

Aus der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
der Universität zu Lübeck

Direktorin: Prof. Dr. med. Barbara Wollenberg

**Die Rolle der Glykogen-Synthase-Kinase 3
in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

– Aus der Sektion Medizin –

vorgelegt von

Lisa Schulz

aus Eisenhüttenstadt

Lübeck 2017

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Barbara Wollenberg

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Frank Gieseler

Tag der mündlichen Prüfung: 9.10.2017

Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 9.10.2017

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches.....	1
1.1.1 Ätiologie und Pathogenese	2
1.1.2 Tumorklassifikation und Stadieneinteilung	3
1.1.3 Therapie und Prognose.....	4
1.2 Epitheliale-Mesenchymale Transition.....	5
1.2.1 Wnt/ β -Catenin-Signalweg.....	7
1.3 Glykogen-Synthase-Kinase 3.....	9
1.3.1 Isoformen	9
1.3.2 Regulierung der Enzymaktivität.....	10
1.3.3 Rolle von GSK3 in malignen Erkrankungen	11
1.3.4 Experimentelle Inhibierung von GSK3.....	12
1.4 Ziele der Arbeit.....	14
2 Material und Methoden.....	15
2.1 Material	15
2.1.1 Verbrauchsmaterialien	15
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien	16
2.1.3 Geräte und Apparaturen.....	18
2.1.4 Kommerziell erwerbbar Kits	19
2.1.5 Puffer und Lösungen.....	20
2.1.6 Antikörper.....	21

2.1.7	Oligonukleotide	22
2.1.8	Humane HNSCC-Zelllinien.....	22
2.1.9	Gewebeproben.....	23
2.1.10	Software	24
2.2	Methoden	25
2.2.1	Zellkulturarbeiten.....	25
2.2.1.1	Kultivierung von HNSCC-Zelllinien	25
2.2.1.2	Zellzahlbestimmung	25
2.2.1.3	Behandlung der Zellen.....	26
2.2.2	Biochemische und zellanalytische Methoden.....	27
2.2.2.1	Western-Blot-Analyse	27
2.2.2.2	MTT-Assay.....	29
2.2.2.3	Real-Time Cell Analysis (RTCA)-Assay	30
2.2.2.4	Wundheilungsassay.....	31
2.2.3	Immunhistochemische Methoden.....	31
2.2.3.1	Labelled-Streptavidin-Biotin-Methode (LSAB-Methode).....	31
2.2.4	Molekularbiologische Methoden.....	33
2.2.4.1	RNA-Isolierung mit DNase-Verdau	33
2.2.4.2	Spektralphotometrische Messung der Nukleinsäurekonzentration	34
2.2.4.3	cDNA-Synthese	34
2.2.4.4	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	35
2.2.4.5	Agarose-Gelelektrophorese	36
2.2.4.6	Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR).....	37
2.2.5	Statistische Auswertung.....	39

3	Ergebnisse.....	40
3.1	Charakterisierung von GSK3 α/β in HNSCC	40
3.1.1	Proteinexpression und Phosphorylierungsstatus von GSK3 α/β in HNSCC-Gewebeproben.....	40
3.1.2	Immunhistochemischer Nachweis von pGSK3 α/β (Ser21/9) und pGSK3 α/β (Tyr279/216) in HNSCC-Primärtumoren und Metastasen	42
3.1.3	Proteinexpression und Phosphorylierungsstatus von GSK3 α/β in permanenten HNSCC-Zelllinien	45
3.1.4	Analyse der subzellulären Lokalisation von pGSK3 α/β (Tyr279/216) und pGSK3 α/β (Ser21/9) in permanenten HNSCC-Zelllinien.....	47
3.2	Einfluss von SB 216763 auf permanente HNSCC-Zelllinien	48
3.2.1	Einfluss von SB 216763 auf das β -Catenin-Level	48
3.2.2	Einfluss von SB 216763 auf den Phosphorylierungsstatus von GSK3 α/β	50
3.2.3	Einfluss von SB 216763 auf die Viabilität von HNSCC-Zelllinien	51
3.2.4	Einfluss von SB 216763 auf die Expression von EMT-Markern	52
3.2.5	Einfluss von SB 216763 auf die Migration von HNSCC-Zelllinien	55
4	Diskussion	59
4.1	Proteinexpression und Phosphorylierungsstatus von GSK3 α/β in HNSCC.....	60
4.2	Einfluss von SB 216763 auf permanente HNSCC-Zelllinien	63
4.2.1	Einfluss von SB 216763 auf die Viabilität von HNSCC-Zelllinien	64
4.2.2	Einfluss von SB 216763 auf die Expression von EMT-Markern und die Migration von HNSCC-Zelllinien.....	66
4.3	Schlussbetrachtung und Ausblick.....	69
5	Zusammenfassung	71
6	Literaturverzeichnis.....	72

7	Anhang	84
7.1	TNM-Klassifikation	84
8	Danksagung	87
9	Lebenslauf	88

Abkürzungsverzeichnis

Auf die Erläuterung von SI-Einheiten und allgemein gebräuchlichen Abkürzungen wurde verzichtet.

Δ	Delta
A.	Arteria
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
APC	adenomatous polyposis coli
APS	Ammoniumperoxodisulfat
α -SMA	α -smooth muscle actin
ATP	Adenosintriphosphat
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
Bim	Bcl-2 interacting mediator of cell death
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
β -TrCP	β -transducin repeat-containing protein
CCND1	Cyclin D1
cDNA	komplementäre DNA
CKI	casein kinase 1
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CREB	cAMP response element binding protein
C _T	cycle treshold
DEPC	Diethyldicarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DR4/5	death receptor 4/5

EBV	Epstein-Barr-Virus
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEA1	early endosome antigen 1
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
EMT	Epitheliale-Mesenchymale Transition
FKS	fetales Kälberserum
Frat1	frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas 1
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GSK3	Glykogen-Synthase-Kinase 3
HCl	Chlorwasserstoff
HNSCC	head and neck squamous cell carcinoma
HPV	Humane Papillomaviren
HSF1	heat shock factor 1
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LRP5/6	low-density lipoprotein receptor-related protein
LSAB	Labelled-Streptavidin-Biotin
M.	Musculus
MAPK/ERK	mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinases
MET	Mesenchymale-Epitheliale Transition
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MMTV	Maus-Mammatumorvirus
mRNA	messenger RNA
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
n	Versuchsanzahl
N.	Nervus
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NFAT	nuclear factor of activated T-cells

NF- κ B	nuclear factor ,kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
O ₂	Sauerstoff
OD	Optische Dichte
p	Signifikanzwert
p70S6K	p90 ribosomal S6 kinase
p90RSK	p70 ribosomal S6 kinase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	platelet derived growth factor
PFA	Paraformaldehyd
pGSK3 α/β	GSK3 α/β , phosphoryliert
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Proc.	Processus
PTEN	phosphatase and tensin homolog
PYK2	proline rich tyrosine kinase 2
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
Rab 5/7/11	Ras-related protein 5/7/11
RIPA	radioimmunoprecipitation assay
RNA	Ribonukleinsäure
RTCA	Real-Time Cell Analysis
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCF/LEF	T-cell factor/lymphoid enhancer factor
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- β	transforming growth factor- β
Thr	Threonin

TNM	Tumor-Nodes-Metastasis
TP53	Tumorprotein 53
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
Tyr	Tyrosin
UICC	Union internationale contre le cancer
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenprozent
w/v	Massenprozent
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein
ZEB1/2	zinc finger E-Box binding homeobox

1 Einleitung

Maligne Tumorerkrankungen sind durch unkontrolliertes und invasives Zellwachstum gekennzeichnet. In Deutschland stellen sie die zweithäufigste Todesursache nach Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems dar¹. Die molekularen Grundlagen maligner Tumorerkrankungen sind bis heute nicht vollständig verstanden und werden weiterhin intensiv erforscht. Bisher wird angenommen, dass die maligne Transformation einer Zelle ein mehrstufiger Prozess ist, für den mehrere genetische und epigenetische Veränderungen notwendig sind². Diese Veränderungen können vererbt oder durch exogene Faktoren erworben werden und führen beispielsweise zur Aktivierung von Onkogenen (z. B. Wachstumsfaktoren und Wachstumsfaktorrezeptoren) oder Hemmung von Tumorsuppressorgenen (z. B. Zellzyklus- und Apoptose-regulierende Gene)². Durch zunehmende genomische Instabilität kommt es zur Akkumulation genetischer Alterationen und letztlich zur Entartung von Zellen³. Im Laufe dieses Prozesses erwerben die Zellen Eigenschaften, die ihr Überleben sowie ungehinderte Proliferation und Dissemination ermöglichen. Maligne Zellen sind im Gegensatz zu normalen Zellen unabhängig von exogenen Wachstumssignalen und unempfindlich gegenüber wachstumshemmenden Stimuli. Sie können apoptotischen Signalen entgehen, besitzen unbegrenztes Replikationspotenzial und zeichnen sich durch die anhaltende Neubildung versorgender Gefäße aus. Die Invasion in umliegende Gewebe und Metastasierung in entfernte Gewebe sind weitere Charakteristika maligner Zellen⁴. Außerdem besitzen sie die Fähigkeit, den zellulären Metabolismus zu Gunsten einer neoplastischen Proliferation zu verändern und der Zerstörung durch Zellen des Immunsystems zu entgehen⁵.

1.1 Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches

Maligne epitheliale Tumore der Mundhöhle, der Nasenhaupt- und Nasennebenhöhlen, des Pharynx (Naso-, Oro- und Hypopharynx) sowie des Larynx werden unter dem Begriff „Kopf-Hals-Karzinome“ zusammengefasst. Histologisch handelt es sich dabei in über 90 % der Fälle um Plattenepithelkarzinome (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC). Nach Daten des GLOBOCAN-Projektes machten Kopf-Hals-Karzinome im Jahr 2012 mit über 680.000 Neuerkrankungen 4,8 % aller erfassten malignen Erkrankungen aus. Die höchsten Inzidenzen zeigten Melanesien, Süd-Zentral-Asien, Süd-Ost-Asien sowie Zentral- und Osteuropa⁶. In Deutschland liegt die altersstandardisierte

Inzidenz bei 13,3/100.000 Einwohner, wobei die Inzidenz ab dem 50. Lebensjahr deutlich zunimmt und Männer häufiger betroffen sind als Frauen^{6,7,8,9}.

1.1.1 Ätiologie und Pathogenese

Bisher wurden zahlreiche Risikofaktoren für Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches identifiziert. Zu den am besten untersuchten und allgemein anerkannten Risikofaktoren zählen exzessiver Tabak- und Alkoholkonsum¹⁰. Es wird angenommen, dass drei Viertel der HNSCC durch diese Noxen verursacht werden^{10,11}. Das Risiko an einem HNSCC zu erkranken ist dosisabhängig und bei starken Rauchern 21-fach, bei häufigem Alkoholkonsum 5-fach erhöht. Durch den Konsum beider Noxen ergibt sich ein multiplikativer Effekt mit einem bis zu 48-fach erhöhtem Risiko^{10,12}. Außerdem können genetische Faktoren, beispielsweise Polymorphismen der ethanolabbauenden Enzyme, die Erkrankungswahrscheinlichkeit zusätzlich beeinflussen^{13–15}. Weitere Risikofaktoren stellen das in großen Teilen Asiens verbreitete Kauen von Betelnüssen¹⁶, inhalative Noxen¹⁷ und virale Infektionen dar. So kann in 25 % der HNSCC die DNA humaner Papillomaviren (HPV) nachgewiesen werden^{18,19}. Hauptsächlich handelt es sich dabei um Oropharynxkarzinome, die durch Infektionen mit den „high-risk“ HPV-Typen 16 und 18 hervorgerufen werden²⁰. Infektionen mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) gelten als Risikofaktor für die Entstehung von Nasopharynxkarzinomen²¹.

Ist die Schleimhaut des oberen Aerodigestivtraktes den genannten Karzinogenen über lange Zeit ausgesetzt, so kommt es in den Epithelzellen schrittweise zu genetischen und chromosomalen Veränderungen. Hierzu zählen unter anderem Mutationen und Heterozygotie-Verluste der Tumorsuppressorgene *P16*, *TP53* (tumor protein 53) und *PTEN* (phosphatase and tensin homolog) oder Amplifikationen des Gens *CCND1*, welches das Zellzyklusregulatorprotein Cyclin D1 codiert. Auch mikroskopisch ist eine schrittweise Veränderung des Gewebes sichtbar. Aus dem gesunden Epithel entwickelt sich zunächst hyperplastisches und später dysplastisches Epithel. Anschließend erfolgt der Übergang in ein Carcinoma in situ und schließlich in ein invasives, die Basalmembran überschreitendes und die Umgebung infiltrierendes Plattenepithelkarzinom (Abbildung 1).

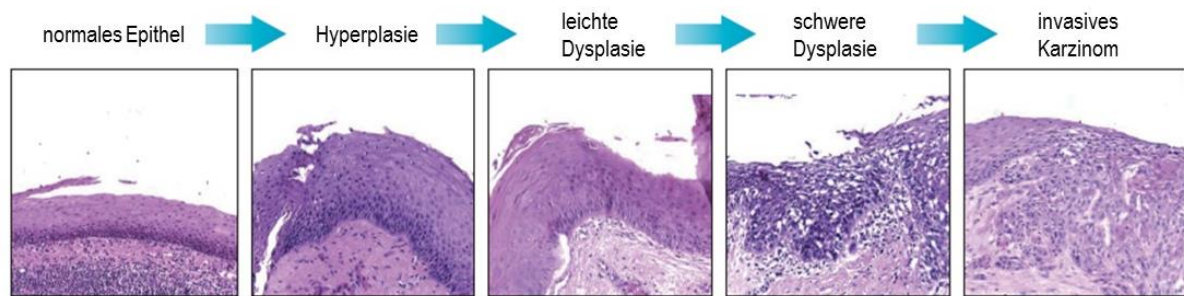


Abbildung 1: Histologische Darstellung der mehrschrittigen HNSCC-Karzinogenese. Entwicklung vom gesunden Epithel bis zum Plattenepithelkarzinom. Verändert nach Argiris *et al.*³.

1.1.2 Tumorklassifikation und Stadieneinteilung

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches werden nach der international anerkannten Tumor-Nodes-Metastasis (TNM)-Klassifikation der UICC (Union internationale contre le cancer) klassifiziert. Die TNM-Klassifikation beinhaltet Angaben über die Ausdehnung des Primärtumors (T0 bis T4) sowie das Fehlen oder Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen (N0 bis N3) und Fernmetastasen (M0, M1). Bei Diagnosestellung erfolgt zunächst eine klinische Klassifikation (cTNM). Sie beruht auf den Befunden klinischer sowie apparativer Untersuchungen und kann durch die histopathologische Aufarbeitung (pTNM) ergänzt und gesichert werden. Die T- und N-Klassifikationskriterien für Karzinome der Mundhöhle/Lippe sowie Pharynx- und Larynxkarzinome sind in Abschnitt 7.1 aufgelistet. Anhand der vollständigen TNM-Klassifikation erfolgt die Einteilung in die prognostisch bedeutsamen UICC-Stadien (Tabelle 1).

Tabelle 1: UICC-Stadieneinteilung für Kopf-Hals-Karzinome²². Die Einteilung gilt nicht für Karzinome des Nasopharynx und der Speicheldrüsen.

Stadium	Primärtumor (T)	Lymphknotenmetastasen (N)	Fernmetastasen (M)	
I	T1	N0	M0	frühe Stadien
II	T2	N0	M0	
III	T3	N0-N1	M0	lokal fortgeschrittene Stadien
	T1-T2	N1	M0	
IVa	T1-T3	N2	M0	
	T4a	N0-N2	M0	
IVb	T4b	jedes N	M0	metastatisches Stadium
	jedes T	N3	M0	
IVc	jedes T	jedes N	M1	

Die histopathologische Untersuchung ermöglicht auch Aussagen über den Malignitätsgrad des Gewebes. Der sogenannte Differenzierungsgrad gibt an, wie stark das maligne Gewebe dem Ursprungsgewebe ähnelt. Es werden vier Differenzierungsgrade unterschieden, wobei gut differenzierte Tumore eine bessere Prognose aufweisen als schlecht oder undifferenzierte Tumore (Tabelle 2).

Tabelle 2: Differenzierungsgrade²².

Differenzierungsgrad	Beschreibung
GX	Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden
G1	gut differenziertes Gewebe
G2	mäßig differenziertes Gewebe
G3	schlecht differenziertes Gewebe
G4	undifferenziertes Gewebe

1.1.3 Therapie und Prognose

Die Therapie von HNSCC erfolgt lokalisations- und stadienabhängig unter Berücksichtigung des Allgemeinzustandes. Der Erhalt der Organfunktion ist dabei ein vorrangiges Therapieziel. Neben operativen und laserchirurgischen Maßnahmen stehen strahlen- und chemotherapeutische Therapieverfahren zur Auswahl. Die vollständige chirurgische Entfernung des Primärtumors stellt bei kurativer Zielsetzung die wichtigste Therapieform dar. Bei ausgedehntem Tumorbefall ist eine operative Therapie aufgrund der engen anatomischen Verhältnisse und begrenzten Rekonstruktionsmöglichkeiten jedoch häufig nur bedingt möglich. Aus diesem Grund werden in den meisten Fällen multimodale Therapieansätze gewählt. Zunehmend werden auch zielgerichtete Therapien (targeted therapies), beispielsweise der monoklonale EGFR-Antikörper Cetuximab, eingesetzt.

Trotz stetig verbesserter Therapiemöglichkeiten blieben die Mortalitätsraten von HNSCC-Patienten bis heute nahezu unverändert^{23,24}. Ein wesentlicher Grund hierfür ist das späte Auftreten von Symptomen wie Heiserkeit oder Schluckbeschwerden. Eine Vorstellung beim Arzt erfolgt deshalb oft erst im lokal fortgeschrittenen Stadium²⁵. Dies ist fatal, da die 5-Jahres-Überlebensrate mit Zunahme des Tumorstadiums drastisch sinkt. Sie beträgt 82 % im Frühstadium, 52 % im lokal fortgeschrittenen Stadium und nur 27 % im metastasierten Stadium²⁵. Insbesondere Lymphknotenmetastasen gelten als negativer prognostischer Faktor. Mit dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen und der Zunahme des T-Stadiums steigt die Rezidivwahrscheinlichkeit deutlich²⁶. Etwa 50 % der

Patienten mit lokal fortgeschrittenen Tumoren entwickeln innerhalb von zwei Jahren lokoregionäre Rezidive³. Aus diesem Grund stellen die molekularen Mechanismen der lokoregionären Metastasierung einen Schwerpunkt der HNSCC-Forschung dar.

1.2 Epitheliale-Mesenchymale Transition

Ein Prozess, der mit der Migration, Invasion und Metastasierung maligner Zellen in Verbindung gebracht wird, ist die Epitheliale-Mesenchymale Transition (EMT). Die EMT ist ein reversibler biologischer Vorgang, bei dem Epithelzellen ihre epithelialen Eigenschaften verlieren und einen mesenchymalen Phänotyp annehmen. Der Transitionsprozess ist sehr komplex und basiert auf einem Zusammenspiel verschiedener molekularer und zellulärer Veränderungen. Charakteristisch sind der Zellpolaritätsverlust, der Abbau von Zell-Zell-Kontakten und der extrazellulären Matrix sowie die Reorganisation des Zytoskeletts²⁷. Dabei nehmen die Epithelzellen eine fibroblastenähnliche Morphologie an, werden beweglich und lösen sich aus dem Zellverband²⁷. Der Umkehrprozess, bei dem mesenchymale Zellen erneut epitheliale Eigenschaften annehmen, wird als Mesenchymale-Epitheliale Transition (MET) bezeichnet. EMT kann sowohl im Rahmen physiologischer als auch pathologischer Prozesse auftreten. Generell werden drei funktionelle EMT-Typen unterschieden^{27,28}. Bei Typ 1 handelt es sich um EMT-Prozesse, die während der Embryonalentwicklung stattfinden. Der entzündungsassoziierte Typ 2 spielt vor allem bei der Wundheilung und Geweberegeneration eine Rolle und kann bei chronischen Entzündungsprozessen zur Fibrose des Gewebes führen. Typ 3 ist bei der Progression, Invasion und Metastasierung von Karzinomen von Bedeutung. Durchlaufen Karzinomzellen eine EMT, so erlangen sie zusätzliche invasive Eigenschaften und die Invasions-Metastasierungskaskade wird ausgelöst. Die Tumorzellen können die Basalmembran durchbrechen und erhalten Anschluss an Blut- und Lymphgefäße (Intravasation). Anschließend zirkulieren sie im Gefäßsystem, haften am Endothel von Kapillaren an (Arretierung) und treten aus der Zirkulation aus (Extravasation). Unter optimalen Bedingungen können dann in fremdem Gewebe zunächst Mikro- und später Makrometastasen gebildet werden, wofür wiederum eine MET stattfinden muss^{27,29}. Neben einem erhöhten Migrations- und Invasionspotenzial zeigen die Zellen auch verstärkte Resistenz gegen Apoptose³⁰.

Für die Analyse des Transitionsprozesses werden Biomarker eingesetzt, die dem epithelialen oder mesenchymalen Phänotyp zugeordnet werden können (Abbildung 2). Hierzu zählen verschiedene Zelloberflächen- und Zytoskelettproteine, Proteine der extrazellulären Matrix sowie Transkriptionsfaktoren.

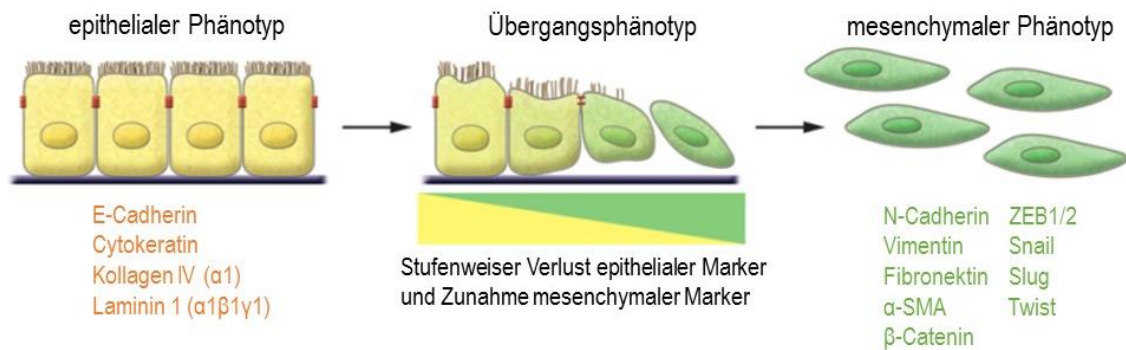


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Epithelialen-Mesenchymalen Transition mit Übergang vom epithelialen zum mesenchymalen Phänotyp und der zugehörigen Marker. Verändert nach Kalluri und Weinberg²⁷.

Eine besondere Rolle spielt das Zelloberflächenprotein E-Cadherin, welches in epithelialen Zellen exprimiert wird und für die Bildung und Stabilisierung von Zell-Zell-Kontakten zuständig ist³¹. E-Cadherin bildet außerdem einen Komplex mit α - und β -Catenin, der durch Verbindung zum Aktingerüst die Zellpolarität aufrechterhält³². Charakteristisch für die EMT ist eine verminderte Expression von E-Cadherin. Dadurch werden Zell-Zell-Kontakte gelöst, die Zellpolarität nimmt ab und ungebundenes β -Catenin transloziert in den Nukleus, wo es die Expression diverser Gene reguliert und EMT fördert (Abschnitt 1.2.1)^{33,34,35}. Neben Mutationen und epigenetischen Veränderungen (z. B. Promotorhypermethylierung) wird die Expression von E-Cadherin vor allem durch die Transkriptionsfaktoren Snail, Slug, Twist, ZEB1 und ZEB2 (zinc finger E-box binding homeobox) beeinflusst^{31,36}. Diese Transkriptionsfaktoren induzieren EMT, indem sie die Expression von E-Cadherin reprimieren und gleichzeitig die Expression mesenchymaler Marker wie N-Cadherin und Fibronectin erhöhen^{28,37}. Der sogenannte „Cadherin-Switch“ von E-Cadherin zu N-Cadherin stellt ein bedeutendes Ereignis während der EMT dar. Der Verlust von E-Cadherin und die verstärkte Expression von N-Cadherin sind bei vielen Tumorentitäten, unter anderem HNSCC, mit verstärkter Mobilität der Zellen, Invasion und Metastasierung sowie schlechter Prognose assoziiert³⁸⁻⁴⁶. Weitere typische Veränderungen während der EMT sind die Degradierung der für Epithelzellen typischen Cytokeratine und die verstärkte Expression des Intermediärfilaments Vimentin sowie des Aktinfilaments α -SMA (mesenchymale Marker). Im Bereich der extrazellulären Matrix kann neben einer verstärkten Fibronectin-Expression auch der Abbau von Kollagen IV ($\alpha 1$) und Laminin 1 ($\alpha 1\beta 1\gamma 1$) (epitheliale Marker) beobachtet werden^{27,28}. Bei Zungenkarzinomen korrelierte der Verlust epithelialer Marker mit der Bildung von Tumorsatelliten und deren Größe. Mit der Zunahme mesenchymaler Marker stieg die Entfernung der Satelliten vom Primärtumor⁴⁷.

Es sind mehrere Signalwege bekannt, durch die eine EMT induziert werden kann. Hierzu zählen Signalwege, an denen die Wachstumsfaktoren TGF- β (transforming growth factor- β), PDGF (platelet derived growth factor) und EGF (epidermal growth factor) beteiligt sind²⁷. Auch durch Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs, welcher im folgenden Abschnitt genauer beschrieben werden soll, kann eine EMT ausgelöst werden.

1.2.1 Wnt/ β -Catenin-Signalweg

Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg ist einer von drei Signalwegen, über die Wnt-Proteine Zellwachstum, -differenzierung und -tod beeinflussen⁴⁸. Wnt-Proteine sind cysteinreiche, glykosylierte Proteine, die sezerniert werden. Durch Bindung der Proteine an Rezeptoren auf der Zelloberfläche und die nachfolgende Signalkaskade wird die Expression verschiedener Zielgene moduliert (Abbildung 3).

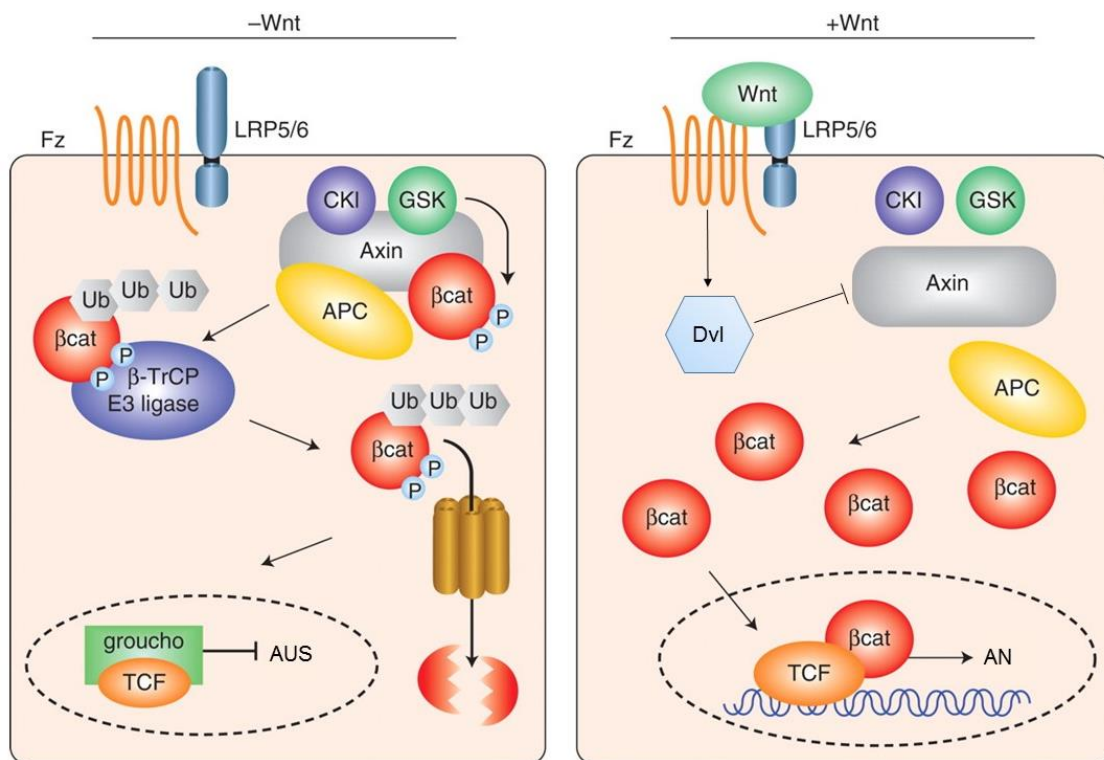


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs. GSK = Glykogen-Synthase-Kinase 3, β cat = β -Catenin, Ub = Ubiquitin, Fz = Frizzled, Dvl = Dishevelled, P = Phosphorylgruppe. Übrige Abkürzungen und Details siehe Text. Verändert nach Cadigan und Peifer⁴⁹.

Zentraler Bestandteil des Signalwegs ist das Protein β -Catenin, welches als Transkriptionsaktivator fungiert. In unstimulierten Zellen wird β -Catenin stetig durch einen Komplex aus mehreren Proteinen phosphoryliert und für den Abbau im Proteasom vorbereitet. Dadurch wird seine Konzentration in der Zelle gering gehalten und die Expression der Wnt-Zielgene verhindert. Das wichtigste Protein des

Abbaufunktion ist die Serin-/Threoninkinase Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3). Darüber hinaus sind die Proteinkinase CKI (casein kinase 1), die Tumorsuppressorproteine APC (adenomatous polyposis coli) und Axin sowie β -TrCP (β -transducin repeat-containing protein) Teil des Komplexes⁵⁰. Axin fungiert als Gerüstprotein des Abbaufunktion und gewährleistet dessen Stabilität sowie die räumliche Nähe der Proteine zueinander. Nach Präphosphorylierung durch CKI, überträgt GSK3 Phosphorylgruppen auf die Aminosäurereste Ser33, Ser37 und Thr41 am N-terminalen Ende von β -Catenin. Die Phosphorylierung durch GSK3 führt zu einer Interaktion von β -Catenin mit β -TrCP, welches die Ubiquitinierung und den anschließenden Abbau von β -Catenin im Proteasom vermittelt^{51,52}.

Binden nun Wnt-Liganden an Rezeptoren der Frizzled-Familie und die Ko-Rezeptoren LRP5/6 (low-density lipoprotein receptor-related protein)⁵³, so wird das zyttoplasmatische Phosphoprotein Dishevelled aktiviert. Es vermittelt die Bindung von Frat1 (frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas 1) an GSK3, wodurch die Kinase inhibiert wird. Außerdem bindet Dishevelled Axin und destabilisiert so den Abbaufunktion^{54,55}. Schließlich kommt es zur Akkumulation von unphosphoryliertem β -Catenin im Zytoplasma. Unphosphoryliertes β -Catenin wird auch als aktives β -Catenin bezeichnet, da es in den Zellkern transloziert, dort an DNA-gebundene Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie (T-cell factor/lymphoid enhancer factor) bindet und die Interaktion dieser Transkriptionsfaktoren mit dem Transkriptionsrepressor Groucho löst⁵⁶. Anschließend aktivieren β -Catenin und TCF/LEF die Transkription verschiedener Gene, unter anderem der EMT-induzierenden Faktoren Snail und Twist^{28,57}. Da zu den Zielgenen des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs auch Gene gehören, die den Zellzyklus sowie die Zellproliferation und -differenzierung regulieren (z.B. *CCND1* und *c-Myc*), spielt er eine große Rolle in der physiologischen Embryonalentwicklung. Auf der anderen Seite kann eine verstärkte Aktivierung des Signalwegs, welche mit verminderter Aktivität der Proteinkinase GSK3 und erhöhter nukleärer β -Catenin-Konzentration einhergeht, zur Entstehung und Progression maligner Erkrankungen beitragen.

1.3 Glykogen-Synthase-Kinase 3

Die Serin-/Threoninkinase Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3) ist in den letzten Jahren nicht nur aufgrund ihrer Funktion im Wnt/ β -Catenin-Signalweg in den Fokus der Forschung gerückt. Die Kinase phosphoryliert neben β -Catenin mehr als 40 weitere Proteine bzw. Enzyme und reguliert dadurch deren Stabilität, Abbau und subzelluläre Lokalisation. In der Regel führt die Phosphorylierung durch GSK3 dabei zur Inaktivierung oder zum Abbau der Substrate. Da das Spektrum der GSK3-Substrate neben Strukturproteinen, metabolischen Proteinen und Signalproteinen auch Transkriptionsfaktoren und Zellzyklusregulatoren wie c-Jun⁵⁸, c-Myc⁵⁹, HSF 1 (heat shock factor 1)⁶⁰, CREB (cAMP response element binding protein)⁶¹, NFAT (nuclear factor of activated T-cells)⁶², NF- κ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells)⁶³, p53⁶⁴, Snail⁶⁵ und Cyclin D1⁶⁶ umfasst, hat die Kinase direkten und indirekten Einfluss auf Zellmetabolismus, Zellproliferation und -differenzierung, Regulation des Zellzyklus und Apoptose⁶⁷. Darüber hinaus ist GSK3 auch an der Regulation des MAPK/ERK (mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases)-Signalwegs sowie des PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase)/Akt-Signalwegs beteiligt. Damit stellt die Kinase insbesondere in Hinblick auf die Erforschung maligner Erkrankungen einen interessanten Forschungsgegenstand dar.

1.3.1 Isoformen

GSK3 kommt in allen Eukaryoten vor und wird ubiquitär exprimiert⁶⁸. Bei Säugetieren existieren zwei GSK3-Isoformen, die durch unterschiedliche Gene codiert werden – GSK3 α und GSK3 β . Ihre Aminosäuresequenzen stimmen zu 85 %, im Bereich der Kinasedomäne sogar zu 98 %, überein⁶⁸. GSK3 α besitzt am N-terminalen Ende eine zusätzliche glycinreiche Sequenz, welche für das höhere Molekulargewicht von 51 kDa (GSK3 β : 47 kDa) verantwortlich ist⁶⁸. Die Expressionsmuster der Isoformen variieren von Gewebe zu Gewebe⁶⁹. In Experimenten mit Knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass GSK3 α und GSK3 β trotz hoher Strukturähnlichkeiten unterschiedliche zelluläre Funktionen besitzen. Bei vollständigem Verlust einer Isoform war die andere Isoform nicht in der Lage den Verlust vollständig zu ersetzen. Dies führte dazu, dass GSK3 β -Knockout-Mäuse nicht überlebensfähig waren und aufgrund massiver Apoptose der Hepatozyten bereits am 16. Embryonaltag verstarben⁶³. GSK3 α -Knockout-Mäuse wiesen hingegen lediglich Veränderungen des Glukose-Stoffwechsels auf⁷⁰.

1.3.2 Regulierung der Enzymaktivität

Im Gegensatz zu anderen Proteinkinasen ist GSK3 in ruhenden, unstimulierten Zellen konstitutiv aktiv und wird durch externe Stimuli, z. B. die Bindung von Wnt-Liganden oder Insulin an die entsprechenden Transmembranrezeptoren, partiell und transient inaktiviert. Dabei erfordert die hohe Anzahl von GSK3-Substraten eine substratspezifische Regulierung der Enzymaktivität. Nur durch mehrere Regulationsmechanismen kann der parallele Ablauf von verschiedenen Signalwegen ermöglicht werden. Beispielsweise erhöht die Stimulation einer Zelle mit Insulin die Aktivität der Glykogen-Synthase, hat aber keinen Einfluss auf den Wnt-Signalweg und das β -Catenin-Level der Zelle⁷¹, obwohl es in beiden Signalwegen zur Inhibierung von GSK3 kommt. Bisher sind vier Mechanismen zur Steuerung der GSK3-Aktivität bekannt⁷². Hierzu zählen die Substraterkennung durch bestimmte Phosphorylierungsmuster (Ser/Thr-X-X-X-pSer/Thr) und die Bildung von Protein-komplexen (z. B. der β -Catenin-Abbaukomplex)⁷³. Durch Veränderung der subzellulären Lokalisation kann die Enzymaktivität ebenfalls reguliert werden, da so einerseits räumliche Nähe zwischen Kinase und Substrat geschaffen und andererseits die Trennung vom Substrat bewirkt werden kann. GSK3 wird vor allem im Nukleus und Zytoplasma, aber auch in den Mitochondrien exprimiert. In Abhängigkeit von lokalen Signalen kann das GSK3-Level und damit die Enzymaktivität, z. B. vermittelt durch die Kernlokalisierungssequenz oder GSK3-bindende Proteine wie Frat1, dynamisch verändert werden^{74,75,76}. Die Regulation durch posttranslationale Phosphorylierung bestimmter Aminosäurereste ist der wichtigste Mechanismus und spielt vor allem bei der Stimulation der Zelle mit Insulin oder Wachstumsfaktoren eine Rolle. Bedeutend sind hierfür die Serinreste Ser21 (pGSK3 α (Ser21)) und Ser9 (pGSK3 β (Ser9)) sowie die Tyrosinreste Tyr279 (pGSK3 α (Tyr279)) und Tyr216 (pGSK3 β (Tyr216)). Durch Phosphorylierung der Serinreste kommt es zur Bildung eines intramolekularen Pseudosubstrats, welches die Substratbindungstasche und das aktive Zentrum des Enzyms verlegt und dadurch als kompetitiver Inhibitor fungiert^{77,78}. Die GSK3-Aktivität kann durch Phosphorylierung der Serinreste um 5 - 70 % reduziert werden⁷⁹. Zu den phosphorylierenden Kinasen zählen, je nach GSK3-Isoform und Stimulus, u. a. Proteinkinase A, Proteinkinase B/Akt, Proteinkinase C, p90RSK (p90 ribosomal S6 kinase) und p70S6K (p70 ribosomal S6 kinase)⁸⁰⁻⁸⁴. Phosphorylierung der Tyrosinreste führt hingegen zur optimalen Faltung und Ausrichtung der katalytischen Domäne und damit zur Verstärkung der Enzymaktivität^{79,85}. GSK3 β scheint auch durch Phosphorylierung der Aminosäurereste Ser389 und Thr390 inaktiviert zu werden, jedoch ist dieser Mechanismus bislang nur wenig untersucht⁸⁶. Veränderungen der Genexpression spielen bei der physiologischen Regulation der GSK3-Aktivität eher eine untergeordnete Rolle⁷⁴.

1.3.3 Rolle von GSK3 in malignen Erkrankungen

GSK3 ist an der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen beteiligt. Hierzu zählen endokrinologische, neurodegenerative, psychiatrische und chronisch entzündliche Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Alzheimer-Demenz, Bipolare Störungen und Arthritiden⁷². Insbesondere die Beteiligung an der Entstehung und Progression maligner Tumoren ist aufgrund der zahlreichen Substrate und der Regulierung von Zellmetabolismus, Zellproliferation und -differenzierung, Zellzyklus und programmiertem Zelltod nicht überraschend. Dabei spricht vor allem die negative Regulation des Wnt/ β -Catenin- und PI3K/Akt-Signalwegs für eine tumorsupprimierende Rolle von GSK3. Beide Signalwege liegen in HNSCC und vielen anderen Tumorentitäten dysreguliert vor⁸⁷⁻⁹⁰. Ihre Aktivierung führt über verschiedene Mechanismen zur Inhibierung von GSK3 und damit zu verminderter Phosphorylierung und reduziertem Abbau bzw. verstärkter Stabilisierung von onkogenen Proteinen wie β -Catenin, c-Jun, c-Myc, p53 und Cyclin D1. Zudem gilt GSK3 als Inhibitor der Epithelialen-Mesenchymalen Transition. Zum einen verhindert die Kinase die Transkription EMT-induzierender Faktoren indirekt durch Phosphorylierung des Transkriptionsaktivators β -Catenin und zum anderen beeinflusst sie die Stabilität, den Abbau und die subzelluläre Lokalisation dieser Faktoren direkt. So konnte gezeigt werden, dass GSK3 β Snail an zwei verschiedenen Konsensusmotiven phosphoryliert und dadurch seine Ubiquitinierung und den anschließenden Abbau einleitet oder den Export von Snail aus dem Nukleus vermittelt und den Transkriptionsfaktor damit funktionell inaktiviert⁶⁵. Auch die Stabilität des EMT-induzierenden Transkriptionsfaktors Slug wird direkt durch GSK3-vermittelte Phosphorylierung beeinflusst⁹¹. Somit besteht ein enger Zusammenhang zwischen der GSK3-Aktivität und dem Migrations- und Invasionspotenzial von Zellen. Abweichend davon gibt es in der Literatur Hinweise, dass nicht nur die Inaktivierung oder verminderte Expression von GSK3, sondern auch eine verstärkte Aktivierung oder Expression das Wachstum und die Progression von Tumoren fördern kann⁹². Dabei scheint es vom Ursprungsgewebe und Zelltyp abhängig zu sein, ob GSK3 tumorsupprimierende oder tumorfördernde Eigenschaften besitzt. Beispielsweise konnte in Plattenepithel- und Basalzellkarzinomen der Haut eine verminderte GSK3 β -Expression im Vergleich zu gesundem Hautepithel gezeigt werden⁹³. Dies spricht für eine tumorsupprimierende Funktion der Kinase in Epithelzellen der Haut. Auch in Brustepithelzellen scheint GSK3 tumorsupprimierend zu wirken. Die Arbeitsgruppe um Farago zeigte, dass die Expression von Kinase-inaktiver GSK3 β bei transgenen Mäusen mit Maus-Mammatumovirus (MMTV) *in vivo* zur Entstehung von Brusttumoren führt⁹⁴. In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass pharmakologische GSK3-Inhibierung in gesunden Brust- und Hautepithelzellen eine EMT auslöst und verstärkte Zellinvasion zur Folge hat⁹⁵. Im Gegensatz dazu wurde bei Kolonkarzinom-Zelllinien und Tumorproben eine erhöhte Expression von GSK3 β im Vergleich zu HEK293-Zellen bzw. nicht-neoplastischem Gewebe nachgewiesen, was

für eine tumorfördernde Rolle von GSK3 spricht. Auch bei nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen, Ovarialkarzinomen und Nierenzellkarzinomen war die Expression der Kinase im Vergleich zu gesundem Gewebe erhöht^{96–99}. Damit könnte GSK3 für diese malignen Erkrankungen einen potenziellen therapeutischen Angriffspunkt darstellen.

Zur Rolle von GSK3 in HNSCC liegen zum jetzigen Zeitpunkt nur wenige Arbeiten vor. Bisher wird angenommen, dass die Progression von HNSCC sowohl durch verminderte Expression als auch verstärkte Inaktivierung der Kinase, insbesondere durch Veränderungen des Phosphorylierungsstatus, begünstigt wird. So beschrieben Georgy *et al.* kürzlich, dass Mäuse mit einer heterozygoten Deletion im GSK3 β -Allel (GSK3 $\beta^{+/-}$) nach Exposition mit 4-Nitrochinolin-N-oxid, einem bekannten Induktor oraler Karzinogenese, im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen Plattenepithelkarzinome entwickeln¹⁰⁰. Die Arbeitsgruppe um Mishra zeigte, dass in invasiven Plattenepithelkarzinomen der Zunge und Lippe mehr pGSK3 α/β (Ser21/9) vorliegt, als in gesunder Schleimhaut¹⁰¹. Der Einfluss von GSK3 auf Zellfunktionen wie Zellviabilität und Zellmigration wurde bisher noch nicht näher untersucht und sollte ein Schwerpunkt dieser Arbeit sein.

1.3.4 Experimentelle Inhibierung von GSK3

Um genaue Erkenntnisse über Enzyme, ihre Substrate, beteiligte Signalwege und vermittelte zelluläre Effekte zu gewinnen, ist die gezielte Inhibierung der Enzyme notwendig. Dies kann durch gentechnische Methoden oder pharmakologische Inhibierung erreicht werden. Die Vorteile pharmakologischer Inhibitoren liegen in der akut einsetzenden Wirkung und einer möglichen späteren therapeutischen Anwendung. Zurzeit stehen für die Inhibierung von GSK3 über 50 verschiedene Wirkstoffe mit unterschiedlichen Wirkmechanismen und pharmakokinetischen Eigenschaften zur Verfügung. Anfänglich wurde Lithiumchlorid verwendet, welches durch kompetitive Verdrängung des benötigten Cofaktors Magnesium (Mg^{2+}) und Verstärkung der inhibitorischen Serinphosphorylierung wirkt^{102,103}. Neuere Erkenntnisse zeigen jedoch, dass die Inhibition durch Lithiumchlorid nur wenig spezifisch ist und auch die Aktivität anderer Enzyme beeinflusst wird. Außerdem müssen für eine effektive Hemmung vergleichsweise hohe Wirkstoffkonzentrationen eingesetzt werden^{77,104}. Mittlerweile werden zur GSK3-Inhibierung vor allem niedermolekulare, ATP-kompetitive Inhibitoren eingesetzt. Sie konkurrieren mit dem Phosphorylgruppen-Donor ATP um die Bindungsstelle im aktiven Zentrum des Enzyms und verhindern so die Phosphorylierung der Substrate. Auch das in dieser Arbeit verwendete Maleimid-Derivat SB 216763 zählt zu den ATP-kompetitiven GSK3-Inhibitoren (Abbildung 4)¹⁰⁴. Da sich die ATP-bindenden Domänen von Proteinkinasen nur geringfügig unterscheiden, besteht auch bei

ATP-kompetitiven Inhibitoren die Gefahr ungewollter Nebeneffekte. Für SB 216763 konnte jedoch in einem Versuch mit 24 weiteren Proteinkinasen eine selektive Wirkung gezeigt werden¹⁰⁴. Dabei inhibiert der Wirkstoff sowohl GSK3 α als auch GSK3 β ¹⁰⁴.

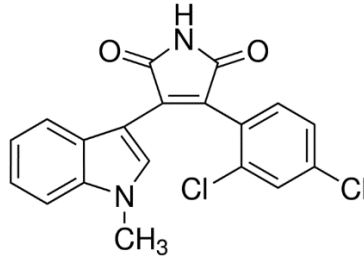


Abbildung 4: Strukturformel des GSK3 α / β -Inhibitors SB 216763¹⁰⁵.

1.4 Ziele der Arbeit

Dysregulationen des Zellmetabolismus und -wachstums, der Zelldifferenzierung und -migration sowie der Apoptose können zur Entstehung von malignen Tumoren führen. Ein wesentlicher Regulator dieser Zellfunktionen ist die Serin-/Threoninkinase GSK3. Aus der Literatur ist bekannt, dass Veränderungen der GSK3-Expression und -Enzymaktivität zur Entstehung von Tumoren beitragen können. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind vielfältig, vom Ursprungsgewebe abhängig und bislang nicht vollständig verstanden. Bei HNSCC wird derzeit eine tumorsupprimierende Funktion von GSK3 angenommen, jedoch ist die Datenlage nicht ausreichend und es bedarf weiterer experimenteller Untersuchungen zur Überprüfung dieser These. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden aus diesem Grund folgende Fragestellungen bearbeitet:

I. Charakterisierung von GSK3 α/β in HNSCC-Gewebeproben und -Zelllinien

Zunächst sollte die Proteinexpression von GSK3 α/β in Gewebeproben aus Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches unterschiedlicher Tumorstadien, histologischer Differenzierung und anatomischer Lokalisation sowie permanenten HNSCC-Zelllinien mittels Western-Blot-Analysen untersucht werden. Da die posttranslationale Phosphorylierung den wichtigsten Mechanismus zur Regulation der GSK3-Enzymaktivität darstellt, sollten mittels Western-Blot-Analysen und immunhistochemischer Färbungen auch die Phosphorylierungen pGSK3 α/β (Ser21/9) und pGSK3 α/β (Tyr279/216) in Gewebeproben und HNSCC-Zelllinien analysiert werden.

II. Einfluss des GSK3 α/β -Inhibitors SB 216763 auf zelluläre Funktionen von HNSCC-Zelllinien

Im zweiten Teil der Arbeit sollten GSK3 α/β *in vitro* durch SB 216763 inhibiert und anschließend verschiedene zelluläre Funktionen analysiert werden. Unter anderen sollte die Viabilität der Zellen unter Einfluss des Inhibitors mittels MTT-Assay untersucht werden. Darüber hinaus sollte geklärt werden, ob die GSK3-Inhibierung zu Veränderungen der mRNA-Expression der EMT-Marker Cytokeratin 8, E-Cadherin, N-Cadherin, Vimentin, Fibronectin, Snail, Slug und Twist führt und ob ein Einfluss auf die Zellmigration besteht. Hierfür wurden qRT-PCRs, RTCA-Assays sowie Wundheilungsassays durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Material	Hersteller
Aluminiumfolie	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Aspirationspipetten (2 ml)	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Cedex Smart Slide	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
CIM-Plates 16	ACEA Biosciences Inc., San Diego (CA), USA
Combitips advanced® (5/10 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Deckgläser (24 x 5 mm)	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Filtertips SafeGuard™ (10/20/200/1000 µl)	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
LightCycler® 480 Sealing Foil	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, weiss	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
Liquid Blocker Super PAP Pen	Science Services GmbH, München
Mini Trans Blot Filter Paper	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules (CA), USA
Multiply®-µStrip Pro 4er Kette	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Nitrocellulose-Membran (0,45 µm)	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules (CA), USA
Pipettenspitzen (10/200/1000 µl)	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Pipettenspitzen Gel-Load (10-200 µl)	Greiner Bio-One AG, Kremsmünster, Österreich
Reagenz- und Zentrifugenröhrchen (15/50 ml)	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Reaktionsgefäße (1,5/2 ml)	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Serologische Pipetten (2/5/10/25 ml)	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Skalpelle	Feather Safety Razor Co., LTD., Osaka, Japan
Stahlkugeln	Qiagen GmbH, Hilden
UV-transparente Einmalküvetten	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Wägeschalen	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen
Zellkulturflaschen (T25/T75/T175)	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Zellkulturkammern (4 Well), Plastikboden	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Zellkulturkammern (4Well), Glasboden	BD Biosciences, San Jose (CA), USA
Zellkulturplatte 96 Well Cellstar®	Greiner Bio-One AG, Kremsmünster, Österreich

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien und Reagenzien.

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
Accutase Enzyme Cell Detachment Medium	eBiosciences, Inc., San Diego (CA), USA
Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare, Chalfont St Giles/Buckinghamshire, UK
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Antikörper-Verdünnungspuffer	DCS Innovative Diagnostik-Systeme Dr. Christian Sartori GmbH & Co. KG, Hamburg
Aprotinin	Sigma-Aldrich Co., St. Louis (MO), USA
Bacillo [®] AF	Bode Chemie GmbH, Hamburg
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
10x Citratpuffer	DCS Innovative Diagnostik-Systeme Dr. Christian Sartori GmbH & Co. KG, Hamburg
Collagen	Sigma-Aldrich Co., St. Louis (MO), USA
DEPC-Treated Water	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA), USA
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis (MO), USA
3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis (MO), USA
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
6x DNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA), USA
DNA-Marker Gene Ruler 100 bp	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA), USA
dNTP-Mix (10 mM)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA), USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA), USA
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Essigsäure (100 %)	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol (100 %)	Apotheke des UKSH, Campus Lübeck
Ethanol (90 %)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethanol (70 %)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA), USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Faramount Mounting Medium	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
Fetales Kälberserum (FKS)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA), USA
Glycerol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Hämalaunlösung nach Mayer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Isopropanolol	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumchlorid (25 mM)	Ampliqon A/S Odense, Dänemark
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Co., St. Louis (MO), USA
Methanol	Avantor™ Performance Materials, Center Valley (PA), USA
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Mycoplasma Off™	Minerva Biolabs GmbH, Berlin
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Co., St. Louis (MO), USA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumpyruvat	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis (MO), USA
Penicillin/Streptomycin	Biochrom GmbH, Berlin
Pepstatin A	Sigma-Aldrich Co., St. Louis (MO), USA
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis (MO), USA
Protease Inhibitor Cocktail (PIC)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis (MO), USA
Protein-Marker V	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Polyacrylamid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ponceau S	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent	Bio-Rad-Laboratories GmbH, Hercules (CA), USA
10x RIPA Puffer	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (MA), USA
Salzsäure	Merck KGaA, Darmstadt
SB 216763	Sigma-Aldrich Co., St. Louis (MO), USA
10x Standard Puffer (15 mM MgCl ₂)	Ampliqon A/S Odense, Dänemark
Stickstoff	Apotheke des UKSH, Campus Lübeck
Taq DNA Polymerase (5 U/μl)	Ampliqon A/S Odense, Dänemark
TaqMan® Gene Expression Master Mix	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA), USA
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Tris Base	Sigma-Aldrich Co., St. Louis (MO), USA
Tris-HCl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich Co., St. Louis (MO), USA
Trypanblau	Biochrom AG, Berlin
Wasserstoffperoxid (30 %)	Apotheke des UKSH, Campus Lübeck
Xylol	Avantor™ Performance Materials, Center Valley (PA), USA

2.1.3 Geräte und Apparaturen

Tabelle 5: Verwendete Geräte und Apparaturen.

Gerät/Apparatur	Hersteller
Absaugpumpe	KNF Neuberger GmbH, Freiburg
Agarosegelkammer	Bio-Rad-Laboratories GmbH, Hercules (CA), USA
Begasungsanlage GM-800	Tokai Hit CO., Ltd, Shizuoka, Japan
Brutschrank INC 153	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Cedex XS Cell Analyzer	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
Electrophoresis Power Supply EPS 601	GE Healthcare, Chalfont St Giles/Buckinghamshire, UK
Fluoreszenz- und Chemilumineszenzsystem Fusion-FX7	Vilber Lourmat GmbH, Eberhardzell
Geldokumentationssystem Gel Doc XR	Bio-Rad-Laboratories GmbH, Hercules (CA), USA
Heizplatte/Rührer RH basic	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Homogenisator TissueLyser LT	Qiagen GmbH, Hilden
Kippwippe ST5	Ingenieurbüro CAT, M. Zipperer GmbH, Staufen
Kippwippe Silent Rocker	Cti-Chemie und Werkstoff-Technik GmbH, Idstein
Mikrowelle Privileg 8020	IRE Beteiligungs GmbH, Stuttgart
Mikroskope	
Axiovert 200M	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
BZ-9000	Keyence Corporation, Osaka, Japan
Hellfeld-Mikroskop	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Wilovert S	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Mini-PROTEAN® Tetra Cell	
Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad-Laboratories GmbH, Hercules (CA), USA
PCR-Geräte	
LightCycler® 96	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
Mastercycler ep Gradient S	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten/Pipettierhilfen	
Elektrische Pipettierhilfe accu-jet® pro	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Multipipette® plus	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten	ABIMED Analysen-Technik GmbH, Langenfeld
Pipetten Eppendorf Research® plus	Eppendorf AG, Hamburg
pH-Meter 766	
PowerPac™HC Power Supply	Bio-Rad-Laboratories GmbH, Hercules (CA), USA

RTCA DP Instrument	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
Sicherheitswerkbank HERAsafe KSP12	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold
Slide Scanner Panoramic DESK	3DHISTECH Ltd., Budapest, Ungarn
<hr/>	
Spektro-/Photometer	
Benchmark Plus Microplate Spectrophotometer	Bio-Rad-Laboratories GmbH, Hercules (CA), USA
BioPhotometer®	Eppendorf AG, Hamburg
NanoDrop 2000c	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA), USA
<hr/>	
Stage Top Incubator KI3 mit INU Control Unit	Tokai Hit CO., Ltd, Shizuoka, Japan
ThermoShaker TS1	Biometra GmbH, Göttingen
Vortexer MS1 Minishaker	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Waage KERN EW620-3NM	KERN & SOHN GmbH, Balingen
Wasserbad GFL-1083	GFL-Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
<hr/>	
Zentrifugen	
Allegra X-12R	Beckman Coulter, Brea (CA), USA
Heraeus Fresco 21	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA), USA
Microfuge® 18	Beckman Coulter, Brea (CA), USA
Mini-Zentrifuge Sprout	Kleinfeld Labortechnik GmbH, Gehrden
Sigma 2K15	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz

2.1.4 Kommerziell erwerbbar Kits

Tabelle 6: Verwendete Kits.

Kit	Hersteller
AEC 2 Komponenten-Kit	DCS Innovative Diagnostik-Systeme Dr. Christian Sartori GmbH & Co. KG, Hamburg
IHC-Kit DCS DetectionLine (PolyLink, HRP-Label)	DCS Innovative Diagnostik-Systeme Dr. Christian Sartori GmbH & Co. KG, Hamburg
QIAshredder™	Qiagen GmbH, Hilden
Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA), USA
RNeasy® Plus Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
RNase-Free DNase Set	Qiagen GmbH, Hilden

2.1.5 Puffer und Lösungen

Tabelle 7: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
10 % APS	228,1 M APS
3 % BSA/TBS	3 % BSA 1x TBS
1x Laufpuffer	192 mM Glycin 25 mM NaCl 0,1 % SDS
3 % Milch/TBS	3 % Milchpulver 1x TBS
MTT-Reagenz	5 mg/ml MTT 1x PBS
MTT Stopp-Lösung	Isopropanol 0,1 N HCl 10 % Triton X-100
4 % Paraformaldehydlösung	4 % Paraformaldehyd 1x PBS
10x Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	140 mM NaCl 3 mM KCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 1,4 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
4x SDS-Probenpuffer	0,25 mM Tris-HCl (pH 6,8) 8 % SDS 40 % Glycerol 20 % 2-Mercaptoethanol 0,004 % Bromphenolblau
50x Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer	2 M Tris Base 5,71 % Essigsäure (100 %) 0,05 M EDTA pH 8,0
10x Tris-gepufferte Salzlösung (TBS)	0,2 M Tris Base 1,37 M NaCl pH 7,6

1x Transferpuffer	25 mM Tris Base (pH 8–10,5) 192 mM Glycin 20 % Methanol
Tris-HCl (pH 6,8 bzw. 8,8)	1 M Tris-HCl pH 6,8 bzw. 8,8
0,3 % Triton X-100/TBS	0,3 % Triton X-100 1x TBS
Zellysepuffer	1x RIPA-Puffer 30 µg/ml Aprotinin 1 µg/ml Pepstatin A 1 % PIC 1 mM PMSF

2.1.6 Antikörper

Tabelle 8: Verwendete Primärantikörper. WB = Western-Blot-Analyse, IHC = Immunhistochemie, ¹ 3 % w/v BSA/TBS, ² 3 % w/v Milch/TBS.

Primärantikörper	Herkunft/Isotyp	Klon	Verdünnung in ^{1,2}	Hersteller
GAPDH	Kaninchen/IgG	14C10	WB 1:1000 ¹	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (MA), USA
pGSK3α/β (Ser21/9)	Kaninchen		WB 1:1000 ¹ IHC 1:50	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (MA), USA
pGSK3α/β (Tyr279/216)	Kaninchen/IgG	EPR933Y	WB 1:1000 ¹ IHC 1:100	Abcam PLC, Cambridge, UK
GSK3α/β	Kaninchen/IgG	D75D3	WB 1:1000 ¹ IHC 1:100	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (MA), USA
Aktives β-Catenin	Maus/IgG _{1κ}	8E7	WB 1:2000 ²	Merck Millipore, Billerica (MA), USA

Tabelle 9: Verwendete Sekundärantikörper. WB = Western-Blot-Analyse.

Sekundärantikörper	Verdünnung	Hersteller
Kaninchen Anti Maus IgG, Peroxidase	1:50 000	Sigma-Aldrich Co., St. Louis (MO), USA
Ziege Anti Kaninchen IgG, Peroxidase	1:50 000	Sigma-Aldrich Co., St. Louis (MO), USA

2.1.7 Oligonukleotide

Tabelle 10: Für die PCR verwendete Primer. FW = forward, REV = reverse.

Primer	Sequenz 5'-3'	Hersteller
β-Actin FW	GAG AAG ATG ACC CAG ATC ATG T	Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg
β-Actin REV	CAT CTC TTG CTC GAA GTC CAG	Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg

Tabelle 11: Für die qRT-PCR verwendete TaqMan®-Sonden.

Gensymbol	Assay ID
ACTB	Hs99999903_m1
CDH1	Hs01023894_m1
CDH2	Hs00983056_m1
CK8	Hs01630795_s1
FN1	Hs01549976_m1
SNAI1	Hs00195591_m1
SNAI2	Hs00950344_m1
TWIST	Hs00361186_m1
VIM	Hs00185584_m1

Die TaqMan®-Sonden wurden von Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA), USA hergestellt.

2.1.8 Humane HNSCC-Zelllinien

Die verwendeten permanenten Zelllinien wurden von Prof. Reidar Grénmann (Universität Turku, UT) zur Verfügung gestellt. Es handelte sich um adhärenz Zellen, die aus Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches generiert wurden (squamous cell carcinoma, SCC). Die Bezeichnung A bzw. B lässt erkennen, ob die Zellen aus einem Primärtumor (A) oder der zugehörigen Halslymphknotenmetastase (B) gewonnen wurden. Bei den verwendeten Zelllinien handelte es sich um HPV-negative Zelllinien. Tabelle 12 fasst Informationen zur Herkunft der Zelllinien zusammen.

Tabelle 12: Verwendete HNSCC-Zelllinien. Alter in Jahren, ED = Erstdiagnose.

Zelllinie	Alter/Geschlecht	Herkunft	TNM bei ED	Differenzierungsgrad	Stadium
UT-SCC-16A	77/weiblich	Zunge	T3 N0 M0	G3	III
UT-SCC-16B	77/weiblich	Hals			
UT-SCC-60A	59/männlich	Tonsille	T4 N1 M0	G1	IV
UT-SCC-60B	59/männlich	Hals			

2.1.9 Gewebeproben

Für die Tissue Microarrays und Western-Blot-Analysen wurden Gewebeproben verwendet. Die Proben wurden von der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck zur Verfügung gestellt. Eine Genehmigung der Studie durch die Ethikkommission der Universität zu Lübeck (Aktenzeichen: 16-278) lag vor. Die histopathologische Begutachtung erfolgte durch das Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck. Tabelle 13 und Tabelle 14 enthalten eine Auflistung aller Proben. Außerdem sind, soweit bekannt, Alter und Geschlecht des Patienten sowie Angaben zu Lokalisation, TNM-Klassifikation, Differenzierungsgrad und UICC-Stadium des Primärtumors bei Erstdiagnose angegeben. Bei unvollständiger TNM-Klassifikation wurde das jeweils kleinstmögliche Stadium genannt.

Tabelle 13: Verwendete Gewebeproben für Western-Blot-Analysen. T = Tumor, Alter in Jahren, ED = Erstdiagnose, x = unbekannt.

Nr.	Alter/Geschlecht	Lokalisation	TNM bei ED	Differenzierungsgrad	Stadium
T-1491	65/weiblich	Oropharynx	cT4b cN2c Mx	G2	mind. IVb
T-1508	60/männlich	Larynx (supraglottisch)	cT3 cN2a cMx	G2	mind. IVa
T-1520	58/männlich	Oropharynx	pT3 pN2b cM0	G2	IVa
T-1522	83/weiblich	Mittelgesicht (Nase, Oberlippe, Gaumen)	cT4 cNx cM0	G3	mind. IVa
T-1527	60/männlich	Hypopharynx/Larynx	pT3 pN2c cM0	G2	IVa
T-1605	43/männlich	Oropharynx	cT4 cN2c cM1	G3	IVc
T-1685	67/männlich	Oropharynx	pT4a pN2b cM0	G2	IVa

Tabelle 14: Verwendete Gewebeproben für Tissue Microarrays. Alter in Jahren, ED = Erstdiagnose, x = unbekannt.

Nr.	Alter/Geschlecht	Lokalisation	TNM bei ED	Differenzierungsgrad	Stadium
1	62/männlich	Hypopharynx/Larynx	pT4 pN2b pMx	G2	mind. IVa
2	51/männlich	Hypopharynx/Larynx	pT2 pN2c cM0	G2	IVa
3	60/männlich	Hypopharynx	pT4a pN2b cM0	G2	IVa
4	63/männlich	Hypopharynx	pT2 pN2b cM0	G2	IVa
5	76/männlich	Oropharynx	pT4a pN1 cM0	G2	IVa
6	45/männlich	Hypopharynx	pT3 pN2c cM0	G2	IVa
7	56/männlich	Hypopharynx	pT2 pN2b cM0	G3	IVa
8	57/männlich	Oropharynx	pT2b pN2b cM0	G3	IVa
9	52/männlich	Hypopharynx/Oropharynx	pT3 pN2c cM0	G3	IVa
10	73/männlich	Larynx (glottisch)	pT3 pN1 cM0	G2	III
11	59/männlich	Hypopharynx	pT1 pN2 pM0	G2	IVa
12	77/männlich	Larynx (supraglottisch)	pT3 pN2c cM0	G3	IVa
13	56/männlich	Larynx (supraglottisch)	cT2 pN2c cMx	G2	mind. IVa
14	55/männlich	Larynx (supraglottisch)	pT2 pN2c cM0	G2	IVa
15	62/männlich	Larynx (supraglottisch)	pT2 pN2c cM0	G3	IVa
16	67/männlich	Hypopharynx/Larynx	pT2 pN1 cM1	G3	IVc
17	49/männlich	Hypopharynx/Larynx	pT3 pN2b cM0	G2	IVa
18	60/männlich	Hypopharynx	mind. pT2 pN3 cMx	G3	mind. IVb
19	46/männlich	Larynx (supraglottisch)	cT3 cN2c pM1	G2	IVc

2.1.10 Software

Tabelle 15: Verwendete Software.

Software	Hersteller
Adobe Photoshop CS6	Adobe Systems Inc., San Jose (CA), USA
AxioVision Rel. 4.8.2	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
BZ II Viewer Software	Keyence Corporation, Osaka, Japan
Cedex XS Software	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
Fusion Bio-1D V12.14	Vilber Lourmat GmbH, Eberhardzell
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, Inc., La Jolla (CA), USA
ImageJ 1.49v	National Institutes of Health, USA
Light Cycler® 96 Software V 1.1.0.1320	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz

Microplate Manager 5.2	Bio-Rad-Laboratories GmbH, Hercules (CA), USA
Microsoft Office 365 ProPlus	Microsoft Co., Redmond (WA), USA
Microsoft Paint 6.3	Microsoft Co., Redmond (WA), USA
NanoDrop 1000 V3.8.0	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA), USA
Pannoramic Viewer 1.15.4	3DHISTECH Ltd., Budapest, Ungarn
Quantity One 1-D Analysis Software V29.0	Bio-Rad-Laboratories GmbH, Hercules (CA), USA
RTCA Software 1.2.1	Bio-Rad-Laboratories GmbH, Hercules (CA), USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturarbeiten

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen an Sicherheitswerkbänken. Es wurden stets autoklavierte und sterile Arbeitsmaterialien sowie Flüssigkeiten verwendet, um Kontaminationen zu verhindern.

2.2.1.1 Kultivierung von HNSCC-Zelllinien

Die adhärennten HNSCC-Zelllinien wurden als Monolayerkulturen in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit 10 % fetalem Kälberserum, 1 % Natriumpyruvat und 1 % Penicillin/Streptomycin bei 37 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Begasung kultiviert. Um eine ausreichende Versorgung der Zellen mit Nährstoffen zu gewährleisten, wurde das Medium in dreitägigen Abständen ausgetauscht. Das Zellwachstum wurde regelmäßig mikroskopisch kontrolliert und die Zellen bei Überschreiten eines Konfluenzgrades von 80 % subkultiviert. Hierfür wurde das Medium entfernt, die Zellen mit DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) gewaschen und anschließend enzymatisch mit Accutase bei 37 °C im Brutschrank abgelöst. Die im Medium befindlichen Zellen wurden nun in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 5 Minuten bei 200 x g zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde verworfen, das Zellsediment gründlich in Medium resuspendiert und im gewünschten Verhältnis auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt. Die Anzahl der Passagen war stets geringer als 30.

2.2.1.2 Zellzahlbestimmung

Die Konzentration vitaler Zellen in einer Zellsuspension wurde mit Hilfe der Trypanblau-Färbung bestimmt. Trypanblau dringt durch die perforierte Membran toter Zellen in das Zytoplasma ein und

färbt es an. Vitale Zellen mit intakter Zellmembran werden nicht angefärbt¹⁰⁶. Für die Färbung wurden 10 µl der Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit 0,2 % Trypanblau gemischt und 10 µl des Gemisches auf einen Cedex Smart Slide aufgetragen. Die Messung erfolgte durch den Cedex XS Analyzer und die dazugehörige Software (F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz).

2.2.1.3 Behandlung der Zellen

Für die Versuche wurden zunächst definierte Zellzahlen in Kulturgefäße ausgesät (Tabelle 16). Die Zellen wurden für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert und anschließend mit SB 216763 oder DMSO behandelt (Tabelle 17). Ausnahmen bildeten die Wundheilungsassays sowie Migrationsversuche, bei denen das RTCA-System eingesetzt wurde. Für Wundheilungsassays wurden die Zellen erst nach Erreichen vollständiger Konfluenz behandelt, bei der RTCA-Methode erfolgte die Behandlung ohne vorherige Inkubation. Durch Ernten (Western-Blot-Analyse, qRT-PCR) oder Fixieren der Zellen (LSAB-Färbung), Auftragen der MTT-Reagenz (MTT-Assay) oder Abbrechen der Zellbeobachtung (RTCA-Assay, Wundheilungsassay) wurden die Versuche zu verschiedenen Zeitpunkten beendet (Tabelle 16). Zum Ernten wurden die Zellen mit Accutase abgelöst und zentrifugiert. Das Zellsediment wurde mehrfach mit gekühltem DPBS gewaschen und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 16: Eingesetzte Zellzahlen, Kulturgefäße und Behandlungsdauer.

Methoden	Zellzahl	Pro	Kulturgefäß	Behandlungsdauer (h)
LSAB-Färbung	4-6 x 10 ⁴	Kammer	4-Well-Zellkulturkammer	24
MTT-Assay	5 x 10 ³	Well	96-Well-Platte	6, 24, 48, 72
RTCA-Assay	6 x 10 ⁴	Well	CIM-Plate 16	18
qRT-PCR	5 x 10 ⁵	Flasche	T25-Flasche	6
Wundheilungsassay	1,5 x 10 ⁵	Kammer	4-Well-Zellkulturkammer	12
Western-Blot-Analyse	5 x 10 ⁵	Flasche	T25-Flasche	24, 48

Tabelle 17: Verwendete Substanzen.

Substanz	Endkonzentration
SB 216763	10 µM, 30 µM
DMSO	0,055 % (v/v)

2.2.2 Biochemische und zellanalytische Methoden

2.2.2.1 Western-Blot-Analyse

Bei der Western-Blot-Analyse werden Proteine durch Gelelektrophorese ihrer Molekülgröße nach aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Dort können die einzelnen Proteine mit Hilfe von spezifischen Antikörpern und Farb- oder Lumineszenzreaktionen nachgewiesen werden.

2.2.2.1.1 Zellyse und Proteinisolation

Zelllinien

Für die Proteinisolation wurden die Zellen, wie in Abschnitt 2.2.1.3 beschrieben, geerntet. Das Sediment wurde mit Zellysepuffer versetzt und für 1,5 Stunden auf Eis inkubiert. Die Menge des verwendeten Lysepuffers (50–200 µl) war von der Größe des Zellsediments abhängig. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Proben bei 16.249 x g und 4 °C für 10 Minuten. Der gewonnene Überstand enthielt die gewünschten Proteine und wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Gewebe

Die bei -80 °C aufbewahrten Gewebeproben wurden auf Eis zerkleinert (ca. 100–200 mg) und in ein Reaktionsgefäß überführt, welches eine kleine Stahlkugel und 500 µl Zellysepuffer enthielt. Die Homogenisierung des Gewebes erfolgte mit Hilfe des TissueLyser LT (Qiagen GmbH, Hilden) bei 50 Hz für 3 Minuten. Bei unvollständiger Homogenisierung des Gewebes wurde dieser Schritt beliebig oft wiederholt. Nach 60-minütiger Inkubation des Gewebelysats wurden die Proben bei 16.249 x g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand mit den gewünschten Proteinen wurde anschließend in ein neues Gefäß überführt.

2.2.2.1.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bradford-Methode ist eine kolorimetrische Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration. Das Bradford-Reagenz enthält den Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G-250, der unter sauren Bedingungen an die Seitenketten von Proteinen bindet. Durch den entstandenen Farbstoff-Protein-Komplex kommt es zu einer Blaufärbung der Lösung und Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm auf 595 nm¹⁰⁷. Mittels photometrischer Messung der Absorption bei 595 nm kann die Proteinkonzentration der untersuchten Lösung anhand einer BSA-Eichkurve bestimmt werden.

Für den Bradford-Test wurde zunächst eine 1:20 Verdünnung des Proteinlysats hergestellt. 5 µl der Verdünnung wurden mit 250 µl Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagenz (Bio-Rad-Laboratories GmbH, Hercules (CA), USA) versetzt. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Messung im BioPhotometer® (Eppendorf AG, Hamburg).

2.2.2.1.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE nach Laemmli)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ermöglicht die elektrophoretische Auftrennung von Proteinlysaten nach ihrem Molekulargewicht. Das anionische Tensid Natriumdodecylsulfat (SDS) bewirkt die Zerstörung von nichtkovalenten Bindungen und somit die Denaturierung der Proteine. Die SDS-Anionen binden an die denaturierten Proteine und überdecken deren Eigenladung, sodass die Probe eine konstante negative Ladungsverteilung aufweist und die Laufgeschwindigkeit der denaturierten Proben zur Anode annähernd proportional zu ihrem Molekulargewicht ist. Die verwendeten Polyacrylamidgele wurden aus den in Tabelle 18 aufgelisteten Komponenten gegossen. Sie enthielten neben Polyacrylamid auch Bisacrylamid, welches für die Quervernetzung der linearen Polyacrylamidketten verantwortlich ist. APS, ein starker Radikalbildner initiiert die Polymerisation des Gels. Diese Reaktion wird durch TEMED katalysiert¹⁰⁸.

Tabelle 18: Zusammensetzung eines Polyacrylamidgels der Dicke 1,5 mm.

Komponente	Volumen	
	Trenngel (10 %)	Sammelgel (4 %)
Tris-HCl (1 M, pH 8,8)	4 ml	-
Tris-HCl (1 M, pH 6,8)	-	0,6 ml
SDS (1 %)	1 ml	0,5 ml
Acrylamid (30 %)/Bisacrylamid (0,8 %)	3,3 ml	0,7 ml
Aqua dest.	1,7 ml	3,2 ml
APS (10 %)	100 µl	50 µl
TEMED	10 µl	5 µl

Vor dem Auftragen der Proben wurden die Lysate zunächst mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 Minuten bei 95 °C inkubiert. Pro Geltasche wurden 30 µg Protein aufgetragen. Der mitgeführte Protein-Marker V (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) ermöglichte die Größenbestimmung der aufgetrennten Proteine. Für die Gelelektrophorese wurden das Mini-PROTEAN® Tetra Cell-System (Bio-Rad-Laboratories GmbH, Hercules (CA), USA) und 1x Laufpuffer verwendet. Sie erfolgte bis zum Erreichen des Trenngels bei 80–100 V, danach bei 130–150 V.

2.2.2.1.4 Proteintransfer auf die Nitrocellulose-Membran

Der Proteintransfer auf die Nitrocellulose-Membran erfolgte mittels Tank-Blot-System. Hierzu wurde die Mini Trans-Blot®-Apparatur (Bio-Rad-Laboratories GmbH, Hercules (CA), USA) nach Herstellerangaben zusammengebaut und mit 1x Transferpuffer befüllt. Um die Erwärmung des Puffers zu verhindern, wurden Kühlelemente und Magnetrührer eingesetzt. Der Proteintransfer erfolgte bei 100 V für 60 Minuten. Um den vollständigen Transfer der Proteine auf die Trägermembran zu kontrollieren, wurde die Membran für eine Minute in Ponceau S geschwenkt. Ponceau S färbt unselektiv alle membrangebundenen Proteine an. Anhand der sichtbaren Banden wurde die Nitrocellulose-Membran geschnitten und anschließend durch mehrfaches Waschen mit TBS entfärbt.

Um freie Bindungsstellen der Nitrocellulose-Membran zu blockieren und unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern, wurde die Membran 60 Minuten bei Raumtemperatur mit 3 % Milch/TBS-Lösung oder 3 % BSA/TBS-Lösung geblockt. Für Antikörper gegen phosphorylierte Proteine wurde BSA verwendet, da Milchpulver Phosphatasen enthalten kann.

2.2.2.1.5 Proteindetektion mittels spezifischer Antikörper

Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte auf einem Schüttler bei 4 °C über Nacht. Nach dreimaligem Waschen mit TBS folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Primär- und Sekundärantikörper wurden in 3 % Milch/TBS-Lösung oder 3 % BSA/TBS-Lösung angesetzt. Zur Detektion der Proteinbanden wurde das ECL (enhanced chemiluminescence)-Verfahren verwendet. Es beruht auf der Oxidation von Luminol, die durch an den Sekundärantikörper gebundene Meerettichperoxidase katalysiert wird. Hierfür wurde die Membran zunächst in TBS gewaschen und dann 3 Minuten mit dem Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagenz (GE Healthcare, Chalfont St Giles/Buckinghamshire, UK) inkubiert. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte im Fluoreszenz- und Chemolumineszenzsystem Fusion-FX7 (Vilber Lourmat GmbH, Eberhardzell). Durch die Banden des Haushaltsgens GAPDH konnte das Gelingen des Versuchs überprüft werden.

2.2.2.2 MTT-Assay

Der MTT-Assay beruht auf der Reduktion des gelben Tetrazoliumsalzes MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) durch mitochondriale, zytoplasmatische und zellmembranständige Enzyme lebender Zellen. Durch Abspaltung des im MTT enthaltenen Tetrazolrings bilden sich in wässriger Lösung unlösliche dunkelblaue/lilafarbene Formazankristalle, die sich nach Zugabe der Stopp-Lösung lösen. Anschließend kann die Optische Dichte der Lösung

im Photometer gemessen werden. Die Optische Dichte ist proportional zur Anzahl lebender Zellen und der metabolischen Aktivität¹⁰⁹.

Für den MTT-Assay wurden die Zellen, wie in Abschnitt 2.2.1.3 beschrieben, in 100 µl Medium ausgesät und behandelt. Zellen einer Zelllinie befanden sich dabei stets auf einer Platte und für jede Bedingung wurden Vierfachbestimmungen durchgeführt. Die restlichen Wells wurden mit PBS befüllt, um das Austrocknen der Platte im Brutschrank zu verhindern. Nach 6 bis 72-stündiger Inkubation wurden 10 µl des MTT-Reagenz (5 mg/ml) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis (MO), USA) zusammen mit 90 µl Medium in die Wells pipettiert und die Platten 120 Minuten im Brutschrank aufbewahrt. Anschließend wurde die Reaktion mit 100 µl Stopp-Lösung beendet und die Platten für 24 Stunden in Dunkelheit und bei Raumtemperatur geschüttelt. Die photometrische Messung der Optischen Dichte erfolgte bei 570 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 690 nm im Benchmark Plus Microplate Spectrophotometer (Bio-Rad-Laboratories GmbH, Hercules (CA), USA). Die Optische Dichte der Lösung aus MTT-Reagenz, Medium und Stopp-Lösung wurde ebenfalls bestimmt und von den Versuchsergebnissen abgezogen. Für die statistische Auswertung wurde zunächst das arithmetische Mittel der Mehrfachbestimmungen ($n = 3-4$) und dann der drei unabhängigen Versuche gebildet.

2.2.2.3 Real-Time Cell Analysis (RTCA)-Assay

Die Zellmigration wurde mit Hilfe des xCELLigence Real-Time Cell Analysis-Systems (F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz) untersucht. Für die Versuche wurden CIM-Plates 16, spezielle 16-Well-Platten, eingesetzt. Die Platten bestehen aus einer zweiteiligen Kammer, deren oberer und unterer Teil durch eine poröse und mit Mikroelektroden bestückte Membran aus Polyethylenterephthalat voneinander getrennt sind. Zu Beginn des Versuches befinden sich die Zellen in der oberen Kammer. Sie können durch die poröse Membran migrieren und gelangen so in den unteren Teil der Platte, welcher Kulturmedium enthält. Dabei haften sie nach dem Durchtreten der Membran an den Mikroelektroden und verursachen eine Veränderung der Impedanz zwischen den Elektroden. Die gemessene Impedanz ist abhängig von Zellanzahl, Zellmorphologie, Stärke der Adhärenz und Viabilität der Zellen. Der ausgegebene Zellindex ist ein dimensionsloser Parameter, der relative Veränderungen der Impedanz und somit die Zellmigration darstellt.

Zunächst wurde die Unterseite der oberen Kammer mit 30 µl Collagen I (400 µg/ml) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis (MO), USA) pro Well beschichtet. Nach 120 Minuten wurden 170 µl Medium mit Zusätzen in die Vertiefungen der unteren Kammer pipettiert, die obere Kammer aufgesetzt und 50 µl des vorbereiteten Mediums in die oberen Vertiefungen pipettiert. Nach 60-minütiger Äquilibration im

Brutschrank wurde je 60.000 Zellen pro Well in 100 µl Medium in die obere Kammer ausgesät. Um Artefakte zu verhindern, wurden die Platten 30 Minuten bei Raumtemperatur belassen, sodass sich die Zellen absetzen konnten. Es folgte eine Hintergrundmessung ohne Zellen. Anschließend wurde der Zellindex in 15-minütigen Abständen über 18 Stunden gemessen und aufgezeichnet. Für die Auswertung wurde die zugehörige Software genutzt und das arithmetische Mittel des Zellindex-Anstiegs zwischen der 5. und 18. Stunde aus drei unabhängigen Versuchen gebildet.

2.2.2.4 Wundheilungsassay

Wundheilungsassays dienen der *in vitro*-Untersuchung ungerichteter Zellmigration. Wie in Abschnitt 2.2.1.3 beschrieben, wurden die Zellen in Zellkulturkammern ausgesät und bis zur Entstehung eines vollständig konfluenten Monolayers im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurde mit Hilfe einer 200 µl Pipettenspitze ein zellfreier Bereich in der Kammermitte geschaffen. Um Zellreste zu entfernen und die Ränder zu glätten, wurden die Kammern mehrmals mit Medium gespült. Es folgte die Behandlung der Zellen und das Einsetzen der Zellkulturkammer in das Mikroskop BZ-9000 (Keyence Corporation, Osaka, Japan). Dort wurden die Zellen mit Hilfe des Stage Top Incubator KI3 mit INU Control Unit und dem Gasmixer GM-8000 (beides: Tokai Hit CO., Ltd, Shizuoka, Japan) bei 37 °C, 5 % CO₂-Gehalt und 18 % O₂-Gehalt inkubiert. Die Migration der Zellen in den freien Bereich wurde halbstündlich über einen Gesamtzeitraum von 12 Stunden fotografiert. Für die Auswertung der Versuche wurde die Breite des zellfreien Bereiches nach 0, 2, 4, 6, 8, 10 und 12 Stunden mit Microsoft Paint (Microsoft Co., Redmond (WA), USA) ausgemessen und jeweils auf den Startzeitpunkt bezogen. Das arithmetische Mittel wurde aus drei unabhängigen Versuchen gebildet.

2.2.3 Immunhistochemische Methoden

2.2.3.1 Labelled-Streptavidin-Biotin-Methode (LSAB-Methode)

Die LSAB-Methode dient der Anfärbung von Zell- oder Gewebestrukturen. Sie beruht auf der hohen Affinität des Glykoproteins Streptavidin zum Vitamin Biotin. Zunächst bindet ein spezifischer Primärantikörper an die gesuchte Struktur. Anschließend wird ein biotinylierter Sekundärantikörper aufgetragen, welcher das Bindeglied zum folgenden Streptavidin-Enzymkomplex darstellt. Als Enzym wird häufig die Meerrettichperoxidase verwendet. Nach Zugabe eines chromogenen Substrats, zum Beispiel AEC (3-Amino-9-ethylcarbazol), wird die gesuchte Struktur sichtbar. Bei der Umsetzung von AEC durch die Meerrettichperoxidase entsteht eine rotbraune Färbung.

2.2.3.1.1 Zelllinien

Wie in Abschnitt 2.2.1.3 beschrieben, wurden die Zellen in Zellkulturkammern ausgesät, behandelt und nach 24 Stunden mit 4 % Paraformaldehyd/PBS-Lösung für 10 Minuten fixiert. Anschließend wurden die Objektträger dreimal in TBS gewaschen und die endogene Peroxidase durch 15-minütige Behandlung mit 3 % H₂O₂ inhibiert. Es folgten weitere Waschschrte und die Permeabilisierung der Zellen mit 0,3 % Triton-X 100/TBS für 10 Minuten. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte bei 4 °C über Nacht. Als Negativkontrolle wurde Antikörper-Verdünnungspuffer (DCS Innovative Diagnostik-Systeme Dr. Christian Sartori GmbH & Co. KG, Hamburg) aufgetragen. Die Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper und dem Streptavidin-Enzym-Konjugat (IHC-Kit DCS DetectionLine (PolyLink, HRP-Label), DCS Innovative Diagnostik-Systeme Dr. Christian Sartori GmbH & Co. KG, Hamburg) erfolgte am folgenden Tag für je 20 Minuten bei Raumtemperatur. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Objektträger erneut in TBS gewaschen. Nach Zugabe des AEC-Substrats (AEC 2 Komponenten-Kit, DCS Innovative Diagnostik-Systeme Dr. Christian Sartori GmbH & Co. KG, Hamburg) wurde die Farbentwicklung mikroskopisch kontrolliert und die Reaktion nach 1–1,5 Minuten durch Waschen in TBS abgestoppt. Anschließend wurde für 2,5 Minuten mit Hämalaunlösung nach Mayer (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) gegengefärbt und 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Das Eindecken der Objektträger erfolgte mit Faramount Aquaeous Mounting Medium (Dako Deutschland GmbH, Hamburg).

2.2.3.1.2 Tissue Microarrays

Die Tissue Microarrays wurden von Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe angefertigt. Sie enthielten formalinfixierte und in Paraffin eingebettete Gewebestanzten mit einem Durchmesser von 1,5 mm. Die verwendeten Gewebeproben sind in Tabelle 14 aufgeführt. Als Kontrolle diente Rattenlebergewebe. Die Paraffinschnitte wurden zunächst zweimal für 10 Minuten mit Xylol behandelt und entparaffiniert. Zur Rehydrierung wurde Ethanol in absteigenden Konzentrationen (100 %, 96 %, 70 %, 50 %) verwendet. Die Paraffinschnitte wurden dazu jeweils für 3 Minuten in den Alkohol gelegt und anschließend mit destilliertem Wasser und TBS gewaschen. Bei der Formalinfixierung des Gewebes können Aldehydverbindungen entstehen, die Antigene maskieren und die Bindung der Antikörper verhindern. Um diese Aldehydverbindungen aufzuschließen wurde die hitzeinduzierte Antigendemaskierung verwendet. Dazu wurden die Tissue Microarrays dreimal für 10 Minuten mit Citratpuffer aufgeköcht. Nach dem Abkühlen der Schnitte auf Eis und Waschen in TBS wurde die LSAB-Färbung wie in Abschnitt 2.2.3.1.1 beschrieben durchgeführt.

Zum Scannen und Fotografieren der gefärbten Tissue Microarrays wurde der Slide Scanner Panoramic DESK und die zugehörige Software Panoramic Viewer 1.15.4 (3DHISTECH Ltd., Budapest, Ungarn) verwendet. Die Auswertung der LSAB-Färbung erfolgte semiquantitativ mittels 4-stufiger Einteilung der Färbeintensität. Unterschieden wurde zwischen keiner (0), schwacher (1+), mittelstarker (2+) und starker (3+) Anfärbung des malignen Gewebes. Abbildung 5 zeigt Färbebeispiele für die Einteilung.

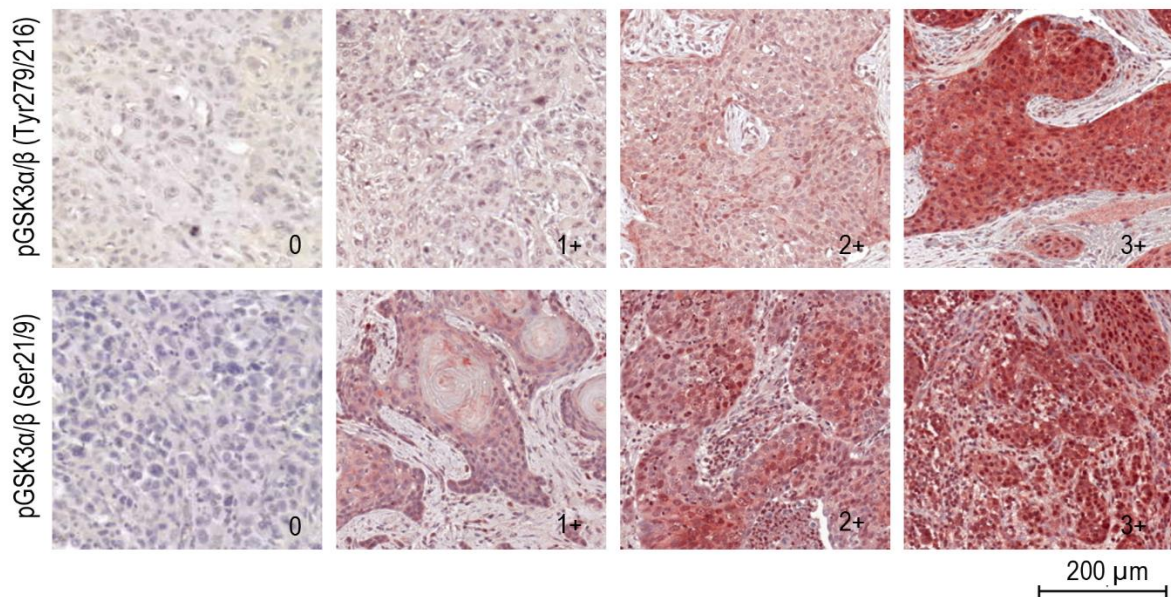


Abbildung 5: 4-stufige Einteilung der Färbeintensität nach LSAB-Färbung gegen pGSK3α/β (Tyr279/216) und pGSK3α/β (Ser21/9). 0 = keine, 1+ = schwache, 2+ = mittelstarke, 3+ = starke Anfärbung. Maßstabbalken 200 µm.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1 RNA-Isolierung mit DNase-Verdau

Für die RNA-Isolierung aus Zellpellets wurden das RNeasy® Plus Mini Kit und das RNase-Free DNase Set (beides: Qiagen GmbH, Hilden) verwendet. Die Durchführung erfolgte mit QIAshredder™-Säulen (Qiagen GmbH, Hilden) nach dem Protokoll des Herstellers. Zunächst wurden die Zellen lysiert. Anschließend wurde genomische DNA aus dem Lysat entfernt und die RNA durch 70 % Ethanol präzipitiert. Da für die Versuche eine hohe Zellzahl eingesetzt wurde, wurde restliche vorhandene genomische DNA durch 15-minütige Inkubation mit DNase bei Raumtemperatur entfernt. Nach mehreren Waschschritten erfolgte die Eluierung der RNA mit RNase-freiem Wasser. Das Nukleinsäureeluat wurde sofort auf Eis gestellt und weiter verwendet oder bei -80 °C eingefroren.

2.2.4.2 Spektralphotometrische Messung der Nukleinsäurekonzentration

Die RNA-Konzentration im Eluat wurde spektralphotometrisch mit Hilfe des NanoDrop 2000c und der dazugehörigen Software (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA), USA) ermittelt. Dazu wurde die Optische Dichte von 2 µl der Probe bei den Wellenlängen 260 und 280 nm gemessen. Da Nukleinsäuren und Proteine verschiedene Absorptionsmaxima besitzen, können durch Bildung des Quotienten aus OD_{260 nm} und OD_{280 nm} auch Aussagen über die Reinheit der eluierten RNA getroffen werden. Ein Quotient von 1,9 bis 2,1 spricht für reine RNA, Werte < 1,8 sprechen für eine Kontamination der Probe mit Proteinen oder aromatischen Verbindungen. Wenn Kontaminationen der untersuchten RNA ausgeschlossen werden konnten, wurde die RNA weiter verwendet.

2.2.4.3 cDNA-Synthese

Die isolierte RNA wurde im nächsten Schritt durch Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und anschließend für die PCR und qRT-PCR verwendet. Die Reverse Transkription beruht auf der Synthese eines zur RNA komplementären DNA-Strangs (cDNA) durch die Reverse Transkriptase (RT), einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase. Nachdem Primer an die RNA gebunden haben, kann das Enzym durch Verknüpfung von Desoxyribonukleosidtriphosphaten einen cDNA-Strang synthetisieren.

Die cDNA-Synthese wurde nach dem Herstellerprotokoll mit dem RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA), USA) durchgeführt. Es wurde je 1 µg RNA eingesetzt. Als Primer wurden Random Hexamer Primer verwendet. Zusätzlich wurde eine Kontrolle ohne Zusatz von Reverser Transkriptase (-RT) und eine Negativkontrolle mitgeführt. Für die Negativkontrolle wurde dem Probenansatz anstelle von RNA nukleasefreies Wasser hinzugefügt. Die cDNA-Synthese erfolgte nach 5-minütiger Preinkubation bei 65 °C und Zugabe des Master Mix in drei Schritten im PCR-Gerät Mastercycler ep Gradient S (Eppendorf AG, Hamburg) (Tabelle 19). Die synthetisierte cDNA wurde bei -80 °C gelagert.

Tabelle 19: PCR-Programm für die cDNA-Synthese.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min)
Inkubation	25	5
Reverse Transkription	42	60
RT-Inaktivierung	70	5

2.2.4.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung definierter DNA-Abschnitte. Die zu amplifizierende DNA-Sequenz wird durch Anlagerung spezifischer Oligonukleotidsequenzen (forward (FW) und reverse (REV) Primer), die jeweils komplementär zum 3'-Ende an die DNA-Stränge binden, festgelegt. Außerdem werden eine hitzeresistente DNA-Polymerase (Taq Polymerase) und Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) benötigt. $MgCl_2$, ein essenzieller Co-Faktor der Taq Polymerase, sowie ein Reaktionspuffer gewährleisten optimale Reaktionsbedingungen. Eine PCR-Reaktion besteht aus 20–50 Zyklen mit jeweils drei Teilschritten, die sich in der Dauer und Reaktionstemperatur unterscheiden. Zunächst erfolgt bei 95 °C die Denaturierung der DNA. Nach dem schnellen Abkühlen auf 57 °C kommt es zur Anlagerung (annealing) der im Überschuss vorhandenen Primer an die DNA-Stränge. Anschließend erfolgt bei 72 °C die Elongation mit Desoxyribonukleotidtriphosphaten durch die Taq Polymerase. Durch Wiederholung des Zyklus erfolgt die annähernd exponentielle Amplifizierung der Zielsequenz.

Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und das PCR-Programm sind in Tabelle 20 und Tabelle 21 dargestellt. Für die PCR-Reaktionen wurde der Mastercycler ep Gradient S (Eppendorf AG, Hamburg) verwendet.

Tabelle 20: Zusammensetzung eines 1x PCR-Reaktionsansatzes.

Komponente	Volumen (μ l)
cDNA	0,5
β -Actin Primer-Mix (FW/REV)	1
Taq DNA-Polymerase (5 U/ μ l)	0,25
dNTP-Mix (10 mM)	0,5
10x Reaktionspuffer	2
$MgCl_2$ (25 mM)	2
DEPC-behandeltes Wasser	13,75
Summe	20

Tabelle 21: PCR-Programm.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min)	Zyklusanzahl
Initialisierung	94	5	1
Denaturierung	94	0,5	35
Annealing	57	0,5	35
Elongation	72	0,75	35
Finale Elongation	72	10	1

2.2.4.5 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese wurden die PCR-Produkte analysiert, um Verunreinigungen der Proben mit genomischer DNA (-RT-Kontrolle) bzw. Kontaminationen der verwendeten Komponenten (Negativkontrolle) auszuschließen. Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von Nukleinsäuren nach ihrer Molekülgröße. Aufgrund der negativen Gesamtladung von Nukleinsäuren wandern die Moleküle im elektrischen Feld in Richtung Anode. Durch die Siebwirkung des Agarosegels werden große Moleküle dabei stärker im Gel zurückgehalten und wandern weniger weit als kleine Moleküle. Da die Molekülgröße proportional zur Anzahl an Basenpaaren ist, können anhand eines mitgeführten Größenstandards mit bekannter Basenpaaranzahl später Rückschlüsse auf die Länge der aufgetrennten Nukleinsäuren gezogen werden. Zum Sichtbarmachen der Nukleinsäurebanden wurde der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid verwendet. Der Farbstoff wandert im elektrischen Feld in Richtung Kathode und zeigt nach Belichtung des Gels mit UV-Licht das Vorhandensein von Nukleinsäurebanden an.

Für die Gelelektrophorese wurden 1 %-ige Agarosegele verwendet. Dazu wurden Agarose und 1x TAE-Puffer aufgekocht und 10 µl Ethidiumbromid hinzugegeben. Die Proben wurden mit 6x DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA), USA) versetzt. Der DNA-Marker Gene Ruler 100 bp (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA), USA) diente als Größenstandard. Die Gelelektrophorese erfolgte mit Elektrophoresepuffer (1x TAE-Puffer) für ca. 40 Minuten bei 100 V. Die Banden wurden anschließend unter UV-Licht im Geldokumentationssystem Gel Doc XR und mit der Quantity One 1-D Analysis Software V29.0 (beides: Bio-Rad-Laboratories GmbH, Hercules (CA), USA) visualisiert.

2.2.4.6 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Um Veränderungen der Expression von EMT-Markern durch die Behandlung mit SB 216763 auf RNA-Ebene festzustellen, wurde die qRT-PCR verwendet. Die Methode verbindet die Amplifizierung von DNA-Sequenzen mit der Möglichkeit einer Echtzeit-Quantifizierung. Für die qRT-PCR wurden spezielle Hydrolysesonden (TaqMan®-Sonden) eingesetzt. Die Sonden bestehen aus einem Oligonukleotid, welches komplementär zur Sequenz des Zielgens ist, sowie einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff am 5'-Ende und einem „Quencher“-Farbstoff am 3'-Ende. Der Reporter fungiert als Fluoreszenz-Donor, der Quencher als Fluoreszenz-Akzeptor. Wird der Reporter-Farbstoff einer intakten, an den Matrizenstrang gebundenen, TaqMan®-Sonde durch Energie einer bestimmten Wellenlänge angeregt, so kann aufgrund der Nähe zwischen Reporter und Quencher ein strahlungsfreier Energietransfer (Förster-Resonanzenergietransfer) stattfinden. Wird die Sonde jedoch während der Elongationsphase der PCR durch die 5'-3'-Exonuklease Aktivität der Taq Polymerase hydrolysiert, so kommt es zur Unterbrechung des Energietransfers und ein Fluoreszenzsignal kann detektiert werden. Das Fluoreszenzsignal nimmt proportional zur Anzahl der gebildeten PCR-Amplifikate zu. Nach Hydrolyse der Sonde wird der DNA-Strang weiter zwischen den Primern vervollständigt und ein neuer PCR-Zyklus beginnt¹¹⁰.

Für die qRT-PCR wurden der TaqMan® Gene Expression Master Mix und verschiedene TaqMan®-Sonden (alle: Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (MA), USA) verwendet. Der Master Mix enthielt die AmpliTaq Gold® DNA Polymerase. Die Proben wurden, wie in Tabelle 22 gezeigt, angesetzt und in die LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 pipettiert. Anschließend wurde die Platte mit einer Folie verschlossen, kurz anzentrifugiert, in den LightCycler® 96 (beides: F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz) eingesetzt und das PCR-Programm (Tabelle 23) gestartet. Für die Versuche wurden Triplikat-Ansätze verwendet. Zum Ausschluss von Kontaminationen wurde eine Negativkontrolle mitgeführt.

Tabelle 22: Zusammensetzung eines 1x qRT-PCR-Ansatzes.

Komponente	Volumen (µl)
cDNA (10 ng)	0,2
DEPC-behandeltes Wasser	8,8
TaqMan® Gene Expression Master Mix	10
TaqMan®-Sonde	1
Summe	20

Tabelle 23: qRT-PCR-Programm.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Zyklusanzahl
Inkubation	50	120	1
Initialisierung	95	600	1
Denaturierung	95	15	50
Hybridisierung/ Elongation	60	60	50

Die relative Quantifizierung (ohne Effizienz-Korrektur) erfolgte mit Hilfe der $\Delta\Delta C_T$ Methode¹¹¹. Der C_T -Wert (cycle threshold) entspricht der PCR-Zyklusanzahl, bei der das detektierte Fluoreszenzsignal erstmals den Schwellenwert, also die Hintergrundfluoreszenz, übersteigt. Zunächst wurde das arithmetische Mittel aus den C_T -Werten der Triplikate gebildet und anschließend der ΔC_T -Wert berechnet, indem die C_T -Werte der Zielgene von den C_T -Werten des Referenzgens (β -Actin) subtrahiert wurden.

$$\Delta C_T = C_T(\text{Zielgen}) - C_T(\text{Referenzgen, } \beta\text{-Actin}) \quad [1]$$

Anhand des ΔC_T -Wertes wurde die mRNA-Expression nach folgender Formel berechnet:

$$\text{mRNA-Expression} = 2^{-\Delta C_T} \quad [2]$$

Für die Berechnung der relativen Expression wurde zunächst der $\Delta\Delta C_T$ -Wert ermittelt. Dazu wurden die ΔC_T -Werte der unbehandelten Proben von den ΔC_T -Werten der behandelten Proben abgezogen.

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T(\text{behandelt}) - \Delta C_T(\text{unbehandelt}) \quad [3]$$

Die relative Expression wurde anschließend wie folgt berechnet:

$$\text{relative Expression} = 2^{-\Delta\Delta C_T} \quad [4].$$

Bei einer relativen Expression größer 1 lag eine Überexpression, bei Werten kleiner 1 eine Unterexpression, des untersuchten Gens in der behandelten Probe im Vergleich zur unbehandelten Probe vor. Für die statistische Auswertung wurden die ΔC_T -Werte aus drei unabhängigen Experimenten verglichen.

2.2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte, wenn nicht anders angegeben, mittels zweiseitigem t-Test für unabhängige Stichproben. Das Signifikanzniveau wurde auf 5 % festgelegt. Für die Berechnungen wurden Microsoft Excel (Microsoft Co., Redmond (WA), USA) und GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla (CA), USA) verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von GSK3 α/β in HNSCC

In HNSCC-Gewebeproben und permanenten HNSCC-Zelllinien wurde zunächst die Proteinexpression von GSK3 α und GSK3 β untersucht. Darüber hinaus wurde der Phosphorylierungsstatus, im Speziellen die Phosphorylierung der Serinreste Ser21 und Ser9 (pGSK3 α/β Ser21/9) sowie der Tyrosinreste Tyr279 und Tyr216 (pGSK3 α/β Tyr279/216), analysiert.

3.1.1 Proteinexpression und Phosphorylierungsstatus von GSK3 α/β in HNSCC-Gewebeproben

Um die Proteinexpression und den Phosphorylierungsstatus von GSK3 α/β in Gewebeproben zu untersuchen, wurden Proteine aus sieben Tumorproben isoliert und mittels Western-Blot-Analyse untersucht. GSK3 α und GSK3 β konnten in allen Proben nachgewiesen werden, jedoch zeigten die unterschiedlichen Gewebeproben ein heterogenes Proteinexpressionsmuster (Abbildung 6A). Beispielsweise war GSK3 β in den Tumorproben T-1520 und T-1508 nur schwer detektierbar. Die densitometrische Auswertung der Western-Blot-Analyse ergab, dass GSK3 α im Mittel 2,4-fach ($2,37 \pm 0,77$) stärker exprimiert war als GSK3 β (Abbildung 6B). Dieser Unterschied war bei Betrachtung aller Gewebeproben statistisch signifikant ($p = 0,007$, zweiseitiger t-Test für abhängige Stichproben).

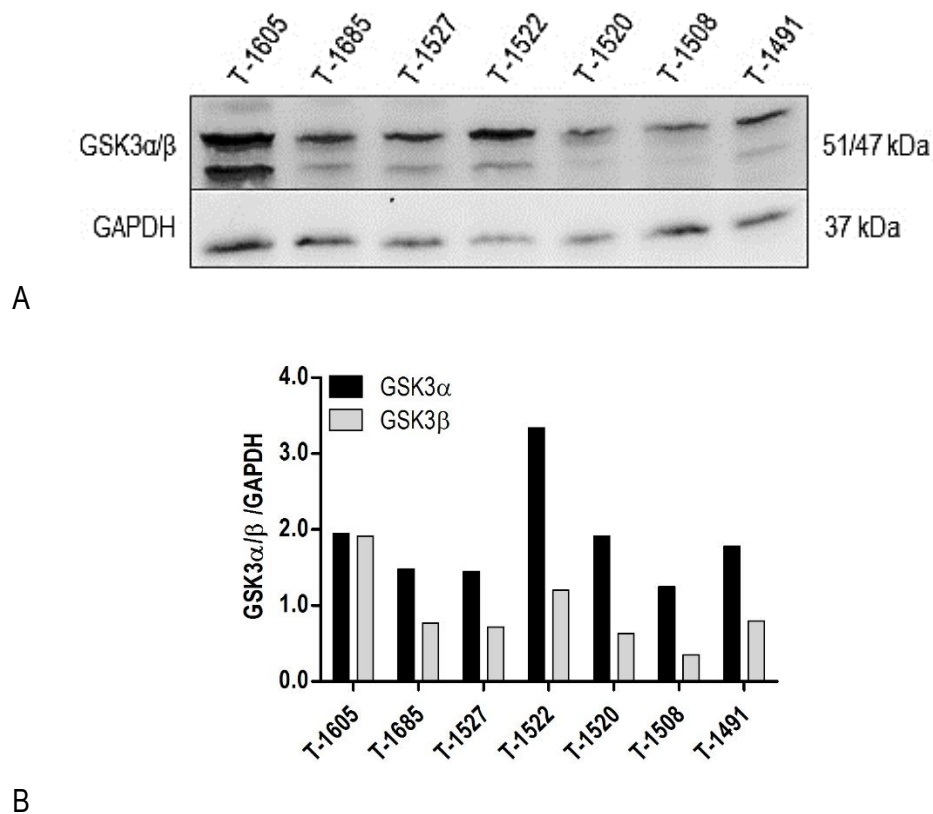


Abbildung 6: Western-Blot-Analyse der Proteinexpression von GSK3α/β in HNSCC-Gewebeproben. (A) Western-Blot-Analyse. GAPDH diente als Ladekontrolle. Molekülmasse von GSK3α/β: 51/47 kDa, Molekülmasse von GAPDH: 37 kDa. (B) Densitometrische Auswertung der Western-Blot-Analyse (n = 1). Die Proteinexpression von GSK3α/β wurde auf die Proteinexpression von GAPDH normalisiert.

Das Phosphorylierungsmuster war ebenfalls sehr heterogen. GSK3α lag in allen untersuchten Gewebeproben sowohl serin- als auch tyrosinphosphoryliert vor (Abbildung 7A und 7B). Bei den Proben T-1605, T-1527, T-1522 und T-1491 konnte dies auch für GSK3β gezeigt werden. Bei den Proben T-1520 und T-1508 konnten hingegen weder die Phosphorylierung an Ser9 noch die Phosphorylierung an Tyr216 nachgewiesen werden bzw. war die Abgrenzung einer Bande gegenüber der starken Hintergrundfärbung nicht möglich. Bei Probe T-1685 war die Phosphorylierung an Ser9 ebenfalls nicht abgrenzbar.

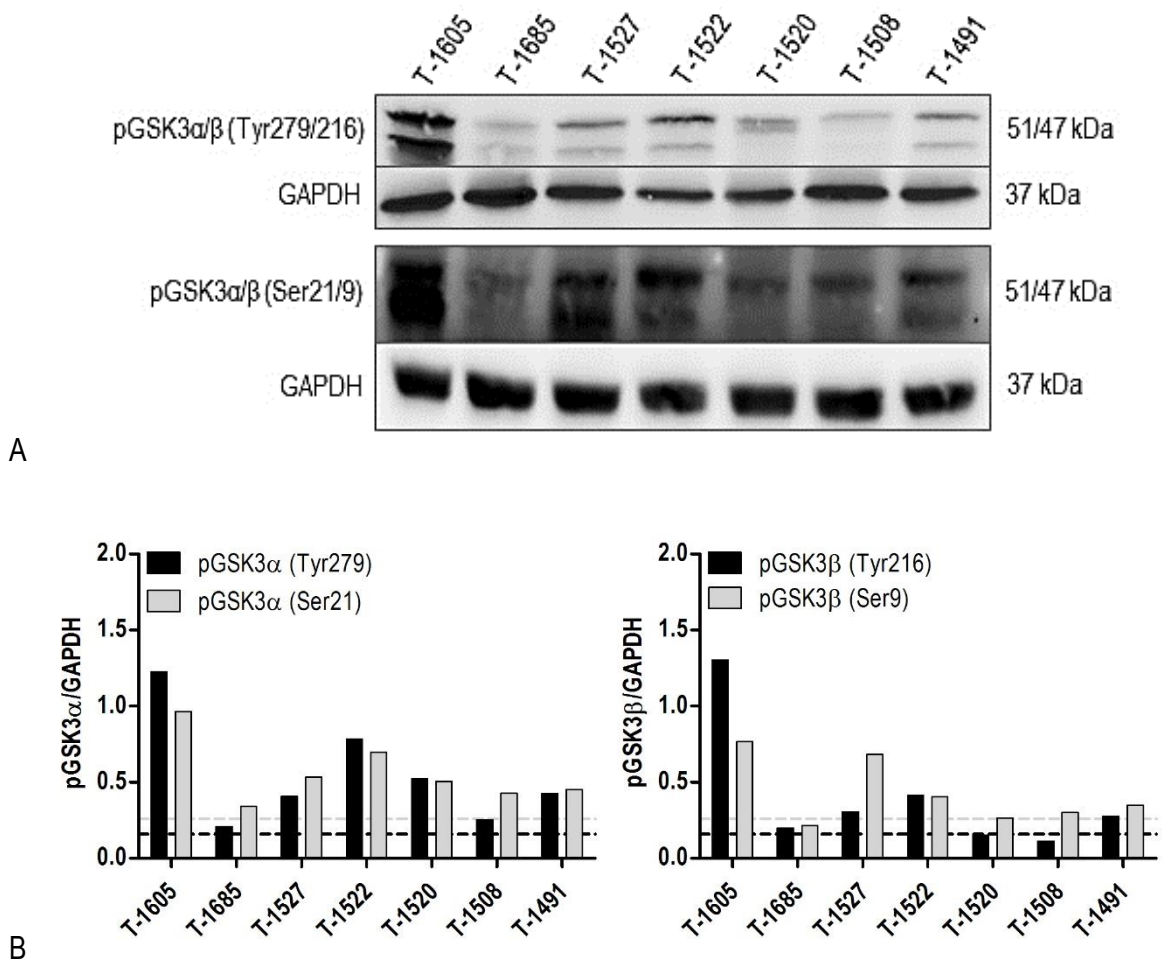


Abbildung 7: Western-Blot-Analysen des GSK3 α/β -Phosphorylierungsstatus (pGSK3 α/β (Tyr279/216) und pGSK3 α/β (Ser21/9)) in HNSCC-Gewebeproben. (A) Western-Blot-Analysen. GAPDH diente als Ladekontrolle. Molekülmasse von pGSK3 α/β (Tyr279/216) und pGSK3 α/β (Ser21/9): 51/47 kDa, Molekülmasse von GAPDH: 37 kDa. (B) Densitometrische Auswertung der Phosphorylierung von GSK3 α an Tyr279 und Ser21 sowie von GSK3 β an Tyr216 und Ser9, normalisiert auf GAPDH (n = 1). Die schwarze (pGSK3 α/β (Tyr279/216)) und graue (pGSK3 α/β (Ser21/9)) gestrichelte Linie markiert jeweils die Hintergrundfärbung.

3.1.2 Immunhistochemischer Nachweis von pGSK3 α/β (Ser21/9) und pGSK3 α/β (Tyr279/216) in HNSCC-Primärtumoren und Metastasen

Mittels immunhistochemischer Färbung von Tissue Microarrays, welche Gewebeschnitte aus Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches und dazugehörigen Lymphknotenmetastasen von 19 Patienten enthielten, sollten nun die Ergebnisse zur Phosphorylierung von GSK3 α/β verifiziert und mögliche Unterschiede zwischen Primärtumor und Metastase untersucht werden.

In Abbildung 8 sind exemplarisch Ausschnitte der Färbungen von je drei Primärtumoren und Metastasen dargestellt. pGSK3 α / β (Ser21/9) konnte in den malignen Zellen aller Primärtumore und Metastasen nachgewiesen werden. pGSK3 α / β (Tyr279/216) war ebenfalls in allen Primärtumoren und in 18 von 19 untersuchten Metastasen nachweisbar. Bei einem Großteil der untersuchten Gewebeschnitte konnten pGSK3 α / β (Ser21/9) und pGSK3 α / β (Tyr279/216) vor allem im Zytoplasma und vereinzelt auch im Nukleus der malignen Zellen nachgewiesen werden. Darüber hinaus lagen pGSK3 α / β (Ser21/9) und pGSK3 α / β (Tyr279/216) auch im umliegenden Bindegewebe vor. Die Färbung war hier allerdings deutlich schwächer ausgeprägt.

Die semiquantitative Auswertung der Färbungen (Tabelle 24) zeigte, dass der größte Anteil der Primärtumore (63,2 %) und Metastasen (47,4 %) eine mittelstarke Anfärbung für pGSK3 α / β (Ser21/9) aufwies. Für pGSK3 α / β (Tyr279/216) zeigte ein Großteil der Primärtumore (47,4 %) ebenfalls eine mittelstarke und die Mehrheit der Metastasen (63,2 %) eine schwache Anfärbung. Dabei wurden die Färbungen gegen pGSK3 α / β (Ser21/9) und pGSK3 α / β (Tyr279/216) in Primärtumor- und Metastasengewebe in zehn Fällen (52,6 %) als gleich eingestuft. Die restlichen Primärtumor- und Metastasenpaare zeigten eine differenzielle Anfärbung, wobei fünf bzw. sieben Primärtumore eine stärkere Anfärbung für pGSK3 α / β (Ser21/9) bzw. pGSK3 α / β (Tyr279/216) aufwiesen, als die Metastasen. In vier bzw. zwei Fällen waren die Metastasen stärker angefärbt, als die Primärtumore.

Tabelle 24: Semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung von Primärtumor- und Metastasengewebe gegen pGSK3 α / β (Ser21/9) und pGSK3 α / β (Tyr279/216). 0 = keine, 1+ = schwache, 2+ = mittelstarke, 3+ = starke Anfärbung. Angabe von absoluter und relativer Häufigkeit (%).

Gewebe	Anzahl	Antikörper	Färbung			
			0	1+	2+	3+
Tumor	19	pGSK3 α / β (Ser21/9)	0 (0 %)	4 (21,1 %)	12 (63,2 %)	3 (15,8 %)
		pGSK3 α / β (Tyr279/216)	0 (0 %)	7 (36,8 %)	9 (47,4 %)	3 (15,8 %)
Metastase	19	pGSK3 α / β (Ser21/9)	0 (0 %)	6 (31,6 %)	9 (47,4 %)	4 (21,1 %)
		pGSK3 α / β (Tyr279/216)	1 (5,3 %)	12 (63,2 %)	4 (21,1 %)	2 (10,5 %)

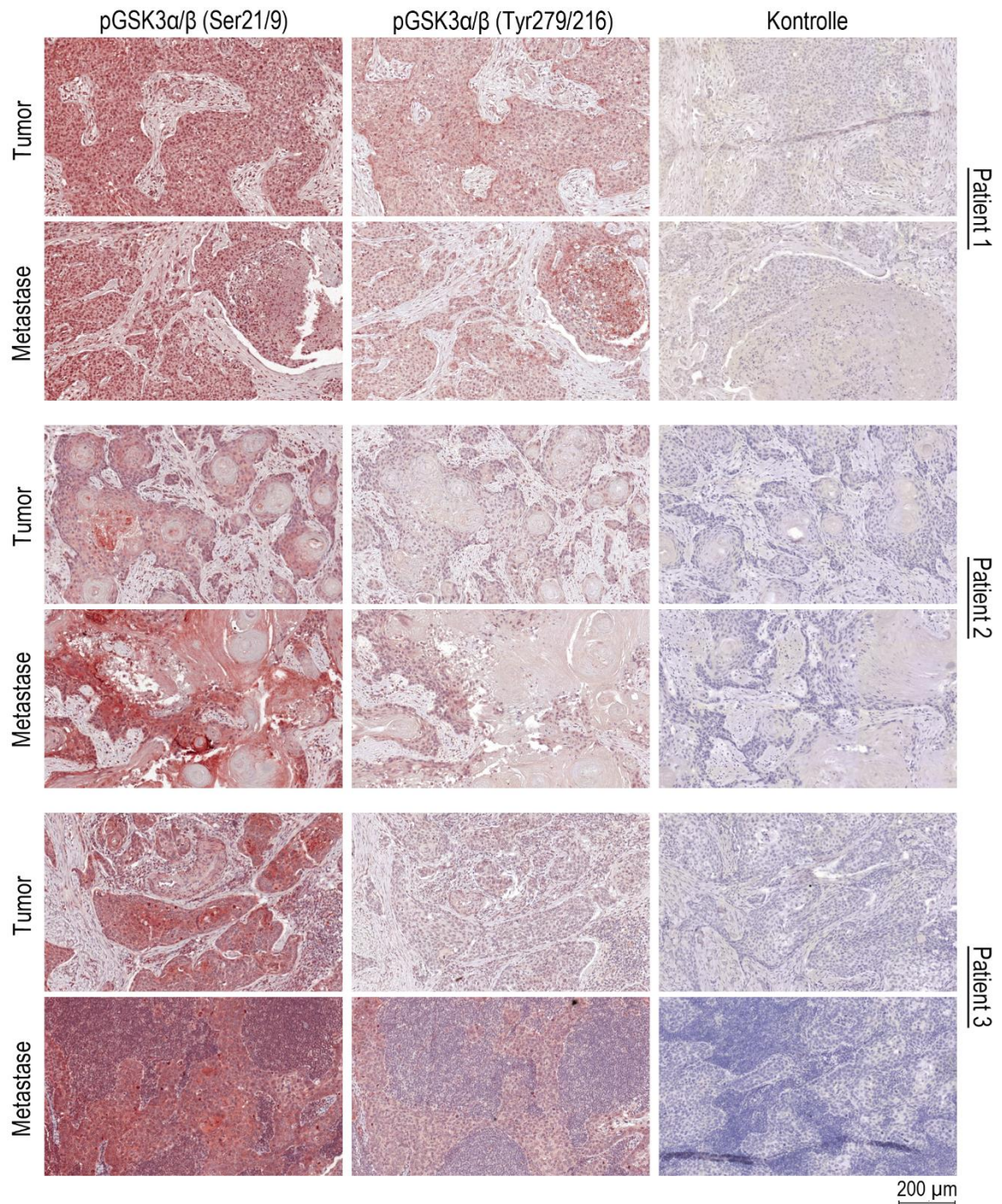


Abbildung 8: Nachweis von pGSK3 α / β (Ser21/9) und pGSK3 α / β (Tyr279/216) in exemplarischen Gewebeschnitten aus Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches und dazugehörigen Halslymphknotenmetastasen mittels immunhistochemischer Färbung (LSAB-Methode). Die Zellkerne wurden mit Hämatoxylin angefärbt. Maßstab Balken 200 μ m.

3.1.3 Proteinexpression und Phosphorylierungsstatus von GSK3 α/β in permanenten HNSCC-Zelllinien

Die Proteinexpression der GSK3-Isoformen und ihr Phosphorylierungsstatus wurden auch in den permanenten HNSCC-Zelllinien UT-SCC-16A, -16B, -60A und -60B mittels Western-Blot-Analysen untersucht. Hierbei konnten GSK3 α und GSK3 β in allen Zelllinien detektiert werden (Abbildung 9A). Die densitometrische Auswertung ergab ein signifikant höheres Proteinexpressionslevel von GSK3 β in der Primärtumor-Zelllinie UT-SCC-60A im Vergleich zur Metastasen-Zelllinie UT-SCC-60B ($p = 0,037$, Abbildung 9B). Für die Zelllinien UT-SCC-16A und -16B konnte diesbezüglich kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Ein signifikanter Unterschied zwischen dem GSK3 α - und GSK3 β -Proteinexpressionslevel war im Gegensatz zu den HNSCC-Gewebeproben (Abschnitt 3.1.1) ebenfalls nicht zu beobachten. Phosphorylierungsanalysen zeigten das Vorliegen der Phosphorylierung an Tyr279 und Ser21 von GSK3 α sowie Tyr216 und Ser9 von GSK3 β in allen Zelllinien (Abbildung 10A und 10B). Zwischen Primärtumor-Zelllinie und Metastasen-Zelllinie zeigten sich bezüglich der Phosphorylierung keine Unterschiede.

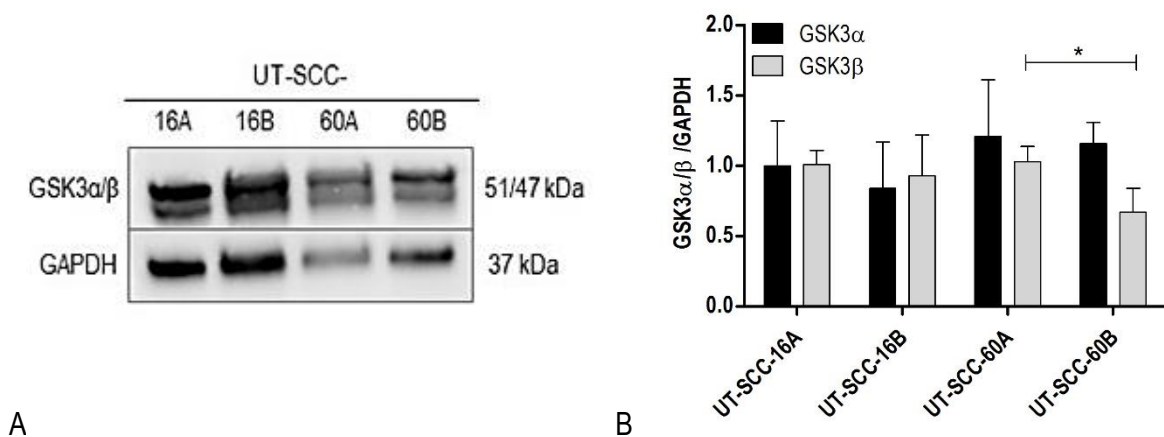


Abbildung 9: Western-Blot-Analysen der Proteinexpression von GSK3 α/β in den HNSCC-Zelllinien UT-SCC-16A, -16B, -60A und -60B. (A) Repräsentative Western-Blot-Analyse. GAPDH diente als Ladekontrolle. Molekülmasse von GSK3 α/β : 51/47 kDa, Molekülmasse von GAPDH: 37 kDa. (B) Densitometrische Auswertung der Western-Blot-Analysen (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 3$, * $p \leq 0,05$).

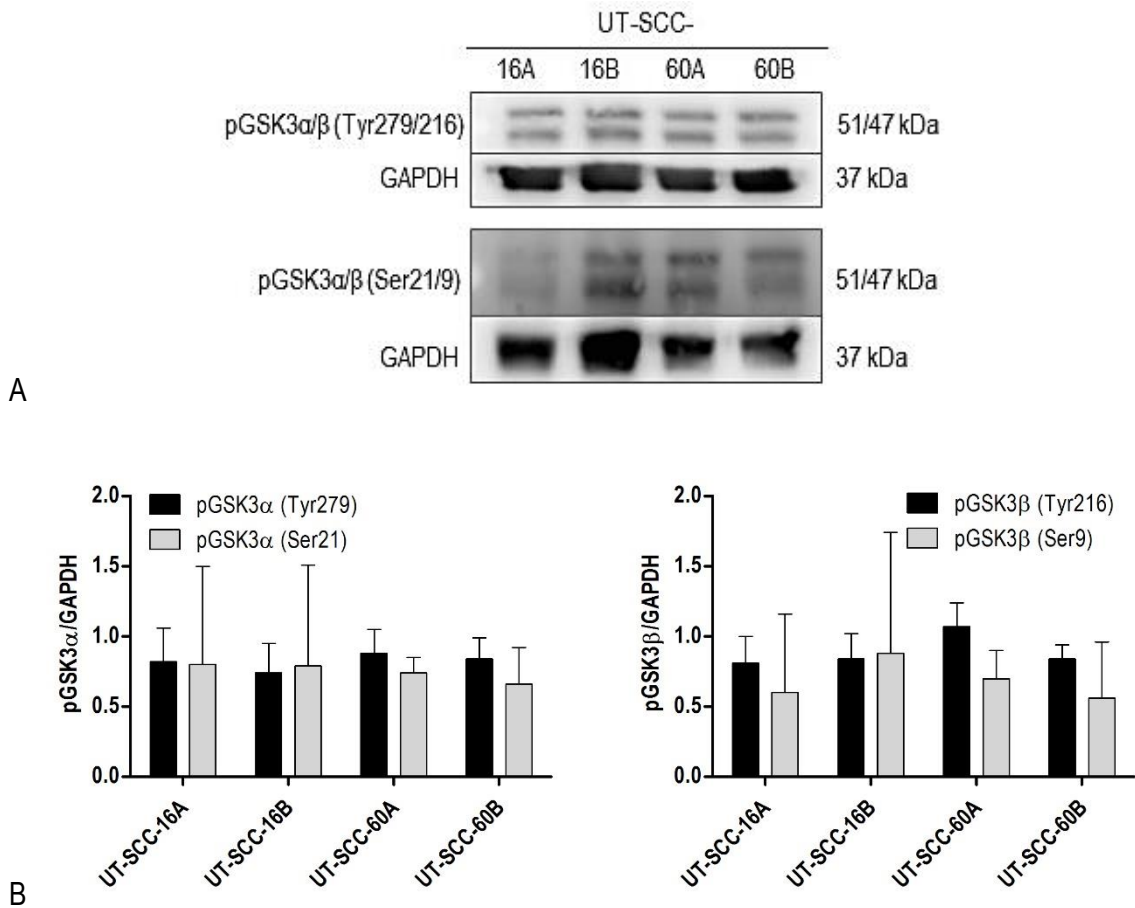


Abbildung 10: Western-Blot-Analysen des GSK3 α/β -Phosphorylierungsstatus in den HNSCC-Zelllinien UT-SCC-16A, -16B, -60A und -60B. (A) Repräsentative Western-Blot-Analysen. GAPDH diente als Ladekontrolle. Molekülmasse von pGSK3 α/β (Tyr279/216) und pGSK3 α/β (Ser21/9): 51/47 kDa, Molekülmasse von GAPDH: 37 kDa. (B) Densitometrische Auswertung der Phosphorylierung an Tyr279 und Ser21 von GSK3 α sowie an Tyr216 und Ser9 von GSK3 β (Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 3).

3.1.4 Analyse der subzellulären Lokalisation von pGSK3 α/β (Tyr279/216) und pGSK3 α/β (Ser21/9) in permanenten HNSCC-Zelllinien

Im folgenden Abschnitt sollte die subzelluläre Lokalisation von GSK3 α/β in Abhängigkeit der Phosphorylierung untersucht werden. Hierzu wurden die HNSCC-Zelllinien UT-SCC-16A, -16B, -60A und -60B immunhistochemisch gegen pGSK3 α/β (Tyr279/216) und pGSK3 α/β (Ser21/9) angefärbt.

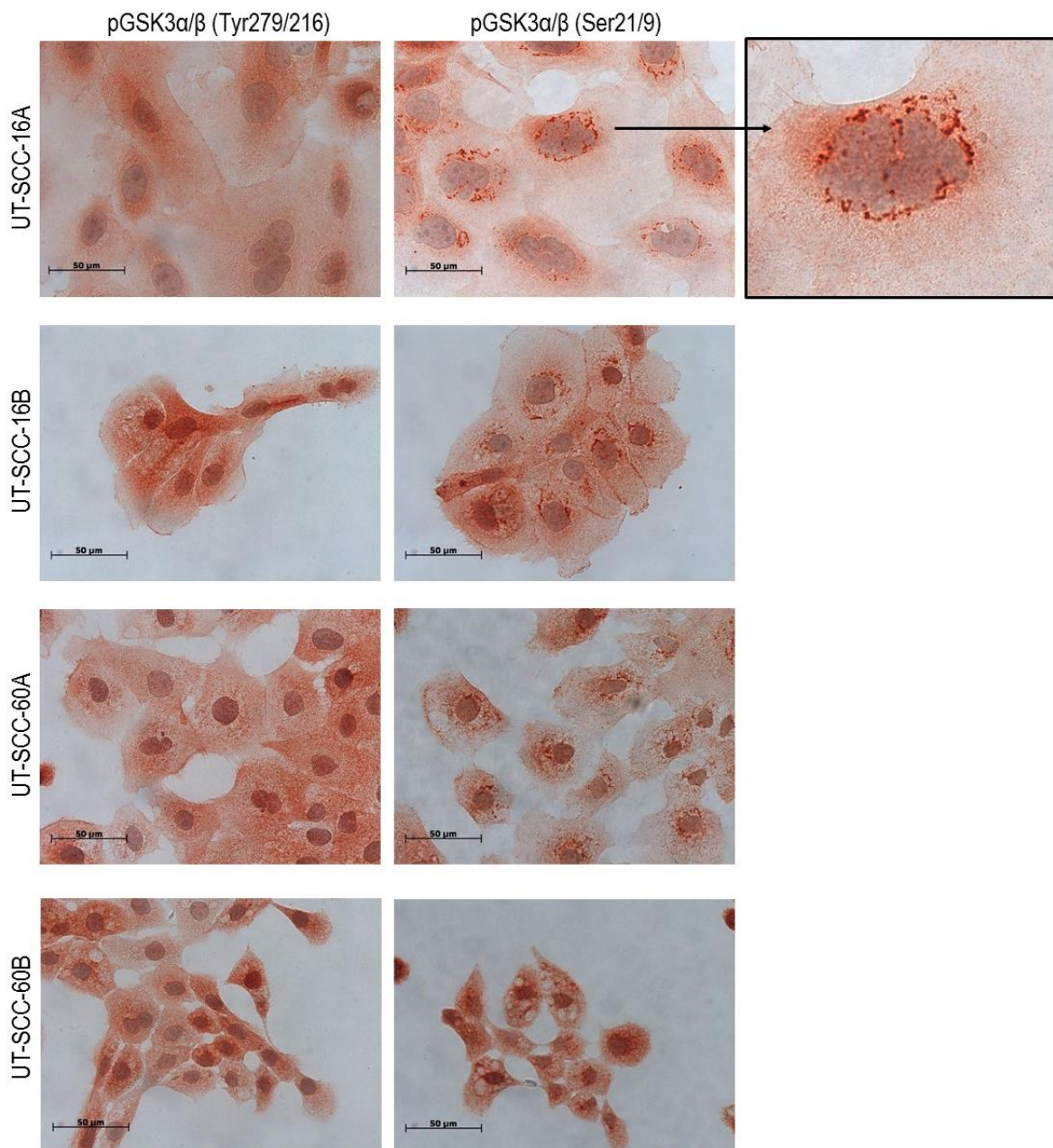


Abbildung 11: Analyse der subzellulären Lokalisation von pGSK3 α/β (Tyr279/216) und pGSK3 α/β (Ser21/9) in den HNSCC-Zelllinien UT-SCC-16A, -16B, -60A und -60B mittels immunhistochemischer Färbung (LSAB-Methode). Die Zellkerne wurden mit Hämatoxylin angefärbt. Der schwarze Pfeil markiert einen Bildausschnitt. Maßstabballen 50 μ m (n = 1–4).

pGSK3 α/β (Tyr279/216) und pGSK3 α/β (Ser21/9) konnten in allen untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden (Abbildung 11). Interessanterweise zeigten die Zelllinien jedoch deutliche Unterschiede in der subzellulären Lokalisation von tyrosin- und serinphosphorylierter GSK3 α/β . Während pGSK3 α/β (Tyr279/216) vor allem im Zytoplasma detektiert werden konnte und überwiegend homogen verteilt vorkam, lag pGSK3 α/β (Ser21/9) in allen untersuchten Zelllinien auch perinukleär konzentriert und in vesikulären Strukturen angeordnet vor.

3.2 Einfluss von SB 216763 auf permanente HNSCC-Zelllinien

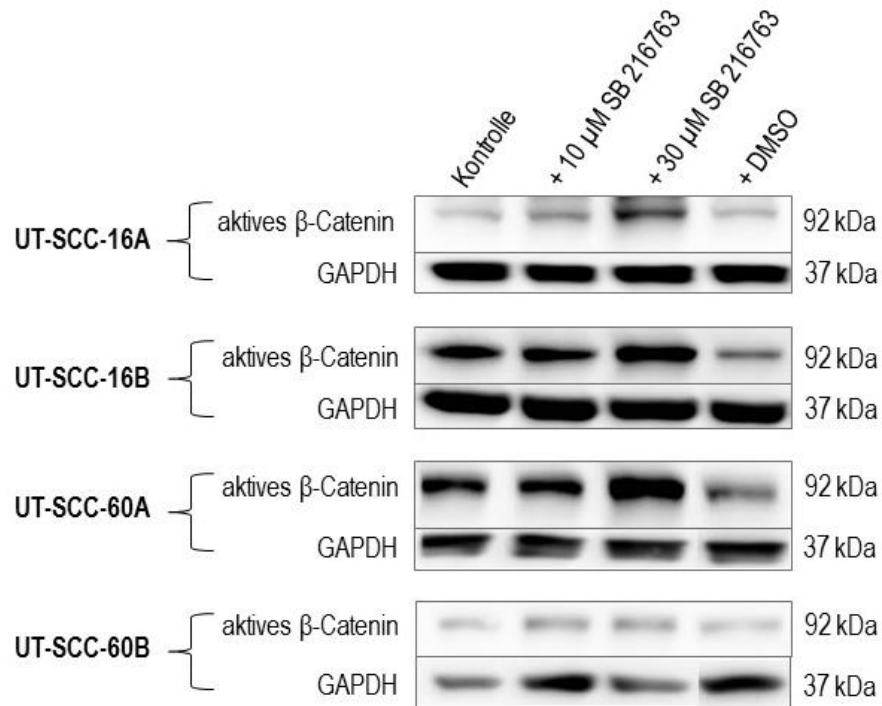
In den folgenden Versuchen wurde der Einfluss des GSK3 α/β -Inhibitors SB 216763 auf verschiedene zelluläre Funktionen untersucht. Durch die ATP-kompetitive Wirkweise des Inhibitors sollten die GSK3 α/β -Moleküle einer Zelle völlig unabhängig von sonstigen Regulationsmechanismen, beispielsweise der Phosphorylierung an Serin- und Tyrosinresten, inhibiert werden. Der Inhibitor wurde in den Konzentrationen 10 μ M und 30 μ M eingesetzt. Die Auswahl der verwendeten Konzentrationen erfolgte auf Grundlage der Literatur sowie arbeitsgruppeninterner Vorversuche^{104,112}. Zum Ausschluss eines Lösungsmittelleffektes wurden die Zellen außerdem mit DMSO behandelt. Unbehandelte Zellen dienten stets als Kontrolle.

3.2.1 Einfluss von SB 216763 auf das β -Catenin-Level

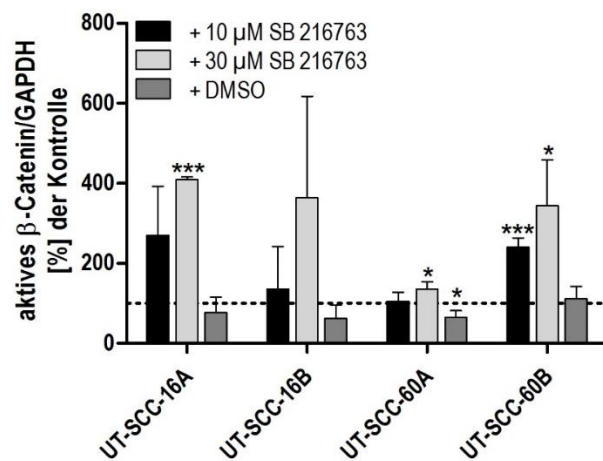
Zunächst sollte überprüft werden, ob SB 216763 in HNSCC-Zelllinien zur gewünschten Inhibition von GSK3 α/β führt. Hierzu wurde bei den Zelllinien UT-SCC-16A, -16B, -60A und -60B nach 24-stündiger Behandlung mit 10 μ M und 30 μ M SB 216763 bzw. DMSO mittels Western-Blot-Analyse das β -Catenin-Level, im Speziellen das Level von unphosphoryliertem, aktivem β -Catenin, untersucht. Die Auswahl der Behandlungsdauer erfolgte auf Grundlage der Literatur¹¹²⁻¹¹⁴.

Aktives β -Catenin konnte in allen HNSCC-Zelllinien nachgewiesen werden und die Behandlung mit SB 216763 führte bei allen Zelllinien zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme von aktivem β -Catenin (Abbildung 12A). Die densitometrische Auswertung ergab im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle einen 1,4 bis 2,7-fachen Anstieg von aktivem β -Catenin nach Inkubation mit 10 μ M SB 216763 (Abbildung 12B). Bei UT-SCC-60B konnte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ein statistisch signifikanter Effekt nachgewiesen werden ($p < 0,001$). Nach Inkubation mit 30 μ M SB 216763 lag im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle 1,4 bis 4-mal mehr aktives β -Catenin vor. Bei den Zelllinien UT-SCC-16A, -60A und -60B war dieser Effekt statistisch signifikant

(UT-SCC-16A: $p \leq 0,001$; UT-SCC-60A: $p = 0,01$; UT-SCC-60B: $p = 0,02$). Die Behandlung mit DMSO führte bei UT-SCC-60A zu Veränderungen des β -Catenin-Levels, jedoch kam es hier im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu einer signifikanten Abnahme von aktivem β -Catenin ($p = 0,01$).



A



B

Abbildung 12: Western-Blot-Analysen des β -Catenin-Levels (aktiv) nach 24-stündiger Behandlung der HNSCC-Zelllinien UT-SCC-16A, -16B, -60A und -60B mit SB 216763 (10 μ M und 30 μ M) oder DMSO. (A) Repräsentative Western-Blot-Analysen. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. GAPDH diente als Ladekontrolle. Molekülmasse von aktivem β -Catenin: 92 kDa, Molekülmasse von GAPDH: 37 kDa. (B) Densitometrische Auswertung der Western-Blot-Analysen (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 3-4$, * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$).

3.2.2 Einfluss von SB 216763 auf den Phosphorylierungsstatus von GSK3 α/β

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle konnte nach 24-stündiger Behandlung der Zelllinien mit 10 μM und 30 μM SB 216763 mittels Western-Blot-Analyse außerdem eine konzentrationsabhängige Abnahme der Phosphorylierung an Tyr279 (GSK3 α) und Tyr216 (GSK3 β) gezeigt werden (Abbildung 13A). Der Effekt war mit einer Ausnahme statistisch hochsignifikant ($p < 0,001$) (Abbildung 13B). DMSO hatte keinen Einfluss auf die Tyrosinphosphorylierung. Ein einheitlicher Effekt von SB 216763 auf die Serinphosphorylierung konnte hingegen nicht gezeigt werden.

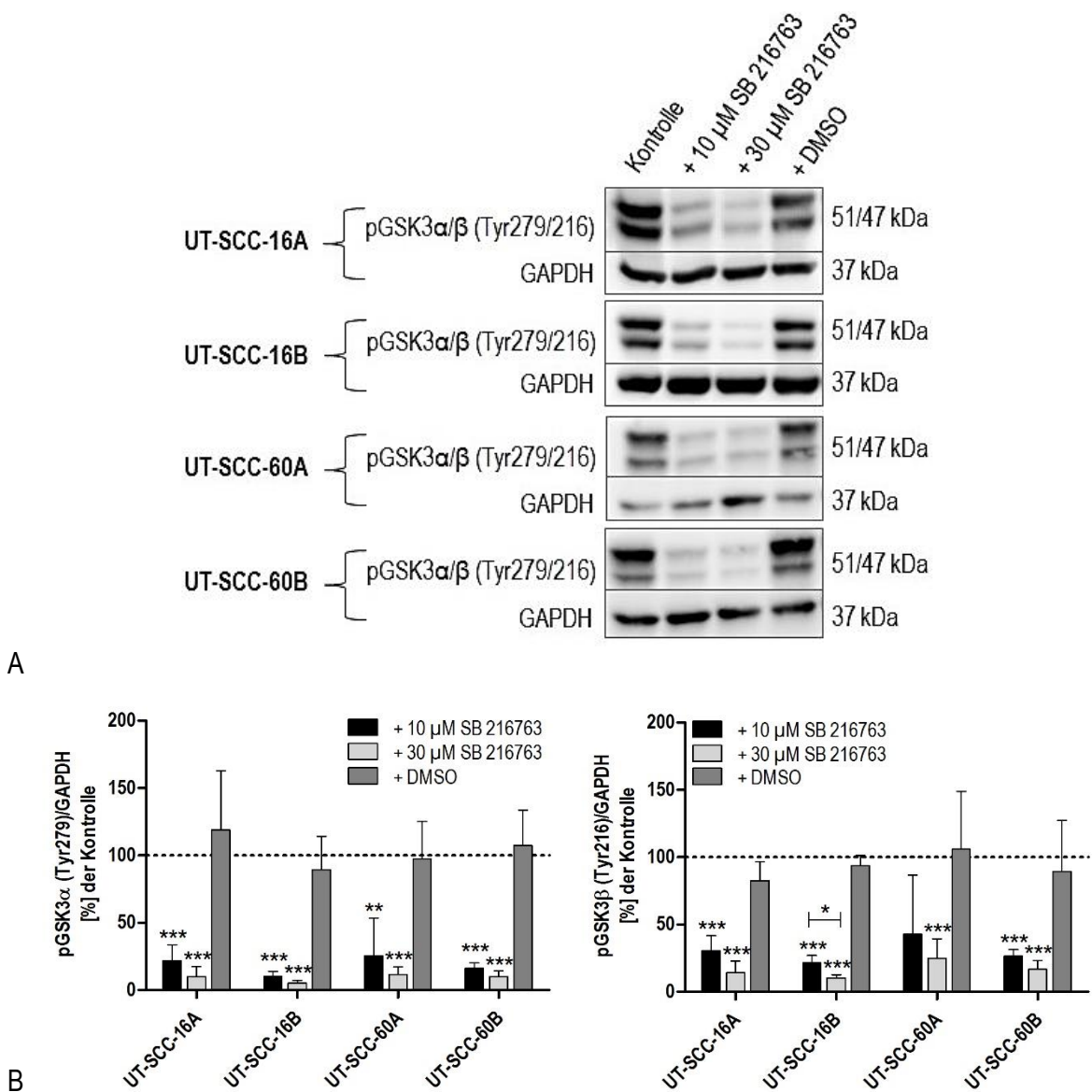


Abbildung 13: Western-Blot-Analysen der Phosphorylierung an Tyr279 (GSK3 α) und Tyr216 (GSK3 β) in den HNSCC-Zelllinien UT-SCC-16A, -16B, -60A und -60B nach 24-stündiger Behandlung mit SB 216763 (10 μM und 30 μM) oder DMSO. (A) Repräsentative Western-Blot-Analysen. GAPDH diente als Ladekontrolle. Molekülmasse von pGSK3 α/β (Tyr279/216): 51/47 kDa, Molekülmasse von GAPDH: 37 kDa. (B) Densitometrische Auswertung der Western-Blot-Analysen (Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 3, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,001$).**

3.2.3 Einfluss von SB 216763 auf die Viabilität von HNSCC-Zelllinien

Im Folgenden sollte mittels MTT-Assay ein möglicher Einfluss von SB 216763 auf die Viabilität von HNSCC-Zelllinien untersucht werden. Wie bereits in den vorherigen Versuchen, wurden die Zelllinien UT-SCC-16A, -16B, -60A, und -60B mit 10 μ M und 30 μ M SB 216763 sowie DMSO behandelt. Die Optische Dichte wurde anschließend nach 6, 24, 48 und 72 Stunden spektrophotometrisch gemessen.

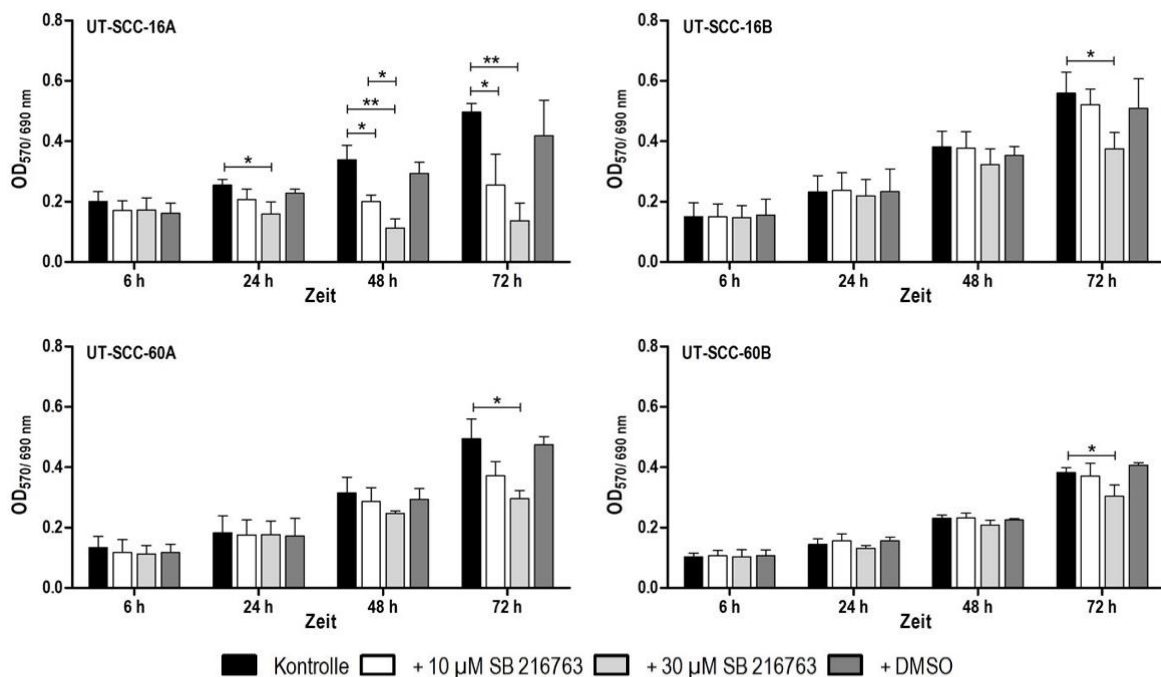


Abbildung 14: Untersuchung des Einflusses von SB 216763 auf die Zellviabilität der HNSCC-Zelllinien UT-SCC-16A, -16B, -60A und -60B mittels MTT-Assay. Die Zellen (5000/Well) wurden ausgesät, für 24 Stunden inkubiert und anschließend mit SB 216763 (10 μ M und 30 μ M) oder DMSO behandelt. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Die Messung der Optischen Dichte (OD) erfolgte nach weiteren 6, 24, 48 und 72 Stunden Inkubation bei einer Wellenlänge von 570/690 nm (Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 3, * p \leq 0,05, ** p \leq 0,01).

Die Optische Dichte nahm über 72 Stunden bei nahezu allen Zelllinien und Versuchsbedingungen zu (Abbildung 14). Eine Ausnahme bildete die Zelllinie UT-SCC-16A, bei der es nach Behandlung mit 30 μ M SB 216763 zu einer Abnahme der Optischen Dichte kam. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle führte die Inkubation mit 30 μ M SB 216763 nach 72 Stunden bei allen Zelllinien zu einer signifikanten Verringerung der Zellviabilität (UT-SCC-16A: p = 0,001; UT-SCC-16B: p = 0,04; UT-SCC-60A: p = 0,02; UT-SCC-60B: p = 0,05). Bei UT-SCC-16A war der Effekt bereits nach 24 Stunden (p = 0,04) sowie 48 Stunden (p = 0,005) nachweisbar. Hier führte auch die Inkubation

mit 10 μM SB 216763 nach 48 Stunden ($p = 0,02$) und 72 Stunden ($p = 0,03$) zu einer signifikant verringerten Zellviabilität. Bei den anderen Zelllinien konnte unter 10 μM SB 216763 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Bei UT-SCC-16A zeigte sich nach 48 Stunden außerdem ein signifikanter Unterschied in der Viabilität zwischen Zellen die mit 10 μM und 30 μM SB 216763 ($p = 0,03$) behandelt wurden. Ein Einfluss von DMSO konnte ausgeschlossen werden. Zusammenfassend hatte SB 216763 einen zeit- und konzentrationsabhängigen Einfluss auf die Viabilität der HNSCC-Zelllinien, wobei die Viabilität der Zelllinie UT-SCC-16A am stärksten beeinflusst wurde.

3.2.4 Einfluss von SB 216763 auf die Expression von EMT-Markern

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Behandlung der HNSCC-Zelllinien UT-SCC-16A, -16B, -60A und -60B mit dem GSK3 α/β -Inhibitor SB 216763 zu Veränderungen der mRNA-Expression epithelialer (E-Cadherin, Cytokeratin 8) sowie mesenchymaler (N-Cadherin, Vimentin, Fibronectin, Snail, Slug, Twist) EMT-Marker führt. Zunächst wurde jedoch die mRNA-Expression der EMT-Marker in den unbehandelten HNSCC-Zelllinien betrachtet. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Zelllinien sowohl epitheliale als auch mesenchymale Marker exprimierten (Tabelle 25). Dabei war der mesenchymale Marker Fibronectin am stärksten und die Transkriptionsfaktoren Snail und Twist am geringsten exprimiert.

Tabelle 25: Analyse der mRNA-Expression ($\times 10^{-4}$) von EMT-Markern in den HNSCC-Zelllinien UT-SCC-16A, -16B, -60A und -60B mittels qRT-PCR. (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 3$).

EMT-Marker	UT-SCC-16A	UT-SCC-16B	UT-SCC-60A	UT-SCC-60B
Cytokeratin 8	13,53 \pm 1,90	17,13 \pm 3,22	16,72 \pm 1,48	42,93 \pm 1,16
E-Cadherin	121,04 \pm 9,84	112,89 \pm 11,63	105,59 \pm 26,01	95,42 \pm 3,41
N-Cadherin	33,35 \pm 11,18	11,14 \pm 2,02	27,13 \pm 4,05	27,14 \pm 3,63
Vimentin	21,04 \pm 26,99	25,61 \pm 20,13	110,13 \pm 92,35	241,70 \pm 11,28
Fibronectin	1163,98 \pm 339,43	159,43 \pm 59,21	214,89 \pm 113,29	205,71 \pm 2,06
Snail	0,57 \pm 0,1	0,14 \pm 0,002	0,006 \pm 0,001	0,01 \pm 0,007
Slug	3,54 \pm 0,97	7,01 \pm 0,83	28,56 \pm 6,9	47,22 \pm 12,36
Twist	0,74 \pm 0,33	1,77 \pm 0,38	0,084 \pm 0,06	1,71 \pm 0,33

Anschließend wurden die Zelllinien mit SB 216763 (10 μM und 30 μM) oder DMSO behandelt und die relative Expression der EMT-Marker im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle mittels $\Delta\Delta C_T$ -Methode berechnet (Abbildung 15). Die Behandlungsdauer betrug 6 Stunden.

Relevante Veränderungen ($\geq 1,5$ -fache Hoch- oder Herunterregulation) der mRNA-Expression konnten nach der Inhibitor-Behandlung vor allem bei Slug und Twist beobachtet werden. So war die Expression von Slug bei UT-SCC-16B nach Inkubation mit 10 μM und 30 μM SB 216763 signifikant hochreguliert (10 μM SB 216763: 1,73-fach, $p = 0,023$) bzw. (30 μM SB 216763: 2,05-fach, $p = 0,01$). Tendenziell führte die Behandlung mit 10 μM und 30 μM SB 216763 bei UT-SCC-16A ebenfalls zu einer Hochregulation der Slug-Expression (10 μM SB 216763: 1,76-fach; 30 μM SB 216763: 1,73-fach). Auch bei UT-SCC-60A und -60B konnte unter 30 μM SB 216763 eine nicht signifikante Hochregulation von Slug nachgewiesen werden (UT-SCC-60A: 1,5-fach, UT-SCC-60B: 1,85-fach).

Im Gegensatz zu Slug wurde die Expression des Transkriptionsfaktors Twist in den Zelllinien UT-SCC-16B und -60B durch die Behandlung mit SB 216763 herunterreguliert. Bei UT-SCC-60B war die Expression von Twist unter 30 μM SB 216763 signifikant vermindert (1,92-fach, $p = 0,034$). Die geringere Inhibitor-Konzentration führte hingegen nicht zu einer relevanten Veränderung der Twist-Expression. Bei UT-SCC-16B kam es nach Inkubation mit 10 μM SB 216763 zu einer Herunterregulation der Twist-Expression (1,59-fach). Dieser Effekt war jedoch nicht statistisch signifikant.

Bei Cytokeratin 8, E-Cadherin, N-Cadherin, Vimentin, Fibronectin und Snail konnte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle keine relevante Veränderung der Expression ($< 1,5$ -fache Hoch- oder Herunterregulation) beobachtet bzw. ein Einfluss von DMSO nicht ausgeschlossen werden. Der für die EMT charakteristische Cadherin-Switch, welcher durch die Abnahme der Expression von E-Cadherin und gleichzeitige Zunahme von N-Cadherin definiert ist, konnte nach 6-stündiger Behandlung von HNSCC-Zelllinien mit SB 216763 nicht nachgewiesen werden.

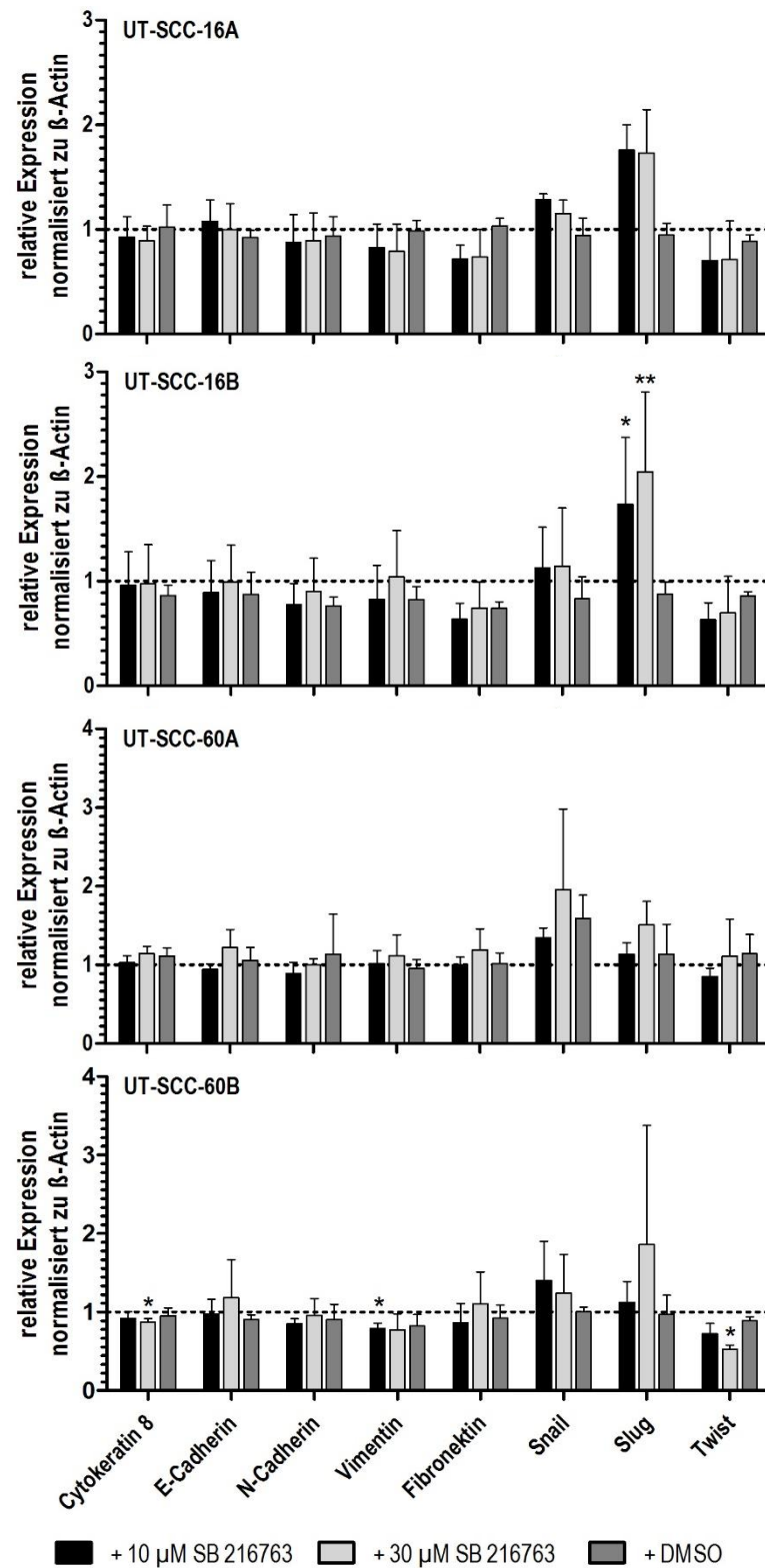


Abbildung 15: Analyse der relativen Expression von EMT-Markern nach 6-stündiger Behandlung der HNSCC-Zelllinien UT-SCC-16A, -16B, -60A und -60B mit SB 216763 (10 μ M und 30 μ M) oder DMSO mittels qRT-PCR. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Die Expression wurde mittels $\Delta\Delta C_T$ -Methode zunächst auf die Expression des Referenzgens β -Actin und anschließend auf die unbehandelte Kontrolle bezogen. Werte > 1 entsprechen einer Hochregulation der Expression des untersuchten Gens im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, Werte < 1 einer Herunterregulation. (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 3$, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$).

3.2.5 Einfluss von SB 216763 auf die Migration von HNSCC-Zelllinien

Im folgenden Abschnitt sollte mittels RTCA-Assays untersucht werden, ob SB 216763 Einfluss auf die Migrationsaktivität der HNSCC-Zelllinien hat. Für die Versuche wurden je 60.000 Zellen der Zelllinien UT-SCC-16A, -16B, -60A und -60B mit SB 216763 (10 μ M und 30 μ M) oder DMSO behandelt und der Zellindex über einen Zeitraum von 18 Stunden ermittelt. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle und reines Medium zur Normalisierung des Zellindex.

Die Behandlung mit dem GSK3 α/β -Inhibitor hatte in allen Zelllinien einen zeit- und konzentrations-abhängigen migrationsinhibierenden Effekt (Abbildung 16A). In Abbildung 16B wurde der Anstieg des Zellindex über einen Zeitraum von 13 Stunden (5.–18. Stunde) dargestellt. Die ersten Stunden nach Versuchsbeginn wurden dabei nicht berücksichtigt, da sich die Zellen zu diesem Zeitpunkt noch nicht vollständig auf der Membran abgesetzt haben und die ermittelten Anstiege somit fehlerhaft gewesen wären. Der Zellindex-Anstieg war bei den Zelllinien UT-SCC-16A, -16B und -60B nach Behandlung mit 30 μ M SB 216763 gegenüber der unbehandelten Kontrolle signifikant verringert (UT-SCC-16A: $p = 0,03$; UT-SCC-16B: $p = 0,008$; UT-SCC-60B: $p = 0,01$). Bei UT-SCC-60A war diesbezüglich eine Tendenz zu erkennen, die aufgrund der hohen Standardabweichung jedoch nicht statistisch signifikant war. Auch nach Behandlung mit 10 μ M SB 216763 war bei UT-SCC-60B im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ein signifikant verminderter Anstieg des Zellindex zu erkennen ($p = 0,04$). Bei den restlichen Zelllinien wurde diese Tendenz ebenfalls beobachtet. Darüber hinaus konnte bei UT-SCC-16B ein signifikanter Unterschied zwischen der Behandlung mit 10 μ M und 30 μ M SB 216763 gezeigt werden ($p = 0,04$). DMSO hatte keinen Einfluss auf die Zellmigration.

Aus den Daten wurde außerdem ersichtlich, dass die Zelllinien starke Unterschiede in der Höhe des Zellindex aufwiesen. UT-SCC-16A und -16B erreichten nach 18 Stunden einen deutlich höheren Zellindex als UT-SCC-60A und -60B. Der Unterschied war insbesondere bei unbehandelten und DMSO-behandelten Zellen sichtbar.

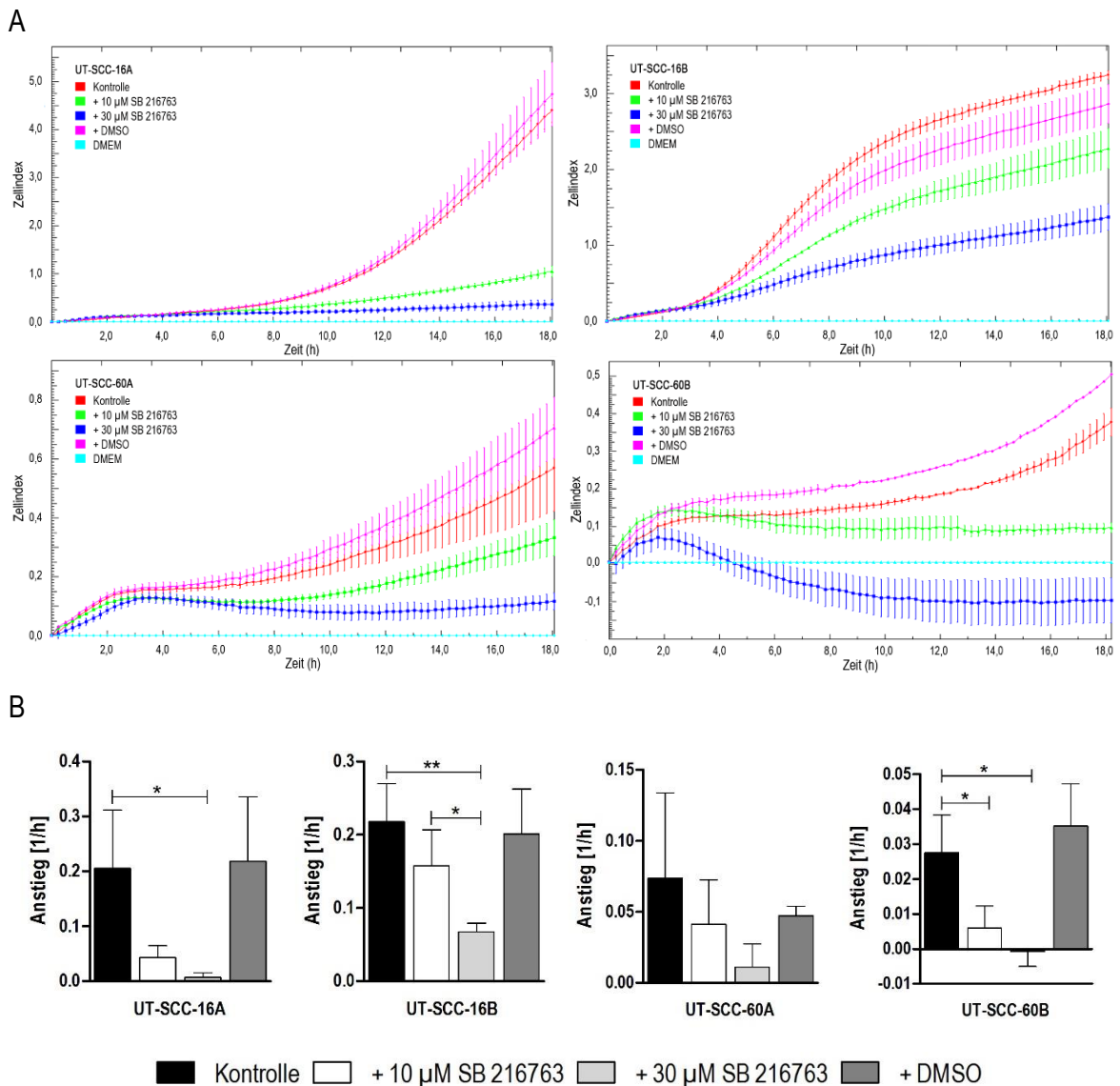


Abbildung 16: Untersuchung der Zellmigration von UT-SCC-16A, -16B, -60A und -60B unter Einfluss von SB 216763 mittels RTCA-Assay. (A) Die Zellen (60.000/Well) wurden in CIM-Plates 16 ausgesät und mit SB 216763 (10 µM und 30 µM) oder DMSO behandelt. Der Zellindex wurde in 15-minütigen Abständen über 18 Stunden gemessen. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle, reines Medium zur Normalisierung des Zellindex. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung von Triplikaten eines repräsentativen Experiments ($n = 3$) dargestellt. (B) Darstellung des Zellindex-Anstiegs (5.–18. Stunde). (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 3$, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$).

Um die Ergebnisse der impedanzbasierten Messung zu verifizieren, wurden mit UT-SCC-16B, -60A und -60B unter den gleichen Versuchsbedingungen Wundheilungsassays durchgeführt. Aufgrund technischer Schwierigkeiten konnte die Zelllinie UT-SCC-16A für diesen Versuch nicht verwendet werden. Abbildung 17 zeigt exemplarisch die Migration der Zelllinien UT-SCC-60A und -60B in den zellfreien Bereich. Unbehandelte Zellen migrierten deutlich schneller und verschlossen den zellfreien Bereich nach 12 Stunden fast (UT-SCC-60A) bzw. vollständig (UT-SCC-60B).

Im Gegensatz dazu war der Bereich bei behandelten Zellen, insbesondere nach Behandlung mit 30 μM SB 216763, zu diesem Zeitpunkt noch deutlich sichtbar. Die Zelllinie UT-SCC-16B migrierte unter Einfluss des Inhibitors ebenfalls langsamer. DMSO hatte keinen Effekt auf die Migrationsaktivität (Daten nicht gezeigt).

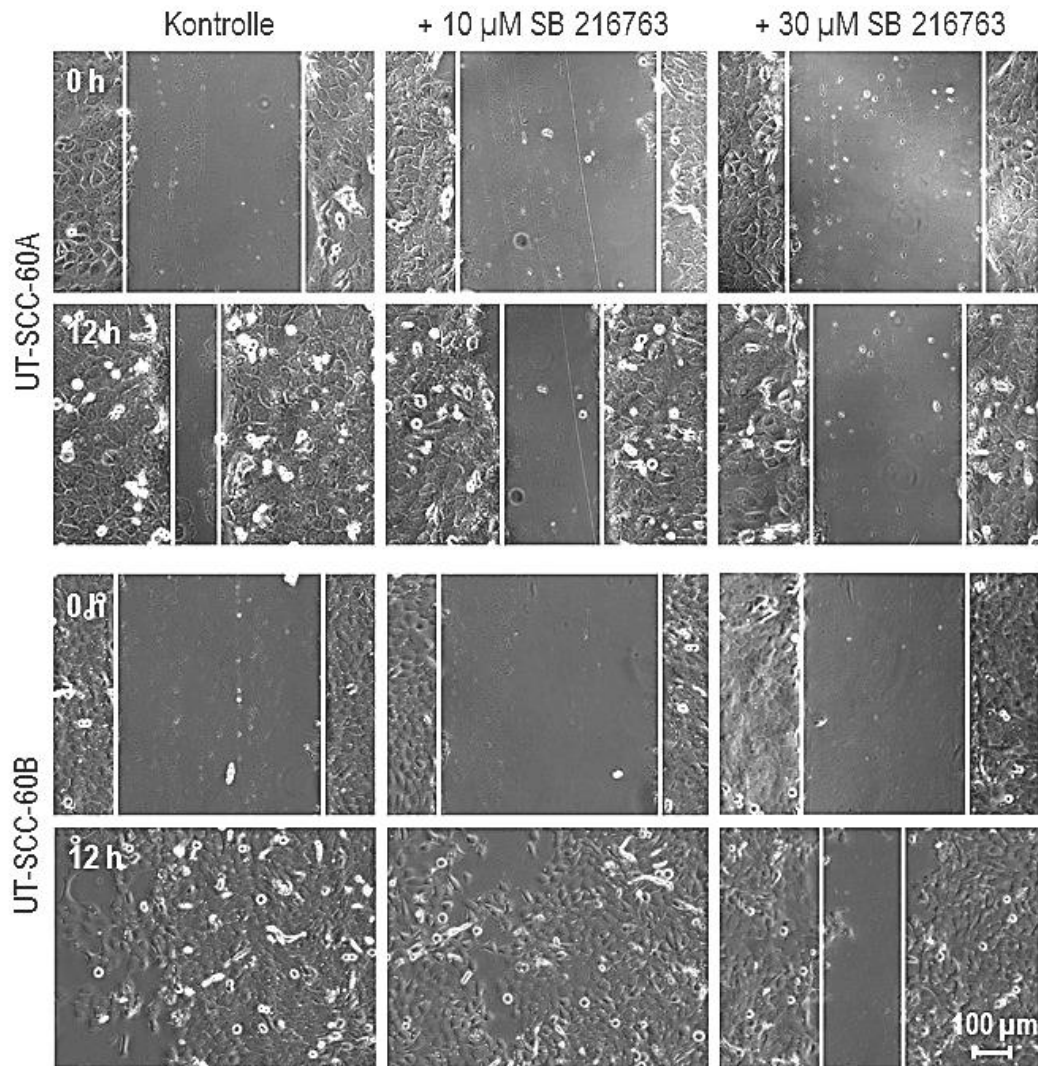


Abbildung 17: Untersuchung des Migrationsverhaltens der HNSCC-Zelllinien UT-SCC-60A und -60B unter Einfluss von SB 216763 mittels Wundheilungsassay. Die Zellen (150.000/Kammer) wurden ausgesät und bis zum Erreichen vollständiger Konfluenz inkubiert. Anschließend wurde mit Hilfe einer Pipettenspitze ein zellfreier Bereich geschaffen und die Zellen mit SB 216763 (10 μM und 30 μM) oder DMSO (Daten nicht gezeigt) behandelt. Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle. Die Abbildung zeigt den zellfreien Bereich zu Beginn des Versuches und 12 Stunden nach der Behandlung. Repräsentative Darstellung eines Experiments ($n = 3$). Maßstabbalken 100 μm .

In Abbildung 18 ist die quantitative Auswertung der Versuche dargestellt. Bei UT-SCC-60A traten signifikante Unterschiede in der Breite des zellfreien Bereiches zwischen unbehandelten Zellen und behandelten Zellen (10 μ M und 30 μ M SB 216763) erstmals nach 6 Stunden auf. Nach 4, 6, 8 und 10 Stunden waren auch signifikante Unterschiede zwischen 10 μ M und 30 μ M SB 216763 sichtbar. Bei UT-SCC-60B waren signifikante Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Zellen erstmals nach 8 Stunden Behandlungsdauer sichtbar. Dies galt jedoch lediglich für die höhere Inhibitor-Konzentration.

Zusammenfassend konnte der konzentrationsabhängige migrationsinhibierende Effekt des GSK3 α / β -Inhibitors auch durch Wundheilungsassays gezeigt und damit die Ergebnisse der impedanzbasierten Messung bestätigt werden.

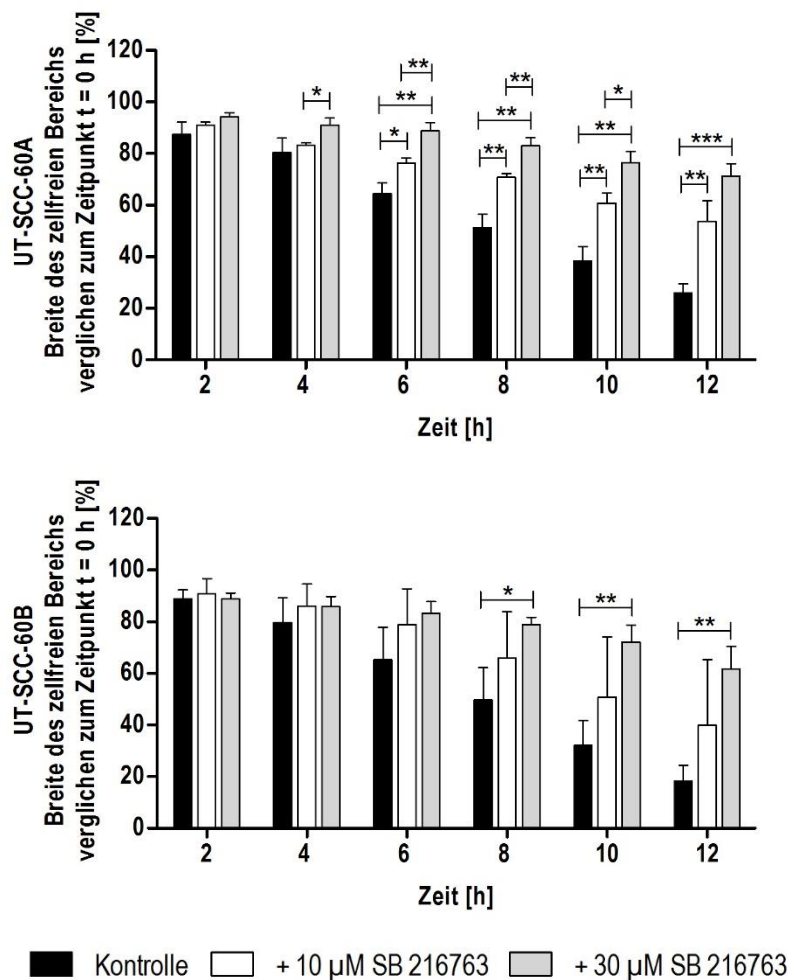


Abbildung 18: Untersuchung des Migrationsverhaltens der HNSCC-Zelllinien UT-SCC-60A und -60B unter Einfluss von SB 216763 mittels Wundheilungsassay. Quantifizierung der Migration in den zellfreien Bereich. Dargestellt ist die Breite des zellfreien Bereiches 2, 4, 6, 8, 10 und 12 Stunden nach Behandlung der Zellen, prozentual zum Startzeitpunkt (Mittelwert \pm Standardabweichung, n = 3, * p \leq 0,05, ** p \leq 0,01, *** p \leq 0,001).

4 Diskussion

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches (HNSCC) gehören weltweit zu den häufigsten malignen Erkrankungen. Trotz intensiver Erforschung der molekularen Grundlagen und Fortschritten in der Therapie hat sich die 5-Jahres-Überlebensrate in den letzten Jahrzehnten nur geringfügig verbessert und insbesondere lokoregionäre Rezidive stellen weiterhin ein großes Problem dar. Die Gründe des Therapieversagens sind vielfältig und hängen von individuellen Faktoren, beispielsweise den vorliegenden genetischen Alterationen, ab. Aus diesem Grund ist die Entwicklung neuer Therapiestrategien von besonderer Bedeutung. Seit einigen Jahren steht die zielgerichtete Krebstherapie (targeted therapy) im Fokus der Forschung. Hierbei sollen Schlüsselprozesse des Tumorwachstums, im Speziellen dysregulierte Signalwege und Proteine, spezifisch durch Antikörper oder niedermolekulare Inhibitoren moduliert werden. Zur gezielten Therapie von fortgeschrittenen HNSCC steht bisher der monoklonale EGFR-Antikörper Cetuximab zur Verfügung. Es ist jedoch notwendig, weitere dysregulierte Proteine und Signalwege zu identifizieren und somit neue potenzielle therapeutische Angriffspunkte zu finden. Insbesondere Proteinkinasen spielen bei der zielgerichteten Krebstherapie eine entscheidende Rolle, da sie zahlreiche Zellfunktionen regulieren und ihre Aktivität in malignen Erkrankungen häufig fehlgesteuert ist. Auch die Serin-/Threoninkinase Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3) scheint in malignen Erkrankungen dysreguliert vorzuliegen. Die Kinase ist an der Steuerung diverser Signalwege beteiligt und besitzt Einfluss auf Zellfunktionen und -prozesse, die bei der Entstehung und Progression von Tumorerkrankungen von Bedeutung sind. Beispielsweise werden Zellmetabolismus und Zellzyklus, Apoptose, Proliferation, Migration und Zelldifferenzierung sowie inflammatorische Prozesse durch GSK3 reguliert. Die Rolle von GSK3 bei der Pathogenese maligner Erkrankungen wird in der Literatur kontrovers diskutiert, da in Abhängigkeit des Zelltyps und Ursprungsgewebes zum einen die Überexpression oder konstitutive Aktivierung und zum anderen die verminderte Expression oder Inaktivierung von GSK3 zur Tumorentstehung führen kann. Da GSK3 als negativer Regulator diverser Proteine gilt, die eng mit der Pathogenese von HNSCC verknüpft sind, wurde für die Kinase bisher eine tumorsupprimierende Funktion angenommen⁹². Bislang wurden jedoch nur wenige Arbeiten veröffentlicht, die dies experimentell bestätigen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, einen tieferen Einblick in die Rolle von GSK3 bei HNSCC zu erhalten.

4.1 Proteinexpression und Phosphorylierungsstatus von GSK3 α / β in HNSCC

Im Rahmen dieser Arbeit konnten GSK3 α und GSK3 β mittels Western-Blot-Analyse sowohl in den HNSCC-Zelllinien UT-SCC-16A, -16B, -60A und -60B als auch in HNSCC-Gewebeproben verschiedener anatomischer Lokalisationen, Tumorstadien und histologischer Differenzierungen nachgewiesen werden. Die Proteinexpression und der Phosphorylierungsstatus von GSK3 α / β in HNSCC-Gewebeproben wurden bisher lediglich von einer weiteren Arbeitsgruppe untersucht. In der kürzlich veröffentlichten Studie wurde die Expression von GSK3 α / β in 57 Mundhöhlenkarzinomen (u. a. Plattenepithelkarzinome und Speicheldrüsenkarzinome) immunhistochemisch analysiert. Dabei konnten ebenfalls beide Isoformen nachgewiesen werden, jedoch war GSK3 β insbesondere in den Plattenepithelkarzinomen signifikant stärker exprimiert als GSK3 α ¹⁰¹. Dieses Ergebnis konnte in der vorliegenden Arbeit weder bei den HNSCC-Gewebeproben noch den HNSCC-Zelllinien bestätigt werden. Die Gewebeproben zeigten eine heterogene Proteinexpression der Isoformen. Bei Betrachtung aller Gewebeproben war das GSK3 α -Proteinlevel signifikant höher als das GSK3 β -Level. Die Zelllinien zeigten im Vergleich zu den Gewebeproben ein homogeneres Proteinexpressionsmuster und höhere GSK3 β -Level, jedoch war GSK3 β auch hier nicht stärker exprimiert als GSK3 α . Ursache für die abweichenden Ergebnisse könnten unter anderem methodische Unterschiede sein. Tumorproben weisen eine heterogene Zusammensetzung auf und enthalten neben malignen Zellen in unterschiedlichem Maße auch Stromazellen, welche GSK3 α / β möglicherweise stärker oder schwächer exprimieren als maligne Zellen. Im Gegensatz zur Western-Blot-Analyse, bei der die Proteine des gesamten Gewebes analysiert werden, können Tumorzellen und Stromazellen in der immunhistochemischen Färbung unterschieden und separat beurteilt werden. Zudem könnte auch die Herkunft und Ätiologie der Proben einen Einfluss auf die Proteinexpression von GSK3 α / β haben und Ursache für die Diskrepanz der Ergebnisse sein. In die genannte Studie wurden ausschließlich indische Patienten einbezogen. Während in westlichen Regionen vor allem Alkohol- und Tabakkonsum sowie HPV-Infektionen die Hauptrisikofaktoren für Mundhöhlenkarzinome darstellen, tragen in Indien andere, lokale Faktoren wie der Verzehr von Produkten der Mahua-Pflanze und das Kauen von Betelnüssen zur Entstehung der Erkrankung bei¹⁰¹. In den letzten Jahren wurde zunehmend deutlich, dass sich HNSCC in Abhängigkeit der Ätiologie auf molekularer Ebene und in ihrem biologischen Verhalten unterscheiden¹¹⁵. Die Untersuchung der Proteinexpression von GSK3 α / β in Zusammenhang mit der Ätiologie der Karzinome wäre somit ein interessanter Ansatz für nachfolgende Studien.

Ein Zusammenhang zwischen der Proteinexpression von GSK3 α und GSK3 β in HNSCC-Gewebeproben und klinisch-pathologischen Parametern wie Differenzierungsgrad, T-Stadium und Nodalstatus konnte in dieser Arbeit nicht hergestellt werden. Ursache hierfür ist zum einen die geringe Probenanzahl. Außerdem handelte es sich bei allen untersuchten Proben um lokal fortgeschrittene oder bereits metastasierte Tumore. Frühe Tumorstadien (T1/T2 und N0/N1) und Präkanzerosen wurden hingegen nicht untersucht. In der Literatur finden sich zwei Arbeiten, bei denen die GSK3 α/β -Expression in gesundem Gewebe, Präkanzerosen und Kopf-Hals-Karzinomen verglichen wurde. Da andere Schleimhautbezirke bei HNSCC-Patienten mit jahrelangem Alkohol- und Nikotinkonsum aufgrund der sogenannten Feldkanzerisierung häufig auch pathologisch verändert sind und Epithelgewebe somit nicht sicher als „gesund“ eingestuft werden kann, wurde in diesen Studien Epithelgewebe von gesunden Patienten als Kontrolle verwendet¹¹⁶. Mishra *et al.* beschrieben, dass GSK3 α und GSK3 β in Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle stärker exprimiert werden, als in gesundem Gewebe und prämaligen Läsionen und postulierten eine Zunahme der Expression mit Progression der Erkrankung¹⁰¹. Goto *et al.* untersuchten nur die Proteinexpression von GSK3 β und kamen zu einem anderen Ergebnis. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass die Proteinexpression von GSK3 β in Plattenepithelkarzinomen der Zunge im Vergleich zu gesundem Zungenepithel gleichstark oder vermindert ist¹¹⁷. Ob es während der malignen Transformation von Epithelzellen zu Veränderungen der GSK3 α/β -Expression kommt, muss somit weiter untersucht werden.

Neben der Proteinexpression wurde im Rahmen dieser Arbeit auch der Phosphorylierungsstatus von GSK3 α/β in HNSCC-Gewebeproben und Zelllinien untersucht, da die posttranslationale Phosphorylierung einen wichtigen Mechanismus zur Regulierung der Enzymaktivität von GSK3 darstellt⁷². In der Literatur wird insbesondere die Phosphorylierung der Serinreste Ser21/9 und/oder der Tyrosinreste Tyr279/216 als Nachweis für die Aktivität von GSK3 α/β verwendet, wobei die Phosphorylierung der Serinreste mit Inaktivität der Kinase und die Phosphorylierung der Tyrosinreste mit Aktivität der Kinase assoziiert wird^{78,85}. Shakoori *et al.* konnten in etablierten Kolonkarzinom-Zelllinien und Tumorproben pGSK3 β (Tyr216), jedoch nicht pGSK3 β (Ser9) nachweisen und nahmen aufgrund der aktivierenden Phosphorylierung eine tumorfördernde Funktion von GSK3 β bei kolorektalen Karzinomen an¹¹⁸. Die Arbeitsgruppe um Leis wies in fortgeschrittenen murinen Hautkarzinomen hingegen pGSK3 β (Ser9), jedoch nicht pGSK3 β (Tyr216) nach und schlussfolgerte aufgrund der überwiegenden Inaktivierung eine tumorsupprimierende Funktion von GSK3 β ¹¹⁹. Im Gegensatz dazu konnten sowohl pGSK3 α/β (Ser21/9) als auch pGSK3 α/β (Tyr279/216) in den HNSCC-Zelllinien und in vier von sieben Gewebeproben mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden. Auch die immunhistochemische Färbung von HNSCC-Zelllinien und Tissue

Microarrays, welche Gewebeproben aus Primärtumoren und Metastasen von 19 Patienten enthielten, ergab mit Ausnahme eines Patienten das Vorliegen beider Phosphorylierungen. Aufgrund des verwendeten Antikörpers war bei der immunhistochemischen Färbung allerdings nur eine gemeinsame Betrachtung von GSK3 α und GSK3 β möglich. Die Tatsache, dass pGSK3 α/β (Ser21/9) und pGSK3 α/β (Tyr279/216) nicht nur im Tumorgewebe, sondern auch im umliegenden Bindegewebe detektiert werden konnten, verdeutlicht die ubiquitäre Expression der Kinase. Ein Zusammenhang zwischen Phosphorylierungsstatus und Metastasierung konnte nicht hergestellt werden, da pGSK3 α/β (Ser21/9) und pGSK3 α/β (Tyr279/216) in 10 von 19 Fällen gleichermaßen in zusammengehörigem Primärtumor- und Metastasengewebe nachgewiesen werden konnten und die Ergebnisse der übrigen neun Fälle uneinheitlich waren. Zusammenfassend könnte das Vorliegen der Serin- und Tyrosinphosphorylierung dafür sprechen, dass HNSCC nicht vom Überwiegen, sondern von einer feinregulierten Balance zwischen aktivierender und inaktivierender Phosphorylierung profitieren. Möglicherweise steht bei der Regulation der GSK3-Enzymaktivität in HNSCC jedoch auch ein anderer Mechanismus, beispielsweise die Bildung von Proteinkomplexen oder Veränderung der subzellulären Lokalisation, im Vordergrund. Diese Mechanismen sind unabhängig von der Phosphorylierung und können deshalb nicht durch Untersuchung des Phosphorylierungsstatus erfasst werden⁷⁴.

Einen Hinweis hierfür könnte die unterschiedliche subzelluläre Verteilung von pGSK3 α/β (Ser21/9) und pGSK3 α/β (Tyr279/216), die in den HNSCC-Zelllinien beobachtet werden konnte und in der Literatur bisher noch nicht beschrieben wurde, sein. Während pGSK3 α/β (Tyr279/216) homogen verteilt im Nukleus und Zytoplasma vorkam, akkumulierte pGSK3 α/β (Ser21/9) zusätzlich in perinukleären, vesikulären Strukturen. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Regulierung der GSK3-Enzymaktivität im Wnt/ β -Catenin-Signalweg nicht nur durch Bildung von Proteinkomplexen, sondern auch durch Veränderung der subzellulären Lokalisation erfolgt. Taelman *et al.* beobachteten, dass die Aktivierung des Signalwegs zur Sequestration von GSK3 in multivesikuläre Endosomen und somit zur Separation von GSK3 und seinen zytoplasmatischen Substraten führt. Durch die Sequestration wird die Kinase funktionell inhibiert und GSK3-Substrate vermindert abgebaut¹²⁰. Es ist denkbar, dass es sich bei den hier gezeigten perinukleären, vesikulären Strukturen ebenfalls um Endosomen handelt, die der Separation von pGSK3 α/β (Ser21/9) und damit der Regulation der Enzymaktivität dienen. Um diese Frage zu klären sollten weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden. Beispielsweise würde sich eine gleichzeitige Immunfluoreszenzfärbung von pGSK3 α/β (Ser21/9) und endosomalen Markern wie EEA1 (early endosome antigen 1), Rab5, Rab7 oder Rab11 anbieten.

4.2 Einfluss von SB 216763 auf permanente HNSCC-Zelllinien

Im zweiten Teil der Arbeit sollte untersucht werden, welchen Einfluss die pharmakologische Inhibierung von GSK3 α/β auf die Zellviabilität und Zellmigration sowie die Expression von EMT-Markern in HNSCC-Zelllinien hat. Der niedermolekulare Wirkstoff SB 216763 wurde in der Literatur als potenter und spezifischer Inhibitor von GSK3 α und GSK3 β beschrieben und bereits in Studien mit diversen Tumorzelllinien und *in vivo*-Modellen eingesetzt^{104,112,121}. Bei HNSCC-Zelllinien wurde der Inhibitor bislang nicht verwendet, weshalb zunächst seine Wirksamkeit überprüft werden sollte. Hierzu wurde das Proteinlevel von β -Catenin in An- und Abwesenheit des Inhibitors untersucht. Phosphorylierung von β -Catenin durch GSK3 führt zu seinem proteasomalen Abbau⁵². Bei GSK3-Inaktivierung bzw. Inhibierung bleibt die Phosphorylierung aus und β -Catenin akkumuliert im Zytoplasma. β -Catenin kann mittels spezifischer Antikörper entweder unabhängig von der Phosphorylierung (gesamtes oder totales β -Catenin) oder an den GSK3-Phosphorylierungsstellen Ser33, Ser37 und Thr41 unphosphoryliert (aktives β -Catenin) nachgewiesen werden. Bei Verwendung von Antikörpern gegen aktives β -Catenin können somit direkte Rückschlüsse auf die Aktivität von GSK3 gezogen werden, wohingegen das totale β -Catenin-Level weiteren Einflüssen unterliegt und Änderungen nicht nur auf die GSK3-Aktivität zurückzuführen sind⁷⁴. In den HNSCC-Zelllinien konnte bereits vor Behandlung mit SB 216763 aktives β -Catenin nachgewiesen werden. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe und lässt darauf schließen, dass der Wnt/ β -Catenin-Signalweg in den Zelllinien aktiviert ist und bereits ein Teil der GSK3-Moleküle inhibiert vorliegt¹²². Nach 24-stündiger Behandlung mit 10 μ M und 30 μ M SB 216763 konnte bei allen Zelllinien eine konzentrationsabhängige Zunahme von aktivem β -Catenin gezeigt werden. Andere Arbeitsgruppen beschrieben ebenfalls eine Erhöhung der β -Catenin-Level nach Behandlung mit SB 216763, jedoch sind die Ergebnisse nur bedingt vergleichbar, da in diesen Studien das totale β -Catenin-Level bestimmt wurde^{112–114,123–125}. Insgesamt zeigen die Untersuchungsergebnisse somit eine effektive und konzentrationsabhängige Inhibierung von GSK3 α/β durch SB 216763.

Die Behandlung mit SB 216763 hatte überraschenderweise nicht nur Einfluss auf das β -Catenin-Level der Zellen, sondern auch auf den GSK3 α/β -Phosphorylierungsstatus. Hier kam es durch SB 216763 in allen Zelllinien zu einer signifikanten Abnahme der aktivierenden Tyrosinphosphorylierung an Tyr279 (GSK3 α) und Tyr216 (GSK3 β). Aus der Literatur sind verschiedene Mechanismen der Tyrosinphosphorylierung von GSK3 α/β bekannt. Lesort *et al.* zeigten als erste Arbeitsgruppe, dass die Tyrosinkinase Fyn GSK3 β an Tyr216 phosphoryliert¹²⁶. Eine andere Arbeitsgruppe wies nach, dass dieser Tyrosinrest auch durch die Tyrosinkinase PYK2 (proline-rich

tyrosine kinase 2) phosphoryliert werden kann¹²⁷. Cole *et al.* erbrachten wiederum den Nachweis einer intramolekularen Autophosphorylierung von GSK3 α/β an Tyr279 und Tyr216¹²⁸. Somit ergeben sich mehrere mögliche Erklärungen für die vorliegenden Ergebnisse. Beispielsweise könnte SB 216763 nicht nur GSK3 α/β , sondern auch die Tyrosinkinase Fyn und PYK2 ATP-kompetitiv inhibieren und damit unspezifischer wirken, als zuvor durch Coghlan *et al.* beschrieben¹⁰⁴. Zudem wäre es möglich, dass der Inhibitor aufgrund seiner ATP-kompetitiven Wirkweise und Bindung an das aktive Zentrum der Kinase nicht nur die Übertragung von Phosphorylgruppen auf GSK3-Substrate, sondern auch die intramolekulare Autophosphorylierung von GSK3 α/β an den Tyrosinresten verhindert. Darüber hinaus könnte die Bindung des Inhibitors eine Konformationsänderung des Enzyms bewirken und so die Phosphorylierung durch Tyrosinkinase erschweren¹²⁸. Welcher der genannten Mechanismen für die Abnahme von pGSK3 α/β (Tyr279/216) in den HNSCC-Zelllinien verantwortlich ist, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. SB 216763 scheint die GSK3-Phosphorylierung jedoch nicht in allen Zelllinien gleichermaßen zu beeinflussen. So stellten Park *et al.* nach 2-stündiger Behandlung der Bronchialkarzinom-Zelllinie RH460 mit 10 μ M SB 216763 ebenfalls eine Abnahme der Tyrosinphosphorylierung fest¹²³. Bei den Kolonkarzinom-Zelllinien SW480 und HCT1116 konnten nach 24- und 48-stündiger Behandlung mit 25 μ M SB 216763 hingegen keine Veränderungen des GSK3 β -Levels und der Phosphorylierung beobachtet werden¹¹⁸. In den Kolonkarzinom-Zelllinien könnte somit ein anderer Mechanismus der Tyrosinphosphorylierung von GSK3 β vorliegen, der nicht durch SB 216763 beeinflusst wird.

4.2.1 Einfluss von SB 216763 auf die Viabilität von HNSCC-Zelllinien

Der Einfluss von SB 216763 auf die Viabilität von HNSCC-Zelllinien wurde mittels MTT-Assay untersucht. Dabei konnte ein zeit- und konzentrationsabhängiger Effekt nachgewiesen werden. Die Zelllinien reagierten in unterschiedlichem Maße auf die GSK3-Inhibierung, jedoch war die Viabilität aller untersuchter Zelllinien nach 72-stündiger Behandlung mit 30 μ M SB 216763 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant verringert. Insbesondere aufgrund der Zunahme von aktivem β -Catenin nach Behandlung mit SB 216763 war dieses Ergebnis zunächst überraschend, da β -Catenin durch Transkriptionsaktivierung Zellüberleben und Zellproliferation vermittelt⁸⁷. In der Literatur wurde eine Abnahme der Zellviabilität nach Behandlung mit GSK3-Inhibitoren oder GSK3 β -Gen-Knockdown (RNA-Interferenz) auch bei Zelllinien und *in vivo*-Modellen anderer Tumorentitäten (Kolonkarzinom, Multiples Myelom, Ovarialkarzinom, nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom, hepatozelluläres Karzinom, Pankreaskarzinom, Magenkarzinom, Prostatakarzinom, Malignes Melanom, *MLL*-Leukämie) beschrieben. Außerdem führte die Inhibierung von GSK3 in

diesen Studien auch zur Abnahme von Zellproliferation und Tumorwachstum sowie verstärkter Apoptose der Zellen^{96,112,118,121,124,125,129–132}. Bei der nicht-neoplastischen Zelllinie HEK293 konnten hingegen keine Veränderung von Viabilität, Proliferation und Apoptose nach GSK3-Inhibierung beobachtet werden¹¹⁸. Eine mögliche Erklärung für die Effekte beschrieben Ougolkov *et al.*, die die Auswirkungen der GSK3-Inhibierung bei Pankreaskarzinom-Zelllinien analysierten¹³³. Die Untersuchungen der Arbeitsgruppe basierten auf der Feststellung von Hoeflich *et al.*, dass GSK3 β zur vollständigen Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, der in malignen Tumoren häufig konstitutiv aktiv ist und u. a. Zellproliferation fördert und Apoptose unterdrückt, notwendig ist^{63,134}. Ougolkov *et al.* zeigten, dass GSK3 β Zellproliferation und -überleben durch Aktivierung der Transkription NF- κ B-abhängiger Gene reguliert. Nach GSK3-Inhibierung durch die ATP-kompetitiven Inhibitoren SB 216763 und AR-A014418 sowie RNA-Interferenz (GSK3 β) nahm die basale NF- κ B-Aktivität ab und die NF- κ B-Zielgene *Bcl-2* (B-cell lymphoma 2), *Bcl-xL* (B-cell lymphoma-extra large), *XIAP* (X-linked inhibitor of apoptosis protein) und *CCND1*, welche u. a. anti-apoptotische Proteine codieren, wurden auf mRNA-Ebene vermindert exprimiert. *In vivo* konnten nach GSK3-Inhibierung verminderte Proteinlevel von Bcl-2, XIAP und Cyclin D1 sowie reduzierte Zellproliferation, verstärkte Apoptose und vermindertes Tumorwachstum gezeigt werden⁹⁸. Auch beim Osteosarkom, Nierenzellkarzinom sowie chronisch lymphatischer Leukämie (CLL) wurde nach GSK3-Inhibierung eine verminderte Expression der NF- κ B-Zielgene und damit einhergehend verstärkte Apoptose und verminderte Zellproliferation beobachtet^{135–137}. Der Mechanismus, durch den SB 216763 in HNSCC-Zelllinien zur Abnahme der Viabilität führt, konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Eine erhöhte Expression und Aktivität von NF- κ B wurde jedoch auch in HNSCC beschrieben⁹⁰. Aus diesem Grund könnte die Hemmung der NF- κ B-Aktivität und verminderte Expression anti-apoptotischer Gene auch in HNSCC-Zelllinien ursächlich für die Abnahme der Viabilität nach pharmakologischer GSK3-Inhibierung sein. In der Literatur finden sich zudem weitere Mechanismen, durch die GSK3 Einfluss auf den programmierten Zelltod nehmen kann¹³⁸. Beispielsweise beschrieben Kotliarova *et al.*, dass GSK3-Inhibierung in Gliom-Zellen zur c-Myc-Aktivierung und damit zur verstärkten Expression der pro-apoptotischen Proteine Bax (Bcl-2-associated X protein), Bim (Bcl-2 interacting mediator of cell death), DR4 (death receptor 4), DR5 (death receptor 5), und TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) führt¹³⁹. Die Untersuchung der Expression NF- κ B und c-Myc-abhängiger Zielgene sowie deren Genprodukte könnte somit entscheidende Hinweise zum Wirkmechanismus von SB 216763 liefern und sollte deshalb in zukünftigen Studien weiter verfolgt werden.

4.2.2 Einfluss von SB 216763 auf die Expression von EMT-Markern und die Migration von HNSCC-Zelllinien

Die Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT) geht mit Veränderungen der Morphologie und Motilität epithelialer Zellen sowie der Stabilität des Epithelzellverbandes einher und gilt derzeit als auslösendes Ereignis der Invasion und Metastasierung von Zellen²⁷. In der vorliegenden Arbeit sollte mittels qRT-PCR der Einfluss von SB 216763 auf die Expression etablierter EMT-Marker in HNSCC-Zelllinien untersucht werden. Dabei konnte in Übereinstimmung mit Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zunächst gezeigt werden, dass die HNSCC-Zelllinien sowohl epitheliale (Cytokeratin 8, E-Cadherin) als auch mesenchymale EMT-Marker (N-Cadherin, Vimentin, Fibronectin, Snail, Slug, Twist) exprimieren und somit nicht eindeutig dem epithelialen oder mesenchymalen Phänotyp zugeordnet werden können¹²². Der Phänotyp von Zellen, die epitheliale und mesenchymale Marker exprimieren, wird als Übergangsphänotyp oder epithelialer/mesenchymaler Hybrid-Phänotyp bezeichnet¹⁴⁰. Hierbei könnte es sich um Zellen handeln, die nicht nur eine EMT, sondern auch eine MET durchlaufen haben und erneut epitheliale Marker exprimieren. Darüber hinaus gibt es Zellen, die eine unvollständige, partielle EMT durchlaufen und neben den erworbenen mesenchymalen Markern weiterhin epitheliale Marker exprimieren¹⁴¹. Es wird angenommen, dass sich die Zellen eines Tumors stark in der Expression der EMT-Marker unterscheiden und der Großteil der Zellen keine oder nur eine partielle EMT durchläuft. Die wenigen Zellen, die den Transitionsprozess vollständig durchlaufen, scheinen jedoch die lokale Invasionsfront des Tumors zu bilden und die Metastasierungskasade auszulösen²⁷.

In der Literatur wurde bisher beschrieben, dass GSK3 die Stabilität und subzelluläre Lokalisation EMT-induzierender Faktoren wie β -Catenin und Snail durch Phosphorylierung reguliert und somit zur Aufrechterhaltung der epithelialen Zellarchitektur beiträgt¹⁴². Bachelder *et al.* wiesen nach, dass GSK3 nicht nur die Stabilität und Lokalisation, sondern auch die Transkription von Snail negativ reguliert. So waren die mRNA-Level des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors nach genetischer und 24-stündiger pharmakologischer GSK3-Inhibierung in Brust- und Hautepithelzellen deutlich erhöht⁹⁵. Im Gegensatz dazu konnte nach Behandlung der HNSCC-Zelllinien mit SB 216763 keine Erhöhung der Snail-Expression festgestellt werden. Ursache für das abweichende Ergebnis könnte u. a. die kürzere Behandlungsdauer von 6 Stunden sein. Es ist denkbar, dass eine längere Behandlung der Zellen ebenfalls zur Hochregulation der Snail-Expression geführt hätte. Eine andere Erklärung könnte die bereits bestehende und womöglich maximale Expression von Snail in den unbehandelten HNSCC-Zelllinien sein. Auch die Stabilität und subzelluläre Lokalisation des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors Slug, der ebenfalls zur Snail-Superfamilie gehört und als

EMT-Induktor gilt, wird durch GSK3 β -vermittelte Phosphorylierung reguliert¹⁴³. Kim *et al.* zeigten, dass bei MCF-7-Zellen sowohl Mutationen im Bereich von GSK3 β -Phosphorylierungsstellen als auch die Behandlung mit dem GSK3-Inhibitor Lithiumchlorid zu erhöhten Slug-Leveln auf mRNA- und Proteinebene sowie erhöhter nukleärer Slug-Expression und Halbwertszeit des Proteins führten¹⁴⁴. Außerdem kann die Transkription von Slug durch den β -Catenin-TCF/LEF-Komplex induziert werden¹⁴⁵. Im Einklang mit der Literatur führte die Behandlung mit SB 216763 bei UT-SCC-16A und -16B (10 μ M und 30 μ M SB 216763) sowie UT-SCC-60A und -60B (30 μ M SB 216763) zu einer Hochregulation von Slug, wobei das Ergebnis lediglich bei UT-SCC-16B (10 μ M und 30 μ M SB 216763) statistisch signifikant war¹⁴⁶. Darüber hinaus konnte in den Zelllinien UT-SCC-16B (10 μ M SB 216763) und UT-SCC-60B (30 μ M SB 216763, signifikant) eine verminderte mRNA-Expression des EMT-fördernden basic Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktors Twist nach GSK3-Inhibierung festgestellt werden. Dieses Ergebnis war überraschend, da bisher angenommen wurde, dass auch Twist Substrat von GSK3 β ist und in ähnlicher Weise wie β -Catenin, Snail und Slug durch GSK3 reguliert wird¹⁴⁷. Beim Zelllinien-Paar UT-SCC-16A und -60A wurden hingegen keine relevanten Veränderungen der mRNA-Expression von Twist unter Einfluss von SB 216763 beobachtet.

Bei Snail, Slug und Twist handelt es sich um bekannte E-Cadherin-Repressoren. Die Transkriptionsfaktoren binden direkt an ein E-Box-Motiv im E-Cadherin-Promotor und reprimieren so die Transkription von E-Cadherin^{43,148,149}. Aufgrund der Hochregulation von Slug nach GSK3-Inhibierung wäre also eine gegenläufige Veränderung des E-Cadherin mRNA-Levels zu erwarten gewesen. Dies konnte jedoch in keiner Zelllinie beobachtet werden. Bachelder *et al.* konnten die Herunterregulation von E-Cadherin nach GSK3-Inhibierung auf mRNA- und Proteinebene zeigen, jedoch war auch hier der Behandlungszeitraum mit über 72 bzw. 48 Stunden deutlich länger als in der vorliegenden Arbeit⁹⁵.

Relevante Veränderungen der Expression von Cytokeratin 8 und N-Cadherin konnten in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Auch die mRNA-Expression von Vimentin und Fibronectin blieb unter Inhibitoreinfluss nahezu unverändert, obwohl in der Literatur eine Slug- und Twist-vermittelte Hochregulation der mesenchymalen Marker Vimentin und Fibronectin beschrieben wurde^{43,144,150}.

Zusammenfassend wurde nur die Expression von zwei der sieben untersuchten EMT-Marker durch SB 216763 relevant verändert. Ein Cadherin-Switch wurde nach Behandlung mit SB 216763 nicht nachgewiesen. Es sollten jedoch weitere Versuche mit längeren Behandlungszeiten durchgeführt werden, um mögliche verzögerte Effekte nachweisen zu können. Darüber hinaus sollten in weiterführenden Untersuchungen auch die Proteinlevel der EMT-Marker untersucht werden, da

Veränderungen des mRNA-Levels nicht zwangsläufig mit Veränderungen des Proteinlevels einhergehen.

Durch RTCA-Assays konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Migration von HNSCC-Zelllinien nach Behandlung mit SB 216763 zeit- und konzentrationsabhängig vermindert ist. Zudem wurde ein Unterschied in der Höhe des Zellindex zwischen den unbehandelten Zelllinien UT-SCC-16A/-16B und UT-SCC-60A/-60B beobachtet. Dieser ist am ehesten auf den geringeren Zelldurchmesser der Zelllinien UT-SCC-60A und -60B zurückzuführen, da der Zellindex neben der Anzahl migrierter Zellen auch von der Adhärenzstärke und Morphologie der Zellen abhängig ist. Um weitere zellmorphologische Aspekte als Ursache der gewonnenen Erkenntnisse auszuschließen, wurden Wundheilungsassays durchgeführt. Auch hier zeigte sich ein starker zeit- und konzentrationsabhängiger migrationsinhibierender Einfluss des Inhibitors. Da, mit Ausnahme von UT-SCC-16A, innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 12 bzw. 18 Stunden im MTT-Assay kein Effekt des Inhibitors auf die Zellviabilität festgestellt wurde, kann dies als Ursache der verminderten Migration ausgeschlossen werden. Die verminderte Migration der Zelllinien ist insbesondere in Hinblick auf die gegenläufige Regulation der Expression von Slug und Twist nach GSK3-Inhibierung bei den Zelllinien UT-SCC-16B und -60B interessant. Aus der Literatur ist bekannt, dass Slug und Twist an der Regulation der Zellmotilität beteiligt sind. Die Expression beider Transkriptionsfaktoren wird mit erhöhter Zellmotilität und damit einhergehend mit der Metastasierung und Invasion von Zellen assoziiert^{91,150,151}. Bei diversen Tumorentitäten, eingeschlossen HNSCC, konnte ein Zusammenhang zwischen der Expression von Slug bzw. Twist und der Metastasierung in Lymphknoten, Lymphgefäße und Venen sowie der Invasionstiefe des Tumors hergestellt werden^{152,153}. Im Umkehrschluss könnte die Herunterregulation von Twist bei UT-SCC-16B und -60B eine Ursache der verminderten Zellmigration sein. Die verminderte Migration der Zelllinien UT-SCC-16A und -60A kann damit jedoch nicht erklärt werden. Im Gegenteil wäre aufgrund der Hochregulation von Slug nach Behandlung mit SB 216763 eine verstärkte Migration zu erwarten gewesen.

Unabhängig von der Expression der EMT-Marker stehen die Ergebnisse dieser Arbeit im Einklang mit einer Studie von Farooqui *et al.* Die Arbeitsgruppe zeigte, dass GSK3 α und GSK3 β in MDCK-Zellen während der aktivsten Phase der Zellmigration aktiviert vorliegen und die Inhibierung von GSK3 im Wundheilungsassay zu reduzierter Zellmigration führt. Demnach ist insbesondere die Aktivität von GSK3 β für die Membranprotrusion der Zellschicht am Wundrand notwendig und damit von entscheidender Bedeutung für die Zellmigration¹⁵⁴. Auch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen stützen die Annahme, dass die Aktivität von GSK3 für die Zellmigration notwendig ist und GSK3 somit einen Beitrag zur Invasion und Metastasierung der Zellen leistet^{155,156}.

4.3 Schlussbetrachtung und Ausblick

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit neben der Proteinexpression von GSK3 α/β in HNSCC-Gewebeproben und -Zelllinien auch die zwiespältigen Funktionen der Serin-/Threoninkinase gezeigt werden. So führte die Behandlung der Zelllinien mit dem GSK3-Inhibitor SB 216763 auf der einen Seite zur Erhöhung des aktiven β -Catenin-Levels und auf der anderen Seite zur Abnahme von Zellviabilität und Zellmigration. Die bisherige Annahme einer reinen tumorsupprimierenden Funktion von GSK3 in HNSCC konnte somit nicht bestätigt werden. Im Gegenteil verdeutlichen die vorliegenden Ergebnisse, dass die Tumorzellen weder von einer kompletten Aktivierung, noch einer vollständigen Inaktivierung der Kinase profitieren. Während sich die partielle Inhibierung der GSK3 durch Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs positiv auf die Proliferation der Tumorzellen auswirkte, hatte die zusätzliche Inhibierung der Kinase durch SB 216763 negative Folgen für die Tumorzellen. Es scheint also vielmehr die Feinregulierung der GSK3-Enzymaktivität zu sein, die das Überleben, Wachstum und die Dissemination der Tumorzellen ermöglicht. Diese Balance zwischen aktivierter und inaktivierter GSK3 wird auch bei Betrachtung des Phosphorylierungsstatus von HNSCC-Gewebeproben und Zelllinien deutlich.

Die Mechanismen und Signalwege, über welche die gegensätzlichen Effekte vermittelt werden, wurden in dieser Arbeit nicht untersucht. Hier ergeben sich jedoch zahlreiche Fragestellungen für weiterführende Studien. Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob SB 216763 oder andere GSK3-Inhibitoren auch *in vivo* zelluläre Funktionen maligner Zellen beeinträchtigen und somit im Sinne einer zielgerichteten Therapie die Progression von HNSCC verhindern könnten. Insbesondere die Hemmung von Migration und Invasion wäre dabei von Bedeutung, da die lokoregionäre Metastasierung wie bereits erwähnt ein großes Problem bei HNSCC-Patienten darstellt. Häufig sind Erkenntnisse aus Versuchen mit Zelllinien jedoch nur eingeschränkt auf das *in vivo*-Verhalten von Tumoren übertragbar. Aus diesem Grund sollte im nächsten Schritt der Einfluss von GSK3-Inhibitoren auf Primärkulturen, die direkt aus Tumorgewebe gewonnen wurden und dem Ursprungsgewebe eher ähneln als permanente Zelllinien, sowie Xenograft-Modelle untersucht werden. Außerdem sollten die spezifischen Funktionen der beiden Isoformen in weiterführenden Studien umfassend untersucht werden. Da SB 216763 GSK3 α und GSK3 β gleichermaßen inhibiert, lassen die vorliegenden Ergebnisse keine Aussagen darüber zu, ob die Effekte durch Inhibierung einer oder beider Isoformen vermittelt werden. Bisher existieren jedoch keine kommerziell erhältlichen Wirkstoffe zur isoformspezifischen Inhibierung. Ursache hierfür ist die hohe Übereinstimmung der ATP-Bindungs tasche von GSK3 α und GSK3 β ¹⁵⁷. Für die Analyse isoformspezifischer Funktionen müssten somit gentechnische Methoden wie die RNA-Interferenz

herangezogen werden. Insbesondere Erkenntnisse über die Funktion von GSK3 α wären interessant, da in vielen der zitierten Studien lediglich die Funktion von GSK3 β untersucht wurde. Es gibt jedoch viele Hinweise, dass die Isoformen unterschiedliche zelluläre Funktionen und Prozesse beeinflussen^{137,158}. Beispielsweise konnten Gao *et al.* kürzlich zeigen, dass GSK3 α *in vitro* vor allem für die Zellproliferation, Kolonieformation und Apoptose von Prostatakarzinom-Zelllinien sowie *in vivo* für das Wachstum von Prostatakarzinom-Xenografts verantwortlich ist, wohingegen GSK3 β nur einen geringen Einfluss hatte¹⁵⁶.

Der therapeutische Einsatz von GSK3-Inhibitoren ist durch die hohe Anzahl von Substraten und involvierten Signalwegen erschwert. Hier müsste bei der Verwendung von unselektiven Inhibitoren mit zahlreichen Nebenwirkungen gerechnet werden. Gegen diese Annahme spricht, dass der GSK3-Inhibitor Lithiumchlorid bereits seit vielen Jahren zur Therapie Bipolarer Störungen eingesetzt wird und keine schweren Nebenwirkungen bekannt sind⁷⁴. Dabei ist jedoch zu bedenken, dass Lithiumchlorid zu den schwächsten GSK3-Inhibitoren gehört¹⁵⁷. Sollte es in Zukunft jedoch gelingen den genauen Mechanismus zu erforschen, durch den GSK3 die Viabilität und Migration von HNSCC-Zellen negativ beeinflusst, könnte eine gezielte Inhibierung dieses Mechanismus erfolgsversprechend sein.

5 Zusammenfassung

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches (HNSCC) gehören weltweit zu den häufigsten malignen Erkrankungen. Da die herkömmlichen Therapieverfahren oft versagen und in vielen Fällen Rezidive auftreten, wird derzeit intensiv nach alternativen Therapiemöglichkeiten gesucht. Die Serin-/Threoninkinase Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3) ist Teil des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs und reguliert den Abbau sowie die subzelluläre Lokalisation zahlreicher onkogener Proteine. Aufgrund ihres Einflusses auf die Proliferation, Migration, Differenzierung und Apoptose von Zellen, wird die Kinase zunehmend als potenzielles therapeutisches Target diskutiert. Es konnte gezeigt werden, dass GSK3 die Tumorprogression je nach Zelltyp und Ursprungsgewebe fördern oder hemmen kann. Bisher wurde angenommen, dass GSK3 bei HNSCC als Tumorsuppressor fungiert. Dies ist jedoch nur unzureichend experimentell belegt und sollte in dieser Arbeit weiter untersucht werden.

In HNSCC-Gewebeproben und etablierten HNSCC-Zelllinien wurden hierzu mittels Western-Blot-Analyse und Immunhistochemie zunächst die Proteinlevel der Isoformen GSK3 α und GSK3 β sowie der Phosphorylierungsstatus, welcher Rückschlüsse auf die Enzymaktivität der Kinase zulässt, untersucht. Anschließend wurde der Einfluss des GSK3 α/β -Inhibitors SB 216763 auf das aktive β -Catenin-Level, die Viabilität (MTT-Assay) und Migration (RTCA-Assays und Wundheilungsassays) der Zelllinien sowie die Expression etablierter Marker der Epithelialen-Mesenchymalen Transition (qRT-PCR) untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten GSK3 α und GSK3 β in allen untersuchten Zelllinien und Gewebeproben nachgewiesen werden. Sowohl in den Zelllinien als auch den meisten Gewebeproben lagen die inaktivierende Serinphosphorylierung und die aktivierende Tyrosinphosphorylierung parallel vor. Dabei konnte erstmals gezeigt werden, dass die subzelluläre Lokalisation von GSK3 α/β in Abhängigkeit der Phosphorylierung variiert. Bei den Zelllinien führte die GSK3 α/β -Inhibierung durch SB 216763 einerseits zur Erhöhung des aktiven β -Catenin-Levels und andererseits zu einer konzentrations- und zeitabhängigen Abnahme der Zellviabilität. Darüber hinaus konnte eine signifikante zeit- und konzentrationsabhängige Abnahme der Zellmigration gezeigt werden. Außerdem wurden unter Einfluss von SB 216763 in einigen Zelllinien Veränderungen der mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren Slug (Hochregulation) und Twist (Herunterregulation) festgestellt.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit die Bedeutung der feinregulierten Balance zwischen Inaktivierung und Aktivierung von GSK3 für die Progression von HNSCC. Außerdem wurde deutlich, dass die Kinase in HNSCC sowohl tumorsupprimierende als auch -fördernde Funktionen hat. Ob GSK3-Inhibitoren auch *in vivo* wichtige Funktionen wie Zellviabilität und -migration beeinträchtigen muss jedoch in weiterführenden Studien geklärt werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt unter:
<https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html> (Tag des Zugriffs: 25.02.2017)
2. Fearon ER, Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759–67 (1990).
3. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL: Head and neck cancer. *Lancet* 371, 1695–709 (2008).
4. Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70 (2000).
5. Hanahan D, Weinberg RA: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–74 (2011).
6. International Agency for Research on Cancer unter:
http://globocan.iarc.fr/old/summary_table_site.html.asp?selection=11100&selection=21030&selection=18020&selection=13010&title=Larynx%2C+Other+pharynx%2C+Nasopharynx%2C+Lip%2C+oral+cavity&sex=0&type=0&window=1&africa=1&america=2&asia=3&europe=4&oceania=5&build=6&sort=0&submit=%C2%A0Execute%C2%A0 (Tag des Zugriffs: 25.02.2017)
7. International Agency for Research on Cancer unter:
http://globocan.iarc.fr/old/age-specific_table_r.asp?selection=75276&title=Germany&sex=0&type=0&stat=0&window=1&sort=0&submit=%C2%A0Execute%C2%A0 (Tag des Zugriffs: 25.02.2017)
8. International Agency for Research on Cancer unter:
http://globocan.iarc.fr/old/age-specific_table_r.asp?selection=75276&title=Germany&sex=1&type=0&stat=0&window=1&sort=0&submit=%C2%A0Execute%C2%A0 (Tag des Zugriffs: 25.02.2017)
9. International Agency for Research on Cancer unter:
http://globocan.iarc.fr/old/age-specific_table_r.asp?selection=75276&title=Germany&sex=2&type=0&stat=0&window=1&sort=0&submit=%C2%A0Execute%C2%A0 (Tag des Zugriffs: 25.02.2017)
10. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg JB, Stemhagen A, Fraumeni JF: Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res.* 48, 3282–7 (1988).
11. Hashibe M, Boffetta P, Zaridze D, Shagina O, Szeszenia-Dabrowska N, Mates D, Fabiánvá E, Rudnai P, Brennan P: Contribution of tobacco and alcohol to the high rates of squamous cell carcinoma of the supraglottis and glottis in Central Europe. *Am. J. Epidemiol.* 165, 814–20 (2007).

12. Rodriguez T, Altieri A, Chatenoud L, Gallus S, Bosetti C, Negri E, Franceschi S, Levi F, Talamini R, La Vecchia C: Risk factors for oral and pharyngeal cancer in young adults. *Oral Oncol.* 40, 207–13 (2004).
13. Hashibe M, Boffetta P, Zaridze D, Shangina O, Szeszenia-Dabrowska N, Mates D, Janout V, Fabiánová E, Bencko V, Moullan N, Chabrier A, Hung R, Hall J, Canzian F, Brennan P: Evidence for an important role of alcohol- and aldehyde-metabolizing genes in cancers of the upper aerodigestive tract. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 15, 696–703 (2006).
14. Copper MP, Jovanovic A, Nauta JJ, Braakhuis BJ, de Vries N, van der Waal I, Snow GB: Role of genetic factors in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 121, 157–60 (1995).
15. Foulkes WD, Brunet JS, Sieh W, Black MJ, Shenouda G, Narod SA: Familial risks of squamous cell carcinoma of the head and neck: retrospective case-control study. *BMJ* 313, 716–21 (1996).
16. Jeng JH, Chang MC, Hahn LJ: Role of areca nut in betel quid-associated chemical carcinogenesis: current awareness and future perspectives. *Oral Oncol.* 37, 477–92 (2001).
17. Maier H, Dietz A, Gewelke U, Heller WD: Occupational exposure to hazardous substances and risk of cancer in the area of the mouth cavity, oropharynx, hypopharynx and larynx. A case-control study. *Laryngorhinootologie* 70, 93–8 (1991).
18. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S: Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14, 467–75 (2005).
19. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zahurak ML, Daniel RW, Viglione M, Symer DE, Shah KV, Sidransky D: Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 709–20 (2000).
20. Shindoh M, Chiba I, Yasuda M, Saito T, Funaoka K, Kohgo T, Amemiya A, Sawada Y, Fujinaga K: Detection of human papillomavirus DNA sequences in oral squamous cell carcinomas and their relation to p53 and proliferating cell nuclear antigen expression. *Cancer* 76, 1513–21 (1995).
21. zur Hausen H, Schulte-Holthausen H, Klein G, Henle W, Henle G, Clifford P, Santesson L: Epstein-Barr Virus in Burkitt's Lymphoma and Nasopharyngeal Carcinoma: EBV DNA in Biopsies of Burkitt Tumours and Anaplastic Carcinomas of the Nasopharynx. *Nature* 228, 1056–8 (1970).
22. Wittekind C, Meyer H-J, Bootz F: TNM Klassifikation maligner Tumoren. 6. Auflage, Kapitel Kopf-und Halstumoren, 20–39, Springer Medizin Verlag, Heidelberg (2002).
23. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland unter:
http://www.gekid.de/Atlas/Tabellen/Tabellen_D.php?Method=MORTALITY_EU&ICD10=C32&Year_from=1995&Year_to=2012&Men=on&Women=on&Rates=on&Cases=on
(Tag des Zugriffs: 25.02.2017)

24. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland unter:
http://www.gekid.de/Atlas/Tabellen/Tabellen_D.php?Method=MORTALITY_EU&ICD10=C00-C14&Year_from=1995&Year_to=2012&Men=on&Women=on&Rates=on&Cases=on
(Tag des Zugriffs: 25.02.2017)
25. Gold KA, Lee H-Y, Kim ES: Targeted therapies in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 115, 922–35 (2009).
26. Leemans CR, Tiwari R, Nauta JJP, van der Waal I, Snow GB: Recurrence at the primary site in head and neck cancer and the significance of neck lymph node metastases as a prognostic factor. *Cancer* 73, 187–90 (1994).
27. Kalluri R, Weinberg RA: The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 119, 1420–8 (2009).
28. Zeisberg M, Neilson EG: Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J. Clin. Invest.* 119, 1429–37 (2009).
29. Zöller M, Wittig B: Prozess der Metastasierung. In: Hiddemann W, Huber H, Bartram CR: *Die Onkologie: Teil 1: Epidemiologie - Pathogenese - Grundprinzipien der Therapie*. 1. Auflage, Kapitel 13, 326–7, Springer-Verlag, Berlin (2004).
30. Kalluri R, Neilson EG: Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J. Clin. Invest.* 112, 1776–84 (2003).
31. Berx G, van Roy F: Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1 (2009).
32. Aberle H, Schwartz H, Kemler R: Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function. *J. Cell. Biochem.* 61, 514–23 (1996).
33. Chaw SY, Majeed AA, Dalley AJ, Chan A, Stein S, Farah CS: Epithelial to mesenchymal transition (EMT) biomarkers--E-cadherin, beta-catenin, APC and Vimentin--in oral squamous cell carcinogenesis and transformation. *Oral Oncol.* 48, 997–1006 (2012).
34. Gottardi CJ, Wong E, Gumbiner BM: E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. *J. Cell Biol.* 153, 1049–60 (2001).
35. Kim K, Lu Z, Hay ED: Direct evidence for a role of beta-catenin/LEF-1 signaling pathway in induction of EMT. *Cell Biol. Int.* 26, 463–76 (2002).
36. Bolós V, Peinado H, Pérez-Moreno MA, Fraga MF, Esteller M, Cano Amparo: The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J. Cell Sci.* 116, 499–511 (2003).
37. Yang Z, Zhang X, Gang H, Li X, Li Z, Wang T, Han J, Luo T, Wen F, Wu X: Up-regulation of gastric cancer cell invasion by Twist is accompanied by N-cadherin and fibronectin expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358, 925–30 (2007).

38. Wu H, Lotan R, Menter D, Lippman SM, Xu XC: Expression of E-cadherin is associated with squamous differentiation in squamous cell carcinomas. *Anticancer Res.* 20, 1385–90 (2000).
39. Zhao Z, Ge J, Sun Y, Tian L, Lu J, Liu M, Zhao Y: Is E-cadherin immunoexpression a prognostic factor for head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC)? A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol.* 48, 761–7 (2012).
40. Oka H, Shiozaki H, Kobayashi K, Inoue M, Tahara H, Kobayashi T, Takatsuka Y, Matsuyoshi N, Hirano S, Takeichi M: Expression of E-cadherin cell adhesion molecules in human breast cancer tissues and its relationship to metastasis. *Cancer Res.* 53, 1696–701 (1993).
41. Umbas R, Isaacs WB, Bringuier PP, Schaafsma HE, Karthaus HFM, Oosterhof GON, Debruyne FMJ, Schalken JA: Decreased E-Cadherin Expression Is Associated with Poor Prognosis in Patients with Prostate Cancer. *Cancer Res.* 54, 3929–33 (1994).
42. Bringuier PP, Umbas R, Schaafsma HE, Karthaus HFM, Debruyne FMJ, Schalken JA: Decreased E-Cadherin Immunoreactivity Correlates with Poor Survival in Patients with Bladder Tumors. *Cancer Res.* 53, 3241–5 (1993).
43. Sulzer MA, Leers MP, van Noord JA, Bollen EC, Theunissen PH: Reduced E-cadherin expression is associated with increased lymph node metastasis and unfavorable prognosis in non-small cell lung cancer. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157, 1319–23 (1998).
44. Nijkamp MM, Span PN, Hoogsteen IJ, van der Kogel AJ, Kaanders JHAM, Bussink J: Expression of E-cadherin and vimentin correlates with metastasis formation in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Radiother. Oncol.* 99, 344–8 (2011).
45. Hazan RB, Qiao R, Keren R, Badano I, Suyama K: Cadherin switch in tumor progression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1014, 155–63 (2004).
46. Nguyen PT, Kudo Y, Yoshida M, Kamata N, Ogawa I, Takata T: N-cadherin expression is involved in malignant behavior of head and neck cancer in relation to epithelial-mesenchymal transition. *Histol. Histopathol.* 26, 147–56 (2011).
47. Yang T-L, Wu C-T, Ko J-Y, Wang C-P, Lou P-J, Chang Y-L: Significance of tumor satellite variables in reflecting the epithelial-mesenchymal transition of tongue cancer. *Oral Oncol.* 47, 720–4 (2011).
48. Miller JR: The Wnts. *Genome Biol.* 3 (2001).
49. Cadigan KM, Peifer M: Wnt signaling from development to disease: insights from model systems. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1 (2009).
50. Stamos JL, Weis WI: The β -catenin destruction complex. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, (2013).
51. Latres E, Chiaur DS, Pagano M: The human F box protein beta-Trcp associates with the Cul1/Skp1 complex and regulates the stability of beta-catenin. *Oncogene* 18, 849–54 (1999).
52. Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R: beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* 16, 3797–804 (1997).

53. Tamai K, Semenov M, Kato Y, Spokony R, Liu C, Katsuyama Y, Hess F, Saint-Jeannet JP, He X: LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* 407, 530–5 (2000).
54. Kishida S, Yamamoto H, Hino S, Ikeda S, Kishida M, Kikuchi A: DIX domains of Dvl and axin are necessary for protein interactions and their ability to regulate beta-catenin stability. *Mol. Cell. Biol.* 19, 4414–22 (1999).
55. Li L, Yuan H, Weaver CD, Mao J, Farr GH, Sussman DJ, Jonkers J, Kimelman D, Wu D: Axin and Frat1 interact with dvl and GSK, bridging Dvl to GSK in Wnt-mediated regulation of LEF-1. *EMBO J.* 18, 4233–40 (1999).
56. Daniels DL, Weis WI: Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 364–71 (2005).
57. Nusse R: The Wnt homepage. unter: http://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/target_genes (Tag des Zugriffs: 25.02.2017)
58. Boyle WJ, Smeal T, Defize LH, Angel P, Woodgett JR, Karin M, Hunter T: Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-Jun at sites that negatively regulate its DNA-binding activity. *Cell* 64, 573–84 (1991).
59. Sears R, Nuckolls F, Haura E, Taya Y, Tamai K, Nevins JR: Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes Dev.* 14, 2501–14 (2000).
60. Chu B, Soncin F, Price BD, Stevenson MA, Calderwood SK: Sequential phosphorylation by mitogen-activated protein kinase and glycogen synthase kinase 3 represses transcriptional activation by heat shock factor-1. *J. Biol. Chem.* 271, 30847–57 (1996).
61. Fiol CJ, Williams JS, Chou CH, Wang QM, Roach PJ, Andrisani OM: A secondary phosphorylation of CREB341 at Ser129 is required for the cAMP-mediated control of gene expression. A role for glycogen synthase kinase-3 in the control of gene expression. *J. Biol. Chem.* 269, 32187–93 (1994).
62. Beals CR, Sheridan CM, Turck CW, Gardner P, Crabtree GR: Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science* 275, 1930–4 (1997).
63. Hoefflich KP, Luo J, Rubie EA, Tsao MS, Jin O, Woodgett JR: Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation. *Nature* 406, 86–90 (2000).
64. Turenne GA, Price BD: Glycogen synthase kinase3 beta phosphorylates serine 33 of p53 and activates p53's transcriptional activity. *BMC Cell Biol.* 2, 12 (2001).
65. Zhou BP, Deng J, Xia W, Xu J, Li YM, Gunduz M, Hung M-C: Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Cell Biol.* 6, 931–40 (2004).
66. Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ: Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev.* 12, 3499–511 (1998).

67. Jope RS, Johnson GVW: The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem. Sci.* 29, 95–102 (2004).
68. Woodgett JR: Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *EMBO J.* 9, 2431–8 (1990).
69. Lau KF, Miller CC, Anderton BH, Shaw PC: Expression analysis of glycogen synthase kinase-3 in human tissues. *J. Pept. Res.* 54, 85–91 (1999).
70. MacAulay K, Doble BW, Patel S, Hansotia T, Sinclair EM, Drucker DJ, Nagy A, Woodgett JR: Glycogen synthase kinase 3 α -specific regulation of murine hepatic glycogen metabolism. *Cell Metab.* 6, 329–37 (2007).
71. Ding VW, Chen RH, McCormick F: Differential regulation of glycogen synthase kinase 3 β by insulin and Wnt signaling. *J. Biol. Chem.* 275, 32475–81 (2000).
72. Jope RS, Yuskaitis CJ, Beurel E: Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics. *Neurochem. Res.* 32, 577–95 (2007).
73. Fiol CJ, Mahrenholz AM, Wang Y, Roeske RW, Roach PJ: Formation of protein kinase recognition sites by covalent modification of the substrate. Molecular mechanism for the synergistic action of casein kinase II and glycogen synthase kinase 3. *J. Biol. Chem.* 262, 14042–8 (1987).
74. Beurel E, Grieco SF, Jope RS: Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. *Pharmacol. Ther.* 148, 114–31 (2015).
75. Meares GP, Jope RS: Resolution of the nuclear localization mechanism of glycogen synthase kinase-3: functional effects in apoptosis. *J. Biol. Chem.* 282, 16989–7001 (2007).
76. Franca-Koh J, Yeo M, Fraser E, Young N, Dale TC: The regulation of glycogen synthase kinase-3 nuclear export by Frat/GBP. *J. Biol. Chem.* 277, 43844–8 (2002).
77. Doble B, Woodgett JR: GSK-3 : tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J. Cell Sci.* 116, 1175–86 (2003).
78. Frame S, Cohen P, Biondi RM: A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of GSK3 and its inactivation by phosphorylation. *Mol. Cell* 7, 1321–7 (2001).
79. Sutherland C: What Are the bona fide GSK3 Substrates? *Int. J. Alzheimers. Dis.* 2011, 505607 (2011).
80. Goode N, Hughes K, Woodgett JR, Parker PJ: Differential regulation of glycogen synthase kinase-3 β by protein kinase C isotypes. *J. Biol. Chem.* 267, 16878–82 (1992).
81. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA: Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785–9 (1995).

82. Sutherland C, Leighton IA, Cohen P: Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochem. J.* 296, 15–9 (1993).
83. Fang X, Yu S, Lu Y, Bast RC, Woodgett JR, Mills GB: Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 11960–5 (2000).
84. Eldar-Finkelman H, Seger R, Vandenheede JR, Krebs EG: Inactivation of glycogen synthase kinase-3 by epidermal growth factor is mediated by mitogen-activated protein kinase/p90 ribosomal protein S6 kinase signaling pathway in NIH/3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 270, 987–90 (1995).
85. Hughes K, Nikolakaki E, Plyte SE, Totty NF, Woodgett JR: Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation. *EMBO J.* 12, 803–8 (1993).
86. Thornton TM, Pedraza-Alva G, Deng B, Wood CD, Aronshtam A, Clements JL, Sabio G, Davis RJ, Matthews DE, Doble B, Rincon M: Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3beta inactivation. *Science* 320, 667–70 (2008).
87. Polakis P: Wnt signaling and cancer. *Genes Dev.* 14, 1837–51 (2000).
88. Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, González-Barón M: PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat. Rev.* 30, 193–204 (2004).
89. Freudsperger C, Burnett JR, Friedman JA, Kannabiran VR, Chen Z, van Waes C: EGFR-PI3K-AKT-mTOR signaling in head and neck squamous cell carcinomas: attractive targets for molecular-oriented therapy. *Expert Opin. Ther. Targets* 15, 63–74 (2011).
90. Molinolo AA, Amornphimoltham P, Squarize CH, Castilho RM, Patel V, Gutkind JS: Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. *Oral Oncol.* 45, 324–34 (2009).
91. Kao S-H, Wang W-L, Chen C-Y, Chang Y-L, Wu Y-Y, Wang Y-T, Wang S-P, Nesvizhskii AI, Chen Y-J, Hong T-M, Yang P-C: GSK3 β controls epithelial-mesenchymal transition and tumor metastasis by CHIP-mediated degradation of Slug. *Oncogene* 33, 3172–82 (2014).
92. Mishra R: Glycogen synthase kinase 3 beta: can it be a target for oral cancer. *Mol. Cancer* 9, 144 (2010).
93. Ma C, Wang J, Gao Y, Gao T-W, Chen G, Bower K, Odetallah M, Ding M, Ke Z, Luo J: The role of glycogen synthase kinase 3beta in the transformation of epidermal cells. *Cancer Res.* 67, 7756–64 (2007).
94. Farago M, Dominguez I, Landesman-Bollag E, Xu X, Rosner A, Cardiff RD, Seldin DC: Kinase-inactive glycogen synthase kinase 3beta promotes Wnt signaling and mammary tumorigenesis. *Cancer Res.* 65, 5792–801 (2005).
95. Bachelder RE, Yoon S-O, Franci C, de Herreros AG, Mercurio AM: Glycogen synthase kinase-3 is an endogenous inhibitor of Snail transcription: implications for the epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell Biol.* 168, 29–33 (2005).

96. Zeng J, Liu D, Qiu Z, Huang Y, Chen B, Wang L, Xu H, Huang N, Liu L, Li W: GSK3 β overexpression indicates poor prognosis and its inhibition reduces cell proliferation and survival of non-small cell lung cancer cells. *PLoS One* 9 (2014).
97. Vincent EE, Elder DJE, O'Flaherty L, Pardo OE, Dzien P, Phillips L, Morgan C, Pawade J, May MT, Sohail M, Hetzel MR, Seckl MJ, Tavaré JM: Glycogen synthase kinase 3 protein kinase activity is frequently elevated in human non-small cell lung carcinoma and supports tumour cell proliferation. *PLoS One* 9 (2014).
98. Ougolkov AV, Fernandez-Zapico ME, Bilim VN, Smyrk TC, Chari ST, Billadeau DD: Aberrant nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 β in human pancreatic cancer: association with kinase activity and tumor dedifferentiation. *Clin. Cancer Res.* 12, 5074–81 (2006).
99. Rask K, Nilsson A, Brännström M, Carlsson P, Hellberg P, Janson P-O, Hedin L, Sundfeldt K: Wnt-signalling pathway in ovarian epithelial tumours: increased expression of beta-catenin and GSK3 β . *Br. J. Cancer* 89, 1298–304 (2003).
100. Georgy SR, Cangkrama M, Srivastava S, Partridge D, Auden A, Dworkin S, McLean CA, Jane SM, Darido C: Identification of a Novel Proto-oncogenic Network in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 107 (2015).
101. Mishra R, Nagini S, Rana A: Expression and inactivation of glycogen synthase kinase 3 α / β and their association with the expression of cyclin D1 and p53 in oral squamous cell carcinoma progression. *Mol. Cancer* 14, 20 (2015).
102. Ryves WJ, Harwood AJ: Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 by competition for magnesium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280, 720–5 (2001).
103. Jope RS: Lithium and GSK-3: one inhibitor, two inhibitory actions, multiple outcomes. *Trends Pharmacol. Sci.* 24, 441–3 (2003).
104. Coghlan MP, Culbert AA, Cross DAE, Corcoran SL, Yates JW, Pearce NJ, Rausch OL, Murphy GJ, Carter PS, Cox LR, Mills D, Brown MJ, Haigh D, Ward RW, Smith DG, Murray KJ, Reith AD, Holder JC: Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription. *Chem Biol.* 7, 793–803 (2000).
105. Sigma-Aldrich Co. unter:
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s3442?lang=de®ion=DE>.
(Tag des Zugriffs: 25.02.2017)
106. Schmitz S: *Der Experimentator: Zellkultur*. 3. Auflage, Kapitel 13, 206, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg (2011).
107. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–54 (1976).
108. Westermeier R: *Elektrophorese leicht gemacht*. 2. Auflage, 14, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim (2016).
109. Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63 (1983).

110. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N: The real-time polymerase chain reaction. *Mol. Aspects Med.* 27, 95–125 (2006).
111. Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–8 (2001).
112. Kubic JD, Mascarenhas JB, Takumi I, Wolfgeher D, Lang D: Glycogen Synthase Kinase-3 promotes cell survival, growth and PAX3 levels in human melanoma cells. *Mol Cancer Res.* 10, 1065–76 (2012).
113. Cross DAE, Culbert AA, Chalmers KA, Facci L, Skaper SD, Reith AD: Selective small-molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 activity protect primary neurones from death. *J. Neurochem.* 77, 94–102 (2008).
114. Lu D, Zhao Y, Tawatao R, Cottam HB, Sen M, Leoni LM, Kipps TJ, Corr M, Carson DA: Activation of the Wnt signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 3118–23 (2004).
115. Lajer CB, von Buchwald C: The role of human papillomavirus in head and neck cancer. *APMIS* 118, 510–9 (2010).
116. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W: Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 6, 963–8 (1953).
117. Goto H, Kawano K, Kobayashi I, Sakai H, Yanagisawa S: Expression of cyclin D1 and GSK-3beta and their predictive value of prognosis in squamous cell carcinomas of the tongue. *Oral Oncol.* 38, 549–56 (2002).
118. Shakoory A, Ougolkov A, Yu ZW, Zhang B, Modarressi MH, Billadeau DD, Mai M, Takahashi Y, Minamoto T: Deregulated GSK3beta activity in colorectal cancer: its association with tumor cell survival and proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334, 1365–73 (2005).
119. Leis H, Segrelles C, Ruiz S, Santos M, Paramio JM: Expression, localization, and activity of glycogen synthase kinase 3beta during mouse skin tumorigenesis. *Mol. Carcinog.* 35, 180–5 (2002).
120. Taelman VF, Dobrowolski R, Plouhinec J-L, Luis C, Vorwald PP, Gumper I, Sabatini DD, De EM: Wnt signaling requires sequestration of glycogen synthase kinase 3 inside multivesicular endosomes. *Cell* 143, 1136–48 (2010).
121. Shakoory A, Mai W, Miyashita K, Yasumoto K, Takahashi Y, Ooi A, Kawakami K, Minamoto T: Inhibition of GSK-3 beta activity attenuates proliferation of human colon cancer cells in rodents. *Cancer Sci.* 98, 1388–93 (2007).
122. Lindemann A: Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals Bereiches: Identifizierung und Charakterisierung von tumorassoziierten Signalprozessen. *Diss. Lübeck* (2013).
123. Park C-H, Lee B-H, Ahn S-G, Yoon J-H, Oh S-H: Serine 9 and tyrosine 216 phosphorylation of GSK-3 β differentially regulates autophagy in acquired cadmium resistance. *Toxicol. Sci.* 135, 380–9 (2013).

124. Wang Z, Smith KS, Murphy M, Piloto O, Somerville TCP, Cleary ML: Glycogen synthase kinase 3 in MLL leukaemia maintenance and targeted therapy. *Nature* 455, 1205–9 (2008).
125. Mai W, Miyashita K, Shakoori A, Zhang B, Yu ZW, Takahashi Y, Motoo Y, Kawakami K, Minamoto T: Detection of active fraction of glycogen synthase kinase 3 β in cancer cells by nonradioisotopic in vitro kinase assay. *Oncology* 71, 297–305 (2006).
126. Lesort M, Jope RS, Johnson GV: Insulin transiently increases tau phosphorylation: involvement of glycogen synthase kinase-3 β and Fyn tyrosine kinase. *J. Neurochem.* 72, 576–84 (1999).
127. Hartigan JA, Xiong WC, Johnson GVW: Glycogen Synthase Kinase 3 β Is Tyrosine Phosphorylated by PYK2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284, 485–9 (2001).
128. Cole A, Frame S, Cohen P: Further evidence that the tyrosine phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in mammalian cells is an autophosphorylation event. *Biochem. J.* 377, 249–55 (2004).
129. Zhou Y, Uddin S, Zimmerman T, Kang J-A, Ulaszek J, Wickrema A: Growth control of multiple myeloma cells through inhibition of glycogen synthase kinase-3. *Leuk. Lymphoma* 49, 1945–53 (2008).
130. Fu Y, Wang X, Cheng X, Ye F, Xie X, Lu W: Clinicopathological and biological significance of aberrant activation of glycogen synthase kinase-3 in ovarian cancer. *Onco Targets Ther.* 7, 1159–68 (2014).
131. Cao Q, Lu X, Feng Y-J: Glycogen synthase kinase-3 β positively regulates the proliferation of human ovarian cancer cells. *Cell Res.* 16, 671–7 (2006).
132. Mazor M, Kawano Y, Zhu H, Waxman J, Kypta RM: Inhibition of glycogen synthase kinase-3 represses androgen receptor activity and prostate cancer cell growth. *Oncogene* 23, 7882–92 (2004).
133. Ougolkov AV, Fernandez-Zapico ME, Savoy DN, Urrutia RA, Billadeau DD: Glycogen Synthase Kinase-3 B Participates in Nuclear Factor K B – Mediated Gene Transcription and Cell Survival in Pancreatic Cancer Cells. *Cancer Res.* 65, 2076–82 (2005).
134. Xia Y, Shen S, Verma IM: NF- κ B, an active player in human cancers. *Cancer Immunol. Res.* 2, 823–30 (2014).
135. Ougolkov AV, Bone ND, Fernandez-Zapico ME, Kay NE, Billadeau DD: Inhibition of glycogen synthase kinase-3 activity leads to epigenetic silencing of nuclear factor kappaB target genes and induction of apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 110, 735–42 (2007).
136. Tang Q-L, Xie X-B, Wang J, Chen Q, Han A-J, Zou C-Y, Yin J-Q, Liu D-W, Liang Y, Zhao Z-Q, Yong B-C, Zhang R-H, Feng Q-S, Deng W-G, Zhu X-F, Zhou BP, Zeng Y-X, Shen J-N, Kang T: Glycogen synthase kinase-3 β , NF- κ B signaling, and tumorigenesis of human osteosarcoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 104, 749–63 (2012).

137. Bilim V, Ougolkov A, Yuuki K, Naito S, Kawazoe H, Muto A, Oya M, Billadeau D, Motoyama T, Tomita Y: Glycogen synthase kinase-3: a new therapeutic target in renal cell carcinoma. *Br. J. Cancer* 101, 2005–14 (2009).
138. Beurel E, Jope RS: The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. *Prog. Neurobiol.* 79, 173–89 (2006).
139. Kotliarova S, Pastorino S, Kovell LC, Kotliarov Y, Song H, Zhang W, Bailey R, Maric D, Zenklusen JC, Lee J, Fine HA: Glycogen synthase kinase-3 inhibition induces glioma cell death through c-MYC, nuclear factor-kappaB, and glucose regulation. *Cancer Res.* 68, 6643–51 (2008).
140. Jolly MK, Boareto M, Huang B, Jia D, Lu M, Ben-Jacob E, Onuchic JN, Levine H: Implications of the Hybrid Epithelial/Mesenchymal Phenotype in Metastasis. *Front. Oncol.* 5, 155 (2015).
141. Christiansen JJ, Rajasekaran AK: Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res.* 66, 8319–26 (2006).
142. Doble BW, Woodgett JR: Role of Glycogen Synthase Kinase-3 in Cell Fate and Epithelial-Mesenchymal Transitions. *Cells Tissues Organs* 185, 73–84 (2007).
143. Phillips S, Kuperwasser C: SLUG: Critical regulator of epithelial cell identity in breast development and cancer. *Cell Adh. Migr.* 8, 578–87 (2014).
144. Kim JY, Kim YM, Yang CH, Cho SK, Lee JW, Cho M: Functional regulation of Slug/Snail2 is dependent on GSK-3 β -mediated phosphorylation. *FEBS J.* 279, 2929–39 (2012).
145. Conacci-Sorrell M, Simcha I, Ben-Yedidia T, Blechman J, Savagner P, Ben-Ze'ev A: Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of beta-catenin signaling, Slug, and MAPK. *J. Cell Biol.* 163, 847–57 (2003).
146. Man X-Y, Chen X-B, Li W, Landeck L, Dou T-T, Chen J-Q, Zhou J, Cai S-Q, Zheng M: Analysis of epithelial-mesenchymal transition markers in psoriatic epidermal keratinocytes. *Open Biol.* 5 (2015).
147. Lander R, Nasr T, Ochoa SD, Nordin K, Prasad MS, Labonn C: Interactions between Twist and other core epithelial-mesenchymal transition factors are controlled by GSK3-mediated phosphorylation. *Nat. Commun.* 4, 1542 (2013).
148. Batlle E, Sancho E, Francí C, Domínguez D, Monfar M, Baulida J, García De Herreros A: The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat. Cell Biol.* 2, 84–9 (2000).
149. Vesuna F, van Diest P, Chen JH, Raman V: Twist is a transcriptional repressor of E-cadherin gene expression in breast cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 367, 235–41 (2008).
150. Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA: Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117, 927–39 (2004).

-
151. Katafiasz D, Smith LM, Wahl JK: Slug (SNAI2) expression in oral SCC cells results in altered cell-cell adhesion and increased motility. *Cell Adh. Migr.* 5, 315–22 (2011).
 152. Alves CC, Carneiro F, Hoefler H, Becker K-F: Role of the epithelial-mesenchymal transition regulator Slug in primary human cancers. *Front. Biosci. Landmark Ed.* 14, 3035–50 (2009).
 153. Ou D-L, Chien H-F, Chen C-L, Lin T-C, Lin L-I: Role of Twist in head and neck carcinoma with lymph node metastasis. *Anticancer Res.* 28, 1355–9 (2008).
 154. Farooqui R, Zhu S, Fenteany G: Glycogen synthase kinase-3 acts upstream of ADP-ribosylation factor 6 and Rac1 to regulate epithelial cell migration. *Exp. Cell Res.* 312, 1514–25 (2006).
 155. Goc A, Al-Husein B, Katsanevas K, Steinbach A, Lou U, Sabbineni H, DeRemer DL, Somanath PR: Targeting Src-mediated Tyr216 phosphorylation and activation of GSK-3 in prostate cancer cells inhibit prostate cancer progression in vitro and in vivo. *Oncotarget* 5, 775–87 (2014).
 156. Gao F, Al-Azayzih A, Somanath PR: Discrete functions of GSK3 α and GSK3 β isoforms in prostate tumor growth and micrometastasis. *Oncotarget* 6, 5947-62 (2015).
 157. Meijer L, Flajolet M, Greengard P: Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3. *Trends Pharmacol. Sci.* 25, 471–80 (2004).
 158. Bang D, Wilson W, Ryan M, Yeh JJ, Baldwin AS: GSK-3 α promotes oncogenic KRAS function in pancreatic cancer via TAK1-TAB stabilization and regulation of noncanonical NF- κ B. *Cancer Discov.* 3, 690–703 (2013).

7 Anhang

7.1 TNM-Klassifikation

Tabelle 26: T- und N-Kategorien für Karzinome der Lippe und Mundhöhle²².

Lippe und Mundhöhle	
T1	≤ 2 cm
T2	> 2 bis 4 cm
T3	> 4 cm
T4a	Lippe: durch kortikalen Knochen, N. alveolaris inferior, Mundboden, Haut Mundhöhle: durch kortikalen Knochen, äußere Muskulatur der Zunge, Kieferhöhle, Haut
T4b	Spatium masticatorium, Proc. pterygoideus, Schädelbasis, A. carotis interna
N1	ipsilateral solitär ≤ 3 cm
N2a	ipsilateral solitär > 3 bis 6 cm
N2b	ipsilateral multipel ≤ 6 cm
N2c	bilateral, kontralateral ≤ 6 cm
N3	> 6 cm

Tabelle 27: T- und N-Kategorien für Karzinome des Oro- und Hypopharynx²².

Oropharynx	
T1	≤ 2 cm
T2	> 2 bis 4 cm
T3	> 4 cm
T4a	Larynx, äußere Muskulatur der Zunge, Lamina medialis des Proc. pterygoideus, harter Gaumen, Unterkiefer
T4b	M. pterygoideus lateralis, Lamina lateralis des Proc. pterygoideus, Nasopharynx, Schädelbasis, A. carotis interna
Hypopharynx	
T1	≤ 2 cm und auf einen Unterbezirk beschränkt
T2	> 2 bis 4 cm oder mehr als ein Unterbezirk
T3	> 4 cm oder mit Hemilarynxfixation
T4a	Schild-/Ringknorpel, Zungenbein, Schilddrüse, Ösophagus, zentrale Halsweichteile
T4b	Prävertebrale Faszie, A. carotis interna, mediastinale Strukturen

Oro- und Hypopharynx

N1	ipsilateral solitär ≤ 3 cm
N2a	ipsilateral solitär > 3 bis 6 cm
N2b	ipsilateral multipel ≤ 6 cm
N2c	bilateral, kontralateral ≤ 6 cm
N3	> 6 cm

Tabelle 28: T- und N-Kategorien für Karzinome des Nasopharynx²².

Nasopharynx	
T1	Nasopharynx, Oropharynx, Nasenhöhle
T2	parapharyngeale Ausbreitung
T3	infiltriert Knochenstrukturen der Schädelbasis und/oder Nasennebenhöhlen
T4	intrakranielle Ausbreitung und/oder Hirnnerv(en), Fossa infratemporalis, Hypopharynx, Augenhöhle, Spatium masticatorium
N1	unilaterale zervikale Lymphknoten oder uni- oder bilaterale retropharyngeale Lymphknoten über Supraklavikulargrube, ≤6 cm
N2	bilaterale(r) Lymphknoten, ≤6 cm, über Supraklavikulargrube
N3a	> 6 cm
N3b	Lymphknoten in Supraklavikulargrube

Tabelle 29: T- und N-Kategorien für Larynxkarzinome²².

Supraglottis	
T1	ein Unterbezirk, normal bewegliche Stimmlippen
T2	Schleimhaut von mehr als einem Unterbezirk von Supraglottis/Glottis oder Schleimhaut eines Areals außerhalb Supraglottis, keine Larynxfixation
T3	begrenzt auf Larynx mit Stimmlippenfixation und/oder Invasion von Postkrikoidregion, präepiglottischem Gewebe, paraglottischem Raum, geringgradiger Schildknorpelerosion
T4a	Ausbreitung durch Schildknorpel: Trachea, Halsweichteile, äußere Muskulatur der Zunge, gerade Halsmuskulatur, Schilddrüse/Ösophagus
T4b	Prävertebralraum, mediastinale Strukturen, A. carotis interna
Glottis	
T1	auf Stimmlippen begrenzt, normal bewegliche Stimmlippen
T1a	eine Stimmlippe
T1b	beide Stimmlippen
T2	Ausbreitung auf Supra- oder Subglottis, eingeschränkte Stimmlippenbeweglichkeit

T3	Stimm lippenfixation, Ausbreitung auf präepiglottischen Raum, geringgradige Erosion des Schildknorpels
T4a	Ausbreitung durch Schildknorpel: Trachea, Halsweichteile, äußere Muskulatur der Zunge, gerade Halsmuskulatur, Schilddrüse/Ösophagus
T4b	Prävertebralraum, mediastinale Strukturen, A. carotis interna

Subglottis

T1	begrenzt auf Subglottis
T2	Ausbreitung auf Stimmlippen, diese normal oder eingeschränkt beweglich
T3	Stimm lippenfixation
T4a	Ausbreitung durch Schildknorpel: Trachea, Halsweichteile, äußere Muskulatur der Zunge, gerade Halsmuskulatur, Schilddrüse/Ösophagus
T4b	Prävertebralraum, mediastinale Strukturen, A. carotis interna

Alle Bezirke

N1	ipsilateral solitär ≤ 3 cm
N2a	ipsilateral solitär > 3 bis 6 cm
N2b	ipsilateral multipel ≤ 6 cm
N2c	bilateral, kontralateral ≤ 6 cm
N3	> 6 cm

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen meinen großen Dank aussprechen, die auf verschiedenste Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Barabara Wollenberg für die Möglichkeit, die Dissertation in ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen, mich mit dem interessanten Thema auseinanderzusetzen und meine Ergebnisse auf verschiedenen Symposien und Kongressen vorzustellen, bedanken.

Dr. Ralph Pries danke ich für die Betreuung meiner Dissertation und seine fachliche Unterstützung. Er hatte jederzeit ein offenes Ohr für Fragen und Probleme und seine aufmunternden Worte haben mir immer wieder Mut gemacht.

Bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe möchte ich mich für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und die vielen netten gemeinsamen Stunden bedanken. Mein besonderer Dank gilt Dr. Michael Könnecke, Dr. Antje Lindemann und Dr. Regina Maushagen, die mich durch zahlreiche fachliche Diskussionen, praktische Hilfestellungen und Anregungen sowie die Korrektur des Manuskriptes stets unterstützt haben. Birgit Hüsing, Maren Drenckhan, Kirstin Plötze-Martin und Brigitte Wollmann danke ich für die Einarbeitung in den Laboralltag und ihre vielen praktischen Tipps und Tricks.

Des Weiteren möchte ich Prof. Dr. Timo Gemoll und Dr. Martina Oberländer von der Sektion für Translationale Chirurgische Onkologie & Biomaterialbanken des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck für die Einweisung und Mitbenutzung der Geräte und Räumlichkeiten zur Auswertung der Tissue Microarrays danken. Prof. Dr. Jan Rupp, Dr. Inga Kaufhold und Dr. Nadja Käding danke ich ebenfalls für die Einweisung und Benutzung von Geräten und Räumlichkeiten in der Klinik für Infektiologie und Mikrobiologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck.

Darüber hinaus möchte ich mich bei der Universität zu Lübeck für die Unterstützung im Rahmen des Promotionsstipendiums „Exzellenzmedizin“ bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Mutter und meinen Großeltern, die mir mein Studium ermöglicht haben und mir in allen Lebenslagen mit Rat und Tat zur Seite standen. Ohne ihre motivierenden Worte und nicht zuletzt ihre finanzielle Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Vielen Dank!

9 Lebenslauf