

Viny Shang  
Dr.med.

## Function of Ryanodine Receptor 2 in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

Fach/Einrichtung: Hals-Nasen-Ohrenheilkunde  
Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. Jochen Heß

In den thematisch vorausgegangenen Forschungsarbeiten von Kathrin Schmitt zeigte sich, dass ein Verlust der Expression und/oder Funktion des endoplasmatischen Kalziumkanals Ryanodin Rezeptor 2 (RYR2) durch Hypermethylierung und/oder somatische Mutation ein häufiges Event in der Pathogenese des Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinoms ist. Es wurde eine hohe Frequenz an somatischen Mutationen und Hypermethylierung des RYR2 Genpromotors gefunden in Tumorproben der HIPO-HNC und TCGA-HNSC Kohorten. Die epigenetische Regulierung von RYR2-Expression durch Promoterhypermethylierung wurde auf Transkriptebene in Tumorproben von TCGA-HNSC und auf Transkript- und Proteinebene in Proben aus HIPO-HNC und in etablierten HNSCC Zelllinien nachgewiesen. In immunhistochemischen Färbungen von Gewebeschnitten aus unabhängigen Kohorten zeigte sich ein gradueller Verlust der RYR2-Expression von gesunder Mukosa, über dysplastische Läsion, bis hin zum Plattenepithelkarzinom mit steigender Dedifferenzierung des Epithels. Der Verlust von RYR2 Expression führt wahrscheinlich zur Entdifferenzierung im Rahmen maligner Transformation im HNSCC. Gleichzeitig war die Expression von RYR2 mit epithelialer zu mesenchymaler Transition (EMT) und Zellmotilität assoziiert: Die RYR2 Expression war in *Scratch Assays* vor allem in mobilen Zellen an der Migrationsfront hoch. Weiterhin exprimierten Zelllinien mit mesenchymalem, aggressivem Phänotyp und ein kultiviertes Zelllinienmodell für EMT mehr RYR2 als Zelllinien vom epithelialen Typ.

Das Ziel dieser Arbeit war die epigenetische Regulation von RYR2 in weiteren Tumorentitäten in einer *pancancer* Analyse zu beurteilen und die funktionelle und klinische Bedeutung von RYR2 im HNSCC und seine Rolle in der Tumorzellmotilität zu erforschen.

Die Ergebnisse der *pancancer* Analyse basierend auf 23 Tumorkohorten von TCGA zeigten, dass eine Hypermethylierung im Promoter des RYR2 Gens in vielen Tumorentitäten vorhanden war. Ausnahmen bildeten das klarzellige, sowie papilläre Nierenzellkarzinom und Schilddrüsenkarzinom, die auch eine geringere somatische Mutationsrate aufwiesen als andere Tumorentitäten. Methylierung und Transkriptexpression von RYR2 war invers korreliert in den TCGA Kohorten des Prostataadenokarzinoms, des Pankreaskarzinoms und des Zervixkarzinoms, was eine epigenetische Regulierung wie beim Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom suggeriert.

Die ausgeführten *Scratch Assays* konnten vorausgegangene Ergebnisse bestätigen: Die Expression von RYR2 war hoch in mobilen Zellen der Migrationsfront, während konfluente Zellen variable, niedrige Expression zeigten. Im *Scratch Assay* mit agonistischer und antagonistischer Stimulation von RYR2 mit den Wirkstoffen Koffein und Tetracain konnte die Zellwanderung und Wundschließung nicht beeinflusst werden.

Cox-Regressionsanalysen zeigten, dass hohe RYR2 Transkriptlevel ein signifikanter Marker für schlechteres Gesamtüberleben, krankheitsspezifisches Überleben und progressionsfreies Intervall und ein signifikanter, unabhängiger Marker für das Gesamtüberleben im Multivariattest sind. Weitere Analysen offenbarten, dass eine hohe RYR2 Expression ein signifikanter Marker für das Gesamtüberleben und progressionsfreie Intervall spezifisch bei Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle ist und einen nicht-signifikanten Trend bei Plattenepithelkarzinomen des Larynx zeigt. Interessanterweise zeigten sich in der Kreuztabellenanalyse weder für die Gesamtkohorte noch spezifisch für Tumoren der

Mundhöhle und des Larynx eine Anreicherung von klinischen Parametern, die für Invasivität und erhöhte Motilität sprechen in Tumoren mit hoher RYR2-Expression. Eine Ko-Expressionsanalyse der Gesamtkohorte wurde durchgeführt mit einem Set aus Genen, die mit niedriger oder hoher RYR2-Expression korrelierten in Tumorgewebsproben und Tumorzelllinien, um ein tumorzellspezifisches Genset zu kreieren. In Tumorgewebsproben allein beeinflussen RYR2-exprimierende stromale Immunzellen die Transkriptlevel und ko-exprimierten Gene von *RYR2*. Es zeigte sich kein Unterschied im Überleben oder in klinisch relevanten Eigenschaften zwischen Patientenclustern basierend auf der Expression von Genen, die mit niedriger und hoher RYR2-Expression korrelierten. In der Ko-Expressionsanalyse nur für Mundhöhlen- und Larynxkarzinome wies eine Untergruppe von Patienten mit Expression von Genen, die mit hoher RYR2-Expression korrelierten, eine Anreicherung von perineuralen Invasionen, Lymphknotenmetasen und einen nicht signifikanten, schlechteren Überlebensrend auf. Das signifikant schlechtere Überleben in Patienten mit hohem RYR2 Transkriptlevel wiederholte sich nicht in Patienten, die mit hoher RYR2-Expression in Tumorzellen korrelierte Gene exprimierten. Dies erhebt die Frage, ob eigentlich RYR2 exprimierende Immunzellen aus dem Tumormikromilieu und nicht RYR2 exprimierende Tumorzellen ursächlich und somit klinisch relevant im HNSCC sind.

Zusammengefasst können die Ergebnisse dieser Dissertation die Rolle von RYR2 in Tumorzellmotilität weder vollends bestätigen, noch entkräften. In vitro Experimente weisen auf einen Zusammenhang zwischen RYR2-Expression und Zellmotilität und Invasion hin, jedoch bewirkte medikamentöse Stimulation der RYR2-Aktivität keine Veränderung des Zellverhaltens. Nur eine Untergruppe der Larynx- und Mundhöhlentumore, die mit hoher RYR2-Expression korrelierte Gene exprimierten, war assoziiert mit perineuraler Invasion und Lymphknotenmetastasen. Wohlmöglich sind vereinzelte RYR2 positive Zellen die Antreiber von Zelleinwanderung und Metastasen. Dieser Ansatz sollte mithilfe weiterentwickelter, präklinischer Modelle verfolgt werden. Ein weiteres Ziel sollte sein, die RYR2 positiven Immunzellen im Tumormikromilieu zu typisieren und ihre klinische Bedeutung aufzuklären. Die Hypermethylierung von RYR2 wurde in mehreren Tumorentitäten entdeckt und potenziell besteht eine epigenetische Regulation von RYR2 im Pankreas- und Prostataadenokarzinom und Zervixkarzinom. Perspektivisch sollte die klinische Rolle von RYR2 in diesen Tumorentitäten weiter untersucht werden.