

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR MUND-, KIEFER- und GESICHTSCHIRURGIE
Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. TORSTEN E. REICHERT
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

AUSWIRKUNGEN ADRENERGER STIMULATION
AUF TUMORSPEZIFISCHE SIGNALSYSTEME
BEI ZELLEN MIT INDUZIERTER EXPRESSION VON P-CADHERIN

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Tobias Hans Gollwitzer

2018

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR MUND-, KIEFER- und GESICHTSCHIRURGIE
Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. TORSTEN E. REICHERT
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**AUSWIRKUNGEN ADRENERGER STIMULATION
AUF TUMORSPEZIFISCHE SIGNALSYSTEME
BEI ZELLEN MIT INDUZIERTER EXPRESSION VON P-CADHERIN**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Tobias Hans Gollwitzer

2018

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	PD Dr. Richard Bauer
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Gero Brockhoff
Tag der mündlichen Prüfung:	30. April 2019

1	Einleitung.....	9
1.1	Physiologischer Aufbau gesunder Mundschleimhaut.....	9
1.2	Das orale Plattenepithelkarzinom.....	9
1.2.1	Inzidenz.....	10
1.2.2	Risikofaktoren, Pathogenese und Symptome.....	11
1.2.3	Diagnostik, Staging und Lokalisation.....	14
1.2.4	Therapie und Prognose.....	16
1.3	Molekularbiologie beim OSCC.....	17
1.3.1	P-Cadherin.....	17
1.3.2	PD-L1.....	19
1.3.3	Wnt-Signalling.....	20
1.3.3.1	β -Catenin und P- β -Catenin.....	23
1.3.3.2	GSK-3 β und P-GSK-3 β	23
1.3.4	Matrixmetalloproteinasen.....	24
1.3.4.1	Aufbau und Funktion.....	24
1.3.4.2	MMPs in Tumoren.....	27
1.4	Das adrenerge System bei Krebserkrankungen.....	28
1.4.1	Adrenerge Agonisten.....	29
1.4.1.1	Brimonidin.....	29
1.4.1.2	Formoterol.....	29
1.5	Zielsetzung der vorgelegten Arbeit.....	30
2	Material.....	31
2.1	Zellen.....	31
2.2	Medien für die Zellkultur.....	32
2.3	Reagenzien und Lösungen.....	33
2.4	Verbrauchsmaterial.....	35

2.5	Geräte.....	36
2.6	Puffer und Lösungen	37
2.6.1	Zellkultur.....	37
2.6.2	Western Blot.....	38
2.6.2.1	Isolierung und Konzentrationsbestimmung von Proteinen	38
2.6.2.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	39
2.6.2.3	Primärantikörper	41
2.6.2.4	Sekundärantikörper.....	41
2.6.3	Zymogramm	42
2.7	Software	44
3	Methoden.....	45
3.1	Zellkultur.....	45
3.1.1	2D-Zellkultur.....	45
3.1.2	Ermittlung der Zellzahl	45
3.2	Proteinbiochemie	46
3.2.1	Proteinisolation aus den 2D-Zellkulturen	46
3.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	46
3.2.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	48
3.2.3.1	Vorbereitung der Proben	48
3.2.3.2	Gelelektrophorese.....	48
3.2.4	Western Blot.....	49
3.2.5	Zymographie.....	51
3.3	Funktionelle Versuchsmodelle	53
3.3.1	Invasionsassay	53
3.3.1.1	Prinzip des Invasionsassays	53
3.3.1.2	Auswirkung der Agonisten auf die Invasion	55

3.3.1.3	Auswertung per Kristallviolett-Assay	56
3.3.2	Migrationsassay.....	57
3.3.3	Vaskulogene Mimikry auf Matrigel®	57
3.3.4	Proliferationsassay	58
4	Ergebnisse	60
4.1	Charakterisierung der verwendeten Zellen	60
4.1.1	Morphologische Charakteristika	60
4.1.2	P-Cadherin-Expression	62
4.1.3	Expression adrenerger Rezeptoren.....	63
4.1.3.1	Expression α_{2B} -adrenerger Rezeptoren	63
4.1.3.2	Expression β_2 -adrenerger Rezeptoren	64
4.2	Molekularbiologische Untersuchung der Proteinexpression	65
4.2.1	Expression von Proteinen des Wnt-Signalsystems	66
4.2.1.1	Expression von GSK-3 β und P-GSK-3 β	66
4.2.1.2	Expression von β -Catenin und P- β -Catenin.....	69
4.2.2	Expression von PD-L1	71
4.3	Funktionelle Versuche.....	72
4.3.1	Vaskulogene Mimikry	72
4.3.2	Invasion	75
4.3.3	Migration.....	77
4.3.4	Proliferation.....	78
4.4	Analyse der MMP-Aktivität	80
5	Diskussion.....	81
5.1	Charakterisierung der verwendeten Zellen	81
5.2	Expression von Proteinen des Wnt-Signalsystems	83
5.2.1	GSK-3 β	83

5.2.2	β-Catenin	85
5.3	Expression von PD-L1	87
5.4	Funktionelle Versuche	89
5.4.1	Vaskulogene Mimikry	89
5.4.2	Invasion	91
5.4.3	Migration	93
5.4.4	Proliferation.....	95
5.5	Analyse der MMP-Aktivität	97
6	Zusammenfassung.....	99
6.1	Proteinbiochemische Untersuchungen.....	99
6.2	Funktionelle Versuchsansätze	100
7	Abkürzungsverzeichnis	102
8	Abbildungsverzeichnis.....	104
9	Tabellenverzeichnis	105
10	Literaturverzeichnis.....	107
11	Lebenslauf	122
12	Danksagung	123
13	Selbstständigkeitserklärung	124

1 Einleitung

1.1 Physiologischer Aufbau gesunder Mundschleimhaut

Die Mundhöhle ist von mehrschichtigem, zumeist unverhorntem Plattenepithel ausgekleidet. Die orale und oropharyngeale Schleimhaut zeichnet sich klinisch durch eine gleichmäßige rosa Farbe und weiche Konsistenz aus. Die Benetzung mit Speichel verhindert das Austrocknen der Oberfläche und schützt die Schleimhaut, die spezifisch an die Umgebung der Mundhöhle angepasst ist. Zur Aufgabe der Epithelien des Mundes zählt der Schutz tieferliegender Gewebe vor mechanischen Einflüssen, dem Eindringen von Mikroorganismen und toxischen Noxen und nicht zuletzt der Schutz vor Flüssigkeitsverlust.

Das Epithel wird durch Zellteilung von Keratinozyten in den tieferen Schichten erneuert; durch Proliferation in basalen und Abschilferung in oberflächlichen Schichten entsteht eine Gewebemöostase [1].

1.2 Das orale Plattenepithelkarzinom

Eine der bedeutendsten malignen Erkrankungen der Mundhöhle stellt das orale Plattenepithelkarzinom (*oral squamous cell carcinoma*, OSCC) dar. Es handelt sich dabei um eine bösartige neoplastische Läsion ausgehend von den oralen Keratinozyten der Schleimhaut der Mundhöhle und des Oropharynx. In über 90 % der Kopf-Hals-Tumoren liegt ein Plattenepithelkarzinom vor, sodass es als der häufigste maligne Tumor in diesem Bereich gilt, wohingegen Lymphome, Sarkome, Speicheldrüsentumoren und weitere nur einen geringen Anteil der Tumorerkrankungen im Kopf-Hals-Bereich ausmachen [2–4]. Karzinome der Mundhöhle gehören weltweit zu den bedeutendsten zehn Krebserkrankungen [4]. In Abbildung 1 sind einige relativ ausgedehnte OSCC-Befunde der Mundhöhle dargestellt.

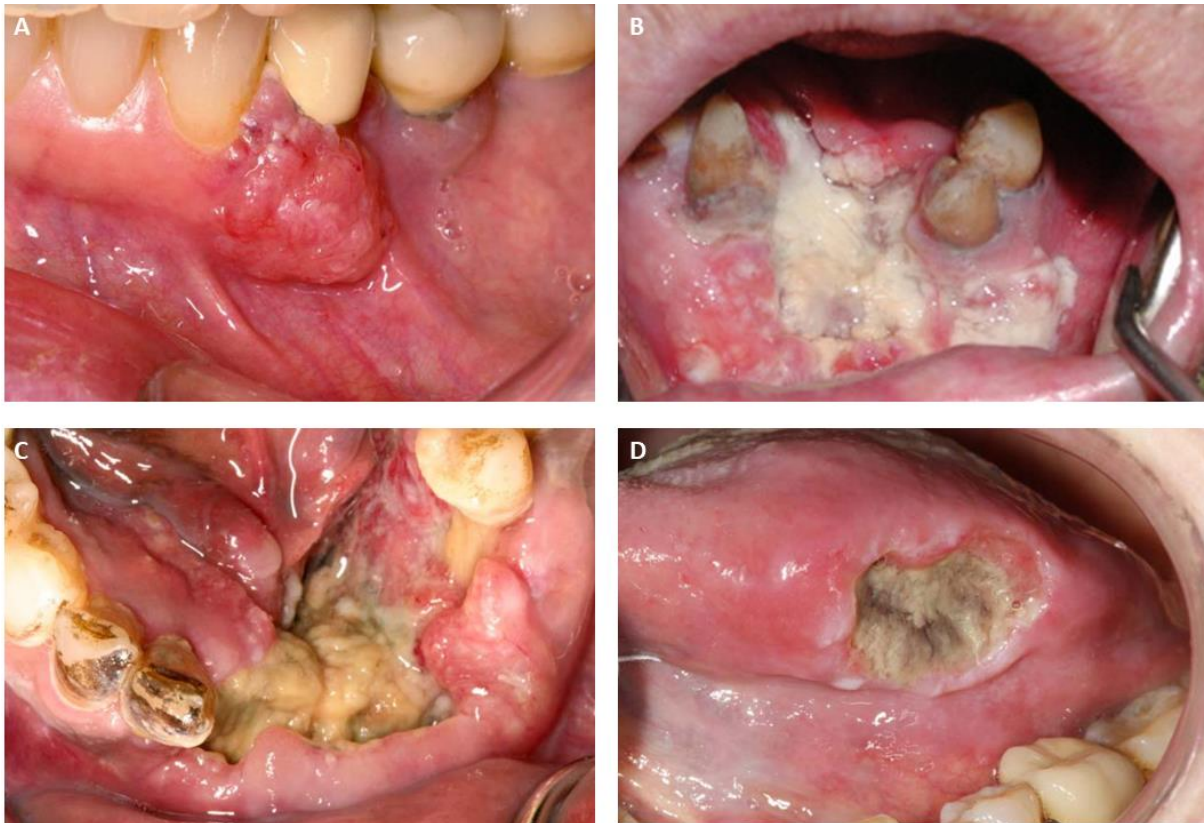


Abbildung 1: Beispiele für das orale Plattenepithelkarzinom.

In A – D sind intraorale Befunde eines OSCCs dargestellt. Dabei liegen meist Läsionen in fortgeschrittenem Stadium vor. Die Fälle B – D zeigen hier eindrücklich den Befall von Mundboden und Zungenrand, die als typische Regionen für das Auftreten eines OSCCs anzusehen sind. **A:** Granuläres ulzerierendes OSCC an der Gingiva, aus [3]. **B:** OSCC am anterioren Mundboden, Kieferkamm und im Vestibulum, aus [5]. **C:** Ulzerierendes OSCC im anterioren Mundboden bis zum Alveolarfortsatz, aus [3]. **D:** Ulzerierendes OSCC am Zungenrand, aus [3].

1.2.1 Inzidenz

Im Jahr 2012 gab es global etwa 300.000 neue Erkrankungsfälle dieses Tumors, in Deutschland treten jährlich etwa 10.000 neue Fälle in Erscheinung [6]. Die höchste Inzidenzrate von 6,4:100.000 wird in Südostasien registriert und eine Rate von 4,6:100.000 in Europa [3]. Aufgrund des dynamischen und regional unterschiedlichen Risikoverhaltens und verschiedener gesellschaftlicher Standards variieren die Inzidenzraten dabei weltweit stark [4]. Der Zeitpunkt der Diagnose erfolgt in einem Altersmedian von derzeit 63 Jahren [7]. Männer sind im Allgemeinen deutlich häufiger, etwa doppelt so oft, von der Erkrankung betroffen als Frauen, was zumeist auf unterschiedliches Risikoverhalten des jeweiligen Geschlechts zurückzuführen ist [8]. Die Inzidenz des OSCCs zeigt sich in gut entwickelten, wohlhabenden Staaten

tendenziell als rückläufig, dagegen steigen die Zahlen in ärmeren Ländern und der Dritten Welt weiter an [3].

Die Gruppe der Betroffenen im Alter von unter 45 Jahren ist zwar mit einem Anteil von 5 % sehr gering, dennoch bemerkenswert, denn bei dieser Patientenfraktion erkranken Männer und Frauen in etwa gleich häufig am OSCC. Das weicht von den allgemeinen Zahlen der älteren Betroffenen ab, wo Männer deutlich häufiger betroffen sind. Zudem steigt die Inzidenz in dieser Bevölkerungsgruppe aktuell leicht an [9].

1.2.2 Risikofaktoren, Pathogenese und Symptome

Verschiedene Lebensbedingungen und vor allem individuelle Konsumverhaltensmuster können zur malignen Entartung des oralen Plattenepithels beitragen. Die beiden wichtigsten Risikofaktoren sind Tabak- und übermäßiger Alkoholkonsum, die gemeinsam für über 75 % der Fälle verantwortlich sind. Ein Viertel der Erkrankungen ist dabei alleine auf das Rauchen von Zigaretten zurückzuführen, deren Konsum sich abhängig von Häufigkeit, Dauer und Pack-Years auf das Erkrankungsrisiko auswirkt [10]. Auch andere Formen des Tabakgenusses, wie Pfeifen- oder Zigarrenrauchen und Kautabak, erhöhen die Wahrscheinlichkeit, ein OSCC zu entwickeln [2, 10], außerdem sind Passivraucher ebenfalls einem höheren Risiko ausgesetzt [11]. Synergistische Effekte aus kombiniertem Alkohol- und Tabakkonsum ziehen ein etwa 15-fach höheres Risiko zur Erkrankung an diesem Tumor nach sich [2, 3].

Einen weiteren Beitrag zur Entstehung eines OSCCs liefern humane Papillomviren (HPV). In ungefähr 25 % der OSCC-Fälle kann die DNA der Viren detektiert werden. Dabei stellen von den über 120 bekannten die beiden Hochrisiko-Typen HPV-16 und HPV-18 mit über 80 % die am häufigsten detektierten HPV-Typen im Kopf-Hals-Bereich dar [12].

Vor allem in Südostasien ist der Konsum von Betel Quid, einer Zubereitung aus Arekanuss, Löschkalk und Betelblättern, unter anderem zum Teil mit Tabakzusatz, sehr beliebt. Das Kauen dieses Gemischs fördert ebenfalls die Entwicklung eines Plattenepithelkarzinoms [13, 14].

Zusätzlich scheint schlechte Mundhygiene mit einem höheren Risiko einherzugehen, am OSCC zu erkranken [15] und einen weiteren Einflussfaktor stellen die individuelle Ernährungszusammensetzung und -gewohnheiten dar [16, 17]. Diskutiert wird außerdem der Beitrag mechanischer Irritation zur Entstehung eines Plattenepithelkarzinoms [18]. Empfänger

transplantierten Organe [19], Menschen mit HIV-Infektion [20] und Patienten, die unter genetischen Krankheitsbildern, wie der Fanconi-Anämie [21], dem Bloom-Syndrom oder unter Dyskeratosis congenita leiden [3], neigen desgleichen verstärkt dazu, ein OSCC zu entwickeln. Ein schlechter sozioökonomischer Gesellschaftsstatus wirkt sich insgesamt ebenfalls negativ auf das OSCC-Risiko eines Individuums aus [22].

In seiner Pathogenese entwickelt sich ein OSCC meist aus einer Vorläuferläsion. Unter diesen ist am häufigsten die Leukoplakie anzutreffen. Dabei handelt es sich um einen weißen nicht wegwischtbaren Fleck, der keiner anderen Krankheit zugeordnet werden kann. Es wird eine jährliche Transformationsrate von etwa 1 % angenommen [23]. Leukoplakien bilden eine sehr heterogene Gruppe, unter anderem hinsichtlich ihrer klinischen Erscheinungsform und ihrer Entartungstendenz. Die Erythroleukoplakie als besonderer Typus mit roten und weißen Farbanteilen wird als nichthomogene Leukoplakie kategorisiert.

Weiterhin zählt auch die Erythroplakie, ein roter Fleck, der keiner anderen Erkrankung zugeschrieben werden kann, zu den potenziellen Vorläuferläsionen für ein OSCC. Histologisch liegt bei diesem Befund meist schon zumindest eine epitheliale Dysplasie, teils ein Carcinoma in Situ oder gar ein invasives Karzinom vor. Ein Großteil erythroplakischer Befunde tendiert zur malignen Entartung; es handelt sich hier um eine Hochrisiko-Vorläuferläsion, die aufgrund ihrer sehr wahrscheinlichen Transformation und des meist auch symptomatischen Erscheinungsbildes der Behandlung bedarf. Beispiele für die Läsionen Leukoplakie und Erythroplakie sind in Abbildung 2 gezeigt.

Auch der orale Lichen Planus wird als Vorläuferläsion eingestuft. Es wird dabei eine jährliche Transformationsrate von unter 1 % angegeben. Orale submuköse Fibrose, die häufig in Ländern angetroffen werden kann, in denen der Kautabak- und Betel Quid-Konsum eine nennenswerte Rolle spielt, kann ebenfalls als präkanzeröser Zustand eingeordnet werden. Hier liegt die Wahrscheinlichkeit des Fortschreitens als maligne Läsion bei jährlich etwa 0,5 % [23].

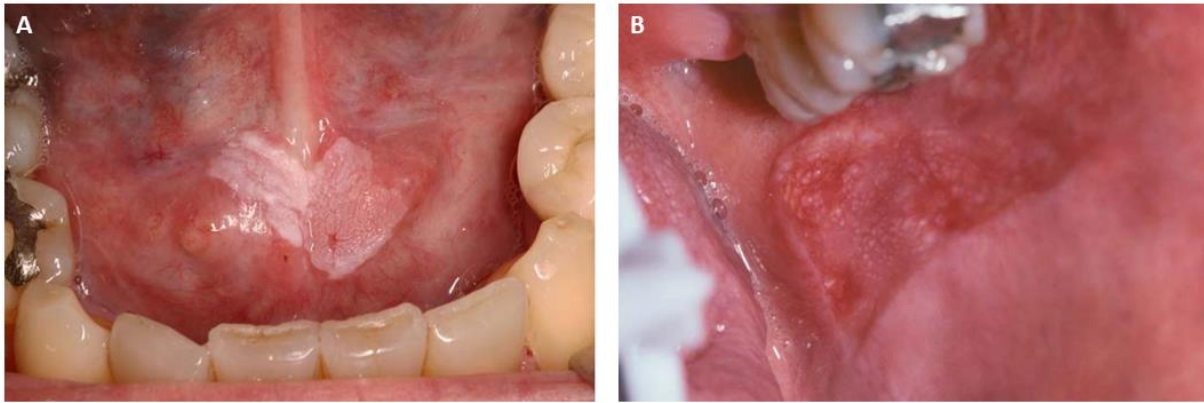


Abbildung 2: Leukoplakie und Erythroplakie.

Auf diesen Fotos sind die beiden gängigsten Vorläuferläsionen eines OSCCs dargestellt: Leukoplakie (A) und Erythroplakie (B). Die Lokalisation der dargestellten Leukoplakie am Mundboden bedarf einer intensiven Beobachtung, da sich OSCC-Befunde in dieser Region als relativ häufig und aggressiv erweisen. Bei einem nicht wegweisbaren weißen Fleck handelt es sich um eine Leukoplakie und bei rötlicher Farbe um eine Erythroplakie. Gemischte Formen treten als Erythroleukoplakie auf und werden als nichthomogene Leukoplakie bezeichnet. **A:** Leukoplakie am Mundboden. Die Diagnose bei der Biopsie beschrieb eine Hyperkeratose mit schwerer epithelialer Dysplasie. Aus [3]. **B:** Erythroplakie an der Wangenschleimhaut. Nach einer Probeentnahme konnte ein invasives OSCC diagnostiziert werden. Aus [3].

Auf genetischer Ebene tragen mehrere Faktoren zur Mutation der DNA von oralen Keratinozyten und damit zur Entstehung eines OSCCs bei. Verlust der Heterozygotie spielt dabei auf verschiedenen Abschnitten der Chromosomen 4q, 8p, 9p und 11q beim OSCC eine Rolle [24], ebenso wie chromosomale Instabilität, Kopierzahlvarianten und erhöhte Telomeraseaktivität in OSCC-Zellen. Der Verlust der Regulation des Zellzyklus, DNA-Schädigung durch endo- und exogene Noxen begünstigen dabei ebenso die Entstehung eines OSCCs wie eine Mutation im Notch-Signalweg. Teils führen diese Variationen direkt zu neuen Zelleigenschaften oder zu veränderter Expression von Tumorsuppressorgenen (TSGs) und von Onkogenen [25].

Mutationen bei den TSGs p53 [26] oder p16^{INK4A} [27], das auf Chromosom 9p21 lokalisiert ist [28], und damit beim Verlust von Heterozygotie eher betroffen ist, sind beispielsweise beim OSCC sehr häufig anzutreffen und führen zu genomischer Instabilität.

Bei einer Infektion mit HPV führen die viralen Onkogene E6 und E7 unter anderem zu einer Inaktivierung von p53 bzw. pRb [29] und verhindern so die Einleitung wichtiger Apoptosevorgänge bei DNA-Schäden.

Zusätzlich zu genetischen Abweichungen können epigenetische Einflüsse, wie beispielsweise DNA-Hypermethylierung, Histonmodifikation oder RNA-Wechselwirkungen ebenfalls eine Tumorentstehung des oralen Plattenepithels begünstigen [30].

Beim Patienten macht sich ein OSCC durch verschiedene Symptome bemerkbar, die allerdings nicht unmittelbar ab der Pathogenese der zu Beginn symptomlosen Malignität feststellbar sind. Schon anfangs klinisch erkennbar sind Schleimhautveränderungen wie oben beschrieben und atypische Keratinisierung. Im Laufe der Erkrankung können Zahnlockerung, Lymphknotenschwellung, Ulzeration, spontane Blutung, Beschwerden bei der Mundöffnung, beim Schlucken, Kauen oder Sprechen und Atembeschwerden auftreten [5]. Außerdem können vom Tumor starke Schmerzen ausgehen, die bis in angrenzende Nachbarregionen ausstrahlen. Als späte Symptome können Kachexie, pathologische Kieferfrakturen oder auch extraorale Fistelbildungen beschrieben werden [31].

1.2.3 Diagnostik, Staging und Lokalisation

Wichtige Grundlage der Diagnostik stellt die Inspektion der Mundhöhle dar, wobei die Erfahrung des Untersuchers eine große Rolle spielt. Als verdächtig für eine maligne Neoplasie gilt dabei jede unklare Schleimhautveränderung, die länger als zwei Wochen besteht. Dabei soll der Patient bei Vorliegen eines Verdachtes unmittelbar an einen Spezialisten, zumeist einen Mund-Kiefer-Gesichtschirurgen, überwiesen werden [31]. Den Goldstandard zur Sicherung einer Diagnose stellt dabei die Biopsie suspekten Gewebes einschließlich der nachfolgenden histologischen Untersuchung dar. Auch zytologische Methoden wie beispielsweise Zyto-morphometrie oder molekulare Analysen können angewandt werden, ebenso wie Anfärben des intraoralen Befundes mittels Toluidinblau oder Bengalrosa [32]. Zur Langzeitbeobachtung präkanzeröser Läsionen bietet sich auch die Bürstenbiopsie als attraktives, da wenig invasives und deshalb von Patienten gut toleriertes Werkzeug zur Diagnose an [33]. Es gibt derzeit außerdem Ansätze, dieses Diagnoseverfahren in Kombination mit Speichelanalyse künftig generell als weniger invasive Alternative zur Gewebeentnahme zu etablieren [34]. Beim Vorliegen oropharyngeal lokalisierter Befunde erfolgt zudem die Zuhilfenahme fiberoptischer Instrumente, da die Tumorherde oftmals nicht direkt eingesehen werden können [3]. Zusätzlich zur Sicherung der Diagnose „OSCC“ mit allen histologischen Kriterien muss weitergehend die lokale Ausbreitung und Beteiligung von Nachbarstrukturen sowie eventuelle Fernmetastasierung untersucht werden. Die Leitlinie der DGMKG sieht daher eine CT- oder MRT- bzw. in besonderen Fällen PET/CT-Untersuchung vor, um die lokale Ausdehnung des Tumors festzustellen und den Lymphknotenstatus des Kopf-Hals-Bereichs zu beurteilen [31].

Sonografie und ultraschallgestützte Feinnadelaspiration können zusätzlich als Mittel der Diagnostik eingesetzt werden. Auch das Vorliegen eines synchronen Zweittumors muss beim Staging in Betracht gezogen werden. Ab dem Tumorstadium T3 schreibt die Leitlinie weiters eine ganzkörperliche Untersuchung zum Auffinden von möglichen Fernmetastasen vor [3, 31].

Die Einteilung von Tumorbefunden erfolgt nach der TNM-Klassifikation des American Joint Committee on Cancer (AJCC). Seit Januar 2017 liegt dabei die 8. Auflage der Vorschriften zur Vorgehensweise vor, bei der hinsichtlich des OSCCs die hauptsächliche Neuerung bei einer Unterscheidung HPV-positiver von -negativen Fällen und der Berücksichtigung extranodaler Ausbreitung beim Lymphknotenstatus liegt [35]. Mit dem Buchstaben „T“ wird mit einem Spektrum von Tx über T0 bis T4b die Größe des Primärtumors angegeben. „N“ bezeichnet das Vorhandensein, die Lokalisation und Größe eventuell befallener Lymphknoten, dabei kann Nx oder N0 bis N3b vorliegen. Mit „M“ wird die Anwesenheit von Metastasen angegeben. Weitere Buchstaben wie „V“, „L“ usw. können zudem Hinweise bezüglich des Befalls von u.a. Blut- oder Lymphgefäßen geben. Der Zusatz „c“ oder „p“ gibt an, ob die TNM-Befundung nach klinischer oder (histo)pathologischer Untersuchung stattgefunden hat. Eine Einteilung in die verschiedenen Stadien I bis IV kann anschließend anhand der TNM-Kriterien erfolgen.

Über 50 % der Fälle, die in westlichen Ländern auftreten, manifestieren sich an Zunge und Mundboden. Dabei ist mit 40 % aller Fälle am häufigsten der Mundboden, gefolgt von der Zunge mit 33 %, betroffen. Der laterale Rand und die Zungenspitze sind dabei bevorzugt befallen. Zusammen mit dem Weichgaumen und den Tonsillen stellen die genannten anatomischen Bereiche die Zone des höchsten Risikos für ein OSCC dar [5, 36].

Die Lokalisation der Befunde ist bei jüngeren Patienten unter 20 – 45 Jahren etwas abweichend. Bei ihnen ist der Mundboden, anders als bei der Masse der Patienten, die in der Regel ein medianes Diagnosealter von 63 Jahren aufweisen, sehr selten betroffen [3]. Am häufigsten betroffen ist bei dieser Patientengruppe die Zunge, gefolgt von Gingiva und Lippen [37].

In Gegenden mit Verbreitung des Kautabakkonsums ist hingegen die ansonsten sehr selten betroffene Wangenschleimhaut eine bedeutende anatomische Region mit Neigung zur OSCC-Entstehung [4].

1.2.4 Therapie und Prognose

Grundsätzlich stehen in der Tumorthherapie, abhängig vom Stadium der Erkrankung sowohl für kurative als auch für palliative Ansätze, chirurgische, radiologische und chemotherapeutische Methoden zur Verfügung. Die Auswahl wird dabei abhängig vom Allgemein- und Gesundheitszustand des Patienten getroffen, eine Kombination ist die Regel. Es bedarf eines multidisziplinären Vorgehens zum Erreichen des Behandlungsziels [38].

Wichtiger Therapiebestandteil ist hierbei das chirurgische Vorgehen. Der Tumor wird dabei reseziert und es erfolgt anschließend, je nach Defektgröße, meist eine Rekonstruktion, teils unter Verwendung von beispielsweise Radialislappen oder Fibula-Transplantaten [39]. Ein Sicherheitsabstand von, je nach Größe des Primärtumors, 1 – 2 cm sollte bei der Resektion erzielt werden [3]. Moderne, minimalinvasive chirurgische Methoden, beispielsweise Laserchirurgie und intraorale Zugänge können ebenfalls angewandt werden [38].

Bei positivem Befall von Halslymphknoten oder Rezidiven nach Strahlentherapie wird außerdem eine *Neck Dissection* zur Ausräumung der zervikalen Lymphknoten durchgeführt. Zu diesem Vorgehen gibt es allerdings unter Fachkreisen Unstimmigkeiten hinsichtlich der anatomisch notwendigen Ausdehnung dieser Behandlung [40].

Bestrahlung, meist in Kombination mit chemischen Therapeutika oder chirurgischem Vorgehen, stellt einen etablierten Bestandteil der Tumorthherapie dar. Neuere Errungenschaften ermöglichen unter anderem die Verbesserung des zielgerichteten Einsatzes der Strahlung zur Schonung gesunden Gewebes [41].

Weitere Optionen eröffnen Chemotherapeutika. Diese können während der Bestrahlung, vor oder nach chirurgischer Behandlung oder als alleinige Therapie zur Anwendung kommen. Es stehen verschiedene Therapeutika zur Verfügung, unter anderem Cisplatin, Methotrexat oder 5-Fluorouracil, die generell das Zellwachstum hemmen. Neuere Substanzen sind auf tumorspezifische Mutationen ausgerichtet [28], sodass chemotherapeutische Methoden durch gezielte Therapie verfeinert werden konnten [42]. Cetuximab als Vertreter dieser Entwicklungen ist auf die erhöhte EGFR-Expression bei OSCCs ausgerichtet und kann dessen Invasions-, Angiogenese- und Metastasierungsaktivitäten verringern [43]. Jüngste Forschungsansätze beziehen immuntherapeutische Aspekte mit ein. Beim OSCC gibt es hierzu Ansätze zu anti-PD-1- und anti-PD-L1-Antikörpern, die sich als vielversprechend erweisen [38].

Hinsichtlich der Prognose sind in der Literatur 5-Jahres-Überlebensraten für Deutschland von etwa 50 % angegeben [44]. Eine Diagnoseverzögerung von über 2 Monaten, T-Status des

Tumors von T3 oder T4, Halsmetastasen und Erkrankungen im Stadium III oder IV wirken sich negativ auf die zu erwartende Überlebensrate aus [45]. Ebenso wirken sich verschiedene Lokalisationen des Befundes innerhalb der Mundhöhle unterschiedlich auf die Prognose aus [46]. Geringer histologischer Differenzierungsgrad, perineurale Invasion, nicht tumorfreie Resektionsränder, tiefe Gewebeinvasion und verschiedene genetische Mutationen nehmen ebenfalls negativen Einfluss auf die Überlebensrate [47].

OSCC-Fälle mit Assoziation zu einer HPV-Infektion gehen außerdem mit einer signifikant besseren Prognose einher als HPV-negative Erkrankungen [48].

1.3 Molekularbiologie beim OSCC

Heutzutage können molekulare Mechanismen immer genauer aufgeklärt werden, so auch beim OSCC. Erkenntnisse über zelluläre Vorgänge und Abweichungen beim OSCC vertiefen sowohl das Verständnis über die Krankheit selbst und können weiterhin neue Wege für moderne Therapieansätze eröffnen [28]. Der Fokus der vorliegenden Arbeit soll dabei hauptsächlich auf die Expression von P-Cadherin, einzelne Bestandteile des Wnt-Signalsystems und im weiteren Verlauf auf adrenerge Signalwege gelegt werden.

1.3.1 P-Cadherin

Cadherine bilden eine große Familie von Oberflächenmolekülen, die durch ihre Fähigkeit, untereinander Ca^{2+} -abhängige Zell-Zell-Kontakte auszubilden, eine wichtige Rolle zur Entwicklung, Architektur und Integrität von Gewebeoberflächen beitragen. Charakteristisch für diese Proteine ist vom N- zum C-terminalen Ende ein extrazellulärer Abschnitt, ein Transmembrananker und eine C-terminale intrazelluläre Sequenz. Über den Anteil außerhalb der Zelle bilden Cadherine in Anwesenheit von Ca^{2+} homophile Adhäsionen untereinander aus, sodass Kontakte zwischen Zellen entstehen können. Über den intrazellulären Abschnitt können diese Oberflächenproteine über Catenine mit der jeweiligen Zelle selbst kommunizieren [49].

P-Cadherin, 1986 erstmals beschrieben, ist ein wichtiger Vertreter dieser Familie in Epithelien und kann in Mamma, Haarfollikeln und der Basalmembran vieler Gewebe angetroffen

werden. In Gehirn und Herzmuskel ist P-Cadherin nicht nachweisbar. Verlust von P-Cadherin hat beim Menschen syndromale Krankheitsbilder zur Folge [50]. P-Cadherin steht intrazellulär unter anderem in Verbindung mit β -Catenin [49]. Bei primären oralen Keratinozyten ist P-Cadherin verantwortlich für die Regulation der Zytokeratin 1- und -10-Expression und damit für deren Differenzierung [51].

Bei der Karzinogenese verschiedener Gewebe im Körper spielt P-Cadherin eine unterschiedliche Rolle. Bei einigen Malignitäten, beispielsweise Brust-, Magen-, Kolorektal- oder Pankreaskarzinomen erfolgt eine Hochregulation der P-Cadherin-Expression im Vergleich zu gesundem Gewebe. Auf der anderen Seite erfolgt eine erniedrigte Expression bei Erkrankungen wie dem Leberzell- [52], Blasen- oder Prostatakarzinom [50].

Im Fall des OSCCs ist die Expression von P-Cadherin herabreguliert. Kommt sie gar zum Erliegen, zeigt das Karzinom ein zunehmend aggressiveres biologisches Verhalten und die Überlebenswahrscheinlichkeit sinkt im Vergleich zu Patienten mit P-Cadherin exprimierendem OSCC [53, 54]. Zudem gibt es Hinweise, dass mit zunehmend geringerem Differenzierungsgrad eines OSCCs nur noch trunkierte 50 kDa große N-terminale P-Cadherin-Fragmente anstatt des Moleküls in voller Länge auftreten. Das Vorhandensein von Bruchstücken des Oberflächenproteins gibt ebenfalls einen Hinweis auf ein zunehmend aggressives Wachstumsmuster des Befundes [55]. Die Proliferation von OSCC-Zellen scheint ebenso begünstigt durch eine geringere P-Cadherin-Expression; dabei handelt es sich um den gegenteiligen Effekt, der bei normalen oralen Keratinozyten auftritt [51]. Morphologisch verursacht eine veränderte P-Cadherin-Expression *in vitro* ebenfalls Variationen bei OSCC-Zellen: in Anwesenheit des Proteins bilden diese ein pflastersteinähnliches Mosaik aus, wohingegen sie ohne dieses Molekül ein spindelförmiges Aussehen annehmen, das an mesenchymale Zellen erinnert [56]. Außerdem sammelt sich P-Cadherin durch stärkere Expression der Presenilin-1/ γ -Sekretase im Zytoplasma von OSCC-Zellen an, was zu einer Verschiebung der Signalwege und geringeren Zell-Zell-Adhäsion führt [57].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die verringerte Expression von P-Cadherin mit einem zunehmend aggressiveren Erscheinungsbild des OSCCs korreliert.

1.3.2 PD-L1

Die Aktivierung einer zellulären Immunantwort durch den Körper bedarf eines komplexen Zusammenspiels verschiedener aktivierender und inhibitorischer Signale zwischen Immunzellen. Diese werden durch Zytokine und Co-Signale auf der Oberfläche beteiligter Zellen vermittelt. Einen dieser Co-Signalwege stellt dabei die Interaktion von PD-L1 mit PD-1 dar.

Der *Programmed Death Ligand 1* (PD-L1, auch B7-H1, CD274) gehört zur B7-Familie von Immunsignalmolekülen und wird normalerweise hauptsächlich von dendritischen Zellen, T- und B-Lymphozyten exprimiert [58]. Daneben zeigen auch viele solide Tumoren eine erhöhte PD-L1-Expression, unter anderem verursacht durch die Aktivierung von Signalwegen, die sich positiv auf das Überleben einzelner Zellen auswirken (z.B. MAPK oder PI3K/Akt) oder auch durch verschiedene Transkriptionsfaktoren. Die vermehrte Expression dieses Oberflächenproteins führt dazu, dass sich der entsprechende Tumor dem Zugriff durch das Immunsystem des Patienten entziehen kann [59].

PD-L1 ist Substrat für zwei Rezeptoren: Zum einen für CD80 (B7-1) auf reaktiven T-Zellen und andererseits den PD-Rezeptor (gehört zur CD28-Familie), der auf T-Zellen, dendritischen Zellen, natürlichen Killerzellen, Makrophagen und B-Lymphozyten exprimiert wird. Dabei tragen verschiedene Mechanismen zum Verbergen des Tumors vor dem Immunsystem bei. Durch Interaktionen von PD-L1 und PD-1 im Mikromilieu des Tumors wird zum einen die Apoptose von antigenspezifischen CD8 T-Zellen induziert. Außerdem wird die Tumorzelle selbst durch reverse Signale ausgehend vom exprimierten B7-H1-Protein direkt vor der Apoptose geschützt. Zusätzlich wird die Immunantwort durch Interaktion von PD-L1 des Tumors mit CD80-Rezeptoren von CD8 T-Zellen unterdrückt. Die Interaktion von PD-L1 mit regulatorischen T-Zellen ist nicht endgültig geklärt, einerseits wird eine toleranzsteigernde Wirkung diskutiert, andererseits eine gesteigerte Funktion der regulatorischen T-Zellen [58]. Die Interaktionen von PD-L1 des Tumors mit Immunzellen ist zusammenfassend in Abbildung 3 veranschaulicht.

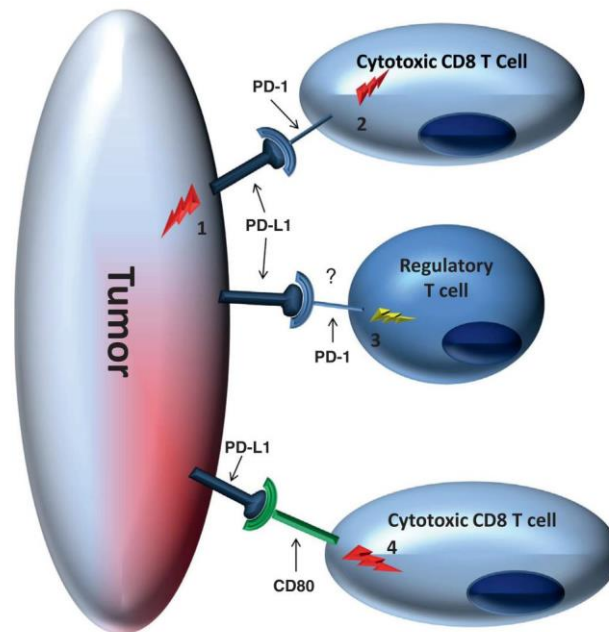


Abbildung 3: Interaktion des PD-L1 von Tumorzellen mit Immunzellen des Körpers.

Der Tumor exprimiert auf seiner Zelloberfläche PD-L1, das 1) durch reverse Signale die Apoptose der Tumorzelle selbst hemmt. 2) Durch die Interaktion mit dem PD-1-Rezeptor und 4) dem CD80-Rezeptor zytotoxischer CD8 T-Zellen induziert PD-L1 bei diesen die Apoptose. 3) Regulatorische T-Zellen entwickeln durch PD-L1-Stimulation entweder gesteigerte Toleranz gegenüber den Tumorzellen oder aber erhöhte Funktion. Die genaue Auswirkung ist hier noch nicht vollständig geklärt. Aus [58].

Beim Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs ist PD-L1 häufig exprimiert, die Literatur gibt dabei einen Wert von 46-100 % PD-L1-positiven Fällen an [58]. Die genaue Auswirkung auf die Prognose ist dabei beim OSCC aktuell nicht ausreichend geklärt [58, 60] und zum Teil kontrovers [61, 62] Allerdings berichtet die Literatur von einer schlechteren Prognose bei erhöhter PD-L1-Expression bei anderen Tumoren wie dem malignen Melanom, Ovarial-, Lungen-, Nasopharyngeal- oder Nierenzellkarzinom [59].

1.3.3 Wnt-Signalling

Das Wnt-Signalsystem ist einer der wenigen bedeutenden Mechanismen, die an der Kontrolle der Embryonalentwicklung beteiligt sind. Dabei spielt es eine wichtige Rolle bei der Regulation von Wachstumsprozessen wie Proliferation, Überleben einzelner Zellen und Differenzierung, auch im adulten Gewebe. Es handelt sich hierbei um ein evolutionär hochkonserviertes System, das in dieser Form bei vielen Spezies anzutreffen ist. Aufgrund seiner Schlüsselfunktionen ist dieser Signalweg streng reguliert, ein Entgleisen der Kontrolle ist bei ver-

schiedenen Krebsformen zu beobachten. Wenn beispielsweise ein aktivierendes Signalmolekül mutiert und in Folge stärker exprimiert wird, wirkt dieses nun als Onkogen; ein inhibitorisches Element, das durch eine Mutation seine Funktion verliert, bedeutet den Verlust eines Tumorsuppressors [63]. Bei den über 19 Wnt-Proteinen, die gewebespezifisch sezerniert werden, handelt es sich um cysteinreiche Moleküle [64].

Das Wnt-System kann in zwei intrazelluläre Signalmechanismen unterteilt werden: die kanonische β -Catenin-abhängige und die nicht-kanonische β -Catenin-unabhängige Signaltransduktion. Beiden geht eine Stimulation von Rezeptoren auf der Zelloberfläche durch Wnt-Liganden voran.

Der unstimulierte Grundzustand beim kanonischen Wnt-Signalweg bewirkt einen proteasomalen Abbau von β -Catenin. Dieses wird in Abwesenheit eines Wnt-Liganden durch den Destruktionskomplex, der sich aus Axin, APC, den Kinasen GSK-3 β und der Casein Kinase 1 α (CK1 α) zusammensetzt, zur Degradation markiert, indem β -Catenin durch GSK-3 β phosphoryliert wird. β -TrCP²⁰⁰ ubiquitinyliert das P- β -Catenin, das anschließend im Proteasom prozessiert wird. Im Zellkern unterdrückt währenddessen ein Proteinkomplex die Expression von Zielgenen des Wnt-Systems [65].

Eine Aktivierung dieses Signalwegs erfolgt durch Interaktion von Wnt auf der Zelloberfläche zum einen mit einem Vertreter der Familie der Frizzled-Rezeptoren, der durch sieben Transmembrandomänen gekennzeichnet ist. Zum anderen erfolgt eine Interaktion mit zwei Mitgliedern der *Lipoprotein-Receptor related Protein-Family*, LRP5 oder LRP6 [64]. Auch Liganden aus der Familie der R-Spondine können den Wnt-Signalweg durch Stimulation von Zellrezeptoren aktivieren [66]. In Folge wird der LRP-Rezeptor durch die Kinasen GSK-3 β und CK1 α phosphoryliert, wodurch Dishevelled-Proteine (Dvl) an die Innenseite der Plasmamembran rekrutiert werden, die dort polymerisieren und dadurch aktiviert werden. Nun können die Dvl-Proteine den Destruktionskomplex inaktivieren, sodass mangels Abbaus eine Ansammlung von β -Catenin erfolgt. Dieses nimmt einen Einfluss auf viele zelluläre Prozesse, indem es nach zytoplasmatischer Anreicherung in den Zellkern übertritt, wo es einen Proteinkomplex bildet, der den Komplex verdrängt, der zuvor die Expression von Zielgenen des Wnt-Signalweges unterdrückte. Die komplette Signalkaskade von der Stimulation bis hin zum Effekt im Zellkern wird durch viele, inzwischen immer genauer bekannte und erfasste modulierende Proteine beeinflusst [65]. Grafisch ist der kanonische Signalweg in Abbildung 4 dargestellt.

Bei der nicht-kanonischen Signalkaskade werden nach Stimulation durch Wnt-Liganden keine β -Catenin-abhängigen Reaktionen ausgelöst, sondern andere Systeme. Von diesen sind PCP- und Ca^{2+} -abhängige Signalwege am besten erforscht. Über diese können Effekte auf das Zytoskelett und auch die Transkription ausgeübt werden.

Es zeigt sich ein Zusammenhang zwischen einer stärkeren Aktivität des Wnt-Signalsystems und der begünstigten Entstehung [63–65] bzw. einem intensiveren Fortschreiten der Krebserkrankung, häufig auch in Form von Metastasierung [65].

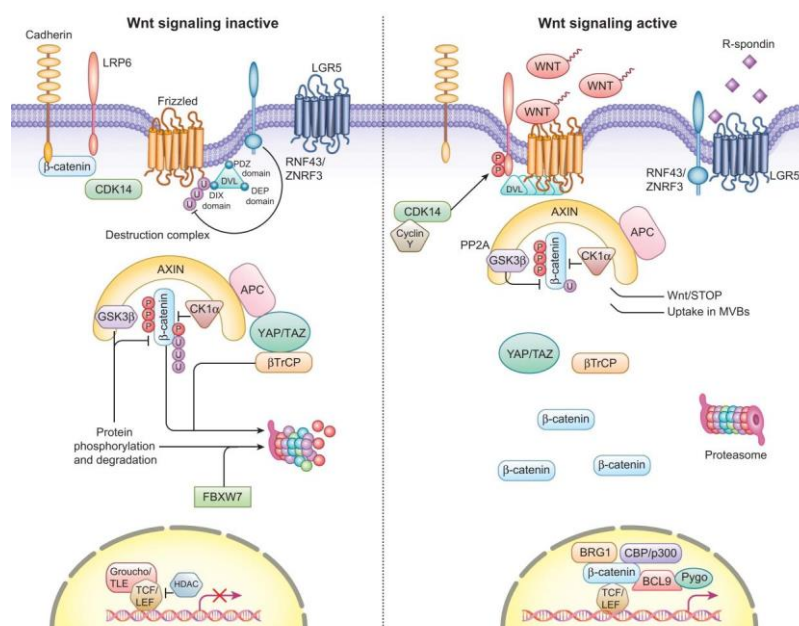


Abbildung 4: Übersicht über die kanonische Signalkaskade beim Wnt-Signalweg.

Links sind die zellulären Vorgänge ohne vorhandene Wnt-Stimulation bei inaktivem Signalweg dargestellt. Zu beachten ist der Destruktionskomplex, der für die Degradation des β -Catenins im Proteasom verantwortlich ist. Im Kern sorgt ein Proteinkomplex für eine Unterdrückung der Transkription von Zielgenen des Wnt-Signalwegs.

Rechts ist ersichtlich, wie sich β -Catenin im Zytoplasma ansammelt, nachdem dessen GSK-3 β - und CK1 α -abhängige Phosphorylierung gehemmt worden ist. Es erfolgt eine erhöhte Expression der Wnt-Zielgene durch die Bildung eines Proteinkomplexes mit β -Catenin im Zellkern.

Es ist auch gezeigt, dass weitere Komponenten an mehreren Stellen modulierend in die Signaltransduktion eingreifen. Aus [65].

Obwohl die Beteiligung des Wnt-Signalwegs bei einigen Krebserkrankungen, wie dem Kolorektalkarzinom, gut erforscht ist, ist der Einfluss auf das OSCC noch nicht vollständig geklärt. Dennoch kann in vielen Fällen eine erhöhte intrazelluläre β -Catenin-Ansammlung detektiert werden, die mit einer geringeren APC-Expression in Verbindung steht. Diese Beobachtung steht in Einklang mit der Vermutung, dass die erhöhte β -Catenin-Aktivität beim OSCC nicht

im Zusammenhang mit einer Mutation des hierfür codierenden Gens steht [67], sondern mit einer fehlerhaften Funktion des Destruktionskomplexes [64]. Auch epigenetische Einflüsse können sich auf die Komponenten des Signalsystems auswirken, beispielsweise eine Hypermethylierung von APC-exprimierenden Genen [30]. Stärkere Aktivität des Wnt-Signalsystems beim OSCC wird mit vermehrter Invasion und Migration *in vitro* [68] und einer schlechteren Prognose für den Patienten assoziiert [69, 70].

Bei HPV-positiven OSCC-Fällen scheinen die Onkoproteine E6/E7 mit dem Wnt-Signalweg interagieren zu können und zu einer höheren intrazellulären β -Catenin-Konzentration zu führen, indem sie dessen Prozessierung direkt beeinflussen [64, 71].

1.3.3.1 β -Catenin und P- β -Catenin

β -Catenin ist wie oben beschrieben das entscheidende Signalmolekül des kanonischen Wnt-Systems innerhalb der Zelle und des Zellkerns. In seiner nicht phosphorylierten Form bildet es im Zellkern einen Proteinkomplex, der zur verstärkten Transkription von Wnt-Zielgenen führt.

In phosphorylierter Form, liegt es bei inaktivem Wnt-Signalling vor und wird in Folge ubiquitinyliert und im Proteasom abgebaut. Die Phosphorylierung erfolgt dabei durch den Destruktionskomplex, der mitunter die Kinase GSK-3 β enthält [63].

1.3.3.2 GSK-3 β und P-GSK-3 β

Die Glykogen Synthase Kinase ist ein zentrales Enzym im menschlichen Organismus. Es ist an sehr vielen unterschiedlichen zellulären Prozessen beteiligt und es gibt zwei Formen, Typen α und β . Ursprünglich wurde sie, wie der Name verrät, als Bestandteil des Glykogenstoffwechsels identifiziert, doch im Laufe der Zeit zeigte sich eine enorme Vielfalt an Vorgängen, in die dieses Enzym involviert ist. Über 40 Proteine, darunter über ein Dutzend Transkriptionsfaktoren, werden von der GSK-3 phosphoryliert.

Die Aktivität dieser Kinase wird durch N-terminale Phosphorylierung gesteuert, die zu einer Inaktivierung führt. Hierzu sind mehrere Kinasen in der Lage, unter anderem Akt, Protein Kinase A und C (PKA und PKC), je nach Lokalisation innerhalb der Zelle. GSK-3 ist in der Lage,

Einfluss auf Zellarchitektur, -beweglichkeit und -überleben zu nehmen, und trägt auch zu Erkrankungen wie Alzheimer und Diabetes bei [72].

Die Aktivität der GSK-3 β ist bei vielen Krebserkrankungen abweichend derer gesunder Zellen. Für das OSCC ist feststellbar, dass GSK-3 β weniger aktiv ist, was über multiple Molekülkaskaden die Tumorentwicklung zu begünstigen scheint [73].

Zudem ist GSK-3 β eine der am Destruktionskomplex des Wnt-Signalsystems beteiligten Kinasen [63, 65, 72]. Als solche ist sie für die Phosphorylierung von β -Catenin an Thr41, Ser37 und Ser33 und damit dessen Degradation verantwortlich, nachdem dieses durch CK1 α an Ser45 phosphoryliert und so für GSK-3 β prozessierbar geworden ist [72].

Ein im Rahmen des oralen Plattenepithelkarzinoms weiteres wichtiges Substrat von GSK-3 β , das außerhalb des Wnt-Signalsystems anzusiedeln ist, stellt der Transkriptionsfaktor Snail dar. Auch bei diesem Protein führt, analog zu β -Catenin, eine Phosphorylierung durch die GSK-3 β zur zytoplasmatischen Aggregation und proteasomalen Degradation. Snail spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Expression von E-Cadherin und trägt so bei Fehlregulation auch zur epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) bei, einem wichtigen Schritt bei der Tumorprogression [74]. Eine fehlende Phosphorylierung durch GSK-3 β hat zur Folge, dass Snail in den Zellkern transloziert wird, wo es die Expression von Zielgenen, wie E-Cadherin, unterdrückt. Dabei wurde festgestellt, dass P-Cadherin beim OSCC einen epithelialen Phänotyp induziert, indem es die durch GSK-3 β vermittelte Phosphorylierung von Snail unterstützt [56]. Weiterhin ist GSK-3 β auch in den PIP3-Kinase-Signalweg zur Vermittlung von Signalen involviert [74].

1.3.4 Matrixmetalloproteinasen

1.3.4.1 Aufbau und Funktion

Beim Menschen sind 23 verschiedene Mitglieder der Familie der Matrixmetalloproteinasen (MMPs) bekannt. Es handelt sich dabei um zinkabhängige Peptid- und Proteinhydrolasen [75]. Die Gruppe dieser Enzyme weist ein breites Spektrum von Substraten auf, von Komponenten der extrazellulären Matrix bis hin zu Zellrezeptoren und freien Proteinen wie Wachstumsfaktoren oder Zytokine; MMPs sind an einer Vielzahl von Entwicklungs- und Krankheitsprozessen im Körper beteiligt. Dazu zählen das Wachstum und *Remodeling* von Gewebe,

Angiogenese, Zellmigration, Entzündung und Wundheilung oder auch die Beteiligung an verschiedenen Erkrankungen, Krebs und Metastasierung [76]. Weitere Aufgabe ist die (In)aktivierung anderer Enzyme und Proteine durch limitierte Proteolyse oder Abspaltung membranständiger Formen von Molekülen zur Freisetzung in den Kreislauf [75].

Zu den Substraten der MMPs zählen neben Komponenten der extrazellulären Matrix unter anderem andere (Pro)proteasen, Proteaseinhibitoren, Hormone, Wachstumsfaktoren und Zytokine und deren Rezeptoren [75].

Die MMP-Expression wird reguliert durch Hormone, Wachstumsfaktoren, Zytokine, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen [75, 76]. Die Sekretion erfolgt dabei zumeist als Zymogen, das einer Aktivierung bedarf.

MMPs mit Furin-Spaltmotiv können im Golgi-Apparat prozessiert werden und können in ihrer aktiven Form sezerniert werden. Manche pro-MMPs können zudem durch andere Matrixmetalloproteinasen aktiviert werden [76]. Eine Inhibition aktivierter MMPs erfolgt unter anderem durch Gewebeinhibitoren für Metalloproteinasen (*tissue inhibitors of metalloproteinases*, TIMPs), von denen vier verschiedene Typen bekannt sind. Durch ihre Funktion bei der Inaktivierung von MMPs können die TIMPs ebenfalls wichtige zelluläre Prozesse wie Proliferation, Angiogenese und Apoptose beeinflussen [75, 76].

Im Allgemeinen sind MMPs hinsichtlich ihrer Struktur aus fünf Proteindomänen aufgebaut. Vom N- zum C-terminalen Ende enthalten die meisten MMPs ein Signalpeptid zur Sekretion, ein Propeptid, eine katalytische Domäne mit aktivem Zentrum, eine Scharnierregion und eine hämopexinähnliche Domäne. Das Zink-Ion, das im katalytischen Abschnitt enthalten ist, ist wichtig für die proteolytische Funktion der MMPs. In Abbildung 5 ist der schematische Aufbau der MMPs mit den Besonderheiten einzelner Typen dargestellt.

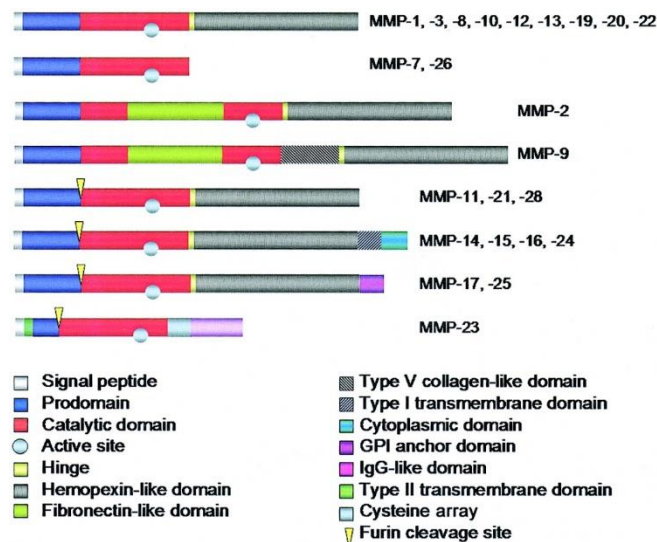


Abbildung 5: Schematischer Aufbau der MMPs.

Die Abbildung zeigt den schematischen Aufbau der MMPs, die im Allgemeinen aus fünf Proteindomänen bestehen. Manche MMPs weichen dabei vom Standard ab, um ihrer spezifischen Funktion gerecht zu werden. Aus [76].

Die Familie der MMPs wird in verschiedene Untergruppen abhängig von ihrer molekularen Struktur und Substratspezifität unterteilt. Dabei werden die sechs Gruppen der Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, Matrilysine, Membran-Typ MMPs und sonstiger MMPs unterschieden. Einzelne Mitglieder einer Gruppe sind zudem in der Lage, zusätzliche zu den jeweils für die Gruppe spezifischen gemeinsamen Substraten zu prozessieren. Eine Übersicht über die Einteilung in die sechs Gruppen mit ihren Mitgliedern, deren Substrate und strukturelle Besonderheiten abweichend vom geschilderten Grundaufbau bietet Tabelle 1.

Gruppe	Zugehörige MMPs	Gemeinsame Substrate	Strukturelle Besonderheiten
Kollagenasen	1, 8, 13	Kollagen Typ I, II und III	---
Gelatinasen	2, 9	Gelatine (denaturiertes Kollagen)	Zusätzliche Fibronectin-Domäne innerhalb der katalytischen Domäne
Stromelysine	3, 10	Sehr breites Spektrum, u.a. Casein, Gelatine	---
Matrilysine	7, 26	Kollagen IV Zusätzlich MMP-spezifisch weitere Substrate	Keine Scharnierregion und hämopexinähnliche Region

Membran-Typ MMPs (MT-MMPs)	14, 15, 16, 17, 24, 25	pro-MMP-2 (außer MMP-17), MMP-spezifisch weitere Substrate	MMP-14, -15, -16, -24: Transmembranenzyme; MMP-17, -25: Glykosylphosphatidylinositol-verankerte Proteasen; Furin-Spaltmotiv am Sequenzende
Sonstige MMPs	11, 12, 19, 20, 21, 22, 23A, 23B, 28	Variabel, MMP-spezifisch	verschiedene

Tabelle 1: Gruppierung der MMPs mit Eigenschaften. Nach [76].

1.3.4.2 MMPs in Tumoren

MMPs bedürfen der genauen zeitlichen und räumlichen Kontrolle. Unkontrolliert können sie Gewebe zerstören und so unter anderem zur Krebsentstehung beitragen [75].

Die Proteolyseenzyme dieser Familie sind bei nahezu allen Krebserkrankungen des Menschen in erhöhter Konzentration nachweisbar. Dabei können sie das Tumormikromilieu beeinflussen, indem sie von benachbarten gesunden oder krebsassoziierten Fibroblasten und nicht-fibroblastischen Krebszellen sezerniert werden [77]. Dabei steht die erhöhte MMP-Expression in Verbindung mit verstärkter Angiogenese, der Zunahme von Tumorwachstum und Metastasierung [77, 78]. Auch bei der Tumordinvasion sollen MMPs, allen voran MMP-2 und -9, beteiligt sein [79].

Auch Funktionen der MMPs unabhängig von der Proteolysetätigkeit können eine Rolle bei Krebserkrankungen spielen, da manche MMPs mit Komponenten des Immunsystems interagieren und so zum Fortschreiten der Krankheit und Metastasierung beitragen können. Weiterhin können MMPs als Mediatoren zur Differenzierung und Morphologie von Zellen zusätzlich, unabhängig von ihrer katalytischen Aktivität, bei einer Krebserkrankung mitwirken [80]. Beim OSCC hat eine erhöhte Expression bestimmter MMPs, vor allem -2 und -9, eine Verbindung zu erhöhter Wahrscheinlichkeit der Metastasierung und schlechterer Prognose [81, 82]. Ebenso sind MMP-1, MT-1 MMP und TIMP-1 in erhöhten Konzentrationen beim Plattenepithelkarzinom feststellbar [83].

1.4 Das adrenerge System bei Krebserkrankungen

Es gibt neun verschiedene Adrenozeptoren im menschlichen Organismus, die durch Noradrenalin und Adrenalin stimuliert werden können. Diese werden in eine Gruppe von α - und β -Rezeptoren mit Subtypen eingeteilt mit den Vertretern der α_{1A} -, α_{1B} -, α_{1D} -, α_{2A} -, α_{2B} - und α_{2C} -Rezeptoren bzw. der β_1 -, β_2 - und β_3 -Rezeptoren [84]. Dabei handelt es sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Über diese können intrazelluläre Signalkaskaden in die Wege geleitet werden [85].

Das adrenerge Signalsystem ist für die Antwort auf vom Sympathikus induzierte Stresssituationen zuständig. Dabei wird als Neurotransmitter sympathischer Fasern das Katecholamin Noradrenalin freigesetzt. Außerdem kann über den Adrenalin- und Noradrenalin Spiegel im Blut systemisch eine sympathische Reaktion ausgelöst werden.

α_1 -Adrenozeptoren sind im Körper weit verbreitet und nach ihrer Stimulation hauptsächlich für die Kontraktion glatter Muskulatur zuständig [86]. Rezeptoren der α_2 -Gruppe übertragen ihre Signale nach Stimulation intrazellulär im Gegensatz zu β -adrenergen Rezeptoren über inhibitorische G-Proteine und folgender negativer cAMP-Modulation. Unter anderem vermittelt diese Rezeptorgruppe ebenfalls die Kontraktion glatter Muskelzellen [87].

Sobald β -adrenerge-Rezeptoren stimuliert werden, wird G-Protein-vermittelt cAMP synthetisiert. Unter anderem wird dadurch die Protein Kinase A (PKA) aktiviert, die eine Vielzahl zellulärer Prozesse beeinflussen kann, die sich vom einfachen Zellmetabolismus und -wachstum über komplexe Vorgänge wie Zelldifferenzierung und -morphologie bis hin zur Gentranskription erstrecken. Auch über MAPK-Signalwege können Effekte des cAMP-Anstiegs vermittelt werden. [88, 89].

Die Literatur berichtet zum einen von steigenden Inzidenzzahlen von Krebserkrankungen in Relation zu Stress, zum anderen von einer Assoziation von einer Medikation mit β -Blockern mit einer weniger starken Progression eines Tumors [88, 89]. Dabei werden multiple zelluläre Vorgänge durch β -adrenerge Stimulation in Tumorzellen beeinflusst, darunter auch verstärkte Invasion im Zusammenhang mit Matrixmetalloproteinasen [88, 90].

Auch beim OSCC wird der β -adrenerge-Rezeptor exprimiert und kann so die Erkrankung und die Prognose für den Patienten beeinflussen [91–94].

1.4.1 Adrenerge Agonisten

Zur Stimulation adrenerger Rezeptoren können Agonisten verwendet werden, die spezifisch an α - oder β -Adrenozeptoren binden. Hierfür soll ein genaueres Augenmerk auf die beiden Substanzen Brimonidin und Formoterol gelegt werden.

1.4.1.1 Brimonidin

Brimonidin, auch UK14,304 bzw. 5-Brom-N-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-yl)chinoxalin-6-amin, ist ein selektiver α_2 -Agonist [95]. Die Strukturformel des Moleküls ist in Abbildung 6 dargestellt. Es handelt sich dabei um ein Imidazolderivat, das sich durch einen Chinoxalinring von Clonidin und Apraclonidin unterscheidet, zwei weiteren α -adrenergen Agonisten, jedoch mit geringerer selektiver Affinität zum α_2 -Adrenozeptor [96]. Brimonidin wird klinisch als Medikament zur Behandlung des erhöhten Augeninnendrucks und topisch als Gel bei Rosazea angewandt [96, 97].

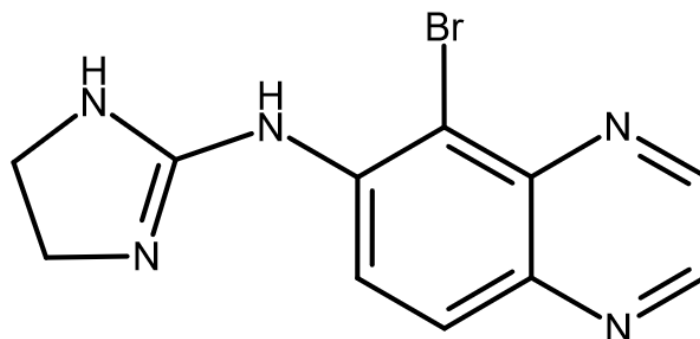


Abbildung 6: Strukturformel von Brimonidin [95].

1.4.1.2 Formoterol

Als selektiver β_2 -adrenerger Agonist mit der Summenformel $C_{19}H_{24}N_2O_4$ eignet sich Formoterol [98]. Klinisch wird es eingesetzt bei Asthma und COPD, um eine Bronchodilatation zu erzielen [99, 100]. Eine Strukturformel ist in Abbildung 7 gezeigt. Aus dieser sind zwei Chiralitätszentren ersichtlich, es existieren also vier Stereoisomere, von denen Arformoterol das am stärksten wirksame Isomer darstellt [98].

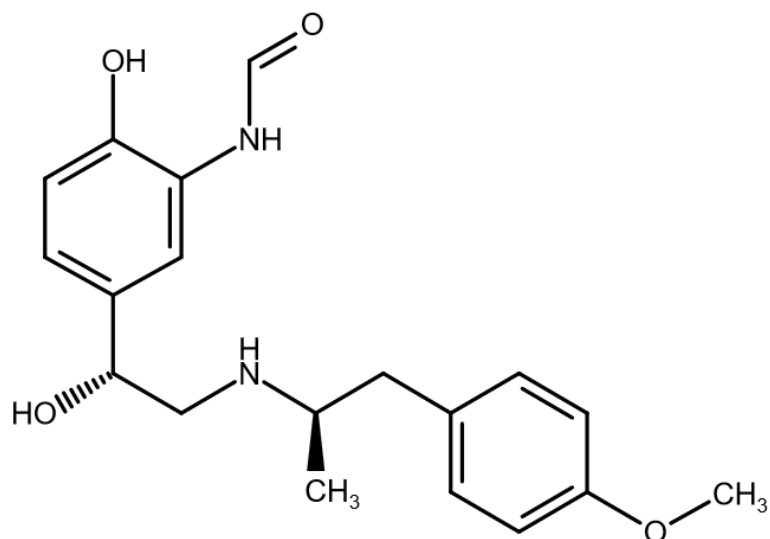


Abbildung 7: Strukturformel von Formoterol [98].

1.5 Zielsetzung der vorgelegten Arbeit

Im Rahmen dieser zahnmedizinischen Doktorarbeit soll untersucht werden, ob die induzierte Expression von P-Cadherin in Kopf-Hals-Tumorzellen eine Auswirkung auf die adrenerge Stimulationsfähigkeit dieser Zellen hat. Als *Readout* sollen funktionelle Eigenschaften wie vasculogene Mimikry, Migration, Proliferation und Invasion dienen. Weiterhin soll analysiert werden, ob sich die Aktivität bzw. Expression tumorassoziierter Proteine wie GSK-3 β , β -Catenin und PD-L1 in Kopf-Hals-Tumorzellen mit induzierter P-Cadherin Expression im Vergleich mit nicht-induzierten Leervektorkontrollen nach adrenerger Stimulation unterscheidet.

Als Modell wurden im Labor bereits etablierte Kopf-Hals-Tumorzellklone verwendet. Diese Zellen wurden stabil mit der kodierenden Sequenz von P-Cadherin transfiziert und zeigen unterschiedliche basale Expressionslevel. Sie werden als K2, K3, K4, K6 und K10 bezeichnet. Als Kontrollzellen wurden Tumorzellen verwendet, die mit Leervektor transfiziert wurden. Sie werden im Folgenden als Mockkontrollen bezeichnet.

2 Material

2.1 Zellen

Für die Herstellung der Zellklone K2, K3, K4, K6 und K10 diente ursprünglich die Kopf-Hals-Tumorzelllinie (HNSCC-Zelllinie) PCI 52. Diese Zelllinie exprimiert im natürlichen Zustand keine klassischen Adhäsionsmoleküle wie N-Cadherin, E-Cadherin oder P-Cadherin. Die Zellen wurden im Pittsburgh Cancer Institute, Pennsylvania, USA aus oralen Plattenepithelkarzinomen isoliert. Die aryepiglottische Falte stellte den Primärherd der verwendeten Zellen dar, die nach TNM-Klassifikation dem Stadium pT2N0M0 zugeordnet wurden. Das Karzinom wies dabei einen mäßigen Differenzierungsgrad (G2) auf.

Die für die Arbeit gestellten Zellen wurden mit dem Vektor pcDNA3.1D/-TOPO, der die stabile Expression von P-Cadherin bewirkt, transfiziert. Um auszuschließen, dass die alleinige Transfektion mit einem Vektor bestimmte Ergebnisse zu verantworten hat, wurden zur Kontrolle Zellen der Linie PCI 52 mit einem Leervektor versetzt, der keine P-Cadherin-Expression zur Folge hat. Für Versuche wurden dabei stets vier Klone der P-Cadherin exprimierenden Zellen, tPCI52 Klon 2, Klon 3, Klon 4 und Klon 6 (K2, K3, K4 bzw. K6), verwendet, die begrifflich der Übersichtlichkeit halber in den folgenden Abschnitten auch kurz als „Klone“ bezeichnet werden. Zudem wurden die beiden Zellklone Mock 1 und Mock 5 (M1 bzw. M5) der nicht P-Cadherin exprimierenden Zellen als Leervektorkontrollen unabhängig kultiviert und eingesetzt. Diese werden in den weiteren Textpassagen auch mit dem Begriff „Mocks“ versehen, um so eine überschaubare Gruppierung aus P-Cadherin exprimierenden „Klonen“ den nicht exprimierenden „Mocks“ gegenüberstellen zu können.

2.2 Medien für die Zellkultur

Die Zusammensetzung des für die Zellkultur verwendeten Mediums ist in Tabelle 2 dargestellt. Zur adrenergen Stimulation erfolgte eine Modifikation des Mediums unter Zugabe des jeweiligen Agonisten wie in Tabelle 3 und Tabelle 4 dargestellt.

OSCC-Medium

DMEM 1,0 g/l Glucose
+ 10 % Gibco Fetal Bovine Serum (FBS)
+ 2 mM L-Glutamin
+ 350 µg/ml Geneticin

Tabelle 2: Medium zur Kultivierung von OSCC-Zelllinien.

OSCC-Medium mit Agonisten f. α_2 -adrenerge Rezeptoren

DMEM 1,0 g/l Glucose
+ 1 % Gibco Fetal Bovine Serum (FBS)
+ 2 mM L-Glutamin
+ 350 µg/ml Geneticin
+ 10^{-8} M Brimonidintartrat

Tabelle 3: Medium mit α_2 -adrenergem-Agonisten.

OSCC-Medium mit Agonisten f. β_2 -adrenerge Rezeptoren

DMEM 1,0 g/l Glucose
+ 1 % Gibco Fetal Bovine Serum (FBS)
+ 2 mM L-Glutamin
+ 350 µg/ml Geneticin
+ 10^{-7} M Formoterolfumarat Dihydrat

Tabelle 4: Medium mit β_2 -adrenergem Agonisten.

2.3 Reagenzien und Lösungen

Reagenz bzw. Lösung	Hersteller, Ort
40 % Acrylamide/Bis Solution, 29:1	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Albumin Standard, c = 2,0 mg/ml	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
ATX Ponceau S red staining solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
BCA Solution	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, D
Brimonidintartrat (UK14,304-18; α_2 -adrenerger Agonist)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Bovine Serum Albumin (BSA), Fraction V	BIOMOL GmbH, Hamburg, D
Brilliant Blau G 250 (Coomassie)	Carl Roth GmbH & Co.
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Calciumchlorid	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, D
Casein from bovine milk	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Cell Proliferation Reagent WST-1	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
CuSO ₄ , 4 %	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, D
DMEM 1,0 g/l Glucose	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, D
Eisessig	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, D
Ethanol	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, D
Formoterolfumarat Dihydrat (β_2 -adrenerger Agonist)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
G-418 Solution (potency 892 μ g/mg)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Gelatine aus Schweinehaut	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Gibco Fetal Bovine Serum (FBS)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Glutaraldehyd, 25 % in H ₂ O	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, D
Glycerol 87 %	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Glycin	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, D
HCl, rauchend (37 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
H ₂ O DNase und RNasefrei, sterilfiltriert	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Isopropanol	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, D

Kristallviolett	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
L-Glutamin 200 mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Matrigel® Basement Membrane Matrix Growth Factor Reduced, c(Protein) = 8,8 mg/ml	Corning Inc., Corning, USA
Methanol	VWR International GmbH, Ismaning, D
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, D
Natriumchlorid (NaCl)	VWR International GmbH, Ismaning, D
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Phosphate buffered saline (PBS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Precision Plus Dual Color Protein Standards Größenmarker	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Proteaseinhibitor cOmplete ULTRA Tablets Mini EASYpack	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
RIPA Buffer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Roti®-Lumin 1 und 2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, D
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
Trypsin-EDTA, 10x	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D
TWEEN® 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, D

Tabelle 5: Verwendete Reagenzien und Lösungen.

2.4 Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
BD 10 ml Syringe	BD Biosciences, Bedford, MA, USA
Cellstar® Platten, flat bottom, transparent mit Deckel: 24 Wells, 48 Wells, 96 Wells	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Combitips advanced®, 100 µl, 5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, D
Corning™ CentriStar™ Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Corning Inc., Corning, USA
Gel-Blotting Papier, 0,34 mm; 580 x 680 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Kulturflaschen T25, T75	Corning Inc., Corning, USA
Microlance 3, 20 G Kanüle	BD Biosciences, Bedford, MA, USA
Omnifix® 100 Solo 1,0 ml Spritze	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Parafilm M	Bemis Company Inc., Neenah, WI, USA
Pipette Tip Eppendorf® Style 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
PVDF Western Blotting Membrane	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Rotilabo®-Spritzenfilter, PVDF, steril Porengröße 0,22 µm, Ø außen 33 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Serologische Pipetten: 2, 5, 10, 25 ml	Sarsted AG & Co, Nümbrecht, D
ThinCert™ 24 Well, 8,0 µm Poren, transluzent	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Zählkammer Cedex Smart Slides 1 x 8 Tests	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Zellophan-Folie	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Zellschaber	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D

Tabelle 6: Verwendetes Verbrauchsmaterial.

2.5 Geräte

Gerät	Hersteller
Brutschrank HERAcCell 240	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Elektrophoresekammer und Blotapparatur Mini-PROTEAN® Tetra System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Eppendorf Research® plus, Einkanalpipette, variabel 0,5 – 10 µl, 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, D
Geldokumentationssystem Chemi-Smart 5000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
GENios Plattenphotometer	Tecan Group Ltd., Männedorf, CH
Glasplatten für SDS-PAGE Mini-PROTEAN® Glass plates für 1,0 und 1,5 mm-Gele	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Invitrogen DryEase® Gel Drying System	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Kamera Digital Sight DS-U1	Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, NL
Laborschüttelgerät BlotBoy™	Benchmark Scientific Inc., Edison, NJ, USA
Lichtmikroskop CKX41	Olympus Corporation, Tokyo, JP
Lichtmikroskop Eclipse TE2000-U	Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, NL
Magnetrührer RCT basic	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, D
Mini-PROTEAN® Gel releaser	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Mini-PROTEAN® Kamm für 10 Taschen, 1,0 und 1,5 mm Gele	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Minizentrifuge Sprout™	Heathrow Scientific, Vernon Hills, IL, USA
Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS+ with Image Lab™ Software	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Multipette® plus	Eppendorf AG, Hamburg, D
Netzgerät PowerPac™ Basic	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Pipetus®-akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & CO. KG, Eberstadt, D

Präzisionswaage Talent TE2101	Sartorius AG, Göttingen, D
Sicherheitswerkbank Heraeus® HERAsafe®	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, D
Thermomixer Compact	Eppendorf AG, Hamburg, D
Ultraschall-Stab Bandelin Sonopuls	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, D
Vortex Genie2	Scientific Industries, New York, NY, USA
Wasserbad Typ 1008	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, D
Wippschüttler Typ MR-1 Mini Rocker	BioSan, Riga, LV
Zellzählgerät Cedex XS Analyzer	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Zentrifuge 3K-30	Sigma Laborzentrifugen, Osterode, D
Zentrifuge PerfectSpin 24 Plus	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Zentrifuge Rotana/P	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, D

Tabelle 7: Verwendete Geräte.

2.6 Puffer und Lösungen

2.6.1 Zellkultur

Komponente	Menge
Trypsin-EDTA, 10x	5 ml
PBS	45 ml

Tabelle 8: 1x Trypsin-EDTA, 50 ml.

Komponente	Menge
Brimonidintartrat 10^{-3} M	10 μ l
PBS	Ad 10 ml

Tabelle 9: Zusammensetzung α_2 -Agonist (UK) – Stocklösung 10^{-6} M, 10 ml.

Komponente	Menge
Formoterolfumarat Dihydrat	10 μ l
PBS	Ad 10 ml

Tabelle 10: Zusammensetzung β_2 -Agonist (FU) – Stocklösung 10^{-6} M, 10 ml.

Die Agonisten wurden aliquotiert in der Konzentration von 10^{-3} M zur Verfügung gestellt. Zur Verwendung für Versuchsansätze wurde eine 10^{-6} M Stocklösung hergestellt. Hierfür wurden die Agonisten auf Eis unter der Sterilbank aufgetaut und mit PBS auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Anschließend wurden die Lösungen mit Rotilabo®-Spritzenfiltern (Porengröße 0,22 μ l; Karl Roth) sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt.

Für die Versuchsansätze wurde in der Regel der α_2 -adrenerge-Agonist (UK) in 10^{-8} M und der β_2 -adrenerge Agonist (FU) in 10^{-7} M Konzentration eingesetzt. Hierzu wurde die vorbereitete 10^{-6} M Stocklösung des jeweiligen Agonisten mit PBS entsprechend weiter verdünnt.

2.6.2 Western Blot

2.6.2.1 Isolierung und Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Komponente	Menge
RIPA Buffer	10 ml
Proteaseinhibitor cComplete ULTRA Tablets	1 Tablette

Tabelle 11: Zusammensetzung des RIPA-Lysepuffers, 10 ml.

In 10 ml RIPA Buffer wurde eine Tablette cComplete ULTRA gelöst. Der Lysepuffer wurde aliquotiert bei -20°C gelagert.

Komponente	Menge
BCA-Solution	50 Teile
CuSO ₄ , 4 %	1 Teil

Tabelle 12: Zusammensetzung des BCA-Reagenz.

Die gebrauchsfertige BCA-Lösung wurde jeweils kurz vor der Verwendung frisch hergestellt.

2.6.2.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Komponente	Menge
Tris pH 6,8	300 mM
Glycerol	50 %
SDS	10 %
Bromphenolblau	0,02 %
β-Mercaptoethanol	4 %

Tabelle 13: Zusammensetzung des 5x Lämmli-Probenpuffers.

Komponente	Menge
H ₂ O	1,8 ml
Acrylamid, 40 %	1,25 ml
10 % SDS	50 µl
1 M Tris pH 8,8	1,9 ml
10 % APS/H ₂ O	25 µl
TEMED	5 µl

Tabelle 14: Zusammensetzung des 10 % Acrylamid-Trenngels; 1,0 mm dick.

Komponente	Menge
H ₂ O	2,9 ml
Acrylamid, 40 %	375 µl
10 % SDS	38 µl
1 M Tris pH 6,8	450 µl
10 % APS/H ₂ O	25 µl
TEMED	4 µl

Tabelle 15: Zusammensetzung des Sammelgels; 1,0 mm dick.

Zur Vorbereitung wurden die Glasplatten mit Isopropanol gesäubert und anschließend in die Gelgießstation eingespannt. Das Trenngel wurde eingefüllt und mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Isopropanol entfernt, das Sammelgel eingegossen und die Kämme hineingesteckt. Für 1,5 mm dicke Gele wurde mindestens die 1,5-fache Menge an Trenn- bzw. Sammelgel mit entsprechender Zusammensetzung wie in Tabelle 14 und Tabelle 15 aufgeführt hergestellt.

Komponente	Menge
Tris pH 8,5	250 mM
Glycin	1,92 M
SDS	1 %

Tabelle 16: Zusammensetzung des 10x SDS-PAGE-Laufpuffers.

Komponente	Menge
Tris pH 8,5	250 Mm
Glycin	1,92 M

Tabelle 18: Zusammensetzung des 10x Blotpuffers.

Komponente	Menge
Tris base	200 mM
NaCl	1,5 M
ddH ₂ O	ad. 1 L

Tabelle 20: Zusammensetzung des 10x TBS, pH 7,5.

NaCl und Tris wurden in ddH₂O gelöst und der pH-Wert von 7,5 wurde mit konzentrierter HCl eingestellt.

Komponente	Menge
10x SDS-PAGE-Laufpuffer	100 ml
ddH ₂ O	ad. 1 L

Tabelle 17: Zusammensetzung des 1x SDS-PAGE-Laufpuffers, 1 L.

Komponente	Menge
10x Blotpuffer	100 ml
Methanol	100 ml
ddH ₂ O	ad. 1 L

Tabelle 19: Zusammensetzung des 1x Blotpuffers, 1 L.

Komponente	Menge
10x TBS	100 ml
TWEEN® 20	1 ml
ddH ₂ O	ad. 1 L

Tabelle 21: Zusammensetzung des 1x TBST, 1 L.

2.6.2.3 Primärantikörper

1. Antikörper	Hersteller/Ort	c (Stock)	Host	Art des Antikörpers
α_{2B} -adrenerge Rezeptoren (extrazellulär)	alomone labs, Jerusalem, Israel	0,8 mg/ml	Rabbit	polyklonal
β_2 -adrenerge Rezeptoren	Abcam, Cambridge, UK	1 mg/ml	Rabbit	polyklonal
β -Aktin	Abcam, Cambridge, UK	0,1 mg/ml	Rabbit	polyklonal
β -Catenin	BD Biosciences, Bedford, MA, USA	0,25 mg/ml	Mouse	monoklonal
GSK-3 β	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	13 μ g/ml	Rabbit	monoklonal
P-Cadherin (N- terminal)	BD Biosciences, Bedford, MA, USA	0,25 mg/ml	Mouse	monoklonal
PD-L1	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	875 μ g/ml	Rabbit	monoklonal
P-GSK-3 β	Cell Signaling, Danvers, MA, USA	61 μ g/ml	Rabbit	monoklonal

Tabelle 22: Verwendete Primärantikörper zum Nachweis von β -Aktin, α_{2B} -/ β_2 -adrenergen Rezeptoren, β -Catenin, GSK-3 β , PD-L1, P-Cadherin (N-terminal) und P-GSK-3 β . c = Konzentration.

2.6.2.4 Sekundärantikörper

2. Antikörper	Hersteller/Ort	c (Stock)	Host	Reaktiv gegen
Goat anti-mouse IgG (H+L), HRP konjugiert	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA	0,01 mg/ml	Goat	Mouse
Goat anti-rabbit IgG (H+L), HRP konjugiert	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA	0,01 mg/ml	Goat	Rabbit

Tabelle 23: Verwendete Sekundärantikörper (HRP-konjugiert). c = Konzentration.

2.6.3 Zymogramm

Komponente	Menge	Konzentration
ddH ₂ O	1,72 ml	
Acrylamid, 40 %	1,125 ml	10 %
10 % SDS	45 µl	0,1 %
1 M Tris pH 8,8	1,125 ml	250 mM
10 % APS/H ₂ O	30 µl	0,07 %
1 % Gelatine/H ₂ O	450 µl	0,1 %
TEMED	4,5 µl	0,1 %
	Σ 4,5 ml	

Tabelle 24: Zusammensetzung des Zymogramm-Trenngels mit Gelatine; 1 mm dick

Komponente	Menge	Konzentration
ddH ₂ O	1,72 ml	
Acrylamid, 40 %	1,125 ml	10 %
10 % SDS	45 µl	0,1 %
1 M Tris pH 6,8	1,125 ml	250 mM
10 % APS/H ₂ O	30 µl	0,07 %
Casein (c=20 mg/ml)	450 µl	2 mg/ml
TEMED	4,5 µl	0,1 %
	Σ 4,5 ml	

Tabelle 25: Zusammensetzung des Zymogramm-Trenngels mit Casein; 1 mm dick

Komponente	Menge	Konzentration
ddH ₂ O	2,8 ml	
Acrylamid, 40 %	506 µl	4,5 %
10 % SDS	45 µl	0,1 %
1 M Tris pH 8,8	1,125 ml	250 mM
10 % APS/H ₂ O	22,5 µl	0,05 %
TEMED	15 µl	0,33 %
	Σ 4,5 ml	

Tabelle 26: Zusammensetzung des Zymogramm-Sammelgels; 1 mm dick. Verwendet für Casein- und Gelatine-Zymographie.

Komponente	Menge
Tris-HCl, pH 8	20 mM
EDTA	2 mM
Glycerol	20 %
SDS	2 %
Bromphenolblau	0,02 %
ddH ₂ O	ad.

Tabelle 27: Zusammensetzung des 2x Proben-Ladepuffers für Zymogramme.

Komponente	Menge
Triton X-100	2,5 %
ddH ₂ O	ad.

Tabelle 28: Zusammensetzung des Renaturierungspuffers.

Komponente	Menge
Tris-HCl, pH 8,5	50 mM
CaCl ₂	5 mM
ddH ₂ O	ad.

Tabelle 29: Zusammensetzung des Zymogramm-Verdaupuffers (500 ml).

Komponente	Menge
Brilliant Blau G 250	0,25 % (w/v)
Eisessig	10 %
Isopropanol	25 %
ddH ₂ O	ad.

Tabelle 30: Zusammensetzung der Coomassie-Färbelösung.

Komponente	Menge
Methanol	50 %
Eisessig	10 %
ddH ₂ O	ad.

Tabelle 31: Zusammensetzung der Entfärbelösung I.

Komponente	Menge
Methanol	5 %
Eisessig	7,5 %
ddH ₂ O	ad.

Tabelle 32: Zusammensetzung der Entfärbelösung II.

Komponente	Menge
Ethanol	25 %
Glycerol	5 %
ddH ₂ O	ad.

Tabelle 33: Zusammensetzung der Entwässerungslösung.

Zur Herstellung von 2,5 ml der Casein-Lösung mit der Konzentration von 20 mg/ml wurden 0,05 g Casein (Sigma-Aldrich) in 1 ml ddH₂O und 500 µl 1 M NaOH gelöst und anschließend auf ein Volumen von 2,5 ml eingestellt.

Das Gießen der Zymogramm-Gele erfolgte wie in Punkt 2.6.2.2 beschrieben aus Trenn- und Sammelgel. Es wurden ausschließlich 1,0 mm dicke Gele verwendet.

Um die Coomassie-Färbelösung herzustellen, wurde der Farbstoff Brilliant Blau G 250, der zum Anfärben von Proteinen auf Polyacrylamidgelen verwendet wird, zuerst in Isopropanol gelöst und anschließend wurden Eisessig und Wasser hinzugefügt.

2.7 Software

Programm	Unternehmen/Ort	Verwendung
Cedex XS Software Version 1.0.4	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D	Bestimmung der Zellzahl
Chemi-Capt 5000 Version 12.8	VILBER LOURMAT Deutschland GmbH, Eberhardzell, D	Dokumentation der Chemilumineszenz (Western Blot)
GraphPad Prism 6	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA	Darstellung von Graphen, statistische Auswertung
ImageJ 1.50i	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA	Analyse beim Assay zur Untersuchung vaskulogener Mimikry
Image Lab™ 6.0	Bio-Rad Laboratories, GmbH, München, D	Dokumentation von Zymogramm-Gelen
Magellan6	Tecan Group Ltd., Männedorf, CH	Photometrische Messungen (BCA Protein-Assay, Kristallviolett-Assay, WST-Proliferations-Assay)
NIS-Elements AR 3.2	Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, NL	Kamerasteuerung für Nikon Digital Sight DS-U1 (Lichtmikroskop)
Photoshop CS4 extended Version 11.0.2	Adobe Systems Inc, San Jose, CA, USA	Bildbearbeitung und Flächenvermessung

Tabelle 34: Verwendete Software.

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 2D-Zellkultur

Die P-Cadherin exprimierenden OSCC-Zellen („Klone“) und die das Oberflächenprotein nicht exprimierenden Leervektorkontrollen („Mocks“) der Zelllinie PCI 52 wurden zumeist in T75- und, seltener für kleinere Zellmengen, auch in T25-Kulturflaschen kultiviert. Hierfür wurden die Zellen im Brutschrank HERAcell 240 (Thermo Scientific) bei 37°C und 5 % CO₂ aufbewahrt. Bei einer Konfluenz von etwa 70-80 % wurden die Zellen passagiert.

Zu diesem Zweck wurde zuerst das alte Medium abgesaugt und die Zellen anschließend mit PBS gewaschen (10 ml für T75-, 5 ml für T25-Kulturflaschen). Nun wurden die OSCC-Zellen mit 1 x Trypsin-EDTA (Tabelle 5) überschichtet und kurz bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert, bis alle Zellen die Adhäsion zum Flaschenboden aufgaben. Dies wurde mechanisch durch seitliches Klopfen auf die Kulturflaschen unterstützt und das Ablösen wurde optisch im Lichtmikroskop (Olympus) kontrolliert. Anschließend wurden die Zellen im serumhaltigen Kulturmedium (Tabelle 2) resuspendiert und in gewünschter Konzentration in neue Zellkulturflaschen ausgesät.

3.1.2 Ermittlung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl der 2D-kultivierten OSCC-Zellen wurden diese nach dem Ablösen mit 1x Trypsin-EDTA in serumhaltigem Medium oder PBS resuspendiert. Von dieser Suspension wurde ein Volumen von etwa 20 µl in eine Kammer einer Cedex Smart Slide Zählkammer (Roche Diagnostics) pipettiert. Alsdann erfolgte die Analyse im Zellzählgerät Cedex XS Analyzer (Roche Diagnostics) und die Bestimmung der Zellzahl mithilfe der Software Cedex XS (Roche Diagnostics) in der Einheit Zellen/ml.

3.2 Proteinbiochemie

3.2.1 Proteinisolation aus den 2D-Zellkulturen

Zur Isolation der Zellproteine wurden die OSCC-Zellen bis zu einer Konfluenz von 60 – 70 % bzw. 90 – 100 % im jeweiligen Medium kultiviert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen, um einer Verunreinigung der Probe durch Serumproteine des Kulturmediums vorzubeugen. Nun wurde erneut PBS (10 ml für T75- bzw. 3-5 ml für T25-Flaschen) in die Kulturflasche pipettiert, um die Zellen dann mithilfe eines Zellschabers (Sarstedt) vom Flaschenboden abzulösen. Die so entstandene Zellsuspension wurde nun in auf Eis bereitstehende Zentrifugenröhrchen (Corning Inc.) überführt und 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert (Zentrifuge Rotana/P; Andreas Hettich GmbH). Der Überstand wurde verworfen und das so gewonnene Zellpellet in 100 bis 200 µl RIPA-Lysepuffer (Tabelle 11) resuspendiert. Die Zellen wurden nun für etwa 30 min auf Eis inkubiert und unter zeitweiliger Zuhilfenahme des Vortex Genie2 (Scientific Industries) lysiert.

Im nächsten Schritt wurden die Proben zusätzlich mittels des Ultraschallstabes Bandelin Sonopuls (BANDELIN electronic; Einstellung: 20 s, 2 Zyklen, 50 %) homogenisiert und weitere Zeit auf Eis inkubiert. Zur Befreiung von Zellfragmenten erfolgte die Zentrifugation (Zentrifuge 3K-30; Sigma Laborzentrifugen) bei 4°C und 13.000 rpm für 10 min. Der so gewonnene Überstand wurde nun in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zu seiner Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des BCA-Assays bestimmt. Dieser beruht, wie in Abbildung 8 dargestellt, auf einer zweistufigen Reaktion, durch die ein violetter Kupferkomplex entsteht, der photometrisch quantifiziert werden kann: Unter alkalischen Bedingungen werden im ersten Schritt Cu^{2+} -Ionen in einer Biuret-Reaktion zu Cu^+ -Ionen reduziert, die anschließend mit zwei Molekülen Bicinchoninsäure einen Farbkomplex, der ein Absorptionsmaximum bei 562 nm aufweist, bilden [101]. Zur Durchführung wurde mit Probenreplets gearbeitet, um anschließend einen Mittelwert bilden zu können.

Auf eine Cellstar® 96 Well Platte (flat bottom, Greiner Bio-One) wurden zur Erstellung einer Standardkurve zuerst jeweils 10 µl eines Protein-Standards in einer aufsteigenden bekannten Konzentration aufgetragen. Der Standard wurde zuvor durch Verdünnung mit RIPA-Lysepuffer (Sigma Aldrich) aus Albumin Standard (c=2,0 mg/ml, Thermo Scientific) in den Konzentrationen 25, 50, 125, 250, 500, 750, 1000 und 1500 µg/ml hergestellt und bei -20°C aufbewahrt. Für den Nullwert wurde reiner RIPA-Lysepuffer ohne Albumin-Zusatz verwendet.

Von den Proben wurde immer ein Volumen von 2 µl (entspricht einer Verdünnung von 1:5 im Vergleich zu den 10 µl eingesetztem Volumen des Protein-Standards) aufgetragen, um Absorptionswerte außerhalb des Messbereiches zu vermeiden. Anschließend erfolgte die Zugabe von 200 µl BCA-Reagenz (Tabelle 12) in jedes Well und eine Inkubation der Platte für 30 min bei 37 °C. Nun wurde die Platte kurz auf 4°C abgekühlt, um die Farbreaktion zu stoppen und die Absorption wurde bei 595 nm im GENios Plattenphotometer (Tecan Group) gemessen. Mithilfe der Software Magellan6 (Tecan Group) konnte so aus den ermittelten Werten eine Standardkurve erstellt werden und anhand dieser die Konzentration der Proben unter Berücksichtigung der vorherigen 1:5 Probenverdünnung beim Auftragen berechnet werden. Die Angabe der Proteinkonzentration erfolgte dabei in µg/ml.

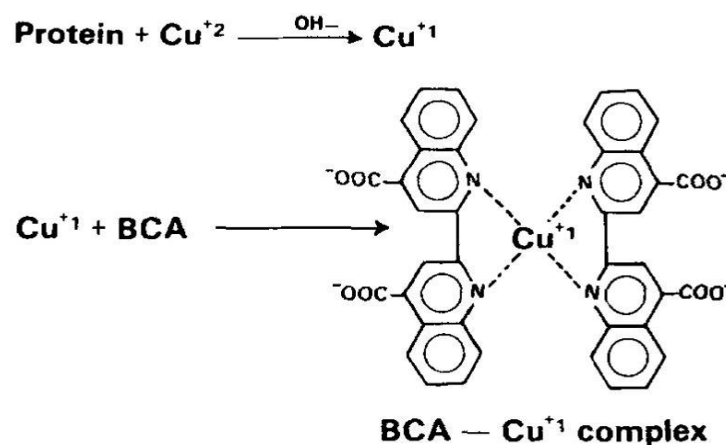


Abbildung 8: Stufen der Nachweisreaktion im BCA-Assay.

Im ersten Schritt reagieren Cu^{2+} -Ionen in basischem Milieu in einer Biuretreaktion in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration zu Cu^{+} -Ionen. Diese bilden in einem zweiten Schritt mit je 2 BCA-Molekülen einen violetten Komplex mit Absorptionsmaximum bei 562 nm. Aus: [101].

3.2.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen in Proben nach ihrer Molekülgröße wurde die Sodium Dodecyl Sulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Hierfür werden die Proteinmoleküle in Anwesenheit von β -Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) unter reduzierenden Bedingungen mit SDS-Molekülen versetzt. Mit Hilfe der negativen Ladung von SDS wird die ursprüngliche Ladung der Proteine maskiert. Die so gewonnene Negativladung steht nun im Verhältnis zur jeweiligen Proteingröße: je kleiner das Molekül, desto schneller laufen die Proteine unter Anlegen einer elektrischen Spannung durch das Polyacrylamid-Gel zur Anode [102].

3.2.3.1 Vorbereitung der Proben

Die gefrorenen zu analysierenden Proben wurden auf Eis aufgetaut und mit Wasser und 5x Lämmli-Probenpuffer (Tabelle 13) vermischt, um ein einheitliches Volumen (20-35 μ l) mit gleicher Proteinmenge zu erzielen. Nach gründlichem Durchmischen mit dem Vortex Genie2 (Scientific Industries) wurden die Proben für 10 min bei 70 °C im Thermomixer Compact (Eppendorf) denaturiert.

Komponente	Menge
Probe	20 – 30 μ g Protein
5x Lämmli-Probenpuffer (Tabelle 13)	20 %
ddH ₂ O	ad. jew. Volumen

Tabelle 35: Vorbereitung der Proben für SDS-PAGE.

3.2.3.2 Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der Proben wurde ein 10 % Acrylamid-Trenngel und Sammelgel verwendet, bestehend aus polymerisierter 40 % Acrylamide/Bis Solution, 29:1 (Bio-Rad Laboratories) mit N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED, Sigma-Aldrich). Gestartet wurde die Polymerisation mit Ammoniumpersulfat (Sigma-Aldrich). Die Zusammensetzung und Herstellung des Gels ist unter Punkt 2.6.2.2 beschrieben.

Für die Elektrophorese wurden die Gele in die Halterungen gespannt und die Kammer mit 1x SDS-PAGE-Laufpuffer (Tabelle 17) befüllt. Es wurden die Kämme herausgezogen und die einzelnen Taschen mit Hilfe einer Spritze gespült. Die erste Tasche eines jeden Gels wurde immer mit 10 µl Precision Plus Dual Color Protein Standard (Bio-Rad Laboratories) beladen und die übrigen Taschen mit den vorbereiteten Proben befüllt.

Anschließend wurden die Gele in die Elektrophoresekammer gestellt, die ebenfalls mit 1x SDS-PAGE-Laufpuffer (Tabelle 17) befüllt wurde. Es wurde eine Spannung von 70 V angelegt, die auf 90 V erhöht wurde, sobald die Lauffront vom Sammel- in das Trenngel übergegangen war. Der Lauf wurde gestoppt, sobald die Proben den unteren Rand des Gels erreichten.

3.2.4 Western Blot

Zur gezielten Detektion mittels spezifischer Antikörper mussten die Proteine vom Acrylamid-Gel auf eine PVDF *Western Blotting Membrane* (Roche Diagnostics) überführt werden, nachdem sie durch SDS-PAGE ihrer Größe nach aufgetrennt worden waren. Hierzu wurde das Tank-Blot-Verfahren angewandt.

Pro Gel wurden hierfür zwei Schwämme, vier Blotting-Papiere (Carl Roth) und eine PVDF Membran (Roche Diagnostics) benötigt. Diese Materialien wurden in 1x Blotpuffer (Tabelle 19) eingeweicht. Die hydrophobe PVDF-Membran wurde zuvor über 5 min in Methanol aktiviert. Die Reihenfolge in der Blottingkassette stellt sich wie folgt dar: Schwamm – 2 Blotting-Papiere – Gel – PVDF-Membran – 2 Blotting-Papiere – Schwamm.

Nach der Elektrophorese wurde das Acrylamid-Gel unter Zuhilfenahme eines Plastikspatels (Mini-PROTEAN® Gel releaser; Bio-Rad Laboratories) aus den Glasplatten entnommen und nach Entfernung des Sammelgels auf die erste Schicht Blotting-Papier in die Transferkassette eingebracht. Die weiteren Schichten (PVDF-Membran, 2 Blotting-Papiere und Schwamm) wurden hinzugefügt und durch vorsichtiges Überrollen mit einem Corning™ CentriStar™ Zentrifugenröhrchen (Corning Inc.) wurde unerwünschten Blasen zwischen Gel und Membran vorgebeugt. Die nun beladene Transferkassette wurde nun in der Blottingkammer positioniert und ein gefrorener Kühlakku wurde hinzugefügt. Die Transferkammer wurde anschließend mit 1x Blottingpuffer aufgefüllt, um die Proteine schließlich bei konstanter Stromstärke von 140 mA 1 h lang vom Trenngel auf die PVDF-Membran zu überführen.

Sobald die Übertragung auf die Membran abgeschlossen war, wurde diese, je nach Anforderungen laut Datasheet für den jeweiligen Primärantikörper, mit Milchpulver/TBST (Milchpulver; Carl Roth) bzw. BSA/TBST (*Bovine Serum Albumine, Fraction V*; BIOMOL) 1 h lang inkubiert, um restliche freie Bindungsstellen an der Membran zu blockieren.

Anschließend wurde der Primärantikörper, ebenfalls wie im jeweils zugehörigen Datasheet gefordert, mit Milchpulver/TBST bzw. BSA/TBST 1:1.000 verdünnt (siehe Tabelle 36). Diese Antikörperlösung wurde auf die Membran gegeben, die dann unter Schütteln (Wippschüttler Typ MR-1 Mini Rocker; BioSan) im Kühlschrank bei 4°C über Nacht inkubiert wurde.

1. Antikörper	Verdünnung	Entspricht c (AK)	Größe des Proteins
α_{2B} -adrenerge Rezeptoren (extrazellulär)	1:1.000	0,8 µg/ml	72 kDa
β_2 -adrenerge Rezeptoren	1:1.000	1 mg/ml	46 kDa
β -Aktin	1:10.000	0,01 µg/ml	42 kDa
β -Catenin	1:1.000	0,25 µg/ml	92 kDa
GSK-3 β	1:1.000	0,013 µg/ml	46 kDa
P-Cadherin (N-terminal)	1:500	0,5 µg/ml	120 kDa
PD-L1	1:1.000	0,874 µg/ml	40-50 kDa
P-GSK-3 β	1:1.000	0,061 µg/ml	46 kDa

Tabelle 36: Verwendete Primärantikörper.

Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für je 5 min mit TBST (Tabelle 21) gewaschen und anschließend mit dem entsprechenden HRP-konjugierten Sekundärantikörper (siehe Tabelle 37) unter Schütteln für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurde erneut für dreimal je 5 min mit TBST gewaschen, um überschüssigen Sekundärantikörper zu entfernen.

2. Antikörper	Verdünnung	Entspricht c (AK)
Goat anti-mouse IgG (H+L), HRP konjugiert	1:1.000	0,01 µg/ml
Goat anti-rabbit IgG (H+L), HRP konjugiert	1:1.000	0,01 µg/ml

Tabelle 37: Verwendete Sekundärantikörper.

Um nun die gesuchten Proteine mit Chemilumineszenz darstellen zu können, wurde Roti®-Lumin 1 und Roti®-Lumin 2 (beides Carl Roth) im Dunkeln auf Raumtemperatur erwärmt und anschließend je 500 µl Lumin 1 und 2 miteinander vermischt. Die gewaschene auf Parafilm M (Bemis) bereitgelegte Membran wurde nun mit der Entwicklersubstanz benetzt und unter Schwenken für 5 min inkubiert. Die Membran wurde dann nach Abtropfen des überschüssigen Lumins zwischen zwei Klarsichtfolien positioniert und im Geldokumentationssystem Chemi-Smart 5000 (PepLab Biotechnologie) nach 1, 5, 10, 15, 20 bzw. 30 min Belichtungszeit fotografiert.

Bei schwacher Chemilumineszenz wurde das Entwicklerreagenz SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific) verwendet. Wie bei Roti®-Lumin wurden hierfür auch jeweils 500 µl von Komponente 1 und 2 vermischt und auf die Membran gegeben. Die Belichtungszeit im Geldokumentationssystem wurde allerdings auf 5, 10, 30, 60 bzw. 300 s verringert.

3.2.5 Zymographie

Mit Hilfe der Zymographie lassen sich Matrixmetalloproteinasen (MMPs) nachweisen. Hierzu wird ein Acrylamid-Gel mit Gelatine (Tabelle 24) bzw. Casein (Tabelle 25) als Substrat für jeweils nachzuweisende MMPs hergestellt. Dabei kann die Gelatinaseaktivität von MMP-2 und -9 und in hohen Konzentrationen auch von MMP-1, -8 und -13 detektiert werden. Mit Casein kann die Anwesenheit von MMP-1, -3, -7, -10, -11 (nicht jedoch der nativen Form von MMP-11), -12 und -13 untersucht werden. In hohen Konzentrationen kann hier zusätzlich MMP-9 nachgewiesen werden [103]. Um überschüssiges freies Casein aus den Gelen zu entfernen, wurden Casein-Gele erst nach 1 h Puffervorlauf bei 20 mA/Gel verwendet. Freies Casein würde ansonsten bei der Auftrennung der Proben im elektrischen Feld mitlaufen und so entstünde ein unerwünschter Casein-Gradient im Gel.

Die Detektion und Identifikation von MMPs erfolgte anhand ihres Molekulargewichtes und der Nachweisbarkeit im jeweiligen Substrat. Hierfür wurden die Proben elektrophoretisch aufgetrennt.

Als Proben wurden Überstände der Zellkultur verwendet, wobei mit serumfreiem Medium gearbeitet wurde, um Verunreinigungen zu vermeiden. Nachdem die Zellen 24 h mit dem Medium ohne Zusatz bzw. unter Anwesenheit von α_2 - oder β_2 -adrenergem Agonisten kulti-

viert worden waren, wurde der Überstand abgenommen, Zellfragmente durch 5-minütige Zentrifugation bei 1.200 rpm entfernt und die Proteinkonzentration nach dem BCA-Verfahren ermittelt (siehe Punkt 3.2.2).

Gelatinegele wurden mit einer Gesamtproteinmenge von je 3 μg pro Tasche beladen. Hierfür wurden zur Vorbereitung entsprechende Mengen der Proben auf Eis mit ddH₂O auf ein Volumen von 10 μl gebracht und im Verhältnis 1:1 mit 2x Zymogramm-Ladepuffer (Tabelle 27) gemischt. Das Gesamtvolumen bei Gelatine-Zymogrammen betrug somit 20 μl .

Bei der Casein-Zymographie mussten höhere Proteinkonzentrationen eingesetzt werden, da diese weniger sensitiv ist als Gelatine-Zymographie. Es wurde also mit einer Gesamtproteinmenge von 10 anstatt 3 μg gearbeitet, die auf ein Volumen von 15 μl eingestellt wurde. Auch hier wurde der 2x Zymogramm-Ladepuffer (Tabelle 27) im Verhältnis 1:1 zugegeben, sodass das Volumen pro Probe 30 μl betrug.

Die Auftrennung erfolgte in Anwesenheit von SDS, im Unterschied zur Elektrophorese beim Western Blot allerdings unter nicht-reduzierenden Bedingungen. Analog zur SDS-PAGE wurden die Halterungen mit den Gelen mit 1x SDS-PAGE-Laufpuffer (Tabelle 17) gefüllt, die Kämme aus dem Gel gezogen und die Taschen gespült. Bei Casein-Gelen wurde wie erwähnt ein Vorlauf durchgeführt. Anschließend wurden die Gele mit den Proben beladen und in die Elektrophoresekammer gestellt, die ebenfalls mit Laufpuffer gefüllt wurde. Die erste Tasche pro Gel wurde immer mit 10 μl Größenmarker Precision Plus Protein Dual Color Standard (Bio-Rad Laboratories) beschickt. Die gesamte Kammer wurde für den Vorgang der Auftrennung in eine Box mit Eis gestellt und es wurde eine Stromstärke von 20 mA pro Gel angelegt, bis die 25 kDa Bande des Markers aus dem Gel hinausgelaufen war.

Bei Raumtemperatur wurden anschließend die Gele nach Entnahme aus den Glasplatten zweimal 30 min in Renaturierungspuffer (Tabelle 28) gewaschen, damit durch Triton X-100 (Sigma-Aldrich) das SDS aus dem Gel entzogen wurde. Danach wurden die Gele viermal 5 min lang mit ddH₂O gewaschen, um den überschüssigen Renaturierungspuffer zu entfernen und schließlich bei 37°C mit Verdaupuffer (Tabelle 29) inkubiert. Gelatine-Gele wurden drei, Casein-Gele vier Tage lang verdaut. Um der Verdunstung des Verdaupuffers im Brutschrank vorzubeugen, wurde die Box mit dem Gel zur Abdichtung mit Parafilm M (Bemis) umwickelt.

Schließlich wurde das Gel über 2 h hinweg unter Schütteln bei Raumtemperatur mit Coomassie Blue (Tabelle 30) angefärbt und überschüssige Färbelösung 30 min mit Entfärbelösung I

(Tabelle 31) und über Nacht mit Entfärbelösung II (Tabelle 32) entfernt. Zur Entfernung des Wassers wurde das Gel nun zweimal 30 min in Entwässerungslösung (Tabelle 33) gewaschen und anschließend im Dokumentationssystem Molecular Imager[®] ChemiDoc[™] XRS+ with Image Lab[™] Software (Bio-Rad Laboratories) fotografiert. Abschließend wurde das Gel ein bis zwei Tage lang mithilfe des Invitrogen DryEase[®] Gel Drying Systems (Thermo Scientific) zwischen zwei in Entwässerungslösung getränkten Zellophanfolien (Carl Roth) aufgespannt, um es zu trocknen.

3.3 Funktionelle Versuchsmodelle

Zur Untersuchung des biologischen Verhaltens der Zellen wurden verschiedene funktionelle Assays durchgeführt. Hierfür wurde in verschiedenen Modellen das Verhalten der Zellen hinsichtlich der Invasion, Migration, Proliferation und der Fähigkeit zur Ausbildung vaskulogener Mimikry analysiert.

3.3.1 Invasionsassay

Um Zellen hinsichtlich ihrer Invasionsfähigkeit zu untersuchen, wurde in vitro ein Invasionsassay nach dem Prinzip der Boydenkammer durchgeführt [104].

3.3.1.1 Prinzip des Invasionsassays

Der Versuch findet, wie in Abbildung 9 dargestellt, in einem System bestehend aus zwei Kompartimenten statt. Die Trennung der beiden Kammern erfolgt durch eine Membran, die für die Zellen durch Poren mit einem Durchmesser von 8 μm durchdringbar ist. Auf der Membran ist eine Schicht Matrigel[®] zur Simulation der Basalmembran aufgebracht, sodass diese von Zellen invadiert werden muss, um von einem Kompartiment in das andere zu gelangen. Nach einer festgelegten Inkubationszeit werden die Zellen, die auf die Unterseite der Membran gelangen konnten, fixiert und angefärbt. Anschließend kann photometrisch vermessen werden, wie hoch die Fähigkeit der Zellen zur Invasion ist.

Das verwendete wachstumsfaktorreduzierte Matrigel® Basement Membran Matrix-Gel (c = 8,8 mg/ml; Corning) besteht zu ca. 60 % aus Laminin, 30 % Kollagen Typ IV und 8 % Nidogen. Es wird aus dem Engelbreth-Holm-Swarm (EHS)-Maussarkom isoliert und geliert bei Temperaturen über 10°C. Es ist hinsichtlich seiner Zusammensetzung ähnlich der humanen Basalmembran *in vivo* [105].

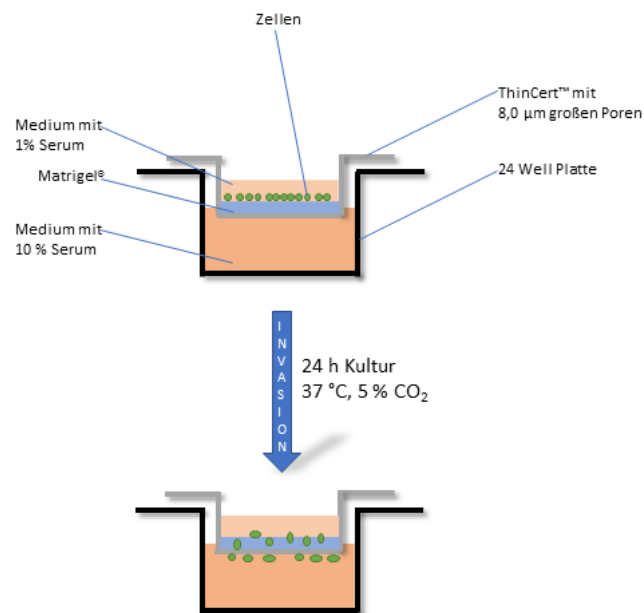


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Invasionsassays.

Zellen werden im oberen Kompartiment in OSCC Medium (Tabelle 2) mit 1 % FBS auf Matrigel® ausgesät. Das untere Kompartiment enthält OSCC Medium mit 10 % FBS, sodass invasive Zellen während der Kultur über 24 h entlang eines chemotaktischen Gradienten durch das Matrigel® und die Membranporen wandern und sich anschließend auf der Unterseite der Membran festsetzen können.

Das untere Kompartiment wurde durch die Wells einer Cellstar® Platte (flat bottom, transparent, 24 Wells; Greiner Bio-One) gebildet. Um einen chemotaktischen Gradienten zwischen den beiden Kammern aufzubauen, wurden in die einzelnen Wells auf der Platte je 600 µl des OSCC Mediums mit 10 % FBS (Tabelle 2) pipettiert, ehe ThinCerts™ (Greiner Bio-One), in denen OSCC Medium mit lediglich 1 % FBS eingesetzt wird, auf die Wells verteilt wurden.

Die ThinCerts™ mit 8,0 µm großen Poren am Boden bildeten im Versuchsansatz das obere Kompartiment der Boydenkammer. Zuvor wurden diese mit 30 µl Matrigel® beschichtet, das über Nacht bei 4°C auf Eis im Kühlschrank aufgetaut und mit serumfreiem kaltem DMEM 1,0 g/l Glucose (PAN-Biotech) auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt worden war.

Zum Gelieren des Matrigels® wurden die derart vorbereiteten 24 Well Platten für 30 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Pro Bedingung wurden Triplikate von je 100 µl der vorbereiteten Zellsuspension (siehe unten) in die ThinCerts™ ausgesät, sodass sich pro Well jeweils 200.000 Zellen im oberen Kompartiment befanden. Anschließend wurden die Zellen 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert.

3.3.1.2 Auswirkung der Agonisten auf die Invasion

Zur Untersuchung einer etwaigen Auswirkung des α_2 - bzw. β_2 -adrenergen Agonisten auf die Invasionsfähigkeit der OSCC-Zellen wurden diese vor der Aussaat in verschiedenen Medien resuspendiert.

Die Zellen, die in T75-Kulturflaschen herangezogen worden waren, wurden mit Trypsin abgelöst und durch 5-minütiges Zentrifugieren bei 1.200 rpm (Zentrifuge Rotana/P; Andreas Hettich) und Resuspendieren in PBS gewaschen und dann erneut zentrifugiert. Anschließend wurde pro Zellklon je eine Suspension in agonistenfreiem OSCC Medium mit 1 % FBS (Zusammensetzung wie in Tabelle 2, nur entsprechend angepasste FBS-Konzentration), Medium mit α_2 -adrenergem Agonisten (Tabelle 3) und Medium mit β_2 -adrenergem Agonisten (Tabelle 4) hergestellt. Die Zellkonzentration wurde immer auf 2 Mio. Zellen pro ml eingestellt.

Es konnten also die Bedingungen Zellen + nur Medium, Zellen + α_2 -Agonist und Zellen + β_2 -Agonist für den Versuch eingesetzt werden. Der α_2 -adrenerge Agonist wurde ursprünglich in 10^{-8} M und der β_2 -adrenerge Agonist in 10^{-7} M Konzentration verwendet. Es erfolgte zusätzlich ein abschließender Versuchsansatz, in dem die beiden Agonisten in jeweils 10-facher Konzentration (10^{-7} M für den α_2 -adrenergen bzw. 10^{-6} M für β_2 -adrenergen Agonisten) eingesetzt wurden. Die Agonisten befanden sich ab dem Zeitpunkt der jeweiligen Aussaat im Medium der entsprechenden Zellen und es erfolgte eine Inkubation über 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank. In dieser Zeit sollten die Zellen wie im Vorversuch festgestellt ausreichend invadieren, um etwaige Unterschiede zwischen den Zellen oder aufgrund adrenerger Stimulation detektieren zu können.

3.3.1.3 Auswertung per Kristallviolett-Assay

Um die Zahl der invadierten Zellen quantifizieren zu können, wurden diese mit Kristallviolett angefärbt, überschüssiges Kristallviolett abgespült und somit lediglich die in den Zellen gebundene Farbe in Ethanol gelöst. Die nun photometrisch messbare Farbintensität ist abhängig von der Anzahl der Zellen, die zur Unterseite der Membran vordringen konnten.

Zur Durchführung des Assays, der schematisch in Abbildung 10 dargestellt ist, wurden die ThinCerts™ nach dem Invasionsassay in eine 24 Well Platte mit je 250 µl PBS umgesetzt und unter Schütteln für 5 min gewaschen. Anschließend wurden die ThinCerts™ für 30 min in je 250 µl 1 % Glutaraldehyd/H₂O unter Schwenken fixiert, erneut zweimal für 5 min in je 250 µl PBS gewaschen und schüttelnd 15 min lang in je 250 µl 0,02 % Kristallviolett/H₂O gefärbt. Nun wurden die Platten mit den ThinCerts™ unter fließendem Leitungswasser gewaschen, um ungebundenes Kristallviolett zu entfernen und unter Zuhilfenahme von feuchten Wattestäbchen wurden Reste des Matrigels® und die Zellen auf der Membranoberseite, d.h. nicht invadierte Zellen, entfernt.

Schließlich wurde das von den Zellen der Membranunterseite aufgenommene Kristallviolett unter einstündigem Schütteln in je 150 µl 70 % Ethanol/H₂O pro Well gelöst. Zur photometrischen Messung wurden je 100 µl der Lösung auf eine 96 Well Platte pipettiert und 100 µl des 70 % Ethanol/H₂O als Blank eingesetzt. Die Messung der Absorption erfolgte im GENios Plattenphotometer (Tecan Group) bei einer Wellenlänge von 595 nm.

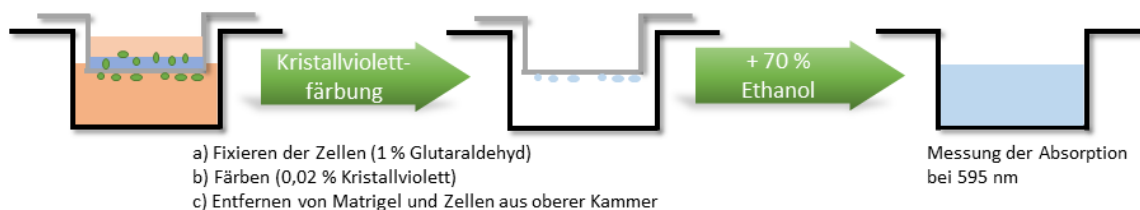


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Kristallviolett-Assays.

Nach Beendigung des Invasionsassays erfolgt die Fixierung und Färbung der Zellen und anschließend die Entfernung des Matrigels® aus dem oberen Kompartiment. Der von den Zellen aufgenommene Farbstoff wird in Ethanol gelöst und es wird die Absorption der Lösung bei 595 nm gemessen.

3.3.2 Migrationsassay

Die Fähigkeit der Zellen zur Migration wurde in einem funktionellen Assay ähnlich des Invasionsversuchs analysiert. Auch dieser Versuch ist aus einem System mit zwei Kompartimenten, die durch eine poröse Membran getrennt sind, aufgebaut. Hier wird allerdings im Gegensatz zu den Bedingungen im Invasionsassay auf eine Beschichtung der Membran mit Matrigel® verzichtet, da das alleinige Migrationsverhalten durch die Poren untersucht werden soll.

Im vorliegenden Versuch wurde die untere Kammer, gebildet durch eine Cellstar® Platte (flat bottom, transparent, 24 Wells; Greiner Bio-One), mit 600 µl des OSCC Mediums mit 10 % FBS (Tabelle 2) befüllt. Die Abtrennung zwischen den beiden Kompartimenten erfolgte mit ThinCerts™ (Greiner Bio-One), deren Boden aus Membranen mit Poren von 8,0 µm Durchmesser besteht.

Die obere Kammer wurde durch die ThinCerts™ gebildet, in die jeweils 100 µl Zellsuspension der jeweiligen Bedingung als Triplikate ausgesät wurden. Die Zellen wurden in OSCC Medium mit 1 % FBS suspendiert, sodass zwischen den beiden Kompartimenten im Versuch ein chemotaktischer Gradient bestand. Pro Well befanden sich je 100.000 Zellen im oberen Kompartiment und es erfolgte eine Inkubation über 16 h bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank.

Die eingesetzte Zellsuspension der Bedingungen Zellen + nur Medium, Zellen + α_2 -Agonist und Zellen + β_2 -Agonist wurden analog zum Invasionsassay wie in Punkt 3.3.1.2 beschrieben hergestellt. Abweichend wurde allerdings eine Zellkonzentration von 1 Mio. Zellen pro ml eingestellt.

Anschließend erfolgte die Auswertung mithilfe des Kristallviolett-Assays. Die Vorgehensweise hierbei ist unter Punkt 3.3.1.3 dargestellt.

3.3.3 Vaskulogene Mimikry auf Matrigel®

Im durchgeführten Versuch wurde dazu eine Cellstar® 96 Well Platte (flat bottom, transparent; Greiner Bio-One) mit wachstumsfaktorreduzierter Matrigel® Basement Membran Matrix (c = 8,8 mg/ml; Corning) beschichtet, nachdem diese über die Nacht zuvor auf Eis im Kühlschrank bei 4°C aufgetaut worden war. In jedes Well wurden hierbei 35 µl unverdünnter Matrix pipettiert und die Platte anschließend 30 min in den Brutschrank gestellt, damit das Matrigel® geliert.

Pro Well wurden 20.000 Zellen im jeweiligen Medium mit einer FBS-Konzentration von 1 % ausgesät. Insgesamt wurde pro Zellklon und Bedingung mit je 5 Wells zur Wiederholung gearbeitet. Um die gewünschte Zellzahl pro Well einsetzen zu können, wurden Zellsuspensionen ohne Agonist und mit α_2 - bzw. β_2 -adrenergem Agonisten mit einem Anteil von 200.000 Zellen pro ml hergestellt, wovon 100 μ l pro Well eingesetzt wurden.

Nach der Aussaat wurde die Platte 16 h bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert, um am folgenden Tag die einzelnen Wells unter dem Lichtmikroskop Eclipse TE2000-U (Nikon Instruments Europe BV) zu fotografieren. Nach insgesamt 48 h Inkubation wurden die Zellen erneut fotografiert. Die Bilder wurden anschließend mithilfe der Software ImageJ ausgewertet.

3.3.4 Proliferationsassay

Zur Untersuchung der Auswirkung von adrenergen Agonisten auf die Proliferation von OSCC-Zellen wurde ein WST-Proliferationsassay durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein Experiment, durch das metabolisch aktive, also vor allem proliferierende, Zellen nachgewiesen werden können. Hier macht man sich die Tatsache zunutze, dass das wasserlösliche leicht rötliche Tetrazoliumsalz (water soluble tetrazolium = WST) WST-1 von Zellen mit aktiver Atmungskette NAD(P)H-abhängig wie in Abbildung 11 gezeigt zu einem dunkelroten Formazan-komplex reduziert wird. Dieser Farbumschlag kann photometrisch detektiert werden und es können Rückschlüsse auf das Vorhandensein proliferierender Zellen gemacht werden, da die Intensität der Rotfärbung in direktem Zusammenhang mit der Anzahl metabolisch aktiver Zellen steht [106].

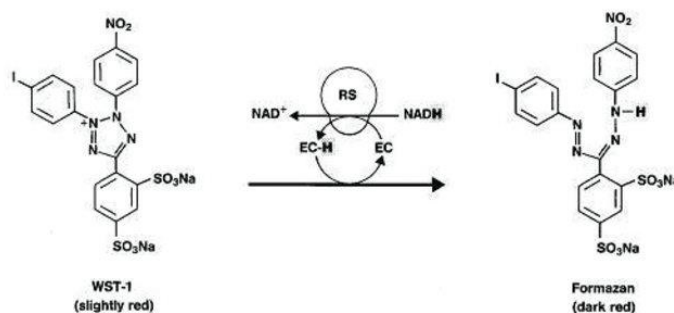


Abbildung 11: Reaktion des leicht rötlichen WST-1 zum dunkelroten Formazan.

In viablen Zellen mit intakter Atmungskette wird das leicht rötliche WST-1 zum dunkelroten Formazan reduziert. Dieser Farbumschlag kann photometrisch detektiert werden und korreliert mit der Zahl proliferierender Zellen. Bildquelle: [107].

Im Versuchsansatz wurde für jeden Messtag eine Cellstar® 96 Well Platte (flat bottom, transparent; Greiner Bio-One) verwendet. In diese wurden Zellen unter den folgenden drei Bedingungen ausgesät: Kulturmedium ohne Agonisten, Medium mit α_2 - bzw. β_2 -adrenergen Agonisten. Dazu wurden analog zum Vorgehen beim Invasionstest (siehe Punkt 3.3.1.2) Zellsuspensionen der Zellklone in den entsprechenden Medien angefertigt. Für den Proliferationsassay wurde allerdings FBS in 10-%iger Konzentration eingesetzt. Die Zellkonzentration betrug dabei 10.000 Zellen pro ml.

Pro Well wurden anschließend 100 μ l, also 1.000 Zellen, ausgesät. Pro Bedingung und Zellklon wurden acht Wells angesetzt. Für die Blank-Werte wurden Quadrupel von OSCC Medium mit 10 % FBS (Tabelle 2) ohne Zellen eingesetzt. Die entsprechend bestückten Platten wurden nun in den Brutschrank zur Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ gegeben.

An jedem Messtag wurde morgens um 8 Uhr der für den jeweiligen Tag vorgesehene Ansatz aus dem Brutschrank genommen und pro Well mit jeweils 10 μ l Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche Diagnostic) versehen, das lichtgeschützt auf Eis aufgetaut wurde, nachdem es aliquotiert bei -20°C gelagert worden war. Im Anschluss wurden die Platten sofort bei 450 nm photometrisch (GENios Plattenphotometer; Tecan) vermessen, um einem Null-Stunden-Wert zu erhalten. Danach wurde der jeweilige Ansatz zurück in den Brutschrank gestellt, um nach 1 h, 2 h und 4 h erneut im Plattenphotometer bei zuvor benannter Wellenlänge vermessen zu werden.

Es erfolgte für die gesamte Dauer des jeweiligen Proliferationsversuchs kein Medienwechsel.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der verwendeten Zellen

4.1.1 Morphologische Charakteristika

Die einzelnen Klone der verwendeten HNSCC-Zelllinie PCI52 unterscheiden sich optisch in ihrem Wachstumsmuster, sobald sie höher konfluent werden. Es werden die Zellklone K2, K3, K4 und K6 mit induzierter P-Cadherin Expression (im Nachfolgenden „Klone“ genannt) mit den Leervektorkontrollen M1 und M5 (im Nachfolgenden „Mocks“ genannt) verglichen. Die Zellen wurden bei etwa 90 % Konfluenz unter dem Lichtmikroskop unter 10-facher Vergrößerung fotografiert. Dabei zeigt sich, dass K2 und K6 (Abbildung 12A und D) morphologisch den Mock-Zellen, also den Leervektorkontrollen, von M1 und M5 (Abbildung 13A und B) ähneln und ihre spindelförmige Morphologie an mesenchymale Zellen erinnert. K3 und K4 zeigen dagegen ein mosaikähnliches Erscheinungsbild (Abbildung 12B und C), das morphologisch eher mit einem epithelialen Wachstumsmuster assoziiert werden kann.

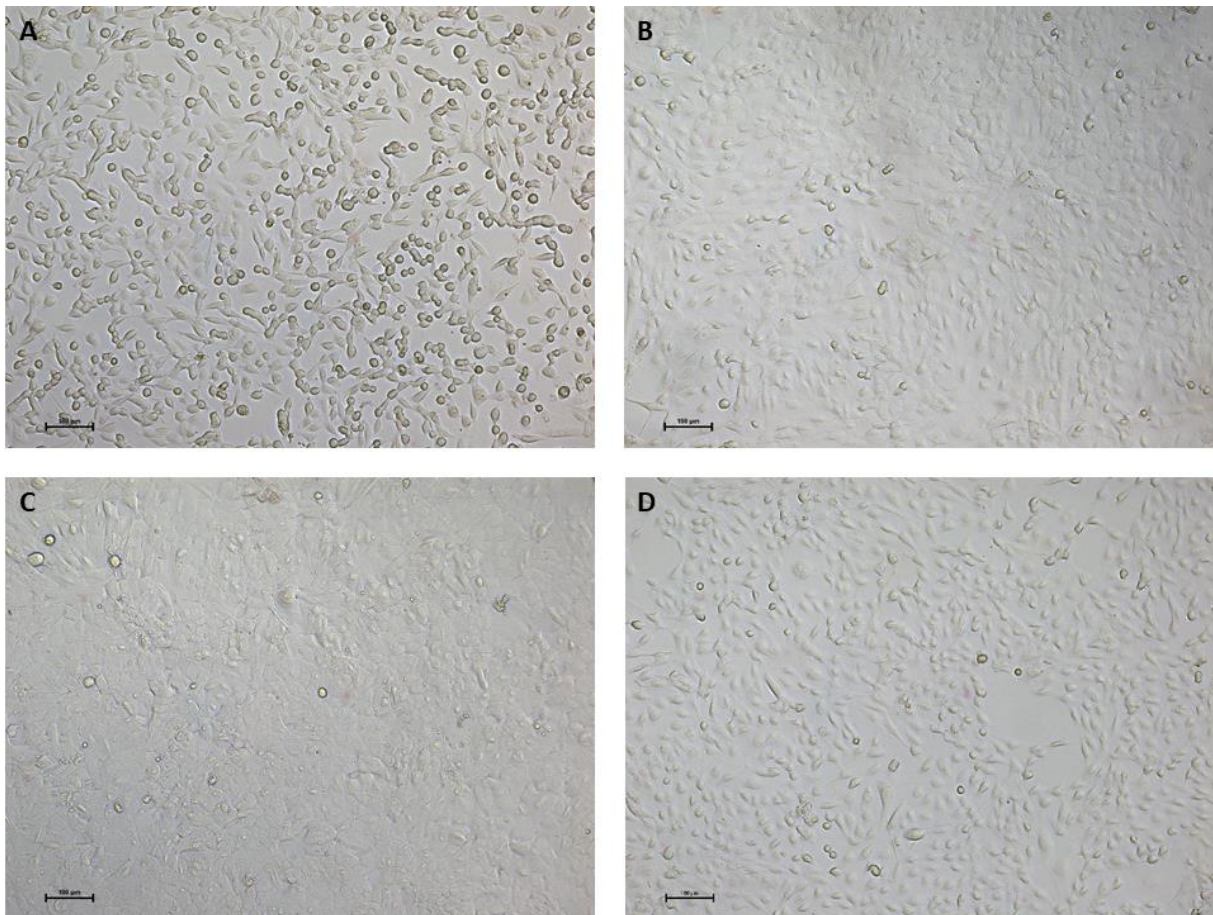


Abbildung 12: Lichtmikroskopische Aufnahmen von K2, K3, K4 und K6 bei hoher Konfluenz.

Zellen wurden in der Kulturflasche bei etwa 90 % Konfluenz unter dem Lichtmikroskop fotografiert. Dabei zeigen sich die Zellen der OSCC-Zelllinie PCI52 morphologisch unterschiedlich. K2 und K6 (A und D) ähneln morphologisch den Mocks, die in Abbildung 13 gezeigt sind. K3 und K4 (B und C) zeigen ein Wachstum, das an ein epitheliales Mosaik erinnert. **A:** K2. **B:** K3. **C:** K4. **D:** K6. Vergrößerung: 10x, Messbalken 100 µm.

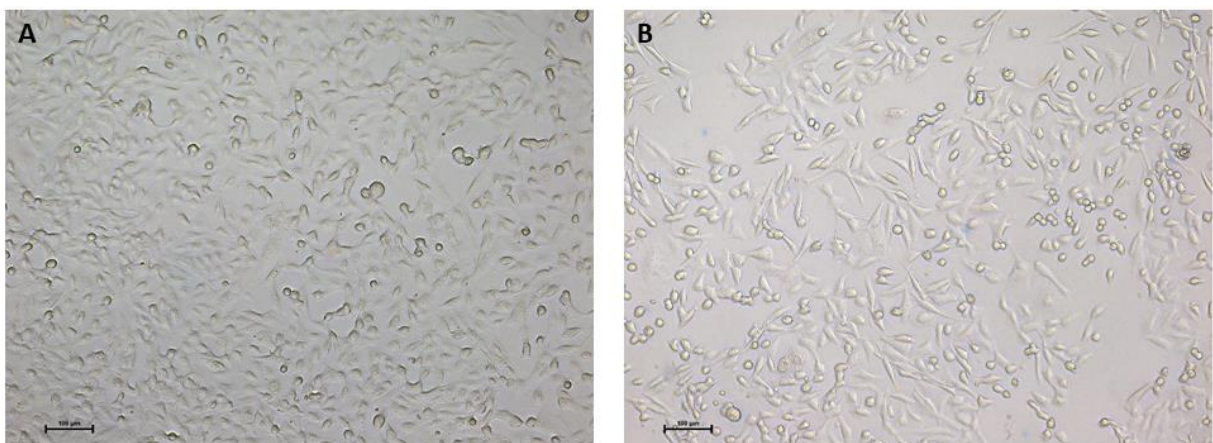


Abbildung 13: Lichtmikroskopische Aufnahmen von M1 und M5 bei hoher Konfluenz.

Zellen wurden in der Kulturflasche bei etwa 90 % Konfluenz unter dem Lichtmikroskop fotografiert. Die Mocks wachsen durcheinander und haben spindelförmiges Aussehen. Diese Feststellung der spindelförmigen Morphologie lässt Assoziationen zu mesenchymalen Zellen zu. **A:** M1. **B:** M5. Vergrößerung: 10x, Messbalken 100 µm.

4.1.2 P-Cadherin-Expression

Die Expression des Oberflächenproteins P-Cadherin wurde mittels Western Blot auf Proteinebene untersucht. Dabei lässt sich feststellen, dass die Klone K2, K3, K4 und K6 auf unterschiedlichem Niveau glykosyliertes, nicht glykosyliertes und trunkiertes P-Cadherin exprimieren, wohingegen bei den beiden Mocks M1 und M5 keine Expression dieses Oberflächenproteins nachweisbar ist. Glykosylierte Banden sind bei 120 kDa zu finden, nicht glykosylierte bei etwa 100 kDa [55]. Trunkierungen zeigen sich unterhalb von 100 kDa als schwächeres Chemilumineszenzsignal.

Im vorliegenden Western Blot (siehe Abbildung 14) sind die Zellen in absteigender Reihenfolge hinsichtlich ihres P-Cadherin-Gehalts sortiert. Klon 4 und 3 zeigen ein ähnliches Expressionsniveau von glykosyliertem P-Cadherin, doch Klon 3 enthält schon deutlich mehr nicht glykosylierte und trunkierte Banden als Klon 4. Bei Klon 2 ist eine insgesamt schwächere Färbung erkennbar und Klon 6 exprimiert nur sehr wenig P-Cadherin. Die Mocks 1 und 5 zeigen keine Expression des Proteins.

Die einzelnen Klone und Mocks lassen sich also hinsichtlich ihrer sinkenden P-Cadherin-Expression wie in Abbildung 14 sortieren, was sich mit einer steigenden Tendenz zu aggressiverem biologischen Verhalten assoziieren lässt.

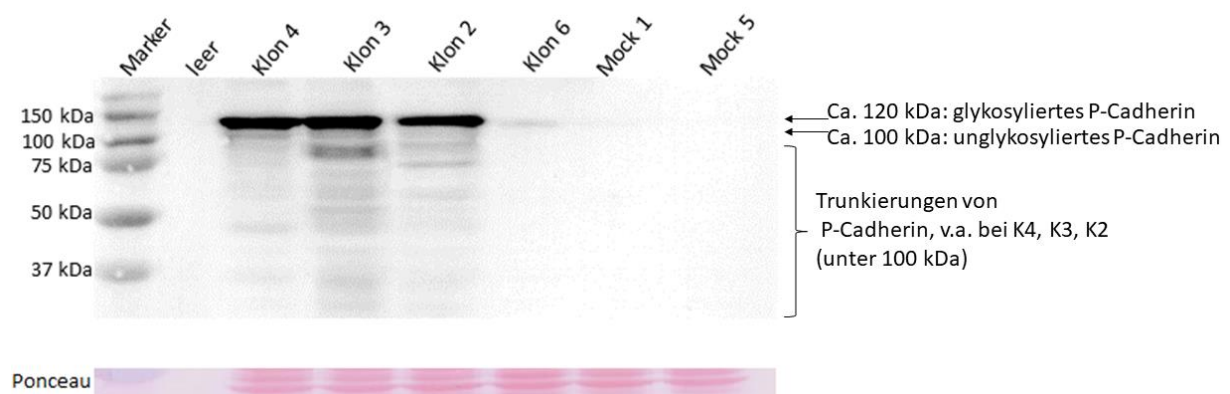


Abbildung 14: Expression von P-Cadherin im Western Blot.

Die Zellen wurden nach 2D-Kultur geerntet, Protein isoliert und dieses durch SDS-PAGE nach dem Molekulargewicht aufgetrennt. Nach Übertragen auf eine PVDF-Membran erfolgte der Nachweis von P-Cadherin mit spezifischen Antikörpern, die N-terminal an das gesuchte Protein binden. So können auch N-terminale trunkierte Proteinfragmente nachgewiesen werden. Es erfolgte eine Ponceau-Färbung zur Darstellung der gleichmäßigen Proteinauftragung.

Auftrag von jeweils 30 µg Protein.

4.1.3 Expression adrenerger Rezeptoren

Für die folgenden Versuche wurden die HNSCC-Zellen mit adrenergen Agonisten stimuliert. Dazu zeigen wir zunächst die Expression der entsprechenden Rezeptoren in den verwendeten Zellklonen. Das Expressionsniveau von α_{2B} - und β_2 -adrenergen Rezeptoren bei Klonen und Mocks wurde mit und ohne vorherige adrenerge Stimulation auf der Ebene der Proteinexpression untersucht.

Als α_2 -adrenerger Agonist wurde für alle folgenden Versuche zur Untersuchung der Proteinexpression und auch für alle funktionellen Versuche das Sympathomimetikum Brimonidin, das auch unter dem Namen UK14,304 geläufig ist (siehe 1.4.1.1), verwendet. Der Übersichtlichkeit halber wird es in Abbildungen lediglich mit „UK“ bezeichnet.

Der für sämtliche weitere Versuche eingesetzte β_2 -adrenerge Agonist Formoterol (siehe 1.4.1.2) wird in Abbildungen unter dem Kürzel „FU“ geführt, um auch hier einen besseren Überblick zu gewähren.

4.1.3.1 Expression α_{2B} -adrenerger Rezeptoren

Sowohl die HNSCC-Zellen der P-Cadherin induzierten Klone als auch der Leervektorkontrollen, der Mocks, exprimieren α_{2B} -adrenerge Rezeptoren, die sich auf Proteinebene nachweisen lassen (siehe Abbildung 15). Dabei sind hinsichtlich der detektierbaren Menge keine Unterschiede zwischen Klonen und Mocks feststellbar.

Auch die Anwesenheit eines adrenergen Agonisten scheint keine Auswirkung auf die Expression des α_{2B} -Adrenozeptors zu erzielen. Grundsätzlich sind die Zellen also aufgrund der Nachweisbarkeit des entsprechenden Rezeptors durch α_2 -adrenerge Agonisten, wie in diesem Fall durch Brimonidin (UK), stimulierbar.

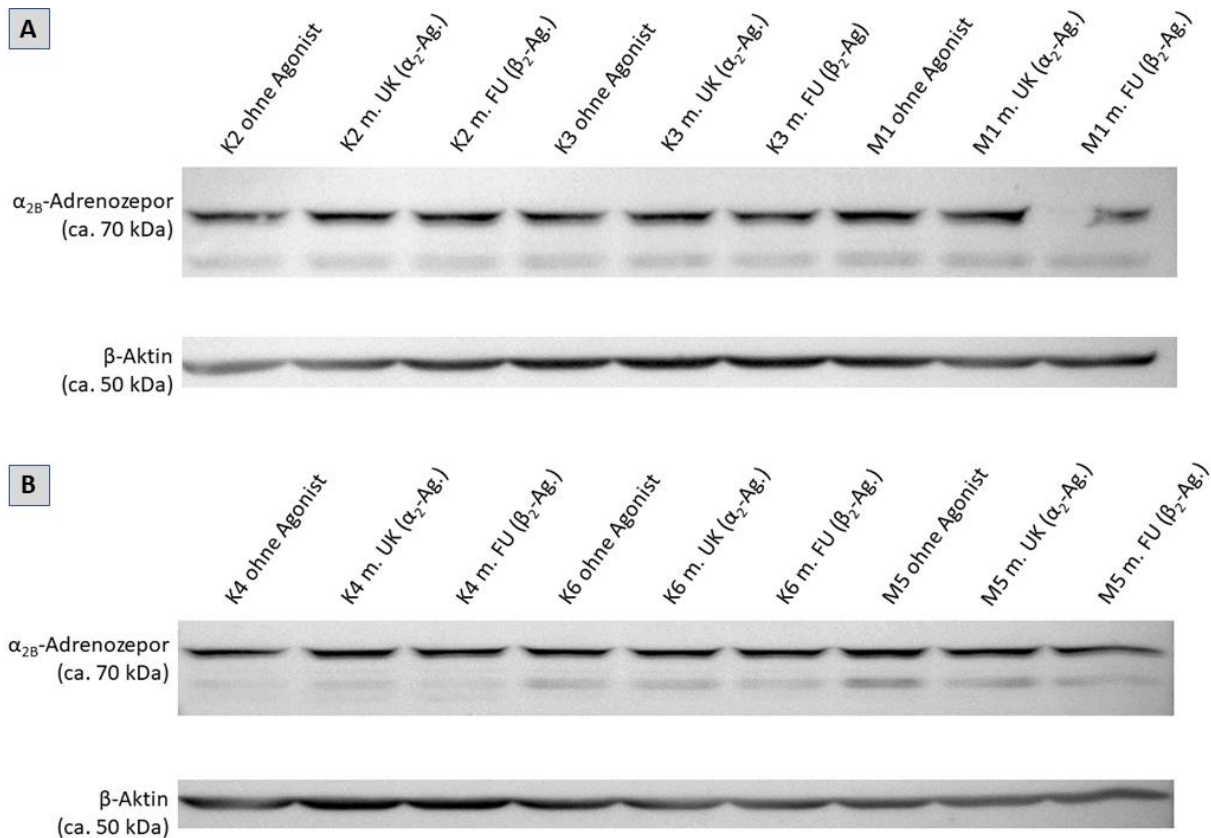


Abbildung 15: Expression α_{2B} -adrenerger Rezeptoren im Western Blot.

Die Zellen wurden bei 90 % Konfluenz über 20 h jeweils ohne bzw. mit dem entsprechenden Agonisten in Kulturfラスchen kultiviert. Der α_2 -Agonist wurde mit einer Konzentration von 10^{-8} M und der β_2 -Agonist mit einer Konzentration von 10^{-7} M eingesetzt. Die Zellen wurden geerntet, Protein isoliert und mithilfe von SDS-PAGE nach dem Molekulargewicht aufgetrennt. Nach Übertragung auf eine PVDF-Membran wurden mittels spezifischer Antikörper α_{2B} -Adrenozeptoren und β -Aktin nachgewiesen. **A:** PVDF-Membran mit K2, K3 und M1 jeweils ohne Agonist, mit UK (α_2 -Agonist) und FU (β_2 -Agonist). **B:** PVDF-Membran mit K4, K6 und M5 jeweils ohne Agonist, mit UK (α_2 -Agonist) und FU (β_2 -Agonist).

Auftrag von jeweils 30 μ g Protein.

4.1.3.2 Expression β_2 -adrenerger Rezeptoren

Auch der Nachweis von β_2 -adrenergen Rezeptoren gelingt sowohl bei den P-Cadherin exprimierenden Klonen als auch bei den Mocks (siehe Abbildung 16). Analog zu den α_{2B} -Adrenozeptoren lassen sich auch hier keine Unterschiede feststellen, die auf unterschiedliche P-Cadherin-Expression bei Klonen und Mocks zurückzuführen wäre.

Eine Behandlung mit α_2 - und β_2 -Agonisten bewirkt auch im Fall der β_2 -Rezeptor-Expression keine Veränderung. Somit können die verwendeten Zellen auch durch β_2 -adrenerge Agonisten, hier Formoterol (FU), stimuliert werden.

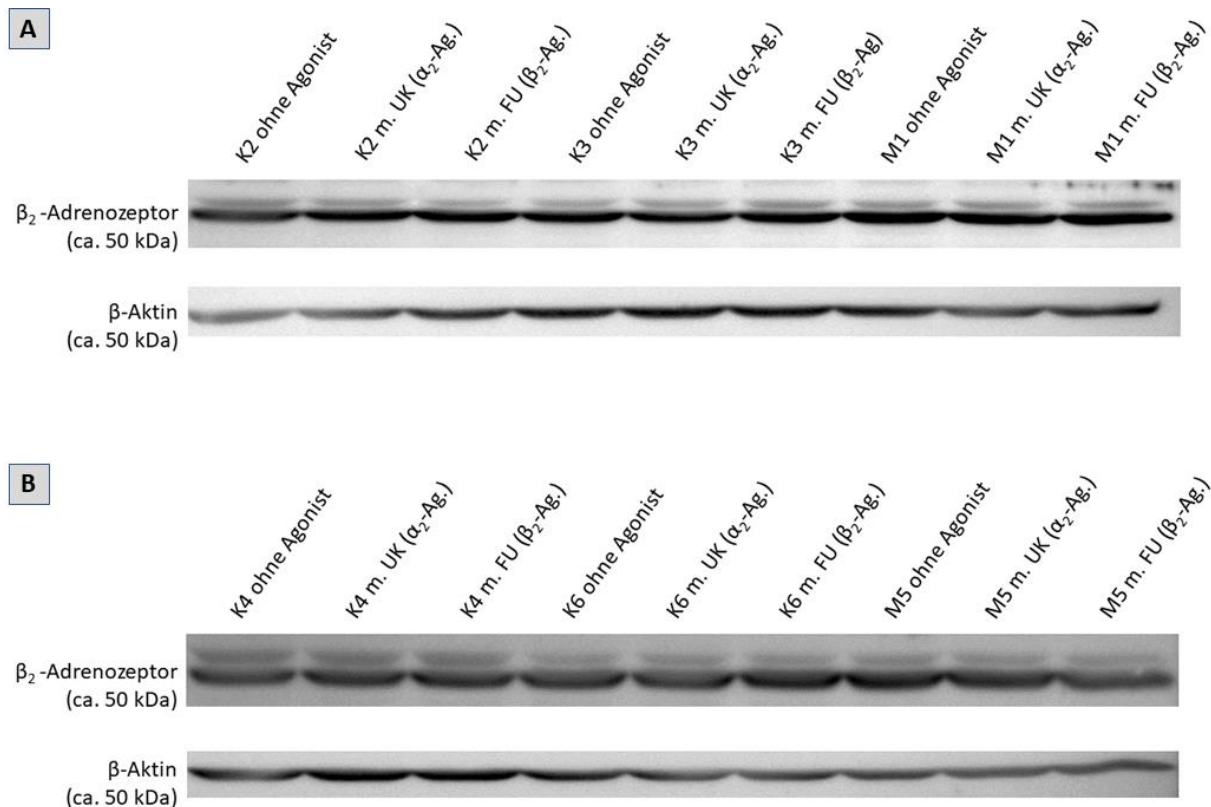


Abbildung 16: Expression β_2 -adrenerger Rezeptoren im Western Blot.

Die Zellen wurden bei 90 % Konfluenz über 20 h jeweils ohne bzw. mit dem entsprechenden Agonisten in Kulturflaschen kultiviert. Der α_2 -Agonist wurde 10^{-8} M und der β_2 -Agonist 10^{-7} M eingesetzt. Die Zellen wurden geerntet, Protein isoliert und mithilfe von SDS-PAGE nach dem Molekulargewicht aufgetrennt. Nach Übertragung auf eine PVDF-Membran wurden mittels spezifischer Antikörper β_2 -Adrenozeptoren und β -Aktin nachgewiesen. **A:** PVDF-Membran mit K2, K3 und M1 jeweils ohne Agonist, mit UK (α_2 -Agonist) und FU (β_2 -Agonist). **B:** PVDF-Membran mit K4, K6 und M5 jeweils ohne Agonist, mit UK (α_2 -Agonist) und FU (β_2 -Agonist).

Auftrag von je 30 μ g Protein.

4.2 Molekularbiologische Untersuchung der Proteinexpression

Zur Analyse etwaiger Auswirkungen der α_2 - bzw. β_2 -adrenergen Stimulation auf HNSCC-Zellen wurde die Expression bestimmter Proteine untersucht. Im Western Blot wurden dabei als Vertreter aus dem Wnt-Signalsystem GSK-3 β und β -Catenin jeweils hinsichtlich ihrer gesamten Proteinmenge und für GSK-3 β auch in der phosphorylierten Form nachgewiesen, um Rückschlüsse auf eine eventuell veränderte Aktivität dieses Signalwegs ziehen zu können. Hierfür wurde auf das Verhältnis der phosphorylierten Form zur Expression der gesamten Menge des Proteins eingegangen.

Zusätzlich wurde die Expression von PD-L1 auf Proteinebene ebenfalls mit Hilfe des Western Blots untersucht, um auch hier etwaige Auswirkungen adrenerger Stimulation auf HNSCC-Zellen zu detektieren.

Für α_2 -adrenerge Stimulation wurden die HNSCC-Zellen mit Brimonidin (UK) in einer Konzentration von 10^{-8} M bzw. für β_2 -adrenerge Stimulation mit Formoterol (FU) in einer Konzentration von 10^{-7} M im Medium inkubiert. Dabei wurden die genannten Konzentrationen der Agonisten für jeden Versuchsansatz, der zur Isolation von Proteinen diente, wie angegeben beibehalten und nicht variiert.

4.2.1 Expression von Proteinen des Wnt-Signalsystems

4.2.1.1 Expression von GSK-3 β und P-GSK-3 β

Es erfolgte nach elektrophoretischer Auftrennung nach dem Molekulargewicht die Proteinanalyse mittels Western Blot. Dabei entstanden mit dem verwendeten Antikörper gegen GSK-3 β bzw. dessen phosphoryliertes Derivat, P-GSK-3 β , spezifisch angefärbte PVDF-Membranen, die fotografisch dokumentiert wurden (siehe Abbildung 17). Eine semiquantitative Auswertung unter Zuhilfenahme der Software Photoshop CS4 extended (Adobe Systems Inc.) ergibt die Werte der in Abbildung 18 dargestellten Diagramme.

Es lassen sich dabei weder für GSK-3 β noch für P-GSK-3 β statistisch haltbare Effekte einer Behandlung mit adrenergen Agonisten mit den verwendeten Konzentrationen sowohl bei den Klonen K2, K3, K4 und K6 mit induzierter Expression von P-Cadherin als auch bei den Mocks M1 und M5 ableiten. Augenscheinlich könnte aber den Diagrammen für die phosphorylierte Form von GSK-3 β (siehe Abbildung 18B) entnommen werden, dass die Anwesenheit des α_2 -adrenergen Agonisten die Expression von P-GSK-3 β tendenziell erhöht im Vergleich zur Behandlung ohne Agonist (aber $p \gg 0,1$). Diese Auswirkung wird allerdings durch die sehr hohe Standardabweichung relativiert. Es lässt sich aber feststellen, dass die Expression von P-GSK-3 β für Klone und Mocks auf unterschiedlich hohem Niveau erfolgt. Die Mocks exprimieren P-GSK-3 β auf einem etwa doppelt so hohen Level wie die Klone mit P-Cadherin-Expression.

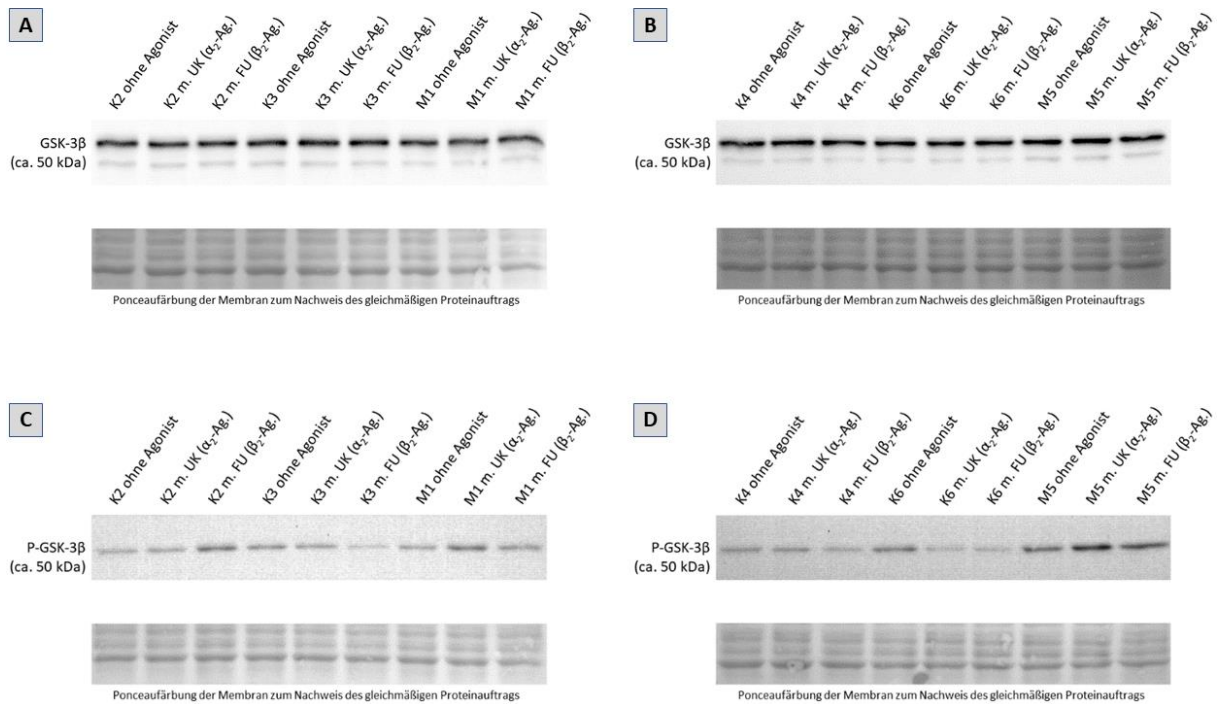


Abbildung 17: Western Blot GSK-3 β und P-GSK-3 β .

Die Zellen wurden bei 90 % Konfluenz über 20 h jeweils ohne bzw. mit dem entsprechenden Agonisten in Kulturflaschen inkubiert. Der α_2 -Agonist wurde 10^{-8} M und der β_2 -Agonist 10^{-7} M eingesetzt. Die Zellen wurden geerntet, Protein isoliert und mithilfe von SDS-PAGE nach dem Molekulargewicht aufgetrennt. Nach Übertragung auf eine PVDF-Membran wurden mittels spezifischer Antikörper GSK-3 β (A und B) bzw. P-GSK-3 β (C und D) nachgewiesen.

Bei den mit Antikörper gegen GSK-3 β behandelten Membranen (A und B) scheint sich keine Auswirkung adrenerger Agonisten auf P-Cadherin exprimierende Zellen (K2, K3, K4, K6) oder Mocks (M1, M5) hinsichtlich der Expression des gesuchten Proteins zu zeigen.

Bei der Verwendung des Antikörpers gegen die phosphorylierte Form von GSK-3 β (C und D) zeigt sich scheinbar eine tendenzielle Beeinflussung der Proteinexpression durch eine Behandlung der Zellen mit den adrenergen Agonisten. **A:** PVDF-Membran mit K2, K3 und M1 jeweils ohne Agonist, mit UK (α_2 -Agonist) und FU (β_2 -Agonist) und Antikörper gegen GSK-3 β . **B:** PVDF-Membran mit K4, K6 und M5 jeweils ohne Agonist, mit UK (α_2 -Agonist) und FU (β_2 -Agonist) und Antikörper gegen GSK-3 β . **C:** PVDF-Membran mit K2, K3 und M1 jeweils ohne Agonist, mit UK (α_2 -Agonist) und FU (β_2 -Agonist) und Antikörper gegen P-GSK-3 β . **D:** PVDF-Membran mit K4, K6 und M5 jeweils ohne Agonist, mit UK (α_2 -Agonist) und FU (β_2 -Agonist) und Antikörper gegen P-GSK-3 β .

4 Experimente, repräsentative Fotos der PVDF-Membranen. Auftrag von je 30 μ g Protein pro Probe.

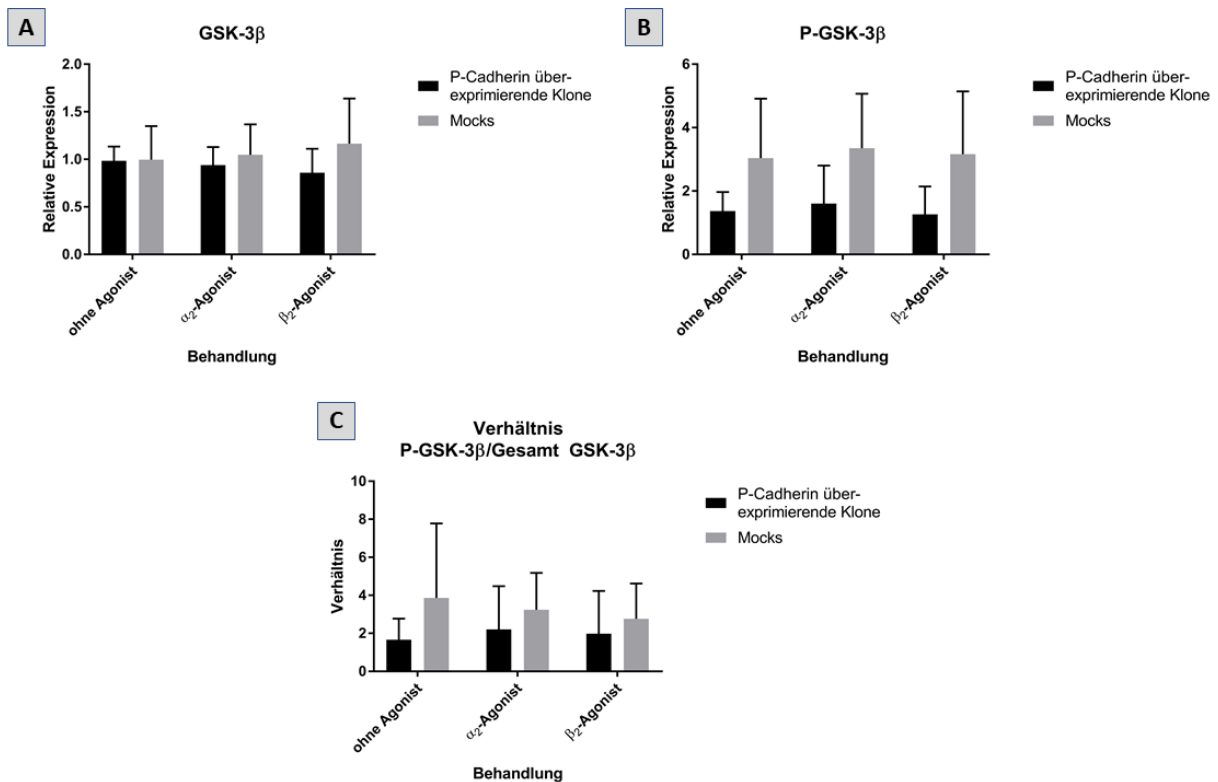


Abbildung 18: Quantifizierung von GSK-3 β und P-GSK-3 β .

Die PVDF-Membranen von insgesamt vier durchgeführten Western Blots wurden mit Photoshop CS4 extended (Adobe Systems Inc.) semiquantitativ ausgewertet. Dazu wurde der Schwarzwert pro Bande gemessen und in das Verhältnis mit der jeweils zugehörigen β -Aktin- oder einer entsprechenden Bande nach Ponceau-Färbung gesetzt. Die Werte der P-Cadherin exprimierenden Klone und Mocks wurden jeweils aus allen durchgeführten Western Blots zusammengefasst und anschließend grafisch dargestellt. Zusätzlich wurden die Werte für die phosphorylierte Form von GSK-3 β (B) zur Menge an gesamt vorhandenem GSK-3 β in den Zellen (A) in ein Verhältnis gesetzt, wodurch sich Diagramm C ergibt, das Rückschlüsse auf den Grad der Phosphorylierung zulässt.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass GSK-3 β (A) scheinbar nicht durch die eingesetzte Konzentration adrenerger Stimulation beeinflusst wird. P-GSK-3 β (B) wird bei Mocks und P-Cadherin-exprimierenden Klonen grundsätzlich unterschiedlich stark exprimiert. Tendenziell lässt sich, statistisch allerdings nicht signifikant, vermuten, dass der α_2 -adrenerge Agonist zu einer höheren Expression der phosphorylierten Form führt. Die Standardabweichung ist dabei allerdings extrem groß. Es liegt im Verhältnis (C) bei den Mocks ein höherer Grad der Phosphorylierung vor als bei den Klonen. **A:** Relative Expression von GSK-3 β bei P-Cadherin exprimierenden Klonen und Mocks in Abhängigkeit einer Behandlung mit adrenergen Agonisten. **B:** Relative Expression von P-GSK-3 β bei P-Cadherin exprimierenden Klonen und Mocks in Abhängigkeit einer Behandlung mit adrenergen Agonisten. **C:** Verhältnis der Expression von P-GSK-3 β zur Expression der gesamten Menge an GSK-3 β , welche auch die nicht-phosphorylierte Form beinhaltet. Möglichkeit des Rückschlusses auf den Grad der Phosphorylierung in Abhängigkeit einer Behandlung mit adrenergen Agonisten.

4 Experimente, n = 14 für Klone und n = 8 für Mocks.

4.2.1.2 Expression von β -Catenin und P- β -Catenin

Bei der proteinbiochemischen Untersuchung der Expression von β -Catenin finden sich auf der PVDF-Membran Doppelbanden. Es wird davon ausgegangen, dass es sich bei der oberen der Banden um die phosphorylierte und bei der darunterliegenden Bande um die unphosphorylierte Form des gesuchten Proteins handelt. Allerdings lassen sich weder durch direkte Betrachtung der PVDF-Membranen (siehe Abbildung 19) noch durch graphische Darstellung (siehe Abbildung 20) nach Analyse mit Photoshop CS4 extended (Adobe Systems Inc.) Effekte einer Behandlung mit adrenergen Agonisten feststellen. Sowohl P-Cadherin exprimierende Klone als auch Mocks zeigen keine Veränderung durch die Anwesenheit eines Agonisten im Medium. Feststellbar ist lediglich eine Expression von β -Catenin auf grundsätzlich unterschiedlichem Niveau für Mocks und P-Cadherin exprimierende Klone (siehe Abbildung 19A und B bzw. Abbildung 20A).

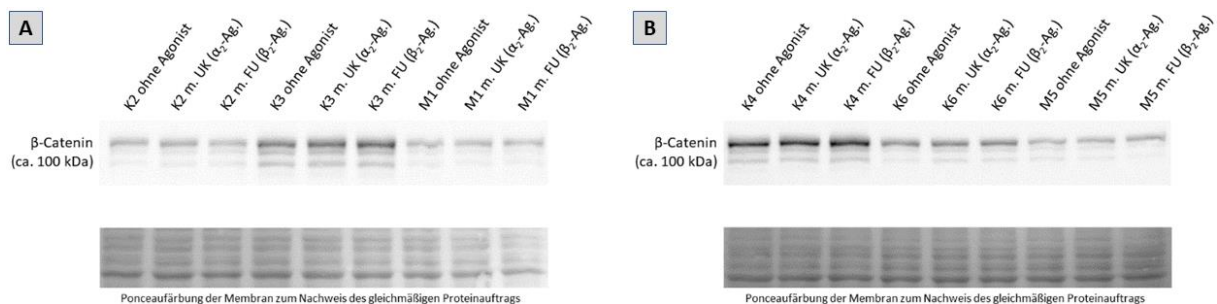


Abbildung 19: Western Blot β -Catenin.

Die Zellen wurden bei 90 % Konfluenz über 20 h jeweils ohne bzw. mit dem entsprechenden adrenergen Agonisten in Kulturflaschen kultiviert. Der α_2 -Agonist wurde 10^{-8} M und der β_2 -Agonist 10^{-7} M eingesetzt. Die Zellen wurden geerntet, Protein isoliert und mithilfe von SDS-PAGE nach dem Molekulargewicht aufgetrennt. Nach Übertragung auf eine PVDF-Membran wurden mittels spezifischen Antikörpers β -Catenin (A und B) nachgewiesen.

Insgesamt scheint sich keine Auswirkung adrenerger Agonisten auf P-Cadherin exprimierende Zellen (K2, K3, K4, K6) oder Mocks (M1, M5) hinsichtlich der Expression des gesuchten Proteins zu zeigen.

Tendenziell exprimieren allerdings P-Cadherin exprimierende Klone das Protein β -Catenin auf höherem Level als die Mocks (A und B). **A:** PVDF-Membran mit K2, K3 und M1 jeweils ohne Agonist, mit UK (α_2 -Agonist) und FU (β_2 -Agonist) und Antikörper gegen β -Catenin. **B:** PVDF-Membran mit K4, K6 und M5 jeweils ohne Agonist, mit UK (α_2 -Agonist) und FU (β_2 -Agonist) und Antikörper gegen β -Catenin.

4 Experimente, repräsentative Fotos der PVDF-Membranen. Auftrag von je 30 μ g Protein pro Probe.

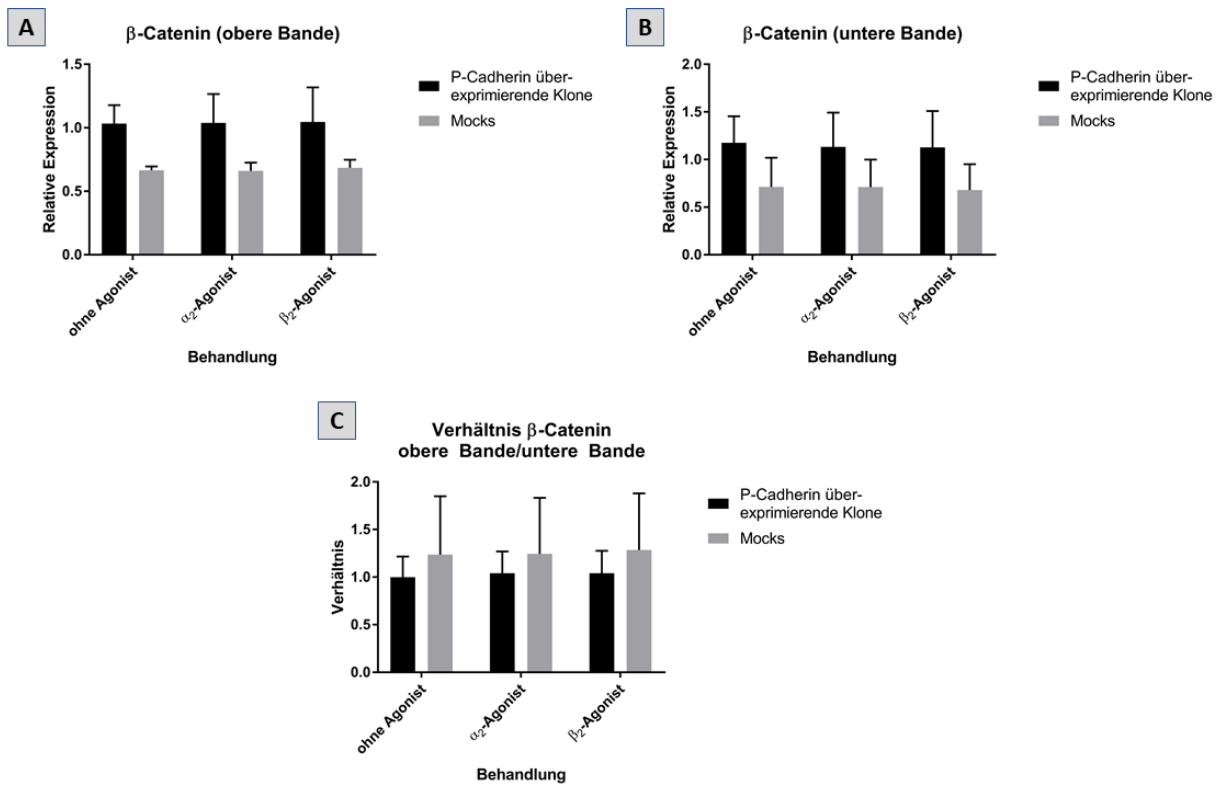


Abbildung 20: Quantifizierung von β -Catenin.

Sämtliche dokumentierte PVDF-Membranen der durchgeführten Western Blots wurden mit Photoshop CS4 extended (Adobe Systems Inc.) semiquantitativ wie in Abbildung 18 ausgewertet. Die Werte der P-Cadherin exprimierenden Klone und der Mocks wurden jeweils aus allen vier durchgeführten Western Blots zusammengefasst und anschließend grafisch aufgetrennt für die obere und untere Bande dargestellt. Zusätzlich wurden die Werte für die obere Bande von β -Catenin (A) in Verhältnis mit der unteren Bande (B) gesetzt, wodurch sich Diagramm C ergibt, welches Rückschlüsse auf den Grad der Phosphorylierung zulässt.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass die obere (A) und untere Bande (B) und auch das berechnete Verhältnis (C) scheinbar nicht durch die Anwesenheit adrenerger Agonisten in den eingesetzten Konzentrationen beeinflusst werden. β -Catenin wird bei Mocks und P-Cadherin-exprimierenden Klonen grundsätzlich unterschiedlich stark exprimiert. **A:** Relative Expression der oberen Bande von β -Catenin bei P-Cadherin exprimierenden Klonen und Mocks in Abhängigkeit einer Behandlung mit Agonisten. **B:** Relative Expression der unteren Bande von β -Catenin bei P-Cadherin exprimierenden Klonen und Mocks in Abhängigkeit einer Behandlung mit Agonisten. **C:** Verhältnis der Expression von oberer zu untere Bande von β -Catenin. Möglichkeit des Rückschlusses auf den Grad der Phosphorylierung in Abhängigkeit einer Behandlung mit Agonisten.

4 Experimente, n = 14 für Klone und n = 8 für Mocks.

4.2.2 Expression von PD-L1

Auch eine proteinbiochemische Untersuchung der verwendeten Zellen auf Auswirkungen adrenerger Stimulation auf die Expression von PD-L1 konnte keine Beeinflussung durch die Agonisten aufdecken. Sowohl die direkte Betrachtung der PVDF-Membranen (siehe Abbildung 21) als auch die graphische Darstellung der ausgewerteten Daten (siehe Abbildung 22) ließe Rückschlüsse auf mögliche Effekte durch Stimulation der Zellen mit α_2 - und β_2 -Agonisten zu. Allerdings lassen sich weder P-Cadherin exprimierende Zellen noch Leervektorkontrollen, also die Mocks, statistisch signifikant durch die eingesetzten Agonisten beeinflussen.

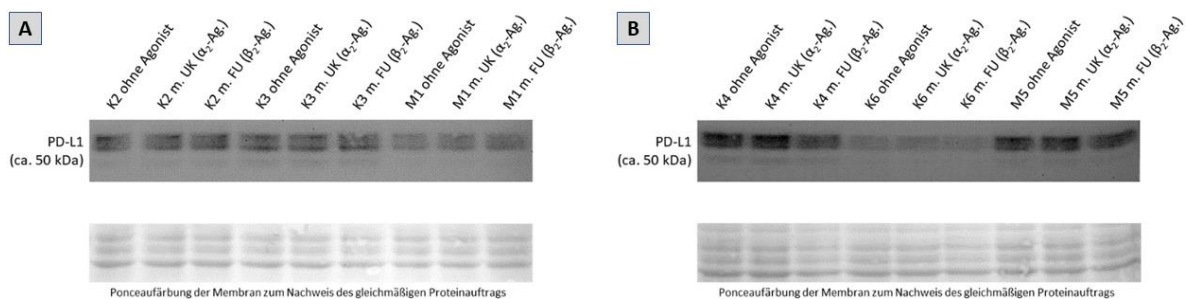


Abbildung 21: Western Blot PD-L1.

Die Zellen wurden bei 90 % Konfluenz über 20 h jeweils ohne bzw. mit dem entsprechenden Agonisten in Kulturflaschen inkubiert. Der α_2 -Agonist wurde 10^{-8} M und der β_2 -Agonist 10^{-7} M eingesetzt. Die Zellen wurden geerntet, Protein isoliert und mithilfe von SDS-PAGE nach dem Molekulargewicht aufgetrennt. Nach Übertragung auf eine PVDF-Membran wurde mit einem spezifischen Antikörper PD-L1 nachgewiesen.

Insgesamt scheint sich keine Auswirkung von Agonisten auf P-Cadherin exprimierende Zellen (K2, K3, K4, K6) oder Mocks (M1, M5) hinsichtlich der Expression des gesuchten Proteins zu zeigen. **A:** PVDF-Membran mit K2, K3 und M1 jeweils ohne Agonist, mit UK (α_2 -Agonist) und FU (β_2 -Agonist) und Antikörper gegen PD-L1. **B:** PVDF-Membran mit K4, K6 und M5 jeweils ohne Agonist, mit UK (α_2 -Agonist) und FU (β_2 -Agonist) und Antikörper gegen PD-L1.

5 Experimente, repräsentative Fotos der PVDF-Membranen. Auftrag von je 30 μ g Protein pro Probe.

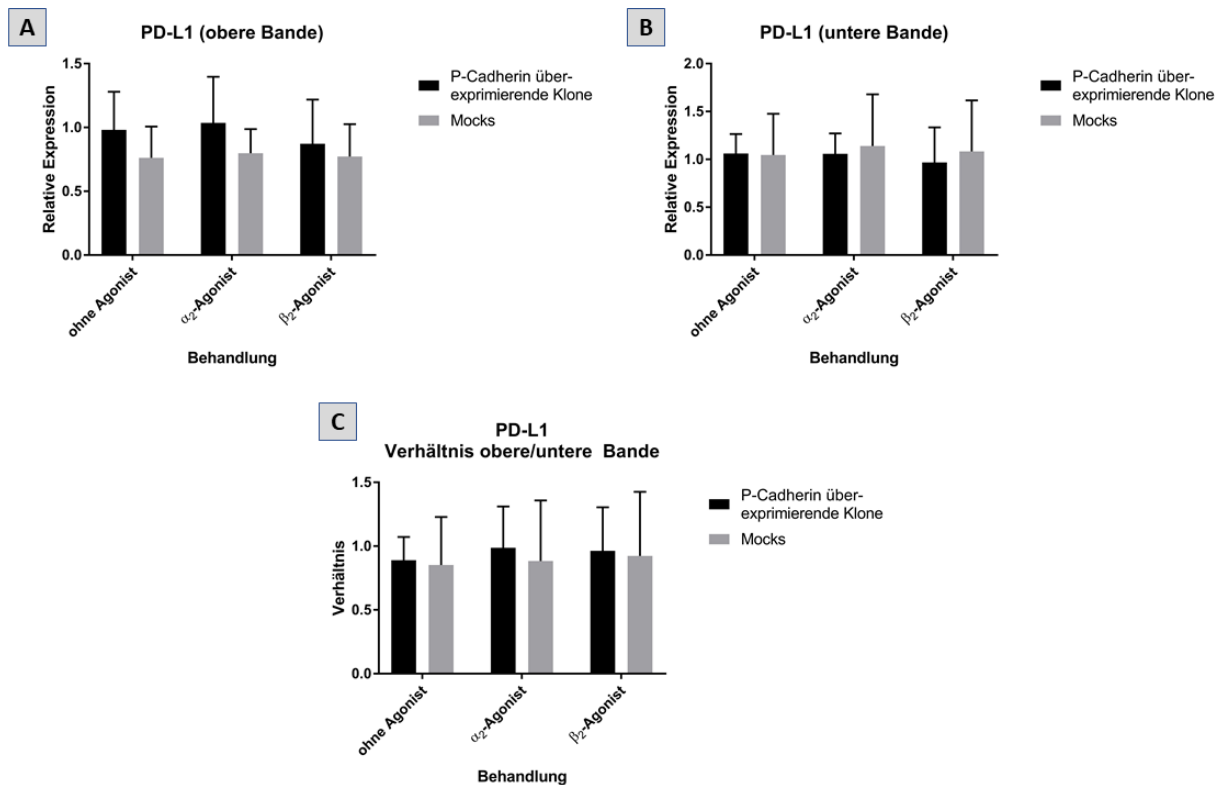


Abbildung 22: Quantifizierung von PD-L1.

Sämtliche dokumentierte PVDF-Membranen der durchgeführten Western Blots wurden mit Photoshop CS4 extended (Adobe Systems Inc.) quantitativ ausgewertet. Dazu wurde der Schwarzwert pro Bande gemessen und in das Verhältnis mit der jeweils zugehörigen β -Aktin- oder einer entsprechenden Bande nach Ponceau-Färbung gesetzt. Die Werte der P-Cadherin exprimierende Klone und der Mocks wurden jeweils aus allen durchgeführten Western Blots zusammengefasst und anschließend grafisch dargestellt. Es wurde dabei zwischen der großen oberen Bande und der kleineren darunterliegenden unterschieden.

Zusätzlich wurden die Werte für die obere Bande von PD-L1 (A) in Verhältnis mit der unteren Bande (B) gesetzt, wodurch sich Diagramm C ergibt.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass die Expression von PD-L1 scheinbar nicht durch die Anwesenheit von Agonisten beeinflusst wird. **A:** Relative Expression der oberen Bande von PD-L1 bei P-Cadherin exprimierenden Klonen und Mocks in Abhängigkeit einer Behandlung mit Agonisten. **B:** Relative Expression der unteren Bande von PD-L1 bei P-Cadherin exprimierenden Klonen und Mocks in Abhängigkeit einer Behandlung mit Agonisten. **C:** Verhältnis der Expression von oberer zur unteren Bande von PD-L1.

5 Experimente, n = 17 für Klone und n = 10 für Mocks.

4.3 Funktionelle Versuche

4.3.1 Vaskulogene Mimikry

Die Fähigkeit der OSCC-Zellen zur Ausbildung netzartiger Strukturen wird auf Matrigel® untersucht. Die Zellen wurden hierfür ohne bzw. unter Anwesenheit des jeweiligen

Agonisten nach Aussaat auf eine 96-Well-Platte für 16 h auf Matrigel® kultiviert und unter dem Lichtmikroskop fotografiert. Nach einem Medienwechsel und weiteren 32 h Inkubation wurden die Zellen in den Wells erneut fotografisch dokumentiert. Abbildung 23 zeigt Fotos von den Zellen 16 h nach Aussaat und Abbildung 24 nach 48-stündiger Inkubation mit zwischendurch erfolgtem Medienwechsel.

Eine anschließende Auswertung mit ImageJ erfolgte. Dazu überlagerte die Software mithilfe eines integrierten Features die aufgenommenen Bilder mit einer wie in Abbildung 25 gezeigten Netzstruktur. Anschließend gab ImageJ die Analysewerte des konstruierten Netzwerkes aus. Insgesamt ergab die Auswertung der Daten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kultur von Zellen in Medium ohne bzw. mit adrenergen Agonisten (siehe Abbildung 26).

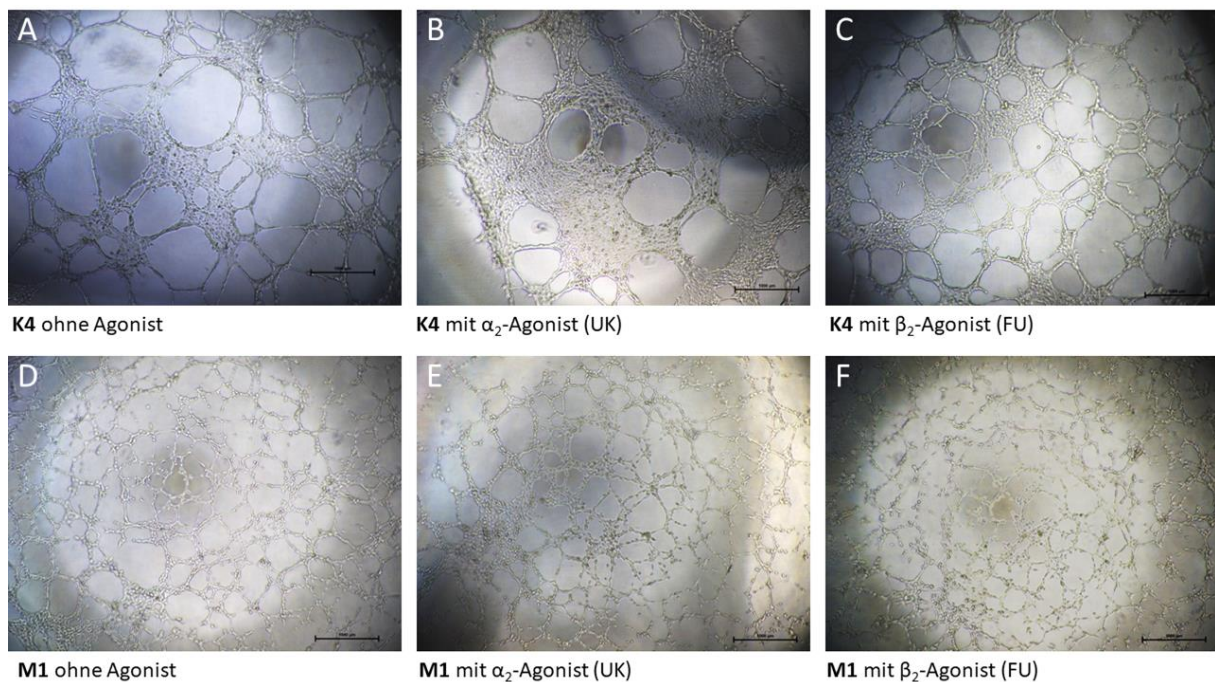


Abbildung 23: K4 und M1 im Versuch zur Untersuchung vaskulogener Mimikry.

P-Cadherin exprimierende Zellen (A-C) bilden nach 16 h mehr Flächen zwischen den netzartigen Strukturen, sogenannte Netzflächen, als die Mockzellen (D-F). Weder der α_2 - (B & E) noch der β_2 -adrenerge Agonist (C & F) scheinen im Vergleich zur Kultur ohne Agonist (A & F) in der verwendeten Konzentration von 10^{-8} M für den α_2 - bzw. 10^{-7} M für den β_2 -adrenergen Agonisten Auswirkungen auf die Ausbildung eines netzartigen Wachstumsmusters zu erzielen.

Fotos wurden unter dem Lichtmikroskop 16 h nach Aussaat aufgenommen. K4 dient als Vertreter der P-Cadherin-exprimierenden Klone und M1 für die Mocks.

1 Experiment, jeweils 5 Wells pro Zellart und Bedingung, repräsentative Fotos.

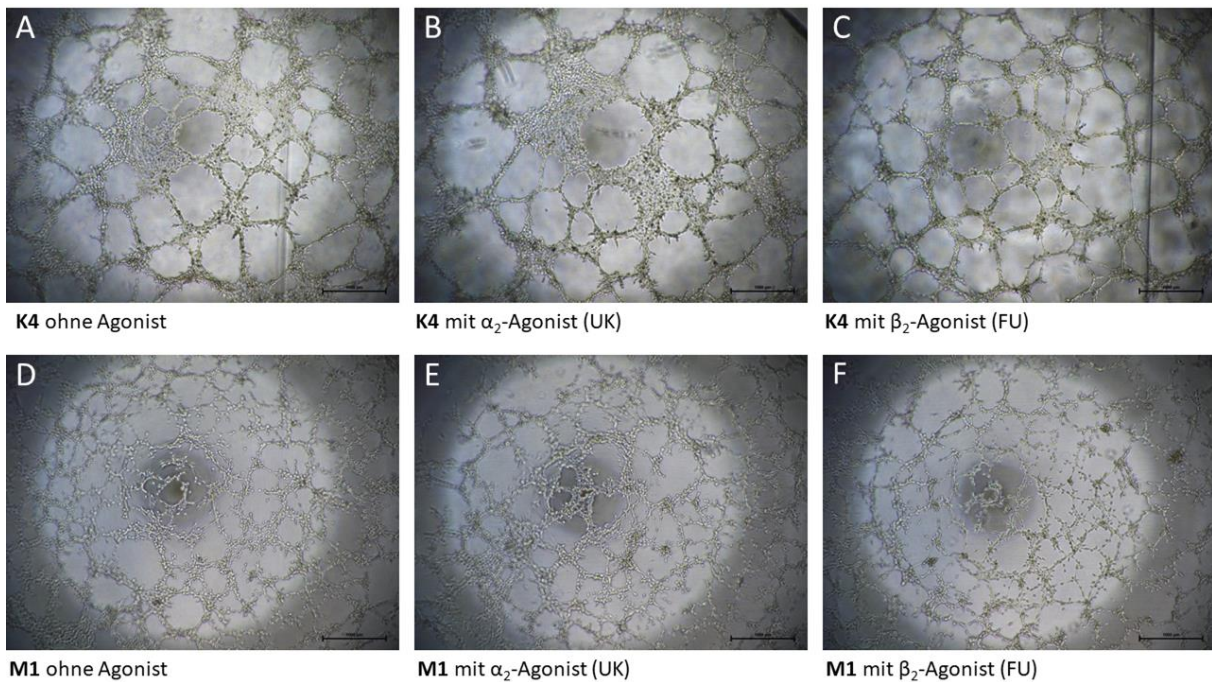


Abbildung 24: K4 und M1 bei der Untersuchung vaskulogener Mimikry.

Zellen, die P-Cadherin exprimieren (A-C), bilden auch nach 48 h geringfügig mehr Netzflächen, also Flächen zwischen den netzartigen Strukturen, als die Mockzellen (D-F). Weder der α_2 - (B & E) noch der β_2 -adrenerge Agonist (C & F) scheinen in der verwendeten Konzentration von 10^{-8} M bzw. 10^{-7} M im Vergleich zur Kultur ohne Agonist (A & F) Auswirkungen auf die Ausbildung eines netzartigen Wachstumsmusters zu erzielen.

Fotos wurden unter dem Lichtmikroskop 48 h nach Aussaat und nach einem Medienwechsel, der nach 20 h stattfand, aufgenommen. K4 dient als Vertreter der P-Cadherin exprimierenden Klone und M1 für die Mocks.

1 Experiment, jeweils $n = 5$ pro Zellklon, repräsentative Fotos.

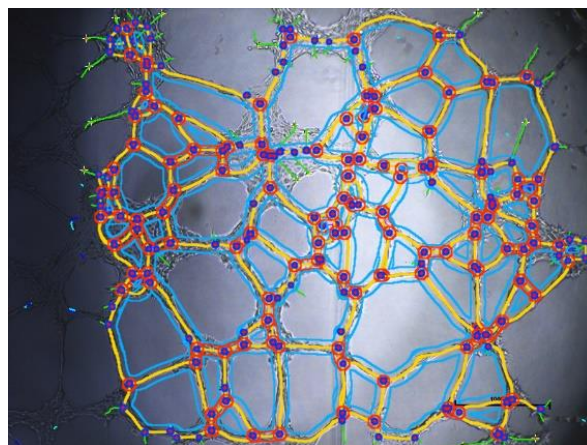


Abbildung 25: Beispiel für die Analyse vaskulogener Mimikry mit ImageJ.

Mittels ImageJ wird ein Netz in der dargestellten Art über das Foto gelegt und die Daten anschließend durch die Software ausgegeben.

Rote Punkte werden dabei als Knotenpunkte bezeichnet. Sie sind definiert als Pixel mit jeweils drei Nachbarsegmenten. Gelb dargestellt sind Bifurkationen und mehrere solcher Segmente definieren eine Fläche (blau).

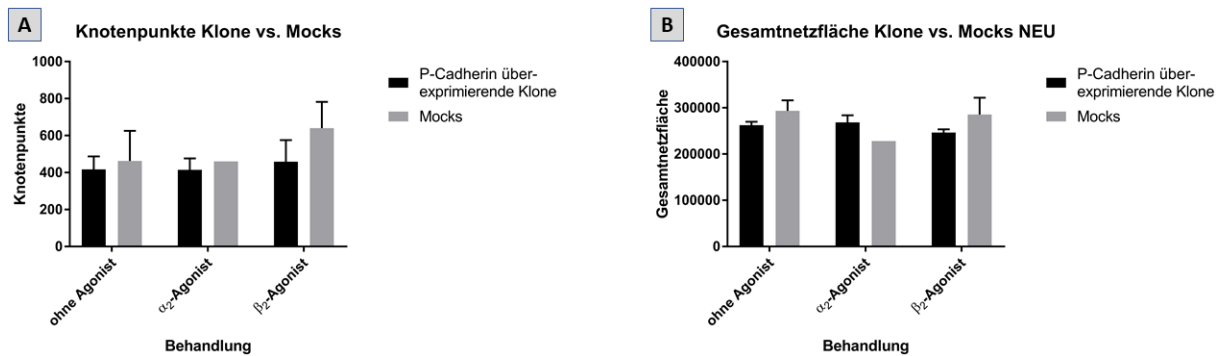


Abbildung 26: Knotenpunkte und Gesamtnetzfläche bei der Untersuchung vaskulogener Mimikry.

Die Bilder nach 16 h wurden mit ImageJ ausgewertet. Hier liegt die Auswertung der Knotenpunkte (A) und der Gesamtnetzfläche (B) vor. Beide Parameter können einen Hinweis auf die Tendenzen zur Ausbildung von Netzstrukturen und damit zu vaskulogenen Mimikry geben. Knotenpunkte werden bei der Analyse mit ImageJ gelb dargestellt (siehe Abbildung 25). Die Gesamtnetzfläche bezeichnet die Summe der durch netzartige Strukturen eingeschlossenen Fläche (blau in Abbildung 25). Es zeigt sich, dass eine Behandlung mit adrenergen Agonisten in der verwendeten Konzentration von 10^{-8} M für den α_2 - bzw. 10^{-7} M für den β_2 -adrenergen Agonisten keine nachweisbare Beeinflussung der untersuchten Parameter sowohl bei Klonen mit Expression von P-Cadherin als auch bei Mocks bewirkt. **A:** Knotenpunkte nach 16 h. **B:** Gesamtnetzfläche nach 16 h.

n = 15 für P-Cadherin exprimierende Klone, n = 10 für Mocks.

4.3.2 Invasion

Es wurde untersucht, ob die Anwesenheit adrenerger Agonisten im Kulturmedium einen Einfluss auf die Invasionsfähigkeit von Zellen zeigt. Hierfür wurden P-Cadherin exprimierende HNSCC-Zellklone und Mocks im Invasionsassay und anschließend zur Auswertung mit Kristallviolett-Assay untersucht. Insgesamt wurden drei Versuchsansätze durchgeführt, wobei zwei Mal mit der Konzentration von 10^{-8} M für den α_2 - bzw. 10^{-7} M für den β_2 -adrenergen Agonisten gearbeitet wurde. Im dritten Ansatz wurde die jeweils 10-fache Konzentration verwendet. Die Inkubation mit und ohne adrenergen Agonisten erfolgte jeweils über Nacht.

Die im Kristallviolett-Assay detektierten optischen Dichten wurden analysiert und statistisch ausgewertet. So konnten signifikante Unterschiede hinsichtlich des Invasionsverhaltens in Anwesenheit des β_2 -adrenergen Agonisten abhängig von der P-Cadherin-Expression festgestellt werden. Es zeichnet sich dabei ab, dass die Stimulation β_2 -adrenerger Rezeptoren auf OSCC-Zellen mit einer erhöhten Expression von P-Cadherin zu einer verminderten Invasionsfähigkeit *in vitro* führt. Im Vergleich dazu lassen sich die Leervektorkontrollen hinsichtlich ihrer Aktivität im Invasionsassay durch die β_2 -adrenerge Stimulation nicht (Abbildung 27B und F) bzw. nur sehr schwach (Abbildung 27D) signifikant beeinflussen.

Die Absorptionswerte für die durchgeführten Versuchsansätze sind nachfolgend in Abbildung 27 dargestellt.

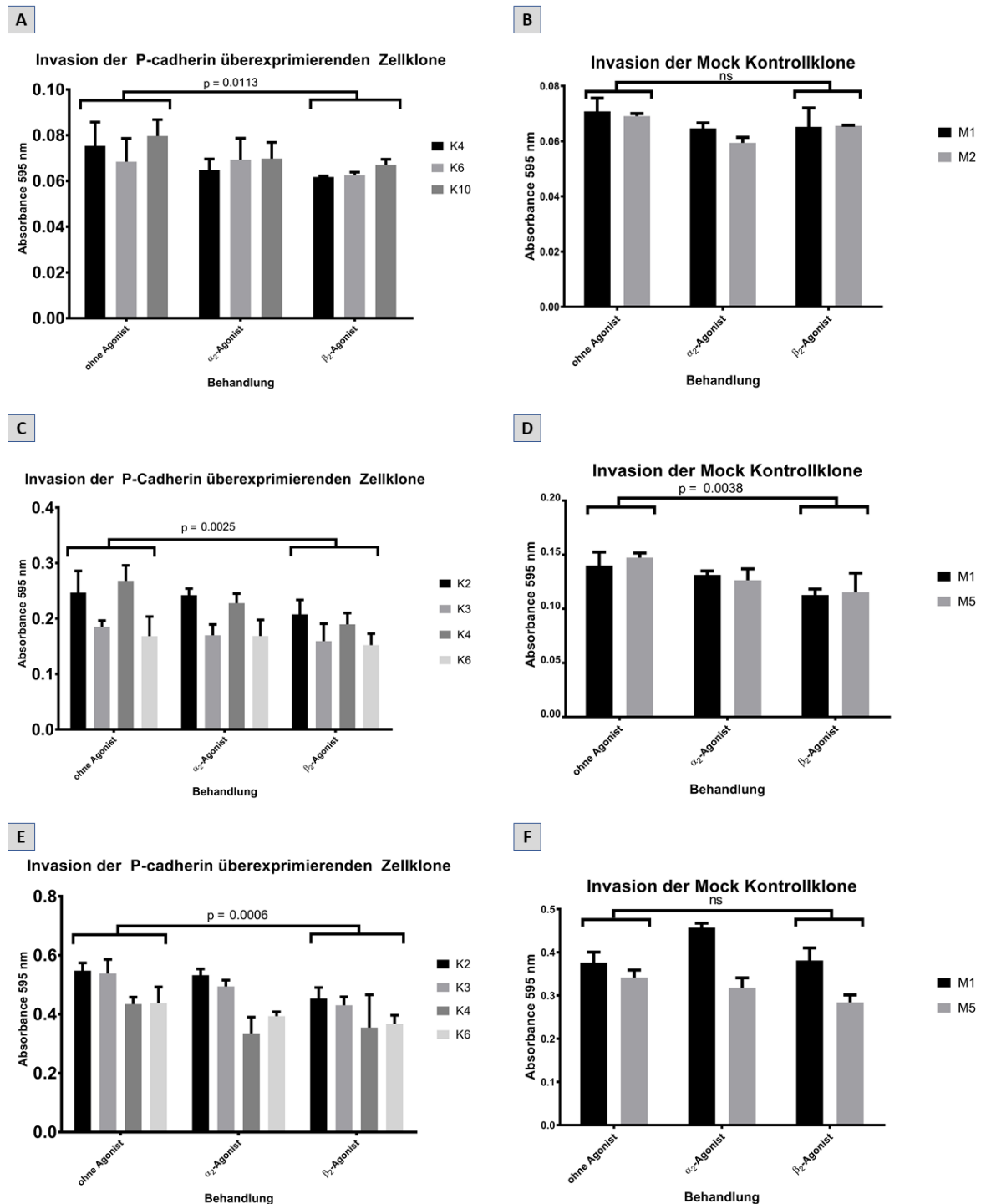


Abbildung 27: Invasionsassay.

Der Invasionsassay wurde insgesamt dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Pro Versuchsansatz wurde je Zellklone und Mock mit Triplets für jede Bedingung gearbeitet (n = 3). Nach Inkubation über Nacht wurde jeweils tags darauf der Kristallviolett-Assay durchgeführt und die so bei 595 nm Wellenlänge gewonnenen Absorptionswerte statistisch ausgewertet. In den Versuchsansätzen 1 (Absorptionswerte A und B) und 2 (Absorptionswerte C und D) wurde mit einer Konzentration

der Agonisten von 10^{-8} M für den α_2 - bzw. 10^{-7} M für den β_2 -adrenergen Agonisten gearbeitet. Für den dritten Ansatz (Absorptionswerte E und F) wurde eine jeweils 10-fache Konzentration des Agonisten (10^{-7} M für Brimonidin bzw. 10^{-6} M für Formoterol) eingesetzt. Zur Feststellung statistischer Signifikanzen erfolgte immer der Vergleich β_2 -adrenerger Stimulation gegen das Vorhandensein keiner adrenergen Stimulation im jeweiligen Versuchsansatz pro Zellklon durch Anova-Test. Anmerkung: Abweichend von den Darstellungen der Ergebnisse anderer Versuche wurde hier eine detaillierte Aufgliederung vorgenommen, um die verwendeten Zellklone einzeln darzustellen. Bei den anderen Versuchen wurde der Übersichtlichkeit halber darauf verzichtet und nur eine gruppierende Darstellung der P-Cadherin exprimierenden Klone gegenüber den Mocks gewählt, da diesen ohnehin keine statistisch verwertbaren Ergebnisse entnommen werden können. **A:** Absorptionswerte von K4, K6 und K10 als P-Cadherin exprimierende Zellklone zeigen eine signifikante ($p = 0,01$) Verringerung der Invasion im durchgeführten Assay durch β_2 -adrenerge Stimulation. **B:** Im selben Versuchsansatz wie für A gewonnene Absorptionswerte von M1 und M2, den Mock Kontrollklonen ohne P-Cadherin-Expression, zeigen keine statistisch signifikante Beeinflussung ($p > 0,05$) hinsichtlich des Invasionsverhaltens *in vitro* durch β_2 -adrenerge Stimulation. **C:** Erneuter Versuchsansatz mit Absorptionswerten für K2, K3, K4 und K6 (jeweils P-Cadherin-Expression) zeigt statistisch signifikanten ($p = 0,0025$) Rückgang bei der Invasion *in vitro* durch Stimulation mit β_2 -adrenergem Agonisten. **D:** Simultan zu C durchgeführter Versuchsansatz mit M1 und M5 als Kontrolle zeigt im vorliegenden Fall leicht, aber schwächer als in C, signifikant ($p = 0,0038$) verringerte Tendenz zur Invasion durch β_2 -adrenerge Stimulation. **E:** Weiterer Ansatz mit 10-facher Konzentration adrenerger Agonisten, also 10^{-7} M für den α_2 - bzw. 10^{-6} M für den β_2 -adrenergen Agonisten, zeigt Absorptionswerte für K2, K3, K4 und K6, die jeweils P-Cadherin exprimieren und durch β_2 -adrenerge Stimulation eine statistisch stark signifikant ($p = 0,0006$) geringere Tendenz zur Invasion aufzeigen. **F:** Gleichzeitig mit E gewonnene Absorptionswerte für M1 und M5 (beide keine Expression von P-Cadherin) zeigen keine statistisch signifikante Auswirkung ($p > 0,05$) durch die Anwesenheit des β_2 -adrenergen Agonisten hinsichtlich ihrer Invasion *in vitro*.

3 Experimente, jeweils $n = 3$ pro Zellklon.

4.3.3 Migration

Ein Migrationsassay wurde durchgeführt, um zu untersuchen, ob die Anwesenheit von Agonisten im Medium Auswirkungen auf die Fähigkeit zur Migration von P-Cadherin exprimierenden Zellen bzw. Mocks ohne Expression dieses Oberflächenproteins hat. Die Auswertung erfolgte nach dem anschließenden Kristallviolett-Assay und photometrischer Detektion und ist in Abbildung 28 dargestellt. Dabei zeigt sich, dass weder der α_2 - noch der β_2 -adrenerge Agonist in der verwendeten Konzentration von 10^{-8} M für den α_2 - bzw. 10^{-7} M für den β_2 -adrenergen Agonisten die Fähigkeit der Zellen zur Migration signifikant beeinflussen. Auch die Expression des Oberflächenproteins P-Cadherin scheint keine statistisch haltbare Beeinträchtigung hinsichtlich der Zellmigration zu verantworten.

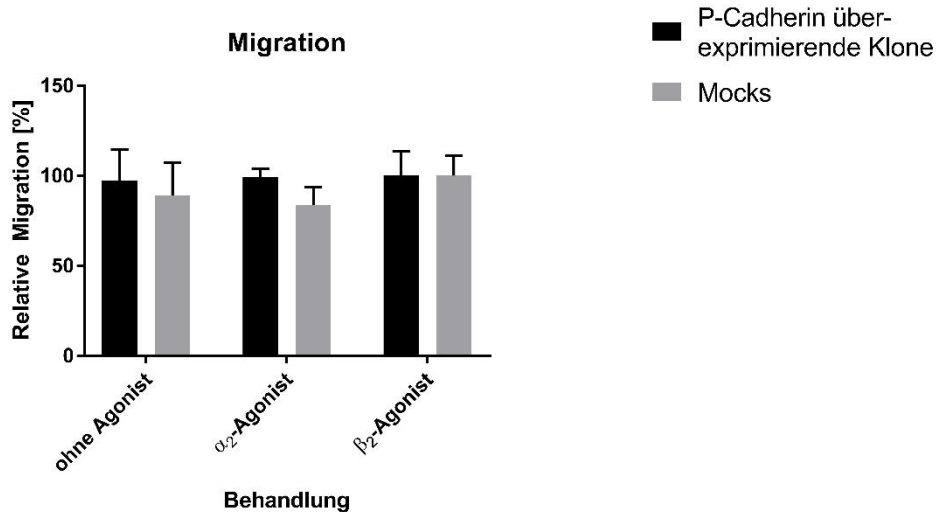


Abbildung 28: Migrationsassay.

Die Zellen wurden 16 h im Migrationsversuch inkubiert. Es erfolgte eine Auswertung mit dem Kristallviolett-Assay. Optische Dichten wurden im Plattenphotometer bei 595 nm detektiert und zur graphischen Darstellung wurden die P-Cadherin exprimierenden Klone und die Mocks jeweils zusammengefasst. Es zeigt sich, dass weder die Agonisten noch die Expression von P-Cadherin einen signifikanten Einfluss auf das Migrationsverhalten der Zellen haben.

1 Experiment, n = 3 pro Zellklon.

4.3.4 Proliferation

Der Einfluss von Agonisten auf Zellklone mit P-Cadherin-Expression und Mockzellen wurde weiterhin mithilfe des WST-Proliferationsversuchs analysiert. Abbildung 29 zeigt die Verdopplungszeiten der P-Cadherin exprimierenden Klone im Vergleich zu denen der Mockkontrollen. Beim ersten Versuchsansatz (Abbildung 29A) wurde die übliche Agonistenkonzentration von 10^{-8} M für Brimonidin (α_2 -adrenerg) bzw. 10^{-7} M für Formoterol (β_2 -adrenerg) eingesetzt und über vier Tage täglich eine photometrische Messung vorgenommen. Beim darauffolgenden Versuchsansatz (Abbildung 29B) wurde dagegen mit der 10-fachen Konzentration der Agonisten (10^{-7} M für Brimonidin bzw. 10^{-6} M für Formoterol) gearbeitet und es erfolgte die Messung über sieben Tage hinweg. Für die normale Agonistenkonzentration (Abbildung 29A) lässt sich insgesamt feststellen, dass keine auffälligen Unterschiede durch die Anwesenheit verschiedener Agonisten im Medium hervortreten. Dabei zeigen sich sowohl die P-Cadherin exprimierenden Klone als auch die Mock Kontrollklone gleichermaßen unauffällig. Wird jedoch die 10-fache Konzentration der Agonisten eingesetzt (Abbildung 29B), so zeichnen sich Tendenzen ab, dass die Anwesenheit des β_2 -adrenergen Agonisten im Vergleich zur Behandlung ohne Agonisten eine Verkürzung der Verdopplungszeit, d.h. eine schnellere

Proliferation *in vitro* nach sich zieht. Dieser Trend lässt sich sowohl bei den P-Cadherin exprimierenden Klonen als auch bei den Mock Kontrollzellen, allerdings auf unterschiedlichem Ausgangsniveau, feststellen. Diese Auswirkungen erwiesen sich jedoch als statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$).

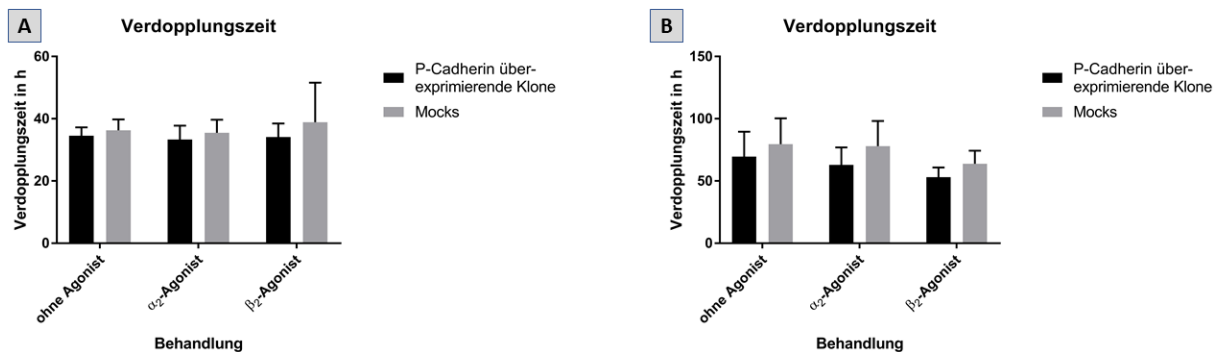


Abbildung 29: WST-Proliferationsassay.

Für den Versuchsansatz wurden pro Zellklon für jede Bedingung 8 Wells einer 96 Well Platte verwendet ($n=8$). Für jeden einzelnen Versuchstag wurde eine 96 Well Platte angesetzt und nach Zugabe des WST-Reagens nach ein, zwei und vier Stunden vermessen. Die vorliegenden Abbildungen A und B beruhen auf Werten, die zwei Stunden nach WST-Zugabe bei 450 nm detektiert wurden. Dabei wurden bei der Auswertung mithilfe von GraphPad Prism über nonlineare Regression Verdopplungszeiten bei angenommenem exponentiellem Wachstum errechnet. Zur graphischen Darstellung wurden zudem die P-Cadherin exprimierenden Klone bzw. die Mocks zusammengefasst, sodass die hier angegebenen Zahlen durch $n = 32$ für die P-Cadherin exprimierenden Klone (4 Klone $\times n = 8$) bzw. $n = 16$ für die Mock Kontrollklone ohne P-Cadherin-Expression (2 Mocks $\times n = 8$) charakterisiert werden können. Bei Versuchsansatz 1 (A) erfolgte über vier Tage hinweg jeweils tägliche Messung und bei Ansatz 2 (B) erfolgte eine Messung über sieben Tage, wobei an Tag eins, zwei, drei, vier, fünf und sieben eine photometrische Analyse erfolgte und Tag sechs graphisch interpoliert wurde. Sobald sinkende Werte festgestellt wurden, die auf absterbende Zellen zurückzuführen waren, wurde der betroffene Zellklon ab dem jeweiligen Zeitpunkt ausgeschlossen, da ansonsten die Verdopplungszeit bei der Auswertung durch GraphPad Prism verfälscht worden wäre. **A:** Verdopplungszeit von P-Cadherin exprimierenden Klonen im Vergleich zu den Mockkontrollen in Abhängigkeit von den verschiedenen Bedingungen „kein Agonist“, „ α_2 -adrenerger Agonist“, „ β_2 -adrenerger Agonist“. Dabei wurden vorhandene Agonisten in der Konzentration 10^{-8} M für α_2 -adrenerg bzw. 10^{-7} M für β_2 -adrenerg eingesetzt. Messung über vier Tage. **B:** Verdopplungszeit von P-Cadherin exprimierenden Klonen im Vergleich zu den Mockkontrollen in Abhängigkeit von den verschiedenen Bedingungen „kein Agonist“, „ α_2 -adrenerger Agonist“, „ β_2 -adrenerger Agonist“. In diesem Fall wurden vorhandene Agonisten in 10-facher Konzentration (10^{-7} M α_2 -adrenerg bzw. 10^{-6} M β_2 -adrenerg) eingesetzt. Messung über sieben Tage.

2 Experimente, $n = 8$ pro Zellklon.

4.4 Analyse der MMP-Aktivität

Nach Inkubation von OSCC-Zellen über Nacht in Ab- bzw. Anwesenheit des jeweiligen Agonisten wurden die Überstände von den Zellen aus den Kulturflaschen abgenommen. Durch die zymographische Analyse dieser Proben aus der Zellkultur konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit bedauerlicherweise keine auswertbaren Daten gewonnen werden. Weder der Verdau von Gelatine- noch der von Caseingelen führte zu brauchbaren Ergebnissen.

5 Diskussion

5.1 Charakterisierung der verwendeten Zellen

Im Folgenden sind, wie auch schon bei der Darstellung der Ergebnisse zuvor, bei der Bezeichnung von Zellen mit dem Begriff „Klone“ (K2, K3, K4, K6) stets die P-Cadherin exprimierenden Zellklone gemeint und die Leervektorkontrollen werden auch als „Mocks“ (M1 und M5) bezeichnet.

Zur Charakterisierung der verwendeten Zellen lässt sich feststellen, dass diese sich morphologisch unterscheiden (siehe Abbildung 12 und Abbildung 13) und gleichzeitig P-Cadherin auf unterschiedlich hohem Niveau exprimieren (siehe Abbildung 14). Wie von der Arbeitsgruppe schon früher aufgeklärt, zeigen OSCC-Zellen mit niedriger oder keiner Expression von P-Cadherin lichtmikroskopisch in 2D-Kultur spindelförmige mesenchymale Morphologie anstatt eines epithelialen mosaikförmigen Erscheinungsbildes [56].

Bei der Betrachtung von Abbildung 12 und Abbildung 13 fällt folgendes auf: M1 und M5 zeigen die angesprochene mesenchymale Zellmorphologie. In Hinblick auf den Western Blot zur Detektion von P-Cadherin (siehe Abbildung 14) präsentiert sich für M1 und M5 keine Expression dieses Proteins. Dagegen erinnern K4 und K3 optisch sehr stark an ein epitheliales mosaikförmiges Wachstum. Dies steht nach obiger Feststellung im Einklang mit deren relativ hoher Expression von Volllänge P-Cadherin (siehe Abbildung 14). Auch K2 und K6 erinnern noch schwach an das epitheliale Erscheinungsbild, wobei K6 optisch zur mesenchymalen Morphologie der Mocks tendiert. Auch dies korreliert mit dem Expressionslevel von P-Cadherin der jeweiligen Zellen. Schließlich lässt sich aus Abbildung 14 entnehmen, dass für K4, K3 und K2 ein Großteil des P-Cadherins in glykosylierter Form vorliegt; dies gilt als eine wichtige Voraussetzung zur Expression von Proteinen an der Oberfläche einer Zelle.

Die Beobachtung hinsichtlich des Wachstumsmusters scheint einleuchtend, wenn man bedenkt, dass P-Cadherin als Zell-Zell-Adhäsionsmolekül fungiert und auch bei der Differenzierung epithelialer Keratinozyten eine Rolle spielt [49, 51]. Wenn die Zellen durch höhere Expression von P-Cadherin bessere Verbindungen untereinander eingehen können, führt dies zu einer größeren Kontaktfläche unter den Zellen, was bei dem pflastersteinartigen Mosaik eines Epithels mehr der Fall ist als bei spindelförmigen mesenchymalen Zellen.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die verwendeten Zellklone in unterschiedlicher Menge P-Cadherin exprimieren, wobei mit schwächerem Expressionslevel zunehmende Ähnlichkeiten mit den Mocks (Leervektorkontrollen) in Erscheinung treten; dies steht im Einklang mit früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe [56]. Da eine geringere P-Cadherin-Expression auf ein fortgeschrittenes OSCC hinweist [54], kann angenommen werden, dass die P-Cadherin exprimierenden Zellklone sich im Vergleich zu den Leervektorkontrollen, den Mocks, weniger aggressiv in ihrem Verhalten zeigen könnten, da sie mehr dem besser differenzierten Gewebe ähneln. Innerhalb der P-Cadherin exprimierenden Klone kann ebenfalls davon ausgegangen werden, dass K2 und K6 mit ihrer Reaktion auf Stimuli ähnlich wie Mocks reagieren könnten. Die verwendeten Zellen lassen sich also anhand ihrer P-Cadherin-Expression und morphologisch in einer Reihenfolge abnehmender Differenzierung anordnen, wie in Abbildung 14 von links nach rechts dargestellt ($K4 \rightarrow K3 \rightarrow K2 \rightarrow K6 \rightarrow M1 \rightarrow M5$). K3 nimmt dabei eine schlechtere Position als K4 ein, da bei diesen Zellen mehr Fragmente des Oberflächenproteins vorliegen, was, aufgrund hoher proteolytischer Aktivität, schon auf einen aggressiveren Phänotypen hinweist [55].

Western Blots zur Detektion α_{2B} - und β_2 -adrenerger Rezeptoren (siehe Abbildung 15 und Abbildung 16) erfolgten, um zu untersuchen, ob die verwendeten Zellen die gesuchten Rezeptoren exprimieren und um etwaige Auswirkungen einer P-Cadherin-Expression auf das Expressionslevel des Rezeptors auszuschließen. Wie in den beiden Abbildungen erkenntlich, exprimieren die verwendeten Zellen, unabhängig einer erfolgten Stimulation durch Agonisten und ohne Verbindung zur Expression von P-Cadherin, gleichmäßig α_{2B} - und β_2 -adrenerge Rezeptoren. Vor allem der β_2 -Rezeptor steht im Mittelpunkt wissenschaftlichen Interesses bei vielen Krebsleiden, so auch beim OSCC. Es wird berichtet, dass beim OSCC eine erhöhte Expression des β_2 -Rezeptors im Vergleich zu gesundem Gewebe erfolgt [92]. Insofern scheint es plausibel, dass im vorliegenden Western Blot die genannten Rezeptoren nachweisbar sind.

In einer anderen Doktorarbeit der Arbeitsgruppe wurden die entsprechenden adrenergen Rezeptoren bereits mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen in der Membran der verwendeten Zelllinien nachgewiesen (Doktorarbeit Maximilian Geyer, 2018).

5.2 Expression von Proteinen des Wnt-Signalsystems

5.2.1 GSK-3 β

GSK-3 β ist ein zentrales Enzym im Organismus, dessen Aktivität durch Phosphorylierung reguliert wird. Eine Phosphorylierung an Ser9 führt zu einer Inaktivierung und bei Tyr216 zur Aktivierung der GSK-3 β [108].

GSK-3 β ist für die Phosphorylierung vieler Substrate zuständig, wobei viele ihrer Substrate nach Phosphorylierung inaktiviert oder der Degradation im Proteasom zugeführt werden. Ein Anstieg der inaktiven Form (P-GSK-3 β Ser9) wird beispielsweise bei neoplastischen Veränderungen und dem Wachstum beim Mammakarzinom oder Plattenepithelkarzinom der Haut beobachtet [108–110]. Der Zusammenhang besteht hier aufgrund geringerer Aktivität der Kinase bei der Phosphorylierung von β -Catenin im kanonischen Wnt-Signalweg, was in Folge zu erhöhter Zellaktivität führt. Nicht phosphoryliertes β -Catenin entzieht sich nämlich der proteasomalen Degradation, sodass es nach zytoplasmatischer Anreicherung auch in den Zellkern transloziert wird, wo es eine verstärkte Expression Zellaktivität steigernder Zielgene nach sich zieht (siehe auch Abschnitt 1.3.3).

Für andere Tumoren, wie unter anderem Ovarial-, Pankreas-, Prostata- und Kolonkarzinome wurde eine erhöhte Aktivität von GSK-3 β festgestellt [108, 111]. Hier ist die Annahme, dass durch die Kinase eine Beeinflussung der Aktivität von NF- κ B erfolgt, was eine erhöhte Tumorerprogression, Metastasierung und Chemoresistenz nach sich zieht.

Die konträre Rolle bei verschiedenen Tumoren legt die Vermutung nahe, dass GSK-3 β in der Lage ist, verschiedene Signalwege bei Tumoren mit unterschiedlichen Effekten zu aktivieren, eventuell auch abhängig vom Tumorstadium [111].

Beim OSCC scheint eine teilweise Inaktivierung der GSK-3 β eine tumorfördernde Wirkung nach sich zu ziehen, sodass hier verstärkt die Funktion als Tumorsuppressor im Vordergrund steht [73]. Dies könnte in einer Ähnlichkeit oraler Keratinozyten mit denen in der Haut begründet sein, wo eine verringerte GSK-3 β -Aktivität ebenfalls mit der Erkrankung am Plattenepithelkarzinom einhergeht [109, 110].

Die Untersuchung der Expression von GSK-3 β und P-GSK-3 β , dem phosphorylierten Derivat dieser Kinase, im Western Blot und die anschließende semiquantitative Auswertung zeigt, dass eine α_2 - oder β_2 -adrenerge Stimulation keinen auf Ebene der Proteinexpression detektierbaren Einfluss auf die verwendeten Zellen ausübt (siehe Abbildung 17 und Abbildung 18).

Der verwendete Antikörper gegen P-GSK-3 β ist spezifisch gegen die Ser9 phosphorylierte, inaktive Form der Kinase gerichtet [112]. In dieser Arbeit ist also mit P-GSK-3 β immer die bei Ser9 phosphorylierte inaktive GSK-3 β gemeint und nicht die bei Tyr216 phosphorylierte aktive Form.

Aufgrund der Regulation von GSK-3 β durch Kinasen wie Protein Kinase A (PKA) oder Protein Kinase C (PKC) kann theoretisch eine cAMP-abhängige, G-Protein-vermittelte Beeinflussung der Aktivität von GSK-3 β in den verwendeten Zellen durch adrenerge Stimulation erfolgen [72, 113].

Auch im Wnt-Signalweg, in dem GSK-3 β am Destruktionskomplex beteiligt ist, erfolgt über den Fzd-Rezeptor eine G-Protein-vermittelte Regulation dieser Kinase [65]. Zusätzlich wurde für die Phäochromozytom-Zelllinie PC12 eine indirekte Aktivierung des Akt Signalsystems, in dem GSK-3 β ebenfalls involviert ist, durch α_2 -adrenerge Rezeptoren nachgewiesen [114]. Das zeigt, dass auch unabhängig von der direkten Stimulation adrenerger Rezeptoren intrazelluläre Prozesse in Gang gesetzt werden können, die die Aktivität der GSK-3 β beeinflussen könnten.

Auf die GSK-3 β wirkt insgesamt eine Vielzahl modulierender Faktoren ein [72, 108], sodass eventuell aufgrund des Überwiegens anderer Parameter die Behandlung mit Agonisten in den durchgeführten Versuchen keine Effekte auf die Expression von GSK-3 β und P-GSK-3 β und damit dessen Aktivität zeigen konnte. Andererseits kann es sein, dass für andere Zellarten beschriebene Beeinflussungen durch α_2 -adrenerge Stimulation [114] beim OSCC nicht zutreffen, da Signale anders vermittelt oder moduliert werden könnten.

Allerdings lässt sich dem Western Blot mit P-GSK-3 β (siehe Abbildung 17C, D und Abbildung 18B, C) entnehmen, dass die Leervektorkontrollen M1 und M5 einerseits absolut betrachtet auf einem höheren Niveau die inaktive P-GSK-3 β exprimieren (siehe Abbildung 18B) und dass auch im Verhältnis zur aktiven Form (siehe Abbildung 18C) der Anteil der bei Ser9 phosphorylierten Kinase erhöht ist. Dieses Ergebnis stützt die Beobachtung, dass die Expression von P-Cadherin mit geringerer Aggressivität des OSCCs verbunden ist, wenn man bedenkt, dass beim OSCC die Inaktivierung der GSK-3 β tumorprogressive Auswirkungen zeigt [73]; dies wurde zudem auch schon in früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe aufgezeigt [56].

Ebenfalls kann der Eindruck des epithelialen Erscheinungsbildes der P-Cadherin exprimierenden Klone mit diesem Ergebnis in Einklang gebracht werden: Durch die geringere Phosphory-

lierung und damit höhere Aktivität der GSK-3 β wird Snail phosphoryliert und durch die geringere Translokation dieses Proteins in den Zellkern wird ein epithelialer Phänotyp beim OSCC ausgehend von der Expression von P-Cadherin induziert [56].

Um genaue Auswirkungen adrenerger Stimulation auf die Expression und Aktivität von GSK-3 β bei P-Cadherin exprimierenden OSCC-Zellen im Vergleich zu Zellen ohne dieses Oberflächenprotein zu untersuchen, sind weitere Ansätze nötig, eventuell auch mit mehreren Konzentrationen der eingesetzten Agonisten oder anderen Methoden.

5.2.2 β -Catenin

Wnt-Liganden können drei verschiedenen intrazelluläre Signalwege auslösen, darunter den kanonischen, von β -Catenin abhängigen. Die Aktivierung des Wnt-Systems führt dabei zu einer Anreicherung von β -Catenin im Zytoplasma, das ansonsten bei Inaktivität nach Phosphorylierung durch Casein Kinase 1a (CK1a) und GSK-3 β ubiquitinyliert und im Proteasom abgebaut wird. Eine zytoplasmatische Anreicherung von β -Catenin hat schließlich zur Folge, dass es zu einer Translokation in den Zellkern kommt, wo eine Hochregulation der Expression von Wnt-/ β -Catenin-Zielgenen erfolgt [68].

Die besondere Bedeutung eines verstärkt aktiven Wnt-Signalsystems ist dabei für einige Tumoren von Interesse [65]. Beim OSCC ist meist eine zytoplasmatische Akkumulation dieses Proteins nachweisbar, wohingegen physiologische orale Mukosa überwiegend membranständiges β -Catenin, gebunden an Cadherine[49], zeigt [49, 68].

β -Catenin nimmt als Bestandteil des kanonischen Wnt-Signalweges eine weniger universale Position innerhalb zellulärer biochemischer Vorgänge ein als GSK-3 β , welche als Kinase an außerordentlich vielen Prozessen, bis hin zu Stoffwechselaktivitäten, beteiligt ist. Somit kann β -Catenin im Rahmen der vorliegenden Arbeit wahrscheinlich als besserer Hinweis auf die Aktivität des Wnt-Signalweges betrachtet werden als GSK-3 β , welches zusätzlich auch stark in andere zelluläre Vorgänge involviert ist.

Bei dem durchgeführten Western Blot wurde ein monoklonaler muriner Antikörper gegen β -Catenin verwendet, zu dessen Herstellung als Immunogen die Aminosäuresequenz von β -Catenin der Maus von Position 571 bis 781 verwendet wurde [115]. Die Kontrolle der Aktivität von β -Catenin durch Phosphorylierung erfolgt aminoterminal an Ser33, Ser37, Thr41 und Ser45 durch CK1a und GSK-3 β [116]. Es kann also davon ausgegangen werden, dass der ver-

wendete Antikörper in der Lage ist, auch phosphoryliertes β -Catenin (P- β -Catenin) zu detektieren. Betrachtet man die PVDF-Membran des durchgeführten Western Blots (siehe Abbildung 19), lassen sich Doppelbanden feststellen, die dahingehend interpretiert werden können, als dass die obere Bande die phosphorylierte und die untere die nicht phosphorylierte Form von β -Catenin darstellt.

Es lässt sich bei der erfolgten proteinbiochemischen Untersuchung im Western Blot und der anschließenden Auswertung (siehe Abbildung 20) allerdings keine Beeinflussung der Expression von β -Catenin oder dessen Phosphorylierung feststellen. Das erlaubt die Schlussfolgerung, dass sich die verwendeten OSCC-Zellen weder in Abhängigkeit einer Expression von P-Cadherin noch durch Einwirken adrenerger Agonisten hinsichtlich der Aktivität des Wnt-Signalweges beeinflussen lassen.

Die Menge des im Zytoplasma vorhandenen β -Catenins steht im Zusammenhang mit der Aktivität des kanonischen Wnt-Signalweges und kann im Rahmen dessen durch die GSK-3 β beeinflusst werden, dessen Aktivität ebenfalls untersucht wurde. Wäre also über diesen Zusammenhang eine direkte Auswirkung adrenerger Stimulation festgestellt worden, hätte dies wahrscheinlich ebenfalls Folgen hinsichtlich der Aktivität des Wnt-Signalweges nach sich gezogen, die sich auf die detektierbare Menge von P- β -Catenin auswirken. In den durchgeführten Western Blots wurde allerdings das Gesamtprotein untersucht, weshalb theoretisch geringfügige Änderungen des phosphorylierten β -Catenin-Anteils im Zytoplasma beispielsweise durch hohe β -Catenin-Vorkommen an der Zellmembran überlagert worden sein können. So wird auch der indirekte Rückschluss auf eine mögliche Beeinflussung der Aktivität von GSK-3 β durch adrenerge Stimulation im Rahmen des kanonischen Wnt-Signalweges erschwert.

Ein anderer möglicher Einflussmechanismus adrenerger Stimulation auf die Proteinmenge von β -Catenin wäre G-Protein-vermittelt über die Protein Kinase A denkbar: Über PKA kann der kanonische Wnt-Signalweg durch Fzd- und LRP5/6-Phosphorylierung aktiviert werden [117]. So wäre grundsätzlich eine Beeinflussung des Levels von β -Catenin ohne direkte Regulation der Aktivität von GSK-3 β über adrenerge Signalkaskaden möglich.

Zu den vorliegenden Western Blots lässt sich lediglich feststellen, dass β -Catenin in phosphorylierter und nicht phosphorylierter Form bei Mockzellen ohne Expression von P-Cadherin, deutlich weniger stark exprimiert wird als bei den Zellklonen mit vorhandener P-Cadherin-Expression. Auch der Zusammenhang zur Aktivität der GSK-3 β lässt sich gut erkennen: bei

den Mocks, also den Leervektorkontrollen, mit höherer Inaktivität dieser für die Phosphorylierung von β -Catenin zuständigen Kinase lässt sich deutlich weniger P- β -Catenin nachweisen als bei den P-Cadherin exprimierenden Zellen mit stärkerer GSK-3 β -Aktivität. Dies kann als indirekte Bestätigung dafür angesehen werden, dass die Antikörper der beiden Nachweise spezifisch an die gesuchten Proteine binden konnten und dass die Regulation für β -Catenin durch GSK-3 β für die verwendeten Zellen zu gelten scheint. Zudem zeigt es, dass P-Cadherin den Wnt-Signalweg negativ moduliert, was eine verringerte Aggressivität dieser Tumorzellen nach sich zieht.

5.3 Expression von PD-L1

Beim gesunden Patienten wird PD-L1 vorwiegend auf T- und B-Zellen, Monozyten, antigenpräsentierenden Zellen (APCs) und Epithelzellen exprimiert. Proinflammatorische Zytokine wie Interferon- γ oder Interleukin-4 führen dabei zu einer Hochregulation der Expression von PD-L1. In seiner physiologischen Funktion trägt PD-L1 zur Modulation der Immunabwehr hinsichtlich deren Toleranz gegenüber körpereigenem Gewebe bei und eine fehlende Expression dieses Proteins führt zu Autoimmunerkrankungen. Die Interaktion von PD-L1 mit seinem Rezeptor auf der Oberfläche von T-Zellen verhindert unter anderem die Proliferation und Funktion dieser Zellen und induziert deren Apoptose [59].

Die verstärkte Expression von PD-L1 bei Tumoren wird mit einer Unterdrückung der Immunantwort und somit einer erhöhten Toleranz des Abwehrsystems gegenüber dem Tumorgewebe assoziiert [118].

Die Aktivität von PD-L1 wird moduliert über Ubiquitylierung und N-Glykosylierung, wobei wahrscheinlich eine Glykosylierung die Bindung von GSK-3 β antagonisieren und die Degradation von PD-L1 verhindern kann. Die N-Glykosylierung dient als Voraussetzung zu Interaktion von PD-L1 mit dem PD1-Rezeptor und erfolgt durch posttranslationale Modifikation. Hierbei ist eine Oligosaccharyltransferase beteiligt, um an Asparagin (Asn) Oligosaccharidreste zu binden. Weitere Prozessierung erfolgt im Golgi-Apparat [119].

Die Regulation der Expression von PD-L1 ist komplex und noch nicht vollständig aufgeklärt, dennoch wird inzwischen davon ausgegangen, dass die Expression sowohl durch onkogene Aktivierung von Signalwegen in Krebszellen als auch durch Faktoren der Tumorumgebung reguliert wird [59]. Dabei wird dem MAPK- und PI3K/Akt-Signalweg, unter denen vor allem letzterer für eine Vielzahl humoraler Stimuli, wie Wachstumshormone und Zytokine, em-

pfänglich ist, eine bedeutende Funktion zugewiesen [59, 120]. Eine Aktivierung dieser Signalsysteme soll eine erhöhte Expression von PD-L1 und damit bessere Unterdrückung der lokalen Immunantwort zur Folge haben. Für den Brustkrebs wurde beispielsweise eine Stabilisierung von PD-L1 durch Inaktivierung von GSK-3 β über EGF festgestellt, was auf eine Akt-vermittelte Signaltransduktion hindeuten könnte [121]. Zusätzlich sollen HIF-1 α , STAT3 und NF- κ B eine Hochregulation von PD-L1 bewirken, letzterer Transkriptionsfaktor auch als Mediator der IFN γ -induzierten Expression von PD-L1 [59, 122].

Die Regulation der Expression von PD-L1 soll zusätzlich gewebe- und zellabhängig erfolgen [59], sodass auch frisch isoliertes Tumorgewebe aus Patienten im Vergleich zu den aus Zellkultur gewonnenen Proben aufgrund des Milieus der Zytokine beim Krebspatienten ein anderes Niveau der PD-L1-Expression aufweisen kann [118].

Für das OSCC wurde beobachtet, dass eine Mehrzahl der Befunde positiv an PD-L1 ist, und so die Immunantwort des Patienten beeinflusst werden kann [123].

Die Expression von PD-L1 steht zudem in Zusammenhang mit der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) beim HNSCC [124]. Für OSCC-Zellen mit höherer Expression von P-Cadherin kann angenommen werden, dass die EMT noch nicht so fortgeschritten ist, wie es bei Zellen ohne dieses Protein der Fall ist [56, 74]. Zudem sind die biologischen Auswirkungen von PD-L1 abhängig von der Lokalisation in der glykosylierten Form an der Zellmembran, denn nur so kann die Aktivierung des Zielrezeptors PD-1 und eine Funktion des Proteins erfolgen [118, 119].

Bei den untersuchten Zellen des HNSCC konnte ebenfalls auf Proteinebene PD-L1 nachgewiesen werden. Im Western Blot wurde dabei eine Doppelbande detektiert (siehe Abbildung 21), wobei die obere Bande als glykosylierte und die untere als nicht glykosylierte Form von PD-L1 interpretiert werden kann [121]. Die semiquantitative Auswertung (siehe Abbildung 22) erlaubt Aussagen über die Menge des exprimierten Proteins sowie über das Verhältnis von glykosyliertem zu nicht glykosyliertem PD-L1 (siehe Abbildung 22C), sodass über den Grad der Glykosylierung auch Rückschlüsse hinsichtlich des membranständigen und damit immunregulatorisch wirksamen PD-L1 getroffen werden können.

In den durchgeführten Western Blots zeigte sich allerdings eine stärkere Expression der oberen Bande bzw. glykosylierten Form von PD-L1 bei den P-Cadherin exprimierenden Zellklonen im Vergleich zu den Mocks (siehe Abbildung 22A). Auch im Verhältnis zur nicht glykosylierten Form von PD-L1 (siehe Abbildung 22C) dominiert unter induzierter Expression von

P-Cadherin die glykosylierte Form. Diese Beobachtung ist konträr zu der Annahme, dass EMT und erhöhte Expression von PD-L1 einhergehen müssten. Es kann im vorliegenden Western Blot allerdings der Fall sein, dass hier aufgrund der Erfassung des Gesamtproteins intrazelluläres und nicht membranständiges trotzdem glykosyliertes PD-L1 erfasst wurde. Die Glykosylierung von PD-L1 ist an mehreren Stellen des Proteins möglich und ermöglicht eine vielseitige posttranslationale Prozessierung [125], sodass im durchgeführten Western Blot vielleicht mehr glykosyliertes Protein erfasst wurde, als letztendlich an der Zelloberfläche tatsächlich nachweisbar oder aktiv wäre. Somit wäre also der Rückschluss unzulässig, dass bei der vorliegenden Auswertung der als glykosyliert bezeichnete Anteil von PD-L1 direkt mit der an der Zellmembran lokalisierten Menge korreliert.

Eine adrenerge Stimulation zeigt bei den verwendeten Zellen weder Auswirkungen auf die Expression von PD-L1 selbst, noch auf das Verhältnis der Glykosylierung, auch nicht in Abhängigkeit einer induzierten Expression von P-Cadherin. Dies steht insofern in Einklang mit der Literatur, als dass sich die Regulation der Expression von PD-L1 als sehr komplex und nicht als unmittelbar adrenerg beeinflusst darstellt.

Zusammenhängend scheint auch die Degradation von PD-L1 unbeeinflusst durch adrenerge Stimulation, da weder GSK-3 β in Expression und Aktivität noch PD-L1 hinsichtlich des Expressionslevels beeinflusst werden.

5.4 Funktionelle Versuche

5.4.1 Vaskulogene Mimikry

Da die Blutversorgung die Voraussetzung zur Versorgung von Gewebe mit Nährstoffen darstellt, gilt Angiogenese als ein bedeutsamer Faktor für invasives Tumorwachstum, Progression des Tumors und dessen Metastasierung [126, 127]. Vor allem β -adrenerge Stimulation soll dabei Auswirkungen auf die Neogenese von Blutgefäßen bei Tumorerkrankungen zeigen. Dies ist für das Adenokarzinom der Lunge und des Pankreasganges, das Kolonkarzinom, für den Brustkrebs und das Ovarialkarzinom beschrieben [126, 128–130]. Für das Nasopharyngealkarzinom wurde ebenfalls erhöhte Tendenz zur Angiogenese unter adrenerger Stimulation beschrieben [90] und insgesamt gilt beim OSCC auch eine Beeinflussung durch Aktivierung adrenerger Signalwege als wahrscheinlich [131–133].

Neben der Angiogenese durch Endothelzellen spielt auch die Ausbildung tubulärer Strukturen durch Tumorzellen selbst eine wichtige Rolle zur Durchblutung von Tumorherden. Diese Fähigkeit ist besonders dann von Bedeutung, wenn bei der Tumorthherapie Substanzen zur Suppression der Angiogenese eingesetzt werden und der Tumor unter Transdifferenzierung selbst vaskulogene Mimikry aufzeigt und sich so dieser Therapie entziehen kann [127].

Es zeigt sich, dass viele molekulare Mechanismen an der Ausbildung vaskulogener Mimikry beteiligt sind, darunter Signalwege wie PI3K/Akt oder MMPs, allen voran MMP-2. Auch Hypoxie, VEGF und cAMP können diesen Vorgang modulieren [127, 134]. Für das maligne Melanom konnte gezeigt werden, dass vaskulogene Mimikry durch einen cAMP-Anstieg, vermittelt über viele weitere Signalwege, gehemmt werden können [134]. Insgesamt zeigen Tumorzellen mit vaskulogenen Tendenzen einen multipotenten stammzellähnlichen Phänotypen und auch der Prozess der EMT und die Ausbildung vaskulogener Mimikry gehen miteinander einher [127]. Anhand des Prostatakarzinoms und des HNSCCs wurde zudem festgestellt, dass EphA2 bei der Ausbildung vaskulogener Mimikry und auch der hierbei wichtigen EMT beteiligt ist [135, 136]. Insgesamt ziehen vaskulogene Mimikry eine schlechtere Prognose bei Tumorerkrankungen wie dem Melanom, dem Prostatakarzinom und dem Larynxkarzinom nach sich [135, 137, 138].

Als *in vitro* Modell zur Untersuchung einer Zelllinie hinsichtlich der Tendenz, vaskulogene Mimikry auszubilden, werden Zellen unter verschiedenen Bedingungen auf Matrigel® kultiviert und es wird die Neigung zur Ausbildung netzartiger Strukturen beobachtet.

Im Rahmen der durchgeführten Experimente konnte keine auswertbare Auswirkung adrenerger Stimulation auf die verwendeten Zellen festgestellt werden. Bei reiner Betrachtung der aufgezeichneten Bilder kann man leichte Tendenzen zur Ausbildung eines etwas feineren Netzwerkes bei β -adrenerger Stimulation durch Formoterol zum einen unter Expression von P-Cadherin und zum anderen bei Mockzellen erkennen (siehe Abbildung 23), allerdings lässt sich dieser Effekt statistisch nicht darstellen (siehe Abbildung 25). Möglicherweise lässt sich dies auf die eingesetzte Konzentration der Agonisten zurückführen oder auch auf die Tatsache, dass die verwendeten Zellen in ihrer Ausbildung netzartiger Strukturen nicht oder nur schwach durch adrenerge Stimulation beeinflussbar sind. Schließlich könnten auch die Parameter der Auswertungssoftware ImageJ und statistische Methoden Einfluss auf die Ergebnisse zeigen.

Da die Behandlung der verwendeten Zellen mit adrenergen Agonisten einen rezeptorvermittelten Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels nach sich ziehen sollte, wäre unter Stimulation mit Formoterol eine geringere Ausbildung vaskulogener Mimikry, analog dem malignen Melanom, denkbar [134].

Eine genaue Rolle von P-Cadherin bei der Ausbildung netzartiger Strukturen und der Angiogenese scheint unklar. Unter der Annahme, dass die Expression von P-Cadherin einen epithelialen Phänotyp des OSCCs induziert [56], und aufgrund der tumorsuppressiven Wirkung dieses Oberflächenmoleküls beim OSCC [50] lässt sich vermuten, dass im vorliegenden Versuch zu vaskulogenen Mimikry ein Unterschied durch die Expression von P-Cadherin nachweisbar sein müsste. Auch die Tatsache, dass EMT zur Ausprägung vaskulogener Mimikry beiträgt und der Verlust von P-Cadherin in Volllänge ein Schritt in die Richtung der EMT darstellt, sollte zur Folge haben, dass Leervektorkontrollen sich von Zellen mit induzierter P-Cadherin-Expression unterscheiden [127]. Statistisch ist hier allerdings kein Anhalt gegeben, lediglich auf den Fotos (siehe Abbildung 23 und Abbildung 24) könnte man erkennen, dass die dargestellte Netzstruktur bei fehlender Expression von P-Cadherin beim Mock tendenziell feinmaschiger ausgeprägt wäre.

Beim durchgeführten Versuch kann möglicherweise durch Modulation der Parameter wie beispielsweise Konzentration der Agonisten oder die Verwendung einer anderen Zelllinie ein aussagekräftigeres Ergebnis als das derzeit vorliegende erzielt werden.

5.4.2 Invasion

Die Fähigkeit von Tumorzellen zur Invasion gibt Aufschluss über die Neigung zur Metastasierung. Das Durchdringen der Basalmembran ist ein wichtiger Schritt zur Verbreitung der Krebszellen im Organismus und zur Ausbildung weiterer Tumorherde.

Eine Aktivierung des Wnt-Signalweges kann ebenso proinvasiv wirken wie viele weitere zelluläre Vorgänge [68].

Bei einigen Tumorerkrankungen spielt zudem die Expression von P-Cadherin eine herausragende Rolle auf dem Weg zur Metastasierung [50]. Bei Erkrankungen wie dem malignen Melanom oder dem Kolonkarzinom zieht geringere P-Cadherin-Expression eine stärkere Neigung zur Invasion und damit auch zur Metastasierung nach sich [139–141]. Der gegenteilige Effekt, also eine geringere Invasion durch Herabregulation der Expression von P-Cadherin,

tritt dagegen beim Mamma-, Magen-, Pankreas-, dem intrahepatischen Cholangio- und dem Blasenkarzinom auf [140, 142–145]. Gewebeabhängig ist also eine erhöhte oder verringerte Expression von P-Cadherin assoziiert mit einer stärkeren Neigung zur Invasion.

Reduzierte Invasionsfähigkeit in Verbindung mit diesem Oberflächenprotein wird dabei vor allem auf eine verstärkte interzelluläre Adhäsion zurückgeführt [141]. Dagegen wird eine erhöhte Neigung zur Invasion, die bei manchen Tumorerkrankungen durch die Expression von P-Cadherin verursacht oder verstärkt wird, auf eine Modulation intrazellulärer Signalwege über die juxtamembrane Domäne von P-Cadherin zurückgeführt [145].

Da beim OSCC die Expression von P-Cadherin ebenso tumorsuppressiv wirkt wie beim Melanom, sollte eine geringere Fähigkeit zur Invasion im Zusammenhang mit diesem Oberflächenprotein nachweisbar sein [50, 56]. Allerdings zeigen die durchgeführten Versuche, dass die Untersuchung simultan gewonnener Proben für Mock Kontrollklone ein geringeres Niveau der optischen Dichte als für die P-Cadherin exprimierenden Klone ergibt (siehe Abbildung 27C-F). Dies würde bedeuten, dass die Expression von P-Cadherin eine stärkere Invasion nach sich zieht, was sich als konträr zu obiger Annahme erweist.

Bei Betrachtung der Literatur zur Auswirkung adrenerger Stimulation auf die Invasion von Tumorzellen wird beispielsweise für das Pankreaskarzinom die proinvasive Wirkung β_2 -adrenerger Rezeptoraktivierung hervorgehoben [146–148]. Für weitere Tumorerkrankungen, so auch das OSCC, wird, auch im Zusammenhang mit erhöhter Expression der Matrixmetalloproteinasen MMP-2 und -9, von verstärkter Neigung zur Invasion durch Stimulation der β_2 -Adrenozeptoren ausgegangen [92] (siehe auch Abschnitt 5.5).

In der durchgeführten Untersuchung konnte allerdings für die Mocks, also native OSCC-Zellen, keine oder nur schwach signifikante Beeinflussung der Invasion durch β_2 -adrenerge Stimulation in der verwendeten Konzentration nachgewiesen werden (siehe Abbildung 27B, D, F). Dagegen zeigen sich OSCC-Zellen unter induzierter Expression von P-Cadherin empfänglich für β_2 -adrenerge Stimulation, die bei diesen Zellklonen zu signifikant geringerer Tendenz zur Invasion führt (siehe Abbildung 27A, C, E). Am stärksten signifikant fällt dabei der durchgeführte Versuch unter Verwendung einer zehnmal höheren Konzentration der Agonisten aus, was die Vermutung nahelegt, dass es sich um eine konzentrationsabhängige Wirkung handeln könnte (siehe Abbildung 27E).

Dabei widersprechen die gewonnenen Ergebnisse der aktuellen zuvor dargestellten Situation in der Literatur. Allerdings muss dabei erwogen werden, dass hier der Zusammenhang mit

der induzierten Expression von P-Cadherin untersucht wird, sodass auch dieses Oberflächenprotein in die Abweichung verwickelt sein könnte. Möglicherweise macht die Expression von P-Cadherin die verwendeten Zellen erst empfänglich für eine Reaktion auf die β_2 -adrenerge Stimulation mit Formoterol in der eingesetzten Konzentration. Dabei könnte die Aktivierung der β_2 -Adrenozeptoren in diesem Fall die Invasionsfähigkeit, möglicherweise auch zugunsten anderer zellulärer Prozesse wie der Proliferation, dämpfend modulieren.

Besonders Abbildung 27C kann entnommen werden, dass K4, also der Klon mit der, wie in 5.1 dargestellt, besten Differenzierung stärker beeinflussbar durch β_2 -adrenerge Stimulation ist als K6, der wie in 5.1 erläutert, hinsichtlich seiner Expression von P-Cadherin und Morphologie am ehesten den Mocks ähneln sollte. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der in 5.1 dargestellten Anordnung der Zellklone in einer Reihe abnehmender Differenzierung. Auch das Ergebnis, dass Leervektorkontrollen nicht bzw. schlechter β_2 -adrenerg in ihrem Invasionsverhalten beeinflussbar sind, spiegelt sich darin wider, dass sich die Auswirkung β_2 -adrenerger Stimulation bei K6 mit geringerer Expression von P-Cadherin weniger stark darstellt als bei K4, dem Klon mit der höchsten Expression dieses Proteins.

Die im Rahmen der durchgeführten Arbeit ausgangs verwendete Agonistenkonzentration von 10^{-8} M für Brimonidin, den α_2 -Agonisten, bzw. 10^{-7} M für Formoterol, den β_2 -Agonisten, könnten eventuell erhöht werden, um das physiologische Level bei Stress besser zu repräsentieren, wie es bei anderen Autoren gehandhabt wird, die teils mit 10^{-5} M Konzentration zur β_2 -adrenergen Stimulation arbeiten [93, 147]. So könnte versucht werden, die Effekte der adrenergen Stimulation zu verstärken. Andererseits könnte verifiziert werden, ob die Invasion tatsächlich dosisabhängig negativ beeinflusst wird durch β_2 -adrenerge Stimulation oder ob sich unter Verwendung einer höheren Konzentration der Agonisten gar eine verstärkte Neigung zur Invasion ergibt.

5.4.3 Migration

Unter anderem eine Aktivierung des Wnt-Signalsystems kann beim OSCC eine erhöhte Tendenz zur Migration nach sich ziehen [68]. Im Rahmen der durchgeführten Experimente konnte allerdings auf Ebene der Proteinexpression keine signifikante Beeinflussung dessen durch adrenerge Stimulation detektiert werden, sodass eine etwaige Auswirkung aktivierter Adrenozeptoren auf die Migration auf andere Ursachen zurückzuführen wäre.

Weiterhin führt die Expression von P-Cadherin nach einer vorherigen Untersuchung der Arbeitsgruppe beim OSCC zu signifikant niedrigerer Migration im Vergleich zu Mock-Kontrollzellen [56], wobei hier auch die durch Slit-2 induzierte Komplexbildung aus P-Cadherin und Robo-3 an der geringeren Migrationsaktivität beteiligt ist [149]. Die Arbeitsgruppe führte dazu einen zum Versuch der vorliegenden Arbeit analogen Assay durch und zudem wurde die gleiche Zelllinie verwendet wie im Rahmen dieser Arbeit. Folglich müsste auch im jetzt durchgeführten Migrationsassay eine unterscheidbare Tendenz zur Migration zumindest für Mocks und P-Cadherin exprimierende Klone ersichtlich sein.

Allerdings zeigt die Auswertung des Versuchs (siehe Abbildung 28) keine statistisch haltbaren Unterschiede zwischen Zellen mit induzierter P-Cadherin-Expression und den Leervektorkontrollen, den Mocks. Dies lässt die Vermutung zu, dass der Versuch insgesamt im Rahmen dieser Arbeit nicht ordnungsgemäß ablaufen konnte. Dabei könnten vielfältige Fehlerquellen ursächlich sein, weshalb eine Wiederholung des Versuchs eventuell dennoch zu weiteren Ergebnissen führen könnte.

Für andere Krebsleiden wurden verschiedene Auswirkungen adrenerger Stimulation auf die Migration beschrieben. Auch die Rolle von P-Cadherin scheint heterogen, denn beim Gallengang-, Pankreas- und Magenkarzinom besteht eine Korrelation zwischen der Expression dieses Proteins und der erhöhten Migrationsneigung der Tumorzellen *in vitro* [143, 144], wohingegen beim OSCC die Herabregulation von P-Cadherin zu einem verstärkt malignen Phänotypen führt. Dabei scheint ein Zusammenhang dazu zu bestehen, ob bei der jeweiligen Tumorerkrankung eine verstärkte Expression von P-Cadherin tumorfördernd oder -supprimierend wirkt [50].

Bei Osteoblasten führt eine β_2 -adrenerge Stimulation mit dem Agonisten Isoproterenol abhängig von der jeweiligen Phase des Zellzyklus zu Auswirkungen auf die Migration, wobei nur Zellen in der G_1 Phase negativ moduliert werden konnten [150]. Bei bronchialen Epithelzellen führt ebenfalls eine Aktivierung von β -Adrenozeptoren zu geringerer Zellmigration bei Wundheilung. Dies wurde von der durchführenden Arbeitsgruppe mehr auf eine PP2A-Aktivierung als auf eine cAMP-abhängigen Regulation zurückgeführt [151]. Schließlich konnte auch für Keratinozyten eine Inhibition der Migration durch β_2 -adrenerge Stimulation festgestellt werden, welche ebenfalls PP2A-vermittelt zu sein scheint [152].

Dagegen zieht die Stimulation von β_2 -Adrenozeptoren beim Kolon- und Prostatakarzinom sowie beim Brustkrebs erhöhte Tendenz der Tumorzellen hinsichtlich ihrer Migration nach sich [153–157].

Abschließend lässt sich feststellen, dass im Rahmen der Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen hinsichtlich der Migrationsfähigkeit *in vitro* viele verschiedene Versuchsansätze verwendet werden [143, 144, 150–152, 154–156]. Bisweilen wurden auch mit Matrigel® beschichtete Einsätze bei Versuchen mit Boydenkammer beschrieben, die ihrem Versuchsaufbau nach mehr dem bei uns als Invasionsassay durchgeführten Experiment ähneln und deshalb nicht als adäquat zum vorliegenden Migrationsversuch angesehen werden.

Insgesamt obliegt die Untersuchung einer möglichen Beeinflussung der Migration von HNSCC-Zellen durch adrenerge Stimulation unter Berücksichtigung der Expression von P-Cadherin zukünftigen Nachforschungen, eventuell auch unter Variation der Rahmenbedingungen des verwendeten Assays.

5.4.4 Proliferation

Zellproliferation ist essenziell für das Fortschreiten einer Tumorerkrankung, sodass Faktoren von Interesse gewinnen, die auf diesen Prozess Einfluss nehmen können. Vielfältigste Einflüsse wie Wachstumsfaktoren und zahlreiche Signalwege sind in der Lage, die Proliferation zu modulieren [158]. Unter anderem auch die an früherer Stelle besprochenen Proteine GSK-3 β und β -Catenin sind in diese intrazellulären Signalkaskaden involviert.

Für einige Krebserkrankungen, wie das Prostata- oder das Pankreaskarzinom wurde *in vitro* oder teils auch *in vivo* eine erhöhte Proliferation durch adrenerge Stimulation von Tumorzellen mit Noradrenalin oder Hemmung dieses Vorgangs durch β_2 -Adrenozeptor-Antagonisten beschrieben [146, 153]. Auch für das OSCC wird durch einige Autoren von einer erhöhten Proliferation im Zusammenhang mit β_2 -adrenerger Stimulation durch Noradrenalin berichtet [92, 93].

Zudem kann auch die Expression von P-Cadherin Einfluss auf die Proliferation nehmen: Beim Leberzellkarzinom oder auch dem Melanom führt eine Inhibition der Expression von P-Cadherin wie beim OSCC zu erhöhter Proliferation bzw. die Expression des Proteins zu einer Wachstumssuppression [51, 52, 139]. Dagegen führt eine verringerte P-Cadherin-Expression beim Magenzellkarzinom zu geringerer Proliferationsaktivität [143]. Die Auswirkung einer

Hoch- oder Herabregulation von P-Cadherin auf die Proliferation scheint also analog zur allgemeinen tumorsuppressiven oder tumorfördernden Wirkung des Oberflächenproteins bei der jeweiligen Krebserkrankung selbst [50].

Mithilfe der durchgeführten Versuche konnte bei P-Cadherin exprimierenden Klonen und Leervektorkontrollen (Mocks) zunächst keine Beeinflussung der Proliferation durch adrenerge Stimulation gezeigt werden (siehe Abbildung 29A). Hierbei erfolgte die Verwendung des α_2 -adrenergen Agonisten in der Konzentration von 10^{-8} M bzw. von 10^{-7} M für den β_2 -adrenergen Agonisten. Unter Erhöhung der Konzentration des jeweiligen Agonisten im Medium um den Faktor 10 konnte eine tendenzielle, statistisch allerdings nicht nachweisbare, Beeinflussung der Proliferation *in vitro* festgestellt werden (siehe Abbildung 29B). In der gewählten graphischen Darstellung bedeutet eine geringere Verdopplungszeit eine erhöhte Neigung zur Proliferation. Dabei zeigt sich, dass vor allem der β_2 -adrenerge Agonist bei einer Konzentration von 10^{-6} M HNSCC-Zellen unabhängig von deren Expression von P-Cadherin, jedoch insgesamt auf unterschiedlichem Niveau für Zellen mit induzierter Expression von P-Cadherin und Mocks, also Leervektorkontrollen, in ihrer Proliferation fördert (siehe Abbildung 29B).

Die gewonnenen Ergebnisse stehen im Einklang mit der Literatur, in der beschrieben wird, dass β_2 -adrenerge Stimulation eine erhöhte Proliferation beim OSCC nach sich ziehen kann [92, 93], was möglicherweise durch die Modulation des MAPK Signalwegs und von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, AP-1 und CREB bzw. deren Zielgene begründet sein könnte [146]. Allerdings zeigten in den durchgeführten Versuchen Klone mit Expression von P-Cadherin eine geringere Verdopplungszeit als die Mocks. Dieser Sachverhalt steht konträr zu den zuvor beschriebenen tumorsuppressiven Eigenschaften der Expression von P-Cadherin beim OSCC [50, 52]. Möglicherweise ist dies durch die Verwendung transfizierter und öfters passagierter Zellen methodisch bedingt oder die verwendete Zelllinie reagiert, möglicherweise auch durch das Mikromilieu bedingt, abweichend. Die Auswirkungen der adrenergen Stimulation könnten verstärkt werden durch die Verwendung einer höheren Agonistenkonzentration. In den durchgeführten Experimenten wurde der β_2 -Agonist Formoterol regulär in einer Konzentration von 10^{-7} M und im Rahmen des Proliferationsassays zusätzlich auch in einer Konzentration von 10^{-6} M, also 1 μ M, verwendet. Andere Autoren berichten hier nämlich vom Einsatz eines Noradrenalinspiegels von 10 μ M bei ähnlichem Aufbau des Proliferationsassays mit Tetrazoliumsalz und Erzielung signifikanter Ergebnisse im Kontext mit OSCC [93].

5.5 Analyse der MMP-Aktivität

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten leider keine Einblicke in die MMP-Aktivität der verwendeten Zellen und deren mögliche Reaktion auf adrenerge Stimulation abhängig von der P-Cadherin-Expression gewonnen werden, da die durchgeführten zymographischen Versuche ergebnislos blieben.

Für das HNSCC [83, 159–161] und andere Tumoren [162, 163] spielen Matrixmetalloproteinasen, allen voran MMP-2 und -9 eine herausragende Rolle bei der Tumorprogression und Metastasierung. Dabei wurde für einige Tumoren eine Möglichkeit der Beeinflussung der Expression durch β_2 -adrenerge Stimulation nachgewiesen. Diese führt beispielsweise beim Lungen-, Pankreas-, Ovarial- und Prostatakarzinom zu erhöhter Expression von MMP-2 und MMP-9 und in Folge dessen teils zu stärkerem Migrations-, Proliferations- oder Angiogeneseverhalten [153, 163–165].

Im Mausmodell konnte auch für humane OSCCs eine erhöhte MMP-2-Expression und ein höheres Plasmalevel an Katecholaminen verbunden mit invasiverem Wachstum durch chronischen Stress nachgewiesen werden [133]. Auch beim Nasopharyngealkarzinom konnte eine Noradrenalin-induzierte vermehrte MMP-2- und -9-Expression nachgewiesen werden, die auf β_2 -adrenerge Stimulation zurückzuführen ist [90]. Das unterstützt die Vermutung, dass auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine grundsätzliche Möglichkeit der Beeinflussung der MMP-Aktivität durch adrenerge Stimulation gegeben sein müsste, sofern die Versuchsergebnisse auswertbar gewesen wären.

Als wahrscheinliche Ursache für die fehlgeschlagene Zymographie könnten methodische Fehler angesehen werden. Zwar wurde der Versuch mehrmals exakt nach dem in der Arbeitsgruppe gängigem Protokoll durchgeführt, das auch alio loco in ähnlicher Form Anwendung findet [166]. Für den Versuch wurde eine Vielzahl von Reagenzien und Lösungen benötigt, die alle im Vorfeld herzustellen waren (siehe Tabelle 24 - Tabelle 33). Alle nicht gut lagerungsfähigen Komponenten wie die Gele wurden vor jedem Versuchsansatz frisch hergestellt. Im Zuge der Versuchswiederholungen wurden zur Kontrolle sämtliche Lösungen erneuert, um auch hier eine falsche Zusammensetzung auszuschließen.

Möglicherweise war in dieser Versuchsreihe die eingesetzte Proteinmenge von 3 μg aus dem Zellüberstand für Gelatine-Zymographie zu gering; manche Protokolle gehen hier von einer höheren Menge des benötigten Proteins aus [166]. Allerdings konnten in der Arbeitsgruppe zuvor schon Zymogramme auf Gelatinebasis unter dem Einsatz von lediglich 3 μg Probepre-

tein erfolgreich durchgeführt werden, sodass dies jedoch als unwahrscheinliche Ursache für das Ausbleiben von Ergebnissen anzusehen ist. Möglicherweise sezernierten die verwendeten Zellen aber nicht ausreichend MMPs, um diese aufgrund eines zu geringen Anteils im Überstand nachzuweisen. Schließlich wurde die Inkubationszeit für die Gele eingehalten, sodass ein ordnungsgemäßer Gelatineverdau durch MMPs möglich gewesen wäre. Die Untersuchung der MMP-Aktivität bleibt also im Zusammenhang mit adrenerger Stimulation von HNSCC-Zellen, auch im Hinblick auf die Expression von P-Cadherin, für die Zukunft offen.

6 Zusammenfassung

Es zeigt sich, dass die Zellen mit induzierter Expression von P-Cadherin hinsichtlich ihres Differenzierungsgrades in ein Schema einteilbar sind und dass sie sich anhand der abnehmenden Expression von P-Cadherin in Volllänge im Hinblick auf die zunehmend malignen Phänotypen wie folgt ordnen lassen: K4 → K3 → K2 → K6 → M1 → M5.

Auch die Verwendung einer anderen oder weiterer OSCC-Zelllinien scheint sinnvoll, um eventuelle individuelle Reaktionen und Verhaltensmuster der eingesetzten Zelllinie auf adrenerge Stimulation aufzudecken.

6.1 Proteinbiochemische Untersuchungen

Proteinbiochemische Untersuchungen zur Expression von GSK-3 β , P-GSK-3 β , β -Catenin und PD-L1 folgten. Dabei wurden stets Zelllysate aus der Kultur mit Konfluenz von 60 % und 90 % hergestellt, wobei hieraus keine Unterschiede resultierten.

Die Inaktivierung von GSK-3 β wirkt beim OSCC tumorfördernd, weshalb dieses Protein in seiner Funktion bei der untersuchten Tumorerkrankung als Tumorsuppressor wirkt. An Ser9 phosphorylierte P-GSK-3 β stellt dabei dessen inaktives Derivat dar. GSK-3 β vermittelt beim OSCC unter anderem die Phosphorylierung von Snail, das in Folge aufgrund vermehrten Abbaus in geringerem Ausmaß in den Zellkern transloziert wird und so einen epithelialen Phänotyp des OSCCs induziert. In den durchgeführten Versuchen kann kein detektierbarer Einfluss adrenerger Stimulation auf die Expression von GSK-3 β und P-GSK-3 β auf Proteinebene nachgewiesen werden. Es zeigt sich, dass die Leervektorkontrollen ein höheres Niveau der Expression von P-GSK-3 β , also der inaktiven Form der Kinase, aufweisen und auch im Verhältnis zu GSK-3 β mehr P-GSK-3 β exprimieren als die Klone mit induzierter P-Cadherin-Expression. Die Annahme, es handle sich bei den Mocks aufgrund fehlender Expression von P-Cadherin um einen aggressiveren Phänotypen der untersuchten Zelllinie kann so untermauert werden.

β -Catenin wird als Bestandteil des Wnt-Signalweges auf Ebene der Proteinexpression ebenfalls untersucht. Intrazellulär erfährt β -Catenin durch GSK-3 β - und CK1 α -vermittelte Phosphorylierung eine Inaktivierung und nach anschließender Ubiquitylierung eine proteosomale Degradation. Eine Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges zieht einen höheren

zytosolischen β -Catenin-Spiegel nach sich, was zu einer vermehrten Translokation dieses Proteins in den Zellkern führt, welches dort eine verstärkte Expression seiner Zielgene vermittelt. Die Detektion von Doppelbanden in den durchgeführten Versuchen erlaubt die Analyse der phosphorylierten und nicht phosphorylierten Form von β -Catenin. Dabei kann keine Beeinflussung der Expression dieses Proteins oder im Grad der Phosphorylierung durch adrenerge Stimulation mit der eingesetzten Konzentration abhängig von der Expression von P-Cadherin nachgewiesen werden. Es kann jedoch gezeigt werden, dass Mocks weniger β -Catenin exprimieren als die Klone mit induzierter Expression von P-Cadherin. Dies wird assoziiert mit einer vermehrten Bindung von β -Catenin an die Transmembrandomäne von P-Cadherin. Bei den Leervektorkontrollen kann weniger P- β -Catenin detektiert werden als bei P-Cadherin exprimierenden Klonen, was wiederum im Zusammenhang steht mit einer geringeren GSK-3 β -Aktivität bei diesen Zellen mit aggressiverem Phänotyp.

Für eine Mehrzahl an OSCCs liegt ein PD-L1-positiver Befund vor. Es wird angenommen, dass der Tumor somit in der Lage ist, Einfluss auf die Immunantwort des Patienten zu nehmen, wobei die genaue Regulation der Expression von PD-L1 bei Tumorerkrankungen noch nicht vollständig aufgeklärt ist. Auch bei der verwendeten Zelllinie lässt sich im Versuch PD-L1 nachweisen, doch die Expression dieses Proteins kann durch adrenerge Stimulation mit der eingesetzten Konzentration nicht beeinflusst werden. Auch die gleichzeitige Expression von P-Cadherin ermöglicht keine Modulation der Proteinmenge von PD-L1 durch adrenerge Agonisten.

Hinsichtlich der Zymographie können keine Ergebnisse erzielt werden, eventuell aufgrund zu geringer eingesetzter Proteinmengen oder wegen zu geringer Sekretion von MMPs durch die verwendeten Zellen. Theoretisch müsste sich mit veränderter Invasion (siehe unten) auch eine Auswirkung auf die Menge bestimmter MMPs nachweisen lassen.

6.2 Funktionelle Versuchsansätze

Weiterhin wurden funktionelle Versuche zur Analyse wichtiger Aspekte der Tumorprogression wie der vaskulogene Mimikry, Invasion, Migration und Proliferation durchgeführt.

Beim Versuch zur Untersuchung vaskulogener Mimikry dürften laut Literatur sowohl die Expression von P-Cadherin als auch adrenerge Stimulation mögliche Einflussfaktoren darstel-

len. Bei den verwendeten Zellen lässt sich im durchgeführten Versuch jedoch keine statistisch nachweisbare Beeinflussung durch diese beiden Faktoren feststellen.

Auch das Invasionsverhalten sollte laut Vorgaben der Literatur vor allem durch β -adrenerge Stimulation verstärkt und durch P-Cadherin gedämpft werden. Im durchgeführten Versuch zeigen P-Cadherin exprimierende Klone eine signifikant niedrigere, wahrscheinlich konzentrationsabhängige, Tendenz zur Invasion durch β_2 -adrenerge Stimulation im Vergleich zur Kontrolle ohne Agonisten. Mockzellen lassen sich dagegen durch Aktivierung von Adrenozeptoren nicht signifikant beeinflussen.

Die Expression von P-Cadherin sollte beim OSCC durch Slit-2 induzierte Komplexbildung aus P-Cadherin und Robo-3 zu einer geringeren Migration führen. Auch eine Möglichkeit der Beeinflussung durch adrenerge Stimulation scheint wahrscheinlich. Im durchgeführten Versuch kann allerdings keine Migration für die verwendeten Zellen nachgewiesen werden und damit auch kein eventuell abweichendes Verhalten unter Expression von P-Cadherin durch adrenerge Stimulation.

Hinsichtlich der Proliferation dürfte P-Cadherin suppressiv wirken und eine β -adrenerge Stimulation fördernd. Im Versuch zeigt sich eine tendenzielle, statistisch allerdings nicht signifikante, gesteigerte Proliferation unter β_2 -adrenerger Stimulation der Zellen. Dabei liegt jedoch bei den Zellen mit Expression von P-Cadherin im Vergleich zu den Mocks ebenfalls eine leicht erhöhte Proliferationstendenz vor.

7 Abkürzungsverzeichnis

Ag.	Agonist
AJCC	American Joint Committee on Cancer
cAMP	Zyklisches AMP (Adenosinmonophosphat)
CK1 α	Casein Kinase 1 α
CREB	cAMP response element-binding protein (Transkriptionsfaktor)
CT	Computertomographie
DGMKG	Deutsche Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
DNA	Desoxyribonuclein Acid (= Desoxyribonukleinsäure, DNS)
Dvl	Dishevelled-Proteine (Messenger im Wnt-Signalsystem)
EGF	Epidermal growth factor (= Epidermaler Wachstumsfaktor)
EGFR	Epidermal growth factor receptor (= Rezeptor für EGF)
EMT	Epithelial mesenchymale Transition
FU	Formoterolhemifumarat, β_2 -Agonist
Fzd-Rezeptor	Frizzled-Rezeptor (Zellrezeptor im Rahmen des Wnt-Signalsystems)
GSK-3 β	Glykogen Synthase Kinase 3 β
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma
HPV	Humane Papillomviren
HRP	Horseradish peroxidase (= Meerrettichperoxidase), verwendet in Konjugaten mit Sekundärantikörpern
IFN γ	Interferon gamma
K2, K3, K4, K6, M1, M5	Klon 2, Klon 3, Klon 4, Klon 6, Mock 1, Mock 5 (= verwendete Zellen)
LRP-Rezeptor	Lipoprotein-Rezeptor related Protein-Familie (Co-Rezeptoren bei der Aktivierung des Wnt-Signalsystems)
MMP	Matrixmetalloproteinase
MRT	Magnetresonanztomographie
NF- κ B	Nukleärer Faktor zur Leichte- κ -Ketten-Verstärkung aktivierter B-Zellen (Transkriptionsfaktor)
OSCC	Oral Squamous Cell Carcinoma (= orales Plattenepithelkarzinom)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese

PBS	Phosphate Buffered Saline
PD-L1	Programmed Death Ligand 1
PET/CT	Positronenemissionstomographie/Computertomographie (kombiniertes nuklearmedizinisches Diagnoseverfahren)
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (= Natriumlaurylsulfat)
TIMP	Tissue inhibitors of metalloproteinases
TSG	Tumor Suppressor Gen
UK	UK14,304 = Brimonidin, α_2 -Agonist
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (= Endothelwachstumsfaktor)

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Beispiele für das orale Plattenepithelkarzinom.....	10
Abbildung 2: Leukoplakie und Erythroplakie.	13
Abbildung 3: Interaktion des PD-L1 von Tumorzellen mit Immunzellen des Körpers.	20
Abbildung 4: Übersicht über die kanonische Signalkaskade beim Wnt-Signalweg.	22
Abbildung 5: Schematischer Aufbau der MMPs.	26
Abbildung 6: Strukturformel von Brimonidin [95].	29
Abbildung 7: Strukturformel von Formoterol [98].....	30
Abbildung 8: Stufen der Nachweisreaktion im BCA-Assay.	47
Abbildung 9: Schematische Darstellung des Invasionsassays.....	54
Abbildung 10: Schematische Darstellung des Kristallviolett-Assays.....	56
Abbildung 11: Reaktion des leicht rötlichen WST-1 zum dunkelroten Formazan.....	58
Abbildung 12: Lichtmikroskopische Aufnahmen von K2, K3, K4 und K6 bei hoher Konfluenz.	61
Abbildung 13: Lichtmikroskopische Aufnahmen von M1 und M5 bei hoher Konfluenz.	61
Abbildung 14: Expression von P-Cadherin im Western Blot.....	62
Abbildung 15: Expression α_{2B} -adrenerger Rezeptoren im Western Blot.....	64
Abbildung 16: Expression β_2 -adrenerger Rezeptoren im Western Blot.	65
Abbildung 17: Western Blot GSK-3 β und P-GSK-3 β	67
Abbildung 18: Quantifizierung von GSK-3 β und P-GSK-3 β	68
Abbildung 19: Western Blot β -Catenin.	69
Abbildung 20: Quantifizierung von β -Catenin.....	70
Abbildung 21: Western Blot PD-L1.....	71
Abbildung 22: Quantifizierung von PD-L1.....	72
Abbildung 23: K4 und M1 im Versuch zur Untersuchung vaskulogener Mimikry.	73
Abbildung 24: K4 und M1 bei der Untersuchung vaskulogener Mimikry.....	74
Abbildung 25: Beispiel für die Analyse vaskulogener Mimikry mit ImageJ.	74
Abbildung 26: Knotenpunkte und Gesamtnetzfläche bei der Untersuchung vaskulogener Mimikry.	75
Abbildung 27: Invasionsassay.....	76
Abbildung 28: Migrationsassay.	78
Abbildung 29: WST-Proliferationsassay.	79

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gruppierung der MMPs mit Eigenschaften. Nach [76].	27
Tabelle 2: Medium zur Kultivierung von OSCC-Zelllinien.	32
Tabelle 3: Medium mit α_2 -adrenergem-Agonisten.	32
Tabelle 4: Medium mit β_2 -adrenergem Agonisten.	32
Tabelle 5: Verwendete Reagenzien und Lösungen.	34
Tabelle 6: Verwendetes Verbrauchsmaterial.	35
Tabelle 7: Verwendete Geräte.	37
Tabelle 8: 1x Trypsin-EDTA, 50 ml.	37
Tabelle 9: Zusammensetzung α_2 -Agonist (UK) – Stocklösung 10^{-6} M, 10 ml.	37
Tabelle 10: Zusammensetzung β_2 -Agonist (FU) – Stocklösung 10^{-6} M, 10 ml.	38
Tabelle 11: Zusammensetzung des RIPA-Lysepuffers, 10 ml.	38
Tabelle 12: Zusammensetzung des BCA-Reagenz.	39
Tabelle 13: Zusammensetzung des 5x Lämmli-Probenpuffers.	39
Tabelle 14: Zusammensetzung des 10 % Acrylamid-Trenngels; 1,0 mm dick.	39
Tabelle 15: Zusammensetzung des Sammelgels; 1,0 mm dick.	39
Tabelle 16: Zusammensetzung des 10x SDS-PAGE-Laufpuffers.	40
Tabelle 17: Zusammensetzung des 1x SDS-PAGE-Laufpuffers, 1 L.	40
Tabelle 18: Zusammensetzung des 10x Blotpuffers.	40
Tabelle 19: Zusammensetzung des 1x Blotpuffers, 1 L.	40
Tabelle 20: Zusammensetzung des 10x TBS, pH 7,5.	40
Tabelle 21: Zusammensetzung des 1x TBST, 1 L.	40
Tabelle 22: Verwendete Primärantikörper zum Nachweis von β -Aktin, α_{2B} -/ β_2 -adrenergen Rezeptoren, β -Catenin, GSK-3 β , PD-L1, P-Cadherin (N-terminal) und P-GSK-3 β . c = Konzentration.	41
Tabelle 23: Verwendete Sekundärantikörper (HRP-konjugiert). c = Konzentration.	41
Tabelle 24: Zusammensetzung des Zymogramm-Trenngels mit Gelatine; 1 mm dick.	42
Tabelle 25: Zusammensetzung des Zymogramm-Trenngels mit Casein; 1 mm dick.	42
Tabelle 26: Zusammensetzung des Zymogramm-Sammelgels; 1 mm dick. Verwendet für Casein- und Gelatine-Zymographie.	42
Tabelle 27: Zusammensetzung des 2x Proben-Ladepuffers für Zymogramme.	42
Tabelle 28: Zusammensetzung des Renaturierungspuffers.	43

Tabelle 29: Zusammensetzung des Zymogramm-Verdaupuffers (500 ml).....	43
Tabelle 30: Zusammensetzung der Coomassie-Färbelösung.....	43
Tabelle 31: Zusammensetzung der Entfärbelösung I.....	43
Tabelle 32: Zusammensetzung der Entfärbelösung II.....	43
Tabelle 33: Zusammensetzung der Entwässerungslösung.	43
Tabelle 34: Verwendete Software.....	44
Tabelle 35: Vorbereitung der Proben für SDS-PAGE.....	48
Tabelle 36: Verwendete Primärantikörper.	50
Tabelle 37: Verwendete Sekundärantikörper.	50

10 Literaturverzeichnis

1. Squier CA, Kremer MJ (2001) Biology of oral mucosa and esophagus. *J Natl Cancer Inst Monographs*(29): 7–15
2. Ernani V, Saba NF (2015) Oral Cavity Cancer: Risk Factors, Pathology, and Management. *Oncology* 89(4): 187–195. doi: 10.1159/000398801
3. Chi AC, Day TA, Neville BW (2015) Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma--an update. *CA Cancer J Clin* 65(5): 401–421. doi: 10.3322/caac.21293
4. Warnakulasuriya S (2009) Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 45(4-5): 309–316. doi: 10.1016/j.oraloncology.2008.06.002
5. Bagan J, Sarrion G, Jimenez Y (2010) Oral cancer: clinical features. *Oral Oncol* 46(6): 414–417. doi: 10.1016/j.oraloncology.2010.03.009
6. RKI Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland
7. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Bishop K, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2014: based on November 2016 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2017.* https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014/. Accessed 03 Dec 2018
8. Gupta B, Johnson NW, Kumar N (2016) Global Epidemiology of Head and Neck Cancers: A Continuing Challenge. *Oncology* 91(1): 13–23. doi: 10.1159/000446117
9. van Monsjou HS, Wreesmann VB, van den Brekel MWM et al. (2013) Head and neck squamous cell carcinoma in young patients. *Oral Oncol* 49(12): 1097–1102. doi: 10.1016/j.oraloncology.2013.09.001
10. Hashibe M, Brennan P, Benhamou S et al. (2007) Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J Natl Cancer Inst* 99(10): 777–789. doi: 10.1093/jnci/djk179
11. Lee Y-CA, Marron M, Benhamou S et al. (2009) Active and involuntary tobacco smoking and upper aerodigestive tract cancer risks in a multicenter case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18(12): 3353–3361. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-09-0910
12. Ndiaye C, Mena M, Alemany L et al. (2014) HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: A systematic review and meta-analysis. *The Lancet Oncology* 15(12): 1319–1331. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70471-1

13. Balaram P, Sridhar H, Rajkumar T et al. (2002) Oral cancer in southern India: the influence of smoking, drinking, paan-chewing and oral hygiene. *Int J Cancer* 98(3): 440–445
14. Chung C-H, Yang Y-H, Wang T-Y et al. (2005) Oral precancerous disorders associated with areca quid chewing, smoking, and alcohol drinking in southern Taiwan. *J Oral Pathol Med* 34(8): 460–466. doi: 10.1111/j.1600-0714.2005.00332.x
15. Wu JF, Lin LS, Chen F et al. (2017) A case-control study: association between oral hygiene and oral cancer in non-smoking and non-drinking women. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 51(8): 675–679. doi: 10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2017.08.004
16. Sapkota A, Hsu CC, Zaridze D et al. (2008) Dietary risk factors for squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract in central and eastern Europe. *Cancer Causes Control* 19(10): 1161–1170. doi: 10.1007/s10552-008-9183-0
17. Yan LJ, Chen F, Liu DM et al. (2016) Tea, coffee intakes and risk of oral squamous cell carcinoma: a case-control study. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 37(11): 1531–1535. doi: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2016.11.019
18. Fan H, Yoon K-Y, Kim S-M et al. (2015) Relationship between squamous cell carcinoma of the tongue and the position of dental prosthesis. *J Adv Prosthodont* 7(2): 129–137. doi: 10.4047/jap.2015.7.2.129
19. Collett D, Mumford L, Banner NR et al. (2010) Comparison of the incidence of malignancy in recipients of different types of organ: a UK Registry audit. *Am J Transplant* 10(8): 1889–1896. doi: 10.1111/j.1600-6143.2010.03181.x
20. Grulich AE, van Leeuwen MT, Falster MO et al. (2007) Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *Lancet* 370(9581): 59–67. doi: 10.1016/S0140-6736(07)61050-2
21. Masserot C, Peffault de Latour R, Rocha V et al. (2008) Head and neck squamous cell carcinoma in 13 patients with Fanconi anemia after hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer* 113(12): 3315–3322. doi: 10.1002/cncr.23954
22. Warnakulasuriya S (2009) Significant oral cancer risk associated with low socioeconomic status. *Evid Based Dent* 10(1): 4–5. doi: 10.1038/sj.ebd.6400623
23. van der Waal I (2009) Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol* 45(4-5): 317–323. doi: 10.1016/j.oraloncology.2008.05.016

24. Chen C, Zhang Y, Loomis MM et al. (2015) Genome-Wide Loss of Heterozygosity and DNA Copy Number Aberration in HPV-Negative Oral Squamous Cell Carcinoma and Their Associations with Disease-Specific Survival. *PLoS ONE* 10(8): e0135074. doi: 10.1371/journal.pone.0135074
25. Ali J, Sabiha B, Jan HU et al. (2017) Genetic etiology of oral cancer. *Oral Oncol* 70: 23–28. doi: 10.1016/j.oraloncology.2017.05.004
26. van Ginkel JH, Leng WWJ de, Bree R de et al. (2016) Targeted sequencing reveals TP53 as a potential diagnostic biomarker in the post-treatment surveillance of head and neck cancer. *Oncotarget* 7(38): 61575–61586. doi: 10.18632/oncotarget.11196
27. Pérez-Sayáns M, Suárez-Peñaranda JM, Gayoso-Diz P et al. (2011) p16(INK4a)/CDKN2 expression and its relationship with oral squamous cell carcinoma is our current knowledge enough? *Cancer Lett* 306(2): 134–141. doi: 10.1016/j.canlet.2011.02.039
28. Leemans CR, Braakhuis BJM, Brakenhoff RH (2011) The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 11(1): 9–22. doi: 10.1038/nrc2982
29. Narisawa-Saito M, Kiyono T (2007) Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci* 98(10): 1505–1511. doi: 10.1111/j.1349-7006.2007.00546.x
30. Hema KN, Smitha T, Sheethal HS et al. (2017) Epigenetics in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Pathol* 21(2): 252–259. doi: 10.4103/jomfp.JOMFP_150_17
31. Deutsche Gesellschaft für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie (2012) *Mundhöhlenkarzinom: Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms*
32. Carreras-Torras C, Gay-Escoda C (2015) Techniques for early diagnosis of oral squamous cell carcinoma: Systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 20(3): e305-15
33. Goodson ML, Smith DR, Thomson PJ (2017) Efficacy of oral brush biopsy in potentially malignant disorder management. *J Oral Pathol Med*. doi: 10.1111/jop.12627
34. Omar E (2015) Current concepts and future of noninvasive procedures for diagnosing oral squamous cell carcinoma--a systematic review. *Head Face Med* 11: 6. doi: 10.1186/s13005-015-0063-z
35. Lydiatt WM, Patel SG, O'Sullivan B et al. (2017) Head and Neck cancers-major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin* 67(2): 122–137. doi: 10.3322/caac.21389

36. Mashberg A, Merletti F, Boffetta P et al. (1989) Appearance, site of occurrence, and physical and clinical characteristics of oral carcinoma in Torino, Italy. *Cancer* 63(12): 2522–2527
37. Bodner L, Manor E, Friger MD et al. (2014) Oral squamous cell carcinoma in patients twenty years of age or younger--review and analysis of 186 reported cases. *Oral Oncol* 50(2): 84–89. doi: 10.1016/j.oraloncology.2013.11.001
38. Lo Nigro C, Denaro N, Merlotti A et al. (2017) Head and neck cancer: improving outcomes with a multidisciplinary approach. *Cancer Manag Res* 9: 363–371. doi: 10.2147/CMAR.S115761
39. Shah JP, Gil Z (2009) Current concepts in management of oral cancer--surgery. *Oral Oncol* 45(4-5): 394–401. doi: 10.1016/j.oraloncology.2008.05.017
40. Pagedar NA, Gilbert RW (2009) Selective neck dissection: A review of the evidence. *Oral Oncol* 45(4-5): 416–420. doi: 10.1016/j.oraloncology.2008.09.001
41. Mazon R, Tao Y, Lusinchi A et al. (2009) Current concepts of management in radiotherapy for head and neck squamous-cell cancer. *Oral Oncol* 45(4-5): 402–408. doi: 10.1016/j.oraloncology.2009.01.010
42. Specenier PM, Vermorken JB (2009) Current concepts for the management of head and neck cancer: Chemotherapy. *Oral Oncol* 45(4-5): 409–415. doi: 10.1016/j.oraloncology.2008.05.014
43. Dai W, Li Y, Zhou Q et al. (2014) Cetuximab inhibits oral squamous cell carcinoma invasion and metastasis via degradation of epidermal growth factor receptor. *J Oral Pathol Med* 43(4): 250–257. doi: 10.1111/jop.12116
44. Jansen L, Castro FA, Gondos A et al. (2015) Recent cancer survival in Germany: an analysis of common and less common cancers. *Int J Cancer* 136(11): 2649–2658. doi: 10.1002/ijc.29316
45. Tong X-J, Shan Z-F, Tang Z-G et al. (2014) The impact of clinical prognostic factors on the survival of patients with oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* 72(12): 2497.e1-10. doi: 10.1016/j.joms.2014.07.001
46. Listl S, Jansen L, Stenzinger A et al. (2013) Survival of patients with oral cavity cancer in Germany. *PLoS ONE* 8(1): e53415. doi: 10.1371/journal.pone.0053415

47. Taghavi N, Yazdi I (2015) Prognostic factors of survival rate in oral squamous cell carcinoma: clinical, histologic, genetic and molecular concepts. *Arch Iran Med* 18(5): 314–319
48. O'Rourke MA, Ellison MV, Murray LJ et al. (2012) Human papillomavirus related head and neck cancer survival: a systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol* 48(12): 1191–1201. doi: 10.1016/j.oraloncology.2012.06.019
49. Shapiro L, Weis WI (2009) Structure and biochemistry of cadherins and catenins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1(3): a003053. doi: 10.1101/cshperspect.a003053
50. Vieira AF, Paredes J (2015) P-cadherin and the journey to cancer metastasis. *Mol Cancer* 14: 178. doi: 10.1186/s12943-015-0448-4
51. Bauer K, Gosau M, Bosserhoff A et al. (2012) P-cadherin controls the differentiation of oral keratinocytes by regulating cytokeratin 1/10 expression via C/EBP-beta-mediated signaling. *Differentiation* 84(5): 345–354. doi: 10.1016/j.diff.2012.09.002
52. Bauer R, Valletta D, Bauer K et al. (2014) Downregulation of P-cadherin expression in hepatocellular carcinoma induces tumorigenicity. *Int J Clin Exp Pathol* 7(9): 6125–6132
53. Lo Muzio L, Campisi G, Farina A et al. (2005) P-cadherin expression and survival rate in oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study. *BMC Cancer* 5: 63. doi: 10.1186/1471-2407-5-63
54. Muñoz-Guerra MF, Marazuela EG, Fernández-Contreras ME et al. (2005) P-cadherin expression reduced in squamous cell carcinoma of the oral cavity: an indicator of poor prognosis. *Cancer* 103(5): 960–969. doi: 10.1002/cncr.20858
55. Bauer R, Dowejko A, Driemel O et al. (2008) Truncated P-cadherin is produced in oral squamous cell carcinoma. *FEBS J* 275(16): 4198–4210. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06567.x
56. Bauer K, Dowejko A, Bosserhoff A-K et al. (2009) P-cadherin induces an epithelial-like phenotype in oral squamous cell carcinoma by GSK-3beta-mediated Snail phosphorylation. *Carcinogenesis* 30(10): 1781–1788. doi: 10.1093/carcin/bgp175
57. Bauer K, Gosau M, Reinders J et al. (2013) Presenilin 1/ γ -secretase modulates P-cadherin processing and influences cell adhesion in oral squamous cell carcinoma cell lines. *Carcinogenesis* 34(11): 2622–2628. doi: 10.1093/carcin/bgt211

58. Zandberg DP, Strome SE (2014) The role of the PD-L1:PD-1 pathway in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol* 50(7): 627–632. doi: 10.1016/j.oraloncology.2014.04.003
59. Chen J, Jiang CC, Jin L et al. (2016) Regulation of PD-L1: a novel role of pro-survival signalling in cancer. *Ann Oncol* 27(3): 409–416. doi: 10.1093/annonc/mdv615
60. Troeltzsch M, Woodlock T, Pianka A et al. (2017) Is There Evidence for the Presence and Relevance of the PD-1/PD-L1 Pathway in Oral Squamous Cell Carcinoma? Hints From an Immunohistochemical Study. *J Oral Maxillofac Surg* 75(5): 969–977. doi: 10.1016/j.joms.2016.11.006
61. Hsu M-C, Hsiao J-R, Chang K-C et al. (2010) Increase of programmed death-1-expressing intratumoral CD8 T cells predicts a poor prognosis for nasopharyngeal carcinoma. *Mod Pathol* 23(10): 1393–1403. doi: 10.1038/modpathol.2010.130
62. Kogashiwa Y, Yasuda M, Sakurai H et al. (2017) PD-L1 Expression Confers Better Prognosis in Locally Advanced Oral Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Res* 37(3): 1417–1424. doi: 10.21873/anticancer.11465
63. Klaus A, Birchmeier W (2008) Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat Rev Cancer* 8(5): 387–398. doi: 10.1038/nrc2389
64. Castilho RM, Gutkind JS (2014) The Wnt/ β -catenin Signaling Circuitry in Head and Neck Cancer. In: Burtneß B, Golemis EA (eds) *Molecular Determinants of Head and Neck Cancer*. Springer New York, New York, NY, s.l., pp 199–214
65. Zhan T, Rindtorff N, Boutros M (2017) Wnt signaling in cancer. *Oncogene* 36(11): 1461–1473. doi: 10.1038/onc.2016.304
66. Glinka A, Dolde C, Kirsch N et al. (2011) LGR4 and LGR5 are R-spondin receptors mediating Wnt/ β -catenin and Wnt/PCP signalling. *EMBO Rep* 12(10): 1055–1061. doi: 10.1038/embor.2011.175
67. Lo LM, Goteri G, Capretti R et al. (2005) Beta-catenin gene analysis in oral squamous cell carcinoma. *Int J Immunopathol Pharmacol* 18(3 Suppl): 33–38
68. Iwai S, Yonekawa A, Harada C et al. (2010) Involvement of the Wnt- β -catenin pathway in invasion and migration of oral squamous carcinoma cells. *Int J Oncol* 37(5): 1095–1103
69. Padhi S, Saha A, Kar M et al. (2015) Clinico-Pathological Correlation of β -Catenin and Telomere Dysfunction in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Patients. *J Cancer* 6(2): 192–202. doi: 10.7150/jca.9558

70. Krüger M, Amort J, Wilgenbus P et al. (2016) The anti-apoptotic PON2 protein is Wnt/ β -catenin-regulated and correlates with radiotherapy resistance in OSCC patients. *Oncotarget* 7(32): 51082–51095. doi: 10.18632/oncotarget.9013
71. Rampias T, Boutati E, Pectasides E et al. (2010) Activation of Wnt signaling pathway by human papillomavirus E6 and E7 oncogenes in HPV16-positive oropharyngeal squamous carcinoma cells. *Mol Cancer Res* 8(3): 433–443. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-09-0345
72. Jope RS, Johnson GVW (2004) The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci* 29(2): 95–102. doi: 10.1016/j.tibs.2003.12.004
73. Mishra R (2010) Glycogen synthase kinase 3 beta: can it be a target for oral cancer. *Mol Cancer* 9: 144. doi: 10.1186/1476-4598-9-144
74. Doble BW, Woodgett JR (2007) Role of glycogen synthase kinase-3 in cell fate and epithelial-mesenchymal transitions. *Cells Tissues Organs (Print)* 185(1-3): 73–84. doi: 10.1159/000101306
75. Tallant C, Marrero A, Gomis-Rüth FX (2010) Matrix metalloproteinases: Fold and function of their catalytic domains. *Biochim Biophys Acta* 1803(1): 20–28. doi: 10.1016/j.bbamcr.2009.04.003
76. Lemaître V, D'Armiento J (2006) Matrix metalloproteinases in development and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today* 78(1): 1–10. doi: 10.1002/bdrc.20065
77. Cathcart J, Pulkoski-Gross A, Cao J (2015) Targeting Matrix Metalloproteinases in Cancer: Bringing New Life to Old Ideas. *Genes Dis* 2(1): 26–34. doi: 10.1016/j.gendis.2014.12.002
78. Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL (2004) Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432(7015): 332–337. doi: 10.1038/nature03096
79. Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S, Liotta LA (1993) Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu Rev Cell Biol* 9: 541–573. doi: 10.1146/annurev.cb.09.110193.002545
80. Shay G, Lynch CC, Fingleton B (2015) Moving targets: Emerging roles for MMPs in cancer progression and metastasis. *Matrix Biol* 44-46: 200–206. doi: 10.1016/j.matbio.2015.01.019
81. Katayama A, Bandoh N, Kishibe K et al. (2004) Expressions of matrix metalloproteinases in early-stage oral squamous cell carcinoma as predictive indicators for tumor metastases and prognosis. *Clin Cancer Res* 10(2): 634–640

82. Kurahara S, Shinohara M, Ikebe T et al. (1999) Expression of MMPs, MT-MMP, and TIMPs in squamous cell carcinoma of the oral cavity: correlations with tumor invasion and metastasis. *Head Neck* 21(7): 627–638
83. Rosenthal EL, Matrisian LM (2006) Matrix metalloproteases in head and neck cancer. *Head Neck* 28(7): 639–648. doi: 10.1002/hed.20365
84. G Protein-Coupled Receptor List | IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY. <http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/GPCRListForward?class=A>. Accessed 02 Dec 2018
85. Lohse MJ (2015) The ins and outs of adrenergic signaling. *Journal of Molecular Medicine* 93(9): 955–962. doi: 10.1007/s00109-015-1323-x
86. (2018) α 1-Adrenoceptors. <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/rbi-handbook/non-peptide-receptors-synthesis-and-metabolism/alpha1-adrenoceptors.html>. Accessed 03 Dec 2018
87. (2018) α 2-Adrenoceptors. <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/rbi-handbook/non-peptide-receptors-synthesis-and-metabolism/alpha2-adrenoceptors.html>. Accessed 02 Dec 2018
88. Cole SW, Sood AK (2012) Molecular pathways: beta-adrenergic signaling in cancer. *Clin Cancer Res* 18(5): 1201–1206. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-0641
89. Tang J, Li Z, Lu L et al. (2013) β -Adrenergic system, a backstage manipulator regulating tumour progression and drug target in cancer therapy. *Semin Cancer Biol* 23(6 Pt B): 533–542. doi: 10.1016/j.semcancer.2013.08.009
90. Yang EV, Sood AK, Chen M et al. (2006) Norepinephrine up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase (MMP)-2, and MMP-9 in nasopharyngeal carcinoma tumor cells. *Cancer Res* 66(21): 10357–10364. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2496
91. Pérez-Sayáns M, Somoza-Martín JM, Barros-Angueira F et al. (2012) Activity of β 2-adrenergic receptor in oral squamous cell carcinoma is mediated by overexpression of the ADRBK2 gene: a pilot study. *Biotech Histochem* 87(3): 179–186. doi: 10.3109/10520295.2011.592151
92. Shang ZJ, Liu K, Liang DF (2009) Expression of beta2-adrenergic receptor in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 38(4): 371–376. doi: 10.1111/j.1600-0714.2008.00691.x

93. Bernabe DG, Tamae AC, Biasoli ER et al. (2011) Stress hormones increase cell proliferation and regulates interleukin-6 secretion in human oral squamous cell carcinoma cells. *Brain Behav Immun* 25(3): 574–583. doi: 10.1016/j.bbi.2010.12.012
94. Coelho M, Soares-Silva C, Brandão D et al. (2017) β -Adrenergic modulation of cancer cell proliferation: Available evidence and clinical perspectives. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 143(2): 275–291. doi: 10.1007/s00432-016-2278-1
95. Chambers M ChemIDplus - 0059803984 - XYLJNLCSTIOKRM-UHFFFAOYSA-N - Brimonidine [INN:BAN] - Similar structures search, synonyms, formulas, resource links, and other chemical information.
<https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/sid/0059803984>. Accessed 23 Nov 2018
96. Cantor LB, Burke J (1997) Brimonidine. *Expert Opin Investig Drugs* 6(8): 1063–1083. doi: 10.1517/13543784.6.8.1063
97. Anderson MS, Nadkarni A, Cardwell LA et al. (2017) Spotlight on brimonidine topical gel 0.33% for facial erythema of rosacea: safety, efficacy, and patient acceptability. *Patient Prefer Adherence* 11: 1143–1150. doi: 10.2147/PPA.S115708
98. Chambers M ChemIDplus - 73573-87-2 - BPZSYCZIITTYBL-YJYMSZOUSAN - Formoterol [USAN:INN:BAN] - Similar structures search, synonyms, formulas, resource links, and other chemical information. <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/73573-87-2>. Accessed 23 Nov 2018
99. Bartow RA, Brogden RN (1998) Formoterol. An update of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in the management of asthma. *Drugs* 55(2): 303–322
100. Steiropoulos P, Tzouvelekis A, Bouros D (2008) Formoterol in the management of chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 3(2): 205–215
101. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT et al. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150(1): 76–85
102. Al-Tubuly AA (2000) SDS-PAGE and Western Blotting. *Methods Mol Med* 40: 391–405. doi: 10.1385/1-59259-076-4:391
103. Snoek-van Beurden PAM, den Hoff JW von (2005) Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *BioTechniques* 38(1): 73–83
104. Falasca M, Raimondi C, Maffucci T (2011) Boyden chamber. *Methods Mol Biol* 769: 87–95. doi: 10.1007/978-1-61779-207-6_7

105. (2012) Frequently Asked Questions. In: Lawler D (ed) Frequently asked questions in anti-bribery and corruption. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, West Sussex, U.K, pp 97–342
106. Cell Viability and Proliferation Assays. <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/cell-viability-and-proliferation.html>. Accessed 25 Nov 2018
107. WST-1 Reaktion zu Formazan. https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/product9/051/cellpro-ro_dwg_2.tif/_jcr_content/renditions/cellpro-ro_dwg_2-large.jpg. Accessed 02 Dec 2018
108. Luo J (2009) Glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) in tumorigenesis and cancer chemotherapy. *Cancer Lett* 273(2): 194–200. doi: 10.1016/j.canlet.2008.05.045
109. Ma C, Wang J, Gao Y et al. (2007) The role of glycogen synthase kinase 3beta in the transformation of epidermal cells. *Cancer Res* 67(16): 7756–7764. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4665
110. Leis H, Segrelles C, Ruiz S et al. (2002) Expression, localization, and activity of glycogen synthase kinase 3beta during mouse skin tumorigenesis. *Mol Carcinog* 35(4): 180–185. doi: 10.1002/mc.10087
111. Walz A, Ugolkov A, Chandra S et al. (2017) Molecular Pathways: Revisiting Glycogen Synthase Kinase-3 β as a Target for the Treatment of Cancer. *Clin Cancer Res* 23(8): 1891–1897. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2240
112. CST - Phospho-GSK-3-beta (Ser9) (D3A4) Rabbit mAb. <https://www.cellsignal.de/products/primary-antibodies/phospho-gsk-3-beta-ser9-d3a4-rabbit-mab/9322>. Accessed 25 Nov 2018
113. Fang X, Yu SX, Lu Y et al. (2000) Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(22): 11960–11965. doi: 10.1073/pnas.220413597
114. Karkoulas G, Mastrogianni O, Lympelopoulos A et al. (2006) alpha(2)-Adrenergic receptors activate MAPK and Akt through a pathway involving arachidonic acid metabolism by cytochrome P450-dependent epoxygenase, matrix metalloproteinase activation and subtype-specific transactivation of EGFR. *Cell Signal* 18(5): 729–739. doi: 10.1016/j.cellsig.2005.06.014
115. Purified, Mouse, Anti- β -Catenin, 14/Beta-Catenin, RUO - 610153 | BD Biosciences-Europe. <http://www.bdbiosciences.com/eu/applications/research/stem-cell-research/cancer->

- research/human/purified-mouse-anti--catenin-14beta-catenin/p/610153. Accessed 02 Dec 2018
116. Liu C, Li Y, Semenov M et al. (2002) Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 108(6): 837–847
117. Faisy C, Grassin-Delyle S, Blouquit-Laye S et al. (2014) Wnt/ β -catenin signaling modulates human airway sensitization induced by β 2-adrenoceptor stimulation. *PLoS ONE* 9(10): e111350. doi: 10.1371/journal.pone.0111350
118. Dong H, Strome SE, Salomao DR et al. (2002) Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 8(8): 793–800. doi: 10.1038/nm730
119. Li C-W, Lim S-O, Chung EM et al. (2018) Eradication of Triple-Negative Breast Cancer Cells by Targeting Glycosylated PD-L1. *Cancer Cell* 33(2): 187-201.e10. doi: 10.1016/j.ccell.2018.01.009
120. Mittendorf EA, Philips AV, Meric-Bernstam F et al. (2014) PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. *Cancer Immunol Res* 2(4): 361–370. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0127
121. Li C-W, Lim S-O, Xia W et al. (2016) Glycosylation and stabilization of programmed death ligand-1 suppresses T-cell activity. *Nat Commun* 7: 12632. doi: 10.1038/ncomms12632
122. Pardoll DM (2012) The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 12(4): 252–264. doi: 10.1038/nrc3239
123. Strome SE, Dong H, Tamura H et al. (2003) B7-H1 blockade augments adoptive T-cell immunotherapy for squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 63(19): 6501–6505
124. Ock C-Y, Kim S, Keam B et al. (2016) PD-L1 expression is associated with epithelial-mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 7(13): 15901–15914. doi: 10.18632/oncotarget.7431
125. Morales-Betanzos CA, Lee H, Gonzalez Ericsson PI et al. (2017) Quantitative Mass Spectrometry Analysis of PD-L1 Protein Expression, N-glycosylation and Expression Stoichiometry with PD-1 and PD-L2 in Human Melanoma. *Mol Cell Proteomics* 16(10): 1705–1717. doi: 10.1074/mcp.RA117.000037
126. Chen H, Liu D, Yang Z et al. (2014) Adrenergic signaling promotes angiogenesis through endothelial cell-tumor cell crosstalk. *Endocr Relat Cancer* 21(5): 783–795. doi: 10.1530/ERC-14-0236

127. Qiao L, Liang N, Zhang J et al. (2015) Advanced research on vasculogenic mimicry in cancer. *J Cell Mol Med* 19(2): 315–326. doi: 10.1111/jcmm.12496
128. Schuller HM, Al-Wadei HAN (2012) Beta-adrenergic signaling in the development and progression of pulmonary and pancreatic adenocarcinoma. *Curr Cancer Ther Rev* 8(2): 116–127. doi: 10.2174/157339412800675351
129. Wong HPS, Le Yu, Lam EKY et al. (2007) Nicotine promotes colon tumor growth and angiogenesis through beta-adrenergic activation. *Toxicol Sci* 97(2): 279–287. doi: 10.1093/toxsci/kfm060
130. Thaker PH, Han LY, Kamat AA et al. (2006) Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. *Nat Med* 12(8): 939–944. doi: 10.1038/nm1447
131. Smith BD, Smith GL, Carter D et al. (2000) Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein levels in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 18(10): 2046–2052. doi: 10.1200/JCO.2000.18.10.2046
132. Denhart BC, Guidi AJ, Tognazzi K et al. (1997) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in oral and laryngeal squamous cell carcinoma and dysplasia. *Lab Invest* 77(6): 659–664
133. Xie H, Li C, He Y et al. (2015) Chronic stress promotes oral cancer growth and angiogenesis with increased circulating catecholamine and glucocorticoid levels in a mouse model. *Oral Oncol* 51(11): 991–997. doi: 10.1016/j.oraloncology.2015.08.007
134. Lissitzky J-C, Parriaux D, Ristorcelli E et al. (2009) Cyclic AMP signaling as a mediator of vasculogenic mimicry in aggressive human melanoma cells in vitro. *Cancer Res* 69(3): 802–809. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2391
135. Wang H, Lin H, Pan J et al. (2016) Vasculogenic Mimicry in Prostate Cancer: The Roles of EphA2 and PI3K. *J Cancer* 7(9): 1114–1124. doi: 10.7150/jca.14120
136. Wang W, Lin P, Sun B et al. (2014) Epithelial-mesenchymal transition regulated by EphA2 contributes to vasculogenic mimicry formation of head and neck squamous cell carcinoma. *Biomed Res Int* 2014: 803914. doi: 10.1155/2014/803914
137. Wang W, Lin P, Han C et al. (2010) Vasculogenic mimicry contributes to lymph node metastasis of laryngeal squamous cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 29: 60. doi: 10.1186/1756-9966-29-60

138. Lin P, Wang W, Sun B-C et al. (2012) Vasculogenic mimicry is a key prognostic factor for laryngeal squamous cell carcinoma: A new pattern of blood supply. *Chin Med J* 125(19): 3445–3449
139. Jacobs K, Feys L, Vanhoecke B et al. (2011) P-cadherin expression reduces melanoma growth, invasion, and responsiveness to growth factors in nude mice. *Eur J Cancer Prev* 20(3): 207–216. doi: 10.1097/CEJ.0b013e3283429e8b
140. van Marck V, Stove C, Jacobs K et al. (2011) P-cadherin in adhesion and invasion: Opposite roles in colon and bladder carcinoma. *Int J Cancer* 128(5): 1031–1044. doi: 10.1002/ijc.25427
141. van Marck V, Stove C, van den Bossche K et al. (2005) P-cadherin promotes cell-cell adhesion and counteracts invasion in human melanoma. *Cancer Res* 65(19): 8774–8783. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-4414
142. Ribeiro AS, Albergaria A, Sousa B et al. (2010) Extracellular cleavage and shedding of P-cadherin: A mechanism underlying the invasive behaviour of breast cancer cells. *Oncogene* 29(3): 392–402. doi: 10.1038/onc.2009.338
143. Park J, Park E, Han S-W et al. (2012) Down-regulation of P-cadherin with PF-03732010 inhibits cell migration and tumor growth in gastric cancer. *Invest New Drugs* 30(4): 1404–1412. doi: 10.1007/s10637-011-9710-9
144. Sakamoto K, Imai K, Higashi T et al. (2015) Significance of P-cadherin overexpression and possible mechanism of its regulation in intrahepatic cholangiocarcinoma and pancreatic cancer. *Cancer Sci* 106(9): 1153–1162. doi: 10.1111/cas.12732
145. Paredes J, Stove C, Stove V et al. (2004) P-cadherin is up-regulated by the antiestrogen ICI 182,780 and promotes invasion of human breast cancer cells. *Cancer Res* 64(22): 8309–8317. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0795
146. Zhang D, Ma Q-Y, Hu H-T et al. (2010) β 2-adrenergic antagonists suppress pancreatic cancer cell invasion by inhibiting CREB, NF κ B and AP-1. *Cancer Biol Ther* 10(1): 19–29
147. Guo K, Ma Q, Wang L et al. (2009) Norepinephrine-induced invasion by pancreatic cancer cells is inhibited by propranolol. *Oncol Rep* 22(4): 825–830
148. Kim-Fuchs C, Le CP, Pimentel MA et al. (2014) Chronic stress accelerates pancreatic cancer growth and invasion: A critical role for beta-adrenergic signaling in the pancreatic microenvironment. *Brain Behav Immun* 40: 40–47. doi: 10.1016/j.bbi.2014.02.019

149. Bauer K, Dowejko A, Bosserhoff A-K et al. (2011) Slit-2 facilitates interaction of P-cadherin with Robo-3 and inhibits cell migration in an oral squamous cell carcinoma cell line. *Carcinogenesis* 32(6): 935–943. doi: 10.1093/carcin/bgr059
150. Katsumura S, Ezura Y, Izu Y et al. (2016) Beta Adrenergic Receptor Stimulation Suppresses Cell Migration in Association with Cell Cycle Transition in Osteoblasts-Live Imaging Analyses Based on FUCCI System. *J Cell Physiol* 231(2): 496–504. doi: 10.1002/jcp.25096
151. Peitzman ER, Zaidman NA, Maniak PJ et al. (2015) Agonist binding to β -adrenergic receptors on human airway epithelial cells inhibits migration and wound repair. *Am J Physiol , Cell Physiol* 309(12): C847-55. doi: 10.1152/ajpcell.00159.2015
152. Pullar CE, Chen J, Isseroff RR (2003) PP2A activation by beta2-adrenergic receptor agonists: Novel regulatory mechanism of keratinocyte migration. *J Biol Chem* 278(25): 22555–22562. doi: 10.1074/jbc.M300205200
153. Barbieri A, Bimonte S, Palma G et al. (2015) The stress hormone norepinephrine increases migration of prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Int J Oncol* 47(2): 527–534. doi: 10.3892/ijo.2015.3038
154. Wilson JM, Lorimer E, Tyburski MD et al. (2015) β -Adrenergic receptors suppress Rap1B prenylation and promote the metastatic phenotype in breast cancer cells. *Cancer Biol Ther* 16(9): 1364–1374. doi: 10.1080/15384047.2015.1070988
155. Palm D, Lang K, Niggemann B et al. (2006) The norepinephrine-driven metastasis development of PC-3 human prostate cancer cells in BALB/c nude mice is inhibited by beta-blockers. *Int J Cancer* 118(11): 2744–2749. doi: 10.1002/ijc.21723
156. Masur K, Niggemann B, Zanker KS et al. (2001) Norepinephrine-induced Migration of SW 480 Colon Carcinoma Cells Is Inhibited by β -Blockers. *Cancer Res* 61(7): 2866–2869
157. Drell TL, Joseph J, Lang K et al. (2003) Effects of neurotransmitters on the chemokinesis and chemotaxis of MDA-MB-468 human breast carcinoma cells. *Breast Cancer Res Treat* 80(1): 63–70. doi: 10.1023/A:1024491219366
158. Sever R, Brugge JS (2015) Signal Transduction in Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med* 5(4). doi: 10.1101/cshperspect.a006098
159. Pramanik KK, Nagini S, Singh AK et al. (2018) Glycogen synthase kinase-3 β mediated regulation of matrix metalloproteinase-9 and its involvement in oral squamous cell

- carcinoma progression and invasion. *Cellular Oncology* 41(1): 47–60. doi: 10.1007/s13402-017-0358-0
160. Chien M-H, Lin C-W, Cheng C-W et al. (2013) Matrix metalloproteinase-2 as a target for head and neck cancer therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 17(2): 203–216. doi: 10.1517/14728222.2013.740012
161. Patel BP, Shah SV, Shukla SN et al. (2007) Clinical significance of MMP-2 and MMP-9 in patients with oral cancer. *Head Neck* 29(6): 564–572. doi: 10.1002/hed.20561
162. Deryugina EI, Quigley JP (2006) Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 25(1): 9–34. doi: 10.1007/s10555-006-7886-9
163. Sood AK, Bhatti R, Kamat AA et al. (2006) Stress hormone-mediated invasion of ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res* 12(2): 369–375. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1698
164. Shan T, Ma J, Ma Q et al. (2013) beta2-AR-HIF-1alpha: A novel regulatory axis for stress-induced pancreatic tumor growth and angiogenesis. *Curr Mol Med* 13(6): 1023–1034
165. Hu P, He J, Liu S et al. (2016) β 2-adrenergic receptor activation promotes the proliferation of A549 lung cancer cells via the ERK1/2/CREB pathway. *Oncol Rep* 36(3): 1757–1763. doi: 10.3892/or.2016.4966
166. Chhabra A, Rani V (2018) Gel-Based Gelatin Zymography to Examine Matrix Metalloproteinase Activity in Cell Culture. *Methods Mol Biol* 1731: 83–96. doi: 10.1007/978-1-4939-7595-2_9

11 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Tobias Hans Gollwitzer

Schulbildung:

09/2001 – 07/2005 Clausnitzer Grundschule Weiden

09/2005 – 06/2013 Kepler-Gymnasium Weiden

Studium:

10/2013 – 11/2018 Studium der Zahnmedizin an der Universität Regensburg

09/2014 Naturwissenschaftliche Vorprüfung

03/2016 Zahnärztliche Vorprüfung

11/2018 Zahnärztliche Prüfung

12 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich nachstehenden Personen besonderen Dank entgegenbringen, denn ohne deren Mithilfe wäre die Anfertigung dieser Promotionsschrift nicht zustande gekommen:

Zunächst möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Richard Bauer herzlich bedanken für die Überlassung der Arbeit, die ausgezeichnete, kompetente und vorbildliche Betreuung bei der Arbeit im Labor, dem Verfassen dieser Dissertation und die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe mitzuwirken.

Ferner danke ich Herrn Prof. Dr. Gero Brockhoff für die hilfsbereite und wissenschaftliche Betreuung als Zweitgutachter.

Eine große Hilfe war mir auch das Engagement von MTA Frau Brigitta Hauer, die mich mit den Grundlagen der Arbeit im naturwissenschaftlichen Labor vertraut machte und auch immer bei Fragen zur Seite stand.

Besonderer Dank ergeht an Anja Wessely, die mir besonders bei den anfänglichen Unsicherheiten im Labor behilflich war und auch für die tolle Zusammenarbeit im Alltag eine wichtige Kollegin war.

Schließlich möchte ich mich bei der gesamten AG Bauer und den weiteren Arbeitsgruppen im ZMB bedanken für die angenehme Arbeitsatmosphäre und den wertschätzenden gegenseitigen Umgang.

Mein ganz besonderer Dank aber gilt meinen Eltern Werner und Elfriede. Sie haben mir meinen bisherigen Lebensweg und das Studium ermöglicht und begleiten mich liebevoll und mit Rat und Tat in allen Lebenslagen. Dank aussprechen möchte ich auch an meinen Bruder Manuel Gollwitzer der für mich ebenfalls stets ein treuer Begleiter im Leben ist.

13 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Tobias Gollwitzer geboren am 28. Oktober 1994 in Weiden i.d.OPf.,

- dass ich den Doktorgrad der Zahnheilkunde nicht schon an einer Hochschule der Bundesrepublik Deutschland erworben habe,
- dass ich nicht an anderer Stelle zu einem Promotionsverfahren zum Erwerb des zahnmedizinischen Doktorgrades zugelassen bin,
- dass ich die zahnmedizinische Doktorprüfung nicht schon an einer Hochschule der Bundesrepublik Deutschland endgültig nicht bestanden habe.

Außerdem erkläre ich,

- dass mir keine Tatsachen bekannt sind, die mich zur Führung eines akademischen Grades im Sinne des Gesetzes über die Führung akademischer Grade unwürdig erscheinen lassen,
- dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, 30. April 2019