

Aus der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde

der Universität zu Lübeck

Direktor: PD Dr. med. Karl-Ludwig Bruchhage

Einfluss von Toll-like-Rezeptor 3 auf die Epithelial-Mesenchymale Transition in Kopf-Hals-Karzinom-Zellen

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Universität zu Lübeck

-Aus der Sektion Medizin-



vorgelegt von

Henrieke Hell aus Itzehoe

Lübeck 2022

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Ralph Pries

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Samer Hakim

Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.2022

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 21.12.2022

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich (Head and neck squamous cell carcinoma)	1
1.2 Toll-like-Rezeptoren	2
1.2.1 Toll-like-Rezeptor 3	3
1.3 Epithelial-Mesenchymale Transition.....	3
1.3.1 Arten der EMT	4
1.3.2 Ablauf und Charakteristika der EMT	4
1.3.3 EMT in Tumorzellen	7
2. Fragestellung der Arbeit	8
3. Material und Methoden	9
3.1 Material.....	9
3.1.1 Zelllinien	9
3.1.1.1 HNSCC-Zelllinien	9
3.1.1.2 HEK-Blue-Zelllinien	9
3.1.2 Zellkulturmedien und Zusätze	9
3.1.3 Kits.....	10
3.1.4 Liganden zur Rezeptorstimulation/-inhibierung	11
3.1.5 Antikörper	11
3.1.6 TaqMan®-Sonden.....	12
3.1.7 Chemikalien und Reagenzien.....	12
3.1.8 Puffer und Lösungen	15
3.1.9 Verbrauchsmaterial	16
3.1.10 Geräte	17
3.1.11 Software.....	19
3.2 Methoden	19
3.2.1 Zellkultur	19
3.2.2 Zellzahlbestimmung	20
3.2.3. Stimulation	20
3.2.4 Real Time quantitative Polymerase-Kettenreaktion.....	21
3.2.4.1 RNA-Isolation.....	21

3.2.4.2 cDNA-Synthese	22
3.2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion	23
3.2.4.4 Real-Time quantitative PCR	24
3.2.5 Proteinisolierung	26
3.2.6 Bradford-Messung	27
3.2.7 SDS-Page.....	27
3.2.8 Western Blot.....	28
3.3 Statistische Auswertung	30
3.3.1 Signifikanztests	30
4. Ergebnisse.....	32
4.1 Expressionsanalyse der EMT-Marker auf RNA-Ebene	32
4.1.1 Vergleich von Primarius und Metastase in nativem Zustand	32
4.1.2 Einfluss der TLR3-Stimulation auf UT-SCC 60A und UT-SCC 60B	37
4.1.3 Genexpression in der Primärtumorzelllinie nach TLR3-Stimulation und TLR3- Inhibition	39
4.2 Expressionsanalyse ausgewählter EMT-Marker auf Proteinebene.....	43
4.2.1 Einleitung	43
4.2.2 Proteinexpression von MMP9	43
4.2.3 Proteinexpression von BMP2.....	45
4.2.4 Proteinexpression von IL1RA.....	46
4.2.5 Proteinexpression von MMP9, BMP2 und IL1RA in HEK-Zellen.....	48
5. Diskussion	52
5.1 Vergleich von Primärtumor- und Metastasenzelllinie in nativem Zustand.....	52
5.2 Einfluss der Aktivierung und Inhibierung von TLR3 auf die EMT in Kopf-Hals- Karzinomen	53
5.3 Limitationen der statistischen Auswertung	59
6. Zusammenfassung.....	60
7. Literaturverzeichnis	61
8. Tabellenverzeichnis.....	71
9. Abbildungsverzeichnis.....	72
10. Abkürzungsverzeichnis	73

11. Danksagung	76
12. Lebenslauf	77

1. Einleitung

1.1 Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich (Head and neck squamous cell carcinoma)

Jährlich erkranken weltweit über 900.000 Menschen (Bray et al. 2018) an einem bösartigen Tumor der Kopf-Hals-Region. Dazu zählen sowohl Tumoren der Mundhöhle und Lippen als auch Pharynx-, Larynx-, Nasenhaupt- und -nebenhöhlen- und Speicheldrüsentumoren. Hierbei sind Männer etwa doppelt so häufig betroffen wie Frauen. Als Risikofaktoren gelten vor allem Tabak- und Alkoholkonsum, weltweit sind 70% der Tumoren im Kopf-Hals-Bereich mit den beiden Noxen assoziiert (Vigneswaran and Williams 2014). Das Risiko für Raucher, an einem Tumor im Kopf-Hals-Bereich zu erkranken ist dabei etwa zehnmal höher als das eines Nichtraucher (Jethwa and Khariwala 2017).

Die Stadieneinteilung wird anhand der internationalen TNM-Klassifikation der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) vorgenommen, T bezeichnet dabei die Ausdehnung des Primärtumors, N das Vorhandensein/Fehlen von regionären Lymphknotenmetastasen, M das Vorhandensein/Fehlen von Fernmetastasen. Im Kopf-Hals-Bereich wird dabei seit der 2016 erschienenen, achten Version der Klassifikation auch zwischen HPV-positiven und -negativen Tumoren unterschieden (Huang et al. 2017). HPV-positive Tumoren sind dabei besonders mit dem Auftreten im Oropharyngealraum bei jüngeren Patienten assoziiert (Marur and Forastiere 2016). Die Diagnose wird dabei in über der Hälfte der Fälle in einem fortgeschrittenen regionalen Stadium oder in einem ausgedehnten Tumorstadium gestellt (Gatta et al. 2015), wobei die Fünf-Jahres-Überlebensrate mit Ausdehnung der Tumormanifestation bei Diagnosestellung deutlich sinkt. So beträgt die Fünf-Jahres-Überlebensrate eines Patienten mit Fernmetastasen bei Diagnosestellung knapp unter 40%, bei Diagnosestellung in einem lokalen Stadium ohne Metastasierung über 80% (Siegel et al. 2016). Wichtigster prognostischer Faktor für das Überleben ist demnach das Vorhandensein und die Ausdehnung von Metastasen bei Diagnosestellung (Zanoni et al. 2019). Häufig geht eine frühe Metastasierung mit einer Beeinflussung des Immunsystems einher. Durch Einflussnahme auf das körpereigene Immunsystem werden antitumoröse Immunantworten verändert (Duray et al. 2011).

Die Therapie der Tumorerkrankung hängt aktuell maßgeblich vom Stadium der Tumorausdehnung bei Diagnosestellung ab. Diese wird bildgebend, makroskopisch und histopathologisch erhoben. Dabei wird aktuell nicht für alle Tumorarten im Kopf-Hals-

Bereich eine molekulargenetische Testung gefordert. Lokale Tumoren in einem frühen Tumorstadium werden meist chirurgisch oder radiotherapeutisch behandelt, Tumoren in fortgeschrittenen Tumorstadien mit einer Kombinationsbehandlung aus chirurgischer Therapie, Radiotherapie und Chemotherapie (Marur and Forastiere 2016).

Trotz vieler Fortschritte und neuer pathophysiologischer Erkenntnisse in der Ätiologie und Therapie der Kopf- und Hals-Tumore verbleiben viele der überlebenden Patienten mit schwersten kosmetischen und funktionellen Einschränkungen. Sprache, Schlucken und Nahrungsaufnahme sowie in einigen Fällen sogar die selbstständige Atmung sind oft schwer beeinträchtigt (Jethwa and Khariwala 2017). Neben dem dadurch entstehenden deutlichen Verlust der Lebensqualität sind die ökonomischen Folgen durch lange Krankenhausaufenthalte und Einschränkungen im alltäglichen Leben massiv. Die weiterführende Forschung auf diesem Gebiet ist dringend notwendig, um die Behandlung, Überlebensrate und insbesondere die Lebensqualität der Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren weiter zu verbessern.

1.2 Toll-like-Rezeptoren

Toll-like-Rezeptoren sind Bestandteil des angeborenen Immunsystems und gehören der Gruppe der „Pattern Recognition Receptors“ an. Diese erkennen „Pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs), Strukturen, die auf oder in Krankheitserregern zu finden sind. Damit besitzen die Toll-like-Rezeptoren eine Schlüsselfunktion in der Initiierung einer Immunantwort sowie in der Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen. Bis heute sind dreizehn Toll-like-Rezeptoren bei Säugetieren bekannt, von denen zehn im Menschen exprimiert werden (Pimentel-Nunes et al. 2013). Toll-like-Rezeptor 3, 7/8 und 9 sind an der Membran von Endo(lyso)somen zu finden, die restlichen an der Zellmembran (Taro Kawai and Akira 2010). Den verschiedenen Toll-like-Rezeptoren gemein ist eine N-terminale leucinreiche Sequenz, welche unterschiedlich ausgeprägt ist und die Ligandenspezifität definiert. Die intrazellulären Toll-like-Rezeptoren dienen der Erkennung von viralen Nukleinsäuren und bakterieller DNA, die an der Zellmembran lokalisierten Toll-like-Rezeptoren der Erkennung bakterieller Zellwandstrukturen und weiterer Komponenten von Mycoplasmen, Pilzen und Viren. Die Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren geschieht durch bakterielle Proteoglykane, DNA oder RNA und führt über verschiedene Signalwege, darunter MyD88 und TRIF, zur Stimulation der Immunantwort (Satoh and Akira 2016), aber auch zur Regulation von Zellproliferation, -differenzierung, Mitose, Apoptose und Zellzyklusregulation. So sind die Toll-like-Rezeptoren in einem

gesunden Organismus maßgeblich an der Immunantwort beteiligt. In tumorös verändertem Gewebe kann durch eine alternierte TLR-Regulation eine chronische Entzündung und letztlich die Tumorprogression unterhalten werden (Pimentel-Nunes et al. 2013). Inzwischen sind die Expressionslevel von Toll-like-Rezeptoren in unterschiedlichen Tumorentitäten untersucht worden, wobei sich auch bei Kopf-Hals-Tumoren ein hohes Expressionslevel an Toll-like-Rezeptoren findet (Ruuskanen et al. 2019), was die Verbindung zwischen TLR und der fortschreitenden Tumorerkrankung in den Fokus der Forschung rücken lässt.

1.2.1 Toll-like-Rezeptor 3

Toll-like-Rezeptor 3 gehört zur Gruppe endosomal lokalisierten der Toll-like-Rezeptoren. TLR3 wird in verschiedenen dendritischen Zellen, Makrophagen, Lymphozyten, Fibroblasten und Epithelzellen exprimiert (Guillerey et al. 2015), aber auch in Tumorzellen des Kopf-Hals-Bereiches (Pries et al. 2008). TLR3 wird durch doppelsträngige virale RNA induziert. Als synthetisches Analogon steht Polyinosinic:polycytidylic acid (Poly(I:C)) zur Verfügung (Y. Zhou et al. 2013). Bei Stimulation von TLR3 wird das Adapterprotein TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β) aktiviert, welches über die Serin-Threoninkinase TBK1 (TANK-binding kinase) die Transkriptionsfaktoren IRF3 (Interferon regulatory factor 3) und NF- κ B (Nuclear-factor ,kappa-light-chain-enhancer‘ of activated B-cells) aktiviert. Dadurch werden Typ I-Interferone (Interferon β) und inflammatorische Zytokine ausgeschüttet (Kawai and Akira 2006).

Dabei spielt TLR3 in Kopf-Hals-Karzinomzellen bisher eine doppeldeutige Rolle. Einerseits scheint TLR3 in der Tumoradaptation an bestimmte Mangelfaktoren eine Rolle zu spielen und somit tumorprogressiv zu wirken (Veyrat et al. 2016), andererseits scheint die Aktivierung von TLR3 über Caspasenaktivierung mit der Induktion von Apoptose einherzugehen (Luo et al. 2012). Ein umfassendes Verständnis der Wirkungsweise von TLR3 in malignen Zellen des Kopf-Hals-Bereiches bedarf weiterer Forschungsarbeiten.

1.3 Epithelial-Mesenchymale Transition

Die Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT) bezeichnet den Übergang von polarisierten Epithelzellen in Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften. Der Prozess ist reversibel und kann auch in entgegengesetzter Richtung als Mesenchymal-Epitheliale Transition stattfinden. Die Signalkaskaden, die zur Ausbildung der EMT führen, sind dabei vielfältig ausgeprägt und abhängig von der Umgebung, in der die EMT stattfindet (Micalizzi,

Farabaugh, and Ford 2010). Es konnten diverse Biomarker der EMT klassifiziert werden, wobei einige während des Vorgangs herauf-, andere herunterreguliert werden (Zeisberg and Neilson 2009).

1.3.1 Arten der EMT

Die EMT tritt im menschlichen Körper in unterschiedlichen biologischen Zusammenhängen auf und wird in drei Typen klassifiziert (Ribatti 2017). Typ I benennt die EMT in der Embryogenese und Organentwicklung. In diesem Zusammenhang haben die Mesenchymzellen die Funktion, eine erneute MET durchzuführen und neue Epithelzellen zu bilden (Kalluri and Weinberg 2009). Der Typ 2 der EMT tritt in Assoziation mit einer Entzündungsreaktion bei Wundheilung und Geweberegeneration auf. Bei chronischem Verlauf und persistierender Inflammationsreaktion kann es zu einer Organdestruktion in Form einer Fibrose kommen. Typ 3 der EMT tritt in neoplastischen Zellen auf und ist eine Form der Migration von Tumorzellen. Dabei kann mit Hilfe der MET nach erfolgreicher EMT ein solider Tumor in Form einer Metastase an anderer Stelle im humanen Organismus ausgebildet werden (Scanlon et al. 2013). Die drei Formen der EMT können dabei voneinander unabhängig oder in Kombination auftreten.

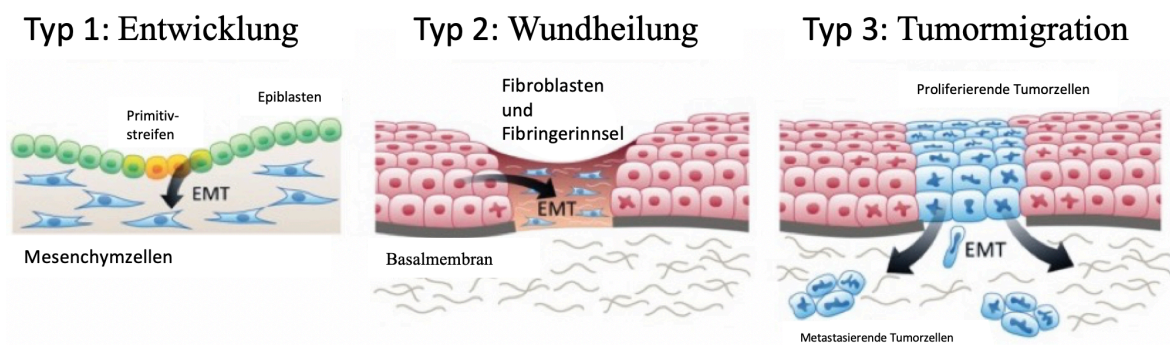


Abbildung 1

Darstellung der drei Typen der EMT. Modifiziert nach Scanlon et al. 2013

1.3.2 Ablauf und Charakteristika der EMT

Die EMT ist ein komplexer Vorgang, bei dem es zur Ausbildung von Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften aus Epithelzellen kommt. Epithelzellen besitzen eine apiko-basale Polarität und über tight junctions, gap junctions und adherens junctions enge Kontakte zu Nachbarzellen. Epithelzellen sind in einem regelmäßigen Zellverband angeordnet. Dabei sorgen verschiedene Proteine wie E-Cadherin, Laminin-1 oder Cytokeratin für die Stabilisierung der Zell-Zell-Kontakte. Der Prozess der EMT geht mit einer Hochregulation

von mesenchymalen Proteinen wie N-Cadherin, Vimentin, Fibronectin, Twist und Snail einher. Das führt zu einem Verlust der apiko-basalen Polarität als Folge der Auflösung der Zell-Zell-Interaktionen und einer Vermischung von apikalen und basalen Membrankomponenten (Ribatti 2017) sowie einer Auflösung der Basalmembran. Der Zellverband wird zu mesenchymalen Zellen mit hohem Migrationspotential und ohne Zell-Zell-Kontakte (Micalizzi et al. 2010), sodass die Zellen in den Extrazellulärraum abwandern können.

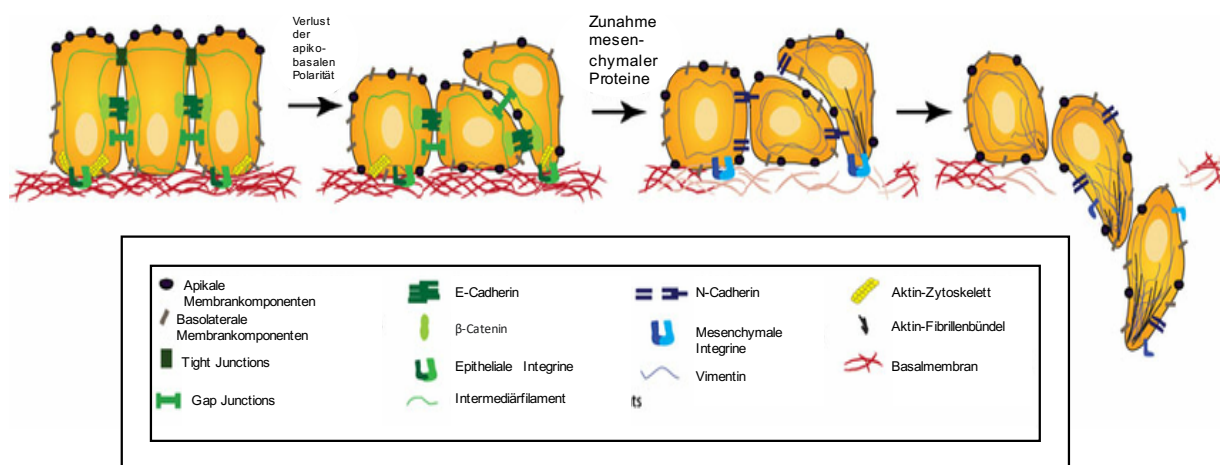


Abbildung 2
Ablauf der EMT. Modifiziert nach Micalizzi et al. 2010

Eigenschaften	Epithelzelle	Mesenchymale Zelle
Morphologie	Polygonal, im Zellverband, Pflastersteinartige Anordnung	Elongiert und spindelförmig
Polarität	Apiko-Basal	Frontal-Dorsal
Motilität	Unbeweglich	Beweglich und invasiv
Zytoskelett	Expression von Zytokeratinen	Expression von Vimentin
Zell-Zell-Kontakte	Tight Junctions, Gap Junctions, Adherens Junctions	Focal adhesions mit der Extrazellulärmatrix

Abbildung 3
Eigenschaften von Epithelzellen und Mesenchymzellen. Modifiziert nach Ye and Weinberg 2015

Auf Signaltransduktionsebene ist die EMT ein vielschichtiger Vorgang, für deren Auslösung mehrere Signalwege bekannt sind. Darunter finden sich TGF- β (Transforming-Growth-Factor) in Kombination mit dem Smad-Protein, Wnt (Wingless Int) und Notch-vermittelte Signalkaskaden (Son and Moon 2013). Viele Signalkaskaden agieren dabei gewebespezifisch, also nicht in allen Geweben auf die gleiche Weise. Dabei spielen sowohl

die Funktion der Zelle zum Zeitpunkt der EMT eine Rolle als auch die Umgebung. Andere Konditionen, wie beispielsweise Hypoxie, scheinen in verschiedenen Geweben zuverlässig mit der EMT in Verbindung zu stehen (Gonzalez and Medici 2014; Gammon and Mackenzie 2016; Philip et al. 2013). Es konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen Signalkaskaden und Transkriptionsfaktoren miteinander in Verbindung stehen und die Induktion der EMT in einem Gewebe auf verschiedene Arten stattfinden kann (Son and Moon 2013). Als Kennzeichen der EMT wird der Verlust von E-Cadherin (Puisieux et al. 2014; Serrano-Gomez et al. 2016) bei gleichzeitiger Zunahme der Expression von N-Cadherin angesehen. Dies wird als „Cadherin-Switch“ bezeichnet (Wheelock et al. 2008). Dieser wird unter anderem über verschiedene Transkriptionsfaktoren vermittelt. Von Snail (Cano et al. 2000; Mendelsohn et al. 2012) sowie Mitgliedern der Zinkfinger-Familie (ZEB, Twist) ist eine direkte (Bolós et al. 2003) oder indirekte Hemmung von E-Cadherin nachgewiesen (Vesuna et al. 2008; Yang et al. 2004). Beim Abbau von E-Cadherin wird β -Catenin als Bestandteil des Cadherin-Komplexes freigesetzt. Dieses transloziert in den Zellkern und fungiert dort als Bestandteil verschiedener Signalwege (Serrano-Gomez et al. 2016) zur Transkription von Zielgenen mit mesenchymalen Eigenschaften wie Fibronectin, Vimentin und N-Cadherin. Die Synthese von Fibronectin wiederum ist mit einer Aktivierung des Wnt-Signalweges verbunden, wodurch eine Rückkopplung über die Akkumulation von β -Catenin im Zellkern erfolgt (T. Brabletz et al. 2001). Dies ist in der physiologischen EMT ein zentraler Bestandteil (Nieto 2011) innerhalb einer Signalkaskade (J. Zhang et al. 2014), aber auch zwischen Zelle und Umgebung. Die Glykogensynthasekinase 3β (GSK 3β) ist als Bestandteil mehrerer Schnittpunkte von Signalkaskaden eins der regulierenden Enzyme (Gonzalez et al. 2014). Bei der physiologischen EMT wird das β -Catenin durch die GSK 3β phosphoryliert und proteasomal abgebaut, bevor es in den Zellkern eindringen kann (Kimelman and Xu 2006; MacDonald et al. 2009). Die Aktivierung des Wnt-Signalweges kann allerdings auch für eine Hemmung der GSK 3β sorgen, wodurch die Menge an Beta-Catenin im Zellkern steigt. Dadurch wird die Transkription von Zielgenen mit mesenchymalen Eigenschaften aktiviert und so die EMT unterhalten (Kazi et al. 2018; Kim et al. 2002; Yeh et al. 2019). Im Falle von malignen Zellen am Beispiel von Nasopharynxkarzinomen bedeutet dies Tumorwachstum und Metastasierung (Ma et al. 2013), sodass die Inhibierung des Wnt-Signalweges und damit der abnormen EMT eine mögliche therapeutische Option darstellt (Reyes et al. 2019).

1.3.3 EMT in Tumorzellen

Die dysreguliert ablaufende EMT ist ein zentraler Prozess in der Entwicklung und Ausbreitung von Tumoren. Die Epithelial-Mesenchymale Transition ist unabdingbar für Metastasierung und Migration der malignen Zellen, was in vielen Tumorentitäten mit einer deutlich erschwerten Behandlung und schlechteren Prognose einhergeht. In HNSCC sind bereits einige Biomarker zur Charakterisierung der EMT bekannt (Scanlon et al. 2013).

Das Vorhandensein einer aktiven EMT gemessen anhand der EMT-Marker ist als ungünstiger prognostischer Faktor nachgewiesen (Zhang et al. 2014). Ein „Cadherin-Switch“ in HNSCC geht mit einer erhöhten Lymphknotenmetastasierung und einem invasiven Wachstum einher (Nguyen et al. 2011). Das Vorhandensein einer mesenchymalen Gensignatur geht dabei mit einer schlechteren Prognose einher als eine epitheliale Gensignatur (Jung et al. 2020). Die Messung der Expression des als epitheliale Marker bekannten E-Cadherin und des als Marker für die mesenchymale Zellausstattung bekannten Vimentin scheint gegenüber der alleinigen Messung der Expression mesenchymaler Gene in der Prognosevorhersage von oralen Karzinomen von Vorteil (Wangmo et al. 2019). Dabei ist die verminderte Expression von E-Cadherin in einer Studie mit Proben aus Plattenepithelkarzinomen aus dem Mundraum (Oral-Squamous Cell Carcinom, OSCC) als signifikant mit dem fortgeschrittenen Tumorstadium verknüpft und die Expression von E-Cadherin und Vimentin mit Metastasierung assoziiert. Das Alter der Patienten, die Lokalisation des Tumors sowie das Geschlecht waren dabei unabhängige Parameter (Zhou et al. 2015).

Das Vorhandensein von Transkriptionsfaktoren allein beeinflusst dabei nicht nur die Metastasierung, sondern gleichfalls die Chemoresistenz (Bharti et al. 2016; Göppel et al. 2017). Epithelzellen in Tumoren, welche eine EMT durchlaufen haben, weisen zum Teil Eigenschaften von Tumorstammzellen auf (Mani et al. 2008) und können in einem Zwischenstadium zwischen Epithelzellen und Mesenchymzellen verbleiben (Pastushenko et al. 2018). In einer Studie mit Snail-transfizierten Zelllinien von Kopf-Hals-Tumoren wurde nachgewiesen, dass diese ähnliche Eigenschaften wie Tumorstammzellen aufweisen und damit ein höheres Potential für invasives Wachstum und Resistenz gegenüber Chemotherapeutika besitzen (Ota et al. 2016). Die EMT in Tumorzellen des Kopf-Hals-Bereiches ist ein vielversprechender Ansatzpunkt für neue Therapeutika (Way et al. 2014) und daher im Fokus weiterführender Forschungsprojekte.

2. Fragestellung der Arbeit

Toll-like-Rezeptor 3 besitzt als Teil des angeborenen Immunsystems eine Vielzahl an Aufgaben und eine Schlüsselfunktion in der Unterscheidung von körpereigenen und körperfremden Strukturen. Bei Induktion von TLR3 wird die Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen angeregt. In malignen Kopf-Hals-Tumoren ist TLR3 ebenfalls zu finden, die Rolle ist bisher jedoch nicht eindeutig geklärt.

Diese Arbeit soll dazu beitragen, die Funktion von TLR3 in Kopf-Hals-Karzinomen weiter zu klären und insbesondere den Einfluss einer Aktivierung von TLR3 auf die Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT) weiter zu charakterisieren. Im ersten Schritt soll die Wirkungsweise einer Aktivierung von TLR3 durch Poly(I:C) auf verschiedene EMT-Marker auf RNA-Ebene untersucht werden. In einem zweiten Schritt erfolgt die Betrachtung ausgewählter, wichtiger EMT-Marker auf Proteinebene. Dabei wird konkret die Frage aufgeworfen, ob es einen Zusammenhang zwischen der Aktivierung von TLR3 und der Expression der EMT-Marker gibt und ob die Aktivierung von TLR3 deren Expression beeinflussen kann. Dies soll zur weiterführenden Analyse sowohl mit kultivierten Tumorzelllinien als auch mit TLR3-Knock-out-Zelllinien untersucht werden.

Durch Aufzeigen der Zusammenhänge zwischen TLR3-Stimulation und Expression von EMT-Markern sollen Grundlagen für mögliche neue Therapiemöglichkeiten und weitere Forschung auf diesem Gebiet geschaffen werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zelllinien

3.1.1.1 HNSCC-Zelllinien

Zelllinie	UT-SCC-60A	UT-SCC-60B
Geschlecht	männlich	männlich
Alter	59 Jahre	59 Jahre
Probenort	Tonsille	Hals
TNM-Klassifikation	T ₄ N ₁ M ₀	T ₄ N ₁ M ₀
Grad	G1	G1
Typ	Primärtumor	Metastase

Tabelle 1 HNSCC-Zelllinien

3.1.1.2 HEK-Blue-Zelllinien

Zelllinie	HEK-Blue™ Null 1 Cells	HEK-Blue™ hTLR3 Cells
Firma	InvivoGen Toulouse, Frankreich	InvivoGen Toulouse, Frankreich
TLR3-Status	Knock-Out	vorhanden
Katalognummer	hkb-null1	hkb-tlr3

Tabelle 2 HEK-Blue-Zelllinien

3.1.2 Zellkulturmedien und Zusätze

Zubehör	Hersteller	Zusätze
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), High Glucose (4,5g/l), L-Glutamin, Phenolrot	Lonza Group Ltd, Basel, Schweiz	10% Fetales Kälberserum 1% Penicillin 1% Natriumpyruvat
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Lonza Group Ltd, Basel, Schweiz	Ohne Calcium, Magnesium und Phenolrot

Accutase-Enzyme Cell Detachment Medium	eBioscience, San Diego, CA, USA
Fetal Bovine Serum	GE Healthcare, Pittsburg, PA, USA Hitzeinaktiviert
Penicillin/Streptomycin, 10.000 U/ml	Biochrom, Berlin, Deutschland
Sodium Pyruvate, 100mM	Invitrogen Gibco ® , Darmstadt, Deutschland
Trypanblau 0,5%	Biochrom, Berlin, Deutschland 0,2% gemischt in PBS
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Mycogone	AMS Biotechnology, Abingdon, Großbritannien
Mycoplasma-Off	Minerva Biolabs, Berlin, Deutschland
HEK-Blue™ detection medium	InvivoGen Europe, Toulouse, Frankreich

Tabelle 3 Zellkulturmedien und Zusätze

3.1.3 Kits

Kit	Verwendung	Hersteller
Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit	cDNA-Synthese	Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA
QIAshredder™ Plus Mini Kit	RNeasy® RNA-Isolation	Qiagen, Hilden, Deutschland
RT ² First Strand Kit	cDNA-Synthese	Qiagen, Hilden, Deutschland
RT ² Profiler™ PCR Array	Real-Time PCR	Qiagen, Maryland, USA
RT ² SYBR Green qPCR Mastermix	Real-Time-PCR	Qiagen, Hilden, Deutschland

Tabelle 4 Kits

3.1.4 Liganden zur Rezeptorstimulation/-inhibierung

Name	Ligand/Inhibitor für:	Hersteller
Poly (I:C) High Molecular Weight 1mg/ml	TLR 3	InvivoGen, San Diego, CAUSA
TLR3/dsRNA Inhibitor	Complex TLR 3	Merck-Millipore, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 5 Liganden

3.1.5 Antikörper

Primärantikörper	Verwendung: Western Blot	Hersteller
Rabbit anti-MMP 9	1:1000 in 5% BSA/TBS-T	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Rabbit anti-SNAIL 1	1:1000 in 5% BSA/TBS-T	Cell Signaling 13667 Cell Signaling 3879
Mouse anti-IL1RA	1:1000 in 5% BSA/TBS-T	Cell Signaling 3865 Cell Signaling 3879
Mouse anti-BMP 2/4	1:1000 in 5% BSA/TBS-T	Santa Cruz, Dallas, Texas, USA sc-137087
Mouse anti-β-Actin	1:50.000 in 5% BSA/TBS-T	Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, USA A1978
Sekundärantikörper	Verwendung: Western Blot	Hersteller
Goat anti-Mouse-AP	1:50.000	BioRad, München, Deutschland
Goat anti-Rabbit-AP	1:50.000	BioRad, München, Deutschland

Tabelle 6 Antikörper

3.1.6 TaqMan®-Sonden

Gen	Beschreibung	Spezies	Produkt
ACTB	β-Aktin	Homo Sapiens	171 bp
CDH1	Cadherin-1, Typ 1 E- Cadherin, epithelial	Homo Sapiens	61 bp
CDH2	Cadherin 2, Typ 1, N-Cadherin, neuronal	Homo Sapiens	66 bp
FN1	Fibronektin 1	Homo Sapiens	66 bp
SNAI1	Snail Homolog 1, Drosophila	Homo Sapiens	66 bp
Twist1	Twist Homolog 1, Drosophila	Homo Sapiens	115 bp
VIM	Vimentin	Homo Sapiens	73 bp

Tabelle 7 TaqMan®-Sonden

3.1.7 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien/Reagenzien	Verwendung	Hersteller
<i>Proteinpräparation</i>		
1x RIPA Puffer		Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Aprotinin (from a bovine lung)		Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)		Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Phosphatase Cocktail	Inhibitor	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumfluorid		Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Pepstatin A		Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Bradford Quickstart 1x Dye Reagenz	BioRad Laboratories GmbH, München, Dtschl.
<i>SDS-Gelektrophorese</i>	
Rotiphorese ®Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
1M Tris-HCl pH 8,8 und 6,8	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
1% SDS/Natriumlaurylsulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
10% APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
TEMED	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
peqGOLD Proteinmarker V, Pre-Stained	Peqlab, Erlangen, Deutschland
<i>Western Blot</i>	
Ponceau S Solution for eletrophoresis (0,2%)	SERVA electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Tween 20 EIA Grade	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
ECL-Lösung	ThermoScientific, Schwerte, Deutschland
<i>DNA-Agarosegel</i>	
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Dtschl.
Gene Ruler 100bp DNA Ladder	Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA
6x Orange DNA Loading Dye	Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA

Ethidiumbromid	Invitrogen,	Darmstadt,
	Deutschland	
<i>RNA-Agarosegel</i>		
GeneRuler™ 1kb DNA ladder	Fermentas,	Schwerte,
	Deutschland	
2xRNA-Loading Dye	Fermentas,	Schwerte,
	Deutschland	
37% Formaldehyd	Sigma Aldrich,	St.Louis,
	Missouri,	USA
<i>RNA-Isolation</i>		
2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich,	St.Louis,
	Missouri,	USA
100% Ethanol	Apotheke UKSH Lübeck,	Deutschland
<i>RT-qPCR</i>		
TaqMan® Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems,	Foster City, CA, USA
DEPC Treated-Water	Life Technologies,	Carlsbad, CA, USA
<i>Kontroll-PCR</i>		
Ampliqon TAQ DNA- Polymerase	Ampliqon,	Odense, Dänemark
dNTP Mix	Thermo Scientific,	Wilmington, DE, USA
10x Reaktionspuffer	Ampliqon,	Odense, Dänemark
MgCl ₂	Fermentas,	Schwerte, Deutschland

Tabelle 8 Chemikalien und Reagenzien

3.1.8 Puffer und Lösungen

Puffer	Verwendung/Zusammensetzung	Hersteller
<i>SDS-Gelektrophorese</i>		
4xSDS-Ladepuffer	0,25mM Tris-Hcl pH6,8	} Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
	8% SDS/Natriumlaurylsulfat	
	40% Glycerol	
	0,004% Bromphenolblau	
	20% 2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
10x Laufpuffer	1% SDS/Natriumlaurylsulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
	0,25 M Tris-Base	
	1,92 M Glycin	
<i>Western Blot</i>		
10x Tris-buffered Saline (TBS)	0,2 M Tris 1,37 M NaCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland Merck, Darmstadt, Deutschland
10x Transferpuffer	20% Methanol	J.T.Baker, Phillipsburg, USA
	25 mM Tris-Base	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
	192 mM Glycin	
<i>Agarose-Gelektrophorese</i>		
50x Tris-Acetat-EDTA (TAE) Puffer (pH8) für DNA-Gele	2 M Tris-Base	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
	1 M Essigsäure 100%	Merck, Darmstadt, Dtschl.
	50 mM EDTA pH8,0 einstellen mit HCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
10x MOPS-Puffer für RNA-Gele	0,2 M MOPS (3-N(Morpholino)propansulfonsäure) 50 mM Natriumacetat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

10 mM EDTA pH 7,0 einstellen mit NaOH	Sigma-Aldrich, München, Deutschland Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
--	---

Tabelle 9 Puffer und Lösungen

3.1.9 Verbrauchsmaterial

Name	Verwendung	Hersteller
<i>Zellkultur/-aussaat</i>		
Zellkulturflaschen T175cm ³		
Zellkulturschalen 150mm Durchmesser		
Zellkulturplatten 6 well/96 well		Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Zellschaber		
Falcon Röhrchen		
Serologische Pipetten		
Mycoplasma-Off™ Wipes		Minerva Biolabs, Berlin, Deutschland
<i>Zellzahlbestimmung</i>		
CEDEX Smart Slides		Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
<i>Proteinpräparation</i>		
UV-transparente Einmalküvetten		Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
<i>RT-qPCR</i>		
Light Cycler Capillaries (20µl)		Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Filtertips		Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
<i>Western Blot</i>		

Mini Trans Blot Filter Papier	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
-------------------------------	---

Nitrocellulosemembran
0,45µm

Tabelle 10 Verbrauchsmaterial

3.1.10 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Abzug	Laborabzüge	Arge Labor- und Objekteinrichtungen GmbH, Wathlingen, Deutschland
Agarosegelelektrophorese	Elektrophoresis Power Supply EPS 601	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
	Elektrophoresis Power Supply EPS 600	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
	Elektrophoresekammer	Bio-Rad, München, Deutschland
Brutschrank	CO ₂ -Brutschrank INC 153	Memmert GmbH + Co.KG Büchenbach, Deutschland
	CO ₂ -Inkubator	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Feinwaage	Kern EW620-3NM	Kern&Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Heizblock/Schüttler	Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	S1 Thermoshaker	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kippwippe	ST 5 CAT	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Magnetrührer	MR 3001	Heidolph, Schwabach, Deutschland

NanoDrop	NanoDrop Spectrophotometer	2000	ThermoScientific, Wilmington, DE, USA
PCR-Cycler	Mastercycler epgradient S		Eppendorf, Hamburg, Deutschland
pH-Meter	Labor-pH-Meter 766		Knick Elektronische Messgeräte, Berlin, Deutschland
Photometer	BioPhotometer		Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe	Accu-Jet® pro		Brand, Wertheim, Deutschland
	Elektrische Pipettierhilfe LHP-PH01		Phoenix Instrument GmbH, Garbsen, Deutschland
Real-Time-PCR-Cycler	Light-Cycler® Based System	Carousel-	Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Sterile Werkbank	HERAsafe KSP12		Thermo Electron Corporation, Langenselb, Dtschl.
UV-Geldokumentation	Gel-Doc™ XR		Bio-Rad, München, Deutschland
Vortexer	MS1 Minishaker		IKA® Labortechnik, Staufen, Dtschl.
Wasserbad	Wasserbad GFL-1083		Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Dtschl.
Western Blot Apparatur	Mini-PROTEAN Tetra cell tank		Bio-Rad, München, Deutschland
	Power Pac HC™ Power Supply		Bio-Rad, München, Deutschland
	Mini Trans-Blot Cell		Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
	Scanner		Canon, Krefeld, Deutschland

Zellzähler	Cedex XS Analyzer	Innovatis, Deutschland	Mannheim,
Zentrifugen	Allegra™ 25R Zentrifuge	Beckmann Deutschland	Coulter,
	Biofuge Fresco 21	Heraeus GmbH, Deutschland	Instruments Hanau,
	Mini-Zentrifuge Sprout	BioLab Products, Hamburg, Deutschland	
	Sigma 2K15	Sigma Laborzentrifugen, Harz, Deutschland	

Tabelle 11 Geräte

3.1.11 Software

Software	Hersteller
Cedex XS Software	Innovatis, Mannheim, Deutschland
GraphPad Prism® Version 8/9	GraphPad Software Inc., La Jolle, CA, USA
Light Cycler® 96 Software	Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA, USA
Microsoft Office	Microsoft, Redmount, WA, USA
NanoDrop 2000 Software	Thermo Scientific GmbH, Wilmington, USA
Quantity One® Software	Bio-Rad Laboratories Inc. Hercules, CA, USA

Tabelle 12 Software

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Für die Versuche wurden zwei Zelllinien verwendet. Zum einen die bereits kultivierten und adhärennten HNSCC-Zelllinien UT-SCC-60A und UT-SCC-60B, zum anderen die HEK-Blue™-Zelllinien TLR3 und Null1. Die HNSCC-Zelllinien wurden für die Durchführung

der meisten Versuche in 175cm³ (175ml) große Zellkulturflaschen ausgesät und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Als Medium wurde DMEM mit zusätzlichem fetalen Kälberserum, einer Antibiose aus Penicillin und Streptomycin sowie Pyruvat verwendet. Die HEK-Blue-Zelllinien wurden auf Zellkulturplatten mit einem Durchmesser von 150 mm ausgesät und ebenfalls bei identischen Bedingungen im Brutschrank kultiviert. Als Medium wurde das HEK-Blue-Detection-Medium mit Endotoxin-freiem Wasser verwendet. Das Medium beider Zelllinien wurde alle 3-4 Tage gewechselt. Dazu wurde das alte Medium verworfen und die Zellen behutsam mit PBS gewaschen. Anschließend wurde frisches Medium hinzugefügt und die Zellen erneut inkubiert. Bei ausreichendem Wachstum der Zellen wurden diese mit Hilfe von Accutase, einem Enzymgemisch aus verschiedenen Proteasen und Kollagenasen, abgelöst, im zugehörigen Medium resuspendiert und in den gewünschten Verdünnungen erneut ausgesät. Für die Lagerung der Zellen wurden diese nach der Ablösung mit Accutase bei 4°C zentrifugiert, erneut mit PBS gewaschen und das Pellet wurde bei -80°C konserviert. Zur Verwendung der eingefrorenen Zellpellets wurden diese bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, erneut im jeweiligen Medium resuspendiert und entweder für die Aussaat in eine Zellkulturflasche gegeben oder für Versuchsreihen genutzt.

3.2.2 Zellzahlbestimmung

Die Zellen wurden mit Accutase von Boden der Zellkulturflaschen oder -platten gelöst, die Reaktion wurde mit Medium gestoppt und im Verhältnis 1:2 mit 0,2% Trypanblau versetzt. Die Suspension wurde in eine Zählkammer pipettiert, mit Hilfe des Cedex XS Analyser sowie der zugehörigen Software wurde die Zellzahl pro Milliliter gemessen. Trypanblau kann nur in tote Zellen eindringen, sodass nur farblose Zellen gezählt wurden. Gleichzeitig konnten so die lebenden und toten Zellen quantifiziert werden.

3.2.3. Stimulation

Für die Stimulation des Toll-like-Rezeptors wurden die Zellen zu gleichen Teilen auf zwei Zellkulturflaschen aufgeteilt und eine Hälfte mit dem TLR3-Agonisten Poly (I:C) High Molecular Weight über 12 bzw. 24 Stunden stimuliert. Die dabei verwendete Konzentration war 10µg/ml nach vorheriger Dosisbestimmung. Die andere Hälfte der Zellen wurde mit dem TLR3-Complex-Inhibitor in der Konzentration von 27µM unter identischen Bedingungen ebenfalls für 12 bzw. 24 Stunden im Brutschrank inkubiert und anschließend weiter verarbeitet. Bei jedem Versuch wurden nicht stimulierte Zellen unter Mediumkontrolle mitgeführt. Die Stimulationszeit wurde nach vorherigem MTT-Test

bestimmt. Dabei wurde eine Stimulationszeit von 12 Stunden für die Weiterverarbeitung auf RNA-Ebene genutzt, eine Stimulationszeit von 24 Stunden für die Weiterverarbeitung auf Proteinebene.

3.2.4 Real Time quantitative Polymerase-Kettenreaktion

3.2.4.1 RNA-Isolation

In Vorbereitung auf die Real-Time qPCR erfolgte die RNA-Isolierung der kultivierten und stimulierten Zellen. Hierzu wurde das RNeasy Plus Mini Kit von Qiagen nach Herstellerangaben verwendet. Der erste Schritt ist dabei die Lyse der Zellen und die sofortige Inaktivierung weiterer Nukleasen durch einen im Kit enthaltenen Puffer zur Sicherstellung der Isolation von intakter RNA. Anschließend wurde das Lysat aus RNA über eine Säule von der genomischen DNA getrennt und mit Hilfe von Ethanol wurden die Bindungskonditionen für die RNA gebahnt. Zuletzt wurde die RNA selektiv an eine Silikatmembran gebunden, Kontaminationen wurden mittels mehrmaliger Waschschriffe mit nukleasefreiem Wasser entfernt. Anschließend erfolgte die Lagerung bei -80°C oder die direkte Weiterverarbeitung.

Es erfolgte die Konzentrationsmessung der RNA am NanoDrop 2000 mit dem Ziel des identischen Einsatzes von RNA in jedem Versuch. Dazu wurden im Spektralphotometer Absorptionsmessungen mit drei verschiedenen Wellenlängen (230nm, 260nm und 280nm) durchgeführt. Das Absorptionsmaximum für RNA liegt bei 260nm. Über die Quotienten der Absorptionsmessungen der anderen Wellenlängen konnten zum einen die Reinheit (über das Verhältnis RNA/Protein), zum anderen die Verunreinigungen (Verhältnis RNA/Salze, organische Lösungsmittel oder Zucker) bestimmt werden. Die Weiterverarbeitung der Proben wurde nur bei ausreichender Reinheit durchgeführt. Zur Überprüfung der RNA-Isolation, der erfolgten Trennung von genomischer DNA sowie dem Degradationsgrad der RNA erfolgte eine Agarosegelelektrophorese. Hierbei funktioniert die Gelelektrophorese als eine Art Sieb für die negativ geladenen Moleküle im elektrischen Feld. Das bedeutet, dass größere Moleküle stärker zurückgehalten werden als kleinere Moleküle, wodurch eine Auftrennung der Stränge nach ihrer Größe ermöglicht wird. Durch Hinzufügen des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid konnte die RNA unter ultraviolettem Licht sichtbar gemacht werden. Zur Größenabschätzung der RNA erfolgte eine Markerkontrolle.

3.2.4.2 cDNA-Synthese

Aufgrund der Instabilität der RNA wurde diese unter Benutzung zweier verschiedener Kits zu stabilerer cDNA umgeschrieben. Zum einen wurde hierzu das RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit von ThermoScientific genutzt, zum anderen das RT² First Strand Kit von Qiagen. Im ersten Kit wurde als Primer ein Random Hexamer Primer genutzt, welcher die mRNA bindet und den Startpunkt der Umschreibung bildete. Random Hexamer Primer bestehen aus zufälligen Hexanukleotiden, wodurch der gesamte mRNA-Bestand zu cDNA umgeschrieben wurden. Die Umschreibung erfolgte durch die RevertAid M-MuLV Reverse Transkriptase. Als Negativkontrolle wurde Nuklease-freies Wasser mitgeführt. Zudem wurde jeweils ein Ansatz ohne die Reverse Transkriptase mitgeführt, um die Proben auf Verunreinigung mit genomischer DNA zu überprüfen. So wurden die Proben, bestehend aus 2µg RNA, dem Random Hexamer Primer und Nuklease-freiem Wasser zunächst über fünf Minuten bei 65°C inkubiert, um GC-reiche Sequenzen und Sekundärstrukturen aufzubrechen, anschließend mit dem MasterMix versetzt und erneut eine PCR durchgeführt. Dabei fand zunächst die fünfminütige RT-Aktivierung bei 25°C statt, anschließend die cDNA-Synthese für 60 Minuten bei 42°C und die zuletzt die fünfminütige Terminierung der Synthese bei 70°C. Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

Das zweite Kit, das RT² First Strand Kit von Qiagen, wurde in Vorbereitung auf den Versuch mit dem RT² Profiler PCR Array von Qiagen genutzt.

Hierbei wurde zunächst mit Hilfe des mitgelieferten Buffer GE ein Mix zur Elimination eventuell vorhandener genomischer DNA erstellt, die Probe über fünf Minuten bei 42°C inkubiert und erst dann die Reverse Transkriptase zugefügt. Dabei enthielt das Kit eine externe RNA-Kontrolle zur Überprüfung der Effizienz der Reversen Transkriptase. Der entstandene Mix wurde erneut über 15 Minuten bei 42°C inkubiert, anschließend wurde die Reaktion bei 95°C für fünf Minuten beendet. Die Probe wurde mit Nukleasefreiem Wasser aufgefüllt und entweder sofort weiter im RT² Profiler PCR Array-Kit verarbeitet oder bei -20°C weggefroren.

3.2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion dient zur Vervielfachung eines Genabschnittes mit Hilfe von DNA-Polymerasen und spezifischen sense- und antisense-Primern, welche die Synthese des komplementären DNA-Stranges initiierten. Dazu wurden mehrere Schritte in einem Thermocycler durchgeführt.

Schritt	Zeit	Temperatur	Anzahl der Zyklen
Initialisierung	5 Minuten	94 °C	1
Denaturierung	30 Sekunden	94 °C	35
Hybridisierung	30 Sekunden	57 °C	35
Elongation	45 Sekunden	72 °C	35
Termination	10 Minuten	72 °C	1

Tabelle 13 Reaktionsablauf der PCR

Jeder Zyklus besteht dabei neben der initialen Denaturierung und der Termination der Reaktion aus drei Schritten. In der Denaturierungs- oder Schmelzphase werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden DNA-Strängen aufgebrochen, sodass die DNA als Einzelstrang vorliegt. Die Initialisierung über fünf Minuten diene der Aktivierung der Polymerase. Danach wurden die DNA-Einzelstränge rasch abgekühlt, um eine erneute Ausbildung einer Doppelhelix zu verhindern.

Im zweiten Schritt, der Hybridisierung, wurde der Primer spezifisch an die Ziel-DNA angelagert, in der Elongationsphase erfolgte die Synthese der komplementären DNA-Stränge durch die Polymerase. Dabei beginnt die Polymerase am 3'-Ende des Primers und bildet den Anfang eines neuen Einzelstrangs. Da die Produkte vorheriger Zyklen als Ausgangsstoffe für den nächsten Zyklus dienen ist in dieser Phase eine exponentielle Vervielfältigung möglich.

Die hergestellten PCR-Produkte sind anschließend bei Raumtemperatur stabil und wurden bei 4°C über Nacht im Thermocycler gelagert.

Komponente	Funktion
cDNA oder Kontrolle	Template, zu vervielfältigender Abschnitt
Primer Mix (0,25 µM)	Startpunkt der DNA-Synthese mittels sense Primer und antisense Primer
Taq-DNA-Polymerase (5U/µl)	Replikation des festgelegten Abschnitts

dNTP Mix (10mM)	Bausteine für den synthetisierten DNA-Strang
10x Reaktionspuffer	Sicherstellung einer geeigneten chemischen Umgebung für die DNA-Polymerase
MgCl ₂	Essentiell für die Funktion der Polymerase, Stabilisierung der Anlagerung der Primer, bilden lösliche Komplexe mit der dNTP
dH ₂ O	Volumen

Tabelle 14 Reaktionskomponenten der PCR

Zur Qualitätskontrolle erfolgte eine Agarosegelelektrophorese. Dabei wurden die PCR-Produkte in einem mit Ethidiumbromid versetzten 1% Agarosegel aufgetragen und bei 120V in 1xTAE-Puffer aufgetrennt. Bei Positivproben wurde eine Bande erwartet, bei der Negativkontrolle nicht. Bei sichtbaren Banden in der Negativkontrolle war von einer Verunreinigung mit genomischer DNA auszugehen und es war ein DNase-Verdau mit anschließender erneuter cDNA-Synthese notwendig.

3.2.4.4 Real-Time quantitative PCR

Die Real-Time qPCR beruht auf der Methode der PCR und ermöglicht zusätzlich die Quantifizierung der gewonnen DNA über Fluoreszenzmessungen. Dabei nimmt die Fluoreszenz proportional zur Menge der PCR-Produkte zu. Dabei wird die Messung in der exponentiellen Phase der PCR, somit am Ende einer Elongation, durchgeführt, da in dieser Phase die optimalen Reaktionsbedingungen vorliegen. Der Unterschied zu anderen Methoden der PCR besteht somit unter anderem im Zeitpunkt der Auswertung.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Arten der Quantifizierung genutzt. Zum einen wurden TaqMan-Sonden (Hydrolyse-Sonden) genutzt, die auf dem Prinzip des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET) beruhen. Am 5'-Ende sind die Sonden mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff markiert, am 3'-Ende mit einem Akzeptor-Fluorochrom (Quencher). Bei Aktivität der 5'-3'-Exonuklease der Taq-Polymerase im Rahmen der Elongation, entfernt sich der Abstand zwischen Reporter und Quencher und das Signal des Reporter-Fluoreszenzfarbstoffes nimmt zu. Im Schwellenwert-Zyklus (C_t-Wert) ist das detektierte Fluoreszenzsignal zum ersten Mal signifikant höher als das Hintergrund-Fluoreszenzsignal und die relative Expression kann im C_t-Wert gemessen werden.

Die Methode bietet den Vorteil einer hohen Spezifität.

Der andere verwendete Farbstoff ist ein SYBR-Green-Farbstoff aus dem RT²-Profiler™ PCR Array Kit von Qiagen. SYBR-Green ist ein DNA-Farbstoff, welcher doppelsträngige DNA bindet. Der daraus resultierende Komplex aus DNA und Fluoreszenzfarbstoff absorbiert blaues Licht bei einer Wellenlänge von 494nm und emittiert grünes Licht bei einer Wellenlänge von 521nm. Die Fluoreszenz von SYBR-Green steigt somit mit der Anzahl der PCR-Zyklen an.

Komponente	Volumen
2xRT ² SYBR Green Mastermix inkl. HotStart Polymerase	1350 μ l
cDNA aus 0,5 μ g RNA	102 μ l
RNAse freies Wasser	1248 μ l
Gesamtvolumen pro 96-well plate	2700 μ l
Volumen pro well	25 μ l

Tabelle 15 Reaktionskomponenten des RT²Profiler PCR Array

Aufgrund der mangelnden Unterscheidung zwischen verschiedenen PCR-Produkten wurde zur Erhöhung der Spezifität eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Anhand dieser können die Fragmentlängen bestimmt werden, da die doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt hat, als unspezifisch entstehende Primerprodukte.

Schritt	Zeit	Temperatur	Anzahl Zyklen
Aktivierung der HotStart DNA Taq Polymerase	10 Minuten	95 °C	1
Denaturierung	15 Sekunden	95 °C	45
Hybridisierung/Elongation	1 Minute	60°C	45

Tabelle 16 Reaktionsablauf der RT-qPCR

Zur Analyse der relativen Expressionsunterschiede zwischen stimulierten und nicht-stimulierten Zellen wurde die $\Delta\Delta C_T$ -Methode verwendet. Dabei wurde im Versuch mit den Taq-Man Sonden die Expressionsveränderung des untersuchten Gens zum Ausgleich der

Ausgangsmenge an eingesetzter RNA auf das housekeeping-Gen β -Aktin normalisiert. Dazu wurde der Mittelwert der C_t -Werte des housekeeping-Gens vom Mittelwert der C_t -Werte des Zielgenes subtrahiert.

$$\Delta C_t = C_t (\text{Zielgen}) - C_t (\beta\text{-Aktin})$$

Der ΔC_t -Wert bezieht somit die Anzahl Amplifikationszyklen des Zielgenes bis zum Erreichen des Schwellenwert-Zyklus in Relation zur Referenz. Umso größer der ΔC_t -Wert, desto mehr Zyklen waren für das Zielgen zum Erreichen des Schwellenwert-Zyklus notwendig. Um verschiedene Stimulationszeitpunkte vergleichen zu können, wurde nun der $\Delta\Delta C_t$ -Wert berechnet. Hierzu wurden die ΔC_t -Werte der nicht stimulierten Proben von den ΔC_t -Werten der stimulierten Proben abgezogen.

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{stimulierte Probe}) - \Delta C_t (\text{unstimulierte Probe})$$

Mit Hilfe des $\Delta\Delta C_t$ - Wertes wurde der relative Expressionsunterschied im mRNA-Level eines Zielgenes von stimulierten zu unstimulierten Proben berechnet.

$$\text{Relative Häufigkeit} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Dabei entspricht der Wert 1 einer identischen Genregulation, ein Wert < 1 einer Herunterregulation, ein Wert > 1 einer Hochregulation des Zielgenes.

3.2.5 Proteinisolierung

Für die Proteinanalyse wurden die Zellen über 24 Stunden mit den entsprechenden Substanzen stimuliert und im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellplatten auf Eis gestellt und mehrmals mit PBS gewaschen. Es wurde ein Lysispuffer aus RIPA-Puffer, Aprotinin, pMSF, Pepstatin A, Natriumfluorid und Phosphatase-Inhibitor-Cocktail hergestellt und dieser auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber vorsichtig von der Zellplatte gelöst und drei Mal für 15 Sekunden im Ultraschallbad bearbeitet. Die Proben wurde auf den Vortexer gestellt und anschließend für 60 Minuten bei 4°C geschüttelt. Danach wurden die Proben bei 5°C für zehn Minuten zentrifugiert, um die Proteine von den Zellresten zu trennen, welche sich im Pellet sammelten. Der proteinhaltige Überstand wurde weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert. Dabei war die niedrige

Temperatur ein wichtiger Bestandteil der Proteinisolation, um den enzymatischen Abbau der Proteine zu vermeiden.

3.2.6 Bradford-Messung

Zur Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte die Bradford-Messung. Die Proteinlysate wurden mit Aqua dest. verdünnt, mit Bradford-Reagenz versetzt und zehn Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Am Photometer erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration. Bradford-Reagenz enthält den Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250, welcher mit den unpolaren Seitenketten von Proteinen Komplexe bildet und in seiner Sulfonatform stabilisiert wird. Dadurch liegt das Absorptionsmaximum bei 595nm. Der Extinktionskoeffizient des Farbstoff-Protein-Komplexes ist höher als der des ungebundenen Farbstoffes, wodurch die Zunahme der Absorption bei 595nm gegen den freien Farbstoff gemessen werden kann. Damit ergibt sich die Proteinkonzentration der Probe. Zur Weiterverarbeitung mittels Gelelektrophorese wurden die Proben mit 4xSDS verdünnt. Die Lagerung der so präparierten Lysate erfolgte bei -20°C.

3.2.7 SDS-Page

Die SDS-Page ist ein Verfahren der Polyacrylamid-Gelelektrophorese und wird für die Analyse von Proteinen verwendet. Dabei wurden eigens gegossene 10% und 15% Polyacrylamid-Gele verwendet. Die niedrigprozentigen Gele für die Auftrennung größerer Proteine, die hochprozentigen für die Auftrennung kleinerer Proteine. Die Herstellung der Gele erfolgte aus u.g. Substanzen, wobei zunächst das Trenngel hergestellt wurde, welches in eine Gießapparatur überführt, mit reinem Ethanol überschichtet und ausgehärtet wurde. Anschließend wurde ein Sammelgel hergestellt und das Trenngel damit nach Entfernung des Ethanols überschichtet. In das Sammelgel wurde ein Kamm zur Erstellung von Taschen zur Proteinbefüllung eingelassen. Die so hergestellten Polyacrylamidgele wurden in feuchten Tüchern im Kühlschrank gelagert.

Trenngel	Sammelgel
1M Tris-HCl pH 8,8	1M Tris-HCl pH 6,8
1% SDS	1% SDS
Polyacrylamid	Polyacrylamid
H ₂ O dest.	H ₂ O dest.
APS	APS
TEMED	TEMED

Tabelle 17 Komponenten der Polyacrylamidgele

SDS ist ein anionisches Tensid, welches die Eigenladungen von Proteinen überdeckt, indem es an Proteine bindet, sodass diese eine negative Ladungsverteilung aufweisen. Durch die negativen Ladungen stoßen sich die Proteine gegenseitig ab, durch Aufkochen für zehn Minuten bei 95°C werden die Proteine linearisiert. An das Polyacrylamidgel wurde ein elektrisches Feld angelegt und die Proteine wurden nach der Kettenlänge proportional zur Molekülmasse aufgetrennt. Dies geschieht einerseits durch das Laufen der negativen Proteine zur Anode, andererseits entsteht durch Verwendung des polymeren Hydrogels ein verstärkter Siebeffekt, sodass kleinere Proteine schneller laufen als größere. Zur Größenzuordnung wurde ein Proteinmarker mitgeführt. Das Gel wurde im Lauffuffer für zehn Minuten bei 80V und anschließend bei 100V laufen gelassen, bis die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte.

3.2.8 Western Blot

Nach der Auftrennung des Proteingemisches mittels SDS-Page wurden die Proteine mittels Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Dazu wird ein senkrecht zum Polyacrylamidgel gerichtetes elektrisches Feld angelegt und die negativ geladenen Proteine wandern in Richtung der Anode und damit auf die verwendete Nitrocellulosemembran. Der Aufbau eines Western Blots besteht in dem hier verwendeten Tank-Blot-System aus zwei Schlitten (a), zwei Schwämmen (b), dünnen und dicken Wattman-Papieren (c, d), der Nitrocellulosemembran (e) und dem Polyacrylamid-Gel (f) in nachfolgend abgebildeter Reihenfolge (s. Abb. 4).

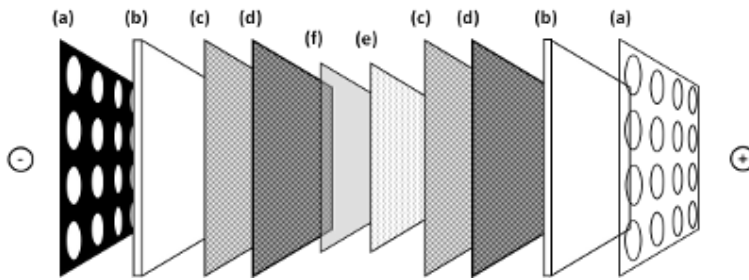


Abbildung 4
Schematischer Aufbau eines Western Blot
Modifiziert nach Freyer 2012

Das System wurde mit Laufpuffer aufgefüllt und für eine Stunde bei 100V geblottet. Nach dem Blot erfolgte die Färbung mittels Ponceau S um die erfolgreiche Übertragung der Proteine auf die Nitrocellulosemembran nachzuweisen. Ponceau S setzt sich als Azofarbstoff an positiv geladene Proteine und wurde mit destilliertem Wasser und TBS wieder abgewaschen. Zur Blockierung der freien Bindungsstellen auf der Membran erfolgte das einstündige Schwenken in 5% Milchpulverlösung. Milchpulverproteine werden nicht von den verwendeten Antikörpern erkannt, sodass nach der Blockade eine selektive Antikörperbindung möglich ist. Die Membran wurde anschließend über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper auf einem Schüttler inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden mehrere Waschschrte mit TBS und TBS-T durchgeführt und es erfolgte die einstündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Dieser bindet an die Spezies des Primärantikörpers und katalysiert eine enzymgekoppelte Farbreaktion, welche eine Bande auf der Nitrocellulosemembran sichtbar macht. Die Nitrocellulosemembran wurde erneut mehrmals gewaschen und danach mit einer Elektrochemielumineszenzlösung im Dunkeln inkubiert. Dabei wurde eine Luminol-Lösung in Kombination mit einer Peroxid-Lösung verwendet. Als Ladekontrolle wurde das Housekeeping-Protein β -Aktin genutzt.

3.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., Version 8 & 9).

Die Experimente wurden, sofern nicht anders angegeben, mindestens drei Mal unabhängig voneinander durchgeführt und die Ergebnisse in der Zusammenschau betrachtet. Hierzu wurden die Mittelwerte der jeweiligen Experimentreihe genutzt. Zur besseren Vergleichbarkeit und Interpretation der Ergebnisse wurden die jeweiligen erhobenen Messdaten im Vergleich zur jeweiligen Kontrolllinie ausgedrückt.

Für die Analyse der Daten wurden dann entsprechend der jeweiligen Voraussetzungen statistische Testverfahren verwendet, die nachfolgend erläutert werden.

3.3.1 Signifikanztests

Zur statistischen Berechnung der Irrtumswahrscheinlichkeit der aufgestellten Hypothesen wurden Signifikanztests durchgeführt. Das Signifikanzniveau beschreibt dabei die Wahrscheinlichkeit, fälschlicherweise einen Effekt anzunehmen, der nicht auf die Grundgesamtheit übertragbar ist. Das Signifikanzniveau α wurde in gängiger Praxis auf 5% festgelegt. Dies entspricht einem p-Wert von $<0,05$.

Durch multiples Testen einer Stichprobe kommt es zu einer α -Fehler-Kumulierung, womit die Wahrscheinlichkeit zur Annahme einer Fehlentscheidung erhöht wird. Die Festlegung eines korrigierten α für jeden einzelnen Test, bspw. mit Hilfe der Bonferroni-Korrektur, berichtigt die α -Fehler-Kumulierung.

In dieser Arbeit wurde aufgrund der kleinen Fallzahlen und des explorativen Charakters der Arbeit auf eine Korrektur der α -Fehler-Kumulierung verzichtet.

3.3.1.1 Nicht-parametrische Tests

In dieser Arbeit wurde ein nicht-parametrisches Testverfahren verwendet. Bei der in dieser Arbeit vorliegenden Stichprobenanzahl kann einerseits nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden, andererseits wurden für verschiedene Fragestellungen unterschiedliche Stichproben verwendet, die unterschiedliche Verteilungen beinhalten. Um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden in konservativer Annahme sämtliche Daten als nicht-normalverteilt betrachtet.

3.3.1.1.1 Mann-Whitney-U-Test

Bei den Berechnungen hinsichtlich statistisch signifikanter Unterschiede wurden zwei unabhängige Gruppen (zwei Zelllinien) zu jeweils einem Merkmal (Genexpression)

miteinander verglichen. Zur Überprüfung signifikanter Unterschiede wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Der Mann-Whitney-U-Test stellt dabei keine konkreten Anforderungen an die Verteilungsform der Stichproben, geht aber zunächst von einer ähnlichen Verteilungsform beider Stichprobengruppen aus. Bei der in dieser Arbeit geringen Stichprobenanzahl ist nicht von einer ähnlichen Verteilungsform auszugehen, sodass bei der Berechnung des Mann-Whitney-U-Test die Verteilungen als Ganzes ohne zusammenfassende Statistik überprüft wird. Dabei werden die Messwerte beider Gruppen in eine gemeinsame Rangliste eingeordnet und jedem Messwert wird ein Platz in dieser Rangliste zugewiesen. Anschließend wird für jede Gruppe der Mittelwert der Ränge gebildet und die Differenz zwischen den mittleren Rängen beider Gruppen berechnet. Anhand dessen werden die zwei Stichprobengruppen auf Unterschiede überprüft.

4. Ergebnisse

4.1 Expressionsanalyse der EMT-Marker auf RNA-Ebene

4.1.1 Vergleich von Primarius und Metastase in nativem Zustand

Es erfolgte die Expressionsanalyse von 84 EMT-Markern auf RNA-Ebene mittels Real-Time quantitativer PCR. Hierzu wurden die Zelllinien UT-SCC-60A und UT-SCC-60B verwendet und die mRNA-Level untersucht.

Abbildung 5 zeigt in einer Übersicht die Gesamtmenge an mRNA in den 84 untersuchten EMT-Markern in der Zelllinie UT-SCC 60A (Primärtumorzelllinie) im Vergleich zur Gesamtmenge an mRNA in der Zelllinie UT-SCC 60B (Metastasenzelllinie). Es fällt die bereits im Nativzustand unterschiedliche Menge an mRNA der einzelnen untersuchten Marker-Gene auf, die sich auch durch die unterschiedlichen Funktionen der Marker erklärt. Die Gene, die für Proteine kodieren, die für Zelladhäsion oder -entwicklung zuständig sind, sind in der Primärtumorzelllinie in höherer Menge vorhanden, wohingegen die Gene, deren Proteinausprägung für Zellmigration und -differenzierung verantwortlich ist, in der Metastasenzelllinie verstärkt vorhanden sind. Insgesamt zeigt sich hier eine Normalverteilung. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde in Abbildung 5 auf eine Aufschlüsselung der einzelnen Gene verzichtet.

Native Genexpression in Primärtumor- und Metastasenzelllinie

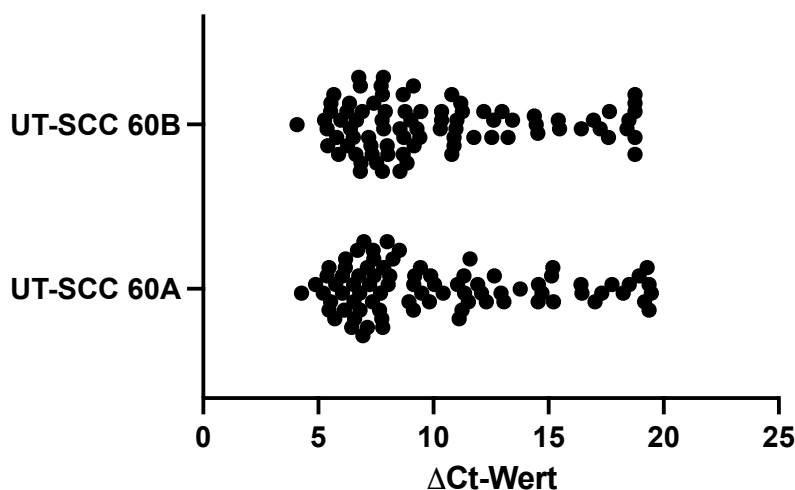


Abbildung 5

Der Wert für die mRNA-Level ergibt sich als Ct-Wert direkt aus den Werten der Real-Time qPCR, als Referenz zur Ermittlung des Δ Ct-Wertes dient dabei β -Aktin. Abgebildet ist der Mittelwert der Δ Ct-Werte.

Abbildung 6 stellt exemplarisch einige der 84 Gene detaillierter dar. Aus Übersichtsgründen wurde die Ansicht in zwei Graphen aufgeteilt. Beginnend ausgewählte der 84 Gene, deren Genexpression in der Metastasenzelllinie (UT-SCC 60B) gegenüber der Primärtumorzelllinie (UT-SCC 60A) vermindert ist. Die Ergebnisse werden dabei aufgrund der kleinen Fallzahl in rein deskriptiver Darstellung aufgeführt.

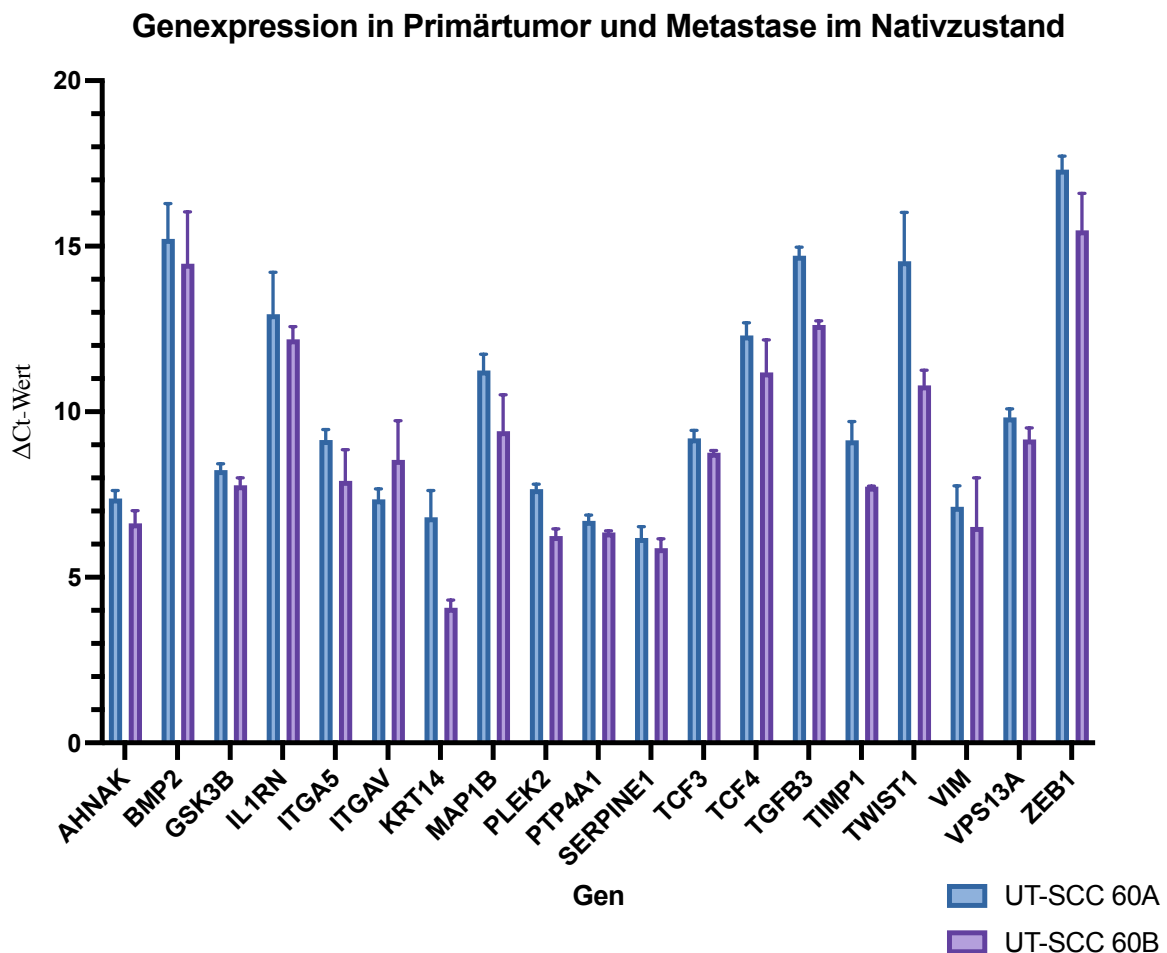


Abbildung 6

Genexpression in Primärtumor und Metastase in nativem Zustand: Dargestellt sind ausgewählte der 84 untersuchten Gene. Das mRNA-Level ist als Mittelwert der Δ Ct-Werte für die beiden Zelllinien angegeben, zusätzlich dargestellt ist die Standardabweichung.
 UT-SCC 60A n=5, UT-SCC 60B n=2

Im Ausgangszustand fallen bereits Unterschiede in der Gesamtmenge der mRNA, hier gemessen am Δ Ct-Wert, zwischen den einzelnen Genen auf. So weisen beispielsweise Vimentin oder Serpine1 mit Δ Ct-Werten <10 in beiden verglichenen Zelllinien eine im Vergleich zu Twist oder TCF4 mit Δ Ct-Werten >10 in beiden Zelllinien geringere Menge an mRNA auf. Vergleichsweise hohe Mengen an mRNA weisen mit Δ Ct-Werten >12 in beiden Tumorzelllinien IL1RN, TGFβ3, TWIST1 und BMP2 sowie der Transkriptionsfaktor ZEB1 auf.

Auffällig ist bei den hier dargestellten Genen die im Vergleich zur Primärtumorzelllinie geringere Genexpression in der Metastasenzelllinie. AHNAK und GSK3 β zeigen in der Metastasenzelllinie eine niedrigere Genexpression (AHNAK 11,2% niedriger, GSK3 β 6% niedriger) als in der Primärtumorzelllinie. ITGA5 weist ebenfalls einen Unterschied in der Genexpression auf, genau wie der epitheliale Marker KRT14, dessen Genexpression im nativen Zustand in der Metastasenzelllinie (Δ Ct-Wert 4,08) um 41,2% niedriger ist als in der Primärtumorzelllinie (Δ Ct-Wert 6,82). MAP1B kodiert für ein Protein, das an der Anordnung von Mikrotubuli beteiligt ist und darüber die Bildung von Nervenzellen beeinflusst und wird in der Metastasenzelllinie (Δ Ct-Wert 9,41) um 17,3% weniger exprimiert als in der Primärtumorzelllinie (Δ Ct-Wert 11,24). Serpine1, TCF3, 4 und TGF β 3 zeigen mit in der Metastasenzelllinie um 5-15% geringeren Genexpressionen im Vergleich zur Primärtumorzelllinie ein ähnliches Resultat und sind an der Zellentwicklung von Nervenzellen sowie der Embryogenese beteiligt. PLEK2, PTP4A und TIMP1 kodieren Proteine, die an der Zellproliferation und -ausbreitung beteiligt sind. Die Menge der mRNA ist in der Primärtumorzelllinie höher als in der Metastasenzelllinie, wobei die drei Gene mit Δ Ct-Werten <9,5 im Vergleich zu anderen hier dargestellten Genen ein eher niedriges Level an Gesamt-mRNA aufweisen. Die Transkriptionsfaktoren Twist1 und ZEB1 sind in einer vergleichsweise hohen Menge in beiden Tumorzelllinien vorhanden (mit Δ Ct-Werte in beiden untersuchten Zelllinien >10) und es zeigt sich eine niedrigere Menge in der Metastasenzelllinie. Dabei ist die Genexpression von TWIST1 mit einem mit Δ Ct-Wert von 14,55 in der Metastasenzelllinie um 25,8% niedriger als in der Primärtumorzelllinie (Δ Ct-Wert 10,8). Als Transkriptionsfaktoren können Twist1 und ZEB1 eine EMT induzieren, müssen dazu jedoch translatiert werden und in den Zellkern gelangen. Vimentin ist ein mesenchymaler Marker und in dieser Untersuchung in diskret niedrigerer Menge in der Metastasenzelllinie (mit Δ Ct-Wert 6,52 im Vergleich zu mit Δ Ct-Wert 7,13 in der Primärtumorzelllinie) zu finden.

Die folgende Abbildung 7 stellt die Genexpression der Gene dar, die in der nativen Metastasenzelllinie in höherer Menge zu finden sind als in der nativen Primärtumorzelllinie.

Genexpression in Primärtumor und Metastase im Nativzustand

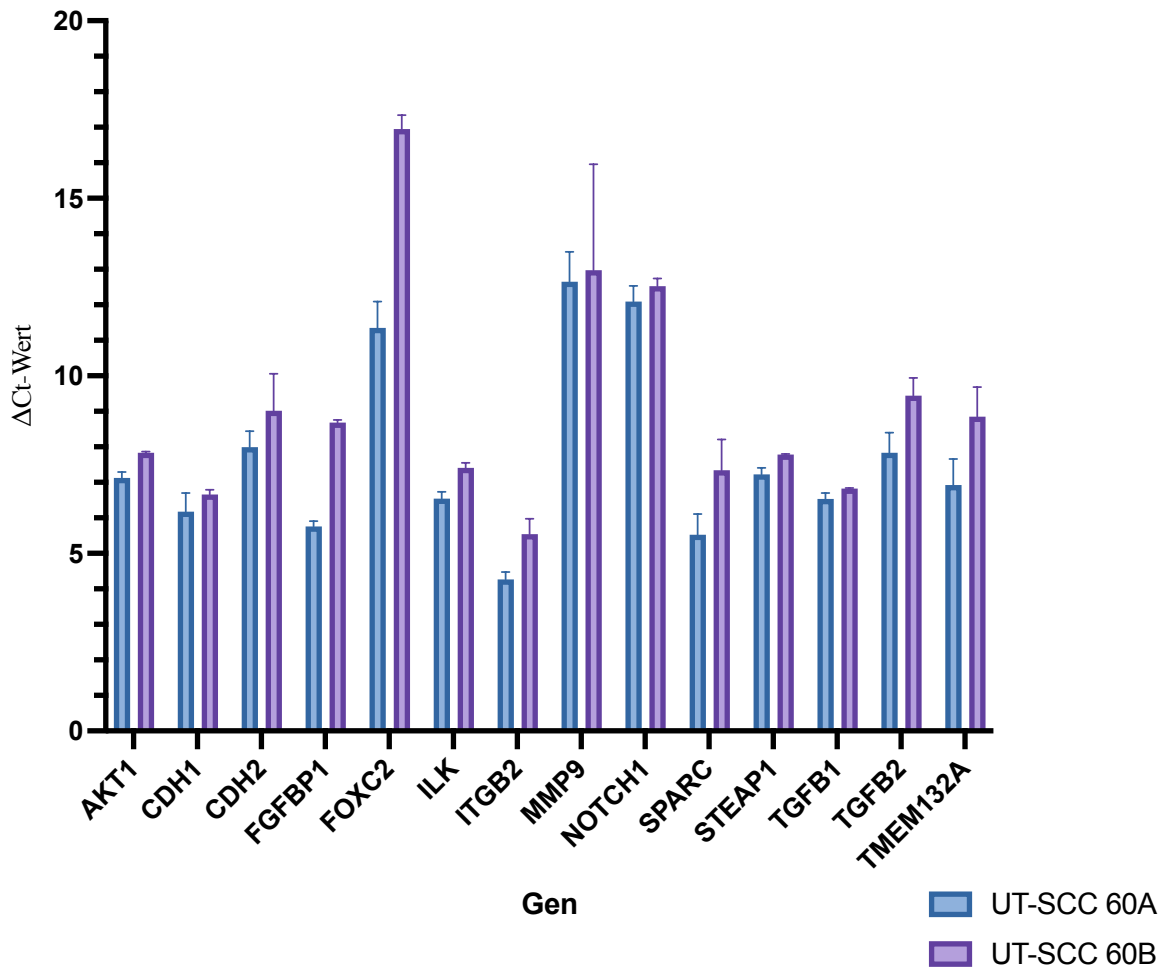


Abbildung 7

Genexpression in Primärtumor- und Metastasenzelllinie in nativem Zustand: Dargestellt sind ausgewählte der 84 untersuchten Gene, deren mRNA-Level in der Metastasenzelllinie höher ist als in der Primärtumorzelllinie. UT-SCC 60A n=5, UT-SCC 60B n=2.

Es fällt die Heterogenität der mRNA-Level in beiden Zellreihen auf. So weist ITGB2 (ΔCt -Wert 4,27 bei UT-SCC 60A/ ΔCt -Wert 5,55 bei UT-SCC 60B) im Vergleich zu MMP9 (ΔCt -Wert 12,65 bei UT-SCC 60A/ ΔCt -Wert 12,98 bei UT-SCC 60B) oder NOTCH1 (ΔCt -Wert 12,09 bei UT-SCC 60A/ ΔCt -Wert 12,53 bei UT-SCC 60B) eine relativ geringe mRNA-Menge auf. E-Cadherin (CDH1) und N-Cadherin (CDH2) weisen in der Metastasenzelllinie UT-SCC 60B eine höhere Menge an mRNA auf. Die Menge von AKT1, einer Serin-Threonin-Protein-Kinase mit apoptosestoppender Funktion, ist in der Metastasenzelllinie (ΔCt -Wert 7,84) höher exprimiert als in der Primärtumorzelllinie (ΔCt -Wert 7,13), ebenso die Menge der Integrine-kodierenden Proteine ILK, ITGAV und ITGB2. FGFBP1 kodiert für ein Protein, das Zellproliferation und Migration beeinflusst und ist in der Metastasenzelllinie in nativem Zustand in 50% höherer Menge vorhanden als in der nativen Primärtumorzelllinie. FOXC2 als mesenchymaler Marker ist in der Metastasenzelllinie

ebenfalls in 49% höherer Menge vorhanden als in den untersuchten Zellen der Primärtumorzelllinie. Hier ist die vergleichsweise hohe Menge an mRNA in beiden Zelllinien auffällig (ΔCt -Wert UT-SCC 60A 11,36/ ΔCt -Wert UT-SCC 60B 16,96). So auch bei MMP9 und NOTCH1 (ΔCt -Wert UT-SCC 60A und UT-SCC 60B >12). Die mRNA-Menge von SPARC1, welches ein Protein kodiert, das in der Veränderung der Zellform eine Rolle spielt, ist in der Metastasenzelllinie 33% höher als in der Primärtumorzelllinie. STEAP1 sowie TMEM132A ebenfalls. TGF β 1 und TGF β 2 kodieren für Proteine, die Zellproliferation und Differenzierung beeinflussen und werden in der Metastasenzelllinie mehr exprimiert als in der Primärtumorzelllinie, der Unterschied ist bei TGF β 2 mit einer 21% höheren Expression in der untersuchten Metastasenzelllinie stärker ausgeprägt als bei TGF β 1.

4.1.2 Einfluss der TLR3-Stimulation auf UT-SCC 60A und UT-SCC 60B

Die nachfolgende Abbildung stellt die Genexpression der untersuchten 84 EMT-relevanten Gene nach Stimulation des Toll-like-Rezeptor 3 durch Poly(I:C) dar. Die Stimulation erfolgte nach Vorversuchen für 12 Stunden.

Genexpression in Primärtumor- und Metastasenzelllinie unter TLR3-Stimulation

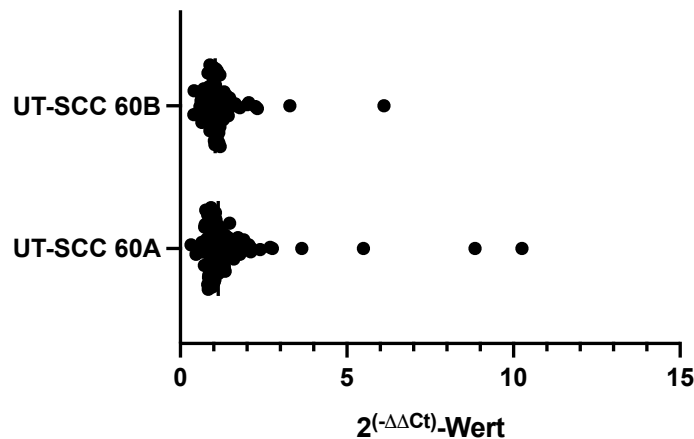


Abbildung 8

Genexpression in Primärtumor- und Metastasenzelllinie nach TLR3-Stimulation mit Poly (I:C). Abgebildet ist der Mittelwert der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Werte.

Die Übersichtsdarstellung zeigt die ähnliche Verteilung der 84 untersuchten Gene mit einigen besonders hoch bzw. niedrig exprimierten Genen. Zur besseren Darstellung finden sich in der folgenden Abbildung ausgewählte der 84 untersuchten Gene. Dabei findet hier der Vergleich zwischen Primärtumorlinie (UT-SCC 60A) und Metastasenzelllinie (UT-SCC 60B) statt. Aufgetragen ist der Mittelwert der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Werte, welche sich aus den Berechnungen der RT-qPCR ergeben. Dabei werden die ΔCt -Werte der stimulierten Proben auf die nicht-stimulierte Probe normalisiert. Der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Wert beschreibt das relative mRNA-Level in Normalisierung auf die unstimulierte Probe, wobei ein $2^{-\Delta\Delta Ct} > 1$ eine Zunahme der Genexpression und ein $2^{-\Delta\Delta Ct} < 1$ eine Abnahme der Genexpression darstellt. Für native Zellen ergibt sich der Wert 1.

Einfluss von TLR 3 auf die Genexpression in UT-SCC 60A und UT-SCC 60B

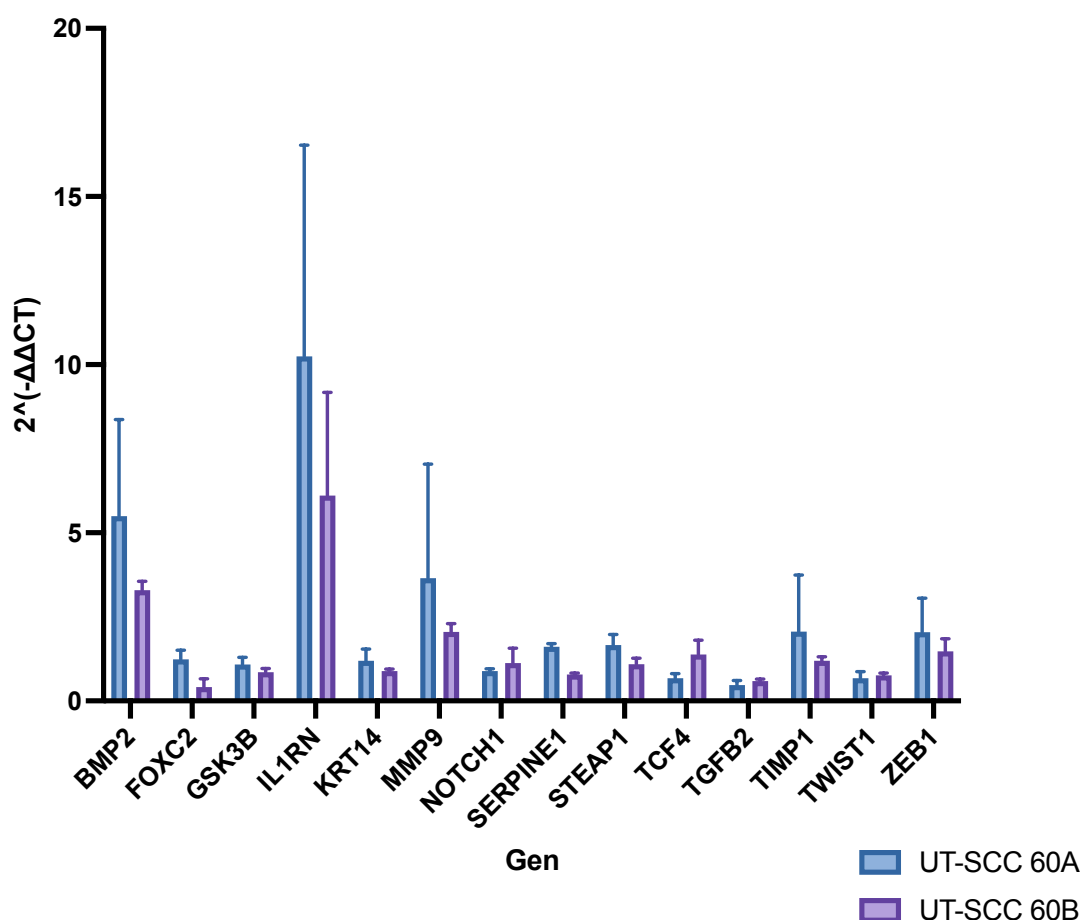


Abbildung 9

Einfluss der Stimulation von TLR3 auf die Genexpression von Primärtumor- und Metastasenzelllinie: Die Stimulation erfolgte über 12 Stunden mit Poly(I:C) in der Konzentration 10 µg/ml. UT-SCC 60A n=5, UT-SCC 60B n=2.

Es fällt erneut das heterogene relative mRNA-Level nach Stimulation von Primärtumor- und Metastasenzelllinie auf. In der Primärtumorzelllinie findet sich für den epithelialen Faktor IL1RN und den mesenchymalen Faktor MMP9 sowie für BMP2 und ZEB1 ein Anstieg der relativen mRNA-Level nach Stimulation von TLR3. In der Metastasenzelllinie findet sich bei TLR3-Stimulation weiterhin ein Anstieg der Expression in Normalisierung auf die unstimulierte Zelle, jedoch in deutlich reduzierter Ausprägung im Vergleich zum Anstieg der Expression in der Primärtumorzelllinie. Bei IL1RN beträgt der Anstieg in der Primärtumorzelllinie ($2^{-\Delta\Delta CT}$ 10,25) 63% mehr als in der Metastasenzelllinie ($2^{-\Delta\Delta CT}$ 6,11). Bei Betrachtung der GSK3 β findet sich ebenfalls eine Änderung der relativen mRNA-Level. In der Primärtumorzelllinie ($2^{-\Delta\Delta CT}$ 1,1) wird die RNA nach TLR3-Stimulation leicht mehr exprimiert, in der Metastasenzelllinie ($2^{-\Delta\Delta CT}$ 0,88) nach TLR3-Stimulation herunterreguliert. So auch bei dem mesenchymalen Marker FOXC2, der in der Primärtumorzelllinie ($2^{-\Delta\Delta CT}$ 1,24) nach Stimulation von TLR3 mittels Poly(I:C) mehr

exprimiert wird als in der Metastasenzelllinie ($2^{-\Delta\Delta CT} 0,415$). Diese Gene zeigen eine Änderung in der Expression zwischen Primärtumor- und Metastasenzelllinie. Eine umgekehrte Expression als Reaktion auf eine TLR3-Stimulation, also eine erhöhte Expression in der Metastasenzelllinie und Herunterregulation in der Primärtumorzelllinie, findet sich bei Betrachtung von NOTCH1 (Primärtumorzelllinie $2^{-\Delta\Delta CT} 0,89$ / Metastasenzelllinie $2^{-\Delta\Delta CT} 1,13$) und Serpine1 (Primärtumorzelllinie $2^{-\Delta\Delta CT} 1,62$ / Metastasenzelllinie $2^{-\Delta\Delta CT} 0,79$). Das relative mRNA-Level von TGF β 2 und TWIST1 weist nach TLR3-Stimulation eine Herunterregulation in beiden Zelllinien auf, erkennbar am $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Wert <1 in beiden untersuchten Zelllinien. KRT14, ein epithelialer Marker, wird in der Primärtumorzelllinie ($2^{-\Delta\Delta CT} 1,20$) nach TLR3-Stimulation leicht heraufreguliert, in der Metastasenzelllinie ($2^{-\Delta\Delta CT} 0,88$) leicht herunterreguliert.

4.1.3 Genexpression in der Primärtumorzelllinie nach TLR3-Stimulation und TLR3-Inhibition

Die Zellen der Primärtumorzelllinie UT-SCC 60A wurden mit dem TLR3/dsRNA Complex Inhibitor über 12 Stunden inkubiert, die RNA isoliert, per Reverse-Transkriptase-Reaktion in cDNA umgeschrieben und mittels quantitativer PCR untersucht. Abbildung 10 stellt das relative mRNA-Level der untersuchten Gene in den kultivierten Zellen der Primärtumorzelllinie UT-SCC 60A dar. Dazu wurde der Mittelwert der erhobenen $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte auf der Y-Achse aufgetragen.

Einfluss von TLR3-Stimulation und -Inhibition auf UT-SCC 60A

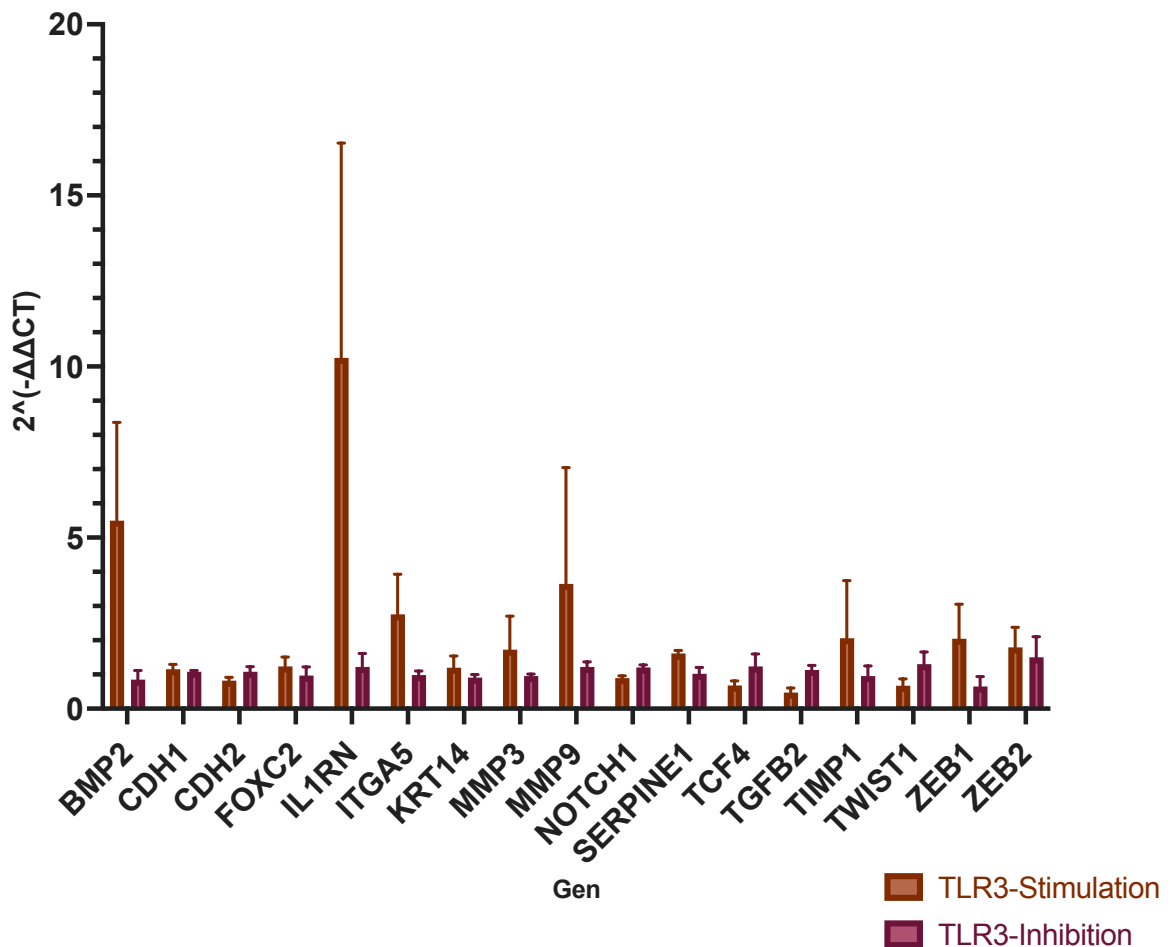


Abbildung 10

Einfluss von TLR3-Stimulation und -Inhibition auf UT-SCC 60A: Die Stimulation erfolgte für 12 Stunden und anschließend die Untersuchung mittels RT-qPCR. UT-SCC 60A TLR3-Stimulation: n=5, UT-SCC 60A TLR-Inhibition: n=3.

Verglichen werden in dieser Grafik die Auswirkungen einer TLR3-Stimulation mit Poly(I:C) mit den Auswirkungen einer TLR3-Inhibition mittels TLR3/dsDNA-Complex-Inhibitor auf die Genexpression in der Primärtumorzelllinie UT-SCC 60A. Dargestellt sind Median und Standardabweichung. Die Berechnung auf signifikante Unterschiede erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test. Dabei ließen sich keine signifikanten Unterschiede nachweisen, sodass die Ergebnisbeschreibung in rein deskriptiver Darstellung erfolgt. Das relative mRNA-Level von BMP2 nimmt nach Stimulation mit dem TLR3-Agonisten Poly(I:C) nach 12 Stunden Inkubation zu, erkennbar am $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Wert von 5,5. Im Vergleich zeigt sich eine Verminderung des relativen mRNA-Levels nach Inkubation mit dem TLR3-Inhibitor und es fällt eine Herunterregulation der Genexpression in Normalisierung auf die nicht-stimulierte Probe auf, erkennbar am $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Wert <1 . IL1RN kodiert für das Protein IL1RA, welches eine entscheidende Rolle in inflammatorischen Prozessen spielt. Bei TLR3-

Stimulation wird die Genexpression in der untersuchten Primärtumorzelllinie heraufreguliert ($2^{-\Delta\Delta CT}$ -Wert 10,25), bei TLR3-Inhibition zeigt sich ein $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Wert von 1,23. Es findet sich weiterhin eine dezent erhöhte Expression in Normalisierung auf die native Kontrolle, jedoch in deutlich verminderter Quantität. Ein ähnliches Ergebnis zeigt sich bei FOXC2 ($2^{-\Delta\Delta CT}$ nach TLR3-Stimulation 1,24, nach TLR3-Inhibition 0,97), MMP9 ($2^{-\Delta\Delta CT}$ nach TLR3-Stimulation 3,65, nach TLR3-Inhibition 1,23) und dem Transkriptionsfaktor ZEB2 ($2^{-\Delta\Delta CT}$ nach TLR3-Stimulation 1,80, nach TLR3-Inhibition 1,50), jeweils ohne Nachweis signifikanter Unterschiede. Der Transkriptionsfaktor ZEB1 weist nach TLR3-Stimulation mit einem $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Wert von 2,04 eine Heraufregulation, nach TLR3-Inhibition mit einem $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Wert von 0,65 eine Herunterregulation auf. Die Expression von MMP3, ebenfalls Bestandteil der Matrix-Metallopeptidasen, nimmt bei TLR3-Stimulation zu, bei TLR3-Inhibition leicht ab, wobei sich ein relatives mRNA-Niveau ähnlich der unstimulierten Zelllinie zeigt ($2^{-\Delta\Delta CT}$ nach TLR3-Stimulation 1,73, nach TLR3-Inhibition 0,96). Die Expression des epithelialen Markers CDH1, welches für E-Cadherin kodiert, wird bei TLR3-Stimulation leicht heraufreguliert ($2^{-\Delta\Delta CT}$ -Wert 1,15), bei TLR3-Inhibition ($2^{-\Delta\Delta CT}$ -Wert 1,08) zeigt sich ein mRNA-Level ähnlich der nativen Kontrolle. KRT14, welches für ein Keratin als Bestandteil des Cytoskeletts der Epithelzelle kodiert, wird gleichartig exprimiert, es zeigt sich keine signifikante Änderung des Niveaus nach TLR3-Stimulation und -Inhibition ($2^{-\Delta\Delta CT}$ nach TLR3-Stimulation 1,19, nach TLR3-Inhibition 0,91). Das relative mRNA-Level des für N-Cadherin kodierenden mesenchymalen Markers CDH2 nimmt nach TLR3-Stimulation ($2^{-\Delta\Delta CT}$ -Wert 0,82) ab und bei TLR3-Inhibition ($2^{-\Delta\Delta CT}$ -Wert 1,10) zu. In Relation zur unstimulierten Zelllinie zeigt sich eine dezente Mehrexpression. ITGA5, Bestandteil der Integrin-Familie und an Zelloberflächenadhäsion beteiligt, zeigt ein ähnliches Expressionsprofil wie CDH1 ($2^{-\Delta\Delta CT}$ nach TLR3-Stimulation 2,76, nach TLR3-Inhibition 0,98). Die relativen mRNA-Level von TCF4 ($2^{-\Delta\Delta CT}$ nach TLR3-Stimulation 0,68, nach TLR3-Inhibition 1,24), TGF β 2 ($2^{-\Delta\Delta CT}$ nach TLR3-Stimulation 0,47, nach TLR3-Inhibition 1,13), Twist1 ($2^{-\Delta\Delta CT}$ nach TLR3-Stimulation 0,67, nach TLR3-Inhibition 1,13) und Notch1 ($2^{-\Delta\Delta CT}$ nach TLR3-Stimulation 0,89, nach TLR3-Inhibition 1,21) zeigen nach TLR3-Stimulation und TLR3-Inhibition eine ähnliche Entwicklung. Stimulation sorgt für eine Herunterregulation und nach Inhibition zeigt sich eine dezente Mehrexpression. Dabei sind die Änderungen in den relativen mRNA-Leveln sämtlich nicht signifikant. Die vier Gene kodieren dabei für Proteine mit unterschiedlicher Funktion, Notch1 kodiert für ein

Protein, welches durch den Golgi-Apparat zu einem Rezeptor prozessiert wird, Twist1 ist, genau wie TCF4, ein Transkriptionsfaktor. TGF β 2 gehört dem SMAD-Signalweg an.

4.2 Expressionsanalyse ausgewählter EMT-Marker auf Proteinebene

4.2.1 Einleitung

Aus den 84 untersuchten Genen wurden drei ausgewählt, die eine entscheidende Rolle in der EMT von HNSCC einnehmen. Diese wurden mittels Western Blot auf Proteinebene untersucht. Dazu wurden die Zellreihen UT-SCC 60A (Primärtumor) und UT-SCC 60B (Metastase) unter jeweils zwei Konditionen für 24 Stunden stimuliert und es wurden Proteinlysate hergestellt. Neben der Mediumkontrolle wurde eine Inkubation mit Poly(I:C) durchgeführt.

Die statistische Auswertung der Western Blots (geltend für Abbildung 11-16) erfolgte mittels Quantity One-Software zur Quantifizierung der Bandenintensitäten. Anschließend wurde der Mann-Whitney-U-Test zur Überprüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen angewendet, wobei sich aufgrund der hohen Variabilität der einzelnen Stichproben keine signifikanten Ergebnisse nachweisen ließen. Daher handelt es sich im Folgenden um eine rein deskriptive Ergebnisdarstellung.

4.2.2 Proteinexpression von MMP9

In der folgenden Abbildung ist die Proteindetektion mittels Western Blot für MMP9 dargestellt. MMP9 gehört zur Familie der Matrix-Metalloproteinasen und damit zu den Zink-abhängigen Endopeptidasen. In der Literatur konnte bereits in mehreren Tumorentitäten eine Überexpression von MMP9 nachgewiesen werden, sodass hier der Effekt von TLR3 auf MMP9 weiter untersucht wurde. Die Proteindetektion erfolgte mittels Anti-Rabbit MMP9-Antikörper (92kDa) und wurde anhand des housekeeping Proteins β -Actin quantifiziert.

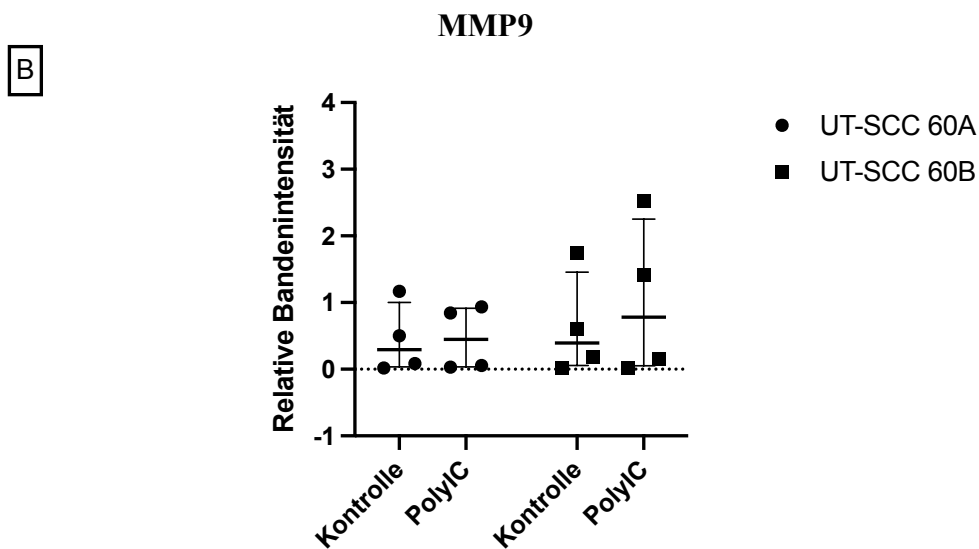
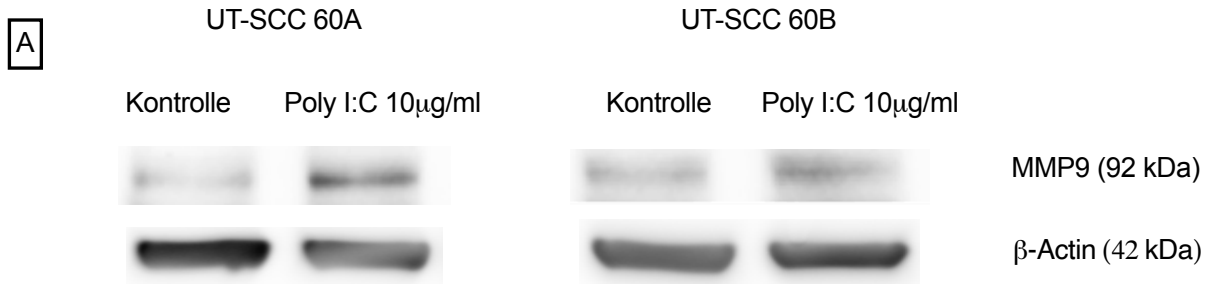


Abbildung 11

A: Proteindetektion von MMP9 mittels Western Blot: β-Actin dient als Ladekontrolle. n=4

B: Grafische Darstellung als Median mit Interquartilsabstand

Die Intensitäten der Banden aller Proben wurden mit Hilfe der QuantityOne®-Software quantifiziert. Die stimulierten Proben wurden auf die Ladekontrolle normalisiert und mit den nativen Proben verglichen, sodass die relative Intensität gemessen werden konnte. Diese gibt somit eine erhöhte/verminderte Proteinexpression in den stimulierten Proben wieder. Diese ist in Abbildung 11 grafisch dargestellt.

Sowohl in der Primärtumorzelllinie als auch in der Metastasenzelllinie lässt sich die Matrix-Metalloproteinase 9 auf Proteinebene nachweisen. Dabei fällt auf, dass die Stimulation von TLR3 mittels Poly(I:C) über 24 Stunden auch auf Proteinebene für eine Mehrexpression in beiden Zelllinien sorgt. Beim Vergleich beider Mediane fällt gegenüber der Kontrolle eine leichte Zunahme nach Stimulation mit Poly (I:C) auf. Diese ist dabei in der Metastasenzelllinie (Kontrolllinie 0,392 vs. Metastasenzelllinie 0,782) ausgeprägter als in der Primärtumorzelllinie (Kontrolllinie 0,293 vs. Metastasenzelllinie 0,458), wobei sich im Vergleich zwischen den beiden Zelllinien keine signifikanten Unterschiede finden.

4.2.3 Proteinexpression von BMP2

Bone Morphogenetic Protein 2 konnte ebenfalls bereits in mehreren Tumorentitäten als überexprimiert nachgewiesen werden und steht in Verdacht, Zellproliferation sowie invasives Tumorwachstum und Metastasierung durch Einflussnahme auf die EMT zu regulieren. In der folgenden Abbildung ist die Detektion von BMP2 mittels Western Blot dargestellt. Die Detektion erfolgte mittels Anti-Mouse-BMP2-Antikörper (54kDa), β -Actin diente als Ladekontrolle. Mit Hilfe der QuantityOne®-Software wurden auch hier die relativen Intensitäten der Banden berechnet und auf die Ladekontrolle und die native Probe normalisiert.

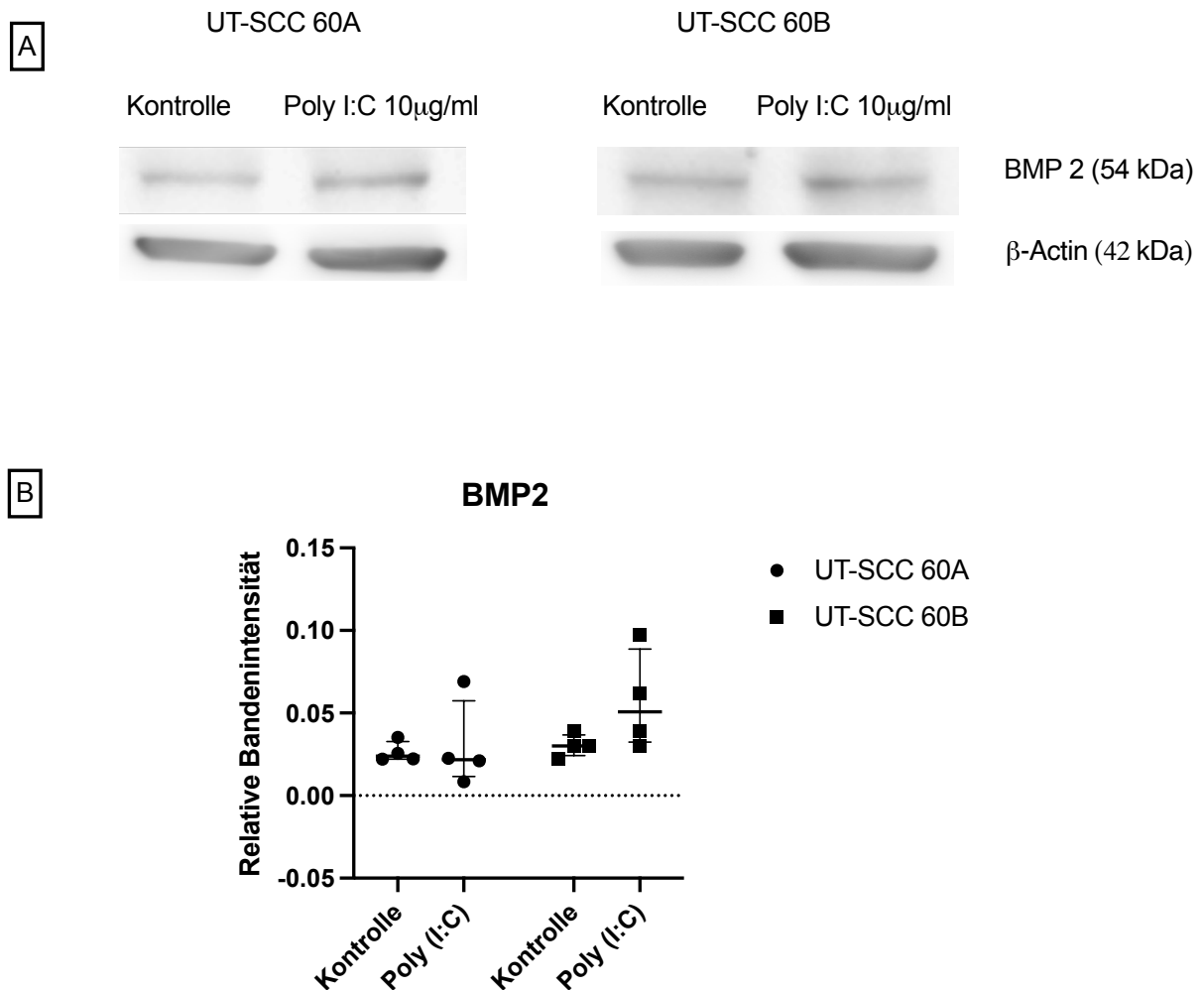


Abbildung 12

A: Proteindetektion von BMP2 mittels Western Blot: β -Actin dient als Ladekontrolle. n=4

B: Grafische Darstellung als Median mit Interquartilsabstand

Das Bone Morphogenetic Protein 2 lässt sich in beiden Zellreihen unter den zwei Konditionen nachweisen. Dabei fällt bei Betrachtung der Proteinintensitäten im Western Blot eine Heterogenität in der Ausprägung der Bandenintensitäten in beiden Zelllinien auf,

welche sich auch nach Quantifizierung der Intensitäten mittels QuantityOne® grafisch darstellen lässt. Die Abbildung 12 zeigt die Mediane der relativen Proteinintensitäten von BMP2 unter den zwei Konditionen in den Zelllinien UT-SCC 60A und UT-SCC 60B. In der Primärtumorzelllinie UT-SCC 60A sind die Mediane der relativen Bandenintensitäten sowohl in der Kontrolle als auch nach Stimulation von TLR3 mittels Poly (I:C) ähnlich (Kontrolllinie 0,0256 vs. Poly (I:C) 0,0219). Dabei ist die Variabilität der Ergebnisse nach Stimulation von TLR3 größer als in der Kontrolllinie, erkennbar am größeren Interquartilsabstand. Bei Betrachtung der Metastasenzelllinie UT-SCC 60B fällt eine Zunahme der relativen Bandenintensität nach Stimulation von TLR3 auf (Median der Kontrolle 0,0301 vs. Poly (I:C) 0,0507), was einer Zunahme um 59% entspricht. Dabei zeigt sich nach Stimulation eine höhere Variabilität als in der Kontrolle, erkennbar am höheren Interquartilsabstand.

4.2.4 Proteinexpression von IL1RA

Der Nachweis von IL1RA, einem Zytokin, erfolgte mittels Anti-Mouse-Antikörper (18kDa). Die folgende Abbildung stellt die detektierten Banden im Western Blot dar. Stimuliert wurden dabei erneut die Primärtumor- und die Metastasenzelllinie und die Quantifizierung der Bandenintensitäten erfolgte mittels QuantityOne®-Software.

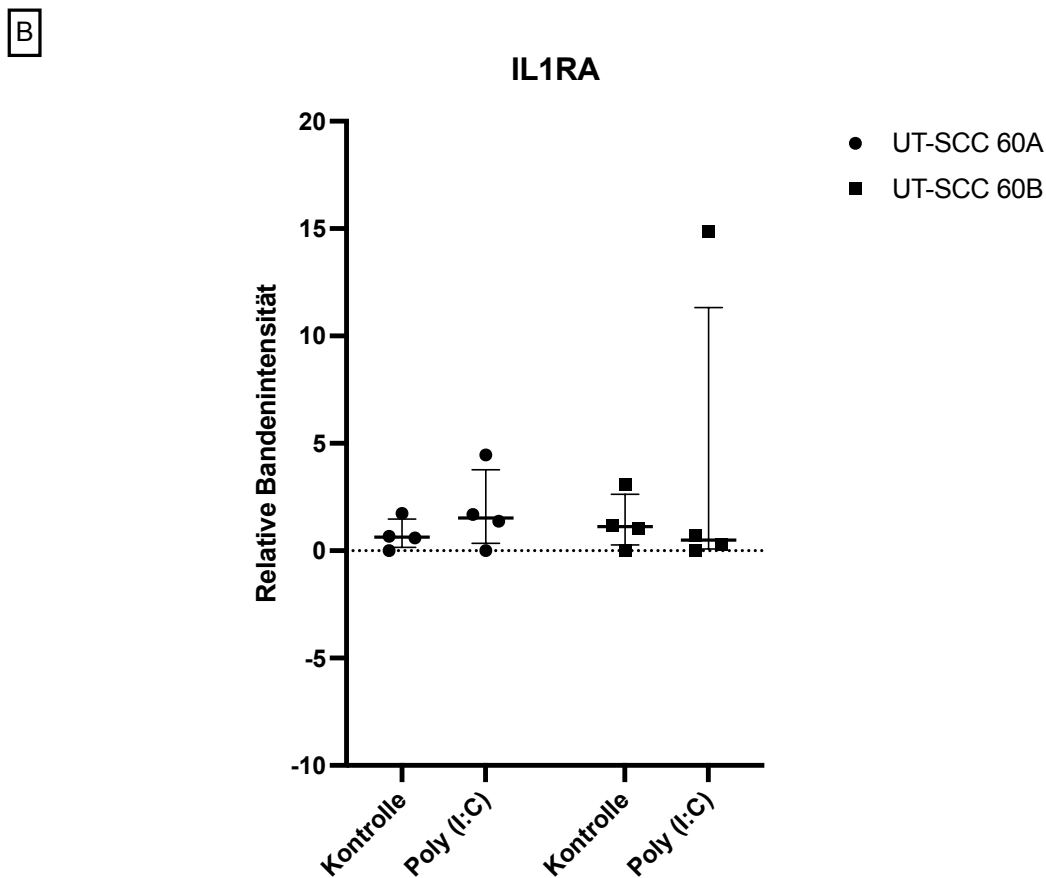
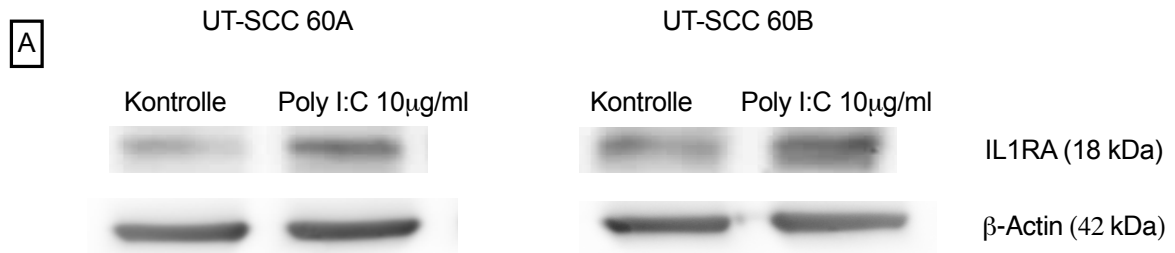


Abbildung 13

A: Proteindetektion von IL1RA mittels Western Blot: β-Actin dient als Ladekontrolle. n=4

B: Grafische Darstellung als Median mit Interquartilsabstand

Die Abbildung fasst die Mediane der gemessenen Proteinintensitäten sowie den Interquartilsabstand grafisch zusammen. Es lässt sich anhand der einzeln aufgetragenen Werte eine große Variabilität der einzelnen Durchläufe bei kleiner Stichprobengröße (n=4) erkennen.

Die Veränderung in der relativen Proteinintensität nach Stimulation von TLR3 durch Poly(I:C) ist sowohl in der Primärtumorzelllinie als auch in der Metastasenzelllinie

nachweisbar. Dabei zeigt sich in der Primärtumorzelllinie UT-SCC 60A eine Zunahme der relativen Bandenintensität nach Stimulation von TLR3 (Kontrolle 0,636 vs. Poly (I:C) 1,529). In der Metastasenzelllinie UT-SCC 60B lässt sich eine Abnahme der relativen Bandenintensität nach Stimulation von TLR3 im Vergleich zur Kontrolle erkennen (Kontrolle 1,118 vs. Poly (I:C) 0,497). Der große Interquartilsabstand erklärt sich durch einen Ausreißer, hier auch grafisch dargestellt. Dieser ist am ehesten auf eine technische Gegebenheit zurückzuführen. Auf eine Korrektur der Ausreißerwerte in der statistischen Auswertung wurde aufgrund des explorativen Charakters dieser Arbeit verzichtet.

4.2.5 Proteinexpression von MMP9, BMP2 und IL1RA in HEK-Zellen

Zur weiterführenden Analyse der Bedeutung von TLR3 für die Expression von EMT-relevanten Proteinen erfolgte die Stimulation von HEK-Blue™-Zellen mit Poly(I:C). Dabei wurden einerseits HEK-Blue™ Null1-Zellen, Zellen ohne TLR3-Rezeptor, andererseits HEK-Blue™ TLR3-Zellen, Zellen mit eingesetztem Toll-like-Rezeptor 3, über 24 Stunden mit Poly(I:C) stimuliert und anschließend die Proteine isoliert und Western Blots angefertigt. β -Actin diente als Ladekontrolle.

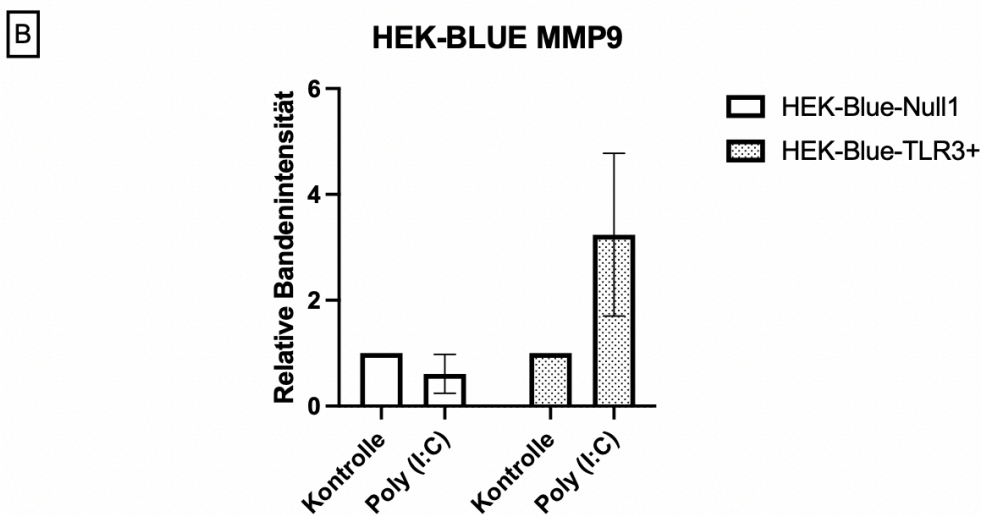


Abbildung 14

A: Proteindetektion von MMP9 mittels Western Blot in HEK-Blue™-Zellen: β-Actin dient als Ladekontrolle. n=3

B: Grafische Darstellung als Mittelwert mit Standardabweichung

Die gemessenen Proteinintensitäten wurden wiederum auf die Ladekontrolle und auf die native Zelle normalisiert, sodass diese einen Wert von 1 aufweist. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung.

Erkennbar ist, dass nach Stimulation von TLR3 mittels Poly(I:C) die relative Proteinintensität in den HEK-Blue™-Zellen mit TLR3 zunimmt, in den Zellen ohne TLR3-Rezeptor unverändert bleibt bzw. abnimmt. Dabei verdreifacht sich

die relative Bandenintensität in der Zelllinie mit vorhandenem TLR3-Rezeptor nach Stimulation mit Poly (I:C) (Kontrolle 1 vs. Poly (I:C) 3,24), in der Zelllinie ohne TLR3-Rezeptor lässt ein geringfügiger Unterschied in der relativen Bandenintensität nach Stimulation von TLR3 im Vergleich zur Kontrolle feststellen (Kontrolle 1 vs. Poly (I:C) 0,61).

Ein ähnliches Resultat weisen die Proteinintensitäten in den Western Blots von BMP2 auf, wie in der folgenden Abbildung dargestellt.

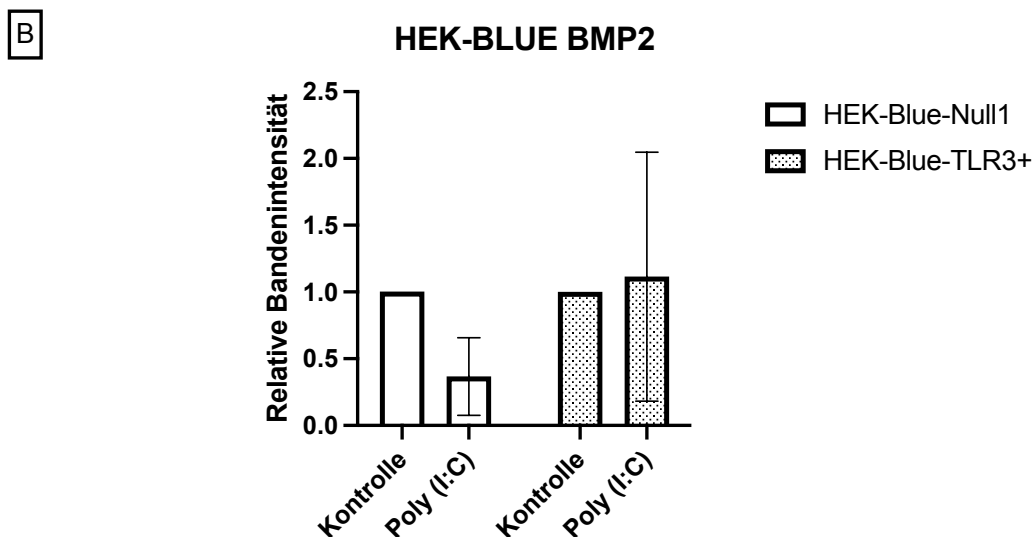
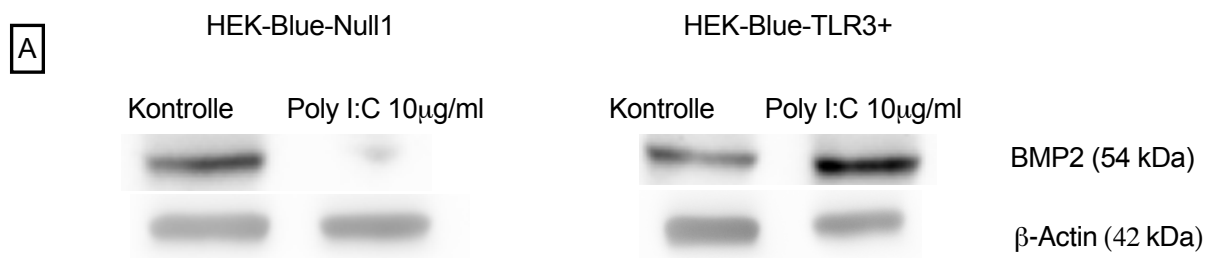


Abbildung 15

A: Proteindetektion von BMP2 mittels Western Blot in HEK-Blue™-Zellen: β-Actin dient als Ladekontrolle. n=3

B: Grafische Darstellung als Mittelwert mit Standardabweichung

Es zeigt sich eine Abnahme der relativen Bandenintensitäten in den HEK-Blue™-Zellen ohne TLR3-Rezeptor (Kontrolle 1 vs. Poly (I:C) 0,40). In den Zellen mit vorhandenem TLR3-Rezeptor ist nach Stimulation des TLR3-Rezeptors durch Poly (I:C) im Mittelwert eine leichte Zunahme zu erkennen (Kontrolle 1 vs. Poly (I:C) 1,2), die jedoch in der geringen Stichprobenanzahl (n=3) einer hohen Varianz unterliegt, dargestellt anhand der Standardabweichung.

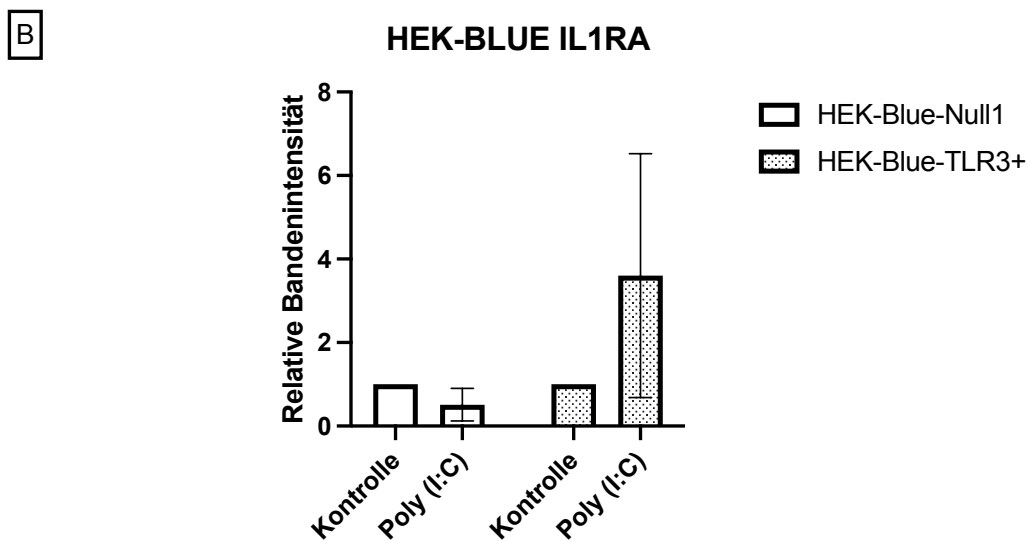
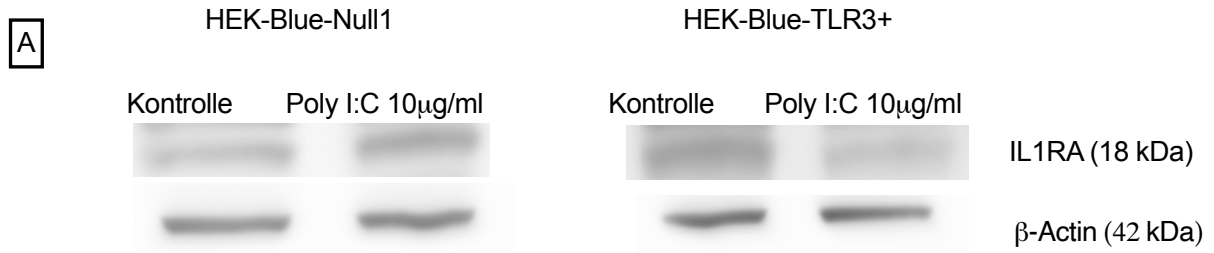


Abbildung 16

A: Proteindetektion von IL1RA mittels Western Blot in HEK-Blue™-Zellen: β-Actin dient als Ladekontrolle. n=3

B: Grafische Darstellung als Mittelwert mit Standardabweichung

Die Proteinintensität von IL1RA zeigt nach Stimulation von TLR3 in den Zellen mit eingesetztem Rezeptor nach 24 Stunden eine deutliche Zunahme (Kontrolle 1 vs. Poly (I:C) 3,6), wohingegen die Proteinintensitäten in der TLR3-negativen Zelllinie nach Stimulation von TLR3 im Vergleich zur Kontrolle eine Abnahme zeigen (Kontrolle 1 vs. Poly (I:C) 0,51). Bei Betrachtung der Standardabweichung zeigt sich dabei in beiden Zelllinien eine hohe Variabilität der Ergebnisse. Diese ist in der TLR3-positiven Zelllinie stärker ausgeprägt als in der TLR3-negativen Zelllinie.

5. Diskussion

5.1 Vergleich von Primärtumor- und Metastasenzelllinie in nativem Zustand

Die gewonnenen Ergebnisse belegen, dass Primärtumorzellen und Metastasenzellen sich bereits in nativem Zustand hinsichtlich der Genexpression EMT-relevanter Gene deutlich unterscheiden (M. Zhang et al. 2020). Dabei unterscheidet sich bereits die mRNA-Menge der einzelnen Gene innerhalb einer Zellreihe deutlich voneinander (von Witzleben et al. 2020). So liegen Transkriptionsfaktoren wie Twist1 oder ZEB1, welche ohne proteasomalen Abbau in den Zellkern gelangen müssen, um ihre Funktion zu erfüllen, in deutlich höherer Menge vor als beispielsweise mesenchymale Marker wie Vimentin (Wahbi et al. 2020). Die Expression von AHNAK und TGF- β 3 ist in den untersuchten Zellen des Primärtumors deutlich höher als in den Zellen der Metastase (Rodrigues-Junior et al. 2019). AHNAK steht bereits in Verdacht, über einen TGF-begleiteten Signalweg die Tumormigration zu unterstützen (Sohn et al. 2018) und so die Metastasierung zu fördern. Dafür spricht das Resultat einer erhöhten Expression von AHNAK in der Primärtumorzelllinie gegenüber der Metastasenzelllinie, die eine EMT bereits durchlaufen hat (Bakir et al. 2020). Der Transkriptionsfaktor ZEB1 kann eine EMT induzieren (Larsen et al. 2016) und damit für die Herunterregulation von epithelialen Markern wie E-Cadherin (CDH1) und die Hochregulation von mesenchymalen Markern wie Vimentin oder N-Cadherin (CDH2) sorgen (Caramel, Ligier, and Puisieux 2018). Dabei findet sich in der Primärtumorzelllinie, welche das Potential besitzt, eine EMT zu durchlaufen, ein höheres Expressionlevel als in der Metastasenzelllinie. Die Expressionen von CDH1 und CDH2 sind in Primärtumor- und Metastasenzelllinie in nativem Zustand nicht signifikant unterschiedlich. Der mesenchymale Marker Vimentin wird in den untersuchten Primärtumor- und Metastasenzelllinien in nativem Zustand insgesamt eher wenig und nicht in signifikant veränderter Weise exprimiert (Paolillo et al. 2019). Daraus lässt sich schließen, dass die Zellen in nativem Zustand weder ein eindeutig epitheliales noch ein eindeutig mesenchymales Expressionsprofil besitzen. Dazu passend wird der mesenchymale Marker FOXC2 in der Metastasenzelllinie in nativem Zustand deutlich mehr exprimiert als in der Primärtumorzelllinie (Weng et al. 2021; Xu et al. 2020), wohingegen STEAP1 als epithelialer Marker in dieser Untersuchung in der Metastasenzelllinie ebenfalls in höherer Menge vorhanden ist als in der Primärtumorzelllinie. Die Expression von MMP9 ist in der nativen Primärtumorzelllinie im Vergleich zur Expression in den Zellen der Metastasenzelllinie vermindert, hingegen sind die

Expressionen von BMP2 und IL1RN gegensätzlich reguliert. Somit scheinen die Zellen der Primärtumorlinie das Potential zu besitzen, eine EMT zu durchlaufen (S. Brabletz et al. 2021), zum Untersuchungszeitpunkt jedoch kein eindeutig epitheliales Genprofil aufzuweisen. Die Zellen der Metastasenzelllinie haben bereits eine EMT durchlaufen, weisen jedoch kein eindeutig mesenchymales Profil auf. Ein Grund dafür könnte die Induktion einer MET sein. Sowohl die Zellen des Primärtumors als auch die Zellen der Metastase gehören kultivierten Zellen an, die bereits eine EMT oder MET durchlaufen haben könnten.

5.2 Einfluss der Aktivierung und Inhibierung von TLR3 auf die EMT in Kopf-Hals-Karzinomen

Toll-like-Rezeptor 3 wird als Teil der pattern recognition receptors in zahlreichen malignen Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches exprimiert, eine starke Expression findet sich dabei vor allem in schlecht differenzierten Tumoren (Chuang et al. 2012). Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits vor einigen Jahren die Expression von TLR3 in den hier verwendeten, kultivierten Zelllinien nachweisen (Xie et al. 2011). TLR3 erkennt doppelsträngige RNA und Poly(I:C) und dient hierfür als synthetisches Analogon. Poly(I:C) ist kommerziell in zwei Formen erhältlich, zum einen als low-molecular weight (LMW) und als das in diesen Untersuchungen verwendete high-molecular weight (HMW). Es wurde bereits gezeigt, dass das genutzte Poly(I:C)HMW signifikant besser funktioniert, um eine TLR3-Aktivierung auszulösen als Poly(I:C)LMW (Y. Zhou et al. 2013). Die Rolle von TLR3 in Kopf-Hals-Karzinomen und besonders in der EMT ist bisher nicht eindeutig geklärt. Einige Studien deuten darauf hin, dass die Aktivierung von TLR3 über verschiedene Mechanismen zu einer Apoptose (Kodama, Kodama, and Suzuki 2010; Luo et al. 2012) und damit zu Verhinderung von Tumorwachstum führt, in anderen Studien wiederum wird ein protumoröser Effekt postuliert, beispielsweise durch Adaptation an Hypoxie (Veyrat et al. 2016) oder durch Ausbildung einer Chemoresistenz (Chuang et al. 2018). Die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse stützen die heterogene Rolle von TLR3 in der EMT. Die relative Menge an mRNA für Notch1, das für den Notch1-Rezeptor kodiert, welcher eine Rolle im Notch-Signalweg einnimmt (Khan et al. 2021), wird bei Stimulation von TLR3 in der Primärtumorzelllinie hoch-, in der Metastasenzelllinie leicht ohne signifikante Änderung herunterreguliert. TLR3-Inhibierung sorgt in der Primärtumorzelllinie gegenüber der TLR3-Stimulation für eine erhöhte Expression von Notch1, sodass eine Herunterregulation durch

TLR3 angenommen werden kann (Rashedi et al. 2017). Es konnte in einer Studie gezeigt werden, dass die direkte Inhibierung von Notch1 in einem Xenograft-Model zu einer Reduktion von Krebsstammzellen sowie der Fähigkeit zur Selbsterneuerung des Tumors in Kopf- und Hals-Tumoren geführt hat (Zhao et al. 2016). Andererseits wurde bereits die Eigenschaft von Notch1 als Tumorsuppressorgen in HNSCC postuliert (Agrawal et al. 2011). Die gegensätzliche Funktion von Notch1 spiegelt sich auch in den hier erhobenen Ergebnissen wider, da die Primärtumorzelllinie mit einer Abnahme der relativen mRNA-Menge auf die TLR3-Stimulation reagiert, die Metastasenzelllinie mit einer Zunahme der relativen mRNA-Menge von Notch1. So könnte Notch1 in den unterschiedlichen Phasen der EMT verschiedene Funktionen erfüllen (Lepikhova et al. 2018). Eine ähnliche Reaktion auf die Stimulation von TLR3 durch Poly(I:C) findet sich bei Betrachtung der relativen mRNA-Menge von TCF4. Transcription Factor-4 ist ein Bestandteil des Wnt-Signalwegs, die Rolle von TCF4 in Kopf-Hals-Karzinomen ist bisher nicht abschließend geklärt (Li et al. 2020). In anderen Tumorentitäten wurden bereits Versuche zur Erhöhung der Chemosensitivität durch Silencing von TCF4 durchgeführt und TCF4 somit bei Aktivierung eine protumoröse Eigenschaft nachgesagt (Kendziorra et al. 2011). In den hier durchgeführten Versuchen zeigt sich eine unterschiedliche Reaktion auf die TLR3-Stimulation in Primärtumor- und Metastasenzelllinie. Dabei führt die Stimulation in der Primärtumorzelllinie zur Abnahme der relativen mRNA-Menge von TCF4, in der Metastasenzelllinie zu einer Zunahme der relativen mRNA-Menge. Die Inhibierung von TLR3 führt in der Primärtumorzelllinie ebenfalls, wie bei Notch1, zur Zunahme der relativen mRNA-Menge, sodass auch für TCF4 eine durch TLR3-getriggerte Inhibierung postuliert werden kann. Die heterogene Reaktion auf Stimulation von TLR3 in der Primarius- und der Metastasenzelllinie könnte mit den unterschiedlichen Stadien der EMT beider Zelllinien zusammenhängen, wobei die genaue Funktion von TCF4 in HNSCC weiterhin ungeklärt bleibt. Angesichts der heterogenen Reaktion in Primärtumor- und Metastasenzelllinie auf die Stimulation von TLR3 scheint eine unterschiedliche, spezifische Funktion in beiden Zelllinien wahrscheinlich. Bei Betrachtung von GSK3 β , welches über die Phosphorylierung von β -Catenin am Wnt-Signalweg beteiligt ist (Bertrand 2020), fällt nach Stimulation von TLR3 eine Hochregulation in der Primärtumorzelllinie neben einer Herunterregulation in der Metastasenzelllinie auf. Der Unterschied nach TLR3-Stimulation in Primärtumor- und Metastasenzelle könnte dabei mit der unterschiedlichen Migrationsfähigkeit der Zelllinien zusammenhängen (Hamidi and Ivaska 2018), die sich bereits in den Leveln der mRNA-Mengen EMT-relevanter Proteine in der nativen Zelllinie widerspiegeln. Der Einfluss von

GSK3 β auf die EMT in HNSCC konnte bereits in vorherigen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden (Schulz et al. 2018) und wird durch die nun erhobenen Ergebnisse gestützt. Eine Mehrexpression in der Primärtumorzelle nach TLR3-Stimulation zeigt sich ebenfalls bei MMP3 und MMP9. MMP3 gehört wie MMP9 zur Familie der Matrix-Metalloproteinasen (Mondal et al. 2020). Es ist bekannt, dass diese Mitglieder der Matrix-Metalloproteinasen in Kopf-Hals-Karzinomen überexprimiert sind, dabei korreliert besonders die Expression von MMP9 mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium (O-charoenrat, Rhys-Evans, and Eccles 2001). Die hier verwendeten permanenten Zelllinien UT-SCC 60A und UT-SCC 60B stammen aus einem Tumor, welcher im Tumorstadium T₄N₁M₀ klassifiziert worden ist und somit eine ausgedehnte Tumormanifestation mit Lymphknoten- und ohne Fernmetastasen darstellt. Bereits in der nativen Zelllinie zeigt sich eine vergleichsweise hohe mRNA-Menge an MMP9, nach Stimulation mit TLR3 zeigt sich sowohl in der Primärtumor- als auch in der Metastasenzelllinie auf RNA-Ebene eine Heraufregulation in Normalisierung auf die nicht-stimulierte Zelle, was bereits für andere Tumorentitäten gezeigt werden konnte (Owyong et al. 2019). Die Inhibition von TLR3 führte in den Untersuchungen der Primärtumorzelllinie zu einer deutlichen Abnahme der Expression und eine Annäherung an den Wert der nativen Zelllinie. Auf Proteinebene sorgt die TLR3-Stimulation in Primärtumor- und Metastasenzelllinie für eine Mehrexpression von MMP9, die Inhibition von TLR3 führt in den Tumorzellen zu einer Annäherung an den Wert der nativen Zelllinie. Diese Ergebnisse lassen sich auf RNA-Ebene gut reproduzieren. Auch in den HEK-Blue™-Zellen mit vorhandenem TLR3-Rezeptor führt eine Stimulation von TLR3 durch Poly(I:C) zu einer Zunahme von MMP9 auf Proteinebene. In vorherigen Arbeiten konnte bereits ein Zusammenhang zwischen der Expression von MMP9 und dem Wnt/ β -Catenin Signalweg in T-Zellen gezeigt werden (Wu, Crampton, and Hughes 2007), in menschlichen Atemwegs-Epithelzellen konnte die Stimulation von TLR3 die Expression von MMP9 als Teil des Wnt/ β -Catenin Signalwegs (Royer et al. 2017) aktivieren. In Anbetracht der geringen Stichprobengröße konnte jedoch keine signifikante Änderung festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung könnte, neben der hohen Varianz aufgrund der geringen Stichprobengröße, auch in der Tatsache liegen, dass HEK-Blue™-Zellen durch Transfektion verändert sind und daher eine im Vergleich zu Tumorzellen andere Zellstruktur aufweisen (Schau et al. 2019).

Die Expression des Transkriptionsfaktors Forkhead Box Protein C2 (FOXC2) zeigt ebenfalls einige bemerkenswerte Änderungen auf TLR3-Stimulation. So steigt das relative mRNA-Level von FOXC2 bei TLR3-Stimulation in der Primärtumorzelllinie. TLR3-Inhibition führt

in der Primärtumorzelllinie zu einem relativen mRNA-Level ähnlich der nativen Zelllinie, woraus abgeleitet werden kann, dass die Menge von FOXC2 in den kultivierten Zellen des untersuchten Primärtumors TLR3-abhängig steigt. Bei Betrachtung der Metastasenzelllinie sinkt das relative mRNA-Level von FOXC2 auf Stimulation mit Poly(I:C), es scheint demnach TLR3-abhängig zu einer Abnahme der relativen mRNA-Menge von FOXC2 in der kultivierten Metastasenzelllinie zu kommen. FOXC2 gilt in mehreren Tumorentitäten als Induktor der EMT, wobei dazu unterschiedliche Signalwege genutzt werden (He et al. 2018). Über diesen Mechanismus könnte es zu einer Chemoresistenz in Karzinomen kommen (Z. Zhou et al. 2015) und die Expression von FOXC2 als negativer prognostischer Marker genutzt werden (Imayama et al. 2015; Jiang et al. 2016). In den hier durchgeführten Untersuchungen ergibt sich eine TLR3-abhängige Erhöhung der Expression von FOXC2 in der Primärtumorzelllinie. Über die FOXC2-abhängige Induktion einer EMT würde die Zelle proliferative und invasive Eigenschaften erlangen (Y. Chen et al. 2020). In der Metastasenzelllinie scheint die Stimulation von TLR3 hingegen zu einer Abnahme der Expression von FOXC2 gegenüber der nicht-stimulierten Zelle zu führen. Damit würde die Zelle mesenchymale Eigenschaften verlieren und das Potential einer EMT-Auslösung wäre geringer. Spezifische Inhibierung der FOXC2-Signalkaskade führte bereits in Studien von Prostatakarzinomen zur Stabilisierung des epithelialen Phänotyps (Paranjape et al. 2016). Angesichts der Untersuchungsergebnisse dieser Forschungsarbeit könnte die Inhibition von TLR3 einen ähnlichen Effekt haben, die Stimulation von TLR3 scheint in den untersuchten Zellen auf RNA-Ebene einen protumorösen Effekt auszulösen. Um die Rolle von FOXC2 in HNSCC genauer zu spezifizieren, wären noch weiterführende Arbeiten unter Berücksichtigung der Proteinebene sinnvoll. Besonders eine TLR3-Inhibition könnte als therapeutisches Target dienen.

Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP2) gehört zur Familie der Transforming Growth Factor Beta (TGF β) und ist seit vielen Jahren als Wachstumsfaktor in der Knochen- und Knorpelentwicklung bekannt (Chen et al. 2004). Darüber hinaus konnte in der jüngsten Forschung ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von BMP2 und verschiedenen Tumorentitäten gezeigt werden (P. Huang et al. 2017; Kang et al. 2010). Das Auftreten von hohen Mengen an BMP2 konnte bereits in Kopf-Hals-Karzinomen nachgewiesen und ein Zusammenhang mit lokal ausgedehntem Tumorstadium sowie einer hohen Rate an Lokalrezidiven festgestellt werden (Sand et al. 2014). Auch in den hier untersuchten Zelllinien lässt sich BMP2 nachweisen, im Nativzustand der Tumorzelllinien sowohl in der Primär- als auch in der Metastasenzelllinie in vergleichsweise hohen Mengen. Die

Aktivierung von TLR3 in Primärtumor- und Metastasenzelllinie durch Poly(I:C) führte in dieser Forschungsarbeit dazu, dass die Menge an BMP2 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zunimmt, wobei die Zunahme in der Primärtumorzelllinie stärker ausgeprägt ist als in der Metastasenzelllinie. Die Inhibition von TLR3 auf RNA-Ebene führt dagegen zu einer deutlichen Abnahme der Expression von BMP2. Bereits bekannt ist, dass das Vorhandensein von BMP2 in Kopf-Hals-Karzinomen zu einer Zunahme an Tumorwachstum führt (Kim et al. 2014). In anderen Tumorentitäten, wie beispielsweise dem Ovarialkarzinom oder dem kolorektalen Karzinom, wird BMP2 aufgrund der protumorösen Wirkung über verschiedene Signalkaskaden bereits als therapeutisches Target erwogen (Feng et al. 2019; Fukuda et al. 2020). In Kopf-Hals-Karzinomen ließ sich in einer früheren Forschungsarbeit mit kleiner Stichprobenanzahl zwar kein Zusammenhang zwischen der histologischen Eingruppierung und der vorhandenen Menge an BMP2 erfassen (Mouchref Hamasni et al. 2016), allerdings wäre im Hinblick auf die hier erhobenen Untersuchungsergebnisse der Einsatz von BMP2 als Target vor Anwendung eines TLR3-aktivierenden Chemotherapeutikums denkbar, um ein Tumorwachstum zu verhindern.

Ebenfalls beachtliche, wenn auch nicht signifikante Ergebnisse, liefert die Stimulation/Inhibition von TLR3 im Hinblick auf IL1RN, welches für den Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist (IL1RA) kodiert. Interleukine sind Zytokine, welche eine entscheidende Rolle in inflammatorischen Prozessen besitzen und damit auch zur Mikroumgebung eines Tumors gehören (Mantovani et al. 2018). In HNSCC ist das Vorhandensein von IL1RA bereits untersucht, dabei scheint IL1RA unabhängig vom Differenzierungsgrad des Tumors vorhanden zu sein (Westin et al. 2002). Über Interleukin 1 (IL1) ist eine protumoröse Wirkung bekannt, besonders die Tumorangiogenese sowie die Metastasierung werden auf verschiedenen Wegen von IL1 gefördert (Mantovani et al. 2019). IL1RA ist ein physiologischer Ligand von IL1 β , welcher bei Bindung keine Antwortkaskade auslöst und somit eine antagonistische Funktion besitzt. Ein spezifischer Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist findet bereits seit einigen Jahren in der Therapie der rheumatoiden Arthritis zur Inflammationseindämmung eine Anwendung (Ramírez and Cañete 2018). In den durchgeführten Versuchen zeigt sich bei TLR3-Stimulation sowohl in der Primärtumor- als auch in der Metastasenzelllinie eine Mehrexpression von IL1RN. Diese ist dabei in der Metastasenzelllinie leicht schwächer ausgeprägt als in der Primärtumorzelllinie. Bei TLR3-Inhibition gleicht das relative mRNA-Level von IL1RN in der Primärtumorzelllinie dem der unstimulierten Zelle. Auf Proteinebene lassen sich diese Ergebnisse in der Primärtumorzelllinie ebenfalls nachvollziehen, wobei sich aufgrund einer hohen Varianz bei

kleiner Stichprobenanzahl keine statistische Signifikanz ergibt. In der Metastasenzelllinie ergibt sich die Tendenz einer Herunterregulation von IL1RN nach Stimulation von TLR3 auf Proteinebene. Insgesamt ist im Vergleich der mRNA-Expression mit der Proteinexpression in den untersuchten Zelllinien die Regulation der Translation zu bedenken. So ist zwar davon auszugehen, dass die untersuchten Gene zu der Proteinbiosynthese unterliegen, diese jedoch deutlich abhängig von der Translationsrate ist, die wiederum zellulärem Stress, veränderter Nährstoffzufuhr oder auch dem Entwicklungs- und Differenzierungsgrad der Zelle unterliegt (Chouaib et al. 2020). Die Rahmenbedingungen (bspw. Nährstoffzufuhr) wurden in dieser Arbeit konstant gehalten, der Entwicklungsgrad der Zelle bspw. lässt sich jedoch durch Rahmenbedingungen kaum beeinflussen.

In den HEK-Blue™-Zellen führt eine TLR3-Stimulation über Poly(I:C) in den Zellen mit vorhandenem Toll-like-Rezeptor 3 zu einer Mehrexpression des Proteins IL1RA im Vergleich zur Kontrolle. Anhand dieser Ergebnisse kann eine TLR3-abhängige Expression des Interleukin-1-Antagonisten abgeleitet werden. Eine ähnliche Hypothese stellt eine kürzlich veröffentlichte chinesische Publikation vor (Liu et al. 2019). Das Potential einer TLR3-abhängigen Blockade eines der einflussreichsten Zytokine im Bereich der Inflammation ist nicht nur im Bereich der Karzinomerkrankungen hoch. Zu diesem Thema sind dringend weitere Forschungsarbeiten notwendig, um den Einfluss einer TLR3-Stimulation auf das Target IL1RA weiter zu untersuchen und als mögliches Therapeutikum einzuordnen.

Insgesamt lassen sich, insbesondere auf Proteinebene, deutliche Tendenzen einer TLR3-abhängigen Aktivierung von wichtigen epithelial-mesenchymalen Markern aufzeigen. Eine zukünftige weiterführende Analyse ist dringend wünschenswert, um diese Befunde zu untermauern.

5.3 Limitationen der statistischen Auswertung

Die hier erhobenen Ergebnisse werden aufgrund der geringen Stichprobenanzahl als Einzelfallergebnisse betrachtet und geben einen Überblick über den Trend der Expression, liefern jedoch in der Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test keine signifikanten Ergebnisse. Die Ergebnisse des Mann-Whitney-U-Tests beruhen auf der Einordnung der Werte in eine Rangliste, die zwar die einzelne Reihenfolge (höherer/niedrigerer Wert) berücksichtigt, jedoch nicht die Werte (viel höher/viel niedriger) der Rangfolge. Somit ist in diesem Fall bei einer kleinen Stichprobengröße (bspw. einer Stichprobengröße von $n=3$) zwar die statistische Berechnung mittels nicht-parametrischem Test für ungepaarte Stichproben folgerichtig, es sollte jedoch die begrenzte Aussagekraft der Ergebnisse und insbesondere der Möglichkeit des Erreichens einer statistischen Signifikanz nach gängiger Konvention berücksichtigt werden. Sämtliche Ergebnisse sind weitestgehend als explorativ zu betrachten und bieten einen Überblick, lassen jedoch nicht auf die Grundgesamtheit schließen.

Daher sind, zur weiterführenden Analyse der hier erhobenen Daten, dringend Untersuchungen mit größerer Stichprobenanzahl und die damit verbundene Wiederholung der statistischen Testverfahren notwendig.

6. Zusammenfassung

Die Epithelial-Mesenchymale Transition ist ein komplexer Vorgang, der für die Metastasierung und Migration von malignen Zellen im menschlichen Körper unabdingbar ist. Metastasierte Karzinome haben eine deutlich schlechtere Prognose als nicht metastasierte maligne Tumoren.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Toll-like-Rezeptor 3 auf die Epithelial-mesenchymale Transition zu studieren und einen Einblick in mögliche Zusammenhänge zu erlangen. Unter Verwendung von molekularbiologischen Untersuchungsmethoden konnte der Einfluss von TLR3 auf spezifische EMT-Marker näher erforscht werden.

In Zusammenschau der Untersuchungsergebnisse und der aktuellen Literatur lässt sich ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung von TLR 3 und einigen EMT-Markern erkennen. Dabei konnte eine heterogene Wirkung auf die Gesamtheit der EMT-Marker nachgewiesen werden und es wurden im Hinblick auf den Einsatz einer TLR3-Stimulation als mögliches Therapeutikum die näher untersucht, bei denen eine protumoröse Wirkung vermutet oder bereits nachgewiesen wurde. Hier konnte auf RNA- und Proteinebene gezeigt werden, dass die Stimulation von TLR3 zu einer Mehrexpression von BMP2, MMP9 und IL1RA in den untersuchten Tumorzelllinien führt. Ob der Einsatz eines TLR3-Inhibitors zur Abnahme der protumorös wirkenden Gene führt, kann in dieser Arbeit nicht beantwortet werden, jedoch zeigen die Ergebnisse interessante Einblicke in einen möglichen Zusammenhang mit TLR3 und fordern weitere Forschungsuntersuchungen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen zum Verständnis von TLR3 in der Epithelial-Mesenchymalen Transition bei und sollen zukünftigen Therapieoptionen von Kopf- und Hals-Karzinomen den Weg ebnen.

7. Literaturverzeichnis

- Agrawal, Nishant et al. 2011. "Exome Sequencing of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Reveals Inactivating Mutations in NOTCH1." *Science*. 333(6046): 1154–57.
- Bakir, Basil, Anna M Chiarella, Jason R Pitarresi, and Anil K Rustgi. 2020. "EMT, MET, Plasticity, and Tumor Metastasis." *Trends in cell biology* 30(10): 764–76.
- Bertrand, Fred E. 2020. "The Cross-Talk of NOTCH and GSK-3 Signaling in Colon and Other Cancers." *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research* 1867(9): 118738.
- Bharti, Rashmi, Goutam Dey, and Mahitosh Mandal. 2016. "Cancer Development, Chemoresistance, Epithelial to Mesenchymal Transition and Stem Cells: A Snapshot of IL-6 Mediated Involvement." *Cancer Letters* 375(1): 51–61.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304383516301264> (March 6, 2020).
- Bolós, Victoria et al. 2003. "The Transcription Factor Slug Represses E-Cadherin Expression and Induces Epithelial to Mesenchymal Transitions: A Comparison with Snail and E47 Repressors." *Journal of Cell Science* 116(3): 499–511.
- Brabletz, Simone, Harald Schuhwerk, Thomas Brabletz, and Marc P Stemmler. 2021. "Dynamic EMT: A Multi-Tool for Tumor Progression." *The EMBO journal*: e108647.
- Brabletz, Thomas et al. 2001. "Variable β -Catenin Expression in Colorectal Cancers Indicates Tumor Progression Driven by the Tumor Environment." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(18): 10356–61.
<https://www.pnas.org/content/98/18/10356> (March 6, 2020).
- Bray, Freddie et al. 2018. "Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries." *CA: a cancer journal for clinicians* 68(6): 394–424.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30207593>.
- Cano, A et al. 2000. "The Transcription Factor Snail Controls Epithelial-Mesenchymal Transitions by Repressing E-Cadherin Expression." *Nature cell biology* 2(2): 76–83.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10655586>.
- Caramel, Julie, Maud Ligier, and Alain Puisieux. 2018. "Pleiotropic Roles for ZEB1 in

- Cancer.” *Cancer Research* 78(1): 30 LP – 35.
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/78/1/30.abstract>.
- Chen, Di, Ming Zhao, and Gregory R Mundy. 2004. “Bone Morphogenetic Proteins.” *Growth factors (Chur, Switzerland)* 22(4): 233–41.
- Chen, Yihong et al. 2020. “FOXC2 Promotes Oxaliplatin Resistance by Inducing Epithelial-Mesenchymal Transition via MAPK/ERK Signaling in Colorectal Cancer.” *OncoTargets and Therapy* Volume 13: 1625–35. <https://www.dovepress.com/foxc2-promotes-oxaliplatin-resistance-by-inducing-epithelial-mesenchym-peer-reviewed-article-OTT> (April 14, 2020).
- Chouaib, Racha et al. 2020. “A Dual Protein-mRNA Localization Screen Reveals Compartmentalized Translation and Widespread Co-Translational RNA Targeting.” *Developmental cell* 54(6): 773-791.e5.
- Chuang, Hui-Ching et al. 2018. “Triggering TLR3 Pathway Promotes Tumor Growth and Cisplatin Resistance in Head and Neck Cancer Cells.” *Oral Oncology* 86: 141–49. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1368837518303397> (April 16, 2019).
- Chuang, Hui-Ching, Chao-Cheng Huang, Chih-Yen Chien, and Jiin-Haur Chuang. 2012. “Toll-like Receptor 3-Mediated Tumor Invasion in Head and Neck Cancer.” *Oral Oncology* 48(3): 226–32. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1368837511008682?via%3Di> hub (April 16, 2019).
- David M. Gonzalez and Damian Medici. 2014. “Signaling Mechanisms of the Epithelial-Mesenchymal Transition.” *Sci Signal*. 344(7). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4740915/pdf/nihms754944.pdf>.
- Dipl. Biol. Timo Freyer. “https://flexikon.doccheck.com/de/Western_Blot.” (Tag des Zugriffs: 13.09.2021)
- Duray, Anaëlle et al. 2011. “Immune Suppression in Head and Neck Cancers: A Review.” *Clinical and Developmental Immunology* 2010(i): 1–15.
- Eickhoff, Sarah. 2011. “Toll-Like Rezeptor Expressionsprofile in Permanenten Zelllinien Maligner Kopf- Und Halskarzinome.” *Bachelorarbeit, Lübeck*.
- Feng, Peng-Cheng et al. 2019. “BMP2 Secretion from Hepatocellular Carcinoma Cell HepG2 Enhances Angiogenesis and Tumor Growth in Endothelial Cells via Activation of the MAPK/P38 Signaling Pathway.” *Stem cell research & therapy* 10(1): 237.

- Fukuda, Tomohiko et al. 2020. "BMP Signaling Is a Therapeutic Target in Ovarian Cancer." *Cell death discovery* 6(1): 139.
- Gammon, Luke, and Ian C Mackenzie. 2016. "Roles of Hypoxia, Stem Cells and Epithelial–Mesenchymal Transition in the Spread and Treatment Resistance of Head and Neck Cancer." *Journal of Oral Pathology & Medicine* 45(2): 77–82.
<https://doi.org/10.1111/jop.12327>.
- Gatta, Gemma et al. 2015. "Prognoses and Improvement for Head and Neck Cancers Diagnosed in Europe in Early 2000s: The EURO CARE-5 Population-Based Study." *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 51(15): 2130–43.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26421817> (April 16, 2019).
- Guillerey, Camille et al. 2015. "Toll-like Receptor 3 Regulates NK Cell Responses to Cytokines and Controls Experimental Metastasis." *Oncology* 4(9): 1–11.
- Hamidi, Hellyeh, and Johanna Ivaska. 2018. "Every Step of the Way: Integrins in Cancer Progression and Metastasis." *Nature reviews. Cancer* 18(9): 533–48.
- He, Yuwen et al. 2018. "FOXC2 Promotes Epithelial–Mesenchymal Transition and Cisplatin Resistance of Non-Small Cell Lung Cancer Cells." *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 82(6): 1049–59. <https://doi.org/10.1007/s00280-018-3697-2>.
- Huang, Peide et al. 2017. "BMP-2 Induces EMT and Breast Cancer Stemness through Rb and CD44." *Cell death discovery* 3: 17039.
- Huang, Shao Hui, and Brian O’Sullivan. 2017. "Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer." *Current Treatment Options in Oncology* 18(7): 40. <https://doi.org/10.1007/s11864-017-0484-y>.
- Imayama, Naomi et al. 2015. "FOXC2 Expression Is Associated with Tumor Proliferation and Invasion Potential in Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma." *Pathology & Oncology Research* 21(3): 783–91. <https://doi.org/10.1007/s12253-014-9891-6>.
- Jethwa, Ashok R., and Samir S. Khariwala. 2017. "Tobacco-Related Carcinogenesis in Head and Neck Cancer." *Cancer and Metastasis Reviews* 36(3): 411–23.
- Jiang, Wei et al. 2016. "Prognostic Value of High FoxC2 Expression in Resectable Non-Small Cell Lung Cancer, Alone or in Combination with E-Cadherin Expression." *BMC Cancer* 16(1): 1–9. <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-016-2056-0>.
- Juliane Göppel, Nikolaus Möckelmann, Adrian Münscher, Guido Sauter and Udo Schumacher 2017. "Expression of Epithelial–Mesenchymal Transition Regulating Transcription Factors in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas." *Anticancer Research* 37(10): 5435–40.

- Jung, Ah Ra et al. 2020. "Epithelial-Mesenchymal Transition Gene Signature Is Associated with Prognosis and Tumor Microenvironment in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma." *Scientific Reports* 10(1): 1–11. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-60707-x>.
- Kalluri, Raghu, and Robert A. Weinberg. 2009. "The Basics of Epithelial-Mesenchymal Transition." *Journal of Clinical Investigation* 119(6): 1420–28.
- Kang, Myoung Hee et al. 2010. "BMP2 Accelerates the Motility and Invasiveness of Gastric Cancer Cells via Activation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/Akt Pathway." *Experimental cell research* 316(1): 24–37.
- Kawai, T., and S. Akira. 2006. "TLR Signaling." *Cell Death and Differentiation* 13(5): 816–25.
- Kawai, Taro, and Shizuo Akira. 2010. "The Role of Pattern-Recognition Receptors in Innate Immunity: Update on Toll-like Receptors." *Nature Immunology* 11(5): 373–84. <https://doi.org/10.1038/ni.1863>.
- Kazi, Aslamuzzaman et al. 2018. "GSK3 Suppression Upregulates β -Catenin and c-Myc to Abrogate KRas-Dependent Tumors." *Nature Communications* 9(1): 5154. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07644-6>.
- Kendziorra, Emil et al. 2011. "Silencing of the Wnt Transcription Factor TCF4 Sensitizes Colorectal Cancer Cells to (Chemo-) Radiotherapy." *Carcinogenesis* 32(12): 1824–31.
- Khan, Fahad et al. 2021. "Rutin Mediated Apoptotic Cell Death in Caski Cervical Cancer Cells via Notch-1 and Hes-1 Downregulation." *Life (Basel, Switzerland)* 11(8).
- Kim, Kwonseop, Zifan Lu, and Elizabeth D Hay. 2002. "DIRECT EVIDENCE FOR A ROLE OF β -CATENIN/LEF-1 SIGNALING PATHWAY IN INDUCTION OF EMT." *Cell Biology International* 26(5): 463–76. <https://doi.org/10.1006/cbir.2002.0901>.
- Kim, Mi-joo, Kwang-mahn Kim, Jin Kim, and Kyoung-nam Kim. 2014. "BMP-2 Promotes Oral Squamous Carcinoma Cell Invasion by Inducing CCL5 Release." *PloS one* 9(10): e108170.
- Kimelman, D., and W. Xu. 2006. " β -Catenin Destruction Complex: Insights and Questions from a Structural Perspective." *Oncogene* 25(57): 7482–91.
- Kodama, Nozomi, Satoru Kodama, and Masashi Suzuki. 2010. "Toll-like Receptor 3 Signaling Induces Apoptosis in Human Head and Neck Cancer via Survivin Associated Pathway." *Oncology Reports* 24(1): 225–31. <http://www.spandidos->

- publications.com/or/24/1/225 (April 16, 2019).
- Larsen, Jill E et al. 2016. "ZEB1 Drives Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Lung Cancer." *The Journal of clinical investigation* 126(9): 3219–35.
- Lepikhova, Tatiana et al. 2018. "Drug-Sensitivity Screening and Genomic Characterization of 45 HPV-Negative Head and Neck Carcinoma Cell Lines for Novel Biomarkers of Drug Efficacy." *Molecular cancer therapeutics* 17(9): 2060–71.
- Li, Liang et al. 2020. "UHRF2 Promotes Intestinal Tumorigenesis through Stabilization of TCF4 Mediated Wnt/ β -Catenin Signaling." *International journal of cancer* 147(8): 2239–52.
- Liu, Yang et al. 2019. "Activation of Toll-Like Receptor 3 Induces Interleukin-1 Receptor Antagonist Expression by Activating the Interferon Regulatory Factor 3." *Journal of Innate Immunity*.
- Luo, Qingqiong et al. 2012. "Activation of Toll-like Receptor 3 Induces Apoptosis of Oral Squamous Carcinoma Cells in Vitro and in Vivo." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44(8): 1266–75.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357272512001501> (April 16, 2019).
- Ma, Renqiang et al. 2013. "Inhibition of GSK 3 β Activity Is Associated with Excessive EZH2 Expression and Enhanced Tumour Invasion in Nasopharyngeal Carcinoma." *PLoS ONE* 8(7): 1–10.
- MacDonald, Bryan T, Keiko Tamai, and Xi He. 2009. "Wnt/Beta-Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases." *Developmental cell* 17(1): 9–26.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19619488> (March 6, 2020).
- Mani, Sendurai A et al. 2008. "EMT Creates Cells with the Properties of Stem Cells." *Cell* 133(4): 704–15.
- Mantovani, Alberto, Isabella Barajon, and Cecilia Garlanda. 2018. "IL-1 and IL-1 Regulatory Pathways in Cancer Progression and Therapy." *Immunological reviews* 281(1): 57–61.
2019. "IL-1 and IL-1 Regulatory Pathways in Cancer Progression and Therapy." 281(1): 57–61.
- Marur, Shanthi, and Arlene A Forastiere. 2016. "Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment." *Mayo Clinic proceedings* 91(3): 386–96. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26944243>.
- Mendelsohn, Abie H. et al. 2012. "Snail as a Novel Marker for Regional Metastasis in

- Head and Neck Squamous Cell Carcinoma.” *American Journal of Otolaryngology* 33(1): 6–13.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0196070910002516?via%3Dihub> (March 5, 2020).
- Micalizzi, Douglas S., Susan M. Farabaugh, and Heide L. Ford. 2010. “Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: Parallels between Normal Development and Tumor Progression.” *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 15(2): 117–34.
- Mondal, Subha et al. 2020. “Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) and Its Inhibitors in Cancer: A Minireview.” *European journal of medicinal chemistry* 194: 112260.
- Mouchref Hamasni, Fatme, and Fady El Hajj. 2016. “Expression of Bone Morphogenetic Protein-2 and Histological Differentiation of Oral Squamous Cell Carcinomas.” *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 17(12): 5243–45.
- Nguyen, Phong Thao; Kudo, Yasusei; Yoshida, Maki; Kamata, Nobuyuki; Ogawa, Ikuko; Takata, Takashi. 2011. “N-Cadherin Expression Is Involved in Malignant Behavior of Head and Neck Cancer in Relation to Epithelial-Mesenchymal Transition.” *Histol Histopathol* 26: 147–56.
- Nieto, M Angela. 2011. “The Ins and Outs of the Epithelial to Mesenchymal Transition in Health and Disease.” *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 27(1): 347–76. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154036>.
- O-charoenrat, Pornchai, Peter H Rhys-Evans, and Suzanne A Eccles. 2001. “Expression of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors Correlates With Invasion and Metastasis in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck.” *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery* 127(7): 813–20. <https://doi.org/10-1001/pubs.Arch Otolaryngol. Head Neck Surg.-ISSN-0886-4470-127-7-ooa00225>.
- Ota, Ichiro et al. 2016. “Snail-Induced EMT Promotes Cancer Stem Cell-like Properties in Head and Neck Cancer Cells.” *Oncology reports* 35(1): 261–66.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26498709>.
- Owyong, Mark et al. 2019. “MMP9 Modulates the Metastatic Cascade and Immune Landscape for Breast Cancer Anti-Metastatic Therapy.” *Life science alliance* 2(6).
- Paolillo, Mayra, and Sergio Schinelli. 2019. “Extracellular Matrix Alterations in Metastatic Processes.” *International journal of molecular sciences* 20(19).
- Paranjape, A. N. et al. 2016. “Inhibition of FOXC2 Restores Epithelial Phenotype and Drug Sensitivity in Prostate Cancer Cells with Stem-Cell Properties.” *Oncogene*

- 35(46): 5963–76. <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2015.498>.
- Pastushenko, Ievgenia et al. 2018. “Identification of the Tumour Transition States Occurring during EMT.” *Nature* 556(7702): 463–68. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0040-3>.
- Philip, Beatrice, Koichi Ito, Rafael Moreno-Sánchez, and Stephen J. Ralph. 2013. “HIF Expression and the Role of Hypoxic Microenvironments within Primary Tumours as Protective Sites Driving Cancer Stem Cell Renewal and Metastatic Progression.” *Carcinogenesis* 34(8): 1699–1707.
- Pimentel-Nunes, Pedro et al. 2013. “Different Toll-Like Receptor Expression Patterns in Progression toward Cancer.” *Front Immunol.* 2014; 5: 638 18(1): 22–32.
- Pries, Ralph et al. 2008. “Induction of C-Myc-Dependent Cell Proliferation through Toll-like Receptor 3 in Head and Neck Cancer.” *International journal of molecular medicine* 21(2): 209–15.
- Puisieux, Alain, Thomas Brabletz, and Julie Caramel. 2014. “Oncogenic Roles of EMT-Inducing Transcription Factors.” *Nature Cell Biology* 16(6): 488–94. <https://doi.org/10.1038/ncb2976>.
- Ramírez, Julio, and Juan D Cañete. 2018. “Anakinra for the Treatment of Rheumatoid Arthritis: A Safety Evaluation.” *Expert Opinion on Drug Safety* 17(7): 727–32. <https://doi.org/10.1080/14740338.2018.1486819>.
- Rashedi, Iran et al. 2017. “TLR3 or TLR4 Activation Enhances Mesenchymal Stromal Cell-Mediated Treg Induction via Notch Signaling.” *Stem cells (Dayton, Ohio)* 35(1): 265–75.
- Reyes, Montserrat, Daniel Peña-Oyarzun, Andrea Maturana, and Vicente A. Torres. 2019. “Nuclear Localization of β -Catenin and Expression of Target Genes Are Associated with Increased Wnt Secretion in Oral Dysplasia.” *Oral Oncology* 94: 58–67. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1368837519301551?via%3Dihub> (March 6, 2020).
- Ribatti, Domenico. 2017. “Epithelial-Mesenchymal Transition in Morphogenesis, Cancer Progression and Angiogenesis.” *Experimental Cell Research* 353(1): 1–5. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0014482717300952?via%3Dihub> (March 5, 2020).
- Rodrigues-Junior, Dorival Mendes et al. 2019. “Circulating Extracellular Vesicle-Associated TGF β 3 Modulates Response to Cytotoxic Therapy in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma.” *Carcinogenesis* 40(12): 1452–61.

- Royer, P. J. et al. 2017. "TLR3 Promotes MMP-9 Production in Primary Human Airway Epithelial Cells through Wnt/ β -Catenin Signaling." *Respiratory Research* 18(1): 1–10.
- Ruuskanen, Miia et al. 2019. "Expression of Toll-like Receptors in Non-Endemic Nasopharyngeal Carcinoma." *BMC Cancer* 19(1): 1–12.
- Sand, Jordan P et al. 2014. "BMP-2 Expression Correlates with Local Failure in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma." *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 150(2): 245–50.
- Satoh, Takashi, and Shizuo Akira. 2016. "Toll-Like Receptor Signaling and Its Inducible Proteins." *Microbiology Spectrum* 4(6): 1–7.
- Scanlon, C. S., E. A. Van Tubergen, R. C. Inglehart, and N. J. D'Silva. 2013. "Biomarkers of Epithelial-Mesenchymal Transition in Squamous Cell Carcinoma." *Journal of Dental Research* 92(2): 114–21.
- Schau, Isabell et al. 2019. "Targeted Delivery of TLR3 Agonist to Tumor Cells with Single Chain Antibody Fragment-Conjugated Nanoparticles Induces Type I-Interferon Response and Apoptosis." *Scientific reports* 9(1): 3299.
- Schulz, Lisa et al. 2018. "Inhibition of GSK3 α/β Impairs the Progression of HNSCC." *Oncotarget* 9(45): 27630–44.
- Serrano-Gomez, Silvia Juliana, Mazvita Maziveyi, and Suresh K. Alahari. 2016. "Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition through Epigenetic and Post-Translational Modifications." *Molecular Cancer* 15(1): 1–14.
<http://dx.doi.org/10.1186/s12943-016-0502-x>.
- Siegel, Rebecca L., Kimberly D. Miller, and Ahmedin Jemal. 2016. "Cancer Statistics, 2016." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 66(1): 7–30.
- Sohn, Mira et al. 2018. "Ahnak Promotes Tumor Metastasis through Transforming Growth Factor- β -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition." *Scientific Reports* 8(1): 2–11. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-32796-2>.
- Son, Hwajin, and Aree Moon. 2013. "Epithelial-Mesenchymal Transition and Cell Invasion." *Toxicological Research* 26(4): 245–52.
- Vesuna, Farhad, Paul van Diest, Ji Hshiang Chen, and Venu Raman. 2008. "Twist Is a Transcriptional Repressor of E-Cadherin Gene Expression in Breast Cancer." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 367(2): 235–41.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006291X07025752?via%3Di>

- hub (March 6, 2020).
- Veyrat, Mathieu et al. 2016. “Stimulation of the Toll-like Receptor 3 Promotes Metabolic Reprogramming in Head and Neck Carcinoma Cells.” *Oncotarget* 7(50): 82580–93.
- Vigneswaran, Nadarajah, and Michelle D. Williams. 2014. “Epidemiologic Trends in Head and Neck Cancer and Aids in Diagnosis.” *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America* 26(2): 123–41.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1042369914000028?via%3Dihub>
 (April 19, 2019).
- Wahbi, Wafa et al. 2020. “The Critical Effects of Matrices on Cultured Carcinoma Cells: Human Tumor-Derived Matrix Promotes Cell Invasive Properties.” *Experimental cell research* 389(1): 111885.
- Wangmo, Chimi et al. 2019. “Epithelial–Mesenchymal Transition Predicts Survival in Oral Squamous Cell Carcinoma.” *Pathology & Oncology Research*.
<https://doi.org/10.1007/s12253-019-00731-z>.
- Way, Tzong-Der et al. 2014. “Emodin Represses TWIST1-Induced Epithelial–Mesenchymal Transitions in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells by Inhibiting the β -Catenin and Akt Pathways.” *European Journal of Cancer* 50(2): 366–78. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2013.09.025>.
- Weng, Zhicheng et al. 2021. “Downregulation of PART1 Inhibits Proliferation and Differentiation of Hep3B Cells by Targeting Hsa-MiR-3529-3p/FOXC2 Axis.” *Journal of oncology* 2021: 7792223.
- Westin, U et al. 2002. “The Presence of Elafin, SLPI, IL1-RA and STNFalpha RI in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas and Their Relation to the Degree of Tumour Differentiation.” 11(1): 7–12.
- Wheelock, Margaret J. et al. 2008. “Cadherin Switching.” *Journal of Cell Science* 121(6): 727–35.
- von Witzleben, Adrian et al. 2020. “HNSCC: Tumour Antigens and Their Targeting by Immunotherapy.” *Cells* 9(9).
- Wu, Beibei, Steve P. Crampton, and Christopher C.W. Hughes. 2007. “Wnt Signaling Induces Matrix Metalloproteinase Expression and Regulates T Cell Transmigration.” *Immunity* 26(2): 227–39.
- Xin Ye and Robert A. Weinberg. 2015. “Epithelial-Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression.” *Trends Cell Biol.* 25(11): 675–686.
- Xu, Bixia, Yun Tian, and Lin Liu. 2020. “Meta-Analysis of the Prognostic Significance of

- FOXC2 in Various Tumors.” *The Journal of international medical research* 48(3): 300060519891648.
- Yang, Jing et al. 2004. “Twist, a Master Regulator of Morphogenesis, Plays an Essential Role in Tumor Metastasis.” *Cell* 117(7): 927–39.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15210113> (March 5, 2020).
- Yeh, Yunshin et al. 2019. “Wnt/Beta-Catenin Signaling and Prostate Cancer Therapy Resistance.” *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1210: 351–78.
- Zanoni, Daniella Karassawa et al. 2019. “Survival Outcomes after Treatment of Cancer of the Oral Cavity (1985–2015).” *Oral Oncology* 90: 115–21.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1368837519300387?via%3Dihub> (April 19, 2019).
- Zeisberg, Michael, and Eric G Neilson. 2009. “Review Series Personal Perspective Biomarkers for Epithelial-Mesenchymal Transitions.” 119(6): 1429–37.
- Zhang, Jingyu et al. 2014. “TGF- β -Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition Proceeds through Stepwise Activation of Multiple Feedback Loops.” *Science Signaling* 7(345): ra91 LP-ra91.
<http://stke.sciencemag.org/content/7/345/ra91.abstract>.
- Zhang, Mingdi et al. 2020. “Bioinformatics Analysis of Prognostic Significance of COL10A1 in Breast Cancer.” *Bioscience reports* 40(2).
- Zhang, Ping et al. 2014. “Prognostic Role of Twist or Snail in Various Carcinomas: A Systematic Review and Meta-Analysis.” *European Journal of Clinical Investigation* 44(11): 1072–94. <https://doi.org/10.1111/eci.12343>.
- Zhao, Zhi Li et al. 2016. “NOTCH1 Inhibition Enhances the Efficacy of Conventional Chemotherapeutic Agents by Targeting Head Neck Cancer Stem Cell.” *Scientific Reports* 6(October 2015): 1–12. <http://dx.doi.org/10.1038/srep24704>.
- Zhou, Jingping et al. 2015. “Expression of E-Cadherin and Vimentin in Oral Squamous Cell Carcinoma.” *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 8(3): 3150–54.
- Zhou, Yu et al. 2013. “TLR3 Activation Efficiency by High or Low Molecular Mass Poly I:C.” *Innate Immunity* 19(2): 184–92.
- Zhou, Zhijiao et al. 2015. “FOXC2 Promotes Chemoresistance in Nasopharyngeal Carcinomas via Induction of Epithelial Mesenchymal Transition.” *Cancer Letters* 363(2): 137–45. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383515002669> (April 14, 2020).

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 HNSCC-Zelllinien	9
Tabelle 2 HEK-Blue-Zelllinien	9
Tabelle 3 Zellkulturmedien und Zusätze	10
Tabelle 4 Kits.....	10
Tabelle 5 Liganden.....	11
Tabelle 6 Antikörper	11
Tabelle 7 TaqMan®-Sonden	12
Tabelle 8 Chemikalien und Reagenzien.....	14
Tabelle 9 Puffer und Lösungen	16
Tabelle 10 Verbrauchsmaterial.....	17
Tabelle 11 Geräte	19
Tabelle 12 Software	19
Tabelle 13 Reaktionsablauf der PCR	23
Tabelle 14 Reaktionskomponenten der PCR.....	24
Tabelle 15 Reaktionskomponenten des RT2 Profiler PCR Array.....	25
Tabelle 16 Reaktionsablauf der RT-qPCR	25
Tabelle 17 Komponenten der Polyacrylamidgele	28

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Darstellung der drei Typen der EMT	4
Abbildung 2 Ablauf der EMT.	5
Abbildung 3 Eigenschaften von Epithelzellen und Mesenchymzellen.....	5
Abbildung 4 Schematischer Aufbau eines Western Blot.....	29
Abbildung 5 Genexpression in Primärtumor- und Metastasenzelllinie, Übersichtsdarstellung.....	32
Abbildung 6 Genexpression in Primärtumor- und Metastasenzelllinie in nativem Zustand I	33
Abbildung 7 Genexpression in Primärtumor- und Metastasenzelllinie in nativem Zustand II	35
Abbildung 8 Genexpression in Primärtumor- und Metastasenzelllinie nach TLR3- Stimulation I.....	37
Abbildung 9 Genexpression in Primärtumor- und Metastasenzelllinie nach TLR3- Stimulation II.....	38
Abbildung 10 Einfluss von TLR3-Stimulation und -Inhibition auf UT-SCC 60A.....	40
Abbildung 11 Proteindetektion von MMP9 mittels Western Blot	44
Abbildung 12 Proteindetektion von BMP2 mittels Western Blot.....	45
Abbildung 13 Proteindetektion von IL1RA mittels Western Blot	47
Abbildung 14 Proteinintensitäten von MMP9 in HEK-Blue™ -Zellen.....	49
Abbildung 15 Proteinintensitäten von BMP2 in HEK-Blue™ -Zellen	50
Abbildung 16 Proteinintensitäten von IL1RA in HEK-Blue™ -Zellen	51

10. Abkürzungsverzeichnis

<u>Abkürzung</u>	<u>Bedeutung</u>
ACT	Aktin
AKT1	Proteinkinase B
APS	Ammoniumperoxidsulfat
BMP	Bone morphogenetic protein
BSA	Bovines Serumalbumin
Bspw.	beispielsweise
CDH1	E-Cadherin
CHD2	N-Cadherin
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cDNA	Komplementäre DNA
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA/DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMT	Epithelial-Mesenchymale Transition
FGFBP1	Fibroblast Growth Factor Binding Protein 1
FN	Fibronektin
FRET	Förster Resonanz-Energie-Transfer
FOXC2	Forkhead Box Protein 2
GSK3 β	Glykogensynthasekinase 3 beta
HEK	Human Embryonic Kidney
HMW	High Molecular Weight
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma
HPV	Humane Papillomviren
IL1	Interleukin 1
IL1RA	Interleukin-1 Rezeptor Antagonist
ILK	Integrin Linked Kinase
IRF3	Interferon Regulatory Factor 3

ITGAV	Integrin Subunit Alpha V
ITGB2	Integrin Subunit Beta 2
KRT14	Keratin 14
LMW	Low Molecular Weight
MAP1B	Microtubule Associated Protein 1B
MET	Mesenchymal-Epitheliale Transition
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MMP 3	Matrix-Metallopeptidase 3
MMP 9	Matrix-Metallopeptidase 9
mRNA	messenger RNA
MyD88	Myeloid-dfferentiation primary response 88 (Name eines Signalwegs)
n	Anzahl
nm	Nanometer
NOTCH1	Notch homolog 1
NF- κ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
OSCC	Oral squamous cell carcinoma
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	potentia hydrogenii
PLEK2	Pleckstrin 2
pMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Poly(I:C)	Polyinosinic:polypeptidylic acid
PTP4A	Protein Tyrosine Phosphatase 4A
RIPA	Radioimmunopräzipitationsassay
RNA/RNS	Ribonukleinsäure
RT-qPCR	Real Time quantitative Polymerasekettenreaktion
SDS	Sodium dodecylsulfate
SDS-Page	Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel elektrophoresis
SPARC1	Secreted protein acidic and cysteine rich 1
STEAP1	Metalloreductase STEAP1
TAE	Tris-Acetat-EDTA

TBK1	TANK-binding kinase 1
TBS	Tris-buffered saline
TBS-T	Tris-buffered saline with Tween 20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF- β	Transformin Growth Factor Beta
TCF4	T-cell Factor 4
TIMP1	Tissue inhibitor of metalloproteinases 1
TLR	Toll-Like-Rezeptor
TMEM132A	Transmembrane Protein 132A
TNM	Tumor, Nodus (Lymphknoten), Metastase
TRIF	TIR-domain-containing-adapter-inducing interferon- β
TWIST1	Twist-homolog 1
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
UT-SCC	University of Turku-squamous cell-carcinoma
VIM	Vimentin
Wnt	Wingless Int
ZEB	Zinc-finger E-box-binding homeobox 1

11. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, ohne deren Unterstützung und Rückhalt diese Arbeit nie zustande gekommen wäre.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Ralph Pries für die ständige Unterstützung, das Lektorat und die hervorragende Betreuung. Die schnellen und kompetenten Antworten auf alle Fragen sowie die durchweg motivierenden Worte haben mir sehr geholfen und dafür gesorgt, dass ich mich allzeit sehr gut aufgehoben gefühlt habe.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. Samer Hakim für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Außerdem möchte ich mich bei der Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde des UKSH Lübeck und besonders bei PD Dr. Karl-Ludwig Bruchhage für die Bereitstellung des Materials und des Arbeitsplatzes sowie der Ermöglichung der Fertigstellung dieser Arbeit unter seiner Leitung bedanken.

Frau Maren Drenckhan, Frau Kirstin Plötze-Martin und Frau Brigitte Wollmann möchte ich für die praktische Hilfe, die vielen Erklärungen sowie die herzliche Atmosphäre im Labor danken.

Herrn Dr. med. Jannik Prasuhn danke ich für die herzlichen und fachlich kompetenten Ratschläge und Anmerkungen.

Mein Dank gilt zudem meiner Familie und ganz besonders meinen Eltern, die mir meinen Lebensweg ermöglichten und denen ich diese Arbeit widme.

Ich danke meinem Ehemann Florian Fedrau-Hell für die uneingeschränkte und liebevolle Unterstützung während des Studiums und der Anfertigung dieser Arbeit.

12. Lebenslauf

Name Henrieke Hell

Ausbildung

10/2010 – 05/2017	Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck mit Erlangung der Approbation als Ärztin
09/2012	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2013	Studium der Humanmedizin an der Universität Bergen, Norwegen (Erasmus)
04/2016	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
05/2017	3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Promotion und beruflicher Werdegang

05/2014- 01/2023	Promotion zum Thema „Einfluss von TLR3 auf die EMT in HNSCC“ in der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde am UKSH Lübeck
01/2016	Vortrag auf dem 6. Symposium zur experimentellen und klinischen Forschung in der Kopf-Hals-Onkologie in Lübeck, Titel: TLR3 mediated EMT-alterations in HNSCC
05/2016	Poster und Vortrag zum Dissertationsthema auf der Deutschen Jahrestagung für HNO-Heilkunde in Düsseldorf, Titel: TLR3-vermittelte EMT-Alteration in HNSCC
09/2017- 04/2020	Ärztin in Weiterbildung im Klinikum Itzehoe, Neurologie
05/2020-04/2021	Ärztin in Weiterbildung im Rotationsjahr Psychiatrie, ZIP Lübeck
Seit 06/2021	Ärztin in Weiterbildung im Klinikum Itzehoe, Neurologie