

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Wolfram Trudo Knoefel

Die Expression und der Einfluss von ST3GAL1 auf die Proliferation
in HNSCC-Zellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Alexander Sklavounos

2024

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolas H. Stoecklein

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Hans Neubauer

„Can you paint with all the colors of the wind?“

Zusammenfassung

Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region (HNSCC) sind Tumore, die frühzeitig in lokoregionäre Lymphknoten metastasieren. Zwei Drittel aller Patienten leiden bereits zum Diagnosezeitpunkt unter manifester Metastasierung. Trotz Fortschritten in der Therapie hat sich das Gesamtüberleben in den letzten Jahrzehnten nicht wesentlich verbessert. Vor diesem Hintergrund wurden in vorausgegangenen Untersuchungen der AG Stoecklein Einzelzellen von HNSCC Primärtumoren und autologen Lymphknotenmetastasen auf somatische Kopienzahlveränderungen untersucht, um potenziell metastasierungsrelevante Unterschiede zu identifizieren. Hierdurch wurde die Region 8q24 identifiziert, die in den Metastasenzellen signifikant häufiger zugewonnen war und in der 7 Gene lokalisiert sind, die signifikant überexprimiert waren. Dies führte zu der Hypothese, dass diese 7 Gene Primärtumorzellen entweder zur lymphatischen Dissemination befähigen oder zur Kolonisation von bereits in die Lymphknoten gestreuten Tumorzellen beitragen. Zu diesen Genen zählt *ST3GAL1*. Eine Datenbankanalyse hat gezeigt, dass die erhöhte Expression von *ST3GAL1* im HNSCC mit einem signifikant verkürzten Überleben assoziiert ist. In dieser Arbeit erfolgte zunächst in ausgewählten HNSCC-Zelllinien eine Genexpressionsanalyse der 7 Kandidatengene, um Zelllinien mit einer möglichst hohen Expression für funktionelle Analysen zu identifizieren. In der Literatur wurde beschrieben, dass *ST3GAL1* nach TGF- β induzierter EMT höher exprimiert wird, weswegen zusätzlich die Expression von *ST3GAL1* in Abhängigkeit der Zelldichte analysiert wurde. Es zeigte sich, dass *ST3GAL1* bei geringerer Zelldichte höher exprimiert wird. Um dann die biologische Funktion von *ST3GAL1* im Zuge der Tumorprogression zu untersuchen, wurde ein *in vitro* Modell etabliert, in dem mittels siRNA-vermitteltem *Knockdown* die Genexpression von *ST3GAL1* in den Zelllinien UT-SCC 42B und UT-SCC 24B supprimiert wurde. Der *Knockdown* wurde auf mRNA-Ebene mittels RT-qPCR validiert. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Konzentration bereits nach 24h signifikant supprimiert wird und dieser Effekt bis mindestens 72h nach Transfektion unverändert andauert. Um den Einfluss auf die Proliferation zu untersuchen, wurde eine Zellzyklusanalyse durchgeführt. Die Suppression von *ST3GAL1* führte in den Zelllinien UT-SCC 42B und UT-SCC 24B zu signifikant weniger Zellen in der S-Phase und einer signifikant größeren Zellpopulation in der G0/G1-Phase. Das Ergebnis konnte im Anschluss durch die Bestimmung der absoluten Zellzahlentwicklung bestätigt werden. Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass *ST3GAL1* einen fördernden Einfluss auf die Proliferation hat. Durch das in dieser Arbeit etablierte *in vitro* Modell können in Zukunft weiterführende Analysen von *ST3GAL1* durchgeführt werden, um dessen biologische Rolle im HNSCC besser zu verstehen.

Abstract

Head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) are aggressive tumours that do early spread into locoregional lymph nodes. Two third of the patients already suffer from manifest metastasis at the time of diagnosis. Despite advances in treatment modalities the overall survival hasn't improved substantially over the last decades. On this background preliminary studies of our working group focused on somatic copy number alterations on a single cell level between HNSCC primary tumours and their autologous lymph node metastases to potentially identify differences relevant for metastasis. Hereby the 8q24 region was identified, which was significantly more often gained in the metastatic cells and harbours 7 genes that were significantly overexpressed. This finding lead to the hypothesis that these 7 candidate genes promote primary tumour cells either to lymphatically disseminate or enable tumour cells that have already invaded the lymph node to colonise and form metastasis. One of these genes is *ST3GAL1*. A database analysis revealed that the overexpression of *ST3GAL1* significantly shortens the disease free survival in HNSCC patients. In this thesis a gene expression analysis of the 7 candidate genes was performed initially in selected HNSCC cell lines to identify suitable cell lines displaying a high expression for further functional experiments. According to the literature *ST3GAL1* is higher expressed after TGF- β induced EMT whereupon we also analysed *ST3GAL1* expression depending on the cell density. This analysis revealed that *ST3GAL1* is higher expressed at lower cell density. To investigate the biological function of *ST3GAL1* in the course of tumour progression, an *in vitro* model was established using siRNA mediated gene expression knockdown to silence *ST3GAL1* gene expression in the cell lines UT-SCC 42B and UT-SCC 24B. The knockdown was validated on mRNA level using RT-qPCR. Additionally we were able to demonstrate that the mRNA concentration is already significantly suppressed after 24h and that this effect lasts unvariedly at least until 72h after transfection. In the following cell cycle analysis silencing of *ST3GAL1* resulted in a significantly reduced number of cells in the S-phase of the cell cycle and also in a significant increase of the cell population in the G0/G1-phase. These results were validated analysing the development of the absolute cell number.

In conclusion, the results of this thesis suggest that *ST3GAL1* may play a key role in promoting tumour cell proliferation in HNSCC. Using the established *in vitro* model for silencing *ST3GAL1* future experiments are necessary to further understand the role of *ST3GAL1* regarding key functions in tumour progression and metastasis in HNSCC.

Abkürzungsverzeichnis

A	Primärtumor
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
AARD	<i>Alanine and arginine rich domain containing protein</i>
ASAP1	<i>ArfGAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain 1</i>
ATC	<i>Anaplastic Thyroid Cancer</i>
B	Metastase
B7-H3	<i>B7 homolog 3 protein</i>
BrdU	Bromodesoxyuridin
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm ²	Quadratzentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i>
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
et al.	et alii
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ENPP2	<i>Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
FRET	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
FSC-A	<i>Forward Scatter Area</i>
FSC-H	<i>Forward Scatter Height</i>
FSC-W	<i>Forward Scatter Width</i>

g	Relative Zentrifugalkraft (rcf)
g	Gramm
h	Stunde
HMBS	<i>Hydroxymethylbilane synthase</i>
HNSCC	<i>Head and neck squamous cell carcinoma</i>
HPV	Humanes Papillomvirus
HTh7	<i>Human Thyroid 7</i>
HTh74	<i>Human Thyroid 74</i>
iCC	Intrahepatisches Cholangiozelluläres Karzinom
IMRT	Intensitätsmodulierte Radiotherapie
LK	Lymphknoten
mm	Millimeter
min	Minute
miRNA	<i>micro ribonucleic acid</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
n	Stichprobengröße
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
nt	Nukleotid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Opti-MEM	<i>Optimized-minimal essential medium</i>
PD-1	<i>Programmed death protein 1</i>
PD-L1	<i>Programmed death ligand 1</i>
pmol	Pikomol
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll Protein
PI	Propidiumiodid
PTGS	<i>Post-transcriptional gene silencing</i>
qPCR	quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion
RefSeq	<i>Reference Sequences Database</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease

RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkriptase
RT-qPCR	Reverse Transkriptase-quantitative Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
siScrambled	Negativkontrolle
ssDNA	einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure
ssRNA	einzelsträngige Ribonukleinsäure
SCNA	Somatische Kopienzahlaberrationen
SLA	<i>Src like adaptor</i>
SSC	<i>Side Scatter</i>
SSC-A	<i>Side Scatter Area</i>
SSC-H	<i>Side Scatter Height</i>
SSC-W	<i>Side Scatter Width</i>
ST3GAL1	<i>ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 1</i>
STR	<i>Short tandem repeats</i>
T75	Zellkulturflasche 75cm ²
T175	Zellkulturflasche 175cm ²
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBP	<i>TATA-box binding protein</i>
TF	Transfektion
TGF-β	<i>Transforming growth factor-β</i>
TIM-3	<i>T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3</i>
TME	<i>Tumor microenvironment</i>
TMEM71	<i>Transmembrane protein 71</i>
TNFRSF11B	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11b</i>
TR	Transfektionsreagenz
TRAIL	<i>Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand</i>
UM-SCC	<i>University of Michigan-Squamous Cell Carcinoma</i>
UT-SCC	<i>University of Turku-Squamous Cell Carcinoma</i>
UTR	<i>Untranslated region</i>
vs.	versus
WHO	<i>World Health Organisation</i>
Δ	Delta
μg	Mikrogramm

μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Einführung in die Thematik.....	1
1.2	Das Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region (HNSCC).....	1
1.2.1	Epidemiologie und Ätiologie.....	1
1.2.2	Therapie und Prognose	2
1.3	Genetische Heterogenität zwischen Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen im HNSCC.....	3
1.4	Glykosylierung	6
1.5	Sialylierung.....	7
1.6	Tumorassoziierte Kohlenhydratantigene.....	9
1.7	Sialyltransferase ST3GAL1.....	10
1.8	Ziele der Arbeit.....	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Material.....	15
2.1.1	Zelllinien.....	15
2.1.2	Oligonukleotide (Primer).....	16
2.1.3	<i>Small interfering</i> RNAs (siRNAs).....	17
2.1.4	Zellbiologische und molekularbiologische Kits	18
2.1.5	Verbrauchsmaterialien.....	18
2.1.6	Chemikalien, Reagenzien, Puffer und Zellkulturmedium	19
2.1.7	Geräte und Nutzgegenstände	20
2.1.8	Software.....	21
2.2	Methoden.....	22
2.2.1	Zellkultur	22
2.2.2	Subkultivierung der Zelllinien.....	22
2.2.3	Zellzahlbestimmung und Vitaltest.....	23
2.2.4	Auftauen und Einfrieren von Zellen.....	24

2.2.5	Ernten der Zellen für die Genexpressionsanalyse	24
2.2.6	Ernten der Zellen bei unterschiedlicher Zelldichte.....	25
2.2.7	Ermittlung der zellinienspezifischen Populationsverdopplungszeit.....	25
2.2.8	Transfektion.....	25
2.2.9	RNA-Interferenz.....	26
2.2.10	Transfektion mit Lipofectamine® 3000.....	26
2.2.11	Transfektion mit Lipofectamine® RNAiMAX.....	27
2.2.12	Genexpressionsanalyse mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion.....	29
2.2.13	RNA-Isolierung	29
2.2.14	cDNA-Synthese.....	30
2.2.15	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion	31
2.2.16	Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse	34
2.2.17	Durchflusszytometrie (FACS).....	34
2.2.18	BrdU und Propidiumiodid Markierung	35
2.2.19	Durchführung des BrdU-Assay	35
2.2.20	Zellzyklusanalyse und Auswertung.....	36
2.2.21	Statistische Auswertung	39
3	Ergebnisse.....	40
3.1	Genexpressionsanalyse in HNSCC- und Schilddrüsenkarzinomzelllinien	40
3.2	Genexpression von <i>ST3GAL1</i> in Abhängigkeit der Zelldichte	44
3.3	siRNA-vermittelter <i>ST3GAL1-Knockdown</i>	46
3.3.1	Beginn und zeitliche Stabilität des <i>ST3GAL1-Knockdowns</i>	47
3.3.2	Validierung des <i>ST3GAL1-Knockdowns</i> mit neuer siRNA.....	48
3.4	Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse	49
3.5	Populationsverdopplungszeit.....	55
3.6	Der Einfluss von ST3GAL1 auf die Zellproliferation.....	57
4	Diskussion	59

4.1	Expression metastasierungsrelevanter Gene in HNSCC- und Schilddrüsenkarzinomzellen.....	59
4.2	<i>ST3GAL1</i> -Expression in Abhängigkeit der Zelldichte	64
4.3	siRNA-vermittelter <i>ST3GAL1-Knockdown</i>	64
4.4	Der Einfluss von ST3GAL1 auf den Zellzyklus	67
4.5	ST3GAL1 – ein Treiber der Proliferation in HNSCC-Zellen	69
4.6	Schlussfolgerungen.....	71
5	Literatur- und Quellenverzeichnis	72
6	Anhang	81

1 Einleitung

1.1 Einführung in die Thematik

Maligne Tumore zählen mit rasant steigender Inzidenz neben kardiovaskulären- und Infektionserkrankungen zu den weltweit führenden Todesursachen (Sung et al., 2021, WHO, 2020). Die zunehmende Relevanz resultiert primär aus der stetig wachsenden- und gleichzeitig durch den demographischen Wandel bedingt alternden Weltbevölkerung. Für das Jahr 2040 werden weltweit 28,4 Millionen neue Krebsfälle prognostiziert. Dies entspräche einer Zunahme um nahezu 50% im Vergleich zu 2020 (Sung et al., 2021).

Krebs ist in erster Linie eine Erkrankung des hohen Alters. Mit jeder Zellteilung eines Organismus steigt das Risiko für die Entstehung und Akkumulation von kanzerogenen, somatischen Genmutationen (Stratton et al., 2009). Durch diese erworbenen Mutationen können sich Zellen den physiologischen Kontroll- und Regulationsmechanismen entziehen. Es wächst eine autonome Zellmasse, die unkontrolliert proliferiert, das lokale Gewebe infiltriert, eine Nische bildet, die Angiogenese induziert, sich der Apoptose und Kontrolle des Immunsystems entzieht, natürliche Gewebegrenzen nicht mehr respektiert und invasiv wächst (Hanahan and Weinberg, 2011).

In der Folge entwickelt sich ausgehend vom Primärtumor durch lymphogene und hämatogene Tumorzell dissemination eine systemische Erkrankung, die durch klonale Selektion Lymphknoten und tumorferne Organe kolonisiert und Metastasen ausbildet. Die Metastasierung ist verantwortlich für die hohe Letalität maligner Tumore und folglich der lebenslimitierende Faktor (Gerstberger et al., 2023).

1.2 Das Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region (HNSCC)

1.2.1 Epidemiologie und Ätiologie

Karzinome der Kopf-Hals-Region sind mit >930.000 Neuerkrankungen und >465.000 Todesfällen im Jahr 2020 der siebthäufigste maligne Tumor weltweit (Sung et al., 2021). Unter vielen histologischen Subtypen bildet das Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals-Region (HNSCC) mit >90% die häufigste Entität des oberen aerodigestiven Trakts. Das HNSCC subsumiert Karzinome der Lippe und Mundhöhle, des Nasopharynx, Oropharynx, Hypopharynx und Larynx. Männer sind bis zu viermal häufiger betroffen als Frauen (Johnson et al., 2020).

Die Ätiologie ist multifaktoriell. Tabak- und exzessiver Alkoholkonsum stellen die zwei wichtigsten Risikofaktoren dar (Hashibe et al., 2009). In Kombination ist die Wirkung synergistisch und der Risikoeffekt multipliziert sich bis auf das >35-fache (Blot et al., 1988, Maier et al., 1992). In den letzten Jahren hat die Infektion mit onkogenen Viren an herausragender Bedeutung gewonnen. Das Humane Papillomvirus (HPV) spielt eine zentrale Rolle in der Genese des Oropharynxkarzinoms (Wagner et al., 2017). Die *low-risk* Typen HPV-6 und -11 sind ursächlich für die Entstehung einer benignen Papillomatose wie z.B. anogenitale Kondylome. Unter den evident karzinogenen *high-risk* Typen ist HPV-16 mit dem Surrogatmarker p16 für die überwiegende Mehrheit der HPV-positiven HNSCC verantwortlich. Die *high-risk* Typen HPV-18, -33, -35, -52, -45 und -39 werden deutlich seltener nachgewiesen (Gillison et al., 2012, Tumban, 2019). Aufgrund der therapeutischen und prognostischen Relevanz hat sich die klinische Einteilung in HPV-positive- und HPV-negative HNSCC etabliert (Johnson et al., 2020). Das Epstein-Barr Virus (EBV) weist eine starke Assoziation mit dem Nasopharynxkarzinom und Karzinomen der Mundhöhle auf (Tsao et al., 2017, Ward et al., 2022). Auch das Kauen von Betelnüssen führt in einigen Regionen der Welt zu einer besonders hohen Inzidenz von Karzinomen der Mundschleimhaut (Su et al., 2020, Narayanan et al., 2020). Schließlich stellt neben insuffizienter Mundhygiene, Immunsuppression, der Exposition gegenüber organischen oder anorganischen Chemikalien und Luftverschmutzung, insbesondere die Fanconi-Anämie eine seltene, jedoch äußerst relevante genetische Prädisposition für die Entwicklung eines HNSCC dar (Velleuer and Dietrich, 2014, Johnson et al., 2020).

1.2.2 Therapie und Prognose

Patienten mit einem lokal begrenzten Frühstadium des HNSCC, die frei von Lymphknoten- oder Fernmetastasen sind, können durch chirurgische In-Sano-Resektion kurativ therapiert werden (Shen et al., 2015). Jedoch präsentieren sich zwei Drittel aller Patienten und drei von vier Männern bereits zum Diagnosezeitpunkt in einem fortgeschrittenen Erkrankungsstadium mit großem Primärtumor und zervikaler Lymphadenopathie (Cognetti et al., 2008, Robert-Koch-Institut, 2021). Der Goldstandard für lokoregionär fortgeschrittene, metastasierte HNSCC ist ein multimodales, multidisziplinäres Therapiekonzept aus Chirurgie, Radio- und Chemotherapie (Cramer et al., 2019).

Auch wenn Patienten bei HPV-positivem HNSCC mit manifester zervikaler Lymphknotenmetastasierung ein exzellentes 5-Jahres-Überleben von 80-87% zeigen, muss gleichzeitig angesichts der chirurgischen Radikalität und Toxizität der Chemotherapeutika der

posttherapeutischen Morbidität und schweren Einschränkung der Lebensqualität Rechnung getragen werden, die zur zweithöchsten Suizidrate unter Krebspatienten beitragen (O'Sullivan et al., 2016, Osazuwa-Peters et al., 2018). Demgegenüber beläuft sich das 5-Jahres-Überleben im fortgeschrittenen HPV-negativen HNSCC mit manifester Lymphknotenmetastasierung auf alarmierende 25-59% (Gatta et al., 2015). Unterschiede im Überleben sind abhängig von der anatomischen Lokalisation des Karzinoms und der geographischen Region.

Trotz chirurgischer Innovationen, der intensitätsmodulierten Radiotherapie (IMRT) und der Fortschritte in der medikamentösen Therapie durch erfolgreiche Implementierung des EGF-Rezeptor Antikörpers Cetuximab und der Immuncheckpoint-Inhibitoren Nivolumab und Pembrolizumab bei rezurrenter oder metastasierter Erkrankung, hat sich das Gesamtüberleben in den letzten Jahrzehnten nicht wesentlich verbessert (Vermorken and Specenier, 2010, Cramer et al., 2019). Die Metastasierung ist entscheidend für die Prognose und stellt den lebenslimitierenden Faktor mit einem kumulativen 5-Jahres-Überleben von <50% dar (Braakhuis et al., 2012).

Bemerkenswerterweise kann zum initialen Diagnose- und Therapiezeitpunkt bereits eine sowohl klinisch als auch histopathologisch okkulte Tumorzelldissemination und Metastasierung stattgefunden haben, die ein Risiko für das Erleiden eines lokoregionären Tumorrezidivs oder metachroner Metastasen darstellt (Kulasinghe et al., 2015, Sproll et al., 2017). Die zur Verfügung stehenden konventionellen Chemotherapeutika werden der tumorbiologischen Komplexität durch inter- und intratumorale Heterogenität nicht gerecht. Hieraus ergibt sich der dringende Bedarf nach neuen, zielgerichteten Therapien, die Metastasen adressieren und deren Bildung verhindern.

1.3 Genetische Heterogenität zwischen Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen im HNSCC

Vor diesem Hintergrund wurden in vorausgegangenen Arbeiten der AG Stoecklein Einzelzellen von HNSCC Primärtumoren und autologen Lymphknotenmetastasen auf somatische Kopienzahlveränderungen (SCNA) analysiert, um potenziell metastasierungsrelevante Aberrationen zu identifizieren, die die Grundlage für die Entwicklung neuer Therapieansätze bilden können. Hierfür wurden insgesamt 82 Zellen analysiert, von denen 34 Zellen von Primärtumoren und 48 Zellen von Metastasen stammten (Abb. 1). Die genetischen Profile der Metastasenzellen waren insgesamt weniger heterogen als die der Primärtumorzellen. Es ließ sich beobachten, dass chromosomale Zugewinne in den Metastasenzellen signifikant häufiger waren als

chromosomale Verluste. Die häufigsten chromosomalen Zugewinne konzentrierten sich auf die Region 8q24.11-8q24.23, in der 46 proteinkodierende Gene lokalisiert sind (Behrens, 2015). Dies führte zu der Hypothese, dass Tumorzellen mit dem spezifischen Zugewinn der Region 8q24.11-8q24.23 ein höheres metastatisches Potenzial mit der Fähigkeit zur Kolonisation besitzen und im Laufes des Metastasierungsprozesses selektiert werden, da sie signifikant häufiger in Lymphknotenmetastasen detektiert werden konnten (Behrens, 2015).

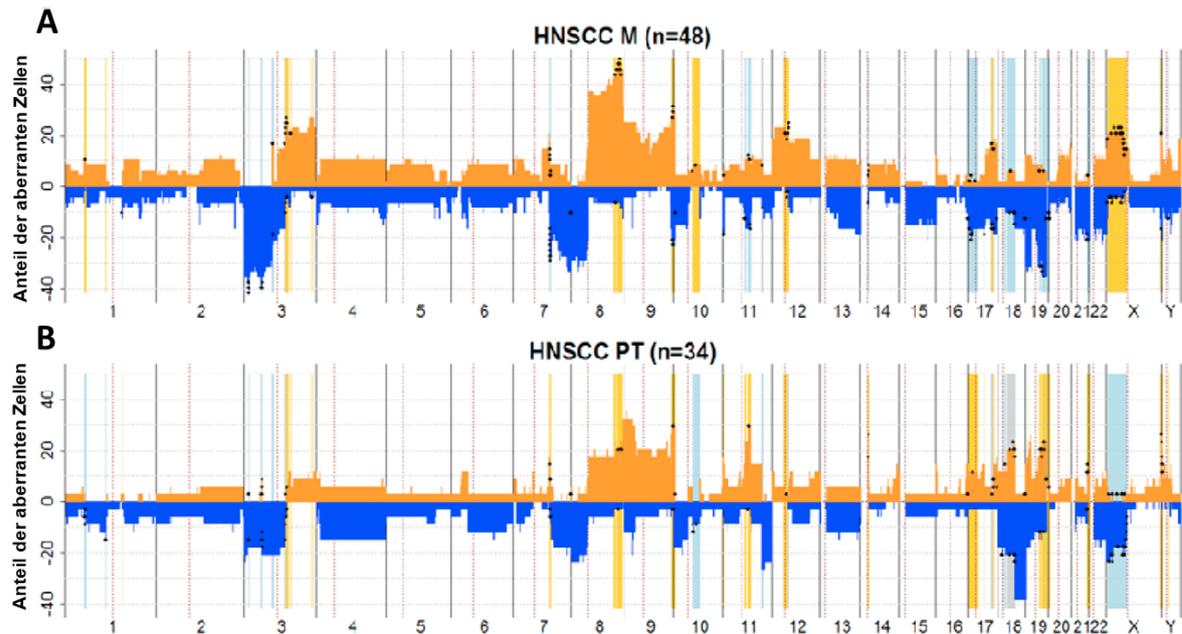


Abb. 1: Somatische Kopienzahlveränderungen in HNSCC Primärtumor- und Metastasenzellen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der aberranten Zellen (Ordinate) mit chromosomalen Zugewinnen (orange) und Verlusten (blau) und entsprechender Zuordnung der Lokalisation auf den Chromosomen (Abszisse). **(A)** Metastasenzellen (M; n = 48), **(B)** Primärtumorzellen (PT; n = 34). Signifikante Häufigkeitsunterschiede sind farbig hinterlegt (Behrens, 2015). HNSCC = *Head and neck squamous cell carcinoma*.

In einem nächsten Schritt wurde in einem weiteren unabhängigen HNSCC-Kollektiv aus 13 Primärtumoren und deren autologen Lymphknotenmetastasen durch Transkriptomanalyse untersucht, ob der Zugewinn auf chromosomaler Ebene konsekutiv in einer erhöhten mRNA-Expression der dort lokalisierten Gene resultiert. Im Rahmen dieser systematischen Analyse konnten 7 Gene identifiziert werden, die in den Metastasenzellen im Gegensatz zu den Primärtumorzellen sowohl in den SCNA-Analysen signifikant zugewonnen als auch signifikant überexprimiert waren (Abb. 2). Unter diesen Genen befand sich neben dem Lymphknotenmetastasen-assoziierten ASAP1 (Müller et al., 2010) auch das Gen ST3GAL1 (Behrens, 2015).

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde anschließend in einer genomischen Datenbankanalyse von 288 HNSCC Fällen überprüft, ob die mRNA-Expression dieser 7 Kandidatengene mit

klinisch relevanten Parametern korreliert (Abb. 3). Die Analyse offenbarte, dass die Hochregulation der 7 Kandidatengene mit einem signifikant verkürzten krankheitsfreien Intervall assoziiert war (Abb. 3, A) und die Überexpression von *ST3GAL1* die stärkste negativ-prognostische Auswirkung auf das Überleben hatte (Abb. 3, B) (nicht veröffentlichte Daten der AG Stoecklein). Diese Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass *ST3GAL1* eine entscheidende Rolle in der Befähigung disseminierter Tumorzellen zur erfolgreichen Kolonisation von tumorfernen Geweben und Etablierung von Metastasen spielt.

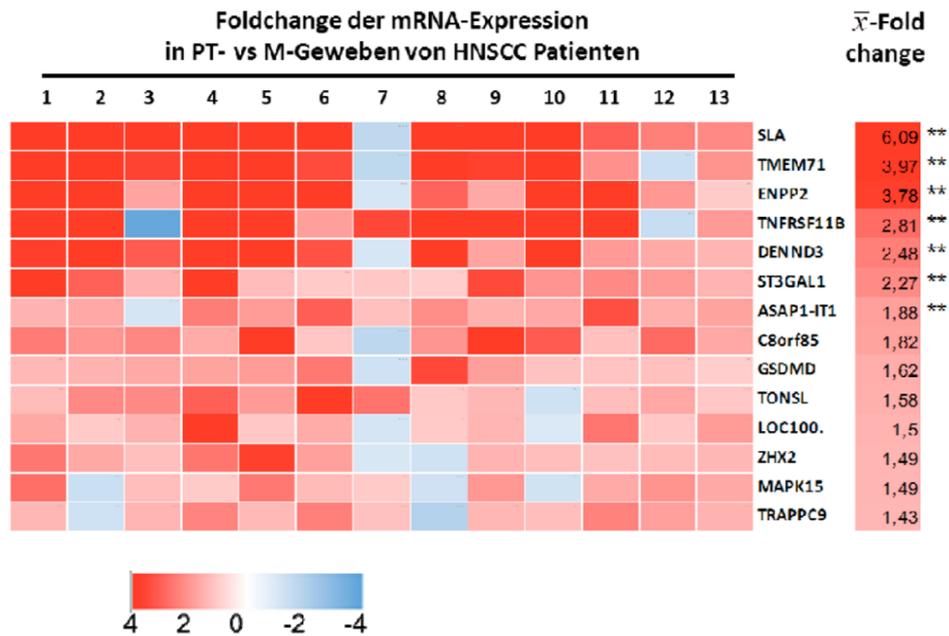


Abb. 2: mRNA-Überexpression in Metastasen im Vergleich zu ihren Primärtumoren. Zusammenfassende Darstellung der 7 Gene eines Kollektivs aus 13 HNSCC-Primärtumoren (PT) und 29 korrespondierenden Metastasen (M), die in den Metastasen im Vergleich zu den Primärtumoren signifikant überexprimiert waren. Foldchange = relative mRNA-Expression. HNSCC = *Head and neck squamous cell carcinoma*, vs = versus (Behrens, 2015).

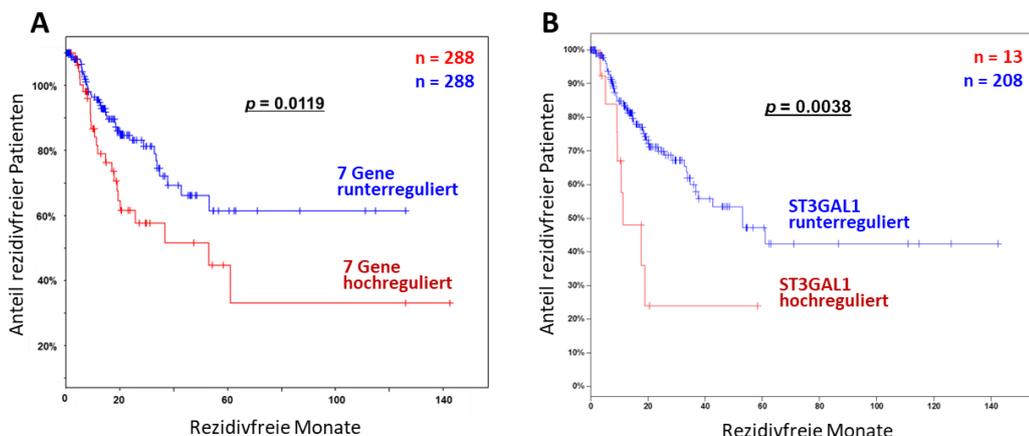


Abb. 3: Der Einfluss der Kandidatengene und *ST3GAL1* auf das Überleben von HNSCC Patienten. Kaplan-Meier-Kurven zeigen die Überlebensraten von HNSCC Patienten (A) abhängig von der Expression aller 7 Kandidatengene und (B) explizit in Abhängigkeit der Expression von *ST3GAL1* (nicht veröffentlichte Daten der AG Stoecklein).

1.4 Glykosylierung

Der Prozess der Glykosylierung stellt eine bedeutende und komplexe posttranslationale Modifikation von Proteinen dar, welcher in multiplen zellulären Kompartimenten wie dem Endoplasmatischen Retikulum, dem Golgi-Apparat, dem Zytosol, dem Zellkern oder Mitochondrium stattfindet (Schjoldager et al., 2020).

Hierbei katalysieren hochspezifische und präzise lokalisierte Glykosyltransferasen den Transfer von Mono- und Oligosacchariden von einem Nukleotid-aktivierten Zuckerdonor durch kovalente Bindung an Aminosäuren oder Lipide. Die Produkte aus Glykoproteinen, Proteoglykanen und Glykolipiden werden in ihrer Gesamtheit als Glykokonjugate bezeichnet. Sie bilden und charakterisieren gemeinsam mit freien Oligo- und Polysacchariden die Glykokalyx der Zelloberfläche. Hierbei handelt es sich um einen dynamischen Prozess, da Glykosylierungen durch die Gegenspieler der Glykosyltransferasen, den Glykosidasen, hydrolytisch wieder entfernt werden können. In Säugetieren können mindestens 9 der 20 Aminosäuren durch eine Vielzahl an Kohlenhydraten modifiziert werden. Die glykosidischen Bindungen erfolgen hauptsächlich als O-Glykosylierung an den Hydroxylgruppen von Serin oder Threonin und als N-Glykosylierung an der Aminogruppe von Asparagin. Daher erfolgt die Einteilung in O- und N-Glykane (Moremen et al., 2012, Schjoldager et al., 2020).

Die wichtigsten Glykane bestehen aus den 10 Monosacchariden Glukose (Glc), Galaktose (Gal), N-Acetylglucosamin (GlcNAc), N-Acetylgalaktosamin (GalNAc), Fucose (Fuc), Mannose (Man), Xylose (Xyl), Glucuronsäure (GlcA), Iduronsäure (IdoA) und 5-N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac, NANA oder Sialinsäure), die alle im zelleigenen Stoffwechsel aus Glukose gebildet werden können. Die hohe Diversität resultiert jedoch nicht nur aus der komplexen Glykankomposition, der anomeren Konfiguration (α vs. β), dem Bindungs- (z.B. 1,3 vs. 1,4 oder 2,3 vs. 2,6) und Verzweigungstyp der Monosaccharide, sondern zusätzlich aus der terminal optionalen Acetylierung, Sulfatierung, Fucosylierung oder Sialylierung (Cummings and Pierce, 2014).

Die Glykosylierung ist organ-, gewebe- und zellspezifisch. Sie erhöht die molekulare Heterogenität und funktionelle Diversität innerhalb einer Zellpopulation, auf der mannigfaltige und essenzielle biologische Funktionen basieren: Korrekte Proteinfaltung und deren Qualitätskontrolle, Proteinstabilität und Schutz vor Proteasen, Proteinlöslichkeit, -transport und -sekretion, Zelladhäsion und -erkennung, interzelluläre Kommunikation und Signaltransduktion, Zell-Matrix-Interaktion, Endo- und Exozytose, Immunmodulation und Inflammation (Varki, 2017, Schjoldager et al., 2020).

Aus dem physiologischen Kontext wird deutlich, dass die aberrante Glykosylierung pathophysiologisch schwerwiegende Konsequenzen für biologische Systeme hat. Zahlreiche Erkrankungen basieren auf den daraus resultierenden dysfunktionalen Proteinen. Darunter zählen Autoimmun- und chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, neurodegenerative Erkrankungen, Infektions- und kardiovaskuläre Erkrankungen, aber auch kongenitale metabolische Erkrankungen (Ząbczyńska et al., 2021, Alves et al., 2021, Yang et al., 2023, Zhang and Qu, 2021, Dashti et al., 2021, Jezela-Stanek et al., 2022).

Eine zentrale Bedeutung kommt der aberranten Glykosylierung in der Tumorgenese und -progression zu. Tumorzellen zeigen häufig abweichende Glykanstrukturen und Expressionsniveaus im Vergleich zu ihren nicht-transformierten Pendanten. Diese tumorspezifischen Glykane gelten als Kennzeichen von Krebszellen und sind mit Schlüsselprozessen der malignen Transformation und Metastasierung wie der Tumorzell-dissoziation, -migration, -adhäsion und -invasion assoziiert (Pinho and Reis, 2015).

In der klinischen Onkologie sind die Glykoproteine Alpha-Fetoprotein (AFP), das Carcinoembryonale Antigen (CEA), das Carbohydrat-Antigen 19-9 (CA 19-9), das Cancer-Antigen 72-4 (CA 72-4), das Cancer-Antigen 15-3 (CA 15-3; Muzin 1), das Cancer-Antigen 125 (CA-125; Muzin 16) und das Prostata-spezifische Antigen (PSA) bereits seit Jahrzehnten etablierte Tumorbiomarker und elementarer Bestandteil für die Diagnostik, Therapie- und Verlaufskontrolle und Prognose vieler Krebserkrankungen, die ihren Ursprung in den unterschiedlichsten Geweben und Organen haben (Silsirivanit, 2019).

1.5 Sialylierung

Die Sialylierung beschreibt einen Teilschritt der Glykosylierung, bei der die terminalen Enden der O- und N-Glykane von Glykokonjugaten an den äußersten Positionen durch kovalente Addition von Sialinsäuren (Sia) modifiziert werden (Harduin-Lepers, 2023).

Sialinsäuren sind eine Familie von Monosacchariden mit einem Rückgrat aus 9 Kohlenstoffatomen, die deshalb auch als Nonulosonsäuren (NulOs) bezeichnet werden. Im Menschen ist die am häufigsten vorkommende Sialinsäure die 5-N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac). Neben ihr kommen auch die N-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc) und Deaminoneuraminsäure (Kdn) vor (Varki et al., 2015).

Neu5Ac kann an allen Hydroxylgruppen der Positionen 4, 7, 8 und 9 durch einfache- oder mehrfache Substitution von Acetyl-, Methyl-, Lactyl-, Phosphat- oder Sulfatgruppen weiter modifiziert werden, woraus eine Familie aus über 50 strukturell unterschiedlichen Derivaten mit großer Diversität entsteht (Angata and Varki, 2002). Jeder einzelne dieser Reste (-R) kann

zur Bindungsspezifität von Sialinsäure bindenden Proteinen oder Funktionen Sialinsäure haltiger Glykane beitragen. Zusätzlich verleihen die Hydroxylgruppen den Sialinsäuren eine negative Ladung und hydrophile Eigenschaften. Ihre exponierte Lage an den terminalen Positionen von Glykoproteinen und Glykolipiden der Glykokalyx, macht sie zu elementaren Informationsträgern im Austausch zwischen Zellen und Zellen mit der extrazellulären Matrix. Anne Harduin-Lepers nennt sie daher auch die „Spielmacher der zellulären Interaktion“ (Varki et al., 2015, Harduin-Lepers, 2023).

Im Menschen wird der Transfer von Sialinsäuren auf ihre Zielmoleküle im Golgi-Apparat durch eine Familie aus 20 gewebe- und zellspezifischen Sialyltransferasen katalysiert (Drula et al., 2022). Die Sialyltransferasen werden durch sechs *ST3GAL*-Gene (*ST3GAL1-6*), die Gene *ST6GAL1* und *ST6GAL2*, sechs *ST6GALNAC*-Gene (*ST6GALNAC1-6*) und sechs *ST8SIA*-Gene (*ST8SIA1-6*) kodiert und besitzen eine hohe Akzeptor- und Bindungsspezifität (Harduin-Lepers, 2023). Für den Transfer von Sialinsäure nutzen sie den Nukleotid aktivierten Zuckerdonor Cytidin-5'-Monophosphat-N-Acetylneuraminsäure (CMP-Neu5Ac). Abhängig von der Sialyltransferase werden α -2,3- oder α -2,6-Bindungen mit Gal, α -2,6-Bindungen mit Galaktosamin oder GalNAc oder α -2,8-Bindungen mit einer anderen Sialinsäure gebildet (Varki et al., 2015). CMP-Neu5Ac wird im Zellkern generiert. Zuvor erfahren Sialinsäuren einen mehrstufigen Syntheseprozess im Zytosol. Im Anschluss an den finalen zytosolischen Schritt gelangt 5-N-Acetylneuraminsäure über einen Antiporter in den Zellkern und wird durch die CMP-Neu5Ac-Synthase mit dem Nukleotid Cytidinmonophosphat (CMP) verknüpft, wodurch das Produkt und erneute Substrat CMP-Neu5Ac entsteht (Varki et al., 2015, Li and Ding, 2019).

Die Sialylierung ist ein dynamisches Geschehen mit einer gewebe- und zellabhängigen Expression. Sialinsäuren können bei Bedarf durch die Aktivität von Sialidasen (Neuraminidasen) hydrolytisch wieder aus den Bindungen der Sialoglykane befreit werden. Dies dient dem Abbau oder der alternativen Verwendung in einem anderen zellulären Prozess und ist Ausdruck der individuellen Adaptationsfähigkeit einer Zelle an sowohl endogene als auch exogene Stimuli (Moremen et al., 2012).

Sialylierte Moleküle sind in der zellulären Erkennung fundamental für das embryonale Wachstum und die Entwicklung, aber auch für die Wirt-Pathogen Antwort in der Immunabwehr (Harduin-Lepers, 2023). Die aberrante Expression wie die Hypersialylierung ist ein etabliertes Kennzeichen verschiedener Krebsentitäten wie dem Mamma- und Ovarialkarzinom, dem Lungen-, Pankreas-, kolorektalen-, Prostata- und hepatozellulären Karzinom (Pietrobono and Stecca, 2021).

1.6 Tumorassoziierte Kohlenhydratantigene

Es ist lange bekannt, dass die Zelloberfläche von Krebszellen mit tumorassoziierten Kohlenhydratantigenen (TACA) bedeckt ist und dies sowohl von diagnostischer- als auch prognostischer Bedeutung ist (Hakomori, 1989, Dabelsteen, 1996, Pearce and Läubli, 2016). TACA werden entweder sezerniert oder gelangen durch Abscherung von Tumorzellmembranen in die Blutzirkulation und sind dadurch labordiagnostisch als Tumorbiomarker nachweisbar (Silsirivanit, 2019).

Zu den sialylierten TACA zählen die Thomsen-Friedenreich Antigene Sialyl-Tn (CA 72-4; sTn, Neu5Ac α 2,6GalNAc) und Sialyl-T (sT, Neu5Ac α 2,3Gal β 1,3GalNAc) als pathologisch verkürzte O-Glykane. Erhöht messbare Serumlevel zeigen das Epitop Sialyl-Lewis^a (CA 19-9; sLe^a: Neu5Ac α 2,3Gal β 1,3[Fuca1,4]GlcNAc) und der Selektin Ligand Sialyl-Lewis^x (sLe^x: Neu5Ac α 2,3Gal β 1,4[Fuca1,3]GlcNAc) (Pinho and Reis, 2015, Harduin-Lepers, 2023). Erhöhte Konzentrationen von Sialyl-Tn werden beim Magen-, Pankreas- und kolorektalen Karzinom nachgewiesen. Die serologische Bestimmung von Sialyl-Lewis^a erfolgt bei Patienten mit Magen-, Pankreas-, kolorektalen- und Gallengangskarzinomen (Reis et al., 2010). Die Höhe und besonders die Dynamik der laborchemisch gemessenen TACA sind relevant für die Diagnose, das Therapieansprechen und die posttherapeutischen Verlaufskontrollen (Reis et al., 2010). Dabei liegt Ursache für die Genese abnormal sialylierter Moleküle in der veränderten Aktivität von Sialyltransferasen, Sialidasen oder Konzentration an verfügbaren Nukleotid-Zuckerdonoren (Silsirivanit, 2019).

Während der malignen Transformation ist die Aktivität der im Golgi-Apparat lokalisierten Sialyltransferasen erhöht (Dall'Olio and Chiricolo, 2001). Die Überexpression sialylierter TACA inklusive der Hypersialylierung sind Schlüsselveränderungen und haben fundamentale Auswirkungen auf das Tumorwachstum, die Invasion und Metastasierung, die Immunevasion und Therapieresistenz (Pearce and Läubli, 2016, Rodrigues and Macauley, 2018, Hugonnet et al., 2021). Dabei findet die Dysregulation der Sialyltransferasen hauptsächlich auf Transkriptionsebene durch alternatives Splicen oder Promotorgebrauch statt und führt zu einer unterschiedlichen Expression von Sialyltransferasen in verschiedenen Karzinomen (Dall'Olio and Chiricolo, 2001, Harduin-Lepers et al., 2012).

Zusammenfassend sind die Sialyltransferasen die enzymatischen Vermittler der Sialylierung und repräsentieren potenzielle Biomarker und Therapieziele (Munkley, 2022).

1.7 Sialyltransferase ST3GAL1

Das humane Gen *ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 1* (*hST3GAL1*) ist auf dem langen Arm von Chromosom 8 in der Region 8q24.22 lokalisiert. Es kodiert für eine Sialyltransferase, die über Ausbildung einer kovalenten α -2,3-Bindung den Transfer von Sialinsäure (Neu5Ac) an terminale Galaktose-Reste (Gal β 1,3GalNAc-O-Ser/Thr) der Kern 1 O-Glykane von Glykoproteinen und Glykolipiden katalysiert. Damit wird die weitere Verlängerung der Glykankette begrenzt (Varki et al., 2015, Harduin-Lepers et al., 2001). Ein Produkt dieser Reaktion ist das sialylierte Thomsen-Friedenreich Antigen und TACA Sialyl3-T (Neu5Ac α 2,3Gal β 1,3GalNAc) (Harduin-Lepers et al., 2001, Harduin-Lepers et al., 2012).

Insbesondere im Laufe dieser Doktorarbeit und der letzten Jahre konnte in wissenschaftlichen Publikationen vermehrt die Relevanz von *ST3GAL1* in der Tumorprogression und malignen Transformation gezeigt werden. *ST3GAL1* unterhält die Proliferation, induziert die Angiogenese und epithelial-mesenchymale Transition (EMT), aktiviert die Invasion und Metastasierung, fördert die Immunevasion und Chemoresistenz und fördert Stammzeleigenschaften (Pietrobono and Stecca, 2021).

2001 zeigten Schneider et al. mittels RT-PCR Analyse an Kryoschnitten von kolorektalen Karzinomen, dass die lymphatische Invasion mit einer erhöhten Genexpression von *ST3GAL1* korreliert (Schneider et al., 2001). Untersuchungen in Ovarial- und Kolonkarzinomzelllinien offenbarten, dass *ST3GAL1* nach EGF- oder TGF- β induzierter EMT höher exprimiert wurde, was mit der Fähigkeit zur Metastasierung verbunden ist (Sakuma et al., 2012, Wu et al., 2018). Die TGF- β induzierte Steigerung der *ST3GAL1*-Expression führte in den Ovarialkarzinomzellen zu einer verminderten Proteinexpression von E-Cadherin, wohingegen die Expression von N-Cadherin und Vimentin zunahm. Der *Knockdown* von *ST3GAL1* inhibierte die EMT-Expression (Wu et al., 2018). Außerdem wurden in der 5'UTR Promotorregion von *ST3GAL1* potenzielle Bindungsstellen des Transkriptionsfaktors MYC identifiziert, während der *Knockdown* von *MYC* die maximale Induktion von *ST3GAL1* auf mRNA-Ebene signifikant inhibierte (Sakuma et al., 2012). Zwei unabhängige Arbeitsgruppen bestätigten, dass im epithelialen Ovarialkarzinom die Überexpression von *ST3GAL1* sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene mit einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium assoziiert ist (Wen et al., 2017, Wu et al., 2018). Wen et al. zeigten darüber hinaus, dass *ST3GAL1* die Migration und peritoneale Dissemination mit simultaner Aktivierung der EGF-Rezeptor-Expression verstärkt und die Wirkung medikamentöser EGF-Rezeptor-Inhibitoren unterdrückt. Durch Anwendung des kompetitiven ST3GAL1-Inhibitors Soyaponin I ließen sich diese Effekte umkehren (Wen

et al., 2017). Chong et al. beobachteten im hochmalignen Glioblastom ebenfalls die Korrelation zwischen der TGF- β -Signalgebung und einer erhöhten ST3GAL1-Expression. Durch lentiviral-vermittelten *ST3GAL1-Knockdown* in NNI-11 und NNI-8 GPCs (*glioma propagating cell*) zeigten sie *in vitro* einen positiven Effekt von ST3GAL1 auf die Proliferation, Invasivität und das Selbsterneuerungsvermögen, welches per definitionem Stammzellen vorbehalten ist. Darüber hinaus führte in einem *in-vivo* Mausmodell die Suppression von *ST3GAL1* zu einem signifikant verlängerten Überleben der Mäuse, wohingegen die Überexpression mit größeren Tumoren und einem höherem Tumorgrad assoziiert war (Chong et al., 2016). Yeo et al. demonstrierten, dass die Suppression von *ST3GAL1* das Tumorwachstum von MCF-7 Xenotransplantaten in Mäusen signifikant reduziert und dies gleichzeitig mit einem bemerkenswerten Rückgang der tumorzentrierten Angiogenese einherging. Sie konnten zeigen, dass die Desialylierung von Angiogenin (Vasorin), das TGF- β bindet, durch Neuraminidase Behandlung die Bindungsaffinität zu TGF- β verstärkt, woraus eine Dämpfung der TGF- β induzierten Angiogenese resultiert. Zuletzt konnte durch Kaplan-Meier Überlebensanalysen anhand von 114 frischen Mammakarzinompräparaten nachgewiesen werden, dass die gleichzeitige Überexpression von *ST3GAL1* und verminderte Expression von Vasorin mit einem signifikant verkürzten rezidiv-freien Überleben verbunden war (Yeo et al., 2019). Zusätzlich wurde in metastatischen Zellen und Tumorgewebe des Hepatozellulären Karzinoms (HCC) im Vergleich zum benachbarten gesunden Lebergewebe durch Western Blot Analyse eine Überexpression von *ST3GAL1* nachgewiesen. Der siRNA-vermittelte *Knockdown* von *ST3GAL1* führte in der metastatischen HCC-Zelllinie HCCLM3 *in vitro* zu einer verminderten Zellmigration und Invasivität. Die Expression von *ST3GAL1* korrelierte außerdem eng mit dem Vorhandensein eines Tumorthrombus, der Tumorgröße und dem Stadium der Lymphknotenmetastasierung und wurde als unabhängiger negativer Prädiktor für das krankheitsfreie- und Gesamtüberleben von Patienten mit HCC identifiziert (Wu et al., 2016). Auch in Harnblasenkarzinomen wurde im Vergleich zum gesunden Urothel eine erhöhte Expression von *ST3GAL1* nachgewiesen, welches statistisch mit einer erhöhten Tendenz zum Erleiden eines Tumorrezidivs assoziiert war (Videira et al., 2009). In der Untersuchung von Bai et al. präsentierten ossär, zerebral und lymphonodal metastasierte Prostatakarzinomzellen im Vergleich zum gesunden Prostatagewebe eine wesentlich erhöhte Expression des Sialyl3-T-Antigens, dessen Bildung durch ST3GAL1 katalysiert wird. In metastatischen PC-3 Zellen konnte *in vitro* durch siRNA-vermittelten *Knockdown* ein fördernder Effekt von *ST3GAL1* auf die Zellproliferation und -migration und ein protektiver Effekt gegenüber der TRAIL-induzierten Apoptose nachgewiesen werden. In einem *in vivo* Mausmodell führte zudem die

Herunterregulierung von *ST3GAL1* zu einer verminderten Tumorgroße, wodurch *ST3GAL1* als potenzielles Therapieziel für das metastasierte Prostatakarzinom konstatiert wurde (Bai et al., 2020).

Die O-Glykane in Mammakarzinomen sind häufig wegen unausgereifter Sialylierung verkürzt (Picco et al., 2010). Das Muzin-1 (CA 15-3), welches auf der luminalen Oberfläche von gesunden Mammaepithelzellen Poly-laktosamin-Ketten trägt, präsentiert hingegen in Karzinomen verkürzte Seitenketten der O-Glykane mit sialylierten Galaktose-Resten (Sia-Gal β 1,3GalNAc) (Burchell et al., 1999). *ST3GAL1* wird in Mammakarzinomen überexprimiert und führt in der Folge zur erhöhten Expression von Sialyl3-T (Neu5Ac α 2,3Gal β 1,3GalNAc) mit konsekutivem Abbruch der Glykanketten-Verlängerung (Burchell et al., 1999, Dalziel et al., 2001). Picco et al. zeigten in *ST3GAL1*-transgenen Mäusen, dass die *ST3GAL1*-vermittelte Sialylierung von Muzinen das Zeitintervall bis zur Ausbildung eines Mammakarzinoms signifikant verkürzt und damit einen fördernden Effekt von *ST3GAL1* auf die Tumorgenese zeigten (Picco et al., 2010). Einige Jahre später wurde durch eine Arbeitsgruppe in Taiwan der GFRA1-Rezeptor (*GDNF family receptor alpha 1*), ein Membranprotein, das in Östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinomen überexprimiert wird, als Zielprotein von *ST3GAL1* identifiziert. GFRA1 erkennt die GDNF-Liganden Familie (*glial cell derived neurotrophic factor*). Binden GDNF an den GFRA1 wird der Rezeptor-Tyrosinkinase (RET) Signalweg aktiviert, woraufhin der Östrogenrezeptor (ER) phosphoryliert und Östrogen-unabhängig die Transkription Östrogen-abhängiger Gene aktiviert wird. Durch siRNA-vermittelte Suppression von *ST3GAL1* konnte in der Mammakarzinom Zelllinie MCF-7 eine verminderte GDNF-vermittelte Proliferation nachgewiesen werden. Gleichzeitig erwies sich die Sialylierung durch *ST3GAL1* als essenziell für die GDNF-vermittelte Aktivierung von GFRA1, wodurch aus der Suppression von *ST3GAL1* außerdem eine verminderte GDNF-vermittelte Phosphorylierung von RET, der Proteinkinase AKT und dem ER α resultierte. Schließlich wurde anhand klinischer Daten demonstriert, dass die mRNA-Überexpression von *ST3GAL1* im fortgeschritten Stadium des Mammakarzinoms mit einem kürzeren rezidiv-freien Überleben assoziiert ist (Fan et al., 2018).

Nach GFRA1 konnte auch CD55 (*Complement Decay Acceleration Factor; DAF*), einem wichtigen Protein für die Regulation der Komplementantwort, als Zielprotein von *ST3GAL1* im Mammakarzinom identifiziert werden. Durch siRNA-vermittelten *ST3GAL1*-Knockdown wurde demonstriert, dass die *ST3GAL1*-vermittelte O-gebundene Sialylierung von CD55 sowohl die Komplement-vermittelte Lyse von Mammakarzinom-Zellen als auch die antikörperabhängige Zytotoxizität der zellulären Immunabwehr reduziert (Lin et al., 2021).

Untersuchungen des Adenokarzinoms im Pankreas (PDAC) offenbarten, dass ST3GAL1 gemeinsam mit ST3GAL4 hauptverantwortlich für die Bildung von sialylierten Glykanen auf Tumorzellen ist, die als Liganden von den inhibitorischen Rezeptoren Siglec-7 und -9 (*Sialic acid-binding Ig-like lectin*) auf der Oberfläche von myeloischen Zellen erkannt werden. Es konnte gezeigt werden, dass tumorassoziierte Sialinsäuren die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen durch die Siglec-7 und -9 Signalgebung bestimmen und insofern als mitverantwortlich für das schlechte klinische *Outcome* identifiziert wurden. Zusätzlich reduziert Siglec-9 die proinflammatorischen Antworten in Makrophagen, wohingegen die Expression von PD-L1 (*Programmed cell death- ligand 1*) und IL-10 erhöht wird (Rodriguez et al., 2021). Dies verdeutlicht die immunmodulatorische Wirkung von Sialinsäuren auf myeloische Zellen und zeigt die immunsuppressive Wirkung von ST3GAL1 auf, welche die Immunevasion von Krebszellen unterstützt.

Ferner konnte ein Einfluss von ST3GAL1 auf die Therapieresistenz gegenüber klinisch etablierten Chemotherapeutika gezeigt werden. ST3GAL1 erhöht sowohl in *in vitro* als auch in *in-vivo* Untersuchungen die Resistenz gegenüber Paclitaxel im Ovarialkarzinom, Tamoxifen und Vandetanib im Mammakarzinom und Adriamycin in der Chronisch myeloischen Leukämie (Wu et al., 2018, Fan et al., 2018, Li et al., 2016).

Trotz der ausführlich dargelegten Erkenntnisse bleibt die Bedeutung und zelluläre Funktion von ST3GAL1 im HNSCC weiterhin ungeklärt, weshalb weitere Untersuchungen dringend notwendig sind. Von großem Interesse ist welche zentralen Prozesse der Tumorprogression und Metastasierung im HNSCC durch ST3GAL1 beeinflusst werden. Darüber hinaus bleibt weiterhin ein Rätsel welche Proteine neben GFRA1, CD55 oder Angiogenin durch ST3GAL1 sialyliert werden und inwiefern die daraus resultierenden dysfunktionalen Proteine im zellulären Kontext biologische Prozesse entscheidend verändern.

1.8 Ziele der Arbeit

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit war es die biologische Funktion von ST3GAL1 auf zentrale Prozesse der Tumorprogression im HNSCC durch siRNA-vermittelten *Knockdown* der Genexpression in verschiedenen HNSCC-Zelllinien *in vitro* zu untersuchen.

1. **Genexpressionsanalyse der identifizierten Kandidatengene *in vitro* in ausgewählten HNSCC-Zelllinien mittels RT-qPCR**
 - UT-SCC 16A und UT-SCC-16B
 - UM-SCC 22A und UM-SCC-22B
 - UT-SCC 24A und UT-SCC 24B
 - UT-SCC 42B

2. **Analyse der Genexpression von *ST3GAL1* *in vitro* bei unterschiedlicher Zelldichte in HNSCC-Zelllinien mittels RT-qPCR**

3. **Etablierung eines *in vitro* Modells für die Untersuchung von ST3GAL1 mittels siRNA-vermittelten *Knockdown* in HNSCC-Zelllinien**
 - Validierung des *Knockdowns* auf mRNA-Ebene durch RT-qPCR
 - Ermittlung der optimalen siRNA-Konzentration
 - Bestimmung des Beginns und der zeitlichen Stabilität des *Knockdowns*

4. **Untersuchung des Einflusses des *ST3GAL1-Knockdowns* auf die Proliferation**
 - Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse und direkter Nachweis aktiv proliferierender Zellen durch BrdU-Markierung
 - Untersuchung des Einflusses auf die Entwicklung der absoluten Zellzahl

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Entität	Ursprungsgewebe	Ort der Etablierung
UT-SCC 16A	HNSCC	Zunge, Primärtumor	Universität Turku, Finnland
UT-SCC 16B	HNSCC	Zunge, LK-Metastase	Universität Turku, Finnland
UM-SCC 22A	HNSCC	Hypopharynx, Primärtumor	Universität Michigan, USA
UM-SCC 22B	HNSCC	Hypopharynx, LK-Metastase	Universität Michigan, USA
UT-SCC 24A	HNSCC	Zunge, Primärtumor	Universität Turku, Finnland
UT-SCC 24B	HNSCC	Zunge, LK-Metastase	Universität Turku, Finnland
UT-SCC 42B	HNSCC	Larynx, LK-Metastase	Universität Turku, Finnland
HTh7	ATC	Schilddrüse, Primärtumor	Sloan Kettering <i>Institute for Cancer Research</i> , New York
HTh74	ATC	Schilddrüse, Primärtumor	Sloan Kettering <i>Institute for Cancer Research</i> , New York

Legende: UT-SCC = *University of Turku-Squamous Cell Carcinoma*; UM-SCC = *University of Michigan-Squamous Cell Carcinoma*; A = Primärtumor; B = Metastase; HTh = *Human Thyroid*; HNSCC = *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*; ATC = *Anaplastic Thyroid Cancer*; LK-Metastase = Lymphknoten-Metastase

Tabelle 1 zeigt die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien. Die HNSCC-Zelllinien wurden freundlicherweise durch das Forschungslabor der Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf, die Zelllinien HTh7 und HTh74 durch das Forschungslabor der Endokrinologie des Universitätsklinikums Essen, zur Verfügung gestellt. Die Zelllinien UT-SCC und UM-SCC entstammen Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region (Carey, 1994, Brenner et al., 2010). Die Bezeichnung A beschreibt Zelllinien, die aus Primärtumoren kultiviert worden sind. Die Zelllinien mit der

Bezeichnung B stammen von deren autologen Lymphknotenmetastasen ab (Lin et al., 2007). Zum Vergleich zwischen Primärtumor und deren autologen Lymphknotenmetastasen wurden drei Paare von A und B ausgewählt. Die Zelllinien Hth7 und HTh74 sind Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien, welche im Sinne einer Positivkontrolle für die Expression von *ST3GAL1* und zur Validierung der verwendeten Primerpaare dienen, da das Schilddrüsenewebe im humanen Organismus laut *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) die höchste Expression von *ST3GAL1* aufweist.

2.1.2 Oligonukleotide (Primer)

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Primer und Hybridisierungs sonden (Probe)

Zielgen	Probe	RefSeq	Sequenz (5' → 3')
ASAP1	#13	NM_001362925.2 NM_001362926.2	Fwd: AGACTCGCCCACATCACC Rev: GGACCCCCATCGTTACCT
ST3GAL1	#30	NM_003033.3 NM_173344.2	Fwd: GAGGACGACACCTACCGATG Rev: TGAACAGCTCCTTGATGGTG
TMEM71_I	#79	NM_144649.2	Fwd: AAGTGAAGACA ACTGGTTGAAGG Rev: TCAGTCAGAGAAGAACAGTCTAAATCA
TMEM71_II	#79	NM_001145153.1	Fwd: TTCTCCAAGTGAAGACA ACTGG Rev: AAGAAGACCTCTTGCAACAACC
ENPP2_I	#83	NM_006209.4	Fwd: GGGGAGGTCAACCGCTAT Rev: GCTCGTGAGGGATGACAAC
ENPP2_II	#84	NM_001330600.1	Fwd: AAGCTGAAACCAGGAAATTCAG Rev: GCCCATAGAGGAGGTGTCTCT
AARD	#51	NM_001025357.2	Fwd: GGTAGAGCGGAGCTTTGGTT Rev: GGCCTCCTCCTGGATGTC
TNFRSF11B	#17	NM_002546.3	Fwd: GAAGGGCGCTACCTTGAGAT Rev: GCAA ACTGTATTTTCGCTCTGG
SLA	#83	NM_001282965.1	Fwd: CCTGGAGGACCTGGTGAAC Rev: TGGTGAGCACACAGCACA
HMBS	#26	NM_000190.4	Fwd: TGTGGTGGGAACCAGCTC Rev: TGTTGAGGTTTCCCCGAAT
TBP	#3	NM_003194.5	Fwd: CGGCTGTTTAACTTCGCTTC Rev: CACACGCCAAGAAACAGTGA

Legende: ASAPI = ArfGAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain 1; ST3GAL1 = ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 1; TMEM71 = Transmembrane protein 71; ENPP2 = Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2; AARD = Alanine and arginine rich domain containing protein; TNFRSF11B = Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11b; SLA = Src like adaptor; HMBS = Hydroxymethylbilane synthase; TBP = TATA-box binding protein; I bzw. II = Primerpaar I bzw. Primerpaar II; RefSeq = Reference Sequences; Fwd = Forward; Rev = Reverse

Tabelle 2 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Primer. Über das online verfügbare *Assay Design Center Universal ProbeLibrary* der Firma Roche (Service wurde Ende 2020 eingestellt) konnten diese in der Literatur etablierten Primerpaare mit passenden, fluoreszierenden Hybridisierungs sonden (*Probes*) kombiniert werden. Diese Hybridisierungs sonden sind komplementär zur Zielsequenz, welche durch den *forward* Primer und den *reverse* Primer flankiert wird. Die Primer wurden über die Firma Eurofins Genomics und die *Probes* von der Firma Roche bezogen. Die römischen Ziffern I und II bezeichnen unterschiedliche Primerpaare, die an verschiedenen Stellen der Zielsequenz binden und verschiedene oder eine unterschiedliche Anzahl der mRNA-Transkriptvarianten des proteinkodierenden Gens detektieren. Das Primerpaar für *ST3GAL1* wurde uns freundlicherweise durch die AG Wirth des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf designt und zur Verfügung gestellt.

2.1.3 Small interfering RNAs (siRNAs)

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten siRNAs, Firma Riboxx GmbH, Dresden

iBONi siRNA pool <i>ST3GAL1</i> (gene ID 6482; NM_173344.2)		
<i>guide</i> (5'-3') ACAAUUUCAACAUAGCGCCCCC	22nt	<i>anti-sense strand</i>
<i>guide</i> (5'-3') UUAUGAACUUUCUCCAGCCCCC	23nt	
<i>guide</i> (5'-3') AUUAAUCUCUGUGACAGUCCCCC	23nt	
<i>passenger</i> (5'-3') GGGGGCGCUAUGUUGAAAUUGU	22nt	<i>sense strand</i>
<i>passenger</i> (5'-3') GGGGGCUGGAAGAAAGUUCAUAA	23nt	
<i>passenger</i> (5'-3') GGGGGACUGUCACAGAGAUUAAU	23nt	
iBONi siRNA pool negative control („scrambled siRNA/siScrambled“)		
<i>guide</i> (5'-3') UUGUACUACACAAAAGUACCCCC	23nt	<i>anti-sense strand</i>
<i>guide</i> (5'-3') GAACGAAUUUAUAAGUGGCCCCC	23nt	
<i>guide</i> (5'-3') ACAACAUUCAUAUAGCUGCCCCC	23nt	

<i>passenger</i> (5'-3') GGGGGUACUUUUGUGUAGUACAA	23nt	<i>sense strand</i>
<i>passenger</i> (5'-3') GGGGGCCACUUAUAAAUUCGUUC	23nt	
<i>passenger</i> (5'-3') GGGGGCAGCUAUAUGAAUGUUGU	23nt	

Legende: *guide* = ssRNA komplementär (anti-sense) zur Ziel-mRNA; *passenger* = ssRNA homolog (sense) zur Ziel-mRNA

Tabelle 3 zeigt die verwendeten siRNAs, welche initial von der Firma Riboxx bezogen wurden. Riboxx stellte die Herstellung unerwartet im Verlauf der Promotionsarbeit ein, weswegen eine alternative Beschaffung über Eurofins Genomics notwendig wurde. Nach Rücksprache und mit anschließender schriftlicher Erlaubnis des Firmeninhabers Herrn Prof. J. Rohayem wurden die identischen Sequenzen der Firma Riboxx für die Herstellung durch Eurofins Genomics verwendet. si*ST3GAL1* ist ein trivalenter dsRNA-Cocktail aus je einem *sense-strand* und einem *anti-sense strand*, der spezifisch auf das mRNA-Transkript von *ST3GAL1* abzielt. Die Negativkontrolle siScrambled besteht aus „*non-sense*“ Sequenzen, die zu keiner physiologischen, humanen mRNA komplementär sind.

2.1.4 Zellbiologische und molekularbiologische Kits

Bezeichnung	Hersteller
BD Pharmingen™ FITC BrdU Flow Kit	BD Biosciences
PCR Mycoplasma Test Kit I/C	PromoKine
QIAshredder	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
RNase-free DNase Set	Qiagen
qScript™ cDNA Synthesis Kit	QuantaBio
Lipofectamine® 3000 Transfektions Kit	Thermo Fisher Scientific, invitrogen

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
FACS Röhrchen, runder Boden	BD Biosciences
Kryoröhrchen Safe-Lock-Tubes (2 ml)	Greiner bio-one
Deckgläser (22mm x 22mm)	VWR

Pasteurpipetten	Brand GmbH & Co. KG
PCR 96-Well-Platte	4titude
PCR Cap Strips Sealer	4titude
Pipettenspitzen mit Filter (2,5 - 1000µl)	Greiner bio-one
Stripette® (5ml, 15ml und 25ml)	Corning
TC-Platte, 6-Well (Standard, F)	Sarstedt
Zellkulturflaschen (25cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²)	Sarstedt
Zellschaber	TPP
Zentrifugenröhrchen Cellstar®, konisch (15ml)	Greiner bio-one
Zentrifugenröhrchen Falcon® (50ml)	Corning

2.1.6 Chemikalien, Reagenzien, Puffer und Zellkulturmedium

Bezeichnung	Hersteller
Agarose	Sigma-Aldrich
β-Mercaptoethanol 98%	Sigma-Aldrich
Buffer RLT	Qiagen
Buffer RPE	Qiagen
Buffer RW1	Qiagen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
DNase I	Qiagen
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) + GlutaMAX™ (1X)	Gibco, Thermo Fisher Scientific
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	Sigma-Aldrich
Ethanol absolut	VWR
FcR Blocking Reagent, human	Miltenyi Biotec
Fetales Kälberserum	Gibco, Thermo Fisher Scientific

Lipofectamine® 3000 Reagent	Thermo Fisher Scientific, invitrogen
Lipofectamine® RNAiMAX Reagent	Thermo Fisher Scientific, invitrogen
Nuclease-free water	Gibco, Thermo Fisher Scientific
Opti-MEM® I Reduced Serum Medium (1X)	Gibco, Thermo Fisher Scientific
P3000 Reagent	Thermo Fisher Scientific, invitrogen
PerfeCTa FastMix II	QuantaBio
Propidium Iodide Solution	Miltenyi Biotec
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich
RNase-free Buffer RDD	Qiagen
RNase-free water	Qiagen
RNeasy Mini Spin Columns	Qiagen
Trypanblau Lösung 0,4 %	Gibco, Thermo Fisher Scientific
Trypsin/EDTA 0,25%/0,02% in PBS	PAN Biotech
Trypsin/EDTA 0.05%/0.02% in PBS	PAN Biotech

2.1.7 Geräte und Nutzgegenstände

Bezeichnung	Hersteller
Brutschrank HERA cell	Heraeus
Elektronische Pipettierhilfe accu-jet® pro	Brand
FACSCanto™ II	BD Biosciences
Gefrierschrank Premium No Frost -20°C	Liebherr
Infinite M200	Tecan Group AG
Kühlschrank Comfort 4°C	Liebherr
Lichtmikroskop Wilovert A	Hund WETZLAR
Mikroskop Leica DMIL	Leica
Mikroskop Nikon Eclipse E400	Nikon

Mikrozentrifuge Fresco 17 Thermo	Heraeus
Neubauer Zählkammer	Brand und OptikLabor
Reagenzglas Schüttler („Vortexer“)	VWR, Sigma-Aldrich
Sicherheitswerkbank HERASAFE KS	Heraeus
Thermocycler AriaMx	Agilent Technologies
Thermocycler C1000	Bio-Rad Laboratories
Thermostatisches Wasserbad WBS	Fried Electric
VersaDoc MP 4000	Bio-Rad
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf
Zell-Einfrierbehälter CoolCell™ „Mr. Frosty“	Sigma-Aldrich

2.1.8 Software

Bezeichnung	Hersteller
Agilent Aria Version 1.5	Agilent Technologies
BD FACSDiva™	BD Biosciences
Excel, PowerPoint, Word	Microsoft Office 365
Infinite Version 1.0	Tecan Group AG
Leica Application Suite Version 3.8	Leica Biosystems
PRISM Versionen 7.03 und 9.0.0	GraphPad

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die Arbeiten in der Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen an einer biologischen Sicherheitswerkbank durchgeführt. In dieser Arbeit wurden adhärent wachsende UM-SCC und UT-SCC Kopf-Hals-Tumor Zelllinien und zwei Schilddrüsenkarzinom Zelllinien HTh7 und HTh74 verwendet (Tabelle 1). Zur Authentifizierung der verwendeten Zelllinien wurden *Short Tandem Repeats* (STR)-Profilanalysen nach DNA-Aufreinigung in Kooperation mit dem Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Düsseldorf durchgeführt. Die resultierenden Profile wurden dann mit den Daten der Online Plattform Cellosaurus und den publizierten STR-Analysen der jeweiligen Zelllinien validiert. Zudem wurden in regelmäßigen Abständen alle Zelllinien auf eine Kontamination mit Mykoplasmen (PCR Mykoplasma Test Kit) getestet.

Als Basis-Zellkulturmedium diente für alle Zelllinien DMEM + GlutaMAX™, das mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) versetzt wurde. Das Ablösen der Zellen vom Flaschenboden wurde enzymatisch mittels Trypsin/Ethylen-diamintetraacetat (EDTA) 0,25% / 0,02% durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte in 75 cm² (T75) Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37°C in 5%-iger Kohlenstoffdioxid (CO₂) Atmosphäre und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit.

2.2.2 Subkultivierung der Zelllinien

Die Nährmedien wurden vor der Verwendung für ca. 20 min bei 37°C im Wasserbad erwärmt. Die kultivierten Zellen wurden je nach Zelllinie alle drei bis vier Tage nach Erreichen eines konfluenten Zellrasens von 80% der Wachstumsfläche passagiert. Dazu wurde das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen mit 6 ml Dulbecco's phosphatgepufferter Salzlösung (DPBS) gewaschen. Nach Hinzugabe von 3 ml Trypsin/EDTA wurden die Zellen abhängig von der Zelllinie zwischen 5 und 10 min bei 37°C inkubiert, bis sich die Zellen unter lichtmikroskopischer Kontrolle aus dem adhären *Monolayer* herausgelöst und größtenteils vereinzelt hatten. Der Enzymstopp erfolgte mit 5 ml Zellkulturmedium. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 4 min bei 150 x g zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurde das Zellpellet in 6 ml DPBS aufgenommen, resuspendiert und erneut für 4 min bei 150 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 6 ml Zellkulturmedium wieder in Suspension gebracht. Je nach Bedarf und Zelllinie wurden entweder 600 µl (1/10) oder 750 µl (1/8) dieser Zellsuspension zusammen mit 13 ml

Zellkulturmedium in eine neue T75 Zellkulturflasche überführt und die Zellen im Brutschrank bei 37°C in 5 %-iger CO₂ Atmosphäre und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert (Protokoll nach den Erfahrungen der AG Stoecklein).

2.2.3 Zellzahlbestimmung und Vitaltest

Unter Verwendung eines Hämocytometers, der Neubauer Zählkammer, wurde lichtmikroskopisch nach Färbung der Zellen mittels 0,4 % Trypanblau-Lösung (Gibco, ThermoFisher Scientific) die Anzahl der Lebendzellen bestimmt. Das Zählgitter der Neubauer Zählkammer beinhaltet vier Eckquadrate, welche jeweils eine Fläche von 1 mm² und eine Tiefe von 0,1 mm aufweisen, woraus sich ein Volumen von 0,1 µl ergibt (Schmitz, 2007). Der Farbstoff Trypanblau wird von lebenden Zellen nicht aufgenommen, da er aufgrund seiner molekularen Größe die intakte Zellmembran nicht passieren kann. Folglich eignet er sich zur Bestimmung der Zellvitalität, indem er selektiv nur in tote Zellen eindringt, deren Zellmembran durchlässig geworden ist. Bei der Färbung wird das Zytoplasma toter Zellen tiefblau bis violett gefärbt, wohingegen lebende Zellen im Lichtmikroskop ungefärbt, leuchtend hell und klar begrenzt erscheinen (Strober, 2015).

Nachdem die adhärennten Zellen gelöst und zentrifugiert worden waren, erfolgte ein Waschschrift mit DPBS. Das Zellpellet wurde dann in 6 ml FCS-freiem Zellkulturmedium resuspendiert. Daraufhin wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau-Lösung gut vermischt und in die Zählkammer gefüllt. Zur Bestimmung der Zelldichte wurden in allen vier Eckquadraten vitale Zellen mäanderförmig ausgezählt. Die gesamte Auszählung erfolgte für jede Zellzählung zweimal, sodass der Mittelwert aus beiden Zählungen zur Optimierung der Zählgenauigkeit als Berechnungsgrundlage verwendet wurde. Die Zellzahl berechnete sich entsprechend nachfolgender Formel:

$$\begin{aligned} \text{Zelldichte (Zellen/ml)} &= \frac{\left[\left(\frac{\text{Gesamtzellzahl}}{\text{Anzahl der Eckquadrate}}\right) + \left(\frac{\text{Gesamtzellzahl}}{\text{Anzahl der Eckquadrate}}\right)\right]}{2} \times 2 \times 10^4 \\ &= \frac{\left[\left(\frac{n_1+n_2+n_3+n_4}{4}\right) + \left(\frac{n_1+n_2+n_3+n_4}{4}\right)\right]}{2} \times 2 \times 10^4 \end{aligned}$$

Die Gesamtzellzahl repräsentiert die Summe aller gezählten vitalen Zellen der vier Eckquadrate. Der Faktor 2 erklärt sich aus der 1:2 Verdünnung mit Trypanblau. Durch die Multiplikation mit 10⁴ errechnet sich die Gesamtzellzahl auf ein Volumen von 1 ml.

2.2.4 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Die in Kultur genommenen Zellen befanden sich für die Langzeitlagerung in einem Stickstofftank in der Gasphase des Stickstoffs zwischen -150°C und -178°C . Die aufzutauenden Zellen wurden unter Einhaltung des empfohlenen Sicherheitsequipments für den Umgang mit Flüssigstickstoff den entsprechenden *Racks* entnommen, auf Eis transportiert und im Wasserbad mit einem Schwimmer bei 37°C achtsam erwärmt, bis alle Eiskristalle aufgelöst waren. Die aufgetauten Zellen wurden unverzüglich in 9 ml vorgewärmten Zellkulturmedium resuspendiert und für 4 min bei $150 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das erhaltene Zellpellet in 13 ml Zellkulturmedium aufgenommen, in eine T75 Zellkulturflasche überführt und bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel.

Um einen Vorrat an Zelllinien mit niedriger Passagenzahl zu generieren, wurden Zellen ebenfalls wieder eingefroren. Das dazu notwendige Einfriermedium bestand aus DMEM + GlutaMAXTM, welches mit 10% FCS und 5% Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt wurde (Protokoll AG Stoecklein). Die Zellen wurden aus der wachsenden Kultur wie in 2.2.1.1 beschrieben vorbereitet, bis sie in 6 ml Zellkulturmedium resuspendiert und die Zellzählung durchgeführt wurde. In jedes vorgekühlte Kryoröhrchen wurden $1,5 \times 10^6$ Zellen in einem Volumen von 1 ml überführt, die zuvor behutsam im Einfriermedium resuspendiert worden waren. Im Anschluss wurden sie unverzüglich in einen Einfrierbehälter gegeben und für 24 Stunden im -80°C Gefrierschrank gelagert, bevor sie für die Langzeitlagerung tabellarisiert, wieder in den Stickstofftank überführt wurden.

2.2.5 Ernten der Zellen für die Genexpressionsanalyse

Für die Analyse der Genexpression ausgewählter Gene wurden die Zelllinien in T75 Zellkulturflaschen kultiviert und während der exponentiellen Proliferationsphase bei etwa 70% Konfluenz geerntet. Dazu wurde das Zellkulturmedium abgenommen, die Zellen mit DPBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA vom Flaschenboden gelöst. Es folgte eine Zentrifugation für 4 min bei $150 \times g$. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in DPBS resuspendiert und erneut für 4 min bei $150 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde ohne das Zellpellet zu berühren vollständig abgenommen und verworfen. Schließlich wurde die RNA-Isolierung durchgeführt, diese in komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) umgeschrieben und anschließend die Quantität der Zielsequenz mittels Reverse Transkriptase-quantitativer Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) analysiert.

2.2.6 Ernten der Zellen bei unterschiedlicher Zelldichte

Dazu wurden die verwendeten Zelllinien bei 30%, 50% und 80% der Wachstumsfläche an drei unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet. Zunächst erfolgte die Aussaat der Zellen in 75cm² (T75) und 175cm² (T175) Zellkulturflaschen so, dass nach 24h eine Konfluenz von 20-30% erreicht wurde. Dabei erfolgte die erste Ernte 30h nach Aussaat aus T175 Zellkulturflaschen. Am zweiten Tag wurden die Zellen ebenfalls aus T175 Zellkulturflaschen nach 48h und einer Konfluenz von 50% und am dritten Tag nach 72h aus T75 Zellkulturflaschen bei einer Konfluenz von 80% geerntet. Es folgte die RNA-Isolierung (3.3.1), die cDNA-Synthese (3.3.2) und die Durchführung der mRNA-Expressionsanalyse mit Hilfe der RT-qPCR (3.3.3).

2.2.7 Ermittlung der zelllinienspezifischen Populationsverdopplungszeit

Um die proliferativen Eigenschaften der Zelllinien UT-SCC 24B und UT-SCC 42B hinsichtlich des Zeitpunktes der exponentiellen Proliferationsphase im Sinne einer Verdopplung der bestehenden Zellpopulation unter normalen Zellkulturbedingungen zu ermitteln, wurden beide Zelllinien in *6-Well* Zellkulturplatten ausgesät. Am Tag der Aussaat (Tag 0) wurde jeweils die Zellzahl ausgesät, aus der nach 24 Stunden (Tag 1) eine Konfluenz von etwa 30% der Wachstumsfläche resultierte. Dafür wurden von der Zelllinie UT-SCC 24B 3×10^5 Zellen und von die Zelllinie UT-SCC 42B 2×10^5 Zellen je *6-Well* in 3 ml Zellkulturmedium ausgesät. Täglich erfolgte von Tag 1 (24h) bis Tag 4 (96h) sowohl eine Fotodokumentation als auch eine händische Auszählung der Gesamtzellzahl und ein Vitaltest wie in 3.1.2 beschrieben. Die Fotodokumentation erfolgte in jedem *6-Well* an vier repräsentativen Stellen. Ein Mediumwechsel wurde lediglich vor der Fotodokumentation am Tag der Zellzahlbestimmung durchgeführt. Für die Zellzählung wurde das Zellpellet am Tag 1 in 500 µl, an den Tagen 2 und 3 in 1 ml und am Tag 4 in 3 ml DPBS resuspendiert.

2.2.8 Transfektion

Für die Suppression der Genexpression von *ST3GAL1* wurde mit Hilfe lipidbasierter Transfektionsreagenzien synthetische doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) artifiziell in die Zellen eingebracht, welche intrazellulär unter Beteiligung mehrerer Enzymkomplexe letztlich in Form sogenannter *small interfering ribonucleic acids* (siRNAs) das komplementäre Ziel-messenger-RNA(mRNA)-Transkript des Zielgens in Bruchstücke spalten und in der Folge die Translation in das Protein verhindern. Dabei ist der *sense strand* (Tabelle 3) homolog zur mRNA-Sequenz des herunter zu regulierenden Gens. Dieser Vorgang wurde initial rein deskriptiv als *post-transcriptional gene silencing* (PTGS) bezeichnet und wird heute allgemein

unter dem Begriff der RNA-Interferenz (RNAi) geführt (Tijsterman et al., 2002, Pratt and MacRae, 2009, Han, 2018).

2.2.9 RNA-Interferenz

Die RNA-Interferenz (RNAi) ist ein erstmalig in den 1990er Jahren in Petunien, Pilzen und dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* nachgewiesener universeller, evolutionär konservierter Mechanismus (Cerutti and Casas-Mollano, 2006), der durch doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) induziert zu einem Abbau homologer mRNA und in der Folge zu einer posttranskriptionellen Stummschaltung der Genexpression führt (Napoli et al., 1990, Fire et al., 1991, Romano and Macino, 1992, Fire et al., 1998, Montgomery et al., 1998). Dieser Mechanismus wird als angeborene, intrazelluläre Nukleinsäure basierte Immunabwehr verstanden, der es der betroffenen Wirtszelle ermöglicht sequenzspezifisch mRNA abzubauen. Ziel dieses Mechanismus ist der Schutz der Integrität des Genoms durch die Erkennung und Abwehr von exogenen viralen Nukleinsäuren aber auch endogenen repetitiven genomischen Sequenzen parasitären Ursprungs, den Transposons (Hannon, 2002, Bagasra and Prilliman, 2004, Fire, 2005, Li et al., 2013, Ding et al., 2018). Darüber hinaus reguliert die RNAi in Eukaryoten in Form nicht kodierender *microRNAs* (miRNAs oder miRs) auf komplexe Art und Weise die endogene Expression proteinkodierender Gene (Kavi et al., 2008, Almeida and Allshire, 2005, Pong and Gullerova, 2018). Deren Dysregulation ist Gegenstand aktueller Forschung und spielt eine bedeutende Rolle im Rahmen von Krebserkrankungen (Macfarlane and Murphy, 2010, Vishnoi and Rani, 2017). In den Biowissenschaften wird sich die RNAi zunutze gemacht, indem anhand chemisch synthetisierter siRNAs gezielt Gene von Interesse transient stummgeschaltet und dadurch deren biologische Funktion sowohl in *in vitro* als auch *in vivo* Experimenten untersucht werden kann (Kim and Rossi, 2008, Elbashir et al., 2001). Auch in der Medizin gibt es bereits klinische Studien, die die Anwendung von siRNAs als potenzielles Therapeutikum bei viralen Infektionserkrankungen, der Krebstherapie und sogar der Atherosklerose untersuchen (Khan et al., 2021, O'Donoghue et al., 2022).

2.2.10 Transfektion mit Lipofectamine® 3000

Die Transfektion der Zelllinie UT-SCC 42B wurde anhand des Transfektion-Kits Lipofectamine® 3000 und nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden in eine 6-Well-Zellkulturplatte pro *Well* 5×10^5 Zellen ausgesät und bei 37°C für 24h in 2 ml Zellkulturmedium ohne den Zusatz von Antibiotika kultiviert, da die Anwesenheit von Antibiotika die Zytotoxizität erhöhen und während der Transfektion zu vermehrtem Zelltod

führen kann. Für die Transfektion wurden in zwei Reaktionsgefäße (A) jeweils 125 µl Opti-MEM Medium und 7,5 µl Lipofectamine® 3000 gegeben. In zwei weitere Reaktionsgefäße (B) wurden jeweils 125 µl Opti-MEM Medium, 4 µl P3000 Reagenz und aus einer 2 µM Arbeitslösung in das eine 60 µl (120 pmol) siRNA der Negativkontrolle (*siRNA pool negative control / siScrambled*) und in das andere 60 µl (120 pmol) Ziel-siRNA für das *ST3GAL1* mRNA-Transkript (*siRNA pool ST3GAL1 / siST3GAL1*) gegeben, um im *Well* letztlich eine Konzentration von 60 nM zu erreichen. Die Komponenten in den jeweiligen Reaktionsgefäßen wurden gut vermischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die verdünnten siRNAs (B) dem verdünnten Lipofectamine® 3000 (A) vollständig hinzugefügt und ebenfalls gut vermischt. Es folgte eine Inkubationszeit von 20 min bei Raumtemperatur. Während der Inkubationszeit der Lösungen wurde das Medium der Zellen, welche 24h zuvor ausgesät worden waren, abgenommen und die Zellen mit DPBS gewaschen. In jedes *Well* wurden 1.679 µl frisches FCS-freies Basis-Zellkulturmedium gegeben. Von den vorbereiteten siRNA-Lipid-Komplexen wurden je 321 µl tröpfchenweise auf die Zellen in den *Wells* gegeben und die 6-Well-Zellkulturplatten im Anschluss behutsam hin und her geschwenkt, damit sich die Transfektionslösung möglichst gleichmäßig im Medium verteilt. Die Zellen wurden bei 37°C inkubiert. Nach 24h und nach 48h erfolgte ein Mediumwechsel mit FCS-freiem Basis-Zellkulturmedium. Die funktionellen Experimente wurden 54h nach Transfektion durchgeführt. Dazu wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit DPBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin/EDTA vom Zellkulturplattenboden gelöst.

Bei jeder Transfektion wurden als Kontrollen sowohl unbehandelte Zellen als auch Zellen mitgeführt, die nur dem Transfektionsreagenz (TR) exponiert wurden.

2.2.11 Transfektion mit Lipofectamine® RNAiMAX

Die Transfektion der Zelllinie UT-SCC 24B wurde mit Hilfe des Transfektionsreagenzes Lipofectamine® RNAiMAX und nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Dafür wurden 6×10^5 Zellen pro *Well* einer 6-Well-Zellkulturplatte ausgesät und bei 37°C für 24h in 2 ml Zellkulturmedium ohne Zusatz von Antibiotika kultiviert. Für die Transfektion wurden in zwei Reaktionsgefäßen (A) je 150 µl Opti-MEM Medium und 7,5 µl Lipofectamine® RNAiMAX gegeben. In zwei weitere Reaktionsgefäße (B) wurden 150 µl Opti-MEM Medium und aus einer 2 µM Arbeitslösung in dem einen 60 µl (120 pmol) siRNA der Negativkontrolle (*siScrambled*) und in dem anderen 60 µl (120 pmol) Ziel-siRNA für das *ST3GAL1* mRNA-Transkript (*siST3GAL1*) verdünnt. Die Inhalte der einzelnen Reaktionsgefäße wurden gut vermischt und anschließend die verdünnte siRNA (B) dem verdünnten Lipofectamine®

RNAiMAX Transfektionsreagenz (A) hinzu-gefügt. Es folgte eine Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur. Während der Inkubationszeit der Lösung wurde das Medium der tags zuvor ausgesäten Zellen abgenommen und die Zellen mit DPBS gewaschen. In jedes *Well* wurden 1633 μ l frisches FCS-freies Basis-Zellkulturmedium pipettiert. Je 367 μ l der vorbereiteten Transfektionslösungen wurden pro *Well* dem Medium hinzugefügt und in diesem einige Male resuspendiert, während die Zellkulturplatte dazu schräg gehalten wurde. Die Zellen wurden bei 37°C inkubiert. Nach 24h und nach 48h erfolgte ein Mediumwechsel mit Basis-Zellkulturmedium + 10% FCS, jedoch weiterhin ohne den Zusatz von Antibiotika. Die funktionellen Experimente wurden 54h nach Transfektion durchgeführt. Dazu wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit DPBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin/EDTA vom Zellkulturplattenboden gelöst.

Bei jeder Transfektion wurden als Kontrollen sowohl unbehandelte Zellen als auch Zellen mitgeführt, die nur dem Transfektionsreagenz (TR) exponiert wurden.

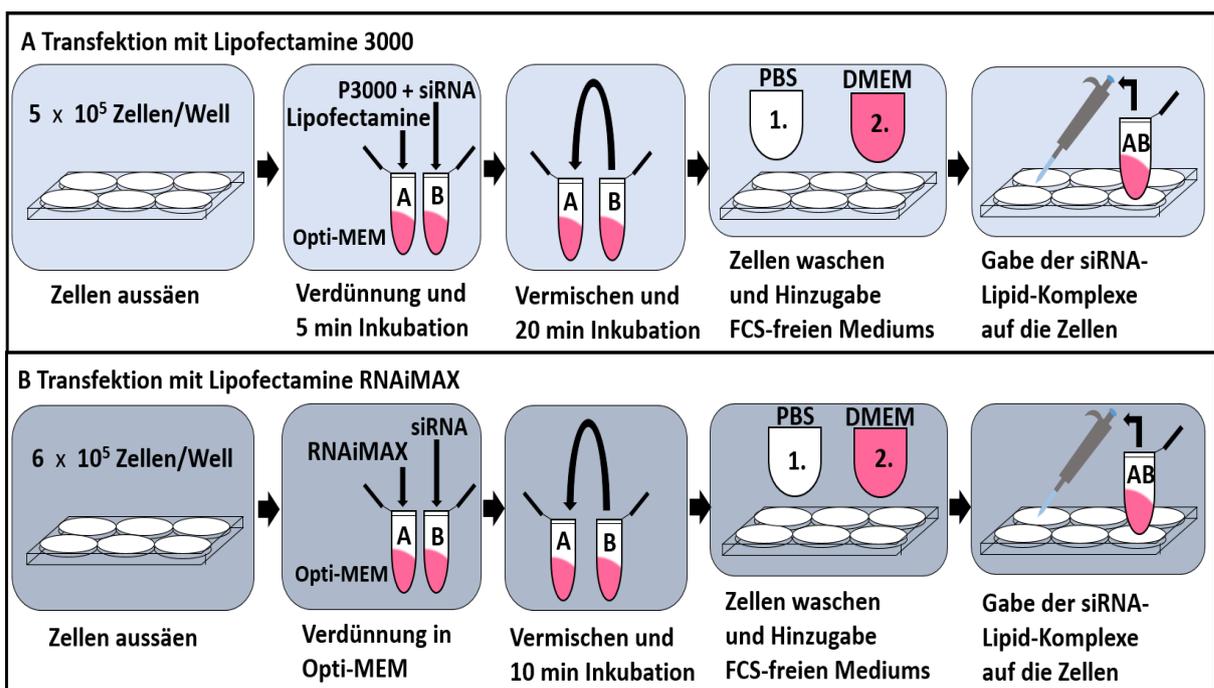


Abb. 4: Schematische Darstellung der Durchführung der Transfektionen. (A) Transfektion der Zelllinie UT-SCC 42B mit Lipofectamine® 3000. Vor der Transfektion wurden die Zellen in 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät und für 24h inkubiert. Das Lipofectamine® 3000 wurde in Opti-MEM Medium verdünnt (Lösung A), separat erfolgte die gemeinsame Verdünnung der siRNA mit dem P3000 Reagenz in Opti-MEM Medium (Lösung B). Nach kurzer Inkubationszeit wurde Lösung B in Lösung A überführt, vorsichtig resuspendiert und erneut inkubiert (Lösung AB). Währenddessen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und frisches FCS-freies Zellkulturmedium hinzugefügt. Lösung AB wurde tropfenweise gleichmäßig auf das Medium der entsprechenden Wells verteilt. **(B)** Transfektion der Zelllinie UT-SCC 24B mit Lipofectamine® RNAiMAX. Nach der Aussaat der Zellen am Vortag, wurden das Transfektionsreagenz und die siRNA in separaten Eppendorf-Tubes in Opti-MEM Medium verdünnt, unmittelbar ineinander überführt und inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen und frisches FCS-freies Zellkulturmedium in die Wells gegeben. Schließlich erfolgte die Gabe der siRNA-Liposomen-Komplexe auf die Zellen. Abbildung modifiziert nach (Baal, 2019).

2.2.12 Genexpressionsanalyse mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

2.2.13 RNA-Isolierung

Für die Reverse Transkriptase-quantitative Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) erfolgte die Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellen unter Verwendung des *QIAshredders* und des *RNeasy Mini Kits* von Qiagen. Der *QIAshredder* dient der Homogenisierung des Zelllysats auf der Grundlage eines Biopolymer Zerkleinerungssystems, welches unlösliche Zellbestandteile herausfiltert und gleichzeitig sowohl den Materialverlust als auch die Viskosität reduziert. Das Funktionsprinzip des *RNeasy Mini Kits* beruht auf der Lyse der Zellen durch Guanidiniumisothiocyanat und der Verwendung von Säulen mit Silica-Gel-Membranen, welche die freiwerdende RNA binden und den Großteil der DNA entfernen.

Vor Beginn wurden 10 ml RLT Puffer mit 100 µl β-Mercaptoethanol (RLT/β-Me) versetzt. Für die RNA-Isolierung wurde zunächst das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen mit DPBS gewaschen. Dann wurden die Zellen aus den Zellkulturflaschen enzymatisch mittels Trypsin-EDTA vom Kulturflaschenboden gelöst und zentrifugiert, wohingegen die Zellen aus den Zellkulturplatten nach direkter Hinzugabe von RLT/β-Me mechanisch mit Hilfe eines Zellschabers gewonnen wurden. Je nach Größe der Zellpellets bzw. der empirisch eingeordneten Zellzahl erfolgte zur Lyse der Zellen die Zugabe von 350 oder 600 µl RLT/β-Me. Unter Vermeidung von Blasenbildung wurden die Zellen darin vorsichtig resuspendiert, bis sich eine homogene Flüssigkeit ergab. Das Zelllysate wurde nun vollständig in den *QIAshredder* überführt und für 2 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Als nächstes erfolgte die Zugabe des gleichen Volumens 70 %-igen Ethanol zum Homogenisat. Dieses wurde resuspendiert, bis keine Bildung von Schlieren mehr vorhanden war. Von der Probe wurden dann maximal 700 µl auf eine *RNeasy Mini Spin* Säule geladen und für 30 Sekunden bei 8000 x g zentrifugiert. Anschließend erfolgte der DNase-Verdau auf der Membran. Dafür wurden zunächst 350 µl RW1 Puffer auf die Säule gegeben und diese erneut für 30 Sekunden bei 8000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde nach jedem Waschschrift verworfen. Im Anschluss wurden 10 µl der DNase *stock solution* (RNase-Free DNase Set, Qiagen) mit 70 µl RDD-Puffer vermischt und auf die Säule pipettiert. Es folgten 15 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur und daraufhin ein erneuter Waschschrift mit 350 µl RW1 Puffer durch eine Zentrifugation von 30 Sekunden bei 8000 x g. Dann wurde die Säule zweimal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen. Beim ersten Mal erfolgte eine Zentrifugation von

30 Sekunden und beim zweiten Mal von 2 Minuten bei 8000 x g. Schließlich wurde die Säule in ein neues 2 ml Zentrifugenröhrchen umgesetzt und für 1 Minute bei maximaler Geschwindigkeit trocken zentrifugiert. In einem letzten Schritt wurde die Säule in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt, mit 40 - 80 µl RNase-freiem Wasser befüllt und abschließend die RNA für 1 Minute bei 8000 x g eluiert. Die Konzentration und die Reinheit des gewonnenen RNA-Eluats wurden im Spektrometer *Infinite M200* (Tecan) gemessen (Protokoll AG Stoecklein).

2.2.14 cDNA-Synthese

Die Transkription der aus den Zellen extrahierten RNA in ihre komplementäre DNA (cDNA) ist Voraussetzung für die anschließende RT-qPCR und wurde unter Verwendung des *qScript* cDNA Synthese Kits (QuantaBio) durchgeführt. Kernbestandteil der Transkription ist das Enzym Reverse Transkriptase (RT), eine spezifische RNA-abhängige DNA-Polymerase. Die Bausteine für die Synthese des komplementären Strangs bilden hierbei Oligo-dT-Nukleotide (20-Desoxythymidin), welche komplementär zum Poly-A-Schwanz der eukaryotischen mRNA sind, und *random* Hexamere, die aus sechs zufällig zusammengesetzten Nukleotiden bestehen (qScript Reaction Mix). Zusammenfassend entspricht die cDNA also der reverse transkribierten Gesamt RNA.

Die Transkription erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl. In einem ersten Schritt wurde 1 µg der umzuschreibenden Gesamt RNA je nach Konzentration mit nuklease-freiem Wasser verdünnt und in 0,2 ml PCR-Röhrchen auf ein Volumen von 15 µl gebracht. Dann wurden 4 µl des qScript Reaction Mix (5x) und 1 µl qScript RT (1x) hinzugefügt und gut resuspendiert. Bei Bedarf folgte eine kurze Zentrifugation. In jeder Reaktion wurden zum Ausschluss einer potenziellen Kontamination eine Kontrolle ohne Probe (*No Template Control*, NTC) und für jede Probe eine Kontrolle ohne Reverse Transkriptase zum Ausschluss unspezifischer Hintergrundfluoreszenz in der anschließenden RT-qPCR (*No Amplification Control*, NAC) mitgeführt. Die PCR-Röhrchen wurden in einen Thermocycler (Life ECO, Bioer Technology) platziert und durchliefen ein bereits zuvor definiertes Temperaturprofil:

22°C für 5 min
42°C für 30 min
85°C für 5 min
4°C Endpunkt

Bei 22°C erfolgt die Hybridisierung der Oligonukleotide (Primer) an den komplementären RNA-Strang. Die Transkription der RNA in cDNA mittels Reverse Transkriptase geschieht über eine halbe Stunde bei 42°C. Im Anschluss folgt die Inaktivierung des Enzyms bei 85°C und letztlich die Lagerung der Proben bis zur Verwendung bei 4°C. Die finale cDNA wurde auf eine Konzentration von 15 ng/µl verdünnt und für die Langzeitlagerung in den -20°C Gefrierschrank überführt (nach Protokoll AG Stoecklein).

2.2.15 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) ist eine der wichtigsten Methoden in der modernen Molekularbiologie. Durch Nachahmung des natürlichen Prinzips der DNA-Replikation lassen sich bereits in der klassischen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) *in vitro* mit Hilfe einer DNA-Polymerase, gensequenzspezifischer Oligonukleotide (Primer) und Desoxyribonukleotiden spezifisch ausgewählte DNA-Sequenzen vervielfältigen (Amplifikation). Die qPCR erlaubt durch die additive Detektion von Fluoreszenzlicht am Ende eines jeden PCR-Zyklus eine zyklussynchrone Quantifizierung der amplifizierten Zielsequenz, wobei die Intensität des entstehenden Fluoreszenzsignals proportional mit der Menge der PCR-Produkte zunimmt (Holzapfel and Wickert, 2007).

Zu Beginn eines PCR-Zyklus findet bei hoher Temperatur das Aufschmelzen (Denaturierung) des DNA-Doppelstranges (dsDNA) in zwei einzelsträngige DNA-Moleküle (ssDNA) statt, an die sich nach einem Senken der Temperatur (*Annealing*) zwei synthetische, sequenzspezifische Primer anlagern. Dabei binden die Primer an den jeweils gegenüberliegenden DNA-Einzelstrang. Indem sie sich mit ihrem 3'-Ende zugewandt gegenläufig zueinander orientiert sind, flankieren sie die gewünschte Zielsequenz. Die Primer dienen der thermostabilen DNA-Polymerase (Taq-Polymerase), einer rekombinanten DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*, als Startmoleküle. Die Taq-Polymerase synthetisiert nun ausgehend von den Primern in 5'-3'-Richtung durch Verwendung von passenden Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) einen zur Zielsequenz komplementären DNA-Einzelstrang (Elongation). Dadurch entsteht ein neuer DNA-Doppelstrang. Nach erneuter Denaturierung dient der neu synthetisierte Doppelstrang im folgenden PCR-Zyklus nun ebenfalls als Kopierschablone für die Amplifikation. Aus der Wiederholung dieses Vorgangs resultiert eine exponentielle Vermehrung der Ausgangssequenz relativ zur Anzahl der durchlaufenen Zyklen (Mullis and Faloona, 1987, Hill and Stewart, 1992). Für die Quantifizierung der PCR-Produkte mittels Fluoreszenzlicht in Echtzeit wurden für unsere Analysen zusätzlich sogenannte

Hybridisierungssonden (*TaqMan-Probes*) verwendet, welche wie die Primer sequenz-spezifische Oligonukleotide sind und während der *Annealing* Phase zwischen die Primer an die Zielsequenz binden. Diese fluorogenen Sonden können im Unterschied zu den Primern im Elongationsschritt nicht durch die Taq-Polymerase verlängert werden, da sie am 3'-Ende keine freie Hydroxyl-Gruppe (OH-) besitzen, sondern durch einen Phosphatrest blockiert sind. Außerdem sind sie am 5'-Ende mit einem fluoreszierenden *Reporter*-Farbstoff (6-FAM-phosphoramidit) und am 3'-Ende mit einem *Quencher*-Farbstoff kovalent gebunden (Livak et al., 1995). Dabei wird die Lichtemission des *Reporters* durch die räumliche Nähe zum *Quencher* supprimiert. Dies basiert auf dem Phänomen des *fluorescence resonance energy transfer* (FRET) (Didenko, 2001). Nach Hybridisierung mit dem komplementären DNA-Strang wird die Sonde in der Elongationsphase durch die Taq-DNA-Polymerase, welche neben ihrer 5'-3'-DNA-Polymerase Aktivität auch eine 5'-Exonuklease Aktivität besitzt, hydrolytisch gespalten. Dies führt zu einer Freisetzung des *Reporters*, wodurch dieser durch die Trennung vom *Quencher* nach Anregung fluoresziert. Die Lichtemission des *Reporters* ist nun messbar und wird am Ende jedes PCR-Zyklus detektiert. Die Intensität dieses Fluoreszenzsignals korreliert proportional mit der Menge der amplifizierten PCR-Produkte.

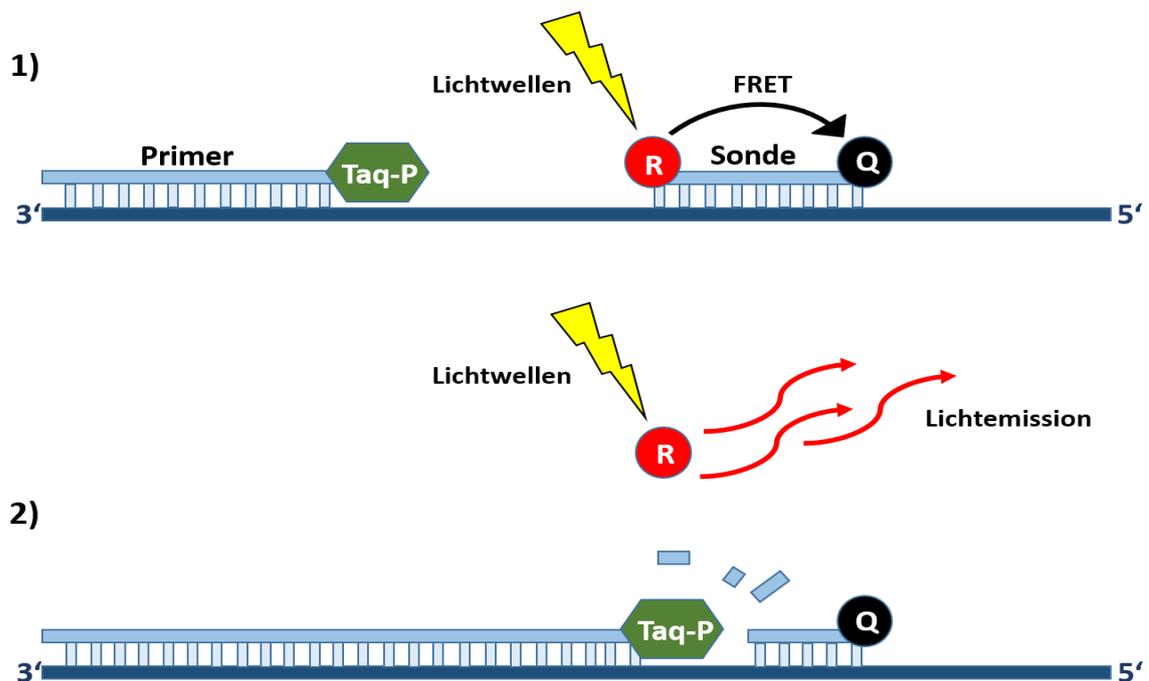


Abb. 5: Prinzip der Hydrolyse von Sonden (Probes). (1) Die Hydrolyse-Sonde (TaqManTM-Sonde) bindet wie die Primer komplementär an den DNA-Zielstrang, der als Matrize für die Amplifikation dient. Bei intakter Sonde unterdrückt der Quencher (Q) in räumlicher Nähe das Fluoreszenzsignal des Reporters (R), indem dessen Energie auf ihn übertragen wird (FRET). (2) Im Elongationsschritt baut die Taq-Polymerase (Taq-P) die Sonde ab, der Reporter wird freigesetzt und die enge Nachbarschaft zum Quencher aufgehoben. Dadurch erlischt die Unterdrückung der Lichtemission des Reporters und eine Detektion dieses Fluoreszenzsignals wird möglich (Abbildung nach Sklavounos, A.).

In dieser Arbeit wurde die RT-qPCR mit Hilfe des *PerfeCTa Fast Mix II* (QuantaBiosciences) durchgeführt, in dem die DNA-Polymerase und die dNTPs enthalten sind. Die Primer für die Detektion des Zielgens *ST3GALI* wurden freundlicherweise durch die AG Wirth des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf designt und zur Verfügung gestellt. Die Wahl der restlichen Primer und aller Hydrolysierungssonden erfolgte durch Nutzung des *Universal ProbeLibrary System Assay* (Roche), eine Online-Software, die für die Detektion der mRNAs der entsprechenden Zielgene eine optimale Kombination aus Primerpaar (*Forward* und *Reverse* Primer) und passender Hydrolysierungssonde erstellt. Um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA-Probe auszugleichen, wurden für die Normalisierung in der Auswertung der qPCR die Fluoreszenzsignale der zwei Referenzgene HMBS (kodiert für die Hydroxymehtylbilan-Synthase, welche essenziell in der Porphyrin-Biosynthese ist) und TBP (kodiert für das TATA-Bindungsprotein, welches ein allgemeiner Transkriptionsfaktor ist und spezifisch an die DNA-Sequenz der TATA-Box bindet) verwendet.

Für jede einzelne Probe eines PCR-Laufs wurden technische Triplikate angefertigt. Dazu wurde auf Eis folgender Ansatz in einem Gesamtvolumen von 20 µl in jedes Well einer 96-Well-Platte pipettiert (nach Protokoll AG Stoecklein):

	10 µl <i>PerfeCTa Fast Mix II</i>
+	0,2 µl Sonde (0,1 µM)
+	0,2 µl <i>Forward</i> Primer (0,1 µM)
+	0,2 µl <i>Reverse</i> Primer (0,1 µM)
+	7,4 µl <i>Aqua dest.</i>
+	2,0 µl cDNA (30 ng)

Nach dem Pipettieren wurde die 96-Well-Platte in den Thermocycler Aria Mx (Agilent Technologies) platziert und durchlief ein zuvor definiertes, zyklisches Temperaturprofil:

- 1) 95°C für 2 min
- 2) 95°C für 10 s
- 3) 60°C für 30 s
- 4) Auslesen der Platte

Die Amplifikation und Fluoreszenzmessung in den Schritten 2) bis 4) wurde für insgesamt 40 Zyklen durchlaufen. Die anschließende Auswertung zur Bestimmung der relativen

Genexpression anhand der Ct-Werte erfolgte gemäß der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode (Livak and Schmittgen, 2001). Dabei gibt der Ct-Wert (*Cycle threshold* = „Zyklus-Schwellenwert“) für jedes einzelne Replikat pro Well die Zykluszahl an, bei der das kumulative Fluoreszenzsignal der *Reporter* erstmals einen definierten Schwellenwert signifikant überschreitet. Dies ist der Punkt, an dem das „echte“ Fluoreszenzsignal das Hintergrundrauschen der Fluoreszenz übersteigt. Je geringer die Ausgangskonzentration der Zielsequenz in der Probe zu Beginn der qPCR ist, desto später wird dieser Schwellenwert erreicht und desto höher ist die entsprechende Zykluszahl in Form des Ct-Werts. Demzufolge besteht ein umgekehrt proportionaler Zusammenhang zwischen der Ausgangsmenge der Zielsequenz und dem Ct-Wert. Die Normalisierung der Ct-Werte wurde wie folgt berechnet:

$$\begin{aligned}\Delta Ct &= [(MW_{Zielgen} - MW_{Referenzgen1}) + (MW_{Zielgen} - MW_{Referenzgen2})] / 2 \\ &= [(MW_{Zielgen} - MW_{HMBS}) + (MW_{Zielgen} - MW_{TBP})] / 2\end{aligned}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{behandelt}} - \Delta Ct_{\text{unbehandelt}}$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \textit{Fold Change}$$

(MW = Mittelwert der technischen Replikate; Fold Change = n-fache Expression)

2.2.16 Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse

2.2.17 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie ist ein technisches Messverfahren, das Einzelzellen einer heterogenen Zellpopulation anhand ihrer physikalischen Eigenschaften analysiert, in Subpopulationen einteilt und quantifiziert. Das Prinzip beruht auf der Messung von optischen Signalen, die Zellen individuell entsprechend ihrer Zellgröße, ihrer Granularität und Fluoreszenzeigenschaften nach Anregung durch Laserstrahlen, emittieren (Givan, 2011). In einer Trägerflüssigkeit werden die Zellen durch einen Hüllstrom fokussiert in eine hochpräzise Küvette geführt, in der sie einzeln den Messbereich der Laserstrahlen passieren. Es wird Streulicht von Fluoreszenzsignalen unterschieden. Das Vorwärtstreulichts (Forward Scatter, FSC) entspricht der relativen Zellgröße, das Seitwärtstreulichts (Side Scatter, SSC) der Granularität bzw. Komplexität der Zelle. Durch den Einsatz verschiedener Laser und Filter lassen sich neben der Färbung von Nukleinsäuren mittels Immunfluoreszenz auch andere Moleküle im Zellkern, Zytoplasma oder auf der Zelloberfläche visualisieren und deren Quantität durch die Intensität des emittierten Lichtsignals an den Detektoren auswerten. Die

Detektoren übersetzen das optische Signal in ein elektrisches Signal. Dieser Impuls hat die Eigenschaften Höhe (*height*, H), Breite (*width*, W) und das Integral (*area*, A) des Impulses (McKinnon, 2018). Wenn Zellen anhand ihrer Fluoreszenzeigenschaften durch das Gerät in separate Gefäße abgelegt werden, spricht man von *fluorescence activated cell sorting* (FACS) und das Gerät entsprechend *sorter*.

2.2.18 BrdU und Propidiumiodid Markierung

Bromodesoxyuridin (BrdU) ist ein Thymidinanalogon, welches während der DNA-Replikation in der S-Phase sich teilender Zellen in die DNA inkorporiert wird. Durch monoklonale Antikörper, welche gegen das BrdU gerichtet und mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein-isothiocyanat (FITC) gekoppelt sind, lassen sich folglich aktiv proliferierende Zellen detektieren (Mead and Lefebvre, 2014). Propidiumiodid (PI) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in die DNA interkaliert. Somit lassen sich Rückschlüsse auf den Gesamt-DNA-Gehalt einer Zelle ziehen. Anhand dieser Methode der Doppelfärbung kann eine Einzelzelle einer expliziten Phase des Zellzyklus zugeordnet werden, woraus sich die Proliferationsaktivität der untersuchten Zellpopulation beschreiben lässt.

2.2.19 Durchführung des BrdU-Assay

Der BrdU-Assay wurde mit dem FITC BrdU Flow Kit von BD Biosciences durchgeführt. Die Zelllinien UT-SCC 42B und UT-SCC 24B wurden zunächst wie in 3.2.2 und 3.2.3 beschrieben transfiziert. Neben der *siST3GAL1* wurden in jedem Experiment folgende Ansätze mitgeführt: Unbehandelte Zellen, nur dem Transfektionsreagenz exponierte Zellen und mit der Negativkontrolle *siScrambled* transfizierte Zellen. Der BrdU Assay startete 54h nach der Transfektion. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da der Hersteller der *siRNA* den maximalen *Knockdown*-Effekt im Zeitfenster zwischen 48h und 72h nach Transfektion angibt. Alle Waschschritte der Zellen wurden mit 1 ml 1x Perm/Wash Puffer und die Zentrifugationen für 5 min bei 300 x g durchgeführt. 20 µl einer 1 mM BrdU-Lösung wurden in jedes Well mit 2 ml Zellkulturmedium gegeben und für 2 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Dann wurde das Medium entfernt, die Zellen mit 1x DPBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin/EDTA vom Plattenboden gelöst. Die Enzymreaktion wurde mit 3 ml Zellkulturmedium gestoppt, die Zellsuspension in ein FACS-Röhrchen mit Deckel überführt und für 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 100 µl BD Cytotfix/Cytoperm Puffer resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen gewaschen, zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgegossen. Die Zellen wurden jetzt in

100 µl Permeabilisierungspuffer Plus (BD) resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Hiernach wurden die Zellen wieder gewaschen, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es folgte das Resuspendieren in 100 µl BD Cytotfix/Cytoperm Puffer und eine Inkubationszeit von 5 min bei RT. Die Zellen wurden gewaschen, zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Dann wurden 30 µl DNase in 70 µl 1x DPBS verdünnt. Jede Probe wurde in 100 µl verdünnter DNase resuspendiert und für 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut gewaschen, zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Nun wurden 20 µl FcR-Blocking Reagent in 80 µl 1x DPBS verdünnt, die Zellen in 100 µl davon resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgten wieder Waschschrift, Zentrifugation und Verwerfen des Überstands. 1 µl der FITC anti-BrdU-Solution wurde in 49 µl 1 x BD-Perm/Wash Puffer 1:50 verdünnt. Die Zellen wurden in 50 µl verdünnter Antikörper Lösung resuspendiert und für 20 min bei RT inkubiert. Wieder wurden die Zellen gewaschen, zentrifugiert und der Überstand entfernt. 2,5 µl PI wurde in 97,5 µl 1x DPBS verdünnt, die Zellen in 100 µl verdünnter PI-Lösung resuspendiert und für 30 min bei 37°C inkubiert. Zuletzt wurde 1 ml 1x DPBS hinzugefügt und die Zellen hinsichtlich ihres Zellzyklus wie in 3.4.4 beschrieben im Durchflusszytometer analysiert. Bei Bedarf konnten die Proben lichtgeschützt bei 4°C bis zur Analyse am Folgetag gelagert werden (nach Protokoll AG Stoecklein).

2.2.20 Zellzyklusanalyse und Auswertung

Die FACS-Analyse aller Proben erfolgte mit dem Durchflusszytometer *FACSCanto II* von BD Biosciences. Dieses Gerät verfügt über einen blauen 488 nm Laser, durch den FITC und PI angeregt werden. PI hat DNA-gebunden ein Emissionsmaximum von 615-620 nm (Miltenyi Biotec), welches durch den 695/40 nm Bandpassfilter gesammelt wurde und im PerCP/PerCP-CyTM5.5 Kanal detektierbar war. FITC besitzt ein Emissionsmaximum von 518 nm (BD Biosciences) und wurde durch den 530/30 nm Bandpassfilter im FITC-Kanal detektiert. Die Fluoreszenzintensität für PI wurde in linearer Skalierung auf der Abszisse, die für FITC logarithmisch auf der Ordinate abgebildet (Abb. 8: Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse. Die Zelllinien UT-SCC 42B und UT-SCC 24B wurden 54h nach Transfektion mittels siRNA mit BrdU und PI inkubiert. Hier ist beispielhaft die Analyse der Zelllinie UT-SCC 24B gezeigt: Die Darstellung erfolgte zweidimensional auf den Achsen FITC-A für BrdU und PerCP-H für PI, um die Zellen hinsichtlich ihres individuellen Status im Zellzyklus diskriminieren zu können. Zum Ausschluss von unspezifischer Hintergrundfärbung wurde stets eine Probe ohne BrdU-Färbung mitgeführt, welche hier als „unbehandelt ohne BrdU“ (A) gekennzeichnet ist. (B) sind unbehandelte, nicht transfizierte Zellen, (C) Zellen, die während der Transfektion

ausschließlich dem Transfektionsreagenz exponiert wurden, (D) Zellen, die mit der Negativkontrolle siScrambled transfiziert wurden und (E) sind Zellen, die mit der Ziel-siRNA siST3GAL1 transfiziert wurden).

Zu Beginn wurden die Zelllinien UT-SCC 42B und UT-SCC 24B bezogen auf ihre Zellgröße (FSC) und Granularität (SSC) analysiert, wodurch intakte Zellen von Zellschrott (Debris) und nicht-zellulären Partikeln differenziert werden konnten (Abb. 6). Um Doppelzellen (Dubletten) und Zellkonglomerate auszuschließen, wurden die Zellen außerdem auf der SSC-W und SSC-A Achse untersucht (Abb. 7). Die Regionen zur Auswahl der weiter zu analysierenden Populationen wurden im Bereich der höchsten Zelldichte gesetzt.

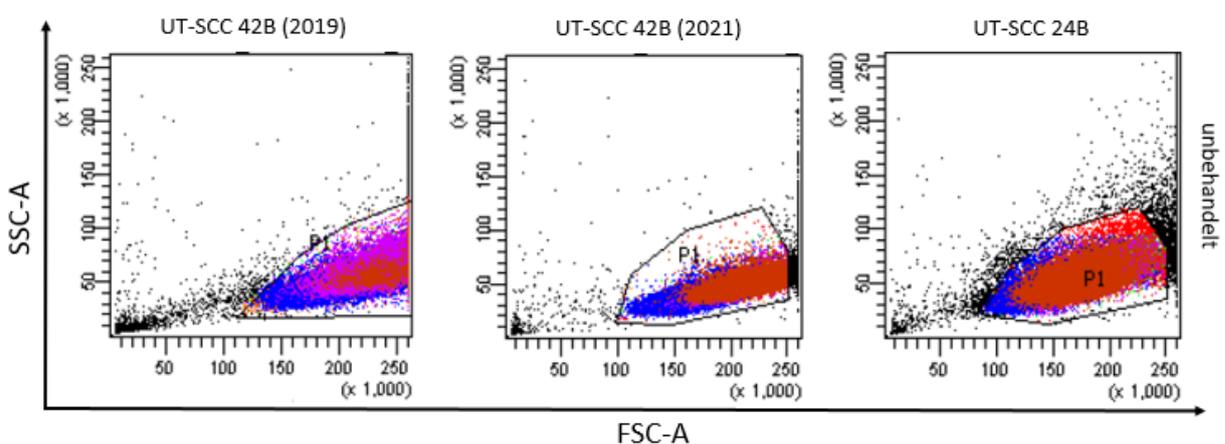


Abb. 6: Durchflusszytometrische Analyse der Zelllinien. Die Zelllinien UT-SCC 42B (2019 und 2021) und UT-SCC 24B wurden hinsichtlich ihrer Zellgröße (FSC-A) und Granularität (SSC-A) analysiert, um Einzelzellen aus Zellschrott (Debris) und nicht-zellulären Partikeln zu selektieren. Hier sind exemplarisch unbehandelte, nicht transfizierte Zellen dargestellt. Die Region zur Auswahl der Population (P1) wurde im Bereich der höchsten Eventdichte gesetzt (Abbildung nach Sklavounos, A.).

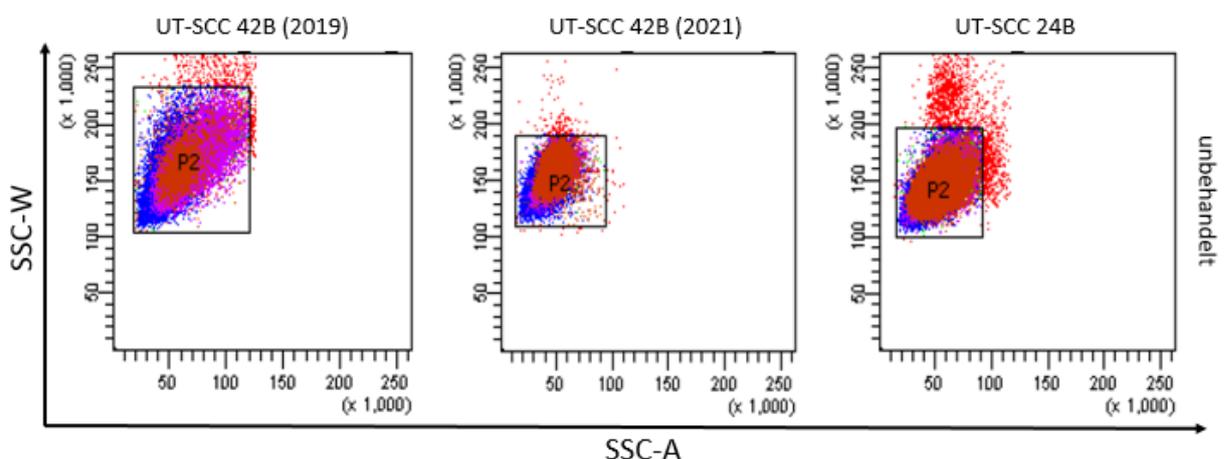


Abb. 7: Durchflusszytometrische Selektion von Einzelzellen. Die Zelllinien UT-SCC 42B (2019 und 2021) und UT-SCC 24B wurden bezogen auf ihre Granularität (SSC-W und SSC-A) analysiert. Hier sind beispielhaft unbehandelte, nicht transfizierte Zellen dargestellt. Die Region zur Auswahl der Population (P2) wurde im Bereich der höchsten Eventdichte gesetzt (Abbildung nach Sklavounos, A.).

Die Zellzyklusanalyse erfolgte wie oben beschrieben durch Analyse der Intensität des FITC- und PI-Fluoreszenzsignals. Hier wurden die Gates im Bereich der größten Eventdichte der Punktwolke gesetzt. Neben der Verwendung des FcR-Blocking Reagents wurde zum Ausschluss einer unspezifischen Hintergrundfärbung durch den mit FITC gekoppelten und gegen BrdU gerichteten monoklonalen Antikörper auch immer eine Kontrolle ohne Inkubation mit BrdU (A) mitgeführt (Abb. 8). In jedem Versuchslauf erfolgte neben dieser Kontrolle die Untersuchung von unbehandelten Zellen (B), Zellen, die nur dem Transfektionsreagenz exponiert (C), Zellen, die mit der Negativkontrolle der *siRNA* (D, *siScrambled*) transfiziert und mit der Ziel-*siRNA* (E, *siST3GAL*) transfiziert worden waren (Abb. 8). Als Grundlage für die Analyse des BrdU-Assays diente das *BD Pharmingen™ BrdU Flow Kits Instruction Manual*.

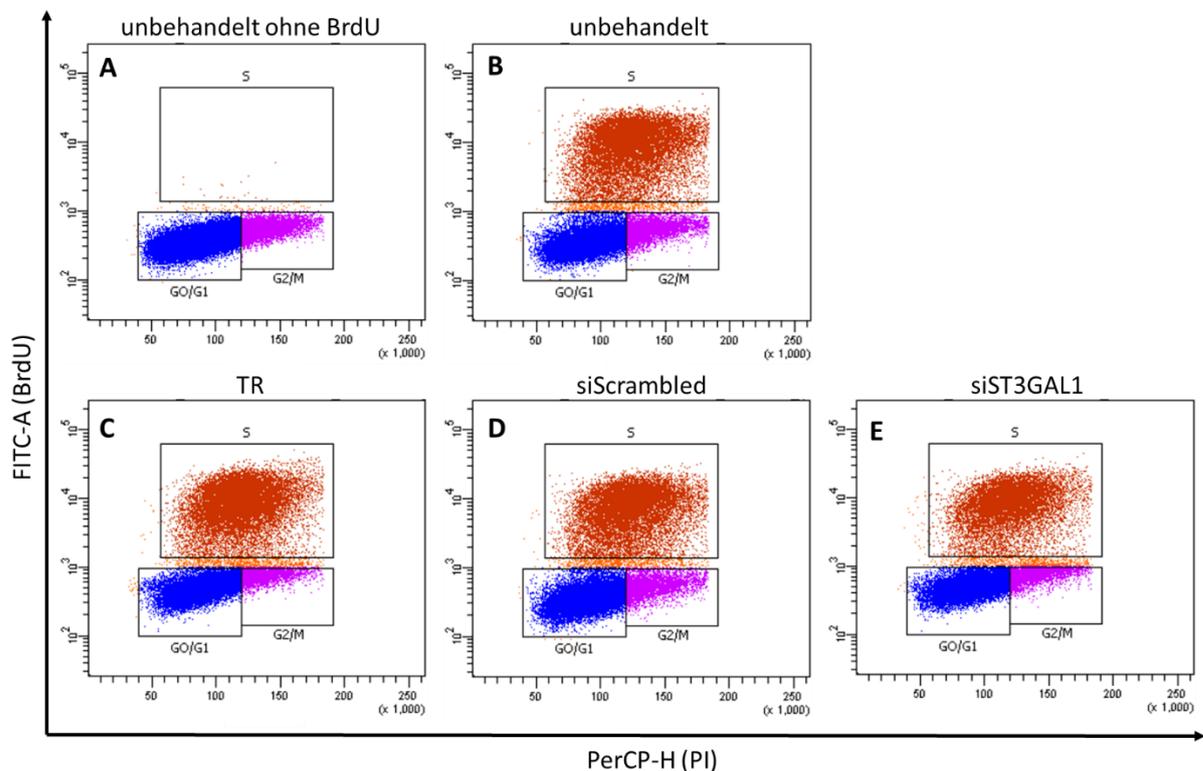


Abb. 8: Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse. Die Zelllinien UT-SCC 42B und UT-SCC 24B wurden 54h nach Transfektion mittels siRNA mit BrdU und PI inkubiert. Hier ist beispielhaft die Analyse der Zelllinie UT-SCC 24B gezeigt: Die Darstellung erfolgte zweidimensional auf den Achsen FITC-A für BrdU und PerCP-H für PI, um die Zellen hinsichtlich ihres individuellen Status im Zellzyklus diskriminieren zu können. Zum Ausschluss von unspezifischer Hintergrundfärbung wurde stets eine Probe ohne BrdU-Färbung mitgeführt, welche hier als „unbehandelt ohne BrdU“ (A) gekennzeichnet ist. (B) sind unbehandelte, nicht transfizierte Zellen, (C) Zellen, die während der Transfektion ausschließlich dem Transfektionsreagenz exponiert wurden, (D) Zellen, die mit der Negativkontrolle *siScrambled* transfiziert wurden und (E) sind Zellen, die mit der Ziel-*siRNA* *siST3GAL1* transfiziert wurden (Abbildung nach Sklavounos, A.).

Die Erstellung der Graphiken, Diagramme und Abbildungen erfolgte in GraphPad Prism und durch Verwendung von Microsoft PowerPoint.

2.2.21 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse der Ergebnisse wurde mit Hilfe der Software GraphPad Prism durchgeführt. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz zwischen Proben einer Zelllinie, die verschiedene Behandlungen erfuhren, wurde der gepaarte, nicht-parametrische Wilcoxon-Test für abhängige Messdaten verwendet. Dieser vergleicht die Rangsummen (engl. *rank sums*) unterschiedlicher Stichproben miteinander, um die Hypothese (H) zu überprüfen, ob die beiden Grundgesamtheiten identisch (H_0) oder nicht identisch (H_1) verteilt sind. Dieser Test wird unter anderem verwendet, wenn nur ein geringer Stichprobenumfang vorliegt. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als Signifikanzniveau festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Genexpressionsanalyse in HNSCC- und Schilddrüsenkarzinomzelllinien

Zu Beginn dieser Arbeit wurden die ausgewählten Zelllinien hinsichtlich ihrer Expression der Kandidatengene analysiert (Abb. 9), um geeignete Zelllinien mit einer möglichst hohen mRNA-Expression für weiterführende biologische Funktionsanalysen zu identifizieren.

Die mRNA-Expression wurde mittels RT-qPCR quantifiziert. Die Auswertung erfolgte anhand der ΔCt -Werte, die wie in 2.2.15 beschrieben durch die Normalisierung mit den endogenen Referenzgenen HMBS und TBP berechnet wurden. Je kleiner der ΔCt -Wert ist, desto größer ist die relative Expression der mRNA in Relation zu den Referenzgenen und umgekehrt. Ein ΔCt -Wert von 0 entspricht der Expressionshöhe der Referenzgene. Von jeder HNSCC-Zelllinie wurden drei voneinander unabhängige biologische Replikate untersucht. Die Analyse der einzelnen Proben erfolgte in technischen Triplikaten. Ein fehlender Balken bedeutet, dass kein mRNA-Transkript amplifiziert wurde.

Zu den untersuchten Genen gehörten neben dem Zielgen *ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 1* (ST3GAL1) die *ArfGAP With SH3 Domain, Ankyrin Repeat And PH Domain 1* (ASAP1), das *Transmembrane protein 71* (TMEM71), die *Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 2* (ENPP2), das *Alanine And Arginine Rich Domain Containing Protein* (AARD), der *Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 11b* (TNFRSF11B) und *Src Like Adaptor* (SLA). Als Referenzgene dienten zur Normalisierung und Vergleichbarkeit der Expressionshöhe die *Hydroxymethylbilane Synthase* (HMBS) und das *TATA-box Binding Protein* (TBP). Insgesamt präsentierten die Zelllinien eine sehr heterogene Expression der Zielgene. Neben der Zelllinie UT-SCC 42B wurden drei Paare von Primärtumorzelllinien (A) und ihren autologen Lymphknotenmetastasen (B) untersucht (Abb. 9).

Die Zelllinie UT-SCC 16A zeigte eine hohe Genexpression von ASAP1 (ΔCt 2,7) und eine noch höhere von ST3GAL1 (ΔCt 1,2), wohingegen das Expressionsniveau von TMEM71_I (ΔCt 4,8) und TMEM71_II (ΔCt 5,0) deutlich niedriger war. ENPP2_I (ΔCt 9,2) präsentierte eine äußerst niedrige Expression. Mittels ENPP2_II ließ sich kein mRNA-Transkript detektieren. Die Gene AARD und SLA wurden in der Zelllinie nicht exprimiert. TNFRSF11B zeigte hier mit einem ΔCt -Wert von 0,1 die höchste Expression unter den untersuchten Genen auf. In der Zelllinie UT-SCC 16B zeigte sich ebenfalls eine hohe Genexpression für ASAP1

(Δ Ct 2,5) und ST3GAL1 (Δ Ct 1,7). TMEM71_I (Δ Ct 2,0) und TMEM71_II (Δ Ct 2,0) wiesen ein hohes Expressionsniveau in Höhe von ST3GAL1 auf. ENPP2_I (Δ Ct 9,7) und SLA (Δ Ct 10,3) wurden nur sehr schwach exprimiert. TNFRSF11B (Δ Ct 4,0) zeigte im Vergleich eine moderate und AARD (Δ Ct 7,7) eine niedrige mRNA-Expression. Auch in dieser Zelllinie konnte mit ENPP2_II keine mRNA-Expression detektiert werden. UM-SCC 22A präsentierte für ENPP2_I (Δ Ct 0,5) die höchste und für ASAP1 (2,1) eine hohe Genexpression. ST3GAL1 (Δ Ct 6,1) wurde ähnlich wie TMEM71_I (Δ Ct 6,0) und TMEM71_II (Δ Ct 6,5) moderat exprimiert. ENPP2_II (Δ Ct 7,5), TNFRSF11B (Δ Ct 8,1) und SLA (Δ Ct 8,5) zeigten eine sehr niedrige Expression. AARD wurde nicht exprimiert. Die Zelllinie UM-SCC 22B zeigte von allen Zelllinien die höchste Genexpression für ASAP1 (Δ Ct 0,2). ST3GAL1 (Δ Ct 2,9) wurde hoch exprimiert. TMEM71_I (Δ Ct 9,1), TMEM71_II (Δ Ct 10,3), ENPP2_I (Δ Ct 8,6) und AARD (Δ Ct 9,1) wiesen allesamt eine vergleichbar schwache Expression auf. Mittels ENPP2_II ließ sich kein mRNA-Transkript detektieren. Die Gene TNFRSF11B und SLA wurden nicht exprimiert. In der Zelllinie UT-SCC 24A präsentierten ASPA1 (Δ Ct 2,8) eine starke und ST3GAL1 (Δ Ct 3,6) eine etwas niedrigere Expression. TMEM71_I (Δ Ct 5,0), TMEM71_II (Δ Ct 5,3) und ENPP2_I (Δ Ct 5,0) wiesen alle eine moderate Expression auf gleichem Niveau auf. Mit ENPP2_II war kein Nachweis eines mRNA-Transkripts möglich. AARD wurde nicht exprimiert, TNFRSF11B (Δ Ct 7,3) zeigte eine sehr geringe Expression in der RT-qPCR-Analyse und SLA (Δ Ct 11,0) ein äußerst spätes Signal nahe der Nachweisgrenze. UT-SCC 24B zeigte wie die Zelllinie UT-SCC 24A eine starke Expression für ASAP1 (Δ Ct 2,7). ST3GAL1 (Δ Ct 4,6), TMEM71_I (Δ Ct 4,8) und TMEM71_II (Δ Ct 5,1) zeigten eine gleichsam moderate Genexpression. Für TNFRSF11B zeigte die Zelllinie eine hohe Expression (Δ Ct 3,6). ENPP2_I (Δ Ct 9,8) und SLA (Δ Ct 8,8) wurden sehr schwach exprimiert, wobei mit ENPP2_II auch in dieser Zelllinie kein mRNA-Transkript detektierbar war. AARD wurde nicht exprimiert. UT-SCC 42B präsentierte eine starke Genexpression für ASAP1 (Δ Ct 1,2) und ebenfalls eine hohe Genexpression für ST3GAL1 (Δ Ct 2,6). Die Gene TMEM71_I (Δ Ct 7,4), TMEM71_II (Δ Ct 7,8) und ENPP2_I (Δ Ct 8,6) zeigten insgesamt eine sehr schwache Genexpression, während mit ENPP2_II in dieser Zelllinie kein mRNA-Transkript nachgewiesen werden konnte. AARD (Δ Ct 6,1) wurde nur moderat exprimiert, TNFRSF11B (Δ Ct 10,9) erwies eine mittels RT-qPCR kaum noch messbare Expression. SLA wurde in dieser Zelllinie nicht exprimiert.

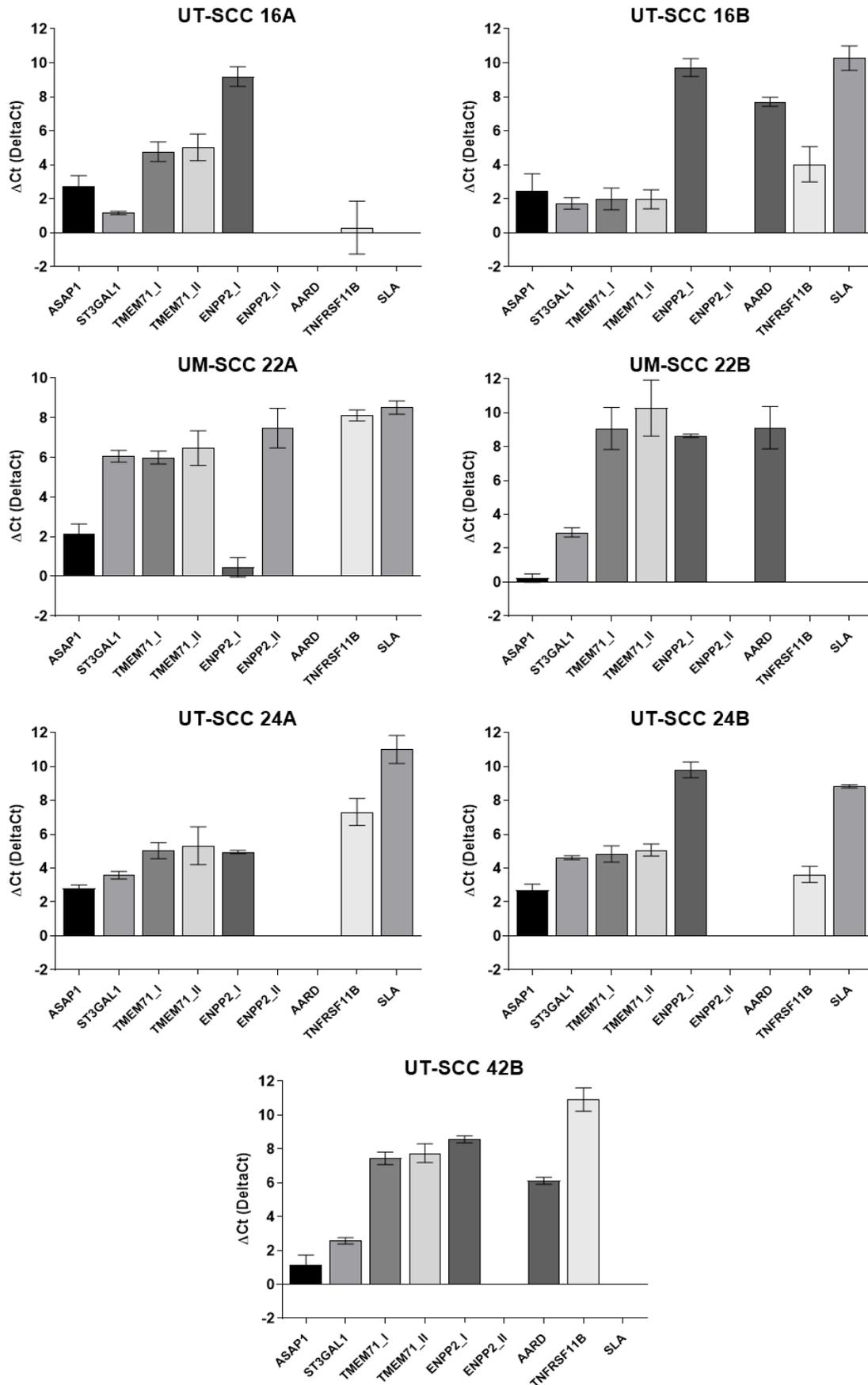


Abb. 9: Genexpressionsanalyse in HNSCC-Zelllinien. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung der mRNA-Expression in Relation zu den Referenzgenen HMBS und TBP (ΔCt). Jede Zelllinie wurde in drei unabhängigen biologischen Replikaten analysiert ($n = 3$). Ein hoher ΔCt -Wert entspricht

einer niedrigen mRNA-Konzentration. Je niedriger der ΔCt -Wert ist, desto höher ist die mRNA-Konzentration und folglich die Expression des Gens. Ein ΔCt -Wert von 0 entspricht der Expressionshöhe der Referenzgene. Kein Balken bedeutet keine Detektion des gesuchten mRNA-Transkripts. ASAP1 = *ArfGAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain 1*; ST3GAL1 = *ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 1*; TMEM71 = *Transmembrane protein 71*; ENPP2 = *Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2*; AARD = *Alanine and arginine rich domain containing protein*; TNFRSF11B = *Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11b*; SLA = *Src like adaptor*; HMBS = *Hydroxymethylbilane synthase*; TBP = *TATA-box binding protein*; I bzw. II = Primerpaar I bzw. Primerpaar II

Als Positivkontrolle für die Expression von *ST3GAL1* und zur Validierung der verwendeten Primer wurden zwei Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien ausgewählt. Das humane Schilddrüsengewebe weist im menschlichen Organismus die höchste mRNA-Expression von *ST3GAL1* auf (NCBI). Beide Zelllinien entstammen einem anaplastischen Schilddrüsenkarzinom (ATC) und zeigten im Gegensatz zu den HNSCC-Zelllinien eine Expression aller Gene (Abb. 10). Die Zelllinie HTh7 (n = 4) zeigte von allen analysierten Zelllinien die höchste Expression von *ST3GAL1* (ΔCt 0,2) und eine ebenfalls sehr hohe Expression für *ASAP1* (ΔCt 1,1). *TMEM71_I* (ΔCt 2,5), *TMEM71_II* (ΔCt 2,0), *AARD* (ΔCt 4,0) und *SLA* (ΔCt 3,4) zeigten jeweils eine hohe bis moderate Genexpression. Die Gene *ENPP2_I* (ΔCt -1,0) und *TNFRSF11B* (ΔCt -3,3) wiesen eine überaus starke Expression auf, die sogar höher lag als das Expressionsniveau der Referenzgene. Die Detektion mittels *ENPP2_II* (ΔCt 10,2) lag sehr schwach im Bereich der unteren Nachweisgrenze. In der Zelllinie HTh74 (n = 7) konnte für *ST3GAL1* (ΔCt 2,6) und *ASAP1* (ΔCt 2,4) eine hohe mRNA-Expression gemessen werden. *TMEM71_I* (ΔCt 4,6), *TMEM71_II* (ΔCt 4,3) und *AARD* (ΔCt 5,0) zeigten eine moderate Expressionshöhe. *ENPP2_I* (ΔCt -1,0) wurde in dieser Zelllinie am höchsten und auch oberhalb des Niveaus der endogenen Referenzgene exprimiert. Ein Nachweis mittels *ENPP2_II* war nicht möglich. Die Gene *TNFRSF11B* (ΔCt 6,6) und *SLA* (ΔCt 6,9) wurden nur niedrig exprimiert.

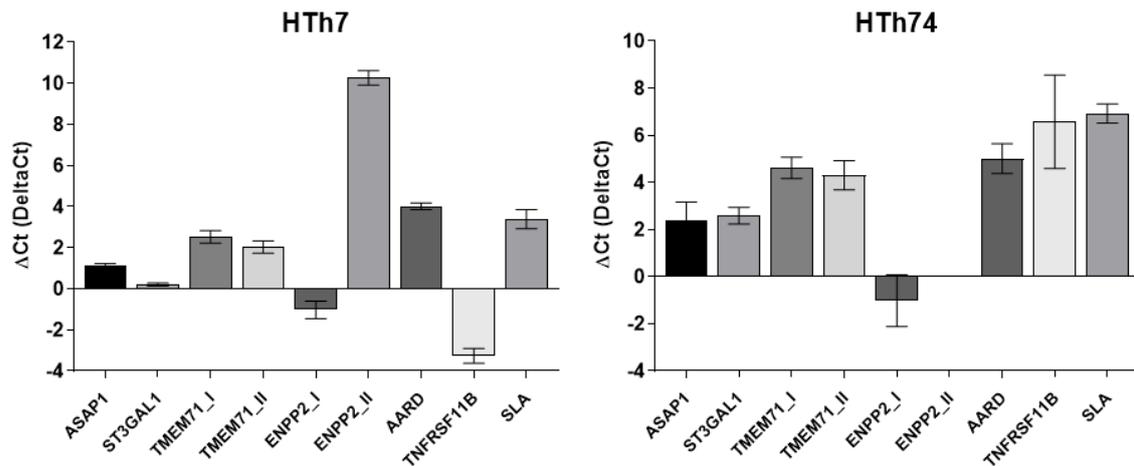


Abb. 10: Genexpressionsanalyse in Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien. Die Balkendiagramme zeigen Mittelwert und Standardabweichung der mRNA-Expression der Zielgene in Relation zu den Referenzgenen HMBS und TBP (Δ Ct). Die Zelllinien wurden in unabhängigen biologischen Replikaten analysiert (HTh7 n = 4; HTh74 n = 7). Ein hoher Δ Ct-Wert entspricht einer niedrigen mRNA-Konzentration. Je niedriger der Δ Ct-Wert ist, desto höher ist die mRNA-Konzentration und folglich die Expression des Gens. Ein Δ Ct-Wert von 0 entspricht der Expressionshöhe der Referenzgene. Kein Balken bedeutet keine Detektion des mRNA-Transkripts. ASAP1 = *ArfGAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain 1*; ST3GAL1 = *ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 1*; TMEM71 = *Transmembrane protein 71*; ENPP2 = *Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2*; AARD = *Alanine and arginine rich domain containing protein*; TNFRSF11B = *Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11b*; SLA = *Src like adaptor*; HMBS = *Hydroxymethylbilane synthase*; TBP = *TATA-box binding protein*; I bzw. II = Primerpaar I bzw. Primerpaar II

3.2 Genexpression von *ST3GAL1* in Abhängigkeit der Zelldichte

Um die Frage zu untersuchen, ob *ST3GAL1* in Abhängigkeit von der Zelldichte und somit der Anzahl an Zell-Zell-Kontakten unterschiedlich exprimiert wird, wurde die Expression des Gens mittels RT-qPCR bei niedriger (30%), moderater (50%) und hoher (80%) Zelldichte analysiert (Abb. 11). Die Durchführung erfolgte wie in 2.2.6 beschrieben. Die Auswahl der gezeigten Zelllinien erfolgte aufgrund ihrer guten Wachstums- und Proliferationseigenschaften unter Zellkulturbedingungen. Die Expressionsanalyse erfolgte in biologischen Triplikaten. Dabei zeigte sich die Expressionshöhe der Referenzgene HMBS und TBP stabil und variierte nicht zwischen den unterschiedlichen Zelldichten und Zeitpunkten. Alle Zelllinien zeigten eine konfluenzabhängig unterschiedliche mRNA-Expression von *ST3GAL1*.

Die Zelllinie UT-SCC 42B präsentierte bei 30% Konfluenz ein gutes Expressionsniveau (Δ Ct 2,9), welches bei 50% Zelldichte deutlich anstieg (Δ Ct 0,5) und im Verlauf bei hoher Zelldichte wieder abnahm (Δ Ct 2,4). Ein ähnliches Expressionsmuster war auch in den anderen Zelllinien zu beobachten. Die UT-SCC 24B exprimierte *ST3GAL1* bei 30% Zelldichte zunächst etwas niedriger (Δ Ct 3,7) im Vergleich zur Zelllinie UT-SCC 42B, bei 50% Zelldichte deutlich höher mit einem Δ Ct-Wert von 1,4 und nach drei Tagen bei 80% Konfluenz des Zellrasens wieder niedriger (Δ Ct 2,8). In der Zelllinie UT-SCC 16B zeigte sich bereits nach 30h bei 30%iger Konfluenz eine hohe Genexpression (Δ Ct 1,8), die am Tag darauf bei 50%

Zelldichte ihren Höhepunkt (ΔCt 1,0) erreichte und bei 80% wieder abfiel. Die Zelllinie UT-SCC 24A zeigte die niedrigste Expression von ST3GAL1 mit einer zu Beginn nur moderaten Expression (ΔCt 4,6), bei 50% höheren (ΔCt 3,1) und bei höherer Konfluenz von 80% wieder deutlich geringeren Expression (ΔCt 5,4).

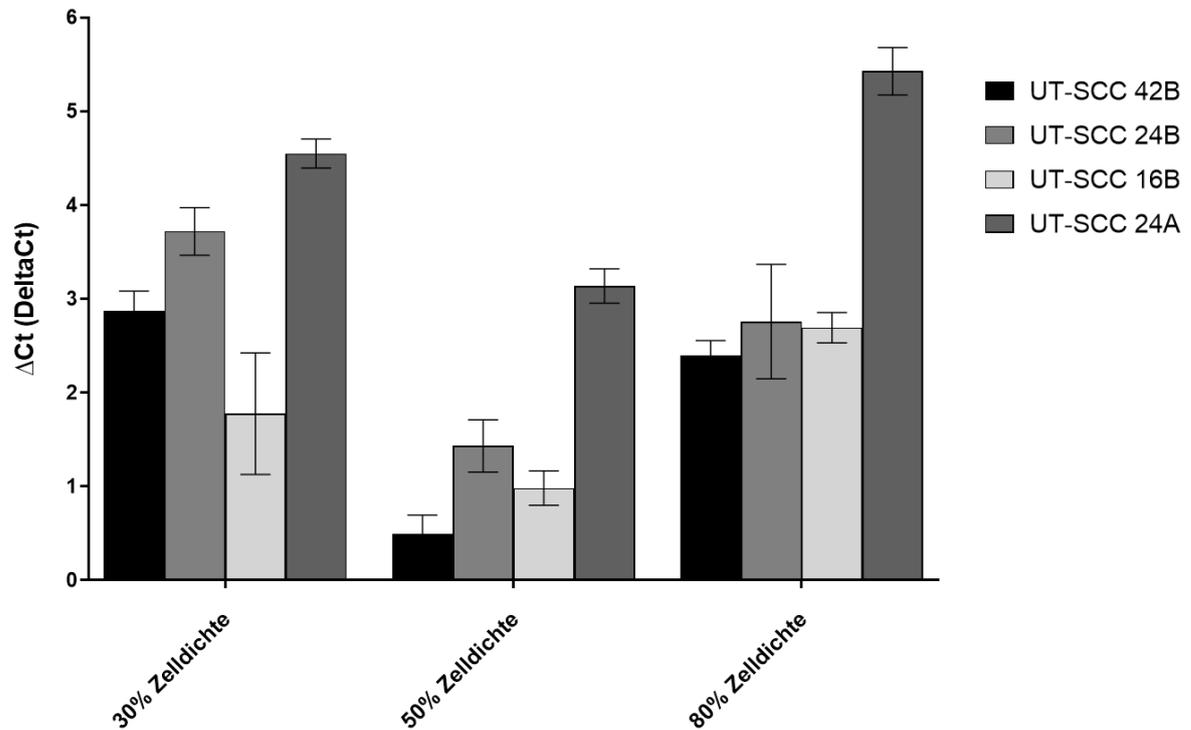


Abb. 11: ST3GAL1 mRNA-Expression in Abhängigkeit der Zelldichte. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung der ST3GAL1 mRNA-Expression in Relation zu den Referenzgenen (ΔCt). Jede Zelllinie wurde in drei unabhängigen biologischen Replikaten analysiert ($n = 3$). Ein hoher ΔCt -Wert entspricht einer niedrigen mRNA-Konzentration. Je niedriger der ΔCt -Wert ist, desto höher ist die mRNA-Konzentration und folglich die ST3GAL1 Expression. Ein ΔCt -Wert von 0 entspricht der Expressionshöhe der Referenzgene. 30% Zelldichte entsprechen der Genexpression 30h nach Aussaat, 50% Zelldichte bestanden 48h und 80% Zelldichte 72h nach Aussaat.

3.3 siRNA-vermittelter *ST3GAL1*-Knockdown

Für die Durchführung funktioneller Experimente zur Untersuchung der biologischen Rolle von *ST3GAL1* im Rahmen metastasierungsrelevanter Eigenschaften wurde die Genexpression siRNA-vermittelt herunterreguliert. Die Zellen der Zelllinie UT-SCC 42B wurden mit einer Verdünnungsreihe von siRNA Konzentrationen transfiziert und die mRNA-Expression mittels RT-qPCR quantifiziert, um eine möglichst geringe siRNA Konzentration mit gleichzeitig hohem *Knockdown*-Effekt zu identifizieren (Abb. 12).

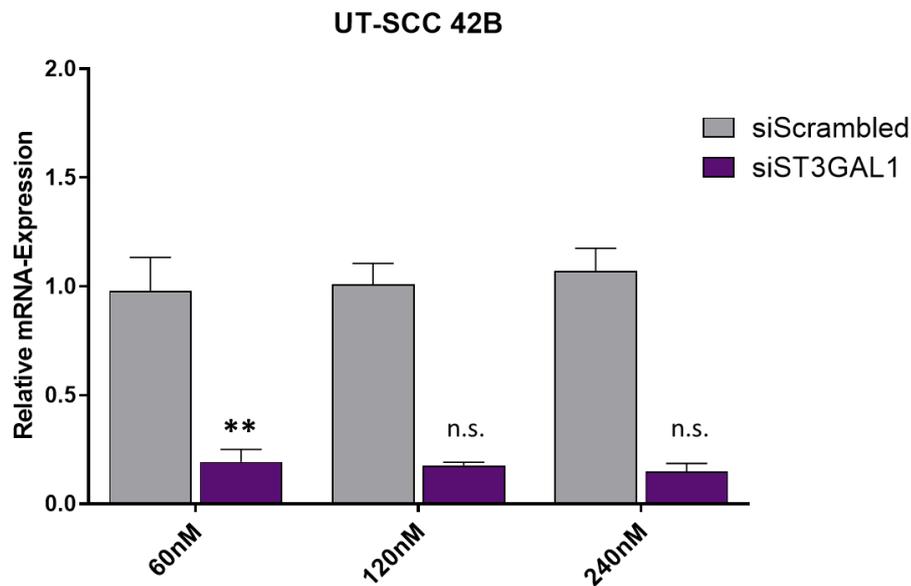


Abb. 12: siRNA-vermittelter *ST3GAL1*-Knockdown. Das Balkendiagramm zeigt den Mittelwert und die Standardabweichung der anhand der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode berechneten relativen mRNA-Expression. Die Erhebung der Daten erfolgte in voneinander unabhängigen biologischen Replikaten (60nM: n = 10; 120nM: n = 3; 240nM: n = 3). Die statistische Auswertung wurde anhand des nicht-parametrischen, gepaarten Wilcoxon-Tests durchgeführt. p-Wert <0,05 = *, <0,01 = **, <0,001 = ***, >0,05 = n.s.

Alle siRNA Konzentrationen zeigten eine deutliche und reproduzierbare Herunterregulierung der Genexpression von *ST3GAL1*. Die Transfektion mit 60nM (n = 10) resultierte in einer 5,2-fach geringeren mRNA-Konzentration auf 19% (p = 0,0019) in Relation zur Negativkontrolle. Mit 120nM (n = 3) ließ sich ein 5,6-facher *Knockdown* auf 18% (p = 0,25) erzielen und die Konzentration von 240nM (n = 3) führte zu einer 6,6-fachen Reduktion der mRNA-Konzentration auf 15% (p = 0,25). Zusammenfassend war bereits mit der niedrigsten siRNA Konzentration eine relevante Suppression der Genexpression möglich. Aus diesem Grund wurden alle weiteren Experimente mit einer siRNA Konzentration von 60nM durchgeführt.

3.3.1 Beginn und zeitliche Stabilität des *ST3GAL1-Knockdowns*

Zur Ermittlung des Beginns und Validierung der zeitlichen Beständigkeit des Gen-*Knockdowns* von *ST3GAL1* auf mRNA-Ebene wurde im Hinblick auf weiterführende Experimente die mRNA-Expression in den ersten drei Tagen nach Transfektion zu drei verschiedenen Zeitpunkten gemessen (Abb. 13).

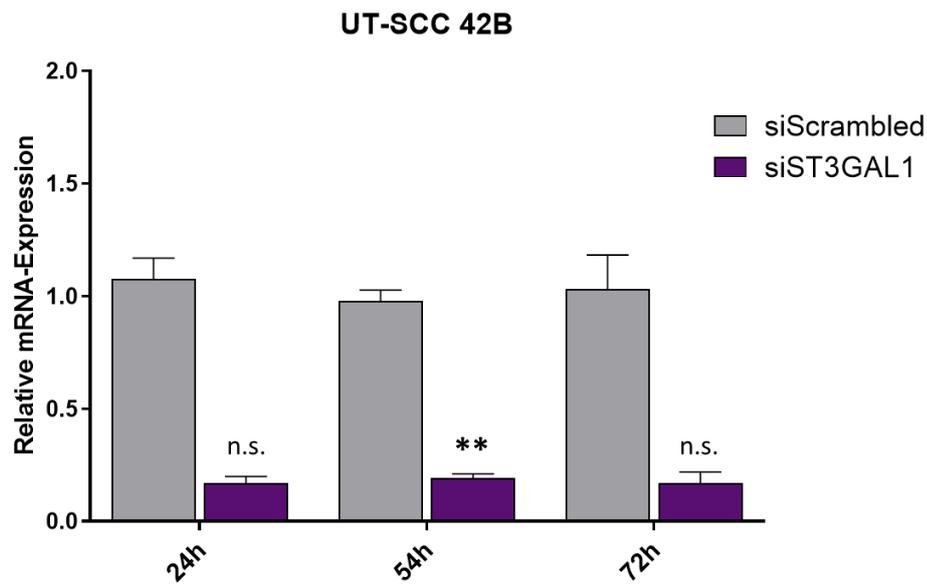


Abb. 13: Beginn und zeitliche Stabilität des *ST3GAL1-Knockdowns*. Das Balkendiagramm zeigt den Mittelwert und die Standardabweichung der anhand der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode berechneten relativen mRNA-Expression. Die Erhebung der Daten erfolgte in unabhängigen biologischen Replikaten (24h: n = 3; 54h: n = 10; 72h: n = 4). Die statistische Auswertung wurde anhand des nicht-parametrischen, gepaarten Wilcoxon-Tests durchgeführt. p-Wert <0,05 = *, <0,01 = **, <0,001 = ***, >0,05 = n.s.

Es zeigte sich, dass bereits bis 24h nach Transfektion in den Zellen eine relevante mRNA-Degradation erfolgte und diese Stilllegung der Genexpression bis mindestens 72h nach Transfektion fortbestand. Im Vergleich zur Negativkontrolle resultierte nach 24h eine 5,9-fache Reduktion der mRNA-Konzentration auf 17% ($p = 0,25$). 54h nach Transfektion zeigte sich ein 5,2-facher *Knockdown* auf 19% ($p = 0,0019$) in Relation zur mit der Negativkontrolle *siScrambled* behandelten Probe. Auch drei Tage nach Transfektion (72h) blieb die *siRNA* vermittelte Herunterregulierung mit einer 5,9-fachen Reduktion der mRNA-Konzentration auf 17% ($p = 0,125$) relevant, jedoch nicht statistisch signifikant.

Zusammenfassend ließ sich durch die vorliegenden Daten zeigen, dass der transiente *Knockdown* mittels *RNAi* bereits früh nach 24h auf mRNA-Ebene seine Wirkung entfaltet und mindestens bis 72h nach Transfektion stabil blieb.

3.3.2 Validierung des *ST3GAL1-Knockdowns* mit neuer siRNA

Da die initial verwendeten siRNAs im Laufe der Laborarbeiten unerwartet nicht mehr vom ursprünglichen Anbieter produziert wurden, musste der *ST3GAL1 Knockdown* für die fortan von Eurofins Genomics bezogenen siRNAs ebenfalls etabliert werden (2.1.3). Die Transfektion der Zelllinien UT-SCC 42B und UT-SCC 24B wurde wie in 2.2.10 und 2.2.11 beschrieben mit einer siRNA Konzentration von 60nM durchgeführt. Die Etablierung des *Knockdowns* erfolgte für jede Zelllinie in drei unabhängigen biologischen Replikaten. In der RT-qPCR-Analyse wurden für jede einzelne Probe technische Triplikate angefertigt (Abb. 14).

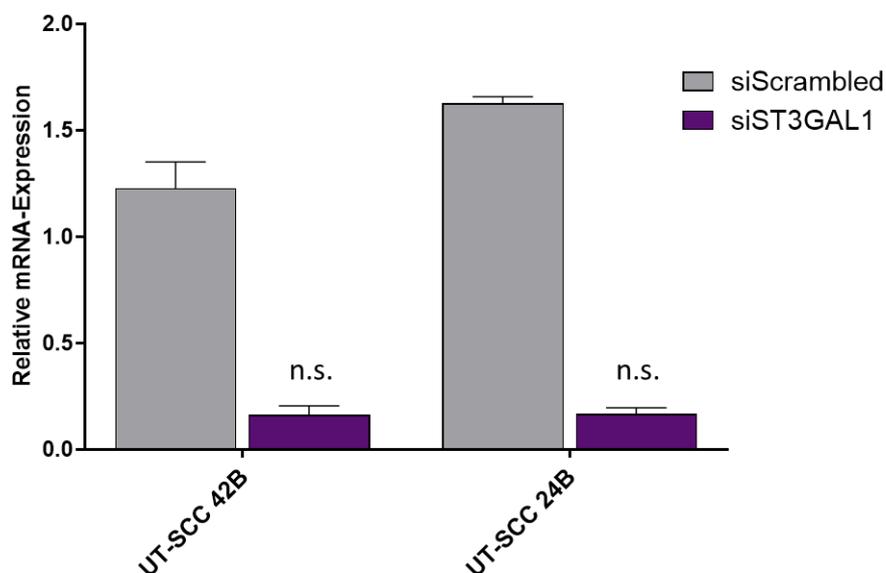


Abb. 14: *ST3GAL1-Knockdown* in den Zelllinien UT-SCC 42B und UT-SCC 24B. Das Balkendiagramm zeigt den Mittelwert und die Standardabweichung der anhand der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode berechneten relativen mRNA-Expression. Für jede Zelllinie wurde der *ST3GAL1 Knockdown* in drei unabhängigen biologischen Replikaten durchgeführt ($n = 3$). Die statistische Auswertung wurde durch den nicht-parametrischen, gepaarten Wilcoxon-Tests durchgeführt. n.s. = nicht signifikant.

In beiden Zelllinien zeigte sich auch mit den neuen siRNAs ein deutliche Herunterregulierung der mRNA-Konzentration. Die Transfektion mit 60nM *siST3GAL1* resultierte in der Zelllinie UT-SCC 42B ($n = 3$) in einer 6,2-fach verminderten mRNA- Konzentration auf 16% ($p = 0,25$) im Vergleich zur Negativkontrolle siScrambled. In der Zelllinie UT-SCC 24B ($n = 3$) führten 60nM *siST3GAL1* zu einer 6-fach erniedrigten mRNA-Konzentration auf 17% ($p = 0,25$).

3.4 Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse

Zur Beschreibung des Einflusses von ST3GAL1 auf zentrale Eigenschaften der Tumorprogression und Metastasierung wurde die Auswirkung auf das Proliferationsverhalten von HNSCC-Zellen in einem ersten Schritt durch die Analyse des Zellzyklus untersucht. Die Zellen wurden zunächst wie in 2.2.10 und 2.2.11 beschrieben transfiziert. In jedem Experiment wurden vier Proben mitgeführt: Unbehandelte Zellen, Zellen, die nur mit dem Transfektionsreagenz behandelt, der Negativkontrolle siScrambled oder siST3GAL1 transfiziert wurden (Abb. 15, Abb. 16, Abb. 17). Zusätzlich wurde stets eine Probe unbehandelter Zellen nicht mit BrdU inkubiert, die als Färbungskontrolle für den Ausschluss einer unspezifischen Antikörperbindung diente (Abb. 8, A). Die Durchführung des BrdU Assays und das Gating der Zellen erfolgte wie in 2.2.19 und 2.2.20 erläutert. Die Transfektion wurde 2019 mit der siRNA der Firma Riboxx (Abb. 12, Abb. 13) und im Jahr 2021 mit der siRNA der Firma Eurofins Genomics durchgeführt (Abb. 14). Der Prozentsatz der Zellen in jedem Gate einer Zellzyklusphase wurde für jede einzelne Probe berechnet und im Folgenden für alle durchgeführten Experimente einer Zelllinie graphisch zusammengefasst. Die Untersuchung der Zelllinie UT-SCC 42B erfolgte 2019 in drei ($n = 3$) und 2021 in zwölf biologischen Replikaten ($n = 12$). Die Zelllinie UT-SCC 24B wurde ebenfalls in zwölf ($n = 12$) biologischen Replikaten untersucht. Bei beiden Zelllinien ließen sich für alle mitgeführten Proben stets Zellen in allen Phasen des Zellzyklus nachweisen.

Die Zelllinie UT-SCC 42B zeigte bereits in der ersten Untersuchung einen Unterschied zwischen mit siST3GAL1 und der Negativkontrolle siScrambled transfizierten Zellen (Abb. 15). Die mit siST3GAL1 transfizierten Zellen wiesen in der G0/G1-Phase eine größere Zellpopulation (68,2%) als die mit siScrambled transfizierten Zellen auf (59,3%). Umgekehrt präsentierten die mit siST3GAL1 transfizierten Zellen in der S-Phase eine kleinere Zellpopulation (2,4%) als in siScrambled (11,9%) detektiert werden konnte. Die unbehandelten- (58,2%) und mit dem Transfektionsreagenz behandelten Zellen (61,9%) unterschieden sich in der G0/G1-Phase nur gering von siScrambled (59,3%) und zeigten im Vergleich zu siST3GAL1 (68,2%) weniger Zellen. In der S-Phase war der prozentuale Anteil in den unbehandelten (4,2%) kleiner als in den mit dem Transfektionsreagenz behandelten Zellen (6,5%). In der G2/M-Phase zeigte siST3GAL1 (21,6%) mehr Zellen als siScrambled (19,8%). Die unbehandelten Zellen zeigten in der G2/M-Phase die größte Population (29,5%), wohingegen die mit dem Transfektionsreagenz behandelten Zellen eine kleinere Zellpopulation

(23,2%) aufwiesen. Die statistische Analyse erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen den erhobenen Messdaten.

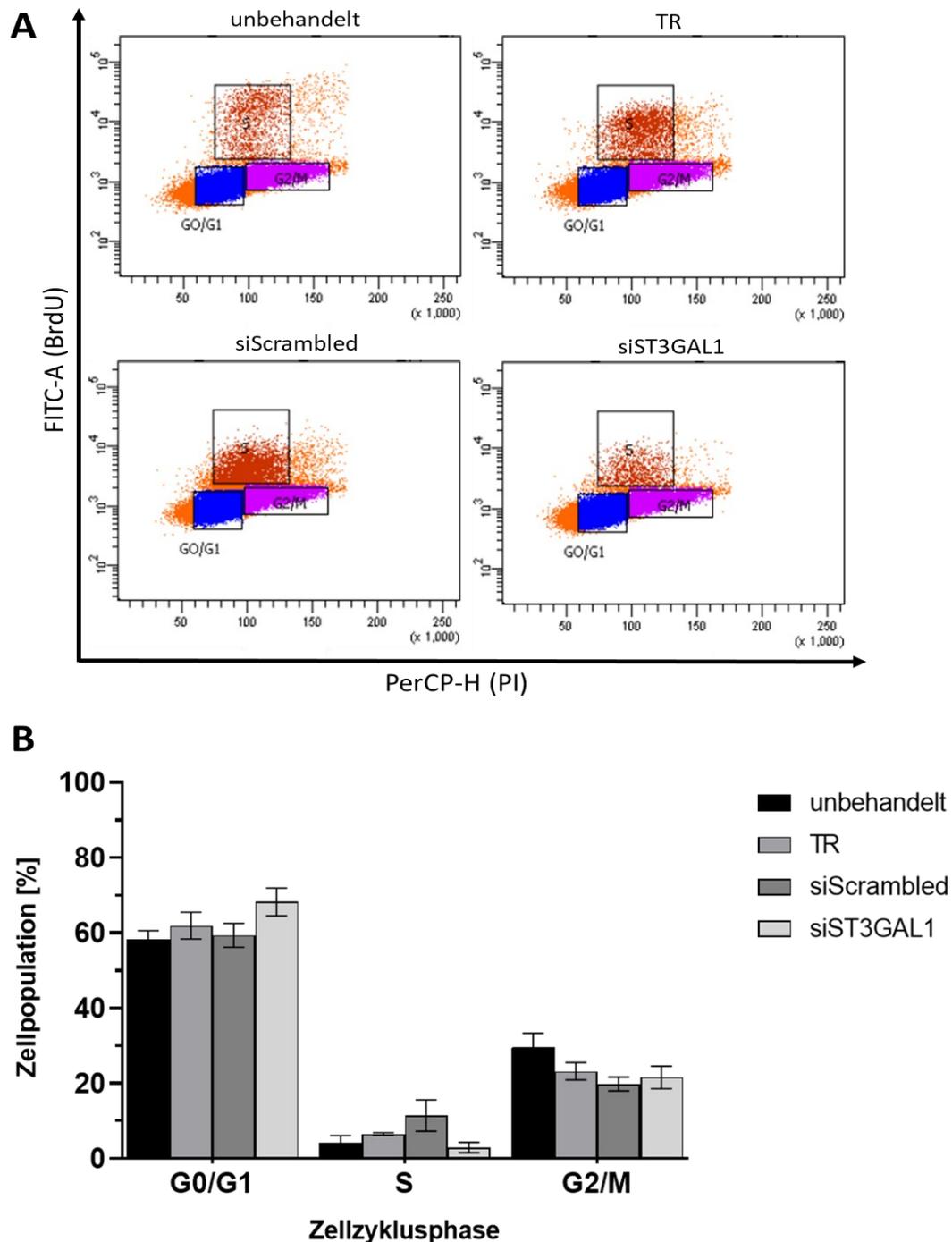


Abb. 15: Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse der UT-SCC 42B (2019). Repräsentatives Ergebnis einer Zellzyklusanalyse ($n = 3$) bestehend aus unbehandelten Zellen, ausschließlich dem Transfektionsreagenz (TR) exponierten-, mit der Negativkontrolle siScrambled oder siST3GAL1 transfizierten Zellen. **(B)** Das Balkendiagramm zeigt den Mittelwert und die Standardabweichung (in Prozent) der jeweiligen Zellzyklusphase (G1/G0, S und G2/M) zugeordneten Zellen. Aus der statistischen Analyse der Daten mit dem gepaarten, nicht-parametrischen Wilcoxon-Test resultierten keine signifikanten Unterschiede.

In der zweiten Untersuchung der Zelllinie UT-SCC 42B zeigten die mit *siST3GALI* transfizierten Zellen (60,9%) in der G0/G1-Phase im Vergleich zu der Negativkontrolle *siScrambled* (54,9%) eine statistisch signifikant ($p = 0,0024$) größere Zellpopulation (Abb. 16). Umgekehrt wiesen die mit *siST3GALI* transfizierten Zellen (35,1%) in der S-Phase signifikant ($p = 0,00048$) weniger Zellen auf als es bei der Negativkontrolle *siScrambled* (41,0%) der Fall war. In der G2/M-Phase wurden in *siST3GALI* (1,4%) ebenfalls signifikant ($p = 0,0048$) weniger Zellen als in *siScrambled* (1,9%) detektiert. Die unbehandelten Zellen präsentierten in der G0/G1-Phase (75,7%) signifikant mehr ($p = 0,00097$) und in der S-Phase signifikant ($p = 0,00097$) weniger Zellen (19,6%) als *siST3GALI* (35,1%). Auch in der G2/M-Phase zeigten sich bei *siST3GALI* (1,4%) im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (4,0%) signifikant ($p = 0,00048$) weniger Zellen. Gleichsam zeigten die unbehandelten Zellen im Gegensatz zu den mit *siScrambled* transfizierten Zellen auch signifikant ($p = 0,00097$) mehr Zellen in der G0/G1-Phase (75,7% und 54,9%), signifikant ($p = 0,00097$) weniger Zellen in der S-Phase (19,6% und 41,0%) und signifikant ($p = 0,00048$) mehr Zellen in der G2/M-Phase (4,0% und 1,9%). Im Vergleich der ausschließlich mit dem Transfektionsreagenz exponierten Zellen und mit den *siScrambled* transfizierten Zellen ergab sich weder in der G0/G1-Phase (57,1% und 54,9%), noch in der S-Phase (38,2% und 41,0%) oder der G2/M-Phase (3,0% und 1,9%) ein statistisch signifikanter Unterschied (jeweils $p > 0,05$). Die mit *siST3GALI* transfizierten Zellen zeigten im Vergleich zu den ausschließlich mit dem Transfektionsreagenz behandelten Zellen auch keine statistisch signifikanten Unterschiede (jeweils $p = > 0,05$).

In der Zelllinie UT-SCC 24B zeigte sich in der G0/G1-Phase bei den mit *siST3GALI* transfizierten Zellen (53,5%) eine signifikant ($p = 0,00048$) größere Zellpopulation als in der Negativkontrolle *siScrambled* (42,3%) (Abb. 17). Umgekehrt zeigte sich in der S-Phase eine statistisch signifikante Reduktion ($p = 0,00048$) der Zellpopulation in den mit *siST3GALI* transfizierten Zellen (31,4%) im Vergleich zu den mit *siScrambled* transfizierten Zellen (43,1%). In der G2/M-Phase waren in den mit *siScrambled* transfizierten Zellen (11,4%) signifikant ($p = 0,035$) weniger Zellen als in *siST3GALI* (11,9%). Die unbehandelten Zellen wiesen im Vergleich zu *siST3GALI* weder in der G0/G1-Phase (54,3% und 53,5%), noch in der S-Phase (30,9% und 31,4%) oder G2/M-Phase einen statistisch signifikanten Unterschied auf (jeweils $p > 0,05$). Verglichen mit *siScrambled* wurden bei den unbehandelten Zellen in der G0/G1-Phase signifikant ($p = 0,01$) mehr Zellen (54,3% und 42,3%), in der S-Phase signifikant ($p = 0,01$) weniger Zellen (30,9% und 43,1%) und in der G2/M-Phase ebenfalls signifikant ($p = 0,02$) mehr Zellen (12,9% und 11,4%) detektiert. Zwischen *siST3GALI* und den Zellen,

welche nur mit dem Transfektionsreagenz behandelt wurden, ergab die statistische Analyse ebenfalls weder in der G0/G1-Phase (53,5% und 55,6%), noch in der S-Phase (31,4% und 27,4%) oder der G2/M-Phase (11,9% und 14,8%) einen signifikanten Unterschied (jeweils $p > 0,05$). Im Vergleich der unbehandelten Zellen (54,3%) zu den ausschließlich dem Transfektionsreagenz exponierten Zellen (55,6%) ergab sich in der G0/G1-Phase kein signifikanter Unterschied ($p = 0,1064$). In der S-Phase zeigten die unbehandelten Zellen (30,9%) eine signifikant ($p = 0,0024$) größere Population als die dem Transfektionsreagenz exponierten Zellen (27,4%) und in der G2/M-Phase eine signifikant ($p = 0,0009$) kleinere Population (12,9% und 14,8%).

Zusammenfassend resultierte aus der siRNA vermittelten Suppression von ST3GAL1 in beiden Zelllinien im Vergleich zur Negativkontrolle eine signifikante Reduktion der Zellpopulation in der S-Phase und gleichzeitig eine signifikante Zunahme der Zellen in der G0/G1-Phase.

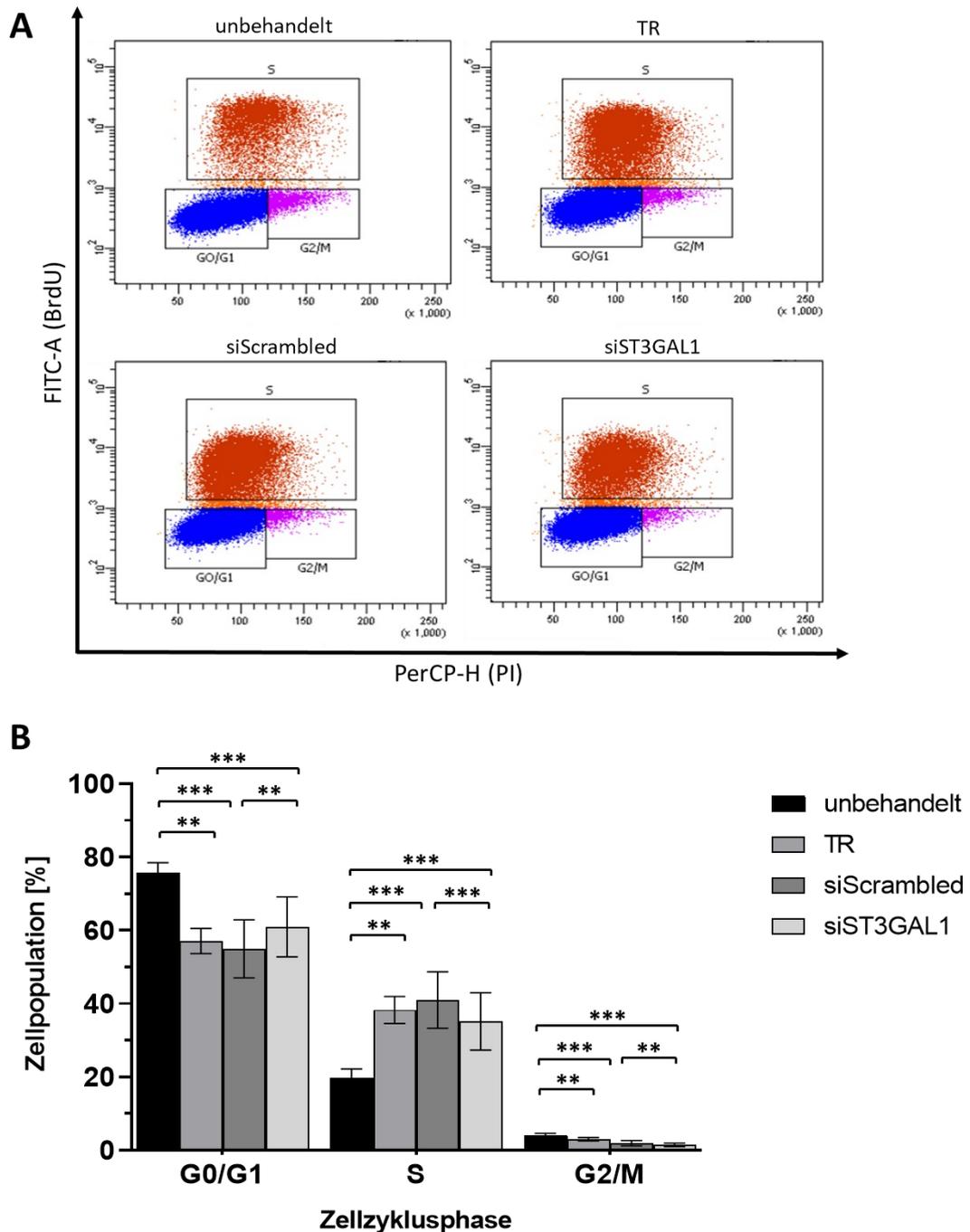


Abb. 16: Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse der UT-SCC 42B (2021). (A) Repräsentatives Ergebnis einer Zellzyklusanalyse (n = 12) mit unbehandelten Zellen, ausschließlich dem Transfektionsreagenz (TR) exponierten-, mit der Negativkontrolle siScrambled oder siST3GAL1 transfizierten Zellen. (B) Das Balkendiagramm zeigt den Mittelwert und die Standardabweichung (in Prozent) der jeweiligen Zellzyklusphase (G1/G0, S und G2/M) zugeordneten Zellen. Die statistische Analyse erfolgte mit dem gepaarten, nicht-parametrischen Wilcoxon-Test. p-Wert <0,05 = *, <0,01 = **, <0,001 = ***

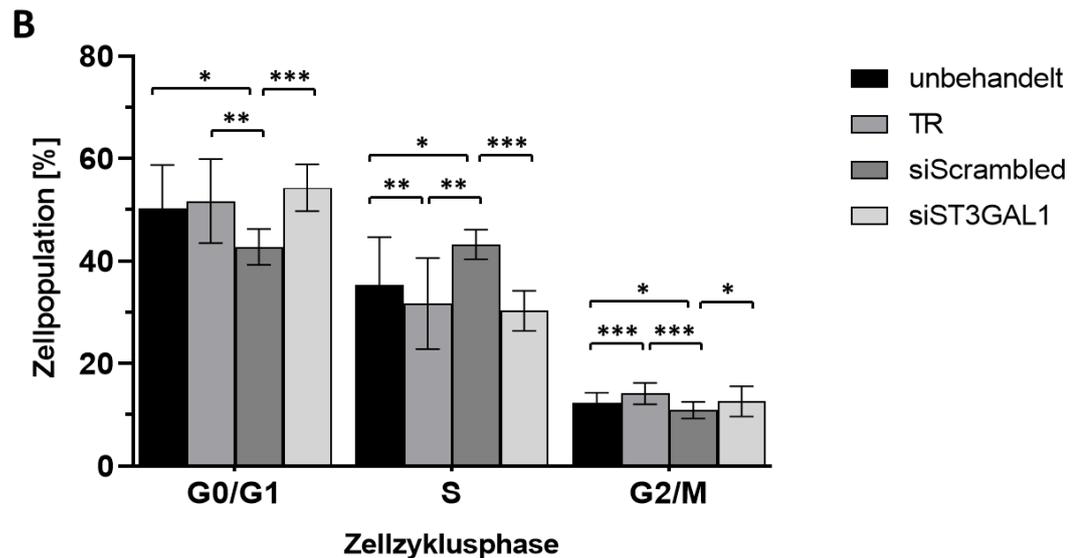
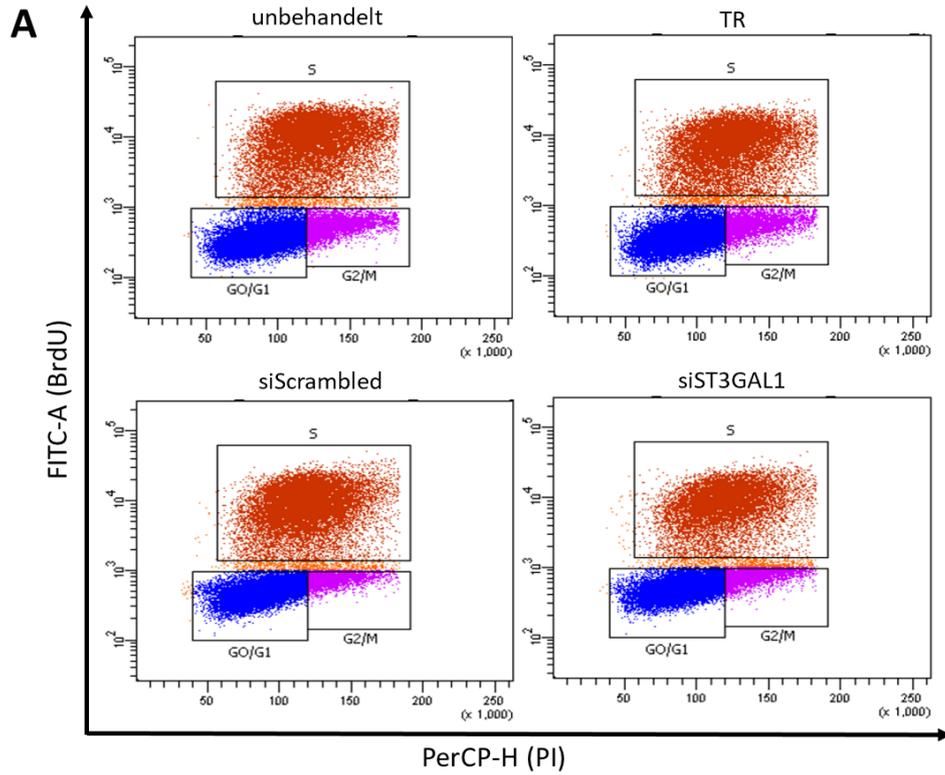


Abb. 17: Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse der UT-SCC 24B (2021). Repräsentatives Ergebnis einer Zellzyklusanalyse (n = 12) mit unbehandelten Zellen, ausschließlich dem Transfektionsreagenz (TR) exponierten-, mit der Negativkontrolle siScrambled oder siST3GAL1 transfizierten Zellen. **(B)** Das Balkendiagramm zeigt den Mittelwert und die Standardabweichung (in Prozent) der jeweiligen Zellzyklusphase (G1/G0, S und G2/M) zugeordneten Zellen. Die statistische Analyse erfolgte mit dem gepaarten, nicht-parametrischen Wilcoxon-Test. p-Wert <0,05 = *, <0,01 = **, <0,001 = ***

3.5 Populationsverdopplungszeit

Im Anschluss an die Zellzyklusanalyse folgte die Analyse der zelllinienspezifischen Proliferationseigenschaften, um in einem zweiten Schritt den Einfluss von ST3GAL1 auf die Entwicklung der absoluten Zellzahl zu untersuchen (3.6). Hierfür wurde die Populationsverdopplungszeit der Zelllinien UT-SCC 42B und UT-SCC 24B unter normalen Zellkulturbedingungen ermittelt. Dies erfolgte in je drei biologischen Replikaten ($n = 3$). Die Zellen wurden so ausgesät, dass 24h nach Aussaat eine Konfluenz von 30% der Wachstumsfläche erreicht wurde (2.2.7). Additiv zur Bestimmung der Zellzahl wurde jeden Tag die Entwicklung des Zellrasens an repräsentativen Stellen lichtmikroskopisch fotodokumentiert (Abb. 18).

Die Zelllinie UT-SCC 42B zeigte nach 24h morphologisch vollständig entwickelte Zellen, die ab diesem Zeitpunkt ($0,217 \times 10^6$ Zellen) innerhalb weiterer 24h ihre Zellzahl bis zum Folgetag (48h) mehr als verdoppelten ($0,466 \times 10^6$ Zellen). Dieses Proliferationspotential blieb über die Zeitpunkte 72h ($1,006 \times 10^6$) und 96h ($1,908 \times 10^6$) erhalten. Nach 96h zeigte sich das 6-Well vollständig mit Zellen übersät.

Die Zelllinie UT-SCC 24B zeigte auch nach 24h Inkubationszeit morphologisch vollständig ausgereifte Zellen ($0,311 \times 10^6$ Zellen). Nach 48h hatte sich die Zellpopulation im Vergleich zum Vortag ebenfalls bereits mehr als verdoppelt ($0,632 \times 10^6$ Zellen). Die Verdopplung der Zellzahl setzte sich bis 72h ($1,146 \times 10^6$ Zellen) und 96h ($2,128 \times 10^6$ Zellen) fort. Nach 96h zeigte sich das 6-Well vollständig mit Zellen übersät.

Zusammenfassend zeigten beide Zelllinien bereits nach 24h in Zellkultur das Potenzial ihre Population innerhalb von je weiteren 24h zu verdoppeln und diese Kapazität für mindestens 96h unter normalen Zellkulturbedingungen aufrecht zu erhalten. Der limitierende Faktor bestand in der begrenzten Wachstumsfläche der verwendeten 6-Well-Platten.

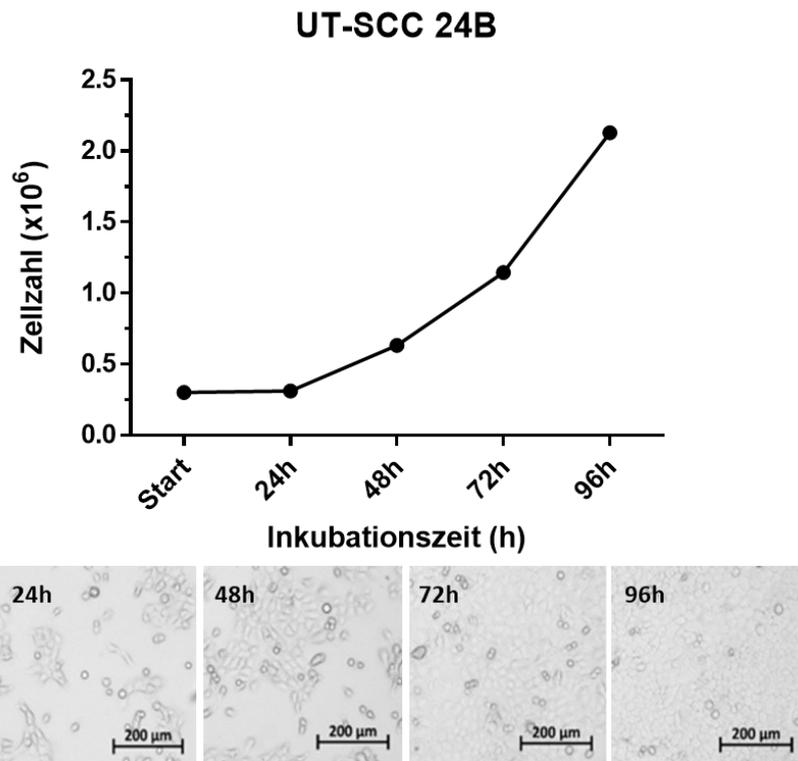
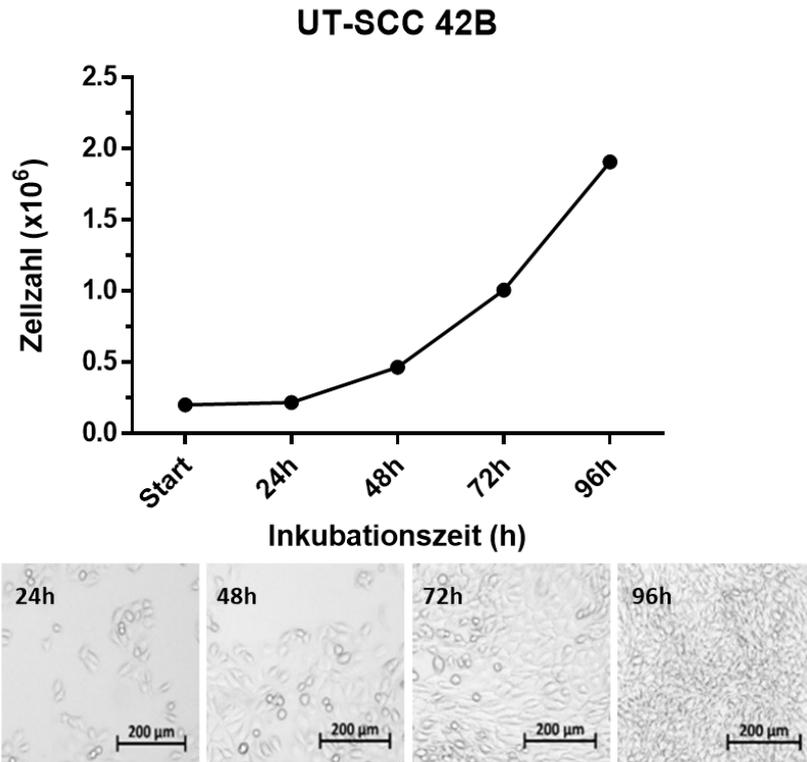


Abb. 18: Absolute Proliferation der Zelllinien UT-SCC 42B und UT-SCC 24B über 96h. Entwicklung der absoluten Zellzahl über einen Zeitraum von vier Tagen (24h bis 96h) unter normalen Zellkulturbedingungen. Oben: UT-SCC 42B (n = 3) mit je einem repräsentativen Foto der täglichen Entwicklung des Zellrasens. Unten: UT-SCC 24B (n = 3) mit je einem repräsentativen Foto der täglichen Entwicklung des Zellrasens. Die Punkte repräsentieren den Mittelwert von drei biologischen Replikaten.

3.6 Der Einfluss von ST3GAL1 auf die Zellproliferation

Die durchflusszytometrischen Zellzyklusanalysen wiesen darauf hin, dass die Suppression von *ST3GAL1* einen negativen Effekt auf die Zellzyklusaktivität und folglich die Proliferationskapazität der Zelllinien hat. Daher sollten diese Ergebnisse mit der Untersuchung der absoluten Zellproliferation bestätigt werden. Dazu wurden unbehandelte Zellen, mit der Negativkontrolle siScrambled und siST3GAL1 transfizierte Zellen (Abb. 19) verwendet. Zur Transfektion (TF) wurden die in 2.2.10 und 2.2.11 beschriebenen Methoden eingesetzt. Zur Sicherstellung der praktischen Genauigkeit und zum Ausschluss von technischen Ausreißern wurde jede Probe in Quadrupeln mitgeführt. Die händische Auszählung der Zellen erfolgte wie in 2.2.3 beschrieben.

In der Zelllinie UT-SCC 42B ($n = 3$) zeigte sich zum Zeitpunkt der Transfektion verglichen zur initialen Aussaat der Zellen (Start) eine stabile Zellzahl ($5,10 \times 10^5$). 24h nach Transfektion nahm die Zellzahl bei den unbehandelten Zellen ($5,40 \times 10^5$), siScrambled ($5,54 \times 10^5$) und siST3GAL1 ($5,53 \times 10^5$) ohne relevante Differenz gleichsam zu. Zwei Tage (48h) nach Transfektion fiel die Zellzahl bei den mit siST3GAL1 transfizierten Zellen ($5,05 \times 10^5$) erstmalig im Vergleich zu siScrambled ($5,37 \times 10^5$) und den unbehandelten Zellen ($5,45 \times 10^5$) ab. Nach 72h verringerte sich die Zellzahl der mit siST3GAL1 transfizierten Zellen weiter ($4,77 \times 10^5$) unter das Niveau der mit siScrambled transfizierten- ($5,12 \times 10^5$) und unbehandelten Zellen ($5,08 \times 10^5$).

Bei der Zelllinie UT-SCC 24B ($n = 6$) ergab sich zum Zeitpunkt der Transfektion verglichen zur initialen Zellaussaat (Start) eine leichte Zunahme der Zellzahl ($0,65 \times 10^6$). Nach 24h zeigte sich bei den mit siST3GAL1 transfizierten Zellen ($0,506 \times 10^6$) eine deutlich verringerte Zellzahl im Vergleich zu der Negativkontrolle siScrambled ($0,562 \times 10^6$), welcher statistisch signifikant war ($p = 0,031$). Auch im Vergleich zu den unbehandelten Zellen ($0,590 \times 10^6$) zeigte siST3GAL1 ($0,506 \times 10^6$) nach 24h weniger Zellen, was in der statistischen Auswertung keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,156$) ergab. 48h nach Transfektion wiesen die mit siST3GAL1 transfizierten Zellen ($0,427 \times 10^6$) erneut signifikant ($p = 0,015$) weniger Zellen als siScrambled ($0,491 \times 10^6$) auf. Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen ($0,606 \times 10^6$) war die Zellzahl der mit siST3GAL1 transfizierten Zellen ebenfalls signifikant ($p = 0,015$) vermindert. Am dritten Tag nach Transfektion (72h) setzte sich diese Entwicklung fort. Die Zellzahl der mittels siST3GAL1 transfizierten Zellen ($0,494 \times 10^6$) war sowohl im Vergleich zu den mit siScrambled transfizierten Zellen ($0,558 \times 10^6$) signifikant ($p = 0,015$) vermindert als auch im Vergleich zu den unbehandelten Zellen ($1,174 \times 10^6$) signifikant ($p = 0,015$) erniedrigt.

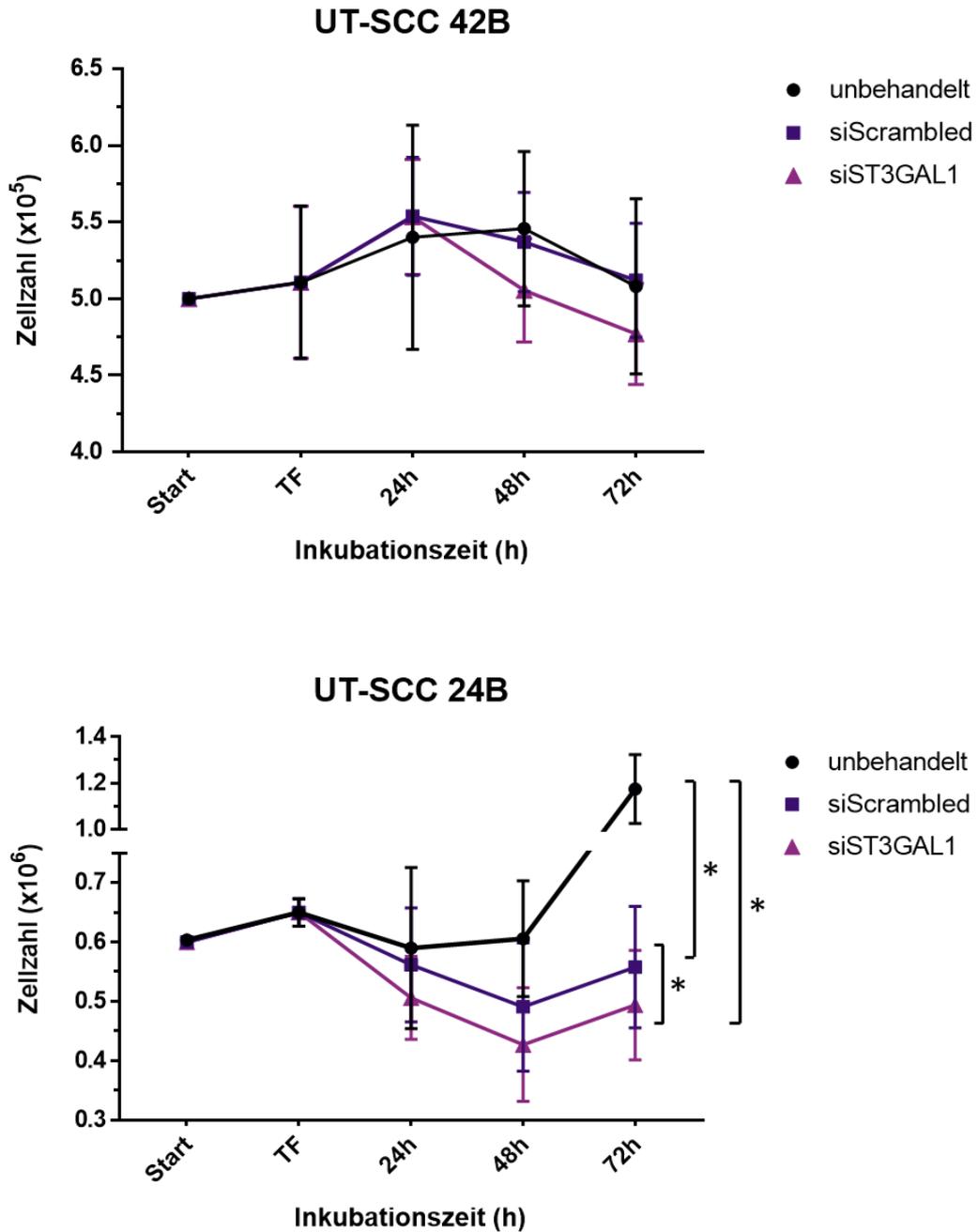


Abb. 19: Der Einfluss von ST3GAL1 auf die Zellproliferation. Dargestellt sind die absoluten Zellzahlen der Zelllinien UT-SCC 42B (n = 3) und UT-SCC 24B (n = 6) jeweils als unbehandelte Zellen (Punkt, schwarz), mit siScrambled transfizierte Zellen (Quadrat, dunkelviolet) und mit siST3GAL1 transfizierte Zellen (Dreieck, hellviolett) im Verlauf ihres Wachstums über 72h. Die Symbole repräsentieren den Mittelwert und die Fehlerbalken die Standardabweichung. Start = Tag der Aussaat. TF = Transfektion 24h nach Aussaat. Die statistische Analyse wurde mit dem gepaarten, nicht-parametrischen Wilcoxon-Test durchgeführt. p-Wert <0,05 = *, <0,01 = **, <0,001 = ***

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst in ausgewählten HNSCC-Zelllinien eine Genexpressionsanalyse der Kandidatengene *ASAP1*, *ST3GAL1*, *TMEM71*, *ENPP2*, *TNFRSF11B*, *AARD* und *SLA* durchgeführt, um geeignete Zelllinien mit einer hohen Expression für weiterführende funktionelle Experimente zu identifizieren. Da die Genexpression jedoch entgegen der Erwartung insgesamt deutlich niedriger ausgeprägt war, wurden zusätzlich die Schilddrüsenkarzinomzelllinien HTh7 und HTh74 im Sinne einer Positivkontrolle für die Expression von *ST3GAL1* und der verwendeten Primer analysiert. Laut des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) in den USA weist das humane Schilddrüsengewebe die höchste Expression von *ST3GAL1* auf. In einem nächsten Schritt wurde anhand der Zelllinien UT-SCC 42B, UT-SCC 24B, UT-SCC 16B und UT-SCC 24A untersucht, ob *ST3GAL1* in Abhängigkeit von der Zelldichte unterschiedlich exprimiert wird. Für die anschließende Untersuchung der biologischen Funktion von *ST3GAL1* konnte in den Zelllinien UT-SCC 42B und UT-SCC 24B durch siRNA-vermittelten *Gen-Knockdown* erfolgreich eine Suppression von *ST3GAL1* etabliert werden, die auf mRNA-Expressionsebene durch RT-qPCR-Analyse validiert wurde. Die durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse zeigte in beiden Zelllinien in den mit si*ST3GAL1* transfizierten Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle eine sowohl statistisch signifikante Reduktion der Zellpopulation in der S-Phase des Zellzyklus als auch eine statistisch signifikante Zunahme der Zellen in der G0/G1-Phase. In einem zweiten Schritt wurde zunächst die Populationsverdopplungszeit der Zelllinien UT-SCC 42B und UT-SCC 24B unter normalen Zellkulturbedingungen und im Anschluss unter *ST3GAL1-Knockdown* bestimmt. Konsekutiv zur Zellzyklusanalyse zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der Proliferationsdynamik. Die supprimierte Genexpression von *ST3GAL1* führte in beiden Zelllinien zu einer signifikanten Reduktion der absoluten Proliferation im Vergleich zur Negativkontrolle si*Scrambled* und den unbehandelten Zellen.

4.1 Expression metastasierungsrelevanter Gene in HNSCC- und Schilddrüsenkarzinomzellen

Das erste Ziel dieser Arbeit war es die Expression der Kandidatengene *ASAP1*, *ST3GAL1*, *TMEM71*, *ENPP2*, *TNFRSF11B*, *AARD* und *SLA* in ausgewählten HNSCC-Zelllinien, die von Primärtumoren (A) und autologen Lymphknotenmetastasen (B) stammen, mittels RT-qPCR zu analysieren (3.1 Abb. 9). Hierbei zeichnete sich ein sehr heterogenes Bild. *TMEM71* und

ENPP2 wurden durch je zwei Primerpaare analysiert, die unterschiedliche mRNA-Transkriptvarianten detektieren. Dabei zeigten *TMEM71_I* und *TMEM71_II* eine nahezu identische Expression, wohingegen *ENPP2_I* und *ENPP2_II* einen deutlichen Unterschied offenbarten. Schließlich konnte anhand der Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien HTh7 und HTh74 der Assay für *ST3GALI* und alle weiteren verwendeten Primer und Sonden validiert werden (Abb. 10).

Die Zelllinien UT-SCC 16A, UT-SCC 16B, UM-SCC 22A, UT-SCC 24A und UT-SCC 24B zeigten eine vergleichbare Expression von *ASAPI* um einen ΔCt -Wert von 2,0. In den Zelllinien UM-SCC 22B (ΔCt 0,2) und UT-SCC 42B (ΔCt 1,2) war die Expression im Vergleich um das 2- bis 4-fache erhöht. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass *ASAPI* in Lymphknotenmetastasen höher exprimiert wird und somit im HNSCC eine Rolle bei der Ausbildung von Metastasen spielt. In der Vergangenheit wurde bereits gezeigt, dass *ASAPI* die Zellmotilität, Invasivität und Adhäsion stimuliert und die Metastasenbildung fördert (Lin et al., 2008, Müller et al., 2010, Li et al., 2014). Auch die AG Stoecklein konnte anhand der Zelllinie UM-SCC 22B in einem *wound healing assay* demonstrieren, dass *ASAPI* die Migrationsfähigkeit positiv beeinflusst (Behrens, 2015). Dies wird durch aktuellere Daten gestützt, die in Ovarialkarzinomzellen einen fördernden Effekt von *ASAPI* auf die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) zeigen (Zhang et al., 2018) und beim Magenkarzinom die erhöhte Expression von *ASAPI* mit tieferer Invasivität, Lymphknotenmetastasierung und einer schlechteren Prognose einhergeht (Luo et al., 2020).

Das Zielgen *ST3GALI* wurde in allen Zelllinien exprimiert, jedoch am höchsten in den Zelllinien UT-SCC 16A (ΔCt 1,2) und UT-SCC 16B (ΔCt 1,7). Dies deutet auf eine deutlich erhöhte Expression hin, da dies dem Niveau der Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien HTh7 (ΔCt 0,2) und HTh74 (ΔCt 2,6) entsprach. Interessant war die 8-fach höhere mRNA-Expression von *ST3GALI* in der UM-SCC 22B (ΔCt 2,9) im Vergleich zur korrespondierenden Primärtumorzelllinie UM-SCC 22A (ΔCt 6,1), weil die UM-SCC 22B gleichzeitig eine höhere Expression von *ASAPI* (ΔCt 0,2) zeigte. Ein vergleichbares Muster zwischen den A und B Zelllinien konnte in weiteren Zelllinien jedoch nicht festgestellt werden. Die UT-SCC 24A (ΔCt 3,6) zeigte eine 2-fach höhere Expression als die UT-SCC 24B (ΔCt 4,6) und das oben beschriebene Expressionsniveau zwischen den Zelllinien UT-SCC 16A und UT-SCC 16B zeigten auch die gegenteilige Tendenz. Dennoch bleibt die Zelllinie UM-SCC 22B für Transfektionsexperimente interessant (siehe 4.3).

Für die Expressionsanalyse von *TMEM71* wurden die Primerpaare *TMEM71_I* und *TMEM71_II* verwendet. Das Gen besitzt 13 validierte mRNA-Transkriptvarianten (NCBI), wobei *TMEM71_I* die Transkriptvariante 1 und *TMEM71_II* die Transkriptvariante 2 detektiert. Anhand unserer Expressionsanalyse ließ sich in den ausgewählten Zelllinien kein Unterschied in der Expression der Transkriptvarianten 1 und 2 zeigen. Folglich läge die Expressionsstärke mit einem Primerpaar, das beide Transkriptvarianten adressiert, doppelt so hoch. Unter den Zelllinien wies interessanterweise die UT-SCC 16B (ΔCt 2,0 und 2,0) eine 8-fach höhere Expression von *TMEM71* auf als die Zelllinie UT-SCC 16A (ΔCt 4,8 und 5,0), was ein Hinweis auf eine erhöhte Expression in Lymphknotenmetastasen sein könnte. Dieser Unterschied ließ sich in der Analyse der weiteren Zelllinien allerdings nicht bestätigen. Die Zelllinien UM-SCC 22B (ΔCt 9,1 und 10,3) und UT-SCC 42B (ΔCt 7,4 und 7,8) exprimierten das Gen sogar deutlich niedriger. In der Literatur ist bis heute sehr wenig über die Rolle von *TMEM71* in Krebs bekannt. Eine Arbeitsgruppe aus China adressierte die Rolle des Gens im Gliom und Glioblastom im Rahmen einer Datenbankanalyse. Sie konnten zeigen, dass *TMEM71* in Gliom Stammzellen und in Temozolomid resistenten Zellen hoch exprimiert wird. Außerdem wiesen sie neben einer erhöhten Zellproliferation und -migration eine enge Assoziation zwischen der *TMEM71*-Expression und der Dichte an PD-1, PD-L1, TIM-3 (*T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3*) und B7-H3 (*B7 homolog 3 protein*) nach, was in direktem Zusammenhang mit der Qualität der Immunantwort und Elimination von Krebszellen steht (Wang et al., 2019a). Besonders interessant war, dass die Autoren neben *TMEM71* das Gen *FUT7* als statistisch signifikant mit dem Überleben assoziiert identifizierten. *FUT7* kodiert für die Fucosyltransferase 7, ein Enzym des Golgi-Apparats, das die Fucosylierung in der Synthese von Sialyl-Lewis^x katalysiert (siehe 1.6) und somit, wie *ST3GAL1* eine elementare Rolle in der posttranslationalen Modifikation von Glykoproteinen der Zelloberfläche spielt. *FUT7* wurde bereits in diversen Publikationen als wichtiger Treiber der Tumorprogression, Zellproliferation, EMT, Migration und Invasion beschrieben (Li et al., 2010, Liang et al., 2017, Wang et al., 2017, Li et al., 2018, Qin et al., 2020). Das Zusammenspiel dieser Gene könnte in der Folge durch komplexe Veränderungen der Zelloberfläche einen möglicherweise multiplizierenden Effekt auf metastasierungsrelevante Eigenschaften und Funktionen haben.

Für die Genexpressionsanalyse von *ENPP2* wurden ebenfalls zwei Primerpaare verwendet. *ENPP2* besitzt 4 identifizierte mRNA-Transkriptvarianten (NCBI). *ENPP2_I* detektiert die Varianten 1, 2, 3 und 5, wohingegen *ENPP2_II* nur die Transkriptvarianten 3 und 5 nachweist.

Die erhobenen Daten zeigen, dass die verwendeten Zelllinien nahezu ausschließlich die Transkriptvarianten 1 und 2 exprimieren, da durch *ENPP2_II* allein in den Zelllinien UM-SCC 22A ($\Delta\text{Ct } 7,5$) und HTh7 ($\Delta\text{Ct } 10,2$) eine Genexpression nachgewiesen werden konnte. Auffällig war, dass in diesen Zelllinien gleichzeitig mittels *ENPP2_I* die höchste Expression für *ENPP2* auf dem Niveau (UT-SCC 22A, $\Delta\text{Ct } 0,5$) und sogar oberhalb des Niveaus der endogenen Referenzgene (HTh7 $\Delta\text{Ct } -1,0$) gemessen werden konnte. Eine mögliche Schlussfolgerung wäre, dass die Transkriptvarianten 3 und 5 erst bei einer sehr hohen Expression des Gens gebildet werden. Dagegen spricht die fehlende Expression von *ENPP2_II* in der Zelllinie HTh74, die *ENPP2_I* ($\Delta\text{Ct } -1,0$) ebenfalls am höchsten exprimierte.

ENPP2 kodiert für Autotaxin, ein sezerniertes Enzym mit Lysophospholipase D Aktivität, das die Konversion von Lysophosphatidylcholin zu Lipophosphatidsäure (LPA) katalysiert. LPAs gehören zur Gruppe der Phospholipide und sind essenzieller Grundbaustein der Zellmembran.

AARD wurde neben den Schilddrüsenkarzinomzellen ausschließlich in den Metastasen-Zelllinien UT-SCC 16B, UM-SCC 22B und UT-SCC 42B exprimiert. Trotz der moderaten bis sehr niedrigen Expression mit ΔCt -Werten zwischen 4 und 9 ist dies äußerst interessant, weil *AARD* laut NCBI nahezu ausschließlich im Hoden, der Lunge und dem Ösophagus exprimiert wird. Das Gen kodiert für ein Protein mit einer Alanin und Arginin reichen Domäne, dessen Funktion noch unbekannt ist. Es wird im Rahmen der Gonadenentwicklung von Mäusen beschrieben (Svingen et al., 2007), wo es in den Sertoli-Zellen in Abhängigkeit des Alters und Androgenrezeptors exprimiert wird (Geng et al., 2017). Außerdem wird *AARD* eine Funktion in der Lungenentwicklung zugeschrieben (NCBI). Über die Rolle von *AARD* im Hinblick auf Krebserkrankungen ist bis zum Verfassen dieser Doktorarbeit noch nichts veröffentlicht.

TNFRSF11B wurde in nahezu allen Zelllinien exprimiert mit einer im Vergleich erhöhten Expression in den Zelllinien UT-SCC 24B ($\Delta\text{Ct } 3,6$) und UT-SCC 16B ($\Delta\text{Ct } 4,0$) und einer besonders starken Expression in der Zelllinie UT-SCC 16A ($\Delta\text{Ct } 0,1$). Die Schilddrüsenkarzinomzellen der HTh7 ($\Delta\text{Ct } -3,3$) zeigten eine Überexpression, wohingegen in der HTh74 ($\Delta\text{Ct } 6,6$) das Gen nur sehr schwach detektiert werden konnte. Letzteres ist bemerkenswert, weil laut NCBI die Schilddrüse unter allen Organen und Geweben mit großem Abstand die höchste Expression von *TNFRSF11B* besitzt, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass das Gen in dieser herunterreguliert ist. Interessanterweise konnte neben der Entdeckung der AG Stoecklein im HNSCC auch im Magenkarzinom eine Amplifikation der 8q24-Region nachgewiesen werden, die mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert war und explizit

die Zugewinne der Gene *MYC* und *TNFRSF11B* als unabhängige prognostische Indikatoren identifiziert wurden (Wang et al., 2016). Sakuma et al. identifizierten in der 5'UTR Promotorregion von *ST3GALI* potenzielle Bindungsstellen für MYC (Sakuma et al., 2012). *MYC* ist eines der 46 Gene, die in den Vorarbeiten der AG Stoecklein in der in Metastasenzellen signifikant häufiger zugewonnen chromosomalen Region identifiziert worden war (8q24.11-8q24.23) und befindet sich folglich in direkter Nachbarschaft zu den in dieser Arbeit adressierten Kandidatengenen. Die Dysregulation von *TNFRSF11B* besitzt auch prognostische Relevanz im Mammakarzinom (Luo et al., 2017). Außerdem aktiviert *TNFRSF11B* den Wnt/ β -Catenin Signalweg und agiert im Magenkarzinom als Treiber der Tumorphprogression (Luan et al., 2020). Im Kolonkarzinom korreliert die Überexpression von *TNFRSF11B* sowohl mit fortgeschrittener Lymphknotenmetastasierung als auch mit einer verminderten Anzahl regulatorischer CD4+ T-Gedächtniszellen im *tumor microenvironment* (TME) (Zhang et al., 2021). Ferner konnte ein negativer Einfluss von *TNFRSF11B* auf die T-Zellaktivität durch eine erhöhte Dichte von PD-1 (*programmed cell death protein 1*) und PD-L1 (*programmed cell death protein 1 ligand 1*) beschrieben werden (Zhang, 2022). Diese T-Zell „Erschöpfung“ ist ein Kennzeichen des TME und bezeichnet T-Zellen, die eine Überexpression inhibitorischer Rezeptoren, eine reduzierte Zytokinproduktion und zytolytische Aktivität zeigen, woraus ein Versagen der Eliminierung von Tumorzellen resultiert (Jiang et al., 2015). In Anbetracht der vorliegenden Daten und des insbesondere in den letzten Jahren zunehmenden Verständnisses über die Rolle von *TNFRSF11B* ist es spannend zukünftig die Funktion dieses Gens im HNSCC zu untersuchen.

SLA wurde in den HNSCC-Zelllinien nur äußerst schwach und in drei Zelllinien überhaupt nicht exprimiert. Das durchschnittliche Expressionsniveau lag über einem Δ Ct-Wert von 8, was bedeutet, dass es um den Faktor 256 niedriger exprimiert wurde als die endogenen Referenzgene *HMBS* und *TBP*.

SLA beeinflusst durch Regulation von Zelloberflächenrezeptoren und zytosolischen Proteinen die intrazelluläre Signaltransduktion (Kazi et al., 2015). Es inhibiert den T- und B-Zell-Rezeptor Signalweg und wird in Leukämiezellen durch Glukokortikoide reguliert (Mansha et al., 2010). Interessanterweise gibt es Daten, die für *SLA* im intrahepatischen Gallengangskarzinom (iCC) im Gegensatz zu *TNFRSF11B* einen negativen Einfluss auf den Wnt-Signalweg mit reduzierter Zellproliferation und Inhibition des Zellzyklus zeigen, wodurch das Gen als mögliches Tumorsuppressorgen postuliert wurde (Wang et al., 2019b). In iCC-Zellen resultierte aus der Überexpression eine verminderte Migrations- und Invasionsfähigkeit, wobei die

Expression von *SLA* eine negativ proportionale Beziehung zur Expression von β -Catenin, c-Myc und der Matrix-Metalloprotease-9 hatte (Wang et al., 2019b).

Zusammenfassend liefern die Ergebnisse einen interessanten *in vitro* Vergleich der Expression von Zelllinien, die aus Primärtumoren und solchen, die aus Metastasengewebe kultiviert worden sind. Anhand dieses *in vitro* Modells können zukünftig weitere funktionelle Experimente durchgeführt werden, mit dem Ziel, die Rolle der Kandidatengene im Prozess der malignen Transformation und Metastasierung besser zu verstehen.

4.2 *ST3GAL1*-Expression in Abhängigkeit der Zelldichte

In Kolon- und Ovarialkarzinomzellen war gezeigt worden, dass *ST3GAL1* nach EGF oder TGF- β induzierter EMT höher exprimiert wird und die Zellmigration fördert (Sakuma et al., 2012, Wu et al., 2018). In der Zellkultur wurde im Rahmen dieser Arbeit nun beobachtet, dass multiple HNSCC Zellen bei niedriger Zelldichte Ausläufer ihrer Zellsomata, sogenannte Filopodien, bildeten und einen mesenchymalen Phänotyp annahmen (Mattila and Lappalainen, 2008). Um daraufhin die Hypothese zu prüfen, ob sich die Expression von *ST3GAL1* in Abhängigkeit der Zelldichte und Anzahl der Zell-Zell-Kontakte verändert, wurde die Expression von *ST3GAL1* bei unterschiedlicher Konfluenz analysiert. Der erste Zeitpunkt wurde 30 Stunden nach Aussaat gewählt, um sicherzustellen, dass die Zellen morphologisch vollständig entwickelt und metabolisch aktiv waren. Es zeigte sich, dass *ST3GAL1* bei mittlerer Zelldichte von 50% bis zu 5,3-fach (UT-SCC 42B, Δ Ct 2,9 vs. 0,5 vs. 2,4) höher exprimiert wurde. Dies entsprach in der Größenordnung dem Expressionsunterschied des im Anschluss etablierten Gen-*Knockdowns* (3.2, Abb. 11). Die Dynamik war allen analysierten Zelllinien gemein. Anhand der später untersuchten Proliferationseigenschaften der Zelllinien (siehe 4.5) scheint die Expressionsdynamik keine unmittelbare Auswirkung auf die Proliferation zu haben. Jedoch wäre es durch die hier gewonnene Erkenntnis äußerst interessant den Einfluss von *ST3GAL1* auf die Migration und Invasion im HNSCC zu untersuchen.

4.3 siRNA-vermittelter *ST3GAL1*-Knockdown

Um die biologische Rolle von *ST3GAL1* in funktionellen Experimenten zu untersuchen, wurde die Genexpression *in vitro* durch transiente Transfektion mit dem siRNA *pool ST3GAL1* supprimiert (2.1.3). In der zu Beginn durchgeführten Verdünnungsreihe der siRNA Konzentration konnte mit der geringsten Konzentration von 60nM eine statistisch signifikante ($p = 0,0019$) Reduktion der mRNA-Konzentration auf 19% erzielt werden. Interessant war,

dass sich dies nur geringfügig von den deutlich höheren Konzentrationen 120nM (18%) und 240nM (15%) unterschied (3.3, Abb. 12). Ein Erklärungsansatz könnte sein, dass die Transfektionseffizienz sinkt, wenn die Nettoladung der RNA-Liposomen-Komplexe nicht mehr positiv ist, weil ein Nukleinsäure-Transfektionsreagenz-Missverhältnis verwendet wird (McNeil et al., 2010). Theoretisch wäre auch möglich, dass die intrazelluläre Endonuklease Dicer oder der *RNA-induced silencing complex* (RISC) ab einer unbekanntenen Konzentration mit dsRNA bzw. siRNA gesättigt sind und nach der Theorie der Michaelis-Menten-Kinetik die maximale Umsatzgeschwindigkeit (V_{\max}) erreicht ist (Pratt and MacRae, 2009, Seibert and Tracy, 2021).

Durch die Verwendung der niedrigsten siRNA-Konzentration reduzieren sich unerwünschte *off-target* Effekte und die Zytotoxizität, die vor allem durch Stimulation proinflammatorischer und proapoptotischer Signalkaskaden über die Aktivierung von Toll-Like-Rezeptoren (TLR) auf der Zelloberfläche von Epithelzellen zu erklären ist (Svoboda, 2007, Whitehead et al., 2011, Lonz et al., 2012). Zum Erreichen eines effektiven Gen-*Knockdowns* variiert die notwendige siRNA-Konzentration zelllinienspezifisch zwischen 5 und 300nM (Han, 2018). Zu Beginn konnte ausschließlich die Zelllinie UT-SCC 42B erfolgreich transfiziert werden, da sie sich unter den gewählten Transfektionsbedingungen als einzige robust und widerstandsfähig erwies. Die Zelllinien UT-SCC 16A, UT-SCC 16B, UM-SCC 22A, UM-SCC 22B, UT-SCC 24A, UT-SCC 24B und THep3 (Zelllinie ist in dieser Arbeit nicht aufgeführt) reagierten mit Zelltod auf das Transfektionsreagenz Lipofectamine® 3000, lösten sich beim Waschschriff am Tag nach der Transfektion vom Flaschenboden und tolerierten insbesondere auch den alleinigen Entzug von FCS nicht (Experimente in dieser Arbeit nicht aufgeführt). Angesichts dessen bestünde die Möglichkeit die siRNA-Transfektion – zu Lasten der Transfektionseffizienz – auch mit vollständigem Zellkulturmedium durchzuführen. Dies wird vom Hersteller so nicht empfohlen, führte jedoch in anderen Arbeitsgruppen auch zum Erfolg (Fan et al., 2018).

Für den Rückschluss biologischer Effekte auf die Suppression von *ST3GAL1* und einen geplanten Transfer der transfizierten Zellen in *in vivo* Modelle, konnten wir zeigen, dass sich der *Knockdown* bereits nach 24h (17%) auf mRNA-Ebene vollständig etabliert und für mindestens 72h (17%) nach erfolgter Transfektion auf diesem Niveau stabil bleibt (3.3.1, Abb. 13). Bai et al. zeigten 2020 durch Western Blot Analyse, dass der siRNA-vermittelte *Knockdown* von *ST3GAL1* auf Proteinebene erst 48h nach Transfektion signifikant war (Bai et al., 2020). Zusammen betrachtet kann hieraus der Schluss gezogen werden, dass im in dieser Arbeit verwendeten Modell die Suppression von *ST3GAL1* in den Zellen auch auf Proteinebene bis mindestens 96h nach erfolgter Transfektion andauert.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde eine alternative Beschaffung der siRNA durch die Firma Eurofins Genomics notwendig (2.1.3). In der Zwischenzeit konnte durch Verwendung des alternativen Transfektionsreagenzes Lipofectamine® RNAiMAX ein erfolgreicher *Knockdown* in der Zelllinie UT-SCC 24B etabliert werden, sodass nun wirkungsgleich sowohl in der UT-SCC 42B eine 6,2-fache (16%) als auch in der UT-SCC 24B eine 6-fache (17%) Herunterregulierung der Genexpression von *ST3GAL1* möglich wurde (3.3.2, Abb. 14). Durch die deutlich geringere Zytotoxizität von Lipofectamine® RNAiMAX konnten auch weitere Zelllinien erfolgreich transfiziert und zugleich demonstriert werden, dass noch deutlich geringere siRNA Konzentrationen ausreichen, um die mRNA-Konzentration von *ST3GAL1* um das 5 bis 6-fache auf bis zu unter 10% zu supprimieren (Anhang, Abb. 20). Damit ließe sich im Umkehrschluss auch die Menge des eingesetzten Transfektionsreagenzes reduzieren. Um die optimale Menge des Transfektionsreagenzes individuell für jede Zelllinie zu ermitteln, sollte zukünftig auch im Sinne einer Transfektionskontrolle die Transfektionseffizienz mittels fluoreszenzmarkierter siRNA (z.B. 6-FAM-phosphoramidit) bestimmt werden. Die Auswertung erfolgt unter dem Fluoreszenzmikroskop. Fluoreszenzmarkierte siRNA werden für diesen Zweck beispielsweise von den Firmen ThermoFisher Scientific und GenePharma angeboten.

Darüber hinaus sollte in Zukunft der *ST3GAL1-Knockdown* nicht nur via RT-qPCR auf mRNA-Ebene, sondern auch via Western Blot auf Proteinebene validiert werden (Wu et al., 2018, Pietrobono et al., 2020). Der Proteinnachweis von ST3GAL1 ist im Anschluss an diese Arbeit via Western Blot erfolgreich etabliert worden (persönliche Kommunikation mit der AG Stoecklein).

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit das Glykosylierungs- und Sialylierungsprofil der Zellen über Lektin oder Antikörper basierte Microarrays zu untersuchen und damit die unterdrückte Funktion durch das verminderte Produkt von ST3GAL1 nachzuweisen. Lektine sind kohlenhydratbindende Proteine, die hochspezifisch für Kohlenhydrate als Bestandteil anderer Moleküle sind. Sie sind in der Lage bestimmte Bindungen und Kombinationen von Monosacchariden erkennen. Darin besteht die Möglichkeit auch feine Strukturunterschiede detektieren und differenzieren zu können. Ihre Substratspezifität deckt den Großteil aller bekannten Oligosaccharidstrukturen ab (Cummings and Pierce, 2014).

4.4 Der Einfluss von ST3GAL1 auf den Zellzyklus

Eine wichtiges Kennzeichen von malignen Tumoren ist die unkontrollierte Proliferation (Hanahan and Weinberg, 2011). Um anhand des in dieser Arbeit etablierten *in vitro* Modells den Einfluss von *ST3GAL1* auf die Proliferation zu untersuchen, wurde ein BrdU-Assay durchgeführt und durchflusszytometrisch analysiert.

Die mit *siST3GAL1* transfizierten Zellen der UT-SCC 42B zeigten in der ersten Untersuchung (2019) verglichen mit der Negativkontrolle *siScrambled* eine Abnahme der Zellen in der S-Phase (2,4% vs. 11,9%) und gleichzeitig eine Zunahme der Zellen in der G0/G1-Phase (68,2% vs. 59,3%) (Abb. 15). Auch im Vergleich zu den unbehandelten Zellen befanden sich von den *siST3GAL1* transfizierten Zellen weniger Zellen in der S-Phase (2,4% vs. 4,2%) und mehr Zellen in der G0/G1-Phase (68,2% vs. 58,2%) (Abb. 15). In der zweiten Untersuchung der UT-SCC 42B (2021) präsentierten die mit *siST3GAL1* transfizierten Zellen eine statistisch signifikante ($p = 0,00048$) Abnahme der Zellen in der S-Phase (35,1% vs. 41,0%) und eine statistisch signifikante ($p = 0,0024$) Zunahme der Zellen in der G0/G1-Phase (60,9% vs. 54,9%) im Vergleich zur Negativkontrolle *siScrambled* (Abb. 16). Dieses Resultat ließ sich in der Zelllinie UT-SCC 24B bestätigen. Hier zeigten die mit *siST3GAL1* transfizierten Zellen im Vergleich zur Transfektionskontrolle *siScrambled* ebenfalls eine statistisch signifikante ($p = 0,00048$) Reduktion der Zellpopulation in der S-Phase (31,4% vs. 43,1%) und eine statistisch signifikante ($p = 0,00048$) Zunahme der Zellpopulation in der G0/G1-Phase (53,5% vs. 42,3%) (Abb. 17). Die Ergebnisse wiesen darauf hin, dass weniger Zellen von der G0/G1-Phase in die S-Phase übertreten, wenn *ST3GAL1* supprimiert ist. Dies ist ein Anzeichen für eine verminderte Proliferation. Das Ergebnis konnte in parallelen Arbeiten der AG Stoecklein durch eine Überexpression von *ST3GAL1* in HEK293-FT-Zellen spiegelbildlich validiert werden, da Suppression und Überexpression den gegenteiligen Effekt ergaben. Die Überexpression resultierte in einer statistisch signifikanten Zunahme der Zellen in der S-Phase und einer statistisch signifikanten Reduktion der Zellen in der G0/G1-Phase (Baal, 2019, Ring, 2022).

Interessant war, dass in der UT-SCC 42B (2021) die unbehandelten Zellen im Vergleich zu *siST3GAL1* statistisch signifikant ($p = 0,00097$) weniger Zellen in der S-Phase (19,6% vs. 35,1%) und statistisch signifikant ($p = 0,00097$) mehr Zellen in der G0/G1-Phase (75,7% vs. 60,9%) aufwiesen (Abb. 16). Durch die ausschließlich mit dem TR behandelten Zellen deutete alles darauf hin, dass am ehesten die kationischen Liposome des Lipofectamine[®] 3000 einen unerwünscht stimulierenden Effekt auf die Zellen haben, da alle Proben, die diesem Transfektionsreagenz ausgesetzt waren im Gegensatz zu den unbehandelten Zellen das gleiche

Muster zeigten (Whitehead et al., 2011, Loney et al., 2012). Auffällig war auch, dass sich dieser Effekt nicht in der Zelllinie UT-SCC 24B beobachten ließ, die mit Lipofectamine® RNAiMAX transfiziert worden war.

In der Untersuchung der UT-SCC 24B war hingegen bemerkenswert, dass die mit *siScrambled* transfizierten Zellen in der S-Phase statistisch signifikant ($p = 0,011$) mehr Zellen (43,1% vs. 30,9%) als die unbehandelten Zellen und auch statistisch signifikant ($p = 0,0034$) mehr Zellen als die nur mit dem TR behandelten Zellen (43,1% vs. 27,4%) zeigten. Zusätzlich wiesen die mit *siScrambled* transfizierten Zellen in der G0/G1-Phase statistisch signifikant ($p = 0,012$) weniger Zellen auf (42,3% vs. 54,3%) als die unbehandelten Zellen und auch statistisch signifikant ($p = 0,0068$) weniger Zellen (42,3% vs. 55,6%) als die nur mit dem TR behandelten Zellen. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die siRNAs der Negativkontrolle *siScrambled* durch eine partielle Komplementarität (*off-target*) RNAi getriggert zu einer ungewollten Stilllegung nicht als Ziel gesetzter mRNA-Transkripte führt (Svoboda, 2007). Dies könnte intrazelluläre Prozesse begünstigen, die zu einer erhöhten Zellaktivität führen.

Möglicherweise ließen sich diese Variablen durch eine weitere Reduktion des eingesetzten Transfektionsreagenzes und der siRNA reduzieren oder sogar ausschließen (siehe 4.3).

Nichtsdestotrotz muss an dieser Stelle auch diskutiert werden, dass die HNSCC-Zelllinien grundsätzlich unter Transfektionsbedingungen diffizil zu handhaben sind und es einer entsprechenden Expertise des Experimentators im Umgang mit diesen Zellen bedarf, um die Kenntnis zahlreicher Feinheiten für funktionelle Experimente und reproduzierbare Ergebnisse zu erlangen. In Bezug darauf wurden im Laufe dieser Arbeit viele Gespräche mit erfahrenen Wissenschaftlern und Experimentatoren anderer Forschungslabore des Universitäts-campus Düsseldorf geführt. In der persönlichen Kommunikation mit der AG Wirth des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf wurde kommuniziert, dass beispielsweise eine stabile Integration des *ST3GALI* Gens mit einem aktivierenden Promoter in das zelluläre Genom durch Transduktion oder CRISPR/Cas9 mit den Zelllinien UT-SCC 42B und UM-SCC 22B aufgrund der Labilität in der Zellkultur nur schwierig vorzustellen sei. Ähnliche Erfahrungen teilte mit mir das Forschungslabor der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Düsseldorf. Sie wiesen zusätzlich darauf hin, dass die Zelllinien außerdem suszeptibel für eine Kontamination mit Mycoplasmen seien (persönliche Kommunikation, Prof. Schulz). Dem wurde jedoch durch engmaschige Kontaminationskontrollen Rechnung getragen.

4.5 ST3GAL1 – ein Treiber der Proliferation in HNSCC-Zellen

Im Anschluss an die Ergebnisse aus der Zellzyklusanalyse wurde die Frage adressiert, ob sich die Resultate auf absolute Zellzahlen übertragen lassen. Hierfür wurden in den Zelllinien UT-SCC 42B und UT-SCC 24B erst die Proliferationseigenschaften unter normalen Zellkulturbedingungen über einen Zeitraum von 96h bestimmt (Abb. 18). Dann wurde die Entwicklung der Zellzahl unbehandelter-, mit siST3GAL1- und der Negativkontrolle siScrambled transfizierter Zellen für insgesamt drei Tage nach Transfektion untersucht.

Unter normalen Zellkulturbedingungen zeigten sowohl die UT-SCC 42B als auch die UT-SCC 24B ab dem ersten Tag nach Aussaat eine tägliche Verdopplung ihrer Zellzahl (Abb. 18). Selbst bei vollständig zugewachsenem Zellrasen zeigte sich in beiden Zelllinien bis zum letzten Tag kein Rückgang der Proliferationsrate, was den Verlust der Kontaktinhibition maligner Zellen widerspiegelt (Abercrombie, 1979, Ribatti, 2017).

Die mit siST3GAL1 transfizierten Zellen der UT-SCC 42B zeigten im Vergleich zur Negativkontrolle siScrambled sowohl 48h (5,05 vs. $5,37 \times 10^5$) als auch 72h nach Transfektion (4,77 vs. $5,12 \times 10^5$) einen Abfall der Zellzahl um 7% (Abb. 19). Auch verglichen mit den unbehandelten Zellen fiel die Zellzahl nach 48h (5,05 vs. $5,45 \times 10^5$) und nach 72h um 7% (4,77 vs. $5,08 \times 10^5$).

In der UT-SCC 24B wiesen die mit siST3GAL1 transfizierten Zellen bereits am ersten Tag (24h) nach Transfektion im Vergleich zu siScrambled eine um 10% statistisch signifikant ($p = 0,031$) reduzierte Zellzahl auf (0,506 vs. $0,562 \times 10^6$). Am zweiten Tag nach Transfektion (48h) setzte sich dieser Trend mit einer Reduktion um 13% (0,427 vs. $0,491 \times 10^6$) und am dritten Tag (72h) um 12% (0,494 vs. $0,558 \times 10^6$) fort, was beide Male statistisch signifikant war ($p = 0,015$). Die mit siST3GAL1 transfizierten Zellen zeigten auch verglichen mit den unbehandelten Zellen 24h nach Transfektion 14% weniger Zellen (0,506 vs. $0,590 \times 10^6$), was statistisch nicht signifikant war ($p = 0,156$). Nach 48h zählten die mit siST3GAL1 transfizierten- im Vergleich zu den unbehandelten Zellen 30% (0,427 vs. 606×10^6) und nach 72h 58% (0,494 vs. $1,174 \times 10^6$) weniger Zellen. Der Unterschied war in beiden Fällen statistisch signifikant ($p = 0,015$).

Diese Ergebnisse zeigen, dass ST3GAL1-supprimierte Zellen eine verminderte Proliferation aufweisen und ST3GAL1 folglich ein Treiber der Proliferation ist.

Auffällig war, dass die dem Lipofectamine® 3000 exponierten Proben der UT-SCC 42B im Vergleich zu den unbehandelten Zellen 24h nach Transfektion mehr Zellen aufwiesen, was in Zusammenschau mit der Zellzyklusanalyse den modulierenden Effekt auf die Zellaktivität bestätigen könnte (Abb. 16 Abb. 19). Bemerkenswert war außerdem, dass die mit siScrambled

transfizierten Zellen der UT-SCC 24B deutlich weniger proliferierten als die unbehandelten Zellen und die Zellzahl gleich den si*ST3GALI* transfizierten Zellen zunächst sogar sukzessive abfiel, wobei theoretisch zu erwarten gewesen wäre, dass lediglich die si*ST3GALI* transfizierten Zellen eine reduzierte Proliferation zeigten. Dies visualisiert am ehesten die Zytotoxizität der Transfektion in Kombination mit dem Entzug von FCS. Dieser Effekt scheint nach 48h überwunden zu sein, da ab diesem Zeitpunkt die Zellzahl wieder zunimmt (Abb. 19). In der theoretischen Annahme, dass nur die *ST3GALI*-supprimierten Zellen eine verminderte Proliferation aufzeigen sollten, präsentiert dieses Ergebnis eine mögliche Limitation der Aussagekraft des verwendeten Assays.

Ein weiterer Punkt ist der unerwartet parallele Anstieg der Zellzahl von si*ST3GALI* und si*Scrambled* in der UT-SCC 42B, da im Rahmen der Etablierung des *Knockdowns* bestätigt werden konnte, dass die Suppression von *ST3GALI* bis mindestens 72h nach Transfektion auf mRNA-Ebene stabil bleibt (Abb. 13 Abb. 19).

4.6 Schlussfolgerungen

Invadierendes, physiologische Grenzen überschreitendes Wachstum und die konsekutive lymphatische und hämatogene Metastasierung sind die Hauptdeterminanten für ein schlechtes *Outcome* von Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs. Ein umfassendes Wissen über die verantwortlichen genetischen Treiber und zellulären Prozesse sind unerlässlich für die Entwicklung neuer, zielgerichteter Therapien.

Zusammenfassend demonstriert diese Arbeit neben der Etablierung eines *in vitro* Modells für die funktionelle Analyse HNSCC-relevanter Gene die Bedeutung von *ST3GALI* für die Proliferation. Für zukünftige Analysen soll die Suppression des Zielgens neben der Validierung auf mRNA-Ebene mittels RT-qPCR auch auf Protein-Ebene mittels Western-Blot validiert werden. Durch minimierte Toxizität wäre in Zukunft ein kombinierter *Knockdown* denkbar, in dem durch RNAi zwei oder sogar mehrere Kandidatengene stillgeschaltet werden. Damit könnten möglicherweise potenzierende Effekte auf metastasierungsrelevante Funktionen oder eine Regulation der Gene untereinander aufgedeckt werden. Nicht zuletzt bietet das etablierte *in vitro* Modell die Option transfizierte Zellen bereits nach 24h in ein *in vivo* Modell zu überführen – z.B. durch Inokulation auf die chorioallantoische Membran im CAM-Modell.

Eine pharmakologische Intervention durch Inhibition der *ST3GALI* bedingten Tumorprogression bietet einen spannenden Ansatzpunkt für die zukünftige Therapie des HNSCC. Angesichts der Komplexität zellulärer Regulationsmechanismen der Glykosylierung und Sialylierung von Glykoproteinen und Glykolipiden sind definitiv weitere Untersuchungen dringend notwendig, um ein detailliertes Verständnis zu gewinnen. Besonders in den letzten Jahren häufen sich die wissenschaftlichen Publikationen zu der Rolle von *ST3GALI* in der Tumorprogression und Metastasierung. Längst ist seine Bedeutung für die schlechtere Prognose von Patienten bekannt. Nichtsdestotrotz fehlt es nach wie vor an funktionellen Analysen, um die biologischen Zusammenhänge, die die Metastasierung antreiben, zu verstehen und einordnen zu können.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

- ABERCROMBIE, M. 1979. Contact inhibition and malignancy. *Nature*, 281, 259-62.
- ALMEIDA, R. & ALLSHIRE, R. C. 2005. RNA silencing and genome regulation. *Trends Cell Biol*, 15, 251-8.
- ALVES, I., VICENTE, M. M., DIAS, A. M., GAIFEM, J., RODRIGUES, C., CAMPAR, A. & PINHO, S. S. 2021. The Role of Glycosylation in Inflammatory Diseases. *Adv Exp Med Biol*, 1325, 265-283.
- ANGATA, T. & VARKI, A. 2002. Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective. *Chem Rev*, 102, 439-69.
- BAAL, P. 2019. *Tumor promoting effects of ST3GAL1 overexpression in human in vitro models*. Master's thesis, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- BAGASRA, O. & PRILLIMAN, K. R. 2004. RNA interference: the molecular immune system. *J Mol Histol*, 35, 545-53.
- BAI, R., LUAN, X., ZHANG, Y., ROBBE-MASSELOT, C., BROCKHAUSEN, I. & GAO, Y. 2020. The expression and functional analysis of the sialyl-T antigen in prostate cancer. *Glycoconj J*, 37, 423-433.
- BEHRENS, B. 2015. *Untersuchungen zur genetischen Heterogenität einzelner Tumorzellen von Kopf-Hals-Karzinomen*. Doctoral thesis, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- BLOT, W. J., MCLAUGHLIN, J. K., WINN, D. M., AUSTIN, D. F., GREENBERG, R. S., PRESTON-MARTIN, S., BERNSTEIN, L., SCHOENBERG, J. B., STEMHAGEN, A. & FRAUMENI, J. F., JR. 1988. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res*, 48, 3282-7.
- BRAAKHUIS, B. J., BRAKENHOFF, R. H. & LEEMANS, C. R. 2012. Treatment choice for locally advanced head and neck cancers on the basis of risk factors: biological risk factors. *Ann Oncol*, 23 Suppl 10, x173-7.
- BRENNER, J. C., GRAHAM, M. P., KUMAR, B., SAUNDERS, L. M., KUPFER, R., LYONS, R. H., BRADFORD, C. R. & CAREY, T. E. 2010. Genotyping of 73 UM-SCC head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Head Neck*, 32, 417-26.
- BURCHELL, J., POULSOM, R., HANBY, A., WHITEHOUSE, C., COOPER, L., CLAUSEN, H., MILES, D. & TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J. 1999. An α 2,3 sialyltransferase (ST3Gal I) is elevated in primary breast carcinomas. *Glycobiology*, 9, 1307-1311.
- CAREY, T. E. 1994. 4 - Head and Neck Tumor Cell Lines. In: HAY, R. J., PARK, J.-G. & GAZDAR, A. (eds.) *Atlas of Human Tumor Cell Lines*. San Diego: Academic Press.
- CERUTTI, H. & CASAS-MOLLANO, J. A. 2006. On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. *Curr Genet*, 50, 81-99.
- CHONG, Y. K., SANDANARAJ, E., KOH, L. W., THANGAVELLO, M., TAN, M. S., KOH, G. R., TOH, T. B., LIM, G. G., HOLBROOK, J. D., KON, O. L., NADARAJAH, M., NG, I., NG, W. H., TAN, N. S., LIM, K. L., TANG, C. & ANG, B. T. 2016. ST3GAL1-Associated Transcriptomic Program in Glioblastoma Tumor Growth, Invasion, and Prognosis. *J Natl Cancer Inst*, 108.
- COGNETTI, D. M., WEBER, R. S. & LAI, S. Y. 2008. Head and neck cancer: an evolving treatment paradigm. *Cancer*, 113, 1911-32.
- CRAMER, J. D., BURTNES, B., LE, Q. T. & FERRIS, R. L. 2019. The changing therapeutic landscape of head and neck cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, 16, 669-683.
- CUMMINGS, R. D. & PIERCE, J. M. 2014. The challenge and promise of glycomics. *Chem Biol*, 21, 1-15.
- DABELSTEEN, E. 1996. Cell surface carbohydrates as prognostic markers in human carcinomas. *J Pathol*, 179, 358-69.

- DALL'OLIO, F. & CHIRICOLO, M. 2001. Sialyltransferases in cancer. *Glycoconj J*, 18, 841-50.
- DALZIEL, M., WHITEHOUSE, C., MCFARLANE, I., BROCKHAUSEN, I., GSCHMEISSNER, S., SCHWIENTEK, T., CLAUSEN, H., BURCHELL, J. M. & TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J. 2001. The relative activities of the C2GnT1 and ST3Gal-I glycosyltransferases determine O-glycan structure and expression of a tumor-associated epitope on MUC1. *J Biol Chem*, 276, 11007-15.
- DASHTI, H., PABON PORRAS, M. A. & MORA, S. 2021. Glycosylation and Cardiovascular Diseases. *Adv Exp Med Biol*, 1325, 307-319.
- DIDENKO, V. V. 2001. DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. *Biotechniques*, 31, 1106-16, 1118, 1120-1.
- DING, S. W., HAN, Q., WANG, J. & LI, W. X. 2018. Antiviral RNA interference in mammals. *Curr Opin Immunol*, 54, 109-114.
- DRULA, E., GARRON, M. L., DOGAN, S., LOMBARD, V., HENRISSAT, B. & TERRAPON, N. 2022. The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature. *Nucleic Acids Res*, 50, D571-d577.
- ELBASHIR, S. M., HARBORTH, J., LENDECKEL, W., YALCIN, A., WEBER, K. & TUSCHL, T. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411, 494-8.
- FAN, T. C., YEO, H. L., HSU, H. M., YU, J. C., HO, M. Y., LIN, W. D., CHANG, N. C., YU, J. & YU, A. L. 2018. Reciprocal feedback regulation of ST3GAL1 and GFRA1 signaling in breast cancer cells. *Cancer Lett*, 434, 184-195.
- FIRE, A. 2005. Nucleic acid structure and intracellular immunity: some recent ideas from the world of RNAi. *Q Rev Biophys*, 38, 303-9.
- FIRE, A., ALBERTSON, D., HARRISON, S. W. & MOERMAN, D. G. 1991. Production of antisense RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle. *Development*, 113, 503-14.
- FIRE, A., XU, S., MONTGOMERY, M. K., KOSTAS, S. A., DRIVER, S. E. & MELLO, C. C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391, 806-11.
- GATTA, G., BOTTA, L., SÁNCHEZ, M. J., ANDERSON, L. A., PIERANNUNZIO, D. & LICITRA, L. 2015. Prognoses and improvement for head and neck cancers diagnosed in Europe in early 2000s: The EUROCARE-5 population-based study. *Eur J Cancer*, 51, 2130-2143.
- GENG, Q., NI, L. W., OUYANG, B., HU, Y. H., ZHAO, Y. & GUO, J. 2017. Alanine and arginine rich domain containing protein, Aard, is directly regulated by androgen receptor in mouse Sertoli cells. *Mol Med Rep*, 15, 352-358.
- GERSTBERGER, S., JIANG, Q. & GANESH, K. 2023. Metastasis. *Cell*, 186, 1564-1579.
- GILLISON, M. L., ALEMANY, L., SNIJDERS, P. J., CHATURVEDI, A., STEINBERG, B. M., SCHWARTZ, S. & CASTELLSAGUÉ, X. 2012. Human papillomavirus and diseases of the upper airway: head and neck cancer and respiratory papillomatosis. *Vaccine*, 30 Suppl 5, F34-54.
- GIVAN, A. L. 2011. Flow cytometry: an introduction. *Methods Mol Biol*, 699, 1-29.
- HAKOMORI, S. 1989. Aberrant glycosylation in tumors and tumor-associated carbohydrate antigens. *Adv Cancer Res*, 52, 257-331.
- HAN, H. 2018. RNA Interference to Knock Down Gene Expression. *Methods Mol Biol*, 1706, 293-302.
- HANAHAHAN, D. & WEINBERG, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.
- HANNON, G. J. 2002. RNA interference. *Nature*, 418, 244-51.

- HARDUIN-LEPERS, A. 2023. The vertebrate sialylation machinery: structure-function and molecular evolution of GT-29 sialyltransferases. *Glycoconj J*, 40, 473-492.
- HARDUIN-LEPERS, A., KRZEWSKI-RECCHI, M. A., COLOMB, F., FOULQUIER, F., GROUX-DEGROOTE, S. & DELANNOY, P. 2012. Sialyltransferases functions in cancers. *Front Biosci (Elite Ed)*, 4, 499-515.
- HARDUIN-LEPERS, A., VALLEJO-RUIZ, V., KRZEWSKI-RECCHI, M. A., SAMYN-PETIT, B., JULIEN, S. & DELANNOY, P. 2001. The human sialyltransferase family. *Biochimie*, 83, 727-37.
- HASHIBE, M., BRENNAN, P., CHUANG, S. C., BOCCIA, S., CASTELLSAGUE, X., CHEN, C., CURADO, M. P., DAL MASO, L., DAUDT, A. W., FABIANOVA, E., FERNANDEZ, L., WÜNSCH-FILHO, V., FRANCESCHI, S., HAYES, R. B., HERRERO, R., KELSEY, K., KOIFMAN, S., LA VECCHIA, C., LAZARUS, P., LEVI, F., LENCE, J. J., MATES, D., MATOS, E., MENEZES, A., MCCLEAN, M. D., MUSCAT, J., ELUF-NETO, J., OLSHAN, A. F., PURDUE, M., RUDNAI, P., SCHWARTZ, S. M., SMITH, E., STURGIS, E. M., SZESZENIA-DABROWSKA, N., TALAMINI, R., WEI, Q., WINN, D. M., SHANGINA, O., PILARSKA, A., ZHANG, Z. F., FERRO, G., BERTHILLER, J. & BOFFETTA, P. 2009. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 18, 541-50.
- HILL, P. J. & STEWART, G. S. 1992. The polymerase chain reaction in molecular and microbiology. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 10, 343-77.
- HOLZAPFEL, B. & WICKERT, L. 2007. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. *Biologie in unserer Zeit*, 37, 120-126.
- HUGONNET, M., SINGH, P., HAAS, Q. & VON GUNTEN, S. 2021. The Distinct Roles of Sialyltransferases in Cancer Biology and Onco-Immunology. *Front Immunol*, 12, 799861.
- JEZELA-STANEK, A., STEPIEN, K. M. & TYLKI-SZYMANSKA, A. 2022. Editorial: Inherited Protein Glycosylation Defects in Humans. *Front Genet*, 13, 851438.
- JIANG, Y., LI, Y. & ZHU, B. 2015. T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Cell Death Dis*, 6, e1792.
- JOHNSON, D. E., BURTNES, B., LEEMANS, C. R., LUI, V. W. Y., BAUMAN, J. E. & GRANDIS, J. R. 2020. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers*, 6, 92.
- KAVI, H. H., FERNANDEZ, H., XIE, W. & BIRCHLER, J. A. 2008. Genetics and biochemistry of RNAi in Drosophila. *Curr Top Microbiol Immunol*, 320, 37-75.
- KAZI, J. U., KABIR, N. N. & RÖNNSTRAND, L. 2015. Role of SRC-like adaptor protein (SLAP) in immune and malignant cell signaling. *Cell Mol Life Sci*, 72, 2535-44.
- KHAN, P., SIDDIQUI, J. A., LAKSHMANAN, I., GANTI, A. K., SALGIA, R., JAIN, M., BATRA, S. K. & NASSER, M. W. 2021. RNA-based therapies: A cog in the wheel of lung cancer defense. *Mol Cancer*, 20, 54.
- KIM, D. & ROSSI, J. 2008. RNAi mechanisms and applications. *Biotechniques*, 44, 613-6.
- KULASINGHE, A., PERRY, C., JOVANOVIĆ, L., NELSON, C. & PUNYADEERA, C. 2015. Circulating tumour cells in metastatic head and neck cancers. *Int J Cancer*, 136, 2515-23.
- LI, D., SUN, H., BAI, G., WANG, W., LIU, M., BAO, Z., LI, J. & LIU, H. 2018. α -1,3-Fucosyltransferase-VII siRNA inhibits the expression of SLex and hepatocarcinoma cell proliferation. *Int J Mol Med*, 42, 2700-2708.
- LI, F. & DING, J. 2019. Sialylation is involved in cell fate decision during development, reprogramming and cancer progression. *Protein Cell*, 10, 550-565.

- LI, M., TIAN, L., YAO, H., LU, J., GE, J., GUO, Y., LIU, M. & XIAO, H. 2014. ASAP1 mediates the invasive phenotype of human laryngeal squamous cell carcinoma to affect survival prognosis. *Oncol Rep*, 31, 2676-82.
- LI, W., ZHANG, W., LUO, J., CAO, A., ZHANG, Y., HUANG, D., SHENG, W., CAI, S. & LI, J. 2010. Alpha1,3 fucosyltransferase VII plays a role in colorectal carcinoma metastases by promoting the carbonylation of glycoprotein CD24. *Oncol Rep*, 23, 1609-17.
- LI, Y., LU, J., HAN, Y., FAN, X. & DING, S. W. 2013. RNA interference functions as an antiviral immunity mechanism in mammals. *Science*, 342, 231-4.
- LI, Y., LUO, S., DONG, W., SONG, X., ZHOU, H., ZHAO, L. & JIA, L. 2016. Alpha-2, 3-sialyltransferases regulate the multidrug resistance of chronic myeloid leukemia through miR-4701-5p targeting ST3GAL1. *Lab Invest*, 96, 731-40.
- LIANG, J. X., GAO, W. & CAI, L. 2017. Fucosyltransferase VII promotes proliferation via the EGFR/AKT/mTOR pathway in A549 cells. *Onco Targets Ther*, 10, 3971-3978.
- LIN, C. J., GRANDIS, J. R., CAREY, T. E., GOLLIN, S. M., WHITESIDE, T. L., KOCH, W. M., FERRIS, R. L. & LAI, S. Y. 2007. Head and neck squamous cell carcinoma cell lines: established models and rationale for selection. *Head Neck*, 29, 163-88.
- LIN, D., WATAHIKI, A., BAYANI, J., ZHANG, F., LIU, L., LING, V., SADAR, M. D., ENGLISH, J., FAZLI, L., SO, A., GOUT, P. W., GLEAVE, M., SQUIRE, J. A. & WANG, Y. Z. 2008. ASAP1, a gene at 8q24, is associated with prostate cancer metastasis. *Cancer Res*, 68, 4352-9.
- LIN, W. D., FAN, T. C., HUNG, J. T., YEO, H. L., WANG, S. H., KUO, C. W., KHOO, K. H., PAI, L. M., YU, J. & YU, A. L. 2021. Sialylation of CD55 by ST3GAL1 Facilitates Immune Evasion in Cancer. *Cancer Immunol Res*, 9, 113-122.
- LIVAK, K. J., FLOOD, S. J., MARMARO, J., GIUSTI, W. & DEETZ, K. 1995. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl*, 4, 357-62.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-8.
- LONEZ, C., VANDENBRANDEN, M. & RUYSSCHAERT, J. M. 2012. Cationic lipids activate intracellular signaling pathways. *Adv Drug Deliv Rev*, 64, 1749-58.
- LUAN, F., LI, X., CHENG, X., HUANGFU, L., HAN, J., GUO, T., DU, H., WEN, X. & JI, J. 2020. TNFRSF11B activates Wnt/ β -catenin signaling and promotes gastric cancer progression. *Int J Biol Sci*, 16, 1956-1971.
- LUO, P., LU, G., FAN, L. L., ZHONG, X., YANG, H., XIE, R., LV, Z., LV, Q. Z., FU, D., YANG, L. X. & MA, Y. 2017. Dysregulation of TMPRSS3 and TNFRSF11B correlates with tumorigenesis and poor prognosis in patients with breast cancer. *Oncol Rep*, 37, 2057-2062.
- LUO, Q., ZHANG, S., ZHANG, D., YUAN, F., CHEN, X. & YANG, S. 2020. Expression of ASAP1 and FAK in gastric cancer and its clinicopathological significance. *Oncol Lett*, 20, 974-980.
- MACFARLANE, L. A. & MURPHY, P. R. 2010. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics*, 11, 537-61.
- MAIER, H., DIETZ, A., GEWELKE, U., HELLER, W. D. & WEIDAUER, H. 1992. Tobacco and alcohol and the risk of head and neck cancer. *Clin Invest*, 70, 320-7.
- MANSHA, M., CARLET, M., PLONER, C., GRUBER, G., WASIM, M., WIEGERS, G. J., RAINER, J., GELEY, S. & KOFLER, R. 2010. Functional analyses of Src-like adaptor (SLA), a glucocorticoid-regulated gene in acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*, 34, 529-34.

- MATTILA, P. K. & LAPPALAINEN, P. 2008. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 446-54.
- MCKINNON, K. M. 2018. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*, 120, 5.1.1-5.1.11.
- MCNEIL, S. E., VANGALA, A., BRAMWELL, V. W., HANSON, P. J. & PERRIE, Y. 2010. Lipoplexes formulation and optimisation: in vitro transfection studies reveal no correlation with in vivo vaccination studies. *Curr Drug Deliv*, 7, 175-87.
- MEAD, T. J. & LEFEBVRE, V. 2014. Proliferation assays (BrdU and EdU) on skeletal tissue sections. *Methods Mol Biol*, 1130, 233-243.
- MONTGOMERY, M. K., XU, S. & FIRE, A. 1998. RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 15502-7.
- MOREMEN, K. W., TIEMEYER, M. & NAIRN, A. V. 2012. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13, 448-62.
- MÜLLER, T., STEIN, U., POLETTI, A., GARZIA, L., ROTHLEY, M., PLAUMANN, D., THIELE, W., BAUER, M., GALASSO, A., SCHLAG, P., PANKRATZ, M., ZOLLO, M. & SLEEMAN, J. P. 2010. ASAP1 promotes tumor cell motility and invasiveness, stimulates metastasis formation in vivo, and correlates with poor survival in colorectal cancer patients. *Oncogene*, 29, 2393-403.
- MULLIS, K. B. & FALOONA, F. A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 155, 335-50.
- MUNKLEY, J. 2022. Aberrant Sialylation in Cancer: Therapeutic Opportunities. *Cancers (Basel)*, 14.
- NAPOLI, C., LEMIEUX, C. & JORGENSEN, R. 1990. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*, 2, 279-289.
- NARAYANAN, A. M., FINEGERSH, A. F., CHANG, M. P., OROSCO, R. K. & MOSS, W. J. 2020. Oral Cavity Cancer Outcomes in Remote, Betel Nut-Endemic Pacific Islands. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 129, 1215-1220.
- O'DONOGHUE, M. L., ROSENSON, R. S., GENCER, B., LÓPEZ, J. A. G., LEPOR, N. E., BAUM, S. J., STOUT, E., GAUDET, D., KNUSEL, B., KUDER, J. F., RAN, X., MURPHY, S. A., WANG, H., WU, Y., KASSAHUN, H. & SABATINE, M. S. 2022. Small Interfering RNA to Reduce Lipoprotein(a) in Cardiovascular Disease. *N Engl J Med*, 387, 1855-1864.
- O'SULLIVAN, B., HUANG, S. H., SU, J., GARDEN, A. S., STURGIS, E. M., DAHLSTROM, K., LEE, N., RIAZ, N., PEI, X., KOYFMAN, S. A., ADELSTEIN, D., BURKEY, B. B., FRIBORG, J., KRISTENSEN, C. A., GOTHELF, A. B., HOEBERS, F., KREMER, B., SPEEL, E. J., BOWLES, D. W., RABEN, D., KARAM, S. D., YU, E. & XU, W. 2016. Development and validation of a staging system for HPV-related oropharyngeal cancer by the International Collaboration on Oropharyngeal cancer Network for Staging (ICON-S): a multicentre cohort study. *Lancet Oncol*, 17, 440-451.
- OSAZUWA-PETERS, N., SIMPSON, M. C., ZHAO, L., BOAKYE, E. A., OLOMUKORO, S. I., DESHIELDS, T., LOUX, T. M., VARVARES, M. A. & SCHOOTMAN, M. 2018. Suicide risk among cancer survivors: Head and neck versus other cancers. *Cancer*, 124, 4072-4079.
- PEARCE, O. M. & LÄUBLI, H. 2016. Sialic acids in cancer biology and immunity. *Glycobiology*, 26, 111-28.
- PICCO, G., JULIEN, S., BROCKHAUSEN, I., BEATSON, R., ANTONOPOULOS, A., HASLAM, S., MANDEL, U., DELL, A., PINDER, S., TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J. & BURCHELL, J. 2010. Over-expression of ST3Gal-I promotes mammary tumorigenesis. *Glycobiology*, 20, 1241-50.

- PIETROBONO, S., ANICHINI, G., SALA, C., MANETTI, F., ALMADA, L. L., PEPE, S., CARR, R. M., PARADISE, B. D., SARKARIA, J. N., DAVILA, J. I., TOFANI, L., BATTISTI, I., ARRIGONI, G., YING, L., ZHANG, C., LI, H., MEVES, A., FERNANDEZ-ZAPICO, M. E. & STECCA, B. 2020. ST3GAL1 is a target of the SOX2-GLI1 transcriptional complex and promotes melanoma metastasis through AXL. *Nat Commun*, 11, 5865.
- PIETROBONO, S. & STECCA, B. 2021. Aberrant Sialylation in Cancer: Biomarker and Potential Target for Therapeutic Intervention? *Cancers (Basel)*, 13.
- PINHO, S. S. & REIS, C. A. 2015. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Cancer*, 15, 540-55.
- PONG, S. K. & GULLEROVA, M. 2018. Noncanonical functions of microRNA pathway enzymes - Drosha, DGCR8, Dicer and Ago proteins. *FEBS Lett*, 592, 2973-2986.
- PRATT, A. J. & MACRAE, I. J. 2009. The RNA-induced silencing complex: a versatile gene-silencing machine. *J Biol Chem*, 284, 17897-901.
- QIN, H., LIU, J., YU, M., WANG, H., THOMAS, A. M., LI, S., YAN, Q. & WANG, L. 2020. FUT7 promotes the malignant transformation of follicular thyroid carcinoma through α 1,3-fucosylation of EGF receptor. *Exp Cell Res*, 393, 112095.
- REIS, C. A., OSORIO, H., SILVA, L., GOMES, C. & DAVID, L. 2010. Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection. *J Clin Pathol*, 63, 322-9.
- RIBATTI, D. 2017. A revisited concept: Contact inhibition of growth. From cell biology to malignancy. *Exp Cell Res*, 359, 17-19.
- RING, L. E. 2022. *Establishment and application of an in vitro model to study biological effects of ST3GAL1 overexpression in cancer cell lines*. Master's thesis, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- ROBERT-KOCH-INSTITUT 2021. Krebs in Deutschland für 2017/2018. 13. Ausgabe ed.: Zentrum für Krebsregisterdaten und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.
- RODRIGUES, E. & MACAULEY, M. S. 2018. Hypersialylation in Cancer: Modulation of Inflammation and Therapeutic Opportunities. *Cancers (Basel)*, 10.
- RODRIGUEZ, E., BOELAARS, K., BROWN, K., EVELINE LI, R. J., KRUIJSSEN, L., BRUIJNS, S. C. M., VAN EE, T., SCHETTERS, S. T. T., CROMMENTUIJN, M. H. W., VAN DER HORST, J. C., VAN GRIEKEN, N. C. T., VAN VLIET, S. J., KAZEMIER, G., GIOVANNETTI, E., GARCIA-VALLEJO, J. J. & VAN KOOYK, Y. 2021. Sialic acids in pancreatic cancer cells drive tumour-associated macrophage differentiation via the Siglec receptors Siglec-7 and Siglec-9. *Nat Commun*, 12, 1270.
- ROMANO, N. & MACINO, G. 1992. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol Microbiol*, 6, 3343-53.
- SAKUMA, K., AOKI, M. & KANNAGI, R. 2012. Transcription factors c-Myc and CDX2 mediate E-selectin ligand expression in colon cancer cells undergoing EGF/bFGF-induced epithelial-mesenchymal transition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 7776-81.
- SCHJOLDAGER, K. T., NARIMATSU, Y., JOSHI, H. J. & CLAUSEN, H. 2020. Global view of human protein glycosylation pathways and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 21, 729-749.
- SCHMITZ, S. 2007. *Der Experimentator: Zellkultur*, Elsevier Spektrum Akademischer Verlag.
- SCHNEIDER, F., KEMMNER, W., HAENSCH, W., FRANKE, G., GRETSCHEL, S., KARSTEN, U. & SCHLAG, P. M. 2001. Overexpression of sialyltransferase CMP-sialic acid:Galbeta1,3GalNAc-R alpha6-Sialyltransferase is related to poor patient survival in human colorectal carcinomas. *Cancer Res*, 61, 4605-11.
- SEIBERT, E. & TRACY, T. S. 2021. Fundamentals of Enzyme Kinetics: Michaelis-Menten and Non-Michaelis-Type (Atypical) Enzyme Kinetics. *Methods Mol Biol*, 2342, 3-27.

- SHEN, W., SAKAMOTO, N. & YANG, L. 2015. Cancer-specific mortality and competing mortality in patients with head and neck squamous cell carcinoma: a competing risk analysis. *Ann Surg Oncol*, 22, 264-71.
- SILSIRIVANIT, A. 2019. Glycosylation markers in cancer. *Adv Clin Chem*, 89, 189-213.
- SPROLL, C., FREUND, A. K., HASSEL, A., HÖLBLING, M., AUST, V., STORB, S. H., HANDSCHEL, J., TEICHMANN, C., DEPPRICH, R., BEHRENS, B., NEVES, R. P., KÜBLER, N. R., KAISER, P., BALDUS, S. E., TÓTH, C., KAISERS, W. & STOECKLEIN, N. H. 2017. Immunohistochemical detection of lymph node-DTCs in patients with node-negative HNSCC. *Int J Cancer*, 140, 2112-2124.
- STRATTON, M. R., CAMPBELL, P. J. & FUTREAL, P. A. 2009. The cancer genome. *Nature*, 458, 719-24.
- STROBER, W. 2015. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol*, 111, A3.B.1-a3.B.3.
- SU, S. Y., CHEN, W. T., CHIANG, C. J., YANG, Y. W. & LEE, W. C. 2020. Oral cancer incidence rates from 1997 to 2016 among men in Taiwan: Association between birth cohort trends and betel nut consumption. *Oral Oncol*, 107, 104798.
- SUNG, H., FERLAY, J., SIEGEL, R. L., LAVERSANNE, M., SOERJOMATARAM, I., JEMAL, A. & BRAY, F. 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 71, 209-249.
- SVINGEN, T., BEVERDAM, A., VERMA, P., WILHELM, D. & KOOPMAN, P. 2007. Aard is specifically up-regulated in Sertoli cells during mouse testis differentiation. *Int J Dev Biol*, 51, 255-8.
- SVOBODA, P. 2007. Off-targeting and other non-specific effects of RNAi experiments in mammalian cells. *Curr Opin Mol Ther*, 9, 248-57.
- TIJSTERMAN, M., KETTING, R. F. & PLASTERK, R. H. 2002. The genetics of RNA silencing. *Annu Rev Genet*, 36, 489-519.
- TSAO, S. W., TSANG, C. M. & LO, K. W. 2017. Epstein-Barr virus infection and nasopharyngeal carcinoma. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 372.
- TUMBAN, E. 2019. A Current Update on Human Papillomavirus-Associated Head and Neck Cancers. *Viruses*, 11.
- VARKI, A. 2017. Biological roles of glycans. *Glycobiology*, 27, 3-49.
- VARKI, A., SCHNAAR, R. L. & SCHAUER, R. 2015. Sialic Acids and Other Nonulosonic Acids. In: VARKI, A., CUMMINGS, R. D., ESKO, J. D., STANLEY, P., HART, G. W., AEBI, M., DARVILL, A. G., KINOSHITA, T., PACKER, N. H., PRESTEGARD, J. H., SCHNAAR, R. L. & SEEBERGER, P. H. (eds.) *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Copyright 2015-2017 by The Consortium of Glycobiology Editors, La Jolla, California. All rights reserved.
- VELLEUER, E. & DIETRICH, R. 2014. Fanconi anemia: young patients at high risk for squamous cell carcinoma. *Mol Cell Pediatr*, 1, 9.
- VERMORKEN, J. B. & SPECENIER, P. 2010. Optimal treatment for recurrent/metastatic head and neck cancer. *Ann Oncol*, 21 Suppl 7, vii252-61.
- VIDEIRA, P. A., CORREIA, M., MALAGOLINI, N., CRESPO, H. J., LIGEIRO, D., CALAIS, F. M., TRINDADE, H. & DALL'OLIO, F. 2009. ST3Gal.I sialyltransferase relevance in bladder cancer tissues and cell lines. *BMC Cancer*, 9, 357.
- VISHNOI, A. & RANI, S. 2017. MiRNA Biogenesis and Regulation of Diseases: An Overview. *Methods Mol Biol*, 1509, 1-10.
- WAGNER, S., SHARMA, S. J., WUERDEMANN, N., KNUTH, J., REDER, H., WITTEKINDT, C. & KLUSSMANN, J. P. 2017. Human Papillomavirus-Related Head and Neck Cancer. *Oncol Res Treat*, 40, 334-340.

- WANG, K. Y., HUANG, R. Y., TONG, X. Z., ZHANG, K. N., LIU, Y. W., ZENG, F., HU, H. M. & JIANG, T. 2019a. Molecular and clinical characterization of TMEM71 expression at the transcriptional level in glioma. *CNS Neurosci Ther*, 25, 965-975.
- WANG, X., LIU, Y., SHAO, D., QIAN, Z., DONG, Z., SUN, Y., XING, X., CHENG, X., DU, H., HU, Y., LI, Y., LI, L., DONG, B., LI, Z., WU, A., WU, X., BU, Z., ZONG, X., ZHU, G., JI, Q., WEN, X. Z., ZHANG, L. H. & JI, J. F. 2016. Recurrent amplification of MYC and TNFRSF11B in 8q24 is associated with poor survival in patients with gastric cancer. *Gastric Cancer*, 19, 116-27.
- WANG, X. K., PENG, Y., TAO, H. R., ZHOU, F. F., ZHANG, C., SU, F., WANG, S. P., LIU, Q., XU, L. H., PAN, X. K., XIE, W. & FENG, M. H. 2017. Inhibition of adhesion and metastasis of HepG2 hepatocellular carcinoma cells in vitro by DNA aptamer against sialyl Lewis X. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 37, 343-347.
- WANG, Y., HE, X., WEI, Y., LIU, L., WANG, W. & LI, N. 2019b. SRC-like adaptor protein negatively regulates Wnt signaling in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Oncol Lett*, 17, 2745-2753.
- WARD, B. J. H., SCHAAL, D. L., NKADI, E. H. & SCOTT, R. S. 2022. EBV Association with Lymphomas and Carcinomas in the Oral Compartment. *Viruses*, 14.
- WEN, K. C., SUNG, P. L., HSIEH, S. L., CHOU, Y. T., LEE, O. K., WU, C. W. & WANG, P. H. 2017. α 2,3-sialyltransferase type I regulates migration and peritoneal dissemination of ovarian cancer cells. *Oncotarget*, 8, 29013-29027.
- WHITEHEAD, K. A., DAHLMAN, J. E., LANGER, R. S. & ANDERSON, D. G. 2011. Silencing or stimulation? siRNA delivery and the immune system. *Annu Rev Chem Biomol Eng*, 2, 77-96.
- WHO 2020. Global Health Estimates 2020: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2019. World Health Organisation.
- WU, H., SHI, X. L., ZHANG, H. J., SONG, Q. J., YANG, X. B., HU, W. D., MEI, G. L., CHEN, X., MAO, Q. S. & CHEN, Z. 2016. Overexpression of ST3Gal-I promotes migration and invasion of HCCLM3 in vitro and poor prognosis in human hepatocellular carcinoma. *Onco Targets Ther*, 9, 2227-36.
- WU, X., ZHAO, J., RUAN, Y., SUN, L., XU, C. & JIANG, H. 2018. Sialyltransferase ST3GAL1 promotes cell migration, invasion, and TGF- β 1-induced EMT and confers paclitaxel resistance in ovarian cancer. *Cell Death Dis*, 9, 1102.
- YANG, J., LI, H. & ZHAO, Y. 2023. Dessert or Poison? The Roles of Glycosylation in Alzheimer's, Parkinson's, Huntington's Disease, and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Chembiochem*, 24, e202300017.
- YEO, H. L., FAN, T. C., LIN, R. J., YU, J. C., LIAO, G. S., CHEN, E. S., HO, M. Y., LIN, W. D., CHEN, K., CHEN, C. H., HUNG, J. T., WU, J. C., CHANG, N. C., CHANG, M. D., YU, J. & YU, A. L. 2019. Sialylation of vasorin by ST3Gal1 facilitates TGF- β 1-mediated tumor angiogenesis and progression. *Int J Cancer*, 144, 1996-2007.
- ZĄBCZYŃSKA, M., LINK-LENCZOWSKI, P. & POCHEĆ, E. 2021. Glycosylation in Autoimmune Diseases. *Adv Exp Med Biol*, 1325, 205-218.
- ZHANG, G. 2022. Regulatory T-cells-related signature for identifying a prognostic subtype of hepatocellular carcinoma with an exhausted tumor microenvironment. *Front Immunol*, 13, 975762.
- ZHANG, J. R., HOU, P., WANG, X. J., WENG, Z. Q., SHANG-GUAN, X. C., WANG, H., YOU, F., LIN, B. Q., HUANG, Z. Y. & CHEN, X. Q. 2021. TNFRSF11B Suppresses Memory CD4⁺ T Cell Infiltration in the Colon Cancer Microenvironment: A Multiomics Integrative Analysis. *Front Immunol*, 12, 742358.
- ZHANG, T., ZHAO, G., YANG, C., DONG, P., WATARI, H., ZENG, L., PFEFFER, L. M. & YUE, J. 2018. Lentiviral vector mediated-ASAP1 expression promotes epithelial to mesenchymal transition in ovarian cancer cells. *Oncol Lett*, 15, 4432-4438.

ZHANG, X. L. & QU, H. 2021. The Role of Glycosylation in Infectious Diseases. *Adv Exp Med Biol*, 1325, 219-237.

6 Anhang

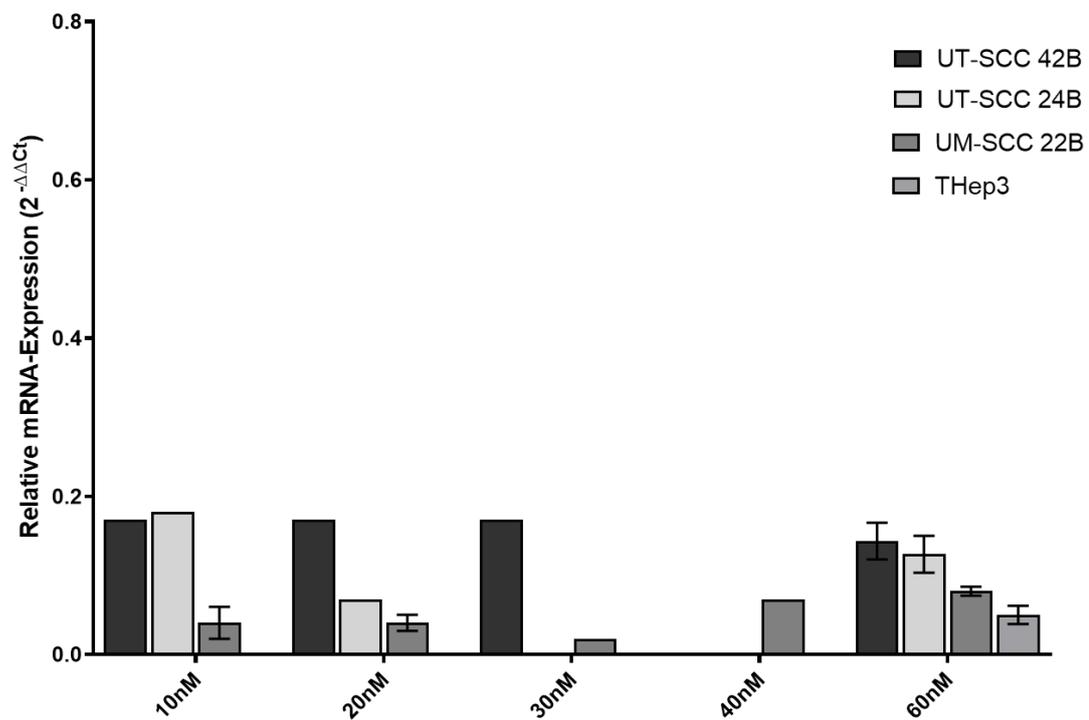


Abb. 20: siRNA-vermittelter ST3GAL1-Knockdown in weiteren Zelllinien mittels RNAiMAX. Das Balkendiagramm zeigt den Mittelwert und die Standardabweichung der anhand der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode berechneten relativen mRNA-Expression in Relation zur Transfektionskontrolle. Für jede Zelllinie wurden die einzelnen Konzentrationen (10 - 60nM) in unterschiedlicher Anzahl biologischer Replikate durchgeführt. UT-SCC 42B (10nM n = 1; 20nM n = 1; 30nM n = 1; 60nM n = 3). UT-SCC 24B (10nM n = 1; 20nM n = 1; 60nM n = 3). UM-SCC 22B (10nM n = 2; 20nM n = 2; 30nM n = 1; 40nM n = 1; 60nM n = 3). THep3 (60nM n = 3).

Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Univ.-Prof. Dr. med. **Nikolas H. Stoecklein** danke ich für die Überlassung des Themas und die produktiven Gespräche, die meinem experimentellen Vorgehen immer wieder einen roten Faden verliehen haben, wenn ich Gefahr lief mich im Detail zu verlieren. Die richtigen Fragen an den entscheidenden Punkten und konstruktive Kritik haben mich wissenschaftlich kontinuierlich wachsen lassen.

Ein besonderer Dank gilt Frau **Elina-Katharina Bongers** für die Einarbeitung und während der gesamten Laborzeit fortbestehend bedingungslosen Unterstützung in allen praktischen und organisatorischen Angelegenheiten. Du warst jederzeit meine Anlaufstelle für die praktische Umsetzung meiner Ideen und gleichzeitig Seelsorgerin, Kummerkasten und Pausenfreundin. Dass Du da warst, ist für mich von unschätzbarem Wert gewesen. Du bist mit mir durch alle Höhen und Tiefen gegangen. Schön, dass ich dich heute eine Freundin nennen darf.

In höchstem Maße möchte ich Herrn Dr. rer. nat. **Volker Stoldt** und Frau Dr. rer. nat. **Cornelia Höhner** danken, die unermüdlich mit Rat und Tat an meiner Seite standen und mich dazu motiviert haben nicht aufzugeben. Für Eure nicht selbstverständliche, aber fürsorgliche, aufrichtige und im tiefsten Sinne ehrliche Unterstützung danke ich Euch von ganzem Herzen. Ihr seid ein elementarer Bestandteil der Verwirklichung dieser Arbeit.

Frau **Christiane Driemel**, **Sina Schütte** und Frau Dr. rer. nat. **Birthe Möhlendick** danke ich für die unzähligen Erklärungen und Hilfestellungen in der Theorie, bei der Ausführung, Optimierung, Analyse und Interpretation meiner Experimente und Ergebnisse. Ihr habt viele Fragezeichen in Luft aufgehen lassen und aus Problemen Lösungen gemacht. Ich danke Euch.

Ich möchte **Frau Katharina Raba** meinen ausdrücklichen Dank aussprechen, für Ihre engagierte Unterstützung und die nicht selbstverständliche Geduld in Hinblick auf die Erklärung und Handhabung des Durchflusszytometers. Mein ebenso großer Dank gilt **Veronica Raba**, die mir neben ihrer eigenen Labortätigkeit am Durchflusszytometer mit Rat und Tat zur Seite stand, wodurch wir nicht zuletzt gemeinsam immer zielführende Lösungen gefunden haben.

Der **AG Wirth** des Instituts für Pathologie der Uniklinik Düsseldorf möchte ich für konstruktive Gespräche, ehrliche Kritik und wertvolle Verbesserungsvorschläge danken, die den entscheidenden Wendepunkt erbrachten und den Erfolg und die Umsetzbarkeit dieses Promotionsvorhabens letztlich erst möglich gemacht haben.

Meinem Co-Betreuer Herrn Prof. Dr. rer. nat. **Wolfgang Schulz** möchte ich für die unermüdliche Zuversicht, den liebevollen Zuspruch, die konstruktivste aller Kritiken und nicht zuletzt die Fokussierung auf die experimentelle Umsetzbarkeit des Promotionsvorhabens in einem realistischen Zeitrahmen danken. Bis heute sind Sie für mich eine sowohl wissenschaftliche als auch menschliche Inspiration. Ihre Leidenschaft für die Wissenschaft ist ansteckend. Danke, dass ich für einige Jahre daran teilhaben durfte.