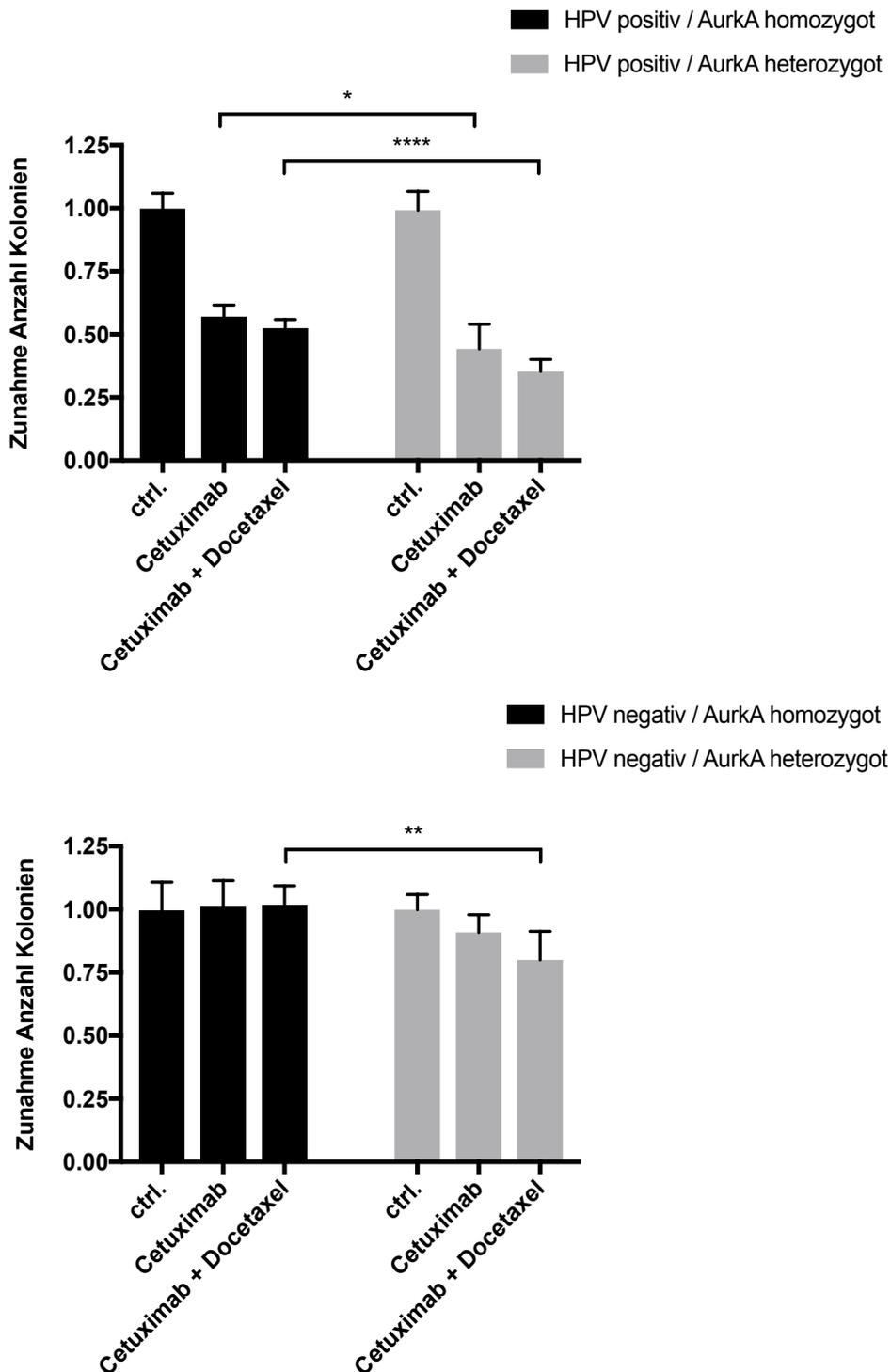


Abb. 21: Gruppenvergleich des Einflusses der Einzel- bzw. Kombinationsbehandlung auf das klonogene Überleben in Abhängigkeit von HPV-Status und Aurora-Kinase A Polymorphismus

Gruppe	Behandlung	p-Wert
HPV positiv / AurkA homozygot vs. HPV positiv / AurkA heterozygot	Cetuximab	0,017 (*)
	Cetuximab + Docetaxel	< 0,0001 (****)
HPV negativ / AurkA homozygot vs. HPV negativ / AurkA heterozygot	Cetuximab	0,06
	Cetuximab + Docetaxel	0,0028 (**)

Tab. 30: p-Werte der Gruppenvergleiche des Einflusses der Einzel- bzw. Kombinationsbehandlung auf das klonogene Überleben in Abhängigkeit von HPV-Status und Aurora-Kinase A Polymorphismus

4.2.4 Western-Blot: Semidry-Blot Methode

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der Marker Aurora-Kinase A und B, p-Akt Ser473, sowie Survivin auch auf Protein-Ebene der Zelllinien untersucht. Dies erfolgte mit Hilfe der Semidry-Blot Methode. Auch bei diesem *in vitro* Versuch wurden wiederum die vier Zelllinien UD-SCC-2 (HPV positiv / AurkA homozygot), UP-SCC-154 (HPV positiv / AurkA heterozygot), UD-SCC-5 (HPV negativ / AurkA homozygot), SAS (HPV negativ / AurkA heterozygot) verwendet, um einen Vergleich der biochemischen Vorgänge anstellen zu können. Dabei wurde die Protein-Expression vor, als auch nach Behandlung mit Cetuximab bzw. nach Einsatz der Kombination der beiden Substanzen Cetuximab und Docetaxel detektiert.

Die Auswertung zeigte erhöhte Protein-Level von Survivin, p-Akt Ser473, als auch Aurora-Kinase B in den heterozygoten Zelllinien verglichen mit den homozygoten Zelllinien. Die Behandlung der Zellen insbesondere mit der Kombination aus Cetuximab und Docetaxel führte bei den HPV negativen Zelllinien zu einer Reduktion der AurkA-Proteinexpression. Am stärksten konnte der Effekt bei der homozygoten Zellreihe UD-SCC-5 beobachtet werden.

Die Ergebnisse des Western-Blots sind in Abbildung 22 dargestellt.

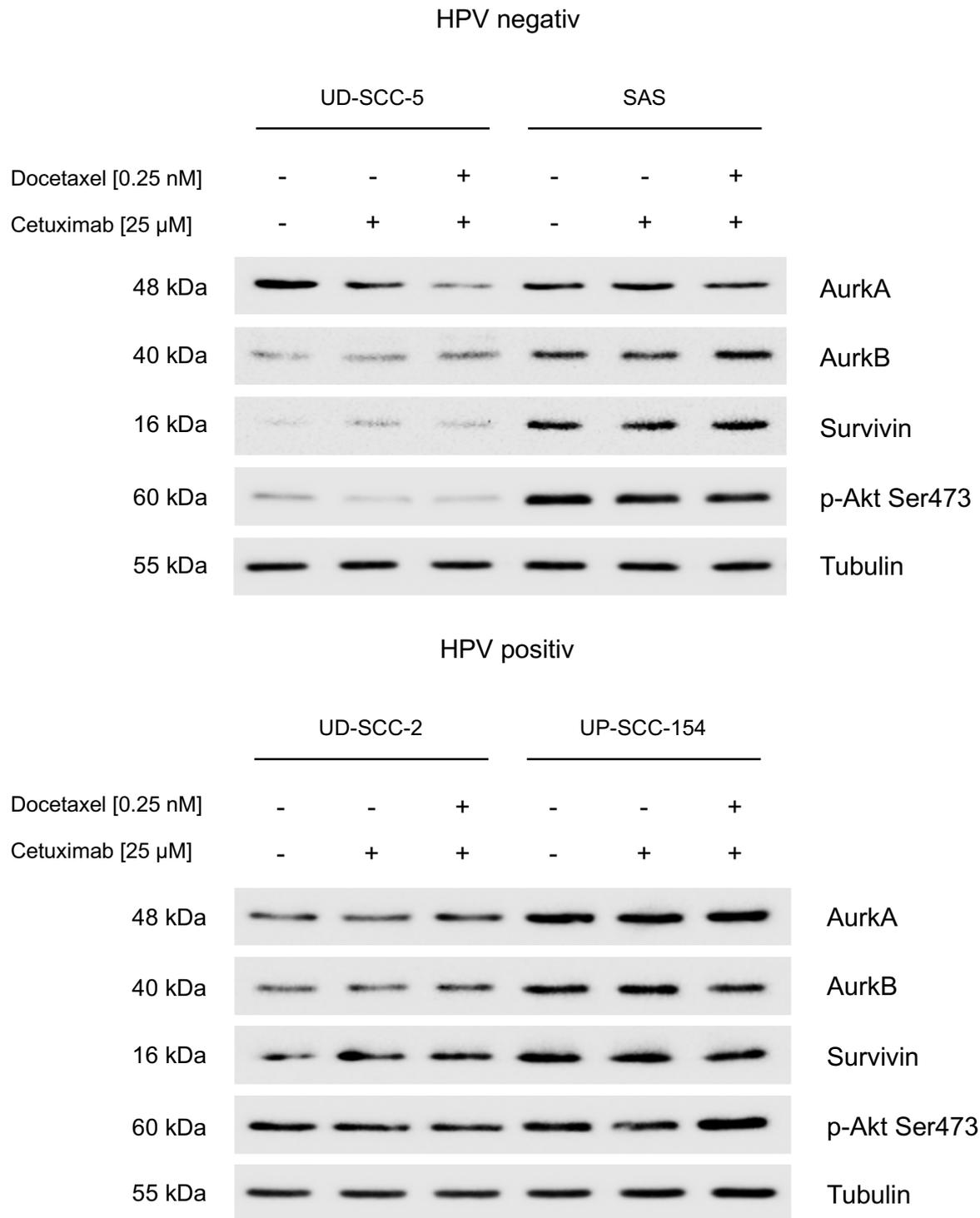


Abb. 22: Ergebnisse des Western-Blots

4.2.5 Durchflusszytometrie (FACS)

Um den Zusammenhang zwischen dem Aurora-Kinase A Polymorphismus und den potentiellen Veränderungen des DNA-Gehalts und damit eine mögliche Zunahme der Aneuploidie aufzuzeigen, wurde der DNA-Gehalt der Zellen *in vitro* mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Diese Analyse wurde an unbehandelten UD-SCC-2 (HPV positiv / AurkA homozygot), UP-SCC-154 (HPV positiv / AurkA heterozygot), UD-SCC-5 (HPV negativ / AurkA homozygot) und SAS (HPV negativ / AurkA heterozygot) jeweils dreimal durchgeführt und anschließend ausgewertet.

Die folgenden Grafiken zeigen den Unterschied des DNA-Gehalts anhand der prozentualen Chromosomenverteilung. Dabei ließ sich feststellen, dass bei den beiden homozygoten Zelllinien UD-SCC-2 und UD-SCC-5 fast ausschließlich diploide Zellen vorlagen, während bei den heterozygoten Zelllinien UP-SCC-154 und SAS vermehrt auch tetraploide Zellen detektierbar waren. Der Unterschied der Zelllinien mit verschiedenem Aurora-Kinase A Polymorphismus hinsichtlich der Anzahl tetraploider Zellen zeigte sich sogar als statistisch signifikant (p-Wert = 0,019).

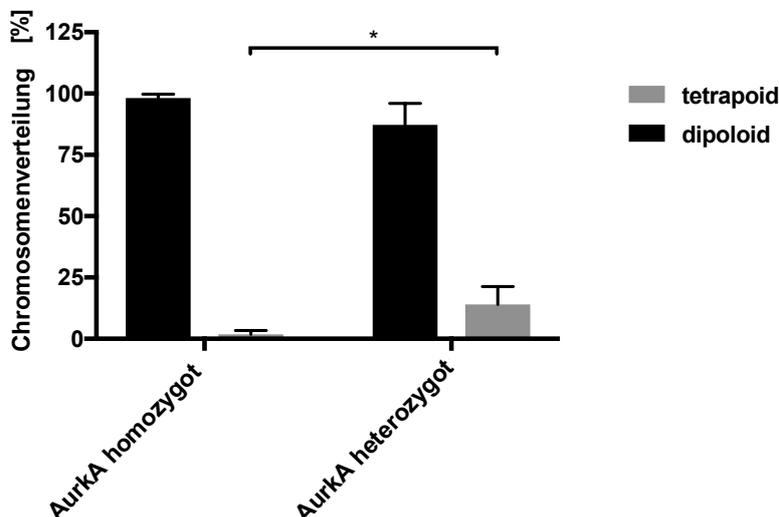
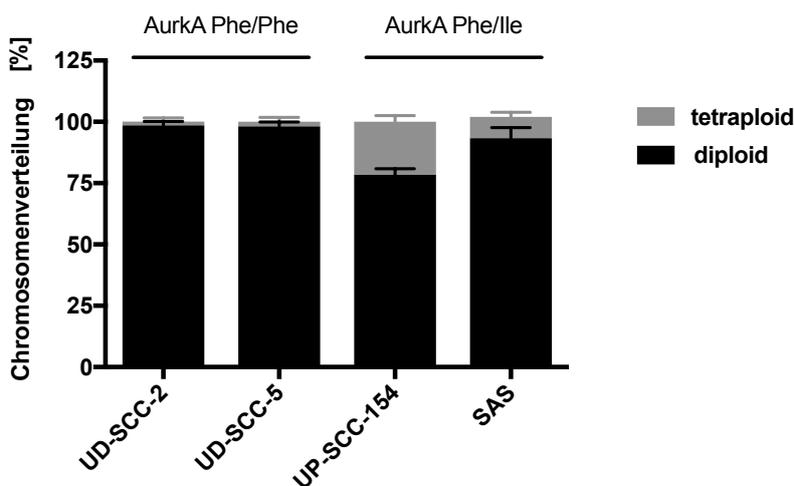


Abb. 23: Ergebnisse der Durchflusszytometrie; p-Wert = 0,019

4.3 Auswertung der Immunhistochemie

Die folgenden Abbildungen zeigen exemplarisch immunhistochemische Färbungen von p-Akt Ser473, Survivin, Aurora-Kinase A, Aurora-Kinase B und p-Histon H3 Ser10 im Tumor- und Normalgewebe. Zudem wurde die p16-Expression immunhistochemisch dargestellt.

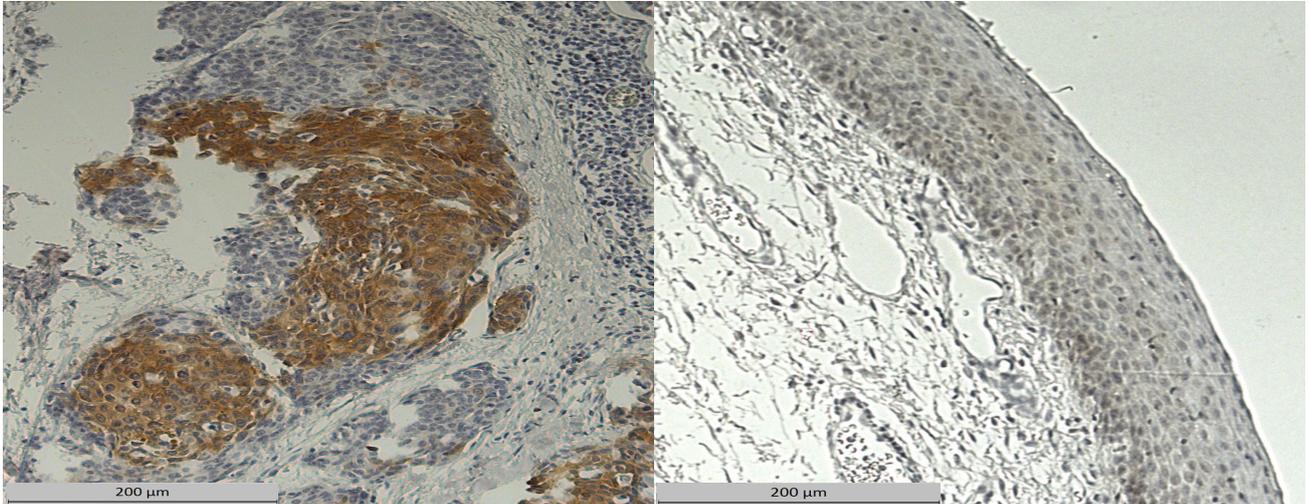


Abb. 24: Immunhistochemische Färbung von p-Akt Ser473 im Tumorgewebe (links) und im Normalgewebe (rechts)

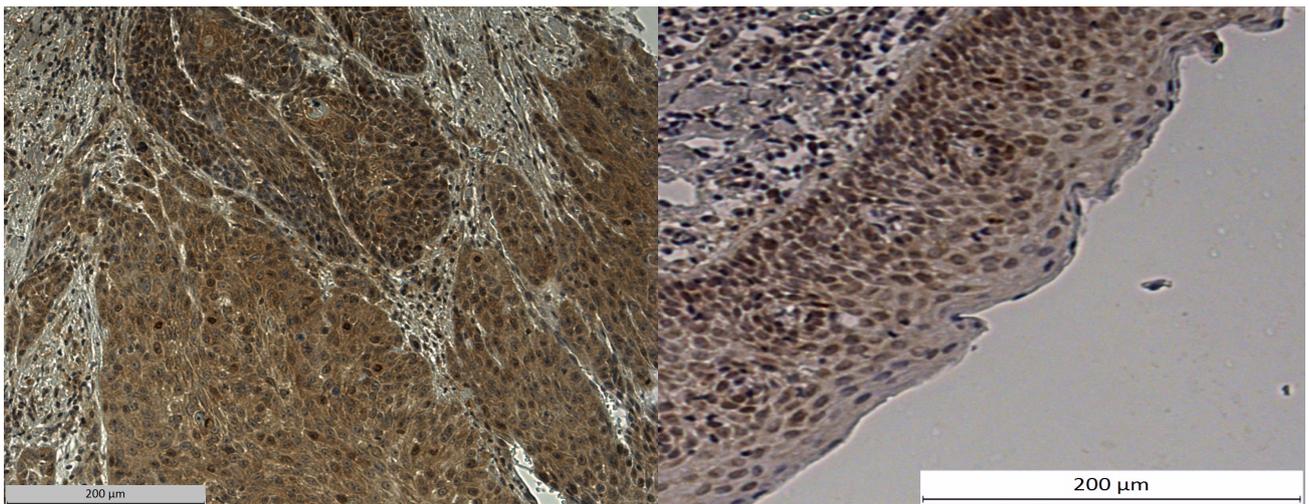


Abb. 25: Immunhistochemische Färbung von Survivin im Tumorgewebe (links) und im Normalgewebe (rechts)

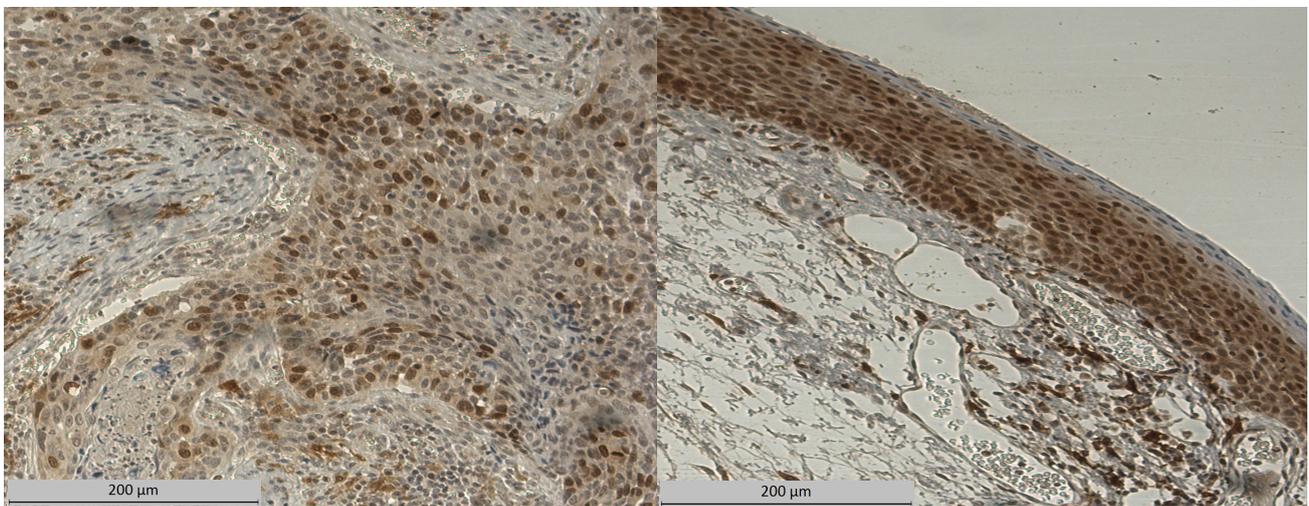


Abb. 26: Immunhistochemische Färbung von AurKB im Tumorgewebe (links) und im Normalgewebe (rechts)

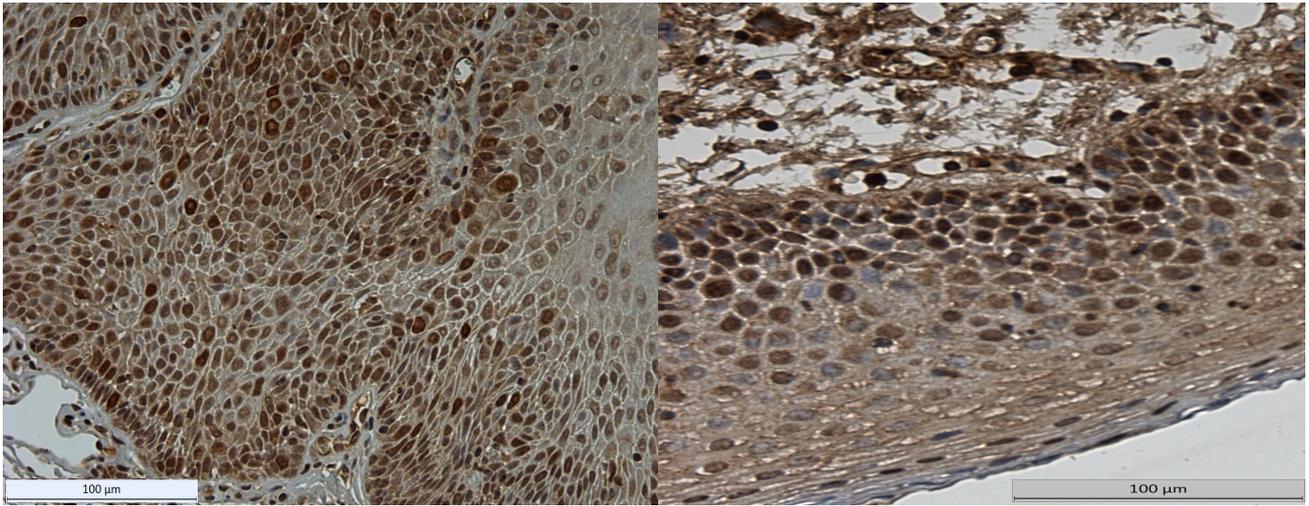


Abb. 27: Immunhistochemische Färbung von AurkA im Tumorgewebe (links) und im Normalgewebe (rechts)

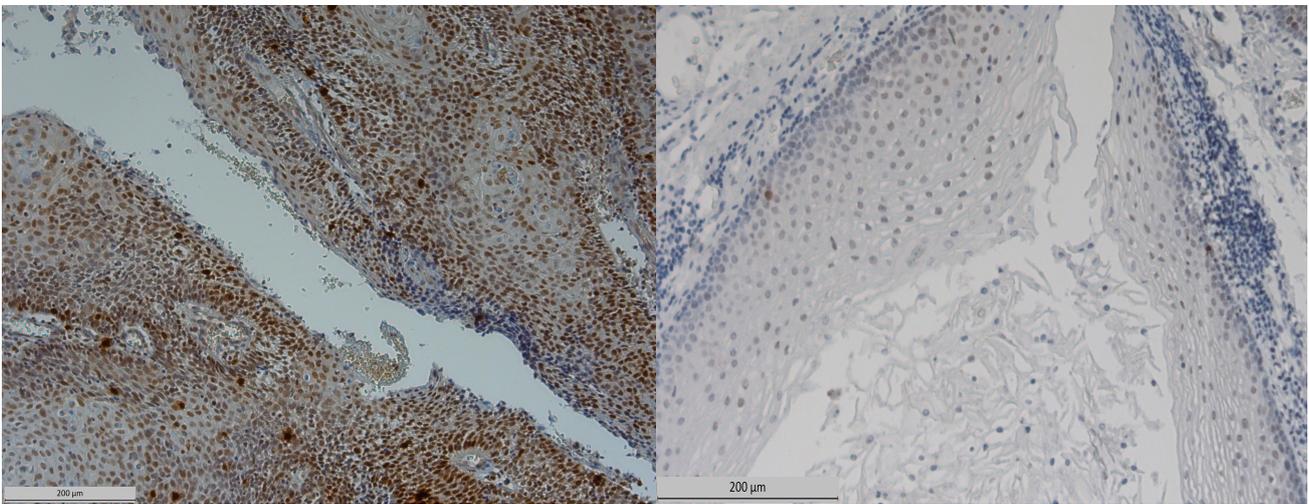


Abb. 28: Immunhistochemische Färbung von p-Histone H3 Ser10 im Tumorgewebe (links) und im Normalgewebe (rechts)

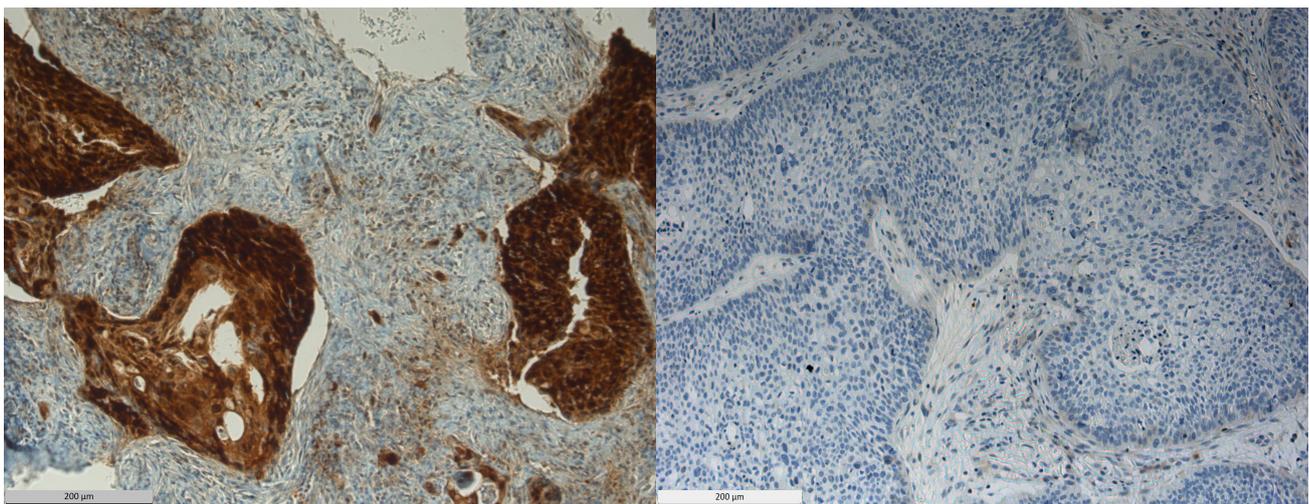


Abb. 29: Immunhistochemische Färbung p16 positiv (links) und p16 negativ (rechts)

4.4 Statistische Auswertung

4.4.1 Wilcoxon-Mann-Whitney-Test

Der Vergleich des Expressions-Scores der jeweiligen Marker im Tumor- bzw. Normalgewebe mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test ergab eine signifikant höhere Expression von p-Akt Ser473, Survivin und Aurora-Kinase A im Tumorgewebe verglichen mit der im Normalgewebe.

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests aufgeführt.

Marker	Mediane des Expressions-Scores		p-Werte
	Normalgewebe	Tumorgewebe	
Polymorphismus	1,42	1,46	0,739
p-Akt Ser473	1,49	1,90	0,014
Survivin	3,55	3,70	0,003
AurkA	1,67	3,38	0,000003
AurkB	4,40	3,89	0,322
p-Histon H3 Ser10	2,13	0,39	0,088

Tab. 31: Wilcoxon-Mann-Whitney-Test: Vergleich des Expressionsprofils zwischen Tumor- und Normalgewebe

4.4.2 Korrelationsanalyse

Bei der Korrelationsanalyse, bei der die jeweiligen Expressionsprofile bivariant miteinander korreliert werden, war für einige Marker eine statistisch signifikante Korrelation beobachtbar. Eine statistisch signifikante negative Korrelation zeigte sich zwischen dem AurkA-Polymorphismus und der Expression von Aurora-Kinase A bzw. dem Tabakkonsum, sowie zwischen p-Akt Ser473 und Aurora-Kinase A. Der am stärksten ausgeprägte Koeffizient lag für p-Akt Ser473/ Survivin bei 0,347. Die meisten Korrelationen ergaben sich für die Marker p-Akt Ser473, Aurora-Kinase B und Aurora-Kinase A, sowie dem Tabakkonsum mit jeweils 3 Korrelationen mit unterschiedlichen Markern.

	STK15	p-Akt Ser473	Survivin	AurkB	AurkA	Alkohol	Nikotin	p16
STK15	-	0,110	0,176	0,302	0,036	0,069	0,038	0,958
p-Akt Ser473	0,110	-	0,000002	0,008	0,028	0,100	0,852	0,251
Survivin	0,176	0,000002	-	0,002	0,800	0,923	0,829	0,164
AurkB	0,302	0,008	0,002	-	0,016	0,991	0,440	0,139
AurkA	0,036	0,028	0,810	0,017	-	0,542	0,424	0,172
Alkohol	0,069	0,100	0,923	0,991	0,536	-	0,019	0,961
Nikotin	0,038	0,852	0,829	0,440	0,432	0,019	-	0,036
p16	0,958	0,251	0,164	0,139	0,173	0,961	0,036	-
p-Histon H3 Ser10	0,505	0,919	0,424	0,029	0,607	0,325	0,017	0,000055

Tab. 32: Übersicht der unterschiedlichen Marker-Korrelationen (Korrelations-Analyse nach Spearman)

4.4.3 Vier-Felder-Tafeln

Die Untersuchung von Zusammenhängen zwischen Markerexpression und klinischen Daten erfolgte durch Vier-Felder-Tafeln mittels Chi-Quadrat-Test, sowie bei geringerer Fallzahl mittels exaktem Test nach Fisher. Als klinische Variablen wurden das T-Stadium, das N-Stadium, die Fernmetastasierung sowie das Stadium der Tumorerkrankung bei Erstdiagnose verwendet. Für die Analyse wurde die Markerexpression zusätzlich in jeweils 2 Kategorien unterteilt: „positiv“ und „negativ“. Der Cut-off Wert für diese Einteilung wurde bei 2 gewählt. Ein Expressions-Score unter 2 wurde folglich als negativ gewertet, alle Fälle mit Expression-Score ≥ 2 wurden einheitlich als positiv gewertet, dabei erfolgte keine genauere Differenzierung zwischen stark und schwach positiv. Der Expressionsstatus wurde im Tumorgewebe erhoben. Die Anzahl der daraus resultierenden Fälle sind in Tabelle 33 aufgeführt.

Marker	Negativ (Cut-off < 2)	Positiv (Cut-off ≥ 2)
p-Akt Ser473	34 (7,8 %)	20 (4,6 %)
Survivin	21 (4,8 %)	33 (7,6 %)
AurkB	17 (3,9 %)	36 (8,3 %)
AurkA	17 (3,9 %)	37 (8,5 %)

Tab. 33: Anzahl der Fälle der Marker-Expression bei Cut-off Wert = 2

Für die Betrachtung der Tumorgöße (T-Stadium) bei Erstdiagnose als eine der klinischen Variablen wurde diese ebenfalls in zwei Kategorien aufgeteilt. Eine Kategorie beinhaltete

die niedrigen T-Stadien T1 und T2 (156 Fälle, insgesamt 35,9 %) die andere die höheren T-Stadien T3 und T4 (225 Fälle, insgesamt 51,8 %).

Auch für die Lymphknotenmetastasierung bei Erstdiagnose wurde zur genaueren Beurteilung des Zusammenhanges zusätzlich die klinische Variable „N-Stadium“ vereinfacht in N+ und N0 unterteilt. Dabei wurde ein positiver Nachweis von Tumorzellen im Lymphknotengewebe, egal welchen N-Stadiums (N1, 2, 3) als positiv (N+) und ein fehlender Nachweis von Tumorzellen im Lymphknoten als negativ (N0) gewertet. Es ergaben sich in unserem Kollektiv bei Erstdiagnose somit 132 Patienten ohne Lymphknotenmetastasierung (N0, insgesamt 30,4 %) und 245 Patienten mit positivem Lymphknotenbefall (N+, insgesamt 56,5 %).

Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Marker-Expression und den klinischen Daten zeigte sich für die Tumorgöße bei Erstdiagnose und der Expression von AurkA bzw. für p16^{INK4}. Bei der Lymphknotenmetastasierung ergab sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang mit der Expression von Survivin bzw. Aurora-Kinase A. Die Expression von p-Akt Ser473 und Aurora-Kinase A korrelierte signifikant mit dem Grading des Tumors. Zudem ließ sich eine signifikante Korrelation zwischen Survivin bzw. Aurora-Kinase A und dem Stadium der Tumorerkrankung bei Erstdiagnose nachweisen. Die p-Werte der Ergebnisse sind in den beiden nachfolgenden Tabellen dargestellt.

Marker	T-Stadium	T-Stadium Gruppen (T1/2, T3/4)	N-Stadium	N-Stadium Gruppen (N0, N+)
	p-Werte	p-Werte	p-Werte	p-Werte
STK15	0,663	0,491 *	0,516	0,211
p-Akt Ser473	0,550	0,311	0,268	0,809
p-Akt Ser473 Cut-off bei 2	0,830	1,000 *	0,817	0,436
Survivin	0,795	0,459	0,005	0,124
Survivin Cut-off bei 2	0,290	0,168 *	0,619	0,400
AurkB	0,665	0,331	0,586	0,962
AurkB Cut-off bei 2	0,263	0,082 *	0,643	0,702
AurkA	0,009	0,005	0,145	0,010
AurkA Cut-off bei 2	0,641	0,372	0,609	0,668
p16	0,027	0,002 *	0,072	0,194

Tab. 34: Zusammenhang von Marker-Expression und klinischen Daten

* Exakter Test nach Fisher

Marker	M-Stadium	Grading	Stadium
	p-Werte	p-Werte	p-Werte
STK15	0,562	0,373	0,197
p-Akt Ser473	0,576	0,118	0,235
p-Akt Ser473 Cut-off bei 2	0,715	0,003	0,493
Survivin	0,073	0,321	0,016
Survivin Cut-off bei 2	0,294	0,272	0,773
AurkB	0,701	0,702	0,544
AurkB Cut-off bei 2	0,327	0,207	0,179
AurkA	0,518	0,310	0,006
AurkA Cut-off bei 2	0,575	0,046	0,770
p16	0,412	0,248	0,416

Tab. 35: Zusammenhang von Marker-Expression und klinischen Daten

4.4.4 Überlebenskurven

Das Gesamtüberleben unseres Kollektivs zeigt die folgende Abbildung. Dabei lag das 5-Jahres-Überleben bei etwa 63 %. Das mittlere Überleben des gesamten Patientenkollektivs lag bei 10,46 Jahren.

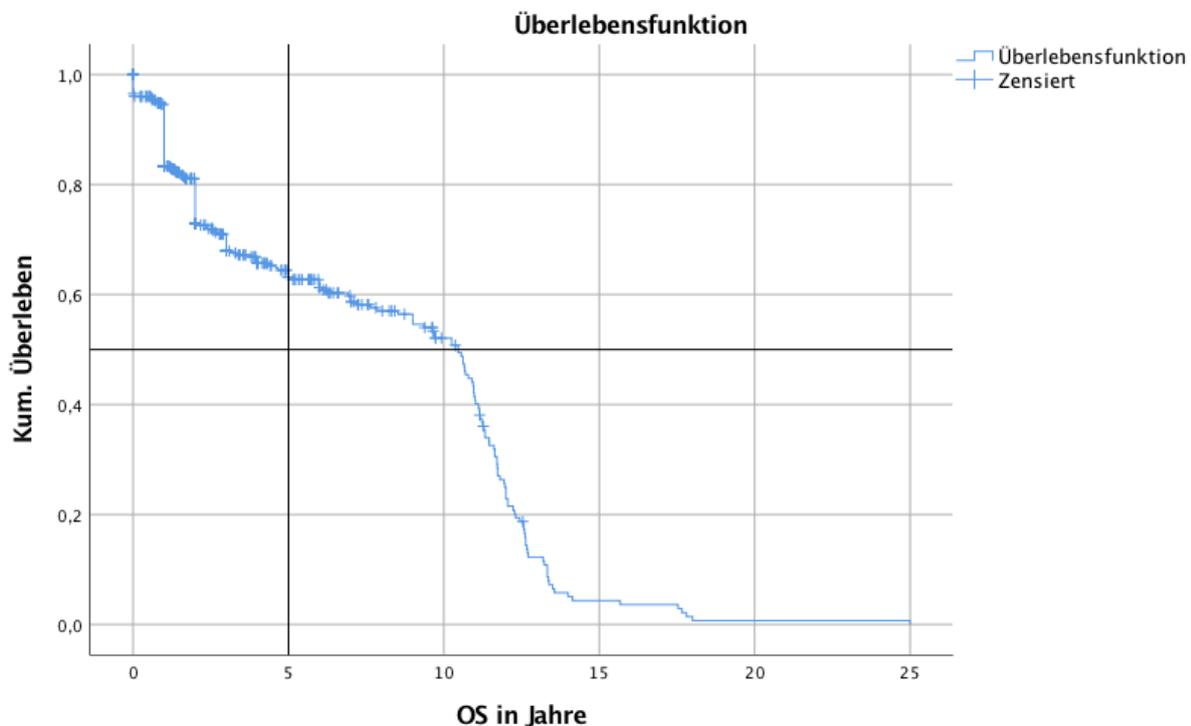


Abb. 30: Gesamtüberleben des Patientenkollektivs

Bereits mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass der HPV-Status einen wichtigen prognostischen Marker für das Überleben der Patienten mit HNSCC darstellt. Dabei zeigte

sich ein HPV positiver Status unter anderem als Vorteil hinsichtlich des Gesamtüberlebens (Ang et al., 2010; Dok & Nuyts, 2016; Fakhry et al., 2008; Kimple & Harari, 2015; Lassen et al., 2009; Lohaus et al., 2014).

Zur Untersuchung des Einflusses von HPV-Status und AurkA-Polymorphismus auf das Gesamtüberleben bzw. auf das Therapieansprechen von Cetuximab führten wir Kaplan-Meier-Analysen und Log Rank Tests durch.

Hierbei resultierte auch in unserem Patientenkollektiv ein deutlich besseres Überleben der HPV positiven Patienten gegenüber derer mit HPV negativen Status, unabhängig vom AurkA-Polymorphismus.

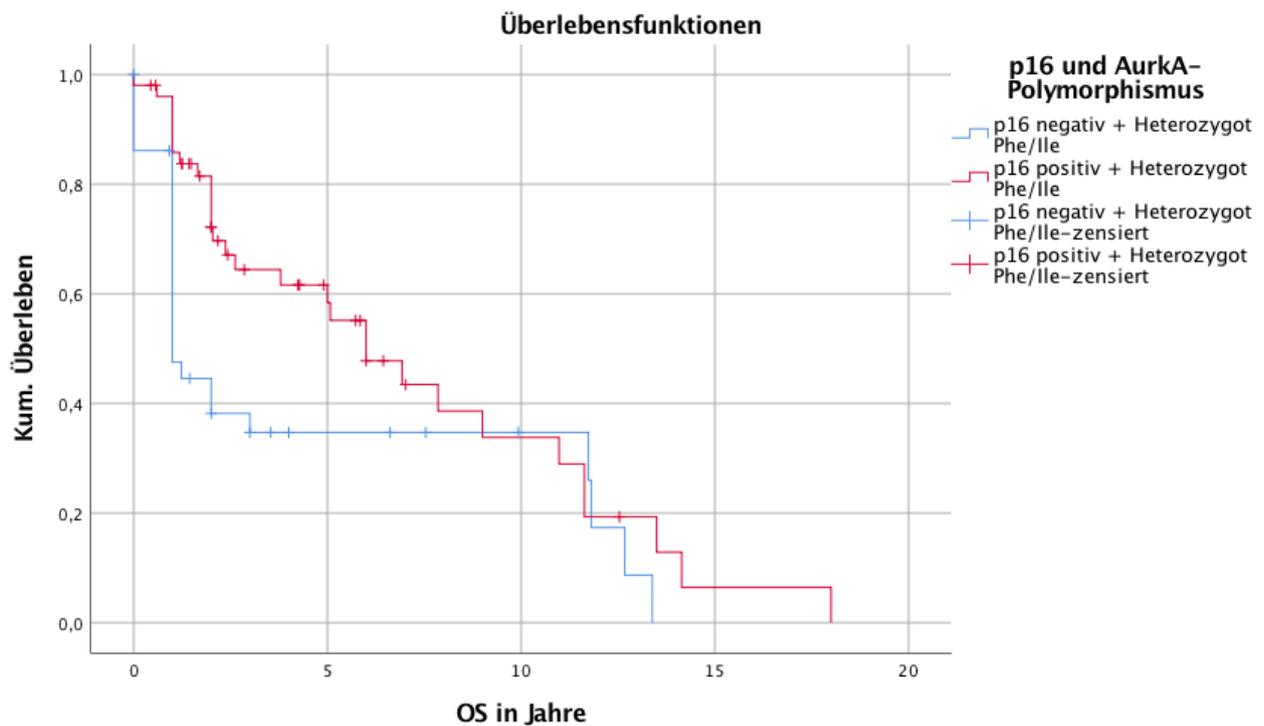


Abb. 31: Kaplan-Meier-Analyse: Auswirkung von HPV-Status auf Gesamtüberleben bei heterozygotem AurkA-Polymorphismus; Log Rank p-Wert = 0,027

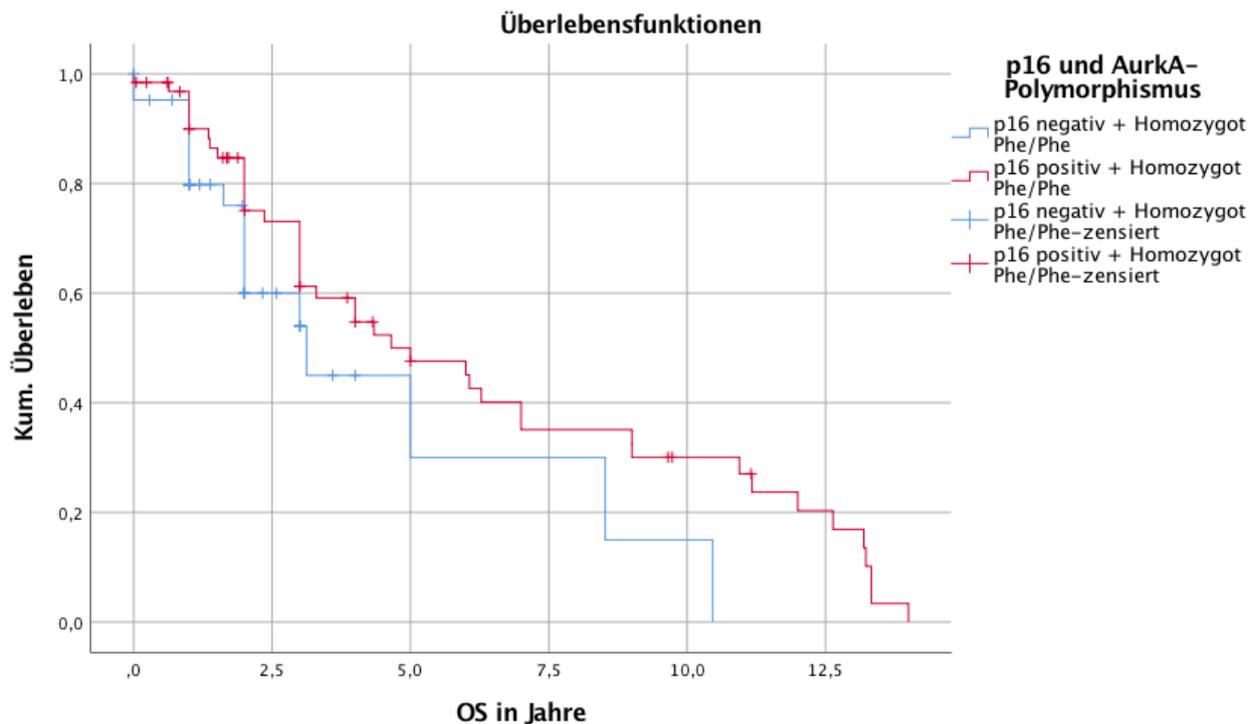


Abb. 32: Kaplan-Meier-Analyse: Auswirkung von HPV-Status auf Gesamtüberleben bei homozygotem Phe/Phe AurkA-Polymorphismus; Log Rank p-Wert = 0,092

Einen statistisch signifikanten Einfluss von HPV-Status und AurkA-Polymorphismus auf das Gesamtüberleben konnte auch speziell bei der Patientengruppe gezeigt werden, die eine Cetuximab-Therapie erhalten hat (p-Wert = 0,001).

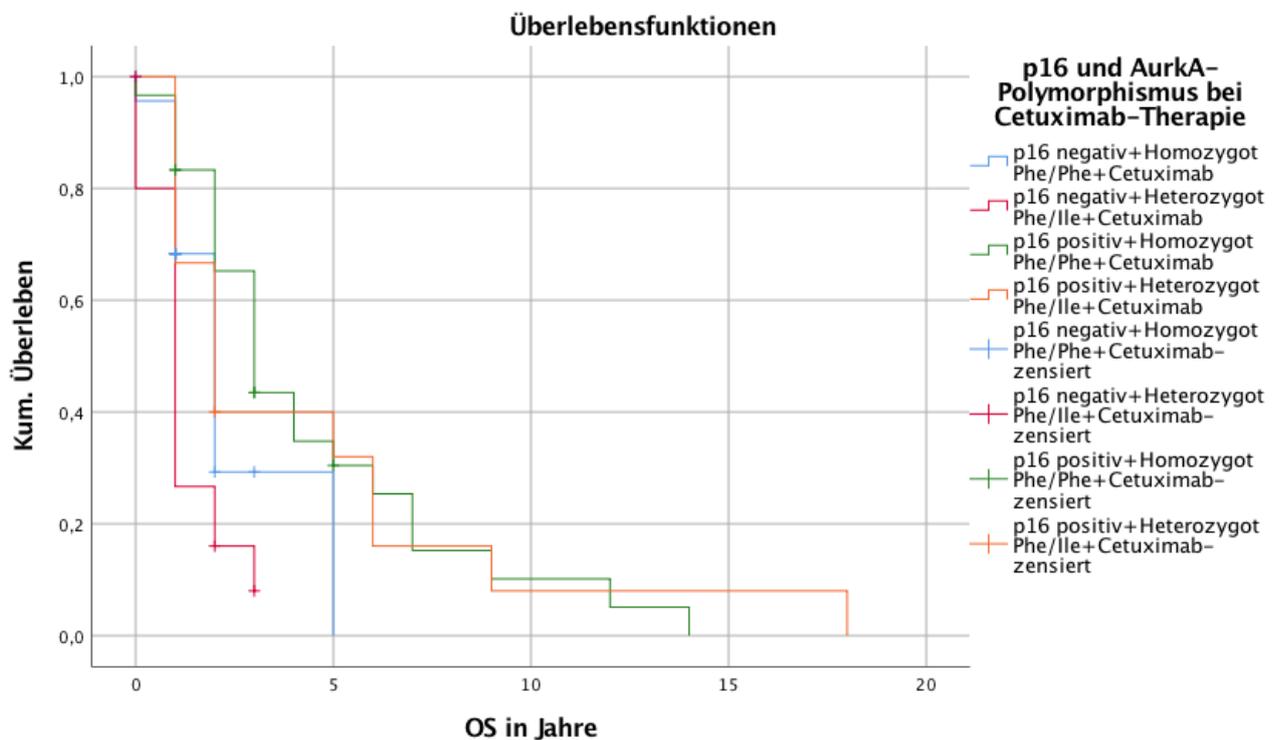


Abb. 33: Kaplan-Meier-Analyse: prognostische Relevanz von HPV-Status und AurkA-Polymorphismus auf das Gesamtüberleben von Patienten mit Cetuximab-Therapie; Log Rank p-Wert = 0,001

Auch in dieser Patientengruppe zeigte sich ein HPV positiver Status als positiver prognostischer Marker für das Gesamtüberleben.

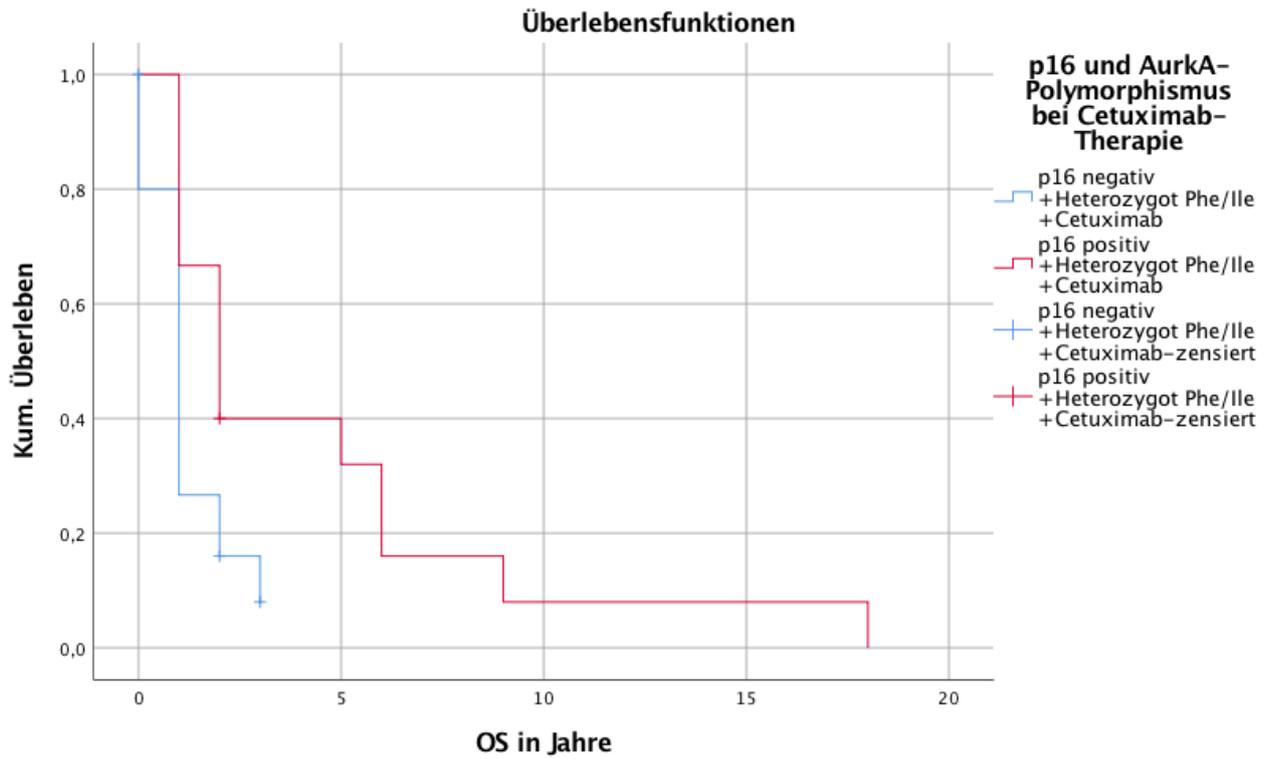


Abb. 34: Kaplan-Meier-Analyse: Einfluss von HPV-Status auf das Gesamtüberleben von Patienten mit Cetuximab-Therapie und heterozygoten AurkA-Polymorphismus; Log Rank p-Wert = 0,013

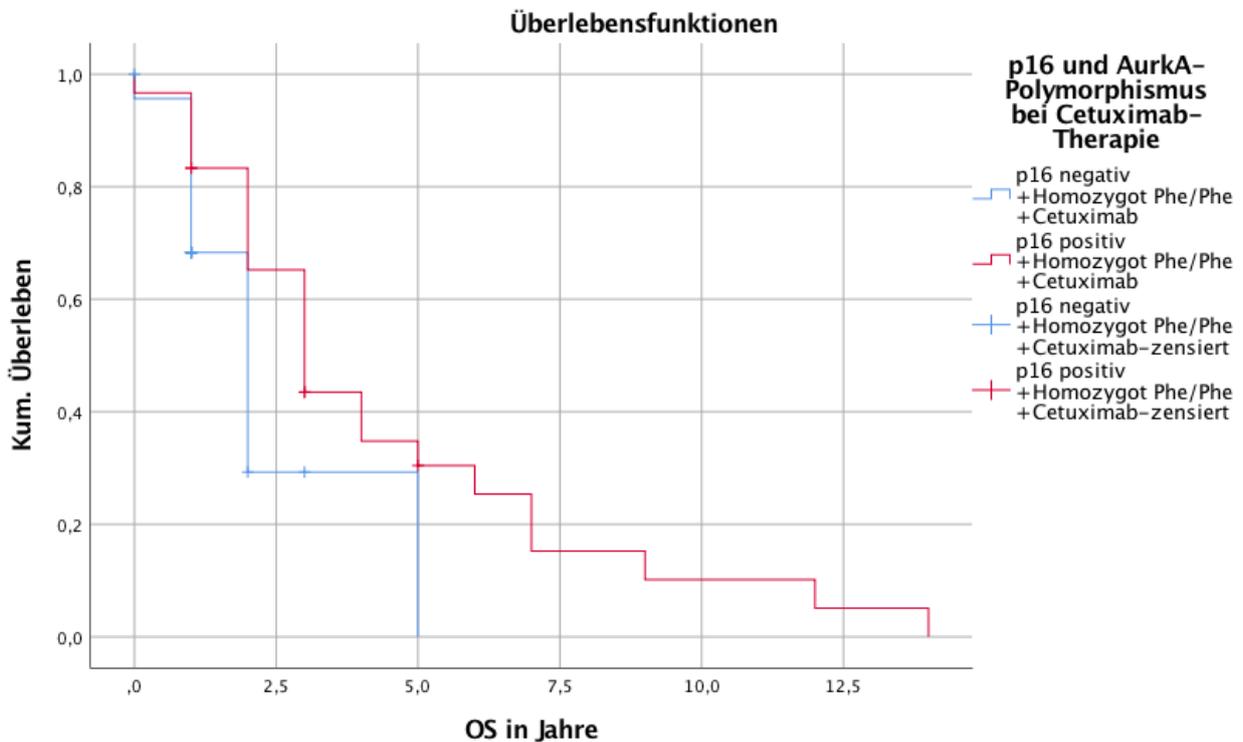


Abb. 35: Kaplan-Meier-Analyse: Einfluss von HPV-Status auf das Gesamtüberleben von Patienten mit Cetuximab-Therapie und homozygoten AurkA-Polymorphismus; Log Rank p-Wert = 0,067

Unabhängig davon zeigte die Kaplan-Meier-Analyse ein statistisch signifikant besseres Gesamtüberleben der Patienten mit Cetuximab-Therapie bei Vorliegen einer Phe/Phe homozygoten Aurora-Kinase A.

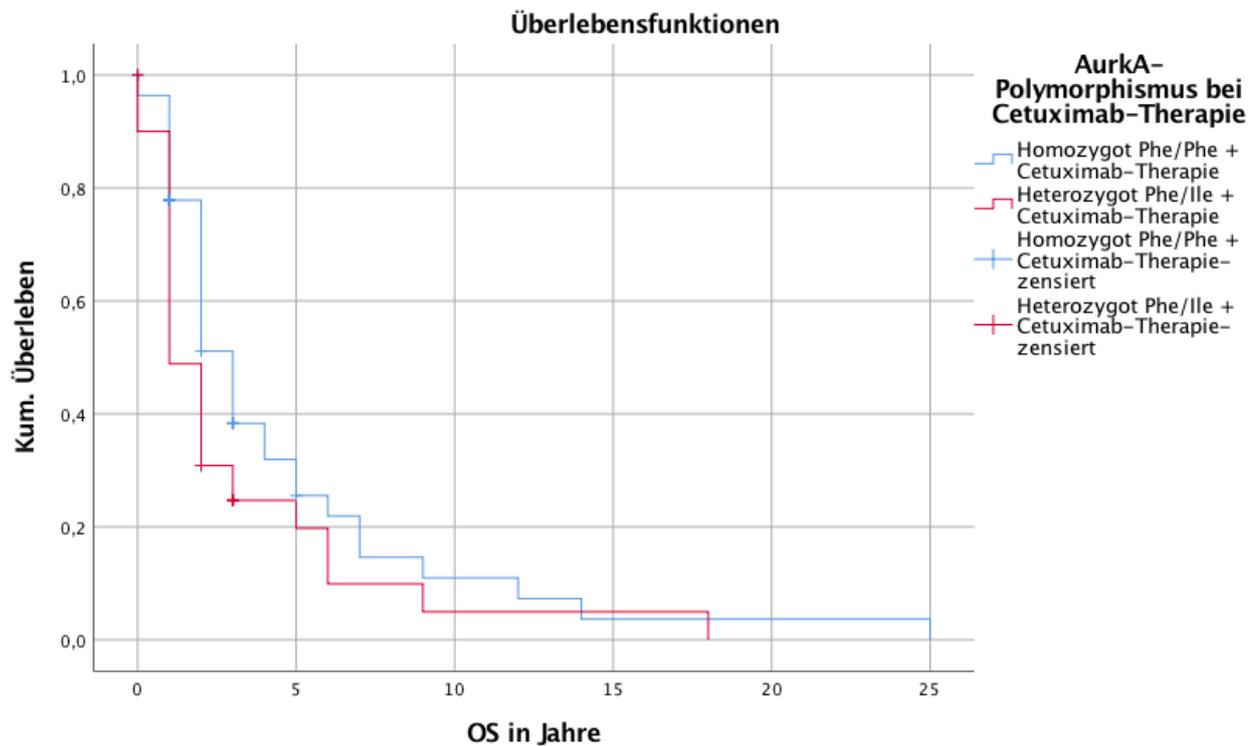


Abb. 36: Kaplan-Meier-Analyse: prognostische Relevanz des AurkA-Polymorphismus auf das Gesamtüberleben von Patienten mit Cetuximab-Therapie; Log Rank p-Wert = 0,048

Die Kombination beider prognostisch positiver Marker, nämlich HPV positiver Status und Phe/Phe homozygot vorliegende Aurora-Kinase A, korrelierte statistisch hoch signifikant mit einem besseren Gesamtüberleben verglichen mit der Kombination aus HPV negativem Status und Phe/Ile heterozygoter Aurora-Kinase A.

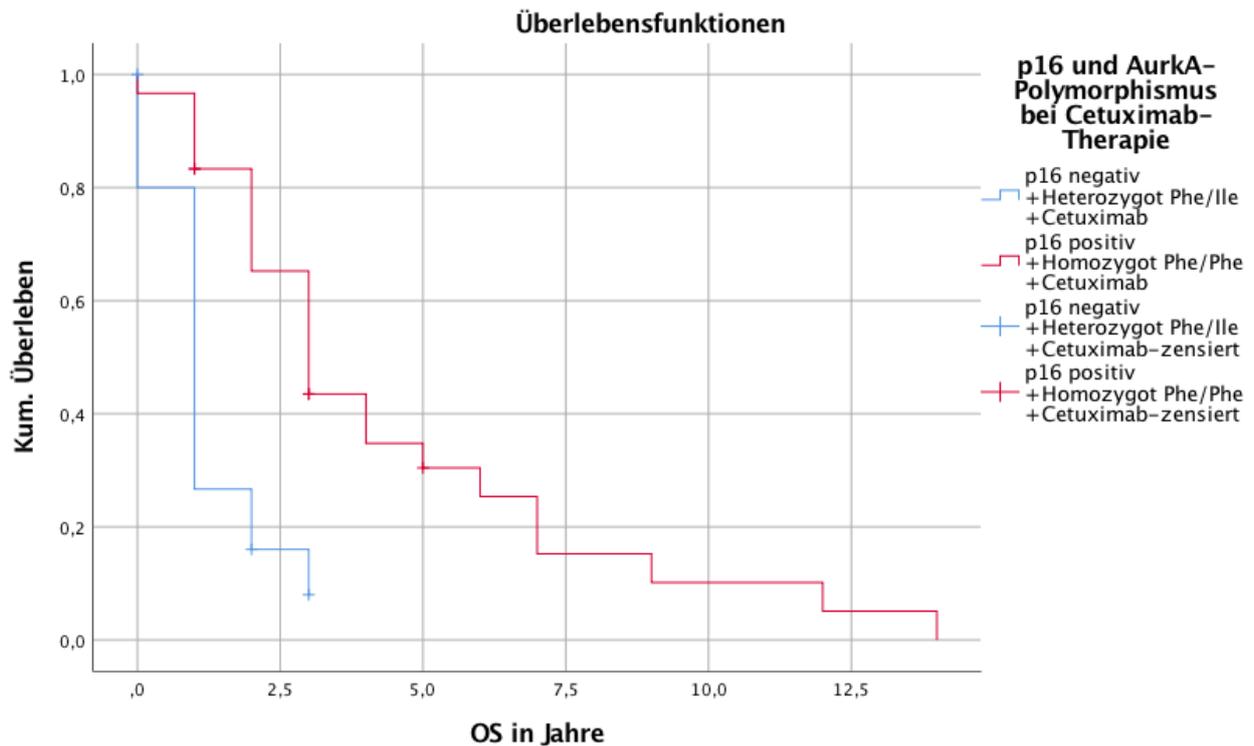


Abb. 37: Kaplan-Meier-Analyse: Statistisch signifikant besseres Gesamtüberleben von Patienten mit HPV positivem Status und homozygoter Phe/Phe AurKA bei Cetuximab-Therapie; Log Rank p-Wert = 0,0001

Für das Ansprechen auf die Cetuximab-Therapie scheint der HPV-Status ebenfalls relevant zu sein (p-Wert = 0,082).

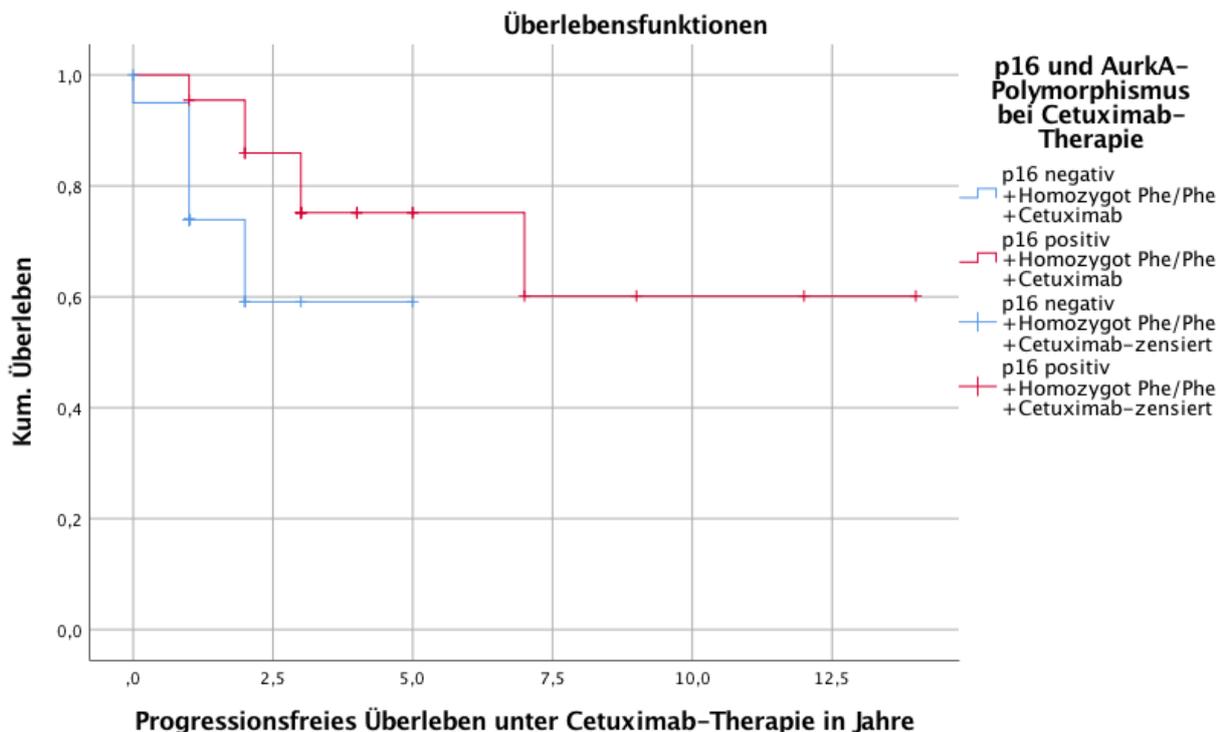


Abb. 38: Kaplan-Meier-Analyse: prognostische Relevanz des HPV-Status auf das Ansprechen der Cetuximab-Therapie bei homozygoter Phe/Phe AurKA; Log Rank p-Wert = 0,082

In Abhängigkeit vom AurkA-Polymorphismus zeigten die Kaplan-Meier-Analysen einen positiven Trend für das Ansprechen auf die Cetuximab-Therapie.

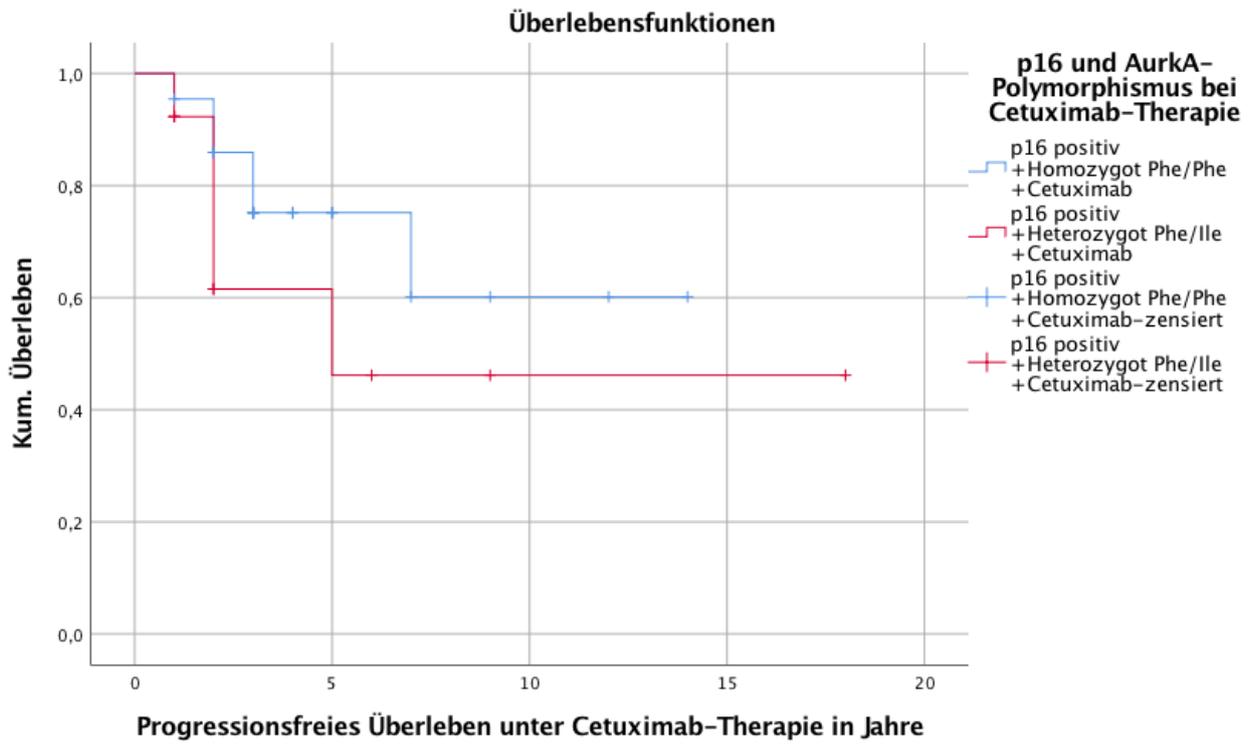


Abb. 39: Kaplan-Meier-Analysen: prognostische Relevanz des AurkA-Polymorphismus auf das Ansprechen der Cetuximab-Therapie bei HPV positivem Status; Log Rank p-Wert = 0,254

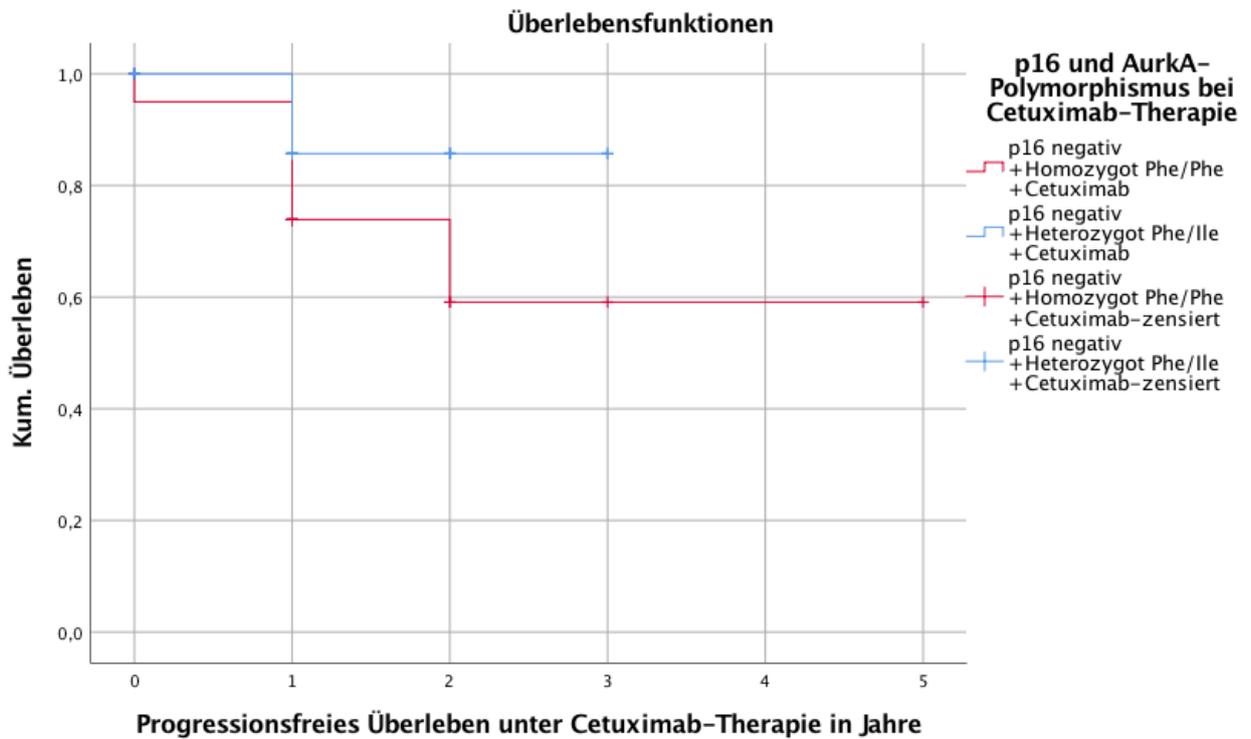


Abb. 40: Kaplan-Meier-Analysen: prognostische Relevanz des AurkA-Polymorphismus auf das Ansprechen der Cetuximab-Therapie bei HPV negativem Status; Log Rank p-Wert = 0,229

Der Vergleich der Therapiegruppen Cetuximab in bzw. ohne Kombination mit einem Taxol ergab in unserem Kollektiv keinen wesentlichen Unterschied hinsichtlich des Gesamtüberlebens.

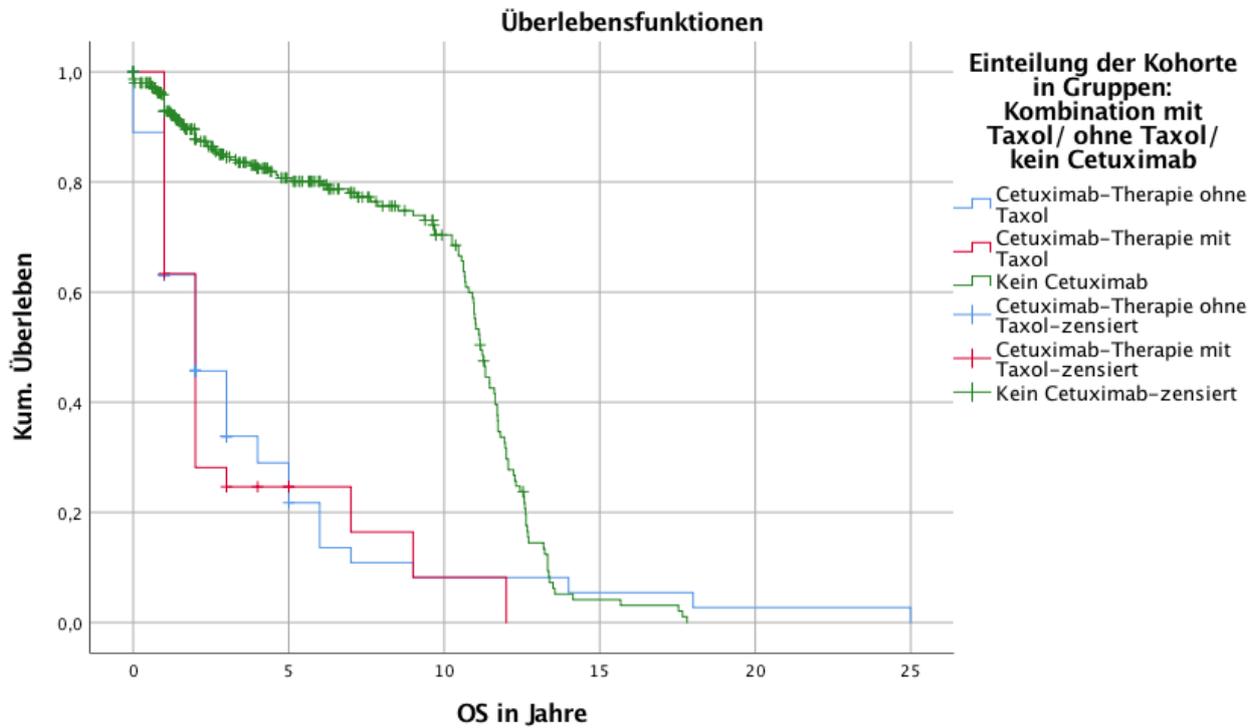


Abb. 41: Kaplan-Meier-Analysen: Unterschied im Gesamtüberleben von Patienten mit Cetuximab-Therapie in bzw. ohne Kombination mit Taxol; Log Rank p-Wert < 0,0001

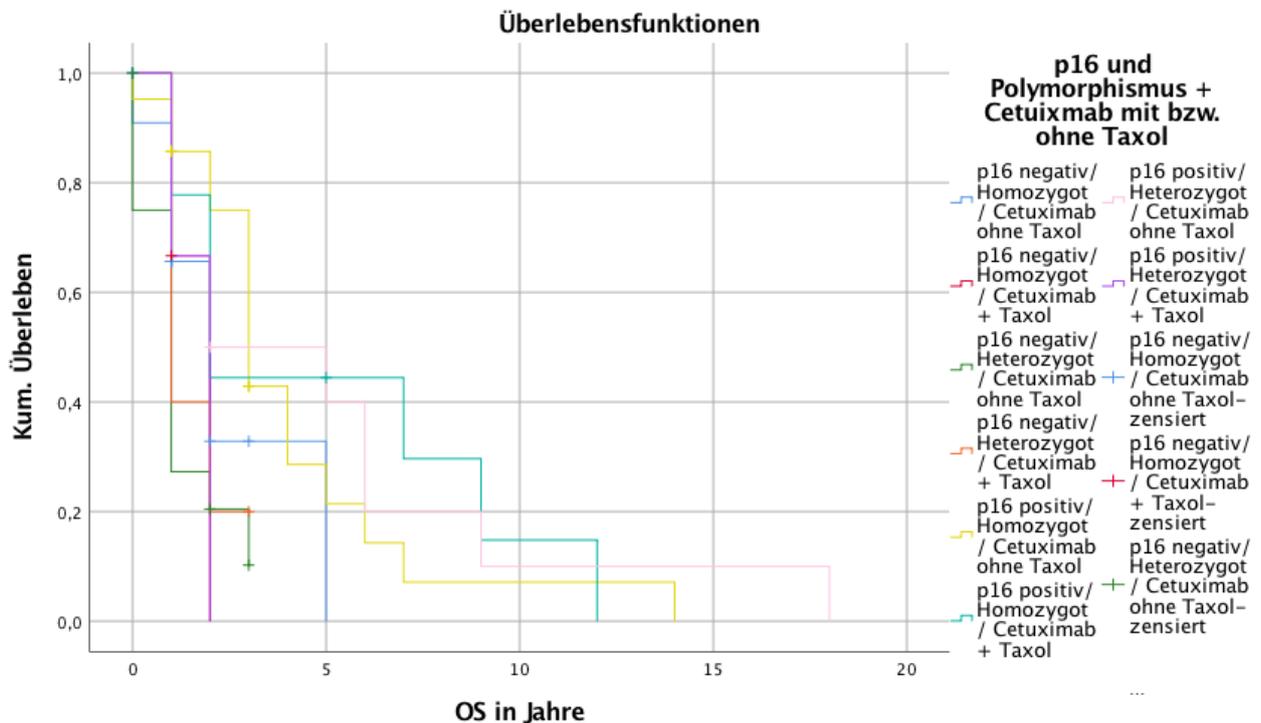


Abb. 42: Kaplan-Meier-Analysen: prognostische Relevanz von p16 und AurKA-Polymorphismus bei Patienten mit Cetuximab-Therapie mit bzw. ohne Taxol; Log Rank p-Wert = 0,021

4.4.5 Cox-Regressions-Modell

Um die Ergebnisse der Kaplan-Meier-Analysen zu verifizieren und zur weiteren Beurteilung des gleichzeitigen Einflusses von mehreren Variablen auf das Gesamtüberleben wurden Multivariant-Analysen in Form von Cox-Regressions-Modellen durchgeführt.

Für die Analysen wurden der HPV-Status sowie der Aurora-Kinase A Polymorphismus untersucht. Zudem dienten die klinischen Merkmale wie Geschlecht, Lokalisation des Primarius und das Alter bei Erstdiagnose als Referenzkontrolle.

Der HPV-Status als wichtigster prognostischer Marker in den Kaplan-Meier-Überlebensdaten zeigte in den Analysen lediglich einen positiven Trend, jedoch keine statistische Signifikanz. Die Patienten mit einer stärkeren p16-Expression hatten tendenziell ein besseres Gesamtüberleben als Patienten ohne Expressionsnachweis.

Im Cox-Regressions-Modell zeichnete sich sonst kein Hinweis für ein positives Prognosepotenzial weiterer Marker oder Markerkombinationen bezüglich des Gesamtüberlebens ab.

Die nachfolgenden Tabellen zeigen die Ausgabe der Regressions-Analyse.

Auswertung der Fallverarbeitung			
		N	Prozent
Für Analyse verfügbare Fälle	Ereignis	98	22,6%
	Zensiert	53	12,2%
	Insgesamt	151	34,8%
Nicht verwendete Fälle	Fälle mit fehlenden Werten	283	65,2%
	Fälle mit negativer Zeit	0	0,0%
	Zensierte Fälle vor dem frühesten Ereignis in einer Schicht	0	0,0%
	Insgesamt	283	65,2%
Insgesamt		434	100,0%

Tab. 36: Cox-Regressionsmodell Fallverarbeitung

Omnibus-Tests der Modellkoeffizienten									
-2 Log-Likelihood	Gesamt (Wert)			Änderung aus vorangegangenem Schritt			Änderung aus vorangegangenem Block		
	Chi-Quadrat	df	p-Wert	Chi-Quadrat	df	p-Wert	Chi-Quadrat	df	p-Wert
762,398	10,605	5	,060	10,623	5	,059	10,623	5	,059

Variablen in der Gleichung								
	B	SE	Wald	df	p-Wert	Exp(B)	95,0 %-KI für Exp(B)	
							Untere	Obere
p16	-,415	,239	3,002	1	,083	,660	,413	1,056
STK15 im Tumorgewebe	-,317	,215	2,180	1	,140	,728	,478	1,110
Geschlecht	,420	,304	1,916	1	,166	1,523	,840	2,761
Lokalisation	-,145	,100	2,095	1	,148	,865	,711	1,053
Alter bei Erstdiagnose	,018	,012	2,514	1	,113	1,018	,996	1,042

Tab. 37: Ergebnisse der Cox-Regressionsmodell

5 Diskussion

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches stehen mit ca. 600.000 Neuerkrankungen jährlich weltweit auf Platz sechs der häufigsten Krebsarten (Bose et al., 2013; Du et al., 2014). Trotz intensiver Forschung zur Verbesserung bzw. Ergänzung der konventionellen Therapiestandards, bestehend aus Operation, Strahlentherapie und Chemotherapie, konnte bisher keine wesentliche Verlängerung des Gesamtüberlebens der Patienten erzielt werden (Bernier et al., 2004; Polanska et al., 2016). Bis heute dienen vornehmlich allgemeine Parameter wie TNM-Klassifikation sowie Staging der Tumorerkrankung zur Abschätzung der Prognose. Zudem können inzwischen weitere Prädiktoren bestimmt werden (Thomas et al., 2005). Hier spielt allen voran der HPV-Status eine wichtige Rolle (Bossi et al., 2016). Das Vorliegen einer Infektion mit dem humanen Papillomavirus korreliert mit einem besseren klinischen Outcome der Patienten (Fakhry et al., 2008). Daneben besitzt der Mutationsstatus von TP53 als weiterer Biomarker einen wichtigen Stellenwert als prognostischer Parameter (Nylander et al., 2000).

Um die Erkrankung besser zu verstehen und damit individuelle, zielgerichtete Behandlungsstrategien zu entwickeln, ist die Entschlüsselung molekularer Mechanismen in der Entstehung von HNSCC von essentieller Bedeutung (Lehnerdt et al., 2010). Bei vielen Tumorentitäten konnten bereits entscheidende Genmutationen entdeckt und erfolgreich für die Weichenstellung in der Therapie umgesetzt werden. So korrelieren beispielsweise Mutationen im KRAS Gen bei kolorektalem Karzinom mit einem Nichtansprechen einer anti-EGFR-Therapie mit Cetuximab. Dies hat bereits Einzug in die klinische Praxis gehalten (Allegra et al., 2016; Saridaki et al., 2010). Auch beim Mammakarzinom kommt inzwischen standardmäßig die Bestimmung von Östrogen-, Progesteron- und Her2/neu-Rezeptor in der Diagnostik zum Einsatz, um die Therapieoptionen individuell anzupassen (Paik et al., 2008). Aufgrund der häufig detektierbaren EGFR-Überexpression in HNSCC hatte man sich viel von der Einführung der anti-EGFR-Therapie mit Cetuximab bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich versprochen (Chau & Hammerman, 2016). Doch trotz dieser spezifischen molekular-basierten Therapie konnte der erhoffte Durchbruch nicht erzielt werden. Unter anderem liegt die Ansprechrate bei den Patienten bei nur ca. 20 % (Sharafinski et al., 2010). KRAS-Mutationen treten in HNSCC nur < 5 % der Fälle auf (Bardelli & Siena, 2010; Bissada et al., 2013). Daher ist dieser bei kolorektalem Karzinom erfolgreich verwendete Prädiktor für HNSCC nicht geeignet.

Aufgrund der Komplexität der involvierten Signalwege und der großen Anzahl beteiligter Proteine ist eine Suche nach prädiktiven Biomarkern für das Ansprechen einer Cetuximab-

Therapie bis heute ohne eindeutige Ergebnisse (Leemans et al., 2011; Weidhaas et al., 2017).

Um die Forschung hinsichtlich prognostischer Biomarker und damit neuer bzw. besser angepasster Behandlungsstrategien weiter voranzubringen, wurden in dieser Arbeit der HPV-Status und der Aurora-Kinase A Polymorphismus als mögliche potentielle prognostische und prädiktive Marker untersucht.

5.1 Diskussion der Methoden

5.1.1 Ermittlung des Aurora-Kinase A Polymorphismus

Um den Aurora-Kinase A Polymorphismus unserer Patientenproben zu bestimmen, wurde die semiquantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion mit anschließendem enzymatischen Verdau und Auftrennung mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Die Methode ist bereits seit vielen Jahren gut etabliert und zeigte auch bei mehrfachen Ansätzen eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

Aufgrund der schlechten Unterscheidbarkeit der Bandenmuster für den heterozygoten Phe/Ile- bzw. homozygoten Ile/Ile-Polymorphismus der Aurora-Kinase A, wurden die DNA-Proben zur Kontrolle zusätzlich sequenziert. Da durch Verwendung der Kettenabbruch-Synthese nach Sanger die genaue Basenabfolge des DNA-Stücks ermittelt werden kann, konnten unsere Ergebnisse so validiert werden.

5.1.2 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie bietet eine einfache und kostengünstige Methode die Expression von verschiedenen Markern zu untersuchen. Jedoch weist dieses Verfahren einige Limitationen auf, da kaum eine quantitative Auswertung möglich ist. Die Interpretation der gefärbten Schnitte ist dabei abhängig von der Subjektivität des Untersuchers. Der für die Auswertung entwickelte Score unserer Arbeitsgruppe berechnet sich aus der Intensität und der Flächenausdehnung des sich anfärbenden Areals.

Des Weiteren gilt zu beachten, dass der verwendete Score unserer Arbeitsgruppe nicht von allen Forschungsgruppen weltweit gleich verwendet wird. Dies muss also bei der Interpretation der dadurch möglicherweise variierenden Ergebnisse berücksichtigt werden (Nylander et al., 2000).

Um das Problem der Subjektivität der Immunhistochemie zu reduzieren, wurde die Beurteilung der Schnitte von zwei unabhängigen Auswertern vorgenommen und für die Berechnungen zudem ein Cut-off Wert gebildet, um Schwankungen zu minimieren.

Bis heute ist umstritten, welche Methode die beste ist, um den HPV-Status sicher festzustellen (Jordan et al., 2012). Im Labor kommt zur Testung bislang die HPV in situ Hybridisierung, sowie die Immunhistochemie am häufigsten zum Einsatz. Seltener werden aufwändigere PCR-basierte Methoden genutzt, um die Viruslast nachzuweisen (Singhi & Westra, 2010).

Für die Detektion des HPV-Status wurde in dieser Arbeit die Expression des Markers p16 verwendet. Seit vielen Jahren hat sich die p16-Expression in der Immunhistochemie als zuverlässiger und vor allem kostengünstiger Marker für eine biologisch aktive Infektion mit dem humanen Papillomavirus etabliert (Ang et al., 2010; Chai et al., 2016; Deng et al., 2014; Wittekindt et al., 2005). Da es sich bei p16 um einen Surrogat-Marker handelt, ist bei p16-Positivität zur Bestätigung einer HPV-Infektion die Durchführung einer weiteren Methode notwendig. Erst bei einem positiven Ergebnis beider Methoden kann eindeutig von der Infektion mit HPV gesprochen werden. Zwar konnte in mehreren Studien eine sehr gute Sensitivität, jedoch eine stark variierende Spezifität von p16-Expression für die Ermittlung des HPV-Status gezeigt werden. Somit waren einige Fälle zwar fälschlicherweise p16 positiv, obwohl keine HPV-Infektion vorlag (M. Hoffmann et al., 2010; Smeets et al., 2007; Vokes et al., 2015; H. Wang et al., 2013). Im infizierten Tumorgewebe wird das Retinoblastom-Gen durch das HPV Onkoprotein E7 inaktiviert. Hierdurch entfällt die hemmende Wirkung auf die p16-Transkription. Folglich resultiert eine p16-Überexpression (Liang et al., 2012; Reimers et al., 2007; Wiest et al., 2002). Jedoch besteht keine Garantie, dass die Überexpression wirklich durch eine HPV-Infektion verursacht und nicht evtl. durch andere Signalwege eine verstärkte p16-Transkription initiiert wurde (M. Hoffmann et al., 2010; Lewis et al., 2010).

5.1.3 Crystal-Violett-Assay

Für die Proliferationsanalyse mittels dem Crystal-Violett-Assay wurden vier passende, gut etablierte Zelllinien gewählt: UD-SCC-2 (HPV positiv, AurKA homozygot Phe/Phe), UP-SCC-154 (HPV positiv, AurKA heterozygot Phe/Ile), UD-SCC-5 (HPV negativ, AurKA homozygot Phe/Phe), sowie SAS (HPV negativ, AurKA heterozygot Phe/Ile).

Viele Arbeitsgruppen verwenden für die Bestimmung des antiproliferativen Effekts einer Substanz auf die verschiedenen Zelllinien den MTT-Assay. Hierbei findet durch Reaktion des verwendeten gelblichen Tetrazolimsalzes MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-

diphenyltetrazoliumbromid) in den Mitochondrien lebender Zellen ein Farbumschlag statt, der letztendlich photometrisch erfasst und damit die katalytische Aktivität der noch lebenden Zellen gemessen werden kann (Alley et al., 1988; Mosmann, 1983; Vistica et al., 1991). Jedoch besteht die Gefahr, dass die Ergebnisse durch Schwankungen dieser Aktivität beeinflusst und verfälscht werden können (Alley et al., 1988; Sliwka et al., 2016).

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Proliferationsanalyse unter anderem der Crystal-Violett-Assay verwendet, eine modifizierte Methode des MTT-Assays. Da alle adhärenenten und damit vitalen Zellen angefärbt und lysiert werden und anschließend die optische Dichte der Lösung bestimmt wird, können so ebendiese Schwankungen ausgeschlossen werden (Feoktistova et al., 2016).

5.1.4 Colony-Formations-Assay

Der Colony-Formations-Assay diente dazu, das Zellverhalten um den weiteren Aspekt des klonogenen Überlebens der vier Ziellinien zu bestimmen. Aufgrund der Ähnlichkeit zum Crystal-Violett-Assay hinsichtlich der Durchführung des Experiments ergänzen sich diese beiden Methoden sehr gut, um das Überleben von Zellen zu untersuchen.

Berücksichtigen sollte man jedoch bei der Auswertung der Ergebnisse, dass bei diesem Versuch allein die Anzahl der Kolonien, nicht jedoch deren Größe bewertet wird. Es ist daher nicht möglich, Aussagen über das Verhalten einzelner Klone auf die Behandlung zu treffen. Es wird beispielsweise nicht erhoben, ob überlebende Klone vielleicht sogar einen Proliferationsschub nach der Behandlung mit dem Inhibitor erfahren, was wiederum auf interessante Resistenzmechanismen hinweisen würde. Um das Verhalten der einzelnen Zellklone besser quantifizieren zu können, wäre es von Vorteil parallel Proliferationsanalysen durchzuführen. Idealerweise bräuchte man eine Software, die zusätzlich zur manuellen Auszählung der Kolonien auch die Auswertung deren Durchmesser ermöglichen würde.

Zudem hängt das Ergebnis der händischen Auswertung der Anzahl der Kolonien vom Untersucher selber ab. Mehrere Studien konnten inzwischen aufzeigen, dass die Ergebnisse hierdurch sehr stark variieren können. Dies macht zum einen die Vergleichbarkeit mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen nahezu unmöglich, zum anderen lässt sich dadurch auch nur schwer die klinische Effizienz der zu untersuchenden Therapiestrategien korrelieren (Lamana et al., 1999; Lumley et al., 1997; Powell et al., 2016).

5.2 Diskussion des Kollektivs

Unser Kollektiv zeigt ähnliche Charakteristika wie das in der Literatur beschriebene Patientenklientel bei Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich.

So waren mit ca. 80 % auch bei dem Kollektiv in der vorliegenden Arbeit weit mehr Männer betroffen als Frauen. Am häufigsten war der Primärtumor im Oropharynx lokalisiert. In der Literatur werden vor allem Nikotin und Alkohol als zwei entscheidende Risikofaktoren für die Entstehung von HNSCC genannt (N. Johnson, 2001; N. W. Johnson et al., 1996; Wynder & Stellman, 1977). Dies bestätigte sich auch in der vorliegenden Arbeit. Bei der Mehrheit der Patienten wurde der Konsum der typischen Risikofaktoren Nikotin und Alkohol angegeben. Wie in der Literatur beschrieben, zeigte sich auch bei dem Kollektiv dieser Arbeit bereits bei Diagnosestellung ein lokal fortgeschrittenes Tumorleiden (Vermorken, 2005). Bei etwa 67,8 % der Patienten wurde die Erkrankung bei Erstdiagnose in ein Stadium III oder IV eingeteilt.

Die Kaplan-Meier-Analyse ergab ein 5-Jahres-Überleben von etwa 63 %. Das mittlere Überleben des gesamten Patientenkollektivs lag bei 10,46 Jahren.

Da in Deutschland, im Gegensatz zu anderen Ländern, wie z.B. den USA, kein einheitliches Therapiekonzept standardmäßig durchgeführt, sondern bei jedem Patienten die Behandlung individuell je nach Stadium der Erkrankung, Allgemeinzustand sowie Wunsch des Patienten angepasst wird, bestand bei dem untersuchten Kollektiv besonders die Schwierigkeit im Vergleich der verschiedenen Behandlungsstrategien. So lagen viele heterogene Therapieschemata vor, wodurch die Fallzahl in den einzelnen Gruppen oft sehr gering war. Dies schränkt die Vergleichbarkeit insbesondere bei der Untersuchung des Einflusses von Kombinationen aus mehreren Merkmalen deutlich ein. Auch die Aussagekraft der einzelnen Ergebnisse ist hierdurch herabgesetzt. Daher wäre beispielsweise die Durchführung einer Multicenterstudie von Vorteil, um die jeweiligen Fallzahlen der zu untersuchenden Gruppen zu erhöhen und somit die Power der Studie zu vergrößern.

5.3 Vergleich der Ergebnisse *in vitro* und *in vivo*

5.3.1 Vergleich der Expression von Aurora-Kinasen, p-Akt Ser473 und Survivin

Aufgrund der Komplexität des Zusammenwirkens von verschiedensten Proteinen und Signalwegen hinsichtlich der Tumorentstehung wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression der Aurora-Kinasen A und B, sowie weiterer wichtiger Zellzyklus regulierender Proteine mittels immunhistochemischer Färbung genauer evaluiert.

1998 fand erstmals der Nachweis statt, dass die Aurora-Kinase A in soliden Tumoren überexprimiert wird (Bischoff et al., 1998; Zhou et al., 1998). Auch im Tumorgewebe von HNSCC-Patienten konnten erhöhte Aurora-Kinase A Proteinlevel detektiert werden (Mehra et al., 2013). Dieselben Beobachtungen ergaben sich in der vorliegenden Arbeit. Für die Aurora-Kinase A zeigte sich eine statistisch hoch signifikante Überexpression im Tumorgewebe, verglichen mit korrespondierendem Normalgewebe (p-Wert < 0,0001).

Weitere wichtige Proteine in der Zellregulation und Zellproliferation stellen Survivin und p-Akt Ser473 dar. Da besonders diese Stellschrauben in der Karzinogenese betroffen sind, wurden zudem Färbungen von p-Akt Ser473, Survivin und p-Histon H3 angefertigt und in die statistische Auswertung mit einbezogen.

Wie in der Literatur beschrieben, war auch in dem vorliegenden Patientenkollektiv eine statistisch signifikante Überexpression von p-Akt Ser473 (p-Wert = 0,014) und Survivin (p-Wert = 0,003) im Tumorgewebe zu verzeichnen (Erpolat et al., 2012; Jaiswal et al., 2015; Pedrero et al., 2005; Qi et al., 2010; P. L. Zhang et al., 2005). Die Überexpression der genannten Proteine verursacht eine chromosomale Instabilität und trägt daher meist bereits als früher Schritt zur Karzinogenese bei (Bannister & Kouzarides, 2011; Dohi et al., 2004; Testa & Bellacosa, 2001).

In unserem Kollektiv konnten einige statistisch signifikante Korrelationen zwischen den einzelnen Markern p-Akt Ser473 und Survivin (p-Wert = 0,000002), Aurora-Kinase A und p-Akt Ser473 (p-Wert = 0,028), Aurora-Kinase B und p-Akt Ser473 (p-Wert = 0,008), Aurora-Kinase B und Survivin (p-Wert = 0,002), Aurora-Kinase A und B (p-Wert = 0,016), sowie Aurora-Kinase B und Histon H3 (p-Wert = 0,029) detektiert werden.

Aufgrund der Komplexität des Zusammenspiels bzw. der Interaktionen während der Mitose lassen sich diese Assoziationen erklären (Erpolat et al., 2012). So hat Survivin nicht nur als Inhibitor der Apoptose eine zentrale Rolle, sondern ist auch Teil des sogenannten Chromosomalen Passenger Komplexes (Qi et al., 2010). Zusammen mit weiteren Proteinen des Chromosomalen Passenger Komplexes, wie unter anderem der Aurora-Kinase B, ist Survivin somit zudem an der Regulierung der Zellteilung beteiligt (Hochegger et al., 2013; Knauer et al., 2007; Lens & Medema, 2003). Die Aurora-Kinase B abhängige

Phosphorylierung von Histon H3 an Ser10 wird wiederum für die Rekrutierung des Chromosomalen Passenger Komplex benötigt (Kitagawa & Lee, 2015).

Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Marker-Expression und klinischen Daten zeigte sich für die Tumorgröße bei Erstdiagnose und der Expression von Aurora-Kinase A (p-Wert = 0,009) bzw. p16^{INK4} (p-Wert = 0,027).

Sowohl bei der Lymphknotenmetastasierung zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang mit der Expression von Survivin (p-Wert = 0,005) bzw. Aurora-Kinase A (p-Wert = 0,010), als auch bei dem Stadium der Tumorerkrankung bei Erstdiagnose (Survivin p-Wert = 0,016 bzw. Aurora-Kinase A p-Wert = 0,006).

Die Expression von p-Akt Ser473 (p-Wert = 0,003) und Aurora-Kinase A (p-Wert = 0,046) korrelierte signifikant mit dem Grading des Tumors.

Die Ergebnisse stimmen mit den Angaben in der Literatur überein. So konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von Survivin mit einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung und größeren Primarius bei Erstdiagnose, einem niedrigeren Differenzierungsgrad der Tumorzellen, sowie Lymphknotenmetastasierung assoziiert ist (Dong et al., 2002; Ko et al., 2010; Lo Muzio et al., 2003; Marioni et al., 2006). Dieselben Beobachtungen konnten ebenfalls für die Aurora-Kinase A festgestellt werden (Jeng et al., 2004; H. Zhang et al., 2012). Eine Überexpression von p-Akt Ser473 korreliert unter anderem mit dem Stadium der Tumorerkrankung, sowie mit dem Lymphknotenbefall (Lim et al., 2005).

5.3.2 Zusammenhang zwischen Aurka-Polymorphismus und Aneuploidie

Beide Aurora-Kinasen A und B spielen eine Schlüsselrolle im Zellteilungsprozess. Die Aurora-Kinase A sorgt dabei maßgeblich für die korrekte Trennung der Zentrosomen während der Mitose, die Aurora-Kinase B bildet einen essentiellen Anteil des Chromosomalen Passenger Komplexes (CPC) und ist dadurch hauptsächlich für die korrekte chromosomale Ausrichtung in der Äquatorialebene, sowie die Anheftung der Mitosespindel am Kinetochor verantwortlich (Hochegger et al., 2013).

Inzwischen konnte schon vor vielen Jahren gezeigt werden, dass die Aurora-Kinase A in Tumorzellen nicht nur häufig überexprimiert ist, sondern dass die erhöhten Level der Aurora-Kinase A auch eine chromosomale Instabilität und dadurch Fehler bei der Zytokinese verursachen und somit eine Aneuploidie nach sich ziehen (Giet et al., 2005; Marumoto et al., 2005; Zhou et al., 1998).

Diese Beobachtung wurde in der Literatur auch speziell für die Überexpression von Aurora-Kinase B beschrieben (Boeckx et al., 2014; Gonzalez-Loyola et al., 2015).

Bei der Untersuchung der Aneuploidie mittels Durchflusszytometrie in der vorliegenden Arbeit konnten bei den homozygoten Zelllinien meist diploide und nur selten tetraploide Zellen detektiert werden. Dahingegen lagen bei den heterozygoten Zelllinien vermehrt tetraploide Zellen und damit eine verstärkte Aneuploidie vor. Diese Beobachtung wird unter anderem durch die Resultate aus Vorarbeiten mit den Zelllinien SAS und UD-SCC-5 unter Verwendung anderer Inhibitoren bestätigt (Baumann et al., 2018). Auch die Untersuchung der Aneuploidie an den Zelllinien Cal27 (homozygote AurKA) und HN (heterozygote AurKA) bestätigte, dass aneuploide Zellen nur bei der heterozygoten Zelllinie HN zu beobachten waren. Hierbei konnte durch einen si-RNA-Knockdown der Aurora-Kinase B die Anzahl aneuploider Zellen zusätzlich noch signifikant gesteigert werden (Pickhard et al., 2014b).

Die bisherigen in der Literatur beschriebenen Ergebnisse stimmen daher mit den Beobachtungen der Western-Blot und FACS Analysen dieser Arbeit überein: Bei den heterozygoten Zelllinien war zum einen die Expression der Aurora-Kinase B erhöht, zum anderen eine verstärkte Aneuploidie zu detektieren. Somit lässt sich mutmaßen, dass ein heterozygoter Aurora-Kinase A Polymorphismus mit Aneuploidie assoziiert ist und eine erhöhte Protein-Expression von Aurora-Kinase B in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Der genaue Mechanismus bleibt allerdings bis heute unklar. Eine bessere Erkenntnis über die exakten Vorgänge und Interaktionen während des Zellzyklus sollten in zukünftigen Studien noch detaillierter untersucht werden.

5.3.3 Einfluss des HPV auf das Gesamtüberleben

In den letzten Jahren konnte ein deutlich wichtigerer Effekt einer Infektion mit dem humanen Papillomavirus in der Tumorentstehung gezeigt werden als bisher angenommen. Besonders oropharyngeale Tumore sind mit dem Vorhandensein einer HPV-Infektion assoziiert (Chaturvedi, 2012). In mehreren Studien konnte bei dieser Lokalisation ein HPV positiver Status in 45-70 % der Fälle detektiert werden (Hammarstedt et al., 2006). Die Inzidenz der durch eine HPV-Infektion induzierten HNSCC im Oropharynx hat in den letzten Jahren weiter deutlich zugenommen. Besonders unter den Männern steigt die Neuerkrankungsrate stark an (Chaturvedi et al., 2011; Gillison et al., 2015; Hong et al., 2010). Insgesamt variiert die Prävalenz von HPV in HNSCC von ca. 25-43 %, je nach Lokalisation und verwendeter Methode zur Bestimmung des HPV-Status (Gillison et al., 2000; Kreimer et al., 2005; McKaig et al., 1998; Mellin et al., 2000; Wilczynski et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit ließ sich ein HPV positiver Status sogar in 49,4 % der Fälle nachweisen.

Bereits viele Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass der HPV-Status nicht nur in der Tumorentstehung einen entscheidenden Beitrag leistet, sondern auch einen wichtigen prognostischen Marker für das Überleben der Patienten mit HNSCC darstellt. Dabei korrelierte ein HPV positiver Status mit einem verlängerten Gesamtüberleben (Ang et al., 2010; Dok & Nuyts, 2016; Fakhry et al., 2008; Kimple & Harari, 2015; Lassen et al., 2009; Lohaus et al., 2014). Dies konnte auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Sowohl bei den Proliferationsanalysen der Zellkultur (Crystal-Violett-Assay p-Wert = 0,011; Colony-Formations-Assay p-Wert = 0,001) als auch bei der Auswertung der Patientenüberlebensdaten, stellte sich ein HPV positiver Status als prognostisch günstiger Parameter für das Gesamtüberleben heraus. Dies war bei dem gesamten Patientenkollektiv sowie speziell bei den Patienten mit Cetuximab-Therapie zu beobachten. Besonders ausgeprägt zeigte sich der Einfluss des HPV-Status auf das Gesamtüberleben bei den Patienten mit heterozygoter (Phe/Ile) Aurora-Kinase A (p-Wert = 0,013). Auch hinsichtlich des Therapieansprechens ergab sich die Tendenz eines günstigen Einflusses bei HPV-Positivität (p-Wert = 0,082).

5.3.4 Einfluss des AurkA-Polymorphismus auf das Gesamtüberleben

Aufgrund ihrer wichtigen Rolle bei der korrekten Chromosomentrennung während des Zellzyklus rückten die Aurora-Kinasen immer mehr in den Fokus bei der Erforschung der Karzinogenese. Inzwischen konnten zahlreiche Studien zeigen, dass die Aurora-Kinase A bei der Entstehung multipler verschiedener Tumorentitäten beteiligt ist. Hierzu gehören neben HNSCC beispielsweise das kleinzellige Lungenkarzinom, sowie Leber-, Pankreas-, Ösophagus-, Kolorektal-, Mamma- und Harnblasenkarzinome (Akkiz et al., 2010; Baba et al., 2009; Jeng et al., 2004; Lam et al., 2008; D. Li et al., 2003; Milam et al., 2007; Ogawa et al., 2008; Royce et al., 2004; Sen et al., 2002; Sun et al., 2011; E. Tanaka et al., 2005; R. Wang et al., 2009; S. B. Yang et al., 2007).

Zudem konnte regelmäßig die Überexpression der Aurora-Kinase A im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Dies korrelierte nicht nur mit dem Differenzierungsgrad der Erkrankung und mit der Tumorprogression, sondern auch mit einem verkürzten Gesamtüberleben der Patienten (Neben et al., 2004; Reiter et al., 2006; Tong et al., 2004; H. Zhang et al., 2012). Diese Beobachtungen konnte Reiter et al. ebenfalls bei Patienten mit HNSCC feststellen (Reiter et al., 2006).

Zudem besteht die Annahme, dass die Aurora-Kinase A die Zellmigration und -invasion in HNSCC initiiert (Wu et al., 2016).

Neben der Überexpression stellten mehrere Studien diese Assoziationen auch zwischen dem Genotyp der Aurora-Kinase A und dem klinischen Outcome der Patienten fest (Miao et al., 2004). Dennoch wird bis heute die prognostische Aussagekraft des AurkA-Polymorphismus auf das Gesamtüberleben kontrovers diskutiert. Auch Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe konnten keine Assoziation zwischen dem Aurora-Kinase A Polymorphismus und dem Gesamtüberleben der Patienten aufzeigen (Baumann et al., 2018; Pickhard et al., 2014b). Jedoch bestätigt sich in der Literatur eindeutig der Verdacht, dass der Aurora-Kinase A Polymorphismus das Risiko, eine Tumorerkrankung zu entwickeln, deutlich erhöht (Tang et al., 2013). Zudem spielt dieser eine entscheidende Rolle für das Therapieansprechen der Patienten. So korrelierte 2014 in einer Studie unserer Arbeitsgruppe *in vitro* der Aurora-Kinase A Polymorphismus statistisch signifikant mit dem Ansprechen auf eine Behandlung mit dem EGF-Rezeptor-Antikörper Cetuximab. Während bei der HNSCC-Zelllinie mit homozygoter Phe/Phe Variante der Aurora-Kinase A durch die Cetuximab-Therapie eine deutliche Reduktion des klonogenen Überlebens möglich war, konnte für die Zelllinie mit heterozygoter Phe/Ile Aurora-Kinase A kein Ansprechen verzeichnet werden. Die Inhibition der Aurora-Kinase A mit spezifischer siRNA in Kombination mit Cetuximab führte auch bei der heterozygoten Zelllinie zu einem statistisch signifikanten Therapieansprechen (Pickhard et al., 2014b).

Auch in einer nachfolgenden Arbeit 2018 bestätigte sich *in vitro* die Relevanz des Aurora-Kinase A Polymorphismus hinsichtlich des Therapieansprechens. Die Korrelationsanalysen ergaben ein signifikant besseres Ansprechen auf die spezifische Inhibitionstherapie bei der AurkA heterozygoten Phe/Ile Zelllinie (Baumann et al., 2018).

Die variierenden Ergebnisse lassen sich durch vielerlei Aspekte begründen. Zum einen wurden unterschiedliche Behandlungen eingesetzt. In der früheren Studie wurde gezielt die Behandlung mit dem monoklonalen Antikörper Cetuximab untersucht, wohingegen in der späteren Arbeit Docetaxel mit spezifischen Aurora-Kinase Inhibitoren verwendet wurde. Zum anderen stammten 2014 die Ergebnisse der Überlebensdaten aus einem Colony-Formations-Assay, während 2018 der Crystal-Violett-Assay zum Einsatz kam.

Die Hauptursache der unterschiedlichen Ergebnisse dürfte jedoch darin liegen, dass 2014 der HPV-Status außer Acht gelassen wurde. Wie sich inzwischen herauskristallisiert hat, spielt dieser jedoch eine wichtige Rolle sowohl als prognostischer, als auch als prädiktiver Marker und kann daher durchaus zu den abweichenden Resultaten geführt haben.

Auch in der vorliegenden Arbeit waren die *in vitro* durchgeführten Proliferations- bzw. Überlebensanalysen mit einem besseren Ansprechen der heterozygoten AurkA (Phe/Ile)

Zelllinien vergesellschaftet. Besonders ließ sich das Zellwachstum bei der Kombination aus HPV positivem Status und heterozygotem (Phe/Ile) Aurora-Kinase A Polymorphismus inhibieren.

Bei dem vorliegenden Patientenkollektiv war die homozygote Phe/Phe Variante im Tumorgewebe mit 52,2 % öfter vertreten als die heterozygote Phe/Ile mit 44,2 %. Auch im Normalgewebe waren der homozygote Phe/Phe Aurora-Kinase A Polymorphismus öfter anzutreffen, nämlich Phe/Phe zu 58,5 % und Phe/Ile zu 41,5 %. Die zweite homozygote Variante Ile/Ile war im Tumorgewebe zu 3,6 % und im Normalgewebe zu 0 % vorhanden. Die nahezu gleiche Verteilung von homozygotem Phe/Phe und heterozygotem Phe/Ile Polymorphismus im Tumorgewebe entspricht den Resultaten aus Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe (Pickhard et al., 2014b). Im Gegensatz dazu war jedoch in dieser Arbeit keine Verschiebung des Verhältnisses von homozygotem Phe/Phe und heterozygotem Phe/Ile Aurora-Kinase A Polymorphismus im Normalgewebe zu beobachten (Pickhard et al., 2014b). Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass in diesem Kollektiv aufgrund der retrospektiven Untersuchung nur wenige Gewebeproben aus Normalgewebe der Patienten zur Verfügung standen, und damit die Fallzahlen nur gering waren.

Die Auswertung der Überlebensdaten ergab einen prognostischen Vorteil hinsichtlich des Gesamtüberlebens bei Vorliegen der homozygoten (Phe/Phe) Variante der Aurora-Kinase A (p-Wert = 0,048).

Während in der Zellkultur der Inhibitor Cetuximab bzw. die Kombination aus Cetuximab und Docetaxel als primäre Behandlung eingesetzt wurde, kam bei den Patienten die Gabe von Cetuximab meist erst im palliativen Setting zum Einsatz. Dies hat zur Folge, dass die Mehrheit der HNSCC-Patienten in dem rekrutierten Kollektiv zuvor bereits multiple Therapieschemata durchlaufen hatten, unter anderem mehrere Kombinationsbehandlungen unterschiedlicher Chemotherapeutika. Die Überlebensdaten präsentieren daher einen langfristigen Effekt mit evtl. bereits Vorliegen von komplexen Resistenzen. Es stellt sich daher zum einen die Frage: hat möglicherweise ein heterozygoter Phe/Ile Aurora-Kinase A Polymorphismus zwar anfangs einen prognostischen Vorteil, jedoch ändert sich dies im Laufe der Zeit bzw. bei Zustand nach Vorbehandlung und damit zusätzlicher Resistenzentwicklung.

Zudem basieren die Resultate der *in vitro* Versuche nur auf den Ergebnissen der vier Zelllinien und somit nur auf jeweils einer Zelllinie pro Merkmalskombination aus HPV-Status

und Aurora-Kinase A Polymorphismus. Daher ist es schwierig von dem Verhalten einer Zelllinie allgemeine Rückschlüsse zu ziehen.

Da zusätzlich im untersuchten Patientenkollektiv mehr HPV negative Patienten vorliegen, stellt sich der statistische Effekt des Aurora-Kinase A Polymorphismus weniger ausgeprägt dar. Dies wird noch deutlicher, wenn die Ergebnisse aus dem Crystal-Violett-Assay betrachtet werden: So zeigte sich nur bei zusätzlicher Gabe von Docetaxel zu Cetuximab-Behandlung ein statistisch signifikant besseres Ergebnis der Zelllinien mit heterozygotem Aurora-Kinase A Polymorphismus, während bei der Cetuximab-Monotherapie kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Varianten des Aurora-Kinase A Polymorphismus hinsichtlich des Ansprechens verzeichnet werden konnte. *In vivo* ist dieser Unterschied aufgrund der multiplen Vortherapien der Patienten äußerst schwer zu detektieren.

5.3.5 Vergleich Monotherapie mit Kombinationstherapie

Etwa 30-60 % der HNSCC-Patienten erleiden im Laufe ihrer Erkrankung ein Lokalrezidiv und/oder Fernmetastasen (Peron et al., 2014). Seitdem die EXTREME Studie ein statistisch signifikant besseres Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben für Patienten mit fortgeschrittenem HNSCC bei zusätzlichem Einsatz von Cetuximab zu Cisplatin und 5-Fluoruracil zeigen konnte, gilt die platinbasierte Kombination mit Cetuximab und 5-FU als sogenannte First-Line Therapie bei lokal fortgeschrittenem oder bereits metastasiertem HNSCC (Mehra et al., 2008; Pendleton & Grandis, 2013; Vermorken et al., 2008).

Aufgrund der hohen Toxizität einer platinbasierten Chemotherapie eignen sich hierfür jedoch nur wenige Patienten (Peron et al., 2012). Für Patienten in zu schlechtem Allgemeinzustand, als auch für Patienten, die unter der platinbasierten Chemotherapie in Kombination mit Cetuximab einen weiteren Progress ihrer Tumorerkrankung erleiden, hat sich als sehr effektive Alternative die Kombinationstherapie aus Cetuximab und einem Taxol erwiesen (Hitt et al., 2012; Peron et al., 2012; Ritter et al., 2016). Allerdings handelt es sich hierbei noch um keine standardisierte Second-Line Therapie (Echarri et al., 2016).

Sowohl in den Zellkulturversuchen der vorliegenden Arbeit, als auch im Patientenkollektiv wurde die Kombinationsbehandlung aus Cetuximab und Docetaxel genauer untersucht.

In den Zellkulturversuchen war eindeutig der Trend hinsichtlich des besseren Ansprechens der kombinierten Gabe aus Cetuximab und Docetaxel bei den Zelllinien mit heterozygoter Aurora-Kinase A erkennbar. Bei heterozygoter Aurora-Kinase A und HPV-Positivität konnte die Proliferationshemmung sogar durch die zusätzliche Verwendung von Docetaxel

nochmals hoch signifikant im Vergleich zum alleinigen Cetuximab-Einsatz verstärkt werden (p-Wert = 0,0017).

Dahingegen zeigte sich keinerlei Unterschied in der Proliferationshemmung bzw. im klonogenen Überleben bei Vorliegen des homozygoten Aurora-Kinase A Polymorphismus.

Im Gegensatz zu den experimentellen Versuchen konnte *in vivo* kein verlängertes Gesamtüberleben bei den Patienten mit der Kombination aus Cetuximab und einem Taxol beobachtet werden. Da auch in unserem Patientenkollektiv in der Regel ein Taxol erst sehr spät im palliativen Setting als Kombinationspartner für Cetuximab gewählt wurde, ist das Vorliegen von mehreren bzw. komplexeren Resistenzen sehr wahrscheinlich. Der fehlende Überlebensvorteil wäre dadurch erklärbar.

6 Ausblick

Die Schwierigkeit im Verständnis und damit auch in der Therapie von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich liegt vor allem in der Heterogenität der Tumore.

Um den Einfluss des Aurora-Kinase A Phe₃₁Ile-Polymorphismus genauer untersuchen zu können, wäre als nächster Schritt die Durchführung einer prospektiven Studie im palliativen Setting von Vorteil. So wäre es möglich, von vornherein die gewünschten Merkmale für alle Patienten vollständig zu erheben und homogene Therapiegruppen zu bilden. Somit ließe sich der Effekt des HPV-Status und vor allem auch des Aurora-Kinase A Polymorphismus genauer eruieren.

Auch sollten für jeden Patienten sowohl Gewebeproben vom Primarius, als auch von den jeweiligen Rezidiven gewonnen werden, um molekulare Unterschiede im Verlauf der Erkrankung detektieren zu können.

Die einheitliche Beobachtung einer Assoziation zwischen dem Vorliegen der heterozygoten Variante der Aurora-Kinase A und Aneuploidie zeigt, dass dies eine wichtige Schlüsselrolle in der Erforschung der Prognose, als auch des Therapieansprechens der Tumorerkrankung zu sein scheint.

Aufgrund der wesentlichen Bedeutung der inkorrekten Zellteilung und der daraus resultierenden Aneuploidie im Rahmen der Karzinogenese, sollte in weiteren Studien ein besonderes Augenmerk auf die Untersuchung der möglichen Unterschiede im Zellzyklus bei Tumorgewebe mit unterschiedlichem Aurora-Kinase A Polymorphismus gerichtet werden: Beispielsweise könnte die Anordnung der Chromosomen an der Äquatoralebene, als auch die anschließende Verteilung zu den Zellpolen einen Hinweis liefern, weshalb der Aurora-Kinase A Polymorphismus das Überleben der Zellen beeinflusst.

7 Zusammenfassung

Das Augenmerk der vorliegenden Arbeit lag darin, den Einfluss des HPV-Status und des Aurora-Kinase A Phe₃₁Ile-Polymorphismus auf das Gesamtüberleben bzw. das Therapieansprechen sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* genauer zu beleuchten.

Hierfür wurden Patientendaten hinsichtlich des Einflusses des HPV-Status und des Aurora-Kinase A Polymorphismus auf das Gesamtüberleben bzw. das Therapieansprechen auf Cetuximab ausgewertet. Zudem wurden passende Zellkulturversuche und anschließend Proliferationsanalysen durchgeführt.

Die vorliegenden Ergebnisse *in vitro* als auch *in vivo* konnten zeigen, dass ein positiver HPV-Status mit einem verlängertem Gesamtüberleben korreliert, sowie mit einem guten Ansprechen in der Zellkultur einhergeht.

Zudem zeigte sich, dass der Aurora-Kinase A Polymorphismus eine große Rolle hinsichtlich der Einschätzung der Prognose und des Therapieansprechens spielt. Nicht nur in der Zellkultur konnte ein statistisch signifikanter Effekt des Aurora-Kinase A Polymorphismus auf die Proliferation detektiert werden, sondern sogar in dem erschwerten Setting einer retrospektiven Studie mit multipel vorbehandelten Patienten war eine prognostische Aussagekraft bzgl. des Gesamtüberlebens und des Therapieansprechens auf Cetuximab des Aurora-Kinase A Polymorphismus beobachtbar.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass neben dem HPV-Status auch der Aurora-Kinase A Phe₃₁Ile-Polymorphismus einen möglichen prädikativen als auch prognostischen Marker bei Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich darstellt und das Therapieansprechen beeinflusst.

Diese Arbeit stellt eine Grundlage dar, auf die weitere prospektive Studien aufgebaut werden können, um hiervon in der Zukunft Behandlungsempfehlungen ableiten zu können.

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Modell zur Entstehung eines HNSCC; modifiziert nach Califano, van der Riet et al., 1996.....	15
Abb. 2: Schematische Übersicht der Liganden der einzelnen ErbB-Rezeptoren; nach Hynes, Horsch et al., 2001.....	21
Abb. 3: Schematische Darstellung des EGFR-Signalwegs; nach Choudhary, Rohatgi et al., 2016.....	22
Abb. 4: Lokalisation von Aurora-Kinase A und Aurora-Kinase B im Zellzyklus; modifiziert nach Carmena, Earnshaw, 2003.....	25
Abb. 5: Schematische Darstellung der Aktivierung von Aurora-Kinase A; modifiziert nach Carmena, Earnshaw, 2003.....	27
Abb. 6: Schematische Darstellung der Aktivierung von Aurora B; nach Carmena, Earnshaw, 2003.....	29
Abb. 7: Versuchsaufbau des Crystal-Violett Proliferations-Assay.....	53
Abb. 8: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus des Western-Blot.....	57
Abb. 9: Beispiel einer Amplifikations- (links) und Schmelzkurve (rechts) der semiquantitativen RT-PCR.....	63
Abb. 10: Beispiel einer Gelelektrophorese zur Ermittlung des Aurora-Kinase A Polymorphismus.....	63
Abb. 11: Elektropherogramm: Beispiel für Aurora-Kinase A Polymorphismus homozygot Phe/Phe.....	64
Abb. 12: Elektropherogramm: Beispiel für Aurora-Kinase A Polymorphismus heterozygot Phe/Ile.....	64
Abb. 13: Elektropherogramm: Beispiel für Aurora-Kinase A Polymorphismus homozygot Ile/Ile.....	64
Abb. 14: Proliferations-Analysen der verwendeten Zelllinien UD-SCC-2, UD-SCC-5, UP-SCC-154 und SAS.....	65
Abb. 15: Einfluss der Einzel- bzw. Kombinationsbehandlung auf die Proliferation in Abhängigkeit von HPV-Status bzw. Aurora-Kinase A Polymorphismus.....	66
Abb. 16: Gruppenvergleich des Einflusses der Einzel- bzw. Kombinationsbehandlung auf die Proliferation in Abhängigkeit von HPV-Status bzw. Aurora-Kinase A Polymorphismus.....	67

Abb. 17: Gruppenvergleich des Einflusses der Einzel- bzw. Kombinationsbehandlung auf die Proliferation in Abhängigkeit von HPV-Status und Aurora-Kinase A Polymorphismus	69
Abb. 18: Einfluss der Einzel- bzw. Kombinationsbehandlung auf das klonogene Überleben der verwendeten Zelllinien UD-SCC-2, UD-SCC-5, UP-SCC-154 und SAS	70
Abb. 19: Einfluss der Einzel- bzw. Kombinationsbehandlung auf das klonogene Überleben in Abhängigkeit von HPV-Status bzw. Aurora-Kinase A Polymorphismus	72
Abb. 20: Gruppenvergleich des Einflusses der Einzel- bzw. Kombinationsbehandlung auf das klonogene Überleben in Abhängigkeit von HPV-Status und Aurora-Kinase A Polymorphismus	73
Abb. 21: Gruppenvergleich des Einflusses der Einzel- bzw. Kombinationsbehandlung auf das klonogene Überleben in Abhängigkeit von HPV-Status und Aurora-Kinase A Polymorphismus	74
Abb. 22: Ergebnisse des Western-Blots	76
Abb. 23: Ergebnisse der Durchflusszytometrie; p-Wert = 0,019	77
Abb. 24: Immunhistochemische Färbung von p-Akt Ser473 im Tumorgewebe (links) und im Normalgewebe (rechts)	78
Abb. 25: Immunhistochemische Färbung von Survivin im Tumorgewebe (links) und im Normalgewebe (rechts)	78
Abb. 26: Immunhistochemische Färbung von AurkB im Tumorgewebe (links) und im Normalgewebe (rechts)	78
Abb. 27: Immunhistochemische Färbung von AurkA im Tumorgewebe (links) und im Normalgewebe (rechts)	79
Abb. 28: Immunhistochemische Färbung von p-Histon H3 Ser10 im Tumorgewebe (links) und im Normalgewebe (rechts)	79
Abb. 29: Immunhistochemische Färbung p16 positiv (links) und p16 negativ (rechts)	79
Abb. 30: Gesamtüberleben des Patientenkollektivs	83
Abb. 31: Kaplan-Meier-Analyse: Auswirkung von HPV-Status auf Gesamtüberleben bei heterozygotem AurkA-Polymorphismus; Log Rank p-Wert = 0,027	84
Abb. 32: Kaplan-Meier-Analyse: Auswirkung von HPV-Status auf Gesamtüberleben bei homozygotem Phe/Phe AurkA-Polymorphismus; Log Rank p-Wert = 0,092	85
Abb. 33: Kaplan-Meier-Analyse: prognostische Relevanz von HPV-Status und AurkA-Polymorphismus auf das Gesamtüberleben von Patienten mit Cetuximab-Therapie; Log Rank p-Wert = 0,001	85

Abb. 34: Kaplan-Meier-Analyse: Einfluss von HPV-Status auf das Gesamtüberleben von Patienten mit Cetuximab-Therapie und heterozygoten AurkA-Polymorphismus; Log Rank p-Wert = 0,013	86
Abb. 35: Kaplan-Meier-Analyse: Einfluss von HPV-Status auf das Gesamtüberleben von Patienten mit Cetuximab-Therapie und homozygoten AurkA-Polymorphismus; Log Rank p-Wert = 0,067	86
Abb. 36: Kaplan-Meier-Analyse: prognostische Relevanz des AurkA-Polymorphismus auf das Gesamtüberleben von Patienten mit Cetuximab-Therapie; Log Rank p-Wert = 0,04887	
Abb. 37: Kaplan-Meier-Analyse: Statistisch signifikant besseres Gesamtüberleben von Patienten mit HPV positivem Status und homozygoter Phe/Phe AurkA bei Cetuximab-Therapie; Log Rank p-Wert = 0,0001	88
Abb. 38: Kaplan-Meier-Analyse: prognostische Relevanz des HPV-Status auf das Ansprechen der Cetuximab-Therapie bei homozygoter Phe/Phe AurkA; Log Rank p-Wert = 0,082	88
Abb. 39: Kaplan-Meier-Analysen: prognostische Relevanz des AurkA-Polymorphismus auf das Ansprechen der Cetuximab-Therapie bei HPV positivem Status; Log Rank p-Wert = 0,254	89
Abb. 40: Kaplan-Meier-Analysen: prognostische Relevanz des AurkA-Polymorphismus auf das Ansprechen der Cetuximab-Therapie bei HPV negativem Status; Log Rank p-Wert = 0,229	89
Abb. 41: Kaplan-Meier-Analysen: Unterschied im Gesamtüberleben von Patienten mit Cetuximab-Therapie in bzw. ohne Kombination mit Taxol; Log Rank p-Wert < 0,0001	90
Abb. 42: Kaplan-Meier-Analysen: prognostische Relevanz von p16 und AurkA-Polymorphismus bei Patienten mit Cetuximab-Therapie mit bzw. ohne Taxol; Log Rank p-Wert = 0,021	90
Abb. 43: Ergebnisse des Western-Blots nach verlängerter (48 h) Inkubation	133

8.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: TNM-Klassifikation der HNSCC (Sobin et al., 2010).....	12
Tab. 2: Stadieneinteilung der HNSCC (Sobin et al., 2010)	13
Tab. 3: Patientenkollektiv.....	38
Tab. 4: Verwendete Zelllinien	38
Tab. 5: Medien und Supplemente für die Zellkultur	39
Tab. 6: Inhibitoren.....	39
Tab. 7: Primärantikörper für Western-Blot	39
Tab. 8: Sekundärantikörper	40
Tab. 9: Antikörper für Immunhistochemie	40
Tab. 10: Verwendete Reagenzien und Enzyme	42
Tab. 11: Verwendete selbst hergestellte Reagenzien und Puffer.....	43
Tab. 12: Verwendete Geräte	44
Tab. 13: Verwendete Verbrauchsmaterialien	45
Tab. 14: Verwendete Computersoftware	45
Tab. 15: Primersequenzen Real-Time PCR	47
Tab. 16: Reagenzien für Mastermix der Real-Time PCR	47
Tab. 17: Master-Mix für Restriktionsverdau	48
Tab. 18: Immunreaktive Scores (IRS=SI+PP).....	50
Tab. 19: Zusammensetzung der Laufgele	55
Tab. 20: Zusammensetzung des Sammelgels	56
Tab. 21: Definition der Signifikanzniveaus.....	60
Tab. 22: Charakterisierung des Patientenkollektivs.....	62
Tab. 23: p-Werte der Proliferationsanalysen nach Einzel- bzw. Kombinationsbehandlung der Zelllinien; Signifikanz bezieht sich jeweils auf die unbehandelte Kontrolle.....	65
Tab. 24: p-Werte der Proliferationsanalysen nach Einzel- bzw. Kombinationsbehandlung in Abhängigkeit von HPV-Status bzw. Aurora-Kinase A Polymorphismus; Signifikanz bezieht sich jeweils auf die unbehandelte Kontrolle	67
Tab. 25: p-Werte der Gruppenvergleiche des Einflusses der Einzel- bzw. Kombinationsbehandlung auf die Proliferation in Abhängigkeit von HPV-Status bzw. Aurora-Kinase A Polymorphismus	68
Tab. 26: p-Werte der Gruppenvergleiche des Einflusses der Einzel- bzw. Kombinationsbehandlung auf die Proliferation in Abhängigkeit von HPV-Status und Aurora-Kinase A Polymorphismus.....	69

Tab. 27: p-Werte des Colony-Formations-Assays nach Einzel- bzw. Kombinationsbehandlung der Zelllinien; Signifikanz bezieht sich jeweils auf die unbehandelte Kontrolle.....	71
Tab. 28: p-Werte des Colony-Formations-Assays nach Einzel- bzw. Kombinationsbehandlung in Abhängigkeit von HPV-Status bzw. Aurora-Kinase A Polymorphismus; Signifikanz bezieht sich jeweils auf die unbehandelte Kontrolle	72
Tab. 29: p-Werte der Gruppenvergleiche des Einflusses der Einzel- bzw. Kombinationsbehandlung auf das klonogene Überleben in Abhängigkeit von HPV-Status und Aurora-Kinase A Polymorphismus.....	73
Tab. 30: p-Werte der Gruppenvergleiche des Einflusses der Einzel- bzw. Kombinationsbehandlung auf das klonogene Überleben in Abhängigkeit von HPV-Status und Aurora-Kinase A Polymorphismus.....	75
Tab. 31: Wilcoxon-Mann-Whitney-Test: Vergleich des Expressionsprofiles zwischen Tumor- und Normalgewebe.....	80
Tab. 32: Übersicht der unterschiedlichen Marker-Korrelationen (Korrelations-Analyse nach Spearman).....	81
Tab. 33: Anzahl der Fälle der Marker-Expression bei Cut-off Wert = 2	81
Tab. 34: Zusammenhang von Marker-Expression und klinischen Daten * Exakter Test nach Fisher	82
Tab. 35: Zusammenhang von Marker-Expression und klinischen Daten	83
Tab. 36: Cox-Regressionsmodell Fallverarbeitung.....	91
Tab. 37: Ergebnisse der Cox-Regressionsmodell	92
Tab. 38: Übersicht der unterschiedlichen Marker-Korrelationen (Korrelations-Analyse nach Spearman).....	132

8.3 Literaturverzeichnis

- Akkiz, H., Bayram, S., Bekar, A., Akgollu, E., & Ozdil, B. (2010). Relationship between functional polymorphism in the Aurora A gene and susceptibility of hepatocellular carcinoma. *J Viral Hepat*, *17*(9), 668-674. doi:10.1111/j.1365-2893.2009.01225.x
- Allegra, C. J., Rumble, R. B., Hamilton, S. R., Mangu, P. B., Roach, N., Hantel, A., & Schilsky, R. L. (2016). Extended RAS Gene Mutation Testing in Metastatic Colorectal Carcinoma to Predict Response to Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibody Therapy: American Society of Clinical Oncology Provisional Clinical Opinion Update 2015. *J Clin Oncol*, *34*(2), 179-185. doi:10.1200/JCO.2015.63.9674
- Alley, M. C., Scudiero, D. A., Monks, A., Hursey, M. L., Czerwinski, M. J., Fine, D. L., Abbott, B. J., Mayo, J. G., Shoemaker, R. H., & Boyd, M. R. (1988). Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res*, *48*(3), 589-601.
- Ambrosini, G., Adida, C., & Altieri, D. C. (1997). A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med*, *3*(8), 917-921.
- Amornphimoltham, P., Sriuranpong, V., Patel, V., Benavides, F., Conti, C. J., Sauk, J., Sausville, E. A., Molinolo, A. A., & Gutkind, J. S. (2004). Persistent activation of the Akt pathway in head and neck squamous cell carcinoma: a potential target for UCN-01. *Clin Cancer Res*, *10*(12 Pt 1), 4029-4037. doi:10.1158/1078-0432.CCR-03-0249
- Andrews, P. D., Knatko, E., Moore, W. J., & Swedlow, J. R. (2003). Mitotic mechanics: the auroras come into view. *Curr Opin Cell Biol*, *15*(6), 672-683.
- Ang, K. K., Harris, J., Wheeler, R., Weber, R., Rosenthal, D. I., Nguyen-Tan, P. F., Westra, W. H., Chung, C. H., Jordan, R. C., Lu, C., Kim, H., Axelrod, R., Silverman, C. C., Redmond, K. P., & Gillison, M. L. (2010). Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*, *363*(1), 24-35. doi:10.1056/NEJMoa0912217
- Baba, Y., Noshu, K., Shima, K., Irahara, N., Kure, S., Toyoda, S., Kirkner, G. J., Goel, A., Fuchs, C. S., & Ogino, S. (2009). Aurora-A expression is independently associated with chromosomal instability in colorectal cancer. *Neoplasia*, *11*(5), 418-425.
- Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res*, *21*(3), 381-395. doi:10.1038/cr.2011.22
- Bardelli, A., & Siena, S. (2010). Molecular mechanisms of resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancer. *J Clin Oncol*, *28*(7), 1254-1261. doi:10.1200/JCO.2009.24.6116
- Barnes, L., International Agency for Research on, C., World Health, O., International Academy of, P., & Universitäts-Spital, Z. (2007). *Pathology and genetics of head and neck tumours*. Lyon: IARC Press.
- Baumann, A., Buchberger, A. M. S., Piontek, G., Schuttler, D., Rudelius, M., Reiter, R., Gebel, L., Piendl, G., Brockhoff, G., & Pickhard, A. (2018). The Aurora-Kinase A Phe31-Ile polymorphism as possible predictor of response to treatment in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, *9*(16), 12769-12780. doi:10.18632/oncotarget.24355
- Baumli, J. M., Cohen, R. B., & Aggarwal, C. (2016). Immunotherapy for head and neck cancer: latest developments and clinical potential. *Ther Adv Med Oncol*, *8*(3), 168-175. doi:10.1177/1758834016631529
- Bernier, J., Dommenege, C., Ozsahin, M., Matuszewska, K., Lefebvre, J. L., Greiner, R. H., Giralt, J., Maingon, P., Rolland, F., Bolla, M., Cognetti, F., Bourhis, J., Kirkpatrick, A., van Glabbeke, M., European Organization for, R., & Treatment of Cancer, T. (2004). Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally

- advanced head and neck cancer. *N Engl J Med*, 350(19), 1945-1952. doi:10.1056/NEJMoa032641
- Betioli, J., Villa, L. L., & Sichero, L. (2013). Impact of HPV infection on the development of head and neck cancer. *Braz J Med Biol Res*, 46(3), 217-226.
- Bischoff, J. R., Anderson, L., Zhu, Y., Mossie, K., Ng, L., Souza, B., Schryver, B., Flanagan, P., Clairvoyant, F., Ginther, C., Chan, C. S., Novotny, M., Slamon, D. J., & Plowman, G. D. (1998). A homologue of *Drosophila aurora* kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO J*, 17(11), 3052-3065. doi:10.1093/emboj/17.11.3052
- Bissada, E., Abboud, O., Abou Chacra, Z., Guertin, L., Weng, X., Nguyen-Tan, P. F., Tabet, J. C., Thibaudeau, E., Lambert, L., Audet, M. L., Fortin, B., & Soulieres, D. (2013). Prevalence of K-RAS Codons 12 and 13 Mutations in Locally Advanced Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Impact on Clinical Outcomes. *Int J Otolaryngol*, 2013, 848021. doi:10.1155/2013/848021
- Blitzer, G. C., Smith, M. A., Harris, S. L., & Kimple, R. J. (2014). Review of the clinical and biologic aspects of human papillomavirus-positive squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 88(4), 761-770. doi:10.1016/j.ijrobp.2013.08.029
- Böcker, W., & Aigner, T. (2012). *Pathologie : mit rund 150 Tabellen* (5., vollst. überarb. Aufl. ed.). München: Elsevier, Urban & Fischer.
- Bockmuhl, U., & Petersen, I. (2002). DNA ploidy and chromosomal alterations in head and neck squamous cell carcinoma. *Virchows Arch*, 441(6), 541-550. doi:10.1007/s00428-002-0729-3
- Boeckx, C., Op de Beeck, K., Wouters, A., Deschoolmeester, V., Limame, R., Zwaenepoel, K., Specenier, P., Pauwels, P., Vermorken, J. B., Peeters, M., Van Camp, G., Baay, M., & Lardon, F. (2014). Overcoming cetuximab resistance in HNSCC: the role of AURKB and DUSP proteins. *Cancer Lett*, 354(2), 365-377. doi:10.1016/j.canlet.2014.08.039
- Boje, C. R. (2014). Impact of comorbidity on treatment outcome in head and neck squamous cell carcinoma - a systematic review. *Radiother Oncol*, 110(1), 81-90. doi:10.1016/j.radonc.2013.07.005
- Bonner, J. A., Harari, P. M., Giralt, J., Azarnia, N., Shin, D. M., Cohen, R. B., Jones, C. U., Sur, R., Raben, D., Jassem, J., Ove, R., Kies, M. S., Baselga, J., Youssoufian, H., Amellal, N., Rowinsky, E. K., & Ang, K. K. (2006). Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*, 354(6), 567-578. doi:10.1056/NEJMoa053422
- Bose, P., Brockton, N. T., & Dort, J. C. (2013). Head and neck cancer: from anatomy to biology. *Int J Cancer*, 133(9), 2013-2023. doi:10.1002/ijc.28112
- Bossi, P., Resteghini, C., Paielli, N., Licitra, L., Pilotti, S., & Perrone, F. (2016). Prognostic and predictive value of EGFR in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. doi:10.18632/oncotarget.11413
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.
- Califano, J., van der Riet, P., Westra, W., Nawroz, H., Clayman, G., Piantadosi, S., Corio, R., Lee, D., Greenberg, B., Koch, W., & Sidransky, D. (1996). Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res*, 56(11), 2488-2492.
- Campo-Trapero, J., Cano-Sanchez, J., Palacios-Sanchez, B., Sanchez-Gutierrez, J. J., Gonzalez-Moles, M. A., & Bascones-Martinez, A. (2008). Update on molecular pathology in oral cancer and precancer. *Anticancer Res*, 28(2B), 1197-1205.

- Cancer Genome Atlas, N. (2015). Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*, 517(7536), 576-582. doi:10.1038/nature14129
- Cantley, L. C. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, 296(5573), 1655-1657. doi:10.1126/science.296.5573.1655
- Carmena, M., & Earnshaw, W. C. (2003). The cellular geography of aurora kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(11), 842-854. doi:10.1038/nrm1245
- Chai, R. C., Lim, Y., Frazer, I. H., Wan, Y., Perry, C., Jones, L., Lambie, D., & Punyadeera, C. (2016). A pilot study to compare the detection of HPV-16 biomarkers in salivary oral rinses with tumour p16(INK4a) expression in head and neck squamous cell carcinoma patients. *BMC Cancer*, 16, 178. doi:10.1186/s12885-016-2217-1
- Chang, J. H., Wu, C. C., Yuan, K. S., Wu, A. T. H., & Wu, S. Y. (2017). Locoregionally recurrent head and neck squamous cell carcinoma: incidence, survival, prognostic factors, and treatment outcomes. *Oncotarget*, 8(33), 55600-55612. doi:10.18632/oncotarget.16340
- Chaturvedi, A. K. (2012). Epidemiology and clinical aspects of HPV in head and neck cancers. *Head Neck Pathol*, 6 Suppl 1, S16-24. doi:10.1007/s12105-012-0377-0
- Chaturvedi, A. K., Engels, E. A., Pfeiffer, R. M., Hernandez, B. Y., Xiao, W., Kim, E., Jiang, B., Goodman, M. T., Sibug-Saber, M., Cozen, W., Liu, L., Lynch, C. F., Wentzensen, N., Jordan, R. C., Altekrose, S., Anderson, W. F., Rosenberg, P. S., & Gillison, M. L. (2011). Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol*, 29(32), 4294-4301. doi:10.1200/JCO.2011.36.4596
- Chau, N. G., & Hammerman, P. S. (2016). Heads Up! Predictive Gene Signatures in Head and Neck Cancer May Be Coming Soon. *Clin Cancer Res*, 22(15), 3710-3712. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-0582
- Chen, S. S., Chang, P. C., Cheng, Y. W., Tang, F. M., & Lin, Y. S. (2002). Suppression of the STK15 oncogenic activity requires a transactivation-independent p53 function. *EMBO J*, 21(17), 4491-4499.
- Choudhary, K. S., Rohatgi, N., Halldorsson, S., Briem, E., Gudjonsson, T., Gudmundsson, S., & Rolfsson, O. (2016). EGFR Signal-Network Reconstruction Demonstrates Metabolic Crosstalk in EMT. *PLoS Comput Biol*, 12(6), e1004924. doi:10.1371/journal.pcbi.1004924
- Chung, C. H., & Gillison, M. L. (2009). Human papillomavirus in head and neck cancer: its role in pathogenesis and clinical implications. *Clin Cancer Res*, 15(22), 6758-6762. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0784
- Ciardiello, F., & Tortora, G. (2001). A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res*, 7(10), 2958-2970.
- Cohen, S. (1983). The epidermal growth factor (EGF). *Cancer*, 51(10), 1787-1791.
- Cunningham, D., Humblet, Y., Siena, S., Khayat, D., Bleiberg, H., Santoro, A., Bets, D., Mueser, M., Harstrick, A., Verslype, C., Chau, I., & Van Cutsem, E. (2004). Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*, 351(4), 337-345. doi:10.1056/NEJMoa033025
- Dar, A. A., Goff, L. W., Majid, S., Berlin, J., & El-Rifai, W. (2010). Aurora kinase inhibitors--rising stars in cancer therapeutics? *Mol Cancer Ther*, 9(2), 268-278. doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-0765
- Dawson, M. A., & Kouzarides, T. (2012). Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell*, 150(1), 12-27. doi:10.1016/j.cell.2012.06.013
- De Carvalho, T. G., De Carvalho, A. C., Maia, D. C., Ogawa, J. K., Carvalho, A. L., & Vettore, A. L. (2013). Search for mutations in signaling pathways in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*, 30(1), 334-340. doi:10.3892/or.2013.2455

- Demokan, S., & Dalay, N. (2011). Role of DNA methylation in head and neck cancer. *Clin Epigenetics*, 2(2), 123-150. doi:10.1007/s13148-011-0045-3
- Deng, Z., Hasegawa, M., Aoki, K., Matayoshi, S., Kiyuna, A., Yamashita, Y., Uehara, T., Agena, S., Maeda, H., Xie, M., & Suzuki, M. (2014). A comprehensive evaluation of human papillomavirus positive status and p16INK4a overexpression as a prognostic biomarker in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*, 45(1), 67-76. doi:10.3892/ijo.2014.2440
- Descamps, G., Karaca, Y., J, R. L., Kindt, N., Decaestecker, C., Remmelink, M., Larsimont, D., Andry, G., Hassid, S., Rodriguez, A., Khalife, M., Journe, F., & Saussez, S. (2016). Classical risk factors, but not HPV status, predict survival after chemoradiotherapy in advanced head and neck cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol*. doi:10.1007/s00432-016-2203-7
- Dhar, A., Mehta, S., Banerjee, S., Dhar, K., Dhar, G., Sengupta, K., Ray, G., Banerjee, S. K., & Campbell, D. R. (2005). Epidermal growth factor receptor: is a novel therapeutic target for pancreatic cancer? *Front Biosci*, 10, 1763-1767.
- Diasio, R. B., & Fourie, J. (2006). Targeting the epidermal growth factor receptor in the treatment of colorectal cancer: state of the art. *Drugs*, 66(11), 1441-1463.
- Dietz, A., Knödl, M., & Lordick, F. (2014). Primary treatment of head and neck tumors. *Der Onkologe*, 20(2), 144-151. doi:10.1007/s00761-013-2586-x
- Dohi, T., Okada, K., Xia, F., Wilford, C. E., Samuel, T., Welsh, K., Marusawa, H., Zou, H., Armstrong, R., Matsuzawa, S., Salvesen, G. S., Reed, J. C., & Altieri, D. C. (2004). An IAP-IAP complex inhibits apoptosis. *J Biol Chem*, 279(33), 34087-34090. doi:10.1074/jbc.C400236200
- Dok, R., & Nuyts, S. (2016). HPV Positive Head and Neck Cancers: Molecular Pathogenesis and Evolving Treatment Strategies. *Cancers (Basel)*, 8(4). doi:10.3390/cancers8040041
- Dong, Y., Sui, L., Watanabe, Y., Sugimoto, K., & Tokuda, M. (2002). Survivin expression in laryngeal squamous cell carcinomas and its prognostic implications. *Anticancer Res*, 22(4), 2377-2383.
- Du, Y., Peyser, N. D., & Grandis, J. R. (2014). Integration of molecular targeted therapy with radiation in head and neck cancer. *Pharmacol Ther*, 142(1), 88-98. doi:10.1016/j.pharmthera.2013.11.007
- Echarri, M. J., Lopez-Martin, A., & Hitt, R. (2016). Targeted Therapy in Locally Advanced and Recurrent/Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (LA-R/M HNSCC). *Cancers (Basel)*, 8(3). doi:10.3390/cancers8030027
- Erpolat, O. P., Gocun, P. U., Akmansu, M., Karakus, E., & Akyol, G. (2012). High expression of nuclear survivin and Aurora B predicts poor overall survival in patients with head and neck squamous cell cancer. *Strahlenther Onkol*, 188(3), 248-254. doi:10.1007/s00066-011-0042-7
- Ewart-Toland, A., Briassouli, P., de Koning, J. P., Mao, J. H., Yuan, J., Chan, F., MacCarthy-Morrogh, L., Ponder, B. A., Nagase, H., Burn, J., Ball, S., Almeida, M., Linardopoulos, S., & Balmain, A. (2003). Identification of Stk6/STK15 as a candidate low-penetrance tumor-susceptibility gene in mouse and human. *Nat Genet*, 34(4), 403-412. doi:10.1038/ng1220
- Eyers, P. A., Erikson, E., Chen, L. G., & Maller, J. L. (2003). A novel mechanism for activation of the protein kinase Aurora A. *Curr Biol*, 13(8), 691-697.
- Fakhry, C., & Gillison, M. L. (2006). Clinical implications of human papillomavirus in head and neck cancers. *J Clin Oncol*, 24(17), 2606-2611. doi:10.1200/JCO.2006.06.1291
- Fakhry, C., Westra, W. H., Li, S., Cmelak, A., Ridge, J. A., Pinto, H., Forastiere, A., & Gillison, M. L. (2008). Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst*, 100(4), 261-269. doi:10.1093/jnci/djn011

- Feoktistova, M., Geserick, P., & Leverkus, M. (2016). Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harb Protoc*, 2016(4), pdb prot087379. doi:10.1101/pdb.prot087379
- Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., & Parkin, D. M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*, 127(12), 2893-2917. doi:10.1002/ijc.25516
- Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J. W., Comber, H., Forman, D., & Bray, F. (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*, 49(6), 1374-1403. doi:10.1016/j.ejca.2012.12.027
- Ferris, R. L., Blumenschein, G., Jr., Fayette, J., Guigay, J., Colevas, A. D., Licitra, L., Harrington, K. J., Kasper, S., Vokes, E. E., Even, C., Worden, F., Saba, N. F., Docampo, L. C. I., Haddad, R., Rordorf, T., Kiyota, N., Tahara, M., Lynch, M., Jayaprakash, V., Li, L., & Gillison, M. L. (2018). Nivolumab vs investigator's choice in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: 2-year long-term survival update of CheckMate 141 with analyses by tumor PD-L1 expression. *Oral Oncol*, 81, 45-51. doi:10.1016/j.oraloncology.2018.04.008
- Forster, M. D., & Devlin, M. J. (2018). Immune Checkpoint Inhibition in Head and Neck Cancer. *Front Oncol*, 8, 310. doi:10.3389/fonc.2018.00310
- Freier, K., Joos, S., Flechtenmacher, C., Devens, F., Benner, A., Bosch, F. X., Lichter, P., & Hofele, C. (2003). Tissue microarray analysis reveals site-specific prevalence of oncogene amplifications in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*, 63(6), 1179-1182.
- Fresno Vara, J. A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., & Gonzalez-Baron, M. (2004). PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev*, 30(2), 193-204. doi:10.1016/j.ctrv.2003.07.007
- Fukuda, T., Mishina, Y., Walker, M. P., & DiAugustine, R. P. (2005). Conditional transgenic system for mouse aurora a kinase: degradation by the ubiquitin proteasome pathway controls the level of the transgenic protein. *Mol Cell Biol*, 25(12), 5270-5281. doi:10.1128/MCB.25.12.5270-5281.2005
- Furniss, C. S., McClean, M. D., Smith, J. F., Bryan, J., Nelson, H. H., Peters, E. S., Posner, M. R., Clark, J. R., Eisen, E. A., & Kelsey, K. T. (2007). Human papillomavirus 16 and head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*, 120(11), 2386-2392. doi:10.1002/ijc.22633
- Garcia, B. A., Barber, C. M., Hake, S. B., Ptak, C., Turner, F. B., Busby, S. A., Shabanowitz, J., Moran, R. G., Allis, C. D., & Hunt, D. F. (2005). Modifications of human histone H3 variants during mitosis. *Biochemistry*, 44(39), 13202-13213. doi:10.1021/bi050906n
- Giet, R., Petretti, C., & Prigent, C. (2005). Aurora kinases, aneuploidy and cancer, a coincidence or a real link? *Trends Cell Biol*, 15(5), 241-250. doi:10.1016/j.tcb.2005.03.004
- Giet, R., & Prigent, C. (1999). Aurora/lpl1p-related kinases, a new oncogenic family of mitotic serine-threonine kinases. *J Cell Sci*, 112 (Pt 21), 3591-3601.
- Gillison, M. L., Chaturvedi, A. K., Anderson, W. F., & Fakhry, C. (2015). Epidemiology of Human Papillomavirus-Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Oncol*, 33(29), 3235-3242. doi:10.1200/JCO.2015.61.6995
- Gillison, M. L., D'Souza, G., Westra, W., Sugar, E., Xiao, W., Begum, S., & Viscidi, R. (2008). Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*, 100(6), 407-420. doi:10.1093/jnci/djn025
- Gillison, M. L., Koch, W. M., Capone, R. B., Spafford, M., Westra, W. H., Wu, L., Zahurak, M. L., Daniel, R. W., Viglione, M., Symer, D. E., Shah, K. V., & Sidransky, D. (2000).

- Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*, 92(9), 709-720.
- Glover, D. M., Leibowitz, M. H., McLean, D. A., & Parry, H. (1995). Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell*, 81(1), 95-105.
- Gonzalez-Loyola, A., Fernandez-Miranda, G., Trakala, M., Partida, D., Samejima, K., Ogawa, H., Canamero, M., de Martino, A., Martinez-Ramirez, A., de Carcer, G., Perez de Castro, I., Earnshaw, W. C., & Malumbres, M. (2015). Aurora B Overexpression Causes Aneuploidy and p21Cip1 Repression during Tumor Development. *Mol Cell Biol*, 35(20), 3566-3578. doi:10.1128/MCB.01286-14
- Gospodarowicz, M. K., Miller, D., Groome, P. A., Greene, F. L., Logan, P. A., & Sobin, L. H. (2004). The process for continuous improvement of the TNM classification. *Cancer*, 100(1), 1-5. doi:10.1002/cncr.11898
- Grandis, J. R., & Tweardy, D. J. (1993). Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res*, 53(15), 3579-3584.
- Grant, P. A. (2001). A tale of histone modifications. *Genome Biol*, 2(4), REVIEWS0003.
- Gregoire, V., Lefebvre, J. L., Licitra, L., Felip, E., & Group, E.-E.-E. G. W. (2010). Squamous cell carcinoma of the head and neck: EHNS-ESMO-ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 21 Suppl 5, v184-186. doi:10.1093/annonc/mdq185
- Grille, S. J., Bellacosa, A., Upson, J., Klein-Szanto, A. J., van Roy, F., Lee-Kwon, W., Donowitz, M., Tschlis, P. N., & Larue, L. (2003). The protein kinase Akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines. *Cancer Res*, 63(9), 2172-2178.
- Gu, J., Gong, Y., Huang, M., Lu, C., Spitz, M. R., & Wu, X. (2007). Polymorphisms of STK15 (Aurora-A) gene and lung cancer risk in Caucasians. *Carcinogenesis*, 28(2), 350-355. doi:10.1093/carcin/bgl149
- Hammarstedt, L., Lindquist, D., Dahlstrand, H., Romanitan, M., Dahlgren, L. O., Joneberg, J., Creson, N., Lindholm, J., Ye, W., Dalianis, T., & Munck-Wikland, E. (2006). Human papillomavirus as a risk factor for the increase in incidence of tonsillar cancer. *Int J Cancer*, 119(11), 2620-2623. doi:10.1002/ijc.22177
- Han, H., & Von Hoff, D. D. (2006). Aurora sheds light on head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 12(17), 5003-5004. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1329
- Hashibe, M., Ford, D. E., & Zhang, Z. F. (2002). Marijuana smoking and head and neck cancer. *J Clin Pharmacol*, 42(11 Suppl), 103S-107S.
- Hashibe, M., Straif, K., Tashkin, D. P., Morgenstern, H., Greenland, S., & Zhang, Z. F. (2005). Epidemiologic review of marijuana use and cancer risk. *Alcohol*, 35(3), 265-275. doi:10.1016/j.alcohol.2005.04.008
- Hauf, S., Cole, R. W., LaTerra, S., Zimmer, C., Schnapp, G., Walter, R., Heckel, A., van Meel, J., Rieder, C. L., & Peters, J. M. (2003). The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol*, 161(2), 281-294. doi:10.1083/jcb.200208092
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., & Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*, 10(4), 413-417.
- Hitt, R., Irigoyen, A., Cortes-Funes, H., Grau, J. J., Garcia-Saenz, J. A., Cruz-Hernandez, J. J., Spanish, H., & Neck Cancer Cooperative, G. (2012). 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*, 23(4), 1016-1022. doi:10.1093/annonc/mdr367

- Hochegger, H., Hegarat, N., & Pereira-Leal, J. B. (2013). Aurora at the pole and equator: overlapping functions of Aurora kinases in the mitotic spindle. *Open Biol*, 3(3), 120185. doi:10.1098/rsob.120185
- Hochst, B., & Knolle, P. A. (2017). Checkpoint Inhibition in Head and Neck Cancer: Immune Therapeutic Options, Limitations, and Beyond. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 79(1-2), 24-33. doi:10.1159/000455810
- Hoellein, A., Pickhard, A., von Keitz, F., Schoeffmann, S., Piontek, G., Rudelius, M., Baumgart, A., Wagenpfeil, S., Peschel, C., Dechow, T., Bier, H., & Keller, U. (2011). Aurora kinase inhibition overcomes cetuximab resistance in squamous cell cancer of the head and neck. *Oncotarget*, 2(8), 599-609. doi:10.18632/oncotarget.311
- Hoffmann, M., Ihloff, A. S., Gorogh, T., Weise, J. B., Fazel, A., Krams, M., Rittgen, W., Schwarz, E., & Kahn, T. (2010). p16(INK4a) overexpression predicts translational active human papillomavirus infection in tonsillar cancer. *Int J Cancer*, 127(7), 1595-1602. doi:10.1002/ijc.25174
- Hoffmann, T. K. (2012). Systemic therapy strategies for head-neck carcinomas: Current status. *GMS Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg*, 11, Doc03. doi:10.3205/cto000085
- Honda, K., Mihara, H., Kato, Y., Yamaguchi, A., Tanaka, H., Yasuda, H., Furukawa, K., & Urano, T. (2000). Degradation of human Aurora2 protein kinase by the anaphase-promoting complex-ubiquitin-proteasome pathway. *Oncogene*, 19(24), 2812-2819. doi:10.1038/sj.onc.1203609
- Hong, A. M., Grulich, A. E., Jones, D., Lee, C. S., Garland, S. M., Dobbins, T. A., Clark, J. R., Harnett, G. B., Milross, C. G., O'Brien, C. J., & Rose, B. R. (2010). Squamous cell carcinoma of the oropharynx in Australian males induced by human papillomavirus vaccine targets. *Vaccine*, 28(19), 3269-3272. doi:10.1016/j.vaccine.2010.02.098
- Hunt, J. L., Barnes, L., Lewis, J. S., Jr., Mahfouz, M. E., Slootweg, P. J., Thompson, L. D., Cardesa, A., Devaney, K. O., Gnepp, D. R., Westra, W. H., Rodrigo, J. P., Woolgar, J. A., Rinaldo, A., Triantafyllou, A., Takes, R. P., & Ferlito, A. (2014). Molecular diagnostic alterations in squamous cell carcinoma of the head and neck and potential diagnostic applications. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 271(2), 211-223. doi:10.1007/s00405-013-2400-9
- Hunter, K. D., Parkinson, E. K., & Harrison, P. R. (2005). Profiling early head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*, 5(2), 127-135. doi:10.1038/nrc1549
- Hynes, N. E., Horsch, K., Olayioye, M. A., & Badache, A. (2001). The ErbB receptor tyrosine family as signal integrators. *Endocr Relat Cancer*, 8(3), 151-159.
- Jaiswal, P. K., Goel, A., & Mittal, R. D. (2015). Survivin: A molecular biomarker in cancer. *Indian J Med Res*, 141(4), 389-397. doi:10.4103/0971-5916.159250
- Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., & Ward, E. (2010). Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*, 60(5), 277-300. doi:10.3322/caac.20073
- Jeng, Y. M., Peng, S. Y., Lin, C. Y., & Hsu, H. C. (2004). Overexpression and amplification of Aurora-A in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*, 10(6), 2065-2071.
- Johnson, N. (2001). Tobacco use and oral cancer: a global perspective. *J Dent Educ*, 65(4), 328-339.
- Johnson, N. W., Warnakulasuriy, S., & Tavassoli, M. (1996). Hereditary and environmental risk factors; clinical and laboratory risk matters for head and neck, especially oral, cancer and precancer. *Eur J Cancer Prev*, 5(1), 5-17.
- Jordan, R. C., Lingen, M. W., Perez-Ordóñez, B., He, X., Pickard, R., Koluder, M., Jiang, B., Wakely, P., Xiao, W., & Gillison, M. L. (2012). Validation of methods for oropharyngeal cancer HPV status determination in US cooperative group trials. *Am J Surg Pathol*, 36(7), 945-954. doi:10.1097/PAS.0b013e318253a2d1

- Kallappagoudar, S., Yadav, R. K., Lowe, B. R., & Partridge, J. F. (2015). Histone H3 mutations--a special role for H3.3 in tumorigenesis? *Chromosoma*, *124*(2), 177-189. doi:10.1007/s00412-015-0510-4
- Kaschke, O. Z., Andre. (2012). Neck dissection – ein wichtiges Behandlungskonzept. *HNO - Nachrichten*, 28-35.
- Katayama, H., Sasai, K., Kawai, H., Yuan, Z. M., Bondaruk, J., Suzuki, F., Fujii, S., Arlinghaus, R. B., Czerniak, B. A., & Sen, S. (2004). Phosphorylation by aurora kinase A induces Mdm2-mediated destabilization and inhibition of p53. *Nat Genet*, *36*(1), 55-62. doi:10.1038/ng1279
- Katz, D., Ito, E., Lau, K. S., Mocanu, J. D., Bastianutto, C., Schimmer, A. D., & Liu, F. F. (2008). Increased efficiency for performing colony formation assays in 96-well plates: novel applications to combination therapies and high-throughput screening. *Biotechniques*, *44*(2), ix-xiv. doi:10.2144/000112757
- Ke, L. D., Adler-Storthz, K., Clayman, G. L., Yung, A. W., & Chen, Z. (1998). Differential expression of epidermal growth factor receptor in human head and neck cancers. *Head Neck*, *20*(4), 320-327.
- Khan, Z., Tiwari, R. P., Mulherkar, R., Sah, N. K., Prasad, G. B., Shrivastava, B. R., & Bisen, P. S. (2009). Detection of survivin and p53 in human oral cancer: correlation with clinicopathologic findings. *Head Neck*, *31*(8), 1039-1048. doi:10.1002/hed.21071
- Kim, Y. H., Kim, S. M., Kim, Y. K., Hong, S. P., Kim, M. J., & Myoung, H. (2010). Evaluation of survivin as a prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, *39*(5), 368-375. doi:10.1111/j.1600-0714.2009.00844.x
- Kimple, R. J., & Harari, P. M. (2015). The prognostic value of HPV in head and neck cancer patients undergoing postoperative chemoradiotherapy. *Ann Transl Med*, *3*(Suppl 1), S14. doi:10.3978/j.issn.2305-5839.2015.01.37
- Kitagawa, M., & Lee, S. H. (2015). The chromosomal passenger complex (CPC) as a key orchestrator of orderly mitotic exit and cytokinesis. *Front Cell Dev Biol*, *3*, 14. doi:10.3389/fcell.2015.00014
- Klinghammer, K., Knodler, M., Schmittel, A., Budach, V., Keilholz, U., & Tinhofer, I. (2010). Association of epidermal growth factor receptor polymorphism, skin toxicity, and outcome in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck receiving cetuximab-docetaxel treatment. *Clin Cancer Res*, *16*(1), 304-310. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-1928
- Knauer, S. K., Mann, W., & Stauber, R. H. (2007). Survivin's dual role: an export's view. *Cell Cycle*, *6*(5), 518-521. doi:10.4161/cc.6.5.3902
- Ko, Y. H., Roh, S. Y., Won, H. S., Jeon, E. K., Hong, S. H., Lee, M. A., Kang, J. H., Hong, Y. S., Kim, M. S., & Jung, C. K. (2010). Prognostic significance of nuclear survivin expression in resected adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *Head Neck Oncol*, *2*, 30. doi:10.1186/1758-3284-2-30
- Kollareddy, M., Zheleva, D., Dzubak, P., Brahmshatriya, P. S., Lepsik, M., & Hajduch, M. (2012). Aurora kinase inhibitors: progress towards the clinic. *Invest New Drugs*, *30*(6), 2411-2432. doi:10.1007/s10637-012-9798-6
- Kops, G. J., Weaver, B. A., & Cleveland, D. W. (2005). On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer*, *5*(10), 773-785. doi:10.1038/nrc1714
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, *128*(4), 693-705. doi:10.1016/j.cell.2007.02.005
- Koynova, D. K., Tsenova, V. S., Jankova, R. S., Gurov, P. B., & Toncheva, D. I. (2005). Tissue microarray analysis of EGFR and HER2 oncogene copy number alterations in squamous cell carcinoma of the larynx. *J Cancer Res Clin Oncol*, *131*(3), 199-203. doi:10.1007/s00432-004-0627-y
- Kreimer, A. R., Clifford, G. M., Boyle, P., & Franceschi, S. (2005). Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review.

- Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14(2), 467-475. doi:10.1158/1055-9965.EPI-04-0551
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjoback, R., Sjogreen, B., Strombom, L., Stahlberg, A., & Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*, 27(2-3), 95-125. doi:10.1016/j.mam.2005.12.007
- Kuroishi, T., Rios-Avila, L., Pestinger, V., Wijeratne, S. S., & Zempleni, J. (2011). Biotinylation is a natural, albeit rare, modification of human histones. *Mol Genet Metab*, 104(4), 537-545. doi:10.1016/j.ymgme.2011.08.030
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Lajer, C. B., & von Buchwald, C. (2010). The role of human papillomavirus in head and neck cancer. *APMIS*, 118(6-7), 510-519. doi:10.1111/j.1600-0463.2010.02624.x
- Lam, A. K., Ong, K., & Ho, Y. H. (2008). Aurora kinase expression in colorectal adenocarcinoma: correlations with clinicopathological features, p16 expression, and telomerase activity. *Hum Pathol*, 39(4), 599-604. doi:10.1016/j.humpath.2007.09.001
- Lamana, M., Albella, B., Rodriguez, F., Regidor, C., & Bueren, J. A. (1999). Conclusions of a national multicenter intercomparative study of in vitro cultures of human hematopoietic progenitors. *Bone Marrow Transplant*, 23(4), 373-380. doi:10.1038/sj.bmt.1701577
- Lampson, M. A., & Cheeseman, I. M. (2011). Sensing centromere tension: Aurora B and the regulation of kinetochore function. *Trends Cell Biol*, 21(3), 133-140. doi:10.1016/j.tcb.2010.10.007
- Landen, C. N., Jr., Lin, Y. G., Immaneni, A., Deavers, M. T., Merritt, W. M., Spanuth, W. A., Bodurka, D. C., Gershenson, D. M., Brinkley, W. R., & Sood, A. K. (2007). Overexpression of the centrosomal protein Aurora-A kinase is associated with poor prognosis in epithelial ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res*, 13(14), 4098-4104. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-0431
- Langer, C. J. (2012). Exploring biomarkers in head and neck cancer. *Cancer*, 118(16), 3882-3892. doi:10.1002/cncr.26718
- Lassen, P., Eriksen, J. G., Hamilton-Dutoit, S., Tramm, T., Alsner, J., & Overgaard, J. (2009). Effect of HPV-associated p16INK4A expression on response to radiotherapy and survival in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol*, 27(12), 1992-1998. doi:10.1200/JCO.2008.20.2853
- Le, J. M., Squarize, C. H., & Castilho, R. M. (2014). Histone modifications: Targeting head and neck cancer stem cells. *World J Stem Cells*, 6(5), 511-525. doi:10.4252/wjsc.v6.i5.511
- Lee, J. W., Soung, Y. H., Kim, S. Y., Nam, H. K., Park, W. S., Nam, S. W., Kim, M. S., Sun, D. I., Lee, Y. S., Jang, J. J., Lee, J. Y., Yoo, N. J., & Lee, S. H. (2005). Somatic mutations of EGFR gene in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res*, 11(8), 2879-2882. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-2029
- Leemans, C. R., Braakhuis, B. J., & Brakenhoff, R. H. (2011). The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*, 11(1), 9-22. doi:10.1038/nrc2982
- Lehnerdt, G., Hoffmann, T. K., Mattheis, S., Brandau, S., Zeidler, R., & Lang, S. (2010). [Diagnostic and prognostic biomarkers in head and neck squamous cell carcinoma]. *HNO*, 58(7), 713-723; quiz 724-715. doi:10.1007/s00106-010-2108-8
- Lengauer, C., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 396(6712), 643-649. doi:10.1038/25292
- Lens, S. M., & Medema, R. H. (2003). The survivin/Aurora B complex: its role in coordinating tension and attachment. *Cell Cycle*, 2(6), 507-510. doi:10.4161/cc.2.6.559
- Lewis, J. S., Jr., Thorstad, W. L., Chernock, R. D., Haughey, B. H., Yip, J. H., Zhang, Q., & El-Mofty, S. K. (2010). p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma: an entity

- with a favorable prognosis regardless of tumor HPV status. *Am J Surg Pathol*, 34(8), 1088-1096. doi:10.1097/PAS.0b013e3181e84652
- Li, D., Zhu, J., Firozi, P. F., Abbruzzese, J. L., Evans, D. B., Cleary, K., Friess, H., & Sen, S. (2003). Overexpression of oncogenic STK15/BTAK/Aurora A kinase in human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*, 9(3), 991-997.
- Li, F. (2003). Survivin study: what is the next wave? *J Cell Physiol*, 197(1), 8-29. doi:10.1002/jcp.10327
- Li, Y., Wang, J., Wang, F., Wang, H., Wang, J., Zeng, X., Liao, G., Dan, H., & Chen, Q. (2013). Tissue microarray analysis reveals the expression and prognostic significance of phosphorylated AktThr(3)(0)(8) in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 116(5), 591-597. doi:10.1016/j.oooo.2013.06.031
- Liang, C., Marsit, C. J., McClean, M. D., Nelson, H. H., Christensen, B. C., Haddad, R. I., Clark, J. R., Wein, R. O., Grillone, G. A., Houseman, E. A., Halec, G., Waterboer, T., Pawlita, M., Krane, J. F., & Kelsey, K. T. (2012). Biomarkers of HPV in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*, 72(19), 5004-5013. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3277
- Licitra, L., Locati, L. D., & Bossi, P. (2004). Head and neck cancer. *Ann Oncol*, 15 Suppl 4, iv267-273. doi:10.1093/annonc/mdh937
- Licitra, L., Storkel, S., Kerr, K. M., Van Cutsem, E., Pirker, R., Hirsch, F. R., Vermorken, J. B., von Heydebreck, A., Esser, R., Celik, I., & Ciardiello, F. (2013). Predictive value of epidermal growth factor receptor expression for first-line chemotherapy plus cetuximab in patients with head and neck and colorectal cancer: analysis of data from the EXTREME and CRYSTAL studies. *Eur J Cancer*, 49(6), 1161-1168. doi:10.1016/j.ejca.2012.11.018
- Lim, J., Kim, J. H., Paeng, J. Y., Kim, M. J., Hong, S. D., Lee, J. I., & Hong, S. P. (2005). Prognostic value of activated Akt expression in oral squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol*, 58(11), 1199-1205. doi:10.1136/jcp.2004.024786
- Lindsey, S., & Langhans, S. A. (2015). Epidermal growth factor signaling in transformed cells. *Int Rev Cell Mol Biol*, 314, 1-41. doi:10.1016/bs.ircmb.2014.10.001
- Llewellyn, C. D., Linklater, K., Bell, J., Johnson, N. W., & Warnakulasuriya, K. A. (2003). Squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients aged 45 years and under: a descriptive analysis of 116 cases diagnosed in the South East of England from 1990 to 1997. *Oral Oncol*, 39(2), 106-114.
- Llewellyn, C. D., Linklater, K., Bell, J., Johnson, N. W., & Warnakulasuriya, S. (2004). An analysis of risk factors for oral cancer in young people: a case-control study. *Oral Oncol*, 40(3), 304-313.
- Lo Muzio, L., Pannone, G., Staibano, S., Mignogna, M. D., Rubini, C., Mariggio, M. A., Procaccini, M., Ferrari, F., De Rosa, G., & Altieri, D. C. (2003). Survivin expression in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*, 89(12), 2244-2248. doi:10.1038/sj.bjc.6601402
- Lohaus, F., Linge, A., Tinhofer, I., Budach, V., Gkika, E., Stuschke, M., Balermipas, P., Rodel, C., Avlar, M., Grosu, A. L., Abdollahi, A., Debus, J., Bayer, C., Belka, C., Pigorsch, S., Combs, S. E., Monnich, D., Zips, D., von Neubeck, C., Baretton, G. B., Lock, S., Thames, H. D., Krause, M., Baumann, M., & Dtk, R. O. G. (2014). HPV16 DNA status is a strong prognosticator of loco-regional control after postoperative radiochemotherapy of locally advanced oropharyngeal carcinoma: results from a multicentre explorative study of the German Cancer Consortium Radiation Oncology Group (DKTK-ROG). *Radiother Oncol*, 113(3), 317-323. doi:10.1016/j.radonc.2014.11.011

- Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., & Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648), 251-260. doi:10.1038/38444
- Lumley, M. A., Burgess, R., Billingham, L. J., McDonald, D. F., & Milligan, D. W. (1997). Colony counting is a major source of variation in CFU-GM results between centres. *Br J Haematol*, 97(2), 481-484.
- Mackenzie, J., Ah-See, K., Thakker, N., Sloan, P., Maran, A. G., Birch, J., & Macfarlane, G. J. (2000). Increasing incidence of oral cancer amongst young persons: what is the aetiology? *Oral Oncol*, 36(4), 387-389.
- Mahlknecht, U., & Hoelzer, D. (2000). Histone acetylation modifiers in the pathogenesis of malignant disease. *Mol Med*, 6(8), 623-644.
- Mancuso, M., Matassa, D. S., Conte, M., Colella, G., Rana, G., Fucci, L., & Piscopo, M. (2009). H3K4 histone methylation in oral squamous cell carcinoma. *Acta Biochim Pol*, 56(3), 405-410.
- Marioni, G., D'Alessandro, E., Bertolin, A., & Staffieri, A. (2010). Survivin multifaceted activity in head and neck carcinoma: current evidence and future therapeutic challenges. *Acta Otolaryngol*, 130(1), 4-9. doi:10.3109/00016480902856588
- Marioni, G., Ottaviano, G., Marchese-Ragona, R., Giacomelli, L., Bertolin, A., Zanon, D., Marino, F., & Staffieri, A. (2006). High nuclear expression of the apoptosis inhibitor protein survivin is associated with disease recurrence and poor prognosis in laryngeal basaloid squamous cell carcinoma. *Acta Otolaryngol*, 126(2), 197-203. doi:10.1080/00016480500266685
- Martins, M. D., & Castilho, R. M. (2013). Histones: Controlling Tumor Signaling Circuitry. *J Carcinog Mutagen*, 1(Suppl 5), 1-12. doi:10.4172/2157-2518.S5-001
- Marumoto, T., Honda, S., Hara, T., Nitta, M., Hirota, T., Kohmura, E., & Saya, H. (2003). Aurora-A kinase maintains the fidelity of early and late mitotic events in HeLa cells. *J Biol Chem*, 278(51), 51786-51795. doi:10.1074/jbc.M306275200
- Marumoto, T., Zhang, D., & Saya, H. (2005). Aurora-A - a guardian of poles. *Nat Rev Cancer*, 5(1), 42-50. doi:10.1038/nrc1526
- Marur, S., & Forastiere, A. A. (2016). Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clin Proc*, 91(3), 386-396. doi:10.1016/j.mayocp.2015.12.017
- Marusawa, H., Matsuzawa, S., Welsh, K., Zou, H., Armstrong, R., Tamm, I., & Reed, J. C. (2003). HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. *EMBO J*, 22(11), 2729-2740. doi:10.1093/emboj/cdg263
- Massarelli, E., Liu, D. D., Lee, J. J., El-Naggar, A. K., Lo Muzio, L., Staibano, S., De Placido, S., Myers, J. N., & Papadimitrakopoulou, V. A. (2005). Akt activation correlates with adverse outcome in tongue cancer. *Cancer*, 104(11), 2430-2436. doi:10.1002/cncr.21476
- Maurizi, M., Almadori, G., Ferrandina, G., Distefano, M., Romanini, M. E., Cadoni, G., Benedetti-Panici, P., Paludetti, G., Scambia, G., & Mancuso, S. (1996). Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in laryngeal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*, 74(8), 1253-1257.
- Mazumdar, A., Henderson, Y. C., El-Naggar, A. K., Sen, S., & Clayman, G. L. (2009). Aurora kinase A inhibition and paclitaxel as targeted combination therapy for head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*, 31(5), 625-634. doi:10.1002/hed.21007
- McIntyre, J. B., Bose, P., Klimowicz, A. C., Brockton, N. T., Petrillo, S., Matthews, W., Easaw, J., Magliocco, A., & Dort, J. C. (2012). Specific and sensitive hydrolysis probe-based real-time PCR detection of epidermal growth factor receptor variant III in oral squamous cell carcinoma. *PLoS One*, 7(2), e31723. doi:10.1371/journal.pone.0031723

- McKaig, R. G., Baric, R. S., & Olshan, A. F. (1998). Human papillomavirus and head and neck cancer: epidemiology and molecular biology. *Head Neck*, *20*(3), 250-265.
- Mehra, R., Cohen, R. B., & Burtneess, B. A. (2008). The role of cetuximab for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Adv Hematol Oncol*, *6*(10), 742-750.
- Mehra, R., Serebriiskii, I. G., Burtneess, B., Astsaturov, I., & Golemis, E. A. (2013). Aurora kinases in head and neck cancer. *Lancet Oncol*, *14*(10), e425-435. doi:10.1016/S1470-2045(13)70128-1
- Mellin, H., Friesland, S., Lewensohn, R., Dalianis, T., & Munck-Wikland, E. (2000). Human papillomavirus (HPV) DNA in tonsillar cancer: clinical correlates, risk of relapse, and survival. *Int J Cancer*, *89*(3), 300-304.
- Meraldi, P., Honda, R., & Nigg, E. A. (2002). Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53^{-/-} cells. *EMBO J*, *21*(4), 483-492.
- Mersfelder, E. L., & Parthun, M. R. (2006). The tale beyond the tail: histone core domain modifications and the regulation of chromatin structure. *Nucleic Acids Res*, *34*(9), 2653-2662. doi:10.1093/nar/gkl338
- Miao, X., Sun, T., Wang, Y., Zhang, X., Tan, W., & Lin, D. (2004). Functional STK15 Phe31Ile polymorphism is associated with the occurrence and advanced disease status of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res*, *64*(8), 2680-2683.
- Michaud, D. S., Langevin, S. M., Eliot, M., Nelson, H. H., Pawlita, M., McClean, M. D., & Kelsey, K. T. (2014). High-risk HPV types and head and neck cancer. *Int J Cancer*, *135*(7), 1653-1661. doi:10.1002/ijc.28811
- Michl, P., Pazdera, J., Prochazka, M., Pink, R., & Stosova, T. (2010). Human papillomavirus in the etiology of head and neck carcinomas. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, *154*(1), 9-12.
- Milam, M. R., Gu, J., Yang, H., Celestino, J., Wu, W., Horwitz, I. B., Lacour, R. A., Westin, S. N., Gershenson, D. M., Wu, X., & Lu, K. H. (2007). STK15 F31I polymorphism is associated with increased uterine cancer risk: a pilot study. *Gynecol Oncol*, *107*(1), 71-74. doi:10.1016/j.ygyno.2007.05.025
- Morgan, S., & Grandis, J. R. (2009). ErbB receptors in the biology and pathology of the aerodigestive tract. *Exp Cell Res*, *315*(4), 572-582. doi:10.1016/j.yexcr.2008.08.009
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, *65*(1-2), 55-63.
- Neben, K., Korshunov, A., Benner, A., Wrobel, G., Hahn, M., Kokocinski, F., Golanov, A., Joos, S., & Lichter, P. (2004). Microarray-based screening for molecular markers in medulloblastoma revealed STK15 as independent predictor for survival. *Cancer Res*, *64*(9), 3103-3111.
- Nicklas, R. B., & Koch, C. A. (1969). Chromosome micromanipulation. 3. Spindle fiber tension and the reorientation of mal-oriented chromosomes. *J Cell Biol*, *43*(1), 40-50.
- Nicklas, R. B., & Ward, S. C. (1994). Elements of error correction in mitosis: microtubule capture, release, and tension. *J Cell Biol*, *126*(5), 1241-1253.
- Nikonova, A. S., Astsaturov, I., Serebriiskii, I. G., Dunbrack, R. L., Jr., & Golemis, E. A. (2013). Aurora A kinase (AURKA) in normal and pathological cell division. *Cell Mol Life Sci*, *70*(4), 661-687. doi:10.1007/s00018-012-1073-7
- Nylander, K., Dabelsteen, E., & Hall, P. A. (2000). The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Oral Pathol Med*, *29*(9), 413-425.
- Ogawa, E., Takenaka, K., Katakura, H., Adachi, M., Otake, Y., Toda, Y., Kotani, H., Manabe, T., Wada, H., & Tanaka, F. (2008). Perimembrane Aurora-A expression is a significant prognostic factor in correlation with proliferative activity in non-small-cell

- lung cancer (NSCLC). *Ann Surg Oncol*, 15(2), 547-554. doi:10.1245/s10434-007-9653-8
- Ongkeko, W. M., Altuna, X., Weisman, R. A., & Wang-Rodriguez, J. (2005). Expression of protein tyrosine kinases in head and neck squamous cell carcinomas. *Am J Clin Pathol*, 124(1), 71-76. doi:10.1309/BTLN5WTMJ3PCNRRC
- Paik, S., Kim, C., & Wolmark, N. (2008). HER2 status and benefit from adjuvant trastuzumab in breast cancer. *N Engl J Med*, 358(13), 1409-1411. doi:10.1056/NEJMc0801440
- Patel, A. N., Mehnert, J. M., & Kim, S. (2012). Treatment of recurrent metastatic head and neck cancer: focus on cetuximab. *Clin Med Insights Ear Nose Throat*, 5, 1-16. doi:10.4137/CMEN.T.S5129
- Patel, D., Lahiji, A., Patel, S., Franklin, M., Jimenez, X., Hicklin, D. J., & Kang, X. (2007). Monoclonal antibody cetuximab binds to and down-regulates constitutively activated epidermal growth factor receptor vIII on the cell surface. *Anticancer Res*, 27(5A), 3355-3366.
- Patel, V., Leethanakul, C., & Gutkind, J. S. (2001). New approaches to the understanding of the molecular basis of oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med*, 12(1), 55-63.
- Pathmanathan, R., Prasad, U., Sadler, R., Flynn, K., & Raab-Traub, N. (1995). Clonal proliferations of cells infected with Epstein-Barr virus in preinvasive lesions related to nasopharyngeal carcinoma. *N Engl J Med*, 333(11), 693-698. doi:10.1056/NEJM199509143331103
- Pedrero, J. M., Carracedo, D. G., Pinto, C. M., Zapatero, A. H., Rodrigo, J. P., Nieto, C. S., & Gonzalez, M. V. (2005). Frequent genetic and biochemical alterations of the PI 3-K/AKT/PTEN pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*, 114(2), 242-248. doi:10.1002/ijc.20711
- Pendleton, K. P., & Grandis, J. R. (2013). Cisplatin-Based Chemotherapy Options for Recurrent and/or Metastatic Squamous Cell Cancer of the Head and Neck. *Clin Med Insights Ther*, 2013(5). doi:10.4137/CMT.S10409
- Peron, J., Ceruse, P., Lavergne, E., Buiet, G., Pham, B. N., Chabaud, S., Favier, B., Girodet, D., Zrounba, P., Ramade, A., & Fayette, J. (2012). Paclitaxel and cetuximab combination efficiency after the failure of a platinum-based chemotherapy in recurrent/metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Drugs*, 23(9), 996-1001. doi:10.1097/CAD.0b013e32835507e5
- Peron, J., Polivka, V., Chabaud, S., Poupart, M., Ceruse, P., Ramade, A., Girodet, D., Zrounba, P., & Fayette, J. (2014). An effective and well-tolerated strategy in recurrent and/or metastatic head and neck cancer: successive lines of active chemotherapeutic agents. *BMC Cancer*, 14, 504. doi:10.1186/1471-2407-14-504
- Pickhard, A., Grober, S., Haug, A. K., Piontek, G., Wirth, M., Strassen, U., Rudelius, M., & Reiter, R. (2014a). Survivin and pAkt as potential prognostic markers in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 117(6), 733-742. doi:10.1016/j.oooo.2014.02.005
- Pickhard, A., Siegl, M., Baumann, A., Huhn, M., Wirth, M., Reiter, R., Rudelius, M., Piontek, G., & Brockhoff, G. (2014b). The response of head and neck squamous cell carcinoma to cetuximab treatment depends on Aurora kinase A polymorphism. *Oncotarget*, 5(14), 5428-5438. doi:10.18632/oncotarget.2117
- Polanska, H., Raudenska, M., Hudcova, K., Gumulec, J., Svobodova, M., Heger, Z., Fojtu, M., Binkova, H., Horakova, Z., Kostrica, R., Adam, V., Kizek, R., & Masarik, M. (2016). Evaluation of EGFR as a prognostic and diagnostic marker for head and neck squamous cell carcinoma patients. *Oncol Lett*, 12(3), 2127-2132. doi:10.3892/ol.2016.4896
- Posner, M. R., Hershock, D. M., Blajman, C. R., Mickiewicz, E., Winkquist, E., Gorbounova, V., Tjulandin, S., Shin, D. M., Cullen, K., Ervin, T. J., Murphy, B. A., Raez, L. E., Cohen, R. B., Spaulding, M., Tishler, R. B., Roth, B., Viroglio Rdel, C., Venkatesan,

- V., Romanov, I., Agarwala, S., Harter, K. W., Dugan, M., Cmelak, A., Markoe, A. M., Read, P. W., Steinbrenner, L., Colevas, A. D., Norris, C. M., Jr., Haddad, R. I., & Group, T. A. X. S. (2007). Cisplatin and fluorouracil alone or with docetaxel in head and neck cancer. *N Engl J Med*, *357*(17), 1705-1715. doi:10.1056/NEJMoa070956
- Powell, K., Kwee, E., Nutter, B., Herderick, E., Paul, P., Thut, D., Boehm, C., & Muschler, G. (2016). Variability in subjective review of umbilical cord blood colony forming unit assay. *Cytometry B Clin Cytom*, *90*(6), 517-524. doi:10.1002/cyto.b.21376
- Qi, G., Kudo, Y., Ando, T., Tsunematsu, T., Shimizu, N., Siriwardena, S. B., Yoshida, M., Keikhaee, M. R., Ogawa, I., & Takata, T. (2010). Nuclear Survivin expression is correlated with malignant behaviors of head and neck cancer together with Aurora-B. *Oral Oncol*, *46*(4), 263-270. doi:10.1016/j.oraloncology.2010.01.004
- Qiu, W., Schonleben, F., Li, X., Ho, D. J., Close, L. G., Manolidis, S., Bennett, B. P., & Su, G. H. (2006). PIK3CA mutations in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, *12*(5), 1441-1446. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-2173
- Ragin, C. C., Modugno, F., & Gollin, S. M. (2007). The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus. *J Dent Res*, *86*(2), 104-114.
- Ramos, M., Benavente, S., & Giralt, J. (2010). Management of squamous cell carcinoma of the head and neck: updated European treatment recommendations. *Expert Rev Anticancer Ther*, *10*(3), 339-344. doi:10.1586/era.10.6
- Reimers, N., Kasper, H. U., Weissenborn, S. J., Stutzer, H., Preuss, S. F., Hoffmann, T. K., Speel, E. J., Dienes, H. P., Pfister, H. J., Guntinas-Lichius, O., & Klussmann, J. P. (2007). Combined analysis of HPV-DNA, p16 and EGFR expression to predict prognosis in oropharyngeal cancer. *Int J Cancer*, *120*(8), 1731-1738. doi:10.1002/ijc.22355
- Reiß, M. (2009). *Facharztwissen HNO-Heilkunde : differenzierte Diagnostik und Therapie ; mit 142 Tabellen*. Heidelberg: Springer.
- Reiter, R., Gais, P., Jutting, U., Steuer-Vogt, M. K., Pickhard, A., Bink, K., Rauser, S., Lassmann, S., Hofler, H., Werner, M., & Walch, A. (2006). Aurora kinase A messenger RNA overexpression is correlated with tumor progression and shortened survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, *12*(17), 5136-5141. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-1650
- Reuter, C. W., Morgan, M. A., & Eckardt, A. (2007). Targeting EGF-receptor-signalling in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Br J Cancer*, *96*(3), 408-416. doi:10.1038/sj.bjc.6603566
- Ringstrom, E., Peters, E., Hasegawa, M., Posner, M., Liu, M., & Kelsey, K. T. (2002). Human papillomavirus type 16 and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res*, *8*(10), 3187-3192.
- Ritter, M., Teudt, I. U., Meyer, J. E., Schroder, U., Kovacs, G., & Wollenberg, B. (2016). Second-line treatment of recurrent HNSCC: tumor debulking in combination with high-dose-rate brachytherapy and a simultaneous cetuximab-paclitaxel protocol. *Radiat Oncol*, *11*, 6. doi:10.1186/s13014-016-0583-0
- Robert Koch-Institut, G. d. e. K. i. D. e. V. H. (2017). Krebs in Deutschland für 2013/2014. *RKI, GEKID, Berlin*, 11.
- Rodriguez, T., Altieri, A., Chatenoud, L., Gallus, S., Bosetti, C., Negri, E., Franceschi, S., Levi, F., Talamini, R., & La Vecchia, C. (2004). Risk factors for oral and pharyngeal cancer in young adults. *Oral Oncol*, *40*(2), 207-213.
- Royce, M. E., Xia, W., Sahin, A. A., Katayama, H., Johnston, D. A., Hortobagyi, G., Sen, S., & Hung, M. C. (2004). STK15/Aurora-A expression in primary breast tumors is correlated with nuclear grade but not with prognosis. *Cancer*, *100*(1), 12-19. doi:10.1002/cncr.11879

- Sacco, A. G., & Cohen, E. E. (2015). Current Treatment Options for Recurrent or Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Oncol*, 33(29), 3305-3313. doi:10.1200/JCO.2015.62.0963
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732), 1350-1354.
- Samra, B., Tam, E., Baseri, B., & Shapira, I. (2018). Checkpoint inhibitors in head and neck cancer: current knowledge and perspectives. *J Investig Med*, 66(7), 1023-1030. doi:10.1136/jim-2018-000743
- Saridaki, Z., Georgoulas, V., & Souglakos, J. (2010). Mechanisms of resistance to anti-EGFR monoclonal antibody treatment in metastatic colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, 16(10), 1177-1187.
- Sawicka, A., & Seiser, C. (2012). Histone H3 phosphorylation - a versatile chromatin modification for different occasions. *Biochimie*, 94(11), 2193-2201. doi:10.1016/j.biochi.2012.04.018
- Schauer, A., Rothe, H., Balzer, I., Fiebig, I., & Rauschecker, H. (1988). [Immunohistochemical tumor diagnosis in breast cancer--use for assessing the stage and biology of so-called "small breast cancer"]. *Rontgenblatter*, 41(8), 340-344.
- Scheid, M. P., & Woodgett, J. R. (2003). Unravelling the activation mechanisms of protein kinase B/Akt. *FEBS Lett*, 546(1), 108-112.
- Science, W. I. o. (2016, 2016). GeneCards.
- Segaert, S., & Van Cutsem, E. (2005). Clinical signs, pathophysiology and management of skin toxicity during therapy with epidermal growth factor receptor inhibitors. *Ann Oncol*, 16(9), 1425-1433. doi:10.1093/annonc/mdi279
- Sen, S., Zhou, H., & White, R. A. (1997). A putative serine/threonine kinase encoding gene BTAK on chromosome 20q13 is amplified and overexpressed in human breast cancer cell lines. *Head Neck*, 14(18), 2195-2200. doi:10.1038/sj.onc.1201065
- Sen, S., Zhou, H., Zhang, R. D., Yoon, D. S., Vakar-Lopez, F., Ito, S., Jiang, F., Johnston, D., Grossman, H. B., Ruifrok, A. C., Katz, R. L., Brinkley, W., & Czerniak, B. (2002). Amplification/overexpression of a mitotic kinase gene in human bladder cancer. *J Natl Cancer Inst*, 94(17), 1320-1329.
- Sepiashvili, L., Bruce, J. P., Huang, S. H., O'Sullivan, B., Liu, F. F., & Kislinger, T. (2015). Novel insights into head and neck cancer using next-generation "omic" technologies. *Cancer Res*, 75(3), 480-486. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-3124
- Sharafinski, M. E., Ferris, R. L., Ferrone, S., & Grandis, J. R. (2010). Epidermal growth factor receptor targeted therapy of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck*, 32(10), 1412-1421. doi:10.1002/hed.21365
- Sheikh Ali, M. A., Gunduz, M., Nagatsuka, H., Gunduz, E., Cengiz, B., Fukushima, K., Beder, L. B., Demircan, K., Fujii, M., Yamanaka, N., Shimizu, K., Grenman, R., & Nagai, N. (2008). Expression and mutation analysis of epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*, 99(8), 1589-1594. doi:10.1111/j.1349-7006.2008.00861.x
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2018). Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*, 68(1), 7-30. doi:10.3322/caac.21442
- Singhi, A. D., & Westra, W. H. (2010). Comparison of human papillomavirus in situ hybridization and p16 immunohistochemistry in the detection of human papillomavirus-associated head and neck cancer based on a prospective clinical experience. *Cancer*, 116(9), 2166-2173. doi:10.1002/cncr.25033
- Sliwka, L., Wiktorska, K., Suchocki, P., Milczarek, M., Mielczarek, S., Lubelska, K., Cierpial, T., Lyzwa, P., Kielbasinski, P., Jaromin, A., Flis, A., & Chilmonczyk, Z. (2016). The Comparison of MTT and CVS Assays for the Assessment of Anticancer Agent Interactions. *PLoS One*, 11(5), e0155772. doi:10.1371/journal.pone.0155772

- Smeets, S. J., Hesselink, A. T., Speel, E. J., Haesevoets, A., Snijders, P. J., Pawlita, M., Meijer, C. J., Braakhuis, B. J., Leemans, C. R., & Brakenhoff, R. H. (2007). A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. *Int J Cancer*, *121*(11), 2465-2472. doi:10.1002/ijc.22980
- Smilek, P., Neuwirthova, J., Jarkovsky, J., Dusek, L., Rottenberg, J., Kostrica, R., Srovnal, J., Hajdich, M., Drabek, J., & Klozar, J. (2012). Epidermal growth factor receptor (EGFR) expression and mutations in the EGFR signaling pathway in correlation with anti-EGFR therapy in head and neck squamous cell carcinomas. *Neoplasma*, *59*(5), 508-515. doi:10.4149/neo_2012_065
- Sobin, L. H., Gospodarowicz, M. K., Wittekind, C., & International Union against Cancer. (2010). *TNM classification of malignant tumours* (7th ed.). Chichester, West Sussex, UK ; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell.
- Sok, J. C., Coppelli, F. M., Thomas, S. M., Lango, M. N., Xi, S., Hunt, J. L., Freilino, M. L., Graner, M. W., Wikstrand, C. J., Bigner, D. D., Gooding, W. E., Furnari, F. B., & Grandis, J. R. (2006). Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting. *Clin Cancer Res*, *12*(17), 5064-5073. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0913
- Stadler, M. E., Patel, M. R., Couch, M. E., & Hayes, D. N. (2008). Molecular biology of head and neck cancer: risks and pathways. *Hematol Oncol Clin North Am*, *22*(6), 1099-1124, vii. doi:10.1016/j.hoc.2008.08.007
- Steuer-Vogt, M. K., Bonkowsky, V., Ambrosch, P., Scholz, M., Neiss, A., Strutz, J., Hennig, M., Lenarz, T., & Arnold, W. (2001). The effect of an adjuvant mistletoe treatment programme in resected head and neck cancer patients: a randomised controlled clinical trial. *Eur J Cancer*, *37*(1), 23-31.
- Steuer-Vogt, M. K., Bonkowsky, V., Scholz, M., Fauser, C., Licht, K., & Ambrosch, P. (2006). [Influence of ML-1 standardized mistletoe extract on the quality of life in head and neck cancer patients]. *HNO*, *54*(4), 277-286. doi:10.1007/s00106-005-1318-y
- Sun, H., Bai, J., Chen, F., Jin, Y., Yu, Y., & Fu, S. (2011). Lack of an association between AURKA T91A polymorphisms and breast cancer: a meta-analysis involving 32,141 subjects. *Breast Cancer Res Treat*, *125*(1), 175-179. doi:10.1007/s10549-010-0936-6
- Tamm, I., Wang, Y., Sausville, E., Scudiero, D. A., Vigna, N., Oltersdorf, T., & Reed, J. C. (1998). IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res*, *58*(23), 5315-5320.
- Tanaka, E., Hashimoto, Y., Ito, T., Okumura, T., Kan, T., Watanabe, G., Imamura, M., Inazawa, J., & Shimada, Y. (2005). The clinical significance of Aurora-A/STK15/BTAK expression in human esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, *11*(5), 1827-1834. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-1627
- Tanaka, M., Ueda, A., Kanamori, H., Ideguchi, H., Yang, J., Kitajima, S., & Ishigatsubo, Y. (2002). Cell-cycle-dependent regulation of human aurora A transcription is mediated by periodic repression of E4TF1. *J Biol Chem*, *277*(12), 10719-10726. doi:10.1074/jbc.M108252200
- Tang, W., Qiu, H., Ding, H., Sun, B., Wang, L., Yin, J., & Gu, H. (2013). Association between the STK15 F31I polymorphism and cancer susceptibility: a meta-analysis involving 43,626 subjects. *PLoS One*, *8*(12), e82790. doi:10.1371/journal.pone.0082790
- Temam, S., Kawaguchi, H., El-Naggar, A. K., Jelinek, J., Tang, H., Liu, D. D., Lang, W., Issa, J. P., Lee, J. J., & Mao, L. (2007). Epidermal growth factor receptor copy number alterations correlate with poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cancer. *J Clin Oncol*, *25*(16), 2164-2170. doi:10.1200/JCO.2006.06.6605
- Testa, J. R., & Bellacosa, A. (2001). AKT plays a central role in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(20), 10983-10985. doi:10.1073/pnas.211430998

- Thomas, G. R., Nadiminti, H., & Regalado, J. (2005). Molecular predictors of clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Exp Pathol*, *86*(6), 347-363. doi:10.1111/j.0959-9673.2005.00447.x
- Thomas Koch, D., Pickhard, A., Gebel, L., Buchberger, A. M. S., Bas, M., Mogler, C., Reiter, R., Piontek, G., & Wirth, M. (2017). Epidermal growth factor receptor variant III in head and neck squamous cell carcinoma is not relevant for targeted therapy and irradiation. *Oncotarget*, *8*(20), 32668-32682. doi:10.18632/oncotarget.15949
- Tinhofer, I., Klinghammer, K., Weichert, W., Knodler, M., Stenzinger, A., Gauler, T., Budach, V., & Keilholz, U. (2011). Expression of amphiregulin and EGFRvIII affect outcome of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck receiving cetuximab-docetaxel treatment. *Clin Cancer Res*, *17*(15), 5197-5204. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-3338
- Tong, T., Zhong, Y., Kong, J., Dong, L., Song, Y., Fu, M., Liu, Z., Wang, M., Guo, L., Lu, S., Wu, M., & Zhan, Q. (2004). Overexpression of Aurora-A contributes to malignant development of human esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, *10*(21), 7304-7310. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0806
- van der Geer, P., Hunter, T., & Lindberg, R. A. (1994). Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol*, *10*, 251-337. doi:10.1146/annurev.cb.10.110194.001343
- Vermorken, J. B. (2005). Medical treatment in head and neck cancer. *Ann Oncol*, *16 Suppl 2*, ii258-264. doi:10.1093/annonc/mdi735
- Vermorken, J. B., Mesia, R., Rivera, F., Remenar, E., Kaweckki, A., Rottey, S., Erfan, J., Zabolotnyy, D., Kienzer, H. R., Cupissol, D., Peyrade, F., Benasso, M., Vynnychenko, I., De Raucourt, D., Bokemeyer, C., Schueler, A., Amellal, N., & Hitt, R. (2008). Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med*, *359*(11), 1116-1127. doi:10.1056/NEJMoa0802656
- Vermorken, J. B., & Specenier, P. (2010). Optimal treatment for recurrent/metastatic head and neck cancer. *Ann Oncol*, *21 Suppl 7*, vii252-261. doi:10.1093/annonc/mdq453
- Vistica, D. T., Skehan, P., Scudiero, D., Monks, A., Pittman, A., & Boyd, M. R. (1991). Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res*, *51*(10), 2515-2520.
- Vokes, E. E., Agrawal, N., & Seiwert, T. Y. (2015). HPV-Associated Head and Neck Cancer. *J Natl Cancer Inst*, *107*(12), djv344. doi:10.1093/jnci/djv344
- Voldborg, B. R., Damstrup, L., Spang-Thomsen, M., & Poulsen, H. S. (1997). Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Ann Oncol*, *8*(12), 1197-1206.
- Walter, A. O., Seghezzi, W., Korver, W., Sheung, J., & Lees, E. (2000). The mitotic serine/threonine kinase Aurora2/AIK is regulated by phosphorylation and degradation. *Oncogene*, *19*(42), 4906-4916. doi:10.1038/sj.onc.1203847
- Wang, H., Sun, R., Lin, H., & Hu, W. H. (2013). P16INK4A as a surrogate biomarker for human papillomavirus-associated oropharyngeal carcinoma: consideration of some aspects. *Cancer Sci*, *104*(12), 1553-1559. doi:10.1111/cas.12287
- Wang, R., Wang, J. H., Chu, X. Y., Geng, H. C., & Chen, L. B. (2009). Expression of STK15 mRNA in hepatocellular carcinoma and its prognostic significance. *Clin Biochem*, *42*(7-8), 641-647. doi:10.1016/j.clinbiochem.2009.01.023
- Warnakulasuriya, S., Trivedy, C., & Peters, T. J. (2002). Areca nut use: an independent risk factor for oral cancer. *BMJ*, *324*(7341), 799-800.
- Weber, A., Langhanki, L., Sommerer, F., Markwarth, A., Wittekind, C., & Tannapfel, A. (2003). Mutations of the BRAF gene in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oncogene*, *22*(30), 4757-4759. doi:10.1038/sj.onc.1206705
- Weidhaas, J. B., Harris, J., Schaeue, D., Chen, A. M., Chin, R., Axelrod, R., El-Naggar, A. K., Singh, A. K., Galloway, T. J., Raben, D., Wang, D., Matthiesen, C., Avizonis, V. N.,

- Manon, R. R., Yumen, O., Nguyen-Tan, P. F., Trotti, A., Skinner, H., Zhang, Q., Ferris, R. L., Sidransky, D., & Chung, C. H. (2017). The KRAS-Variant and Cetuximab Response in Head and Neck Squamous Cell Cancer: A Secondary Analysis of a Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*, 3(4), 483-491. doi:10.1001/jamaoncol.2016.5478
- West, K. A., Brognard, J., Clark, A. S., Linnoila, I. R., Yang, X., Swain, S. M., Harris, C., Belinsky, S., & Dennis, P. A. (2003). Rapid Akt activation by nicotine and a tobacco carcinogen modulates the phenotype of normal human airway epithelial cells. *J Clin Invest*, 111(1), 81-90. doi:10.1172/JCI16147
- Wiest, T., Schwarz, E., Enders, C., Flechtenmacher, C., & Bosch, F. X. (2002). Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control. *Oncogene*, 21(10), 1510-1517. doi:10.1038/sj.onc.1205214
- Wilczynski, S. P., Lin, B. T., Xie, Y., & Paz, I. B. (1998). Detection of human papillomavirus DNA and oncoprotein overexpression are associated with distinct morphological patterns of tonsillar squamous cell carcinoma. *Am J Pathol*, 152(1), 145-156.
- Wittekindt, C., Gultekin, E., Weissenborn, S. J., Dienes, H. P., Pfister, H. J., & Klussmann, J. P. (2005). Expression of p16 protein is associated with human papillomavirus status in tonsillar carcinomas and has implications on survival. *Adv Otorhinolaryngol*, 62, 72-80. doi:10.1159/000082474
- Wittekindt, C., Wagner, S., Mayer, C. S., & Klussmann, J. P. (2012). [Basics of tumor development and importance of human papilloma virus (HPV) for head and neck cancer]. *Laryngorhinootologie*, 91 Suppl 1, S1-26. doi:10.1055/s-0031-1297241
- Wu, J., Yang, L., Shan, Y., Cai, C., Wang, S., & Zhang, H. (2016). AURKA promotes cell migration and invasion of head and neck squamous cell carcinoma through regulation of the AURKA/Akt/FAK signaling pathway. *Oncol Lett*, 11(3), 1889-1894. doi:10.3892/ol.2016.4110
- Wynder, E. L., & Stellman, S. D. (1977). Comparative epidemiology of tobacco-related cancers. *Cancer Res*, 37(12), 4608-4622.
- Yang, K. T., Tang, C. J., & Tang, T. K. (2015). Possible Role of Aurora-C in Meiosis. *Front Oncol*, 5, 178. doi:10.3389/fonc.2015.00178
- Yang, S. B., Zhou, X. B., Zhu, H. X., Quan, L. P., Bai, J. F., He, J., Gao, Y. N., Cheng, S. J., & Xu, N. Z. (2007). Amplification and overexpression of Aurora-A in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*, 17(5), 1083-1088.
- Young, E. R., Diakos, E., Khalid-Raja, M., & Mehanna, H. (2015). Resection of subsequent pulmonary metastases from treated head and neck squamous cell carcinoma: systematic review and meta-analysis. *Clin Otolaryngol*, 40(3), 208-218. doi:10.1111/coa.12348
- Zain, R. B., Gupta, P. C., Warnakulasuriya, S., Shrestha, P., Ikeda, N., & Axell, T. (1997). Oral lesions associated with betel quid and tobacco chewing habits. *Oral Dis*, 3(3), 204-205.
- Zaoui, K., Doll, J., Stiebi, P., Federspil, P., Plinkert, P. K., & Hess, J. (2016). [Diabetes mellitus as a prognostic marker in oropharyngeal and laryngeal squamous cell carcinoma]. *HNO*, 64(7), 479-486. doi:10.1007/s00106-016-0177-z
- Zhang, H., Chen, X., Jin, Y., Liu, B., & Zhou, L. (2012). Overexpression of Aurora-A promotes laryngeal cancer progression by enhancing invasive ability and chromosomal instability. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 269(2), 607-614. doi:10.1007/s00405-011-1629-4
- Zhang, N., Erjala, K., Kulmala, J., Qiu, X., Sundvall, M., Elenius, K., & Grenman, R. (2009). Concurrent cetuximab, cisplatin, and radiation for squamous cell carcinoma of the head and neck in vitro. *Radiother Oncol*, 92(3), 388-392. doi:10.1016/j.radonc.2009.04.019

- Zhang, P. L., Pellitteri, P. K., Law, A., Gilroy, P. A., Wood, G. C., Kennedy, T. L., Blasick, T. M., Lun, M., Schuerch, C., 3rd, & Brown, R. E. (2005). Overexpression of phosphorylated nuclear factor-kappa B in tonsillar squamous cell carcinoma and high-grade dysplasia is associated with poor prognosis. *Mod Pathol*, *18*(7), 924-932. doi:10.1038/modpathol.3800372
- Zhao, J., Tenev, T., Martins, L. M., Downward, J., & Lemoine, N. R. (2000). The ubiquitin-proteasome pathway regulates survivin degradation in a cell cycle-dependent manner. *J Cell Sci*, *113 Pt 23*, 4363-4371.
- Zhou, H., Kuang, J., Zhong, L., Kuo, W. L., Gray, J. W., Sahin, A., Brinkley, B. R., & Sen, S. (1998). Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat Genet*, *20*(2), 189-193. doi:10.1038/2496
- Ziegler, A., Lange, S., & Bender, R. (2007a). [Survival analysis: log rank test]. *Dtsch Med Wochenschr*, *132 Suppl 1*, e39-41. doi:10.1055/s-2007-959040
- Ziegler, A., Lange, S., & Bender, R. (2007b). [Survival analysis: properties and Kaplan-Meier method]. *Dtsch Med Wochenschr*, *132 Suppl 1*, e36-38. doi:10.1055/s-2007-959038

8.4 Ergebnisübersicht - Anhang

8.4.1 Spearman-Korrelation

	Stk15	p-Akt Ser473	Survivin	AurkA	AurkB	Alkohol	Nikotin	p16	p-Histon H3 Ser10
Stk15	p-Wert	0,110	0,176	0,036	0,302	0,069	0,038	0,958	0,505
	Korrelationskoeffizient	1,000	0,116	-0,165	0,084	-0,147	-0,160	-0,004	-0,066
p-Akt Ser473	p-Wert	0,110	0,000002	0,028	0,008	0,100	0,852	0,251	0,919
	Korrelationskoeffizient	0,171	0,347	-0,166	0,221	-0,144	-0,015	0,092	-0,011
Survivin	p-Wert	0,176	-	0,800	0,002	0,923	0,829	0,164	0,424
	Korrelationskoeffizient	0,116	1,000	-0,017	0,223	0,007	0,016	0,097	0,067
AurkA	p-Wert	0,302	0,002	0,016	-	0,991	0,440	0,139	0,029
	Korrelationskoeffizient	0,084	0,223	0,161	1,000	0,001	0,055	0,105	0,181
AurkB	p-Wert	0,036	0,810	-	0,017	0,542	0,424	0,172	0,607
	Korrelationskoeffizient	-0,165	-0,016	1,000	0,160	0,042	-0,053	-0,092	-0,040
Alkohol	p-Wert	0,069	0,923	0,536	0,991	-	0,019	0,961	0,325
	Korrelationskoeffizient	-0,147	0,007	,043	,001	1,000	0,145	0,004	0,085
Nikotin	p-Wert	0,038	0,829	0,432	0,440	0,019	-	0,036	0,017
	Korrelationskoeffizient	-0,160	0,016	-0,052	0,055	0,145	1,000	0,147	0,195
p16	p-Wert	0,958	0,164	0,173	0,139	0,961	0,036	-	0,000055
	Korrelationskoeffizient	-0,004	0,097	-0,092	0,105	0,004	0,147	1,000	0,331
p-Histon H3 Ser10	p-Wert	0,505	0,424	0,607	0,029	0,325	0,017	0,000055	-
	Korrelationskoeffizient	-0,066	0,067	-0,040	0,181	0,085	0,195	0,331	1,000

Tab. 38: Übersicht der unterschiedlichen Marker-Korrelationen (Korrelations-Analyse nach Spearman)

8.4.2 Western-Blot: Semidry-Blot Methode

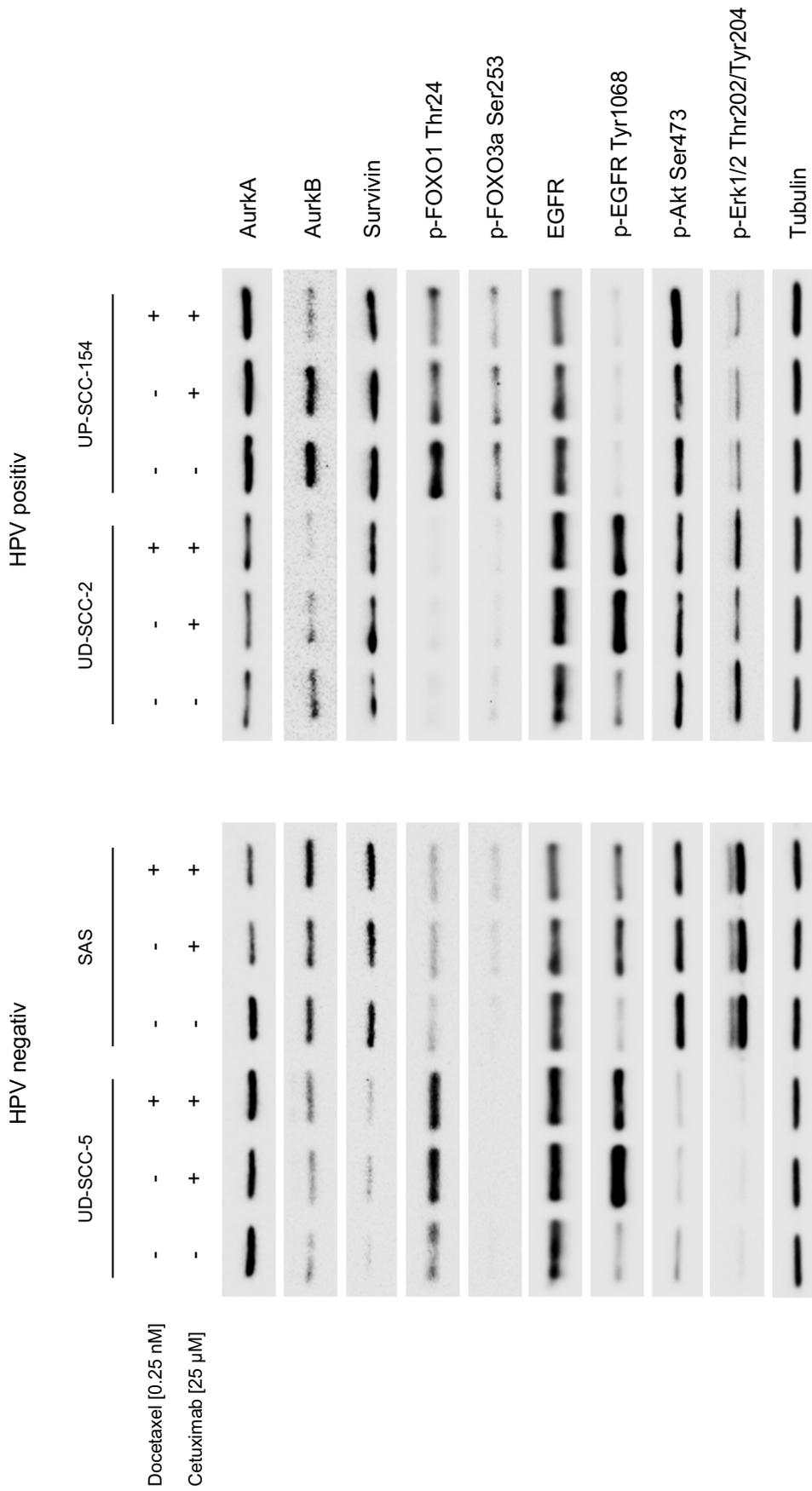


Abb. 43: Ergebnisse des Western-Blots nach verlängerter (48 h) Inkubation

9 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Univ.-Professor Dr. med. Henning Bier bedanken, dass er es mir überhaupt ermöglichte, im Rahmen der onkologischen Arbeitsgruppe seiner Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde am Universitätsklinikum rechts der Isar mich intensiv mit diesem Thema auseinanderzusetzen und diese Dissertation zu verfassen.

Meiner Doktormutter Frau Privatdozentin Dr. med. Anja Pickhard gilt großer Dank, nicht nur für die Vergabe des interessanten Dissertationsthemas, sondern vor allem auch für ihre Geduld und äußerst wertvolle, professionelle Unterstützung bei jedem Schritt dieser Dissertation. Jede Phase wurde von ihr hilfsbereit und immer freundlich begleitet. Das Gelingen dieser Arbeit hing maßgeblich von ihrem außerordentlichen Engagement ab.

Ebenso möchte ich mich herzlich bei meinem Mentor Herrn Dr. med. Markus Wirth bedanken. Er stand mir mit seiner tatkräftigen Unterstützung, seinen vielen Ideen und seinem großen Engagement bei Planung, Durchführung und Auswertung immer zur Seite. Zudem danke ich ihm für die schnelle Korrektur meines Manuskripts.

Herrn Guido Piontek möchte ich aus vielen Gründen außerordentlich danken: Zum einen für die professionelle Einführung in die wissenschaftlichen Methoden, die große Unterstützung bei Versuchsplanung und -durchführung, sowie die kompetente Hilfe bei der Durchführung der Experimente. Ich verdanke ihm alle experimentellen Fertigkeiten. Zum anderen stand er mir nicht nur bei praktischen Fragen immer mit Rat und Tat zur Seite, sondern hat mir mit sehr großem Engagement immer geholfen, aufkommende Probleme jeglicher Art zu lösen. Seine nie endenden kreativen Ideen und die gemeinsamen bereichernden Diskussionen haben erheblich zum Ergebnis dieser Arbeit geführt.

Darüber hinaus danke ich Herrn Peter Strzelczyk für die Hilfe bei der Durchführung der immunhistochemischen Färbungen.

Herrn Prof. Dr. med. Wilko Weichert und Herrn Dr. med. Alexander Höllein bin ich für die Zusammenarbeit und die fachliche Unterstützung bei dieser Arbeit außerordentlich dankbar.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Gero Brockhoff und Herrn Gerhard Piendl vom Universitätsklinikum Regensburg für die hilfsbereite Durchführung der FACS-Analyse.

Mein Dank gilt ebenfalls meinen Laborkollegen für die anregende Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit.

Ganz besonders herzlich danken möchte ich Felix Wirth für die anregenden Diskussionen sowie die äußerst tatkräftige, immer hilfsbereite und geduldige Unterstützung.

Meinen lieben Eltern möchte ich von Herzen danken für die uneingeschränkte und äußerst liebevolle Unterstützung und ihrem Rückhalt bei jedem Schritt auf diesem Weg bis zur Fertigstellung dieser Dissertation.