

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR MUND-, KIEFER- UND GESICHTSCHIRURGIE
PROF. DR. DR. T. E. REICHERT
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Der Einfluss von Tumorgröße, Sauerstoffgehalt und adrenerger
Stimulation auf die Expression und Funktion tumorassoziierter
Proteine in Kopf-Hals Tumorzelllinien

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Maximilian Geyer

2017

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR MUND-, KIEFER- UND GESICHTSCHIRURGIE
PROF. DR. DR. T. E. REICHERT
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Der Einfluss von Tumorgröße, Sauerstoffgehalt und adrenerger
Stimulation auf die Expression und Funktion tumorassoziierter
Proteine in Kopf-Hals Tumorzelllinien

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Maximilian Geyer

2017

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: PD Dr. Richard Bauer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Denitsa Docheva

Tag der mündlichen Prüfung: 25.04.2018

Inhaltsverzeichnis

1.1 DAS ORALE PLATTENEPITHELKARZINOM	4
1.1.1 EPIDEMIOLOGIE	4
1.1.2 ÄTIOLOGIE	5
1.1.3 KLINISCHES ERSCHEINUNGSBILD	6
1.1.4 TUMORGENESE	7
1.2 TUMORMARKER	8
1.2.1 CADHERINE	9
1.2.2 MATRIX-METALLOPROTEINASEN (MMPs)	11
1.2.3 PROGRAMMED CELL-DEATH LIGAND 1 (PD-L1)	14
1.3 ADRENERGE REZEPTOREN	15
2. ZIELSETZUNG DER ARBEIT	17
3. MATERIAL UND METHODEN	18
3.1 ZELLKULTUR	18
3.1.1 VERWENDETE ZELLEN	18
3.1.2 ZELLKULTUR	18
3.1.3 HERSTELLUNG VON SPHÄROIDEN UNTERSCHIEDLICHER ZELLZAHL	18
3.2 PROTEINCHEMISCHE METHODEN	19
3.2.1 HERSTELLUNG VON PARAFFINSCHNITTEN	19
3.2.2 IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG VON PARAFFINSCHNITTEN	19
3.2.3 GEWINNUNG VON PROTEINLYSATEN AUS SPHÄROIDEN	21
3.2.4 PROTEINQUANTIFIZIERUNG	21
3.2.5 SDS-PAGE GELELEKTROPHORESE	21
3.2.6 WESTERN-BLOT	22
3.2.7 PROTEINDETEKTION AUF WESTERN-BLOT	23
3.2.8 GEWINNUNG VON ÜBERSTÄNDEN MIT SPHÄROIDEN	24
3.2.9 ZYMOGRAMM	25
3.3 FUNKTIONELLE ASSAYS	26
3.3.1 MIGRATIONSASSAY MIT BOYDEN-KAMMER	26
3.3.2 INVASIONSASSAY MIT BOYDEN-KAMMER UND MATRIGEL	27
3.3.3 WST-PROLIFERATIONSASSAY	28
3.4 MATERIAL	28
4. ERGEBNISSE	31

4.1 EXPRESSION VON TUMORASSOZIERTEN PROTEINEN IN SPHÄROIDEN MIT UNTERSCHIEDLICHER ZELLZAHL	31
4.1.1 N-CADHERIN	32
4.1.2 P-CADHERIN	32
4.1.3 AUSWIRKUNG VON HYPOXIE AUF P-CADHERIN-EXPRESSION UND SPHÄROIDGRÖßE	34
4.1.4 E-CADHERIN	36
4.1.5 LOKALISATION DER CADHERINE	37
4.1.6 MMP2	38
4.1.7 MMP9	39
4.1.8 ZYMOGRAPHIE	40
4.1.9 PD-L1	40
4.2 EXPRESSION VON TUMORASSOZIERTEN PROTEINEN BEI HNSCC SPHÄROIDEN MIT STIMULIERUNG VON α2- UND β2-ADRENERGEN REZEPTOREN	41
4.2.1 P-CADHERIN	42
4.2.2 E-CADHERIN	43
4.2.3 MMP2	44
4.2.4 MMP9	45
4.2.5 ZYMOGRAMM VON MMP2 UND MMP9 NACH ADRENERGER STIMULIERUNG	46
4.2.6 PD-L1	46
4.3 FUNKTIONELLE ASSAYS	47
4.3.1 MIGRATION	48
4.3.2 INVASION	48
4.3.3 PROLIFERATION	49
5. DISKUSSION	53
5.1 EXPRESSION TUMORASSOZIIERTER PROTEINE BEI DER TUMORPROGRESSION	53
5.2 DER EFFEKT VON α2- UND β2-ADRENERGEN AGONISTEN AUF DIE EXPRESSION TUMORASSOZIIERTER PROTEINE UND AUF DAS VERHALTEN BEZÜGLICH MIGRATION, INVASION UND PROLIFERATION	57
6. ZUSAMMENFASSUNG	62
7. LITERATURVERZEICHNIS	64
8. ANHANG	73
8.1 DANKSAGUNG	73
8.2 LEBENS LAUF	74

1. Einleitung

1.1 Das orale Plattenepithelkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Mit jährlich etwa 14 Mio. Neuerkrankungen und 8 Mio. Todesfällen stellen Krebserkrankungen weltweit einen bedeutenden Grund für Morbidität und Mortalität dar [1]. Auch in Deutschland ist Krebs eine der häufigsten Erkrankungsursachen und die zweithäufigste Todesursache [2]. Maligne Erkrankungen im Kopf- / Halsbereich, zu denen das orale Plattenepithelkarzinom gehört (*OSCC: oral squamous cell carcinoma*), stehen dabei mit 6% an sechster Stelle der häufigsten Krebsarten. Kopf- und Halstumore umfassen dabei Malignitäten in paranasalen Höhlen, der Mund- und Nasenhöhle, des Pharynx und des Larynx [3, 4]. 90% der malignen Erkrankungen der Mundhöhle und des Oropharynx sind dabei auf OSCC zurückzuführen [5]. In westlichen Ländern ist am häufigsten mit etwa 20-40% die Zunge und mit 15-20% der Mundboden betroffen [6]. Weltweit entfielen darauf 2012 529.000 Neuerkrankungen und 292.000 Todesfälle, die mit Krebs der Lippen, Mundhöhle oder des Pharynx assoziiert wurden [1]. In Deutschland gab es 2012 bei Männern 9290 Neuerkrankungen und 4090 Sterbefälle, bei Frauen 3650 neue Erkrankungen und 1303 Todesfälle. Für 2016 werden 10.000 Neuerkrankungen bei Männern und 4200 bei Frauen prognostiziert. Deutschlandweit weist die Erkrankungs- und Sterberate seit dem Jahr 2000 keine signifikanten Unterschiede auf [2]. Weltweit liegt das Verhältnis der Erkrankungsraten zwischen Männern und Frauen bei ca. 1,5:1, in Deutschland etwa 3:1. Erklären lässt sich der geschlechtliche Unterschied wahrscheinlich durch eine höhere Exposition an Risikofaktoren durch die männliche Bevölkerung [2, 6]. Das Lebenszeitrisiko einer Erkrankung liegt bei männlichen Deutschen in den nächsten 10 Jahren mit 1,7%, bei weiblichen mit 0,3%. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei Männern bei 62 Jahren, bei Frauen wird es mit 66 Jahren angegeben [2, 4]. 6% liegen vor dem 45. Lebensjahr, in Ländern mit hoher Inzidenz – wie etwa Indien, Pakistan oder Sri Lanka - sogar vor dem 40. Lebensjahr, mit sinkender Tendenz [4, 7].

Die höchsten Erkrankungsinzidenzen für maligne Erkrankungen der Mundhöhle lassen sich in Neuguinea, Süd- und Zentralasien und Europa beobachten [8]. Innerhalb Europas ist vor allem Frankreich betroffen, Deutschland liegt etwa an siebter Stelle [2, 4].

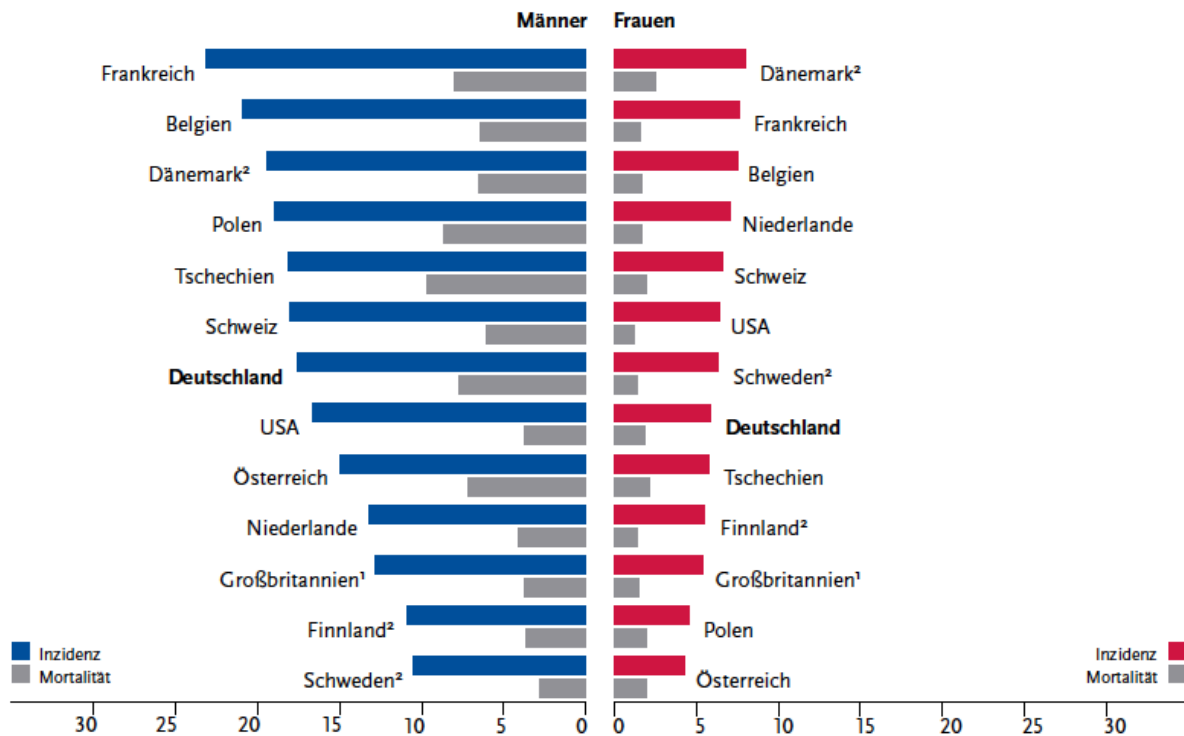


Abb. 1: Altersstandardisierte Neuerkrankungs- und Sterberaten im internationalen Vergleich 2011/2012. Je 100.000 Einwohner (Europastandard). Daten des Robert-Koch-Institutes. Nach [2].

Die 5-Jahres-Überlebensrate wird beim oralen Plattenepithelkarzinom mit etwa 50% angegeben [6]. Trotz der Verbesserungen von Therapiemöglichkeiten gab es in den vergangenen 50 Jahren keine signifikanten Veränderungen in der Überlebensrate [9].

1.1.2 Ätiologie

Orale Plattenepithelkarzinome haben ihren Ursprung in der teilungsfähigen Basalzellschicht des Epithels. Dabei werden fortschreitend Epithelzellen durch Tumorgewebe ersetzt [10]. Dieser komplexe, multifokale Prozess, über den sukzessiv genomische Alterationen akkumuliert werden, findet oft über mehrere Jahre statt [11].

Der Konsum von Alkohol und Tabak gilt als Hauptursache von 75% aller Plattenepithelkarzinome der Kopf- und Halsregion (*HNSCC: squamous cell carcinoma of the head and neck*), mit einem multiplikativen Effekt bei gleichzeitigem Gebrauch [3, 12]. Der Tabakrauch enthält mehr als 50 kanzerogene Stoffe, wie etwa aromatische Amine oder Nitrosamine, die zu DNA-Mutationen führen können [7]. Genau wie starker Tabakkonsum, ist das Risiko durch erhöhten Alkoholkonsum stark dosisabhängig. So steigt das relative Risiko um den Faktor 13 bei einer Aufnahme von 125g Ethanol pro Tag [13]. Der genaue Mechanismus ist dabei noch unklar. Es wird vermutet, dass Ethanol in den Epithelzellen zu

Acetaldehyd metabolisiert wird, welches das Kanzerogen darstellen soll [14, 15]. Als ein weiterer Risikofaktor wird das Kauen von Betelnüssen angesehen. Bei weltweit bis zu 1,2 Mrd. Konsumenten, v.a. in vielen Teilen Asiens, ist das relative Risiko stark erhöht. In den meisten Fällen führt das Betelnuss-Kauen zu präkanzerösen Läsionen (orale submuköse Fibrose) [15, 16].

Neuere Untersuchungen zeigen auch eine Beteiligung von humanen Papillomaviren (HPV) – vor allem HPV16 und HPV18 - bei der Entstehung von HNSCC und OSCC [3]. Etwa 26% aller HNSCC tragen ein HPV Onkogen in ihrer DNA [17]. Der kanzerogene Effekt wird dabei durch die viralen Onkoproteine E6 und E7 herbeigeführt, welche die Tumorsuppressorproteine p53 und pRb inaktivieren [3, 18]. Durch ihr besseres Ansprechverhalten auf Radio- und Chemotherapie besitzen HPV-positive HNSCC eine günstigere Prognose als Tumoren anderer Genese [19].

Des Weiteren können eine familiäre genetische Vorprägung, wie etwa das Li Fraumeni Syndrom, das Plummer-Vinson Syndrom oder die Fanconi-Anämie, eine chronische Immunsuppression, ionisierende Strahlung oder die Exposition verschiedenener Industriegifte das Risiko eines oralen Plattenepithelkarzinoms erhöhen [3, 20-22].

Diskutiert werden derzeit auch Studien, die einen protektiven Effekt gegenüber HNSCC durch ausreichende Obst- und Gemüsezufuhr zeigen. Demnach sind obst- und gemüsearme Diäten als ein möglicher Risikofaktor anzusehen [23, 24].

1.1.3 Klinisches Erscheinungsbild

Vorläuferläsionen des OSCC können in präkanzeröse Läsionen und Konditionen eingeteilt werden [5]. Zu den Läsionen gehören die Leukoplakie, Erythroplakie und die proliferative verruköse Leukoplakie (PVL). Die höchste Inzidenz besitzt die Leukoplakie (2% weltweit), welche nach WHO (World Health Organisation) als eine weiße, nicht wegwischbare Plaque, die keinem pathologischen Prozess zuzuordnen ist, definiert ist. Dennoch ist die Transformationsrate einer Erythroplakie als deutlich höher anzusehen [25, 26]. Zu den präkanzerösen Konditionen zählen Syphilis, oraler Lichen planus, Eisenmangel, Xeroderma pigmentosum, Lupus erythematodes, Epidermolysis bullosa dystrophica und die orale submuköse Fibrose. Von ihnen geht ein signifikant erhöhtes Risiko für OSCC aus [5, 26].

Oftmals ist ein erstes Anzeichen für OSCC eine nicht schmerzhaft Veränderung der Schleimhaut im Bereich des anterioren Mundbodens, des seitlichen Zungenrandes, dem

Gaumenbogen oder der retromolaren Region des Unterkiefers. Dabei werden ein endophytischer Wachstumstyp, der in die Tiefe des Gewebes vordringt und ein exophytischer Wachstumstyp, der über die Schleimhaut wächst, unterschieden. Klinisch äußert sich ein endophytischer Typ häufig als Ulkus mit aufgeworfenem Randwall, ein exophytischer Typ als ein die Schleimhaut überragender Fibrinbelag [27].

Etwa 66% der Patienten eines HNSCCs sind von einer Metastasierung in regionale Lymphknoten betroffen. Hierbei vor allem in die Level I, II und III, weniger in Level IV und V. Eine Fernmetastasierung tritt nur in 10% der Fälle auf [3, 5].

1.1.4 Tumorgenese

Generell ist bekannt, dass OSCCs auf dem Boden prämaligener Läsionen durch Genmutationen über mehrere Schritte entstehen. Diese Mutationen führen zur Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen und Aktivierung von Proto-Onkogenen durch Punktmutationen, Deletionen, Promotor-Methylierung oder Überexpression. In der Folge kommt es zur Deregulation des Zellverhaltens (z.B. Apoptose, Zellproliferation) und zur Tumorentstehung [3, 28, 29].

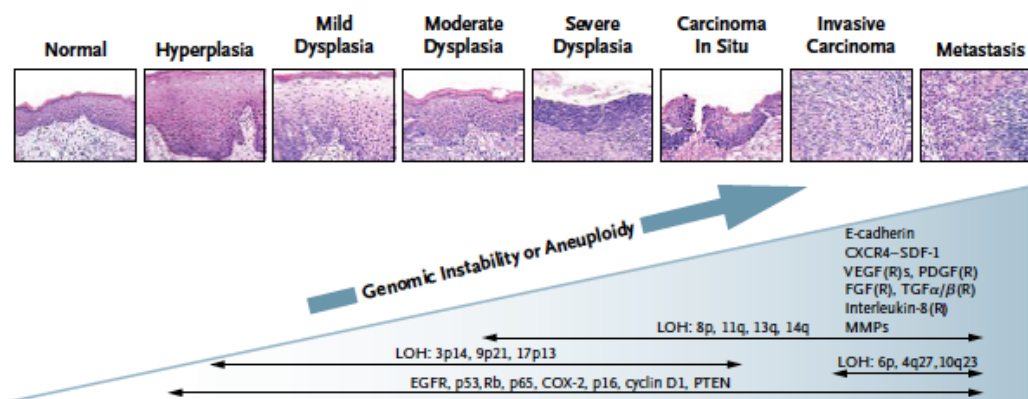


Abb. 2: Die Entstehung von OSCC ist ein mehrstufiger Prozess über verschiedene Dysplasiegrade, dem Carcinoma in situ bis hin zum invasiven Karzinom und Metastasierung. Dabei konnte der Verlust der Heterozygotie (*engl. loss of heterozygosity; LOH*) in den chromosomalen Bereichen 3p14, 9p21, 17p13, 8p, 11q, 13q, 14q, 6p, 4q27 und 10q23 in den verschiedenen Stufen beobachtet werden. Außerdem findet eine Überexpression, Hoch- bzw. Herunterregulation, Inaktivierung oder Deletion von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen wie EGFR (*engl. epidermal growth factor receptor; EGFR*), p53, Rb (Retinoblastomgen), Cyclooxygenase 2 (COX-2), cyclin D1 (CCND1) oder phosphatase and tensin homolog (PTEN) statt. Es ließen sich auch Aberrationen der Gene für E-Cadherin, receptor-stromal-cell-derived factor (CXCR4-SDF-1), vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet-derived growth factor (PDGF), fibroblast growth factor (FGF), transforming growth factor α und β (TGF- α und TGF- β) und Interleukin-8 mit dazugehörigen Rezeptoren, sowie Matrixmetalloproteinasen (MMPs) nachweisen, die in ihrer Gesamtheit an der frühen Tumorprogression und Metastasierung beteiligt sind. Nach [30].

In der frühen Phase der Karzinogenese ist in 70-80% der Fälle der Verlust der chromosomalen Region 9p21, auf der das Gen p16 liegt, zu beobachten [3]. Durch die Inaktivierung des Genproduktes p16/INK4A geht ein Inhibitor von Cyclin-abhängigen Kinasen (*engl. cyclin-dependent kinase; CDK*), die eine tragende Rolle bei der Regulation des Zellzyklus spielen, verloren [31, 32].

Bei etwa der Hälfte aller HNSCCs können der Verlust der chromosomalen Region 17p13, oder Punktmutationen des darin enthaltenen Gens TP53 nachgewiesen werden [3]. Dadurch wird der Tumorsuppressor p53 inaktiviert [33]. Man geht hierbei vom Übergang einer präinvasiven in eine invasive Läsion aus [31]. Der p53-Tumorsuppressor ist ein Transkriptionsfaktor, der im Nucleus lokalisiert ist. Bei vorliegenden DNA-Schäden führt p53 bis zur Reparatur zum Zellzyklusarrest in der G1-Phase. Aktives p53 induziert die Apoptose bei zu großen oder irreparablen DNA-Schäden [34, 35]. Dagegen verhindert der Verlust von aktivem p53 die Apoptose, der Zellzyklus wird nicht unterbrochen und es kommt so zu genetischer Instabilität [36].

In vielen HNSCCs liegt eine Überexpression des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (*engl. epidermal growth factor receptor; EGFR*) vor. Die Rezeptor-Tyrosinkinase führt bei Aktivierung durch Liganden mit Hilfe verschiedener Signalwege u.a. zu einer gesteigerten Zellproliferation und Angiogenese. Dadurch steigt das Metastasierungspotential [3, 30, 34].

In 90% der HNSCC Fälle kommt es zu einer Reaktivierung der Telomerase. Durch die aktive Erhaltung der Telomerlänge werden die Zellen so immortalisiert [3].

Wie unter Punkt 1.1.2 (Ätiologie) erwähnt, trägt eine HPV-Infektion durch die Onkoproteine E6 und E7 zu einer Degradation und Inaktivierung der Tumorsuppressorproteine p53 und pRb bei [3, 18]. E6 führt dabei zu einer Ubiquitin-vermittelten Proteolyse und damit zur Inaktivierung von p53, E7 zur Degradierung von pRb [28].

Des Weiteren stehen einige andere genetische Mutationen in Verbindung mit der Entstehung von OSCC, z.T. dargestellt in Abb. 2.

1.2 Tumormarker

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression verschiedener tumorassoziierter Proteine untersucht. Im Fokus standen dabei N-, P- und E-Cadherin, MMP2 und MMP9, sowie PD-L1. Der folgende Abschnitt soll eine kurze Einführung in den Aufbau und die Funktion dieser Proteine darstellen.

1.2.1 Cadherine

1.2.1.1 Cadherine allgemein

Cadherine stellen eine Familie von Glykoproteinen dar, die Ca^{2+} -vermittelt an der Zell-Zell-Adhäsion beteiligt sind. Zustande kommt dies durch homophile Interaktion zwischen den Cadherinen verschiedener Zellen in Adhärenzverbindungen oder Desmosomen [37]. Sie spielen damit sowohl eine fundamentale Rolle bei der Gewebeintegrität, als auch bei der Morphogenese verschiedener Gewebe [37, 38]. Man geht davon aus, dass der Verlust oder die Herunterregulation von Cadherinen mit einem erhöhten Metastasierungspotential und erhöhter Invasivität des Tumors einhergeht [39, 40].

Diese Gruppe von Glykoproteinen lassen sich in die klassischen Cadherine (Typ I und II), Protocadherine, desmosomale Cadherine, Fat- und 7-TM Cadherine einteilen [41]. Die bekanntesten Vertreter sind dabei E-, P- und N-Cadherin, die zu den klassischen Typ I-Cadherinen gehören [38].

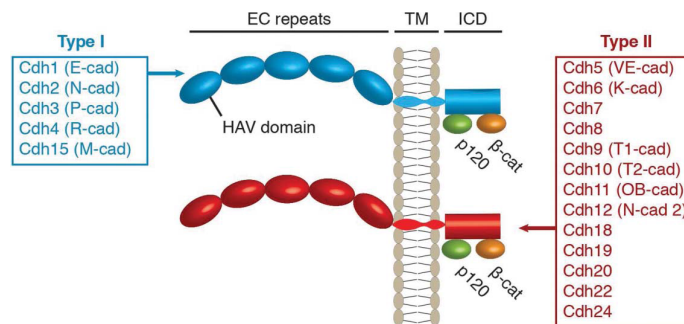


Abb. 3: Struktur klassischer Cadherine (Typ I und II). Klassische Cadherine bestehen aus fünf, sich wiederholenden, extrazellulären Domänen (EC), einer Transmembrandomäne (TM) und einer intrazellulären Domäne (ICD), die an Catenin-p120 (p120) und β -Catenin (β -cat) bindet. Die erste EC der Typ I-Cadherine besitzt ein Histidin-Alanin-Valin Motiv (HAV domain), das bei den Typ II-Cadherinen fehlt. Nach [42].

Der generelle Aufbau von Cadherinen gliedert sich in eine Amino-terminale extrazelluläre Domäne, eine Transmembrandomäne und eine intrazelluläre, Carboxy-terminale Domäne. Die extrazelluläre Domäne besteht dabei aus mehreren, sich wiederholenden Untereinheiten (*Ectodomain*, *EC*) durch die Zell-Zell-Verbindungen hergestellt werden. Die intrazelluläre Domäne stellt den Kontakt zum Zytoskelett her [37]. Klassische Cadherine besitzen 5 ECs (EC1-5) [41]. Dabei enthalten Typ I Cadherine in EC1 ein Histidin-Alanin-Valin Motiv, dass für starke Zell-Zell-Verbindungen verantwortlich gemacht wird, was jedoch bei Typ II Cadherinen gänzlich fehlt [38]. Die intrazelluläre Domäne interagiert mit Catenin-p120, α - und β -Catenin und stellt somit die Verbindung zum Zytoskelett her [43]. Eine Unterbrechung des Cadherin-Catenin-Komplexes wurde in vielen Karzinomen nachgewiesen und korreliert mit einer

Dedifferenzierung des Tumors, einem infiltrativen Wachstum, lymphogener Metastasierung und einer allgemein verschlechterten Prognose für die Patienten [39].

Neben der Funktion als Adhärenzmoleküle greifen Cadherine auch in verschiedene Signalwege von Zellen ein. Durch Catenin-p120 können Cadherine die Aktivität von Rho GTPasen (z.B. RhoA, Rac1, Cdc42), welche die Signaltransduktion und verschiedene Zellfunktionen steuern, beeinflussen. So inaktiviert freies, nicht an Cadherine gebundenes Catenin-p120 im Zytosol RhoA und damit einen wichtigen Baustein der Signaltransduktion. Rac1 und Cdc42 werden dagegen aktiviert [44]. Über β -Catenin besitzen Cadherine die Fähigkeit in den Wnt-Signalweg einzugreifen. β -Catenin fungiert dabei als ein Transkriptionsfaktor verschiedener Gene. Durch den Wnt-Signalweg werden vor allem Zellwachstum und –differenzierung und damit wichtige Faktoren der Tumorentstehung gesteuert [44-46]. Außerdem sind Cadherine in der Lage durch Interaktion mit Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) in die nachgeschaltete Signaltransduktion einzugreifen [44].

1.2.1.2 E-Cadherin

E-Cadherin wird mit seinen sich wiederholenden 5 ECs und dem HAV-Motiv in EC1 zu den klassischen Typ I-Cadherinen gezählt [38]. Vorwiegend wird es in Epithelzellen exprimiert und ist deshalb essentiell für multizelluläre Organismen [47]. Es wird durch das CDH1-Gen codiert und besitzt Einfluss auf verschiedene Prozesse wie Zellentwicklung, Gewebeintegrität, Zellmigration und –morphologie, sowie Zellpolarität [48]. Etwa 50% aller Tumortypen sind von Mutationen dieses Gens betroffen [39].

Im oralen Plattenepithelkarzinom sinkt die Expression von E-Cadherin mit dem Differenzierungsgrad des Tumors [49, 50]. Gleichzeitig erhöht sich das Risiko einer Fernmetastasierung. E-Cadherin kommt somit eine tumorsuppressive und der Invasion entgegenwirkende Funktion zu und hat damit maßgeblichen Anteil an der Überlebensrate von OSCC-Patienten [51, 52].

1.2.1.3 P-Cadherin

Auch P-Cadherin gehört zu den klassischen Typ I-Cadherinen und gilt als Protein-Homolog zu E-Cadherin [41, 53]. Es ist ein zentrales Zelladhäsionsmolekül und wird nur in regenerativen basalen und suprabasalen Zellschichten des oralen Epithels exprimiert [54].

Über die genaue Expression von P-Cadherinen in OSCC ist noch wenig bekannt. Dennoch zeigt sich eine höhere Expression bei besser differenzierten Zellen als in weniger differenzierten [53]. Während der Tumorprogression steigt die Expression von P-Cadherin im Allgemeinen. An der Invasionsfront zeigt sich jedoch eine erniedrigte Expression von membranständigem P-Cadherin, während zytoplasmatisches P-Cadherin dagegen ansteigt [55]. Dadurch wird die Mobilität der Zellen erhöht. Bei fortgeschrittener Tumorprogression lassen sich auch trunkierte Formen von P-Cadherin im Zytoplasma nachweisen [56].

1.2.1.4 N-Cadherin

Das klassische Typ I-Cadherin wird üblicherweise in mesenchymalen Zellen vorgefunden. Dennoch ließ es sich auch in Krebszellen epithelialen Ursprungs und in OSCC nachweisen [57-59]. Es wird angenommen, dass eine erhöhte Expression von N-Cadherin dem Migrations- und Invasionspotential zuträglich ist [60]. Häufig ist eine höhere Expression von N-Cadherin und eine gleichzeitige erniedrigte Expression von E-Cadherin in aggressiven Krebsgeschehen zu beobachten, bezeichnet als sog. „Cadherin-Switch“ [57].

Während ein gesundes orales Epithel keine Expression von N-Cadherin zeigt, konnte dagegen durch einige Studien eine steigende Expression in OSCC-Zellen gezeigt werden [61, 62].

1.2.2 Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)

1.2.2.1 MMPs allgemein

MMPs stellen eine Familie von Zn^{2+} -abhängigen Endopeptidasen dar, die in der Lage sind, sämtliche Proteinkomponenten der Extrazellulären-Matrix (EZM) und Basalmembranen proteolytisch abzubauen [63, 64]. Sie spielen sowohl bei physiologischen Prozessen wie Embryogenese, Wundheilung oder Gewebeumbau, als auch bei pathologischen Vorgängen wie Tumorerkrankungen, Arthritis oder Arteriosklerose eine Rolle [64, 65]. Im Tumorgeschehen trägt v.a. ihr Abbau der EZM und von Basalmembranen zum gesteigerten Metastasierungspotential und Zellproliferation bei [66].

Derzeit sind im humanen Organismus 23 verschiedene MMPs bekannt, die anhand ihrer Substratspezifität in sechs Gruppen eingeteilt werden können: Collagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, Matrilysine, Membran-Type MMPs (MT-MMPs) und andere MMPs [64-66].

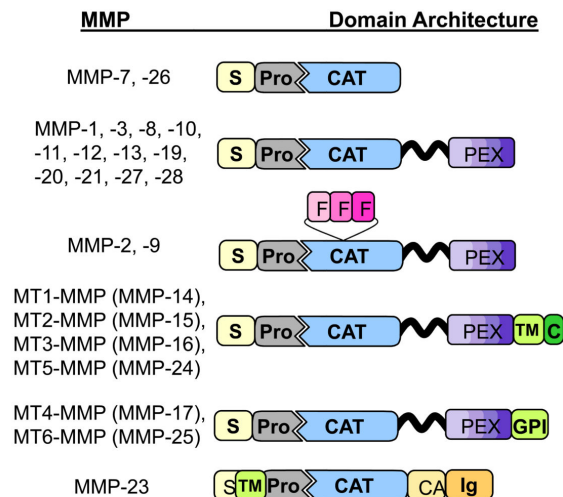


Abb. 4: Struktur humaner MMPs. Aufbau aus Signalpeptid (S), Propeptid (Pro), katalytischer Domäne (CAT), Fibronektin Typ II Wiederholungen (F), Hemopexin-Domäne (PEX), Transmembran-Domäne (TM), Membranverankerung durch Glycosylphosphatidylinositol (GPI), zytoplasmatische Domäne (C), Cystein-Array (CA) und immunoglobulin-like-Domäne. Die Hinge-Region ist als schwarze Welle dargestellt. Nach [63].

Der grundsätzliche strukturelle Aufbau aller MMPs ist identisch. Er besteht aus einem Signalpeptid, einem Propeptid, um die zymogene Form in inaktiviertem Zustand wahren zu können, und einem kompakten katalytischen Zentrum mit zentralem Zn^{2+} -Ion. Einige MMPs besitzen, verbunden durch die Hinge-Region, eine zusätzliche Hemopexin-Domäne (*engl. hemopexin-like domain; PEX*). Diese kann durch Protein-Protein-Wechselwirkungen eine Verbindung zu Rezeptoren (z.B. Integrine) auf der Zelloberfläche herstellen und die MMPs auf der Membran lokalisieren. Außerdem hat die PEX Einfluss auf die Substraterkennung. Während die meisten MMPs lösliche, extrazelluläre Proteine darstellen, besitzen einige von ihnen C-terminale Transmembran-Domänen, C-terminale Glycosylphosphatidylinositol-Anker oder eine N-terminale Transmembrandomäne, um sie fest an der Zellmembran zu binden [67-69].

Die Gelatinasen (MMP2 und MMP9) tragen zudem ein sich wiederholendes Fibronektin Typ-II Motiv, das zur Erkennung bestimmter extrazellulärer Proteine führt (u.a. Elastin und denaturiertes Collagen)[63].

MMPs werden als inaktive Zymogene sezerniert und durch die Entfernung des Propeptids mit Hilfe der Endopeptidase Furin aktiviert. Hierbei werden die meisten sezernierten MMPs durch TIMPs (*engl. tissue inhibitors of metalloproteinases; TIMPs*) wieder inhibiert [64, 68, 70]. Die

Regulation der MMP-Expression kann auf drei Ebenen stattfinden: bei der Transkription, der Enzymaktivierung oder durch die Inhibierung der Enzymaktivität [71].

Neben der reinen Funktion als EZM-degradierende Enzyme nehmen MMPs auch maßgeblichen Einfluss auf die Tumorprogression. So werden z.B. das Tumorwachstum, Angiogenese oder die Regulation der Apoptose durch Aktivierung von Wachstumsfaktoren, Aktivierung oder Induktion von pro-angiogenen Faktoren wie VEGF (*engl. vascular endothelial growth factor; VEGF*), bFGF (*engl. basic fibroblast growth factor; bFGF*) und TGF β (*transforming growth factor- β ; TGF- β*) oder die Ausbildung von Fas-Liganden [63, 65, 71-73]. Durch diese Wirkungen sind MMPs derzeit auch Gegenstand der Erforschung von MMP-inhibierenden Krebstherapeutika [65].

1.2.2.2 Gelatinasen – MMP2 und MMP9

Die beiden Matrix-Metalloproteinasen 2 und 9 stellen die Gruppe der Gelatinasen dar, auch bezeichnet als Gelatinase A (MMP2) und Gelatinase B (MMP9). Durch ihre Überexpression in vielen malignen Tumoren und den Zusammenhang ihrer Expression und Aktivität mit der Tumoraggressivität und Prognose, schreibt man ihnen den größten Anteil der Auswirkungen aller MMPs bei malignen Erkrankungen zu [68, 74]. Im aktivierten Zustand sind sie in der Lage, beim Abbau von EZM-Komponenten, der Basalmembran (Abbau des Hauptkomponenten Collagen IV) und Nicht-Matrix Proteinen, bioaktive Moleküle zu erzeugen oder freizusetzen [68, 75]. So kann beispielsweise der Abbau von Collagen IV durch MMP9 oder Laminin-5 durch MMP2 zur Freisetzung von bioaktiven Molekülen führen, welche die Angiogenese oder endotheliale Zellmigration fördern [76, 77]. Außerdem ist MMP9 an der Freisetzung von VEGF, TGF- β und FGF-2 (*engl. fibroblast growth factor -2; FGF-2*) beteiligt und stimuliert so die Zellproliferation, -migration, Angiogenese und das Tumorwachstum [78-81]. Des Weiteren zielen die Gelatinasen auf Cyto-, Chemokine und Wachstumsfaktoren ab und greifen somit wiederum in die Tumorentstehung, -progression und Immunmodulation ein [82-84].

Bei OSCC-Patienten werden hohe Expressionen von prä- und aktiven Formen der Gelatinasen beobachtet. Außerdem soll die Überexpression mit dem Tumorgrad korrelieren [85]. Smith et al. zeigten auch auf, dass hohe Expressionen der Gelatinasen in oralen Dysplasien das Risiko von OSCC zunehmend steigern [86]. Eine weitere Studie legte eine Verbindung des Expressionslevels mit einem positiven Lymphknotenstatus bei OSCC-Patienten dar [66, 87].

1.2.3 Programmed Cell-Death Ligand 1 (PD-L1)

PD-1 ist ein Typ I Transmembranprotein und einer der wichtigsten inhibitorischen Co-Rezeptoren, die von T-Zellen ausgebildet werden [88]. Der Rezeptor wird auf T- und auch auf B-Zellen, Monozyten, NKC (*engl. natural killer cells; NKC*), dendritischen Zellen und vielen tumor-infiltrierenden Lymphozyten ausgebildet [89]. Er besitzt mit PD-L1 und PD-L2 zwei potentielle Liganden, wobei die Prävalenz von PD-L1 deutlich höher ist [90].

PD-L1 wird dabei auf verschiedenen Zellen exprimiert: Plazentazellen, vaskuläre Endothelzellen, pankreatische Inselzellen, Muskelzellen, Hepatozyten, im Epithel, in mesenchymalen Stammzellen, auf B- und T-Zellen, dendritischen Zellen, Makrophagen und Mastzellen [90, 91]. Physiologisch reguliert PD-L1 zusammen mit PD-1 die Aktivität von T-Zellen in peripheren Geweben [90]. Im Zustand einer chronischen Entzündung oder Infektion kann durch die Hochregulierung von PD-L1 ein Autoimmunangriff (v.a. ausgelöst durch IFN γ) auf körpereigene Gewebe verhindert werden [91]. Die Bindung von PD-L1 an PD-1 führt dabei zu einer negativen Regulation der Aktivität von T-Zellen und steigert damit die immunologische Toleranz der betroffenen T-Zellen [92]. Krebszellen haben diesen Mechanismus vereinnahmt und führen damit zu einer Überexpression von PD-L1, um der immunologischen Überwachung zu entgehen und somit das Tumorstadium zu verstärken [91]. Sie sind also in der Lage, durch die Inhibierung der T-Zell-Aktivität, ein geeignetes Tumormikromilieu zu schaffen und ungehindert zu proliferieren [93].

Der PD-1 / PD-L1 Komplex besitzt die Fähigkeit, die Immunsuppression über verschiedene Mechanismen zu regulieren: Die Induktion der Apoptose von aktivierten T-Zellen, die Erleichterung von T-Zell-Anergie, die Verbesserung der Funktion regulatorischer T-Zellen (tragen zum immunsuppressiven Tumormikromilieu bei), die Inhibierung der T-Zell-Proliferation und geschädigter T-Zell-Aktivierung und IL-2 (*Interleukin-2; IL-2*) Produktion [90]. Eine höhere Expression von PD-L1 lässt sich somit in den meisten soliden Tumoren feststellen, u.a. auch bei HNSCC [94]. Des Weiteren lassen sich häufig Mutationen des PTEN-Tumorsuppressorgens, das einen negativen Einfluss auf die Expression von PD-L1 besitzt, nachweisen [90]. Es wird davon ausgegangen, dass die Überexpression mit einem höheren Metastasierungspotential und einer verschlechterten Gesamtprognose für den Patienten zu rechnen ist, obwohl die Rolle bei OSCC noch nicht stichhaltig geklärt ist [94].

1.3 Adrenerge Rezeptoren

Adrenerge Signalübertragung wird üblicherweise bei Stresssituationen - hervorgerufen durch Umwelt- oder psychologische Faktoren - über das periphere und zentrale Nervensystem aktiviert [95]. Chronische Zustände führen zu einer Gesundheitsbeeinträchtigung, z.B. durch kardiovaskuläre Erkrankungen, Allergien oder Infektionen [96, 97]. Auch ein Einfluss bei verschiedenen zellulären Prozessen und der Krebsentstehung konnte nachgewiesen werden. U.a. ist die adrenerge Signalübertragung bei der Adhäsion von Krebszellen an der EZM, der Invasion und Migration von Krebszellen oder der Angiogenese beteiligt [96].

Die adrenergen Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (*engl. G protein-coupled receptors; GPCRs*), die eine Gruppe von integralen Membranproteinen darstellen, welche Signale – nach extrazellulären Stimuli - in das Zellinnere übermitteln. Die Signalübertragung kommt dabei durch die Interaktion mit heterotrimeren G-Proteinen zustande [98]. Strukturell sind die Rezeptoren mit Hilfe von sieben Transmembran- α -Helices in die Doppellipidschicht der Zellmembran eingebettet. Die C- und N-Termini, sowie die extra- und intrazellulären Schleifen, unterscheiden sich dabei in ihrer Länge [97, 99]. Es werden neun verschiedene Untergruppen von Adrenorezeptoren (AR) unterschieden: α 1A, α 1B, α 1D, α 2A, α 2B, α 2C, β 1, β 2 und β 3, wobei der β 2-AR am besten erforscht ist und die größte Prävalenz besitzt [97].

Die Aktivierung wird durch Liganden (Katecholamine) ausgelöst, die eine strukturelle Veränderung des Rezeptors und die Bindung eines G-Proteins zur Folge haben. Das so aktivierte heterotrimere G-Protein ist in der Lage, Signale zu nachgeschalteten Effektorproteinen, wie z.B. Enzymen oder Ionenkanälen, zu übertragen und somit einige Signalkaskaden zu initiieren. Bei der Gruppe der β 2-ARs wird dadurch die Adenylylzyklase aktiviert, womit ein erhöhter cAMP-Spiegel einhergeht; bei den α 2-Ars dagegen wird die Adenylylzyklase inhibiert. Höhere Konzentrationen von cAMP lösen die Aktivierung der Protein-Kinase A (PKA) aus, welche für die Phosphorylierung von Effektorproteinen verantwortlich ist. Durch die PKA werden eine Reihe von zellulären Prozessen gesteuert, die Einfluss auf den Zellmetabolismus, -differenzierung, -morphologie, -motilität oder Gentranskription haben [96, 97, 99, 100].

Außerdem kann durch die erhöhte cAMP-Konzentration EPAC (*engl. exchange protein activated by adenylyl cyclase; EPAC*), das einige Funktionen mit der PKA teilt, aber auch Einfluss auf den MAPK-Signalweg hat, aktiviert werden. Des Weiteren spielt die

neuroendokrine Signalübertragung bei der Funktion des Immunsystems oder bei der Angiogenese, durch die Ausschüttung von proangiogenen Faktoren, z.B. VEGF, bFGF, und die Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen (MMP2 und MMP9) eine Rolle [96].

Die Deaktivierung des Rezeptors und der Signaltransduktion wird mit der Abkopplung vom G-Protein durch die Phosphorylierung des C-Terminus und der Bindung von β -Arrestin, welches die Endozytose des Rezeptors stimuliert, erreicht [99].

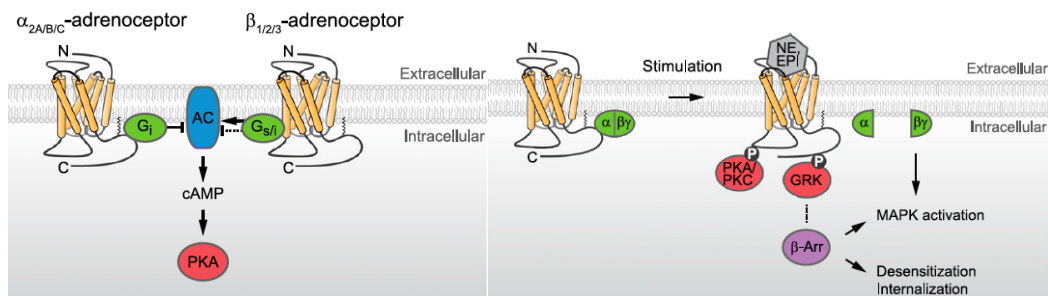


Abb. 5: Signaltransduktion von Adrenorezeptoren. Links: α 2- und β 2-ARs sind an G-Proteine gekoppelt. Dabei inhibieren α 2-ARs die Adenylzyklase (AC), die β 2-ARs stimulieren sie. Bei Stimulation folgt eine cAMP-Produktion und die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA). N=N-terminales Ende. C=C-terminales Ende. Rechts: Aktivierte Adrenorezeptoren werden durch PKA und Proteinkinase C (PKC) phosphoryliert. Durch GRKs (G-Protein-coupled receptor kinase) folgt eine Rekrutierung von β -Arrestin. Dadurch wird eine weitere Aktivierung von G-Proteinen verhindert und der Rezeptor desensibilisiert. β -Arrestin und G-Protein $G_{\beta\gamma}$ regulieren die Aktivierung von MAPKs. Verändert, nach [100].

Einige Studien zeigen fördernde Einflüsse von adrenergen Rezeptoren und Katecholaminen auf die Progression, Migration, Invasion und das Metastasierungspotential von Krebszellen [96, 101, 102]. Shang et al. zeigten eine Expression von β -adrenergen Rezeptoren bei OSCC-Zelllinien und deren durch Adrenalin und Noradrenalin stimulierte Proliferation [101, 102].

2. Zielsetzung der Arbeit

Die Zielsetzung dieser Arbeit lag in der Erfassung der Expression tumorassoziierter Proteine in vier verschiedenen OSCC-Zelllinien die zu multizellulären Sphäroiden kultiviert wurden. Im Fokus standen dabei die Proteine N-, P- und E-Cadherin, MMP2 und MMP9 sowie PD-L1 in Abhängigkeit von Zellzahl beziehungsweise der Sphäroidgröße. Hierfür wurden Sphäroide mit Größen von 5000, 10.000, 20.000 und 30.000 Z/25 μ l hergestellt und analysiert.

Im Mittelpunkt des zweiten Teiles stand wiederum die Erfassung der Expression oben genannter Proteine. Hierbei wurde der Einfluss der Stimulierung von α 2- und β 2-adrenergen Rezeptoren mit Hilfe spezifischer Agonisten bei gleichbleibender Sphäroidgröße (25.000 Z/25 μ l) auf die Expression der Tumormarker untersucht. Außerdem wurden anhand funktioneller Assays das Proliferations-, Migrations- und Invasionsverhalten dieser Zelllinien (in 2D-Zellkultur) mit und ohne Stimulierung analysiert.

3. Material und Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Verwendete Zellen

Die vier verwendeten humanen HNSCC Zelllinien PCI 1, PCI 9, PCI 13 und PCI 68 wurden ursprünglich im Labor von Prof. T. L. Whiteside (University of Pittsburgh Cancer Institute; Pittsburgh, PA) isoliert. Die Herstellung folgte der Beschreibung von Heo et al. [103].

Bezeichnung	Herkunft / Primärtumor	Klassifikation	Differenzierung
PCI 1	Larynx	T2N0M0	moderately Well
PCI 9	Zungengrund	T4N3M0	moderately
PCI 13	Retromolares Dreieck	T4N1M0	poorly
PCI 68	Zunge	T4N0M0	Well

Tab. 1: Verwendete Zellen.

3.1.2 Zellkultur

Die Zellen wurden bei -80°C gelagert, bei 37°C im Wasserbad zügig aufgetaut und in eine T75 Zellkulturflasche ausgesät.

Als Kulturmedium wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit einem Zusatz von 10% fötalem Kälberserum (FKS), 2mM L-Glutamin und 1% Penicillin / Streptomycin verwendet. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und 5% CO₂. Ab einer Konfluenz von ca. 80% wurden die Zellen gesplittet. Hierzu wurde zunächst das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit 10ml PBS unter vorsichtigem Schwenken gewaschen. Nach Entfernung des PBS wurde 1ml Accutase (Gibco) hinzugefügt, die Zellen zur vollständigen Ablösung im Inkubator ca. 5min inkubiert und unter dem Mikroskop kontrolliert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde 10ml Kulturmedium zugegeben und je nach Mischungsverhältnis in eine neue Zellkulturflasche überführt.

3.1.3 Herstellung von Sphäroiden unterschiedlicher Zellzahl

Es wurden Sphäroide der vier Zelllinien mit Zellzahlen von 5000, 10.000, 20.000, 25.000 und 30.000 Zellen bei einer Tropfengröße von 25µl mit Hilfe der Hanging-Drop Methode hergestellt.

Zunächst wurde, wie unter Punkt 3.1.2 (Zellkultur) beschrieben, vorgegangen. Nach dem Ablösen der Zellen vom Flaschenboden und dem Abstoppen der Accutase-Reaktion, wurde die Zellzahl der gewonnenen Zellsuspensionen bestimmt. Hieraus konnten die notwendigen Mengen berechnet werden und in separate Tubes überführt werden. Diese wurden 5 min bei 1200 U/min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Zellpellets wurden dann in der vorgesehenen Menge in Hanging-Drop-Medium (HD-Medium) resuspendiert, das sich aus DMEM, 2% FKS, 2mM L-Glutamin, 1% Penicilin / Streptomycin, 5ng/ml EGF und 0,24% Methylcellulose (zur Vergrößerung der Oberflächenspannung) zusammensetzt. Die nun gewonnenen Zellsuspensionen wurden mit einer Tropfengröße von 25µl mittels Pipette auf Petrischalendeckel aufgebracht. Der Schalenboden enthielt jeweils 10ml PBS-Puffer. Inkubiert wurden die Sphäroide über drei Tage bei 37°C und 5% CO₂.

3.2 Proteinchemische Methoden

3.2.1 Herstellung von Paraffinschnitten

Die Sphäroide wurden mittels Pipette und gekürzten Pipettenspitzen in 1,5ml Reaktionsgefäßen mit 200µl 4% Paraformaldehyd / PBS fixiert. Inkubiert wurde 6h bei 37°C und 5% CO₂. Danach erfolgte die Lagerung gekühlt bei 4°C. Die Herstellung der Paraffinschnitte (Paraffin-Mikro-Arrays) erfolgte in Kooperation mit der Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg.

3.2.2 Immunfluoreszenzfärbung von Paraffinschnitten

Zum Entparaffinieren und Rehydrieren wurden die Objektträger in einer Alkoholreihe mit 100%, 96%, 90% und 70% Ethanol jeweils 5min inkubiert und anschließend mit dest. H₂O gespült. Für die Demaskierung der Epitope wurden die Schnitte bei 90°C in 10mM Natriumcitrat-Puffer 2min erhitzt. Danach erfolgte eine 30-minütige, gleichmäßige Abkühlungsphase und eine Spülung mit PBS.

Für die Blockierung der unspezifischen Antikörper-Bindungsstellen wurden die Objektträger 1h mit IF-Puffer (Tab. 2) inkubiert, anschließend über Nacht mit spezifischem Primärantikörper bei 4°C in einer Feuchtkammer gelagert. Bevor und nachdem der fluoreszierende Sekundärantikörper zugegeben wurde, folgte dreimaliges Waschen mit IF-Puffer.

Verwendete Primär- und Sekundärantikörper siehe Tab. 3 und Tab. 4.

Zum Eindeckeln der Objektträger wurden entsprechende Deckgläser (Roth) und Vectashield DAPI Mounting Medium (Vector Laboratories) verwendet.

Name	Reagenz	Menge
IF-Puffer	1% BSA / PBS	0,1%
	2% Triton-X 100 / PBS	0,2%
	1% Tween 20 / PBS	0,05%
	100% Goat Serum	10%
	PBS	ad 1L
Natriumcitratpuffer	Tri-sodium citrate	2,94g
	Tween-20	0,05%
	H ₂ O	ad 1L
	1M HCL	auf pH 6 einstellen

Tab. 2: Inhaltsstoffe von IF-Puffer und Natriumcitratpuffer.

Antigen	Host	Hersteller	Prod.-nr. #	Konzentration	Verdünnungspuffer
Anti P-Cadherin	Mouse	BD Bioscience	610228	1:500	IF-Puffer
Anti E-Cadherin	Mouse	BD Bioscience	610182	1:500	IF-Puffer
Anti Col XVI	Rabbit	Sigma Life Science	HPA027237-100UL	1:100	IF-Puffer
Anti Ki67	Rabbit	Thermo Scientific	PA5- ???	1:500	IF-Puffer
Anti MMP2	Rabbit	Sigma Life Science	HPA001939-100UL	1:100	IF-Puffer
Anti MMP9	Rabbit	Sigma Life Science	HPA001238-100UL	1:300	IF-Puffer
Anti TIMP	Rabbit			1:300	IF-Puffer

Tab. 3: Spezifische Primärantikörper bei der Immunfluoreszenzfärbung.

Name	Host	Hersteller	Prod.-nr. #	Konzentration	Verdünnungspuffer
Alexa Fluor 568 Anti-Rabbit	Goat	Invitrogen	A11031	1:500	IF-Puffer
Alexa Fluor 488 Anti-Mouse	Goat	Invitrogen	A11019	1:500	IF-Puffer
Alexa Fluor 488 Anti-Rabbit	Goat	Invitrogen	A11034	1:500	IF-Puffer

Tab. 4: Fluoreszenz-gekoppelte Sekundärantikörper bei der Immunfluoreszenzfärbung.

3.2.3 Gewinnung von Proteinlysaten aus Sphäroiden

Analog zu Punkt 3.2.1 (Herstellung von Paraffinschnitten) wurden die Sphäroide mit einer Pipette aufgenommen und in 1,5ml Reaktionsgefäßen mit 300µl PBS gewaschen. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 12.000 U/min wurde der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde je nach Sphäroidgröße mit 50-150µl RiPa-Puffer (*engl. radioimmunoprecipitation assay buffer; RiPa*) mit *EDTA-free Protease Inhibitor* (Roche) resuspendiert und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Nach dem Auftauen folgte eine Ultraschallbehandlung mit 2 Zyklen bei 20 sek und 50% Power und eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Es wurde ein weiterer 10-minütiger Zentrifugationsschritt bei 13.000 U/min und 4°C durchgeführt. Der Überstand wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C aufbewahrt.

3.2.4 Proteinquantifizierung

Zur Ermittlung der Proteinkonzentration wurde ein BCA Test durchgeführt. Dieser basiert auf einer Reduktion von Cu^{2+} -Ionen zu Cu^{+} -Ionen durch Proteine im alkalischen Milieu. Die Proteinmenge ist dabei äquivalent zu den entstandenen Cu^{+} -Ionen, die im nächsten Schritt einen violetten Chelatkomplex mit der Bicinchoninsäure (*engl. bicinchoninic acid; BCA*) mit einem Absorptionsmaximum bei 562nm bilden [104].

Zur Durchführung des Tests wurden in jeweils drei Wells einer 96-Well-Platte 10µl BCA-Standard (Albumin, 0-1500 µg/ml) und 2µl Proteinprobe (1:5 Verdünnung) vorgelegt und mit jeweils 200µl BCA-Reagenz (50 Teile BCA-Solution; 1 Teil 4% Kupfersulfat) 30min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption im Photometer (Tecan GENios Microplate Reader; Software Magellan V.6) bei 595nm gemessen. Mit Hilfe des BCA-Standards konnte die Konzentration der Proteinlysate errechnet werden.

3.2.5 SDS-Page Gelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) erhalten die Proteine eine zu ihrem Molekulargewicht proportionale, negative Gesamtladung und können somit auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Die Wanderung erfolgt dabei vom Minus- zum Pluspol.

Im ersten Schritt erfolgte die Gelherstellung. Verwendet wurde hierbei ein 10%iges Trenngel (aufgrund der zu erwartenden Molekulargewichte) und ein Sammelgel (Stärke jeweils 1mm)

nach der Rezeptur in Tab. 5. Die formgebende Kammer wurde hierzu mit dem noch nicht ausgehärteten Trenngel befüllt und um eine Blasenbildung zu verhindern und überschüssiges Wasser zu entfernen, mit ca. 1ml Isopropanol überschichtet. Nach der vollständigen Polymerisation und der Entfernung des Isopropanols wurde das Sammelgel über die Schicht Trenngel pipettiert. Zur Ausformung der Taschen wurde ein Kamm mit definierter Kantenlänge eingesteckt.

Für die Auftrennung wurde eine Proteinmenge von jeweils 30µg und ein Auftragsvolumen von 25-30µl pro Tasche festgelegt. Die Proteinproben wurden nach Zugabe von SDS-haltigem 5x Laemmli-Puffer (Roth, Karlsruhe) 10min bei 70°C denaturiert. Nach Befüllung der Taschen mit 10µl Marker (Protein Plus, ProteinTM Dual Color, Biorad) und der Proteinproben, wurden die Proteine für ca. 2h bei 70-90V aufgetrennt. Die Elektrophoresekammer enthielt dabei Elektrodenpuffer nach Tab. 5.

Name	Reagenz	Menge
10% Trenngel	ention. H2O	3,6 ml
	Acrylamid (40%)	2,5 ml
	SDS (10%)	100 µl
	1M Tris pH 8,8	3,8 ml
	APS (10%)	50 µl
	TEMED	10 µl
Sammelgel	ention. H2O	5,7 ml
	Acrylamid (40%)	750 µl
	SDS (10%)	75 µl
	1M Tris pH 6,8	900 µl
	APS (10%)	50 µl
	TEMED	7 µl
10x Elektrodenpuffer (1L)	Tris pH 8,5	30 g
	SDS (20%)	50 ml
	Glycin	144 g
	ention. H2O	ad 1L

Tab. 5: Rezepturen von Trenngel und Sammelgel, sowie 10x Elektrodenpuffer.

3.2.6 Western-Blot

Beim Western-Blot werden die im Gel enthaltenen Proteine elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran transferiert. Dafür wurden die Gele aus den Kammern gelöst und das Sammelgel entfernt. Die PVDF-Membran (Roche) wurde zuerst ca. 10sec in Methanol aktiviert und anschließend mit Blot-Puffer (Tab. 6) getränkt, bevor sie auf dem Gel mittig platziert wurde und zusammen mit Filterpapieren (Whatman-Papier) in die Blotting-Kammer (Bio-Rad)

eingespannt wurde. Die Blot-Apparatur enthielt Blot-Puffer (Tab. 6). Die Blotting-Zeit betrug 1h 15min bei 140mA.

Name	Reagenz	Menge
Blot-Puffer	Tris pH 8,5 (ohne HCl)	50 mM
	Glycin	40 mM
	Methanol	10%
	ention. H2O	

Tab. 6: Inhaltsstoffe des Blot-Puffers.

3.2.7 Proteindetektion auf Western-Blot

Nach der Vollendung des Blots wurde die Membran entnommen und für 1h in 5% BSA / TBST auf dem Schüttler blockiert, um unspezifische Antikörper-Bindungen zu vermeiden.

Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte mittels spezifischem Primärantikörper und HRP-gekoppeltem (*engl. horse radish peroxidase; HRP*) Sekundärantikörper. Die Peroxidase katalysiert nach Zugabe der Entwickler-Lösungen Roti-Lumin (Roth, Karlsruhe) oder SuperSignal® West Femto (Thermo Fisher Scientific) mit Hilfe von Luminol ein chemolumineszentes Signal erzeugt werden, das detektiert werden kann.

Hierzu wurde die Membran zunächst über Nacht mit dem spezifischen Primärantikörper schüttelnd bei 4°C inkubiert. Es folgte ein dreimaliger, 5-minütiger Waschschriff mit TBST, ehe der Sekundärantikörper 1h hinzugegeben wurde. Nach weiterem dreimaligem Waschen wurde die Membran mit entsprechender Entwicklerlösung ca. 2min gleichmäßig überschichtet.

Die Detektion der Proteinbanden erfolgte im Chemilumineszenz-Imager (Biorad) mit Belichtungszeiten von 10sek bis 45min.

Für eine bessere graphische Darstellung wurden die Ergebnisse in Adobe Photoshop CS2 nachbearbeitet. Dabei wurde eine schwarz-weiß Tonumkehr, Tonwertkorrekturen, Helligkeitsanpassungen und Modifikationen der Schärfe vorgenommen.

Die semiquantitative Auswertung erfolgte mit Adobe Photoshop CC anhand der integrierten Dichte der jeweiligen Banden. Dafür wurden diese auch in Relation zur korrespondieren beta-Aktin-Bande gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism 7 mit Hilfe des one-way Anova Tests.

Name	Reagenz	Menge
10x TBS-Puffer (1L)	Tris Base NaCl konz. HCl ention. H2O	24,23 g 80,06 g auf pH 7,5 einstellen ad 1L
10x TBST-Puffer (1L)	10x TBS-Puffer Tween-20 ention. H2O	100 ml 1 ml ad 1L

Tab. 7: Inhaltsstoffe von TBS- und TBST-Puffer.

Antigen	Host	Hersteller	Prod.-nr. #	Konzentration	Verdünnungspuffer
Anti-P-Cadherin (N-terminal)	Mouse	BD Biosciences	610228	1:1000	5% BSA / TBST
Anti-E-Cadherin	Mouse	BD Biosciences	610182	1:5000	5% BSA / TBST
Anti-N-Cadherin	Mouse	BD Biosciences	610921	1:1000	5% BSA / TBST
Anti-MMP2	Rabbit	Sigma Life Science	HPA001939-100UL	1:1000	5% BSA / TBST
Anti-MMP9	Rabbit	Sigma Life Science	HPA001939-100UL	1:1000	5% BSA / TBST
Anti-PD-L1	Rabbit	Cell Signaling Tech.	13684	1:1000	5% Milchp. / TBST
Beta-Aktin	Rabbit	abcam	ab8227	1:10000	5% BSA / TBST

Tab. 8: Spezifische Primärantikörper bei Western-Blots.

Name	Host	Hersteller	Prod.-nr. #	Konzentration	Verdünnungspuffer
Goat anti mouse	Goat	Thermo Scientific	31430	1:1000	5% BSA / TBST
Goat anti rabbit	Goat	Thermo Scientific	31460	1:1000	5% BSA / TBST

Tab. 9: Sekundärantikörper bei Western-Blots.

3.2.8 Gewinnung von Überständen mit Sphäroiden

Zunächst wurde analog zu Punkt 3.1.3 vorgegangen. Nach der Inkubation über 48h wurden die Sphäroide entnommen und in HD-Medium ohne Zusatz von FKS resuspendiert. Die Sphäroide wurden daraufhin erneut ausgesät. Nach weiteren 24h erfolgte die Abnahme der Überstände. Zur quantitativen Proteinbestimmung wurde ein BCA-Test verwendet (Punkt 3.2.4).

3.2.9 Zymogramm

Mit Hilfe der Zymographie lassen sich nach einer SDS-PAGE-Gelelektrophorese spezifische aktive Proteasen in einem Gelatine-Gel nachweisen.

Die Proteinproben bestanden aus den Überständen (Punkt 3.2.8) und Zymogramm-Ladepuffer (Tab. 10) zu jeweils gleichen Teilen. Ein Denaturierungsschritt fand dabei nicht statt, um die Aktivität der Enzyme zu erhalten. Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteinproben wurde dabei ein Gelatine-Gel dessen Zusammensetzung in Tab. 10 beschrieben ist und eine Stromstärke von 20mA pro Gel verwendet (etwa 2,5h). Pro Spur wurde eine Proteinmenge von 2µg aufgetragen. Als Kontrollspuren wurde rekombinantes MMP2 und MMP9 verwendet (Tab. 12). Nach erfolgter Auftrennung wurden die Gele aus den Kammern entnommen und in einem geeigneten Puffer (Renaturierungspuffer Tab. 11) zweimal a 30min renaturiert. Danach wurden die Gele einem viermaligen, 5-minütigen Waschschrift mit ddH₂O zugeführt, ehe sie 36h zusammen mit einem Verdaupuffer (Tab. 11) bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert wurden. Nach 12h erfolgte ein Tausch des Verdaupuffers. Zur Färbung wurden die Gele in 25ml Comassie-Blau-Lösung schüttelnd eingelegt. Entfärbt wurde zunächst 1h mit einer stärkeren Entfärbelösung 1 (Tab. 11), anschließend mit der Entfärbelösung 2 (Tab. 11) über Nacht. Zur graphischen Erfassung wurden die Gele mit Hilfe eines Scanners digitalisiert.

Name	Reagenz	Menge
10% Acrylamid + 0,1% Gelatine Trenngel	ention. H2O	1,72 ml
	Acrylamid (40%)	1,125 ml
	SDS (20%)	22,5 µl
	1M Tris pH 8,8	1,125 ml
	APS (10%)	30 µl
	1% Gelatine	450 µl
	TEMED	4,5
4,5% Sammelgel	ention. H2O	2,8 ml
	Acrylamid (40%)	506 µl
	SDS (20%)	22,5 µl
	1M Tris pH 6,8	1,125 ml
	APS (10%)	22,5 µl
	TEMED	15 µl
10x Elektrodenpuffer (1L)	Tris pH 8,5	30 g
	SDS (20%)	50 ml
	Glycin	144 g
	ention. H2O	ad 1L
2X Zymogramm Ladepuffer	Tris-HCl pH8	31,52 mg
	EDTA	7,5 mg

	Glycerlol 87% SDS 20% Bromphneolblau ddH2O	1 ml 2,298 ml Konz. 0,02% ad 10ml
--	---	--

Tab. 10: Rezepturen der Gelatine-Gele und Zusammensetzung des Elektrodenpuffers sowie des Ladepuffers.

Name	Reagenz	Menge
Renaturierungspuffer	Triton X-100 ention. H2O	12,5 ml ad 500 ml
Zymogramm-Verdaupuffer	Tris-HCl pH 8,5 CaCl2 ention. H2O	3,94 g 367,55 mg ad 500 ml
Comassie Blue - Färbelösung	Brilliant Blau G 250 Eisessig Isopropanol ention. H2O	1,25 g 50 ml 125 ml ad 500 ml
Erster Entfärber	Methanol Eisessig ention. H2O	250 ml 50 ml ad 500 ml
Zweiter Entfärber	Methanol Eisessig ention. H2O	25 ml 37,5 ml ad 500 ml
Entwässerungslösung	Ethanol Glycerol 87% ention. H2O	125 ml 28,736 ml ad 500 ml

Tab. 11: Zusammensetzung verschiedener Puffer zur Durchführung einer Zymographie sowie Entfärbe- und Entwässerungslösungen.

Name	Hersteller	Cat.-nr. #	Konzentration	Eingesetzte Menge	Größe
Rekomb. MMP2	Calbiochem	PF023	0,1 mg/ml	50 pg	66 kDa
Rekomb. MMP9	Calbiochem	PF024	0,1 mg/ml	500 pg	83 kDa

Tab. 12: Verwendete Kontrollen.

3.3 Funktionelle Assays

3.3.1 Migrationsassay mit Boyden-Kammer

Beim Versuch wurde eine Boyden-Kammer verwendet. Dafür wurde hierbei das Prinzip der Migration der OSCC-Zellen entlang eines chemotaktischen Gradienten zwischen zwei Kompartimenten durch eine Membran mit einer Porosität von 8µm genutzt [105].

Verwendet wurde eine 24-Well-Kulturplatte (Corning) mit ThinCert Zellkultureinsätzen (Greiner BioONE) mit oben genannter Porengröße. In das so entstandene untere Kompartiment wurde 600µl Zellkulturmedium mit einem 10%-Anteil FKS pipettiert. Das obere

Kompartiment enthielt 100µl Zellsuspension aus 100.000 Zellen/Well und Zellkulturmedium mit 1% FKS. Die Zellsuspension wurde analog zu Punkt 3.1.3 hergestellt, jedoch wurden die Zellen in Kulturmedium mit 1% FKS resuspendiert. Für die Behandlung der Zellen mit einem β 2-adrenergen Agonisten und einem α 2-adrenergen Agonisten wurden die Zellen im entsprechenden Kulturmedium mit einem Zusatz 1% FKS und dem jeweiligen Agonisten – nach einer Sterilfiltration - resuspendiert. Die Konzentration von Formoterol Hemifumarate (β 2-Agonist, Seleckchem) wurde auf eine Endkonzentration von 10^{-7} M eingestellt, die von UK 14.304 (α 2-Agonist) auf 10^{-8} M. Es folgte eine 16h Inkubation bei 37°C und 5% CO₂. Anschließend wurden die migrierten Zellen an der Unterseite der Membran mit Hilfe einer Kristallviolett-Färbung angefärbt. Hierfür wurden die ThinCert-Einsätze zunächst mit 250µl PBS pro Well 5min gewaschen, ehe die Zellen mit 1% Glutaraldehyd fixiert wurden (30min). Nach weiterem zweimaligem Waschen erfolgte die Färbung mit 0,02% Kristallviolettlösung (250µl/Well; 15min). Ungebundenes Kristallviolett wurde unter fließendem Wasser verworfen und die nicht migrierten Zellen auf der Membranoberseite mit Wattestäbchen entfernt. Zur vollständigen Lösung des Farbstoffes wurde 70%iges Ethanol hinzugefügt. Dabei wurden 250µl pro Well verwendet, 1h lang auf dem Schüttler.

Die Absorption wurde bei 595nm im Photometer (Tecan GENios Microplate Reader; Tecan, Crailsheim, Deutschland) gemessen. Diese war dabei direkt proportional zur Anzahl der migrierten Zellen. Als Blank-Kontrolle wurde 70%iges Ethanol verwendet. Dafür wurde jeweils 200µl der Proben pro Well in eine 96-Well-Platte überführt (unverdünnt) und gemessen.

3.3.2 Invasionsassay mit Boyden-Kammer und Matrigel

Der generelle Versuchsaufbau kann Punkt 3.3.1 entnommen werden.

Der Unterschied der beiden Assays lag darin, dass beim Invasionsassay die ThinCert-Einsätze mit Matrigel (Corning, Stockkonzentration 8mg/ml) mit einer Endkonzentration von 1mg/ml beschichtet wurden. Hierfür wurde das Matrigel über Nacht bei 4°C aufgetaut und entsprechend verdünnt. Zur Beschichtung wurden pro ThinCert (in einer 24-Well-Platte) 30µl Matrigel auf die Oberseite der Membran pipettiert. Die Gelierung erfolgte 1h 30min bei 37°C. Danach konnte analog zu Punkt 3.3.1 fortgefahren werden. Die Inkubation erfolgte 24h lang bei 37°C und 5% CO₂.

Vor der Auswertung mit dem Kristallviolett-Test (siehe Punkt 3.3.1) wurden Fotos der Membranoberseite mit einem inversen Mikroskop (Nikon) angefertigt, um die Invasion in das Gel zu kontrollieren. Die Auswertung erfolgte analog zum Migrationsassay.

3.3.3 WST-Proliferationsassay

Der WST-Proliferationsassay (*engl. water soluble tetrazolium*) dient zum Nachweis einer intakten Atmungskette in Zellen. Viable Zellen mit einem intakten mitochondrialen Succinat-Tetrazolium Dehydrogenase System bewirken eine enzymatische Umsetzung des schwach rot gefärbten Tetrazoliumsalzes WST-1 in das dunkelrote Formazan. Der Farbumschlag kann in einem Spektralphotometer erfasst und ausgewertet werden.

Insgesamt wurde an vier Tagen gemessen. An Tag 0 erfolgte die Aussaat in vier 96-Well-Platten. Es wurden jeweils 1000 Zellen/Well in Zellkulturmedium mit einem Zusatz von 1% FKS verwendet. Für den Blank-Wert wurde dieses Medium verwendet. Pro Tag (Tag 1 – 4) wurde eine Platte vermessen. Dafür wurde täglich (8:00 Uhr) pro Well 10µl WST-1-Reagenz (Roche) zugegeben. Gemessen wurde jeweils 1h, 2h und 4h nach Reagenzzugabe bei 450nm.

3.4 Material

Bezeichnung	Katalognummer #	Hersteller	Ort / Land
40% Acrylamide	161-0146	Bio-Rad Laboratories	Hercules, CA / USA
Ammonium Persulfate (APS)	13375	Serva	Heidelberg / DE
BCA Solution	71288	Novagen	USA
Brilliant Blau G 250	9598.1	Roth	Karlsruhe / DE
Bromphenolblau	B3269-5ML	Sigma	St. Louis, MO / USA
BSA	9048-46-8	BIOMOI GmbH	Hamburg / DE
CaCl₂	2382.1000	Merck	Darmstadt / DE
Cell Proliferation Reagent WST-1	11644807001	Roche	Deutschland
Cupric Sulfate 4%	71287	Novagen	USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	P04-01515	Pan Biotech GmbH	Aidenbach / DE
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	D8537	Sigma	St. Louis, MO / USA
EDTA	8043.3	Roth	Karlsruhe / DE
Eisessig	100063	Merck	Darmstadt / DE
Ethanol	100983	Merck	Darmstadt / DE

FKS	10500064	Gibco	USA
Formaldehyd	F8775-24ML	Sigma	St. Louis, MO / USA
Gelatine aus Schweinehaut	48722	Fluka	Schweiz
Glycerol 87%	A3561,1000	Applichem	Darmstadt / DE
Glycin	33226-1KG	Sigma	St. Louis, MO / USA
Isopropanol	109634	Merck	Darmstadt / DE
Kristallviolett	T123.1	Roth	Karlsruhe / DE
L-Glutamin	K0283	Biochrom	Berlin / DE
Matrigel	356231	Corning	England
Methanol	MFCD00004595	VWR Chemicals	Amerika
Milchpulver	T145.1	Roth	Karlsruhe / DE
NaOH	1.06498.1000	Merck	Darmstadt / DE
Penicillin/Streptomycin Solution	0503	ScienceCell	Carlsbad, CA / USA
Precision Plus Protein Dual Color Standards	161-0374	Bio-Rad Laboratories	Hercules, CA / USA
RIPA Buffer	R0278	Sigma	St. Louis, MO / USA
Roti Lumin 1 + 2	P079 + P080	Roth	Karlsruhe / DE
Roti-Load Laemlli-Puffer	K929.1	Roth	Karlsruhe / DE
SDS	0183.1	Roth	Karlsruhe / DE
SiperSignal West Femto	34095	Thermo Scientific	Rockford, IL / USA
StemPro Accutase	A11105-01	Gibco	USA
TEMED	T7024-25ML	Sigma	St. Louis, MO / USA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	1.08382.2500	Merck	Darmstadt / DE
Tris-HCl	9090.3	Roth	Karlsruhe / DE
Triton X-100	T8787-250ML	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim / DE
Tween 20	P1379-100ML	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim / DE
Vectashield Mounting Medium + DAPI	H-11200	Vector Laboratories	Burlingame, CA / USA

Tab. 13: Verwendete Lösungen und Chemikalien.

Typ	Bezeichnung	Hersteller	Ort / Land
8-fach Pipette	Multipipette	Eppendorf AG	Hamburg / DE
Blot- und Elektrophorese System	Mini-PROTEAN [®] Tetra System	Bio-Rad Laboratories	Hercules, CA / USA
Inkubator	HERAcell 240	Thermofisher	Deutschland
Magnetrührer	IKA RCT basic	IKA	Deutschland
Mikroskop	CKX41	Olympus Co.	Tokyo / JP
Fluoreszenzmikroskop	BX61	Olympus Co.	Tokyo / JP
Mikroskop Kamera	XC10	Olympus Co.	Tokyo / JP

Multipipette	Multipipette® plus	Eppendorf AG	Hamburg / DE
Photometer	Genios	Tecan	Männedorf / CH
Pipetten versch. Größen	Eppendorf Research plus	Eppendorf AG	Hamburg / DE
Scanner	HP Scanjet 5530	Hewlett Packard	Palo Alto, CA / USA
Sterilbank	KS 18	Kendro	Langenselbold / DE
Stromquelle Elektrophorese	PowerPac Basic	Bio-Rad Laboratories	Hercules, CA / USA
Thermomixer	ThermoMixer C	Eppendorf AG	Hamburg / DE
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries	Bohemia, NY / USA
Waage	TE2101	Sartorius AG	Göttingen / DE
Wasserbad	1086	GFL	Deutschland
Zellzahlbestimmung	Cedex XS	Innovatis	Schweiz
Zentrifuge	Sigma 3K30	Sigma Laboratory Centrifuges	Deutschland
Zentrifuge	Rotanta/P	Hettich	Deutschland

Tab. 14: Verwendete Geräte.

Typ	Bezeichnung	Hersteller	Ort / Land
Deckglas	Deckgläser	Roth	Karlsruhe / DE
Objektträger	SuperFrost Plus	Menzel GmbH	Braunschweig / DE
Slides	Cedex Smart Slides	Roche	Deutschland
Tubes versch. Größen	CentriStar + CellStar	Corning	NY / USA
Well-Platten versch. Größen	Cellstar	Greiner bio-one	NY / USA
Elektr. Pipettenspitzen versch. Größen	Cellstar	Greiner bio-one	NY / USA
Zellkulturflaschen versch. Größen	Cell Culture Flasks	Corning	NY / USA

Tab. 15: Verbrauchsmaterialien.

4. Ergebnisse

Die Versuche im Rahmen dieser Arbeit befassten sich mit der Erfassung der Expression der tumorassoziierten Proteine N-, P- und E-Cadherin, MMP2, MMP9 und PD-L1 mittels Western-Blot und Zymographie. Weiterhin sollte die Funktion α 2- und β 2- adrenerger Rezeptoren in HNSCC Zellen mit Hilfe verschiedener funktioneller Assays untersucht werden.

Die Versuchsreihen können dabei in zwei Teile gegliedert werden. Im ersten Teil wurden die Expressionen der Proteine im Verhältnis zur Zellzahl multizellulärer Tumorsphäroide und unter hypoxischen Bedingungen untersucht. Gegenstand waren dabei Sphäroide mit 5000, 10.000, 20.000 und 30.000 Z/25 μ l.

Der zweite Teil befasste sich mit der Expression und dem Einfluss der Stimulierung von α 2- und β 2- adrenergen Rezeptoren auf die Expression der oben genannten Proteinmarker in Sphäroiden mit einer Zellzahl von jeweils 25.000 Zellen. Dabei wurde die Wirkung der Rezeptoren mit Hilfe funktioneller Assays im Vergleich zu unbehandelten Zellen in 2D-Zellkultur festgehalten.

Gegenstand aller Versuche waren die vier HNSCC-Zelllinien PCI 1, PCI 9, PCI 13 und PCI 68.

Im Folgenden wurden nur die Signifikanzen gekennzeichnet.

4.1 Expression von tumorassoziierten Proteinen in Sphäroiden mit unterschiedlicher Zellzahl

In diesem ersten Teil lag der Fokus auf der Erfassung der Expression verschiedener Tumormarker in Abhängigkeit zur Zellzahl in multizellulären Tumorsphäroiden. Die eingesetzte Proteinmenge in Western-Blots belief sich jeweils auf 30 μ g, die der Zymogramme auf 2 μ g.

4.1.1 N-Cadherin

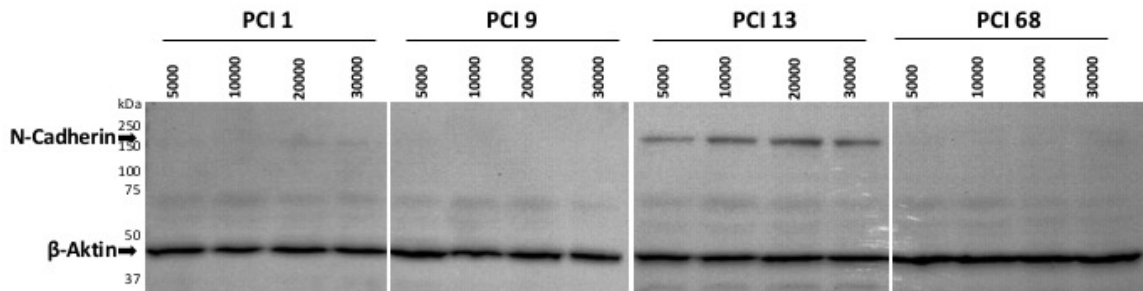


Abb. 6: Exemplarischer Western-Blot mit Detektion von N-Cadherin in Lysaten. β -Aktin fungiert als Ladekontrolle. Aufgetragene Proteinmenge 30 μ g.

Eine Expression von N-Cadherin ließ sich lediglich bei der Zelllinie PCI 13 und marginal bei PCI 1 feststellen. Dabei stieg die Expression bis zu einer Sphäroidgröße von 20.000 Z/25 μ l an, während sie bei 30.000 Z/25 μ l wieder sank. Die Zelllinien PCI 9 und PCI 68 zeigten keine erfassbare Expression von N-Cadherin. In den Folgeversuchen wurde deshalb auf eine semiquantitative Erfassung von N-Cadherin verzichtet.

4.1.2 P-Cadherin

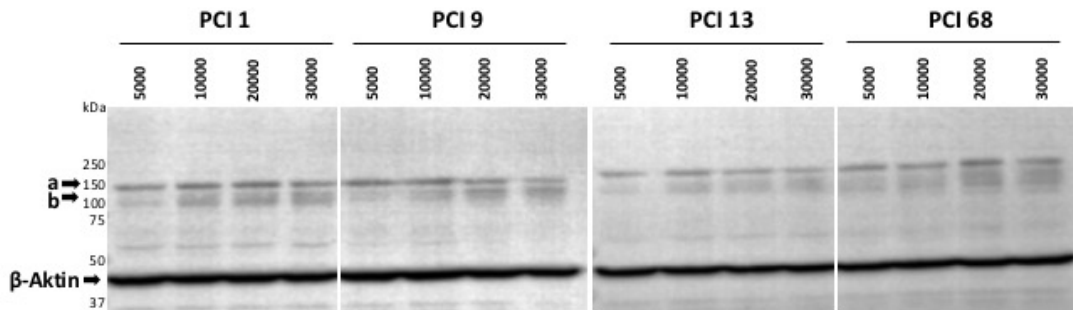
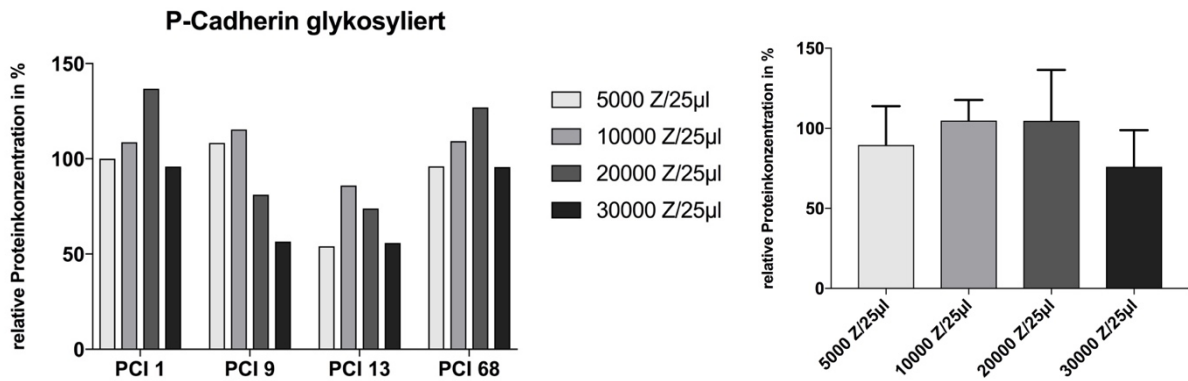


Abb. 7: Exemplarischer Western-Blot mit Detektion von P-Cadherin in Lysaten. β -Aktin fungiert als Ladekontrolle. **a** = glykosyliertes P-Cadherin; **b** = nicht glykosyliertes P-Cadherin. Aufgetragene Proteinmenge 30 μ g.

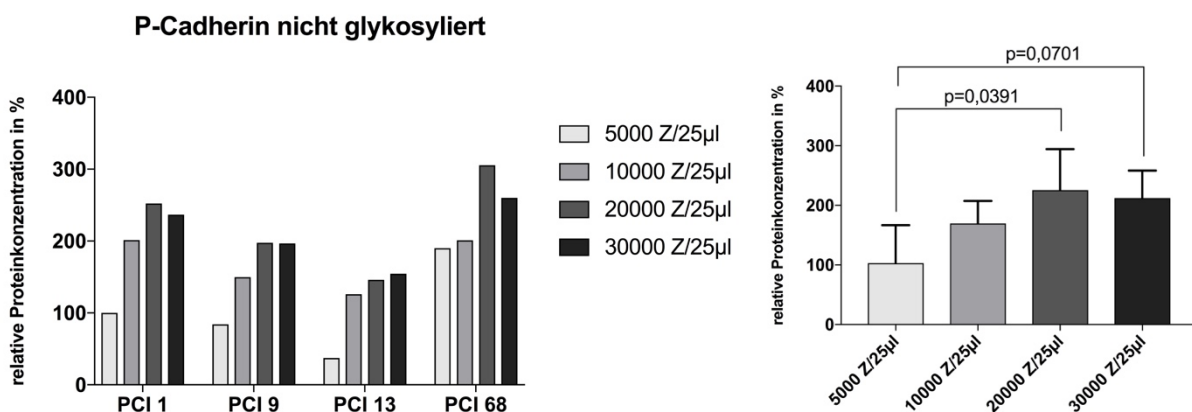
Eine Expression von P-Cadherin war bei allen Zelllinien feststellbar. Hierbei treten üblicherweise 2 Banden auf: die eine stellt das glykosylierte (ca. 120kDa), die andere das nicht glykosylierte (ca. 100kDa) dar [55].



Diagr. 1: links: Densitometrische Auswertung des Western-Blots aus Abb. 7 von glykosyliertem P-Cadherin im Verhältnis zur jeweiligen β -Aktin-Bande. **rechts:** Darstellung der Zelllinien zusammen. n=4.

Insgesamt betrachtet ließen sich bei PCI 1 und PCI 68 tendenziell höhere Expressionen von glykosyliertem P-Cadherin gegenüber PCI 9 und PCI 13 feststellen (bei Auftrag der jeweils gleichen Proteinmenge). Dabei stieg die Expression bei einer Sphäroidgröße von 5.000 Z/25µl über 10.000 Z/25µl bis zu einem Maximum bei 20.000 Z/25µl. Bei PCI 1 betrug die Differenz von 5000 zu 20.000 Z/25µl etwa 37% (rel. Proteinkonzentration), bei PCI 68 30%. Die Werte bei 30.000 Z/25µl entsprachen in etwa den Ausgangswerten bei 5000 Z/25µl.

Bei PCI 9 und PCI 13 wurde das Maximum schon bei 10.000 Z/25µl erreicht. Bei 20.000 und 30.000 Z/25µl sank die Expression in etwa linear wieder ab.



Diagr. 2: links: Densitometrische Auswertung des Western-Blots aus Abb. 7 von nicht glykosyliertem P-Cadherin im Verhältnis zur jeweiligen β -Aktin-Bande. **rechts:** Darstellung der Zelllinien zusammen. n=4.

Bei der Expression von nicht glykosyliertem P-Cadherin zeichnete sich ein kongruentes Verhalten von PCI 1 mit PCI 68 und PCI 9 mit PCI 13 ab. Im Überblick nahm die Expression bei allen Zelllinien mit steigender Zellzahl zu, bis zu einem Plateau bei 20.000 Z/25µl.

Während bei PCI 1 und PCI 68 ein Anstieg der Expression bis zu einem Maximum bei 20.000 Z/25 μ l und ein folgender leichter Abfall zu beobachten war, stieg die Expression bei PCI 9 und PCI 13 durchgehend bis zur Sphäroidgröße von 30.000 Z/25 μ l (bei PCI 9 Erreichung eines Plateaus).

Dabei ergaben sich Signifikanzen beim Anstieg der Expression von 5000 Z/25 μ l zu 20.000 Z/25 μ l ($p=0,0391$) und 5000 Z/25 μ l zu 30.000 Z/25 μ l ($p=0,0701$). Sphäroide mit 20.000 Zellen enthielten doppelt bis 3-fach soviel P-cadherin im unglykosyliertem Zustand als Sphäroide mit 5000 Zellen.

4.1.3 Auswirkung von Hypoxie auf P-Cadherin-Expression und Sphäroidgröße

Nach dem Anstieg der P-Cadherin Expression mit Sphäroiden steigender Zellzahl (siehe Punkt 4.1.2), lag die Vermutung nahe, dass dies durch steigende hypoxische Bedingungen im Sphäroidzentrum bedingt war.

In einem weiteren Versuch wurden deshalb Sphäroide mit einer Größe von 5000 Z/25 μ l jeweils 24h und 72h in einem Hypoxie Inkubator (5% CO₂, 2% O₂, Thermo Scientific) kultiviert (Gesamtzeit der Kultivierung 72h). Als Kontrolle dienten Sphäroide, die in Normoxie kultiviert wurden (Inkubator mit 5% CO₂, 5% O₂).

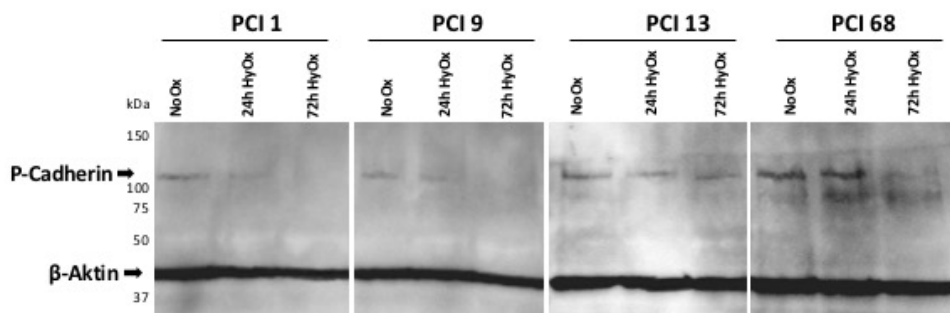
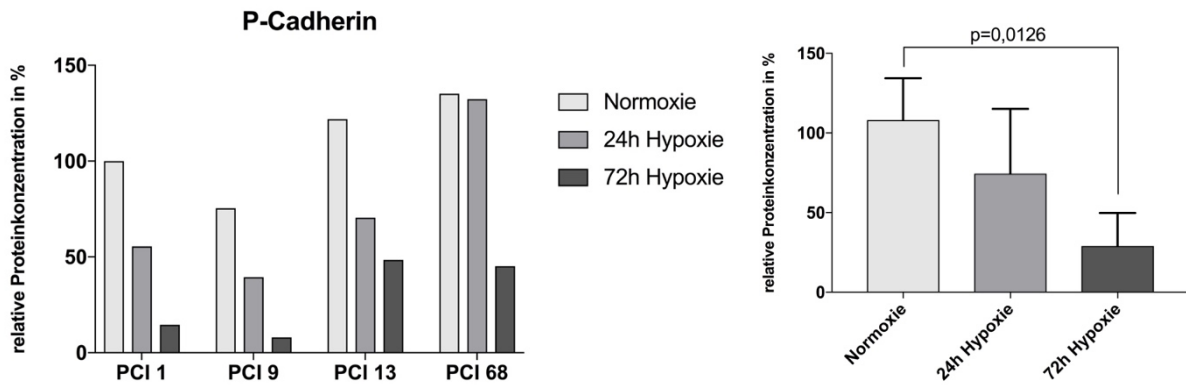


Abb. 8: Western-Blot mit Detektion von P-Cadherin in Lysaten. β -Aktin fungiert als Ladekontrolle. Aufgetragene Proteinmenge 30 μ g. NoOx=Normoxie, HyOx=Hypoxie.



Diagr. 3: links: Densitometrische Auswertung des Western-Blots aus Abb. 8 von P-Cadherin im Verhältnis zur jeweiligen β -Aktin-Bande. rechts: Darstellung der Zelllinien zusammen. n=4.

Entgegen der Erwartungen zeigte sich eine sinkende Expression von P-Cadherin (glykosyliert) mit steigender Hypoxiedauer. Dieser Trend war bei allen vier Zelllinien zu beobachten. Die Abnahme der Expression war dabei nach 72h Hypoxie im Verhältnis zur Normoxie signifikant ($p=0,0126$).

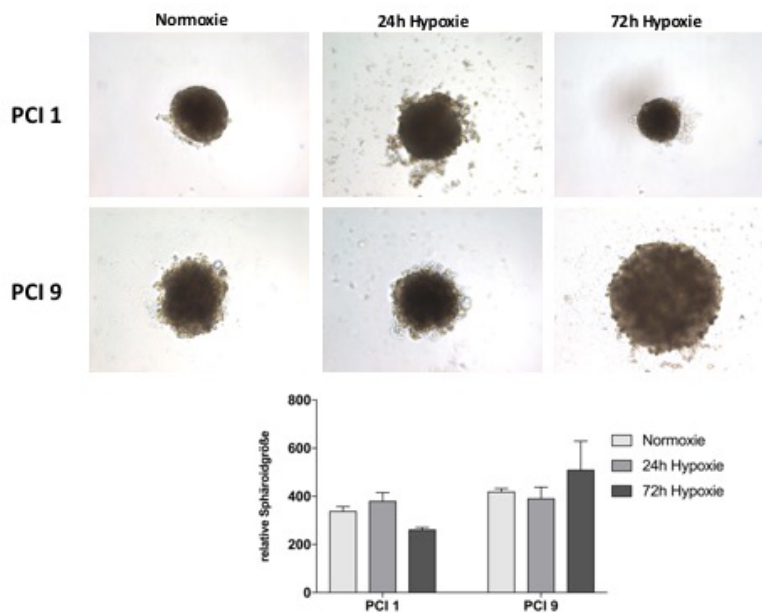


Abb. 9: Vergleich der Sphäroidgrößen von PCI 1 und PCI 9 unter hypoxischen Bedingungen. 10-fache Vergrößerung. Die Messungen wurden jeweils mit 3 Bildern im rechten Winkel durchgeführt. n=6.

Um morphologische Veränderungen der Sphäroide unter Hypoxiebedingungen zu untersuchen wurden exemplarisch die Größen von zwei HNSCC Zelllinien (PCI1 und PCI9) im Vergleich zu Normoxiebedingungen vermessen. Beim Vergleich der Sphäroidgrößen ließen sich Unterschiede zwischen PCI 1 und PCI 9 erkennen. Während bei PCI 1 sich die größten

Sphäroidgrößen nach 24h Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen, die kleinsten nach 72h erfassen ließen, zeigten die Sphäroide bei PCI 9 ein entgegengesetztes Verhalten.

4.1.4 E-Cadherin

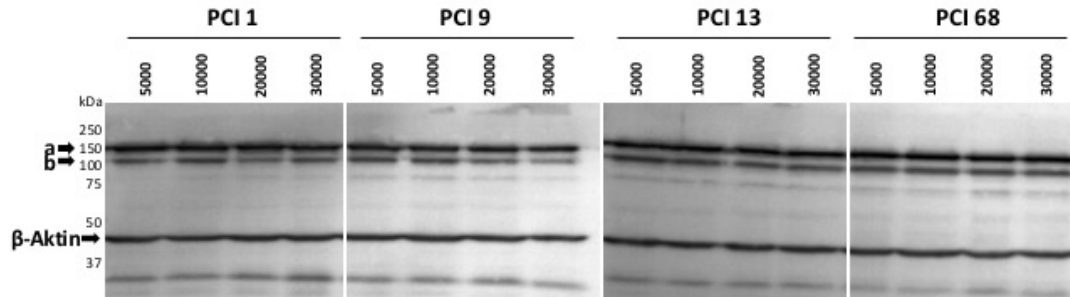
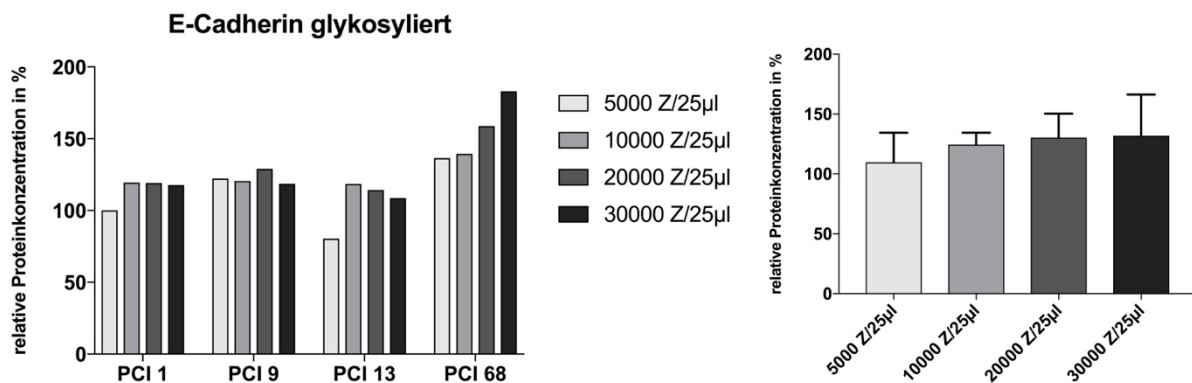


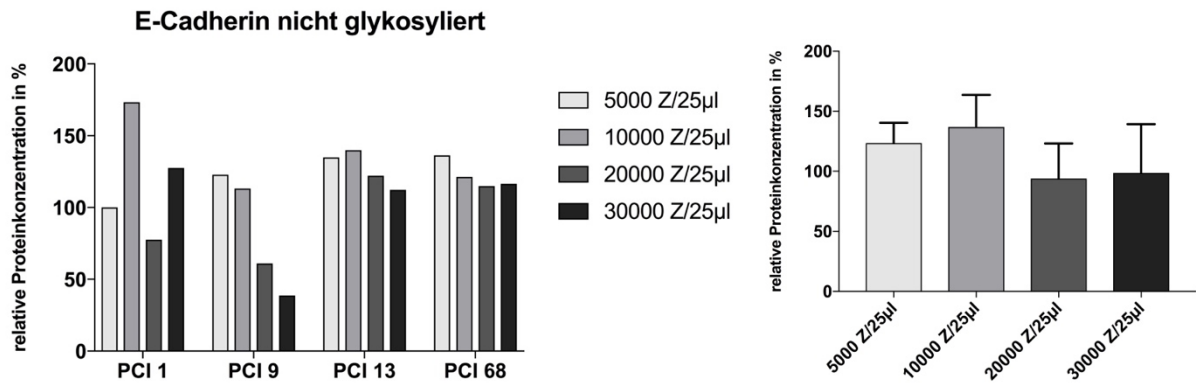
Abb. 10: Western-Blot mit Detektion von E-Cadherin in Lysaten. β -Aktin fungiert als Ladekontrolle. **a** = glykosyliertes E-Cadherin; **b** = nicht glykosyliertes E-Cadherin. Aufgetragene Proteinmenge 30µg.

Auch hier ließ sich eine Expression von E-Cadherin bei allen vier Zelllinien festhalten.



Diagr. 4: *links:* Densitometrische Auswertung des Western-Blots aus Abb. 10 von glykosyliertem E-Cadherin im Verhältnis zur jeweiligen β -Aktin-Bande. *rechts:* Darstellung der Zelllinien zusammen. n=4.

Bei der Expression von glykosyliertem E-Cadherin zeigten sich bei PCI 1, PCI 9 und PCI 13 kaum Unterschiede. Bei PCI 1 und 13 stieg die Expression zunächst an, ehe sie ein Plateau erreichte. Die Expressionen bei PCI 9 waren annähernd gleichbleibend und unabhängig von der Sphäroidgröße. Dagegen konnte bei PCI 68 ein leichter Anstieg beobachtet werden.



Diagr. 5: links: Densitometrische Auswertung des Western-Blots aus Abb. 10 von nicht glykosyliertem E-Cadherin im Verhältnis zur jeweiligen β -Aktin-Bande. rechts: Darstellung der Zelllinien zusammen. n=4.

Während bei PCI 13 und PCI 68 keine wesentlichen Unterschiede erkannt werden konnten, zeigte sich ein Abfall der Expression bei PCI 9 mit steigender Sphäroidgröße. Die Expression von nicht glykosyliertem E-Cadherin war bei PCI 1 bei einer Sphäroidgröße von 10.000 und 30.000 Z/25µl gegenüber den anderen Größen erhöht.

4.1.5 Lokalisation der Cadherine

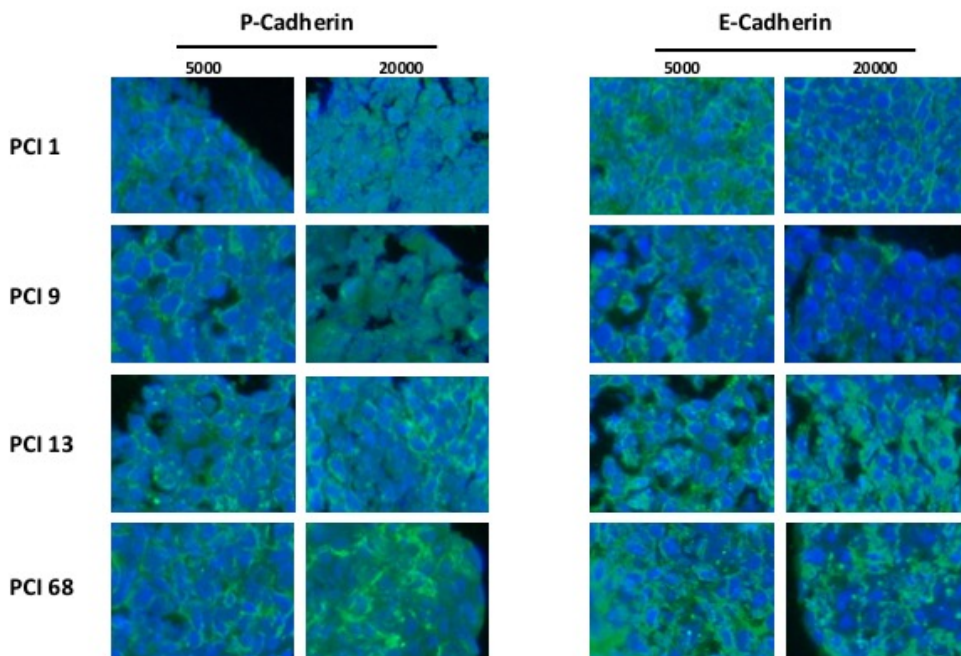


Abb. 11: Immunfluoreszenzfärbung von Sphäroiden mit 5000 und 20.000 Z/25µl der Zelllinien PCI 1, PCI 9, PCI 13 und PCI 68. Detektion von P- und E-Cadherin. 20-fache Vergrößerung 0,322µm/Pixel.

Um die Lokalisation von P- und E-Cadherin in multizellulären HNSCC-Sphäroiden mit steigender Zellzahl festzustellen wurden Paraffin-Mikroarrays mit anschließender immunhistochemischer Färbung hergestellt.

Während sich bei kleinen Sphäroidgrößen die Expression der Cadherine eher in Membrannähe darstellt, zeigte sich bei der Größe von 20.000 Z/25µl eine eher diffusere Verteilung über die gesamten Zellen.

4.1.6 MMP2

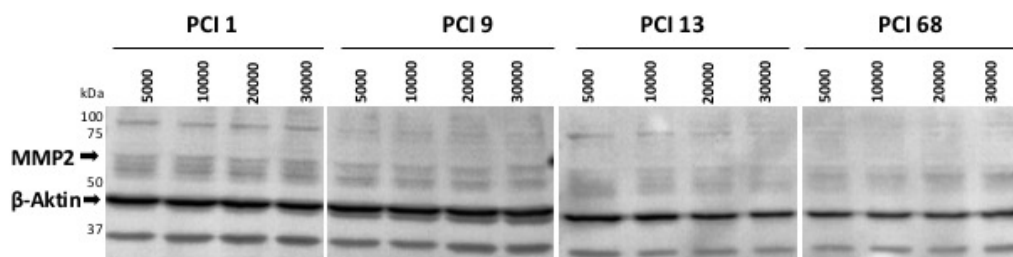
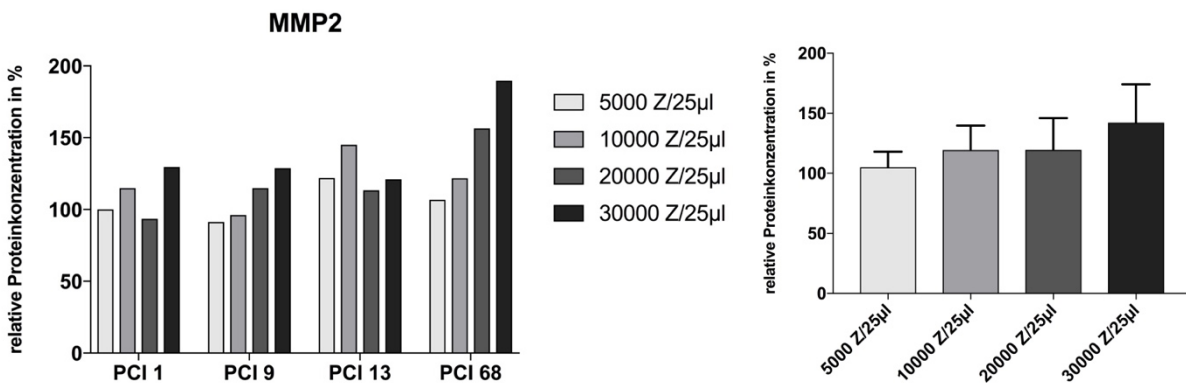


Abb. 12: Western-Blot mit Detektion von MMP2 aus Zelllysaten unter reduzierenden Bedingungen. β -Aktin fungiert als Ladekontrolle. Aufgetragene Proteinmenge 30µg. Die nicht gekennzeichneten Banden entsprechen unspezifischen Banden.

MMP2 wurde von allen Zelllinien exprimiert.



Diagr. 6: links: Densitometrische Auswertung des Western-Blots aus Abb. 12 von MMP2 im Verhältnis zur jeweiligen β -Aktin-Bande. rechts: Darstellung der Zelllinien zusammen. n=4.

Bei PCI 1 und PCI 13 ließ sich kein Zusammenhang der MMP2-Expression mit zunehmender Sphäroidgröße erkennen, während sich bei PCI 9 und PCI 68 dagegen eine leichte bzw. deutlichere Zunahme der Expression bei steigender Sphäroidgröße zeigte.

Zur besseren Darstellung der MMPs wurden neben der Western-Blot-Analyse Zymogramme angefertigt.

4.1.7 MMP9

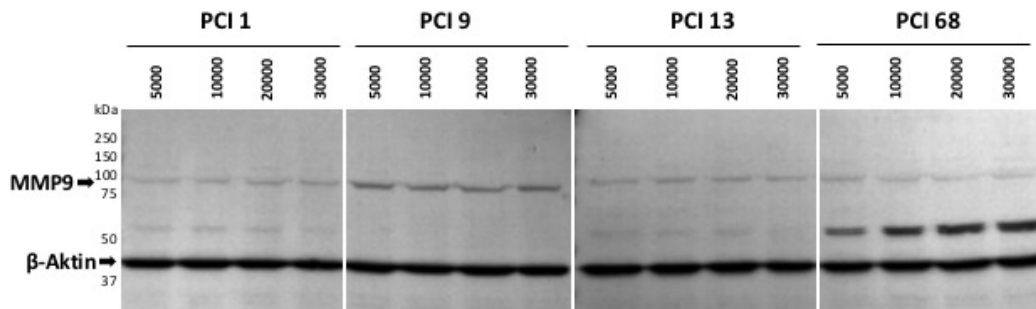
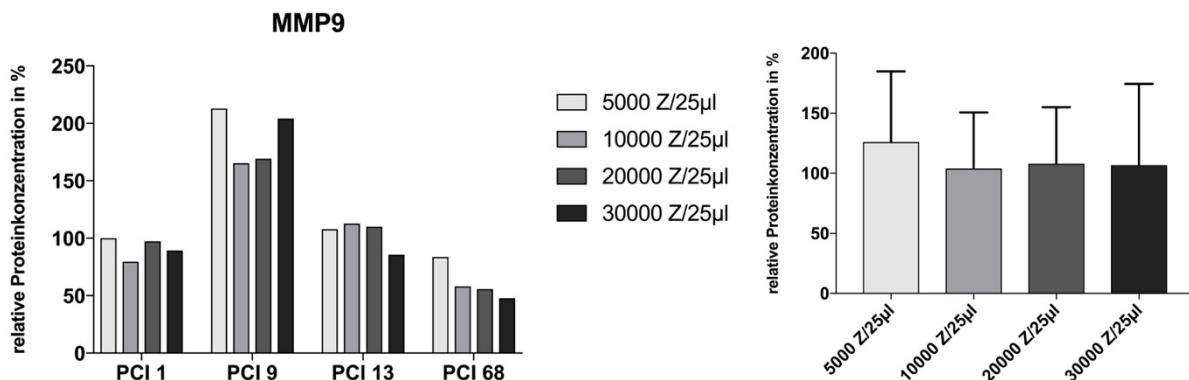


Abb. 13: Western-Blot mit Detektion von MMP9 aus Zelllysaten unter reduzierenden Bedingungen. β-Aktin fungiert als Ladekontrolle. Aufgetragene Proteinmenge 30µg. Die nicht gekennzeichneten Banden entsprechen unspezifischen Banden.

Die Bande bei etwa 50kDa kann mit einer trunkierten Form von MMP9 erklärt werden, die posttranslational prozessiert wurde [106].



Diagr. 7: links: Densitometrische Auswertung des Western-Blots aus Abb. 13 von MMP9 im Verhältnis zur jeweiligen β-Aktin-Bande. rechts: Darstellung der Zelllinien zusammen. n=4.

Insgesamt zeigte sich eine etwa doppelt so hohe Expression von MMP9 bei PCI 9 gegenüber den übrigen Zelllinien, die etwa auf einem Expressionsniveau lagen. Während bei PCI 68 eine kontinuierliche Zunahme von MMP2 bei steigender Sphäroidgröße zu beobachten war, sank die Expression von MMP9 ab. Die übrigen Zelllinien zeigten keine wesentlichen Veränderungen im Verlauf der steigenden Zellzahlen.

Die Darstellung von MMP9 mittels Western-Blot erwies sich als deutlich besser gegenüber MMP2. Dennoch wurden auch hier zu Darstellungszwecken der sezernierten MMPs Zymogramme aus Sphäroidüberständen angefertigt.

4.1.8 Zymographie

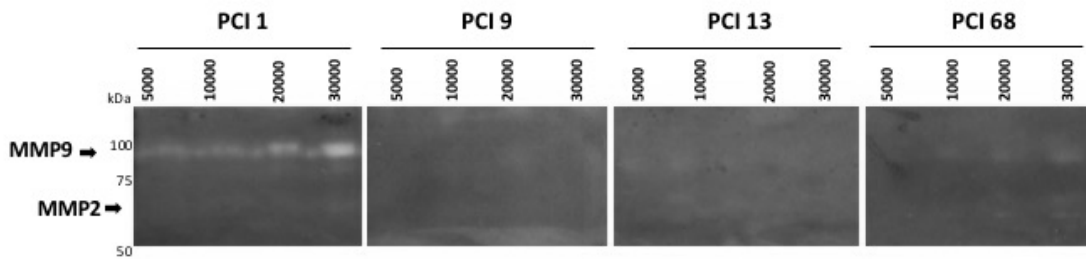


Abb. 14: Zymogramm mit der Detektion von MMP2 und MMP9 aus Sphäroidüberständen. Aufgetragene Proteinmenge 2 μ g.

Insgesamt sind MMP2 und MMP9 in den Überständen der Sphäroide sehr schwach sezerniert. In den Überständen von PCI 9 und PCI 13 beobachtet man nur eine marginale Expression von MMP9 in Sphäroiden mit 5000 Zellen und 10.000 Zellen. In PCI 13 Überständen zeigt sich auch eine schwache MMP2 Expression. Bei PCI 1 und PCI 68 hingegen steigt die Sekretion von MMP9 mit steigender Zellzahl in den Sphäroiden. Dabei stellten sich die Banden bei PCI 1 wesentlich deutlicher dar. Die Sekretion steht hier im Gegensatz zur Expression in den Gesamtzelllysaten in der Western-Blot-Analyse, bei denen sich eine kaum ändernde Expression beobachten ließ.

Eine detektierbare Expression von MMP2 zeigte sich nur bei PCI 68 mit den Sphäroidgrößen von 20.000 und 30.000 Z/25 μ l und marginal bei PCI 1.

4.1.9 PD-L1

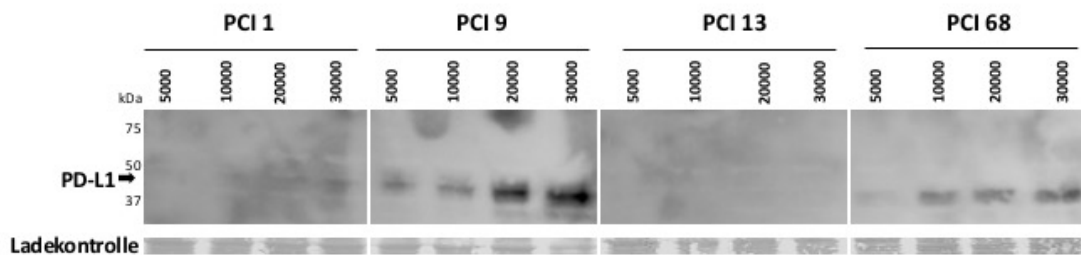
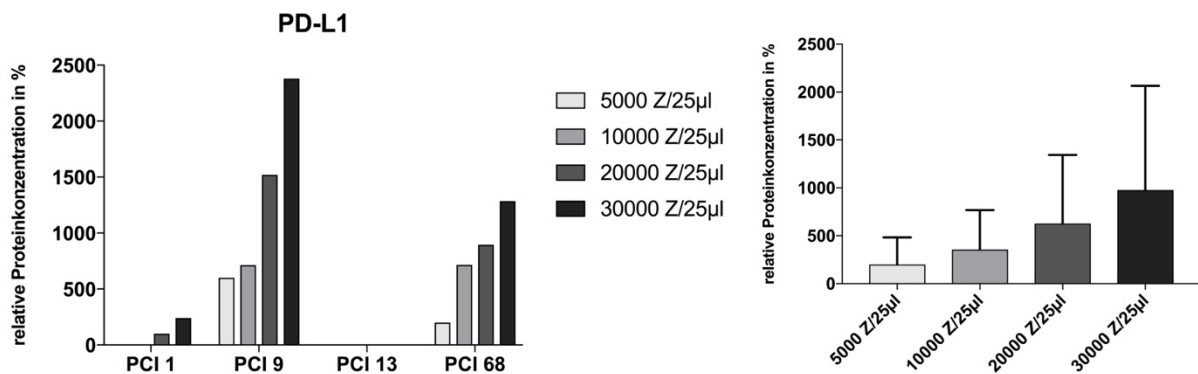


Abb. 15: Western-Blot mit Detektion von PD-L1 aus Zelllysaten. Als Ladekontrolle diente die mit Ponceau-Rot gefärbte PVDF-Membran. Aufgetragene Proteinmenge 30 μ g.

Wie auch bei den vorangehenden Versuchen, wurde zur Darstellung der Expression aus Zelllysaten der Sphäroide Western-Blots angefertigt.

Expressionen von PD-L1 konnten bei den Zelllinien PCI 1, PCI 9 und PCI 68 festgestellt werden. Bei PCI 13 zeigten sich keine erfassbaren Banden.



Diagr. 8: links: Densitometrische Auswertung des Western-Blots aus Abb. 15 von PD-L1 im Verhältnis zur jeweiligen Bande der Ladekontrolle. **rechts:** Darstellung der Zelllinien zusammen. n=3.

Während bei PCI 13 keinerlei Expression von PD-L1 feststellbar war, ließen sich bei den übrigen Zelllinien eine deutliche Korrelation der PD-L1-Expression mit der zunehmenden Sphäroidgröße erkennen. Dabei stiegen die Expressionen mit steigenden Zellzahlen an.

4.2 Expression von tumorassoziierten Proteinen bei HNSCC Sphäroiden mit Stimulierung von α 2- und β 2-adrenergen Rezeptoren

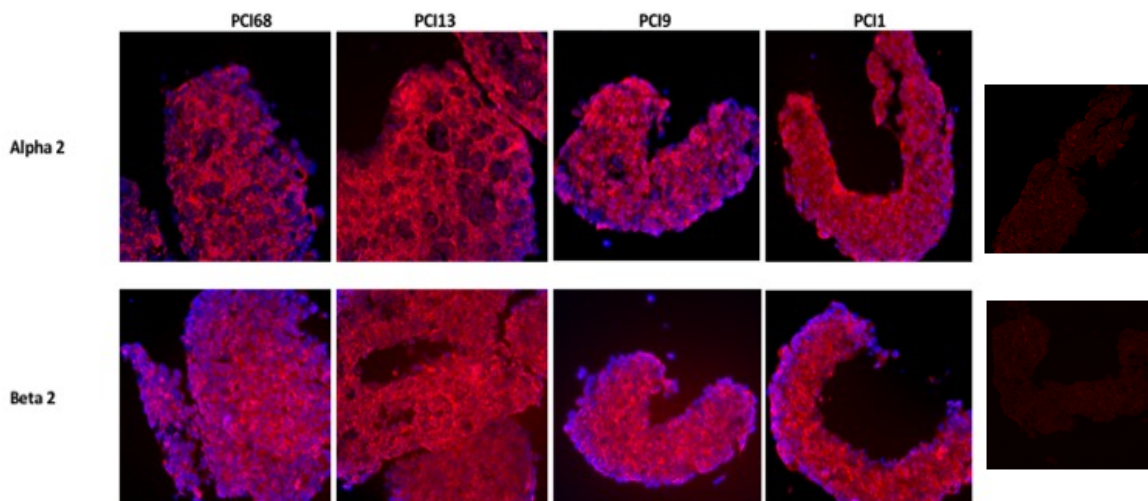


Abb. 16: links: Beweis der Rezeptorexpression der alpha 2- und beta 2-adrenergen Rezeptoren der Zelllinien PCI 1, PCI 9, PCI 13 und PCI 68. IF-Färbungen. 20-fache Vergrößerung 0,322µm/Pixel. **rechts:** Negativkontrolle.

In diesem Teil lag der Fokus auf der Erfassung des Unterschiedes der Expression und Sekretion verschiedener Tumormarker durch die Verwendung von α 2- und β 2-adrenergen Agonisten während des 3-tägigen Wachstums der Tumorsphäroide gleicher Ausgangszellzahl (25.000

Z/25µl). In Zahlreichen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen adrenerger Stimulation und der Tumorprogression nachgewiesen [107-109].

In den folgenden Versuchen wurde als α 2-adrenerger Agonist UK 14.304 (10^{-8} M) und als β 2-adrenerger Agonist Formoterol Hemifumarate (10^{-7} M) verwendet. Diese werden in den Grafiken entsprechend mit *alpha-2* und *beta-2* bezeichnet.

4.2.1 P-Cadherin

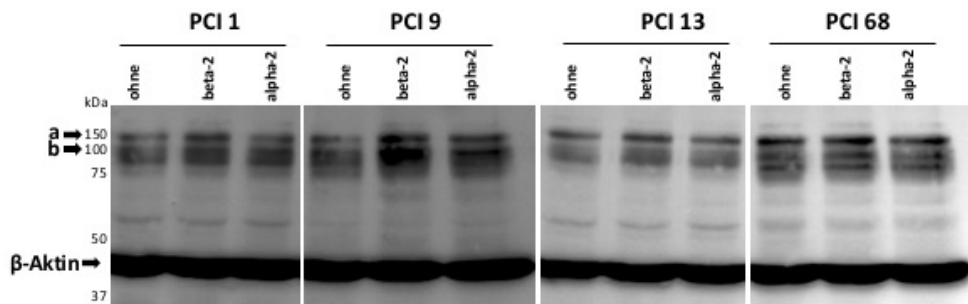
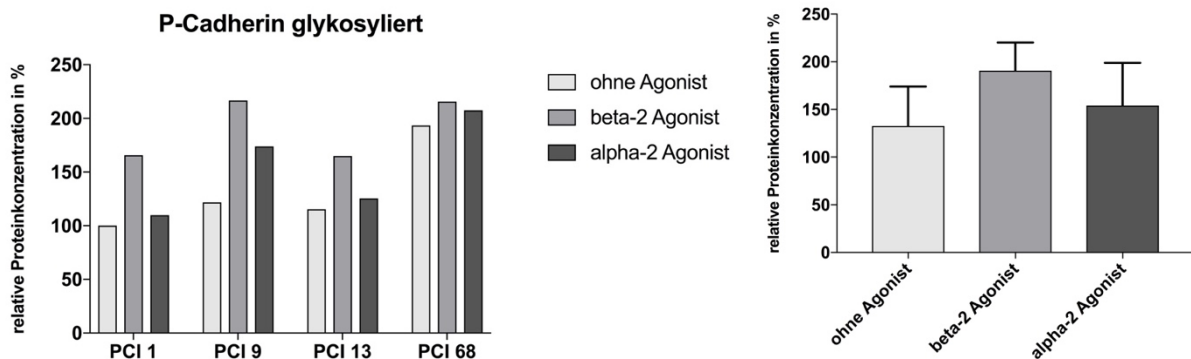
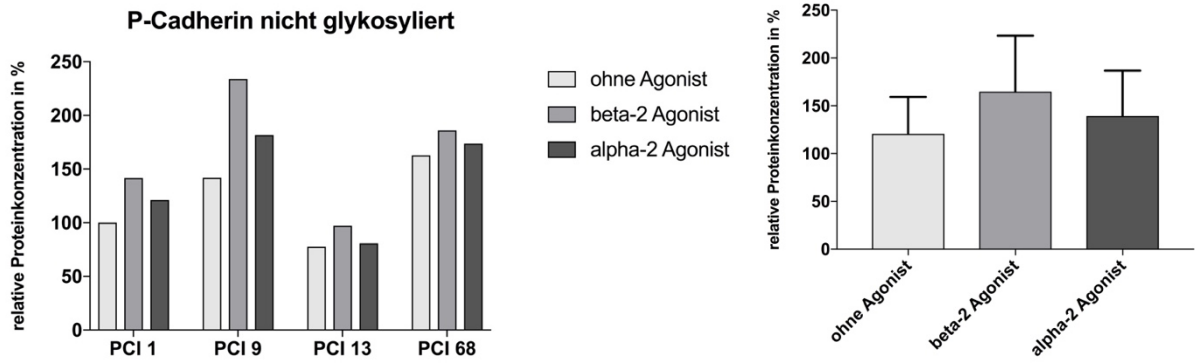


Abb. 17: Western-Blot mit Detektion von P-Cadherin aus Zellysaten. β -Aktin fungiert als Ladekontrolle. **a** = glykosyliertes P-Cadherin; **b** = nicht glykosyliertes P-Cadherin. Aufgetragene Proteinmenge 30µg.



Diagr. 9: links: Densitometrische Auswertung des Western-Blots aus Abb. 17 von glykosyliertem P-Cadherin im Verhältnis zur jeweiligen β -Aktin-Bande. **rechts:** Darstellung der Zelllinien zusammen. n=4.

Generalisiert zeigte sich bei allen Zelllinien ein deutlicher Anstieg der Expression von glykosyliertem P-Cadherin nach Zugabe eines β 2-Agonisten, weniger deutlich nach Zugabe eines α 2-Agonisten. Dabei ergaben die Zelllinien PCI 1, PCI 9 und PCI 13 größere Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Sphäroiden, als bei den Zellen der Linie PCI 68.



Diagr. 10: *links:* Densitometrische Auswertung des Western-Blots aus Abb. 17 von nicht glykosyliertem P-Cadherin im Verhältnis zur jeweiligen β -Aktin-Bande. *rechts:* Darstellung der Zelllinien zusammen. n=4.

Nach adrenerger Stimulation der Sphäroide mit gleichbleibender Zellzahl von 25.000 Zellen zeigte sich keine Diskrepanz zwischen der Expression von glykosyliertem und nicht-glykosyliertem P-Cadherin. Auch hier bedingte ein β 2-Agonist tendenziell einen stärkeren Anstieg der Expression, ein α 2-Agonist einen weniger starken.

4.2.2 E-Cadherin

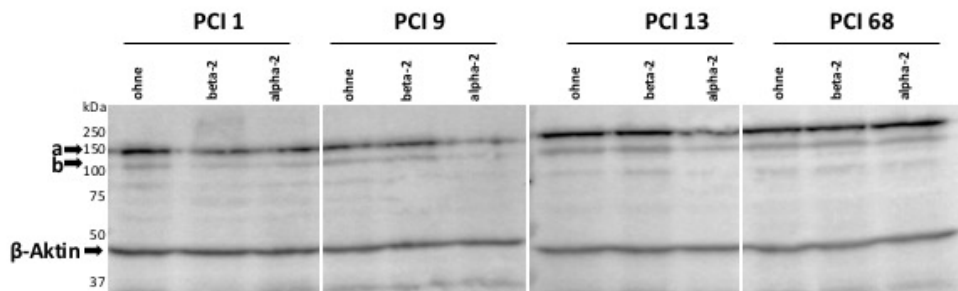
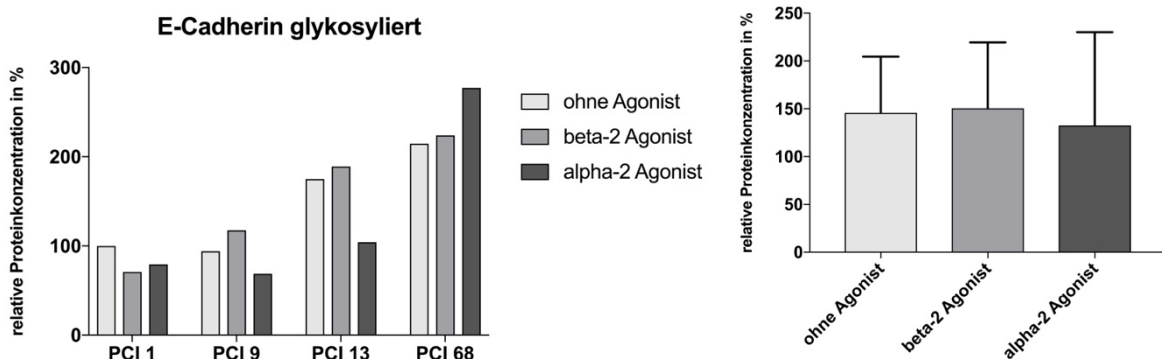
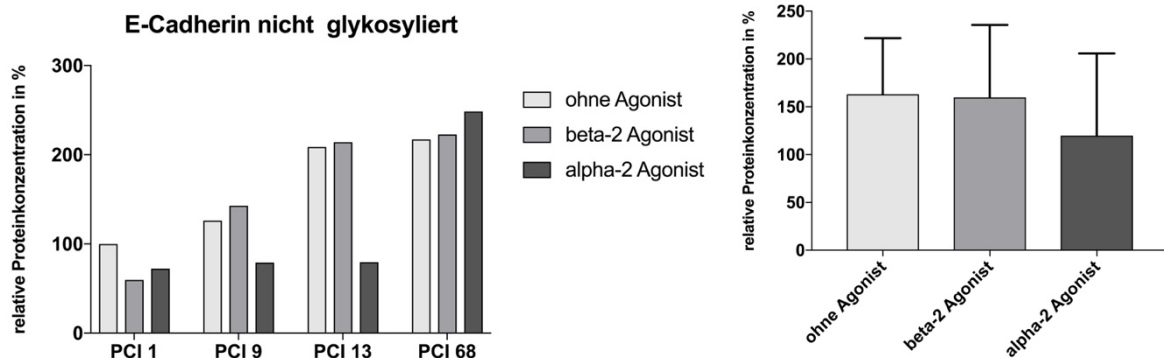


Abb. 18: Western-Blot mit Detektion von E-Cadherin aus Zelllysaten. β -Aktin fungiert als Ladekontrolle. **a** = glykosyliertes E-Cadherin; **b** = nicht glykosyliertes E-Cadherin. Aufgetragene Proteinmenge 30 μ g.



Diagr. 11: *links:* Densitometrische Auswertung des Western-Blots aus Abb. 18 von glykosyliertem E-Cadherin im Verhältnis zur jeweiligen β -Aktin-Bande. *rechts:* Darstellung der Zelllinien zusammen. n=4.

Bei PCI 9 und PCI 13 ließ sich ein Abfall der Expression von glykosyliertem E-Cadherin nach Zugabe eines β 2-Agonisten gegenüber unbehandelten Sphäroiden erkennen. Die Expression bei einer Stimulierung von α 2-Rezeptoren zeigte dagegen keinen erkennbaren Einfluss. Auch bei den Zelllinien PCI 1 und PCI 68 konnte kein direkter Zusammenhang zur Expression von glykosyliertem E-Cadherin nach der Zugabe des α 2-Agonisten hergestellt werden. Durch die Zugabe des β 2-Agonisten ergab sich eine Zunahme der Expression von glykosyliertem E-Cadherin bei PCI 68.



Diagr. 12: *links:* Densitometrische Auswertung des Western-Blots aus Abb. 18 von nicht glykosyliertem E-Cadherin im Verhältnis zur jeweiligen β -Aktin-Bande. *rechts:* Darstellung der Zelllinien zusammen. n=4.

Ähnlich der Expression von P-Cadherin zeigte die relative Expression von nicht glykosyliertem E-Cadherin eine sehr hohe Ähnlichkeit zur Expression von glykosyliertem E-Cadherin.

4.2.3 MMP2

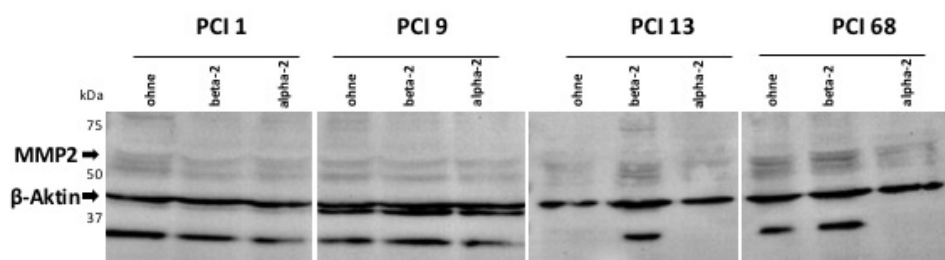
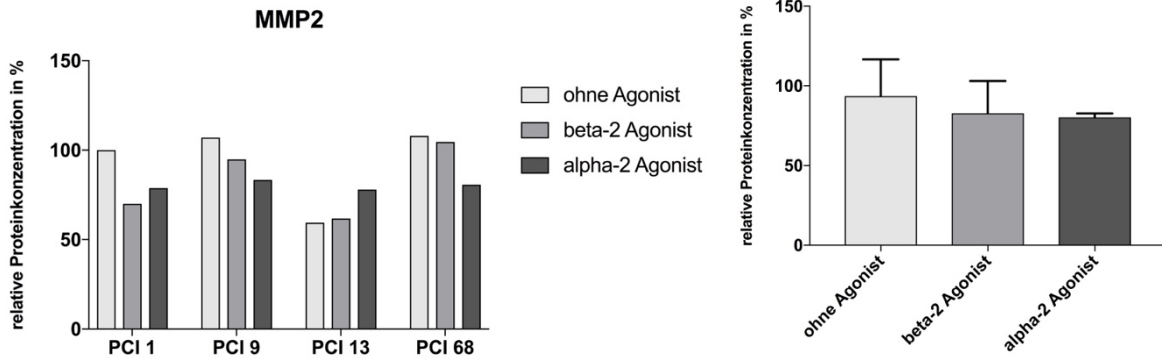


Abb. 19: Western-Blot mit Detektion von MMP2 aus Zelllysaten unter reduzierenden Bedingungen. β -Aktin fungiert als Ladekontrolle. Aufgetragene Proteinmenge 30 μ g. Die nicht gekennzeichneten Banden entsprechen unspezifischen Banden.

Durch das Auftreten vieler Nebenbanden (Spaltprodukte durch weitere MMPs, siehe Punkt 4.1.7) gestaltete sich die densitometrische Auswertung von MMP2 anhand von Western Blots schwierig.



Diagr. 13: *links:* Densitometrische Auswertung des Western-Blots aus Abb. 19 von MMP2 im Verhältnis zur jeweiligen β -Actin-Bande. *rechts:* Darstellung der Zelllinien zusammen. n=4.

Während sich bei PCI 1, PCI 9 und PCI 69 Unterschiede erkennen ließen, lag die Expression von MMP2 bei PCI 13 etwa auf einem Niveau. Dabei zeigte sich jeweils die höchste Expression von MMP2 tendentiell bei den unbehandelten Sphäroiden. Nach Behandlung mit α 2- und β 2-Agonisten sank die Expression dagegen ab.

4.2.4 MMP9

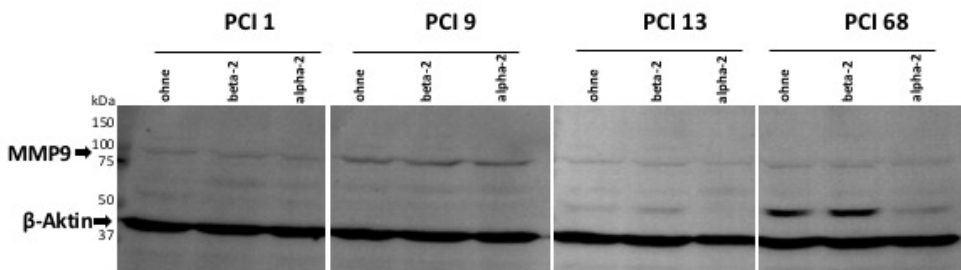
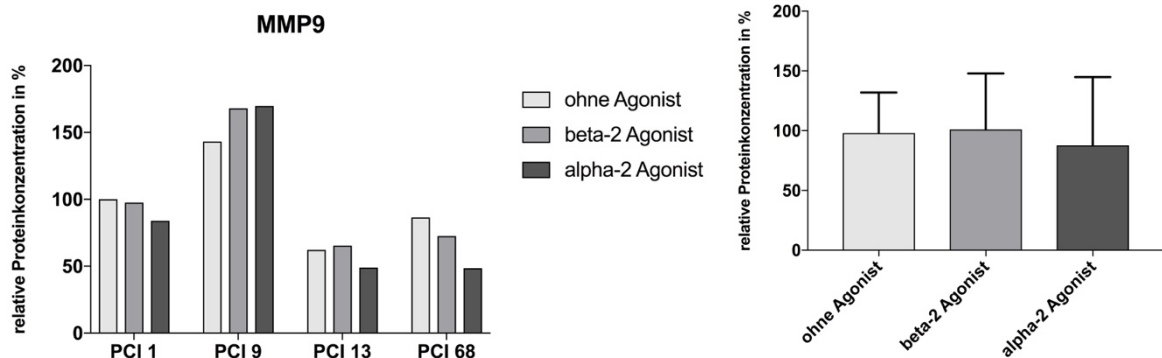


Abb. 20: Western-Blot mit Detektion von MMP2 aus Zelllysaten unter reduzierenden Bedingungen. β -Aktin fungiert als Ladekontrolle. Aufgetragene Proteinmenge 30 μ g. Die nicht gekennzeichneten Banden entsprechen unspezifischen Banden.



Diagr. 14: *links:* Densitometrische Auswertung des Western-Blots aus Abb. 20 von MMP2 im Verhältnis zur jeweiligen β -Actin-Bande. *rechts:* Darstellung der Zelllinien zusammen. n=4.

Bei PCI 1 ließen sich keine Einflüsse von adrenergen Agonisten auf die Expression von MMP9 beobachten. Dagegen stieg die Expression bei PCI 9 nach Behandlung mit α 2- und β 2-adrenergen Agonisten an, bei PCI 68 fiel sie leicht ab. Bei PCI 13 zeigte sich ein minimaler Anstieg bei dem α 2-Agonisten, beim β 2-Agonisten ein leichter Abfall.

4.2.5 Zymogramm von MMP2 und MMP9 nach adrenerger Stimulierung

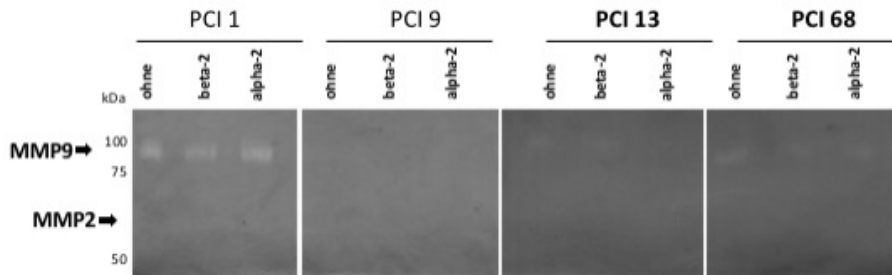


Abb. 21: Zymogramm mit der Detektion vom MMP2 und MMP9 aus Sphäroidüberständen. Aufgetragene Proteinmenge 2 μ g.

Vergleichend zu Punkt 4.1.5 stellten sich Banden von sekretiertem MMP9 nur bei PCI 1 und PCI 68 dar. Hierbei zeigten sich für MMP9 bei PCI 1 kaum erfassbare Unterschiede. Dennoch schien die Expression von MMP9 nach β 2-adrenerger Stimulation verringert. Bei PCI 68 fiel die Expression von nicht behandelten Sphäroiden höher, als die der behandelten aus. Eine Expression von sezerniertem MMP2 war nicht detektierbar.

4.2.6 PD-L1

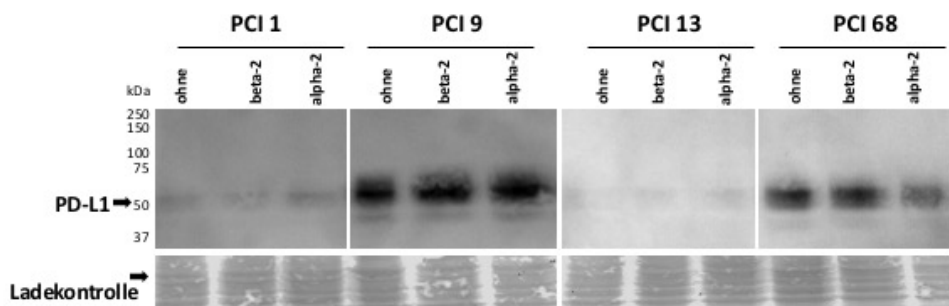
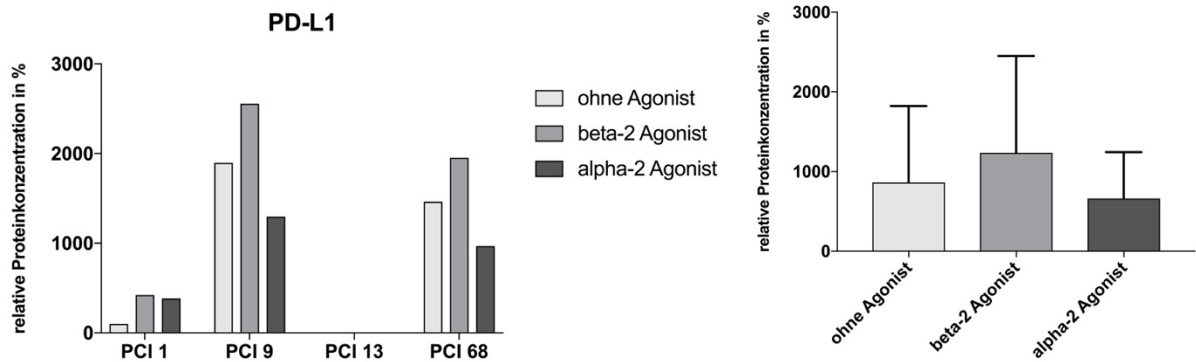


Abb. 22: Western-Blot mit Detektion von PD-L1 aus Zelllysaten. Als Ladekontrolle diente die mit Ponceau-Rot gefärbte PVDF-Membran. Aufgetragene Proteinmenge 30 μ g.



Diagr. 15: *links:* Densitometrische Auswertung des Western-Blots aus Abb. 22 von PD-L1 im Verhältnis zur jeweiligen Bande der Ladekontrolle. *rechts:* Darstellung der Zelllinien zusammen. n=3.

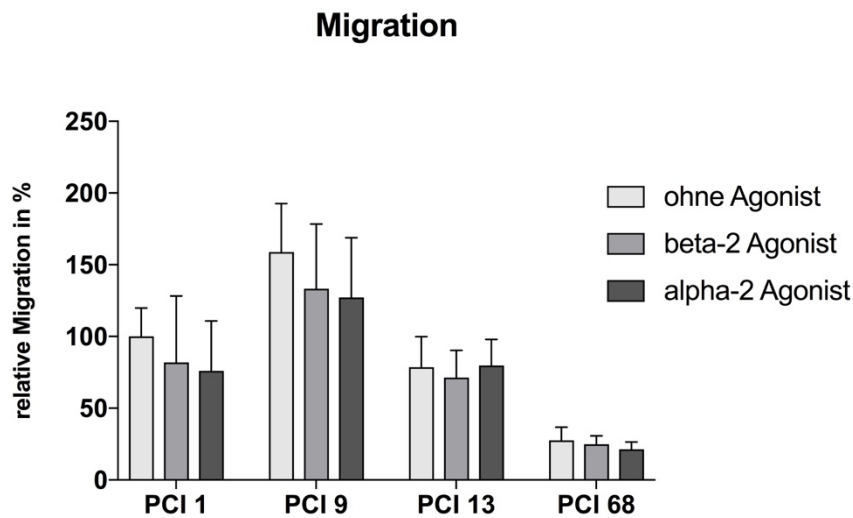
Während sich bei der Zelllinie PCI 13 keine Expression von PD-L1 zeigte (vgl. Punkt 4.1.9), ließ sich bei den übrigen Zelllinien an Anstieg der Expression nach Behandlung mit α 2- und β 2-adrenergen Agonisten festhalten. Bei PCI 1 und PCI 9 war dabei der Anstieg nach Zugabe des β 2-Agonisten etwas stärker gegenüber dem α 2-Agonisten. Bei PCI 68 fiel der Anstieg beim α 2-Agonisten größer aus, während die Expression bei Sphäroiden, die einem β 2-adrenergen Agonisten ausgesetzt waren, unter den Wert der unbehandelten Sphäroide fiel.

4.3 Funktionelle Assays

Zur Untersuchung des Verhaltens der Zelllinien wurden verschiedene funktionelle Assays angefertigt. Der Fokus lag hierbei auf der Invasion, Migration und Proliferation.

Die Versuche wurden mit den oben genannten Zelllinien anhand von 2D-Zellkulturen durchgeführt. Als β 2-adrenerger Agonist wurde Formoterol Hemifumarate mit einer Konzentration von 10^{-7} M verwendet, als α 2-adrenerger Agonist UK 14.304 mit 10^{-8} M.

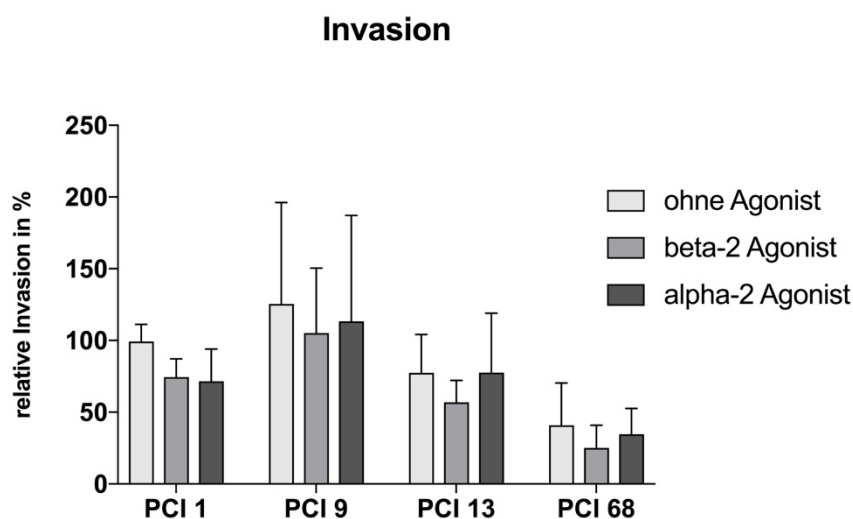
4.3.1 Migration



Diagr. 16: Darstellung der relativen Absorptionswerte in Prozent des Migrationsassays. n=7.

Bei der Migration zeigte sich bei allen vier Zelllinien eine sinkende Tendenz nach Zugabe eines β 2-Agonisten. Dabei zeigten PCI 1 und PCI 9 die deutlichsten Unterschiede mit einer Abnahme von etwa 30% bzw. 20%. Auch nach Zugabe eines α 2-Agonisten zeigte sich selbiges (außer bei PCI 13).

4.3.2 Invasion



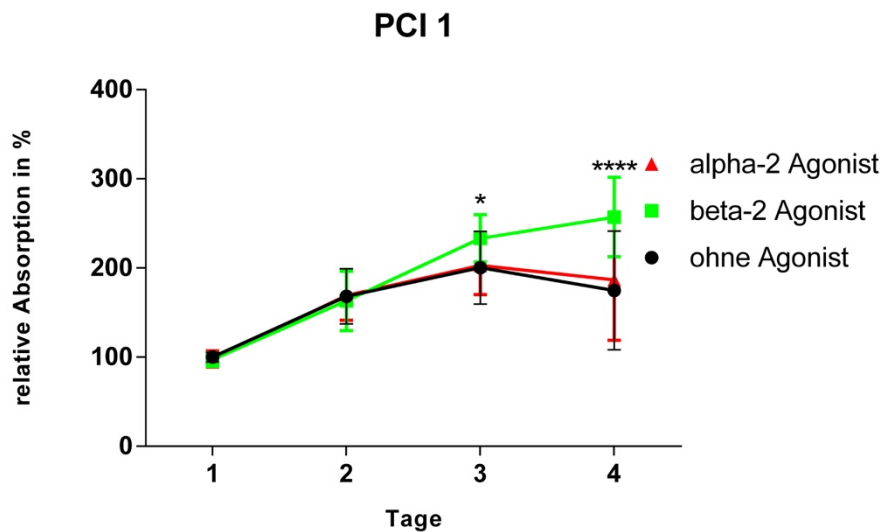
Diagr. 17: Darstellung der relativen Absorptionswerte in Prozent des Invasionsassays mit Matrigel. n=7.

Die Invasivität der OSCC-Zellen nahm nach Zugabe eines β 2-Agonisten im Bezug auf die unbehandelten Zellen generalisiert ab (etwa 20%). Bei PCI 1, PCI 13 und PCI 68 zeigten sich die

mit einem α 2-Agonisten behandelten Zellen invasiver als die mit β 2-Agonisten behandelten Zellen. Dennoch lag die Invasivität unter dem Niveau der unbehandelten Zellen.

4.3.3 Proliferation

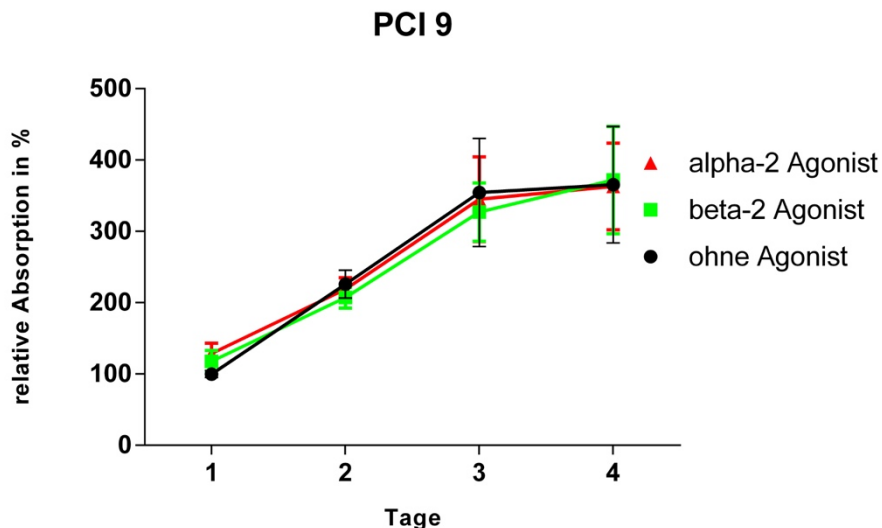
Zur Feststellung der Proliferation über vier Tage wurden WST-Proliferationsassays der vier Zelllinien angefertigt.



Diagr. 18: Auswertung des WST-Proliferationsassays von PCI 1. Die Messpunkte entsprechen 2h nach WST-Zugabe. n=14.

Während sich an den ersten beiden Tagen zwischen den unbehandelten und behandelten Zellen keine Unterschiede erkennen ließen, zeichnete sich ab dem dritten Tag eine deutliche Stimulierung der Proliferation durch den β 2-Agonisten ab (etwa 40%). Dabei ergaben sich Signifikanzen am dritten (* $p=0,0435$) und vierten Tag (**** $p\leq 0,0001$) gegenüber den nicht stimulierten Zellen. Die unbehandelten und mit dem α 2-Agonisten behandelten Zellen verhielten sich identisch. Ihre Proliferation fiel ab dem dritten Tag ab.

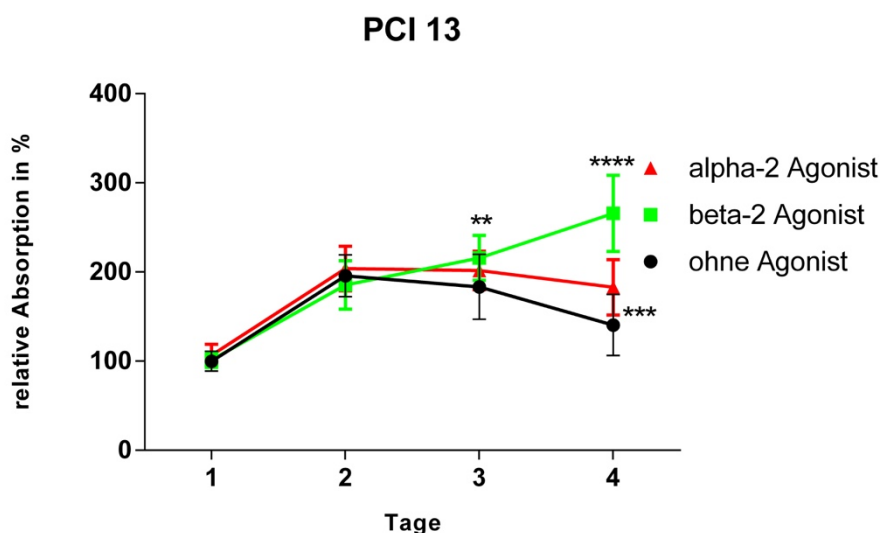
Die Verdopplungszeit (Messpunkte Tag 1 – Tag 3) der unbehandelten Zellen betrug 71,79h, mit dem β 2-Agonist 54,04h und dem α 2-Agonist 68,52h.



Diagr. 19: Auswertung des WST-Proliferationsassays von PCI 9. Die Messpunkte entsprechen 2h nach WST-Zugabe. n=14.

Bei PCI 9 zeichneten sich keine Einflüsse der adrenergen Agonisten im Vergleich zu den unbehandelten Zellen ab.

Die Verdopplungszeit (Messpunkte Tag 1 – Tag 3) der unbehandelten Zellen betrug 39,44h, mit dem β 2-Agonist 48,85h und dem α 2-Agonist 50,59h.

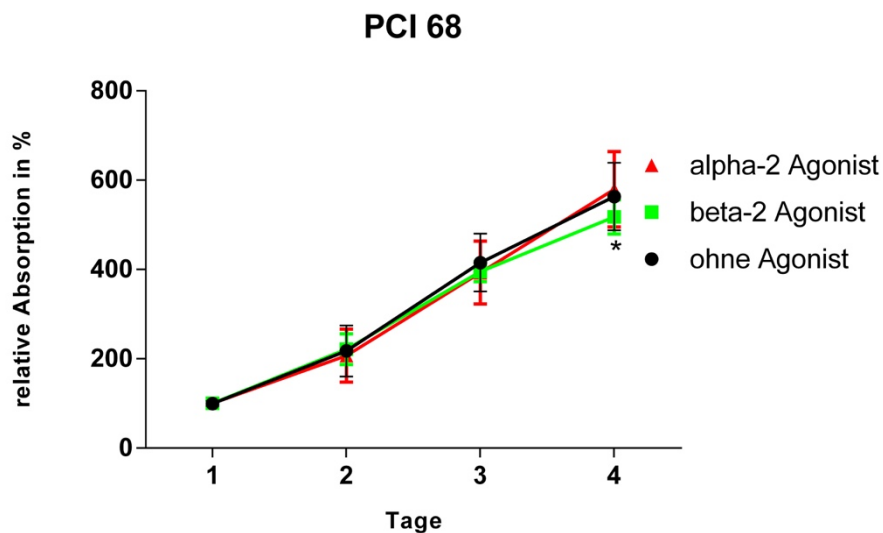


Diagr. 20: Auswertung des WST-Proliferationsassays von PCI 13. Die Messpunkte entsprechen 2h nach WST-Zugabe. n=14.

Die Zellen der Linie PCI 13 proliferierten an den ersten beiden Tagen in gleicher Weise, unabhängig von adrenerger Stimulation. Nach dem zweiten Tag erreichte die Proliferation der

unbehandelten und der mit einem α 2-Agonisten stimulierten Zellen zunächst ein Plateau, während sie ab dem dritten Tag abfiel. Am vierten Tag war dabei der Unterschied (ohne Behandlung und alpha-2 Stimulierung) signifikant (** $p \leq 0,0001$). Dabei lag die Proliferation der mit einem α 2-Agonisten behandelten Zellen jedoch höher. Bei der Stimulation der Zellen mit einem β 2-Agonisten ließ sich über alle vier Tage eine etwa gleichbleibende Proliferationstendenz ohne Abfall erkennen. Dabei ergaben sich Signifikanzen am dritten (** $p=0,0034$) und vierten Tag (***) gegenüber den unbehandelten Zellen.

Die Verdopplungszeit (Messpunkte Tag 1 – Tag 3) der unbehandelten Zellen betrug 82,58h, mit dem β 2-Agonist 63,02h und dem α 2-Agonist 78,59h.



Diagr. 21: Auswertung des WST-Proliferationsassays von PCI 68. Die Messpunkte entsprechen 2h nach WST-Zugabe. n=14.

Bei PCI 68 ließen sich keine wesentlichen Unterschiede bei der Proliferation durch die adrenerge Stimulierung erkennen. Nach β 2-adrenerger Stimulierung war am vierten Tag der Unterschied zu den unbehandelten Zellen signifikant (* $p=0,0392$).

Die Verdopplungszeit (Messpunkte Tag 1 – Tag 3) der unbehandelten Zellen betrug 35,04h, mit dem β 2-Agonist 36,33h und dem α 2-Agonist 36,51h.

Zusammenfassend verhielten sich die Zelllinien PCI 1 / PCI 13 und PCI 9 / PCI 68 ähnlich. Dabei zeigten PCI 9 und PCI 68 keine Einflüsse auf die Proliferation durch adrenerge Stimulierung, während sich bei PCI 1 und PCI 13 ein signifikanter Unterschied nach β 2-adrenerger

Stimulierung erkennen ließ. So hielt die Proliferation nach 2 Tagen kontinuierlich an, die der unbehandelten und mit einem $\alpha 2$ -adrenergen Agonisten stimulierten Zellen fiel ab.

5. Diskussion

Plattenepithelkarzinome sind eine der häufigsten Tumoren im Kopf- und Halsbereich [110]. Im Rahmen dieser Arbeit stand die Charakterisierung von vier HNSCC-Zelllinien hinsichtlich ihrer Expression von verschiedenen tumorassoziierten Proteinen und ihrem Verhalten nach Variation der Zellzahl und adrenerger Stimulation im Vordergrund.

Dabei wurde die Expression bestimmter tumorassoziiertes Proteine anhand eines 3D-Sphäroidmodells von HNSCC-Zelllinien in Abhängigkeit steigender Zellzahlen charakterisiert. Im Mittelpunkt standen dabei Cadherine, die eine fundamentale Rolle bei der Integrität des Tumors sowie dessen Metastasierungspotential spielen, die Matrix-Metalloproteinasen 2 und 9, denen durch ihre Überexpression im Tumorgewebe eine wachstums- und invasionsfördernde Wirkung zugeschrieben wird sowie mit PD-L1 ein Protein, das dem Tumor spezielle Charakteristika verleiht, durch das er Angriffen des Immunsystems entgehen kann [93, 111, 112].

Im zweiten Teil dieser Studie wurde die Expression oben genannter tumorassoziierte Proteine nach α 2- und β 2-adrenerger Stimulation untersucht. Außerdem wurde dabei das Migrations-, Invasions- und Proliferationspotential anhand gesonderter Versuche dargestellt. Nach adrenerger Stimulation konnte eine Wirkung auf die Adhäsion, Invasion, Migration und allgemein auf die Tumorprogression aufgezeigt werden [113].

Die Ergebnisse dieser Arbeit dienen als Grundlage und genaue Charakterisierung der vier HNSCC-Zelllinien PCI1, PCI 9, PCI 13 und PCI 68 mit jeweils unterschiedlicher Lokalisation des Primärtumors und Differenzierung für darauf aufbauende Versuche.

5.1 Expression tumorassoziiertes Proteine bei der Tumorprogression

Zunächst wurden Sphäroide unterschiedlicher Zellzahl hinsichtlich ihrer Expression an tumorassoziierten Proteinen einerseits mit Zelllysaten in Western-Blot-Analysen, andererseits mit Hilfe der Zymographie aus Sphäroidüberständen untersucht. Dabei standen die Proteine N-, P- und E-Cadherin, sowie MMP2, MMP9 und PD-L1 im Mittelpunkt.

Hierbei ließen sich bei den Typ 1 Cadherinen (N-, P- und E-Cadherin) im Rahmen dieser Versuche Gemeinsamkeiten hinsichtlich steigender Zellzahlen, d.h. fortschreitendem Tumorwachstum erkennen. N-Cadherin wurde nur von den HNSCC Zelllinien PCI 1 und PCI 13 exprimiert. Dabei stieg die Expression mit steigender Zellzahl an. Gleiches Verhalten zeigten alle vier Zelllinien auch bei P-Cadherin, während die Expression von E-Cadherin nahezu konstant blieb. Bei P- und E-Cadherin muss jedoch zwischen einer glykosylierten und einer nicht glykosylierten Form unterschieden werden. Für P-Cadherin treten jeweils eine von Shimoyama et al. beschriebene Bande bei 120 kDa (Volllänge P-Cadherin) und eine von Bauer et al. beschriebene, deglykosylierte Form bei 100 kDa auf [55, 114]. Zunächst decken sich die Expressionen von P-Cadherin mit denen von Bauer et al. vorangegangenen Untersuchungen (hierbei wurden die Zelllinien PCI 1, PCI 13 und PCI 68 verwendet) [115]. Während sich zunächst bei P-Cadherin ein nahezu kongruentes Verhalten der glykosylierten und nicht glykosylierten Form zeigte (Zunahme mit steigender Zellzahl bis 20.000 Z/25µl, danach Abfall) und dabei eine signifikante Zunahme der Expression der nicht glykosylierten Form, fiel dagegen bei E-Cadherin auf, dass mit steigender Zellzahl die Diskrepanz zwischen glykosylierter und unglykosylierter Form größer wurde. Dabei zeigte die Expression von glykosyliertem E-Cadherin kaum Veränderung. Ursache hierfür könnte eine gesteigerte Aktivität von Glykosidasen bei der Tumorprogression sein. Die nahezu gleichbleibende Expression von E-Cadherin (sowohl der glykosylierten, als auch der nicht glykosylierten Form) steht dabei also im Gegensatz zur steigenden P-Cadherin-Expression (glykosylierte und nicht glykosylierte Form). Die anfängliche Zunahme und Abfall der P-Cadherin-Expression und die nahezu gleichbleibende E-Cadherin Expression kann mit der fortschreitenden Differenzierung erklärt werden [116]. Üblicherweise geht eine Tumorprogression mit einem Verlust von E-Cadherin einher. Jedoch zeigt ein Teil der HNSCC durchweg gleiche E-Cadherin Expression, wie auch im Rahmen dieser Arbeit beobachtet [117-119]. Zahlreiche Studien weisen eine Veränderung von Cadherin-abhängigen Zellfunktionen durch eine Glykosylierung nach [120]. Dabei spielt vor allem die N-Glykosylierung von E-Cadherinen an EC 4 und EC 5 eine entscheidende Rolle zur Ausbildung stabiler Zell-Zell-Verbindungen. Nita-Lazar et al. zeigten bei A253 Krebszellen eine durch Deglykosylierung verminderte N-Glykosylierung von E-Cadherin und dadurch verbesserte interzelluläre Verbindungen. Dabei konnte sogar eine Rückführung zu einem epithelialen Phänotyp der Zellen erreicht werden [117, 121].

Zusätzlich wurde P-Cadherin aufgrund des zellzahl-abhängigen Abfalls der Expression nach 20.000 Z/25µl hinsichtlich einwirkender Hypoxie untersucht. Dabei stellte sich eine Abnahme der P-Cadherin Expression mit längerer Inkubation unter hypoxischen Bedingungen heraus. Daraus lässt sich schließen, dass die vermehrte Expression nicht glykosylierten P-cadherins nicht ein Resultat von Hypoxie ist, sondern durch andere Faktoren bedingt wird. Es gibt in der Literatur Hinweise darauf, dass Sphäroide mit hohen Zellzahlen - also größer werdenden zentralen Hypoxiebedingungen, wie in unserem Experiment gezeigt - schon mit dem Abbau von P-Cadherin beginnen. In gleicher Weise zeigten Sahlgren et al. eine Abnahme der Expression von E-Cadherin in Brustkrebszellen unter hypoxischen Bedingungen [122]. Dabei wird auch der Epithelial-mesenchymalen-Transition Vorschub geleistet [123]. Grund dafür könnten die erhöhte Expression spezifischer Proteasen unter Hypoxiebedingungen sein, welche Zelloberflächenproteine verdauen. Auch hinsichtlich morphologischer Veränderungen von Sphäroiden unter Hypoxiebedingungen zeigten sich Unterschiede: Dabei stellte sich die Zelllinie PCI 9 als weniger beeinflussbar gegenüber Hypoxie als PCI 1 dar. Das könnte auch mit der unterschiedlichen Lage und Differenzierung des Primärtumors erklärt werden.

Bei der Lokalisation von E- und P-Cadherin innerhalb der Zellen ließen sich Unterschiede erkennen. Bei kleinen Zellzahlen konnten die Cadherine vorwiegend in Membrannähe erkannt werden, während sich bei größeren Zellzahlen eine diffusere Verteilung in den Zellen zeigte. Gleiche Ergebnisse lassen sich auch in unterschiedlichen Veröffentlichungen finden. Dabei geht man auch, mit Verlust der Membranständigkeit der Proteine, von einer schlechteren Prognose für den Patienten aus. [55, 124, 125].

Für die Erfassung der Expression der Gelatinasen MMP2 und MMP9 wurden einerseits Western-Blots aus Zelllysaten und andererseits Zymogramme aus Sphäroidkulturüberständen angefertigt, um die sezernierten MMPs zu erfassen.

Betrachtet man zunächst die Western-Blot Analysen, die mit Hilfe von Zelllysaten angefertigt wurden, ist auffällig, dass sich die Expression weder von MMP2 noch von MMP9 maßgeblich im Verlauf steigender Zellzahlen verändert. Die einzigen Unterschiede innerhalb der vier Zelllinien ergeben sich mit einer tendenziell steigenden Expression für MMP2 bei PCI 9 und PCI 68, während die Expression bei PCI 1 und PCI 9 als gleichbleibend erscheint. Erklärt werden könnte das mit der gleichen Herkunft (Zunge) der Primärtumoren von PCI 9 und PCI 68. Auch bei der Expression von MMP9 gibt es nur marginale Unterschiede unter den Zelllinien. Hierbei

wird MMP9 von PCI 9 deutlich stärker exprimiert im Vergleich mit den übrigen Zelllinien. Nur bei PCI 68 ließ sich ein leichter Abfall der MMP9-Expression mit steigenden Zellzahlen feststellen. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zur Erfassung der sezernierten MMPs. Während eine Sezernierung von MMP2 in 3D Zellkultur mit der aufgetragenen Proteinmenge von 2µg im Überstand nur marginal bei PCI 13 nachgewiesen werden konnte, zeigten v.a. die Zelllinien PCI 1 und PCI 68 eine deutliche Korrelation von sezerniertem MMP9 mit steigender Zellzahl. Dabei stieg die Menge an nachweisbarem MMP9 kongruent mit der Zellzahl an. Zunächst kann festgehalten werden, dass sich insgesamt die höchste Expression an MMP2 bei PCI 68 feststellen ließ. Erklärt werden könnte das durch den höchsten Differenzierungsgrad und deckt sich mit einer Studie von Lawal et al. in der die Expression von MMP2 und MMP8 mit Hilfe von immunhistochemischer Analyse bei verschiedenen OSCC Tumoren untersucht wurde [66]. Gegenläufig war in dieser Arbeit die Expression von MMP9. Hierbei zeigte PCI9 nicht mit dem höchsten Differenzierungsgrad die höchste Expression, wie in einer anderen Studie (Analyse wiederum durch immunhistochemische Methoden) gezeigt [126]. Andisheh-Tadbir et al. konnten in einer klinischen Studie einen Zusammenhang zwischen dem klinischen Status und der Lymphknotenmetastasierung mit der steigenden Expression von MMP9 herstellen. Hierbei wurden Daten (Immunhistochemie) von insgesamt 42 OSCC Patienten und 15 Patienten mit gesundem Epithel untersucht [127]. Für PCI 1 und PCI 68, die beiden Zelllinien ohne Lymphknoteninvasion, trifft diese Erkenntnis auch auf die Ergebnisse dieser Arbeit zu. Für diese beiden Zelllinien konnte die niedrigste Expression von MMP9 in der Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden. Nanda et al. zeigten in einer Studie mit der Hilfe der Zymographie eine Korrelation von MMP9 und dem T-Status des Tumors. MMP2 konnte in dieser Studie mit OSCC-Patienten durch Zymographie nicht nachgewiesen werden [128]. Für PCI 68 treffen diese Erkenntnisse zu. Bei PCI 1 kann man somit von einem aggressiven Typ ausgehen. Durch Werner et al. konnte eine Verbindung von einer MMP9 Überexpression zu einem invasiven Phänotyp und einem gesteigerten Metastasierungspotential hergestellt werden [129]. Die ansteigende Expression von MMP9 könnte auch in Zusammenhang mit steigender Hypoxie stehen. Liu et al. konnten derartiges anhand von Knochenmarksstammzellen beobachten [130].

Zur Analyse der Expression von PD-L1 wurden wie in den vorangegangenen Versuchen Western-Blot-Analysen aus Zelllysaten hergestellt.

Eine Basalexpression von PD-L1, ohne Stimulation, zeigte sich bei drei der vier HNSCC-Zelllinien (PCI 1, PCI 9 und PCI 68). Dabei fiel eine Korrelation der Expression mit steigender Zellzahl der Sphäroide auf. Diese Beobachtung ließ sich bei allen drei Zelllinien gleichermaßen festhalten. Keine Basalexpression fand sich bei der Zelllinie PCI 13, welche die am niedrigsten differenzierte Linie darstellt. Die höchsten Expressionen zeigten dabei die Zelllinien PCI 9 und PCI 68.

Hirai et al. zeigten in einer Studie anhand von drei unterschiedlich differenzierten Zelllinien, dass die Expression von PD-L1 maßgeblich mit dem Differenzierungsgrad korreliert. Dabei konnte festgehalten werden, dass besser differenzierte Tumorzellen eine höhere Expression an PD-L1 besitzen [131]. Selbiges konnte auch im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Zahlreiche Studien konnten auch nachweisen, dass eine Blockade des PD-L1 / PD-1 Signalwegs das Tumorstadium reduzieren und das allgemeine Überleben der Patienten verbessern kann [132-134]. Durch diese Annahme ist davon auszugehen, dass durch die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete steigende Expression von PD-L1 im Verlauf der Tumorstadium, dem Tumorstadium, Metastasierung und einer verschlechterten Prognose zuträglich ist.

Die Zunahme der PD-L1 Expression bei steigenden Zellzahlen könnte mit größer werdenden hypoxischen Bedingungen innerhalb der Sphäroide erklärt werden. Diesen Sachverhalt konnten Noman et al. anhand einer Studie mit MDSC-Zellen (myloid-derived suppressor cells) unter hypoxischen Bedingungen zeigen [135].

5.2 Der Effekt von α 2- und β 2-adrenergen Agonisten auf die Expression tumorassoziierter Proteine und auf das Verhalten bezüglich Migration, Invasion und Proliferation

Nach Entschladen et al. besitzen Neurotransmitter ähnliche Funktionen wie Chemokine bei der Metastasierung von Krebserkrankungen [136]. Die Katecholamine Adrenalin (Bindung an α 2- und β 2-adrenerge Rezeptoren) und Noradrenalin (Bindung an α 2-adrenerge Rezeptoren) zeigten dabei eine fördernde Wirkung für die Karzinogenese und Tumorstadium [137-139]. Bei OSCC lässt sich eine hohe Rate einer Metastasierung in lokale Lymphknoten beobachten. Shang et al. zeigten eine höhere Expression von β 2-adrenergen Rezeptoren bei OSCC gegenüber gesunder Mukosa. Außerdem wies die Expression von β 2-adrenergen

Rezeptoren in OSCC-Geweben eine signifikante Verbindung zu Lymphknotenmetastasierung auf [102].

Im Rahmen dieser Studie wurde nun die Expression der gleichen tumorassoziierten Proteine aus dem ersten Teil hinsichtlich der α 2- und β 2-adrenergen Stimulierung untersucht. Als α 2-adrenerger Agonist wurde hierfür UK14.304 mit einer Konzentration von 10^{-8} M und als β 2-adrenerger Agonist Formoterol Hemifumarate in einer Konzentration von 10^{-7} M verwendet. Die Analyse erfolgte analog zum ersten Teil mittels Western-Blot und Zymographie. Außerdem wurde der Einfluss der adrenergen Stimulation hinsichtlich der Migration, Invasion und Proliferation ausgewertet.

Bei den Typ 1 Cadherinen P- und E-Cadherin ließ sich jeweils das gleiche Verhalten der glykosylierten und unglykosylierten Form beobachten. Dabei zeigte P-Cadherin eine tendenziell verstärkte Expression beider Varianten nach Zugabe des β 2-adrenergen Agonisten, während die Expression nach Zugabe des α 2-adrenergen Agonisten nur leicht erhöht bzw. auf demselben Level der unbehandelten Sphäroide erschien. Die Expression von E-Cadherin wies kleinere Unterschiede auf. Insgesamt zeigte sich keine wesentliche Veränderung der Expression nach Zugabe des β 2-adrenergen Agonisten. Auffällig erschien nur die Zelllinie PCI 1, bei der eine deutliche Erniedrigung festzustellen war. Die Expression von E-Cadherin nach Zugabe des α 2-adrenergen Agonisten lag bei PCI 1, PCI 9 und PCI 13 niedriger, als die der unbehandelten Sphäroide. Nur bei PCI 68 konnte ein leichter Anstieg der Expression verzeichnet werden.

Insgesamt zeigte sich tendenziell eine Steigerung der P-Cadherin Expression nach Zugabe eines β 2-adrenergen Agonisten und ein leichter Rückgang der Expression von E-Cadherin nach Zugabe eines α 2-adrenergen Agonisten.

Barbieri et al. zeigten anhand einer Studie an Mäusen, denen DU145-Zellen (Prostatakrebszellen) transplantiert wurden, eine Reduktion und eine Dislokation von E-Cadherin von der Zellmembran in das Zytoplasma nach Stimulierung der Zellen mit Noradrenalin [140]. Auch Shan et al. beschrieben in einer ähnlichen Studie anhand von zwei verschiedenen Zelllinien, die aus einem Adenokarzinom des Magens isoliert wurden, eine signifikante Verringerung der E-Cadherin Expression nach Behandlung mit Noradrenalin. Dahinter wird die regulatorische Achse β 2-AR-HIF-1 α -Snail vermutet, die nach Stimulation zu

einer sinkenden E-Cadherin-Expression und einer gleichzeitig steigenden Vimentin-Expression führt [141].

Über die Auswirkungen von adrenerger Stimulation ist noch nichts Wesentliches bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit deutete sich jedoch an, dass die Expression von P-Cadherin v.a. nach β 2-adrenerger Stimulation ansteigt. Dennoch korreliert zunächst eine steigende P-Cadherin-Expression mit einer voranschreitenden Tumorprogression, während sie später wieder abfällt [55]. Daher kann in Verbindung mit der Wirkung auf die E-Cadherin-Expression von einem fördernden Einfluss der adrenergen Stimulation auf die Tumorprogression ausgegangen werden.

Insgesamt stellte sich die Expression von MMP2 bei den Western-Blot-Analysen aus Zelllysaten sowohl nach α 2-adrenerger, als auch nach β 2-adrenerger Stimulation als verringert dar. Nur die Zelllinie PCI 13 zeigte ein gegenläufiges Verhalten. Hier lag die Expression nach Stimulation leicht höher.

Bei MMP9 zeigten sich weniger deutliche Unterschiede. Während bei PCI 1 und PCI 68 die Expression abfiel, stieg sie bei PCI 9 an.

Bei der Analyse der sezernierten MMPs konnten dennoch Unterschiede für PCI 1 und PCI 9 bei MMP9 aufgezeigt werden. Die Expression schien dabei nach β 2-adrenerger Stimulation verringert.

Zahlreiche Studien konnten allgemein zeigen, dass die MMP2 und MMP9 Expression durch adrenerge Rezeptoren moduliert wird [142]. Ito et al. und Ooi et al. zeigten eine gesteigerte MMP9 Expression durch den α 2-adrenergen Agonisten Brimonidine in konjunktivalen Zellen bei Ratten und humanen Ziliarmuskelzellen. Die MMP2 Expression der Konjunktivazellen von Ratten wurde dadurch jedoch nicht beeinflusst [143, 144]. In einigen Studien wurde auch der Einfluss von β 2-adrenerger Stimulation auf die MMP Expression beobachtet. Der β 2-adrenerge Agonist Salbutamol begründete eine Zunahme der MMP9 Expression bei Patienten mit einem akuten respiratorischen Distresssyndrom in bronchoalveolärer Flüssigkeit und distalen Epithelzellen der Lunge [145]. Auch durch Formoterol (β 2-adrenerger Agonist) konnten ähnliche Ergebnisse bei einer pulmonalen Entzündung im Rattenmodell beobachtet werden [146].

Auch bei Krebszellen können derartige Beobachtungen gemacht werden. Yang et al. zeigten in einer Studie anhand dreier Zelllinien, die aus Nasopharyngealkarzinomen gewonnen wurden, eine Zunahme der Sekretion von MMP2 und MMP9 adrenerger Stimulation durch

Noradrenalin. Die Zunahme war dabei dosisabhängig [147]. Selbiges zeigten auch Barbieri et al. bei DU145 (Prostatakrebs) Zellen nach Behandlung mit Noradrenalin [140].

Im Allgemeinen stehen die Ergebnisse dieser Arbeit dazu im Gegensatz. Hierbei wurden sowohl für MMP2, als auch für MMP9 erniedrigte bzw. gleichbleibende Expressionswerte nach adrenerger Stimulation beobachtet. Ausnahmen hiervon sind die MMP2 Expression nach α 2-adrenerger Stimulation der Zelllinie PCI 13 und die MMP9 Expression der Zelllinie PCI 9 nach α 2- und β 2-adrenerger Stimulation.

In der hier durchgeführten Studie konnte eine Korrelation der PD-L1 Expression mit adrenerger Stimulation gezeigt werden. Während bei der Zelllinie PCI 13 keine Expression von PD-L1 beobachtet werden konnte, zeigten die anderen drei Zelllinien eine Zunahme der PD-L1 Expression nach β 2-adrenerger Stimulation. Während PCI 1 auch nach α 2-adrenerger Stimulation eine Zunahme aufwies, sank sie dagegen bei PCI 9 und PCI 68 unter den Wert der unbehandelten Sphäroide.

Über die Wirkung adrenerger Stimulation auf die PD-L1 Expression ist bisher noch wenig bekannt. Dennoch zeigten Wang et al. anhand von Pankreaskarzinomzellen einen direkten Effekt von Noradrenalin auf die Expression von B7-H1 (PD-L1 Homolog). Durch steigende Noradrenalkonzentrationen wurde dabei B7-H1 signifikant hochreguliert. Ausgelöst wurde dies hauptsächlich durch die Stimulation der β 2-adrenergen Rezeptoren [148].

Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte das gezeigt werden. Durch die β 2-adrenerge Stimulation stieg die Expression von PD-L1 tendenziell an.

Insgesamt betrachtet, zeigten die in dieser Studie verwendeten vier HNSCC Zelllinien nach α 2- und β 2-adrenerger Stimulation, sowohl eine verringerte Migrations-, als auch eine verminderte Invasionstendenz. Dabei nahm die Migrationsfähigkeit (außer PCI 13) nach Zugabe eines α 2-Agonisten am deutlichsten ab. Dennoch wies die β 2-adrenerge Stimulation auch eine generalisierte Abnahme auf. Für den β 2-Agonisten zeigte sich bei der Invasion selbiges. Dabei lag jedoch die Invasionstendenz nach Zugabe des α 2-Agonisten stets höher gegenüber dem β 2-Agonisten.

Vor allem β -adrenerge Rezeptoren besitzen eine hohe Expression bei OSCC und eine damit einhergehende Korrelation mit der zervikalen Lymphknotenmetastasierung, Tumorgöße und klinischem Status [149]. Verschiedene Studien zeigen - entgegen der Ergebnisse dieser Arbeit - den direkten fördernden Einfluss von Neurotransmittern auf die Migration und Invasion von

Krebszellen [137, 138, 150, 151]. Unter anderem zeigten Barbieri et al. eine signifikant erhöhte Migrationsaktivität an DU145-Zellen (Prostatakarzinomzellen) in Mäusen durch eine β 2-Stimulation mit Noradrenalin [140]. Auch Huang et al. zeigten anhand von Pankreaskarzinomzellen den fördernden Einfluss auf die Migration, Invasion und Proliferation durch die Aktivierung des p38 MAPK Signalwegs [152].

Während im Rahmen dieser Arbeit keine derartigen Effekte auf die Migration und Invasion beobachtet werden konnten, zeigte die Proliferation Ergebnisse, die sich mit diesen Studien decken.

Bei der Proliferation konnten für die Zelllinien PCI 9 und PCI 68 keine Unterschiede ohne und mit adrenerger Stimulation beobachtet werden. Dagegen zeigten die Linien PCI 1 und PCI 13 signifikante Unterschiede im Bezug auf die unbehandelten Zellen. Die Proliferationstendenz nach Zugabe des β 2-adrenergen Agonisten wies jeweils ab dem dritten Tag eine signifikante Steigerung gegenüber den unbehandelten Zellen auf. Nach Zugabe des α 2-Agonisten ließen sich keine derartigen Beobachtungen machen, wenngleich es eine signifikante Erhöhung bei PCI 13 am vierten Tag gegenüber den unbehandelten Zellen gab.

Zahlreiche Studien brachten ähnliche Ergebnisse hervor. Liu et al. legten anhand von Zellen eines ösophagealen Plattenepithelkarzinoms eine signifikant erhöhte Proliferationstendenz nach Zugabe von Adrenalin und der damit verbundenen adrenergen Stimulierung dar [153]. Auch Barbieri et al. zeigten gleiche Ergebnisse. Dabei erhöhte Noradrenalin die Proliferation von DU145-Krebszellen [140].

6. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression verschiedener tumorassoziierter Proteine im Sphäroidmodell (3D-Zellkultur) untersucht. Einerseits wurde dabei die Expression in Abhängigkeit steigender Zellzahlen der Sphäroide und andererseits der Einfluss von α 2- und β 2-adrenergen Agonisten bei Sphäroiden gleicher Zellzahl (25.000 Z/25 μ l) darauf sowie deren funktionelles Verhalten bei Invasion, Migration und Proliferation dargelegt. Der Fokus lag auf den Proteinen N-, P- und E-Cadherin, MMP2 und MMP9 und PD-L1, die eine Rolle bei der Tumorprogression spielen. Gegenstand der Versuche waren dabei die vier HNSCC-Zelllinien PCI 1, PCI 9, PCI 13 und PCI 68, die mit Hilfe von Western-Blot-Analysen, Zymographie, Immunhistochemie und mit den oben genannten funktionellen Assays analysiert wurden.

Während sich im ersten Teil der Versuche bei den Cadherinen für P-Cadherin eine ansteigende Expression mit steigender Zellzahl (bis 20.000 Z/25 μ l) und danach ein leichter Abfall (sowohl für die glykosylierte, als auch die nicht glykosylierte Form) zeigte, konnten bei E-Cadherin kaum Veränderungen beobachtet werden. Hierbei konnte auch eine Verringerung der Expression von P-Cadherin unter hypoxischen Bedingungen nachgewiesen werden. Eine Expression für N-Cadherin zeigte sich nur bei zwei der vier Zelllinien. Bei der Expression der MMPs offenbarten sich Unterschiede zwischen der Western-Blot-Analyse (Zelllysate) und der Zymographie (Sphäroidüberstände). Bei MMP2 zeichnete sich in den Western-Blots ein leichter Anstieg der Expression mit steigender Zellzahl ab, bei MMP9 traten kaum Veränderungen auf. Bei der Zymographie dagegen konnte in den beiden Zelllinien PCI 1 und PCI 68 eine steigende MMP9 Sekretion mit steigender Zellzahl beobachtet werden. Eine deutliche Korrelation der Sphäroidgröße (Zellzahl) konnte für PD-L1 nachgewiesen werden. Die Expression stieg mit steigender Zellzahl an.

Im zweiten Teil der Arbeit stellte sich eine Zunahme der P-Cadherin Expression (sowohl der glykosylierten, als auch der nicht glykosylierten Form) nach Zugabe des β 2-adrenergen Agonisten (Formoterol Hemifumarate) heraus. Weniger stark erschien die Zunahme der P-Cadherin Expression nach Zugabe des α 2-adrenergen Agonisten (UK 14.304). Bei E-Cadherin traten weniger deutliche Veränderungen der Expression auf. Bei drei der vier Zelllinien verringerte sich die E-Cadherin Expression nach Zugabe des α 2-adrenergen Agonisten. Nach Zugabe des β 2-adrenergen Agonisten zeigten sich nur marginale Veränderungen. Während die Expression von MMP2 nach der Zugabe beider Agonisten verringert erschien, wies

dagegen MMP9 insgesamt nur eine leichte Veränderung nach Zugabe des α 2-adrenergen Agonisten auf. Für PD-L1 ließ sich eine Steigerung der Expression nach Zugabe des β 2-adrenergen Agonisten erkennen, nach Zugabe des α 2-adrenergen Agonisten sank die Expression insgesamt ab.

Nach Zugabe der beiden Agonisten, wiesen die Zellen jeweils verringerte Fähigkeit zur Migration und Invasion auf.

Bei der Proliferation manifestierte sich bei zwei der vier Zelllinien eine deutliche Steigerung nach Zugabe des β 2-adrenergen Agonisten gegenüber den unbehandelten und mit dem α 2-adrenergen Agonisten behandelten Zellen.

7. Literaturverzeichnis

1. Stewart, B. and C.P. Wild, *World cancer report 2014*. World, 2016.
2. Kaatsch, P., et al., *Krebs in Deutschland 2011/2012*. 2015, Robert Koch-Institut.
3. Argiris, A., et al., *Head and neck cancer*. Lancet, 2008. **371**: p. 1695-709.
4. Warnakulasuriya, S., *Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer*. Oral oncology, 2009. **45**(4): p. 309-316.
5. Barnes, L., *Pathology and genetics of head and neck tumours*. 2005: IARC.
6. Feller, L. and J. Lemmer, *Oral squamous cell carcinoma: Epidemiology, clinical presentation and treatment*. 2012.
7. Gillison, M.L., *Current topics in the epidemiology of oral cavity and oropharyngeal cancers*. Head & neck, 2007. **29**(8): p. 779-792.
8. Torre, L.A., et al., *Global cancer statistics, 2012*. CA Cancer J Clin, 2015. **65**(2): p. 87-108.
9. Chandolia, B., S.K. Basu, and M. Kumar, *Can MMP-9 be a Prognosticator Marker for Oral Squamous Cell Carcinoma?* J Clin Diagn Res, 2016. **10**(1): p. Zc09-13.
10. Böcker, W., H. Denk, and P.U. Heitz, *Pathologie*. 2008: Elsevier, Urban und Fischer.
11. Tanaka, T. and R. Ishigamori, *Understanding carcinogenesis for fighting oral cancer*. Journal of oncology, 2011. **2011**.
12. Blot, W.J., et al., *Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer*. Cancer Res, 1988. **48**(11): p. 3282-7.
13. Turati, F., et al., *A meta-analysis of alcohol drinking and oral and pharyngeal cancers: results from subgroup analyses*. Alcohol and alcoholism, 2013. **48**(1): p. 107-118.
14. Hashibe, M., et al., *Evidence for an important role of alcohol-and aldehyde-metabolizing genes in cancers of the upper aerodigestive tract*. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 2006. **15**(4): p. 696-703.
15. Chi, A.C., T.A. Day, and B.W. Neville, *Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma--an update*. CA Cancer J Clin, 2015. **65**(5): p. 401-21.
16. Warnakulasuriya, S., *Areca nut use following migration and its consequences*. Addict Biol, 2002. **7**(1): p. 127-32.
17. D'Souza, G., et al., *Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer*. N Engl J Med, 2007. **356**(19): p. 1944-56.
18. Münger, K. and P.M. Howley, *Human papillomavirus immortalization and transformation functions*. Virus research, 2002. **89**(2): p. 213-228.
19. Licitra, L., et al., *High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma*. Journal of Clinical Oncology, 2006. **24**(36): p. 5630-5636.
20. Suárez, C., et al., *Tumours of familial origin in the head and neck*. Oral oncology, 2006. **42**(10): p. 965-978.
21. Foulkes, W.D., et al., *Familial risks of squamous cell carcinoma of the head and neck: retrospective case-control study*. Bmj, 1996. **313**(7059): p. 716-21.

22. Marur, S. and A.A. Forastiere. *Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment*. in *Mayo Clinic Proceedings*. 2008. Elsevier.
23. Petridou, E., et al., *The role of diet and specific micronutrients in the etiology of oral carcinoma*. *Cancer*, 2002. **94**(11): p. 2981-8.
24. Pavia, M., et al., *Association between fruit and vegetable consumption and oral cancer: a meta-analysis of observational studies*. *The American journal of clinical nutrition*, 2006. **83**(5): p. 1126-1134.
25. Warnakulasuriya, S., N. Johnson, and I. Van der Waal, *Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa*. *Journal of oral pathology & medicine*, 2007. **36**(10): p. 575-580.
26. van der Waal, I., *Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management*. *Oral Oncol*, 2009. **45**(4-5): p. 317-23.
27. Schwenzer, N. and M. Ehrenfeld, *Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie*. 2010: Georg Thieme Verlag.
28. Perez-Ordóñez, B., M. Beauchemin, and R. Jordan, *Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck*. *Journal of clinical pathology*, 2006. **59**(5): p. 445-453.
29. Hardisson, D., *Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma*. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2003. **260**(9): p. 502-8.
30. Haddad, R.I. and D.M. Shin, *Recent advances in head and neck cancer*. *New England Journal of Medicine*, 2008. **359**(11): p. 1143-1154.
31. Forastiere, A., et al., *Head and neck cancer*. *N Engl J Med*, 2001. **345**(26): p. 1890-900.
32. Rothenberg, S.M. and L.W. Ellisen, *The molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma*. *J Clin Invest*, 2012. **122**(6): p. 1951-7.
33. Poeta, M.L., et al., *TP53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck*. *New England Journal of Medicine*, 2007. **357**(25): p. 2552-2561.
34. Crowe, D.L., et al., *Molecular pathology of head and neck cancer*. *Histol Histopathol*, 2002. **17**(3): p. 909-14.
35. Marur, S., et al., *HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic*. *Lancet Oncol*, 2010. **11**(8): p. 781-9.
36. Mannarini, L., et al., *Human Papilloma Virus (HPV) in head and neck region: review of literature*. *Acta Otorhinolaryngol Ital*, 2009. **29**(3): p. 119-26.
37. Shapiro, L. and W.I. Weis, *Structure and biochemistry of cadherins and catenins*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009. **1**(3): p. a003053.
38. Halbleib, J.M. and W.J. Nelson, *Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis*. *Genes Dev*, 2006. **20**(23): p. 3199-214.
39. Hajra, K.M. and E.R. Fearon, *Cadherin and catenin alterations in human cancer*. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 2002. **34**(3): p. 255-268.
40. Pokutta, S. and W.I. Weis, *Structure and mechanism of cadherins and catenins in cell-cell contacts*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2007. **23**: p. 237-61.

41. Angst, B.D., C. Marcozzi, and A.I. Magee, *The cadherin superfamily: diversity in form and function*. Journal of cell science, 2001. **114**(4): p. 629-641.
42. Basu, R., M.R. Taylor, and M.E. Williams, *The classic cadherins in synaptic specificity*. Cell Adh Migr, 2015. **9**(3): p. 193-201.
43. Yagi, T. and M. Takeichi, *Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity*. Genes & development, 2000. **14**(10): p. 1169-1180.
44. Wheelock, M.J. and K.R. Johnson, *Cadherin-mediated cellular signaling*. Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(5): p. 509-14.
45. Nelson, W.J. and R. Nusse, *Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1483-7.
46. Lo Muzio, L., *A possible role for the WNT-1 pathway in oral carcinogenesis*. Crit Rev Oral Biol Med, 2001. **12**(2): p. 152-65.
47. Qian, X., et al., *E-cadherin-mediated adhesion inhibits ligand-dependent activation of diverse receptor tyrosine kinases*. The EMBO journal, 2004. **23**(8): p. 1739-1784.
48. Jamora, C. and E. Fuchs, *Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton*. Nature cell biology, 2002. **4**(4): p. E101-E108.
49. Kaur, G., et al., *Expression of E-cadherin in primary oral squamous cell carcinoma and metastatic lymph nodes: an immunohistochemical study*. Indian J Dent Res, 2009. **20**(1): p. 71-6.
50. Zhou, J., et al., *Expression of E-cadherin and vimentin in oral squamous cell carcinoma*. Int J Clin Exp Pathol, 2015. **8**(3): p. 3150-4.
51. Fan, C.C., et al., *Expression of E-cadherin, Twist, and p53 and their prognostic value in patients with oral squamous cell carcinoma*. J Cancer Res Clin Oncol, 2013. **139**(10): p. 1735-44.
52. Zaid, K.W., *Immunohistochemical assessment of E-cadherin and beta-catenin in the histological differentiations of oral squamous cell carcinoma*. Asian Pac J Cancer Prev, 2014. **15**(20): p. 8847-53.
53. Lo Muzio, L., et al., *P-cadherin expression predicts clinical outcome in oral squamous cell carcinomas*. 2004.
54. Bauer, K., et al., *Slit-2 facilitates interaction of P-cadherin with Robo-3 and inhibits cell migration in an oral squamous cell carcinoma cell line*. Carcinogenesis, 2011. **32**(6): p. 935-43.
55. Bauer, K., et al., *Presenilin 1/gamma-secretase modulates P-cadherin processing and influences cell adhesion in oral squamous cell carcinoma cell lines*. Carcinogenesis, 2013. **34**(11): p. 2622-8.
56. Bauer, R., et al., *Truncated P-cadherin is produced in oral squamous cell carcinoma*. Fcbs j, 2008. **275**(16): p. 4198-210.
57. Wheelock, M.J., et al., *Cadherin switching*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 6): p. 727-35.
58. Islam, S., et al., *Expression of N-cadherin by human squamous carcinoma cells induces a scattered fibroblastic phenotype with disrupted cell-cell adhesion*. The Journal of cell biology, 1996. **135**(6): p. 1643-1654.

59. Costa, L.C., et al., *Expression of epithelial-mesenchymal transition markers at the invasive front of oral squamous cell carcinoma*. J Appl Oral Sci, 2015. **23**(2): p. 169-78.
60. Nieman, M.T., et al., *N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression*. The Journal of cell biology, 1999. **147**(3): p. 631-644.
61. Angadi, P.V., et al., *Immunoexpression of Epithelial Mesenchymal Transition Proteins E-Cadherin, beta-Catenin, and N-Cadherin in Oral Squamous Cell Carcinoma*. Int J Surg Pathol, 2016.
62. M, D.I.D., et al., *Prognostic significance of N-Cadherin expression in oral squamous cell carcinoma*. Anticancer Res, 2011. **31**(12): p. 4211-8.
63. Radisky, E.S. and D.C. Radisky, *Matrix metalloproteinases as breast cancer drivers and therapeutic targets*. Front Biosci (Landmark Ed), 2015. **20**: p. 1144-63.
64. Decock, J., et al., *Matrix metalloproteinases: protective roles in cancer*. J Cell Mol Med, 2011. **15**(6): p. 1254-65.
65. Yadav, L., et al., *Matrix metalloproteinases and cancer - roles in threat and therapy*. Asian Pac J Cancer Prev, 2014. **15**(3): p. 1085-91.
66. Lawal, A.O., et al., *Immunohistochemical expression of MMP-2 and MMP-8 in oral squamous cell carcinoma*. J Clin Exp Dent, 2015. **7**(2): p. e203-7.
67. Piccard, H., P.E. Van den Steen, and G. Opdenakker, *Hemopexin domains as multifunctional liganding modules in matrix metalloproteinases and other proteins*. Journal of leukocyte biology, 2007. **81**(4): p. 870-892.
68. Bauvois, B., *New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer, 2012. **1825**(1): p. 29-36.
69. Murphy, G. and H. Nagase, *Localizing matrix metalloproteinase activities in the pericellular environment*. Febs Journal, 2011. **278**(1): p. 2-15.
70. Chakraborti, S., et al., *Regulation of matrix metalloproteinases: an overview*. Molecular and cellular biochemistry, 2003. **253**(1-2): p. 269-285.
71. Folgueras, A.R., et al., *Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies*. International Journal of Developmental Biology, 2004. **48**(5-6): p. 411-424.
72. Belotti, D., et al., *Matrix Metalloproteinases (MMP9 and MMP2) induce the release of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) by ovarian carcinoma cells implications for ascites formation*. Cancer Research, 2003. **63**(17): p. 5224-5229.
73. Egeblad, M. and Z. Werb, *New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression*. Nature Reviews Cancer, 2002. **2**(3): p. 161-174.
74. Turpeenniemi-Hujanen, T., *Gelatinases (MMP-2 and-9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers*. Biochimie, 2005. **87**(3): p. 287-297.
75. Hangai, M., et al., *Matrix metalloproteinase-9-dependent exposure of a cryptic migratory control site in collagen is required before retinal angiogenesis*. The American journal of pathology, 2002. **161**(4): p. 1429-1437.

76. Xu, J., et al., *Proteolytic exposure of a cryptic site within collagen type IV is required for angiogenesis and tumor growth in vivo*. The Journal of cell biology, 2001. **154**(5): p. 1069-1080.
77. Giannelli, G., et al., *Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5*. Science, 1997. **277**(5323): p. 225-228.
78. Bergers, G., et al., *Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis*. Nature cell biology, 2000. **2**(10): p. 737-744.
79. Yu, Q. and I. Stamenkovic, *Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- β and promotes tumor invasion and angiogenesis*. Genes & development, 2000. **14**(2): p. 163-176.
80. Du, R., et al., *HIF1 α induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion*. Cancer cell, 2008. **13**(3): p. 206-220.
81. Ardi, V.C., et al., *Neutrophil MMP-9 proenzyme, unencumbered by TIMP-1, undergoes efficient activation in vivo and catalytically induces angiogenesis via a basic fibroblast growth factor (FGF-2)/FGFR-2 pathway*. Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(38): p. 25854-25866.
82. Mantovani, A., et al., *Cancer-related inflammation*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 436-444.
83. Tian, M., J.R. Neil, and W.P. Schiemann, *Transforming growth factor- β and the hallmarks of cancer*. Cellular signalling, 2011. **23**(6): p. 951-962.
84. Sheu, B.-C., et al., *A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression*. Cancer research, 2001. **61**(1): p. 237-242.
85. Singh, R.D., et al., *Matrix metalloproteinases and their inhibitors: correlation with invasion and metastasis in oral cancer*. Indian Journal of Clinical Biochemistry, 2010. **25**(3): p. 250-259.
86. Smith, J., et al., *Biomarkers in dysplasia of the oral cavity: a systematic review*. Oral oncology, 2009. **45**(8): p. 647-653.
87. Fan, H.-X., et al., *Changes in the expression of MMP2, MMP9, and ColIV in stromal cells in oral squamous tongue cell carcinoma: relationships and prognostic implications*. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2012. **31**(1): p. 1.
88. Riley, J.L., *PD-1 signaling in primary T cells*. Immunological reviews, 2009. **229**(1): p. 114-125.
89. Keir, M.E., et al., *PD-1 and its ligands in tolerance and immunity*. Annu. Rev. Immunol., 2008. **26**: p. 677-704.
90. He, J., et al., *Development of PD-1/PD-L1 Pathway in Tumor Immune Microenvironment and Treatment for Non-Small Cell Lung Cancer*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 13110.
91. Patel, S.P. and R. Kurzrock, *PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy*. Mol Cancer Ther, 2015. **14**(4): p. 847-56.

92. Francisco, L.M., et al., *PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells*. The Journal of experimental medicine, 2009. **206**(13): p. 3015-3029.
93. Li, J., et al., *PD-1/SHP-2 inhibits Tc1/Th1 phenotypic responses and the activation of T cells in the tumor microenvironment*. Cancer research, 2015. **75**(3): p. 508-518.
94. Lin, Y.M., et al., *High PD-L1 Expression Correlates with Metastasis and Poor Prognosis in Oral Squamous Cell Carcinoma*. PLoS One, 2015. **10**(11): p. e0142656.
95. Glaser, R. and J.K. Kiecolt-Glaser, *Stress-induced immune dysfunction: implications for health*. Nature Reviews Immunology, 2005. **5**(3): p. 243-251.
96. Thaker, P.H., A.K. Sood, and L.M. Ramondetta, *Importance of adrenergic pathways in women's cancers*. Cancer Biomark, 2013. **13**(3): p. 145-54.
97. Kolinski, M., A. Plazinska, and K. Jozwiak, *Recent progress in understanding of structure, ligand interactions and the mechanism of activation of the β 2-adrenergic receptor*. Current medicinal chemistry, 2012. **19**(8): p. 1155-1163.
98. Yeagle, P.L. and A.D. Albert, *A conformational trigger for activation of a G protein by a G protein-coupled receptor*. Biochemistry, 2003. **42**(6): p. 1365-1368.
99. Tikhonova, I.G., et al., *Simulations of biased agonists in the beta(2) adrenergic receptor with accelerated molecular dynamics*. Biochemistry, 2013. **52**(33): p. 5593-603.
100. Ahles, A. and S. Engelhardt, *Polymorphic variants of adrenoceptors: pharmacology, physiology, and role in disease*. Pharmacol Rev, 2014. **66**(3): p. 598-637.
101. Bernabe, D.G., et al., *Stress hormones increase cell proliferation and regulates interleukin-6 secretion in human oral squamous cell carcinoma cells*. Brain Behav Immun, 2011. **25**(3): p. 574-83.
102. Shang, Z.J., K. Liu, and D.F. Liang, *Expression of β 2-adrenergic receptor in oral squamous cell carcinoma*. Journal of oral pathology & medicine, 2009. **38**(4): p. 371-376.
103. Heo, D.S., et al., *Biology, cytogenetics, and sensitivity to immunological effector cells of new head and neck squamous cell carcinoma lines*. Cancer Res, 1989. **49**(18): p. 5167-75.
104. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem, 1985. **150**(1): p. 76-85.
105. Boyden, S., *The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes*. J Exp Med, 1962. **115**: p. 453-66.
106. Ramsey, K.H., et al., *Expression of matrix metalloproteinases subsequent to urogenital Chlamydia muridarum infection of mice*. Infect Immun, 2005. **73**(10): p. 6962-73.
107. Fitzgerald, P.J., *Beta blockers, norepinephrine, and cancer: an epidemiological viewpoint*. Clin Epidemiol, 2012. **4**: p. 151-156.
108. Barron, T.I., et al., *Beta blockers and breast cancer mortality: a population-based study*. Journal of clinical oncology, 2011. **29**(19): p. 2635-2644.

109. Eng, J.W.-L., et al., *A nervous tumor microenvironment: the impact of adrenergic stress on cancer cells, immunosuppression, and immunotherapeutic response*. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2014. **63**(11): p. 1115-1128.
110. Argiris, A. and C. Eng, *Epidemiology, staging, and screening of head and neck cancer*, in *Head and neck cancer*. 2004, Springer. p. 15-60.
111. Gumbiner, B.M., *Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis*. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2005. **6**(8): p. 622-634.
112. Roy, R., J. Yang, and M.A. Moses, *Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer*. *Journal of Clinical Oncology*, 2009. **27**(31): p. 5287-5297.
113. Kim-Fuchs, C., et al., *Chronic stress accelerates pancreatic cancer growth and invasion: a critical role for beta-adrenergic signaling in the pancreatic microenvironment*. *Brain Behav Immun*, 2014. **40**: p. 40-7.
114. Shimoyama, Y., et al., *Cadherin cell-adhesion molecules in human epithelial tissues and carcinomas*. *Cancer research*, 1989. **49**(8): p. 2128-2133.
115. Bauer, R., et al., *Truncated P-cadherin is produced in oral squamous cell carcinoma*. *FEBS journal*, 2008. **275**(16): p. 4198-4210.
116. Thomas, G. and P. Speight, *Cell adhesion molecules and oral cancer*. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 2001. **12**(6): p. 479-498.
117. Nita-Lazar, M., et al., *Overexpression of DPAGT1 leads to aberrant N-glycosylation of E-cadherin and cellular discohesion in oral cancer*. *Cancer research*, 2009. **69**(14): p. 5673-5680.
118. Diniz-Freitas, M., et al., *Reduced E-cadherin expression is an indicator of unfavourable prognosis in oral squamous cell carcinoma*. *Oral oncology*, 2006. **42**(2): p. 190-200.
119. Tanaka, N., et al., *Expression of E-cadherin, α -catenin, and β -catenin in the process of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma*. *British journal of cancer*, 2003. **89**(3): p. 557-563.
120. Langer, M.D., et al., *N-glycosylation alters cadherin-mediated intercellular binding kinetics*. *J Cell Sci*, 2012. **125**(Pt 10): p. 2478-85.
121. Jamal, B.T., et al., *N-glycosylation status of E-cadherin controls cytoskeletal dynamics through the organization of distinct β -catenin- and γ -catenin-containing AJs*. *Cell health and cytoskeleton*, 2009. **2009**(1): p. 67.
122. Sahlgren, C., et al., *Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008. **105**(17): p. 6392-6397.
123. Huber, M.A., N. Kraut, and H. Beug, *Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression*. *Current opinion in cell biology*, 2005. **17**(5): p. 548-558.
124. Scully, C. and J. Bagan, *Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications*. *Oral Dis*, 2009. **15**(6): p. 388-99.

125. Kaur, J., et al., *Clinical significance of altered expression of β -catenin and E-cadherin in oral dysplasia and cancer: potential link with ALCAM expression*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e67361.
126. Mohtasham, N., et al., *Immunohistochemical study of p53, Ki-67, MMP-2 and MMP-9 expression at invasive front of squamous cell and verrucous carcinoma in oral cavity*. Pathology-Research and Practice, 2013. **209**(2): p. 110-114.
127. Andisheh-Tadbir, A., et al., *Prognostic value of matrix metalloproteinase-9 expression in oral squamous cell carcinoma and its association with angiogenesis*. Journal of clinical and experimental dentistry, 2016. **8**(2): p. e130.
128. Nanda, D., et al., *MMP-9 as a potential biomarker for carcinoma of oral cavity: a study in eastern India*. Neoplasma, 2013. **61**(6): p. 747-757.
129. Werner, J., I. Rathcke, and R. Mandic, *The role of matrix metalloproteinases in squamous cell carcinomas of the head and neck*. Clinical & experimental metastasis, 2002. **19**(4): p. 275-282.
130. Liu, J., et al., *Hypoxia pretreatment of bone marrow mesenchymal stem cells facilitates angiogenesis by improving the function of endothelial cells in diabetic rats with lower ischemia*. PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0126715.
131. Hirai, M., et al., *Regulation of PD-L1 expression in a high-grade invasive human oral squamous cell carcinoma microenvironment*. International Journal of Oncology, 2017. **50**(1): p. 41.
132. Strome, S.E., et al., *B7-H1 blockade augments adoptive T-cell immunotherapy for squamous cell carcinoma*. Cancer research, 2003. **63**(19): p. 6501-6505.
133. Dong, H., et al., *Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion*. Nature medicine, 2002. **8**(8): p. 793-800.
134. Iwai, Y., S. Terawaki, and T. Honjo, *PD-1 blockade inhibits hematogenous spread of poorly immunogenic tumor cells by enhanced recruitment of effector T cells*. International immunology, 2005. **17**(2): p. 133-144.
135. Noman, M.Z., et al., *PD-L1 is a novel direct target of HIF-1 α , and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation*. J Exp Med, 2014. **211**(5): p. 781-90.
136. Entschladen, F., et al., *Neurotransmitters are regulators for the migration of tumor cells and leukocytes*. Cancer Immunology, Immunotherapy, 2002. **51**(9): p. 467-482.
137. Drell IV, T., et al., *Effects of neurotransmitters on the chemokinesis and chemotaxis of MDA-MB-468 human breast carcinoma cells*. Breast cancer research and treatment, 2003. **80**(1): p. 63-70.
138. Masur, K., et al., *Norepinephrine-induced migration of SW 480 colon carcinoma cells is inhibited by β -blockers*. Cancer Research, 2001. **61**(7): p. 2866-2869.
139. Schuller, H., B. Porter, and A. Riechert, *Beta-adrenergic modulation of NNK-induced lung carcinogenesis in hamsters*. Journal of cancer research and clinical oncology, 2000. **126**(11): p. 624-630.
140. Barbieri, A., et al., *The stress hormone norepinephrine increases migration of prostate cancer cells in vitro and in vivo*. Int J Oncol, 2015. **47**(2): p. 527-34.

141. Shan, T., et al., *Novel regulatory program for norepinephrine-induced epithelial-mesenchymal transition in gastric adenocarcinoma cell lines*. *Cancer Sci*, 2014. **105**(7): p. 847-56.
142. Rietz, A. and J. Spiers, *The relationship between the MMP system, adrenoceptors and phosphoprotein phosphatases*. *British journal of pharmacology*, 2012. **166**(4): p. 1225-1243.
143. Ito, T., et al., *Effects of antiglaucoma drops on MMP and TIMP balance in conjunctival and subconjunctival tissue*. *Investigative ophthalmology & visual science*, 2006. **47**(3): p. 823-830.
144. Ooi, Y.H., D.-J. Oh, and D.J. Rhee, *Analysis of α 2-adrenergic receptors and effect of brimonidine on matrix metalloproteinases and their inhibitors in human ciliary body*. *Investigative ophthalmology & visual science*, 2009. **50**(9): p. 4237-4243.
145. O'Kane, C.M., et al., *Salbutamol up-regulates matrix metalloproteinase-9 in the alveolar space in the acute respiratory distress syndrome*. *Critical care medicine*, 2009. **37**(7): p. 2242-2249.
146. Zhang, W., et al., *Anti-inflammatory effects of formoterol and ipratropium bromide against acute cadmium-induced pulmonary inflammation in rats*. *European journal of pharmacology*, 2010. **628**(1): p. 171-178.
147. Yang, E.V., et al., *Norepinephrine up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase (MMP)-2, and MMP-9 in nasopharyngeal carcinoma tumor cells*. *Cancer Research*, 2006. **66**(21): p. 10357-10364.
148. Wang, L., et al., *Immune sculpting of norepinephrine on MHC-I, B7-1, IDO and B7-H1 expression and regulation of proliferation and invasion in pancreatic carcinoma cells*. *PloS one*, 2012. **7**(9): p. e45491.
149. Nguyễn, L.T.H., *The roles of beta-adrenergic receptors in tumorigenesis and the possible use of beta-adrenergic blockers for cancer treatment: possible genetic and cell-signaling mechanisms*. *Cancer management and research*, 2012. **4**: p. 431.
150. Lang, S.H., et al., *Enhanced expression of vimentin in motile prostate cell lines and in poorly differentiated and metastatic prostate carcinoma*. *The Prostate*, 2002. **52**(4): p. 253-263.
151. Lang, K., et al., *Neurotransmitters regulate the migration and cytotoxicity in natural killer cells*. *Immunology letters*, 2003. **90**(2): p. 165-172.
152. Huang, X.-Y., et al., *Norepinephrine stimulates pancreatic cancer cell proliferation, migration and invasion via β -adrenergic receptor-dependent activation of P38/MAPK pathway*. *Hepato-gastroenterology*, 2012. **59**(115): p. 889-893.
153. Liu, X., et al., *Epinephrine stimulates esophageal squamous-cell carcinoma cell proliferation via β -adrenoceptor-dependent transactivation of extracellular signal-regulated kinase/cyclooxygenase-2 pathway*. *Journal of cellular biochemistry*, 2008. **105**(1): p. 53-60.

8. Anhang

8.1 Danksagung

Es ist mir ein besonderes Anliegen, all jenen zu danken, die mir behilflich waren, diese Dissertation zu erstellen.

Dieser Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert als Direktor des Lehrstuhls für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, für die Möglichkeit, meine Dissertation an diesem Institut zu erstellen.

Des Weiteren bedanke ich mich besonders bei Herrn PD Dr. Richard Bauer für die Überlassung des Themas und die Betreuung der Arbeit. Durch seine stets konstruktive Kritik, Ideen und Korrekturen wurde erst eine schnelle Anfertigung dieser Dissertation möglich.

Vielen Dank für deine Unterstützung, deine unkomplizierte und stets offene Zusammenarbeit!

Meinen größten Dank spreche ich Frau MTA Brigitta Hauer aus. Ohne Ihre freundliche Anleitung und Geduld wäre mir die Arbeit im Labor nicht möglich gewesen.

Vielen lieben Dank für die herzliche Aufnahme, die angenehme Zusammenarbeit und deine Geduld mit mir!

Vergessen möchte ich auch meine Familie nicht, die mich stets moralisch unterstützte.

8.2 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Nach-/Vorname: Geyer, Maximilian
Geburtsdatum: 10.02.1993
Geburtsort: Bayreuth
Wohnort: Mühlweg 18, 95686 Fichtelberg
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Ausbildung:

1999 – 2003: Grundschule Fichtelberg
2003 – 2011: Luisenburg-Gymnasium Wunsiedel
Juli 2011: Abitur am Luisenburg-Gymnasium Wunsiedel
2012 – 2017: Studium der Zahnmedizin an der Universität Regensburg

8.3 Erklärung

Hiermit erkläre ich, Maximilian Geyer, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel verfasst habe.

Die Dissertation ist bisher an keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Ort, Datum

Maximilian Geyer