

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Canis

Second und Third Harmonic Generation Imaging von Kopf- Hals-Tumoren

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Magdalena Widmann

aus
Berchtesgaden

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Olivier Gires

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Heiko Hermeking

Priv.-Doz. Dr. Louisa von Baumgarten

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 13.01.2022

Im Rahmen des Ethikantrags Nr. 140-13 wurde die Konfokalmikroskopie als ethisch unbedenklich bewertet. Aufgrund aktueller Entwicklungen zeigt sich die Mehrphotonenmikroskopie mit einem Mehrwert gegenüber der Konfokalmikroskopie, deshalb wurde in dieser Arbeit die Mehrphotonenmikroskopie in Einverständnis mit der zuständigen Ethikkommission angewendet.

Für meine Familie

Inhalt

1	Abstract	7
2	Einleitung.....	11
2.1	Kopf-Hals-Tumoren.....	11
2.2	Die Extrazellulärmatrix und ihr Hauptbestandteil Kollagen	17
2.3	Grundlagen zur Tumorigenese und die Rolle der Extrazellulärmatrix.....	20
2.3.1	Theorien der Tumorentstehung	20
2.3.2	Epithelial-mesenchymale Transition.....	21
2.3.3	Das Tumor-Mikromilieu	22
2.4	Mehrphotonen-Mikroskopie: Second und Third Harmonic Generation Imaging	23
2.5	Kollagen und Second Harmonic Generation Imaging	25
3	Zielsetzung	27
4	Material und Methoden	28
4.1	Versuchsaufbau	28
4.2	Mehrphotonen-Mikroskop	28
4.3	Verbrauchsmaterialien	29
4.4	Weitere Geräte.....	30
4.5	Präparation der Gewebeproben.....	31
4.6	Färbungen und Antikörper	31
4.6.1	Immunhistologie	31
4.6.2	Elastica van Gieson.....	33
4.6.3	Hämalaun	33
4.7	Sonstige Materialien.....	34
4.8	Durchführung am Mehrphotonen-Mikroskop.....	34
5	Ergebnisse.....	36
5.1	SHG-Signal.....	36
5.2	Vergleich der Färbungen mit SHG	38
5.2.1	Immunhistologie und SHG.....	38
5.2.2	Elastica van Gieson und SHG	39
5.2.3	Vergleich aller Färbemethoden	41

5.3 Qualitative und quantitative Auswertung von SHG-Messungen in gesunden und malignen Geweben aus dem Kopf-Hals-Bereich	42
5.4 SHG in Kombination mit THG	48
5.5 Qualitätssicherung und Negativkontrolle des SHG-Signals	49
6 Diskussion	51
6.1 SHG und THG als Werkzeuge für die Tumordiagnostik.....	51
6.2 Färbungen mit Einfluss auf SHG/THG	53
6.3 Geordnete vs. ungeordnete Kollagenfibrillen	54
6.4 Limitationen von SHG, Stärken und Schwächen des Projekts.....	57
6.5 Klinische Relevanz und Ausblick	58
7 Zusammenfassung	61
8 Lebenslauf	62
9 Anhang.....	62
9.1 Abkürzungsverzeichnis	62
9.2 Abbildungsverzeichnis	63
9.3 Tabellenverzeichnis	64
9.4 Literaturverzeichnis	65
10 Danksagung	78

1 Abstract

The project's goal is to detect differences between healthy and malignant tissue of the human head and neck area by utilizing Second and Third Harmonic Generation Imaging (SHG and THG). The focus lies on changes in the structure and quantity of collagenous extracellular matrix. In this study, we assess post-surgical head and neck squamous cell carcinoma tissue from different patients as well as healthy tissue.

SHG and THG are nonlinear optical phenomena: two or three photons (in practice with a wavelength of typically ≥ 800 nm or ≥ 1200 nm) are coherently scattered at the extracellular collagen matrix of the tissue to generate a higher harmonic photon with half or one third of the wavelength, respectively. SHG and THG rely on endogenous contrasts. SHG can image changes in the collagenous extracellular matrix structure and composition with great sensitivity and specificity as it emerges from non-centrosymmetric structures such as several collagen types. THG provides information on cell-cell as well as cell-collagen matrix integrity and visualizes cells as well as membrane borders. The sub-resolution fibrillar assembly is revealed through emission directionality. This information is inherent due to the coherence and phase-matching process of SHG. SHG and THG can present a powerful tool to detect carcinoma *in vivo*, without causing any harm to the surrounding tissue.

We examined tissue from patients with head and neck squamous cell carcinoma and tissue from healthy mucosa (each $n = 10$). The post-surgical tissue samples were snap-frozen, embedded in OCT (optimal cutting temperature) compound and cut with a cryotome into four-micrometer thick samples. The samples were prepared for conventional histological staining procedures and conventional immunohistochemistry methods. The antibody used is specific for collagen-I-type and was combined with a biotinylated anti-mouse-antibody as secondary antibody. Normal light microscopy was utilized for analysis. Consecutive slides of the samples were stained only with hemalaun and analyzed via SHG imaging. A multiphoton microscope with an optical parametric oscillator was used. Qualitative imaging analysis compared collagen matrices detected via immunohistochemistry and SHG. Quantitative imaging analysis measured forward to backward intensity ratio ($f_{\text{SHG}}/b_{\text{SHG}}$) of SHG images. This ratio provides information on organization and density of the tissue. THG images were used to develop a holistic image of the tissue. Since THG visualizes membrane borders and cell-cell associations among other things, it was used to complement the overall image of the tissue. An f/b -ratio of THG images was not formed, the interest of f/b focuses on collagen and thus on SHG-signals.

Our qualitative and quantitative assessments of the tissue samples demonstrate a structural change of collagen matrix organization from healthy to malignant tissue. Eight out of ten tissue samples showed a lower $f_{\text{SHG}}/b_{\text{SHG}}$ in malignant compared to healthy tissue. This indicates a structural change of collagen matrix organization from healthy to malignant tissue. A lower f/b ratio indicates greater disorder of collagen fibrils in the tissue of interest. The lower the f/b ratio, the higher the number of scattering events of photons in the tissue. Thus, highly ordered collagen fibrils in tissue show a high f/b ratio. The assessed tissue samples showed a high f/b ratio in healthy tissue, describing highly

organized tissue and few scattering events. In reverse, malignant tissue showed a low f/b ratio with many scattering events. This information can be used to broaden the *in vivo* diagnostic and therapeutic possibilities for HNSCC.

Intravital imaging techniques are emerging and can provide a detailed view on the extracellular matrix without being harmful to the tissue. Such techniques can be coupled to existing fiber optic imaging devices and enhance pathology analysis of early stage HNSCC as well as real-time surgical determination of tumor margins. Thus, Second and Third Harmonic Generation Imaging provides broad possibilities to analyze not only the cellular but also the extracellular changes in diseased tissue.

Das Ziel dieses Projektes war es, Unterschiede zwischen gesundem und maligne entartetem menschlichen Gewebe des Kopf-Hals-Bereiches mithilfe von Second und Third Harmonic Generation Imaging (SHG und THG) zu erkennen. Veränderungen der Kollagenstruktur und -menge in der Extrazellulärmatrix standen dabei im Vordergrund. Es wurden Gewebeschnitte von verschiedenen Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren sowie von gesunder Schleimhaut (n = 10) mit dieser Methode untersucht.

SHG und THG sind nichtlineare optische Phänomene: zwei oder drei Photonen (in diesem Projekt typischerweise mit Wellenlängen ≥ 800 nm oder ≥ 1200 nm) werden kohärent an den Kollagenfibrillen der Extrazellulärmatrix des Gewebes gestreut und bilden ein Photon mit höherer Harmonie, welches nun nur noch die halbe oder ein Drittel der ursprünglichen Wellenlänge besitzt. SHG und THG basieren auf endogenen Kontrasten und benötigen daher keine weiteren Färbungen des Gewebes. SHG entsteht an nicht-inversionssymmetrischen Strukturen, wie zum Beispiel verschiedenen Kollagen-Subtypen, THG hingegen entsteht an Membrangrenzen. Mit SHG können Veränderungen der Struktur und Zusammensetzung von Kollagenfasern mit hoher Sensitivität und Spezifität dargestellt werden. Mithilfe von THG ergeben sich Informationen über Zell-Zell- und auch Zell-Kollagen-Grenzen, Zellmembranen an sich können ebenfalls dargestellt werden. SHG und THG könnten als aussagekräftige Instrumente verwendet werden, um Karzinome *in vivo* zu erkennen, ohne das umgebende Gewebe zu schädigen. Da sie auf endogenen Kontrasten und geometrischen Eigenschaften von Gewebe basiert, verursacht diese Art der nichtlinearen Optik keine Schädigung des Gewebes durch Phototoxizität oder Bleichung.

Die Gewebeproben wurden direkt nach der operativen Entfernung tiefgefroren, in ein OCT–(optimal cutting temperature) Gemisch eingebettet und mit einem Kryotom in vier Mikrometer dicke Proben geschnitten. Das Gewebe wurde anschließend sowohl mit konventionellen histologischen Methoden wie H.E. und Elastica van Gieson gefärbt, als auch immunhistologisch. Für die Immunhistologie wurde ein Kollagen-Typ 1-spezifischer Antikörper als primärer sowie ein biotinylierter anti-Maus-Antikörper als sekundärer Antikörper verwendet. Für die Untersuchung der gefärbten Schnitte wurde ein Lichtmikroskop benutzt. Nachfolgende Schnitte der Gewebe wurden lediglich mit Hämalaun angefärbt und mittels SHG- und THG-Bildgebung analysiert. Hierfür wurde ein Mehrphotonen-Mikroskop mit einem Titan-Saphir-Laser und einem optisch-parametrischem Oszillator verwendet.

Die qualitative Bildanalyse verglich Kollagenfasern, die durch die Immunhistologie sichtbar gemacht wurden mit denen, die das SHG-Verfahren zeigte. Die quantitative Bildanalyse konzentrierte sich auf die Messung des Verhältnisses zwischen vorwärts und rückwärts gestreuten Signalen der histologischen Schnitte am Mehrphotonen-Mikroskop. Dieses Verhältnis, $f_{\text{SHG}}/b_{\text{SHG}}$, gibt Aufschluss über die Organisation und Dichte der Kollagenfibrillen.

Acht von zehn Proben zeigten eine höhere f/b-Ratio im gesunden als im tumorösen Gewebe. Dies deutet auf einen geringeren Grad der Struktur von Tumorgewebe im Vergleich zu gesundem Gewebe hin. Eine höhere f/b-Ratio kann als eine höhere Ordnung von Kollagenfibrillen im betreffenden Gewebe interpretiert werden. Je höher die f/b-Ratio, desto weniger Streuereignisse von Photonen im Verlauf durch das Gewebe treten auf. Durch die vorwärts gerichteten Detektoren ergibt sich f_{SHG} , also das Signal der durch das Gewebe reichenden Photonen. Rückwärts gerichtete Detektoren ermitteln gestreute Photonen. Lediglich zwei von zehn Proben wiesen eine höhere f/b-Ratio in Tumoren als in

gesundem Gewebe auf. Diese zwei Proben zeigten bezüglich der Art des Tumors keine eindeutigen Unterschiede zu den anderen Proben. Es handelte sich jeweils um ein Oropharynx- und ein Hypopharynxkarzinom. Die anderen acht Gewebeproben waren ebenfalls entweder Oro-oder Hypopharynxkarzinome. Für THG wurde diese Art der Auswertung nicht durchgeführt, da die Interpretation der Ordnung speziell von Kollagenfibrillen nur mit SHG möglich ist. In dieser Arbeit liegt der Fokus auf Veränderungen von Kollagenfibrillen von gesundem hin zu Tumorgewebe. Kollagen wird spezifisch mittels SHG dargestellt. THG-Signale der Gewebeproben wurden jedoch dennoch generiert, um ein Gesamtbild des Gewebes zu erhalten.

SHG und THG Imaging sind vielversprechende Werkzeuge zur Diagnostik und Therapie von Tumorerkrankungen. Hiermit können Änderungen innerhalb von Tumorgewebe nicht nur auf zellulärer Struktur, sondern auch im Bereich der Extrazellulärmatrix erkannt und interpretiert werden. *In vivo*-Mikroskopie kann aufgrund der gewebeschonenden Eigenschaften einen hilfreichen Mehrwert in der Tumordiagnostik und -therapie erbringen.

2 Einleitung

2.1 Kopf-Hals-Tumoren

Kopf-Hals-Tumoren sind eine heterogene Gruppe von Tumoren, die Larynx, Pharynx, Mundhöhle, Speicheldrüsen, Lippe und innere Nase beinhalten (Beynon *et al.* 2018; Robert Koch-Institut (RKI)). Es handelt sich dabei in allen oben genannten Regionen hauptsächlich um Plattenepithelkarzinome, andere Tumorarten wie Adenokarzinome oder Lymphome sind selten (Spence *et al.* 2016). Weltweit erkranken jährlich fast 700.000 Menschen, Kopf-Hals-Tumore sind damit die sechsthäufigste Krebsart weltweit (Sung, Ferlay *et al.* 2021). Im Jahr 2013 lag die Inzidenz dieser Tumoren in Deutschland bei 12.992 (Männer), beziehungsweise 4.532 (Frauen), die Prävalenz war ungefähr dreimal so hoch. Eine Prognose des Robert-Koch-Institutes aus dem „Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland“ von 2016 (RKI) berechnete einen Anstieg der Inzidenz auf 14.300 (Männer), beziehungsweise 5.500 (Frauen) bis zum Jahr 2020 in Deutschland. Endgültige Daten sind hierzu zum aktuellen Zeitpunkt noch ausstehend. Das relative Fünf-Jahres-Überleben liegt bei 51% (Männer), beziehungsweise 61% (Frauen), das Zehn-Jahres-Überleben liegt bei Männern nur noch bei 39%, im Gegensatz zu 50% bei Frauen (Robert Koch-Institut (RKI)).

Kopf-Hals-Tumoren gehören zu den fünf Krebserkrankungen mit den meisten Arbeitsunfähigkeitstagen bei Männern in Deutschland (RKI). Dies ist zu einem großen Teil mit den weitreichenden Konsequenzen einer Therapie dieser Tumoren zu erklären. Hierauf wird im Folgenden noch weiter eingegangen.

Tabakkonsum jeglicher Art und auch Alkoholkonsum gelten als Haupt-Risikofaktoren für die Entstehung von Kopf-Hals-Tumoren (Blot *et al.* 1988; Ridge *et al.* 2016; Winn *et al.* 2015). Beide sind unabhängig voneinander starke Risikofaktoren für die Entstehung dieser Tumoren (Hashibe *et al.* 2007). Eine Kombination dieser zwei Faktoren hat jedoch noch stärkeren Einfluss und vermutlich nicht nur einen additiven, sondern einen multiplikativen Effekt auf das Erkrankungsrisiko (Hashibe *et al.* 2009; Hashim *et al.* 2019). So werden im klinischen Alltag regelhaft Patienten mit einer ausgedehnten Noxenanamnese bezüglich Nikotin und Alkohol angetroffen.

Ein weiterer Risikofaktor gewinnt seit einigen Jahren immer mehr an Gewicht: HPV-Infektionen, also chronische Infektionen mit humanen Papillomaviren, vor allem mit dem Untertyp 16. Dieser wird, gemeinsam mit weiteren kanzerogenen Subtypen von HPV, als wichtiger Auslöser für die Entstehung von Kopf-Hals-Tumoren, vor allem Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx angesehen (Shanthi Marur *et al.* 2010; Argiris *et al.* 2008).

Zur Diagnostik wird meist ein p16-Nachweis als Surrogatmarker für HPV-Infektionen durchgeführt. Es handelt sich um ein Tumorsuppressorgen, welches in HPV-induzierten Tumoren eine Überexpression zeigt und mittels immunhistologischer Färbungen nachgewiesen werden kann (C. Grønhoj Larsen *et al.* 2014). P16 zeigt eine hohe Sensitivität in Bezug auf den Nachweis transkriptionell aktiver HP-Viren (Lewis 2012).

Mehrere Studien beschreiben einen deutlichen Anstieg an HPV-positiven Kopf-Hals-Tumoren. Hammarstedt *et al.* beobachteten einen Anteil HPV-positiver Plattenepithelkarzinome der Tonsille von 68%, gemessen an allen Tumoren dieser Art in den Jahren 2000-2002 (Hammarstedt *et al.* 2006). In

den 1970er Jahren wurde dieser Anteil noch mit 23,3% angegeben (Hammarstedt *et al.* 2006). Chaturvedi *et al.* beobachteten ähnliche Zahlen für Plattenepithelkarzinome des Oropharynx: auch hier wurde der Anteil HPV-positiver Karzinome in diesem Bereich mit 16,3% in den 1980er Jahren verglichen mit 70,2% in den 2000er Jahren beschrieben (Chaturvedi *et al.* 2011). Eine starke Gewichtung haben HPV-induzierte Erkrankungen vor allem bei jungen, männlichen Patienten zwischen 40 und 55 Jahren (Shanthi Marur *et al.* 2010). Da sich HPV-Infektionen als gewichtige Risikofaktoren bei derartigen Tumorerkrankungen darstellen, jedoch eine deutlich bessere Überlebensrate haben (Khardori 2010), wurde ihre Relevanz in der aktuellen, achten Ausgabe der TNM-Klassifikationen durch eine eigene Klassifikation bei Oropharynx-Karzinomen verdeutlicht (Brierley *et al.* 2017; Wittekind 2017).

Tabelle 1: T-Kategorien p16-positiver und negativer Oropharynxkarzinome nach der aktuellen achten Auflage der TNM-Klassifikation, frei nach (Doescher *et al.* 2017; Wittekind 2017)

T-Kategorie	p16-positive Oropharynxkarzinome	p16-negative Oropharynxkarzinome
T0	CUP-Syndrom mit p16-Überexpression	kein Primärtumor, CUP-Syndrom
Tis	/	<i>Carcinoma in situ</i>
T1	Tumor mit zwei cm oder weniger in größter Ausdehnung	Tumor mit zwei cm oder weniger in größter Ausdehnung
T2	Tumor mit mehr als zwei cm, aber nicht mehr als vier cm in größter Ausdehnung	Tumor mit mehr als zwei cm, aber nicht mehr als vier cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor mit mehr als vier cm in größter Ausdehnung oder Ausbreitung zur lingualen Oberfläche der Epiglottis	Tumor mit mehr als vier cm in größter Ausdehnung oder Ausbreitung zur lingualen Oberfläche der Epiglottis
T4	Tumor infiltriert den Larynx, die äußere Zungenmuskulatur, die mediale Pterygoidmuskulatur, den harten Gaumen, die Mandibula, die Schädelbasis oder ummauert die A. carotis	T4a: Tumor infiltriert eine der folgenden Nachbarstrukturen: Larynx, äußere Zungenmuskulatur, mediale Pterygoidmuskulatur, harter Gaumen, Mandibula
		T4b: Tumor infiltriert Nachbarstrukturen wie M. pterygoideus lateralis, Lamina lateralis des Processus pterygoideus, Schädelbasis oder ummauert die A. carotis

Tabelle 2: klinische N-Kategorien p16-positiver Oropharynxkarzinome und p16- negativer Oro- und Hypopharynxkarzinome nach der aktuellen achten Auflage der TNM-Klassifikation, frei nach (Doescher *et al.* 2017; Wittekind 2017)

klinische N-Kategorie	p16-positive Oropharynxkarzinome	p16-negative Oro- und Hypopharynxkarzinome
cNx	Regionäre Lymphknotenmetastasen können nicht beurteilt werden	Regionäre Lymphknotenmetastasen können nicht beurteilt werden
cN0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
cN1	Metastasen in einem oder mehreren ipsilateralen Lymphknoten, nicht größer als sechs cm	Metastasen in einem unilateralen Lymphknoten, nicht größer als drei cm ohne extranodale Ausbreitung
cN2	Metastasen in kontralateralen oder bilateralen Lymphknoten, nicht größer als sechs cm	N2a: ein unilateraler Lymphknoten, größer als drei cm, jedoch nicht größer als sechs cm ohne extranodale Ausbreitung
		N2b: multiple ipsilaterale Lymphknoten, nicht größer als sechs cm ohne extranodale Ausbreitung
		N2c: multiple bilaterale Lymphknoten, nicht größer als sechs cm ohne extranodale Ausbreitung
cN3	Metastasen in Lymphknoten größer als sechs cm	N3a: Metastasen in Lymphknoten größer als sechs cm ohne extranodale Ausbreitung
		N3b: Metastase in einem Lymphknoten größer als drei cm mit extranodaler Ausbreitung oder in multiplen ipsilateralen, kontralateralen oder bilateralen Lymphknoten mit extranodaler Ausbreitung

Therapie- und prognoseentscheidend bei bereits vorhandenen Lymphknotenmetastasen bei p16-negativen Karzinomen ist das extranodale Wachstum, hier wird nochmals zwischen N3a und N3b unterschieden, wobei es sich bei N3b-Metastasen um Lymphknotenmetastasen mit extranodaler Ausbreitung handelt (Doescher *et al.* 2017).

Tabelle 3: Stadieneinteilung der Oropharynxkarzinome nach UICC, frei nach (Doescher *et al.* 2017; Wittekind 2017)

Stadium pathologisch	p16-negativ	p16-positiv
I	T1, N0, M0	T1/2, N0/1, M0
II	T2, N0, M0	T1/2, N2, M0 T3, N0/1, M0
III	T1/2, N1, M0 T3, N0/1, M0	T3/4, N2, M0
IV	IVa: T1-3, N3, M0 T4a, N0-N2, M0 IVb: jedes T, N3, M0 T4b, jedes N, M0 IVc: jedes T, jedes N, M1	jedes T, jedes N, M1

Eine deutlich bessere Prognose der p16-positiven im Vergleich zu p16-negativen Karzinomen führt zu einem Downstaging dieser Karzinome in der Tumorklassifikation.

Zahlreiche weitere Risikofaktoren wie genetische Prädisposition, Ernährung und ein niedriger sozioökonomischer Stand werden beschrieben (Winn *et al.* 2015; Conway *et al.* 2015; Chuang *et al.* 2012). Die Entstehung von Kopf-Hals-Tumoren basiert also wie viele andere Tumorerkrankungen auf einem multifaktoriellen Geschehen. Hervorzuheben sind jedoch trotzdem eindeutig zuzuordnende Risikofaktoren wie die oben diskutierten, allen voran Tabak- und Alkoholkonsum sowie HPV-Infektionen vor allem bei jüngeren Patienten.

Die Erkennung der Risikofaktoren Alkohol und Tabak ist auch deshalb so wichtig, da es noxenbedingt zu einer Feldkanzerisierung sowie dem Auftreten von syn- und metachronen Karzinomen kommen kann.

Feldkanzerisierung ist ein erstmals 1953 von Slaughter *et al.* beschriebenes Auftreten präkanzeröser Läsionen in Umgebung des Primärtumors, welche klinisch oft nicht von gesundem Gewebe zu unterscheiden sind. Es zeigen sich möglicherweise Leukoplakien, Schleimhautatrophien oder auch ein völlig unauffälliger klinischer Befund in der Umgebung des Primarius. Die Theorie, dass ein weitläufiger Bereich an Gewebe durch ein Karzinogen maligne oder prämaligne verändert sein kann, entstand und damit auch der Begriff der Feldkanzerisierung (Slaughter *et al.* 1953). Dieses Prinzip beschränkt sich nicht nur auf Karzinome des Kopf-Hals-Bereiches sondern ist ein Phänomen vieler Karzinome (Ryser *et al.* 2016). Eine fehlende Resektion dieser prämaligen Läsionen führt zu einer hohen Rezidivrate des Tumors und damit einer schlechten Prognose (Poh *et al.* 2006; Ryser *et al.* 2016).

Synchrone Tumoren beschreiben das gleichzeitige Auftreten weiterer Malignome innerhalb von sechs Monaten der Erstdiagnose, meist in Bereichen, die ebenfalls Kontakt zur verursachenden Noxe haben. So können synchrone Tumoren eines Oropharynx-Karzinoms ebenfalls im Pharynx, jedoch auch weiter distal im Aerodigestivtrakt auftreten (Griffioen *et al.* 2015; Jain *et al.* 2013).

Metachrone Tumoren treten später als sechs Monate nach Erstdiagnose des Primärtumors auf (Jain *et al.* 2013).

In klinischen Studien wurde ein Auftreten von synchronen Karzinomen in 2,4-9,1% der Fälle beschrieben (Erkal *et al.* 2001; Jain *et al.* 2013; Robinson *et al.* 1995; Rennemo *et al.* 2011; Panosetti *et al.* 1989; Schwartz *et al.* 1994), das Auftreten von metachronen Karzinomen in 5,6-11,2% (Erkal *et al.* 2001; Panosetti *et al.* 1989; Schwartz *et al.* 1994). Im Vergleich hierzu treten synchrone sowie metachrone Mammakarzinome im Sinne von bilateralen Karzinomen in 2-11% aller Mammakarzinome auf (A. Ozturk *et al.* 2018; Pan *et al.* 2019). Hiervon wurden 63-87% als metachrone und 8-37% als synchrone Tumoren beschrieben (A. Ozturk *et al.* 2018; Jobsen *et al.* 2015). Die Zahlen für synchrone kolorektale Karzinome, gemessen an allen kolorektalen Karzinomen, liegen zwischen 0,7% und 1,3%, für metachrone Karzinome zwischen 1,6% und 8% (Samadder *et al.* 2014).

Ein interessanter Aspekt bezüglich syn- sowie metachroner Tumoren ist in den letzten Jahrzehnten in Bezug auf Oropharynxkarzinome aufgefallen: diese galten als Tumorlokalisation mit einem hohen Risiko für die Entwicklung syn- oder metachroner Karzinome. Mit dem Auftreten und der inzwischen hohen Fallzahl an HPV-positiven Oropharynxkarzinomen sank jedoch der relative Anteil an Oropharynxkarzinomen mit syn- oder metachronen Karzinomen. Die Vermutung liegt also nahe, dass das Prinzip der Feldkanzerisierung in deutlich geringerem Maße auf HPV-assoziierte Tumoren zutrifft. Vielmehr wird ein höheres Risiko an Zweit- Plattenepithelkarzinomen in der Genitalregion und umgekehrt vermutet (Jain *et al.* 2013; Nelson und Lai 2017; Sikora *et al.* 2009). Wichtig ist hier zu erwähnen, dass dies nur auf HPV-assoziierte Kopf-Hals-Tumoren bei Patienten mit blander Noxenanamnese zutrifft. Patienten mit HPV-positiven Oropharynxkarzinomen und blander Noxenanamnese haben vermutlich das niedrigste Risiko, syn- oder metachrone Karzinome zu entwickeln (Jain *et al.* 2013).

Je nach Lokalisation des Primärtumors treten Erstsymptome früh, jedoch häufig auch erst sehr spät im Krankheitsverlauf auf. Karzinome der Lippe, der Mundhöhle und auch Glottiskarzinome zeigen meist früher Symptome als andere Lokalisationen. Glottiskarzinome äußern sich durch eine früh einsetzende Heiserkeit, Karzinome der Lippe durch sichtbare Veränderung und Karzinome der Mundhöhle oft durch Oodynophagie. Larynxkarzinome anderer Lokalisationen hingegen (supra- sowie subglottische Karzinome) und auch Hypopharynxkarzinome werden häufig erst in bereits fortgeschrittenen Stadien symptomatisch. Heiserkeit ist hier ein Spätsymptom und weist auf eine ausgedehnte Situation der Erkrankung hin (Ridge *et al.* 2016; Argiris *et al.* 2008).

Bei 45% der Erkrankungen ist das Erstsymptom eine regionäre Metastasierung im Sinne einer oder mehrerer Halslymphknotenmetastasen. Eine Metastasierung in die Halslymphknoten reduziert das Fünf-Jahres-Überleben eines Patienten um 50% (Ridge *et al.* 2016). In zwei bis zehn Prozent der Fälle ist bei Erstdiagnose bereits eine Fernmetastasierung geschehen (Kuperman *et al.* 2011; Spector *et al.* 2001). Bei 50% der Patienten mit fortgeschrittener Tumorerkrankung (UICC III-IV) treten innerhalb von zwei Jahren nach Therapie lokoregionäre oder auch Fernmetastasen auf (Argiris *et al.* 2008). Eine Sonderrolle nimmt der sogenannte „Cancer of unknown primary“ oder auch CUP ein. Hierbei handelt es sich um eine meist im Zervikalbereich auftretende Lymphknotenmetastase oder seltener Fernmetastase eines Plattenepithelkarzinoms ohne Korrelat eines passenden Primärtumors.

Je nach Studienlage sind bis zu vier Prozent aller Kopf-Hals-Tumoren als CUP-Syndrom anzusehen (Herruer *et al.* 2020; Strojjan *et al.* 2013; Wallace *et al.* 2011). Fünf-Jahres-Überlebensraten liegen zwischen 43% und 53% (Balaker *et al.* 2012; Iganej *et al.* 2002; Issing *et al.* 2003). Eine zielgerichtete operative sowie adjuvante Therapie aufgrund der fehlenden Lokalisation des Primärtumors erschwert die Therapie.

Aufgrund der nicht unerheblichen Rate an synchronen Tumoren im Kopf-Hals-Bereich und zur weiteren Histologiesicherung des Primärtumors wird bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren bzw. dem Verdacht hierauf eine Panendoskopie mit Probenentnahme in Intubationsnarkose durchgeführt (Jain *et al.* 2013). Hierbei wird durch eine Pharyngoskopie, Laryngoskopie, Ösophagoskopie sowie teils Tracheobronchoskopie ein möglichst großflächiger Bereich der Schleimhäute des Kopf-Hals-Bereiches untersucht. Handelt es sich um ein zervikales CUP-Syndrom, also eine Metastase ohne Primarius, wird die Panendoskopie mit zahlreichen Probenentnahmen vor allem des Zungengrundes und – wenn noch vorhanden – mit einer beidseitigen Tonsillektomie durchgeführt, um eine möglichst hohe Wahrscheinlichkeit zu erreichen, den Primärtumor zu finden.

Zur weiteren Diagnostik zählen auch Staging-Untersuchungen in Form von computertomographischen Bildgebungen des Halses und des Thorax. Aufgrund der deutlich selteneren abdominellen Metastasierung wird ein CT des Abdomens nur in speziellen Fragestellungen durchgeführt.

Leidet der Patient nicht unter Fernmetastasen und erscheint der Primärtumor als operabel, so ist die Therapie der Wahl die chirurgische Entfernung des Tumors. Eine Tumorsektion, entweder mit oder ohne Laser sowie eine Ausräumung der Halslymphknoten (Neck Dissection), gilt als Goldstandard der operativen Therapie. Eine Ausräumung der Halslymphknoten kann einseitig und nur in bestimmten Halslymphknoten-Regionen durchgeführt werden, dies bezeichnet man als selektive Form. Eine beidseitige Ausräumung der Halslymphknoten aller Regionen ist die radikalere Form und kann auch die Resektion von Nerven, Muskeln und/oder Gefäßen des Halses mit sich ziehen. Das genaue Vorgehen bezüglich des Umfangs einer Neck Dissection ist abhängig von der Ausdehnung des Primärtumors sowie von möglicherweise vorhandenen Lymphknotenmetastasen, also von T- und N-Status.

Eine adjuvante Therapie im Sinne einer Bestrahlung oder auch einer Radiochemotherapie wird je nach Indikation nach durchgeführter operativer Therapie angeschlossen. Wichtig ist ein interdisziplinäres Vorgehen im gesamten Therapiekonzept. Patientenfälle werden in zertifizierten Tumorzentren im Rahmen von interdisziplinären Konferenzen im Beisein von Kopf-Hals-Chirurgen, Radiologen, Strahlentherapeuten, Pathologen und Onkologen diskutiert. Therapiekonzepte werden in Rücksicht auf Art, Ausdehnung und Metastasierungsgrad sowie Allgemeinzustand des Patienten erstellt. Vor allem bei CUP-Syndromen kann – wie bereits erwähnt – eine zielgerichtete Therapie erschwert sein, da der Primärtumor nicht bekannt ist. So ist teils ein deutlich weitreichenderes Bestrahlungsfeld nötig. Zu erwarten sind hier ausgeprägtere Therapiefolgen durch die Bestrahlung, unter anderem Xerostomie durch ein Untergehen des Speicheldrüsengewebes, Lymphödeme, chronische Schmerzsyndrome sowie Bewegungseinschränkungen im Kopf-Hals-Bereich.

Ein wichtiger weiterer Bestandteil der interdisziplinären Behandlung ist eine psychoonkologische Betreuung sowie Schlucktherapie, Logopädie und Physiotherapie.

Kopf-Hals-Tumoren sind nicht nur aufgrund der mäßigen Überlebensraten eine Gruppe gravierender Tumorerkrankungen – Patienten, die diese Erkrankungen überleben, leiden oft an Folgen der Therapie, die massive Auswirkungen auf die Lebensqualität haben. Da diese Tumoren in einer Region auftreten, welche hochfunktionell ist, sind operative sowie strahlentherapeutische Therapien oft mit einer nicht zu unterschätzenden Funktionseinschränkung verbunden. Allen voran ist der Verlust der physiologischen Lautbildung bei Laryngektomien durch fortgeschrittene Larynx- oder Hypopharynx-Karzinome zu nennen. Diese radikale operative Therapie bedeutet jedoch nicht nur den Verlust der physiologischen Sprachbildung, sondern auch die Notwendigkeit eines permanenten Tracheostomas als einzigen Atemweg. Damit verbunden sind eine fehlende Befeuchtung der Atemluft über die Nase und eine trockene Trachealschleimhaut mit möglicher Borkenbildung. Verlust von Geruchs- und Geschmackssinn, Dysphagie, Xerostomie durch operative Eingriffe und Strahlentherapie sowie auch kosmetische Beeinträchtigungen sind weitere relevante Folgen, mit welchen Patienten konfrontiert werden (Nelke *et al.* 2014).

Bei einer durch demographische Entwicklungen steigenden Inzidenz, neuen, gravierenden Risikofaktoren wie HPV, mäßigen Überlebensraten und greifbaren Kosten für die Gesellschaft durch Therapie, Rehabilitation und Fehltage am Arbeitsplatz gilt es, diese Erkrankungen früh zu erkennen und adäquat zu therapieren. Ein ausschlaggebendes Kriterium hierbei ist eine verlässliche Diagnostik. In der vorliegenden Arbeit wird eine vielversprechende Methode vorgestellt, Tumorgewebe zuverlässig, gewebeschonend und ohne die Notwendigkeit von histologischen Färbungen von gesundem Gewebe zu unterscheiden.

2.2 Die Extrazellulärmatrix und ihr Hauptbestandteil Kollagen

Kollagene bilden mit 30% der Gesamtmasse die Mehrheit des Proteins im menschlichen Körper und einen Hauptbestandteil der Extrazellulärmatrix (ECM) (Myllyharju und Kivirikko 2004). Bindegewebe besteht zu einem großen Teil aus Kollagen und jedes parenchymatöse Organ enthält ebenfalls Kollagen (Gelse 2003). Aktuell sind 28 verschiedene Kollagenarten in Wirbeltieren bekannt (Egeblad *et al.* 2010; Shoulders und Raines 2009). Sie werden hauptsächlich als Stütz- und Strukturproteine beschrieben, erfüllen jedoch eine Vielzahl weiterer Aufgaben. Unter anderem spielen Kollagene eine Rolle bei Zellmigration, und -adhäsion, sowie der Interaktion mit anderen Proteinen der Extrazellulärmatrix und Teilnahme an Signalfunktionen (Myllyharju und Kivirikko 2004; Karsdal *et al.* 2017; Nicol *et al.* 2018; Bonnans *et al.* 2014). Kollagen ist also weitaus mehr als nur ein Stützprotein und daher weit verbreitet von großem wissenschaftlichen Interesse.

Basierend auf der Struktur der Kollagene lassen sich verschiedene Subtypen unterscheiden. Diese beinhalten fibrilläre und netzbildende Kollagene, Kollagene der Basalmembran, fibrillenassoziierte Kollagene (sogenannte FACIT-Kollagene, „Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple Helices“) und Weitere (Gelse 2003; Shoulders und Raines 2009). FACIT-Kollagene bilden keine eigenen Fibrillen, sind jedoch an der Oberfläche von Kollagenfibrillen zu finden (Ricard-Blum 2011).

Alle Subtypen haben eine bestimmte Grundstruktur gemeinsam, eine Tripelhelix aus α -Ketten. Diese Tripelhelix kann entweder aus einem oder verschiedenen Subtypen zusammengesetzt sein. Besteht die Tripelhelix aus drei gleichen Subtypen, wie dies unter anderem bei den Typen II, III und VII der Fall ist, wird von einem Homotrimer gesprochen. Ein Heterotrimer hingegen liegt vor, wenn die Helix aus zwei oder mehr verschiedenen Subtypen zusammengesetzt ist. Die Typen I, IV, V und andere gehören zu dieser zweiten Gruppe. Fibrilläre Kollagene bestehen aus einer Tripelhelix-Domäne, wohingegen FACIT-Kollagene, Multiplexine und andere mehrere Domänen enthalten, die teilweise aus Nicht-Kollagenen bestehen (Ricard-Blum 2011). Mit einem Anteil von 90% an der Gesamtmenge des Kollagens bilden fibrillenartige Kollagene den weitaus größten Anteil. Hierzu gehören unter anderem die Typen I, II, IV, V und XI. Typ I ist hierunter der am stärksten vertretene Subtyp (Gelse 2003).

Tabelle 4: Übersicht über die bekannten Kollagenarten und ihr Vorkommen, frei nach (Gelse 2003) und (Fang et al. 2014)

Kollagentyp	Vorkommen
fibrilläre Kollagene	
I	Knochen, Dermis, Kornea, Sehnen, Ligamente
II	Knorpel, Glaskörper des Auges, Nucleus pulposus des Discus intervertebralis
III	Haut, Gefäßwand, retikuläre Fasern in Leber, Lunge, Milz, etc.
V	Lunge, Kornea, Knochen; gemeinsam mit Kollagen Typ I fetale Membranen
XI	Knorpel, Glaskörper des Auges
XXIV	Kornea, Knochen
XXVII	Knorpel
Kollagen der Basalmembran	
IV	Basalmembran
mikrofibrilläre Kollagene	
VI	Dermis, Knorpel, Gefäßwand, Placenta, Lunge, Discus intervertebralis
netzbildende Kollagene	
VIII	Endothelzellen, Descemet-Membran des Auges
X	hypertropher Knorpel
XVIII	Schwann-Zellen, Dermis, Nervus ischiadicus
fibrillenassoziierte Kollagene (FACIT)	
VII	Dermis, Harnblase
IX	Knorpel, Kornea, Glaskörper des Auges

XII	Perichondrium, Ligamente, Sehnen
XIV	Dermis, Sehnen, Gefäßwand, Placenta, Lunge, Leber
XIX	humanes Rhabdomyosarkom
XX	Epithel der Kornea, embryonale Haut, Sehnen, Knorpel des Sternums
XXI	Gefäßwand, Niere, Magen
XXII	Zellkontakte
XXVI	Hoden, Ovar
Kollagene mit Transmembrandomänen	
XIII	Epidermis, Haarfollikel, Endomysium, Chondrozyten, Lunge, Leber, Darm
XVII	dermal-epidermale Junktionszone
XXIII	Herz, Retina
XXV	Gehirn, Hoden, Herz
Multiplexine	
XV	Fibroblasten, glatte Muskelzellen, Niere, Pankreas
XVI	Fibroblasten, Amnion, Keratinozyten
XVIII	Lunge, Leber

Kollagene sind ein Hauptbestandteil der ECM, zu welcher außerdem weitere Bestandteile zählen, u.a. Proteoglykane und Tenascin (Bosman und Stamenkovic 2003; Hynes und Naba 2012). Die ECM unterteilt sich in zwei Hauptbestandteile: interstitielles Bindegewebe und Basalmembran (Hynes und Naba 2012). Das interstitielle Bindegewebe umgibt Zellen und übt eine Stützfunktion aus, die Basalmembran hingegen trennt die Epithelschicht vom Gewebestroma (Bonnans *et al.* 2014).

In gesundem Gewebe findet ein streng regulierter, ständiger Auf- und Abbau der ECM statt, das Gewebe befindet sich in Homöostase (Rozario und DeSimone 2010; Joyce und Pollard 2009). Diverse Erkrankungen gehen mit einem Ungleichgewicht der ECM-Zusammensetzung einher, der Zustand der Homöostase geht verloren. Dies wurde in Entzündungsvorgängen, fibrotischen Erkrankungen, *Osteogenesis imperfecta* und vielen weiteren Erkrankungen beobachtet (Cox und Erler 2011; Karsdal *et al.* 2017; Nicol *et al.* 2018).

Auch in vielen Karzinomen wurde eine Veränderung der ECM gegenüber gesundem Gewebe beschrieben (Birk *et al.* 2014; Chen *et al.* 2014; Heuke *et al.* 2016; Hompland *et al.* 2008; Wen *et al.* 2014). Desmoplasie, also eine Vermehrung von Bindegewebe und dadurch auch von Kollagen, wurde in Karzinomen festgestellt (Tilbury *et al.* 2014; Pupa *et al.* 2002). Diese Veränderungen können durch Second Harmonic Generation Imaging (SHG) als diagnostisches Werkzeug und zum besseren Verständnis der Vorgänge in Karzinomen genutzt werden.

Lange Zeit wurde der Fokus auf Veränderungen von Zellen und Zellverbänden in malignen Geschehen gelegt. Die klassische Pathologie basiert in der Tumordiagnostik auf der Interpretation von Zellarchitektur. Die Rolle der ECM wurde vernachlässigt. Mit der Kenntnis, dass Bestandteile der

ECM wie Kollagene nicht nur Stütz- und Stabilitätsfunktionen haben, sondern an Signalwegen, Zellmigration und weiteren Vorgängen beteiligt sind (Rozario und DeSimone 2010; Walker *et al.* 2018), rücken diese auch in den Vordergrund hinsichtlich des Verständnis maligner Geschehen. So wurde festgestellt, dass eine Veränderung der ECM und genauer des Kollagens Typ I Einfluss auf die Zellinvasion in malignen Tumoren hat (Sapudom *et al.* 2015; Chen *et al.* 2019). Nadiarnykh *et al.* stellen Veränderungen der ECM in malignen Geweben sogar als möglichen Biomarker bezogen auf die Invasivität eines Tumors vor (Nadiarnykh *et al.* 2010). Eine genauere Betrachtung dieser Strukturen kann neue Erkenntnisse bezüglich Karzinomentstehung, -wachstum und Metastasierung erbringen (Cox und Erler 2011).

2.3 Grundlagen zur Tumorigenese und die Rolle der Extrazellulärmatrix

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Messung und Quantifizierung von Veränderungen der ECM, genauer des Kollagens zwischen gesundem und malignem Gewebe. In diesem Unterkapitel soll ein Überblick über das Tumorgeschehen gegeben und genauer darauf eingegangen werden, warum die ECM in diesem Prozess von Interesse ist.

2.3.1 Theorien der Tumorentstehung

Hanahan und Weinberg definierten im Jahr 2000 die Entstehung maligner Neoplasien als komplexen Ablauf von sechs verschiedenen Schritten: dauerhafte Veränderung von proliferativen Signalwegen, Sensibilitätsverlust gegenüber antiproliferativer Signalwege, Resistenz gegenüber Apoptose, verstärkte Angiogenese, unlimitierte Replikation sowie Gewebeinvasion und Metastasierung (Hanahan und Weinberg 2000). Zehn Jahre später ergänzen sie diese um zwei weitere: ein Umprogrammieren des Energiestoffwechsels zur Anpassung an das Mikromilieu und die Vermeidung einer Immunantwort auf veränderte Zellen (Hanahan und Weinberg 2011). Diese Schritte sollen, zwar in Chronologie und genauem Mechanismus variierend, in allen Geweben, die maligne entarten, ablaufen. Die genannten Abläufe beeinflussen nicht nur die Tumorzellen an sich, sondern das gesamte Mikromilieu inklusive umliegender Gefäße, Extrazellulärmatrix, Immunzellen und Weitere (Hanahan und Weinberg 2000, 2011).

Zwei Theorien zur Tumorentstehung sind heutzutage verbreitet: die klonale Selektionstheorie und die Tumorstammzelltheorie. Die klonale Selektionstheorie, erstmalig beschrieben von Nowell 1976, beschreibt den Selektionsvorteil einer einzigen, neoplastisch veränderten Zelle gegenüber allen anderen Zellen (Nowell 1976). Diese Veränderungen entstehen durch multiple, in derselben Zelle ablaufende genetische Mutationen. Die neoplastische Veränderung kann so entweder sofort oder mit einer gewissen Latenz voranschreiten und zu einer Krebserkrankung führen. Neoplasie wird hier als das Ausbrechen einer Zelle aus normalerweise regulierten Wachstumsbedingungen beschrieben

(Nowell 1976). Im Laufe der Tumorprogression entstehen durch genetische Instabilität und unkontrollierte Proliferation weitere neoplastische Zellen und kreieren so eine Heterogenität innerhalb des Tumors (Campbell und Polyak 2007).

Das Modell der Tumorstammzellen hingegen geht von einer hierarchischen Organisation innerhalb von Tumorzellen aus, in der nicht alle Zellen das gleiche onkogene Potential haben. An der Spitze dieser Hierarchie stehen stammzellähnliche, sogenannte Tumor-induzierende Zellen (TICs), welche das Tumorwachstum unterhalten (Visvader und Lindeman 2008; Reya *et al.* 2001). TICs haben die Fähigkeit zur unlimitierten Erneuerung und zur Differenzierung, ähnlich den embryonalen Stammzellen (Campbell und Polyak 2007). Die ersten Beweise dieser Theorie wurden durch Untersuchungen von akuter myeloischer Leukämie erbracht, in welcher der hierarchische Aufbau der Erkrankung erkannt wurde. Hier konnte eine Subpopulation von AML-Zellen (akute myeloische Leukämie) mit den Oberflächenproteinen $CD34^+/CD38^-$ nach Xenotransplantation immunsupprimierter Mäuse einen Ausbruch der Erkrankung bewirken, AML-Zellen mit anderen Oberflächenproteinen jedoch nicht (Bonnet und Dick 1997; Lapidot *et al.* 1994). Beide Theorien finden Anwendung in der aktuellen Forschung und sind mögliche Erklärungen für die Tumorentstehung. Ein Einfluss beider grundsätzlichen Annahmen der vorgestellten Theorien im Verlauf der malignen Transformation ist ebenfalls diskutiert. So könnten TICs im Verlauf der Tumorprogression weitere Mutationen erwerben, die u.a. das metastatische Potential dieser Zellen beeinflusst.

Die Entstehung von Tumoren ist also ein komplexer Vorgang, der weiterhin Gegenstand aktueller Forschung ist. Es entsteht jedoch auch ein immer größeres Interesse an der Umgebung maligner Zellen, also dem Mikromilieu eines Tumors. Die Vermutung, dass solch komplexe Abläufe wie oben genannt, nicht rein durch Zellveränderungen der Tumorzellen geschehen können, liegt nahe. So rückt die Rolle der Extrazellulärmatrix weiter in den Vordergrund.

2.3.2 Epithelial-mesenchymale Transition

Die epithelial-mesenchymale Transition, kurz EMT genannt, ist ein zentraler Mechanismus zur Diversifizierung von Zellen in Gewebe. In der Embryogenese ist EMT klar definiert als wichtiger Schritt der Gastrulation. Zellen des frühen Endoderms vollziehen im Rahmen der Gastrulation eine EMT, um innerhalb des sich entwickelnden Embryos zu migrieren und zur Bildung der drei Keimblätter beizutragen (Nieto *et al.* 2016). EMT ist jedoch auch ein wichtiger Mechanismus der Organogenese, Fibrose und metastatischen Kaskade (Kalluri und Weinberg 2009; Kalluri und Neilson 2003; Tsai und Yang 2013). Zellen verlieren ihre epithelialen Eigenschaften und adoptieren mesenchymale Zellcharaktere. EMT beschreibt einen Verlust der apiko-basalen Polarität von Epithelzellen, eine variabelere Zellmorphologie und damit eine erleichterte Mobilität innerhalb des Gewebes durch verschiedenste molekulare und biochemische Veränderungen (Kalluri und Weinberg 2009). Zytokeratine, typisch in Epithelzellen vorkommend, sowie Desmosomen und *Tight Junctions* im Epithel werden in ihrer Expression reduziert, Matrix-Metalloproteinasen hingegen verstärkt exprimiert, um ein Durchwandern der Zellen durch die Basalmembran zu erleichtern (Kalluri und Weinberg 2009).

Die Synthese der ECM konzentriert sich vermehrt auf die Bildung von interstitieller ECM anstatt der Basalmembran. EMT unterliegt einer Regulation durch lösliche Faktoren wie dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) und dem Transforming Growth Factor beta (Nieto *et al.* 2016). Die Expression von EMT-induzierenden Transkriptionsfaktoren, unter anderem SNAIL, TWIST und ZEB wird erhöht, hierüber ändert sich auch des Genexpressionsprofil der Zellen, die E-Cadherin-Expression wird vermindert und EMT wird ermöglicht (Nieto *et al.* 2016). Nicht nur eine direkte Repression von E-Cadherin durch EMT-Transkriptionsfaktoren ermöglicht den phänotypischen Wechsel, sondern zahlreiche andere Mechanismen auf Genexpressionsebene wie die Aktivierung mesenchymaler Gene, die eine zelluläre Umprogrammierung ermöglichen (Ocaña *et al.* 2012). Diese verschiedenen Mechanismen definieren die epithelial-mesenchymale Transition (Hugo *et al.* 2007; Hay 1995; Kalluri und Neilson 2003; Thiery *et al.* 2009; Lambert *et al.* 2017).

Auch eine Reversion der EMT, also eine mesenchymal-epitheliale Transition (MET), wird als ein zentraler Aspekt der Tumordinvasion und Metastasierung betrachtet. Durch EMT erreichen Zellen einen invasiven Phänotyp, welcher ihnen erlaubt, zu disseminieren und damit erste Schritte der Metastasierung zu vollziehen. Die metastasierten Zellen müssen jedoch wieder Charakteristika des Primärtumors annehmen, um eine solide Metastase bilden zu können. Dies ist der Zeitpunkt, bei dem eine MET zur Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten und zur erhöhten Proliferation verhilft (Hugo *et al.* 2007). Das Modell der EMT/MET ist dabei kein rigides Konzept, in welchem sich eine Zelle entweder in einem epithelialen oder mesenchymalen Status befindet. Vielmehr ist es als dynamisches und transientes Modell anzusehen, Zellen können sich gewisse mesenchymale Eigenschaften aneignen, währenddessen sie andere epitheliale Eigenschaften beibehalten (Lambert *et al.* 2017). Man spricht hier von einer partiellen EMT (pEMT). Es handelt sich also um einen komplexen Vorgang mit einer großen Variabilität und Plastizität innerhalb der betroffenen Zellen.

Während der EMT und auch MET findet eine bimodulare Kommunikation zwischen den Zellen, der ECM, den umgebenden Immunzellen, Fibroblasten und Weiteren statt (Tse und Kalluri 2007). Dies zeigt die hohe Dynamik der Tumorzellen und ihres Mikromilieus.

2.3.3 Das Tumor-Mikromilieu

Das Tumor-Mikromilieu umfasst alle umgebenden Strukturen des Tumors, unter anderem Immunzellen, Fibroblasten und auch die ECM (Venning *et al.* 2015). Eine Veränderung des Mikromilieus kann zu einer Erleichterung der Tumorprogression und des Metastasierungs Vorganges führen. Eine veränderte Zusammensetzung der ECM und auch des Kollagens ist in malignen Tumoren zu erkennen (Kauppila *et al.* 1998; Zhu *et al.* 1995; Ramaswamy *et al.* 2003; Lu *et al.* 2012). Diese Veränderungen sind jedoch vielfältig: es wird von Desmoplasie, also einer Erhöhung der Kollagenmenge berichtet (Tilbury *et al.* 2014; Pupa *et al.* 2002) aber auch von einer verminderten Kollagenmenge im Vergleich zu gesundem Gewebe (Curino *et al.* 2005; Wolf *et al.* 2007) und auch einer vermehrten Quervernetzung der Fibrillen (Levental *et al.* 2009). Diese Veränderungen können unter dem Begriff des *Remodelings* zusammengefasst werden (Adur *et al.* 2014). *Remodeling* in maligne entartetem Gewebe dient der erleichterten Tumorprogression und -invasion. An diesem Prozess sind zahlreiche Strukturen beteiligt, unter anderem Enzyme wie Metalloproteinasen, die in

der Lage sind, das hochstabile Kollagen Typ I und auch andere Kollagene abzubauen (Hotary *et al.* 2000; Friedl und Gilmour 2009). Metalloproteinasen sind die wichtigsten Enzyme in Bezug auf den Abbau von ECM. Ihre Aktivität steigt in verletztem Gewebe bei Reparaturvorgängen, in entzündetem Gewebe und auch im Rahmen eines *Remodelings* in Neoplasien (Bonnans *et al.* 2014). Durch diese Enzyme können unter anderem Kollagenfibrillen derart neu angeordnet werden, um als „Pfad“ für Tumorzellen zu dienen und dadurch eine Invasion zu erleichtern (Friedl und Wolf 2008). Ruokolainen konnte einen Zusammenhang zwischen der Aktivität der Matrix-Metalloproteinase-9 und dem Überleben von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren aufzeigen. Patienten mit einer hohen Expression von MMP-9 zeigten ein signifikant niedrigeres Fünf-Jahres-Überleben als Patienten mit einer niedrigen Expression (Ruokolainen 2004).

Mit all diesen Erkenntnissen liegt die Vermutung nahe, dass eine Tumorerkrankung und Metastasierung durch veränderte ECM erleichtert wird (Venning *et al.* 2015).

Die ECM ist daher von großem diagnostischem Interesse hinsichtlich Tumorerkrankungen und erweitert den Blick auf die Dynamik und Reichweite der Veränderungen in malignen Neoplasien. Ein Miteinbeziehen der ECM in die Tumorforschung zeigt, dass die Komplexität dieses Bereichs weitreichender ist als bei reinem Betrachten auf Zellebene. Jedoch ergeben sich hieraus auch neue Chancen auf ein breiteres Verständnis der Abläufe im Tumorgeschehen.

2.4 Mehrphotonen-Mikroskopie: Second und Third Harmonic Generation Imaging

Die klassische Lichtmikroskopie, sowie auch konfokale Mikroskopie und prinzipiell jedes optische Phänomen im Alltag unterliegen den Regeln der linearen Optik: ein Kontrast entsteht bei der Interaktion von Licht mit Materie. Es kommt zu Reflexion, Absorption, Streuung und weiteren Effekten, jedoch nie zu einer Änderung der Wellenlänge des Lichts (Helmchen und Denk 2005). Lichtwellen beeinflussen sich nicht gegenseitig. Dies kann jedoch bei ausreichend hohen Lichtintensitäten auftreten, im Sinne nichtlinearer Optik.

SHG und THG sind Teil besagter nichtlinearer optischer Phänomene. Es handelt sich hierbei um eine Frequenzverdopplung bzw. -verdreifachung: zwei oder drei Photonen (Wellenlänge in dieser Arbeit typischerweise ≥ 800 nm oder ≥ 1200 nm) werden kohärent an einer Struktur gestreut und bilden nunmehr ein Photon (Provenzano *et al.* 2006; Burke *et al.* 2013). Dieses Photon besitzt nur noch die halbe oder ein Drittel der ursprünglichen Wellenlänge (Abbildung 1, S. 24). Es kommt also zu einer Vervielfachung der Frequenz, der Bildung sogenannter Harmonischen. Im Gegensatz zur linearen Optik verändert sich hier also die Wellenlänge des ausgesandten Lichtes. Die Änderung der Wellenlänge durch Nichtlinearität ermöglicht eine Darstellung von bestimmten Strukturen im Bereich von sichtbaren Wellenlängen (Aptel *et al.* 2010). Voraussetzung für die nichtlineare Optik sind hohe Lichtintensitäten, welche durch einen gepulsten Laser ermöglicht werden (Dela Cruz *et al.* 2010).

Erstmalig wurde SHG in der Theorie von Maria Göppert-Mayer 1931 beschrieben. Sie vermutete „[...]“, dass eine Wahrscheinlichkeit dafür besteht, dass ein angeregtes Atom seine Anregungsenergie in zwei Lichtquanten aufteilt, deren Energien in Summe die Anregungsenergie ergeben [...]“ (Göppert-Mayer 1931). Praktisch durchgeführt wurde diese Idee erstmalig von Kleinman *et al.* 1962 (Kleinman 1962). Somit ist Higher Harmonic Generation kein Phänomen, welches erst vor Kurzem nachgewiesen wurde. Hellwarth *et al.* integrierten schließlich 1974 SHG erstmals in ein Mikroskop, um die kristalline Struktur von Zinkselenid zu untersuchen (Hellwarth und Christensen 1974). Seitdem gewinnt SHG und auch THG stetig an wissenschaftlichem Interesse und wird von zahlreichen Arbeitsgruppen verwendet.

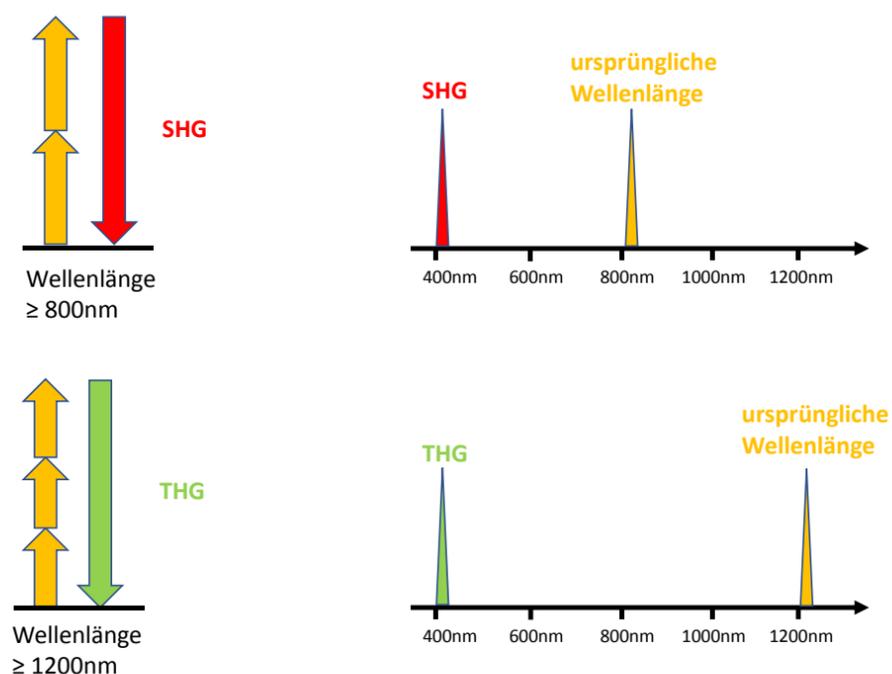


Abbildung 1: Second und Third Harmonic Generation Imaging. Prinzip der Frequenzverdopplung (SHG, rot, oben) und Frequenzverdreifung (THG, grün, unten) mit jeweiligen Wellenlängen, frei nach (Aptel *et al.* 2010)

Die Kohärenz des einstrahlenden mit dem austretenden Licht unterscheidet SHG/THG von Fluoreszenz. Hierbei werden die Moleküle der bestrahlten Materie angeregt, dies passiert bei SHG/THG nicht. Die Energie, die auf das Gewebe trifft, wird vom Gewebe im Wesentlichen nicht aufgenommen und erzeugt somit keinen Energieaustausch mit dem Gewebe. Phototoxizität sowie ein Bleicheffekt des Gewebes sind deutlich geringer als beispielsweise bei der Fluoreszenzmikroskopie (Campagnola und Loew 2003; Zipfel *et al.* 2003b; Green *et al.* 2017). Zusätzlich ist durch die Wellenlänge des Lasers im nahen Infrarotbereich eine Eindringtiefe von mehreren Hundert Mikrometern mit diesem optischen Verfahren möglich (Campagnola *et al.* 2002; Campagnola und Loew 2003). Die Schonung des Gewebes und große Eindringtiefen eröffnen zusätzlich eine *in vivo* Anwendung dieses Verfahrens. Dies wurde bereits mehrfach von diversen Arbeitsgruppen erfolgreich durchgeführt (Brown *et al.* 2003; Wu *et al.* 2015; Song *et al.* 2016). Ein weiterer Vorteil der SHG- und THG-Mikroskopie ist die Möglichkeit der Kombination mit weiteren optischen Verfahren wie Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie (TPEF) oder Coherent Anti Stokes Raman Scattering-Mikroskopie (CARS) (Campagnola und Loew 2003), auf welche in dieser Arbeit jedoch nicht weiter eingegangen werden soll. Durch unterschiedliche Detektoren können diese

verschiedenen optischen Verfahren gleichzeitig ablaufen. So kann ein maximaler Informationsgewinn aus Gewebeproben und auch aus vitalem Gewebe erzielt werden.

Die Entstehung der Frequenzverdopplung (SHG) basiert auf der dielektrischen Hyper-Suszeptibilität $\chi^{(2)}$, eine Materialkonstante, welche nur in nicht-inversionssymmetrischen Anordnungen von Molekülen einen Wert ungleich Null annimmt (Tilbury und Campagnola 2015). Ihr Wert ist üblicherweise in Kollagen sowie Myosin und Mikrotubuli relativ hoch (Green *et al.* 2017). SHG kann also nur an Strukturen mit den geeigneten geometrischen Eigenschaften auftreten (Tilbury und Campagnola 2015; Campagnola *et al.* 2002).

Die Stärke des SHG-Signals ist abhängig von der Anordnung, Menge und dem Durchmesser der Kollagenfasern (Conklin *et al.* 2011; Wu *et al.* 2015; Plotnikov *et al.* 2006). Gleichmäßige, linear angeordnete Fasern erzeugen ein stärkeres Signal als ungeordnete Fasern. So kann Gewebe mit wenig, jedoch sehr gleichmäßig angeordneten Kollagenfasern ein intensiveres Signal erzeugen als Gewebe mit vielen, jedoch ungeordneten Fasern (Conklin *et al.* 2011). THG entsteht an Membrangrenzen und optischen Inhomogenitäten (Adur *et al.* 2011; Aptel *et al.* 2010; Rehberg *et al.* 2011; Oron *et al.* 2004). Starke THG-Signale werden vor allem an Grenzen zwischen einem Medium mit hohem Fettgehalt und einem Medium mit hohem Flüssigkeitsgehalt generiert. Homogene Medien hingegen emittieren kaum Signale (Aptel *et al.* 2010). Somit kann THG prinzipiell an jeder Membrangrenze generiert werden, es sind keine speziellen Symmetrievoraussetzungen wie bei SHG nötig. Grundsätzlich ist SHG- bzw. THG-Mikroskopie mit verschiedensten Ausgangs-Wellenlängen möglich (Weigelin *et al.* 2016). Mit einer Wellenlänge ≥ 800 nm für SHG und ≥ 1200 nm für THG befindet man sich jedoch im Nah-Infrarotbereich und bei einer Halbierung bzw. Drittelung dieser Werte im optimalen Wellenlängenbereich für das menschliche Auge und entscheidet sich somit für diese Wellenlängen.

Zusammengefasst bietet das Feld der nichtlinearen Optik und speziell Higher Harmonic Generation wie SHG und THG zahlreiche Vorteile gegenüber linearer Optik: Eindringtiefen von mehreren Hundert Mikrometern durch Wellenlängen im Nah-Infrarotbereich, geringe Phototoxizität sowie kaum Bleichung durch eine fehlende energetische Anregung des Gewebes sowie eine Unabhängigkeit von Färbemethoden durch die Nutzung endogener Kontraste wie Symmetrieeigenschaften.

2.5 Kollagen und Second Harmonic Generation Imaging

Fibrilläre Kollagene zeigen durch ihre nicht-inversionssymmetrische Struktur optimale Voraussetzungen für eine Darstellung mittels SHG-Mikroskopie. Vor allem die Subtypen I und II generieren ein starkes SHG-Signal (Ranjit *et al.* 2015; Rehberg *et al.* 2011). Kollagen Typ I ist das im menschlichen Körper am häufigsten vorkommende Kollagen (Nicol *et al.* 2018) und eignet sich aufgrund der Menge in menschlichem Gewebe und der geometrischen Gegebenheiten außerordentlich gut für die SHG-Mikroskopie. Zusätzlich ist die bei zahlreichen Pathologien auftretende Veränderung der ECM im Allgemeinen und Kollagen im Speziellen von immer größerem Interesse. Die Rolle der Extrazellulärmatrix in der Tumorprogression wird weiterhin geklärt und ist Gegenstand aktueller Forschung (Cox und Erler 2011; Devendra *et al.* 2018). Es lässt sich jedoch

bereits zeigen, dass Veränderungen der Bestandteile der ECM gravierenden Einfluss auf Tumorprogression und Metastasierung haben (Ruokolainen 2004; Chen *et al.* 2019). So kann eine verlässliche, detaillierte Interpretation von Kollagenfasern hilfreiche Erkenntnisse in Bezug auf das Verständnis von Tumorerkrankungen erbringen. All diese Punkte zeigen, dass das SHG-Imaging von fibrillärem Kollagen höchst interessant und vielversprechend ist.

3 Zielsetzung

Die Extrazellulärmatrix ist ein essenzieller Aspekt der Tumorigenese: sie kann als Barriere bei der Tumorinvasion dienen, diese jedoch auch erleichtern. Signalwege können – durch die ECM initiiert – einen großen Einfluss auf die Tumorentstehung und auch Metastasierung nehmen. Veränderungen bestimmter Bestandteile der ECM, wie des Kollagens, könnten durch spezifische Veränderungen als Biomarker verschiedener Tumorarten dienen. Noch liegt das Hauptaugenmerk der Diagnostik von Tumoren auf Veränderungen der Zellen, weniger auf dem umliegenden Gewebe der ECM. Diese kann jedoch weitere nützliche Erkenntnisse bezüglich der Entstehung, Invasion und Metastasierung von Tumoren erbringen. Als Hauptbestandteil der ECM ist hier das Kollagen von besonderem Interesse und im Zentrum dieser Arbeit. Nichtlinear optische Verfahren wie Higher Harmonic Generation ermöglichen seit mehreren Jahrzehnten eine detaillierte Beurteilung von Gewebe, SHG vor allem von nicht-inversionssymmetrischen Strukturen wie fibrillärem Kollagen. Dies ist von hohem klinischen Interesse, da es sich um ein gewebeschonendes Verfahren handelt, welches ohne Färbung hochspezifisch Kollagen darstellt. *In vivo*-Mikroskopie ist gewebeschonend möglich und wurde bereits mehrfach erfolgreich durchgeführt. Ein klinischer Gebrauch dieser Art von Mikroskopie, unter anderem auch im Sinne einer Mikroendoskopie, ist aktuell in der Erprobung und äußerst vielversprechend.

Diese Arbeit dient der Darstellung dieses optischen Verfahrens und sowie der möglichen Anwendung im klinischen Gebrauch.

Folgende Ziele wurden definiert:

- Darstellung von Kollagen mittels SHG und Zellverbänden mittels THG von Tumorgewebe (n=10) sowie gesunder Schleimhaut (n=10) an einem Mehrphotonen-Mikroskop
- Vergleich der erhaltenen SHG- und THG-Signale mit etablierten Färbungen (Immunhistologie und Elastica van Gieson)
- Interpretation des fibrillären Kollagens in oben genanntem mittels f/b-Ratio

4 Material und Methoden

4.1 Versuchsaufbau

Der Ablauf der Experimente ist in folgender Abbildung dargestellt:

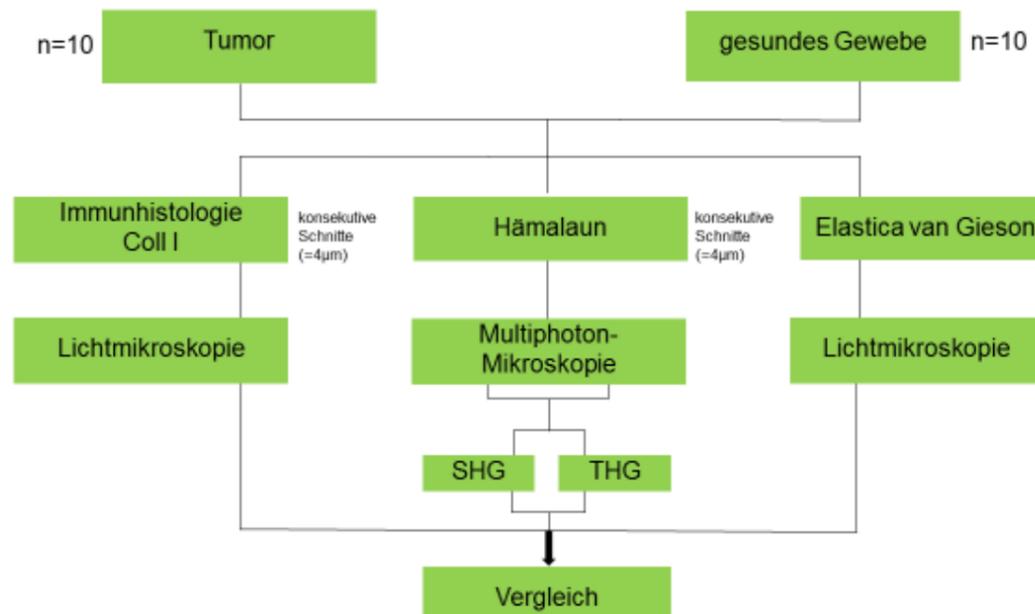


Abbildung 2: Ablauf der Experimente

Insgesamt wurde Gewebe von zehn Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren untersucht, dabei handelt es sich um acht Oropharynxkarzinome sowie zwei Hypopharynxkarzinome. Es wurden zwei Gewebeproben pro Patienten untersucht, jeweils tumoröse und gesunde Schleimhautabschnitte, also insgesamt 20 Proben. Die verschiedenen histologischen Schnitte wurden für die Untersuchung am Lichtmikroskop immunhistologisch mit Coll-1-Antikörper und mit Elastica van Gieson gefärbt, für die Untersuchung am Mehrphotonen-Mikroskop mit Hämalaun. Es wurde darauf geachtet, sukzessive Schnitte zu verwenden, um einen genaueren Vergleich zu ermöglichen.

4.2 Mehrphotonen-Mikroskop

Das in dieser Arbeit verwendete Mehrphotonen-Mikroskop bestand aus einem TriM Scope, einer Mehrphotonen-Mikroskop-Plattform (LaVision Biotec, Bielefeld), kombiniert mit einem Olympus BX51 Mikroskop (Olympus, Hamburg) und einem gepulsten Femtosekunden-Titan-Saphir-Laser (Coherent, Dieburg). Der Laser ist in der Lage, Wellenlängen zwischen 500 nm und 900 nm zu generieren. Ein OPO, also ein optisch-parametrischer Oszillator (APE, Berlin), welcher die Wellenlänge auf bis zu 1300 nm verlängern kann, wurde bei Bedarf für die Generierung der THG-Signale eingesetzt. Für alle

Experimente wurde ein Olympus 20x/0.95 W Objektiv mit einer Arbeitsdistanz von zwei Millimetern verwendet. Photomultiplier (Hamamatsu Photonics, Japan) in Kombination mit entsprechenden Filtern wurden zur Detektion der Signale eingesetzt. Detektoren, welche die vorwärts- und rückwärts gerichteten Signale aufnehmen, sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Tabelle 5: Die drei verwendeten Detektoren des Mehrphotonen-Mikroskops mit detektiertem Wellenlängenbereich und Richtung des Signalempfangs

Detektierter Wellenlängenbereich	Richtung des Signalempfangs
417-477 nm	rückwärts gerichtet
F417-477 nm	vorwärts gerichtet
584-664 nm	rückwärts gerichtet

Die Einstellung der Detektoren sowie Intensität und Wellenlängen des Lasers wurden für alle Gewebeproben gleich gewählt und unverändert genutzt, um eine Vergleichbarkeit der Signale zu gewährleisten.

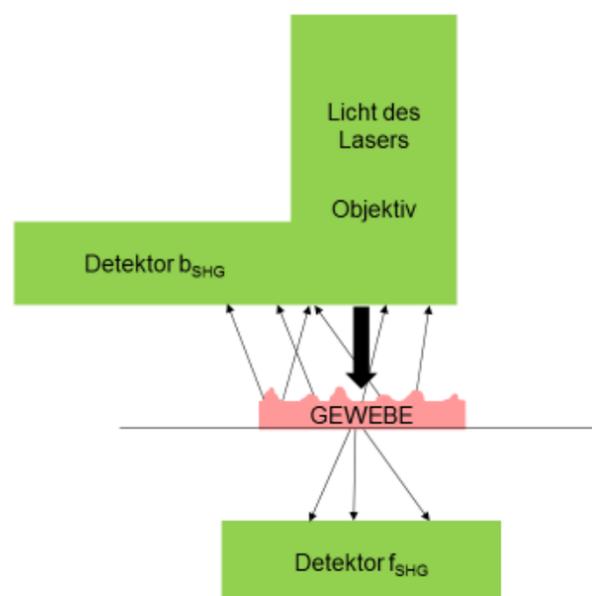


Abbildung 3: Schematischer, vereinfachter Aufbau des Mehrphotonen- Mikroskops und der Streuung der Photonen. Detektor b_{SHG} ist rückwärts gerichtet (backward), Detektor f_{SHG} vorwärts gerichtet (forward).

4.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 6: In der Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller
Corning® Costar® Stripette	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Einmalglaspipetten	Costar, New York (USA)

Handschuhe Peha-Soft Latex	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Objektträger „Super Frost“	Nunc, Wiesbaden
Parafilm	Nunc, Wiesbaden
Pipettenspitzen	Starlab, Hamburg
Reagenzreservoir	Costar, New York (USA)
Safe Seal Tips Professional	Biozym, Hessisch Oldendorf
Sterilfilter	Millipore, Wiesbaden
Einbettmedium Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn (NL)
Zentrifugengefäße 15 mL/ 50 mL	Becton Dickinson, Heidelberg

4.4 Weitere Geräte

Tabelle 7: In der Arbeit verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklave-System Systec 95	Systec GmbH, Wettenberg
Einkanalpipette „Transferpette“	Brand GmbH, Wertheim
Gefrierschrank (-20 °C, -80 °C)	Liebherr, Ochsenhausen
Kühlschrank (4 °C)	Liebherr, Ochsenhausen
Magnetrührer mit Heizblock	Janke & Kunkel, Staufen
Mikroliter Pipetten	Gilson Inc., Middleton (USA)
pH-Meter	WTW, Weilheim
Sicherheitswerkbank HLB 2448 GS	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Vortex Mixer	IKA Works Inc., Wilmington (USA)
Waage CP 4202 S	Sartorius, Göttingen
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg

4.5 Präparation der Gewebeproben

Das Gewebe wurde direkt nach der operativen Entfernung schockgefroren. Mithilfe von Tissue-Tek® O.C.T.™ wurden die Präparate eingebettet in einem Kryostaten bei -20 °C vier Mikrometer dick geschnitten und direkt auf Objektträger aufgetragen. Nach Trocknung und Fixierung mit Aceton waren die Schnitte bereit zur weiteren Verwendung.

4.6 Färbungen und Antikörper

Tabelle 8: Durchgeführte Färbungen

Färbung	Bestandteile	Hersteller
Hämalaun	Hämalaun	Merck KGaA, Darmstadt
Elastica van Gieson	Resorcin-Fuchsin Pikrofuchsin Salzsäure Alkohol einprozentig Weigert Eisenhämatoxylin (Ethanol, Hämatoxylin)	Morphisto
Immunhistologie Kollagen Typ 1	Anti-Coll-I-Antikörper biotinylierter anti-Maus-Antikörper Brij© 15% Pferdeserum	Abcam (ab21286) Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen

4.6.1 Immunhistologie

Konventionelle Immunhistologie wurde angewandt, um Kollagen-Typ-1-Stränge im Gewebe erkennbar zu machen. Dieser Kollagen-Subtyp zeichnet sich durch eine nicht-inversionssymmetrische Struktur aus, welche eine Voraussetzung für das Imaging mit SHG ist (Ranjit *et al.* 2015).

Tabelle 9: Verbrauchslösungen Immunhistologie

Lösung	Zusammensetzung
PBS	8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g Na ₂ HPO ₄ , 0,2 g KH ₂ PO ₄ in 1 L
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Pferdeserum	1:100, 200 µl pro Präparat

1. Antikörper Coll 1	1:100, in PBS, 100 µL pro Präparat
2. Antikörper bioM	1:100, in TRIS, 100 µL pro Präparat
Hämalaun	100 mL Hämalaun gefiltert + 5 µL Natriumacetat
3-Amino-9-ethyl-Carbazol	Eine Tablette in Natriumacetat + 100 µL H ₂ O ₂

Färbeprotokoll:

Tabelle 10: Färbeprotokoll Immunhistologie

Lösung	Dauer/min	Vorgang
Ø	30	Auftauen
Aceton	5	Fixieren
Ø	10	Lufttrocknen
Paraformaldehyd	5	Fixieren
PBS	1	Spülen
PBS	5	Spülen
PBS	5	Spülen
PBS	5	Spülen
500 µL H ₂ O ₂ in PBS	5	Zerstören der endogenen Peroxidase
PBS	5	Spülen
Pferdeserum	30	Blockieren unspezifischer Bindungen
Coll 1	120	Binden des ersten Antikörpers
PBS	1	Spülen
PBS	5	Spülen
PBS + Detergenz Brij©	5	Herabsetzen der Oberflächenspannung
bioM	30	Binden des zweiten Antikörpers
PBS	1	Spülen
PBS	5	Spülen
PBS	5	Spülen
PBS + Brij©	Ø	Herabsetzen der Oberflächenspannung
ABC	30	Markieren
PBS	5	Spülen
PBS	5	Spülen
3-Amino-9-ethyl-carbazol-Tablette in Natriumacetat + 100 µL H ₂ O ₂	5	Färben
Aqua nondest.	10	Spülen
Hämalaun + Ammoniak+ Aqua dest.	Ø	Gegenfärben
Aqua dest.	1	Spülen
Aqua dest.	1	Spülen
Aqua nondest.	2-5	Spülen
Eindeckmittel Gelatine	Ø	Eindecken

4.6.2 Elastica van Gieson

Durch die Immunhistologie wird Kollagen Typ I dargestellt, durch SHG fibrilläres, nicht inversionssymmetrisches Kollagen (v.a. Typ I, II). Um einen Eindruck des gesamten in den Präparaten vorhandenen Kollagens zu erhalten, ist jedoch eine andere Färbung nötig. Die Elastica van Gieson-Färbung färbt Kollagenfasern unabhängig vom Fasertyp an. Sie dient hauptsächlich zur Unterscheidung zwischen Kollagen- und elastischen Fasern (Kazlouskaya *et al.* 2013). Hier ist sie jedoch nützlich, um das gesamte Kollagen in den Präparaten sichtbar zu machen, unabhängig vom Fasertyp.

Färbeprotokoll:

Tabelle 11: Färbeprotokoll Elastica van Gieson

Lösung	Dauer/min	Vorgang
Ø	30	Auftauen
Ethanol 96%, vergällt	2	Wässern
Ethanol 80%, vergällt	2	Wässern
Ethanol 70%, vergällt	2	Wässern
Paraformaldehyd	5	Fixieren
Aqua nondest.	1	Spülen
Resorcin-Fuchsin	20	Elasticafärbung
Aqua nondest.	1	Spülen
Weigerts Eisenhämatoxylin	15	Kernfärbung
Aqua nondest.	10	Auswaschen
Aqua dest.	5	Spülen
Pikrofuchsin	5	Färben
Aqua dest.	5	Spülen
Ethanol 96%, vergällt	2	Entwässern
Ethanol 96%, vergällt	2	Entwässern
Isopropanol (2-Propanol)	2	Entwässern
Xylol	5	Entwässern
Xylol	5	Entwässern
Eindeckmittel (xylolhaltig)	Ø	Eindecken

4.6.3 Hämalan

Konsequente Schnitte der Gewebeproben wurden mit Hämalan angefärbt und anschließend am Mehrphotonen-Mikroskop analysiert. Hämalan verfälscht die SHG-/THG-Signale nicht, erleichtert

jedoch die Orientierung im Präparat. Das THG-Signal wird zudem verstärkt und somit Zellkerne und -grenzen besser erkennbar (Tuer *et al.* 2010).

Färbeprotokoll:

Tabelle 12: Färbeprotokoll Hämalaun

Lösung	Dauer/min	Vorgang
∅	30	Auftauen
Aceton	5	Fixieren
∅	10	Lufttrocknen
Paraformaldehyd	5	Fixieren
PBS	1	Spülen
PBS	5	Spülen
PBS	5	Spülen
PBS	5	Spülen
Hämalaun	1-2	Färben
Aqua nondest.	10	Spülen
Eindeckmittel Gelatine	∅	Eindecken

4.7 Sonstige Materialien

FIJI (“FIJI Is Just Image J”) ist eine kostenfreie Software zur Bildanalyse (Schindelin *et al.* 2012). Mithilfe dieses Programmes wurde die f/b-Ratio der Gewebeproben berechnet, Bildrekonstruktionen angefertigt und alle Abbildungen von Gewebeproben in dieser Arbeit erstellt. Zur Berechnung der f/b-Ratio wurden die vorwärts gerichteten Signale durch die rückwärts gerichteten dividiert. Der Mittelwert der Pixelintensität, maximale und minimale Werte sowie Median wurden berechnet, um eine detaillierte Aussage zu ermöglichen. Dies erfolgte zum einen für das jeweilige Gesamtbild, sowie auch für einen selektierten Bereich *als Region of interest* (ROI), welche für jedes Bild individuell ausgewählt wurde. Die ROI enthält immer den signalstärksten Teil des Bildes, also den Bereich, welcher möglichst viel Kollagen enthält. Weiteres zur genauen Anwendung von FIJI ist in Kapitel 5.3 beschrieben.

4.8 Durchführung am Mehrphotonen-Mikroskop

Die immunhistologisch und mit Elastica van Gieson gefärbten Präparate wurden am Lichtmikroskop analysiert, die ausschließlich mit Hämalaun angefärbten Präparate am Mehrphotonen-Mikroskop. Bereiche, welche sich in der Immunhistologie kollagenreich darstellten, wurden ebenso wie eindeutig

tumorbefallene bzw. tumorfreie Bereiche am Lichtmikroskop fotografiert und dokumentiert. Diese Bereiche wurden anschließend in den konsekutiven, Hämalaun-gefärbten Schnitten am Mehrphotonen-Mikroskop analysiert. Die Hämalaun-Färbung erleichterte die Orientierung im Präparat. SHG-Signale wurden sowohl rückwärts- als auch vorwärts gerichtet nacheinander detektiert, THG-Signale wurden vorwärts gerichtet detektiert. Die Intensität des Lasers, Sensibilität der Detektoren sowie die jeweils nötigen Wellenlängen blieben bei allen Experimenten unverändert, um eine direkte Vergleichbarkeit zu erreichen. Die Wellenlänge des Lasers für SHG betrug 834 nm, für THG 1275 nm. Um die für das THG-Signal erforderliche Wellenlänge von mehr als 1200 nm zu erhalten, wurde ein OPO verwendet. Diese Schritte wurden an allen Präparaten durchgeführt und die Bildinformationen als Rohdaten gesammelt. Die Rohdaten bestehen aus einzelnen Pixeln, die in einer ausgewählten ROI befindlich waren. So setzt sich eine ROI aus mehreren hundert Pixelwerten zusammen. Da der Laser des Mehrphotonen-Mikroskops jede Region und jedes Pixel nacheinander abrastert, erhält man verschiedene, voneinander unabhängige Pixelwerte, die dann in einem Mittelwert pro ROI zusammengefasst werden. Hierauf wird in Kapitel 5.3 genauer eingegangen.

5 Ergebnisse

Der Ergebnisteil gliedert sich in zwei Abschnitte: einen Vergleich des SHG-Signals mit immunhistochemischen und cytochemischen Färbungen der betroffenen Fasern und eine detailliertere Auswertung der Bilddaten zur Interpretation der SHG-Signale. Im ersten Abschnitt liegt der Fokus auf der Darstellung von Kollagenfibrillen ohne einen Vergleich von gesundem und malignem Gewebe. Dies erfolgt zum einen mittels der Rohdaten aus dem Mehrphotonen-Mikroskop und zum anderen durch einen Vergleich der SHG-Signale mit etablierten histologischen Färbungen, Immunhistologie mit Coll-1-spezifischen Antikörpern und Elastica van Gieson.

Der zweite Abschnitt beschäftigt sich mit der Morphologie des Kollagens in gesundem, verglichen mit maligne entartetem Gewebe. Hier wurde die forward – to backward – ratio (f/b), eine Interpretationsart des SHG-Signals verwendet. Darauf soll in Kapitel 5.3 genauer eingegangen werden. Mit den generierten THG-Signalen wurde keine f/b-Ratio durchgeführt, mittels THG keine Aussage zu fibrillärem Kollagen getroffen werden kann. THG diente in dieser Arbeit vielmehr als eine Ergänzung durch Darstellung von Zellverbänden und Membrangrenzen des untersuchten Gewebes.

5.1 SHG-Signal

Das SHG-Signal beruht auf den nicht-inversionssymmetrischen Eigenschaften von fibrillären Kollagenen, Myosin und Mikrotubuli (Burke *et al.* 2013; Campagnola und Loew 2003; Zipfel *et al.* 2003). Das fibrilläre Kollagen, vor allem Kollagen Typ I wurde hier mithilfe des Mehrphotonen-Mikroskops detailliert dargestellt. Dies wurde an allen untersuchten Gewebeproben aus dem Kopf-Hals-Bereich, sowohl gesundem als auch Tumorgewebe durchgeführt (n = jeweils 10). Abbildung 4 zeigt eine repräsentative Darstellung dieser Fibrillen in gesundem Gewebe, Abbildung 5 stellt THG-Signale an Zellgrenzen in gesundem Gewebe dar.

Zu erwähnen sei, dass die dargestellten Abbildungen 4 und 5 (Seite 37) den generierten Rohdaten entsprechen. Alle folgenden Abbildungen wurden durch Nachbearbeitung digital eingefärbt, um vor allem bei digital übereinander gelegten SHG-THG-Bildern die Übersichtlichkeit zu gewähren. Das SHG-Signal wurde dabei stets in Rot, das THG-Signal stets in Grün dargestellt.

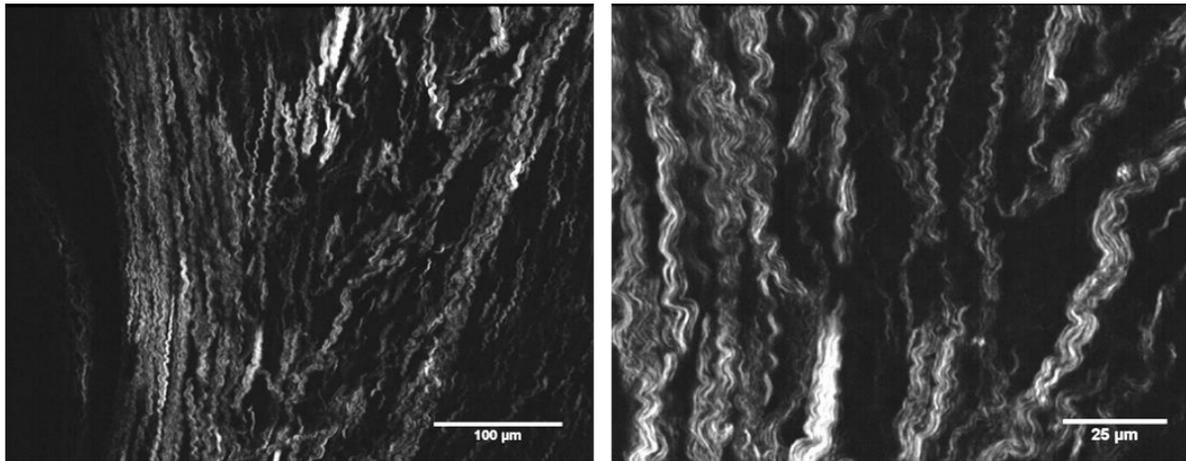
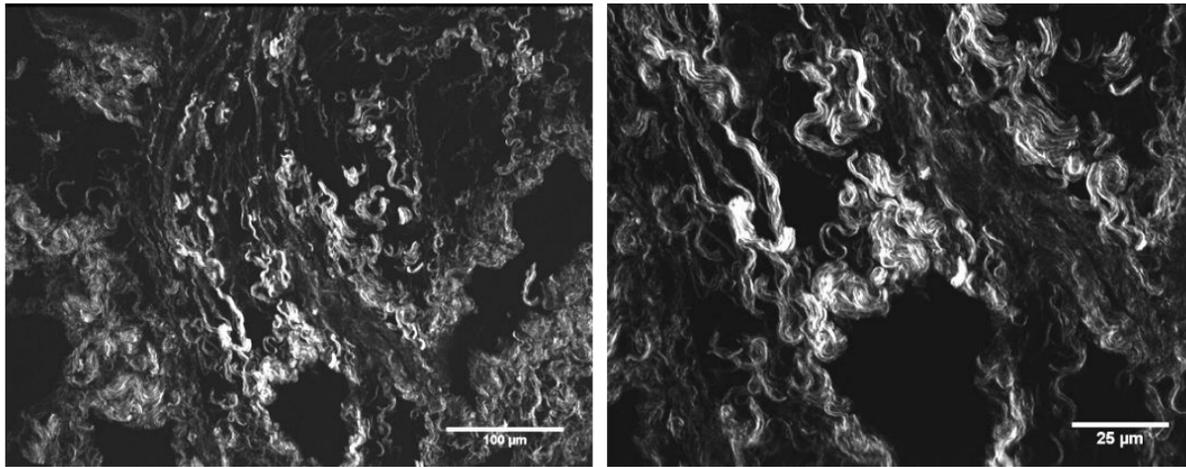


Abbildung 4: SHG-Signal an Kollagenfibrillen in gesundem Gewebe, links in der Übersicht, rechts in der Detailaufnahme unter Angabe des Größenbalkens (links 100 μm , rechts 25 μm)

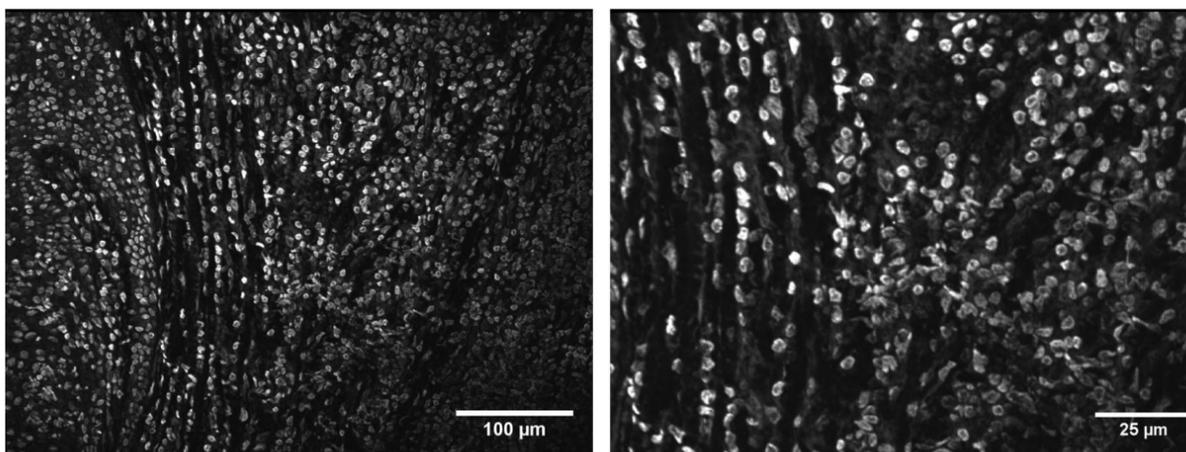
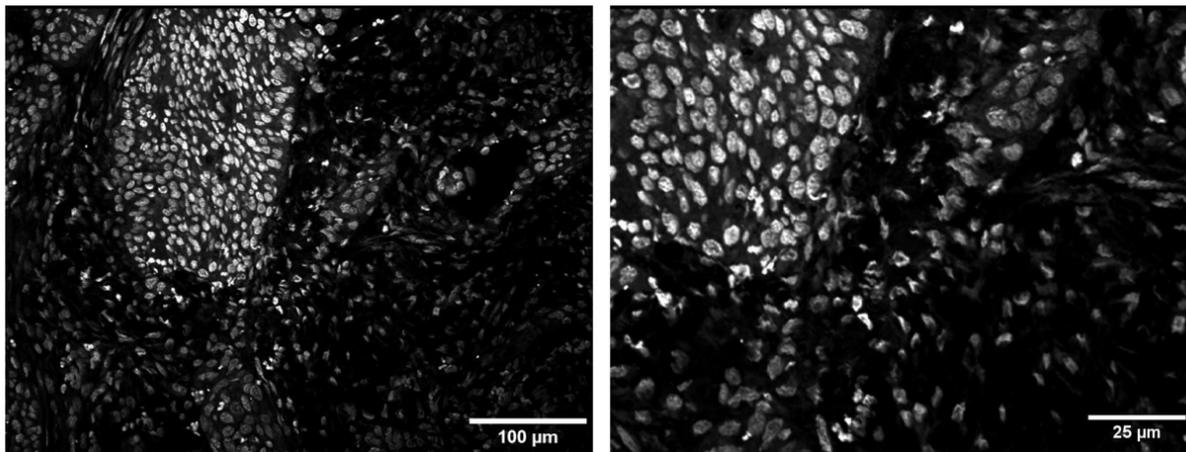


Abbildung 5: THG-Signal an Zellgrenzen in gesundem Gewebe, links in der Übersicht, rechts in der Detailaufnahme unter Angabe des Größenbalkens (links 100 μm , rechts 25 μm)

5.2 Vergleich der Färbungen mit SHG

Der Fokus dieses Abschnittes liegt auf dem Vergleich verschiedener Färbungen mit dem generierten SHG-Signal. Etablierte (immun-)histologische Färbungen wurden mit SHG verglichen, um herauszufinden, ob dieses tatsächlich spezifisch Kollagenfibrillen sichtbar macht. Gezeigt wurde dies bereits in zahlreichen Experimenten von verschiedensten Arbeitsgruppen (Rivard *et al.* 2014; Williams *et al.* 2005; Tilbury und Campagnola 2015). Wichtig ist jedoch, für die eigenen Experimente zu beweisen, dass die Bedingungen erfüllt sind, um ein korrektes SHG-Signal zu erhalten. Gemeint ist damit die richtige Einstellung am Mehrphotonen-Mikroskop hinsichtlich Wellenlänge, Detektoren und Laser-Intensität.

5.2.1 Immunhistologie und SHG

Die Immunhistologie mit Coll-I spezifischen Antikörpern und das SHG-Signal markierten den Anfang des Projektes. Bereiche, die sich in der Immunhistologie kollagenreich darstellten, wurden am Mehrphotonen-Mikroskop ebenfalls dargestellt. Hierbei wurden jedoch lediglich mit Hämalaun angefärbte Schnitte verwendet. Konsekutive Schnitte wurden jeweils in der Immunhistologie mit Coll-I-spezifischen Antikörpern und Hämalaun angefärbt und an den verschiedenen Mikroskopen untersucht. So konnte ein direkter Vergleich stattfinden.

Es zeigte sich, dass das Kollagen Typ I, welches durch die Immunhistologie angefärbt wurde, auch als SHG-Signal sichtbar ist. Dies wurde an zwei verschiedenen Bereichen pro Gewebeprobe in allen 20 Gewebeproben (Tumorgewebe $n = 10$, gesundes Gewebe $n = 10$) durchgeführt. Somit konnte bewiesen werden, dass mithilfe von SHG spezifisch Kollagen nachgewiesen werden kann (Abbildungen 6, 7, Seiten 38 und 39). Dies gilt selbstverständlich nur für die Subtypen des Kollagens ohne Inversionssymmetrie, hier vor allem Kollagen Typ I.

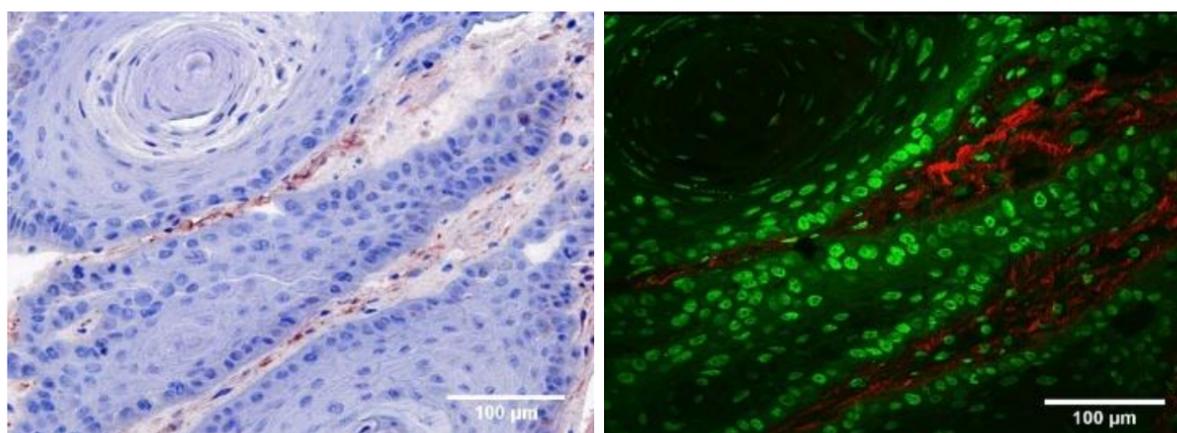


Abbildung 6: Vergleich Immunhistologie gegen Coll-I (links) mit SHG+THG (rechts) von sukzessiven Schnitten von Tumorgewebe unter Angabe des Größenbalkens (100 µm). Links ist das Kollagen in Braun dargestellt, Zellkerne und Zytoplasma in Blau. Rechts zeigt sich Kollagen als SHG-Signal in Rot, Zellkerne und Zytoplasma als THG-Signal in Grün.

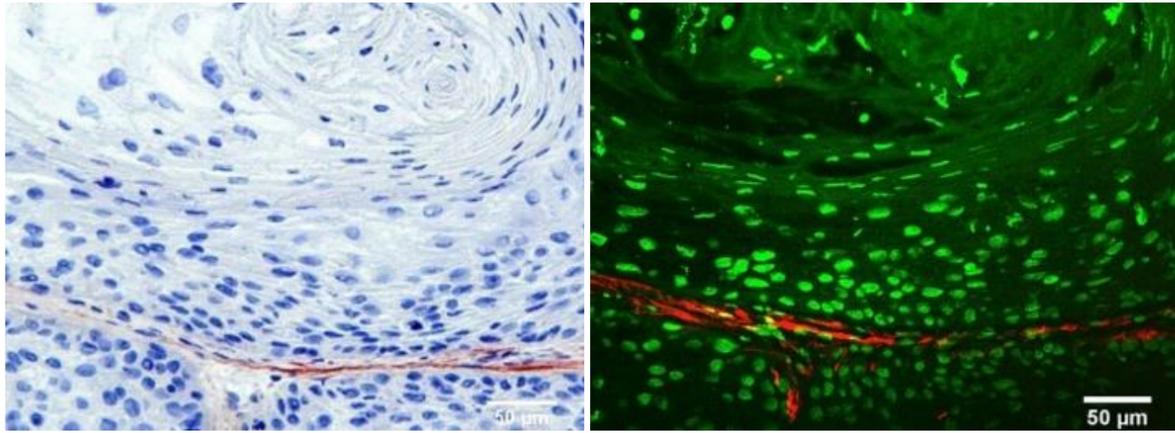


Abbildung 7: Vergleich Immunhistologie gegen Coll-I (links) mit SHG+THG (rechts) von sukzessiven Schnitten von Tumorgewebe unter Angabe des Größenbalkens (50 µm). Links ist das Kollagen in Braun dargestellt, Zellkerne und Zytoplasma in Blau. Rechts zeigt sich Kollagen als SHG-Signal in Rot, Zellkerne und Zytoplasma als THG-

5.2.2 Elastica van Gieson und SHG

Die Elastica van Gieson-Färbung färbt Kollagen unabhängig vom Fasertyp an (Kazlouskaya *et al.* 2013). Um herauszufinden, ob es sich tatsächlich vor allem um Kollagen Typ I in den Gewebepreparaten handelt oder doch noch weitere Subtypen vorhanden sind, wurde diese Färbung durchgeführt. Nur die nicht-inversionssymmetrischen Kollagentypen sind mithilfe von SHG sichtbar zu machen und deshalb hier von Bedeutung. Der Vergleich von SHG-Bildern mit Färbungen mittels Elastica van Gieson zeigt, dass Letztere mehr Kollagen sichtbar macht als SHG, da in Geweben mit viel Extrazellulärmatrix verschiedene Kollagentypen anzutreffen sind (Abbildungen 8 und 9, Seite 40). Die Fasern, die als SHG-Signal zu sehen sind, werden ebenfalls durch die Elastica van Gieson-Färbung sichtbar gemacht. Das SHG-Signal wird aber nur an geometrisch geeigneten Strukturen generiert und dementsprechend nicht an allen Kollagenfasern, die durch Elastica van Gieson sichtbar gemacht werden. Somit ist bewiesen, dass SHG gezielt Kollagenfasern mit nicht-inversionssymmetrischer Struktur darstellt.

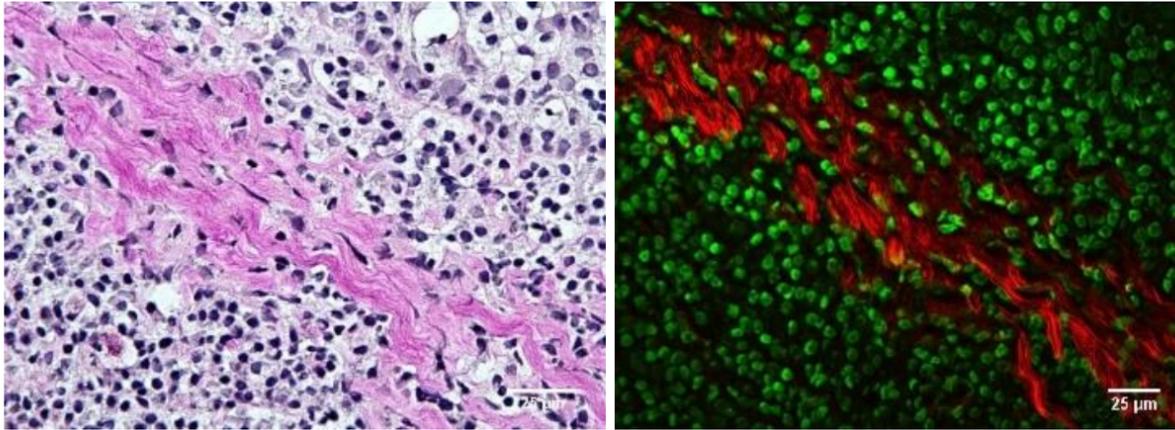


Abbildung 9: Vergleich Elastica van Gieson (links) mit SHG+THG (rechts) in sukzessiven Schnitten von gesundem Gewebe unter Angabe des Größenbalkens (25 µm). Links sind Kollagenfasern in Magenta dargestellt, rechts in Rot.

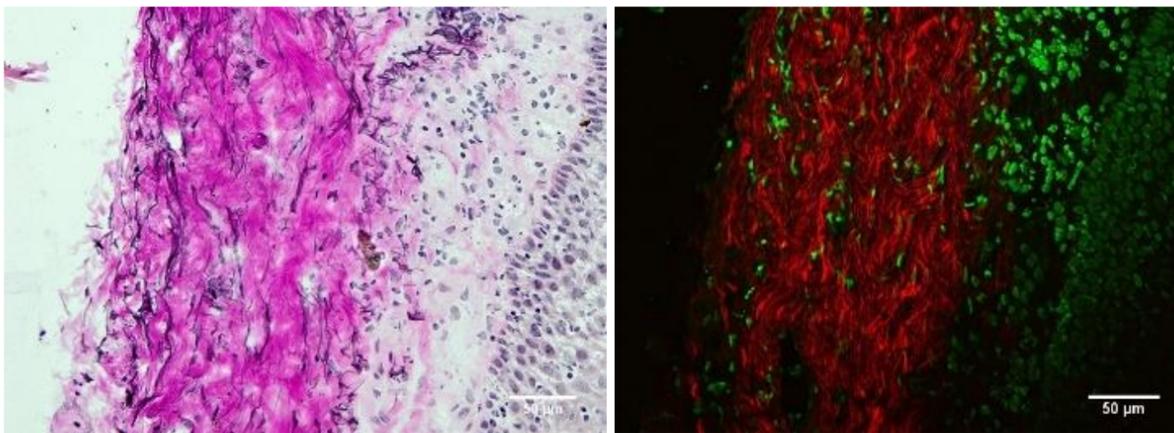


Abbildung 8: Vergleich Elastica van Gieson (links) mit SHG+THG (rechts) in sukzessiven Schnitten von gesundem Gewebe unter Angabe des Größenbalkens (50 µm). Links sind Kollagenfasern in Magenta dargestellt, rechts in Rot.

5.2.3 Vergleich aller Färbemethoden

Vergleicht man alle drei Nachweismethoden miteinander, wie in Abbildung 10 dargestellt, sind große Übereinstimmungen der Kollagenexpressionsmuster zu erkennen. Da es sich um konsekutive und nicht die exakt gleichen Schnitte handelt, sind geringfügige Unterschiede zwischen den verschiedenen Abbildungen zu erkennen. Es handelt sich jedoch um denselben Bereich innerhalb der Gewebeprobe. Ein direkter Vergleich der durch die drei vorgestellten Methoden dargestellten Kollagenfibrillen ist somit möglich.

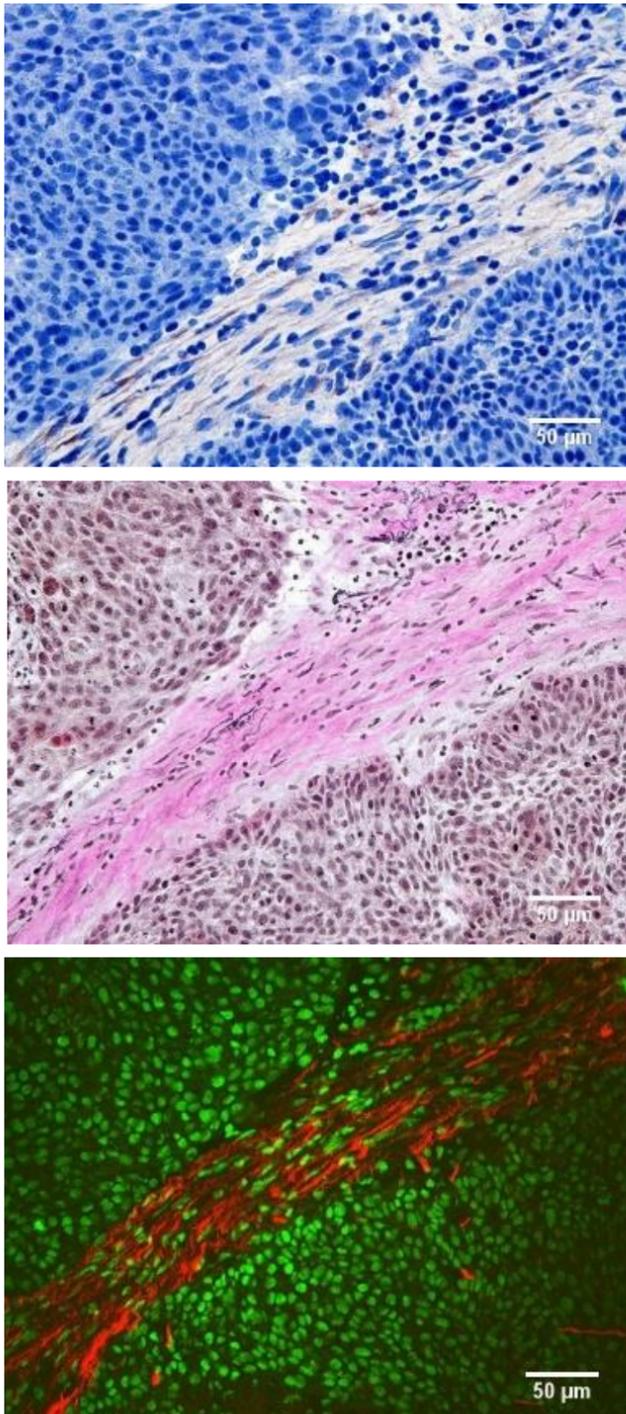


Abbildung 10: Vergleich Immunhistologie Coll-I (oben), Elastica van Gieson (mittig) und SHG+THG (unten) in sukzessiven Schnitten von gesundem Gewebe unter Angabe des Größenbalkens (50 µm).

5.3 Qualitative und quantitative Auswertung von SHG-Messungen in gesunden und malignen Geweben aus dem Kopf-Hals-Bereich

In Kapitel 2.4 wurde erwähnt, dass die Signalstärke von SHG nicht nur abhängig von der Menge des Kollagens, sondern auch von der Anordnung und dem Durchmesser der Kollagenfibrillen ist (Wu *et al.* 2015). Hier lässt sich jedoch noch ein weiterer Faktor unterscheiden: vorwärts und rückwärts gerichtete Signale. Diese Signale stellen einen Hauptteil der Auswertung in diesem Projekt dar. Hierauf soll im folgenden Kapitel genauer eingegangen werden.

Von allen Bereichen, die mit dem Mehrphotonen-Mikroskop analysiert wurden, entstanden jeweils zwei Aufnahmen: eine, die das vorwärts gerichtete Signal widerspiegelte und eine mit rückwärts gerichtetem Signal. Diese Aufnahmen sind das Ergebnis der verschiedenen Detektoren. Das vorwärts gerichtete Signal wird von einem Detektor, welcher unterhalb des Gewebepreparats liegt, aufgefangen. Das rückwärts gerichtete Signal hingegen gelangt an einen Detektor, der oberhalb des Präparats liegt (vgl. Abbildung 3, S. 31). Diese beiden Detektoren erhalten somit unterschiedliche Informationen: das vorwärts gerichtete Signal f_{SHG} beinhaltet die Photonen, die durch das Gewebe hindurchgelangt sind und den Detektor hinter dem Gewebe erreichen. Das Rückwärts-Signal b_{SHG} entspricht den reflektierten, am Gewebe gestreuten Photonen, welche nicht durch das Gewebe gelangten und von dem Detektor, der sich oberhalb des Gewebes befindet, erkannt wurden. Je dichter das Gewebe ist, desto mehr Photonen werden in ihrem Verlauf durch das Gewebe gestreut und ändern ihre Richtung. Erfährt ein Photon keine Streuung, wird von einem „scattering mean-free-path“ gesprochen (Helmchen und Denk 2005). In diesem Falle würde man ein rein vorwärts gerichtetes und kein rückwärts gerichtetes Signal erhalten. Beide Signale erbringen wichtige Informationen über die Anordnung und Menge der Kollagenfibrillen im Gewebe. (Chen *et al.* 2012; Tilbury und Campagnola 2015; Han und Brown 2010).

Aus dem vorwärts gerichteten Signal f_{SHG} und dem rückwärts gerichtetem b_{SHG} kann ein Verhältnis gebildet werden, $f_{\text{SHG}}/b_{\text{SHG}}$. Mittels der $f_{\text{SHG}}/b_{\text{SHG}}$ -Ratio konnte bereits zwischen Gewebe gesunder Ovarien und Ovarialkarzinomen *ex vivo* unterschieden werden. Nadiarnykh *et al.* untersuchten menschliche Biopsate von gesunden Ovarien und Ovarialkarzinomen. In allen Gewebeproben (gesundes Ovarialgewebe $n = 5$, Ovarialkarzinome $n = 3$) zeigte sich eine höhere f/b -Ratio in gesundem als in maligne entartetem Gewebe (Nadiarnykh *et al.* 2010). Die Begründung ist, dass je geordneter und linearer Kollagenfibrillen im Gewebe vorliegen, desto größer $f_{\text{SHG}}/b_{\text{SHG}}$ aufgrund der geringeren Streuung der Photonen ist (Ajeti *et al.* 2011). Dies bedeutet, dass nur ein geringer Teil der emittierten Photonen an Kollagenfibrillen zerstreut und reflektiert wird. Mit der Annahme, dass Tumorgewebe keinem kontrollierten Wachstum unterliegt, kann hier im Umkehrschluss eine geringe $f_{\text{SHG}}/b_{\text{SHG}}$ -Ratio erwartet werden. Ungeordnete Fibrillen führen zu einer verstärkten Zerstreung der Photonen und damit zu einer niedrigen $f_{\text{SHG}}/b_{\text{SHG}}$ -Ratio. Die Abbildungen 11 und 12 zeigen f_{SHG} und b_{SHG} jeweils in gesundem (Abbildung 11, Seite 43) und Tumorgewebe (Abbildung 12, Seite 43).

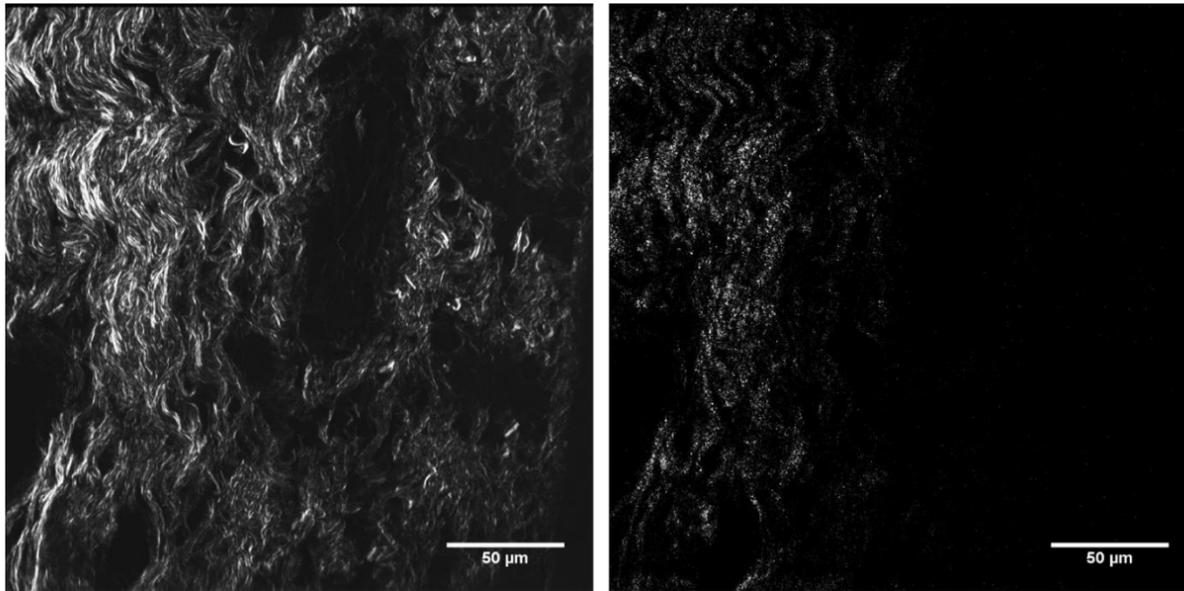


Abbildung 11: SHG-Signal von gesundem Gewebe aus dem Kopf-Hals-Bereich. Gezeigt sind repräsentative Beispiele der Bestimmung der Pixelintensität des vorwärts- (links) und rückwärts gerichteten SHG-Signals (rechts) unter Angabe des Größenbalkens (50 μm). Das f_{SHG} -Signal wird durch den vorwärts gerichteten Detektor mit detektierbarem Wellenlängenbereich von 417-477 nm aufgefangen, das b_{SHG} -Signal durch den vorwärts gerichteten Detektor mit gleichem detektierbarem Wellenlängenbereich.

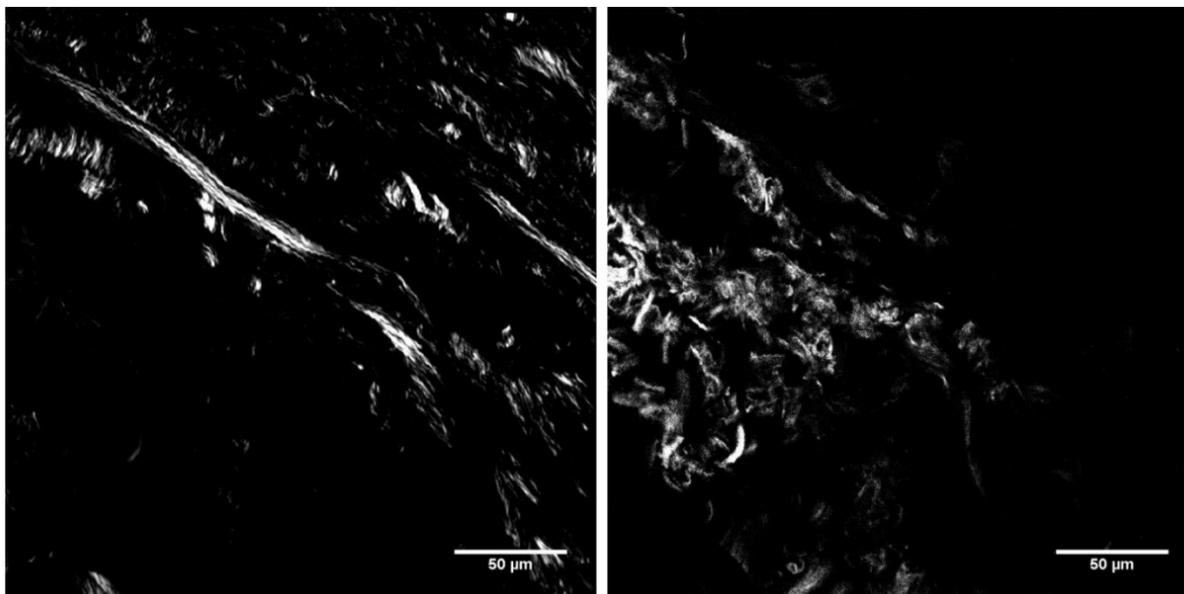


Abbildung 12: SHG-Signal von Tumorgewebe aus dem Kopf-Hals-Bereich. Gezeigt sind repräsentative Beispiele der Bestimmung der Pixelintensität des vorwärts- (links) und rückwärts gerichteten SHG-Signals (rechts) unter Angabe des Größenbalkens (50 μm). Das f_{SHG} -Signal wird durch den vorwärts gerichteten Detektor mit detektierbarem Wellenlängenbereich von 417-477 nm aufgefangen, das b_{SHG} -Signal durch den vorwärts gerichteten Detektor mit gleichem detektierbarem Wellenlängenbereich.

Des Weiteren kann die Signalstärke des SHG-Signals anhand von Pixelintensitäten gemessen werden (Abbildungen 13-15, Seiten 44 und 45). Hierzu wird mithilfe von FIJI das gesamte Bildareal ausgewählt und mittels Analyse-Funktion des Programmes eine automatische Messung der Intensität jedes einzelnen Pixels im Bild durchgeführt. Eine Darstellung in Falschfarben vereinfacht die bildliche Interpretation des Bildes. Eine farbkodierte Skala zeigt die Pixelintensitäten in absoluten Zahlen. Ein Größenbalken wurde zusätzlich eingefügt.

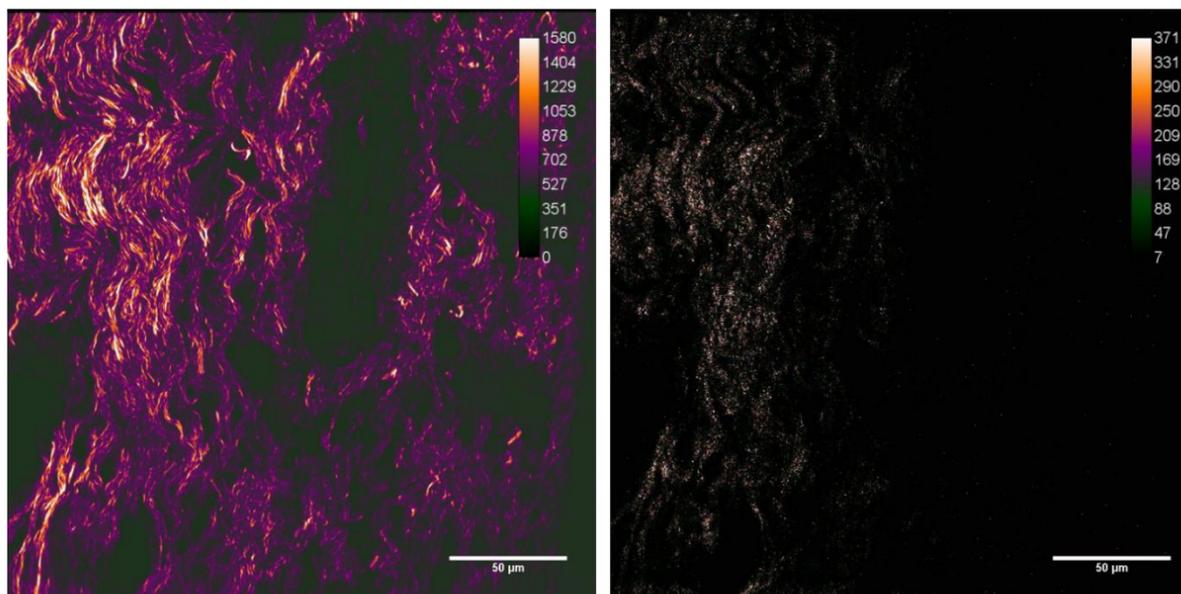


Abbildung 13: Pixelintensität der vorwärts- und rückwärts gerichteten SHG-Signale in gesundem Gewebe aus dem Kopf-Hals-Bereich. Gezeigt sind repräsentative Beispiele der Bestimmung der Pixelintensität des vorwärts- (links) und rückwärts gerichteten SHG-Signals (rechts) unter Angabe des Größenbalkens (50 µm). die farbskalierte Pixelintensität ist in jedem repräsentativen Bild angegeben.

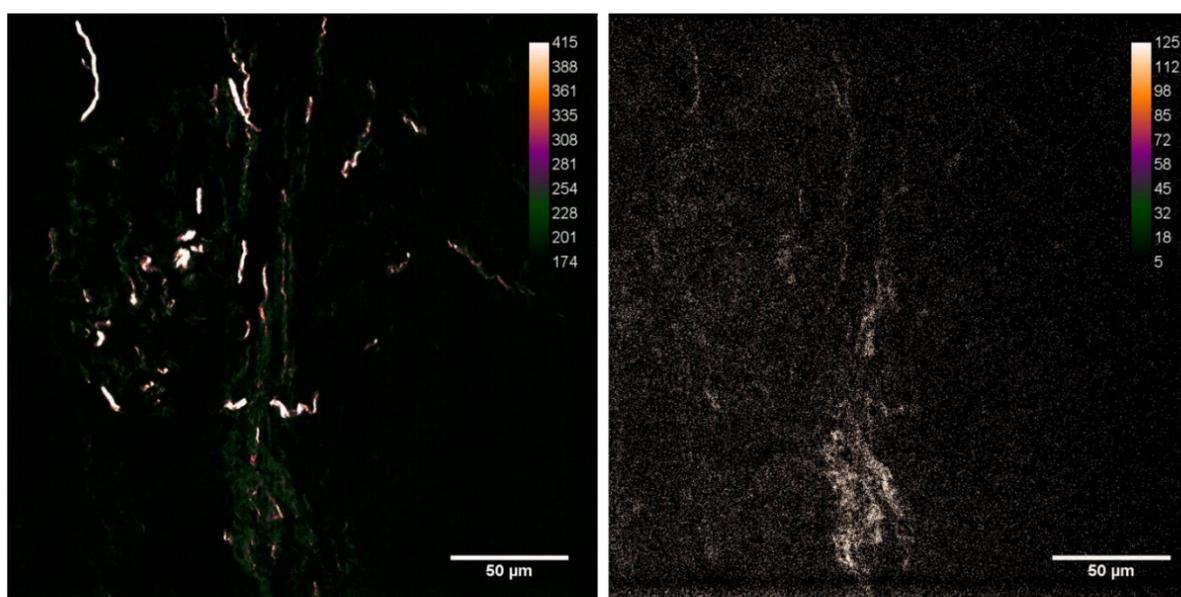


Abbildung 14: Pixelintensität der vorwärts- und rückwärts gerichteten SHG-Signale in Tumorgewebe aus dem Kopf-Hals-Bereich. Gezeigt sind repräsentative Beispiele der Bestimmung der Pixelintensität des vorwärts- (links) und rückwärts gerichteten SHG-Signals (rechts) unter Angabe des Größenbalkens (50 µm). die farbskalierte Pixelintensität ist in jedem repräsentativen Bild angegeben.

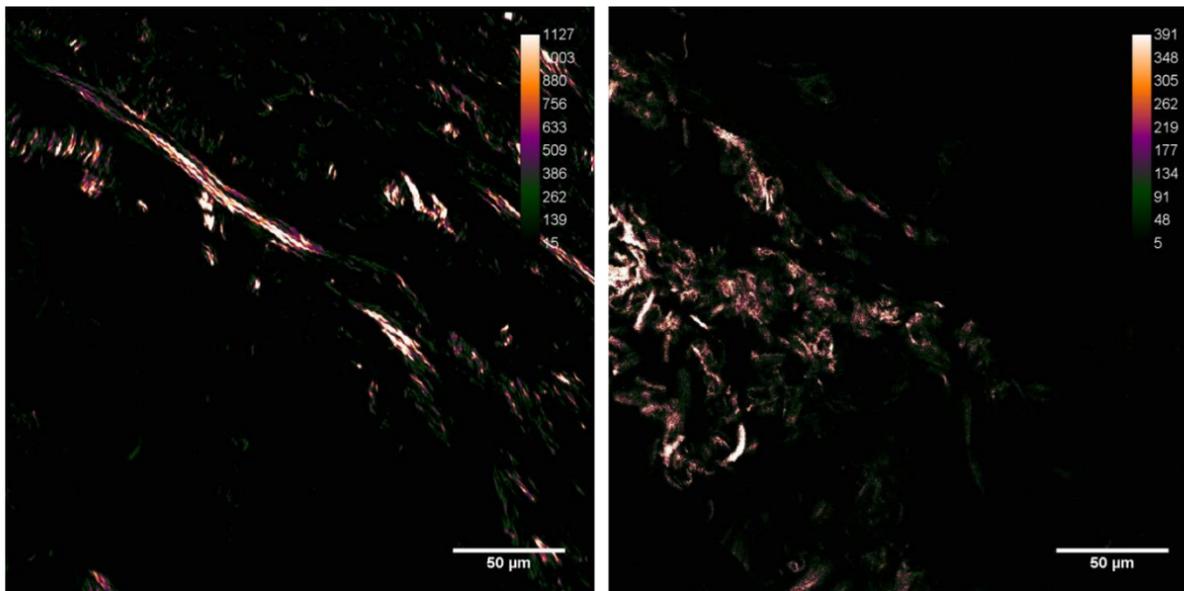


Abbildung 15: Pixelintensität der vorwärts- und rückwärts gerichteten SHG-Signale in Tumorgewebe aus dem Kopf-Hals-Bereich. Gezeigt sind repräsentative Beispiele der Bestimmung der Pixelintensität des vorwärts- (links) und rückwärts gerichteten SHG-Signals (rechts) unter Angabe des Größenbalkens (50 µm). die farbskalierte Pixelintensität ist in jedem repräsentativen Bild angegeben.

Die Bilder wurden in Rohform in FIJI geöffnet und nacheinander bearbeitet. Zunächst wurde bei allen Originalbildern der Hintergrund gemessen. Dieser wurde vom gesamten Bild subtrahiert. Die Bilder wurden anschließend auf Typ 32-bit umgewandelt. Danach wurden die f_{SHG} -Bilder punktweise durch die dazugehörigen b_{SHG} -Bilder dividiert. Hierbei wurde stets in jedem Originalbild der Abschnitt mit dem intensivsten SHG-Signal, also mit dem kollagenreichsten Gewebe als ROI ausgewählt, um eine möglichst große Vergleichbarkeit zu erreichen. Diese Region setzt sich aus zahlreichen einzelnen Pixelwerten zusammen, welche vom Laser des Mehrphotonen-Mikroskops einzeln abgerastert werden. Eine ROI besteht also aus mehreren hundert einzelnen Pixelwerten, die zusammengefügt werden. So wird eine detaillierte Bildinformation zur Verfügung gestellt. Die Pixelwerte sind als unabhängige Einzelwerte anzusehen, in einem erstellten Mittelwert all dieser einzelnen Pixelwerte ist also die Information von mehreren hundert Pixeln enthalten.

Das Ergebnis wurde logarithmiert, um zu verhindern, dass Punkte, bei denen der Nenner sehr klein wird, dominieren. Schließlich wurde das Ergebnis in Falschfarben dargestellt und – ebenfalls mittels FIJI – die sogenannten mean gray value – der Mittelwert –, maximal gray value und minimal gray value ermittelt. Von jeder Gewebeprobe wurden zwei separate Bilder am Mehrphotonen-Mikroskop generiert. Der oben genannte Vorgang wurde an beiden Bildern durchgeführt, sodass in jedem Bild das intensivste SHG-Signal ermittelt wurde und zwei Maximalwerte dieser Art pro Gewebeprobe ermittelt werden konnten. Die zwei Regionen innerhalb des jeweiligen Gewebes wurden anhand der verglichenen immunhistologischen Regionen ausgewählt, die zum Vergleich der Kollagensignale in den jeweiligen Darstellungsmethoden ausgewählt wurden (siehe Kapitel 5.2).

Alle diese Schritte wurden sowohl für alle gesunden Schleimhautproben sowie für Tumorproben durchgeführt. Somit wurden 40 verschiedene f/b-Ratios errechnet, jeweils zwei aus jeder Gewebeprobe. Letztendlich wurden nach Mittelung 20 f/b-Ratios in zwei Datensätzen für gesunde und maligne Gewebe miteinander verglichen (Abbildung 16, Seite 46).

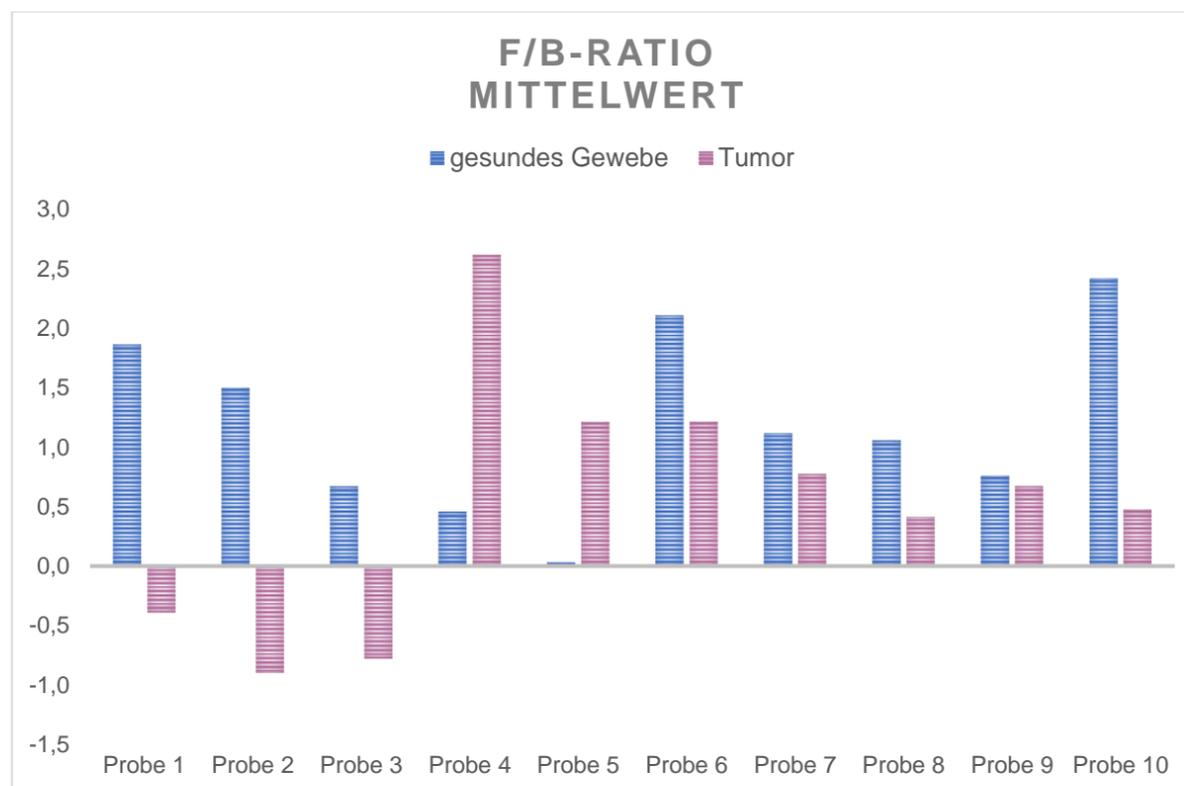


Abbildung 16: Mittelwerte der jeweiligen f/b-Ratio aller Gewebeprouen in gesundem und malignem Gewebe. Alle zehn untersuchten Gewebeprouen sind abgebildet, hierzu jeweils gesundes Gewebe (blauer Balken) und Tumorgewebe (roter Balken). Die x-Achse zeigt die Aufreihung der verschiedenen Gewebeprouen, die y-Achse die f/b-Ratio in absoluten Zahlen ohne Einheit.

Die x-Achse der Abbildung 16 stellt die untersuchten Gewebeprouen dar, hierzu jeweils die f/b-Ratio von gesundem Gewebe und Tumorgewebe. Die y-Achse zeigt die f/b-Ratio an sich, ein Wert ohne Einheit. Es handelt sich hierbei um logarithmierte Werte (\log_{10}). Ein Wert von -1 bedeutet also einen um eine Zehnerpotenz niedrigeren Wert, ein Wert von 1 einen um eine Zehnerpotenz höheren Wert. Acht von zehn Prouen zeigten eine höhere f/b-Ratio im gesunden als im tumorösen Gewebe. Dies deutet auf eine höhere Unordnung in tumorösem Gewebe als in gesundem Gewebe hin. Lediglich zwei von 10 Prouen wiesen eine höhere f/b-Ratio in Tumoren als in gesundem Gewebe auf. Hier war eine niedrigere f/b-Ratio im gesunden als im tumorösen Gewebe erkennbar. Diese zwei Prouen zeigten bezüglich der Art des Tumors keine Unterschiede zu den anderen Prouen. Es handelte sich jeweils um ein Oropharynx- und ein Hypopharynxkarzinom. Es ist also eine Tendenz zu ungeordneterem Gewebe innerhalb des untersuchten Tumorgewebes im Vergleich zu den gesunden Prouen zu erkennen.

Zur weiteren Analyse wurden mittels der Mittelwerte der f/b-Ratio in gesundem und Tumorgewebe gepaarte T-Tests durchgeföhrt.

Tabelle 13: Zweistichproben t-Test bei unabhängigen Stichproben. Gesundes Gewebe wird mit Tumorgewebe verglichen. Es handelt sich um zehn Beobachtungen.

	gesundes Gewebe	Tumor
Mittelwert	1,1346	0,4059
Varianz	0,45551893	1,18558271
Beobachtungen	10	10
Gepoolte Varianz	0,82055082	
Hypothetische Differenz der Mittelwerte	0	
Freiheitsgrade (df)	18	
t-Statistik	1,79879234	
P(T<=t) einseitig	0,04442088	
Kritischer t-Wert bei einseitigem t-Test	1,73406361	
P(T<=t) zweiseitig	0,08884175	
Kritischer t-Wert bei zweiseitigem t-Test	2,10092204	

Mit Einschluss aller Gewebeprouben zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen gesundem und Tumorgewebe $t(9)=1,79$, $p=0,044$ ($<0,05$), wobei gesundes Gewebe meist höhere f/b-Werte erreicht hat. Da es sich um eine gerichtete Hypothese handelt und die Vermutung besteht, dass die f/b-Ratio in gesundem Gewebe höher ist als in Tumorgewebe, wird der kritische T-Wert bei einseitigem t-Test herangezogen. Des Weiteren ist der kritische t-Wert bei zweiseitigem t-Test höher als die t-Statistik. Die zwei Probenpaare mit konträren Werte zu den anderen Proben könnten als Ausreißer angesehen werden. Es ist keine eindeutige Ursache zur Entstehung dieser divergierenden Ergebnisse zu eruieren. Jedoch lässt sich nicht endgültig beweisen, dass es sich um echte Ausreißer handelt, weshalb diese in der Statistik verbleiben. Angesichts der niedrigen Fallzahlen ist eine statistisch valide Aussage in diesem Projekt schwer zu erreichen, es zeigt sich jedoch die Tendenz hin zu einer niedrigeren f/b-Ratio in Tumorgewebe verglichen mit gesundem Gewebe.

5.4 SHG in Kombination mit THG

SHG stellt fibrilläre Kollagenstrukturen, sowie Myosin, Mikrotubuli und andere, nicht-inversionssymmetrische Strukturen dar. THG hingegen zeigt Membrangrenzen vor allem zwischen fett- und flüssigkeitshaltigen Strukturen auf (Adur *et al.* 2011; Aptel *et al.* 2010; Rehberg *et al.* 2011; Tilbury und Campagnola 2015).

Kombiniert ergeben diese zwei optischen Verfahren einen holistischen Eindruck des Gewebes. Die Orientierung fällt bei Überlappung der beiden Bilder leichter und Zusammenhänge zwischen Extrazellulärmatrix und Zellverbänden können erkannt werden (Abbildung 17, Seite 49). In dieser Arbeit liegt der Fokus auf SHG. THG wird zur besseren Vermittlung eines Gesamteindrucks des Gewebeabschnittes und Orientierung im Gewebe genutzt. Eine weitere Analyse der THG-Signale findet in dieser Arbeit nicht statt. THG ist leicht kombinierbar mit anderen Verfahren wie SHG und wird daher oft als Ergänzung des Gewebeindrucks verwendet (Weigelin *et al.* 2016).

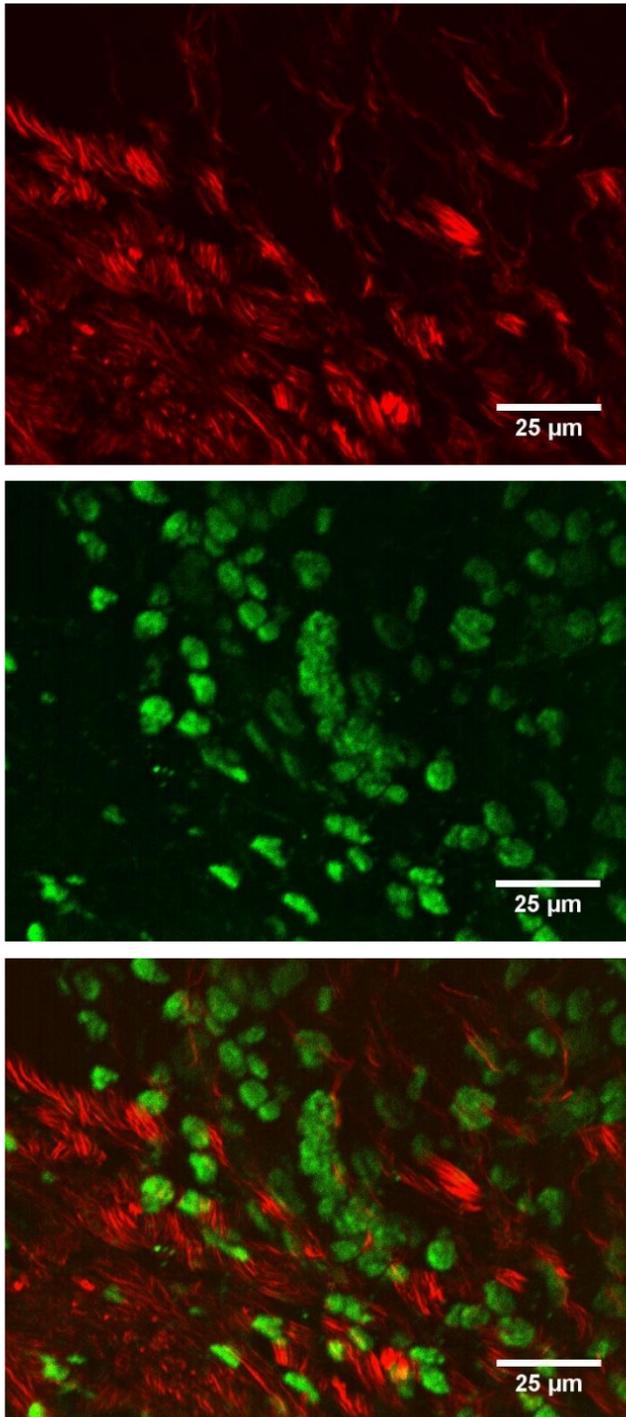


Abbildung 17: SHG-Signal (oben, rot), THG-Signal (mittig, grün) und Kombination der beiden Signale (unten) in einer repräsentativen Probe von gesundem Gewebe mit Angabe des Größenbalkens (25 μm).

5.5 Qualitätssicherung und Negativkontrolle des SHG-Signals

SHG-Imaging unterliegt der Bedingung des Vorhandenseins bestimmter geometrischer Eigenschaften und ist daher ein sehr spezifisches Signal. Es benötigt keine besondere Fixierung oder Färbung, somit ist quasi keine Vorbereitung des Gewebes nötig. Es sind jedoch einige Voraussetzungen zu erfüllen, um erfolgreich ein SHG-Signal zu generieren: der Laser muss eine ausreichende Intensität besitzen, es sollte sich dementsprechend um einen gepulsten Laser handeln. Die Ausgangswellenlänge des Laserlichts ist korrekt einzustellen, als optimal für ein SHG-Signal sind Wellenlängen $>800\text{ nm}$ zu wählen. Es müssen geeignete Detektoren vorhanden sein, um Signale mit der dann halbierten Wellenlänge empfangen zu können.

Um sicherzustellen, dass es sich tatsächlich um Second Harmonics handelt, wurden im Rahmen dieser Arbeit Negativkontrollen durchgeführt (Abbildung 18). In Bereichen, in denen keine Kollagenfasern durch Immunhistologie und Elastica van Gieson nachgewiesen werden konnten, wurden SHG-Bilder angefertigt. Durch diese Messungen konnte bestätigt werden, dass eine SHG-Messung unter den gewählten Bedingungen und Lasereinstellungen zu keinen falsch-positiven Ergebnissen führt. THG-Signale wurden erwartungsgemäß jedoch an Zellgrenzen und Zellkernen in diesen Kollagen-negativen Bereichen generiert. Somit konnte sichergestellt werden, dass das SHG-Signal frei von Artefakten ist und keine falsch positiven Signale detektiert werden.

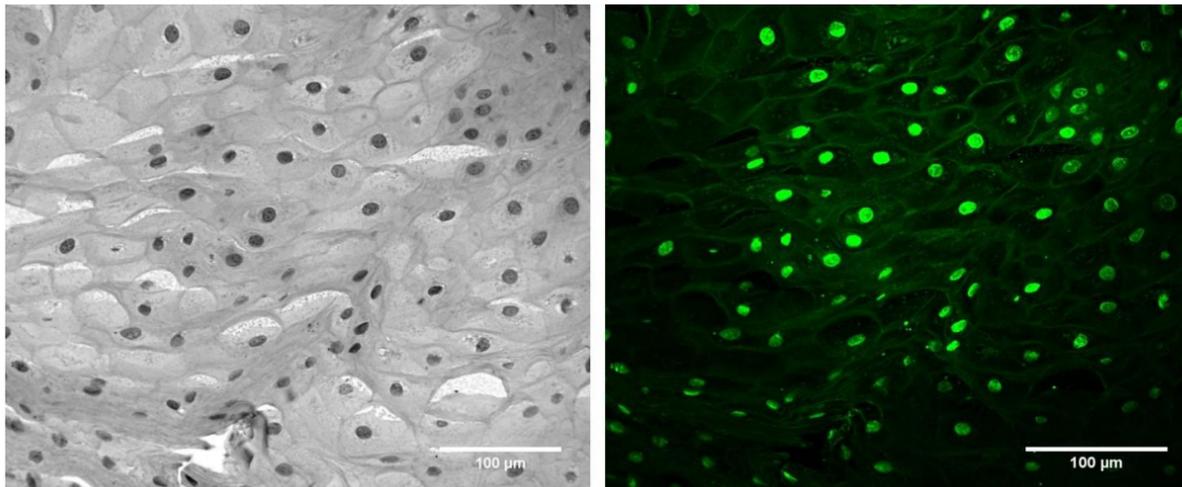


Abbildung 18: Negativkontrolle in einem Bereich ohne Kollagen unter Angabe des Größenbalkens (100 µm). Links ist das lichtmikroskopische Bild zu sehen, rechts das THG-Signal (grün), welches an Zellgrenzen und Nuklei generiert wird. Ein SHG-Signal konnte nicht generiert werden.

6 Diskussion

6.1 SHG und THG als Werkzeuge für die Tumordiagnostik

SHG gewinnt seit seiner erstmaligen praktischen Anwendung durch Kleinman *et al.* 1962 (Kleinman 1962) immer mehr an Bedeutung. Dieses nichtlinear optische Verfahren ermöglicht eine detaillierte Darstellung nicht-inversionssymmetrischer Strukturen wie fibrillärem Kollagen, Myosin und Mikrotubuli (Tilbury und Campagnola 2015). Es handelt sich um ein gewebeschonendes Verfahren ohne Risiko von Phototoxizität oder Bleichung des Gewebes, wie es bei anderen Verfahren wie Zwei-Photonen-Fluoreszenz-Mikroskopie (TPEF) vorkommt (Campagnola und Loew 2003). Die Grundlage der Signalerhebung ist die Symmetrieeigenschaft der untersuchten Strukturen, somit ist keine Färbung des Gewebes nötig (Campagnola *et al.* 2002). Andere Arten der Mikroskopie, wie die Zwei-Photonen-Fluoreszenz-Mikroskopie (TPEF) basieren auf Fluoreszenz, welche zum Einen durch Fluoreszenz-Färbungen, zum Anderen von intrinsisch-fluoreszenten biologischen Molekülen entstehen kann (Zipfel *et al.* 2003). TPEF ist ebenfalls ein nichtlinear optisches Verfahren. Zwei Photonen interagieren simultan mit fluoreszenzbildenden Chromophoren in Geweben, welche entweder intrinsischer Art (als Beispiel ist NADH zu nennen) oder durch zugeführte Fluoreszenzfärbungen entstehen (Aptel *et al.* 2010; Zipfel *et al.* 2003). Eine Transition vom Ruhe- in einen Exzitationsstatus durch Absorption der Photonen kann entstehen, wenn die Summe der Energien der jeweiligen Photonen die Lücke zwischen Ruhe- und Exzitationsstatus füllen kann (Parodi *et al.* 2020). Das Risiko der Phototoxizität bei TPEF basiert auf diesem Exzitationsstatus. Durch die energetische Erhöhung von Ruhe- in den Exzitationsstatus interagiert das zu untersuchende Gewebe direkt energetisch mit den Photonen (Parodi *et al.* 2020). Bei HHG ist das zu untersuchende Gewebe nicht in eine Energieübertragung involviert, da die beteiligten Photonen keine Energie an das Gewebe abgeben. Daher ist das Risiko der Phototoxizität deutlich reduziert. Diese zwei Verfahren – TPEF und HHG – können jedoch komplementär zueinander verwendet werden (Zoumi *et al.* 2002). Mit derselben Mehrphotonen-Mikroskop-Plattform kann sowohl HHG- als auch TPEF-Mikroskopie erfolgen (Campagnola und Loew 2003). Durch die Möglichkeit der Verwendung verschiedener Wellenlängen des Lasers können verschiedene nichtlineare optische Verfahren an denselben Gewebeproben in einer Sitzung am Mikroskop angewandt werden. Dies ist ein genereller Vorteil der Mehrphotonen-Mikroskopie.

Die ECM rückt vermehrt in den Vordergrund bezüglich der Entstehung und Progression maligner Tumoren (Nadiarnykh *et al.* 2010; Cox und Eler 2011; Burke *et al.* 2013; Brown *et al.* 2003; Bonnans *et al.* 2014; Chen *et al.* 2019; Conklin *et al.* 2011; Fang *et al.* 2014). Ein umfassendes Verständnis aller beteiligten Aspekte im Tumorgeschehen ist nötig, um Diagnostik und Therapie maligner Erkrankungen so erfolgreich wie möglich zu gestalten. HHG Imaging ist ein vielversprechendes und nützliches Werkzeug zur Darstellung und Interpretation maligne veränderter Extrazellulärmatrix in menschlichem Gewebe. Diverse Arbeitsgruppen haben bereits gezeigt, dass zuverlässige Aussagen zur Unterscheidung zwischen maligne verändertem und gesundem Gewebe getroffen werden können

(Adur *et al.* 2011; Birk *et al.* 2014; Kiss *et al.* 2018; Provenzano *et al.* 2008) und ebenso, dass es in Zukunft möglich sein wird, *in vivo*-Diagnostik mittels HHG durch endoskopische Mikroskopie durchzuführen (Zhang *et al.* 2012; Ducourthial *et al.* 2016; Williams und Campagnola 2015). Zhang *et al.* entwickelten ein Mikroendoskop mit einem Durchmesser von zwei Millimetern zur Interpretation von Zervix-Gewebe und dessen Modifikationen während der Schwangerschaft am Mausmodell mittels SHG. In dieser Studie wurden *ex vivo* Untersuchungen von Gewebe am Mausmodell in verschiedenen Stadien der Schwangerschaft sowohl mit einem bereits etabliertem Mehrphotonen-Mikroskop als auch mit einem neu entwickelten SHG-Mikroendoskop untersucht. Das etablierte Mehrphotonen-Mikroskop ist ähnlich dem in diesem Projekt verwendeten. Bildqualität und Auflösung des Mikroendoskops waren vergleichbar zu denen des Mehrphotonen-Mikroskops. Es wurde also ermöglicht, mit einem deutlich kleineren, kompakten Mikroendoskop, welches mobil eingesetzt werden kann und nicht ortsgebunden ist, eine vergleichbare Qualität an SHG-Signalen zu erzeugen (Zhang *et al.* 2012). Dies könnte im weiteren Verlauf auch zur *in vivo* Mikroendoskopie genutzt werden. *In vivo* Mikroendoskopie wurde von Ducourthial *et al.* bereits präsentiert. Diese Arbeitsgruppe entwickelte ein Mehrphotonen-Mikroendoskop mit 2,2 Millimeter Durchmesser, welches SHG-sowie TPEF-fähig ist. Am Mausmodell wurden *in vivo* Untersuchungen der Niere durchgeführt. Hierbei konnten Eindringtiefen von mehr als 300 μm in das Organ erreicht werden (Ducourthial *et al.* 2016). Auch diese Arbeit zeigt, dass SHG zur *in situ* Beurteilung von Gewebe genutzt werden kann. So könnte auch, bezogen auf dieses Projekt, eine präzise Identifikation von Tumorgewebe und Interpretation von Resektionsrändern möglich werden. Mittels eines Mikroendoskops könnte im Rahmen einer operativen Tumorresektion im Kopf-Hals-Bereich eine *in situ* Beurteilung von Resektionsrändern nach Entfernung des Tumors, zusätzlich zu einer pathologischen Schnellschnittdiagnostik durchgeführt werden.

THG an sich ermöglicht zudem interessante Ansätze zur weiteren (Tumor-) Mikroskopie (Zhang *et al.* 2019). Da THG Gewebsheterogenitäten darstellt, eignet es sich, wie bereits erwähnt, zur Darstellung von Zellen und Membrangrenzen. Auch Unterschiede in Zellgrößen, Größen der Nuklei, Lipidanteilen und weitere Charakteristika können mit THG dargestellt werden und ermöglichen weitere Einsicht in den Aufbau von Tumorgewebe (Weigelin *et al.* 2016, 2012; Aptel *et al.* 2010; Rehberg *et al.* 2011). Sogar die Zellmembranen von Erythrozyten emittieren ein starkes THG-Signal und Unterschiede zwischen oxygeniertem und desoxygeniertem Status des Hämoglobins konnten auf Zellebene ausgemacht werden (Chang *et al.* 2010). THG stellt daher eine weitere Möglichkeit dar, um Abläufe innerhalb von Tumorentwicklung und möglicherweise auch die Interaktion zwischen Tumorzellen und der Extrazellulärmatrix darzustellen. Hier ist ein weiterer Ansatz für zukünftige Arbeiten also vielversprechend.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mittels SHG und THG eine detaillierte Darstellung von fibrillärem Kollagen bzw. Zellverbänden möglich ist. Der Fokus dieser Arbeit lag vor allem auf SHG, hier konnten Detailaufnahmen von Kollagenfibrillen in gesundem sowie in tumorösem Gewebe gemacht werden. Mit einem Mehrphotonen-Mikroskop wurden Gewebeproben von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren untersucht, genauer Bereiche mit tumorösem sowie auch gesundem Gewebe. Der Vergleich mit etablierten Färbungen (Immunhistologie sowie Elastica van Gieson) zeigte die Spezifität des nichtlinear optischen Verfahrens SHG auf. Angefärbte Bereiche in den Färbungen wurden mit den am Mehrphotonen-Mikroskop generierten SHG-Signalen verglichen. Regionen, die

immunhistologisch und auch mittels Elastica van Gieson als kollagenreich identifiziert werden konnten, zeigten auch in der Mehrphotonen-Mikroskopie distinkte SHG-Signale. Das Ziel, Kollagen innerhalb der untersuchten Gewebeproben mittels SHG darzustellen wurde also erreicht.

Des Weiteren wurden die Bilddaten des Mehrphotonen-Mikroskops quantitativ ausgewertet. Durch verschiedene Detektoren des Mikroskops wurden Bildinformationen des nicht gestreuten, sowie gestreuten Lichtes des Gewebes gesammelt. Hierbei handelt es sich um Detektoren, die oberhalb bzw. unterhalb des zu untersuchenden Gewebes liegen. Die Bildinformationen der Detektoren zeigten deutliche Unterschiede und wurden quantitativ mittels der Bildsoftware „FIJI“ ausgewertet. Ein Verhältnis der Pixelintensitäten der vorwärts und rückwärts gerichteten Bilddaten wurde gebildet, die sogenannte f/b-Ratio. Mit diesem Verhältnis können Aussagen über die Ordnung der Kollagenfibrillen im interessierenden Gewebe gemacht werden (Legare *et al.* 2007). Es zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen gesundem und Tumorgewebe in acht der zehn Patientenproben. Somit kann die Aussage, dass eine Umstrukturierung hin zu geringerer Ordnung der ECM in tumorösem Gewebe stattfindet, bestätigt werden (Nadiarnykh *et al.* 2010; Burke *et al.* 2013).

Mit der korrekten Anwendung eines geeigneten Mehrphotonen-Mikroskops ist die Erzeugung von SHG und THG ein unkompliziertes Verfahren. Jedoch sind einige Aspekte zu beachten, die die Ergebnisse der Mikroskopie beeinflussen und die Authentizität der harmonischen Signale alterieren können. Diese werden im folgenden Abschnitt diskutiert.

6.2 Färbungen mit Einfluss auf SHG/THG

Nichtlineare Optik ermöglicht eine weitreichendere Interpretation von Gewebe als konventionelle Lichtmikroskopie von histologisch gefärbten Gewebeschnitten. Klassische histologische Färbungen benötigen dünne Gewebeschnitte von nur wenigen Mikrometern, um Färbeartefakte und damit verminderte Interpretationsmöglichkeiten zu verhindern. So sind nur begrenzte, dünn-schichtige Schnitte interpretierbar. Um einen detaillierteren Eindruck des gesamten Gewebes zu erhalten, müssen zahlreiche Schnitte evaluiert werden und gegebenenfalls eine digitale Rekonstruktion erfolgen. Die Auswahl möglichst repräsentativer Abschnitte des Gewebes hängt von der Erfahrung des untersuchenden Pathologen ab.

Obwohl Färbungen im Rahmen von Higher Harmonic Generation Imaging nicht nötig sind, wurde deren Einfluss von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. Dabei wurden Einflüsse verschiedener etablierter histologischer Färbungen auf das SHG-Signal kaum diskutiert. Burke *et al.* führten f/b-Ratio-Messungen von Mammakarzinom-Gewebe, gesundem Gewebe und *Carcinomata in situ* sowohl an histologischen, fünf µm dicken ungefärbten Schnitten als auch mit H.E. gefärbten Schnitten durch und stellten keine Änderung der Signalintensitäten fest (Burke *et al.* 2013). Da das Signal auf Symmetrieeigenschaften basiert, haben Färbungen am ehesten keinen Einfluss darauf.

Anders ist dies bei THG: hier sind Heterogenitäten benachbarter Strukturen signalgebend. Diese Unterschiede können durch Färbungen verstärkt werden und somit eine Kontrastverstärkung des

THG-Signals erzeugen. Vor allem H.E. wird als Kontrastverstärker des THG-Signals ohne Einfluss auf die Konfiguration des Signals beschrieben, also die resultierende Wellenlänge im Prozess von THG. Hier ist ein besonders ausgeprägter Effekt auf die Darstellung von Zellkern zu erkennen (Adur *et al.* 2011; Tuer *et al.* 2010; Yu *et al.* 2008). Elastica van Gieson- und auch Pikrofuchsin-Färbungen wurden hinsichtlich der Signalgebung bei THG untersucht und zeigten ebenfalls eine Kontrastverstärkung (Kazarine *et al.* 2019).

Auch SHG-Signale wurden erfolgreich an H.E.-gefärbten histologischen Schnitten generiert, zeigten jedoch keine Signaländerungen, weder eine Verminderung noch eine Verstärkung, im Vergleich zu ungefärbten Schnitten (Adur *et al.* 2014; Birk *et al.* 2014; Kazarine *et al.* 2019).

In dieser Arbeit wurden mit Hämalun angefärbte Schnitte mittels HHG untersucht, um eine bessere Orientierung innerhalb des Gewebes zu ermöglichen.

Eine weitere Einflussnahme auf die Signale im Sinne von Verfälschungen kann durch die Anwendung von Hämalun ausgeschlossen werden. Hämalun wurde in zahlreichen Studien zur nichtlinearen Optik verwendet und bis heute wurde kein negativer Effekt auf HHG-Signale beschrieben (Campagnola und Loew 2003; Campagnola *et al.* 2002; Campbell *et al.* 2017; Chen *et al.* 2012; Kazarine *et al.* 2019; Nadiarnykh *et al.* 2010; Ranjit *et al.* 2015; Tilbury und Campagnola 2015; Tilbury *et al.* 2014).

Klassische histologische Färbungen können also unterstützend verwendet werden, eine andere Notwendigkeit als die bessere Orientierung im Gewebe durch Anfärbung kann jedoch nicht eindeutig gesehen werden.

6.3 Geordnete vs. ungeordnete Kollagenfibrillen

Die verringerte f/b-Ratio von SHG-Signalen der tumorösen Gewebeproben in dieser Arbeit lässt darauf schließen, dass Kollagenfibrillen hier ungeordneter in ihrem Aufbau, vermindert in ihrer Menge oder beides sind. Eine hohe f/b-Ratio bedeutet ein starkes vorwärts gerichtetes Signal, welches durch eine hohe Ordnung der Fibrillen und/oder reichlich Kollagen im Gewebe entsteht, eine niedrige f/b-Ratio jeweils das Gegenteil (Chen *et al.* 2012; Han und Brown 2010; Tilbury und Campagnola 2015). Einige Arbeitsgruppen berichten von ähnlichen Ergebnissen in soliden Tumorarten. Burke *et al.* untersuchten Gewebe von gesundem Mammagewebe (n=37), duktalem *Carcinoma in situ* (n=20) und Mammakarzinomen (n=147) mittels f/b-Ratio von SHG-Signalen. Fünf Mikrometer dicke histologische Schnitte der verschiedenen Gewebe wurden mit H.E. gefärbt und mittels f/b-Ratio analysiert. Hier zeigte sich ein nicht signifikanter Unterschied der Messergebnisse zwischen gesundem Gewebe und *Carcinoma in situ*, jedoch eine signifikante Verminderung der f/b-Ratio von Mammakarzinom-Gewebe im Vergleich zu den anderen beiden Gewebearten (Burke *et al.* 2013). Nadiarnykh *et al.* führten f/b-Ratio-Messungen an Ovarialkarzinomen durch. Hier wurden 50-100 µm dicke, ungefärbte Gewebeschnitte von gesundem Ovarialgewebe (n = 5) und Ovarialkarzinomen (n = 3) durchgeführt. Auch hier zeigte sich eine niedrigere f/b-Ratio in Tumorgewebe verglichen mit gesundem Gewebe. Hier wurden zum weiteren Vergleich von Tumor- mit gesundem Gewebe T-Tests

in zehn μm -Intervallen innerhalb des Gewebes durchgeführt, alle Ergebnisse zeigten einen signifikanten Unterschied der f/b-Ratio zwischen Tumor- und gesundem Gewebe (Nadiarnykh *et al.* 2010). Zusätzlich wurde beobachtet, dass die f/b-Ratio sich mit zunehmender Eindringtiefe innerhalb des Gewebes vermindert. Je tiefer ein Photon in das Gewebe eindringt, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit eines Streuungsereignisses und damit eines rückwärts gerichteten Signals (Nadiarnykh *et al.* 2010).

Andere Arbeitsgruppen berichten von einer erhöhten Linearität der Kollagenfibrillen in Tumorgewebe. Conklin *et al.* untersuchten die Intensität von SHG-Signalen in 196 Gewebeproben von Mammakarzinomen. Anhand der verschiedenen Intensitätssignale und morphologischen Eigenschaften in der Mikroskopie wurden Rückschlüsse auf die Linearität gezogen. Intensive Signale wurden hier an linear angeordneten Kollagenfibrillen generiert, schwache Signale an ungeordneten Kollagenfibrillen. Diese Linearität würde eine hohe f/b-Ratio in Tumorgewebe bedingen, f/b wurde in dieser Studie jedoch leider nicht angewandt (Conklin *et al.* 2011). Auch von vermehrten (Birk *et al.* 2014), sowie verminderten Kollagenkonzentrationen in Tumorgewebe wird berichtet (Curino *et al.* 2005). Da nicht alle Arbeitsgruppen mit der gleichen Methode der Auswertung arbeiten, ist ein direkter Vergleich der Ergebnisse hier schwierig. Manche konzentrieren sich auf die Kollagenmenge oder den Durchmesser der Fibrillen, andere benutzen die f/b-Ratio, um eine Aussage über die Ordnung des Gewebes zu treffen. Ebenfalls verwendet werden schnelle Fourier-Transformationen (FFT), um Ordnung oder Unordnung in Geweben zu interpretieren (Tilbury und Campagnola 2015; Adur *et al.* 2011). Eine einheitliche Auswertung der SHG-Signale würde einen Vergleich der Arbeiten erleichtern. Studien mit Fokus auf f/b-Ratio, die oben diskutiert wurden, zeigen jedoch ebenfalls, dass in Tumorgewebe eine niedrigere f/b-Ratio messbar ist als in gesundem Gewebe, wie dies in der vorliegenden Arbeit ebenfalls beschrieben wird.

Aufgrund der großen Heterogenität solider Tumoren ist es gut vorstellbar, dass sich Kollagenfibrillen nicht in jedem Tumor gleich verhalten. Sie können in einigen Tumoren durch hohe Linearität der Fasern als Invasionspfad für Tumorzellen dienen (Friedl und Wolf 2008). Linear und teils radiär um den soliden Tumor angeordnete Fasern wurden in bestimmten Tumorentitäten, vor allem Mammakarzinomen gefunden (Conklin *et al.* 2011; Provenzano *et al.* 2006). Auch in Kopf-Hals-Tumoren wurden Kollagenfasern, die radiär um Tumorzellen angeordnet sind als Risikofaktor für Invasivität beschrieben. Conklin *et al.* zeigten dies anhand von HNSCC-Zelllinien mit hoher Invasivität (OECM-1 und SAS). Spheroide dieser Zelllinien wurden in 3D-Kollagen-Typ-I-Matrices mit Fluoreszenzpartikeln eingebettet und kultiviert. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen im Zeitverlauf zeigten eine radiäre Anordnung von Kollagenfibrillen um die Tumorzellspheroide herum (Conklin *et al.* 2011).

Auch erhöhte Mengen an Kollagenfasern in Tumorgewebe wurde beobachtet und als Faktor für eine Invasivität des Tumors beschrieben (Provenzano *et al.* 2008). So zeigten Provenzano *et al.* an Col1a1^{tmJae}-mutierten Mausmodellen ein signifikant höheres Risiko der Entwicklung von Mammakarzinomen sowie von pulmonalen Metastasen. Diese Mäuse tragen eine Mutation im Bereich einer Matrix-Metalloproteinase für Kollagen Typ I und sind somit resistent gegen einen enzymatischen Abbau von Kollagen Typ I. Col1a1^{tmJae}-mutierte Mäuse entwickelten somit eine exzessive Kollagenproduktion. Diese Mausmodelle zeigten eine 2,5-fache Erhöhung von stromalem Kollagen im Vergleich zu Wildtyp-Modellen (Provenzano *et al.* 2008). Mausmodelle mit dieser

Mutation zeigten nicht nur höhere Raten an invasiven Tumoren, sondern auch eine höhere Rate an pulmonalen Metastasen (Provenzano *et al.* 2008).

Eine Degradation der Fasern zur erleichterten Invasion durch epitheliale Tumoren wurde jedoch auch beobachtet. Curino *et al.* zeigten dies anhand von uPARAP/Endo180, einem Mitglied der Makrophagen-Mannose-Rezeptor-Familie von endozytischen transmembranösen Glykoproteinen. Hier wurde eine höhere Expression von uPARAP/Endo180 durch mesenchymale Zellen in Regionen aktiver Gewebetransformation wie beispielsweise Tumorgewebe beschrieben. Das umgebende Stroma von Tumorgewebe erhöht also die Expression von uPARAP/Endo180. Eine erhöhte Expression von uPARAP/Endo180 fördert die lysosomale Degradation von Kollagen. Dies wurde in einem vergleichenden Mausmodell mit Mammakarzinom-entwickelnden, uPARAP/Endo180-defizienten und Wildtyp Mäusen gezeigt. In Tumoren der uPARAP/Endo180-defizienten Mausmodelle war Kollagen im Zeitverlauf von mehreren Stunden weiterhin extrazellulär nachweisbar. In dem nicht defizienten Modell war Kollagen in intrazellulären Vesikeln nachweisbar (Curino *et al.* 2005). Die lysosomale Degradation von Kollagen wird hier als wichtiger Aspekt der Kollagenreduktion in Tumorgewebe zur weiteren Tumorprogression angesehen.

Das Verhalten des Tumor-Mikromilieus und damit auch des Kollagens ist noch nicht abschließend verstanden und zeigt eine große Heterogenität der Extrazellulärmatrix in verschiedenen soliden Tumoren. Hier ist weitere Forschung nötig, um die verschiedenen Abläufe besser verstehen und einordnen zu können.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse dieser Arbeit mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen übereinstimmen. Eine verringerte f/b-Ratio in maligne entartetem gegenüber gesundem Gewebe wurde bereits beobachtet und eignet sich als diagnostisches Kriterium zur Erkennung von Tumorgewebe. Dies wurde bis jetzt vor allem an Gewebe von Mammakarzinomen, Ovarialkarzinomen und Ösophaguskarzinomen gezeigt. Tilbury *et al.* untersuchten sowohl Mamma- als auch Ovarialkarzinome *ex vivo* mittels SHG (Tilbury und Campagnola 2015). Chen *et al.* führten sowohl SHG- als auch TPEF-Mikroskopie an humanem gesundem Gewebe und Ösophaguskarzinomen *ex vivo* durch (Chen *et al.* 2014). Studien zu Mehrphotonen-Mikroskopie von Kopf-Hals-Tumoren sind jedoch seltener als Studien von Mamma- und Ovarialkarzinomen sowie Ösophaguskarzinomen. Von Meyer *et al.* wurde ein Case Report vorgestellt, in welchem das Gewebe von drei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren (Hypopharynx, Larynx sowie Tonsille) *ex vivo* mittels SHG, CARS und TPEF analysiert wurde (Meyer *et al.* 2013). Mit diesem Case Report sollte die Kombination dieser Methoden als Werkzeug zur Tumordiagnostik, vergleichbar mit konventionellen histologischen H&E-Färbungen vorgestellt werden. Der Fokus liegt dabei jedoch auf fluoreszenzbasierter TPEF-Mikroskopie und CARS, weniger auf SHG. Rodner *et al.* untersuchten Kopf-Hals-Tumorgewebe von 12 verschiedenen Patienten *ex vivo* ebenfalls mittels einer Kombination von SHG, CARS und TPEF (Rodner *et al.* 2019). Mittels Literaturrecherche wurden jedoch weder Studien zur Analyse von Kopf-Hals-Tumoren mittels SHG und THG gemeinsam noch Untersuchungen dieser Tumore durch f/b-Ratio gefunden, wie es in dieser Arbeit vorgestellt wird.

6.4 Limitationen von SHG, Stärken und Schwächen des Projekts

Die Restriktion von SHG auf Strukturen mit bestimmten geometrischen Eigenschaften stellt die größte Limitation dieses optischen Verfahrens da. Nur Strukturen, die nicht-inversionssymmetrisch sind, erzeugen ein SHG-Signal (Campagnola und Loew 2003). Dies ist vor allem fibrilläres Kollagen, jedoch weisen auch Myosin und Mikrotubuli geeignete geometrische Eigenschaften auf. Strukturen ohne die geeigneten Symmetrieeigenschaften, wie Zellen oder andere Bestandteile der Extrazellulärmatrix wie nicht-lineare Kollagene, Fibroblasten und weitere können durch SHG nicht dargestellt werden. Hier kann jedoch eine Kombination mit anderen optischen Verfahren einen ergänzenden Beitrag leisten. Um einen ganzheitlichen Eindruck eines Gewebes zu erhalten, kann SHG mit THG kombiniert werden oder auch eine Ergänzung zu anderen optischen Verfahren wie CARS oder TPEF darstellen. THG unterliegt keiner geometrischen Limitation, benötigt jedoch eine gewisse Heterogenität der biophysikalischen Eigenschaften des Gewebes als Voraussetzung. Grenzstrukturen von lipidreichen und flüssigkeitsreichen Membranen sind optimal für das THG-Signal (Aptel *et al.* 2010). Dies ermöglicht die Darstellung von Zellen, Zellkernen, Membrangrenzen und lipidhaltigen Strukturen, eine detailliertere Auswertung und Interpretation vor allem der ECM ist jedoch mit SHG möglich.

Ein großer Vorteil gegenüber anderen Imaging-Verfahren ist die Eindringtiefe von SHG und THG. Rehberg *et al.* erreichten Eindringtiefen von 550 μm für SHG und 525 μm für THG bei *ex vivo* Untersuchungen der Oberschenkelmuskulatur von Mäusen (Rehberg *et al.* 2011). Weigelin *et al.* führten THG-Mikroskopie *in vivo* an einem Mausmodell durch, um die Invasion maligner Melanomzellen zu interpretieren und erreichten eine Eindringtiefe von bis zu 650 μm (Weigelin *et al.* 2012). Eine Eindringtiefe von bis zu 1,5 mm am lebenden Zebrafischembryo-Modell ohne Gewebeschäden wurde von Sun *et al.* beschrieben (Sun *et al.* 2004) Diese Eindringtiefen ermöglichen eine dreidimensionale Darstellung des interessierenden Gewebes, *in vivo* wie *ex vivo*.

In dieser Arbeit lag der Fokus auf der Darstellung von Kollagen mittels SHG und der Interpretation verschiedener Signale in Bezug auf gesundes und maligne entartetes Gewebe des Kopf-Hals-Bereiches. Dies war unabhängig von der Eindringtiefe möglich, da histologische Schnitte mit einer Gewebedicke von vier Mikrometern verwendet wurden. Somit wurde das Potenzial von SHG in Bezug auf die Eindringtiefe in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt. Da die Eindringtiefe vor allem in Bezug auf *in vivo*-Mikroskopie von großem Interesse ist, stellt dies einen vielversprechenden Ansatz für weitere Forschung in diesem Bereich dar, welche auf die präsentierten Daten aufbaut. Auch denkbar ist eine Interpretation von Gewebe mittels f/b-Ratio in Abhängigkeit von der Eindringtiefe. Dies würde bedeuten, dass eine Interpretation eines Tumors *in vivo* auch in Bezug auf seine Tiefenausdehnung möglich wäre.

Eine Stärke des Projekts ist die klar definierte Zielsetzung: Kollagen sollte mittels SHG sowohl in gesundem als auch in Tumorgewebe von Kopf-Hals-Tumoren dargestellt und ein Unterschied in der Kollagenorganisation zwischen den beiden Gruppen herausgearbeitet werden. Hierbei wurde sich auf eine bestimmte Messweise, die forward-to-backward-intensity-Ratio konzentriert. Somit sind Ziele

klar definiert und ein Erfolg des Projektes an wenigen, gut definierten Parametern messbar. Wie bereits beschrieben konnten diese Ziele erfüllt werden.

Durch eine größere Fallzahl in einem Folgeprojekt könnten statistisch validere Aussage erzielt werden. Es wurden ausschließlich Oropharynx-Karzinome ($n = 8/10$) und Hypopharynx-Karzinome ($n = 2/10$) untersucht. Risikofaktoren der Karzinome, also Noxenanamnese oder HPV-Status wurden nicht miteinbezogen, nur die Lokalisation des Karzinoms war bekannt. Dies ist für weitere Untersuchungen sicher relevant, da es hier große Unterschiede in der Prognose der jeweiligen Karzinome gibt. Die große Heterogenität innerhalb von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches macht es nötig, größere Fallzahlen miteinzubeziehen und die Tumorarten im Studiendesign voneinander zu unterscheiden. Das in dieser Arbeit dargestellte Projekt ist eine Grundlagenarbeit, die den Grundstein für weitere Projekte dieser Art legen soll. Verbesserungen des Studiendesigns im Sinne von größeren Fallzahlen, genaueren Tumoreinteilungen und Imaging von ausgedehnten Tumorgebieten sollen auf diesem Projekt aufbauen können. Somit setzt diese Arbeit eine Basis für weitere Projekte in diesem Bereich.

Der Fokus des Projekts lag auf der experimentellen Definition eines validierten HHG-Signals sowie der korrekten Interpretation und Auswertung der Signale. Weitere Projekte dieser Art müssen in Zukunft die Anwendbarkeit und Interpretationsstärke dieses Verfahrens unterstreichen.

Auch eine weitere Interpretation des THG-Signals sollte für zukünftige Projekte in Erwägung gezogen werden. Diverse Forschungsgruppen sehen in THG ein weiteres vielversprechendes Imaging-Verfahren, welches unter anderem Stärken im Bereich der Darstellung von Zellmigration zeigt (Weigelin *et al.* 2016). Somit wäre THG nicht nur eine optische Unterstützung zur Orientierung in Gewebeproben, sondern ein eigener Ansatzpunkt zur Gewebeinterpretation.

6.5 Klinische Relevanz und Ausblick

Aufgrund ihrer gewebeschonenden Eigenschaften und Eindringtiefe von mehreren hundert Mikrometern kann SHG-Imaging als optimales Instrument zur *in vivo*-Mikroendoskopie genutzt werden. Trotz nicht zu unterschätzender technischer Herausforderungen wurden bereits Mikroendoskope hergestellt, welche erfolgreich *in vivo* getestet wurden und eine qualitativ hochwertige Mikroskopie ermöglichten. 2012 stellten Brown *et al.* als erste Arbeitsgruppe ein Mikroendoskop vor, mit welchem *in vivo* Mikroskopie an Niere, Leber und Darm von Mäusen erfolgreich durchgeführt wurde. Qualitativ hochwertige Bilder konnten generiert werden und das Potential der SHG-Mikroendoskopie wurde aufgezeigt (Brown *et al.* 2012). Auch Zhang *et al.* gelang es, ein Mikroendoskop von nur zwei Millimetern Durchmesser mit einer Auflösung vergleichbar zu der von großen Mehrphotonen-Mikroskopen zu entwickeln (Zhang *et al.* 2012). Ducourthial *et al.* haben ein Mikroendoskop entwickelt, welches simultan SHG- und TPEF- Bilder erzeugen kann. *In vivo* Experimente an Mäusenieren waren bereits erfolgreich, es wurden Eindringtiefen von mehr als 300 μm erreicht (Ducourthial *et al.* 2016). Erste Schritte in Richtung einer SHG-Tomographie im Sinne einer 3D-Gewebedarstellung von Gewebeproben aus Mausschwänzen *ex vivo* (Campbell *et al.* 2017)

und humanen Ovarialkarzinomen sowie gesundem Ovarialgewebe *ex vivo* wurden ebenfalls bereits gemacht (Campbell *et al.* 2017; Wen *et al.* 2016). Diverse Arbeitsgruppen entwickeln diese und ähnliche Mikroskope trotz schwieriger technischer Voraussetzungen stetig weiter. Das Potential der SHG-Mikroskopie wurde erkannt und es kann davon ausgegangen werden, dass der klinische Gebrauch in naher Zukunft möglich ist.

Ein weiterer interessanter Ansatz zur Nutzung von Mehrphotonen-Mikroskopie im Allgemeinen und SHG-Imaging im Speziellen ist die Beurteilung von operativen Resektionsrändern bei Tumorpatienten. Funktionserhalt geht vor allem bei Kopf-Hals-Tumoren Hand in Hand mit Lebensqualität. Durch detaillierte und sichere Beurteilung von Tumorsektionsrändern kann unter maximaler Schonung von gesundem Gewebe therapiert werden. Somit ist ein Funktionserhalt leichter zu erreichen, ohne das Risiko eines Verbleibs möglicher Tumormassen *in situ* zu erhöhen. Gewebeproben müssen nicht gefärbt werden und können direkt nach Resektion mikroskopisch analysiert werden. Denkbar wäre eine Mikroskopie im Sinne einer Schnellschnittdiagnostik, welche valide Aussagen über eine Resektion *in sano* oder eine möglicherweise nötige radikalere Resektion direkt im intraoperativen Setting machen könnte. Arbeitsgruppen haben bereits Resektionsränder von Kolonkarzinomen auf diese Weise untersucht und waren in der Lage, signifikante Unterschiede zwischen tumorfreien und tumorbefallenen Resektionsrändern festzustellen (Yan *et al.* 2014). Ebenso denkbar wäre eine zur Schnellschnitt-Diagnostik komplementäre Anwendung, um direkt *in vivo* mittels SHG/MPM-Mikroskopie den nötigen Resektionsumfang für eine Entfernung im Gesunden erkennen zu können. Dazu wäre ein kompaktes, für einen OP-Saal geeignetes Mikroskop und eine standardisierte Analysemöglichkeit des jeweiligen Tumors nötig, um valide Aussagen treffen zu können (Meyer *et al.* 2013).

Auch im Hinblick auf eine mögliche Feldkanzerisierung sowie synchroner Tumoren ist eine nichtinvasive Untersuchungstechnik von großer Relevanz. Dies ist besonders im Bereich der Kopf-Hals-Tumoren der Fall, da sie noxenbedingt hier vermehrt auftreten (Ryser *et al.* 2016). Eine flächendeckende Beurteilung nicht eindeutig tumorösen Gewebes im Kopf-Hals-Bereich, die über das stichprobenartige Entnehmen von Biopsien hinausgeht, könnte von großem Nutzen hinsichtlich synchroner Tumoren sein. Auch hier wäre *in vivo* Mikroskopie im OP mittels SHG ein vielversprechendes Verfahren.

Solche Projekte werden bereits in die Praxis umgesetzt. Dies zeigen bereits entwickelte, handliche Mikroskope und Mikroendoskope (Zhang *et al.* 2012; Ducourthial *et al.* 2016; Yan *et al.* 2014; Wu *et al.* 2009). Hiermit könnten bei Verdacht auf Feldkanzerisierung große Schleimhautbezirke nichtinvasiv untersucht werden. Dies würde eine schnellere, schonendere und verlässlichere Diagnostik bedeuten.

Aktuell basiert eine Panendoskopie mit Probenentnahme auf dem mehr oder weniger erfahrenen Auge des Operateurs und somit auf subjektiven Parametern. Wie bereits beschrieben, können jedoch präkanzeröse Läsionen oder auch bereits invasive Tumoren dem menschlichen Auge entgehen. Ein objektivierbares Setting im Sinne einer *in vivo* Mikroskopie würde die Diagnostik bedeutend erleichtern.

Die Mehrphotonen-Mikroskopie und mit ihr Second und Third Harmonic Generation Imaging stellen vielversprechende Werkzeuge zur Diagnostik maligner Erkrankungen dar. Tumordiagnostik sowie -therapie könnten gezielter und gewebeschonender durchgeführt werden. Dies ist ein dynamisches Forschungsgebiet mit hochinteressanten Erkenntnissen in den letzten Jahren. Es kann für sich alleinstehend interessante Aussagen über verschiedene Gewebestrukturen treffen und in Kombination mit anderen Imaging-Verfahren ein ganzheitliches, detailliertes Bild schaffen. Der Weg hin zu gewebeschonenden, möglichst wenig invasiven Mikroskopier-Arten eröffnet ein breites Feld im Bereich der Diagnostik und Therapie verschiedenster Erkrankungen. Das Potential nichtlinearer Optik in der Medizin hat sich in den letzten Jahren bereits gezeigt und wird mit der Weiterentwicklung klinischer Anwendungsgebiete weiter ausgeschöpft.

7 Zusammenfassung

Kopf-Hals-Tumore sind mit 700.000 Neuerkrankungen pro Jahr weltweit eine häufige Gruppe an malignen Tumoren (Sung, Ferlay *et al.* 2021). Mäßige Überlebensraten und eine steigende Inzidenz in Deutschland (Robert Koch-Institut (RKI)) verlangen sichere Diagnostik- und Therapiemöglichkeiten für Patienten und Ärzte. Vor allem hinsichtlich operativer Therapien ist eine genaue Kenntnis der Tumorgrenzen von Nöten, um möglichst funktionserhaltend, jedoch mit minimalem Risiko von Tumorresiduen zu therapieren. Dies stellt sich aufgrund der Lage von Kopf-Hals-Tumoren, vor allem im Bereich von Larynx und Pharynx oft als Herausforderung dar.

Ein vielversprechender Ansatz zum weiteren Verständnis von Tumorerkrankungen bietet die Untersuchung der Extrazellulärmatrix und Veränderungen dieser in der Tumorprogression. Die ECM ist nicht nur Stütz- und Füllwerk für Zellen, sondern interagiert aktiv mit umliegenden Gewebebestandteilen, nimmt Einfluss auf Signalwege sowie auf die Progression und Metastasierung maligner Tumoren (Walker *et al.* 2018; Venning *et al.* 2015). Sie ist somit ein äußerst komplexes Netzwerk und weitere Erkenntnisse im Hinblick auf Aufgaben der ECM können wertvolle Informationen bezüglich des Verständnisses von Tumorerkrankungen erbringen.

In der vorliegenden Arbeit wurde das nichtlinear optische Verfahren der Higher Harmonic Generation, genauer Second und Third Harmonic Generation vorgestellt – eine Möglichkeit, Veränderungen der ECM ohne Färbungen und ohne Schädigung des Gewebes zu untersuchen. Die theoretischen Grundlagen wurden erläutert und ein Überblick über Anwendungsbereiche und Limitationen wurde gegeben. Der experimentelle Teil der Arbeit beinhaltete die mikroskopische Analyse histologischer Schnitte von Kopf-Hals-Tumoren und gesundem Gewebe mehrerer Patienten (n jeweils = 10). Zum einen wurden diese am Lichtmikroskop untersucht, zum anderen an einem Mehrphotonen-Mikroskop. Hierbei konnte ein eindeutiger Beweis eines erfolgreich generierten SHG-Signals durch Vergleich mit etablierten histologischen Färbungen wie Immunhistologie (Coll I) und Elastica van Gieson erbracht werden. Ferner wurde mit Hilfe der Software „FIJI“ eine detaillierte Auswertung der angefertigten SHG-Bilder durchgeführt. Hierbei zeigte sich ein deutlicher Unterschied der Bildinformation zwischen gesundem und maligne entartetem Gewebe. Dies wurde durch die f/b-Ratio, also dem Verhältnis zwischen vorwärts und rückwärts gerichtetem SHG-Signal der jeweiligen Gewebeproben erreicht. In fast allen Tumorgewebeproben war dieses Verhältnis niedriger als in den korrespondierenden gesunden Proben. Dies gibt Hinweis auf einen weniger geordneten Zustand des Tumorgewebes und eine Veränderung der Kollagenfibrillen und damit der Extrazellulärmatrix in Tumorgewebe.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Second und Third Harmonic Generation Imaging vielversprechende Werkzeuge zur Diagnostik und Therapie von Tumorerkrankungen sind. Die nächsten Jahre werden weitere Entwicklungen und Erkenntnisse in diesem interessanten Gebiet der Mikroskopie erbringen. Vor allem können Weiterentwicklungen im Bereich der *in vivo* Mikroskopie für den klinischen Gebrauch äußerst interessant werden.

8 Lebenslauf

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

AML.....	<i>akute myeloische Leukämie</i>
CARS	<i>Coherent Anti Stokes Raman Scattering-Mikroskopie</i>
Coll-I.....	<i>Kollagen Typ I</i>
CUP.....	<i>Cancer of unknown primary</i>
ECM	<i>Extrazellulärmatrix</i>
EGF.....	<i>epidermal growth factor/epidermaler Wachstumsfaktor</i>
EMT.....	<i>epithelial-mesenchymale Transition</i>
FACIT.....	<i>Fibril Associated Collagens with Interrupted Triple helices</i>
FFT.....	<i>schnelle Fourier-Transformation</i>
Fiji.....	<i>Fiji Is Just Image J</i>
H.E	<i>Hämatoxylin-Eosin</i>
HHG	<i>Higher Harmonic Generation</i>
HNSCC	<i>Head and Neck Squamous Cell Carcinoma</i>
HPV.....	<i>humane Papillomaviren</i>
MET.....	<i>mesenchymal-epitheliale Transition</i>
MMP-9.....	<i>Matrix-Metalloproteinase-9</i>
MPM.....	<i>Mehrphotonen-Mikroskopie</i>
NADH.....	<i>Nicotinamidadenindinukleotid</i>
nm	<i>Nanometer</i>
OCT.....	<i>Optimal Cutting Temperature</i>
OPO	<i>optisch-parametrischer Oszillator</i>
ROI.....	<i>Region of interest</i>
SHG	<i>Second Harmonic Generation</i>
SNAIL.....	<i>Snail family zinc finger</i>
THG.....	<i>Third Harmonic Generation</i>
TICs.....	<i>Tumor-induzierende Zellen</i>
TNM-Klassifikationen	<i>Klassifikation maligner Tumoren nach Tumor(ausdehnung), Nodus, Metastase</i>
TPEF	<i>2-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie</i>
TWIST	<i>Twist basic helix-loop-helix transcription factor</i>
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
ZEB	<i>Zinc finger E-box binding homeobox</i>

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Second und Third Harmonic Generation Imaging. Prinzip der Frequenzverdopplung (SHG, rot, oben) und Frequenzverdreifachung (THG, grün, unten) mit jeweiligen Wellenlängen, frei nach (Aptel et al. 2010).....	24
Abbildung 2: Ablauf der Experimente.....	28
Abbildung 3: Schematischer, vereinfachter Aufbau des Mehrphotonen- Mikroskops und der Streuung der Photonen. Detektor b_{SHG} ist rückwärts gerichtet (backward), Detektor f_{SHG} vorwärts gerichtet (forward).....	29
Abbildung 4: SHG-Signal an Kollagenfibrillen in gesundem Gewebe, links in der Übersicht, rechts in der Detailaufnahme unter Angabe des Größenbalkens (links 100 μm , rechts 25 μm)	37
Abbildung 5: THG-Signal an Zellgrenzen in gesundem Gewebe, links in der Übersicht, rechts in der Detailaufnahme unter Angabe des Größenbalkens (links 100 μm , rechts 25 μm).....	37
Abbildung 6: Vergleich Immunhistologie gegen Coll-I (links) mit SHG+THG (rechts) von sukzessiven Schnitten von Tumorgewebe unter Angabe des Größenbalkens (100 μm). Links ist das Kollagen in Braun dargestellt, Zellkerne und Zytoplasma in Blau. Rechts zeigt sich Kollagen als SHG-Signal in Rot, Zellkerne und Zytoplasma als THG-Signal in Grün.	38
Abbildung 7: Vergleich Immunhistologie gegen Coll-I (links) mit SHG+THG (rechts) von sukzessiven Schnitten von Tumorgewebe unter Angabe des Größenbalkens (50 μm). Links ist das Kollagen in Braun dargestellt, Zellkerne und Zytoplasma in Blau. Rechts zeigt sich Kollagen als SHG-Signal in Rot, Zellkerne und Zytoplasma als THG-Signal in Grün.	39
Abbildung 8: Vergleich Elastica van Gieson (links) mit SHG+THG (rechts) in sukzessiven Schnitten von gesundem Gewebe unter Angabe des Größenbalkens (50 μm). Links sind Kollagenfasern in Magenta dargestellt, rechts in Rot.	40
Abbildung 9: Vergleich Elastica van Gieson (links) mit SHG+THG (rechts) in sukzessiven Schnitten von gesundem Gewebe unter Angabe des Größenbalkens (25 μm). Links sind Kollagenfasern in Magenta dargestellt, rechts in Rot.	40
Abbildung 10: Vergleich Immunhistologie Coll-I (oben), Elastica van Gieson (mittig) und SHG+THG (unten) in sukzessiven Schnitten von gesundem Gewebe unter Angabe des Größenbalkens (50 μm).	41
Abbildung 11: SHG-Signal von gesundem Gewebe aus dem Kopf-Hals-Bereich. Gezeigt sind repräsentative Beispiele der Bestimmung der Pixelintensität des vorwärts- (links) und rückwärts gerichteten SHG-Signals (rechts) unter Angabe des Größenbalkens (50 μm). Das f_{SHG} -Signal wird durch den vorwärts gerichteten Detektor mit detektierbarem Wellenlängenbereich von 417-477 nm aufgefangen, das b_{SHG} -Signal durch den rückwärts gerichteten Detektor mit gleichem detektierbarem Wellenlängenbereich.....	43
Abbildung 12: SHG-Signal von Tumorgewebe aus dem Kopf-Hals-Bereich. Gezeigt sind repräsentative Beispiele der Bestimmung der Pixelintensität des vorwärts- (links) und rückwärts gerichteten SHG-Signals (rechts) unter Angabe des Größenbalkens (50 μm). Das f_{SHG} -Signal wird durch den vorwärts gerichteten Detektor mit detektierbarem Wellenlängenbereich von 417-477 nm aufgefangen, das b_{SHG} -Signal durch den rückwärts gerichteten Detektor mit gleichem detektierbarem Wellenlängenbereich.....	43

Abbildung 13: Pixelintensität der vorwärts- und rückwärts gerichteten SHG-Signale in gesundem Gewebe aus dem Kopf-Hals-Bereich. Gezeigt sind repräsentative Beispiele der Bestimmung der Pixelintensität des vorwärts- (links) und rückwärts gerichteten SHG-Signals (rechts) unter Angabe des Größenbalkens (50 μm). die farbskalierte Pixelintensität ist in jedem repräsentativen Bild angegeben.	44
Abbildung 14: Pixelintensität der vorwärts- und rückwärts gerichteten SHG-Signale in Tumorgewebe aus dem Kopf-Hals-Bereich. Gezeigt sind repräsentative Beispiele der Bestimmung der Pixelintensität des vorwärts- (links) und rückwärts gerichteten SHG-Signals (rechts) unter Angabe des Größenbalkens (50 μm). die farbskalierte Pixelintensität ist in jedem repräsentativen Bild angegeben.	44
Abbildung 15: Pixelintensität der vorwärts- und rückwärts gerichteten SHG-Signale in Tumorgewebe aus dem Kopf-Hals-Bereich. Gezeigt sind repräsentative Beispiele der Bestimmung der Pixelintensität des vorwärts- (links) und rückwärts gerichteten SHG-Signals (rechts) unter Angabe des Größenbalkens (50 μm). die farbskalierte Pixelintensität ist in jedem repräsentativen Bild angegeben.	45
Abbildung 16: Mittelwerte der jeweiligen f/b-Ratio aller Gewebeproben in gesundem und malignem Gewebe. Alle zehn untersuchten Gewebeproben sind abgebildet, hierzu jeweils gesundes Gewebe (blauer Balken) und Tumorgewebe (roter Balken). Die x-Achse zeigt die Aufreihung der verschiedenen Gewebeproben, die y-Achse die f/b-Ratio in absoluten Zahlen ohne Einheit.	46
Abbildung 17: SHG-Signal (oben, rot), THG-Signal (mittig, grün) und Kombination der beiden Signale (unten) in einer repräsentativen Probe von gesundem Gewebe mit Angabe des Größenbalkens (25 μm).	49
Abbildung 18: Negativkontrolle in einem Bereich ohne Kollagen unter Angabe des Größenbalkens (100 μm). Links ist das lichtmikroskopische Bild zu sehen, rechts das THG-Signal (grün), welches an Zellgrenzen und Nuklei generiert wird. Ein SHG-Signal konnte nicht generiert werden.	50

9.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: T-Kategorien p16-positiver und negativer Oropharynxkarzinome nach der aktuellen achten Auflage der TNM-Klassifikation, frei nach (Doescher et al. 2017; Wittekind 2017)	12
Tabelle 2: klinische N-Kategorien p16-positiver Oropharynxkarzinome und p16- negativer Oro- und Hypopharynxkarzinome nach der aktuellen achten Auflage der TNM-Klassifikation, frei nach (Doescher et al. 2017; Wittekind 2017)	13
Tabelle 3: Stadieneinteilung der Oropharynxkarzinome nach UICC, frei nach (Doescher et al. 2017; Wittekind 2017)	14
Tabelle 4: Übersicht über die bekannten Kollagenarten und ihr Vorkommen, frei nach (Gelse 2003) und (Fang et al. 2014)	18
Tabelle 5: Die drei verwendeten Detektoren des Mehrphotonen-Mikroskops mit detektiertem Wellenlängenbereich und Richtung des Signalempfangs	29
Tabelle 6: In der Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien	29

Tabelle 7: In der Arbeit verwendete Geräte	30
Tabelle 8: Durchgeführte Färbungen	31
Tabelle 9: Verbrauchslösungen Immunhistologie	31
Tabelle 10: Färbeprotokoll Immunhistologie	32
Tabelle 11: Färbeprotokoll Elastica van Gieson.....	33
Tabelle 12: Färbeprotokoll Hämalalaun	34
Tabelle 13: Zweistichproben t-Test bei unabhängigen Stichproben. Gesundes Gewebe wird mit Tumorgewebe verglichen. Es handelt sich um zehn Beobachtungen.	47

9.4 Literaturverzeichnis

A. Ozturk; G. Alco; D. Sarsenov; S. Ilgun; C Ordu; U Koksall et al. (2018): Synchronous and Metachronous Bilateral Breast Cancer. A Long-Term Experience. In: *Journal of B.U.ON. : official journal of the Balkan Union of Oncology* 23 (6). Online verfügbar unter https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.emedien.ub.uni-muenchen.de/30610782/?from_term=metachronous+tumor&from_sort=&from_pos=3.

Adur, Javier; Pelegati, Vitor B.; Costa, Levenson F. L.; Pietro, Luciana; Thomas, Andre A. de; Almeida, Diogo B. et al. (2011): Recognition of serous ovarian tumors in human samples by multimodal nonlinear optical microscopy. In: *Journal of biomedical optics* (16(9)), 1-10. Online verfügbar unter <http://biomedicaloptics.spiedigitallibrary.org/> on 08/27/2015 Terms of Use: <http://spiedigitallibrary.org/ss/TermsOfUse.aspx>.

Adur, Javier; Pelegati, Vitor B.; Thomaz, Andre A. de; Baratti, Mariana O.; Andrade, Liliana A. L. A.; Carvalho, Hernandes F. et al. (2014): Second harmonic generation microscopy as a powerful diagnostic imaging modality for human ovarian cancer. In: *Journal of biophotonics* 7 (1-2), S. 37–48. DOI: 10.1002/jbio.201200108.

Ajeti, Visar; Nadiarnykh, Oleg; Ponik, Suzanne M.; Keely, Patricia J.; Eliceiri, Kevin W.; Campagnola, Paul J. (2011): Structural changes in mixed Col I Col V collagen gels probed by SHG microscopy, implications for probing stromal alterations in human breast cancer. In: *Biomedical optics express* 2011 (Vol. 2, No.8).

Aptel, Florent; Olivier, Nicolas; Deniset-Besseau, Ariane; Legeais, Jean-Marc; Plamann, Karsten; Schanne-Klein, Marie-Claire; Beaurepaire, Emmanuel (2010): Multimodal nonlinear imaging of the human cornea. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 51 (5), S. 2459–2465. DOI: 10.1167/iovs.09-4586.

Argiris, Athanassios; Karamouzis, Michalis V.; Raben, David; Ferris, Robert L. (2008): Head and neck cancer. In: *The Lancet* 371 (9625), S. 1695–1709. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)60728-X.

Balaker, Ashley E.; Abemayor, Elliot; Elashoff, David; St John, Maie A. (2012): Cancer of unknown primary. Does treatment modality make a difference? In: *The Laryngoscope* 122 (6), S. 1279–1282. DOI: 10.1002/lary.22424.

Beynon, Rhona A.; Lang, Samantha; Schimansky, Sarah; Penfold, Christopher M.; Waylen, Andrea; Thomas, Steven J. et al. (2018): Tobacco smoking and alcohol drinking at diagnosis of head and neck

cancer and all-cause mortality. Results from head and neck 5000, a prospective observational cohort of people with head and neck cancer. In: *International journal of cancer*. DOI: 10.1002/ijc.31416.

Birk, John W.; Tadros, Micheal; Moezardalan, Koorosh; Nadyarnykh, Oleg; Forouhar, Faripour; Anderson, Joseph; Campagnola, Paul (2014): Second harmonic generation imaging distinguishes both high-grade dysplasia and cancer from normal colonic mucosa. In: *Digestive diseases and sciences* 59 (7), S. 1529–1534. DOI: 10.1007/s10620-014-3121-7.

Blot et al. (1988): Smoking and Drinking in Relation to Oral and Pharyngeal Cancer. In: *Cancer Research* (48), S. 3282–3287.

Bonnans, Caroline; Chou, Jonathan; Werb, Zena (2014): Remodelling the extracellular matrix in development and disease. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 15 (12), S. 786–801. DOI: 10.1038/nrm3904.

Bonnet, D.; Dick, J. E. (1997): Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. In: *Nature medicine* 3 (7), S. 730–737.

Bosman, Fred T.; Stamenkovic, Ivan (2003): Functional structure and composition of the extracellular matrix. In: *The Journal of pathology* 200 (4), S. 423–428. DOI: 10.1002/path.1437.

Brierley, James; Gospodarowicz, Mary K.; Wittekind, Christian (Hg.) (2017): TNM classification of malignant tumours. Eighth edition. Chichester, West Sussex, UK, Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Inc.

Brown, Christopher M.; Rivera, David R.; Pavlova, Ina; Ouzounov, Dimitre G.; Williams, Wendy O.; Mohanan, Sunish et al. (2012): In vivo imaging of unstained tissues using a compact and flexible multiphoton microendoscope. In: *Journal of biomedical optics* 17 (4), S. 40505. DOI: 10.1117/1.JBO.17.4.040505.

Brown, Edward; McKee, Trevor; diTomaso, Emmanuelle; Pluen, Alain; Seed, Brian; Boucher, Yves; Jain, Rakesh K. (2003): Dynamic imaging of collagen and its modulation in tumors in vivo using second-harmonic generation. In: *Nature medicine* 9 (6), S. 796–800. DOI: 10.1038/nm879.

Burke, Kathleen; Tang, Ping; Brown, Edward (2013): Second harmonic generation reveals matrix alterations during breast tumor progression. In: *Journal of biomedical optics* 18 (3), S. 0–9. DOI: 10.1117/1.JBO.18.3.031106.

C. Grønhøj Larsen; M. Gyldenløve; DH. Jensen; MH. Therkildsen; K. Kiss; B. Norrild et al. (2014): Correlation Between Human Papillomavirus and p16 Overexpression in Oropharyngeal Tumours. A Systematic Review. In: *British journal of cancer* 110 (6). DOI: 10.1038/bjc.2014.42.

Campagnola, Paul J.; Loew, Leslie M. (2003): Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms. In: *Nature biotechnology* 21 (11), S. 1356–1360. DOI: 10.1038/nbt894.

Campagnola, Paul J.; Millard, Andrew C.; Terasaki, Mark; Hoppe, Pamela E.; Malone, Christian J.; Mohler, William A. (2002): Three-Dimensional High-Resolution Second-Harmonic Generation Imaging of Endogenous Structural Proteins in Biological Tissues. In: *Biophysical journal* 82 (1), S. 493–508. DOI: 10.1016/S0006-3495(02)75414-3.

Campbell, Kirby R.; Wen, Bruce; Shelton, Emily M.; Swader, Robert; Cox, Benjamin L.; Eliceiri, Kevin; Campagnola, Paul J. (2017): 3D second harmonic generation imaging tomography by multi-view excitation. In: *Optica* 4 (10), S. 1171–1179. DOI: 10.1364/OPTICA.4.001171.

Campbell, Lauren L.; Polyak, Kornelia (2007): Breast tumor heterogeneity. Cancer stem cells or clonal evolution? In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 6 (19), S. 2332–2338. DOI: 10.4161/cc.6.19.4914.

Chang, Chieh-Feng; Yu, Che-Hang; Sun, Chi-Kuang (2010): Multi-photon resonance enhancement of third harmonic generation in human oxyhemoglobin and deoxyhemoglobin. In: *Journal of biophotonics* 3 (10-11), S. 678–685. DOI: 10.1002/jbio.201000045.

Chaturvedi, Anil K.; Engels, Eric A.; Pfeiffer, Ruth M.; Hernandez, Brenda Y.; Xiao, Weihong; Kim, Esther et al. (2011): Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29 (32), S. 4294–4301. DOI: 10.1200/JCO.2011.36.4596.

Chen, W. S.; Wang, Y.; Liu, N. R.; Zhang, J. X.; Chen, R. (2014): Multiphoton microscopic imaging of human normal and cancerous oesophagus tissue. In: *Journal of microscopy* 253 (1), S. 79–82. DOI: 10.1111/jmi.12102.

Chen, Xiyi; Nadiarynkh, Oleg; Plotnikov, Sergey; Campagnola, Paul J. (2012): Second harmonic generation microscopy for quantitative analysis of collagen fibrillar structure. In: *Nature protocols* 7 (4), S. 654–669. DOI: 10.1038/nprot.2012.009.

Chen, Yin-Quan; Kuo, Jean-Cheng; Wei, Ming-Tzo; Chen, Yen-Chih; Yang, Muh-Hwa; Chiou, Arthur (2019): Early stage mechanical remodeling of collagen surrounding head and neck squamous cell carcinoma spheroids correlates strongly with their invasion capability. In: *Acta biomaterialia* 84, S. 280–292. DOI: 10.1016/j.actbio.2018.11.046.

Chuang, Shu-Chun; Jenab, Mazda; Heck, Julia E.; Bosetti, Cristina; Talamini, Renato; Matsuo, Keitaro et al. (2012): Diet and the risk of head and neck cancer. A pooled analysis in the INHANCE consortium. In: *Cancer causes & control : CCC* 23 (1), S. 69–88. DOI: 10.1007/s10552-011-9857-x.

Conklin, Matthew W.; Eickhoff, Jens C.; Riching, Kristin M.; Pehlke, Carolyn A.; Eliceiri, Kevin W.; Provenzano, Paolo P. et al. (2011): Aligned collagen is a prognostic signature for survival in human breast carcinoma. In: *The American journal of pathology* 178 (3), S. 1221–1232. DOI: 10.1016/j.ajpath.2010.11.076.

Conway, David I.; Brenner, Darren R.; McMahon, Alex D.; Macpherson, Lorna M. D.; Agudo, Antonio; Ahrens, Wolfgang et al. (2015): Estimating and explaining the effect of education and income on head and neck cancer risk. INHANCE consortium pooled analysis of 31 case-control studies from 27 countries. In: *International journal of cancer* 136 (5), S. 1125–1139. DOI: 10.1002/ijc.29063.

Cox, Thomas R.; Erler, Janine T. (2011): Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix. Implications for fibrotic diseases and cancer. In: *Disease models & mechanisms* 4 (2), S. 165–178. DOI: 10.1242/dmm.004077.

Curino, Alejandro C.; Engelholm, Lars H.; Yamada, Susan S.; Holmbeck, Kenn; Lund, Leif R.; Molinolo, Alfredo A. et al. (2005): Intracellular collagen degradation mediated by uPARAP/Endo180 is a major pathway of extracellular matrix turnover during malignancy. In: *The Journal of cell biology* 169 (6), S. 977–985. DOI: 10.1083/jcb.200411153.

Dela Cruz, Johanna M.; McMullen, Jesse D.; Williams, Rebecca M.; Zipfel, Warren R. (2010): Feasibility of using multiphoton excited tissue autofluorescence for in vivo human histopathology. In: *Biomedical optics express* 1 (5), S. 1320–1330. DOI: 10.1364/BOE.1.001320.

Devendra, Alrani; Niranjan, Kochli C.; Swetha, Acharya; Kaveri, Hallikeri (2018): Histochemical analysis of collagen reorganization at the invasive front of oral squamous cell carcinoma tumors. In: *Journal of investigative and clinical dentistry* 9 (1). DOI: 10.1111/jicd.12283.

Doescher, J.; Veit, J. A.; Hoffmann, T. K. (2017): Die 8. Ausgabe der TNM-Klassifikation. Neuerungen für das Fachgebiet Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie. In: *HNO* 65 (12), S. 956–961. DOI: 10.1007/s00106-017-0391-3.

Ducourthial, Guillaume; Leclerc, Pierre; Mansuryan, Tigran; Fabert, Marc; Brevier, Julien; Habert, Rémi et al. (2016): Development of a real-time flexible multiphoton microendoscope for label-free imaging in a live animal. In: *Sci Rep* 5 (1), S. 73. DOI: 10.1038/srep18303.

Egeblad, Mikala; Rasch, Morten G.; Weaver, Valerie M. (2010): Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. In: *Current opinion in cell biology* 22 (5), S. 1–17. DOI: 10.1016/j.ceb.2010.08.015.

Erkal et al. (2001): Synchronous and Metachronous Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck Mucosal Sites. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* (19), S. 1358–1362.

Fang, Min; Yuan, Jingping; Peng, Chunwei; Li, Yan (2014): Collagen as a double-edged sword in tumor progression. In: *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 35 (4), S. 2871–2882. DOI: 10.1007/s13277-013-1511-7.

Sung, Hyuna; Ferlay, Jacques; Siegel, Rebecca L.; Laversanne, Mathieu; Soerjomataram, Isabelle; Jemal, Ahmedin; Bray, Freddie (2021): Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. In: *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2021;0: 1-41 DOI: 10.3322/caac.21660.

Friedl, Peter; Gilmour, Darren (2009): Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 10 (7), S. 445–457. DOI: 10.1038/nrm2720.

Friedl, Peter; Wolf, Katarina (2008): Tube travel. The role of proteases in individual and collective cancer cell invasion. In: *Cancer Research* 68 (18), S. 7247–7249. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0784.

Gelse, K. (2003): Collagens—structure, function, and biosynthesis. In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 55 (12), S. 1531–1546. DOI: 10.1016/j.addr.2003.08.002.

Göppert-Mayer, Maria (1931): Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. In: *Ann. Phys.* 401 (3), S. 273–294. DOI: 10.1002/andp.19314010303.

Green, Nicola H.; Delaine-Smith, Robin M.; Askew, Hannah J.; Byers, Robert; Reilly, Gwendolen C.; Matcher, Stephen J. (2017): A new mode of contrast in biological second harmonic generation microscopy. In: *Scientific reports* 7 (1), S. 13331. DOI: 10.1038/s41598-017-13752-y.

Griffioen, Gwendolyn H. M. J.; Louie, Alexander V.; Bree, Remco de; Smit, Egbert F.; Paul, Marinus A.; Slotman, Ben J. et al. (2015): Second primary lung cancers following a diagnosis of primary head and neck cancer. In: *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 88 (1), S. 94–99. DOI: 10.1016/j.lungcan.2015.01.011.

Hammarstedt, Lalle; Lindquist, David; Dahlstrand, Hanna; Romanitan, Mircea; Dahlgren, Liselotte Onelöv; Joneberg, Jeanna et al. (2006): Human papillomavirus as a risk factor for the increase in incidence of tonsillar cancer. In: *International journal of cancer* 119 (11), S. 2620–2623. DOI: 10.1002/ijc.22177.

- Han, Xiaoxing; Brown, Edward (2010): Measurement of the ratio of forward-propagating to back-propagating second harmonic signal using a single objective. In: *Optics express* 18 (10), S. 1–23. DOI: 10.1364/OE.18.010538.
- Hanahan, Douglas; Weinberg, Robert A. (2000): The Hallmarks of Cancer. In: *Cell* 100 (1), S. 57–70. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9.
- Hanahan, Douglas; Weinberg, Robert A. (2011): Hallmarks of cancer. The next generation. In: *Cell* 144 (5), S. 646–674. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Hashibe, Mia; Brennan, Paul; Benhamou, Simone; Castellsague, Xavier; Chen, Chu; Curado, Maria Paula et al. (2007): Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer. Pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. In: *Journal of the National Cancer Institute* 99 (10), S. 777–789. DOI: 10.1093/jnci/djk179.
- Hashibe, Mia; Brennan, Paul; Chuang, Shu-Chun; Boccia, Stefania; Castellsague, Xavier; Chen, Chu et al. (2009): Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer. Pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. In: *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 18 (2), S. 541–550. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0347.
- Hashim, D.; Genden, E.; Posner, M.; Hashibe, M.; Boffetta, P. (2019): Head and neck cancer prevention. From primary prevention to impact of clinicians on reducing burden. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 30 (5), S. 744–756. DOI: 10.1093/annonc/mdz084.
- Hay, E. D. (1995): An overview of epithelio-mesenchymal transformation. In: *Acta anatomica* 154 (1), S. 8–20.
- Hellwarth, Robert; Christensen, Paul (1974): Nonlinear optical microscopic examination of structure in polycrystalline ZnSe. In: *Optics Communications* 12 (3), S. 318–322. DOI: 10.1016/0030-4018(74)90024-8.
- Helmchen, Fritjof; Denk, Winfried (2005): Deep tissue two-photon microscopy. In: *Nature methods* 2 (12), S. 932–940. DOI: 10.1038/nmeth818.
- Herruer, Jasmijn M.; Taylor, S. Mark; MacKay, Colin A.; Ubayasiri, Kishan M.; Lammers, Deanna; Kuta, Victoria et al. (2020): Intraoperative Primary Tumor Identification and Margin Assessment in Head and Neck Unknown Primary Tumors. In: *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 194599819900794. DOI: 10.1177/0194599819900794.
- Heuke, Sandro; Chernavskaia, Olga; Bocklitz, Thomas; Legesse, Fisseha Bekele; Meyer, Tobias; Akimov, Denis et al. (2016): Multimodal nonlinear microscopy of head and neck carcinoma - toward surgery assisting frozen section analysis. In: *Head & neck* 38 (10), S. 1545–1552. DOI: 10.1002/hed.24477.
- Hompland, Tord; Erikson, Arne; Lindgren, Mikael; Lindmo, Tore; Lange Davies, Catharina de (2008): Second-harmonic generation in collagen as a potential cancer diagnostic parameter. In: *Journal of biomedical optics* 13 (5), S. 1–11. DOI: 10.1117/1.2983664.
- Hotary, Kevin; Allen, Edward; Punturieri, Antonello; Yana, Ikuo; Weiss, Stephen J. (2000): Regulation of Cell Invasion and Morphogenesis in a Three-Dimensional Type I Collagen Matrix by Membrane-Type Matrix Metalloproteinases 1, 2, and 3. In: *J Cell Biol* 149 (6), S. 1309–1323. DOI: 10.1083/jcb.149.6.1309.

- Hugo, Honor; Ackland, M. Leigh; Blick, Tony; Lawrence, Mitchell G.; Clements, Judith A.; Williams, Elizabeth D.; Thompson, Erik W. (2007): Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression. In: *Journal of cellular physiology* 213 (2), S. 374–383. DOI: 10.1002/jcp.21223.
- Hynes, Richard O.; Naba, Alexandra (2012): Overview of the matrisome--an inventory of extracellular matrix constituents and functions. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4 (1), a004903. DOI: 10.1101/cshperspect.a004903.
- Iganej, Shahrokh; Kagan, Robert; Anderson, Paul; Rao, Aroor; Tome, Michael; Wang, Ricardo et al. (2002): Metastatic squamous cell carcinoma of the neck from an unknown primary. Management options and patterns of relapse. In: *Head & neck* 24 (3), S. 236–246. DOI: 10.1002/hed.10017.
- Issing, Wolfgang J.; Taleban, Behsad; Tauber, Stefan (2003): Diagnosis and management of carcinoma of unknown primary in the head and neck. In: *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery* 260 (8), S. 436–443. DOI: 10.1007/s00405-003-0585-z.
- Jain, Kunal S.; Sikora, Andrew G.; Baxi, Shrujal S.; Morris, Luc G. T. (2013): Synchronous cancers in patients with head and neck cancer. Risks in the era of human papillomavirus-associated oropharyngeal cancer. In: *Cancer* 119 (10), S. 1832–1837. DOI: 10.1002/cncr.27988.
- Jobsen, J. J.; van der Palen, J.; Ong, F.; Riemersma, S.; Struikmans, H. (2015): Bilateral breast cancer, synchronous and metachronous; differences and outcome. In: *Breast Cancer Res Treat* 153 (2), S. 277–283. DOI: 10.1007/s10549-015-3538-5.
- Joyce, Johanna A.; Pollard, Jeffrey W. (2009): Microenvironmental regulation of metastasis. In: *Nature reviews. Cancer* 9 (4), S. 239–252. DOI: 10.1038/nrc2618.
- Kalluri, Raghu; Neilson, Eric G. (2003): Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. In: *The Journal of clinical investigation* 112 (12), S. 1776–1784. DOI: 10.1172/JCI20530.
- Kalluri, Raghu; Weinberg, Robert A. (2009): The basics of epithelial-mesenchymal transition. In: *The Journal of clinical investigation* 119 (6), S. 1420–1428. DOI: 10.1172/JCI39104.
- Karsdal, M. A.; Nielsen, S. H.; Leeming, D. J.; Langholm, L. L.; Nielsen, M. J.; Manon-Jensen, T. et al. (2017): The good and the bad collagens of fibrosis - Their role in signaling and organ function. In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 121, S. 43–56. DOI: 10.1016/j.addr.2017.07.014.
- Kaupila, Saila; Stenbäck, Frej; Risteli, Juha; Jukkola, Arja; Risteli, Leila (1998): Aberrant type I and type III collagen gene expression in human breast cancerin vivo. In: *J. Pathol.* 186 (3), S. 262–268. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9896(1998110)186:3<262::AID-PATH191>3.0.CO;2-3.
- Kazarine, Alexei; Gopal, Angelica A.; Wiseman, Paul W. (2019): Nonlinear microscopy of common histological stains reveals third harmonic generation harmonophores. In: *The Analyst* 144 (10), S. 3239–3249. DOI: 10.1039/c9an00267g.
- Kazlouskaya, Viktoryia; Malhotra, Saurabh; Lambe, Jennifer; Idriss, Munir Hassen; Elston, Dirk; Andres, Christian (2013): The utility of elastic Verhoeff-Van Gieson staining in dermatopathology. In: *Journal of cutaneous pathology* 40 (2), S. 211–225. DOI: 10.1111/cup.12036.
- Khadori, N. M. (2010): Human Papillomavirus and Survival of Patients with Oropharyngeal Cancer. In: *Yearbook of Medicine* 2010, S. 118–120. DOI: 10.1016/S0084-3873(10)79678-4.

Kiss, Norbert; Haluszka, Dóra; Lőrincz, Kende; Gyöngyösi, Nóra; Bozsányi, Szabolcs; Bánvölgyi, András et al. (2018): Quantitative Analysis on Ex Vivo Nonlinear Microscopy Images of Basal Cell Carcinoma Samples in Comparison to Healthy Skin. In: *Pathology oncology research : POR*. DOI: 10.1007/s12253-018-0445-1.

Kleinman, D. A. (1962): Nonlinear Dielectric Polarization in Optical Media. In: *Phys. Rev.* 126 (6), S. 1977–1979. DOI: 10.1103/PhysRev.126.1977.

Kuperman, David I.; Auethavekiat, Vorachart; Adkins, Douglas R.; Nussenbaum, Brian; Collins, Sharon; Boonchalermvichian, Chaiyaporn et al. (2011): Squamous cell cancer of the head and neck with distant metastasis at presentation. In: *Head & neck* 33 (5), S. 714–718. DOI: 10.1002/hed.21529.

Lambert, Arthur W.; Pattabiraman, Diwakar R.; Weinberg, Robert A. (2017): Emerging Biological Principles of Metastasis. In: *Cell* 168 (4), S. 670–691. DOI: 10.1016/j.cell.2016.11.037.

Lapidot, T.; Sirard, C.; Vormoor, J.; Murdoch, B.; Hoang, T.; Caceres-Cortes, J. et al. (1994): A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. In: *Nature* 367 (6464), S. 645–648. DOI: 10.1038/367645a0.

Legare, Francois; Pfeffer, Christian; Olsen, Bjorn R. (2007): The role of backscattering in SHG tissue imaging. In: *Biophysical journal* 93 (4), S. 1312–1320. DOI: 10.1529/biophysj.106.100586.

Levental, Kandice R.; Yu, Hongmei; Kass, Laura; Lakins, Johnathon N.; Egeblad, Mikala; Ertler, Janine T. et al. (2009): Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. In: *Cell* 139 (5), S. 891–906. DOI: 10.1016/j.cell.2009.10.027.

Lewis, James S. (2012): p16 Immunohistochemistry As a Standalone Test for Risk Stratification in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. In: *Head and Neck Pathol* 6 (S1), S. 75–82. DOI: 10.1007/s12105-012-0369-0.

Lu, Pengfei; Weaver, Valerie M.; Werb, Zena (2012): The extracellular matrix. A dynamic niche in cancer progression. In: *The Journal of cell biology* 196 (4), S. 395–406. DOI: 10.1083/jcb.201102147.

Meyer, Tobias; Guntinas-Lichius, Orlando; Eggeling, Ferdinand von; Ernst, Günther; Akimov, Denis; Schmitt, Michael et al. (2013): Multimodal nonlinear microscopic investigations on head and neck squamous cell carcinoma. Toward intraoperative imaging. In: *Head & neck* 35 (9), E280-7. DOI: 10.1002/hed.23139.

Myllyharju, Johanna; Kivirikko, Kari I. (2004): Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. In: *Trends in genetics : TIG* 20 (1), S. 33–43. DOI: 10.1016/j.tig.2003.11.004.

Nadiarnykh, Oleg; LaComb, Ronald B.; Brewer, Molly A.; Campagnola, Paul J. (2010): Alterations of the extracellular matrix in ovarian cancer studied by Second Harmonic Generation imaging microscopy. In: *BMC cancer* 10, S. 94. DOI: 10.1186/1471-2407-10-94.

Nelke et al. (2014): Head and Neck Cancer Patients' Quality of Life, Nelke et al. In: *Adv Clin Exp Med*, S. 1019–1027.

Nelson, Rebecca A.; Lai, Lily L. (2017): Elevated risk of human papillomavirus-related second cancers in survivors of anal canal cancer. In: *Cancer* 123 (20), S. 4013–4021. DOI: 10.1002/cncr.30828.

Nicol, Lindsey; Morar, Patrick; Wang, Ying; Henriksen, Kim; Sun, Shu; Karsdal, Morten et al. (2018): Alterations in non-type I collagen biomarkers in osteogenesis imperfecta. In: *Bone* 120, S. 70–74. DOI: 10.1016/j.bone.2018.09.024.

Nieto, M. Angela; Huang, Ruby Yun-Ju; Jackson, Rebecca A.; Thiery, Jean Paul (2016): EMT. 2016. In: *Cell* 166 (1), S. 21–45. DOI: 10.1016/j.cell.2016.06.028.

Nolting, Jürgen (2004): Was ist eigentlich nichtlineare Optik? In: *DOZ Optometrie* (9).

Nowell, P. (1976): The clonal evolution of tumor cell populations. In: *Science* 194 (4260), S. 23–28. DOI: 10.1126/science.959840.

Ocaña, Oscar H.; Córcoles, Rebeca; Fabra, Angels; Moreno-Bueno, Gema; Acloque, Hervé; Vega, Sonia et al. (2012): Metastatic colonization requires the repression of the epithelial-mesenchymal transition inducer Prrx1. In: *Cancer cell* 22 (6), S. 709–724. DOI: 10.1016/j.ccr.2012.10.012.

Oron, Dan; Yelin, Dvir; Tal, Eran; Raz, Sefi; Fachima, Rachel; Silberberg, Yaron (2004): Depth-resolved structural imaging by third-harmonic generation microscopy. In: *Journal of Structural Biology* 147 (1), S. 3–11. DOI: 10.1016/S1047-8477(03)00125-4.

Pan, Bo; Xu, Ying; Zhou, Yi-Dong; Yao, Ru; Wu, Huan-Wen; Zhu, Qing-Li et al. (2019): The prognostic comparison among unilateral, bilateral, synchronous bilateral, and metachronous bilateral breast cancer. A meta-analysis of studies from recent decade (2008-2018). In: *Cancer Med* 65 (2), S. 87. DOI: 10.1002/cam4.2198.

Panosetti, E.; Luboinski, B.; Mamelle, G.; Richard, J. M. (1989): Multiple synchronous and metachronous cancers of the upper aerodigestive tract. A nine-year study. In: *The Laryngoscope* 99 (12), S. 1267–1273. DOI: 10.1288/00005537-198912000-00011.

Parodi, Valentina; Jacchetti, Emanuela; Osellame, Roberto; Cerullo, Giulio; Polli, Dario; Raimondi, Manuela Teresa (2020): Nonlinear Optical Microscopy. From Fundamentals to Applications in Live Bioimaging. In: *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 8, S. 585363. DOI: 10.3389/fbioe.2020.585363.

Plotnikov, Sergey V.; Millard, Andrew C.; Campagnola, Paul J.; Mohler, William A. (2006): Characterization of the myosin-based source for second-harmonic generation from muscle sarcomeres. In: *Biophysical journal* 90 (2), S. 693–703. DOI: 10.1529/biophysj.105.071555.

Poh, Catherine F.; Zhang, Lewei; Anderson, Don W.; Durham, J. Scott; Williams, P. Michele; Priddy, Robert W. et al. (2006): Fluorescence visualization detection of field alterations in tumor margins of oral cancer patients. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 12 (22), S. 6716–6722. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1317.

Provenzano, Paolo P.; Eliceiri, Kevin W.; Campbell, Jay M.; Inman, David R.; White, John G.; Keely, Patricia J. (2006): Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. In: *BMC medicine* 4 (1), S. 1–38. DOI: 10.1186/1741-7015-4-38.

Provenzano, Paolo P.; Inman, David R.; Eliceiri, Kevin W.; Knittel, Justin G.; Yan, Long; Rueden, Curtis T. et al. (2008): Collagen density promotes mammary tumor initiation and progression. In: *BMC medicine* 6, S. 11. DOI: 10.1186/1741-7015-6-11.

Pupa, Serenella M.; Ménard, Sylvie; Forti, Stefania; Tagliabue, Elda (2002): New insights into the role of extracellular matrix during tumor onset and progression. In: *Journal of cellular physiology* 192 (3), S. 259–267. DOI: 10.1002/jcp.10142.

Ramaswamy, Sridhar; Ross, Ken N.; Lander, Eric S.; Golub, Todd R. (2003): A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. In: *Nature genetics* 33 (1), S. 49–54. DOI: 10.1038/ng1060.

Ranjit, Suman; Dvornikov, Alexander; Stakic, Milka; Hong, Suk-Hyun; Levi, Moshe; Evans, Ronald M.; Gratton, Enrico (2015): Imaging Fibrosis and Separating Collagens using Second Harmonic Generation and Phasor Approach to Fluorescence Lifetime Imaging. In: *Scientific reports* 5, S. 1–10. DOI: 10.1038/srep13378.

Rehberg, Markus; Krombach, Fritz; Pohl, Ulrich; Dietzel, Steffen (2011): Label-free 3D visualization of cellular and tissue structures in intact muscle with second and third harmonic generation microscopy. In: *PloS one* 6 (11), e28237. DOI: 10.1371/journal.pone.0028237.

Rennemo, Erlend; Zätterström, Ulf; Boysen, Morten (2011): Synchronous second primary tumors in 2,016 head and neck cancer patients. Role of symptom-directed panendoscopy. In: *The Laryngoscope* 121 (2), S. 304–309. DOI: 10.1002/lary.21385.

Reya, T.; Morrison, S. J.; Clarke, M. F.; Weissman, I. L. (2001): Stem cells, cancer, and cancer stem cells. In: *Nature* 414 (6859), S. 105–111. DOI: 10.1038/35102167.

Ricard-Blum, Sylvie (2011): The collagen family. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3 (1), a004978. DOI: 10.1101/cshperspect.a004978.

Ridge; Rane Mehra, M. D.; Miriam N. Lango, M. D.; Thomas Galloway, M. D. (2016): Head and Neck Tumors. Hg. v. Cancer Network.

Rivard, Maxime; Popov, Konstantin; Couture, Charles-Andre; Laliberte, Mathieu; Bertrand-Grenier, Antony; Martin, Francois et al. (2014): Imaging the noncentrosymmetric structural organization of tendon with Interferometric Second Harmonic Generation microscopy. In: *Journal of biophotonics* 7 (8), S. 638–646. DOI: 10.1002/jbio.201300036.

Robert Koch-Institut: Kapitel 2: Epidemiologie von Krebserkrankungen – Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016.

Robert Koch-Institut (RKI): Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016.

Robinson, Eliezer; Neugut, Alfred I.; Jones, A. S. (1995): Second primary tumors in patients with head and neck squamous cell carcinoma. In: *Cancer* 76 (9), S. 1684–1685. DOI: 10.1002/1097-0142(19951101)76:9<1684::AID-CNCR2820760931>3.0.CO;2-V.

Rodner, Erik; Bocklitz, Thomas; Eggeling, Ferdinand von; Ernst, Günther; Chernavskaia, Olga; Popp, Jürgen et al. (2019): Fully convolutional networks in multimodal nonlinear microscopy images for automated detection of head and neck carcinoma. Pilot study. In: *Head & neck* 41 (1), S. 116–121. DOI: 10.1002/hed.25489.

Rozario, Tania; DeSimone, Douglas W. (2010): The extracellular matrix in development and morphogenesis. A dynamic view. In: *Developmental biology* 341 (1), S. 126–140. DOI: 10.1016/j.ydbio.2009.10.026.

Ruokolainen, H. (2004): Expression of Matrix Metalloproteinase-9 in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. A Potential Marker for Prognosis. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10 (9), S. 3110–3116. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0530.

Ryser, Marc D.; Lee, Walter T.; Ready, Neal E.; Leder, Kevin Z.; Foo, Jasmine (2016): Quantifying the Dynamics of Field Cancerization in Tobacco-Related Head and Neck Cancer. A Multiscale Modeling Approach. In: *Cancer Research* 76 (24), S. 7078–7088. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1054.

Samadder, N. Jewel; Curtin, Karen; Wong, Jathine; Tuohy, Thérèse M.F.; Mineau, Geraldine P.; Smith, Ken Robert et al. (2014): Epidemiology and Familial Risk of Synchronous and Metachronous Colorectal Cancer. A Population-Based Study in Utah. In: *clinical gastroenterology and hepatology* 12 (12), 2078-2084.e2. DOI: 10.1016/j.cgh.2014.04.017.

Sapudom, Jiranuwat; Rubner, Stefan; Martin, Steve; Kurth, Tony; Riedel, Stefanie; Mierke, Claudia T.; Pompe, Tilo (2015): The phenotype of cancer cell invasion controlled by fibril diameter and pore size of 3D collagen networks. In: *Biomaterials* 52, S. 367–375. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.02.022.

Schindelin, Johannes; Arganda-Carreras, Ignacio; Frise, Erwin; Kaynig, Verena; Longair, Mark; Pietzsch, Tobias et al. (2012): Fiji. An open-source platform for biological-image analysis. In: *Nature methods* 9 (7), S. 676–682. DOI: 10.1038/nmeth.2019.

Schwartz, L. H.; Ozsahin, M.; Zhang, G. N.; Touboul, E.; Vataire, F. de; Andolenko, P. et al. (1994): Synchronous and metachronous head and neck carcinomas. In: *Cancer* 74 (7), S. 1933–1938.

Shanthi Marur; Gypsyamber D'Souza; William H Westra; Arlene A Forastiere (2010): HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic.

Shoulders, Matthew D.; Raines, Ronald T. (2009): Collagen structure and stability. In: *Annual review of biochemistry* 78, S. 1–48. DOI: 10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833.

Sikora, Andrew G.; Morris, Luc G.; Sturgis, Erich M. (2009): Bidirectional Association of Anogenital and Oral Cavity/Pharyngeal Carcinomas in Men. In: *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 135 (4), S. 402–405. DOI: 10.1001/archoto.2009.19.

Slaughter et al.; Slaughter, Danely P.; Southwick, Harry W.; Smejkal, Walter (1953): "Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium. Clinical implications of multicentric origin // "Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium. Clinical implications of multicentric origin. In: *Cancer* 6 (5), S. 963–968. DOI: 10.1002/1097-0142(195309)6:5<963::AID-CNCR2820060515>3.0.CO;2-Q.

Song, Wei; Xu, Qiang; Zhang, Yang; Zhan, Yang; Zheng, Wei; Song, Liang (2016): Fully integrated reflection-mode photoacoustic, two-photon, and second harmonic generation microscopy in vivo. In: *Scientific reports* 6, S. 32240. DOI: 10.1038/srep32240.

Spector, J. G.; Sessions, D. G.; Haughey, B. H.; Chao, K. S.; Simpson, J.; El Mofty, S.; Perez, C. A. (2001): Delayed regional metastases, distant metastases, and second primary malignancies in squamous cell carcinomas of the larynx and hypopharynx. In: *The Laryngoscope* 111 (6), S. 1079–1087. DOI: 10.1097/00005537-200106000-00028.

Spence, Tara; Bruce, Jeff; Yip, Kenneth W.; Liu, Fei-Fei (2016): HPV Associated Head and Neck Cancer. In: *Cancers* 8 (8). DOI: 10.3390/cancers8080075.

Strojan, Primož; Ferlito, Alfio; Medina, Jesus E.; Woolgar, Julia A.; Rinaldo, Alessandra; Robbins, K. Thomas et al. (2013): Contemporary management of lymph node metastases from an unknown primary to the neck. I. A review of diagnostic approaches. In: *Head & neck* 35 (1), S. 123–132. DOI: 10.1002/hed.21898.

Sun, Chi-Kuang; Chu, Shi-Wei; Chen, Szu-Yu; Tsai, Tsung-Han; Liu, Tzu-Ming; Lin, Chung-Yung; Tsai, Huai-Jen (2004): Higher harmonic generation microscopy for developmental biology. In: *Journal of Structural Biology* 147 (1), S. 19–30. DOI: 10.1016/j.jsb.2003.10.017.

Thiery, Jean Paul; Acloque, Hervé; Huang, Ruby Y. J.; Nieto, M. Angela (2009): Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. In: *Cell* 139 (5), S. 871–890. DOI: 10.1016/j.cell.2009.11.007.

- Tilbury, Karissa; Campagnola, Paul J. (2015): Applications of second-harmonic generation imaging microscopy in ovarian and breast cancer. In: *Perspectives in medicinal chemistry* 7, S. 21–32. DOI: 10.4137/PMC.S13214.
- Tilbury, Karissa; Lien, Chi-Hsiang; Chen, Shean-Jen; Campagnola, Paul J. (2014): Differentiation of Col I and Col III isoforms in stromal models of ovarian cancer by analysis of second harmonic generation polarization and emission directionality. In: *Biophysical journal* 106 (2), S. 354–365. DOI: 10.1016/j.bpj.2013.10.044.
- Tsai, Jeff H.; Yang, Jing (2013): Epithelial-mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis. In: *Genes & development* 27 (20), S. 2192–2206. DOI: 10.1101/gad.225334.113.
- Tse, Joyce C.; Kalluri, Raghu (2007): Mechanisms of metastasis. Epithelial-to-mesenchymal transition and contribution of tumor microenvironment. In: *Journal of cellular biochemistry* 101 (4), S. 816–829. DOI: 10.1002/jcb.21215.
- Tuer, Adam; Tokarz, Danielle; Prent, Nicole; Cisek, Richard; Alami, Jennifer; Dumont, Daniel J. et al. (2010): Nonlinear multicontrast microscopy of hematoxylin-and-eosin-stained histological sections. In: *Journal of biomedical optics* (15(2)), 026018-1-9. Online verfügbar unter <http://biomedicaloptics.spiedigitallibrary.org/>.
- Venning, Freja A.; Wullkopf, Lena; Erler, Janine T. (2015): Targeting ECM Disrupts Cancer Progression. In: *Frontiers in oncology* 5, S. 224. DOI: 10.3389/fonc.2015.00224.
- Visvader, Jane E.; Lindeman, Geoffrey J. (2008): Cancer stem cells in solid tumours. Accumulating evidence and unresolved questions. In: *Nature reviews. Cancer* 8 (10), S. 755–768. DOI: 10.1038/nrc2499.
- Walker, Cameron; Mojares, Elijah; Del Río Hernández, Armando (2018): Role of Extracellular Matrix in Development and Cancer Progression. In: *International journal of molecular sciences* 19 (10). DOI: 10.3390/ijms19103028.
- Wallace, Audrey; Richards, Greg M.; Harari, Paul M.; Kirwan, Jessica M.; Morris, Christopher G.; Katakam, Haritha; Mendenhall, William M. (2011): Head and neck squamous cell carcinoma from an unknown primary site. In: *American journal of otolaryngology* 32 (4), S. 286–290. DOI: 10.1016/j.amjoto.2010.05.004.
- Weigelin, Bettina; Bakker, Gert-Jan; Friedl, Peter (2012): Intravital third harmonic generation microscopy of collective melanoma cell invasion. Principles of interface guidance and microvesicle dynamics. In: *Intravital* 1 (1), S. 32–43. DOI: 10.4161/intv.21223.
- Weigelin, Bettina; Bakker, Gert-Jan; Friedl, Peter (2016): Third harmonic generation microscopy of cells and tissue organization. In: *Journal of cell science* 129 (2), S. 245–255. DOI: 10.1242/jcs.152272.
- Wen, Bruce; Campbell, Kirby R.; Tilbury, Karissa; Nadiarnykh, Oleg; Brewer, Molly A.; Patankar, Manish et al. (2016): 3D texture analysis for classification of second harmonic generation images of human ovarian cancer. In: *Scientific reports* 6, S. 35734. DOI: 10.1038/srep35734.
- Wen, Bruce L.; Brewer, Molly A.; Nadiarnykh, Oleg; Hocker, James; Singh, Vikas; Mackie, Thomas R.; Campagnola, Paul J. (2014): Texture analysis applied to second harmonic generation image data for ovarian cancer classification. In: *Journal of biomedical optics* (19(9)), 096007-1-6.
- Williams, Justin C.; Campagnola, Paul J. (2015): Wearable Second Harmonic Generation Imaging. The Sarcomeric Bridge to the Clinic. In: *Neuron* 88 (6), S. 1067–1069. DOI: 10.1016/j.neuron.2015.12.009.

Williams, Rebecca M.; Zipfel, Warren R.; Webb, Watt W. (2005): Interpreting second-harmonic generation images of collagen I fibrils. In: *Biophysical journal* 88 (2), S. 1377–1386. DOI: 10.1529/biophysj.104.047308.

Winn, D. M.; Lee, Y-C A.; Hashibe, M.; Boffetta, P. (2015): The INHANCE consortium. Toward a better understanding of the causes and mechanisms of head and neck cancer. In: *Oral diseases* 21 (6), S. 685–693. DOI: 10.1111/odi.12342.

Wittekind, Christian (Hg.) (2017): TNM - Klassifikation maligner Tumoren. Union for International Cancer Control; Wiley-VCH. Achte Auflage. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Online verfügbar unter <http://www.wiley-vch.de/publish/dt/books/ISBN978-3-527-34280-8/>.

Wolf, Katarina; Wu, Yi I.; Liu, Yueying; Geiger, Jörg; Tam, Eric; Overall, Christopher et al. (2007): Multi-step pericellular proteolysis controls the transition from individual to collective cancer cell invasion. In: *Nature cell biology* 9 (8), S. 893–904. DOI: 10.1038/ncb1616.

Wu, Pei-Chun; Hsieh, Tsung-Yuan; Tsai, Zen-Uong; Liu, Tzu-Ming (2015): In vivo quantification of the structural changes of collagens in a melanoma microenvironment with second and third harmonic generation microscopy. In: *Scientific reports* 5, S. 8879. DOI: 10.1038/srep08879.

Wu, Yicong; Leng, Yuxin; Xi, Jiefeng; Li, Xingde (2009): Scanning all-fiber-optic endomicroscopy system for 3D nonlinear optical imaging of biological tissues. In: *Optics express* 17 (10), S. 7907–7915. DOI: 10.1364/oe.17.007907.

Yan, Jun; Zhuo, Shuangmu; Chen, Gang; Milsom, Jeffrey W.; Zhang, Hui; Lu, Jianping et al. (2014): Real-time optical diagnosis for surgical margin in low rectal cancer using multiphoton microscopy. In: *Surgical Endoscopy* 28 (1), S. 36–41. DOI: 10.1007/s00464-013-3153-7.

Yu, Che-Hang; Tai, Shih-Peng; Kung, Chun-Ta; Lee, Wen-Jeng; Chan, Yi-Fan; Liu, Hsiang-Lin et al. (2008): Molecular third-harmonic-generation microscopy through resonance enhancement with absorbing dye. In: *Optics letters* 33 (4), S. 387–389. DOI: 10.1364/ol.33.000387.

Zhang, Y.; Akins, M. L.; Murari, K.; Xi, J.; Li, M.-J.; Luby-Phelps, K. et al. (2012): A compact fiber-optic SHG scanning endomicroscope and its application to visualize cervical remodeling during pregnancy. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (32), S. 12878–12883. DOI: 10.1073/pnas.1121495109.

Zhang, Zhiqing; Munck, Jan C. de; Verburg, Niels; Rozemuller, Annemieke J.; Vreuls, Willem; Cakmak, Pinar et al. (2019): Quantitative Third Harmonic Generation Microscopy for Assessment of Glioma in Human Brain Tissue. In: *Advanced science (Weinheim, Baden-Wurtemberg, Germany)* 6 (11), S. 1900163. DOI: 10.1002/adv.201900163.

Zhu, Guo-Guang; Kauppila, Antti; Risteli, Leila; Mäkinen, Markus; Stenbäck, Frej; Risteli, Juha (1995): Immunohistochemical study of type I collagen and type I pN-collagen in benign and malignant ovarian neoplasms. In: *Cancer* 75 (4), S. 1010–1017. DOI: 10.1002/1097-0142(19950215)75:4<1010::AID-CNCR2820750417>3.0.CO;2-O.

Zipfel, Warren R.; Williams, Rebecca M.; Christie, Richard; Nikitin, Alexander Yu; Hyman, Bradley T.; Webb, Watt W. (2003a): Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (12), S. 7075–7080. DOI: 10.1073/pnas.0832308100.

Zipfel, Warren R.; Williams, Rebecca M.; Webb, Watt W. (2003b): Nonlinear magic. Multiphoton microscopy in the biosciences. In: *Nature biotechnology* 21 (11), S. 1369–1377. DOI: 10.1038/nbt899.

Zoumi, Aikaterini; Yeh, Alvin; Tromberg, Bruce J. (2002): Imaging cells and extracellular matrix in vivo by using second-harmonic generation and two-photon excited fluorescence. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (17), S. 11014–11019. DOI: 10.1073/pnas.172368799.

10 Danksagung

Ich möchte meiner Familie danken für die grenzenlose Unterstützung, die ich tagtäglich erfahre. Während meines Studiums, meiner Promotion und meinem Berufseinstieg kann und konnte ich mich immer auf bedingungslosen Rückhalt verlassen. Als treue Wegbegleiter vermitteln sie mir stets Kontinuität und Stabilität in meinem Leben, welche ich nicht missen möchte.

Ein großer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Olivier Gires, der mir mit Geduld, konstruktiver Kritik und einem offenen Ohr zur Seite stand. Die stete Unterstützung und positiven Worte haben wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen. Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. Philipp Baumeister meinen Dank aussprechen, als kompetenter Ansprechpartner half er, einige Hürden innerhalb des Projekts zu überwinden. Ein besonderer Dank gilt auch Dr. Martin Vogel, der durch Fachkompetenz und Begeisterung für die Mehrphotonenmikroskopie eine sehr wichtige Rolle in diesem Projekt gespielt hat. Des Weiteren möchte ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Labors, allen voran Frau Brigitte Mack, Frau Gisela Kranz und Herrn Darko Libl für die große Unterstützung, detaillierte Einarbeitung und Geduld bedanken.

Eidesstattliche Versicherung

Widmann, Magdalena

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Second und Third Harmonic Generation Imaging von Kopf-Hals-Tumoren

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung des akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 18.01.2022

Ort, Datum

Magdalena Widmann

Unterschrift Doktorandin/Doktorand