

Aus dem Medizinischen Zentrum für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde  
Geschäftsführender Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Boris A. Stuck  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Unterschiedliche Sensitivität von  
Kopf-Halskarzinom Zelllinien  
auf den EMT Masterregulator TGF- $\beta$ 1**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der  
gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Laura Reinhardt**

aus Kassel

Marburg, 2019

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

am: 20.09.2019

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: apl. Prof. Dr. med. Robert Mandić

1. Korreferent: PD Dr. W. Meißner

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>VIII</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Tumore im Kopf- Halsbereich .....	1
1.2 Epitheliale Mesenchymale Transition (EMT).....	2
1.2.1 Die Rolle der EMT bei der Invasivität und Metastasierung.....	2
1.2.2 Klassische Merkmale der EMT.....	3
1.2.3 Zytokine- EMT induzierende Faktoren.....	6
1.3 TGF- $\beta$ ein Masterregulator der EMT .....	7
1.3.1 TGF- $\beta$ Signalweg .....	7
1.3.2 TGF- $\beta$ 1 in HNSCC assoziierter EMT .....	8
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	11
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>12</b>
2.1 Material .....	12
2.1.1 Technische Geräte .....	12
2.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	13
2.1.3 Kulturmedien und Reagenzien für die Zellkultur.....	14
2.1.4 Reagenzien .....	14
2.1.5 Puffer und Lösungen .....	15
2.1.6 Antikörper .....	16
2.1.7 Zytokine .....	17
2.1.8 Software .....	17
2.1.9 Zelllinien .....	17
2.2 Methoden.....	17
2.2.1 Zellkultur.....	17
2.2.2 Zellgewinnung und Zellzahlbestimmung.....	18
2.2.3 Real Time Cellular Analysis (RTCA).....	18
2.2.4 “ <i>In vitro scratch wound assay</i> ” Analyse .....	20
2.2.5 Analyse der Proteinexpression .....	22
2.2.5.1 Proteinextraktion .....	23
2.2.5.2 Messung der Proteinkonzentration nach der Bradford Methode.....	23
2.2.5.3 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	24
2.2.5.4 Western Blot Transfer .....	25
2.2.5.5 Immundetektion .....	26
2.2.6 Durchflusszytometrie .....	27

---

2.2.7	Immunzytochemie .....	28
2.2.8	Statistische Analysen.....	30
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>31</b>
3.1	Unterschiedliche Sensitivität von Zelllinien auf EMT induzierende Zytokine .....	31
3.1.1	Hinweise auf eine EMT Induktion bei UM-SCC-3 Zellen nach TGF- $\beta$ 1 Exposition.....	32
3.1.2	HNSCC Zelllinien zeigen in der RTCA ausgeprägte Unterschiede in der Sensitivität auf TGF- $\beta$ 1 .....	35
3.1.3	<i>In vitro scratch wound assay</i> : TGF- $\beta$ 1 führt überwiegend in HaCaT und UM-SCC-3 Zellen zu morphologischen Veränderungen.....	39
3.2	Der TGF- $\beta$ 1 induzierte mesenchymale Phänotyp von HaCaT und UM-SCC-3 Zellen korreliert mit der Phosphorylierung von Tyrosin 424 des TGF- $\beta$ Rezeptor Typ II .....	43
3.3	TGF- $\beta$ 1 Einfluss auf E-Cadherin und das Zytoskelett .....	48
3.3.1	TGF- $\beta$ 1 vermindert die Expression von E-Cadherin in UM-SCC-1 Zellen, jedoch nicht in UM-SCC-3,-22B und HaCaT Zellen.....	49
3.3.2	Unter TGF- $\beta$ 1 Einfluss zeigt sich in HaCaT und UM-SCC-3 Zellen eine Relokalisierung von E-Cadherin .....	54
3.3.3	TGF- $\beta$ 1 bewirkt eine Aktin Reorganisation in HaCaT und UM-SCC-3 Zellen .	57
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>62</b>
4.1	Bedeutung der EMT bei der Invasivität von soliden Tumoren .....	62
4.2	Die Rolle von TGF- $\beta$ 1 als Masterregulator der EMT .....	63
4.2.1	TGF- $\beta$ 1 und seine kontextabhängige Wirkung <i>in vivo</i> .....	68
4.3	Die Rolle weiterer Zytokine bei der EMT.....	69
4.4	Therapie und Angriffsziele der EMT: TGF- $\beta$ Inhibition .....	71
4.5	Fazit und Ausblick .....	73
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>75</b>
<b>6</b>	<b>Summary .....</b>	<b>77</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>79</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>87</b>
8.1	Verzeichnis der akademischen Lehrer .....	87
8.2	Danksagung.....	88

## Abkürzungsverzeichnis

AKT	entspricht Proteinkinase B
APC	Adenomatous polyposis coli
BSA	Bovines Serum Albumin
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
BMP	Bone Morphogenetic Protein
cdc-42	Cell division control protein 42 homolog
CI	Cell Index
CTL	CD8+ zytotoxische T-Lymphozyten
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
CXCL	Chemokine (C-X-C motif) Ligand 1
DAPI	4',6-Diaminidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	EGF Rezeptor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMT	Epitheliale Mesenchymale Transition
Erk	Extracellular signal-regulated Kinase
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetales Kälberserum
GDF	Growth Differentiation Factor
GTPase	Hydrolyse Enzym des Guanosin Triphosphat
Grb	Growth factor receptor-bound protein
HaCaT	Human adult low Calcium high Temperature Keratinocytes
HCL	Chlorwasserstoffsäure
HepG2	Human hepatocellular carcinoma derived cell line
HER	Human epidermal growth factor related Receptor
HGF	Hepatocyte Growth Factor

---

HNSCC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma
HPV	Humanes Papillomavirus
HRP	Horseradish Peroxidase (Merettichperoxidase)
HuH6	Human hepatoblastoma derived cell line
IL	Interleukin
JNK	c-Jun N- terminale Kinase
kDa	kilo Dalton
LIMK	LIM domaine Kinase
NaCl	Natriumchlorid
NK	Natürliche Killerzellen
NZI	Normalisierter Zell Index
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MMP	Matrix Metalloproteinase
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney (Hunde Nierenzelllinie)
MEKK	murine MAP kinase kinase kinase
MET	Mesenchymale Epitheliale Transition
miRNA/miR	microRiboNucleicAcid
MISC	Myeloid immune suppressor cells
MKK	Mitogen-activated protein kinase kinase
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
NMuMG cell	Nontransformed murine mammary gland epithelial cell
PAK1	p21 aktivierte Kinase 1
Par6	Partitioning defective (par) 6
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PDL-1	Programmed Cell Death Ligand-1
PI3K	Phosphatidylinositol-3 Kinase
PKC	Protein Kinase C
P38 MAPK	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase
Ras	Rat sarcoma
Rho	Ras homologue
ROCK	Rho associated coiled coil containing proteinkinase
RTCA	Real Time cellular Analysis

SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SLUG	entspricht SNAI2
Smad	homologies to SMA ("small" worm phenotype) and MAD ("Mothers Against Decapentaplegic") family of genes.
SNAIL	entspricht SNAI1
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
S6K	Ribosomal protein S6 kinase beta-1
TAF	Tumor assoziierte Fibroblasten
TAK	Tat associated Kinase
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor- $\beta$
TGF- $\beta$ R	TGF- $\beta$ Rezeptor
TIL	Tumor infiltrierende Lymphozyten
TME	Tumormikroumgebung
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF	TNF-receptor associated factor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TWIST	Twist-related protein 1
UM-SCC	University of Michigan-Squamous Cell Carcinoma
Wnt	Wingless Int. 1
ZEB	Zinc finger E-box-binding homeobox 1

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Invasions-Metastasierungskaskade. ....	3
Abbildung 2. Änderungen des Zellphänotyps bei der EMT.....	5
Abbildung 3. Änderung der Zellmorphologie unter EGF. ....	7
Abbildung 4. Beteiligung des TGF- $\beta$ Signalwegs am Prozess der Epithelialen Mesenchymalen Transition. ....	9
Abbildung 5. Schematische Darstellung der Funktionsweise einer E-Plate 96. ....	19
Abbildung 6. <i>in vitro scratch wound assay</i> .....	21
Abbildung 7. SDS-PAGE und Proteintransfer. ....	25
Abbildung 8. Immundetektion und Visualisierung des Proteins.....	27
Abbildung 9. Auswirkung von TGF- $\beta$ 1 auf den RTCA Zell Index in UM-SCC-3 Zellen. ....	33
Abbildung 10. Auswirkung von TGF- $\beta$ 2 auf den RTCA Zell Index in UM-SCC-3 Zellen. ....	33
Abbildung 11. Auswirkung von TGF- $\beta$ 3 auf den RTCA Zell Index in UM-SCC-3 Zellen. ....	34
Abbildung 12. Auswirkung von HGF auf den RTCA Zell Index in UM-SCC-3 Zellen. ....	35
Abbildung 13. <i>In vitro</i> Proliferation der untersuchten Zelllinien.....	36
Abbildung 14. Verlauf der <i>in vitro</i> Proliferation von HaCaT Zellen ohne und nach Zugabe von TGF- $\beta$ 1.....	37
Abbildung 15. Verlauf der <i>in vitro</i> Proliferation von UM-SCC-1 Zellen ohne und nach Zugabe von TGF- $\beta$ 1.....	38
Abbildung 16. Verlauf der <i>in vitro</i> Proliferation von UM-SCC-3 Zellen ohne und nach Zugabe von TGF- $\beta$ 1.....	38
Abbildung 17. Verlauf der <i>in vitro</i> Proliferation von UM-SCC-22B Zellen ohne und nach Zugabe von TGF- $\beta$ 1.....	39
Abbildung 18. TGF- $\beta$ 1 induziert eine morphologische Veränderung in der Zelllinie HaCaT. ..	40
Abbildung 19. TGF- $\beta$ 1 hat keinen Einfluss auf den morphologischen Phänotyp in UM-SCC-1 Zellen.....	41
Abbildung 20. TGF- $\beta$ 1 induziert eine morphologische Veränderung in UM-SCC-3 Zellen.....	42
Abbildung 21. Die Exposition von UM-SCC-22B Zellen mit exogenen TGF- $\beta$ 1 bewirkt keine Veränderung des Phänotyps. ....	43
Abbildung 22. TGF- $\beta$ 1 Exposition von HaCaT Zellen führt zu einer Aktivierung des TGF- $\beta$ RII. ....	44
Abbildung 23. TGF- $\beta$ 1 Exposition von UM-SCC-1 Zellen führt zu keiner signifikanten Aktivierung von TGF- $\beta$ RII. ....	45
Abbildung 24. Aktivierung des TGF- $\beta$ RII in UM-SCC-3 Zellen durch TGF- $\beta$ 1. ....	46
Abbildung 25. TGF- $\beta$ 1 Behandlung von UM-SCC-22B Zellen führt zu keiner Aktivierung von TGF- $\beta$ RII.....	47

---

Abbildung 26. Die E-Cadherin Expression verringert sich in UM-SCC-1 Zellen nach Inkubation mit TGF- $\beta$ 1.....	50
Abbildung 27. TGF- $\beta$ 1 zeigt keinen Einfluss auf die E-Cadherin Expression in HaCaT Zellen. .....	51
Abbildung 28. TGF- $\beta$ 1 zeigt keinen Einfluss auf die E-Cadherin Expression in UM-SCC-3 Zellen.....	52
Abbildung 29. TGF- $\beta$ 1 zeigt keinen Einfluss auf die E-Cadherin Expression in UM-SCC-22B Zellen.....	53
Abbildung 30. Die E-Cadherin Lokalisation in HaCaT und UM-SCC-1 Zellen zeigt ohne exogenes TGF- $\beta$ 1 deutliche Unterschiede, welche sich nach TGF- $\beta$ 1 Zufuhr angleichen. ....	55
Abbildung 31. Die E-Cadherin Lokalisation in UM-SCC-3 und UM-SCC-22B Zellen weist ohne exogenes TGF- $\beta$ 1 Unterschiede auf, mit TGF- $\beta$ 1 kommt es in UM-SCC-3, jedoch weniger in UM-SCC-22B Zellen zu einer Relokalisation. ....	56
Abbildung 32. In HaCaT Zellen zeigt sich nach TGF- $\beta$ 1 Gabe eine Zunahme der $\beta$ -Aktin Expression und eine subzellige Relokalisation mit der Bildung von <i>stress fibers</i> .....	58
Abbildung 33. In UM-SCC-1 Zellen zeigt sich nach TGF- $\beta$ 1 Gabe keine signifikante Änderung der $\beta$ -Aktin Expression bei unveränderter subzellulärer Lokalisation. ....	59
Abbildung 34. In UM-SCC-3 Zellen zeigt sich nach TGF- $\beta$ 1 Gabe eine Änderung der $\beta$ -Aktin Expression und eine subzellige Relokalisation mit der Bildung von <i>stress fibers</i> .....	60
Abbildung 35. In UM-SCC-22B Zellen zeigt sich nach TGF- $\beta$ 1 Gabe keine signifikante Änderung der Aktin Expression und subzellulären Verteilung.....	61
Abbildung 36. Hypothese: Inverse Korrelation der TGF- $\beta$ 1 Sensitivität mit dem Grad des mesenchymalen Phänotyps von Tumorzellen. ....	64

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Verwendete HNSCC Zelllinien.....	17
Tabelle 2. Konzentration der im RTCA eingesetzten Zytokine .....	20
Tabelle 3. TGF- $\beta$ 1 Inkubation Schema.....	23
Tabelle 4. Pipettierschema für die Erstellung einer Proteinstandardkurve .....	24

# 1 Einleitung

## 1.1 Tumore im Kopf- Halsbereich

Bösartige Neubildungen, die ihren Ursprung im Kopf-Halsbereich haben, umfassen Tumore der Mundhöhle (Cavum oris), des Rachens (Nasopharynx, Oropharynx, Hypopharynx), des Kehlkopfes (Larynx), sowie der Speicheldrüsen, Nasennebenhöhlen und –haupthöhlen. Die am häufigsten vorkommende histologische Tumorentität ist mit mehr als 90% das Plattenepithelkarzinom. Plattenepithelkarzinome des Kopf- Halsbereichs werden international als *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma* (HNSCC) bezeichnet und stehen weltweit an sechster Stelle aller Malignomerkrankungen (Siegel et al., 2018). Trotz verbesserter Therapiekonzepte in Chirurgie, Strahlen- und Chemotherapie liegt die Fünf Jahres-Überlebensrate bei lediglich 51% (Bray et al., 2018). Männer erkranken dreimal so häufig wie Frauen an dieser Krebsform, wobei durch Änderungen im Lebensstil eine Angleichung der Geschlechter erfolgt (Bose et al., 2013; Siegel et al., 2018).

Haupttrisikofaktor für die Entstehung von HNSCC ist mit ca. 80% der Nikotinabusus in Form von Tabakrauchen. Es konnte festgestellt werden, dass Raucher im Vergleich zu Nichtrauchern ein bis zu 10-fach erhöhtes Risiko haben an einem HNSCC zu erkranken (Bose et al., 2013). In Verbindung mit übermäßigem Alkoholkonsum potenziert sich die kanzerogene Wirkung nochmals erheblich. Zu weiteren Risikofaktoren zählen schlechte Mundhygiene und bei einigen Tumorentitäten eine erhöhte Strahlenbelastung, sowie beruflich bedingte Exposition bestimmter Karzinogene (Leemans et al., 2011).

Als ein weiterer Risikofaktor hat sich eine Infektion mit Hochrisiko-Humanen Papilloma Viren (HPV), insbesondere des Typs 16, herausgestellt. Es konnte gezeigt werden, dass ca. 25% aller HNSCC (insbesondere Oropharynxkarzinome) mit einer HPV Infektion assoziiert sind (Leemans et al., 2011).

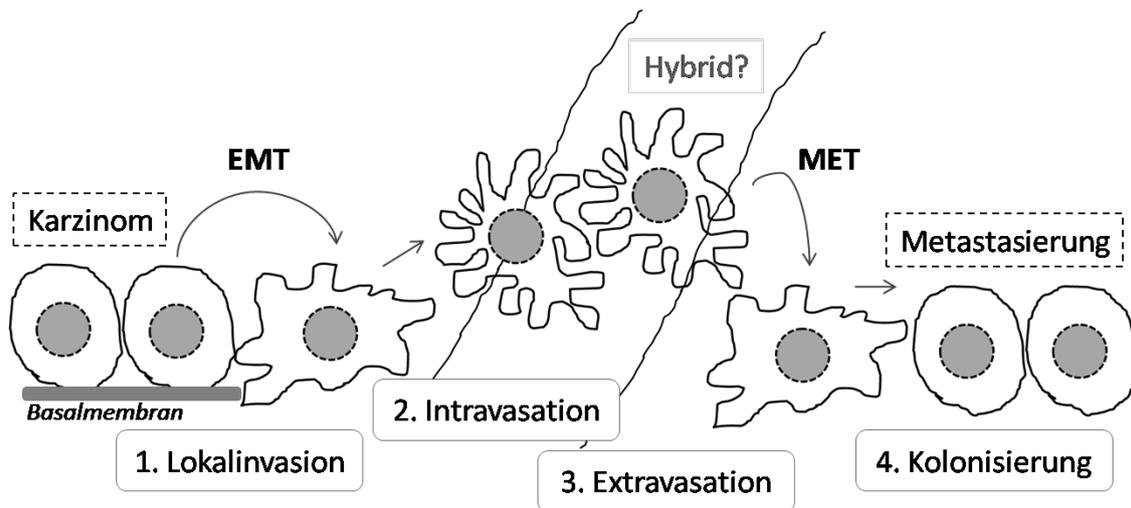
Aufgrund der hohen Mortalität und Morbidität dieser Erkrankung, ist es von großer Bedeutung, HNSCC frühzeitig zu erkennen. Die Prognose von HNSCC Patienten hängt im Wesentlichen davon ab, ob eine Metastasierung des Primärtumors zum Zeitpunkt der Diagnose bereits stattgefunden hat. So sinken die Heilungsaussichten bei Vorliegen von Lymphknotenmetastasen bei Diagnosestellung um bis zu 50% gegenüber einem nicht metastasierten Tumor (Bhave et al., 2011). Die Identifizierung der zum Invasionspotential von HNSCC Tumoren beitragenden Mechanismen ist aufgrund der für diese Tumoren charakteristischen frühen Metastasierung besonders relevant (Bhave et al., 2011).

## **1.2 Epitheliale Mesenchymale Transition (EMT)**

Die Epitheliale Mesenchymale Transition (EMT) beschreibt einen Prozess vom Verlust epithelialer Eigenschaften und der Erlangung mesenchymaler Attribute, der sowohl physiologischerweise in gesunden als auch in malignen Zellen vorkommt. Die Aktivierung des EMT Programms kann dabei temporär oder dauerhaft bestehen (Hanahan et al., 2011). Als eine der Pioniere auf dem EMT Gebiet gilt Elisabeth Hay, die eine Transformation des Phänotyps epithelialer Zellen beschrieb, die dem Einfluss von Kollagen ausgesetzt waren (Greenburg et al., 1982). Der Begriff der Transformation wurde später durch Transition ersetzt, um die Reversibilität des Prozesses widerzuspiegeln (Kalluri et al., 2009). Eine Konversion von Epithelzellen in Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften ist ein fundamentaler Prozess in physiologischen Abläufen, wie der Embryogenese und Wundheilung. Gleichzeitig spielt EMT aber auch eine Schlüsselrolle bei pathologischen Prozessen, wie Inflammation, Fibrose und Tumorgenese (Tan et al., 2015), unterstützt die Unterwanderung zellbiologischer Kontrollsysteme und akquiriert durch die Erlangung erhöhter Plastizität Stammzeleigenschaften, die mit Therapieresistenzen assoziiert sind (Ansieau et al., 2008; Pattabiraman et al., 2016). Zur besseren Übersichtlichkeit, kann die EMT in drei Typen klassifiziert werden (Kalluri et al., 2009). Typ 1 umfasst den Bereich der Embryonalentwicklung, der die Entstehung des primären Mesenchyms aus dem Mesoderm während der Gastrulation sowie die Migration der Neuralzellen aus dem Primitivstreifen miteinschließt. Typ 2 findet sich während der Gewebsregeneration, Wundheilung und Fibrogenese. Typ 3 wird bei der Tumorprogression beobachtet (Kalluri et al., 2009; Zeisberg et al., 2009), welches Thema dieser Arbeit ist.

### **1.2.1 Die Rolle der EMT bei der Invasivität und Metastasierung**

Im Rahmen der Krebsentwicklung repräsentiert die Fähigkeit zur Metastasierung eine der essentiellen Eigenschaften des Tumors (Hanahan et al., 2011). Betrachtet man Teilaspekte der Invasivität und Metastasierung, kann der Ablauf schematisch in die Schritte lokale Invasion, Intravasation in Lymph- und Blutgefäße, Extravasation, Bildung von Mikrometastasen und Heranwachsen von Makrometastasen (Kolonisierung), unterteilt werden (Talmadge et al., 2010). Dieser sequenzielle Ablauf wird auch als Invasions-Metastasierungskaskade beschrieben (Talmadge et al., 2010). Es wird angenommen, dass der Prozess in der frühen und intermediären Phase, das heißt Invasion, Zirkulation im Gefäßsystem und Extravasation, im Wesentlichen durch das zellbiologische Programm der EMT gesteuert wird (Polyak et al., 2009; Thiery et al., 2009). Zwischenstadien der EMT, ein Hybrid aus mesenchymalen und epithelialen Charakteristika, wird als überlebenswichtig bei der Wanderung im Gefäßsystem diskutiert (Jolly et al., 2015).



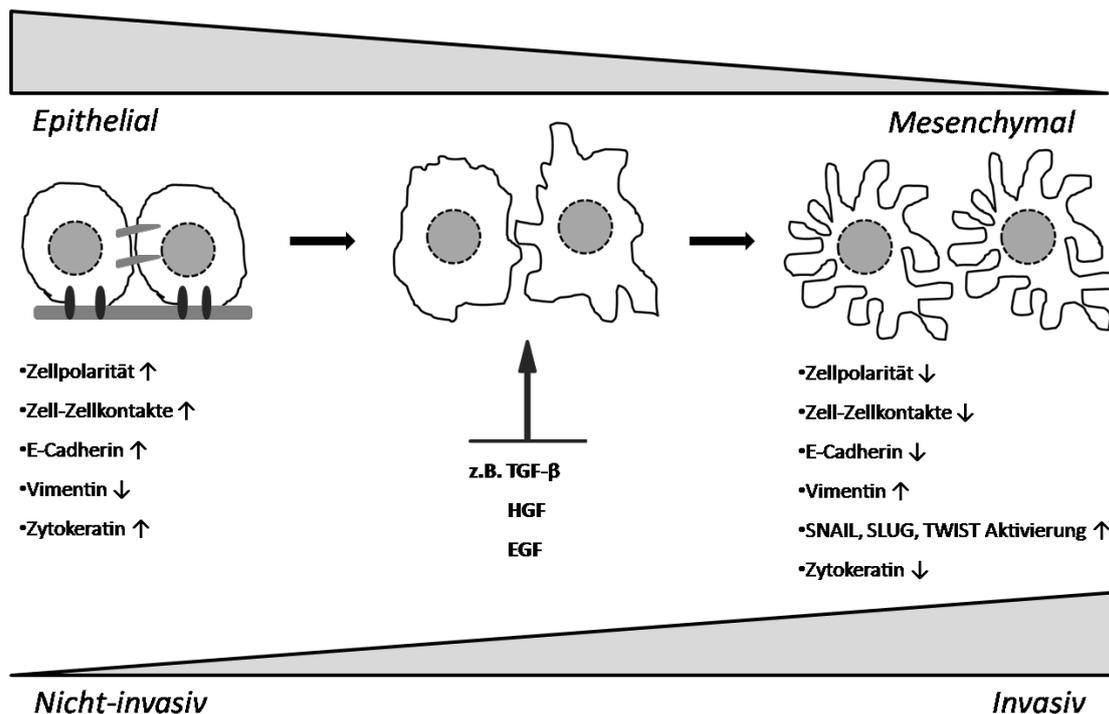
**Abbildung 1. Invasions-Metastasierungskaskade.** Der Prozess wird gesteuert über EMT bzw. MET. EMT=Epitheliale Mesenchymale Transition; MET=Mesenchymale Epitheliale Transition (Modifiziert nach Samatov et al., 2013).

Der reverse Ablauf, die Mesenchymale Epitheliale Transition (MET), scheint im letzten Schritt, der Bildung von Metastasen eine kritische Rolle zu spielen (Ocana et al., 2012). Der Ablauf der Invasion-Metastasierungskaskade ist in Abbildung 1 dargestellt. In Studien mit dreidimensionaler Rekonstruktion von Tumoren sowie durch Rückverfolgung der genetischen Abstammung von Tumorkolonien, konnte durch Nachweis abgespaltener polyklonaler Zellcluster des Primärtumors (Primarius) (Cheung et al., 2016) gezeigt werden, dass innerhalb der Metastasierungskaskade die überwiegende Art der Dissemination über eine sogenannte kollektive Metastasierung erfolgt (Bronsert et al., 2014; Pattabiraman et al., 2016). Kaum beobachtet wurde dagegen die in zahlreichen Studien untersuchte Einzel-Zell Dissemination (Bronsert et al., 2014). Die am Rande des Primarius (invasive Front) befindlichen Tumorknospen wiesen dabei klassische EMT Merkmale auf (Bronsert et al., 2014; Ye et al., 2015). Interessanterweise zeigten vollständig abgespaltene Zellcluster sogar ausgeprägtere EMT Merkmale, waren assoziiert mit größerem Metastasierungspotential und resistenter gegen z.B. mechanische Alterationen, wie sie im Blutkreislauf auf Zellen einwirken (Bronsert et al., 2014).

## 1.2.2 Klassische Merkmale der EMT

Zahlreiche Arbeiten haben in den letzten Jahrzehnten einen differenzierteren Einblick in den Prozess der EMT ermöglicht wobei das Verständnis der Wirkungszusammenhänge, welche den komplexen Mechanismen zugrunde liegen, unvollständig ist. Auf die zentralen Abläufe der EMT, welche in Abbildung 2 zusammengefasst sind, wird im Folgenden näher eingegangen. Eine Reihe von zellbiologischen Vorgängen ist notwendig, um die Initiierung und Progression der EMT zu erreichen.

Zu diesen gehören Verlust der Zellpolarität, Expression Zell-spezifischer Oberflächen-Proteine, die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, Expression und Reorganisation von Proteinen des Zytoskeletts, Induktion von Enzymen, welche die Extrazelluläre Matrix (ECM)-Membran abbauen und ein verändertes Expressionsprofil von microRNA (miR) (Zeisberg et al., 2009). Als ein zentrales Schlüsselement der EMT gilt der Abbau des Oberflächenproteins E-Cadherin, der im Wesentlichen auf transkriptionaler Ebene von den Faktoren SNAIL, ZEB1/2 und TWIST gesteuert wird (Thiery et al., 2009). Eine erniedrigte E-Cadherin Expression wird vielfach in Karzinomen mit besonders malignen Phänotypen beobachtet. Aus diesem Grund gilt eine vermehrte E-Cadherin Expression als etablierter Gegenspieler von Invasion und Metastasierung (Berox et al., 2009; Thiery et al., 2009; Zeisberg et al., 2009). Eine mit der Abnahme von E-Cadherin häufig assoziierte Hochregulierung von N-Cadherin führte zur Etablierung des Begriffs *cadherin-switch* (Zeisberg et al., 2009). E-Cadherin dient, vermittelt durch  $\beta$ -Catenin, als Anker von *adherens junctions* zweier Nachbarzellen und unterstützt als Schlüsselprotein von Zell-Zell Kontakten die Beibehaltung der Form und Festigkeit des Epithelverbands (Scanlon et al., 2013). Neben der Induktion und Suppression typischer EMT assoziierter Proteine, kommt es unter Aktivierung der Transkriptionsfaktoren SNAIL und ZEB zur Reorganisation des Zytoskeletts und zum Abbau von Kernstrukturen, die zu einer erhöhten Motilität der Zelle führen (Liu et al., 2016; Ozdamar et al., 2005). Ein initialer Schritt der EMT ist der Verlust der Zellpolarität mittels Auflösung von Zell-Zellkontakten und Änderung des epithelialen Zytokeratinprofils, insbesondere von Aktin (O'Connor et al., 2016). Physiologisch ist Aktin in Epithelzellen in diffus verteilten dünnen Filamenten angeordnet, während in Mesenchymzellen die Aktinfilamente in dicken kortikal gelegenen, kontraktile Bündeln (*stress fibers*) vorliegen, die eine erhöhte Motilität der Zelle ermöglichen (Haynes et al., 2011). Durch Faktoren der EMT getriggerte Modulationen des Zytoskeletts sind zum Beispiel während der Wundheilung, Embryogenese und Fibrogenese möglich. In Tumorzellen bewirken Aktin vermittelte *stress fibers* jedoch eine erhöhte Migrations- und Invasionseigenschaft (Kelley et al., 2008). Die Aktivierung von EMT Transkriptionsfaktoren wie ZEB, und TWIST, führt außerdem zu einem Abbau der epithelialen Zell-Zell-Kontakte über Repression von *tight junction* Proteinen wie Claudin-4 und Zonula Occludens (ZO)-3 und gleichzeitig zur Expression mesenchymaler Markerproteine wie Vimentin, Occludin und N-Cadherin (Vandewalle et al., 2005), vermehrter Expression von Matrix Metalloproteinasen (MMPs) sowie konsekutivem Abbau von Basalmembran Bestandteilen. Eine Aktivierung von ZEB1 führt zudem zur Akquirierung von Stammzeleigenschaften, die mit einer erhöhten Resistenz gegen Medikamente und Bestrahlung korrelieren (Zhang et al., 2015; Zeisberg et al., 2009).



**Abbildung 2. Änderungen des Zellphänotyps bei der EMT.** Dargestellt sind schematisch die Abläufe der EMT und deren Charakteristika (Modifiziert nach Kalluri et al., 2009; Pattabiraman et al., 2016; Scanlon et al., 2013).

EMT Transkriptionsfaktoren können wiederum von microRNAs moduliert werden, die über negative Feedbackschleifen entweder als Repressoren (z.B. miR-34 bzw. miR506) oder Promoter (z.B. miR21 bzw. miR10-b) der EMT agieren (Liu et al., 2016).

EMT Abläufe konnten in einer Vielzahl von Tumorentitäten nachgewiesen werden. Umfassende Untersuchungen fanden dabei in Brusttumorzelllinien statt, aber auch in HNSCC konnten relevante EMT Prozesse, die mit erhöhter Invasion und Metastasierung assoziiert waren, beobachtet werden (Nijkamp et al., 2011). Dabei korrelierte eine niedrige E-Cadherin Expression bei HNSCC mit einem verstärkten metastatischen Phänotyp, eine gleichzeitig vorliegende Vimentin Überexpression fand man in Tumoren mit vermehrter Fernmetastasierung (Nijkamp et al., 2011). Das bei E-Cadherin Verlust frei werdende zytoplasmatische  $\beta$ -Catenin korrelierte mit einer schlechten Prognose bei Patienten mit metastasiertem HNSCC (Liu et al., 2016; Tsai et al., 2009). Der Gen knock-down von EMT Transkriptionsfaktoren führte darüber hinaus zu erhöhter Cisplatin Sensitivität in HNSCC (Hsu et al., 2010; Scanlon et al., 2013), Initiierung einer EMT, sowie Stabilisierung metastatischer Phänotypen (Scanlon et al., 2013). Die vorliegenden Daten unterstützen die Ansicht, dass der Beitrag des EMT Programms am Invasions- und Metastasierungsverhalten von HNSCC Tumoren von wesentlicher Bedeutung ist. EMT als medikamentöses Angriffsziel zu nutzen erscheint daher zur Verbesserung therapeutischer Maßnahmen sinnvoll. Dafür ist die Identifizierung von EMT induzierenden Faktoren und das bessere Verständnis ihres Wirkmechanismus notwendig.

### 1.2.3 Zytokine- EMT induzierende Faktoren

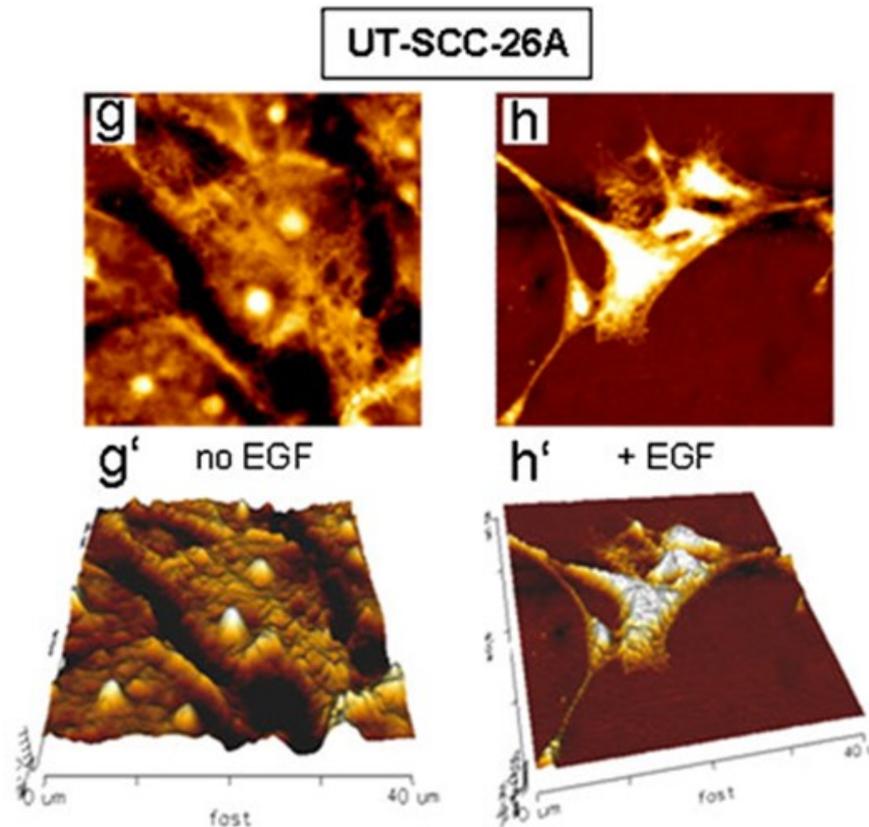
Im Jahr 1985 gelang es Stoker und Perryman einen von Fibroblasten freigesetzten Faktor zu beschreiben, welchen sie aufgrund seiner Wirkung auf das umliegende Epithel als *scatter factor* bezeichneten (Stoker et al., 1985). Die damals untersuchten Nierenzellen vollzogen unter Co-Kultivation mit embryonalen Fibroblasten eine drastische Änderung ihres Phänotyps und erlangten unter Auflösung des Zellverbands die Fähigkeit zur Migration. Als Bindeglied dieser Interaktion von Mesenchym und Epithel wurde der *scatter factor* später als *Hepatocyte Growth Factor* (HGF) identifiziert (Gherardi et al., 1989; Sonnenberg et al., 1993). Diese Beobachtung zeigte den Zusammenhang von EMT mit der Wirkung extrazellulärer Botenstoffe.

In ähnlicher Weise konnte nach Exposition von HNSCC Zellen mit dem Zytokin *Epidermal growth factor* (EGF), eine drastische Änderung der Zellmorphologie beobachtet werden (Makarova et al., 2013), welche Ähnlichkeiten einer Mesenchymzelle aufwies (Abbildung 3). Der Prozess der EMT in HNSCC Zelllinien erscheint daher durch extrazelluläre Botenstoffe wie HGF, EGF sowie weitere Zytokine wie *Transforming growth factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ), *Brain derived neurotrophic factor* (BDNF) und Liganden des *Wingless Int-1* (Wnt) und *Notch* Signalwegs, induzierbar (Douma et al., 2004; Huber et al., 2004; Kupferman et al., 2010; Reichardt, 2006; Roh et al., 2015).

Die Zytokine scheinen jedoch in der Potenz der EMT Induktion zu variieren (Li et al., 2015; Lu et al., 2006), was zur Folge hat, dass zwar viele der Liganden EMT modulieren können, eine suffiziente EMT Antwort jedoch häufig nur in Kombination mehrerer dieser Faktoren erreicht werden kann (Li et al., 2015; Lu et al., 2006).

Als Beispiel sei hier das Zytokin HGF angeführt, welches an der Regulation von Embryogenese, Gewebsregeneration und Wundheilung beteiligt ist und in über 80% der HNSCC Tumoren überexprimiert vorliegt (Rothenberger et al., 2017). Insbesondere in HPV negativen Tumoren ist HGF mit einer schlechten Prognose und Lymphknotenmetastasen assoziiert (Zhang et al., 2016). Eine Beteiligung von HGF am EMT Progress in HNSCC wurde über Suppression von E-Cadherin (Kim et al., 2007) und Aktivierung von EMT Regulatoren wie STAT3 beobachtet (Zhang et al., 2016). Die EMT induzierende Wirkung von HGF erfolgt dabei jedoch im Wesentlichen nicht isoliert, sondern über Interaktion mit der Rezeptortyrosinkinase EGFR (Rothenberger et al., 2017; Smith et al., 2013), welche in HNSCC häufig überexprimiert ist (Lindsey et al., 2015; Makarova et al., 2013), sowie weiterer Signalwege, wie dem von TGF- $\beta$  (Rothenberger et al., 2017).

Im Vergleich zu der oben aufgeführten synergistischen Wirkweise anderer EMT induzierender Faktoren, wie HGF, konnte dagegen allein durch TGF- $\beta$ 1 in Lungen- (A549) und Brusttumor- (MCF-7) Zelllinien eine vollständige EMT Induktion erreicht werden (Li et al., 2015; Lu et al., 2006).



**Abbildung 3. Änderung der Zellmorphologie unter EGF.** Dargestellt ist die HNSCC Zelllinie UT-SCC-26A ohne (**g**) und nach exogener Zugabe von EGF (**h**)(**g'**) und (**h'**)=dreidimensionale Ansicht). Unter EGF Exposition ist eine drastische Änderung der Zellmorphologie zu beobachten. Aufnahme AG Mandic (Makarova et al., 2013).

### 1.3 TGF- $\beta$ ein Masterregulator der EMT

Das Zytokin TGF- $\beta$  gehört zu einer Superfamilie von Liganden, zu denen neben den TGF- $\beta$  Isoformen 1-3, *Bone Morphogenetic Protein* (BMP), Aktivine und *Growth Differentiation Factors* (GDFs) gezählt werden. Diese Liganden kontrollieren über Serin/Threonin Kinase Rezeptoren zellbiologische Prozesse und steuern die Regulation der Gewebs-Homöostase, Zellwachstum, Differenzierung, Migration, Inflammation und Angiogenese (Chen et al., 2002; Massagué, 2008; Pardali et al., 2007; Valcourt et al., 2005; Wang et al., 2008). Neben der Regulation physiologischer Prozesse, sorgt TGF- $\beta$  für eine günstigere Umgebung des Tumorwachstums, zum Teil vermittelt über Suppression von Lymphozyten, und spielt eine bedeutende Rolle während der Karzinogenese (Tan et al., 2015).

#### 1.3.1 TGF- $\beta$ Signalweg

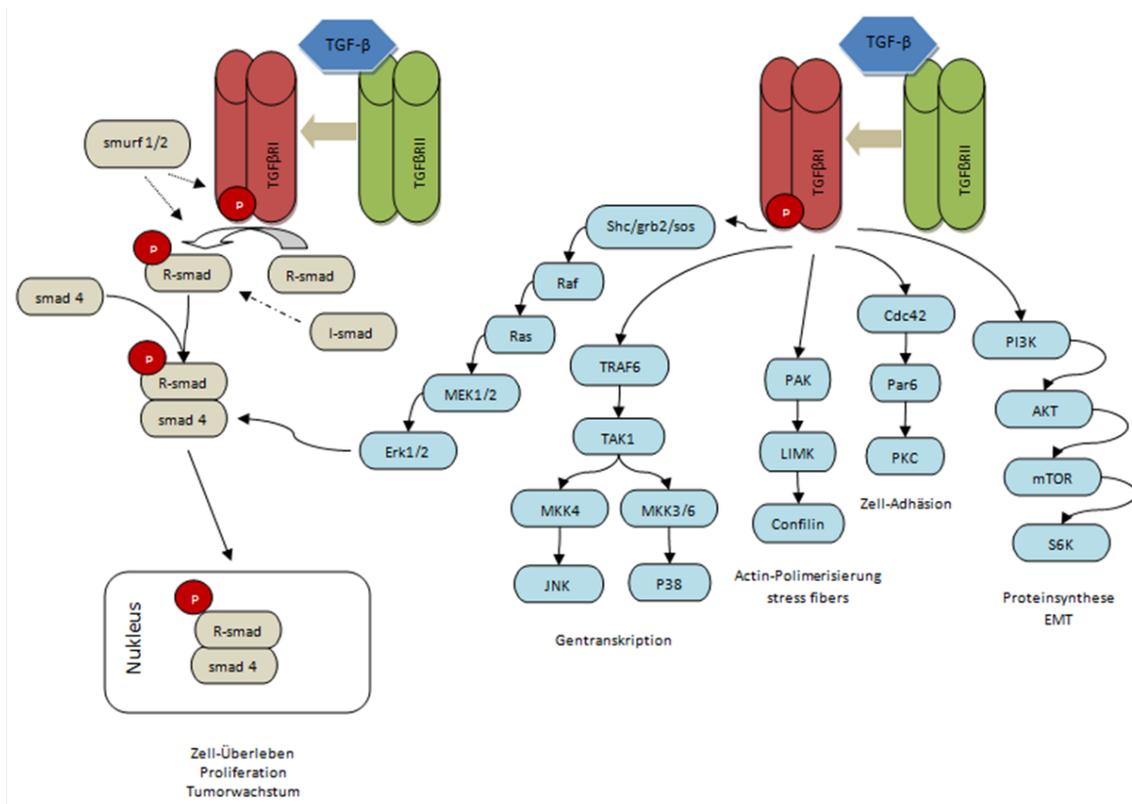
TGF- $\beta$  aktiviert mehrere für den Prozess der EMT relevante Signalwege, welche in Abbildung 4 dargestellt sind. Die Wirkung erfolgt über Bindung des als Dimer vorliegenden Transmembranrezeptors TGF- $\beta$  RII, über Rekrutierung von Rezeptor Typ I und Bildung eines Heterotetramerkomplexes.

Innerhalb des Komplexes transphosphoryliert TGF- $\beta$  RII den TGF- $\beta$  RI, welches zu einer downstream Signalkaskade mit nachfolgender Serin Phosphorylierung von Smad2 und Smad3 Proteinen führt. TGF- $\beta$  RII hat zudem eine duale Kinasespezifität als Serin/Threonin-Kinase und Tyrosinkinase. TGF- $\beta$  RII hat somit die Fähigkeit über eine Serin/Threonin Domäne zu phosphorylieren, sowie über die Tyrosindomänen 259, 336 und 424 selbst phosphoryliert zu werden (Lawler et al., 1997). Die Tyrosindomäne scheint eine autoregulatorische Rolle zu spielen, da *in vitro* Beobachtungen eine dauerhafte Autophosphorylierungsfähigkeit in der Abwesenheit eines Liganden zeigten (Chen et al., 1995).

### 1.3.2 TGF- $\beta$ 1 in HNSCC assoziierter EMT

TGF- $\beta$  bewirkt eine mesenchymale Differenzierung über Aktivierung der EMT Transkriptionsfaktoren SNAIL, SLUG und TWIST zum einen über Smad abhängige (Derynck et al., 2003; Ebisawa et al., 2001), aber auch Smad unabhängige Signalwege (Massagué, 2008). Aktivierung der Ras vermittelten Erk/MAP Kinase Kaskade (Heldin et al., 2012) moduliert den R-Smad vermittelten Signalweg (Zhang, 2009) und kontrolliert die EMT Gentranskription neben Phosphatidylinositol-3-Kinase/AKT und S6K (White et al., 2010), welches zusätzlich den Zellzyklusarrest hemmt (Zhang, 2009).

Die Aktivierung von p38 MAP und JNK über MAP Kinase Kinase Kinase TAK1, MEKK 3/6 bzw. MKK4 führt zu verstärktem Tumorwachstum und EMT Gentranskription (Heldin et al., 2012). Die Rekrutierung von cdc-42, Par6 und PKC moduliert die Zell-Adhäsion und Auflösung von Zell-Zellkontakten (Foletta et al., 2003; Kelley et al., 2008). Eine Reorganisation des Zytoskeletts und Bildung Aktin vermittelter *stress fiber* erfolgt über PAK, Cofilin und LIMK unter Regulation der Rho GTPase RhoA und ROCK (Foletta et al., 2003; Haynes et al., 2011; Kelley et al., 2008). Eine Beteiligung von p38 MAPK an TGF- $\beta$  vermittelter *stress fiber* Bildung wird diskutiert (Bakin et al., 2002). In HNSCC wurde durch *loss of function* Mutationen oder transkriptionale Suppression (Garrigue-Antar et al., 1995) TGF- $\beta$  RII, Smad2 und Smad4 häufig inaktiviert vorgefunden (Chen et al., 2001). Zelllinien mit mutiertem p53 wiesen eine verminderte TGF- $\beta$  RII Expression auf (Cohen et al., 2009; White et al., 2010). Durch gewebspezifisch variierende Expression sowie unterschiedliche Bindungsaffinität an den verschiedenen Rezeptortypen scheinen die TGF- $\beta$  Isoformen 1-3 als Modulatoren von EMT verschiedene Funktionen *in vivo* zu erfüllen (Bierie et al., 2006; Nieto et al., 2016), wie der Einsatz von knock-out Mäusen demonstriert. Physiologisch werden EMT Prozesse während TGF- $\beta$ 3 induzierter Gaumenschlussbildung aktiviert, wie Suppression von E-Cadherin durch Aktivierung von SNAI1, ZEB2, sowie eine Modulation des Aktin Zytoskeletts zeigt (De Crescenzo et al., 2006; Tan et al., 2015).



**Abbildung 4. Beteiligung des TGF- $\beta$  Signalwegs am Prozess der Epithelialen Mesenchymalen Transition.** Auf der linken Seite ist der smad abhängige Signalweg gezeigt. Nach Bindung des Liganden kommt es zur Bildung eines Heterotetramers der Serin/Threonin Rezeptor Kinase Typ I und Typ II mit TGF- $\beta$  und zur Aktivierung von zytoplasmatischen Rezeptor aktivierten Smads (R-smad: Smad2 und Smad3) mittels Phosphorylierung. Aktivierung von R-smads führt zur Komplexbildung mit dem Common Mediator Smad4 und gemeinsamer Translokation in den Zellkern, wo mittels Transkription diverse Zell-Prozesse moduliert werden. Der smad Signalweg wird von Inhibitorischen Smads (I-smad: Smad6 und Smad7) antagonisiert. Ubiquitin Ligase smurf1/2 steuert mittels Degradation von TGF- $\beta$  RI und R-smads die Stabilität der Signalaktivierung. Smad unabhängige Signalwege modulieren den smad Signalweg und werden zum Teil direkt vom TGF- $\beta$ /Rezeptorkomplex aktiviert. Die an der EMT Regulierung beteiligten smad unabhängigen Signalwege sind rechts dargestellt. Die Aktivierung von PI3K/AKT steuert über S6K die EMT relevante Proteinsynthese. Die Rekrutierung von cdc-42, Par6 und PKC bewirkt den Abbau von tight junctions und eine verringerte Zell-Adhäsion. PAK moduliert über Aktivierung von LIM Kinase und Cofilin die Bildung von stress fibers. Die Aktivierung von TRAF6 führt zur Rekrutierung von JNK sowie p38 MAP Kinase und reguliert Zell-Status spezifische Gentranskription. Die P38 Aktivierung trägt zudem zur stress fiber Bildung bei. Die Aktivierung des MEK/Erk Weges erfolgt über die Rekrutierung von Ras und moduliert über die Interaktion mit R-smads wiederum smad abhängige Gentranskription. Modifiziert nach ‚TGF- $\beta$  Signaling‘ (Cell Signaling Technology Inc., 2014, URL: <https://www.cellsignal.de/contents/science-cst-pathways-stem-cell-markers/tgf-smad-signaling-interactive-pathway/pathways-tgfb>). Angelehnt an Heldin et al., 2012; Bierie et al., 2006; Miyazono, 2009.

TGF- $\beta$ 3 knock-out führte zur Entwicklung von Gaumenspalten und Defekten in der Lungenentwicklung. TGF- $\beta$ 1 knock-out Mäuse präsentierten sich unter anderem mit Autoimmun- und inflammatorischen Erkrankungen. Das Fehlen von TGF- $\beta$ 2 führte zu erhöhter perinataler Mortalität und Fehlbildungen der Herzklappen (De Crescenzo et al., 2006; Tan et al., 2015).

Im Kontext einer Tumor assoziierten EMT (Typ 3), gibt es Hinweise für die Beteiligung aller drei Isoformen (Gotzmann et al., 2006; Xue et al., 2012), wobei die Datenlage für TGF- $\beta$ 1 deutlich überwiegt (Bierie et al., 2006; O'Connor et al., 2016; Tan et al., 2015).

Eine erhöhte TGF- $\beta$ 1 Expression sowie Defekte in der Signalweiterleitung wurden in der Mehrzahl an Tumoren wie Brust, Kolon, Ösophagus, Lunge, Magen, Leber, Lunge (Bierie et al., 2006) sowie in 80% aller HNSCC nachgewiesen (Lu et al., 2004) und korrelierte mit einer reduzierten Überlebenswahrscheinlichkeit und fortgeschrittenen Tumorstadien (Levy et al., 2006; Lu et al., 2004).

Die Daten legen TGF- $\beta$ 1 als potenten EMT Aktivator nahe. Modelle *in vitro* zeigen nach TGF- $\beta$ 1 Exposition jedoch eine sehr heterogen ausfallende EMT Antwort und widersprechen sich sogar zum Teil in ihrer Aussage über eine tumorfördernde oder tumorhemmende Eigenschaft (Heldin et al., 2012; Weeks et al., 2001). Als Beispiel zeigte sich in einem verwendeten Mausmodell in niedrigmalignen Tumorstadien ein Wachstumsarrest nach Stimulation mit TGF- $\beta$ 1, in hochmalignen Tumoren dagegen eine frühzeitige Metastasierung gegenüber nicht exponierten Tumoren (Heldin et al., 2012; Weeks et al., 2001). Andriani und Kollegen beobachteten in Subpopulationen von Lungentumorzellen unter TGF- $\beta$ 1 die ganze Spannbreite zwischen einem gänzlichen Fehlen einer EMT Antwort bis zu einer vollständigen Stimulation (Andriani et al., 2016). In HNSCC Zelllinien wurde unter EMT Faktoren ein variabel ausfallendes Invasionspotential beobachtet. Simon und Kollegen fanden bei Exposition mehrerer HNSCC Zelllinien mit EGF lediglich in der Zelllinie UM-SCC-1 eine Steigerung der Invasionsrate (Simon et al., 1998). UM-SCC-1 scheint ohnehin durch niedrige Level an Basalmembranproteinen mit einem hohen endogen invasivem Potential vergesellschaftet (Todorović et al., 2010). Die Heterogenität von HNSCC Zelllinien in ihrem Invasions- und Differenzierungsmuster ist bekannt und wurde unter anderem in Voruntersuchungen dieser Arbeitsgruppe dargestellt (Mandic et al., 2004). Es wurde ein Zusammenhang einer variierenden Aktivität EMT induzierender Faktoren, wie TGF- $\beta$ 1, in verschiedenen HNSCC Zelllinien und der beobachteten Heterogenität im Invasions- und Differenzierungsmuster vermutet.

#### **1.4 Zielsetzung der Arbeit**

Ziel dieser Arbeit ist es, mögliche Unterschiede in der Sensitivität etablierter HNSCC Zelllinien auf EMT induzierende Zytokine zu untersuchen und deren Hintergrund heraus zu arbeiten. Es werden dabei *in vitro* Beobachtungen an etablierten HNSCC Tumorzelllinien von unterschiedlichen histologischen Subtypen und epithelialen bzw. mesenchymalen Charakteristika durchgeführt. Diese können isoliert auf typische EMT Kennzeichen, wie E-Cadherin Lokalisation und Expression, Zell-Proliferation und Migration, sowie Bildung von *stress fibers* nach Exposition externer Stimuli untersucht werden. Hierbei wird sich insbesondere auf die variierend ausfallende Sensitivität der Zelllinien auf EMT Signale fokussiert, wobei auf Unterschiede in der EMT Antwort geachtet wird. Die so erhaltenen Daten können tiefere Einblicke in das klinisch häufig zu beobachtende unterschiedliche Invasions- und Metastasierungsverhalten von HNSCC Tumoren geben.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Technische Geräte

Analysenwaage Discovery	OHAUS Waagen Vertriebs GmbH, Gießen, Deutschland
Autoklav Autoclavi Spa	Fedegari GmbH, München, Deutschland
BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
BD LSR II	BD Biosciences, San Jose, USA
Blotkammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Eismaschine	Ziegra-Eismaschinen GmbH, Isernhagen, Deutschland
Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Gefrierschrank MF	Porkka Deutschland GmbH, Tornesch, Deutschland
Gefrierschrank	Liebherr, Bulle, Schweiz
Gelkammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Schüttelmaschine	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Deutschland
Heizblock HCL HBT 130	Otto E.Kobe KG, Marburg, Deutschland
Heraeus Biofuge Pico	DJB Labcare, Newport Pagnell, England
Heraeus Function Line Brutschrank	DJB Labcare, Newport Pagnell, England
Heraeus Megafuge 1.0R	DJB Labcare, Newport Pagnell, England
Kühlschrank MC	Porkka Deutschland GmbH, Tornesch, Deutschland
Laminarflow	DJB Labcare, Newport Pagnell, England
Leica TCS SP2	Leica Microsystems AG, Wetzlar, Deutschland
Laser Scanning Mikroskop	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Lichtmikroskop Telaval 31	Carl Zeiss AG, Feldbach, Schweiz
Magnetrührer Mini-MR 1	IKA GmbH & CO KG, Staufen, Deutschland
Magnetrührer CB161	Keison Products, Essex, England
Microzentrifuge 5415C	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Optimax Typ TR	MS-Laborgeräte GmbH, Dielheim, Deutschland
Plattformschüttler Duomax 1030	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Deutschland
Reinstwasseranlage Astacus	membraPure GmbH, Berlin, Deutschland
Sanyo Ultra Low Freezer	Panasonic Deutschland GmbH, Wiesbaden,
Schüttler	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Suspensionsmixer	Fröbel Labortechnik, Lindau, Deutschland
Tischzentrifuge	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Tprofessional, Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Unimax 1010	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland

Vakuumpumpe	Dräger, Lübeck, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Wasserbad	GFL mbH, Burgwedel, Deutschland
xCELLigence System	Roche, Mannheim, Deutschland
Zentrifuge Universal 30RF	Hettich GmbH & CO KG, Tuttlingen, Deutschland
Glaspipette 1 ml	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Glaspipette 2 ml	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Glaspipette 5 ml	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Glaspipette 10 ml	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Glaspipette 25 ml	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Labogaz 206 Bunsenbrenner	Camping Gaz GmbH, Hungen, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Karl Hecht GmbH, Sondheim/Rhön, Deutschland
Pasteurpipetten	HirschmannLaborgeräte GmbH, Eberstadt, Deutschland
Pipette (0,1-2 µl)	Gilson, Inc, Middleton, USA
Pipette (1-10 µl)	Gilson, Inc, Middleton, USA
Pipette (2-20 µl)	Gilson, Inc, Middleton, USA
Pipette (20-100 µl)	Gilson, Inc, Middleton, USA
Pipette (50-200 µl)	Gilson, Inc, Middleton, USA
Pipette (200-1000 µl)	Gilson, Inc, Middleton, USA
Pipettierhelfer Pipetus	Otto E. Kobe KG, Marburg, Deutschland

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

6-Well-Platte, steril	Sarstedt AG & CO, Nürnbrecht, Deutschland
Butan/Propan	Camping Gaz GmbH, Hungen, Deutschland
E-Plate (96 Well Platte)	Roche, Mannheim
Entsorgungsbeutel	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
FACS Röhrchen (75 x 12 mm)	Sarstedt AG & CO, Nürnbrecht, Deutschland
Falcon Röhrchen (15 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Falcon Röhrchen (50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Latex Handschuhe	Nobaglove, Wetter, Deutschland
Objektträger	Roth, Karlsruhe
Nitril Handschuhe	Nobaglove, Wetter, Deutschland
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, INC, Chicago, USA
Pipette (1 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipette (2 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipette (5 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipette (10 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

Pipette (25 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen (10 µl)	Gilson, Inc, Middleton, USA
Pipettenspitzen (200 µl)	Gilson, Inc, Middleton, USA
Pipettenspitzen (1000 µl)	Gilson, Inc, Middleton, USA
Protran Nitrocellulose Membran	Whatman GmbH, Dassel, Deutschland
Rasierklingen	Apollo Herkenrath GmbH. & Co. KG, Solingen
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Sarstedt AG & CO, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße (2,0 ml)	Sarstedt AG & CO, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturschale, steril (d = 6 cm)	Sarstedt AG & CO, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturschale, steril (d = 10 cm)	Sarstedt AG & CO, Nümbrecht, Deutschland
Terralin liquid	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
X-Ray Film	Agfa, Köln, Deutschland

### 2.1.3 Kulturmedien und Reagenzien für die Zellkultur

Amphotericin B	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
DMEM High Glucose (4,5 g/L)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Fetales Kälberserum Gold	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Gentamicin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland

### 2.1.4 Reagenzien

*Soweit nicht näher klassifiziert, entsprechen die Reagenzien pro analysi Qualität*

Acrylamid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Bio-Rad	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
BSA	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
4',6-Diamidino-2-phenylindole (Dapi)	Roche Diagnostics, Indianapolis, USA
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol	Mallinckrodt Baker, Griesheim, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Fluorescent Mounting Medium	Dako Cytomation, Carpinteria, Foster City, USA
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
<i>Laemmli Sample Buffer</i>	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA

Luminol Enhancer Solution	Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt, Deutschland
Nonidet P 40 (NP-40)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Peroxide Solution	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland
<i>Precision Plus Protein All Blue Standards</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Proteaseinhibitor	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Phosphataseinhibitor	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tris/Base	Acros Organics, New Jersey, USA
Tris/HCL	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

### 2.1.5 Puffer und Lösungen

#### Western Blot

##### Lysispuffer

Tris-HCL (pH 7,5)	20 mmol/l
NaCl	150 mmol/l
Glycerol	10%
Nonidet P 40	1%

##### Trenngel für Gelelektrophorese (10%)

N-Methylolacrylamid (37,5:1)	13,4 ml
H <sub>2</sub> O	15,8 ml
Tris-HCl 1,5 mol/l (pH 6,8)	10 ml
SDS	0,4 ml
APS	0,4 ml
TEMED	40 µl

##### Sammelgel für Gelelektrophorese (6%)

N-Methylolacrylamid	4,0 ml
H <sub>2</sub> O	10,8 ml
Tris 0,5 mol/l (pH 8,8)	5,0 ml
SDS	0,2 ml
APS	0,2 ml
TEMED	20 µl

10x Elektrophorese-Puffer für SDS-PAGE

Tris Base	60,4 g
Glycin	376,0 g
SDS	20,0 g
H <sub>2</sub> O	2 l

Transferpuffer Blotten (pH 8,5)

Tris Base	15,125 g
Glycin	75 g
Methanol	1 l

Block- und Waschpuffer

Magermilchpulver	3 g
PBS	100 ml

**Immunzytochemie**Inkubationspuffer

PBS	100 ml
BSA	3 g
NP-40	300 µl

**2.1.6 Antikörper**Primärantikörper für Western Blot und Immunfluoreszenz

Anti E-Cadherin (67A4, sc-21791 Mouse)	Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas, USA
p-Anti TGF-β RII (Tyr 424, sc-17007 Rabbit)	Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas, USA
Anti β-Tubulin (H-235, sc-9104 Rabbit)	Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas, USA
Anti-β-Actin (AC-74, A 5316 Mouse)	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA

Sekundärantikörper für Western Blot

Anti-Mouse IgG HRP (sc-2096)	Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas, USA
Anti-Rabbit IgG HRP (sc-2004)	Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas, USA

Sekundärantikörper Immunfluoreszenz

Anti-Mouse-IgG-R (sc-2300)	Santa Cruz Biotechnology, Inc, Dallas
----------------------------	---------------------------------------

Antikörper für Durchflusszytometrie

PE Mouse Isotype IgG1, κ Control MOPC-21	BD Bioscience, San Jose, USA
PE Mouse Anti-Human CD324 (E-Cadherin)-	BD Bioscience, San Jose, USA

67A4 Isotype IgG1,  $\kappa$

### 2.1.7 Zytokine

Transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)(Cat 240-B) R&D Systems Inc, Minneapolis, USA  
 Transforming growth factor- $\beta$ 2 (TGF- $\beta$ 2)(Cat 302-B2) R&D Systems Inc, Minneapolis, USA  
 Transforming growth factor- $\beta$ 3 (TGF- $\beta$ 3)(Cat 243-B3) R&D Systems, Inc, Minneapolis, USA  
 Hepatocyte growth factor (HGF)(H-1404) Sigma Aldrich, Saint Louis, USA

### 2.1.8 Software

RTCA Software 1.2.1.1002 ACEA Bioscience, San Diego, CA, USA  
 FACS-Analyse-Programm FlowJo v7.2.5. FlowJo LLC, Ashland, OR, USA  
 ImageJ 1.51f National Institut of Health, MD, USA

### 2.1.9 Zelllinien

Die UM-SCC-Zelllinien wurden freundlicherweise durch Prof. Dr. Thomas E. Carey (University of Michigan, MI, USA) zur Verfügung gestellt (Zhao et al., 2011). Als Kontrolle diente die von Keratinozyten stammende Zelllinie HaCaT (Boukamp et al., 1988), welche aus der Peripherie eines Melanoms am Rücken einer 62 jährigen Patienten entnommen und etabliert wurde.

**Tabelle 1. Verwendete HNSCC Zelllinien.** (Zhao et al., 2011)

Name	Lokalisation	Probenherkunft	TNM	Grading	Alter	Geschlecht
UM-SCC-1	Mundboden	Primärtumor	T2N0M0	G2	73	männlich
UM-SCC-3	Nasenscheidewand	Lymphknotenmetastase	T1N0M0	G1-G2	73	weiblich
UM-SCC-22B	Hypopharynx	Lymphknotenmetastase	T2N1M0	G2	58	weiblich

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Es wurden die immortalisierten HNSCC Zelllinien UM-SCC-1, UM-SCC-3, UM-SCC-22B und die Zelllinie HaCaT verwendet. Alle Arbeiten erfolgten zur Vermeidung von mikrobieller Verunreinigung unter sterilen Bedingungen. Zur Kultivierung wurden die kryogelagerten Zellen zunächst aus dem Flüssigstickstoff genommen und im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Nach Zentrifugation der Zellen und Entfernung des zugesetzten Gefrierschutzmittels DMSO (10%) wurden die Zellen unter Standardbedingungen in 10 cm Zellkulturschalen inkubiert (37 °C und 5% CO<sub>2</sub>).

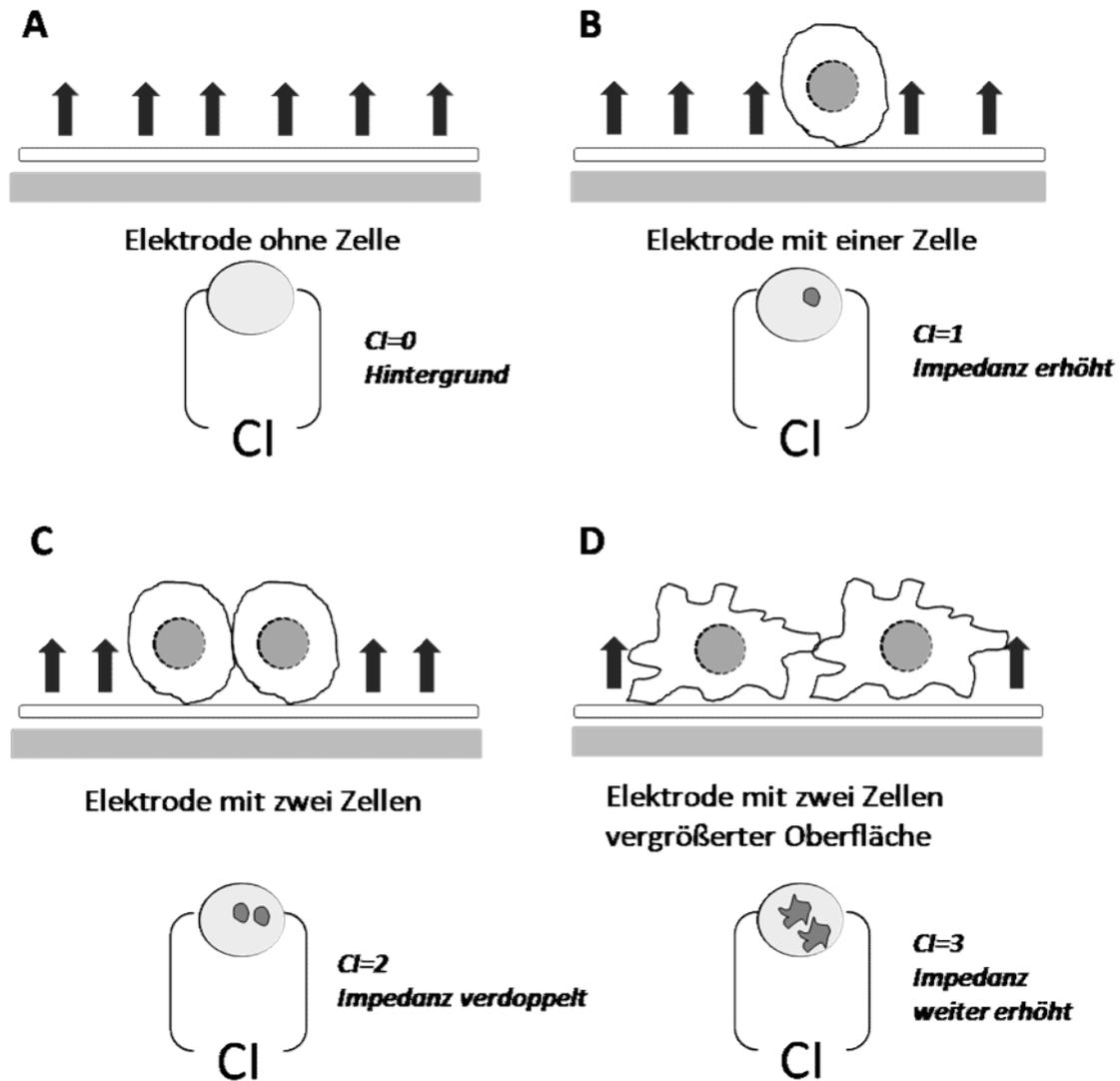
Als Nährmedium diente *Dulbecco's modified Eagle Medium* (DMEM), das mit 10% fetalem Kälberserum (FCS), 2 mM L-Glutamin, 50 µg/ml Gentamicin, 250 ng/ml Amphotericin B, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin versetzt wurde (DMEM+). Die Zellpassage erfolgte bei ca. 80-90% Konfluenz. Dafür wurde das Medium mittels Glaspipette abgesaugt und die Platte mit 2-5 ml PBS ausgewaschen. Nach Absaugen von überschüssigem Medium und PBS, wurden 2 ml von Trypsin/EDTA Lösung (0,025% Trypsin, 0,05% EDTA) zur enzymalen Ablösung des Zellrasens vom Plattenboden zugegeben. Da Trypsin seine optimale Enzymaktivität bei 37° entfaltet, wurden die Platten wieder für ca. 10 min im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Platten leicht beklopft, um eventuell verbliebene adhärenente Zellen mechanisch vom Boden zu lösen. Die Enzymaktivität wurde nun mit Zugabe von DMEM+ gestoppt und die Zellsuspension mittels Glaspipette in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Durch Zentrifugation bei 300 g wurden die Zellen vom Überstand getrennt. Nach Absaugen des Überstands wurde das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und auf drei neue Zellkulturschalen verteilt. Nach Zugabe von 10 ml DMEM+ erfolgte die weitere Inkubation.

### **2.2.2 Zellgewinnung und Zellzahlbestimmung**

Für die Versuche wurden Zelllinien verwendet, nachdem diese in der Kultur 80-90% Konfluenz erreicht hatten. Die Zellen wurden zunächst wie oben beschrieben abgelöst und gerettet. Zur Zell-Zahlbestimmung wurde eine Neubauer Zählkammer eingesetzt. Hierfür wurden 10 µl der Zellsuspension zwischen Deckgläschen und Kammer pipettiert und Zellen aus mindestens drei Großquadraten ausgezählt. Die gemittelte Zell-Zahl multipliziert mit  $10 \times 10^3$  entspricht der Zell-Zahl pro ml.

### **2.2.3 Real Time Cellular Analysis (RTCA)**

Um Veränderungen in der Zellmorphologie und Zellproliferation durch EMT wirksame Zytokine in HNSCC Zelllinien zu untersuchen, wurde das xCELLigence System eingesetzt. Adhäsive Zellen interagieren bei Bodenkontakt mit Elektroden, die Teil einer speziellen goldbeschichteten 96-Well Platte (E-Plate 96) sind und bewirken einen messbaren Impedanzanstieg, welcher im Abstand von 15 min gemessen wird. Ein Anstieg der Impedanz wird von der interagierenden Flächengröße abhängig von Zellzahl, Adhäsion und Zellgröße, bestimmt (Abbildung 5). Die Impedanz wird mit dem dimensionslosen Parameter *Cell Index* (CI) bezeichnet. Der CI ist zu jedem Zeitpunkt definiert als  $(R_n - R_b) / (15 \Omega)$ , wobei  $R_n$  die Impedanz wiedergibt, wenn im Well Zellen vorhanden sind und  $R_b$  die Impedanz darstellt, wenn lediglich zellfreies Medium enthalten ist. Die größer werdenden CI-Werte werden mit einem xCELLigence systemgekoppelten Monitor in Echtzeit dokumentiert.



**Abbildung 5. Schematische Darstellung der Funktionsweise einer E-Plate 96.** (A) E-Plate ohne Zellen, der Cell Index (CI) ist Null. (B) Erhöhung des CI bei einer Zelle auf dem Boden der E-Plate. (C) Verdopplung des CI unter zweifacher Impedanzerhöhung durch den Bodenkontakt mit zwei Zellen. (D) Weitere Erhöhung des CI durch Veränderung der Zelloberfläche (Modifiziert nach ACEA Biosciences, RTCA MP Instrument Operator's Manual, Version Oktober 2017, Seite 14 Abbildung 1).

Zum xCELLigence System gehören:

- Real-time cellular analysis (RTCA) Analyzer
- RTCA SP Station
- RTCA Control Unit
- E-Plate 96

Alle RTCA Messungen wurden im Institut für chirurgische Forschung in freundlicher Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. P. Di Fazio durchgeführt. Zunächst erfolgte die Inkubation der Zelllinie UM-SCC-3 mit den Zytokinen TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3 oder HGF.

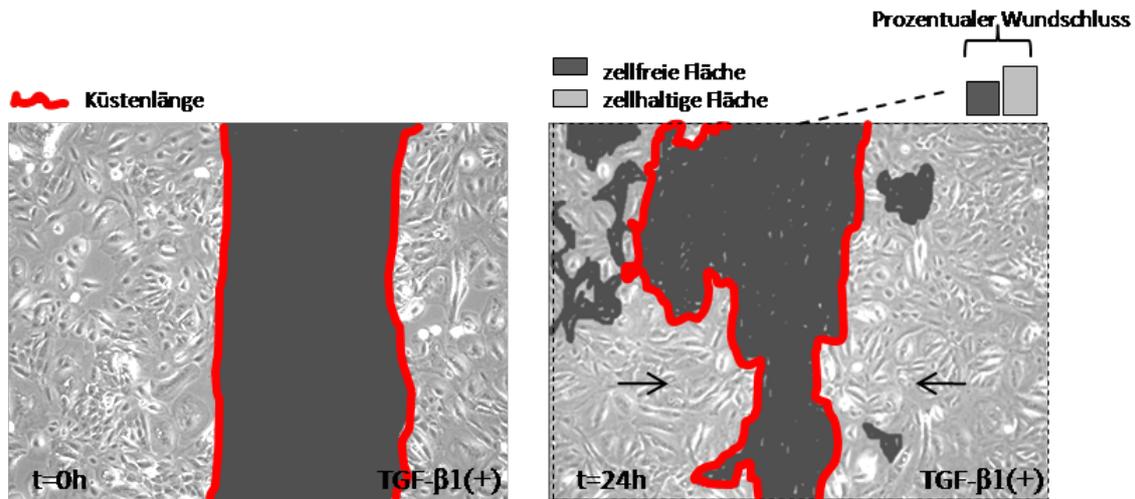
Hierfür wurden die Zellen als Triplikate in einer Menge von  $5 \times 10^3$ /Well in 50  $\mu$ l Medium in einer zuvor mit 100  $\mu$ l DMEM befüllten 96-Well E-Platte ausgesät und in den Inkubator gestellt. Nach Erreichen eines Zell Index von mindestens 1 (in der Regel nach 24 h), erfolgte die Zugabe der Zytokine. Dafür wurde die E-Plate aus dem Inkubator genommen und unter sterilen Bedingungen mit weiteren 50  $\mu$ l DMEM/Well, welche das entsprechende Zytokin enthielten, versetzt, sodass jedes Well ein Endvolumen von 200  $\mu$ l aufwies. Die Zytokine wurden zuvor jeweils in Triplikaten in einer aufsteigenden Dosierung von 1:10 verdünnt (Tabelle 2). Anschließend erfolgte die weitere Inkubation der E-Platte sowie die Aufzeichnung (15 min Abstände) des Wachstumsverhaltens der Zelllinie bis zum Überschreiten der maximalen Konfluenz (zumeist 4 bis 5 Tage). Der Zugabezeitpunkt wurde auf Null gesetzt und der Zell Index normalisiert. Im zweiten Versuchsabschnitt wurden die Zelllinien UM-SCC-1 ( $5 \times 10^3$ /Well), UM-SCC-3 ( $5 \times 10^3$ /Well), UM-SCC-22B ( $20 \times 10^3$ /Well) und HaCaT ( $5 \times 10^3$ /Well) als Triplikate in 50  $\mu$ l Medium einer zuvor mit 100  $\mu$ l DMEM/Well befüllten E-Plate ausgesät und der Zell Index in 15 minütigen Abständen für mindestens 120 Stunden aufgezeichnet und das für jede Zelllinie typische Wachstumsmuster ausgewertet. In einem weiteren Versuchsdurchlauf erfolgte bei gleicher Vorgehensweise nach 24 Stunden die Zugabe von TGF- $\beta$ 1 in 50  $\mu$ l Nährmedium mit einer finalen Konzentration von 10 ng/ml. Als Kontrolle diente die Trägersubstanz (Vehikel) von TGF- $\beta$ 1 (4 mmol/l HCl). Der Zell Index wurde zum Zeitpunkt der Zugabe von TGF- $\beta$ 1 normalisiert (Normalisierter Zell Index (NZI)) und das Wachstumsverhalten der Zelllinien für mindestens 96 Stunden aufgezeichnet. Die Auswertung erfolgte mit der RTCA Software 1.2.1.1002 (Firma ACEA Bioscience, San Diego, CA, USA).

**Tabelle 2. Konzentration der im RTCA eingesetzten Zytokine**

Verdünnung	TGF- $\beta$ 1	TGF- $\beta$ 2	TGF- $\beta$ 3	HGF
1:1	(20 ng/ml)	(20 ng/ml)	(20 ng/ml)	(100 ng/ml)
1:10	(2 ng/ml)	(2 ng/ml)	(2 ng/ml)	(10 ng/ml)
1:100	(0,2 ng/ml)	(0,2 ng/ml)	(0,2 ng/ml)	(1 ng/ml)
1:1000	(0,02 ng/ml)	(0,02 ng/ml)	(0,02 ng/ml)	(0,1 ng/ml)
-	(0 ng/ml)	(0 ng/ml)	(0 ng/ml)	(0 ng/ml)

#### 2.2.4 “*In vitro scratch wound assay*” Analyse

Zur Beurteilung der Migrationseigenschaften der Zelllinien nach Inkubation mit TGF- $\beta$ 1 wurde ein sogenannter *in vitro scratch wound assay* durchgeführt. Hierbei wird eine Wunde simuliert, indem eine Pipettenspitze durch einen konfluent wachsenden Zellrasen „kratzt“ wonach das Einwachsen bzw. die Migration der Zellen in den freien Bereich mikroskopisch detektiert und photographisch festgehalten wird. Jede Zelllinie wurde jeweils auf zwei Schalen ausgesät (HaCaT, UM-SCC-1 und UM-SCC-3  $200 \times 10^3$ /Well und UM-SCC-22B  $300 \times 10^3$ /Well) und für 24 h inkubiert.



**Abbildung 6. in vitro scratch wound assay.** Dargestellt ist eine mikroskopische Aufnahme von HaCaT Zellen, welche Konfluenz erreicht haben und 24 h mit TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml) inkubiert wurden. Der linke Teil der Abbildung zeigt einen frischen „scratch“ durch den Zellrasen (Zeitpunkt  $t=0$  h). Rechts abgebildet ist derselbe Bildabschnitt 24 Stunden später (schwarze Pfeile geben die Wachstumsrichtung an). Prozentualer Wundschluss: Im gesamten Bildausschnitt wird das Verhältnis der zellhaltigen (hellen) Fläche und zellfreien (dunkle) Fläche mittels ImageJ Software zu den Versuchszeiten  $t=0$  gemessen und mit  $t=24$  h verglichen. Die rote Markierung zeigt dabei die Grenze von zellhaltiger und zellfreier Fläche, welche mittels ImageJ Software quantifiziert und in dem dimensionslosen Parameter ‚Relative Küstenlänge‘ wiedergegeben wird. Der Verlauf der Küstenlänge verändert sich in Abhängigkeit der Zellformation an den Zellgrenzen. 24 h nach dem „scratch“ ist nach Exposition von TGF- $\beta$ 1 eine Migration der Zellen in den zellfreien Bereich erkennbar, wobei sich die Küstenlänge vergrößert.

Hiernach erfolgte ein Mediumwechsel und die Zugabe von 1,5  $\mu$ l TGF- $\beta$ 1 (finale Konzentration 10 ng/ml) bzw. 1,5  $\mu$ l Trägersubstanz (4 mmol/l HCl) als Kontrolle. Die Inkubation wurde für 24 h fortgesetzt. Nach Erreichen der Konfluenz wurde mittels einer 1000  $\mu$ l Pipettenspitze ein Kratzer quer durch den bewachsenen Zellrasen gezogen. Bei den Wiederholungen des Versuchs wurde auf einen gleich breit ausfallenden „scratch“ geachtet. Mit dem Mikroskop wurde eine geeignete Stelle zur fortlaufenden Beobachtung ermittelt und durch einen Marker am Boden der Platte zum Wiederauffinden beschriftet. Zur Beurteilung der Migration in das zellfreie Areal wurde die Inkubation fortgeführt und die markierte Stelle nach 24 h fotografiert und als TIFF Grafik gespeichert. Da bereits geringfügige Verschiebungen des Bildausschnitts die Parameter maßgeblich verändern, war eine exakte Einstellung des initialen Messfensters notwendig. Vor der Auswertung wurde die Bildgröße normiert. Die Auswertung erfolgte mittels der ImageJ Software (National Institut of Health, MD, USA; Schneider et al., 2012). Die Migrationsrate wird üblicherweise beurteilt, indem die Breite des „scratch“ unter Verwendung einer Maßstabsleiste zu den definierten Versuchszeiten gemessen wird (mehrere Abstände des „scratch“ in einem Bildausschnitt werden gemessen und der Mittelwert gebildet). Die Zellgrenze muss dabei möglichst gerade sein. Aufgrund der sich bei einer Migration bildenden Zellformation, wird jedoch häufig eine sehr heterogene Zellgrenze beobachtet (Omelchenko et al., 2003).

Darüber hinaus kann das Ergebnis in dem gewählten Zeitfenster von 24 h durch eine Proliferation, welche in Tumorzellen durch die häufig fehlende Kontaktinhibition verstärkt vorliegen kann, signifikant beeinflusst werden. Zur Differenzierung zwischen einem durch Proliferation getriggerten Überwachsen des zellfreien Areals und einer Migration wurden daher zwei Werte herangezogen, welche als „prozentualer Wundschluss“ und „Küstenlänge“ bezeichnet wurden (in freundlicher Zusammenarbeit mit Herrn apl. Prof. M. Buchholz). Dafür wurde der Bildausschnitt auf den prozentualen Anteil zellfreier und zellhaltiger Areale unterteilt (der prozentuale Wundschluss), und zum anderen die vertikal verlaufende Strecke an der Grenze zum zellfreien Areal gemessen (Küstenlänge). Die mittels ImageJ ermittelte einheitslose Küstenlänge (1:1 Skalierung der x-/y-Achse) zum Zeitpunkt  $t=0$  h diente als Ausgangswert. Bei einer Migration kommt es aufgrund der Auflockerung des Zellverbands zu einer verlängerten Wegstrecke und die „Küstenlänge“ wird größer (Murrell et al., 2011). Ein durch Proliferation verursachtes Überwachsen führt hingegen zu keiner Veränderung der Strecke, da die gegenüber liegenden Zellfronten aufeinander zu wachsen (Abbildung 6).

### 2.2.5 Analyse der Proteinexpression

Die Expression des phosphorylierten TGF- $\beta$  Rezeptor RII (Tyr 424), E-Cadherin und  $\beta$ -Aktin wurde in den Zelllinien HaCaT, UMSCC-1, UM-SCC-3 und UM-SCC-22B nach Zugabe von exogenem TGF- $\beta$ 1 zu definierten Inkubationszeiten untersucht (Tabelle 3). Als Ladungskontrolle diente  $\beta$ -Tubulin. Hierfür wurde eine definierte Zellzahl jeder Zelllinie auf acht Zellkulturschalen (6 cm) ausgesät und beschriftet. Um zu gewährleisten, dass zum Zeitpunkt der Proteinernte genug Material vorhanden ist, wurden die Zelllinien aufgrund ihrer erfahrungsgemäß unterschiedlichen Zellteilungsrate folgendermaßen ausgesät HaCaT $>500 \times 10^3$ /Well, UM-SCC-1 $>500 \times 10^3$ /Well, UM-SCC-3 $>500 \times 10^3$ /Well und UM-SCC-22B $>600 \times 10^3$ /Well und unter Standardbedingungen (5% CO<sub>2</sub> bei 37 °C) für 24 Stunden kultiviert. Am darauffolgenden Tag erfolgte ein vollständiger Mediumwechsel und in die mit  $t=72$  h Stunden markierten Schalen wurde TGF- $\beta$ 1 in einer Endkonzentration von 10 ng/ml zugegeben. Als Kontrolle diente die Trägersubstanz von TGF- $\beta$ 1 (4 mmol/l HCL), welche in gleicher Menge (1,5  $\mu$ l) in die entsprechende Kontrollschale pipettiert wurde. Nach Schwenken der Platte zur Mischung wurde die Inkubation fortgesetzt. Am nachfolgenden Tag wurden die mit  $t=48$  h markierten Schalen entsprechend entweder mit 1,5  $\mu$ l TGF- $\beta$ 1 oder mit der Kontrollsubstanz versetzt. Nach weiteren 24 h erfolgte die gleiche Behandlung der mit  $t=24$  h markierten Wells und 24 Stunden später die Zugabe in die mit  $t=0$  h markierten Schalen und die sofortige Beendigung des Versuchs.

**Tabelle 3. TGF- $\beta$ 1 Inkubation Schema**

Zeit (h)	72	72	48	48	24	24	0	0
TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml)	+	-	+	-	+	-	-	-
Kontrolle (4 mmol/l HCl)	-	+	-	+	-	+	-	+
Proben Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8

### 2.2.5.1 Proteinextraktion

Zum sofortigen Reaktionsstopp und zur Gewinnung des Zelllysats, wurde das Nährmedium entfernt, der Zellrasen mit 1 ml PBS gespült und anschließend mit 100  $\mu$ l Protein Lysepuffer (20 mmol/l Tris/HCl pH 7,5, 137 mmol/l NaCl, 10% Glycerol, 1% NP40 und 2 mmol/l EDTA, mit 100  $\mu$ l/ml Proteaseinhibitor Cocktail 1 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) und 50  $\mu$ l/ml Phosphataseinhibitor Cocktail 2 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA)) versetzt. Die Auflösung der Zellmembran mittels Lysepuffer ist notwendig, um Proteine freizusetzen, die im weiteren Verfahren gemessen werden sollen.

Phosphatase- und Protease-Inhibitoren verhindern eine weiter voranschreitende Degradierung und Dephosphorylierung, welche das Ergebnis beeinflussen würden. Die Ablösung der Zellen erfolgte mechanisch mittels eines Zell-Schabers. Um eine ausreichende Durchmischung der Substanzen zu gewährleisten, wurde das Lysat in ein Reaktionsgefäß überführt und für 30 min bei 4 °C auf einem Suspensionsmischer durchgerührt und anschließend für 10 min bei 10.000 g zentrifugiert. Der Überstand mit den enthaltenen Proteinen wurde in ein weiteres Eppendorf Gefäß überführt. Nun erfolgte die quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Photometrie nach der Bradford Methode, wonach die Zell Lysate zur Lagerung bei -80 °C eingelagert wurden.

### 2.2.5.2 Messung der Proteinkonzentration nach der Bradford Methode

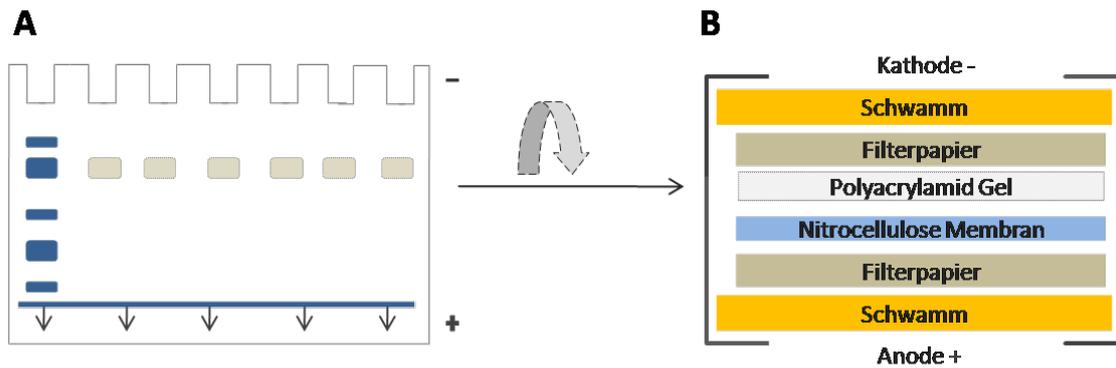
Zur Vergleichbarkeit der Proteinmengen erfolgte eine Konzentrationsbestimmung der Proteine in Gesamt Zelllysaten der jeweiligen Zelllinien. Hierfür wurde die Methode nach Bradford eingesetzt, wonach Proteine konzentrationsabhängig einen Farbstoff binden. Die proportionale Farbveränderung und damit Änderung der Absorption wird mittels eines Photometers bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Zur Proteinbestimmung wurde das *Bio-Rad Protein-Assay Dye Reagent Concentrate* (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) entsprechend der Herstellerangaben eingesetzt. BSA diente als Standard zur Herstellung einer Proteinstandardkurve (Tabelle 4).

**Tabelle 4. Pipettierschema für die Erstellung einer Proteinstandardkurve**

	Leerwert	Standard 1:2	Standard 1:4	Standard 1:6	Standard 1:8	Standard 1:10	Probe
<b>Bio Rad 1:5</b>	1 ml	1 ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1 ml
<b>BSA</b>	-	1µl	2µl	3µl	4µl	5µl	-
<b>Lysispuffer</b>	3µl	3µl	3µl	3µl	3 µl	3µl	-
<b>Probenextrakt</b>	-	-	-	-	-	-	3µl

### 2.2.5.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Nach Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte mittels SDS-PAGE in einem elektrischen Feld die Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Molekülmasse. Durch Zugabe des Detergenz SDS werden die Proteine zunächst einheitlich negativ geladen, damit die Auftrennung nicht von unterschiedlichen Ladungen beeinflusst wird, sondern lediglich von der Größe des Proteins abhängig ist. Der im Ladepuffer enthaltene Farbstoff Bromphenolblau (Molekulargewicht=0,67 kDa), macht die Lauffront der Proteine sichtbar. Nun werden die Proteine in ein zuvor polymerisiertes SDS-Polyacrylamid Gel aufgetragen und an ein elektrisches Feld angeschlossen. Die Proteine wandern aufgrund ihrer Negativladung durch das Gel Richtung Anode. Das Gel wirkt dabei wie ein Sieb, bei dem kleinere Proteine schneller wandern, große Proteine hingegen, abhängig von ihrem Molekulargewicht, langsamer (Abbildung 7A). In dieser Arbeit wurde ein diskontinuierliches Gel verwendet, bestehend aus einem Sammel- und Trenngel. Im Sammelgel liegt ein pH-Wert von 6,8 zur Konzentrierung der Proteinproben und im Trenngel ein basischer pH-Wert von 8,8 vor, was einen Stapelungseffekt der Proteine an der Grenze beider Gelbereiche bewirkt. Als Elektrolyt diente ein Tris/Glycin-SDS-Gemisch. Für die Herstellung des Gels wurde zunächst das Trenngel erstellt, das zur Glättung der Oberfläche mit Isopropanol bedeckt und bis zur Aushärtung (Polymerisierung) des Gels so belassen wurde. Nach Abschluss der Polymerisierung wurde das Isopropanol entfernt und mit der Sammelgel-Lösung übergossen. Die Kämme für die Geltaschen wurden in dem noch flüssigen Sammelgel platziert und bis zum Abschluss der Polymerisation dort belassen. Im Anschluss wurden die Kämme entfernt und das Proteingemisch (enthält jeweils 35 µg Protein) 1:1 mit *2x Laemmli Sample Buffer* vermischt und nach einer Inkubationszeit von mindestens 5 min in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese Kammer wurde mit Puffer (25 mmol/l Tris/Base, 250 mmol/l Glycin und 3,5 mmol/l SDS) aufgefüllt. Als Proteingrößen Standard wurden 3 µl des *Precision Plus Protein all Blue Standard Bio Rad* (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) eingesetzt. Bei zunächst 75 Volt kam es zu einer Konzentrierung der Proteinproben im Sammelgel. Nach ca. 15 min wurde die elektrische Spannung auf 100 Volt erhöht. Die Auftrennung der Proteine wurde beendet, wenn die Lauffront den unteren Rand des Gels erreichte.



**Abbildung 7. SDS-PAGE und Proteintransfer.** (A) Schematische Darstellung der Proteinseparation im SDS Page. Die Proteine werden im elektrischen Feld ihrer Größe nach aufgetrennt, wobei kleine Proteine weiter in Richtung Anode wandern als große Proteine. Durch Bromophenolblau (im Ladepuffer) wird die Lauffront der Proteine sichtbar (blaue Linie). Die Pfeile geben die Laufrichtung der Proteine im Gel an. Nach Auftrennung der Proteine im Gel erfolgt der horizontale Transfer auf eine Nitrocellulose Membran. (B) Schichtung der Materialien während der Transfers.

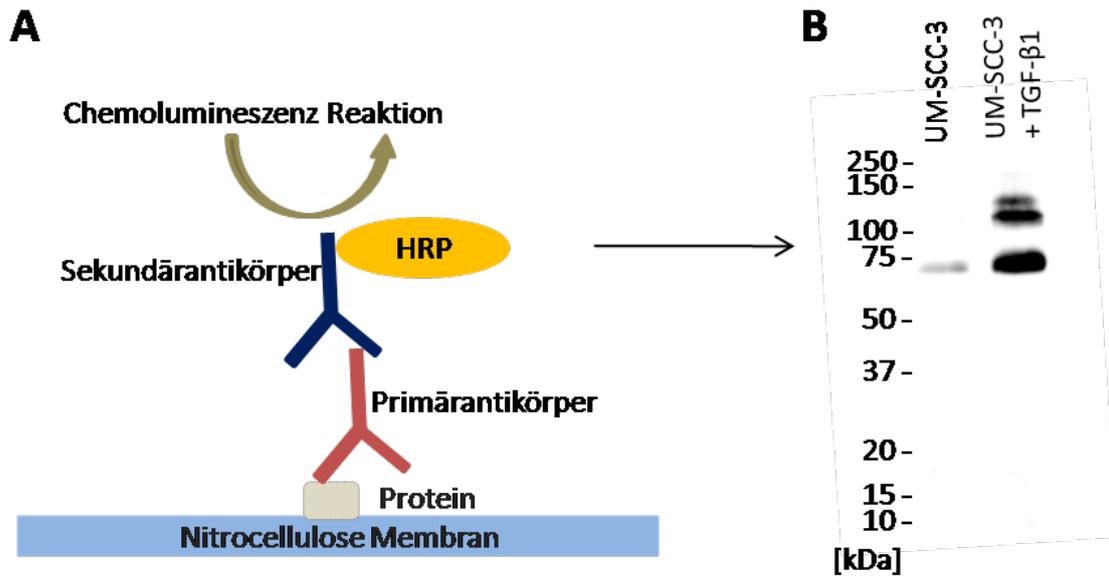
#### 2.2.5.4 Western Blot Transfer

Das Blot Verfahren dient dazu, die mittels SDS-PAGE entsprechend ihrer Größe aufgetrennten Proteine vom Gel auf eine Nitrocellulose-Membran zu transferieren, wo sie dauerhaft fixiert werden können.

Dazu wird ein elektrisches Feld angelegt, in dem die Proteine aus dem Gel auf die Nitrocellulose Membran wandern und dort fixiert werden. Zunächst werden alle Materialien in Transferpuffer getränkt, wobei sichergestellt wird, dass die flankierenden Halterungen vollständig luftblasenfrei sind. Es erfolgte eine Positionierung der Materialien wie in Abbildung 7B dargestellt. Wichtig dabei ist, dass gemäß der Wanderungsrichtung der Proteine die Nitrocellulose Membran zwischen Gel und Anode platziert wird. Das elektrische Feld wird nun senkrecht zu Membran und Gel angelegt. Die Blot-Kammer wird mit Transferpuffer (25 mmol/l Tris/Base, 200 mmol/l Glycin, 20% Methanol) aufgefüllt und eine Eistasche zur Kühlung des Puffers eingesetzt. Zusätzlich wird ein Stabrührer in der Kammer positioniert und diese auf einem Magnetrührer platziert. Eis und Stabrührer sollen während des Transfervorgangs die entstehende Wärme reduzieren und gleichmäßig verteilen. Der Transfer wird für 45 min bei 100 Volt durchgeführt. Im Anschluss wird die Membran zur Kontrolle eines erfolgten Transfers mit Ponceau S inkubiert, was eine reversible Anfärbung der gesamten, auf der Membran fixierten Proteine, erlaubt.

### 2.2.5.5 Immundetektion

Um interessierende Proteinbanden sichtbar zu machen, werden Primärantikörper verwendet, die spezifisch für das zu untersuchende Protein sind. Damit die Position der gebundenen Antikörper für das Auge erkennbar wird, folgt eine Inkubation mit einem zweiten Antikörper, der an den ersten Antikörper bindet und mit einer Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt ist. Die HRP katalysiert eine chemische Reaktion, bei welcher durch Zugabe von Luminol und Wasserstoffperoxid Licht emittiert wird (Abbildung 8A). Diese Reaktion wird mittels Röntgen Film detektiert. Die auf dem Film sichtbare Lichtreaktion entspricht dabei der Proteinposition auf der Membran. Um eine unspezifische Bindung des Primärantikörpers zu verhindern, wird die Membran zuvor für mindestens 20 min mit einer Magermilchpulver-Lösung inkubiert. Durch diese Behandlung werden freie unspezifische Proteinbindungsstellen blockiert. Durch Auswaschen mit PBS wird überschüssiges Detergenz entfernt und der Primärantikörper in einem PBS Puffer (3% Milchpulver) aufgetragen und über Nacht bei 4 °C zur Inkubation auf einem Schwenkbrett belassen. Nach Entfernung der Primärantikörper-Lösung nach ca. 24 Stunden wird durch zweimaliges Waschen in PBS ungebundener Antikörper entfernt und der zweite Antikörper mit der gekoppelten Meerrettichperoxidase (1:2.000) in PBS Puffer (3% Milchpulver) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Sekundärantikörper-Lösung wird anschließend entfernt und die Membran weitere zweimal mit PBS gewaschen. Nach Entfernung von PBS wird 1 ml einer 1:1 Mischung von Luminol und Peroxidase auf die Membran aufgetragen und für 1 Minute geschwenkt, sodass die Membran von der Lösung vollständig bedeckt ist. Im Anschluss wird die Membran mit einer flachen Pinzette aus der Glasküvette geholt, zum Abtropfen der überschüssigen Lösung einige Sekunden gehalten, wonach sie in eine Filmkassette gelegt wird. Zur Aufnahme der Chemolumineszenz-Reaktion wird ein Röntgen Film auf die Membran in der Filmkassette gelegt und exponiert mit nachfolgender Filmentwicklung mittels Optimax Typ TR. Ein Beispiel eines Western Blot Ergebnisses ist in Abbildung 8B dargestellt.



**Abbildung 8. Immundetektion und Visualisierung des Proteins.** (A) Der spezifische Primärantikörper bindet das auf der Membran fixierte Protein. Ein unspezifischer Sekundärantikörper, an welchem eine Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt ist, bindet den Primärantikörper. Nach der Bindung wird eine Chemolumineszenz Reaktion in Gang gesetzt. Das emittierte Licht schwärzt einen Röntgenfilm. (B) Beispiel eines fertigen Western Blot Ergebnisses. Das Protein TGF- $\beta$  RII Phospho (70 kDa) in der Zelllinie UM-SCC-3 nach 24 h Inkubation ohne und mit 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1.

### 2.2.6 Durchflusszytometrie

Mittels FACS-Analyse wurde die Expression des Proteins E-Cadherin in den Zelllinien HaCaT, UM-SCC-1, UM-SCC-3 und UM-SCC-22B nach Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 beurteilt. Abhängig von der Menge an E-Cadherin in der einzelnen Zelle stellt diese Methode einen direkten Zusammenhang zwischen Fluoreszenzintensität und Proteingehalt der fixierten Zellen her. Da der Gesamtgehalt des Proteins zu beurteilen war, konnte dies an Ethanol fixierten Zellen untersucht werden. Das Wachstum der Zellen erfolgte bis eine Konfluenz von ca. 80% erreicht wurde. Hiervon wurden insgesamt  $150 \times 10^3$  Zellen in jedes Well einer 6-Well Schale aufgetragen. Zytokinkonzentration (10 ng/ml) und Inkubationszeit (Zeit=h) entsprechen der Darstellung in Tabelle 3 (siehe auch Kapitel 2.2.5). Zur Zellgewinnung wurden die Zellen mittels Trypsin vom Boden der Zellkulturschale gelöst und in einem Falconröhrchen für 10 min bei 350 g zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurde das Zellpellet in 500  $\mu$ l kaltem PBS resuspendiert und unter ständigem vortexen in 4,5 ml kaltem (-20 °C) Ethanol (70%) fixiert. Vor der sich anschließenden FACS Messung wurde das zugeführte Ethanol entfernt. Hierfür wurden die Zellen zentrifugiert und der Ethanol Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde in 500  $\mu$ l PBS resuspendiert, wonach zur restlichen Auswaschung des Ethanols der Waschvorgang einmal wiederholt wurde.

Zur Entfernung von Zellklumpen, welche insbesondere bei der Erstellung von HaCaT und UM-SCC-3 Proben entstanden, wurden die Proben mit einem 50  $\mu$ m Filter filtriert.

Anschließend erfolgte eine Aufteilung der Probe (250 µl PBS/Zell-Suspension pro FACS-Röhrchen). Ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin (PE) gekoppelter E-Cadherin-Antikörper (PE Mouse Anti-Human CD324 (E-Cadherin)-67A4 Isotype IgG1, κ) wurde in einer Verdünnung von 1:100 (in 250 µl PBS) eingesetzt. Als Isotyp Kontrolle diente PE Mouse Isotype IgG1, κ Control, welches in gleicher Menge in 250 µl PBS zugegeben wurde. Final befanden sich in jeder Probe 500 µl der PBS/Zellsuspension. Die Röhrchen wurden für eine Stunde im Dunkeln inkubiert und im Abstand von 5 min geschüttelt, um ein Absetzen der Zellen am Röhrchenboden und damit einhergehende ungleichmäßige Anfärbungen zu verhindern. Daraufhin folgte zur Auswaschung von überschüssigem nicht gebundenem Antikörper eine Zentrifugation bei 350 g und nach Entfernung des Überstands eine Resuspendierung des Zellpellets in 500 µl PBS. Die Röhrchen wurden abgedunkelt, auf Eis gelagert und bis zum Zeitpunkt der Messung dort belassen. Die FACS-Messungen erfolgten in der FACS Core Facility der Klinik für Hämatologie und Onkologie (Leiterin PD Dr. med. C. Brendel), in freundlicher Zusammenarbeit mit Herrn Gavin Giel, am LSR II-Durchflusszytometer (Firma BD Bioscience). Vor Messung der einzelnen Proben, wurde jedes Röhrchen gevortext und anschließend am Vakuumseptum des LSR II fixiert. Zur Messung wurden die für den PE Farbstoff zugehörigen Exzitations- und Detektions-Wellenlängenkanäle am LSR II eingestellt. Es wurden 20.000 Zellen pro Probe detektiert. Die Datenauswertung erfolgte mit dem FACS-Analyse-Programm FlowJo v7.2.5 (FlowJo LLC, Ashland, OR, USA). Anhand der Einstellung des Messfensters konnten mögliche Zelldupletten ausgeschlossen werden. Der prozentuale Anteil des Proteins wurde als relatives geometrisches Mittel der Fluoreszenzintensität (*geometric mean fluorescence* (GMF)) dargestellt.

### 2.2.7 Immunzytochemie

Um den Einfluss von exogen zugeführtem TGF-β1 auf die subzelluläre Lokalisation von E-Cadherin und β-Aktin in den Zelllinien HaCaT, UM-SCC-1, UM-SCC-3 und UM-SCC-22B zu beurteilen, wurden immunzytochemische Untersuchungen durchgeführt.

Durch das Verfahren der Immunzytochemie kann die subzelluläre Lokalisation von Proteinen spezifisch innerhalb einer Zelle sichtbar gemacht werden. Das Prinzip beruht auf einer Antigen-Antikörper-Bindung die mittels eines an den Sekundärantikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffes sichtbar gemacht werden kann. Zur besseren Beurteilung der Einzelzellmorphologie wurde eine Konfluenz der Zellen von ca. 30% angestrebt. Hierfür wurden die Zellen in einer Menge von  $20 \times 10^3$ /Well (HaCaT, UM-SCC-3 und UM-SCC-22B) bzw.  $10 \times 10^3$ /Well (UM-SCC-1) in 2 ml DMEM (6-Well Platte) kultiviert.

Zuvor wurde ein mittels einer Flamme hitzesterilisiertes Deckgläschen (10x10 mm) in jedes Well der 6-Well Schale gelegt. So konnten die Zellen Deckgläschen und Well-Boden bewachsen.

Nach 24 Stunden wurde das Nährmedium abgesaugt und 2 ml frisches Medium hinzu pipettiert. Dann wurde 1,0 µl TGF-β1 (finale Konzentration 10 ng/ml) bzw. die gleiche Menge an Trägerlösung (4 mmol/l HCl) als Kontrolle in die dafür markierte Schale pipettiert. Es erfolgte eine Inkubation für 72 Stunden im Brutschrank (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 100% Luftfeuchtigkeit). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt und die Zellen 3x5 min mit eiskaltem PBS/MgCl<sub>2</sub> gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in kaltem Methanol für 5 min fixiert. Es folgte ein weiterer Waschgang für 2x5 min in PBS. Nun wurden die Zellen zur Erhöhung der Zell-Permeabilität und zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen in einer Pufferlösung mit 3% BSA/0.3% NP40/PBS für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin erfolgte die Inkubation über Nacht mit dem Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:50 in 500 µl (E-Cadherin) bzw. die Inkubation für 1 Stunde in der Verdünnung von 1:500 (β-Aktin) in BSA/NP40/PBS-Pufferlösung. Die Inkubation erfolgte dabei auf einem Schwenkbrett bei 4 °C. Überschüssiger Primärantikörper wurde mit der beschriebenen Pufferlösung ausgewaschen wonach eine Inkubation mit einem an Rhodamin gekoppelten Sekundärantikörper in der Verdünnung 1:50 (in 500 µl BSA/NP40/PBS) (E-Cadherin) bzw. 1:500 (β-Aktin) für 1 Stunde bei Raumtemperatur erfolgte. Da der Sekundärantikörper mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt ist, erfolgte die Inkubation und weitere Arbeitsschritte unter Abdunkelung. Die Zellen wurden 3x5 min in der beschriebenen Pufferlösung, dann 3x5 min mit PBS, dann 3x5 min in H<sub>2</sub>O gewaschen. Zur Anfärbung des Zellkerns wurden die Zellen für weitere 10 min mit dem Farbstoff DAPI inkubiert und nochmals in H<sub>2</sub>O gewaschen. Die Deckgläschen wurden mit einer Pinzette aus den Wells genommen, vorsichtig abgetropft und mit der bewachsenen Seite auf einen Objektträger mit zuvor aufgetragenem *Fluorescent Mounting Medium* (Dako Cytomation, Carpinteria, Foster City, USA) fixiert. Um eine Austrocknung des Präparats zu verhindern, wurden die Ränder des Deckgläschens mit klarem Nagellack verschlossen. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C im Dunkeln bis zum Zeitpunkt der mikroskopischen Beurteilung (Konfokalmikroskop Leica TCS SP2, AG Kinscherf), welche mit freundlicher Unterstützung von Herrn PD Dr. M. Bette im Institut für Anatomie und Zellbiologie erfolgte.

### **2.2.8 Statistische Analysen**

Alle statistischen Berechnungen der RTCA Analyse wurden mit dem gepaarten inversen Students T-Test ausgewertet, da die Ergebnisse ungleiche Varianzen aufwiesen. Die Ergebnisse wurden mit einem Signifikanzniveau  $*p < 0,05$  als signifikant bewertet. Western Blot, ImageJ und FACS-Analysen wurden bei Annahme einer einseitigen Ausrichtung der Proteinmenge mit dem einseitig gepaarten T-Test ausgewertet. Ergebnisse wurden nach den gängigen Methoden mit  $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$  und  $***p < 0,001$  als signifikant gewertet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Unterschiedliche Sensitivität von Zelllinien auf EMT induzierende Zytokine

Die Prozesse des EMT Programms erfordern eine gesteigerte Metabolisierungsrate der Zelle durch erhöhte Synthese mesenchymaler Proteine und den Abbau epithelialer Markerproteine. Durch Erlangung mesenchymaler Charakteristika unter Verlust der Zellpolarität und dem Abbau von festen Zell-Zell Kontakten, kommt es zu einer Umwandlung des Zellverbands, der mit einer mikroskopisch sichtbaren Phänotypänderung und einem veränderten Adhäsionsverhalten assoziiert ist. Die aktuelle Datenlage suggeriert, dass extrazelluläre Botenstoffe wie TGF- $\beta$ , HGF oder BDNF EMT Prozesse in Tumorzelllinien modulieren (Richter et al., 2011; Smith et al., 2013; Thiery et al., 2009). Dabei unterscheidet sich die Potenz der Zytokine eine EMT Antwort hervorzurufen (Li et al., 2015).

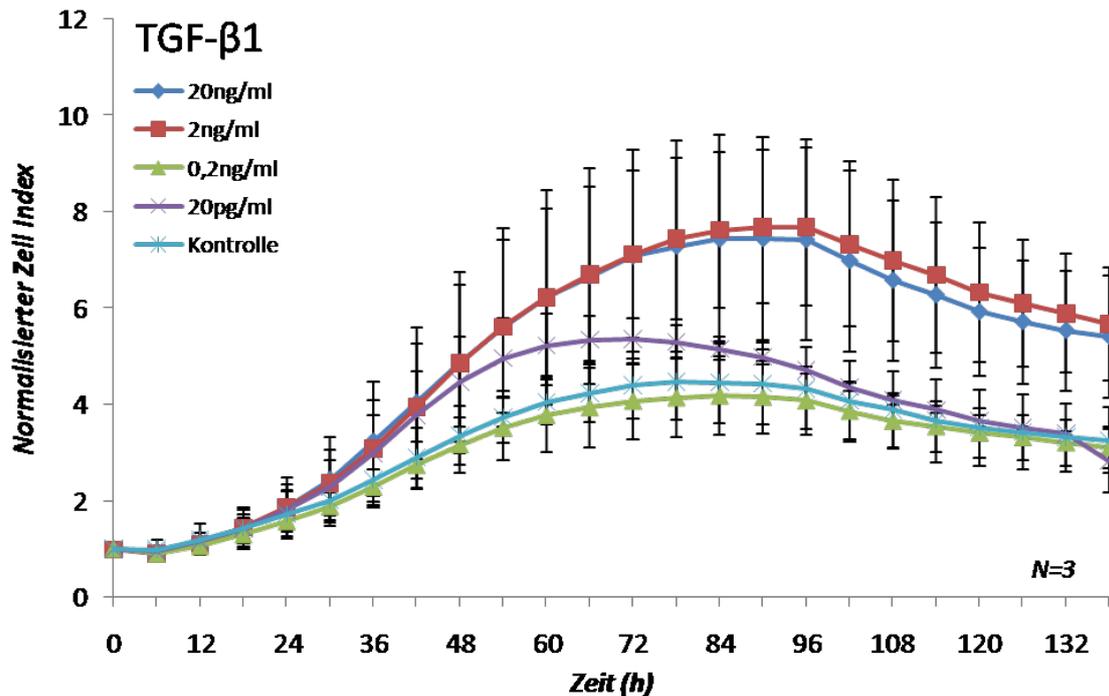
Primär von Interesse war zunächst wirksame Zytokin Kandidaten für eine EMT Induktion in HNSCC Tumorzelllinien zu identifizieren. Als Messmethode wurde das Real Time Cellular Analysis (RTCA) xCELLigence System ausgewählt (Abbildung 5). Da bei dem RTCA System die Zellanzahl und die Größe der Zelloberfläche direkt auf die Interaktion von Zellmaterial mit den Messelektroden einwirken (Zell Index), konnte der Einfluss exogen zugeführter Zytokine sowohl auf die Proliferation als auch auf eine Änderung des Zellphänotyps untersucht werden. Die Effektstärke der ausgewählten Zytokine auf HNSCC Zellen wurde verglichen. Da nach Gabe von TGF- $\beta$ 1 zu HNSCC Zellen ein erhöhter Zell Index gemessen werden konnte, wurde für die nachfolgenden Untersuchungen TGF- $\beta$ 1 als EMT Induktor eingesetzt.

Im zweiten Abschnitt wurde untersucht, ob in etablierten HNSCC Zelllinien Unterschiede in der Sensitivität einer EMT Antwort auf den zuvor ausgewählten Liganden existieren. Hinweise auf eine variabel ausfallende EMT Antwort verschiedener Zelllinien auf TGF- $\beta$  Gabe beobachteten Andriani und Kollegen in Lungentumorzellen (Andriani et al., 2016). Für den zweiten Versuchsteil wurde ebenfalls die Methode der RTCA verwendet.

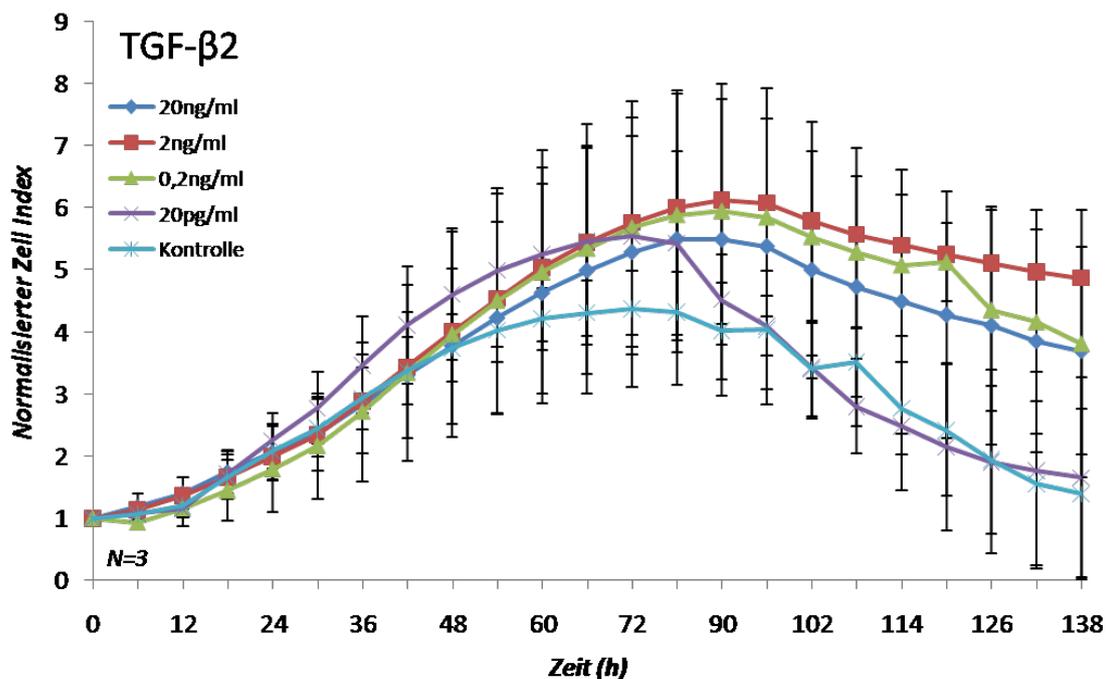
Im dritten Abschnitt wurde schließlich mittels eines *in vitro scratch assay* untersucht, ob die Auswirkung auf den Zell Index in den untersuchten HNSCC Zelllinien mit der Bildung eines mesenchymalen Zellverbands korreliert.

### 3.1.1 Hinweise auf eine EMT Induktion bei UM-SCC-3 Zellen nach TGF- $\beta$ 1 Exposition

Da initial durchgeführte Versuche unter Verwendung eines Viabilitätsassay (XTT) nicht weiterführend waren (Daten nicht gezeigt), wurde das xCELLigence System eingesetzt, um Hinweise auf ablaufende EMT Prozesse bei Exposition von Zellen mit den Zytokin Kandidaten zu erhalten. Dieses System misst mittels, an der Zellkulturplatte befindlichen, Elektroden die zelluläre Bodenhaftung, die mit dem dimensionslosen Parameter ‚Zell-Index‘ wiedergegeben wird und sensitiv für bereits geringfügige Änderung im Zellverhalten ist. Der Zell Index wird von Parametern wie Adhäsion, Zellzahl und Zellmorphologie beeinflusst. Die Bildung eines mesenchymalen Phänotyps führt unter Veränderung der Morphologie zur Auflockerung des Zellverbands und zu einer Änderung der Zelloberfläche und konsekutivem Anstieg des Zell Index. Durch die Möglichkeit der Echtzeitmessung kann zudem der zeitliche Verlauf der Zytokinwirkung erfasst werden. Hierzu wurde die Zelllinie UM-SCC-3 mit den Kandidaten Zytokinen TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3 und HGF jeweils in einer Konzentrationsreihe inkubiert und die Trägersubstanzen der Zytokine als Negativkontrollen eingesetzt. UM-SCC-3 wurde dafür in einer speziellen 96 Well Kultur Platte ausgesät und der Zell Index aufgezeichnet. 24 Stunden nach Aussaat wurde dem Medium das Zytokin oder die entsprechende Kontrollsubstanz (4 mmol/l HCL) zugesetzt und der Zell Index auf 1 gesetzt (Zeitpunkt Null mit Normalisiertem Zell Index (NZI)). Mit TGF- $\beta$ 1 in der Konzentration 2 ng/ml und 20 ng/ml versetzte Zellen zeigten reproduzierbar einen Anstieg des NZI im Vergleich zu nicht exponierten Zellen. Abbildung 9 zeigt die Auswirkung verschiedener Konzentrationen von TGF- $\beta$ 1 auf den NZI in UM-SCC-3 Zellen. Nach Zugabe des Zytokins (Zeitpunkt Null) kommt es zu einem höheren Anstieg des NZI bei TGF- $\beta$ 1 Konzentrationen von 2 ng/ml und 20 ng/ml im Vergleich zu den niedrigeren TGF- $\beta$ 1 Werten (0,2 ng/ml und 20 pg/ml) sowie der Negativkontrolle. Der Verlauf des NZI bei Konzentrationen von 2 ng/ml und 20 ng/ml ist nahezu gleich. Eine im Verhältnis sichtbare Erhöhung zeigt sich nach 24 h und bleibt bis zur Beendigung des Versuchs bestehen. In Abbildung 10 und Abbildung 11 ist die Wirkung von TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3 dargestellt, die in gleichen Konzentrationen wie TGF- $\beta$ 1 zugegeben wurden. Im Vergleich zu TGF- $\beta$ 1 verursachten TGF- $\beta$ 2 und - $\beta$ 3 keine Änderung des NZI. Abbildung 12 gibt den Effekt von HGF wieder. Ca. 20 Stunden nach Zugabe des Zytokins wurde ein ähnlich hoher Anstieg des NZI bei Konzentrationen von 10 ng/ml und 100 ng/ml gemessen, der bis zur Beendigung des Versuchs anhielt. Die nahezu gleiche Wirkstärke bei einer Konzentration von 10 ng/ml und 100 ng/ml (bzw. bei TGF- $\beta$ 1 2 ng/ml und 20 ng/ml) könnte auf eine Sättigung der verfügbaren Rezeptoren hinweisen. Das Verhältnis des erhöhten NZI von TGF- $\beta$ 1 war im Vergleich mit HGF ausgeprägter, was auf eine größere Effektstärke von TGF- $\beta$ 1 schließen lässt.

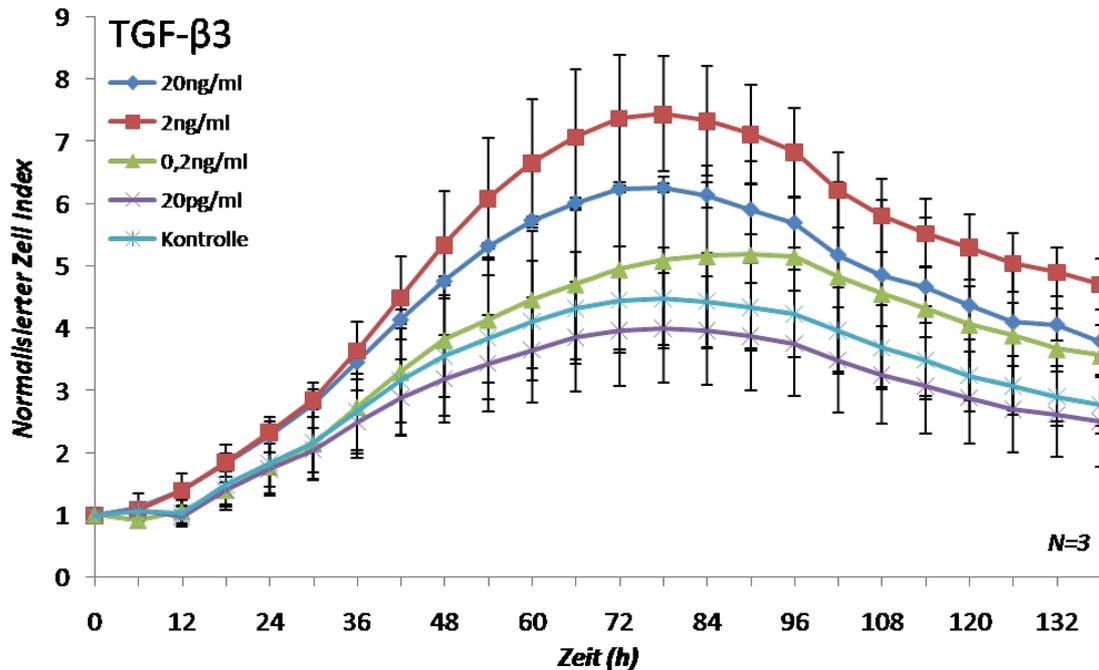


**Abbildung 9. Auswirkung von TGF-β1 auf den RTCA Zell Index in UM-SCC-3 Zellen.** Zeitabhängiger Wachstumsverlauf der Zell-Linie UM-SCC-3 nach Inkubation mit TGF-β1. Auf der X-Achse ist die zelluläre Antwort als Normalisierter Zell Index (NZI) wiedergegeben. Zum Zeitpunkt Null erreichten die Zellen eine Impedanz von 1 und es erfolgte die Zugabe von TGF-β1 (Konzentrationen siehe Legende). Zellen mit exogener Zufuhr von TGF-β1 20 ng/ml und 2 ng/ml zeigen einen verhältnismäßig höheren NZI Anstieg. Auswertung erfolgte mittels inversen Students T-Test. Unterschiede nicht signifikant

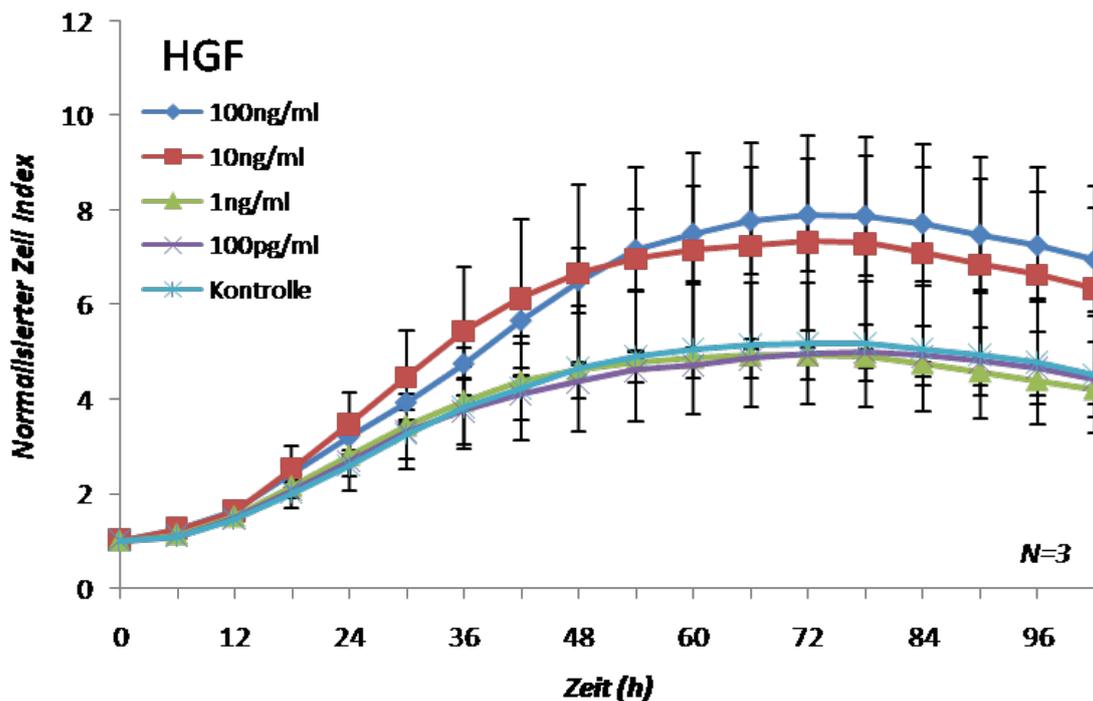


**Abbildung 10. Auswirkung von TGF-β2 auf den RTCA Zell Index in UM-SCC-3 Zellen.** Wachstumsverlauf der Zell-Linie UM-SCC-3 nach Inkubation mit TGF-β2. Auf der X-Achse ist die zelluläre Antwort als Normalisierter Zell Index (NZI) wiedergegeben. Zum Zeitpunkt Null erreichten die Zellen eine Impedanz von 1 wonach die Zugabe von TGF-β2 erfolgte

(Konzentrationen siehe Legende). Zellen mit exogener Zufuhr von TGF- $\beta$ 2 20 ng/ml, 2 ng/ml und 0,2 ng/ml zeigen einen verhältnismäßig höheren NZI nach Erreichen der Konfluenz im Vergleich zur Kontrolle bzw. nach Zufuhr von TGF- $\beta$ 2 20 pg/ml. Auswertung erfolgte mittels inversen Students T-Test. Unterschiede nicht signifikant.



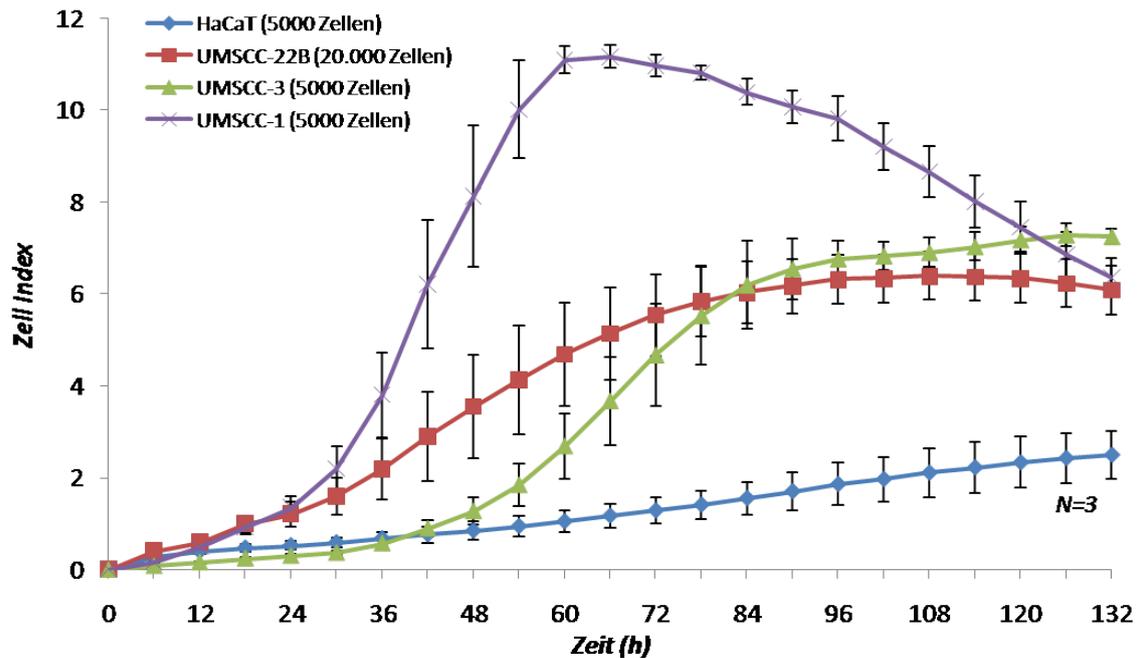
**Abbildung 11. Auswirkung von TGF- $\beta$ 3 auf den RTCA Zell Index in UM-SCC-3 Zellen.** Wachstumsverlauf der Zell-Linie UM-SCC-3 nach Inkubation mit TGF- $\beta$ 3. Auf der X-Achse ist die zelluläre Antwort als Normalisierter Zell Index (NZI) wiedergegeben. Zum Zeitpunkt Null erreichten die Zellen eine Impedanz von 1 wonach die Zugabe von TGF- $\beta$ 3 erfolgte (Konzentrationen siehe Legende). Zellen mit TGF- $\beta$ 3 zeigen in aufsteigender Konzentration einen verhältnismäßig höheren NZI. Auswertung erfolgte mittels inversen Students T-Test. Unterschiede nicht signifikant.



**Abbildung 12. Auswirkung von HGF auf den RTCA Zell Index in UM-SCC-3 Zellen.** Zeitabhängiger Wachstumsverlauf der Zell-Linie UM-SCC-3 nach Inkubation mit HGF. Auf der X-Achse ist die zelluläre Antwort als Normalisierter Zell Index (NZI) wiedergegeben. Zum Zeitpunkt Null erreichten die Zellen eine Impedanz von 1 wonach die Zugabe von HGF erfolgte (Konzentrationen siehe Legende). Zellen mit exogener Zufuhr von 100 ng/ml und 10 ng/ml HGF zeigen einen verhältnismäßig höheren NZI Anstieg. Dieser Effekt ist weniger ausgeprägt im Vergleich zu TGF- $\beta$ 1. Auswertung erfolgte mittels inversen Students T-Test. Unterschiede nicht signifikant.

### 3.1.2 HNSCC Zelllinien zeigen in der RTCA ausgeprägte Unterschiede in der Sensitivität auf TGF- $\beta$ 1

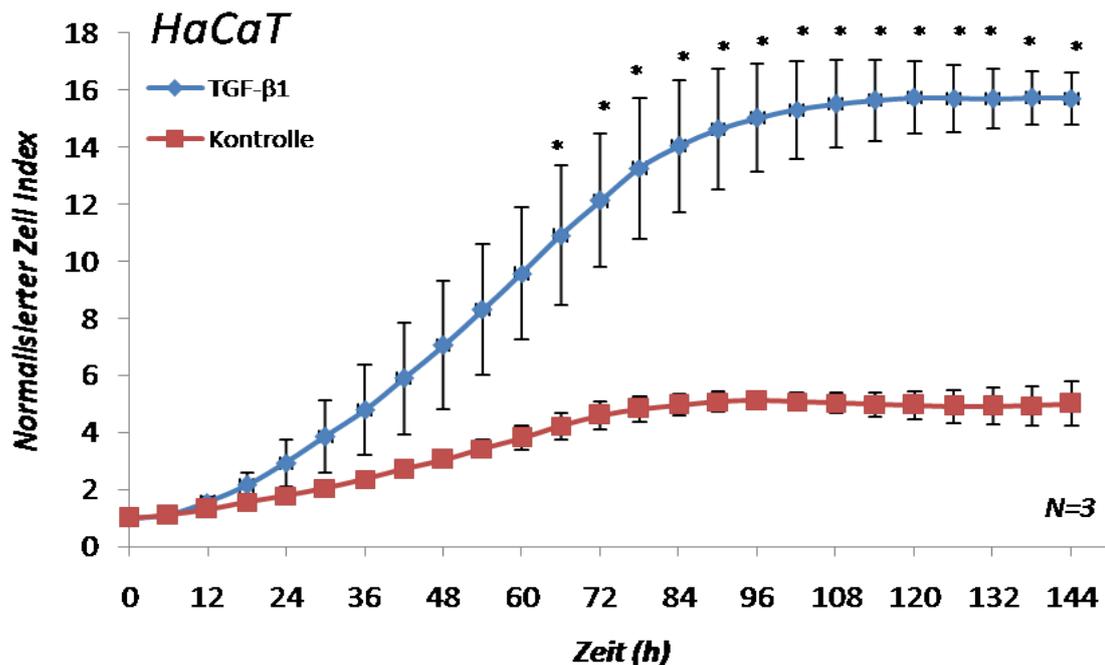
In Kapitel 3.1.1 wurde nach Zugabe von exogenem TGF- $\beta$ 1 in der Zelllinie UM-SCC-3 eine Erhöhung des NZI nachgewiesen. Der Unterschied war in den initialen Versuchsdurchläufen nicht signifikant. Jedoch konnte bei Zugabe von höheren Konzentrationen von TGF- $\beta$ 1 (20 ng/ml und 2 ng/ml) der erhöhte NZI mit sehr ähnlichem Verlauf reproduziert werden. Eine Großzahl an Referenzen belegen eine EMT modulierende Wirkung von TGF- $\beta$ 1 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Massagué, 2012). Auf Grundlage aktueller Daten sowie der eigenen Beobachtungen, dargelegt in Kapitel 3.1.1, war ein Ansprechen von HNSCC Zellen unter Verwendung des Zytokins TGF- $\beta$ 1 am vielversprechendsten. In diesem Versuchsabschnitt sollte untersucht werden, ob unterschiedliche Reaktionen in Bezug auf eine Verringerung oder Erhöhung des NZI auftreten, wenn unterschiedliche Tumorzelllinien mit TGF- $\beta$ 1 inkubiert werden. Es wurden die HNSCC Zelllinien UM-SCC-1, UM-SCC-3 und UM-SCC-22B eingesetzt.



**Abbildung 13. In vitro Proliferation der untersuchten Zelllinien.** Zeitabhängiger Wachstumsverlauf der Zelllinien HaCaT, UM-SCC-1, UM-SCC-3 und UM-SCC-22B. Dargestellt ist der Zell Index, welcher abhängig ist von Adhärenz, Zahl und Zellform der jeweiligen Zelllinie.

Die ursprünglich als Negativkontrolle eingesetzten Keratinozyten wiesen im RTCA Impedanzwerte unterhalb des notwendigen Soll-Bereichs auf, welches auf eine unzureichende Adhäsion am Boden der Messplatte hinwies. Als Kontrolle wurde hierfür die Zelllinie HaCaT eingesetzt. HaCaT (*Human adult low Calcium high Temperatur keratinocytes*) wird üblicherweise aufgrund der geringfügigen Unterscheidung von nativen Keratinozyten in Bezug auf Zell-Adhäsion, -Interaktion, -Wachstum, Membranaufbau und einer geringen bis fehlenden Invasionsneigung als nicht tumorigen eingestuft (Braut-Boucher et al., 1997; Kürschner, 2007) und gilt daher als etablierte Negativkontrolle (Mandal et al., 2016). Zunächst wurde das basale, für jede Zelllinie charakteristische, Wachstumsverhalten aufgezeichnet und verglichen (Abbildung 13). Nachfolgend wurden Änderungen unter TGF- $\beta$ 1 Behandlung beurteilt. 5000 Zellen (HaCaT, UM-SCC-1 und UM-SCC-3) oder  $20 \times 10^3$  (UM-SCC-22B) pro Well wurden hierzu in einer 96-Well Platte ausgesät. 24 Stunden nach Aussaat, bzw. nach Erreichen eines Zell-Index von 1, wurde TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml) hinzugegeben und der NZI aufgezeichnet. Als Kontrolle wurde die Trägersubstanz von TGF- $\beta$ 1 (4 mmol/l HCL) verwendet. Die Änderung der Impedanz wurde in 15 min Intervallen aufgezeichnet.

Alle vier Zelllinien reagierten auf exogenes TGF- $\beta$ 1 mit einem Anstieg des NZI (Abbildungen 14-17), wobei die Wirkstärke jedoch erheblich variierte. Ein signifikanter Anstieg des NZI wurde in HaCaT nachgewiesen (3,2-fach im Vergleich mit der Kontrolle; Abbildung 14), in geringerer Ausprägung in UM-SCC-3 (1,78-fach; Abbildung 16). In UM-SCC-1 kam es nach Erreichen der maximalen Konfluenz und bei Ausbildung eines Plateaus in der mit TGF- $\beta$ 1 inkubierten Gruppe zu einem signifikanten Anstieg des NZI (2,79-fach; Abbildung 15).



**Abbildung 14.** Verlauf der *in vitro* Proliferation von HaCaT Zellen ohne und nach Zugabe von TGF-β1. Zeitabhängiger Verlauf der Proliferation von HaCaT Zellen nach Zugabe von TGF-β1 (10 ng/ml) zum Zeitpunkt Null. Der NZI steigt nach 24 h unter exogenem TGF-β1 an und ist signifikant erhöht ab 66 Stunden (Mit TGF-β1 maximal 3,20-fach erhöht bei t=132 h) bis zum Versuchsende nach 144 Stunden. Auswertung erfolgte mittels inversen Students T-Test (Ergebnis signifikant \* $p < 0,05$ ). N=3 Versuchsdurchläufe jeweils in Triplikaten.

In UM-SCC-22B zeigte sich lediglich ein marginal erhöhter NZI (1,36-fach bei t=24-84 h; Abbildung 17). Anhand des sensitiven Verfahrens der RTCA konnten unterschiedliche Ausprägungen einer TGF-β1 induzierten Erhöhung des Zell Index in den ausgewählten Zelllinien gemessen werden. Da der erhöhte Zell Index durch eine erhöhte Proliferationsrate als auch durch eine Vergrößerung der Zelloberfläche bedingt sein kann, musste der beobachtete Effekt nun weiter differenziert werden. Ein geeignetes Verfahren zur Messung einer Änderung der Proliferationsrate ist der XTT-Assay. Da initiale Versuche mit dem XTT-Assay nicht weiterführend waren, konzentrierte man sich im weiteren Verlauf auf eine nähere Betrachtung der Zellmorphologie.

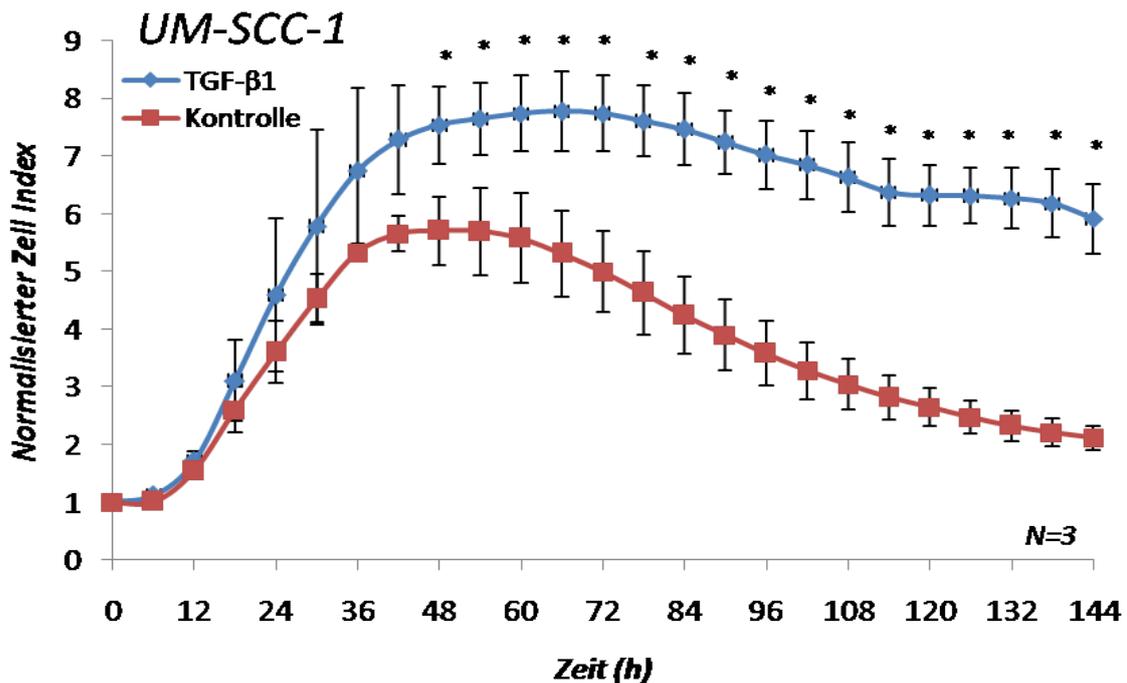


Abbildung 15. Verlauf der *in vitro* Proliferation von UM-SCC-1 Zellen ohne und nach Zugabe von TGF-β1. Zeitabhängiger Verlauf der Proliferation von UM-SCC-1 Zellen nach Zugabe von TGF-β1 (10 ng/ml) zum Zeitpunkt Null. Der NZI steigt nach 24 h unter exogenem TGF-β1 und ist signifikant erhöht ab ca. 48 Stunden (maximal 2,79-fach erhöht bei t=144 h). Der erhöhte NZI unter exogenem TGF-β1 bleibt bis zur Beendigung des Versuchs nach 144 Stunden und bildet ein Plateau (Ergebnis signifikant \* $p < 0,05$ ). N=3 Versuchsdurchläufe jeweils in Triplikaten.

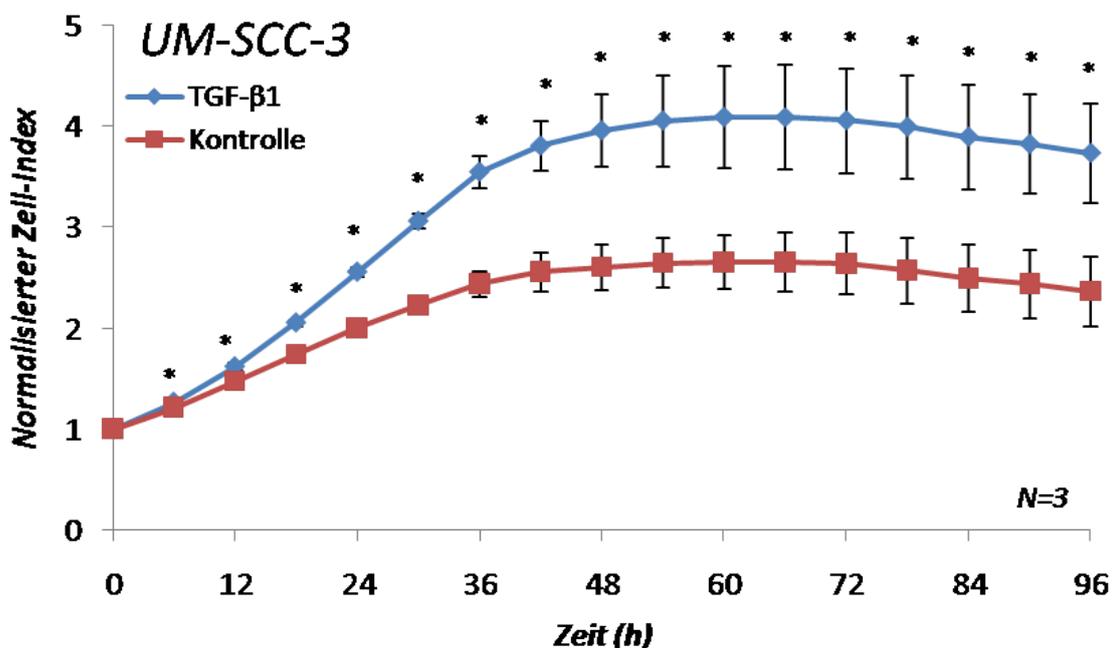
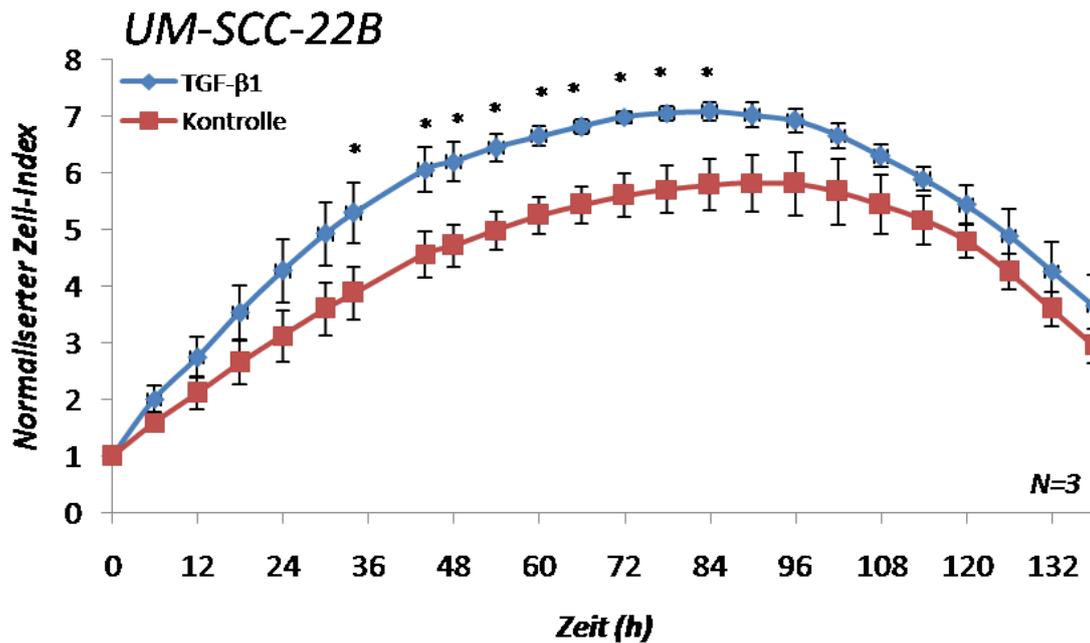


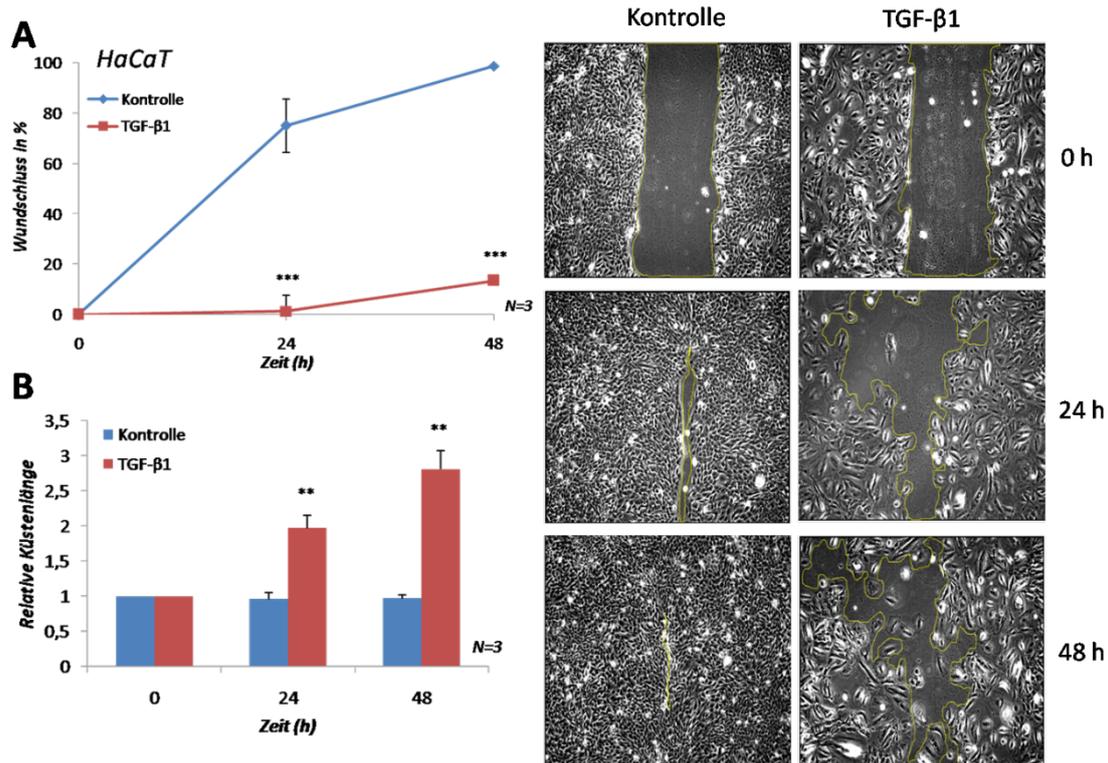
Abbildung 16. Verlauf der *in vitro* Proliferation von UM-SCC-3 Zellen ohne und nach Zugabe von TGF-β1. Zeitabhängiger Verlauf der Proliferation von UM-SCC-3 Zellen nach Zugabe von TGF-β1 (10 ng/ml) zum Zeitpunkt Null. Der NZI steigt nach 12 h unter exogenem TGF-β1 und ist signifikant erhöht (1,58-fach bei t=96 h). Der Anstieg hält bis zum Ende des Versuchs an (Ergebnis signifikant \* $p < 0,05$ ). N=3 Versuchsdurchläufe jeweils in Triplikaten.



**Abbildung 17.** Verlauf der *in vitro* Proliferation von UM-SCC-22B Zellen ohne und nach Zugabe von TGF-β1. Zeitabhängiger Verlauf der Proliferation von UM-SCC-22B Zellen nach Zugabe von TGF-β1 (10 ng/ml) zum Zeitpunkt Null. Der NZI steigt nach 12 h unter exogenem TGF-β1 und ist signifikant erhöht ab 36 Stunden (maximal 1,36-fach bei t=34 h), gleicht sich im Verlauf jedoch wieder der Kontrollgruppe an. Versuchsdurchläufe N=3 jeweils in Triplikaten.

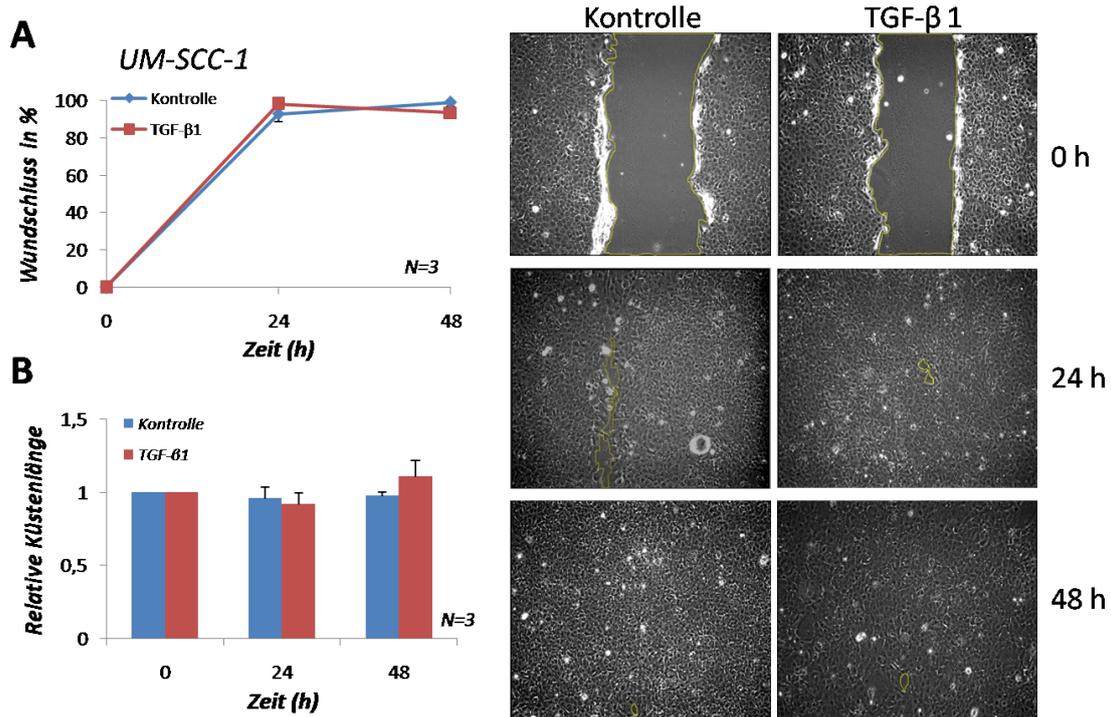
### 3.1.3 *In vitro* scratch wound assay: TGF-β1 führt überwiegend in HaCaT und UM-SCC-3 Zellen zu morphologischen Veränderungen

In diesem Versuchsabschnitt wurde untersucht, ob der erhöhte NZI, welcher in unterschiedlicher Ausprägung in den untersuchten Zelllinien nach Zugabe von TGF-β1 beobachtet wurde, durch die Bildung eines mesenchymalen Phänotyps bzw. durch morphologische Änderungen und der Fähigkeit zur Migration zustande kommt. Hierfür wurde eine Wunde simuliert, indem in einen konfluenten Zellrasen mit Hilfe einer Pipettenspitze durch einmaliges Kratzen ein zellfreies Areal geschaffen wurde. Beurteilt wurde der Verlauf des Wundschlusses, in welchem ein definierter Ausschnitt des zellfreien Areals von Zellen überwachsen wurde. Neben dem Verhältnis von zellfreier und zellbewachsener Fläche (Prozentualer Wundschluss) wurde das Maß der relativen Küstenlänge herangezogen, welches Hinweise auf einen mesenchymalen bzw. epithelialen Zellverband geben kann. In den untersuchten Zelllinien zeigte sich unter Zufuhr von TGF-β1 eine signifikante Erhöhung der Küstenlänge in HaCaT und UM-SCC-3 Zellen, weniger deutlich jedoch in UM-SCC-1 und UM-SCC-22B Zellen. In Abbildung 18 sind die Ergebnisse für HaCaT Zellen mit und ohne exogen zugeführtes TGF-β1 dargestellt.



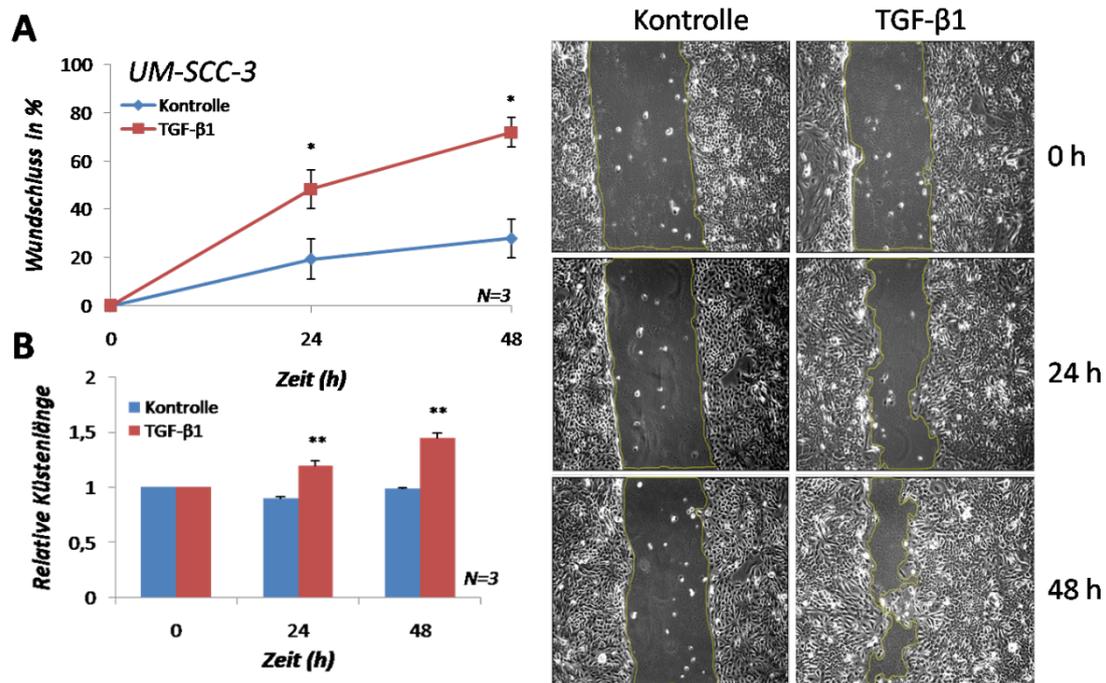
**Abbildung 18. TGF- $\beta$ 1 induziert eine morphologische Veränderung in der Zelllinie HaCaT.** Dargestellt ist das Proliferations-/Migrationsverhalten der Zelllinie HaCaT im scratch wound assay. (A) zeigt den prozentualen Wundschluss der Kontroll- und TGF- $\beta$ 1 Gruppen ( $t=48$  h,  $K=98,8\%$  7,36-fach erhöht zu TGF- $\beta$ 1=13,4%,  $***p<0,001$ ). (B) Dargestellt ist die relative Küstenlänge. Unter TGF- $\beta$ 1 wird eine Auflösung des dichten Zellverbands und eine Migration in den zellfreien Bereich beobachtet. Die Küstenlänge wird deutlich größer ( $K$  Gruppe konstant, TGF- $\beta$ 1 Gruppe 2,82-facher Anstieg nach  $t=48$  h,  $**p=0,0012$ ). Rechts abgebildet sind mikroskopische Aufnahmen nach einem „scratch“ in 24 h Intervall. Versuchsanzahl  $N=3$ .

In den Aufnahmen der Negativkontrolle liegen die Zellen ähnlich einem Pflastersteinrelief aneinander. Ein vollständiges Überwachsen des zellfreien Areals im gesamten Bildausschnitt ist nach 48 h erreicht (98,8%, Abbildung 18A) und erfolgt in unveränderter Zellformation (Küstenlänge der Kontrollgruppe konstant; Abbildung 18B). Unter Einfluss von TGF- $\beta$ 1 zeigen sich spindelförmige Zellen, die in loser Formation in das zellfreie Areal migrieren (Abbildung 18B, relative Küstenlänge der TGF- $\beta$ 1 Gruppe bei  $t=48$  h 2,81-facher Anstieg,  $**p<0,01$ ). Der prozentuale Anteil von zellhaltigen und zellfreiem Areal im gesamten Bildausschnitt ist dabei nach 48 h gegenüber der initialen Bildaufnahme lediglich geringfügig gestiegen (TGF- $\beta$ 1=13,4%; Abbildung 18A). In Abbildung 19 ist die Wirkung von TGF- $\beta$ 1 auf UM-SCC-1 Zellen dargestellt. Die Zellen liegen dicht gedrängt, teilweise in Zellhaufen vor. Das zellfreie Areal ist nach 24 h in beiden Gruppen vollständig überwachsen ( $K=98\%$ , TGF- $\beta$ 1=96%). In den Bildaufnahmen lassen sich einzelne Resorptionsareale erkennen. Die Formation des Zellverbands ist aufgrund fehlender sichtbarer Zellverbandsgrenzen nicht beurteilbar (Bildaufnahmen rechts in Abbildung 19). In Abbildung 20 ist das Verhalten der UM-SCC-3 Zellen ohne und nach Zugabe von TGF- $\beta$ 1 dargestellt. Unter Zufuhr von exogenem TGF- $\beta$ 1, wird die Ausprägung spindelförmiger Zellen beobachtet.



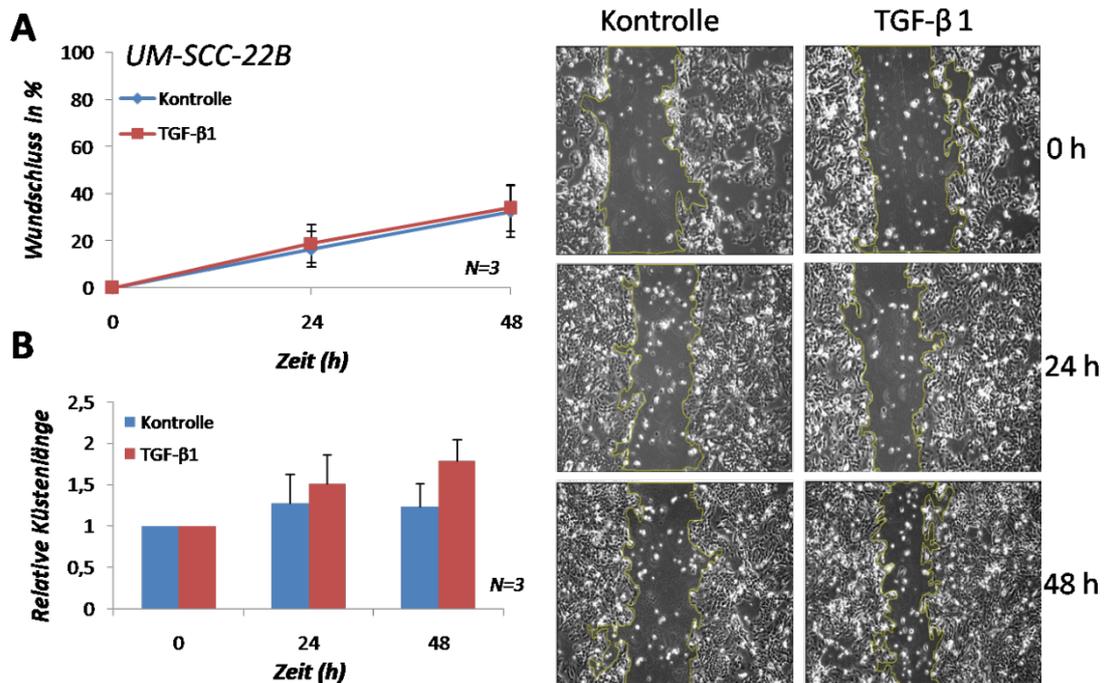
**Abbildung 19.** TGF-β1 hat keinen Einfluss auf den morphologischen Phänotyp in UM-SCC-1 Zellen. (A) Dargestellt ist der prozentuale Wundschluss von Kontroll- und TGF-β1 Gruppe ( $t=24$  h,  $K=98\%$ ,  $TGF-β1=96\%$ , nicht signifikant). (B) Dargestellt ist die relative Küstenlänge. In Kontroll- und TGF-β1 Gruppe ist die zellfreie Fläche nach 24 h vollständig bewachsen, wodurch die Küstenlänge nicht beurteilt werden kann. Rechts abgebildet sind mikroskopische Aufnahmen nach dem „scratch“ in 24 h Intervall. Versuchsanzahl  $N=3$ .

Einzelne Zellverbände wachsen fischzugartig in das zellfreie Areal. Die Auflockerung der dichten Zellformation am Rand des zellfreien Areales vor TGF-β1 Inkubation spiegelt sich in einer Vergrößerung der Küstenlänge wider (Abbildung 20B; die relative Küstenlänge ist durch Gabe von TGF-β1 nach  $t=48$  h 1,45-fach erhöht). In den Kontrollaufnahmen dagegen bleibt der pflastersteinartige Zellverband während des Überwachsens des zellfreien Areals erhalten, sodass die relative Küstenlänge konstant bleibt (Abbildung 20 rechts, relative Küstenlänge=0,99 bei  $t=48$  h). Der prozentuale Anteil von zellreicher Fläche ist unter TGF-β1 Einfluss nach  $t=48$  h höher (TGF-β1=75% gegenüber  $K=30\%$ , Abbildung 20A). In Abbildung 21 ist die Zelllinie UM-SCC-22B und deren Antwort auf exogen zugeführtes TGF-β1 dargestellt. Die Zellen liegen initial in einem lockeren Verband vor. Phänotypische Unterschiede von TGF-β1 inkubierten im Vergleich zu den Zellen der Kontrollgruppe zeigen sich mikroskopisch nicht (Abbildung 21 rechts). Der Zellverband erscheint in beiden Gruppen nach 48 h minimal aufgelockert, unter TGF-β1 tendenziell etwas mehr, welches sich in einer Vergrößerung der Küstenlänge abbildet, jedoch keine Signifikanz erreicht (Abbildung 21B). Dementsprechend zeigt sich nach 48 h ein vergleichbarer Anstieg des prozentualen Wundschlusses in beiden Gruppen ( $K=40\%$ , TGF-β1=40%, Abbildung 21A).



**Abbildung 20. TGF- $\beta$ 1 induziert eine morphologische Veränderung in UM-SCC-3 Zellen.** (A) Der prozentuale Wundschluss der Kontrollgruppe ist niedriger im Vergleich zur TGF- $\beta$ 1 Gruppe ( $K=30\%$ , TGF- $\beta$ 1= $75\%$  bei  $t=48$  h,  $*p<0,05$ ). (B) Dargestellt ist die relative Küstenlänge. Unter TGF- $\beta$ 1 wird eine Auflösung des dichten Zellverbands und eine Migration in den zellfreien Bereich beobachtet. Die Küstenlänge wird deutlich größer ( $K$ =konstant, TGF- $\beta$ 1= $1,45$ -facher Anstieg nach  $t=48$  h,  $**p=0,0079$ ). Rechts abgebildet sind mikroskopische Aufnahmen nach einem „scratch“ im 24 h Intervall. Versuchsanzahl  $N=3$ .

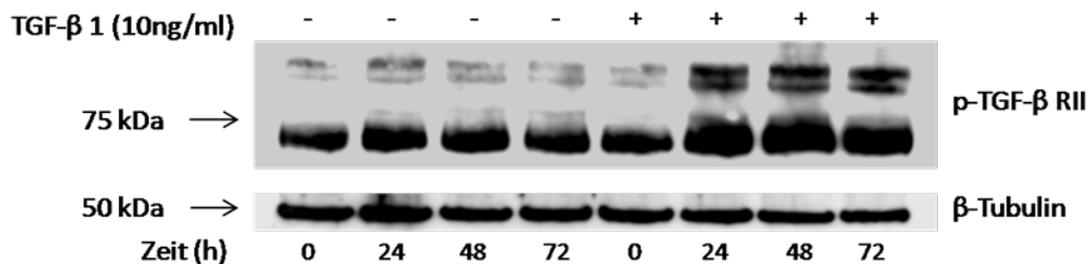
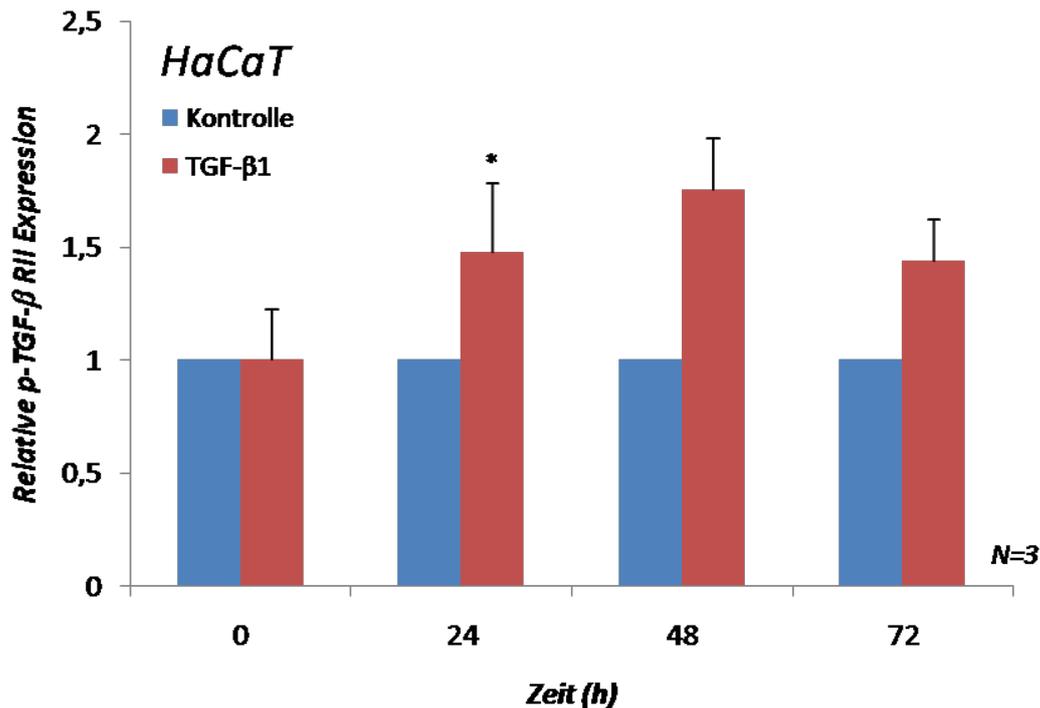
Insgesamt betrachtet konnte nach Zufuhr von TGF- $\beta$ 1 ein verstärkter mesenchymaler Phänotyp beobachtet werden, welcher in den untersuchten Zelllinien unterschiedlich ausgeprägt war. Der deutlichste Anstieg der Küstenlänge wurde in den Zelllinien HaCaT und UM-SCC-3 gemessen. Es zeigte sich kein signifikanter Anstieg in UM-SCC-22B Zellen. Die Küstenlänge in den UM-SCC-1 Zellen konnte in dem erhobenen Zeitfenster nicht ausgewertet werden. Der beobachtete Sensitivitätsunterschied von TGF- $\beta$ 1 auf die Zelllinien im *in vitro scratch wound assay* scheint mit der Ausprägung der NZI Erhöhung aus Kapitel 3.1.2 zu korrelieren. Im Vergleich zu der nahezu konstant bleibenden Küstenlänge in den Kontrollgruppen von HaCaT und UM-SCC-3 Zellen (ca. 1), zeigte sich in UM-SCC-22B Zellen eine diskrete Erhöhung der Küstenlänge bereits ohne Zugabe von TGF- $\beta$ 1 nach 24 h und 48 h, wobei jedoch keine Signifikanz erreicht wird (Abbildung 21B).



**Abbildung 21.** Die Exposition von *UM-SCC-22B* Zellen mit exogenen *TGF-β1* bewirkt keine Veränderung des Phänotyps. (A) Dargestellt ist der prozentuale Wundschluss der Kontroll- im Vergleich zur *TGF-β1* Gruppe ( $K=40\%$ ,  $TGF-β1=40\%$  bei  $t=48$  h). (B) Darstellung der relativen Küstenlänge (*K* und *TGF-β1* sind zu den Zeiten  $t=24$  h und 48 h nicht signifikant vergrößert). Rechts abgebildet sind mikroskopische Aufnahmen nach einem „scratch“ in 24 h Intervall. Versuchsanzahl  $N=3$ .

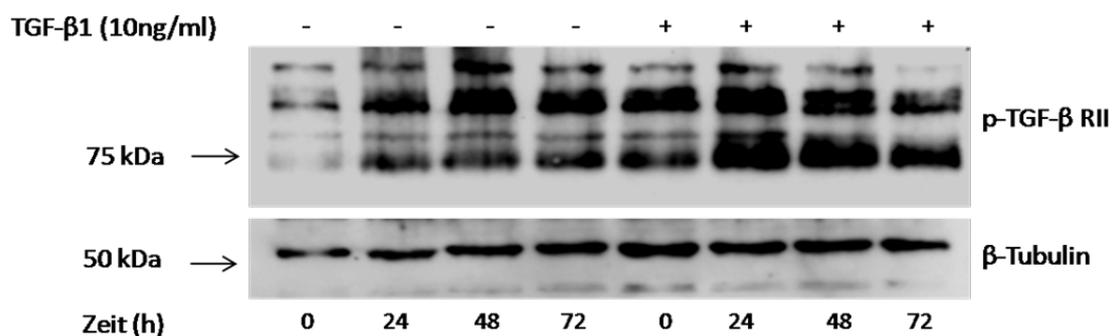
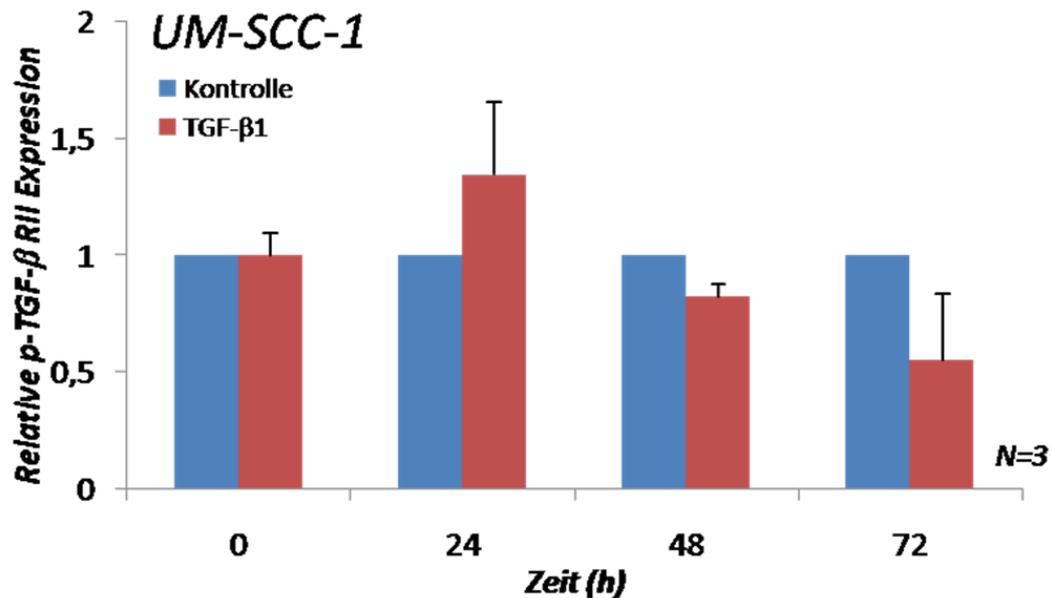
### 3.2 Der *TGF-β1* induzierte mesenchymale Phänotyp von HaCaT und *UM-SCC-3* Zellen korreliert mit der Phosphorylierung von Tyrosin 424 des *TGF-β* Rezeptor Typ II

In früheren Arbeiten wurde in fortgeschrittenen HNSCC eine verminderte Expression von Komponenten des *TGF-β1* Signalwegs, insbesondere *TGF-β* RII und *Smad4*, beobachtet (Chen et al., 2001; Garrigue-Antar et al., 1995). Um eine Korrelation der unterschiedlichen Sensitivität von *TGF-β1* und einer variierenden Expression von Proteinen des *TGF-β1* Signalwegs in den Zelllinien zu erheben, wurden zunächst relevante Komponenten des *smad* abhängigen *TGF-β* Signalwegs im Western Blot zu mehreren Expositionszeiten von *TGF-β1* quantifiziert. Getestet wurden aktivierter *Smad2/3*-Komplex (*p-smad2/3*), *Smad4*, *TGF-β* RI, *TGF-β* RII und die an einer Tyrosin-Domäne phosphorylierte Form des *TGF-β* RII (*p-TGF-β* RII Tyr424) (Daten nicht gezeigt). *p-TGF-β* RII Tyr424 konnte in allen untersuchten Zelllinien detektiert werden, da eine vermutlich durch Autophosphorylierung getriggerte Grundaktivität, welche durch die duale Kinasespezifität bedingt sein kann, beobachtet wurde (Lawler et al., 1997). In diesem Versuch wurde nach Zugabe von *TGF-β1* eine signifikante Erhöhung der Grundaktivität beobachtet, die mit den induzierten morphologischen Veränderungen in HaCaT und *UM-SCC-3* Zellen korrelierte.



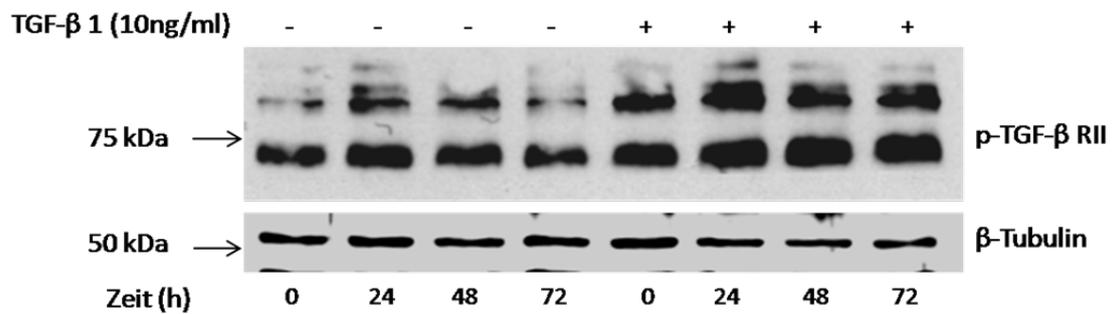
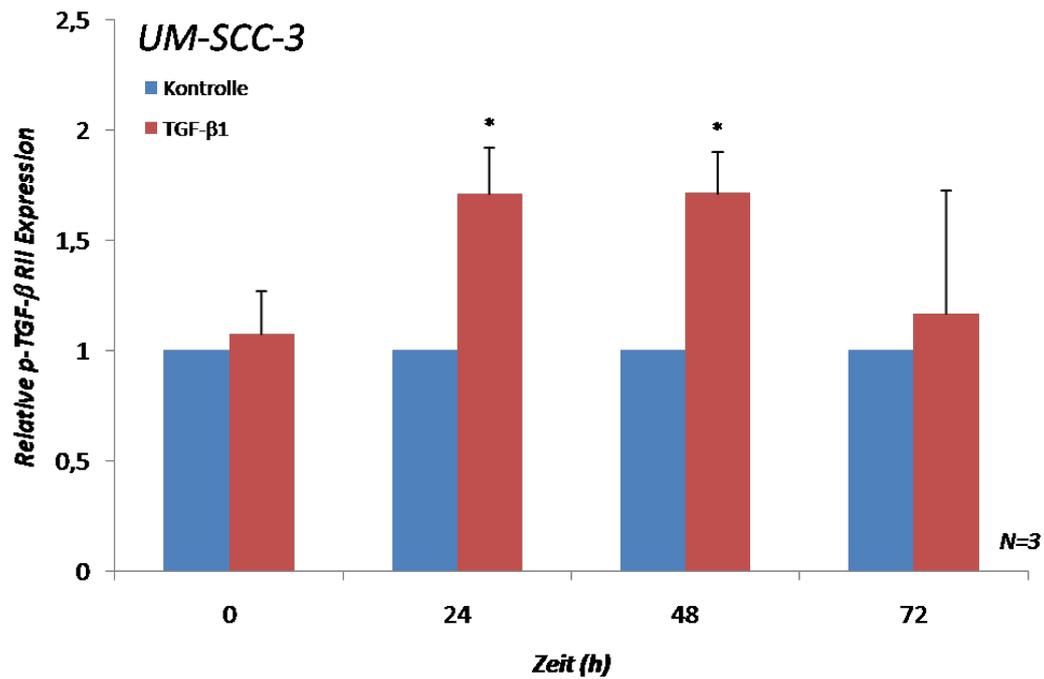
**Abbildung 22. TGF-β1 Exposition von HaCaT Zellen führt zu einer Aktivierung des TGF-β RII.** Die Aktivierung des TGF-β Signalwegs erfolgt über die Phosphorylierung des TGF-β Rezeptor Typ II. 24 h nach TGF-β1 Zugabe (10 ng/ml) kommt es zu einem signifikanten Anstieg (\* $p=0,038$ ) von TGF-β RII Phospho im Vergleich zur Kontrolle (24 h Inkubation mit der Trägersubstanz von TGF-β1, 4 mmol/l HCL). Eine Inkubation mit TGF-β1 für 48 h und 72 h führt ebenfalls zu einer erhöhten Rezeptor Aktivierung. Erreicht jedoch keine Signifikanz. Im unteren Abschnitt dargestellt ist eine repräsentative Western Blot Analyse. Als Ladungskontrolle diente β-Tubulin. Versuche  $N=3$ .

In UM-SCC-1 Zellen war der Effekt nicht signifikant und in UM-SCC-22B Zellen ließ sich kein Einfluss nachweisen. In HaCaT Zellen kam es zu einer Aktivierung des Rezeptors nach Zugabe von TGF-β1 zu den untersuchten Inkubationszeiten  $t=24$  h (\* $p=0,038$ ), 48 h und 72 h (Abbildung 22). In UM-SCC-3 kam es zu einer signifikanten Signalerhöhung nach  $t=24$  h und  $t=48$  h (\* $p=0,039$ , Abbildung 24) und in UM-SCC-1 schien eine Aktivierung nach  $t=24$  h zu erfolgen (nicht signifikant). Zu einem späteren Versuchszeitpunkt ( $t=72$  h) wurde eine Abnahme der Rezeptorphosphorylierung im Vergleich zur Kontrollgruppe und zum Ausgangswert beobachtet (Abbildung 23).

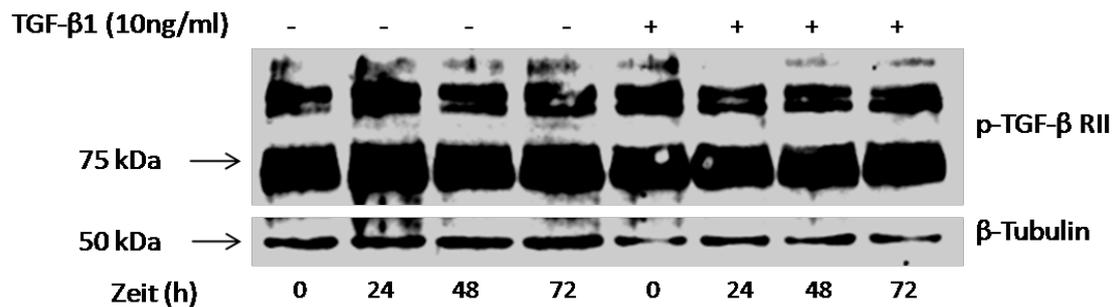
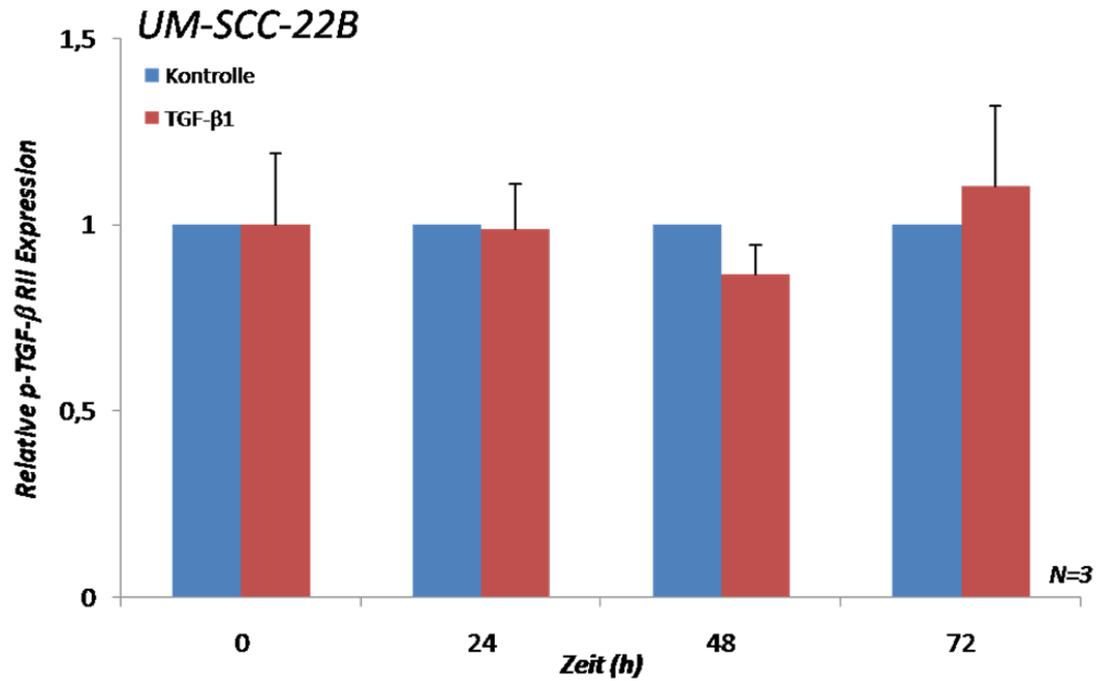


**Abbildung 23.** TGF-β1 Exposition von UM-SCC-1 Zellen führt zu keiner signifikanten Aktivierung von TGF-β RII. 24 h nach TGF-β1 Zugabe kommt es zu einem Anstieg der aktivierten Rezeptor Form im Vergleich zur Kontrolle (4 mmol/l HCL). Der Anstieg ist jedoch nicht signifikant. Nach 48 h und 72 h Inkubation mit TGF-β1 wird eine verminderte Aktivität des Rezeptors beobachtet. Die Messungen erreichen keine Signifikanz. Im unteren Abschnitt dargestellt ist eine repräsentative Western Blot Analyse. Als Ladungskontrolle diente β-Tubulin. Versuche N=3.

Dies kann ein Hinweis für einen zum Sensitivitätsverlust führenden Mechanismus sein: Vermittelt durch stetige Signalwirkung von exogen vorliegendem TGF-β1, wird ein Abbau des Rezeptors induziert. Eine Korrelation von erhöhter TGF-β1 Expression und erniedrigtem Rezeptor Typ II wurde in Tumorzellen verschiedener Entitäten beobachtet (Lu et al., 2006). Der Effekt war in der vorliegenden Messung jedoch nicht signifikant. In UM-SCC-22B Zellen wurde keine signifikante Aktivierung oder Verminderung des Rezeptors nach TGF-β1 Exposition beobachtet (Abbildung 25). Die Phosphorylierung des TGF-β RII an Tyr424 korrelierte mit dem beobachteten Effekt von TGF-β1 aus den Versuchen in Kapitel 3.1.2. und 3.1.3. Im Folgenden wurde die Wirkung von TGF-β1 auf intrazelluläre EMT Strukturen in den verwendeten Zelllinien untersucht.



**Abbildung 24. Aktivierung des TGF- $\beta$  RII in UM-SCC-3 Zellen durch TGF- $\beta$ 1.** 24 h und 48 h nach TGF- $\beta$ 1 Zugabe kommt es zu einem signifikanten Anstieg ( $t=24$  h,  $*p=0,046$  und  $t=48$  h,  $*p=0,039$ ) der aktivierten Rezeptor Form im Vergleich zur Kontrolle. Nach 72 h Inkubation mit TGF- $\beta$ 1 ist die Aktivierung abgeklungen. Im unteren Abschnitt dargestellt ist eine repräsentative Western Blot Analyse. Als Ladungskontrolle diente  $\beta$ -Tubulin. Versuche N=3.



**Abbildung 25.** TGF- $\beta$ 1 Behandlung von UM-SCC-22B Zellen führt zu keiner Aktivierung von TGF- $\beta$  RII. Zu den ausgewählten Inkubationszeiten ist nach TGF- $\beta$ 1 Zugabe keine Aktivierung des Rezeptors im Vergleich zur Kontrolle sichtbar. Im unteren Abschnitt dargestellt ist ein repräsentative Western Blot Analyse. Als Ladungskontrolle wurde  $\beta$ -Tubulin eingesetzt. Versuche N=3.

### 3.3 TGF- $\beta$ 1 Einfluss auf E-Cadherin und das Zytoskelett

Charakteristisch für ein epitheliales Expressionsmuster ist ein pflastersteinartiger Zellverband. Die dafür typische Zellform wird gebildet durch Komponenten des Zytoskeletts wie Aktin und wird stabilisiert durch enge Zell-Zellkontakte, die wiederum über epitheliale Proteine wie E-Cadherin vermittelt werden. Durch Auflösung von Zell-Zellkontakten, dem Verlust der Zellpolarität und Bildung von kontraktile Zellausläufern (*Stress fiber*), kommt es zu einem Zugewinn motiler Eigenschaften. Ein Abbau des epithelialen Markerproteins E-Cadherin wird als Schlüsselereignis der EMT diskutiert (Kalluri et al., 2009; Nijkamp et al., 2011). Das intrazelluläre Expressionsmuster von zytoskelettalen Strukturen, wie z.B.  $\beta$ -Aktin, ist hierbei ebenfalls von Interesse, da es bei der Motilität von Zellen eine zentrale Rolle einnimmt.

Im ersten Versuchsteil wurde die Gesamtexpression des Oberflächenproteins E-Cadherin vor und nach Zugabe von TGF- $\beta$ 1 mittels zweier unabhängiger Messverfahren, Western Blot und FACS Analyse, an fixierten Tumorzellen quantifiziert.

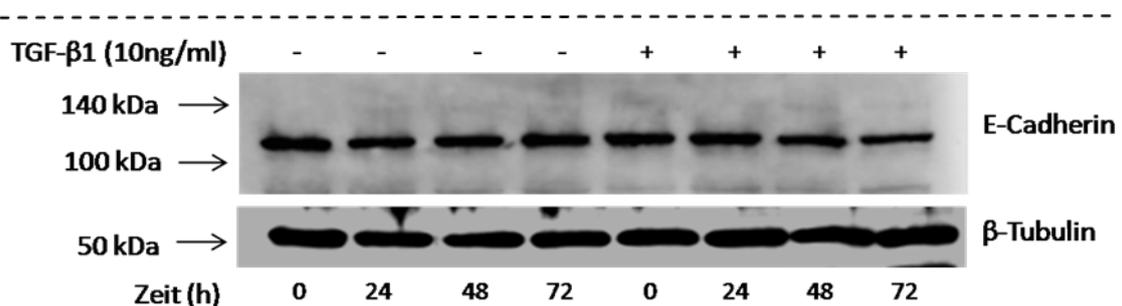
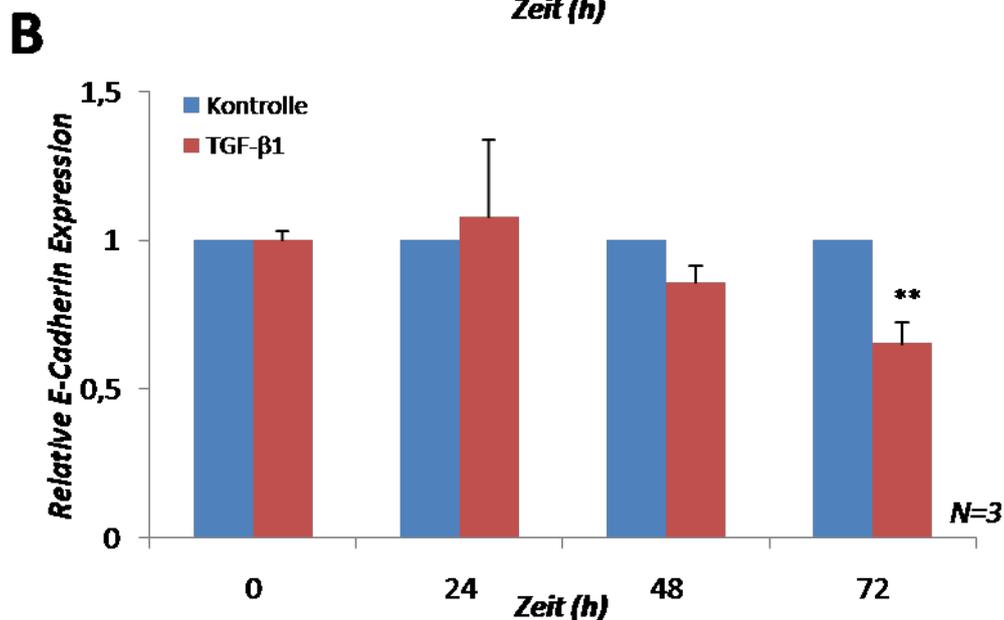
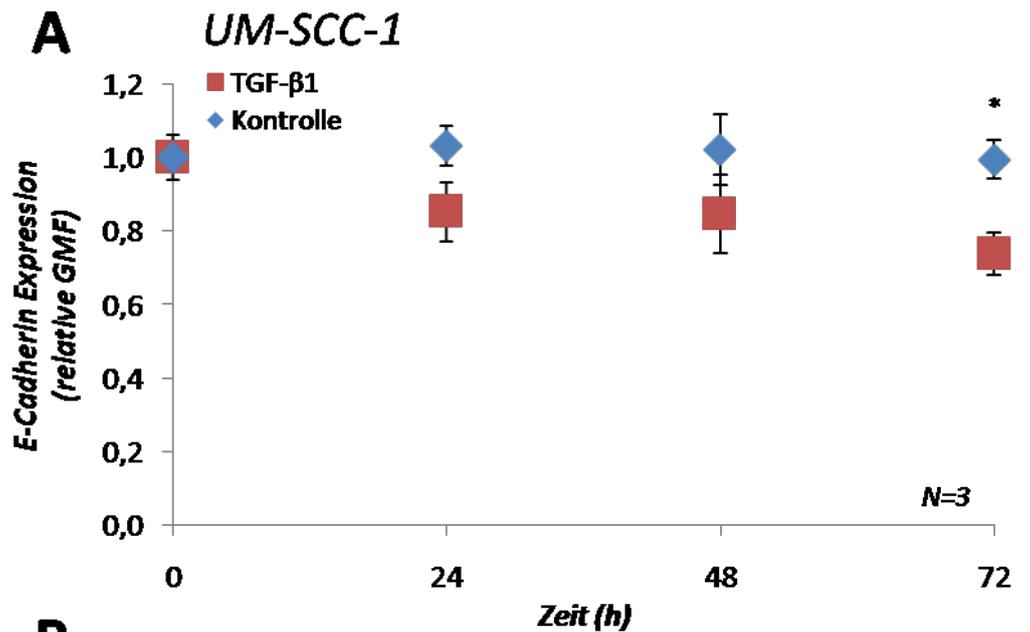
Im zweiten Abschnitt wurde die intrazelluläre Lokalisation von E-Cadherin mittels immunzytologischer Färbung detektiert. E-Cadherin ist in Epithelzellen an der Innenseite des Zellkortex gelegen und trägt hier zur Aufrechterhaltung fester Zell-Zellkontakte und des epithelialen Phänotyps bei. Eine Relokalisierung des Proteins vom Zellcortex in Richtung Zytoplasma ist ein initialer Schritt der EMT, wobei die Gesamtmenge des Proteins sich nicht zwangsläufig ändern muss. Aufgrund dieser Überlegung wurde untersucht, ob die Zufuhr von exogenem TGF- $\beta$ 1 eine Änderung der E-Cadherin Lokalisation in den Zelllinien verursacht und diese in Korrelation zum beobachteten mesenchymalen Phänotyp steht.

Im dritten Abschnitt wurde die Modulierung von  $\beta$ -Aktin und dem damit korrelierenden motilen Phänotyp mittels immunzytologischer Färbungen und Quantifizierung im Western Blot beurteilt.

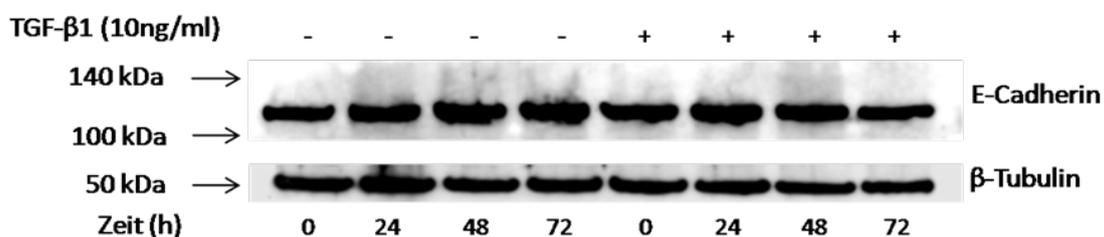
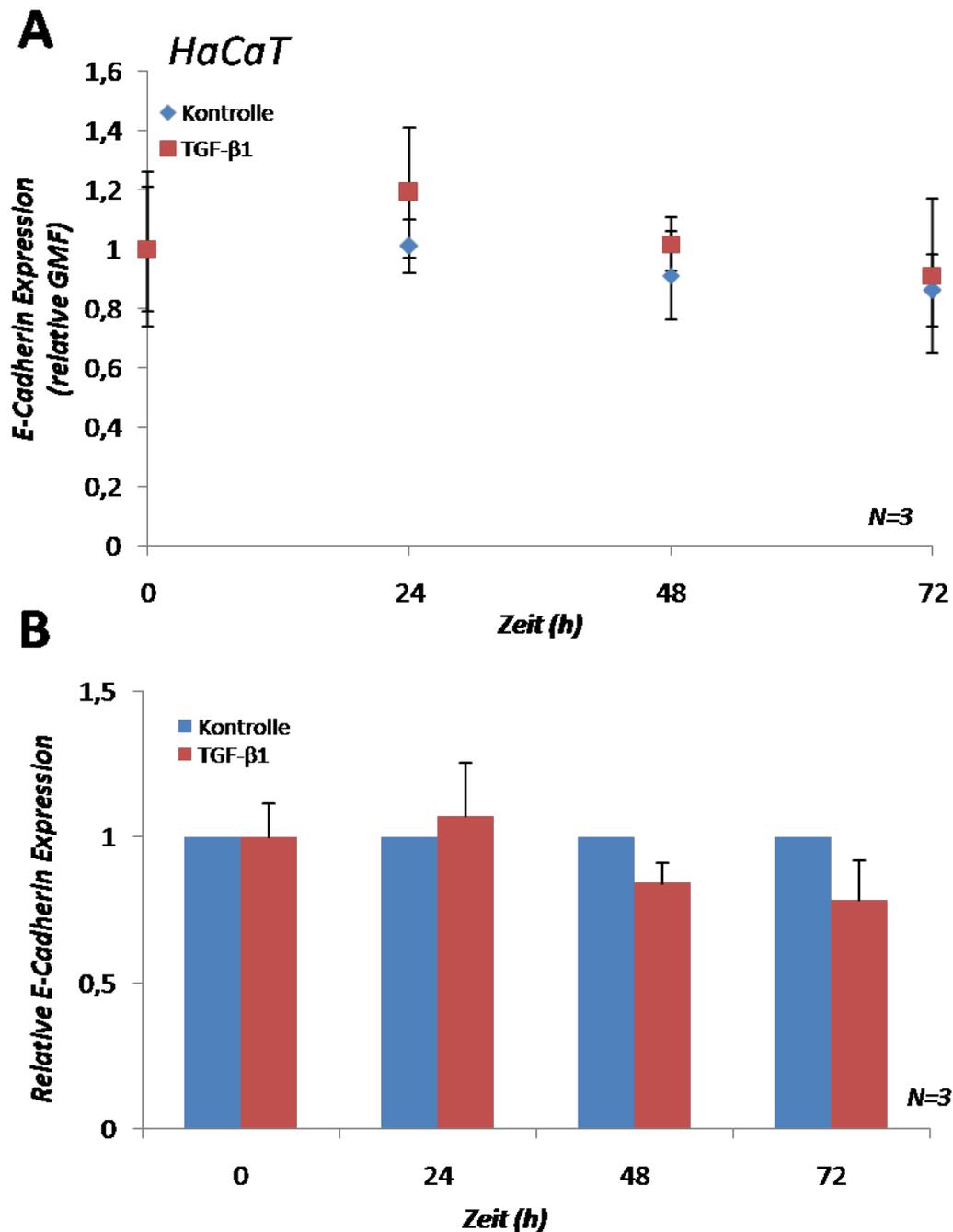
Eine signifikante Reduktion der E-Cadherin Gesamtexpression zeigte sich in UM-SCC-1 Zellen 72 h nach Exposition mit TGF- $\beta$ 1, keine signifikante Verminderung war in HaCaT, UM-SCC-3 und UM-SCC-22B Zellen darstellbar. In HaCaT und UM-SCC-3 Zellen erfolgte, verglichen mit dem initialen Expressionsmuster, eine Relokalisierung von E-Cadherin vom Zellcortex in Richtung Zytoplasma. Dieser Effekt zeigte sich stärker in HaCaT Zellen. UM-SCC-1 und UM-SCC-22B Zellen wiesen ohne TGF- $\beta$ 1 eine ähnliche diffuse Verteilung von E-Cadherin im Zytoplasma auf. In Abhängigkeit vom basalen Phänotyp korrelierte in HaCaT und UM-SCC-3 Zellen die Entstehung eines mesenchymalen Expressionsmusters mit der Bildung von  $\beta$ -Aktin vermittelten *stress fibers*.

### **3.3.1 TGF- $\beta$ 1 vermindert die Expression von E-Cadherin in UM-SCC-1 Zellen, jedoch nicht in UM-SCC-3,-22B und HaCaT Zellen**

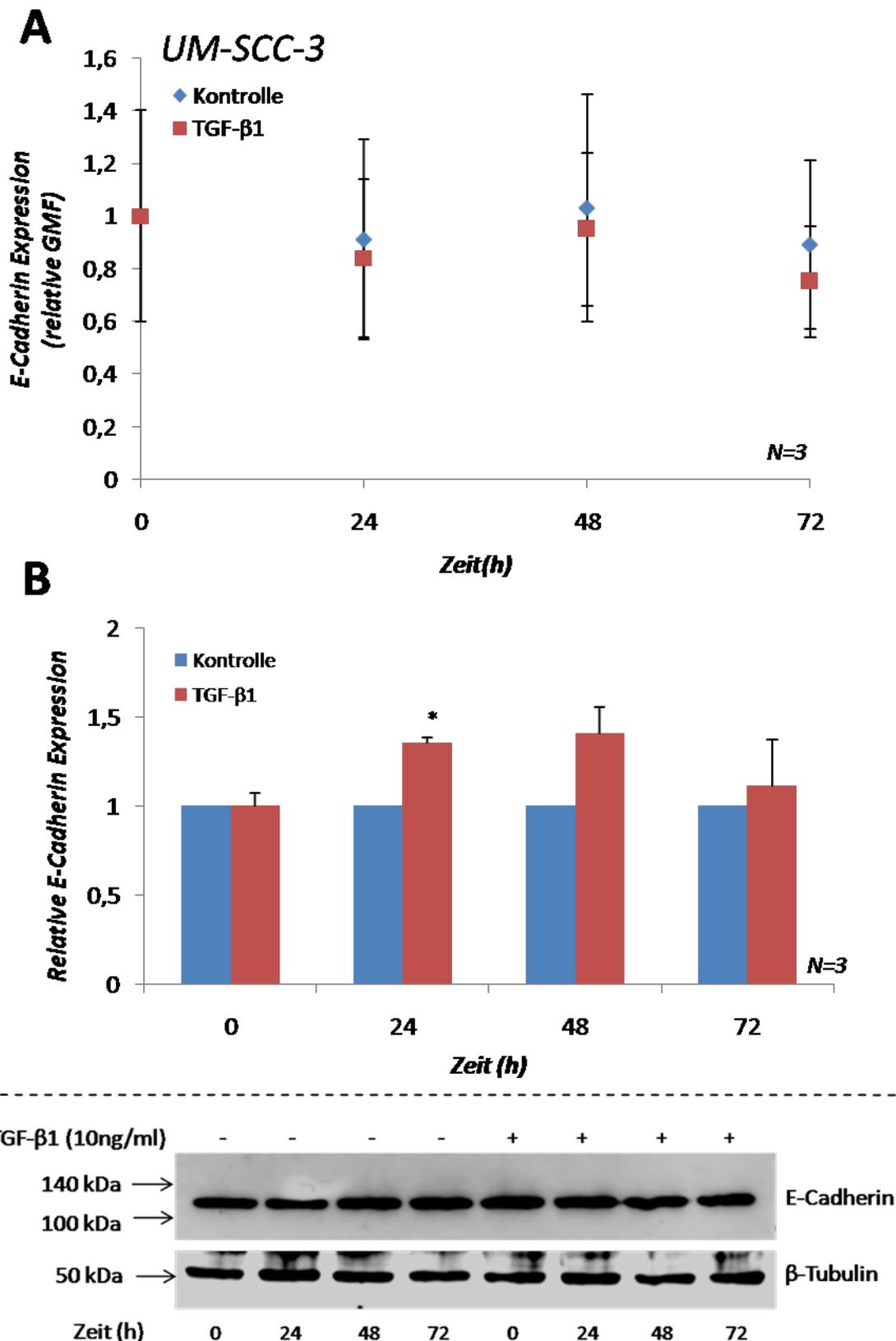
Es wurde zunächst die Gesamtexpression von E-Cadherin ohne (Vehikel) und mit TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml) nach einer Inkubationszeit von 0 h, 24 h, 48 h und 72 h mittels Western Blot und FACS Analyse beurteilt. Beide Messverfahren zeigten teilweise hohe Standardabweichungen, sodass die Beobachtungen in der Expressionsänderung größtenteils nicht signifikant und unter Vorbehalt zu bewerten sind. Es zeigte sich jedoch eine signifikant verringerte Gesamtexpression von E-Cadherin in der Zelllinie UM-SCC-1 nach 72 h Inkubation mit TGF- $\beta$ 1. Diese Abnahme war sowohl in den FACS Analysen (Abbildung 26A, \* $p=0,03$ ) als auch im Western Blot (Abbildung 26B; \*\* $p=0,006$ ) signifikant im Vergleich zu den Kontrollen. TGF- $\beta$ 1 zeigte in den anderen getesteten Zelllinien hingegen keine wesentliche Beeinflussung der E-Cadherin Expression. In HaCaT Zellen wurde eine E-Cadherin Abnahme in beiden Messverfahren beobachtet. Dieser Effekt erreichte jedoch keine Signifikanz (Abbildung 27A und B). In UM-SCC-3 Zellen wurde eine ebenfalls nicht signifikante Verminderung von E-Cadherin in der FACS Analyse nach 72 h beobachtet (Abbildung 28A). Im Western Blot zeigte sich sogar eine Zunahme des Proteins nach 24 h Inkubation (Abbildung 28B,  $t=24$  h, \* $p=0,01$ ). Hierbei ist zu beachten, dass die Untersuchungen das Gesamtprotein des E-Cadherin erfassen und keine Aussage über die subzelluläre Lokalisation erlauben. In UM-SCC-22B Zellen zeigte sich bei beiden Messverfahren kein Einfluss von TGF- $\beta$ 1 auf die E-Cadherin Expression (Abbildung 29A und B).



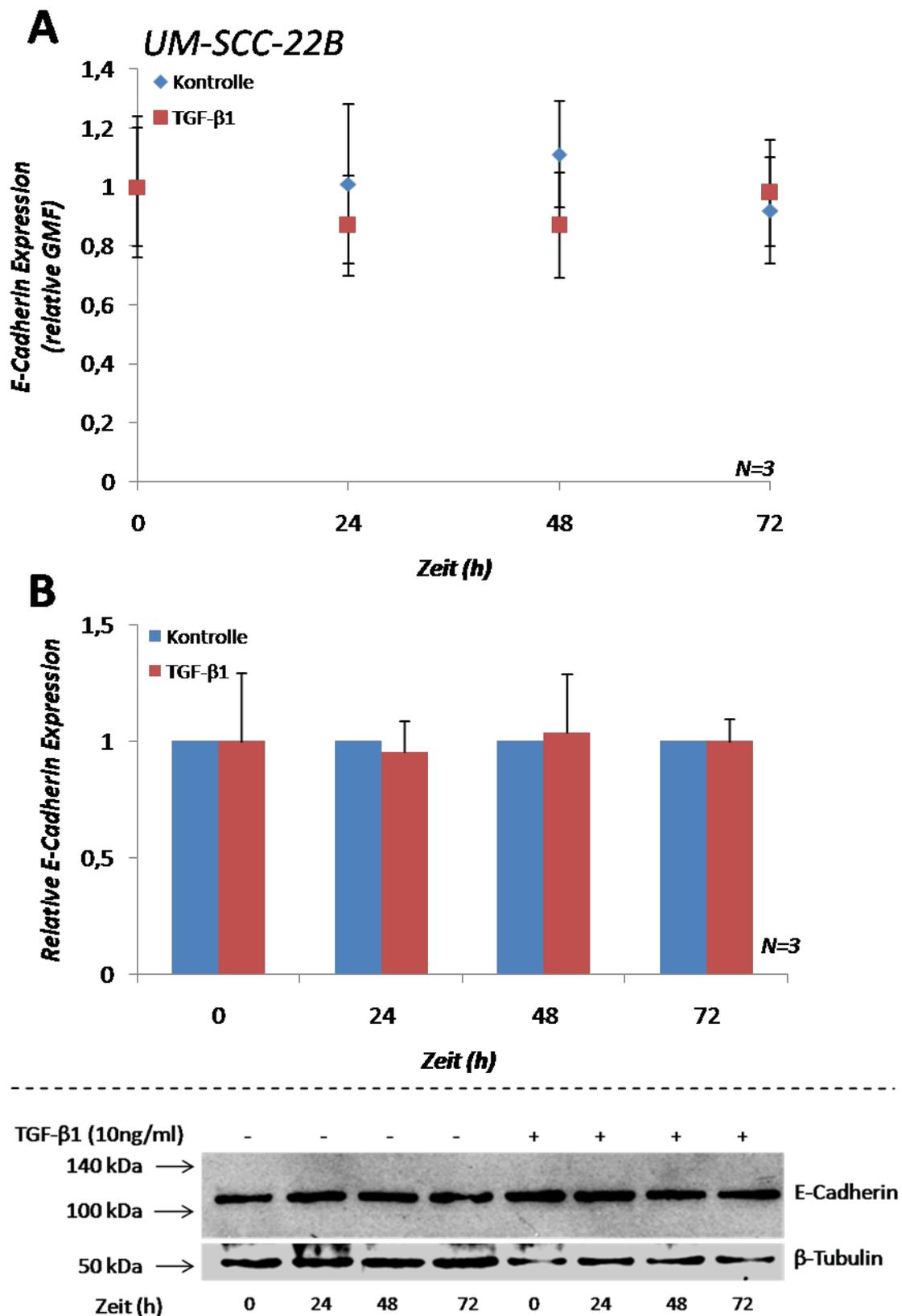
**Abbildung 26.** Die E-Cadherin Expression verringert sich in UM-SCC-1 Zellen nach Inkubation mit TGF-β1. (A) Dargestellt ist die relative geometric mean fluorescence (GMF) der E-Cadherin Expression einer FACS-Analyse in UM-SCC-1 Zellen nach einer Inkubationszeit von 0 h, 24 h, 48 h und 72 h ohne und mit TGF-β1 (10 ng/ml). Nach 72 h kommt es zu einem signifikanten Fluoreszenzabfall (\* $p=0,03$ ). (B) Quantifizierung (ImageJ) und eine beispielhafte Darstellung der relativen E-Cadherin Expression im Western Blot. Analog zur FACS-Analyse zeigt sich im Western Blot nach 72 h Inkubation mit TGF-β1 eine verminderte E-Cadherin Expression (\*\* $p=0,006$ ). Versuche  $N=3$



**Abbildung 27. TGF- $\beta$ 1 zeigt keinen Einfluss auf die E-Cadherin Expression in HaCaT Zellen.** (A) Dargestellt ist die relative geometric mean fluorescence (GMF) der E-Cadherin Expression einer FACS-Analyse in HaCaT Zellen nach einer Inkubationszeit von 0 h, 24 h, 48 h und 72 h ohne und mit TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml). (B) Quantifizierung (ImageJ) und eine beispielhafte Darstellung der relativen E-Cadherin Expression im Western Blot. In beiden Untersuchungen zeigt sich keine signifikante Änderung der E-Cadherin Expression. Versuche N=3



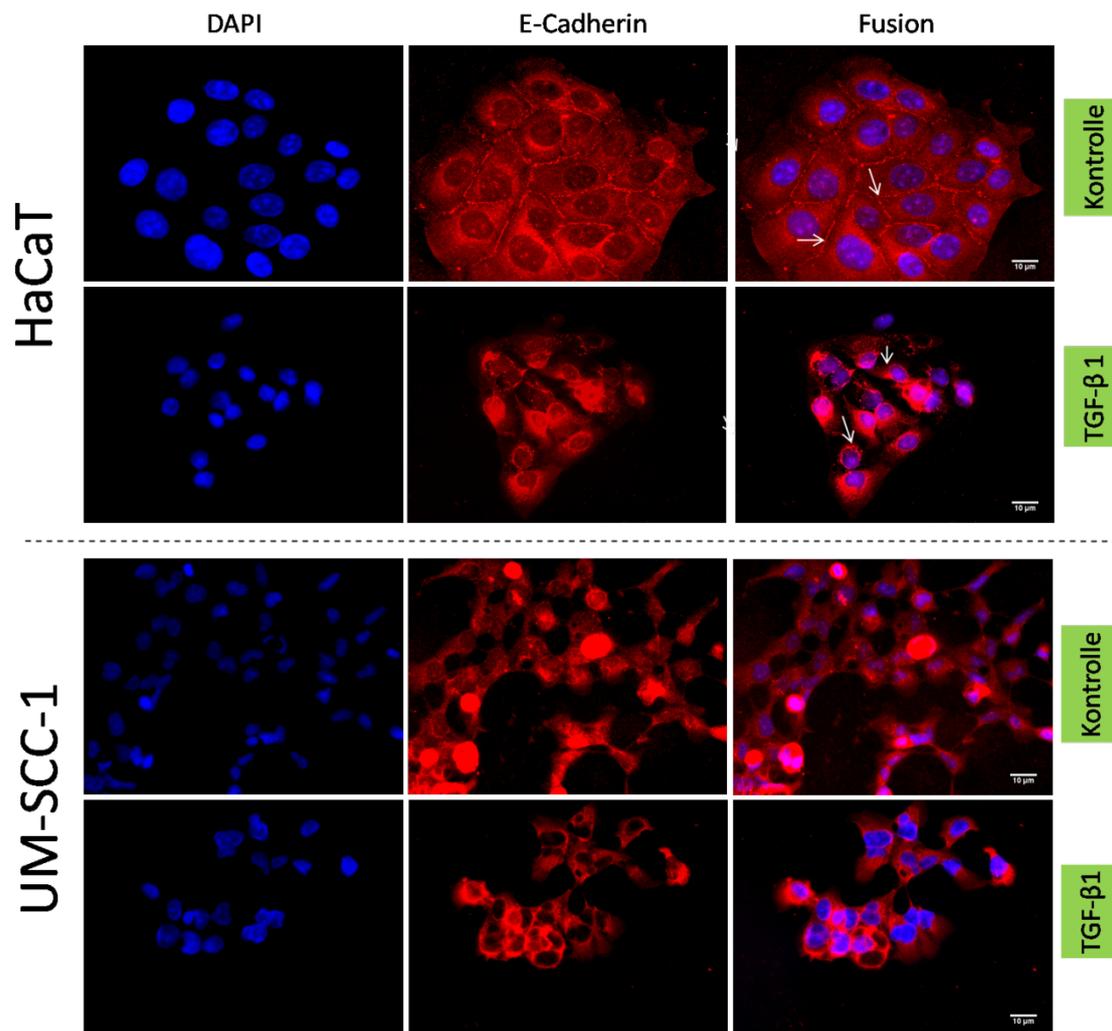
**Abbildung 28. TGF-β1 zeigt keinen Einfluss auf die E-Cadherin Expression in UM-SCC-3 Zellen.** (A) Dargestellt ist die relative geometric mean fluorescence (GMF) der E-Cadherin Expression einer FACS-Analyse in UM-SCC-3 Zellen nach einer Inkubationszeit von 0 h, 24 h, 48 h und 72 h ohne und mit TGF-β1 (10 ng/ml). (B) Quantifizierung (ImageJ) und eine beispielhafte Darstellung der relativen E-Cadherin Expression im Western Blot. Nach Exposition mit TGF-β1 für 24 h ist die E-Cadherin Expression erhöht (\* $p=0,01$ ). Versuche  $N=3$



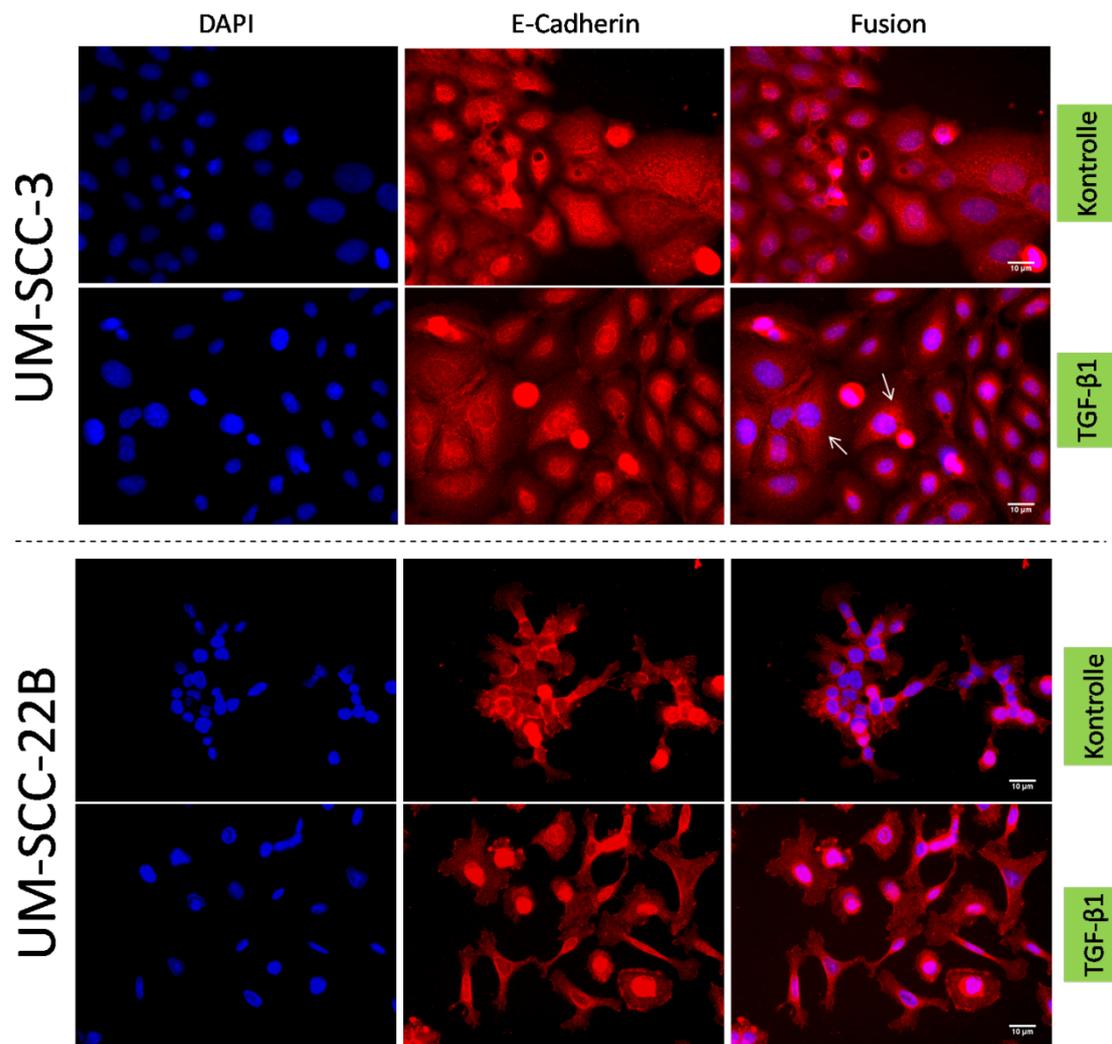
**Abbildung 29. TGF- $\beta$ 1 zeigt keinen Einfluss auf die E-Cadherin Expression in UM-SCC-22B Zellen.** (A) Dargestellt ist die relative geometric mean fluorescence (GMF) der E-Cadherin Expression einer FACS-Analyse in UM-SCC-22B Zellen nach einer Inkubationszeit von 0 h, 24 h, 48 h und 72 h ohne und mit TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml). (B) Quantifizierung (ImageJ) und eine beispielhafte Darstellung der relativen E-Cadherin Expression im Western Blot. Die Menge von E-Cadherin ändert sich nicht. Versuche N=3

### **3.3.2 Unter TGF- $\beta$ 1 Einfluss zeigt sich in HaCaT und UM-SCC-3 Zellen eine Relokalisierung von E-Cadherin**

Die in Kapitel 3.1.3 beschriebene induzierte morphologische Veränderung in HaCaT und UM-SCC-3 Zellen korrelierte nicht mit einer verminderten E-Cadherin Gesamtexpression. In einem folgenden Versuchsabschnitt sollte untersucht werden, ob die Zugabe von TGF- $\beta$ 1 eine Relokalisierung des Proteins bewirkt, die möglicherweise mit der Bildung eines mesenchymalen Expressionsmusters korreliert. Hierfür wurde die intrazelluläre Lokalisation von E-Cadherin mittels immunzytochemischer Färbungen dargestellt. Nach einer Inkubationszeit von 24 h mit einem Anti E-Cadherin Maus Antikörper (67A4 (sc-21791)) in einer Verdünnung 1:50 und entsprechendem Rhodamin gekoppelten Sekundärantikörper konnte die subzelluläre Verteilung von E-Cadherin sichtbar gemacht werden. Aufgrund der technischen Durchführung war in diesem Abschnitt keine simultane Quantifizierung von E-Cadherin möglich. Eine falsch positive Anfärbung wurde mittels Negativkontrollen ausgeschlossen. Der in der RTCA gemessene erhöhte NZI der UM-SCC-1 Zellen, welcher aufgrund der hohen Zellteilungsrate in Kapitel 3.1.3 hinsichtlich einer morphologischen Veränderung nicht genau spezifiziert werden konnte, ist möglicherweise mit einer signifikanten Verringerung von E-Cadherin, wie sie in Kapitel 3.3.1 beobachtet wurde, und damit einer Langzeitwirkung von TGF- $\beta$ 1 vermittelter EMT assoziiert. Für einen zu erwartenden Effekt, wurde deshalb eine Inkubationszeit von 72 h ohne (Kontrolle: 4 mmol/l HCL) und mit TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml) festgelegt. Die E-Cadherin Lokalisation unterschied sich ohne Zugabe von TGF- $\beta$ 1 deutlich zwischen den vier Zelllinien (Abbildung 30 und Abbildung 31). Erwartungsgemäß war E-Cadherin in HaCaT Zellen am Zellcortex nahe der Plasmamembran lokalisiert und ähnelte so einem typisch epithelialen Expressionsmuster. Im Vergleich hierzu befand sich E-Cadherin in UM-SCC-1 Zellen diffus im Zytoplasma verteilt (Abbildung 30, Kontrolle). Nach Inkubation mit TGF- $\beta$ 1 wurde in HaCaT Zellen eine Relokalisierung von E-Cadherin vom Zellcortex in Richtung Zytoplasma beobachtet. In UM-SCC-1 Zellen konnte hingegen nach TGF- $\beta$ 1 Exposition keine veränderte Lokalisation des bereits zytoplasmatischen E-Cadherin Expressionsmusters gesehen werden, sodass sich der Phänotyp der HaCaT und UM-SCC-1 Zellen nach TGF- $\beta$ 1 Gabe im Wesentlichen angeglichen hat (Abbildung 30). In UM-SCC-3 Zellen kam es ebenfalls zu einer Relokalisierung von E-Cadherin in das Zytoplasma. In UM-SCC-22B Zellen wurde nach TGF- $\beta$ 1 Exposition keine veränderte Lokalisation der E-Cadherin Expression beobachtet, wodurch der Phänotyp beider Zelllinien nach TGF- $\beta$ 1 Inkubation Ähnlichkeiten aufwies (Abbildung 31).



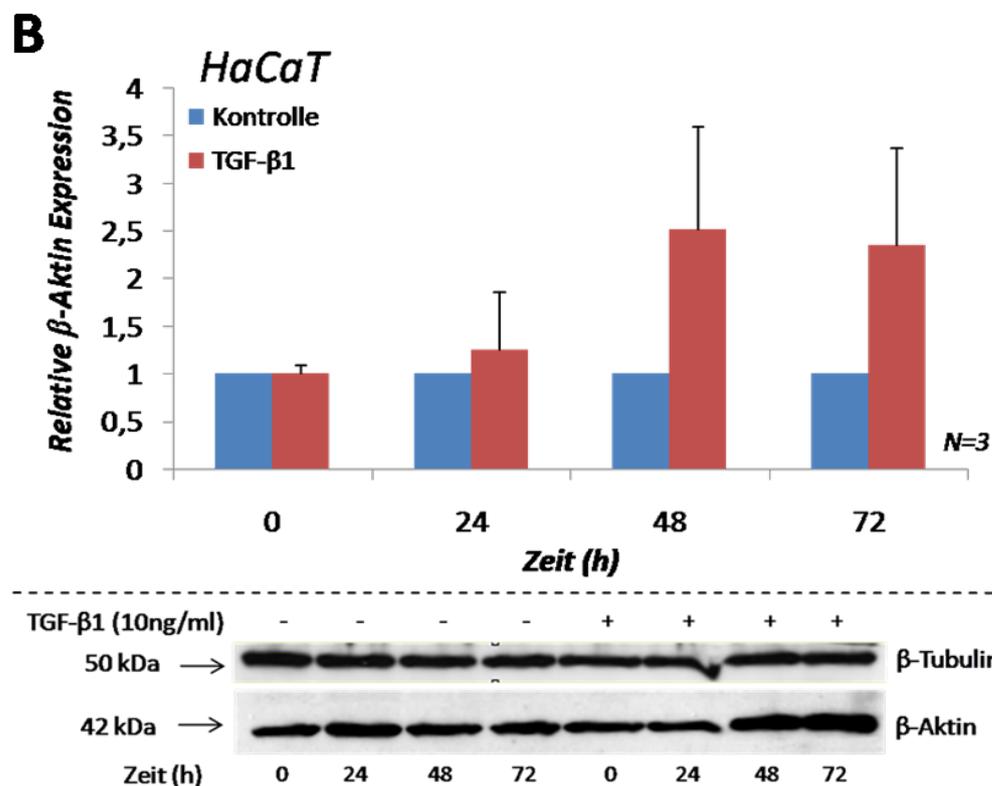
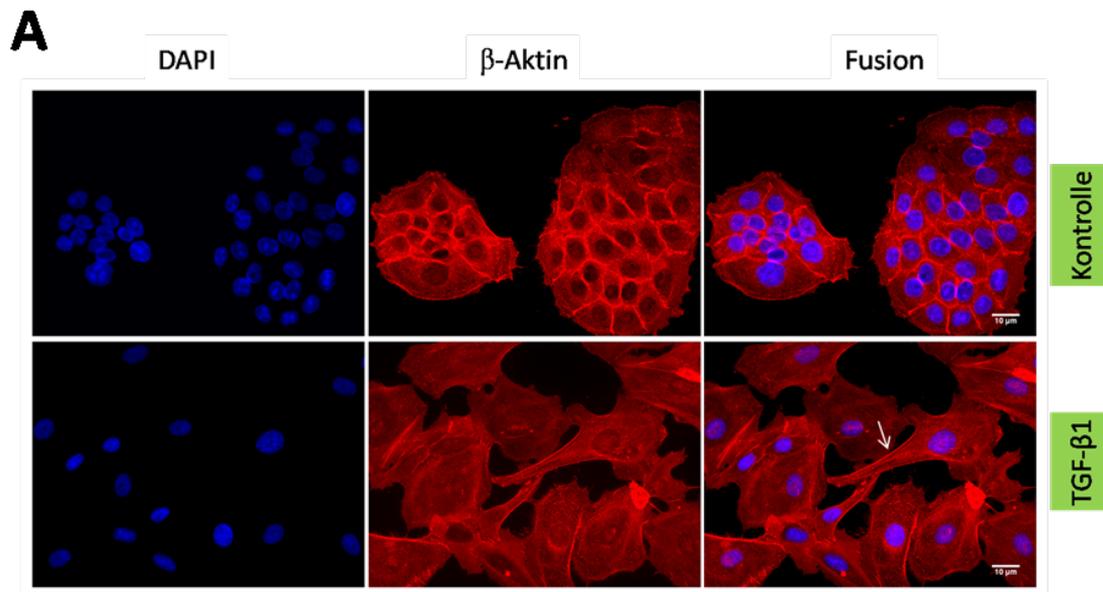
**Abbildung 30.** Die E-Cadherin Lokalisation in HaCaT und UM-SCC-1 Zellen zeigt ohne exogenes TGF-β1 deutliche Unterschiede, welche sich nach TGF-β1 Zufuhr angleichen. Dargestellt ist die E-Cadherin (Rhodamin) Lokalisation sowie Gegenfärbung mit Dapi (Zellkern). In HaCaT Zellen ohne TGF-β1 Zugabe ist E-Cadherin verstärkt am Zellkortex lokalisiert (siehe Pfeile). Nach Inkubation mit TGF-β1 (10 ng/ml, t=72 h) relokalisiert E-Cadherin in das Zytoplasma (siehe Pfeile). In UM-SCC-1 Zellen zeigt sich E-Cadherin diffus im Zytoplasma verteilt. Nach Inkubation mit TGF-β1 (10 ng/ml, t=72 h) kommt es hier jedoch zu keiner sichtbaren Änderung der subzellulären Lokalisation. Quantitative Aussagen lassen sich aufgrund unterschiedlicher Belichtungszeiten nicht treffen. Versuche N=3.



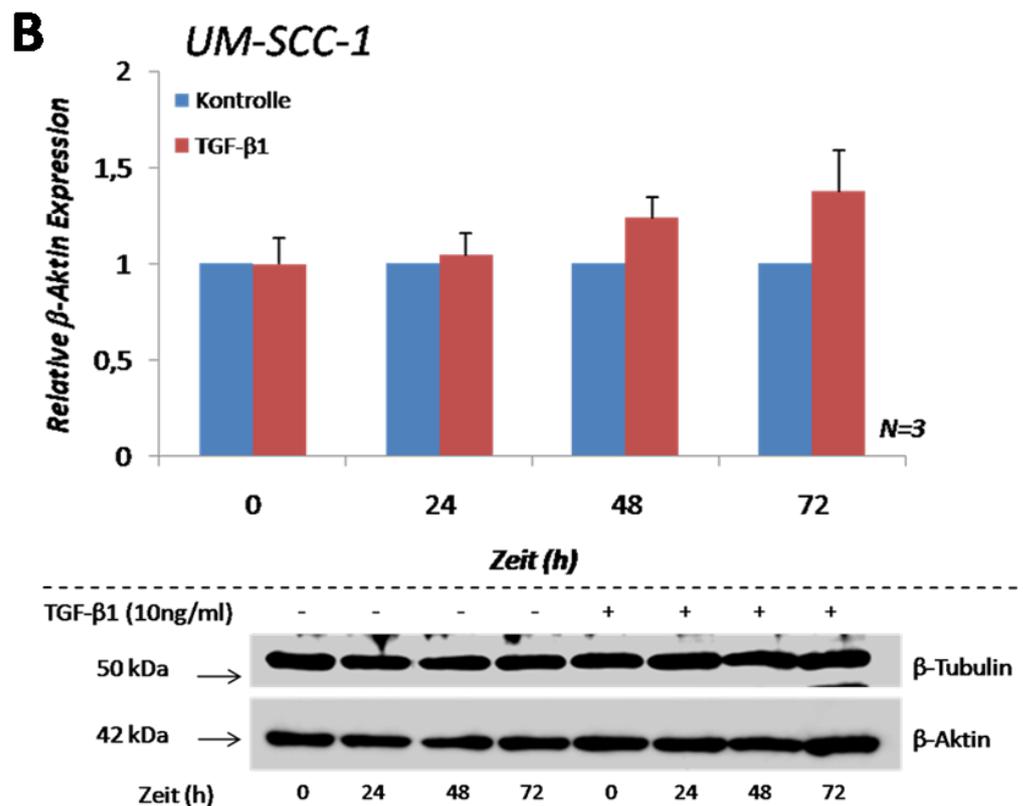
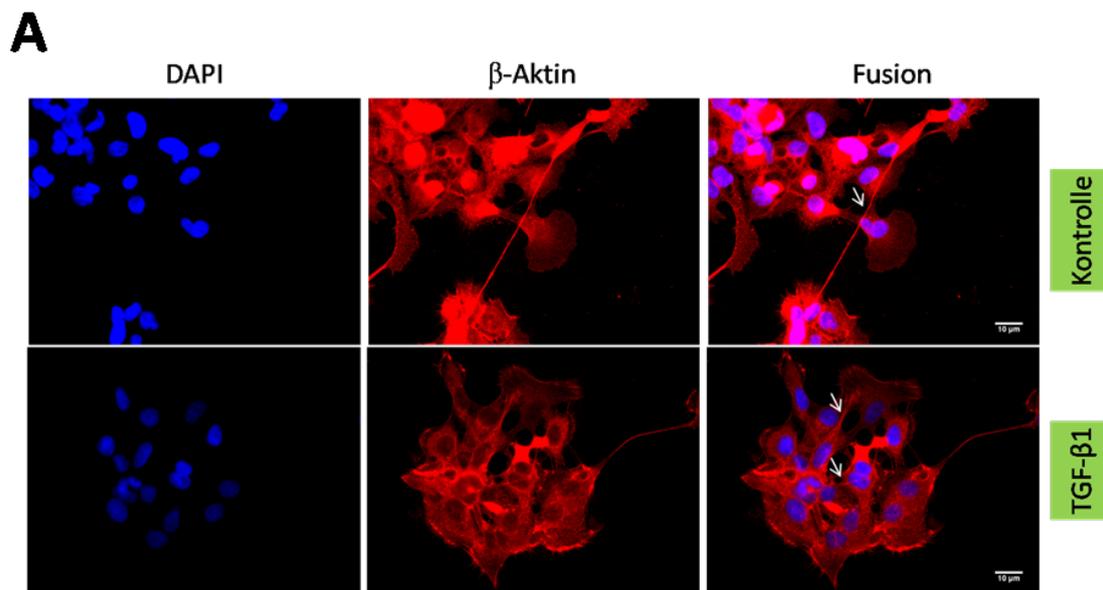
**Abbildung 31.** Die E-Cadherin Lokalisation in UM-SCC-3 und UM-SCC-22B Zellen weist ohne exogenes TGF- $\beta$ 1 Unterschiede auf, mit TGF- $\beta$ 1 kommt es in UM-SCC-3, jedoch weniger in UM-SCC-22B Zellen zu einer Relokalisation. Dargestellt ist die E-Cadherin (Rhodamin) Lokalisation sowie Gegenfärbung mit Dapi (Zellkern). In UM-SCC-3 Zellen ohne TGF- $\beta$ 1 Zugabe ist E-Cadherin verstärkt am Zellkortex und Zytoplasma lokalisiert. Nach Inkubation mit TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml, t=72 h) relokalisiert E-Cadherin in das Zytoplasma bzw. konzentriert sich perinukleär (siehe Pfeile). In UM-SCC-22B Zellen zeigt sich E-Cadherin diffus im Zytoplasma verteilt. Nach Inkubation mit TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml, t=72 h) kommt es hier jedoch zu keiner sichtbaren Änderung der subzellulären Lokalisation. Quantitative Aussagen lassen sich aufgrund unterschiedlicher Belichtungszeiten nicht treffen. Versuche N=3.

### 3.3.3 TGF- $\beta$ 1 bewirkt eine Aktin Reorganisation in HaCaT und UM-SCC-3 Zellen

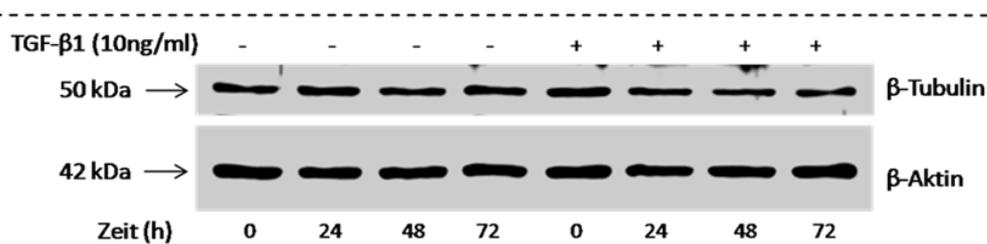
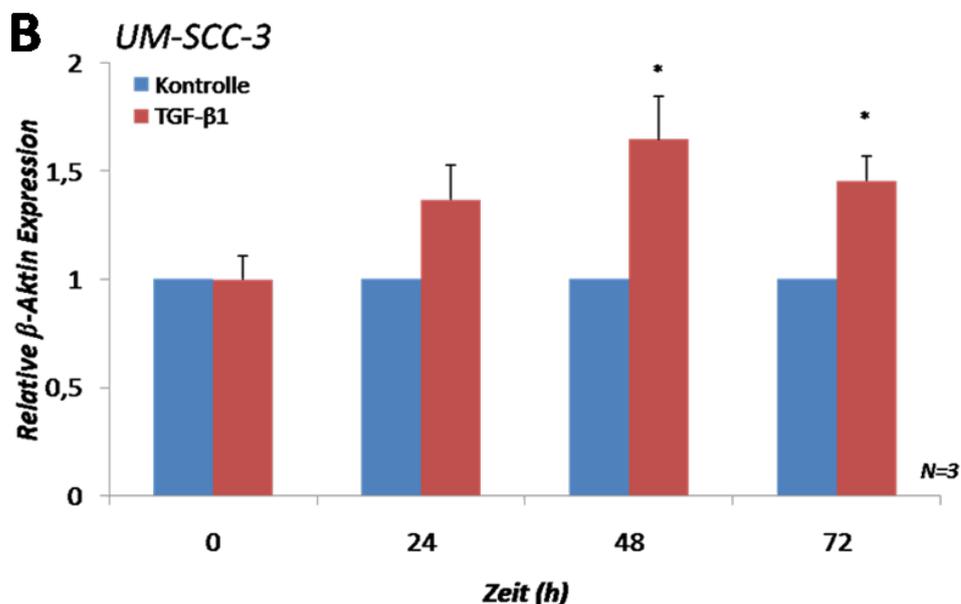
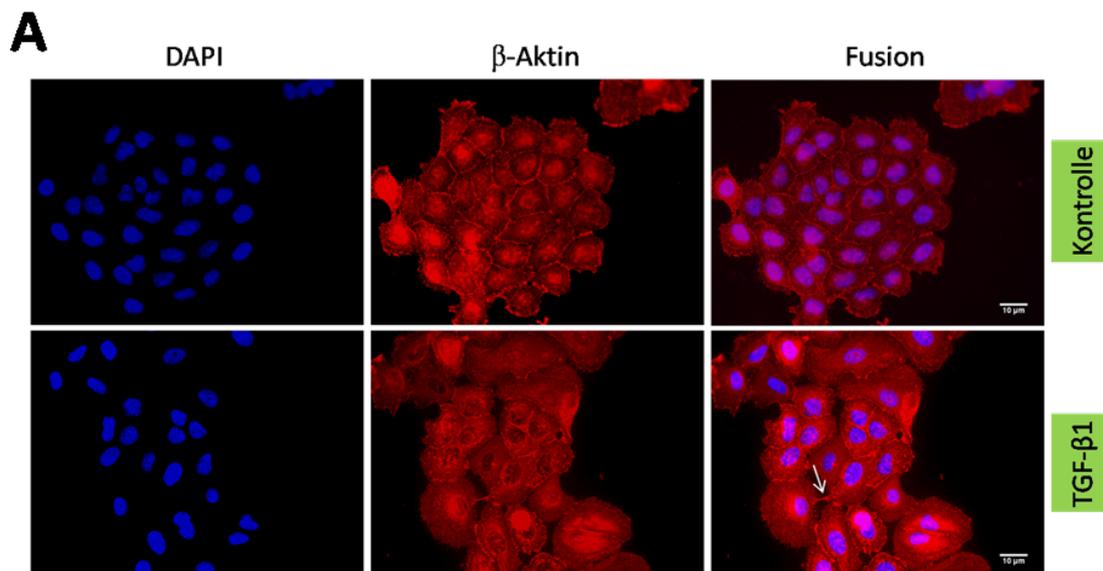
In den initialen Western Blot Versuchen wurde zunächst  $\beta$ -Aktin als Ladungskontrolle verwendet. In den mit TGF- $\beta$ 1 inkubierten Proben zeigte sich in allen Zelllinien wiederholt eine auffällige Zunahme der  $\beta$ -Aktin Expression. Da  $\beta$ -Aktin an der Bildung von *stress fibers* beteiligt ist, wurde ein Einfluss von TGF- $\beta$ 1 auf eine Zytoskelett Modulierung angenommen. Neben den initialen Western Blot Analysen wurde mittels Immunzytochemie die intrazelluläre Lokalisation von  $\beta$ -Aktin sichtbar gemacht, da eine Korrelation einer Zytoskelett Modulierung mit der Bildung eines mesenchymalen Phänotyps durch den Einfluss TGF- $\beta$ 1 vermutet wurde. Nach einer Inkubationszeit von 1 h mit einem Anti  $\beta$ -Aktin Maus Antikörper (AC-74, A 5316) in einer Verdünnung 1:500 und entsprechendem Rhodamin gekoppelten Sekundärantikörper konnte die subzelluläre Verteilung von  $\beta$ -Aktin sichtbar gemacht werden. In HaCaT zeigte sich nach Anfärbung von  $\beta$ -Aktin ein pflastersteinartiger epithelialer Zellverband mit engen Zell-Zell-Kontakten (Abbildung 32A). Nach TGF- $\beta$ 1 Inkubation fand sich eine ausgeprägte zellmorphologische Transition mit aufgelösten Zellkontakten und  $\beta$ -Aktin enthaltenden Zytoplasmaausläufern. Insgesamt zeigte sich ein fischzugartiger mesenchymal wirkender Zellverband. In Korrelation mit der immunzytochemisch sichtbaren Umverteilung von  $\beta$ -Aktin zeigte sich im Western Blot nach 48 h und 72 h eine deutlich stärkere Bandenausprägung, welche jedoch aufgrund hoher Standardabweichungen keine Signifikanz erreichte (Abbildung 32B). In geringerer Ausprägung konnte in UM-SCC-3 Zellen im Vergleich zur Kontrolle nach TGF- $\beta$ 1 Zugabe ebenfalls ein mesenchymal wirkender Zellverband beobachtet werden (Abbildung 34A). Die Ausbildung eines Zellverbands mit mesenchymalen Eigenschaften korrelierte dabei mit einer signifikant erhöhten  $\beta$ -Aktin Gesamtexpression im Western Blot (Abbildung 34B, t=48 h, \*p=0,023 und t=72 h, \*p=0,021). Die unbehandelten UM-SCC-1 Zellen hingegen bildeten lange Zytoplasmaausläufer und ähnelten mehr einem mesenchymal wirkenden Phänotyp. Nach Inkubation mit TGF- $\beta$ 1 zeigte sich optisch keine Abgrenzung zur Kontrollgruppe (Abbildung 33A). Analog dazu fand sich im Western Blot lediglich ein sehr diskreter Anstieg der  $\beta$ -Aktin Expression, welcher nicht signifikant war (Abbildung 33B). Die Zelllinie UM-SCC-22B stellte sich in der immunzytochemischen Untersuchung als loser Zellverband dar. Die Zellen bildeten unregelmäßige Zytoplasmaausläufer, welche einer mesenchymalen Zelle ähnelten. Die Kontrollen sowie mit TGF- $\beta$ 1 inkubierte Zellen zeigten hingegen keinen detektierbaren Unterschied (Abbildung 35A). In Korrelation mit der unveränderten intrazellulären Verteilung ließ sich im Western Blot keine signifikante Erhöhung der  $\beta$ -Aktin Gesamtexpression in UM-SCC-22B Zellen nachweisen (Abbildung 35B).



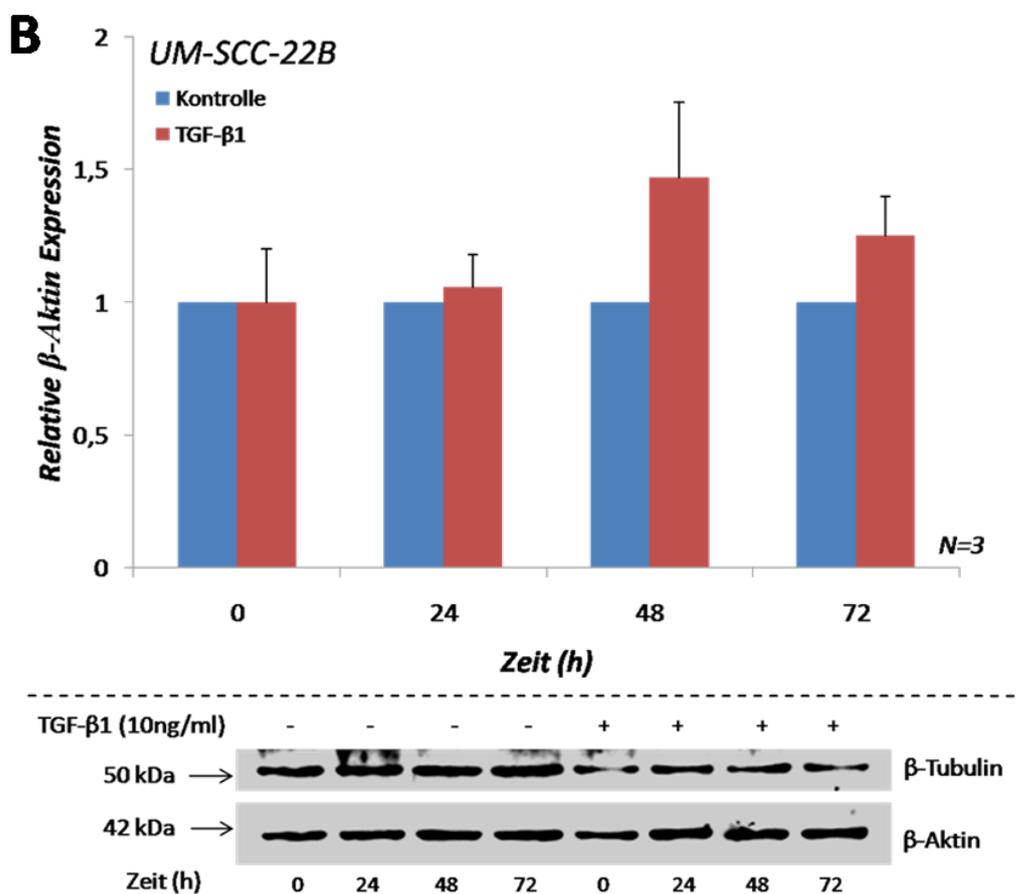
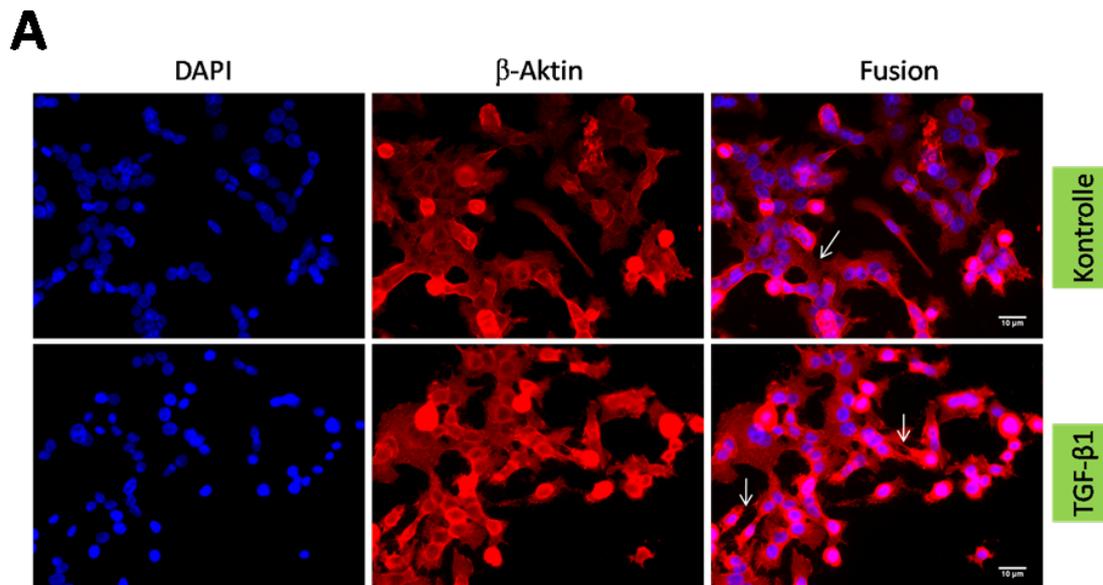
**Abbildung 32.** In HaCaT Zellen zeigt sich nach TGF- $\beta$ 1 Gabe eine Zunahme der  $\beta$ -Aktin Expression und eine subzelluläre Relokalisation mit der Bildung von stress fibers. (A) Darstellung der intrazellulären Lokalisation von  $\beta$ -Aktin (Rhodamin) sowie Gegenfärbung mit Dapi (Zellkern). In den Kontrollen (4 mmol/l HCL) zeigen die Zellen einen epitheliale Phänotyp. Es stellen sich dicht aneinandern liegende Zellen dar, wobei  $\beta$ -Aktin sich im Bereich des Zellcortex befindet und im Bereich der Zell-Zellkontakte konzentriert vorliegt. Nach Inkubation mit TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml, t=72 h) bildet  $\beta$ -Aktin Zytoplasma Ausläufer (stress fiber, siehe Pfeile). (B) Quantifizierung (ImageJ) und eine beispielhafte Darstellung der  $\beta$ -Aktin Expression im Western Blot. Die Expression von  $\beta$ -Aktin steigt unter TGF- $\beta$ 1 an, erreicht jedoch keine Signifikanz. Als Ladungskontrolle diente  $\beta$ -Tubulin. Versuche N=3



**Abbildung 33.** In UM-SCC-1 Zellen zeigt sich nach TGF-β1 Gabe keine signifikante Änderung der β-Aktin Expression bei unveränderter subzellulärer Lokalisation. (A) Darstellung der intrazellulären Lokalisation von β-Aktin (Rhodamin) in UM-SCC-1 Zellen sowie Gegenfärbung mit Dapi (Zellkern). Nach Inkubation mit TGF-β1 (10 ng/ml, t=72 h) bildet β-Aktin teilweise Zytoplasma Ausläufer. In den Kontrollen (4 mmol/l HCL) sind stress fibers zum Teil bereits vorhanden. (B) Quantifizierung (ImageJ) und eine beispielhafte Darstellung der β-Aktin Gesamtexpression im Western Blot. Die Expression von β-Aktin steigt unter TGF-β1 an, erreicht jedoch keine Signifikanz. Als Ladungskontrolle diente β-Tubulin. Versuche N=3



**Abbildung 34.** In UM-SCC-3 Zellen zeigt sich nach TGF-β1 Gabe eine Änderung der β-Aktin Expression und eine subzelluläre Relokalisation mit der Bildung von stress fibers. (A) Darstellung der intrazellulären Lokalisation von β-Aktin (Rhodamin) in UM-SCC-3 Zellen sowie Gegenfärbung mit Dapi (Zellkern). In den Kontrollen (4 mmol/l HCL) bilden die Zellen einen epithelialen Phänotyp. Es zeigen sich dicht aneinander liegende Zellen wobei β-Aktin sich im Bereich des Zellcortex konzentriert. Nach Inkubation mit TGF-β1 (10 ng/ml, t=72 h) bildet β-Aktin Zytoplasma Ausläufer (stress fibers, siehe Pfeile). (B) Quantifizierung (ImageJ) und eine beispielhafte Darstellung der β-Aktin Expression im Western Blot. Die Expression von β-Aktin steigt unter TGF-β1 signifikant an (t=48 h, \*p=0,023 und t=72 h, \*p=0,021). Als Ladungskontrolle diente β-Tubulin. Versuche N=3



**Abbildung 35.** In UM-SCC-22B Zellen zeigt sich nach TGF-β1 Gabe keine signifikante Änderung der Aktin Expression und subzellulären Verteilung. (A) Darstellung der intrazellulären Lokalisation von β-Aktin (Rhodamin) in UM-SCC-22B Zellen sowie Gegenfärbung mit Dapi (Zellkern). Kontrollen (4 mmol/l HCL) und mit TGF-β1 (10 ng/ml, t=72 h) inkubierte Zellen zeigen den gleichen Phänotyp. Stress fiber sind in Kontrollgruppe und nach Zugabe von TGF-β1 vorhanden (siehe Pfeile). (B) Quantifizierung (ImageJ) und eine beispielhafte Darstellung der β-Aktin Gesamtexpression im Western Blot. Die Expression von β-Aktin steigt unter TGF-β1 an, erreicht jedoch keine Signifikanz. Als Ladungskontrolle diente β-Tubulin. Versuche N=3

## 4 Diskussion

### 4.1 Bedeutung der EMT bei der Invasivität von soliden Tumoren

Zu der Entstehung und Progression von Tumoren trägt ein komplexes System bei, welches gekennzeichnet ist durch genetische Mutationen, Störungen von Signalweiterleitung, fehlerhafte Kommunikation mit der Mikroumgebung und dem Immunsystem sowie maligne Alterationen von zellbiologischen Abläufen. Im Kontext der Tumorprogression wurde der Mechanismus EMT als ein wesentlicher Bestandteil der Invasions-Metastasierungskaskade identifiziert (Thiery, 2002), welcher Tumorzellen solider Tumoren hilft *Escape* Mechanismen für vorzeitige Seneszenz zu entwickeln (Ansieau et al., 2008), zellbiologische Kontrollsysteme zu unterwandern, migratorische und invasive Eigenschaften zu akquirieren und eine erhöhte Plastizität Stammzeleigenschaften zu erlangen, die mit Therapieresistenzen assoziiert sind (Zhang et al., 2018). Die Expression von EMT Markern wurde in verschiedenen Tumorentitäten wie Brust-, Ovarial- und Kolonkarzinomen nachgewiesen (Pastushenko et al., 2019) und korrelierte dabei mit klinisch pathologischen Parametern wie histologischem Grad und Tumorsubtypen wie basalzell-ähnlichen Karzinomen sowie mit einer geringeren Überlebensrate und Tumorrezidiven (Thiery et al., 2009). Ebenso wurde in HNSCC Tumoren die Ausprägung von EMT Eigenschaften, wie die Bildung eines mesenchymalen Phänotyps bzw. eine verminderte E-Cadherin Expression, beobachtet, welche mit einer schlechteren Prognose assoziiert waren (Jouppila-Mättö et al., 2011; Nijkamp et al., 2011).

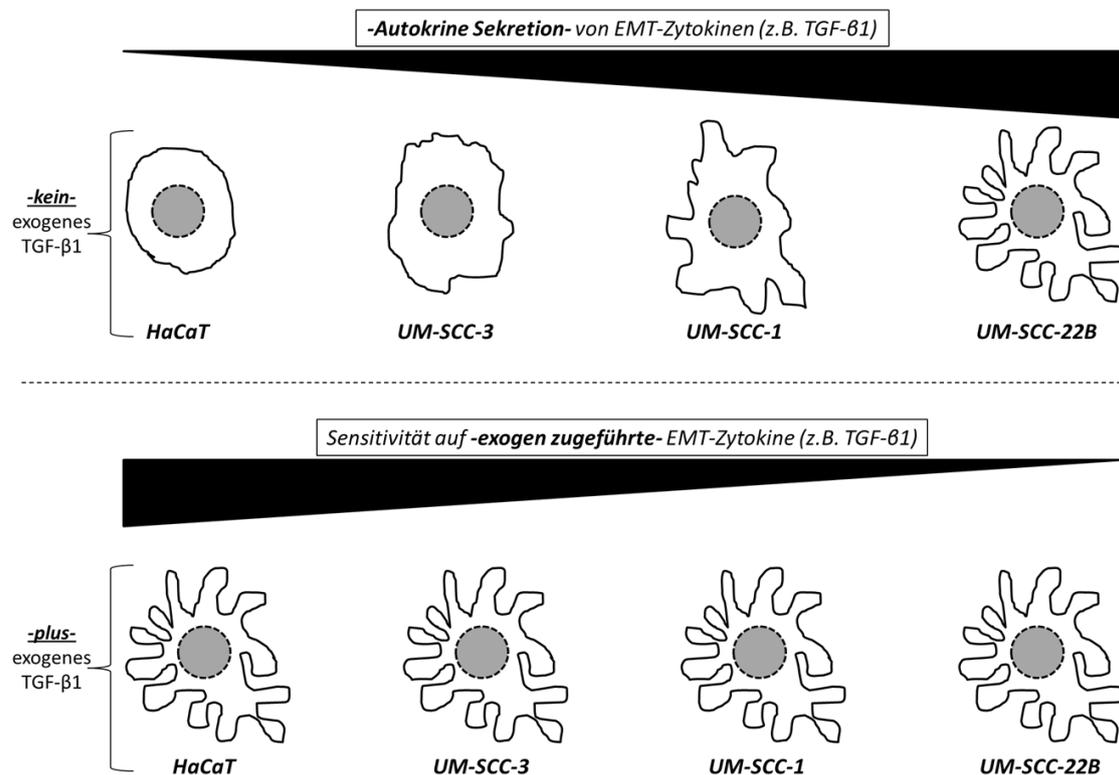
Dem gegenüber wird jedoch in einigen Publikationen die Notwendigkeit einer EMT am Metastasierungsprozess infrage gestellt, da zum Beispiel gezeigt werden konnte, dass unter Verwendung von *in vitro* und *in vivo* Modellen die Metastasierungsrate trotz Suppression von EMT über Deletion von TWIST und SNAIL bzw. Überexpression von miR-200 im Wesentlichen unbeeinflusst bleibt (Fischer et al., 2015; Zheng et al., 2016). Eine mögliche Erklärung dieser widersprüchlichen Ergebnisse liefert das Vorhandensein partiell ablaufender EMT Prozesse, welche je nach kontextabhängiger Signalwirkung aktiviert oder ausgeschaltet werden können (Pattabiraman et al., 2016). Publikationen, die einen differenzierten Blick auf die Vorgänge der EMT liefern, heben neben dem Ablauf partieller EMT Prozesse die Bedeutung von EMT Intermediärtypen *in vitro* als auch *in vivo* hervor, welche im Vergleich zu Tumorzellen mit vollständiger Ausbildung eines mesenchymalen Phänotyps sogar invasivere Eigenschaften aufweisen (Bronsert et al., 2014; Jolly et al., 2015; Schliekelman et al., 2015). Andriani und Kollegen brachten Daten hervor, dass sich Tumore unterschiedlicher Malignitätsstufen durchaus variabel bezüglich ihrer Sensitivität auf EMT Induktoren zeigen, implizierend, dass der basale Phänotyp des Tumors bereits durch EMT Faktoren beeinflusst wird (Andriani et al., 2016).

HNSCC Tumore zeigen sich in ihrem Differenzierungsmuster und Invasionspotential sehr heterogen. Ein Zusammenhang von EMT Aktivierung und Invasionspotential zur näheren Differenzierung bzw. prognostischen Relevanz war für uns von Interesse. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht wie sich die Sensitivität von HNSCC Tumoren auf EMT induzierende Faktoren unterscheidet. Dafür wurde modellhaft der Einfluss von TGF- $\beta$ 1 zu verschiedenen Stadien des EMT Programms beurteilt. Die Ergebnisse zeigten eine unterschiedliche Sensitivität auf den EMT Regulator TGF- $\beta$ 1 in den untersuchten Zelllinien. Zelllinien mit einem epithelialen Expressionsmuster sprachen besonders sensitiv auf eine EMT Induktion via Bildung eines mesenchymalen Phänotyps an. Zelllinien mit bereits mesenchymalen Charakteristika zeigten sich dagegen in ihrer Sensitivität auf TGF- $\beta$ 1 deutlich abgeschwächt.

#### 4.2 Die Rolle von TGF- $\beta$ 1 als Masterregulator der EMT

In dieser Arbeit war von Interesse zu untersuchen, ob nach Exposition mit EMT assoziierten Zytokinen EMT typische Merkmale in HNSCC Zellen hervorgerufen werden können und ob es Unterschiede in der Sensitivität des Ansprechens gibt. Hierbei wurden vier Zelllinien untersucht, die unterschiedliche anatomische Herkunftsorte des Primärtumors und unterschiedliche Malignitätsgrade aufwiesen. Beurteilt wurde das sich variabel präsentierende Expressionsmuster anhand des mikroskopischen Phänotyps, der Adhäsion und Proliferationsrate im Echtzeitproliferationsassay (RTCA), der Migrationsfähigkeit im *in vitro scratch wound assay*, sowie der subzellulären Lokalisation und Expression des EMT Markerproteins E-Cadherin und des Aktin Zytoskeletts.

Als EMT Induktor wurde das Zytokin TGF- $\beta$ 1 ausgewählt, da nach TGF- $\beta$ 1 Exposition EMT typische Merkmale wie Verlust des Zell-Zellkontakts, Zytoskelett Reorganisation mit Bildung von Aktin vermittelter *stress fiber*, sowie Abbau von E-Cadherin unter Erlangung eines mesenchymalen Phänotyps mit erhöhter Migrationseigenschaft bereits in früheren Untersuchungen *in vitro* induziert werden konnten (Miettinen et al., 1994; Xu et al., 2009). Erste Hinweise für eine TGF- $\beta$ 1 induzierte EMT wurde mit Hilfe der RTCA gewonnen, da hier zum einen insbesondere unter TGF- $\beta$ 1 von den untersuchten Zytokinen ein reproduzierbarer Effekt auf den NZI nachgewiesen werden konnte (Kapitel 3.1.1) und zum anderen ein signifikanter NZI Anstieg in allen Zelllinien beobachtet wurde, welcher in der Ausprägung variierte (Kapitel 3.1.2). In der üblicherweise als nicht invasiv geltenden Zelllinie HaCaT, die als Kontrolle eingesetzt wurde, trat unter TGF- $\beta$ 1 Exposition der deutlichste Effekt auf. Da die NZI Erhöhung durch ein verändertes Adhäsions- bzw. Proliferationsverhalten zustande kommen kann, sollte im Anschluss mit einem XTT-Assay das Proliferationsverhalten nach TGF- $\beta$ 1 Gabe untersucht werden, wobei die Daten nicht weiterführend waren (nicht gezeigt).



**Abbildung 36. Hypothese: Inverse Korrelation der TGF- $\beta$ 1 Sensitivität mit dem Grad des mesenchymalen Phänotyps von Tumorzellen.** Bei Zugabe von TGF- $\beta$ 1 gleicht sich der Phänotyp in Richtung mesenchymal an, da phänotypisch epitheliale Zelllinien besonders sensitiv reagieren und die Sensitivität auf exogenes TGF- $\beta$ 1 bei mesenchymalen Phänotypen geringer ausgeprägt ist. Dieser Sensitivitätsgradient ist möglicherweise bedingt durch eine autokrine Produktion von EMT induzierenden Zytokinen.

Mit dem Fokus auf eine Veränderung der Zellmorphologie wurde daraufhin ein *in vitro scratch wound assay* durchgeführt, welcher relevante Unterschiede des morphologischen Phänotyps nach TGF- $\beta$ 1 Zugabe zeigte (insbesondere in HaCaT und UM-SCC-3 Zellen), sodass eine Korrelation der NZI Erhöhung mit einer morphologischen Änderung anzunehmen war (Kapitel 3.1.3). In den sich anschließenden immunzytochemischen Untersuchungen bestätigte sich eine Induktion von EMT Merkmalen durch TGF- $\beta$ 1 Exposition, da sich insbesondere in HaCaT und UM-SCC-3 eine E-Cadherin Relokalisierung sowie eine Aktin vermittelte *stress fiber* Bildung darstellen ließ (Kapitel 3.3.2 und 3.3.3). Hingegen wurde in der Zelllinie UM-SCC-1 und deutlicher in UM-SCC-22B Zellen unter TGF- $\beta$ 1 Stimulation der Phänotyp nicht oder lediglich geringfügig beeinflusst. Auffällig war jedoch, dass der morphologische Phänotyp bzw. die subzelluläre Verteilung von E-Cadherin und Aktin in UM-SCC-1 und UM-SCC-22B Zellen bereits initial mesenchymale Charakteristika aufwies (Kapitel 3.1.2, 3.1.3, 3.2, 3.3.2, 3.3.3). Betrachtet man Ergebnisse anderer Gruppen, fällt auf, dass TGF- $\beta$  induzierte Phänotypänderungen insbesondere in niedrigmalignen oder benignen Zellen wie *Namru murine mammary gland* (NMuMG), *Madin-Darby Canine Kidney* (MDCK) oder HaCaT beobachtet wurden (Mandal et al., 2016; Räsänen et al., 2010; Zavadil et al., 2001).

Teilt man die untersuchten Zelllinien nach ihrem basalen mesenchymalen Phänotyp ein, wobei u.a. das subzelluläre Expressionsmuster von E-Cadherin und Aktin berücksichtigt wird (Kapitel 3.3.2, 3.3.3), scheint die Sensitivität auf eine TGF- $\beta$ 1 Stimulation vom Tumorgrad abhängig zu sein (HaCaT < UM-SCC-3 < UM-SCC-1 < UM-SCC-22B). Mit Zunahme des mesenchymalen Phänotyps scheint es zu einem *shift* in der TGF- $\beta$ 1 Wirkung zu kommen bis hin zu einem möglichen Sensitivitätsverlust. In der Gesamtschau konnte nach Zugabe von TGF- $\beta$ 1 eine Angleichung des Phänotyps in Richtung mesenchymal im Sinne einer EMT in den untersuchten Zelllinien verzeichnet werden (Abbildung 36). Dies lässt vermuten, dass zwar das Potential für eine EMT in Zelllinien mit epithelialem Phänotyp vorhanden ist, hier jedoch weniger EMT stimulierende Signale vorliegen. In Zelllinien mit einem mesenchymalen Phänotyp scheinen dagegen bereits EMT Prozesse eingeleitet worden zu sein, sodass die Zufuhr von exogenen Faktoren wie TGF- $\beta$ 1 einen geringeren Effekt ausübt. Um einen möglichen Mechanismus des beobachteten variierenden Effekts von TGF- $\beta$ 1 zu identifizieren, wurde die Rezeptoraktivität des TGF- $\beta$  RII im Western Blot quantifiziert. Frühere Untersuchungen zeigen zum Beispiel eine Korrelation von Mutationen von Komponenten des TGF- $\beta$  Signalwegs (Andriani et al., 2016; Li et al., 2015), häufig TGF- $\beta$  RII und Smad4 (Garrigue-Antar et al., 1995; Lu et al., 2004), mit dem Verlust einer TGF- $\beta$  vermittelten Wachstumshemmung, die insbesondere in späten Tumorstadien beobachtet wurde (Pardali et al., 2007; Wilentz et al., 2000). Darüber hinaus wurde bei einem *knock-down* von Smad4 in UM-SCC-1 und UM-SCC-22B Zellen eine erhöhte EMT Neigung beobachtet, welche zudem mit einer Therapieresistenz gegen den monoklonalen EGFR Antikörper Cetuximab korrelierte (Cheng et al., 2015).

Die Rezeptoraktivität des TGF- $\beta$  RII korrelierte mit der Sensitivität der Zelllinien auf EMT (Kapitel 3.2). In HaCaT und UM-SCC-3 Zellen scheint ein Rezeptor vorzuliegen, der durch die Zufuhr von exogenem TGF- $\beta$ 1 stark aktiviert werden kann. In UM-SCC-22B Zellen wurde dagegen keine signifikant erhöhte Aktivierung unter TGF- $\beta$ 1 beobachtet. Hier zeigte sich jedoch eine hohe basale Rezeptoraktivität (Abbildung 25), welche möglicherweise durch endogen produziertes TGF- $\beta$ 1 der UM-SCC-22B Zellen zu einem vergleichbaren Aktivierungsgrad des Rezeptors wie dem von HaCaT Zellen nach Zugabe von TGF- $\beta$ 1 führt. Endogen produziertes TGF- $\beta$ 1 würde in dem Fall eine weitere Signalerhöhung durch eine Sättigung des Rezeptors verhindern. Zudem könnte eine verminderte Gesamtexpression des Rezeptors vorliegen, wie die nach Langzeitinkubation beobachtete Expressionsminderung des Rezeptors in UM-SCC-1 Zellen suggeriert. Dies könnte ein Hinweis für einen möglichen Abbau nach Internalisierung des Rezeptors bei einem Überangebot an TGF- $\beta$ 1 sein, welches wiederum eine erhöhte Resistenz gegenüber exogenem TGF- $\beta$ 1 oder anderen EMT Faktoren zur Folge hat. Inwiefern TGF- $\beta$ 1 einen Einfluss auf *downstream* gelegene Signalwegskomponenten nimmt, wie z.B. Smad4, konnte in eigenen Untersuchungen nicht abschließend geklärt werden (Daten nicht gezeigt).

Neben Variablen in den Signalwegkomponenten lässt der unterschiedliche epitheliale bzw. mesenchymale Phänotyp in Korrelation mit der abnehmenden Sensitivität auf TGF- $\beta$ 1 vermuten, dass hier eine zunehmende Expression an Faktoren wie TGF- $\beta$ 1 vorliegt und zur Aufrechterhaltung eines mesenchymalen Phänotyps beiträgt. Da mögliche Einflussgrößen wie parakrin sezernierte Faktoren, insbesondere aus dem Tumormikromilieu von *in vivo* Modellen, in dieser Arbeit vernachlässigt werden können, da ausschließlich *in vitro* Untersuchungen an isolierten Zelllinien durchgeführt wurden, scheint eine unterschiedliche autokrine Produktion von TGF- $\beta$ 1 oder anderen EMT Zytokinen in den Zelllinien für die Ausprägung des basalen Phänotyps mit der variablen Sensitivität auf TGF- $\beta$ 1 in Verbindung zu stehen, welche zu einer abnehmenden Sensitivität auf exogen zugeführtes TGF- $\beta$ 1 in einer fortgeschrittenen Tumorphase führt. Diese Hypothese basiert auf den vorliegenden Untersuchungen und konnte in dieser Arbeit nicht abschließend bewiesen werden, da es in eigenen Versuchen technisch nicht gelang TGF- $\beta$ 1 im Lysat der eingesetzten Zelllinien nachzuweisen (Daten nicht gezeigt). In unabhängigen Publikationen wurde in metastatischen Tumoren jedoch eine erhöhte TGF- $\beta$ 1 Expression gemessen (Lu et al., 2004; Massagué, 2008), wodurch ein Zusammenhang einer erhöhten autokrinen TGF- $\beta$ 1 Expression mit der Ausprägung eines mesenchymalen Phänotyps sowie einer erhöhten Metastasierungsneigung in HNSCC Tumoren suggeriert wird (Lu et al., 2004; Richter et al., 2011). Der Grund für die indifferenten Ergebnisse ist möglicherweise eine unzureichende Sensitivität der verwendeten Messverfahren, weshalb in weiterführenden Untersuchungen zur Detektion von endogenem TGF- $\beta$ 1 zum Beispiel eine quantitative Analyse mittels PCR zum Einsatz kommen sollten. Zudem wäre eine suffiziente Neutralisierung von endogen produziertem TGF- $\beta$ 1 bzw. anderer relevanter EMT Zytokine, durch spezifische etablierte Inhibitoren, wie es im RTCA versucht wurde (Daten nicht gezeigt), zur genaueren Differenzierung des TGF- $\beta$ 1 Effekts auf den Ausgangs-Phänotyp sinnvoll. Hier wäre unter anderem ein *knockdown* von TGF- $\beta$ 1 zu favorisieren. Alternativ sollte eine Transfektion der untersuchten Zelllinien mit TGF- $\beta$ 1 erfolgen, um beurteilen zu können, ob hierdurch Morphologie und Invasivität beeinflusst werden können.

Im Prinzip wurde in dieser Arbeit eine EMT Induktion mittels morphologischer Änderung des Phänotyps in Zelllinien mit bekanntem unterschiedlichem Invasionspotential bzw. Malignitätsgrad gemessen. Hinweise für eine erhöhte Migrationseigenschaft nach TGF- $\beta$ 1 Exposition, insbesondere in HaCaT Zellen ergaben dabei die Beobachtungen des *in vitro scratch wound assay* (Kapitel 3.1.3). Stellt der *in vitro scratch wound assay* zwar eine praktikable Methode zur Beurteilung der Migrationseigenschaft dar, ist jedoch seine Aussagekraft aufgrund potentieller Störfaktoren begrenzt (dargelegt in Kapitel 2.2.4). Für eine differenzierte Beurteilung sollte bei der Versuchsdurchführung die Zellformation an der Grenze zum zellfreien Bereich berücksichtigt werden (Glaß et al., 2012), wie es in der vorliegenden Arbeit unter Verwendung der Küstenlänge versucht wurde.

Für ein detailliertere Untersuchung des Migrationsverhaltens wäre die Verwendung eines Zeitraffer-Mikroskopiesystem sinnvoll, da hierbei das Migrationsverhalten von einzelnen Zellen dokumentiert werden kann und kürzere Zeitintervalle miterfasst werden. Alternativ kann die Verwendung eines Woundmakers<sup>TM</sup> (EssenBioscience, 2015) erfolgen, welcher eine Echtzeit-Datenerhebung ermöglicht und geringeren Messschwankungen unterliegt.

Inwieweit der induzierte mesenchymale Phänotyp bzw. die erhöhte Migrationseigenschaft mit einem erhöhten Invasionspotential assoziiert ist, lässt sich anhand der durchgeführten Untersuchungen nicht beurteilen. Um eine Korrelation von erhöhter Motilität und Invasionsneigung zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit der Versuch unternommen, das Invasionspotential der Zelllinie UM-SCC-3 ohne und nach Exposition mit TGF- $\beta$ 1 zu testen. Die Ergebnisse mittels *electrical resistance breakdown assay*, ein von der AG als geeignet publiziertes Verfahren zur differenziellen Invasionsmessung von HNSCC Tumoren (Mandic et al., 2004), wiesen jedoch keine eindeutigen Effekte auf (Daten nicht gezeigt). Für die Untersuchung einer erhöhten Invasionsbereitschaft von HNSCC Zelllinien nach Exposition von TGF- $\beta$ 1 sollten spezifische Messverfahren zum Einsatz kommen wie z.B. der Transwell-Invasionsassay. Dabei wird die Invasionskapazität der Zellen beurteilt, wobei diese entlang eines Gradienten für ein chemisches Attraktans in eine Extrazellulärmatrix eindringen bzw. hindurch wandern (Justus et al., 2014).

Zeigen eine Vielzahl an Untersuchungen zwar eine Korrelation von mesenchymalem Phänotyp und erhöhter Invasionsneigung (Han et al., 2005), gibt es jedoch auch Hinweise, dass eine allein durch TGF- $\beta$ 1 induzierte Änderung des Phänotyps nicht zwangsweise zu einer erhöhten Invasionsbereitschaft führt, sondern weitere Faktoren wie zum Beispiel eine *ras* Mutation vorhanden sein müssen (Lu et al., 2006; Miyazono, 2009). In NMuMG Zellen wurde unter TGF- $\beta$  eine zeitabhängige und reversible EMT induziert, die jedoch erst nach *ras* Transfektion stabilisiert werden konnte (Miettinen et al., 1994). Räsänen und Kollegen beobachteten in einem Modell im Vergleich von benigner bzw. durch *ras* transformierte HaCaT Zellen nach TGF- $\beta$ 1 Stimulation zwar eine hohe Sensitivität benigner HaCaT Zellen (Änderungen der Zell-Morphologie und eine erhöhte Migration), jedoch eine konstante E-Cadherin Expression und kein erhöhtes Invasionspotential (Räsänen et al., 2010). Erst durch eine *ras* Mutation wurde eine vollständige EMT unter Aktivierung von SNAIL und dem Abbau von E-Cadherin beobachtet (Davies et al., 2005; Richter et al., 2011; Räsänen et al., 2010).

In Anbetracht der Evidenz von EMT Intermediärtypen *in vivo* und *in vitro* in HNSCC, welche die Bedeutung inkompletter EMT Prozesse hervorheben (Pastushenko et al., 2019), wird möglicherweise auch die Beobachtung erklärt, dass zwar eine Relokalisierung von E-Cadherin in HaCaT und UM-SCC-3 stattfand, jedoch kein Abbau, während in der Zelllinie UM-SCC-1 eine Abnahme der E-Cadherin Expression nachzuweisen war (Kapitel 3.3.1).

Analog beobachteten Umbreit und Kollegen in UM-SCC-22B Zellen nach Exposition von EGF bzw. von EGF/ TGF- $\beta$ 1 Ko-Stimulation zwar eine erfolgreiche Induktion von EMT Prozessen, wie morphologische Veränderungen und eine erhöhte Expression von Vimentin, jedoch fand sich dabei paradoxerweise eine Erhöhung der E-Cadherin Expression (Umbreit et al., 2014). In Anlehnung an die eigenen Untersuchungen zeigte sich zudem in der Zelllinie UM-SCC-22B eine verminderte Sensitivität auf EMT induzierende Zytokine im Vergleich mit anderen Zelllinien.

Es ist nur folgerichtig, dass durch die isolierte *in vitro* Untersuchung eines Zytokins lediglich ein partieller Blick auf den EMT Entstehungsprozess gewährt werden kann und sogar dessen Wirkungsspektrum innerhalb der EMT von zahlreichen anderen Faktoren abhängig ist. In diesem Kontext sollen einige weitere untersuchte Einflussgrößen auf TGF- $\beta$ 1 induzierte EMT erwähnt werden. So scheint die Sensitivität von TGF- $\beta$ 1 nicht nur abhängig von der Zellklusphase zu sein, da in der G2-Phase eine drastisch erhöhte Zellmotilität nach TGF- $\beta$ 1 Exposition beobachtet wurde (Zicha et al., 1999). Kaplan und Kollegen fanden auch eine lineare Korrelation vom Konfluenzzustand untersuchter Zelllinien *in vitro* mit einer Hemmung der TGF- $\beta$ 1 vermittelten EMT Induktion (O'Connor et al., 2016; Tamiya et al., 2010). Dies deckt sich mit den Beobachtungen aus initialen Versuchen dieser Arbeit. Im Western Blot wurden die Proben zunächst zum gleichen Zeitpunkt ausgesät und je nach vorgegebener Inkubationszeit gesammelt, sodass zum Zeitpunkt der Sammlung unterschiedliche Konfluenzzustände vorlagen. Interessanterweise wurde in den Kontrollen abhängig von der Länge der Inkubationszeit eine zunehmende Auto-Aktivierung von TGF- $\beta$  RII und Erk gemessen (Daten nicht gezeigt). Die erhöhte Autoaktivierung scheint möglicherweise eine, durch extern zugeführtes TGF- $\beta$ 1 induzierte, EMT zu erschweren.

#### 4.2.1 TGF- $\beta$ 1 und seine kontextabhängige Wirkung *in vivo*

Die Möglichkeit einer EMT Induktion mittels TGF- $\beta$ 1, wie sie in dieser Arbeit an isolierten HNSCC Zelllinien gezeigt werden konnte, macht das Zytokin zu einem etablierten Masterregulator dieses Prozesses und offenbart dessen tumorförderndes Potential. Gleichzeitig ist TGF- $\beta$ 1 durch die Regulation wachstumshemmender Prozesse, nicht nur in physiologischen Abläufen sondern auch in Stadien früher Tumoren, ein potenter Tumorsuppressor. Diese zweiseitige Wirkung erschwert eine Konkretisierung der TGF- $\beta$ 1 vermittelten Wirkung auf die EMT. Für eine Differenzierung ist möglicherweise die Betrachtung der kontextspezifischen Wirkung *in vivo* notwendig, da hier das komplexe Zusammenspiel verständlicher wird. Im Rahmen der Tumorprogression wird ein *switch* von Tumorsuppression auf Tumorpromotion durch Veränderung bzw. Verminderung der TGF- $\beta$ 1 Sensitivität durch erhöhte Expression oder Aktivierung des Liganden vermutet (Yang et al., 2010).

Konkret wirkt ein stetiges TGF- $\beta$  Signal hemmend auf das Epithelwachstum und führt bei Überexpression des Liganden über parakrine Produktion z.B. aus Stromazellen zu einem Sensitivitätsverlust, der wiederum einen tumorfördernden Effekt inne hat (Dumont et al., 2003; Subramanian et al., 2004). Dieser Mechanismus führte in Mausmodellen zur Hemmung des Tumorwachstums in frühen Stadien und zur Förderung der Metastasierung von Karzinomen in späten Stadien (Lu et al., 2004; Weeks et al., 2001; White et al., 2010).

Für die unterschiedliche Wirkung von TGF- $\beta$ 1 scheint außerdem dessen Regulation des Immunsystems wichtig zu sein. Im Fokus aktueller Untersuchungen steht TGF- $\beta$  als bedeutender Regulator von Immunzellen, welche die Tumormikroumgebung (TME) infiltrieren (Yang, 2010). TGF- $\beta$ 1 inhibiert die Funktion von Natürlichen Killerzellen (NK) und CD8+ zytotoxischen T Lymphozyten (CTL) (Yang, 2010) und aktiviert bei Störungen des TGF- $\beta$  Signalwegs, zum Beispiel eine Herabregulierung von TGF- $\beta$ RII, die Expression von Chemokinen und deren Rezeptoren wie CXCL5, SDF1 und CXCR4. Dies bewirkt eine Rekrutierung von körpereigenen *myeloid immune suppressor cells* (MISCs) in die TME und konsekutiver Erhöhung von MMPs und TGF- $\beta$  Expression, welche wiederum den tumorfördernden Effekt von TGF- $\beta$  unterstützen (Yang, 2010). Neben seiner systemischen supprimierenden Wirkung auf das Immunsystem bewirkt TGF- $\beta$ 1 eine direkte Veränderung in der TME durch Förderung der Einwanderung von inflammatorischen/Immun- Zellen und Tumor assoziierten Fibroblasten (TAFs) (Yang et al., 2010). Der Einfluss von TGF- $\beta$ 1 an der Schnittstelle von Tumorregulation und Immunsystem liefert mögliche effektive Therapieansätze und Biomarker für Patienten (Yang et al., 2010).

### 4.3 Die Rolle weiterer Zytokine bei der EMT

Neben TGF- $\beta$ 1 sind auch weitere Zytokine, wie EGF, HGF, Wnt, Notch und BDNF Regulatoren der EMT. Eine Rolle der TGF- $\beta$  Isoformen 2 und 3 wurde zwar im Kontext der EMT bei der Gaumenschlussbildung (TGF- $\beta$ 3) und Embryogenese von Herzkissen (TGF- $\beta$ 2) identifiziert, im Zusammenhang mit der Karzinogenese wurde jedoch nahezu in allen *in vitro* und *in vivo* Modellen (Bierie et al., 2006) mit TGF- $\beta$ 1 gearbeitet. Von Interesse war daher eine mögliche relevante EMT Wirkung der anderen Isoformen auf HNSCC Tumorzellen.

HGF ist im Zusammenhang mit EMT für seinen Einfluss auf die Entstehung eines mesenchymalen Phänotyps bekannt und fand hier ebenfalls Verwendung. Als Messverfahren der Zytokinwirkung wurde das RTCA System verwendet. Hierbei konnte erstens die optimale Wirkkonzentration der einzelnen Zytokine im direkten Vergleich ermittelt werden. Zweitens erfolgte ein großer Informationsgewinn durch die Möglichkeit der Echtzeitmessung und Erfassung mehrerer relevanter Eigenschaften der EMT wie Proliferation und Migration, sowie Zellformänderung, durch Messung der variierenden Bodeninteraktion. Erwartungsgemäß erfolgte unter TGF- $\beta$ 1 ein reproduzierbarer Anstieg des NZI.

Im Vergleich wurde unter HGF ebenfalls ein erhöhter NZI verzeichnet (Kapitel 3.1.1). HGF bewirkt in niedrigmalignen Zelllinien wie MDCK, HepG2 und HuH6 insbesondere phänotypische Änderungen durch Auflösung der Zell-Zellkontakte und Erhöhung der Motilität (Grotegut et al., 2006; Ravikrishnan et al., 2016), sodass HGF insbesondere an der frühen Phase der EMT beteiligt zu sein scheint. Eine E-Cadherin Repression, konnte unter alleiniger Wirkung von HGF jedoch nicht erreicht werden (Grotegut et al., 2006). Wheeler und Kollegen zeigten unter Co-Kultivation von Tumor assoziierten Fibroblasten (TAFs) mit UM-SCC-1 Zellen eine erhöhte Proliferation und Migration, die mittels Inhibition von HGF reversibel war (Wheeler et al., 2014). Der Effekt kann jedoch durch Interaktion mit anderen im TAF Medium enthaltenen EMT Faktoren, wie SDF-1-alpha und TGF- $\beta$  (Kuperwasser et al., 2004), in ihrer Wirkung potenziert worden sein. Die Abhängigkeit anderer Komponenten der HGF Wirkung in einer späten EMT Phase zeigten Lewis und Kollegen, indem eine autokrine Produktion von TGF- $\beta$ 1 aus dem Tumorstroma zur Aktivierung einer autokrinen HGF Produktion mit nachfolgend erhöhter Metastasierung führte (Lewis et al., 2004).

Es konnte dagegen kein erhöhter NZI mit TGF- $\beta$ 2 und - $\beta$ 3 im RTCA in UM-SCC-3 Zellen induziert werden (Kapitel 3.1.1). Da weitere Faktoren, wie E-Cadherin Expression, Aktin vermittelte Zell-Morphologie und Migration nicht weiter untersucht wurden und die Stimulation lediglich beispielhaft für eine Zelllinie erfolgte, ist die Aussagekraft über die Wirkung von TGF- $\beta$ 2 und - $\beta$ 3 limitiert. In den Vorversuchen erwies sich das RTCA Verfahren in Bezug auf die untersuchte Wirkung von TGF- $\beta$ 1 als sehr sensitiv, sodass sich zumindest eine geringere Wirkung der beiden Isoformen im Vergleich zu TGF- $\beta$ 1 auf eine EMT Induktion vermuten lässt. Betrachtet man die aktuelle Datenlage, sind zwar alle drei Isoformen TGF- $\beta$ 1-3 im EMT Prozess involviert, jedoch existieren wenige Arbeiten mit TGF- $\beta$ 2 und - $\beta$ 3 als EMT Modulatoren bei der Tumorprogression. In den Untersuchungen, in denen ein Einfluss von TGF- $\beta$ 2 oder - $\beta$ 3 auf EMT Vorgänge des Typ 3 (Tumorprogression, Erklärung in Kapitel 1.2) gezeigt wurde, war die Wirkung jedoch von weiteren EMT Faktoren abhängig (Cui et al., 1996; Kleczko et al., 2015; Krasagakis et al., 1998; Nakamura et al., 2015). Eine TGF- $\beta$ 2 Überexpression in malignen Melanomen war mit einer Ko-Expression von TGF- $\beta$ 1 assoziiert (Krasagakis et al., 1998). Nakamura und Kollegen fanden eine nach TGF- $\beta$ 2 Überexpression induzierte Aktivierung des SDF-1-CXCR-4 Signalwegs von HNSCC Knochenmetastasen, die für eine Therapieresistenz ursächlich war (Nakamura et al., 2015). Die Überexpression von TGF- $\beta$ 2 korrelierte dabei mit einer variierenden Expression von TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\beta$ 3. Eine in Spindelzellkarzinomen beobachtete Überexpression von TGF- $\beta$ 3 korrelierte mit dem Erhalt eines mesenchymalen Phänotyps, konnte jedoch nur nach EMT Induktion durch TGF- $\beta$ 1 erreicht werden (Cui et al., 1996). Die gegenseitige Wechselwirkung der TGF- $\beta$  Isoformen scheint von *crosstalks* mit anderen, im Kontext der EMT diskutierten, Zytokinen abhängig zu sein.

So fördert eine TGF- $\beta$  Expression z.B. die Therapieresistenz von HNSCC Tumoren im Rahmen einer EGFR Inhibitor Therapie (Kleczo et al., 2015). Von der unzureichenden Funktion als EMT Induktor abgesehen, scheint ein relevanter Einfluss beider Isoformen neben ihrer Rolle in EMT Typ 1 (Embryonalentwicklung) und Typ 2 (Gewebsregeneration) auch in Typ 3 (Tumorprogression) (Zeisberg et al., 2009) vorzuliegen, der Gegenstand weiterer Forschung sein sollte. Von Interesse wäre insbesondere die gegenseitige Wechselwirkung der drei Isoformen bei einer EMT Antwort, welche bei der Co-Stimulation oder einer sequenziellen Inkubation von HNSCC untersucht werden könnte.

#### 4.4 Therapie und Angriffsziele der EMT: TGF- $\beta$ Inhibition

Der Ablauf des EMT Programms in Tumoren ist Gegenstand aktueller Forschungen, da hier die Möglichkeit einer Hemmung von tumorbedingter Invasion und Metastasierung besteht. In den letzten Jahren zeigte sich jedoch die ausgeprägte Komplexität von EMT Prozessen, gekennzeichnet durch viele verschiedene Phänotypen mit Zwischenstadien von Zellen mit sowohl epithelialen als auch mesenchymalen Eigenschaften. Dieser Umstand sowie eine tumorzellspezifisch variierende Expression von epithelialen EMT Faktoren erschwert die Identifikation potentieller Angriffsziele (Nieto et al., 2016). Nichtsdestotrotz konnte gezeigt werden, dass eine EMT Repression und Aufrechterhaltung oder Re-Induktion epithelialer Strukturen, im Sinne einer MET, als Therapiekonzept einen Erfolg aufweist (Thiery et al., 2009). Die Identifikation und Inhibition zentraler EMT Regulatoren erscheint daher für eine Therapie nach wie vor am vielversprechendsten.

Die Rolle als Masterregulator der EMT macht TGF- $\beta$  zu einem attraktiven therapeutischen Angriffsziel. Es wurden daher Strategien zur TGF- $\beta$  induzierten EMT Hemmung entwickelt, wobei die größte Herausforderung beim Antagonisieren von TGF- $\beta$  in der Förderung seiner tumorsupprimierenden und Hemmung seiner tumorfördernden Wirkung besteht. Zu etablierten Verfahren zählt der Einsatz niedermolekularer Inhibitoren und löslicher Proteine, *antisense*-Inhibitoren sowie die Modifizierung von Komponenten des Immunsystems (Bierie et al., 2006; Yingling et al., 2018). Eine niedrigere Invasion und Metastasierung bzw. Unterdrückung der durch autokrin produziertes TGF- $\beta$  induzierten Metastasierungsrate konnte mit einem, gegen alle drei TGF- $\beta$  Isoformen gerichteten, löslichen pan-Antikörper erreicht werden, wie es in Modellen mit Brust- und Lungentumorzelllinien gezeigt werden konnte (Biswas et al., 2007; Muraoka et al., 2002). Das Wachstum des Primärtumors wurde dabei jedoch nicht beeinflusst (Muraoka et al., 2002). Effektiver in der Inhibition von TGF- $\beta$  induzierter Metastasierung bzw. Induktion einer MET gestaltete sich ein *knockdown* von Smad3 in *scid-beige mice* oder dessen Antagonisierung durch Aktivierung von *peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$*  (PPAR $\gamma$ ), einem Suppressor von Smad3, mittels Troglitazon (Reka et al., 2010).

Niedermolekulare Inhibitoren, wie LY2109761, ein Antagonist beider TGF- $\beta$  Rezeptor Kinasen, waren zwar effektiv bei der Hemmung von Lungenmetastasierung von Pankreas- (Melisi et al., 2008) und Brusttumorzellen, jedoch wurde die Entwicklung von *drug* resistenten Tumoren mit Zeichen der EMT und erhöhter Invasivität nach konstanter LY2109761 Exposition beobachtet (Connolly et al., 2011; Heldin et al., 2012). Die effektivste Methode scheint in der Hemmung der systemischen Wirkung von TGF- $\beta$  auf das Immunsystem und dessen Interaktion mit der TME zu sein (Yang, 2010). In vielen Tumorentitäten sind Tumor infiltrierende Lymphozyten (TILs) mit besserer Prognose und längerem Gesamtüberleben verbunden (de Ruiter et al., 2017). Die klinische Relevanz der Interaktion von TME und TGF- $\beta$  zeigt sich in einem variierenden Ansprechen von PDL-1 Inhibitoren, wobei die zugrunde liegenden Mechanismen noch nicht vollständig verstanden sind. Zwei unabhängige Studien erbrachten Hinweise, dass bei invasiven Tumoren des Urogenitaltrakts sowie in Kolonkarzinomen eine verstärkte TGF- $\beta$  Signalaktivierung in randständigen Tumorstromazellen mit weniger TILs (CD8+ T-Zellen) im Tumor assoziiert ist und dies mit einem geringeren Ansprechen von PDL-1 Inhibitoren korreliert (Harjes, 2018). In einem Quadriple mutant Mausmodell (*K-ras*, TGF- $\beta$  RI, APC und p53 mutiert) erzeugte Lungen- und Lebermetastasen intestinaler Stammzellen, welche TIL frei waren und im Tumorstroma eine hohe TGF- $\beta$  Aktivität aufwiesen, verringerten ihr Primärwachstum unter der Behandlung mit dem TGF- $\beta$  RI spezifischen Inhibitor Galunisertib. Gleichzeitig kam es unter Therapie zu einer erhöhten T-Zell Infiltration. Eine Behandlung mit Galunisertib in frühen Metastasen führte zu geringerer Metastasierungslast bis hin zur Komplettremission. Voll entwickelte Metastasen zeigten sich unter Galunisertib gering responsiv. Hier fand man jedoch eine verstärkte T-Zell Infiltration mit hoher Expression von PD-1 und PDL-1 positiven Makrophagen. In Kombination von Galunisertib und anti-PDL-1 Inhibitoren kam es zu einer kompletten Tumorunterdrückung (Tauriello et al., 2018). In der zweiten Studie wurden Biomarker in metastasierten Urothelkarzinomen nach PD-L1 Inhibitor Behandlung untersucht. Tumore mit guter therapeutischer Ansprechrate zeigten eine ausgeprägte Infiltration von CD8+ Effektorzellen. Bei *non-respondern* wurde eine hohe Expression von Komponenten des TGF- $\beta$  Signalwegs im umliegenden Tumorstroma beobachtet, welche assoziiert war mit T-Zell freiem Tumorparenchym und T-Zell reichem peritumoralem Stroma (Mariathasan et al., 2018). Eine kombinierte Behandlung führte zu vermindertem TGF- $\beta$  Signal im Stroma, T-Zell Infiltration in das Tumorparenchym und erhöhter Anti-Tumor Immunaktivität, die eine Tumorregression förderte. Beide Studien zeigen, dass die TGF- $\beta$ 1 Aktivität in der TME als therapeutisches Ziel genutzt werden kann, um das *Outcome* von PDL-1 *non-responder* Patienten zu verbessern (Harjes, 2018).

#### 4.5 Fazit und Ausblick

EMT ist ein Prozess, der neben seiner essentiellen Rolle in der Embryogenese und Wundheilung ebenfalls die Invasion und Metastasierung von Tumorzellen beeinflusst. Die Komplexität des EMT Programms erschwert die Identifikation und Funktion relevanter Modulatoren. Bei der Aktivierung EMT typischer Eigenschaften hat sich TGF- $\beta$ 1 in der Mehrzahl der Tumorentitäten als einer der Hauptregulatoren etabliert. Zu welchem Zeitpunkt und zu welchem Grad TGF- $\beta$ 1 im EMT Progress agiert und welche weiteren Einflussgrößen dessen Wirkung bedingen, ist jedoch nur zum Teil verstanden. In dieser Arbeit wurde das vermutete EMT Potential von TGF- $\beta$ 1 in HNSCC Tumorzelllinien anhand typischer EMT Merkmale nachgewiesen. Es zeigte sich eine inverse Korrelation von mesenchymalen Phänotyp mit der Sensitivität auf TGF- $\beta$ 1 in den untersuchten Zelllinien.

Es konnte gezeigt werden, dass TGF- $\beta$ 1 über Aktivierung seines Rezeptors Typ II in Tumorzelllinien mit initial vorwiegend epitheliale Phänotyp wie HaCaT und UM-SCC-3 einen mesenchymalen, zur Migration fähigen, Phänotyp induziert, der mit einer intrazellulären Relokalisierung von E-Cadherin und mit der Bildung  $\beta$ -Aktin vermittelter *stress fibers* korreliert. Die TGF- $\beta$ 1 induzierte Auflösung von Zell-Zell Kontakten durch Relokalisierung von E-Cadherin in Richtung Zytoplasma begünstigt als initialen Schritt der EMT die Bildung eines mesenchymalen Phänotyps. Des Weiteren scheint TGF- $\beta$ 1 eine mesenchymale Zellmorphologie über  $\beta$ -Aktin vermittelte *stress fiber* Bildung zu induzieren. Zelllinien, die einem mesenchymalen Phänotyp entsprechen, charakterisiert durch Relokalisierung von E-Cadherin und  $\beta$ -Aktin vermittelte Zytoplasma Ausläufer, sprechen weniger auf eine Phänotypänderung durch exogenes TGF- $\beta$ 1 an. Zum Teil kann hier jedoch, wie in UM-SCC-1 gezeigt, ein TGF- $\beta$ 1 induzierter signifikanter Abbau von E-Cadherin beobachtet werden. In der Zelllinie UM-SCC-22B, vom Phänotyp ebenfalls mesenchymal wirkend, konnte kein wesentliches Ansprechen auf exogenes TGF- $\beta$ 1 gesehen werden.

Inwieweit die von TGF- $\beta$ 1 induzierte EMT eine erhöhte Invasionsbereitschaft beeinflusst bzw. deren Assoziation zur beobachteten Migration von Tumorzellen mit epitheliale Phänotyp, müssten weiterführende Untersuchungen klären. Schwerpunkt weiterer Versuche sollte insbesondere die Ursache des Sensitivitätsgradienten von TGF- $\beta$ 1 sein. Da eine erhöhte autokrine Produktion in Tumoren mit mesenchymalen Phänotyp vermutet wird, wäre relevant das Verhältnis der basalen Autoexpression von TGF- $\beta$ 1 bzw. anderer EMT Zytokine mit dem Ansprechen auf TGF- $\beta$ 1 Gabe zu untersuchen. Zur näheren Charakterisierung ist z.B. eine Transfektion und Expression von TGF- $\beta$ 1 in ausgewählte Zelllinien sinnvoll, sowie eine suffiziente Hemmung der autokrinen TGF- $\beta$ 1 Produktion bzw. anderer EMT Zytokine und deren mögliche Auswirkung auf den morphologischen Phänotyp und das Invasionsverhalten.

In Ermangelung einer einheitlichen Definition von EMT Eigenschaften (Tan et al., 2014), der möglichen Existenz vieler verschiedener EMT Zwischenstufen (Pattabiraman et al., 2016) mit der Intermediärform als potentiell aggressivsten Phänotyp (Jolly et al., 2019), sowie der vermutlich sogar überholten Annahme eines linearen Ablaufs der EMT (Schliekelman et al., 2015), ist die genaue Rolle der EMT bei der Tumorprogression noch nicht abschließend geklärt. Isolierte *in vitro* Untersuchungen helfen hierbei Details dieses Zusammenspiels besser zu verstehen. Für ein tiefergehendes Verständnis ist es jedoch notwendig, die Funktion relevanter Faktoren, wie TGF- $\beta$ 1, im Gesamtkontext des Tumors, d.h. *in vivo* zusammen mit EMT relevanten Faktoren der TME zu betrachten.

## 5 Zusammenfassung

Plattenepithelkarzinome im Kopf- und Halsbereich (HNSCC) gehören zu den sechsthäufigsten Tumoren weltweit. Trotz verbesserter Behandlungsmethoden liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei lediglich 50%. Prognose entscheidend für HNSCC Patienten ist die zum Zeitpunkt der Diagnose häufig bereits stattgefundene Metastasierung. Ein zentraler Mechanismus, der dem invasiven Potential von HNSCC und anderen Tumoren zugrunde liegt, ermöglicht es Tumorzellen aus einer stationären, epithelialen Form in eine motile Form, welche Eigenschaften mesenchymaler Zellen aufweist, überzugehen. Diese sogenannte Epitheliale Mesenchymale Transition (EMT), ist mit der verringerten Expression typischer epithelialer Markerproteine wie E-Cadherin und Keratinen sowie der Zunahme typischer mesenchymaler Faktoren wie N-Cadherin und Vimentin assoziiert. Als ein zentraler Regulator der EMT wurde *Transforming Growth Factor* (TGF)- $\beta$ 1 identifiziert. Unter dem Einfluss von TGF- $\beta$ 1 entwickeln Kopf-Halstumorzellen einen mesenchymalen Phänotyp, welcher assoziiert ist mit einer gesteigerten Migration und klinisch schlechterer Prognose. TGF- $\beta$ 1 kann je nach zellulärem Kontext sowohl als Tumorsuppressor als auch Tumorpromoter wirken. TGF- $\beta$ 1, aktiviert über seinen Rezeptor TGF- $\beta$  RII neben dem Smad abhängigen Signalweg, weitere Smad unabhängige Signalwege, wie Erk/MEK, PI3K/MAPK und Ras. Dies führt zur Modulation der E-Cadherin Expression, zur Bildung von  $\beta$ -Aktin Stressfasern über Modulation des Zytoskeletts und zu einer erhöhten Migration und Invasivität der Zellen.

In HNSCC Tumoren, die sich in ihrem Invasivitätspotential und ihrer Differenzierung häufig sehr heterogen darstellen, konnten durch zahlreiche Untersuchungen Hinweise eines relevanten Einflusses der EMT auf diesen Phänotyp gefunden werden. Es stellt sich dabei die Frage, ob das histopathologisch zu beobachtende variierende Differenzierungs- bzw. Invasivitätsmuster auf eine unterschiedliche Aktivierung von EMT induzierenden Faktoren zurückgeführt werden kann. Zur Untersuchung wie sich verschiedene etablierte HNSCC Zelllinien *in vitro* in ihrer Sensitivität auf EMT induzierende Zytokine unterscheiden, wurden Zelllinien eingesetzt, die Unterschiede in relevanten EMT Merkmalen aufweisen. Beurteilt wurde der morphologische Phänotyp der Zellen ohne und nach Zugabe EMT induzierender Faktoren, die Aktivierung (Phosphorylierung) des TGF- $\beta$  Rezeptors Typ II, sowie Änderungen im Migrationsverhalten, E-Cadherin Status und in der Zytoskelettarchitektur.

Das Ausmaß der EMT Antwort von HNSCC-Zelllinien auf exogen zugeführtes TGF- $\beta$ 1 zeigte signifikante Unterschiede in der Sensitivität, welche mit dem initialen Phänotyp unbehandelter HNSCC Zellen korrelierte. Bei Zugabe von TGF- $\beta$ 1 glich sich der Phänotyp bei den verschiedenen Zelllinien in Richtung mesenchymal an, da eher epitheliale Zelllinien besonders sensitiv reagierten und die Sensitivität auf exogenes TGF- $\beta$ 1 bei Zelllinien mit bereits vorhandener mesenchymaler Ausprägung weniger deutlich erfolgte.

Die Transformation des Zellphänotyps durch TGF- $\beta$ 1 konnte anhand mikroskopischer Aufnahmen, einer Veränderung der *in vitro* Proliferation der Zelllinien, einer Aktivierung des TGF- $\beta$  RII sowie durch subzelluläre Umverteilung von EMT typischen Proteinen und Strukturen des Zytoskeletts nachgewiesen werden. An der morphologischen Änderung war insbesondere eine Modulierung des Aktinzytoskeletts, sowie die E-Cadherin Relokalisation bzw. der E-Cadherin Abbau beteiligt.

Da TGF- $\beta$ 1 und andere Zytokine durch Zellen des Stromas (z.B. Immunzellen) sezerniert werden, könnte die Tumormikroumgebung (*tumor microenvironment*) mit verantwortlich sein für den in HNSCC Tumoren beobachteten variablen zellulären Phänotyp, welcher mit der Fähigkeit der Tumorzellen zur Invasivität und Metastasierung korreliert. Im Hinblick auf die vorliegenden Untersuchungen stellt sich dabei die Frage, inwiefern eine autokrine Sekretion von TGF- $\beta$ 1 (bzw. andere EMT Zytokine) in HNSCC Tumorzellen zu den beobachteten Sensitivitätsunterschieden einer EMT beigetragen hat. Für weiterführende Untersuchungen erscheint es daher sinnvoll nach Identifikation von Zelllinien-spezifischen EMT Zytokinen sowie anderen relevanten Komponenten der EMT diese gezielt auszuschalten, um hierdurch neue therapeutische Angriffsziele zur Hemmung der Invasivität und Metastasierung von HNSCC Tumoren aufzudecken.

## 6 Summary

Head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) are the sixth most common tumors world wide. Despite improved treatments the 5-year survival rate has remained merely at 50%. Crucial for prognosis of HNSCC patients is the level of metastatic spread that has often already occurred at the time of diagnosis. A central mechanism underlying the invasive potential of HNSCC allows to transform tumor cells from a stationary, epithelial-like into a motile form thereby acquiring mesenchymal cell properties. This so-called epithelial mesenchymal transition (EMT) is characterized by the reduced expression of typical epithelial marker proteins such as E-cadherin and keratins as well as an increase in typical mesenchymal factors such as N-cadherin and vimentin. Transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1 was identified as a central regulator of EMT. Head and neck tumor cells, under the influence of TGF- $\beta$ 1, develop a mesenchymal phenotype associated with increased migration and clinically poor prognosis. TGF- $\beta$ 1 may act as a tumor suppressor as well as a tumor promoter, depending on the cellular context. TGF- $\beta$ 1, via its receptor TGF- $\beta$  RII, activates -besides the Smad-dependent signaling pathway- other Smad-independent signaling pathways, such as Erk/MEK, PI3K/MAPK and Ras. This results in the modulation of E-cadherin expression, formation of actin stress fibers via modulation of the cytoskeleton, and increased tumor cell migration and invasion.

Numerous studies have found evidence of a relevant role of EMT in HNSCC, being involved in the observed different morphological HNSCC phenotypes. This raises the question of whether the observed varying histopathological pattern of differentiation or invasiveness can be attributed to a difference in the activation status of EMT inducing factors. HNSCC cell lines with differences in their epithelial/mesenchymal phenotypes were used to investigate how they differ in their sensitivity to EMT-inducing cytokines *in vitro*. The morphological phenotype without and with the exogenous supply of EMT inducing factors, the activation (phosphorylation) of the TGF- $\beta$  receptor type II as well as changes in the migration behavior, E-cadherin status and cytoskeleton architecture were assessed.

Upon addition of TGF- $\beta$ 1, the rather epithelial cell lines adapted a more mesenchymal phenotype, whereas in cells that already carried mesenchymal features, this effect was less pronounced. Transformation of the cellular phenotype by TGF- $\beta$ 1 was documented by microscopic imaging, alteration of *in vitro* proliferation, activation of the TGF- $\beta$  RII, and subcellular redistribution of typical EMT proteins as well as in changes of the cytoskeleton architecture. In particular, a modulation of the actin cytoskeleton, as well as the E-cadherin relocation and E-cadherin degradation appeared to be involved in the morphological change. Since TGF- $\beta$ 1 and other cytokines are partially secreted by cells of the stroma (e.g. immune cells), the tumor microenvironment may be involved in the variable cellular phenotypes observed in HNSCC tumors, which correlate with the ability of the tumor cells to invade and metastasize.

In view of the present investigations, the question arises to which extent an autocrine secretion of TGF- $\beta$ 1 (or other EMT cytokines) in HNSCC tumor cells contributed to the observed variable sensitivity of the cells to exogenous TGF- $\beta$ 1. For further investigations, it seems meaningful to, after evaluation of the cell-line-specific TGF- $\beta$ 1 expression (including other EMT cytokines) or other relevant components of the EMT, to specifically knockdown these components as this may potentially lead to new therapeutic targets that can be used to inhibit invasiveness and metastasis of HNSCC tumors.

## 7 Literaturverzeichnis

- ACEA Biosciences, 2017: RTCA MP Instrument Operator's Manual. RTCA MP Instrument Operator's Manual, Version Oktober 2017, Seite 14 Abbildung 1
- Andriani, F.; Bertolini, G.; Facchinetti, F.; Baldoli, E.; Moro, M.; Casalini, P.; Caserini, R.; Milione, M.; Leone, G.; Pelosi, G.; Pastorino, U.; Sozzi, G.; Roz, L., 2016: Conversion to stem-cell state in response to microenvironmental cues is regulated by balance between epithelial and mesenchymal features in lung cancer cells. *Molecular Oncology.*, 10, 253–271
- Ansieau, S.; Bastid, J.; Doreau, A.; Morel, A. P.; Bouchet, B. P.; Thomas, C.; Fauvet, F.; Puisieux, I.; Doglioni, C.; Piccinin, S.; Maestro, R.; Voeltzel, T.; Selmi, A.; Valsesia-Wittmann, S.; Caron de Fromental, C.; Puisieux, A., 2008: Induction of EMT by Twist Proteins as a Collateral Effect of Tumor-Promoting Inactivation of Premature Senescence. *Cancer Cell.*, 14, 79–89
- Bakin, A. V.; Rinehart, C.; Tomlinson, A. K.; Arteaga, C. L., 2002: p38 mitogen-activated protein kinase is required for TGFbeta-mediated fibroblastic transdifferentiation and cell migration. *Journal of cell science.*, 115, 3193–3206
- Bhave, L. S.; Teknos, T. N.; Pan, Q.; James, A. G.; Solove, R. J., 2011: Molecular parameters of head and neck cancer metastasis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.*, 70, 646–656
- Bierie, B.; Moses, H. L., 2006: Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nature reviews. Cancer.*, 6, 506–520
- Biswas, S.; Guix, M.; Rinehart, C.; Dugger, T. C.; Chytil, A.; Moses, H. L.; Freeman, M. L.; Arteaga, C. L., 2007: Inhibition of TGF-beta with neutralizing antibodies prevents radiation-induced acceleration of metastatic cancer progression. *The Journal of clinical investigation.*, 117, 1305–1313
- Bose, P.; Brockton, N. T.; Dort, J. C., 2013: Head and neck cancer : from anatomy to biology. *Int. J. Cancer.*, 133, 2013–2023
- Boukamp, P.; Petrussevska, R. T.; Breitkreutz, D.; Hornung, J.; Markham, A.; Fusenig, N. E., 1988: Normal Keratinization in a Spontaneously Immortalized Aneuploid Human Keratinocyte Cell Line. *The Journal of Cell Biology.*, 106, 761–771
- Braut-Boucher, F.; Pichon, J.; Wantyghem, J.; Muriel, M. P.; Giner, M.; Font, J.; Aubery, M., 1997: Human keratinocyte models: Assessment of cell adhesion and dermatotoxicity using fluorescent probes. *Toxicology in Vitro.*, 11, 601–611
- Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I., 2018: Global Cancer Statistics 2018 : GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.*, 68, 394–424
- Bronsert, P.; Enderle-Ammour, K.; Bader, M.; Timme, S.; Kuehs, M.; Csanadi, A.; Kayser, G.; Kohler, I.; Bausch, D.; Hoepfner, J.; Hopt, U. T.; Keck, T.; Stickeler, E.; Passlick, B.; Schilling, O.; Reiss, C. P.; Vashist, Y.; Brabletz, T.; Berger, J. et al., 2014: Cancer cell invasion and EMT marker expression: a three-dimensional study of the human cancer-host interface. *The Journal of Pathology.*, 234, 410–422
- Cell Signaling Technology Inc., 2014: Interaktiver Signalweg TGF-β/Smad.  
URL: <https://www.cellsignal.de/contents/science-cst-pathways-stem-cell-markers/tgf-smad-signaling-interactive-pathway/pathways-tgfb>; erstellt 2003 (aktualisiert 2014).  
Letzter Zugriff 24.03.2019.
- Chen, C. R.; Kang, Y.; Siegel, P. M.; Massagué, J., 2002: E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the TGFβ receptor to c-myc repression. *Cell.*, 110, 19–32
- Chen, F.; Weinberg, R. A., 1995: Biochemical evidence for the autophosphorylation and transphosphorylation of transforming growth factor beta receptor kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, 92, 1565–1569
- Chen, T.; Yan, W.; Wells, R. G.; Rimm, D. L.; McNiff, J.; Leffell, D.; Reiss, M., 2001: Novel inactivating mutations of transforming growth factor-beta type I receptor gene in head-and-neck cancer metastases. *Int.J Cancer.*, 93, 653–661

- Cheng, H.; Fertig, E. J.; Ozawa, H.; Hatakeyama, H.; Howard, J. D.; Perez, J.; Considine, M.; Thakar, M.; Ranaweera, R.; Krigsfeld, G.; Chung, C. H., 2015: Decreased SMAD4 expression is associated with induction of epithelial-to-mesenchymal transition and cetuximab resistance in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Biology and Therapy.*, 16, 1252–1258
- Cheung, K. J.; Padmanaban, V.; Silvestri, V.; Schipper, K.; Cohen, J. D.; Fairchild, A. N.; Gorin, M. A.; Verdone, J. E.; Pienta, K. J.; Bader, J. S.; Ewald, A. J., 2016: Polyclonal breast cancer metastases arise from collective dissemination of keratin 14-expressing tumor cell clusters. *Proceedings of the National Academy of Sciences.*, 113, 854–863
- Cohen, J.; Chen, Z.; Lu, S. L.; Yang, X. P.; Arun, P.; Ehsanian, R.; Brown, M. S.; Lu, H.; Yan, B.; Diallo, O.; Wang, X. J.; Van Waes, C., 2009: Attenuated transforming growth factor beta signaling promotes nuclear factor-kappa B activation in head and neck cancer. *Cancer research.*, 69, 3415–3424
- Connolly, E. C.; Saunier, E. F.; Quigley, D.; Luu, M. T.; De Sapio, A.; Hann, B.; Yingling, J. M.; Akhurst, R. J., 2011: Outgrowth of Drug-Resistant Carcinomas Expressing Markers of Tumor Aggression after Long-term T $\beta$ RI/II Kinase Inhibition with LY2109761. *Cancer Research.*, 71, 2339–2349
- Cui, W.; Fowles, D. J.; Bryson, S.; Duffie, E.; Ireland, H.; Balmain, A.; Akhurst, R. J., 1996: TGF $\beta$ 1 inhibits the formation of benign skin tumors, but enhances progression to invasive spindle carcinomas in transgenic mice. *Cell.*, 86, 531–542
- Davies, M.; Robinson, M.; Smith, E.; Huntley, S.; Prime, S.; Paterson, I., 2005: Induction of an epithelial to mesenchymal transition in human immortal and malignant keratinocytes by TGF- $\beta$ 1 involves MAPK, Smad and AP-1 signalling pathways. *Journal of Cellular Biochemistry.*, 95, 918–931
- De Crescenzo, G.; Hinck, C. S.; Shu, Z.; Zúñiga, J.; Yang, J.; Tang, Y.; Baardsnes, J.; Mendoza, V.; Sun, L.; López-Casillas, F.; O'Connor-McCourt, M.; Hinck, A. P., 2006: Three Key Residues Underlie the Differential Affinity of the TGF $\beta$  Isoforms for the TGF $\beta$  Type II Receptor. *Journal of Molecular Biology.*, 355, 47–62
- de Ruiter, E. J.; Ooft, M. L.; Devriese, L. A.; Willems, S. M., 2017: The prognostic role of tumor infiltrating T-lymphocytes in squamous cell carcinoma of the head and neck: A systematic review and meta-analysis. *Oncology.*, 6, 1–10
- Derynck, R.; Zhang, Y. E., 2003: Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- $\beta$ . *Nature.*, 425, 577–584
- Douma, S.; van Laar, T.; Zevenhoven, J.; Meuwissen, R.; van Garderen, E.; Peeper, D. S., 2004: Suppression of anoikis and induction of metastasis by. *Nature.*, 430, 1034–1040
- Dumont, N.; Bakin, A. V.; Arteaga, C. L., 2003: Autocrine transforming growth factor-beta signaling mediates Smad-independent motility in human cancer cells. *The Journal of biological chemistry.*, 278, 3275–3285
- Ebisawa, T.; Fukuchi, M.; Murakami, G.; Chiba, T.; Tanaka, K.; Imamura, T.; Miyazono, K., 2001: Smurf1 Interacts with Transforming Growth Factor- $\beta$  Type I Receptor through Smad7 and Induces Receptor Degradation. *Journal of Biological Chemistry.*, 276, 12477–12480
- EssenBioscience, 2015: IncuCyte ZOOM® 96-Well Scratch Wound Cell Migration & Invasion Assays. User Manual., 1–26
- Fischer, K. R.; Durrans, A.; Lee, S.; Sheng, J.; Li, F.; Wong, S.; Choi, H.; Rayes, T. El; Ryu, S.; Troeger, J.; Schwabe, R. F.; Vahdat, L. T.; Altorki, N. K.; Mittal, V.; Gao, D., 2015: EMT is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature.*, 527, 472–476
- Foletta, V. C.; Lim, M. A.; Soosairaiyah, J.; Kelly, A. P.; Stanley, E. G.; Shannon, M.; He, W.; Das, S.; Massagué, J.; Bernard, O., 2003: Direct signaling by the BMP type II receptor via the cytoskeletal regulator LIMK1. *Journal of Cell Biology.*, 162, 1089–1098
- Garrigue-Antar, L.; Muñoz-Antonia, T.; Antonia, S. J.; Gesmonde, J.; Vellucci, V. F.; Reiss, M., 1995: Missense mutations of the transforming growth factor beta type II receptor in human head and neck squamous carcinoma cells. *Cancer research.*, 55, 3982–3987

- Gherardi, E.; Gray, J.; Stoker, M.; Perryman, M.; Furlong, R., 1989: Purification of scatter factor, a fibroblast-derived basic protein that modulates epithelial interactions and movement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, 86, 5844–5848
- Glaß, M.; Möller, B.; Zirkel, A.; Wächter, K.; Hüttelmaier, S.; Posch, S., 2012: Cell migration analysis: Segmenting scratch assay images with level sets and support vector machines. *Pattern Recognition.*, 45, 3154–3165
- Gotzmann, J.; Fischer, a N. M.; Zojer, M.; Mikula, M.; Proell, V.; Huber, H.; Jechlinger, M.; Waerner, T.; Weith, A.; Beug, H.; Mikulits, W., 2006: A crucial function of PDGF in TGF-beta-mediated cancer progression of hepatocytes. *Oncogene.*, 25, 3170–3185
- Greenburg, G.; Hay, E. D., 1982: Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *Journal of Cell Biology.*, 95, 333–339
- Grotegut, S.; von Schweinitz, D.; Christofori, G.; Lehembre, F., 2006: Hepatocyte growth factor induces cell scattering through MAPK/Egr-1-mediated upregulation of Snail. *The EMBO Journal.*, 25, 3534–3545
- Han, G.; Lu, S. long; Li, A. G.; He, W.; Corless, C. L.; Kulesz-martin, M.; Wang, X. jing, 2005: Distinct mechanisms of TGF- $\beta$  1 – mediated epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis during skin carcinogenesis. *The Journal of Clinical Investigation.*, 115, 1714–1723
- Hanahan, D.; Weinberg, R. A., 2011: Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.*, 144, 646–674
- Harjes, U., 2018: Immunotherapy: Tear down this wall. *Nature Reviews Cancer.*, Published online 9 Mar 2018; doi:10.1038/nrc.2018.
- Haynes, J.; Srivastava, J.; Madson, N.; Wittmann, T.; Barber, D. L., 2011: Dynamic actin remodeling during epithelial-mesenchymal transition depends on increased moesin expression. *Molecular biology of the cell.*, 22, 4750–4764
- Heldin, C. H.; Vanlandewijck, M.; Moustakas, A., 2012: Regulation of EMT by TGF $\beta$  in cancer. *FEBS Letters.*, 586, 1959–1970
- Hsu, D. S. S.; Lan, H. Y.; Huang, C. H.; Tai, S. K.; Chang, S. Y.; Tsai, T. L.; Chang, C. C.; Tzeng, C. H.; Wu, K. J.; Kao, J. Y.; Yang, M. H., 2010: Regulation of excision repair cross-complementation group 1 by snail contributes to cisplatin resistance in head and neck cancer. *Clinical Cancer Research.*, 16, 4561–4571
- Huber, M. a; Azoitei, N.; Baumann, B.; Grünert, S.; Sommer, A.; Pehamberger, H.; Kraut, N.; Beug, H.; Wirth, T., 2004: NF- $\kappa$  B is essential for epithelial- mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *The Journal of Clinical Investigation.*, Vol. 114, 569-581
- Jolly, M. K.; Boareto, M.; Huang, B.; Jia, D.; Lu, M.; Ben-Jacob, E.; Onuchic, J. N.; Levine, H., 2015: Implications of the Hybrid Epithelial/Mesenchymal Phenotype in Metastasis. *Frontiers in Oncology.*, 5, 1–19
- Jolly, M. K.; Somarelli, J. A.; Sheth, M.; Biddle, A.; Tripathi, S. C.; Armstrong, A. J.; Hanash, S. M.; Bapat, S. A.; Rangarajan, A.; Levine, H., 2019: Hybrid epithelial/mesenchymal phenotypes promote metastasis and therapy resistance across carcinomas. *Pharmacology and Therapeutics.*, 194, 161–184
- Jouppila-Mättö, A.; Närkiö-Mäkelä, M.; Soini, Y.; Pukkila, M.; Sironen, R.; Tuhkanen, H.; Mannermaa, A.; Kosma, V. M., 2011: Twist and snail expression in pharyngeal squamous cell carcinoma stroma is related to cancer progression. *BMC Cancer.*, 11, 1–8
- Justus, C. R.; Leffler, N.; Ruiz-Echevarria, M.; Yang, L. V., 2014: In vitro Cell Migration and Invasion Assays. *Journal of Visualized Experiments.*, 1–8
- Kalluri, R.; Weinberg, R. a, 2009: Review series The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation.*, 119, 1420–1428
- Kelley, L. C.; Shahab, S.; Weed, S. A., 2008: Actin cytoskeletal mediators of motility and invasion amplified and overexpressed in head and neck cancer. *Clinical and Experimental Metastasis.*, 25, 289–304

- Kim, C. H.; Kim, J.; Kahng, H.; Choi, E. C., 2007: Change of E-Cadherin by Hepatocyte Growth Factor and Effects on the Prognosis of Hypopharyngeal Carcinoma. *Annals of Surgical Oncology.*, 14, 1565–1574
- Kleczo, E. K.; Kim, J.; Keysar, S. B.; Heasley, L. R.; Eagles, J. R.; Simon, M.; Marshall, M. E.; Singleton, K. R.; Jimeno, A.; Tan, A. C.; Heasley, L. E., 2015: An inducible TGF- $\beta$ 2-TGF $\beta$ R pathway modulates the sensitivity of HNSCC cells to tyrosine kinase inhibitors targeting dominant receptor tyrosine kinases. *PLOS ONE.*, 10, 1–16
- Krasagakis, K.; Thölke, D.; Farthmann, B.; Eberle, J.; Mansmann, U.; Orfanos, C. E., 1998: Elevated plasma levels of transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 2 in patients with disseminated malignant melanoma. *British journal of cancer.*, 77, 1492–1494
- Kuperwasser, C.; Chavarria, T.; Wu, M.; Magrane, G.; Gray, J. W.; Carey, L.; Richardson, A.; Weinberg, R. A., 2004: Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, 101, 4966–4971
- Kupferman, M.; Jiffar, T.; El-Naggar, A.; Yilmaz, T.; Zhou, G.; Xie, T.; Feng, L.; Wang, J.; Holsinger, F.; Yu, D.; Myers, J., 2010: TrkB induces EMT and has a key role in invasion of head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene.*, 29, 2047–2059
- Kürschner, U., 2007: Untersuchungen zur Toxizität und Biotransformation an der humanen Keratinozytenzelllinie HaCaT. *Nat. Diss. Halle/Saale.Thesis.URL:* <http://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/07/08H301/prom.pdf>
- Lawler, S.; Feng, X. H.; Chen, R. H.; Maruoka, E. M.; Turck, C. W.; Griswold-Prenner, I.; Derynck, R., 1997: The Type II Transforming Growth Factor- $\beta$  Receptor Autophosphorylates Not Only on Serine and Threonine but Also on Tyrosine Residues. *Journal of Biological Chemistry.*, 272, 14850–14859
- Leemans, C. R.; Braakhuis, B. J. M.; Brakenhoff, R. H., 2011: The molecular biology of head and neck cancer. *Nature Reviews Cancer.*, 11, 9–22
- Levy, L.; Hill, C. S., 2006: Alterations in components of the TGF- $\beta$  superfamily signaling pathways in human cancer. *Cytokine and Growth Factor Reviews.*, 17, 41–58
- Lewis, M. P.; Lygoe, K. A.; Nystrom, M. L.; Anderson, W. P.; Speight, P. M.; Marshall, J. F.; Thomas, G. J., 2004: Tumour-derived TGF- $\beta$ 1 modulates myofibroblast differentiation and promotes HGF/SF-dependent invasion of squamous carcinoma cells. *British Journal of Cancer.*, 90, 822–832
- Li, L.; Qi, L.; Liang, Z.; Song, W.; Liu, Y.; Wang, Y.; Sun, B.; Zhang, B.; Cao, W., 2015: Transforming growth factor- $\beta$ 1 induces EMT by the transactivation of epidermal growth factor signaling through HA/CD44 in lung and breast cancer cells. *International Journal of molecular medicine.*, 36, 113–122
- Lindsey, S.; Langhans, S. A., 2015: Epidermal Growth factor signaling in transformed cells. *Int Rev Cell Mol Biol.*, 314, 1–41
- Liu, F.; Gu, L. N.; Shan, B. E.; Geng, C. Z.; Sang, M. X., 2016: Biomarkers for EMT and MET in breast cancer: An update (review). *Oncology Letters.*, 12, 4869–4876
- Lu, S. L.; Reh, D.; Li, A. G.; Woods, J.; Corless, C. L.; Kulesz-Martin, M.; Wang, X. J., 2004: Overexpression of transforming growth factor  $\beta$ 1 in head and neck epithelia results in inflammation, angiogenesis, and epithelial hyperproliferation. *Cancer Research.*, 64, 4405–4410
- Lu, S. long; Herrington, H.; Reh, D.; Weber, S.; Bornstein, S.; Wang, D.; Li, A. G.; Tang, C. Fang; Siddiqui, Y.; Nord, J.; Andersen, P.; Corless, C. L.; Wang, X. jing, 2006: Loss of transforming growth factor $\beta$  type II receptor promotes metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma. *Genes & Development.*, 20, 1331–1342
- Makarova, G.; Bette, M.; Schmidt, A.; Jacob, R.; Cai, C.; Rodepeter, F.; Betz, T.; Sitterberg, J.; Bakowsky, U.; Moll, R.; Neff, A.; Sesterhenn, A.; Teymoortash, A.; Ocker, M.; Werner, J. A.; Mandic, R., 2013: Epidermal growth factor-induced modulation of cytokeratin expression levels influences the morphological phenotype of head and neck squamous cell carcinoma cells. *Cell and Tissue Research.*, 351, 59–72
- Mandal, M.; Ghosh, B.; Anura, A.; Mitra, P.; Pathak, T.; Chatterjee, J., 2016: Modeling continuum of epithelial mesenchymal transition plasticity. *Integr. Biol.*, 8, 167–176

- Mandic, R.; Ludwig, T.; Oberleithner, H.; Werner, J. A., 2004: Evaluation of head and neck squamous cell carcinoma invasiveness by the electrical resistance breakdown assay. *Clinical and Experimental Metastasis.*, 21, 699–704
- Mariathasan, S.; Turley, S. J.; Nickles, D.; Castiglioni, A.; Yuen, K.; Wang, Y.; Kadel III, E. E.; Koeppen, H.; Astarita, J. L.; Cubas, R.; Jhunjhunwala, S.; Banchereau, R.; Yang, Y.; Guan, Y.; Chalouni, C.; Ziai, J.; Şenbabaoglu, Y.; Santoro, S.; Sheinson, D. et al., 2018: TGF $\beta$  attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of t-cells. *Nature.*, 554, 544–548
- Massagué, J., 2008: TGF $\beta$  in cancer. *Cell.*, 134, 215–230
- Massagué, J., 2012: TGF $\beta$  signalling in context. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.*, 13, 616–630
- Melisi, D.; Ishiyama, S.; Scwab, G. M.; Fleming, J. B.; Xia, Q.; Tortora, G.; Abbruzzese, J. L.; Chiao, P. J., 2008: LY2109761, a novel transforming growth factor  $\beta$  receptor type I and type II dual inhibitor, as a therapeutic approach to suppressing pancreatic cancer metastasis. *Molecular cancer therapeutics.*, 7, 829–840
- Miettinen, P. J.; Ebner, R.; Lopez, A. R.; Derynck, R., 1994: TGF- $\beta$  induced Transdifferentiation of Mammary Epithelial Cells to Mesenchymal Cells: Involvement of Type I Receptors. *The Journal of cell biology.*, 127, 2021–2036
- Miyazono, K., 2009: Transforming growth factor- $\beta$  signaling in epithelial-mesenchymal transition and progression of cancer. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences.*, 85, 314–323
- Muraoka, R. S.; Dumont, N.; Ritter, C. A.; Dugger, T. C.; Brantley, D. M.; Chen, J.; Easterly, E.; Roebuck, L. R.; Ryan, S.; Gotwals, P. J.; Kotliansky, V.; Arteaga, C. L., 2002: Blockade of TGF- $\beta$  inhibits mammary tumor cell viability, migration, and metastasis. *The Journal of Clinical Investigation.*, 109, 1551–1559
- Murrell, M.; Kamm, R.; Matsudaira, P., 2011: Tension, free space, and cell damage in a microfluidic wound healing assay. *PLoS ONE.*, 6, 1–14
- Nakamura, T.; Shinriki, S.; Jono, H.; Guo, J.; Ueda, M.; Hayashi, M.; Yamashita, S.; Zijlstra, A.; Nakayama, H.; Hiraki, A.; Shinohara, M.; Ando, Y., 2015: Intrinsic TGF- $\beta$ 2-triggered SDF-1-CXCR4 signaling axis is crucial for drug resistance and a slow-cycling state in bone marrow-disseminated tumor cells. *Oncotarget.*, 6, 1008–1019
- Nieto, M. A.; Huang, R. Y. Y. J.; Jackson, R. A. A.; Thiery, J. P. P., 2016: EMT: 2016. *Cell.*, 166, 21–45
- Nijkamp, M. M.; Span, P. N.; Hoogsteen, I. J.; Van Der Kogel, A. J.; Kaanders, J. H. A. M.; Bussink, J., 2011: Expression of E-cadherin and vimentin correlates with metastasis formation in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Radiotherapy and Oncology.*, 99, 344–348
- O'Connor, J. W.; Mistry, K.; Detweiler, D.; Wang, C.; Gomez, E. W., 2016: Cell-cell contact and matrix adhesion promote  $\alpha$  SMA expression during TGF  $\beta$ 1-induced epithelial-myofibroblast transition via Notch and MRTF-A. *Nature Publishing Group.*, 1–12
- Ocana, O. H.; Corcoles, R.; Fabra, A.; Moreno-Bueno, G.; Acloque, H.; Vega, S.; Barrallo-Gimeno, A.; Cano, A.; Nieto, M. A., 2012: Metastatic Colonization Requires the Repression of the Epithelial-Mesenchymal Transition Inducer Prrx1. *Cancer Cell.*, 22, 709–724
- Omelchenko, T.; Vasiliev, J. M.; Gelfand, I. M.; Feder, H. H.; Bonder, E. M., 2003: Rho-dependent formation of epithelial ““ leader ”” cells during wound healing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, 100, 10788–10793
- Ozdamar, B.; Bose, R.; Barrios-Rodiles, M.; Wang, H. R.; Zhang, Y.; Wrana, J. L., 2005: Regulation of the Polarity Protein Par6 by TGF Receptors Controls Epithelial Cell Plasticity. *Science.*, 307, 1603–1609
- Pardali, K.; Moustakas, A., 2007: Actions of TGF- $\beta$  as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer.*, 1775, 21–62
- Pastushenko, I.; Blanpain, C., 2019: EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends in Cell Biology.*, 29, 212–226

- Pattabiraman, D. R.; Weinberg, R. A., 2016: Targeting the Epithelial-to-Mesenchymal Transition: The Case for Differentiation-Based Therapy. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology.*, LXXXI, 1–9
- Polyak, K.; Weinberg, R. A., 2009: Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nature Reviews Cancer.*, 9, 265–273
- Räsänen, K.; Vaheri, A., 2010: TGF-beta1 causes epithelial-mesenchymal transition in HaCaT derivatives, but induces expression of COX-2 and migration only in benign, not in malignant keratinocytes. *Journal of Dermatological Science.*, 58, 97–104
- Ravikrishnan, A.; Ozdemir, T.; Bah, M.; Baskerville, K. A.; Shah, S. I.; Rajasekaran, A.; Jia, K. X., 2016: Regulation of Epithelial-to-Mesenchymal Transition Using Biomimetic Fibrous Scaffolds. *ACS Applied Materials & Interfaces.*, 8, 583–592
- Reichardt, L. F., 2006: Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.*, 361, 1545–1564
- Reka, A. K.; Kurapati, H.; Narala, V. R.; Bommer, G.; Standiford, T. J.; Keshamouni, V. G., 2010: Peroxisome Proliferator Activated Receptor- $\gamma$  Activation Inhibits Tumor Metastasis by Antagonizing Smad3 Mediated Epithelial Mesenchymal Transition. *Molecular cancer therapeutics.*, 9, 3221–3232
- Richter, P.; Umbreit, C.; Franz, M.; Berndt, A.; Grimm, S.; Uecker, A.; Böhmer, F. D.; Kosmehl, H.; Berndt, A., 2011: EGF/TGF $\beta$ 1 co-stimulation of oral squamous cell carcinoma cells causes an epithelial-mesenchymal transition cell phenotype expressing laminin 332. *Journal of Oral Pathology and Medicine.*, 40, 46–54
- Roh, J.; Muelleman, T.; Tawfik, O.; Thomas, S. M., 2015: Perineural growth in head and neck squamous cell carcinoma: A review. *Oral Oncology.*, 51, 16–23
- Rothenberger, N. J.; Stabile, L. P., 2017: Hepatocyte growth factor/c-met signaling in head and neck cancer and implications for treatment. *Cancers.*, 9, 1–21
- Samatov, T. R.; Tonevitsky, A. G.; Schumacher, U., 2013: Epithelial-mesenchymal transition: focus on metastatic cascade, alternative splicing, non-coding RNAs and modulating compounds. *Molecular Cancer.*, 12, 1–12
- Scanlon, C. S.; Van Tubergen, E. A.; Inglehart, R. C.; D’Silva, N. J., 2013: Biomarkers of epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma. *Journal of dental research.*, 92, 114–121
- Schliekelman, M. J.; Taguchi, A.; Zhu, J.; Hanash, S. M., 2015: Molecular portraits of epithelial, mesenchymal and hybrid states in lung adenocarcinoma and their relevance to survival. *Cancer Research.*, 75, 1789–1800
- Schneider, C. A.; Rasband, W. S.; Eliceiri, K. W., 2012: NIH Image to ImageJ: 25 years of Image Analysis. *Nature Methods.*, 9, 671–675
- Siegel, R. L.; Miller, K. D.; Jemal, A., 2018: Cancer statistics, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians.*, 68, 7–30
- Simon, C.; Nemechek, A. J.; Boyd, D.; O’Malley, B. W. J.; Goepfert, H.; Flaitz, C. M.; Hicks, M. J., 1998: An orthotopic floor-of-mouth cancer model allows quantification of tumor invasion. *The Laryngoscope.*, 108, 1686–1691
- Smith, A.; Teknos, T. N.; Pan, Q.; James, A. G., 2013: Epithelial to Mesenchymal Transition in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Oral Oncology.*, 49, 287–292
- Sonnenberg, E.; Meyer, D.; Weidner, K. M.; Birchmeier, C., 1993: Scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor, the c-met tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between mesenchyme and epithelia during mouse development. *Journal of Cell Biology.*, 123, 223–235
- Stoker, M.; Perryman, M., 1985: An epithelial scatter factor released by embryo fibroblasts. *Journal of cell science.*, 77, 209–223
- Subramanian, G.; Schwarz, R. E.; Higgins, L.; McEnroe, G.; Chakravarty, S.; Dugar, S.; Reiss, M., 2004: Targeting Endogenous Transforming Growth Factor Receptor Signaling in SMAD4-Deficient Human Pancreatic Carcinoma Cells Inhibits Their Invasive Phenotype1. *Cancer Research.*, 64, 5200–5211
- Talmadge, J. E.; Fidler, I. J., 2010: AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective. *Cancer Research.*, 70, 5646–5669

- Tamiya, S.; Liu, L. H.; Kaplan, H. J., 2010: Epithelial-mesenchymal transition and proliferation of retinal pigment epithelial cells initiated upon loss of cell-cell contact. *Investigative Ophthalmology and Visual Science.*, 51, 2755–2763
- Tan, E. J.; Olsson, A. K.; Moustakas, A., 2015: Reprogramming during epithelial to mesenchymal transition under the control of TGF $\beta$ . *Cell Adhesion & Migration.*, 9, 233–246
- Tan, T. Z.; Miow, Q. H.; Miki, Y.; Noda, T.; Mori, S.; Huang, R. Y. J.; Thiery, J. P., 2014: Epithelial-mesenchymal transition spectrum quantification and its efficacy in deciphering survival and drug responses of cancer patients. *EMBO Molecular Medicine.*, 6, 1279–1293
- Tauriello, D. V. F.; Palomo-Ponce, S.; Stork, D.; Berenguer-Llgero, A.; Badia-Ramentol, J.; Iglesias, M.; Sevillano, M.; Ibiza, S.; Cañellas, A.; Hernando-Momblona, X.; Byrom, D.; Matarin, J. A.; Calon, A.; Rivas, E. I.; Nebreda, A. R.; Riera, A.; Attolini, C. S. O.; Batlle, E., 2018: TGF $\beta$  drives immune evasion in genetically reconstituted colon cancer metastasis. *Nature.*, 554, 538–543
- Thiery, J. P., 2002: Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews Cancer.*, 2, 442–454
- Thiery, J. P.; Acloque, H.; Huang, R. Y. J.; Nieto, M. A., 2009: Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell.*, 139, 871–890
- Todorović, V.; Desai, B. V.; Eigenheer, R. a; Yin, T.; Amargo, E. V; Mrksich, M.; Green, K. J.; Patterson, M. J. S., 2010: Detection of differentially expressed basal cell proteins by mass spectrometry. *Molecular & cellular proteomics : MCP.*, 9, 351–361
- Tsai, Y. P.; Yang, M. H.; Huang, C. H.; Chang, S. Y.; Chen, P. M.; Liu, C. J.; Teng, S. C.; Wu, K. J., 2009: Interaction between HSP60 and  $\beta$ -catenin promotes metastasis. *Carcinogenesis.*, 30, 1049–1057
- Umbreit, C.; Flanjak, J.; Weiss, C.; Erben, P.; Aderhold, C.; Faber, A.; Stern-Straeter, J.; Hoermann, K.; Schultz, J. D., 2014: Incomplete epithelial-mesenchymal transition in p16-positive squamous cell carcinoma cells correlates with  $\beta$ -catenin expression. *Anticancer research.*, 34, 7061–7069
- Valcourt, U.; Kowanzetz, M.; Niimi, H.; Heldin, C. H.; Moustakas, A., 2005: TGF- $\beta$  and the Smad Signaling Pathway Support Transcriptomic Reprogramming during Epithelial-Mesenchymal Cell Transition. *Molecular biology of the cell.*, 16, 1–13
- Vandewalle, C.; Comijn, J.; De Craene, B.; Vermassen, P.; Bruyneel, E.; Andersen, H.; Tulchinsky, E.; Van Roy, F.; Berx, G., 2005: SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions. *Nucleic Acids Research.*, 33, 6566–6578
- Wang, J.; Yang, L.; Yang, J.; Kuropatwinski, K.; Wang, W.; Liu, X. Q.; Hauser, J.; Brattain, M. G., 2008: Transforming growth factor  $\beta$  induces apoptosis through repressing the phosphoinositide 3-kinase/AKT/survivin pathway in colon cancer cells. *Cancer Research.*, 68, 3152–3160
- Weeks, B. H.; He, W.; Olson, K. L.; Weeks, B. H.; He, W.; Olson, K. L.; Wang, X. Jing, 2001: Inducible Expression of Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 in Papillomas Causes Rapid Metastasis. *Cancer Research.*, 61, 7435–7443
- Wheeler, S. E.; Shi, H.; Lin, F.; Dasari, S.; Bednash, J.; Thorne, S.; Watkins, S.; Joshi, R.; Thomas, S. M., 2014: Tumor associated fibroblasts enhance head and neck squamous cell carcinoma proliferation, invasion, and metastasis in preclinical models. *Head Neck.*, 36, 385–392
- White, R. A.; Malkoski, S. P.; Wang, X. J., 2010: TGF $\beta$  signaling in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene.*, 29, 5437–5446
- Wilentz, R. E.; Iacobuzio-Donahue, C. A.; Argani, P.; McCarthy, D. M.; Parsons, J. L.; Yeo, C. J.; Kern, S. E.; Hruban, R. H., 2000: Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: Evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression. *Cancer Research.*, 60, 2002–2006
- Xu, J.; Lamouille, S.; Derynck, R., 2009: TGF- $\beta$ -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Research.*, 19, 156–172

- Xue, G.; Restuccia, D. F.; Lan, Q.; Hynx, D.; Dirnhofer, S.; Hess, D.; Rüegg, C.; Hemmings, B. A., 2012: Akt/PKB-mediated phosphorylation of Twist1 promotes tumor metastasis via mediating cross-talk between PI3K/Akt and TGF- $\beta$  signaling axes. *Cancer Discovery.*, 2, 248–259
- Yang, L.; Pang, Y.; Moses, H. L., 2010: TGF- $\beta$  and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends in Immunology.*, 31, 220–227
- Yang, L., 2010: TGF $\beta$ , a potent regulator of Tumor Microenvironment and Host Immune Response, Implication for Therapy. *Current molecular medicine.*, 10, 374–380
- Ye, X.; Tam, W. L.; Shibue, T.; Kaygusuz, Y.; Reinhardt, F.; Eaton, E. N.; Weinberg, R. A., 2015: Distinct EMT programs control normal mammary stem cells and tumour-initiating cells. *Nature.*, 525, 256–272
- Yingling, J. M.; McMillen, W. T.; Yan, L.; Huang, H.; Sawyer, J. S.; Graff, J.; Clawson, D. K.; Britt, K. S.; Anderson, B. D.; Beight, D.; Desai, D.; Lahn, M. M.; Benhadji, K. A.; Lallena, M. J.; Holmgaard, R. B.; Xu, X.; Zhang, F.; Manro, J. R.; Iversen, P. W. et al., 2018: Preclinical assessment of galunisertib (LY2157299 monohydrate), a first-in-class transforming growth factor- $\beta$ ; receptor type I inhibitor. *Oncotarget.*, 9, 6659–6677
- Zavadil, J.; Bitzer, M.; Liang, D.; Yang, Y. C.; Massimi, A.; Kneitz, S.; Piek, E.; Bottinger, E. P., 2001: Genetic programs of epithelial cell plasticity directed by transforming growth factor- $\beta$ . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, 98, 6686–6691
- Zeisberg, M.; Neilson, E. G., 2009: Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *The Journal of Clinical Investigation.*, 119, 1429–1437
- Zhang, P.; Sun, Y.; Ma, L., 2015: ZEB1: At the crossroads of epithelial-mesenchymal transition, metastasis and therapy resistance. *Cell Cycle.*, 14, 481–487
- Zhang, Y.; Du, Z.; Zhang, M., 2016: Biomarker development in MET-targeted therapy. *Oncotarget.*, 7, 37370–37389
- Zhang, Y.; Weinberg, R. A., 2018: Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities. *Frontiers of Medicine.*, 12, 361–373
- Zhang, Y. E., 2009: Non-smad pathways in TGF- $\beta$  signaling. *Cell Research.*, 19, 128–139
- Zhao, M.; Sano, D.; Pickering, C. R.; Jasser, S. A.; Henderson, Y. C.; Clayman, G. L.; Sturgis, E. M.; Ow, T. J.; Lotan, R.; Carey, T. E.; Sacks, P. G.; Grandis, J. R.; Sidransky, D.; Heldin, N. E.; Myers, J. N., 2011: Assembly and Initial Characterization of a Panel of 85 Genomically Validated Cell Lines from Diverse Head and Neck Tumor Sites. *Human Cancer Biology.*, 17, 7248–7265
- Zheng, X.; Carstens, J. L.; Kim, J.; Scheible, M.; Kaye, J.; Sugimoto, H.; Wu, C. Chin; Lebleu, V. S.; Kalluri, R., 2016: EMT Program is Dispensable for Metastasis but Induces Chemoresistance in Pancreatic Cancer. *Nature.*, 527, 525–530
- Zicha, D.; Genot, E.; Dunn, G. a; Kramer, I. M., 1999: TGF $\beta$ 1 induces a cell-cycle-dependent increase in motility of epithelial cells. *Journal of cell science.*, 112, 447–454

## 8 Anhang

### 8.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die im Folgenden aufgeführten Damen und Herren in Marburg:

Adamkiewicz, Baumann, Becker, Bette, Braun, Brehm, Bücking, Cetin, Czubayko, Daniel, Daut, Decher, del Rey, Dodel, Eberhart, Eickmann, Eisoldt, Feuser, Fritz, Gress, Grundmann, Hertl, Hildebrandt, Höffken, Homberg, Hoyer, Kann, Kinscherf, Kircher, Köhler, König, Kühnert, Leonhardt, Lill, Lohoff, Lüsebrink, Maier, Mandic, Meissner, Moll, Morin, Mueller, Mutters, Neubauer, Neumüller, Oberwinkler, Oliver, Opitz, Pankuweit, Plant, Preisig-Müller, Reese, Renz, Roelcke, Rost, Ruchholtz, Schäfer, Schieffer, Schratt, Seifart, Seitz, Sekundo, Sevinc, Sommer, Steinfeldt, Steiniger, Stuck, Timmesfeld, Vassiliou, Vogelmeier, Wagner, Weihe, Westermann, Wilhelm, Wrocklage, Wulf und Zemlin.

## 8.2 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn apl. Prof. R. Mandic für sein Engagement und seine tatkräftige Unterstützung bedanken, welche die Fertigstellung dieser Arbeit erst ermöglicht hat. Er stand mir mit seinem wissenschaftlichen Rat jederzeit zur Seite. Seine inhaltlichen und praktischen Ideen und Anregungen haben wesentlich den Rahmen dieser Arbeit geformt.

Zudem bedanke ich mich bei Roswitha A. Peldszus und Maria Sadowski für ihre praktische Hilfeleistung und umfassende Unterstützung innerhalb und außerhalb des Labors.

Herrn Gavin Giel (AG PD Dr. C. Brendel) danke ich herzlich für die Einführung und angenehme Zusammenarbeit am LSR II.

Herrn PD Dr. rer. nat. M. Bette danke ich für die freundliche Einführung in die Fluoreszenzmikroskopie.

Herrn PhD P. DiFazio danke ich für die freundliche Bereitstellung und umfassende Einführung in das RTCA Gerät.

Herrn apl. Prof. Dr. rer. nat. M. Buchholz danke ich für die freundliche Unterstützung bei der Auswertung des *in vitro scratch wound assays*.

Auch bedanke ich mich bei Jovine, Philipp und Philip für das gemeinsame Durchstehen emotionaler und wissenschaftlicher Höhen und Tiefen.

Zu guter Letzt gebührt der größte Dank meinen Freunden und meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meinem Bruder, die mich tagtäglich in jeder Lebens- und Gefühlslage unterstützt haben.