

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

**Der Einfluss der Gamma-Sekretase auf die Expression von
P-Cadherin im oralen Plattenepithelkarzinom**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Bettina Ragab

2016

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

**Der Einfluss der Gamma-Sekretase auf die Expression von
P-Cadherin im oralen Plattenepithelkarzinom**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Bettina Ragab

2016

Dekan:

Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter:

PD Dr. Richard Bauer

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Susanne Grässel

Tag der mündlichen Prüfung:

24. Januar 2017

Meinem Sohn Nadim gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Mundhöhlenepithel	1
1.1.2	Aufbau der gesunden Mundschleimhaut	1
1.1.3	Funktion der Mundschleimhaut	2
1.2	Das orale Plattenepithelkarzinom	3
1.2.1	Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle – Definition	3
1.2.2	Epidemiologie	5
1.2.3	Ätiologie	7
1.2.4	Klinik und Tumorlokalisierung	9
1.2.5	Diagnostik	9
1.2.6	Staging und Tumorklassifikation	10
1.2.7	Metastasierungswege	13
1.2.8	Therapie	14
1.3	Tumorbiologie	16
1.3.1	Entstehung von Krebserkrankungen	16
1.3.2	Modell zur Karzinogenese	17
1.4	Zelladhäsion und Cadherine	21
1.4.1	Zelladhäsion und Zelladhäsionsmoleküle	21
1.4.2	Cadherin-Superfamilie	21
1.4.2.1	Klassische Cadherine	22
1.4.2.2	P-Cadherin	23
1.5	Gamma-Sekretase	25
1.5.1	Komponenten des Gamma-Sekretase-Komplexes	26
1.5.1.1	Presenilin	26
1.5.1.2	Nicastrin, APH-1 und PEN-2	27
1.5.2	Substrate der Gamma-Sekretase	27

1.5.2.1	Der Notch-Signalweg	28
1.6	Fragestellung	29
2	Material und Methoden	30
2.1	Zellkulturmethoden	30
2.1.1	Verwendete Zelllinien	30
2.1.2	Gewinnung primärer, oraler Keratinozyten aus gesundem Randgewebe des oralen Plattenepithelkarzinoms	31
2.1.3	Kultur der Zelllinien	31
2.1.3.1	Kultur der OSCC-Zelllinien	31
2.1.3.2	Kultur der HOK-Zellen, gesunden POKs und OSCC-POKs	32
2.2	Proteinchemische Methoden	32
2.2.1	Proteinisolierung aus Zellen	32
2.2.2	Die Messung der Proteinkonzentration	33
2.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	34
2.2.3.1	Prinzip der SDS-PAGE	34
2.2.3.2	Herstellung und Gießen des Trenn- und Sammelgels	36
2.2.4	Western-Blot-Analyse	38
2.2.4.1	Tank-Blot-Verfahren	38
2.2.5	Nachweis von Proteinen auf Western-Blots mittels Antikörpern	40
2.2.5.1	Prinzip der Immundetektion	40
2.2.5.2	Blockieren der Membran und Immunfluoreszenzfärbung	41
2.2.6	Biotinylierung	41
2.2.6.1	Prinzip der Biotinylierung	41
2.2.6.2	Biotinylierung der Zelloberflächenproteine	42
2.3	Immunhistochemie	44
2.3.1	Prinzip der indirekten Immunfluoreszenzfärbung	44
2.3.1.1	Kultivierung von Zellen für die Immunfluoreszenzfärbung	44
2.3.1.2	Fixierung und Permeabilisierung von Zellen	44

2.3.1.3	Blockieren der Objektträger und Immunfluoreszenzfärbung _____	45
2.4	Durchflusszytometrie und Zellzyklusanalysen _____	45
2.4.1	Prinzip der Durchflußzytometrie _____	45
2.4.2	Zellzyklus _____	46
2.4.2.1	Zellsynchronisation _____	47
2.4.2.2	Ernten und Fixieren der Zellen _____	47
2.4.2.3	RNAse-Verdau und Propidiumiodidfärbung _____	48
2.4.2.4	Zellzyklusanalysen im FACS _____	49
3	Ergebnisse _____	51
3.1	Nachweis von P-Cadherin in Zelllysaten aus humanen oralen Keratinozyten (HOKs), Oral squamous cell carcinoma-Zellen (OSCCs) und primären oralen Keratinozyten aus gesunder Mukosa (gesunde POKs) wie auch aus Geweben von Patienten mit oralem Plattenepithelkarzinom (OSCC-POKs) _____	51
3.1.1	P-Cadherin-Expressionsmuster in der Western-Blot-Analyse _____	51
3.2	Presenilin-1-Expression in gesunden humanen oralen Keratinozyten und Plattenepithelkarzinomzellen _____	53
3.2.1	Western-Blot-Analyse mit einem Antikörper gegen Presenilin-1 _____	54
3.3	Die Auswirkung der Gamma-Sekretase-Inhibition auf die Expression und Funktion von P-Cadherin _____	55
3.3.1	Modulation der P-Cadherin-Expression nach Inkubation mit Gamma-Sekretase-Inhibitor-I (GSI-I) _____	55
3.4	Nachweis des Einflusses der Aktivität von Gamma-Sekretase-Aktivität auf die Expression und Lokalisation von P-Cadherin mithilfe von immunzytochemischen Färbungen _____	58
3.4.1	P-Cadherin-Färbung in OSCC-Zellen mit und ohne Gamma-Sekretase-Inhibitor-I _____	58
3.4.2	Immunzytochemische Färbung von P-Cadherin in HOKs - mit und ohne Gamma-Sekretase-Inhibitor-I _____	60
3.5	Nachweis von Presenilin-1 in der Membranfraktion von HOKs und OSCC-Zellen _____	61

3.5.1	Presenilin-1-Expressionsmuster in der Western-Blot-Analyse der Membranfraktion von OSCC- und HOK-Zellen	62
3.6	Proliferationsanalysen im Durchflusszytometer	63
3.6.1	Zellzyklusanalysen der HOK-Zellen	63
3.6.2	Zellzyklusanalysen der OSCC-Zellen	65
4	Diskussion	68
4.1	Diskussion der Ergebnisse	68
4.1.1	Expressionsmuster von P-Cadherin in gesunden POKs, OSCC-POKs, OSCC-Zelllinien und HOKs	68
4.1.2	Erhöhte Expression von unglykosyliertem P-Cadherin (Pcad100) nach Hemmung der Gamma-Sekretase-Aktivität in OSCC-Zellen	71
4.1.3	Verstärkte P-Cadherin-Expression bei OSCC-Zellen nach Behandlung mit GSI-I – Nachweis in der Immunfluoreszenzfärbung	74
4.1.4	Unterschiedliche Lokalisation der Presenilin-1-Expression in OSCC- und HOK-Zellen	75
4.1.5	Unveränderte Proliferationsaktivität der OSCC-Zellen nach Behandlung mit GSI-I	78
4.2	Diskussion der Materialien und Methoden	80
4.2.1	Verwendete Primär- und Tumorzelllinien	80
4.2.2	Western-Blot-Analysen	81
4.2.3	Immunfluoreszenzfärbungen	82
4.2.4	Durchflusszytometrie	83
5	Zusammenfassung	85
6	Literaturverzeichnis	87
7	Anhang	105
7.1	Abkürzungsverzeichnis	105
7.2	Tabellenverzeichnis	108
7.3	Abbildungsverzeichnis und -nachweise	109
7.4	Antikörperliste	113

7.5	Eidesstattliche Erklärung _____	114
7.6	Danksagung _____	115

1 Einleitung

1.1 Das Mundhöhlenepithel

1.1.2 Aufbau der gesunden Mundschleimhaut

Die Mundhöhle ist mit Schleimhaut ausgekleidet. Die orale Mukosa wird nach ihrem histologischen Aufbau und ihrer Funktion in drei Typen unterteilt (Orban und Sicher, 1946). Die auskleidende Schicht der Mundschleimhaut besteht aus unverhorntem Plattenepithel und liegt über einer dünnen, elastischen Lamina propria. Sie kleidet das Gaumensegel, die Zungenunterseite, die Alveolarfortsätze sowie den Mundboden und -vorhof aus. Die mastikatorische Schleimhaut findet man in Bereichen mit hoher kaumechanischer Beanspruchung, wie z.B. am Zahnfleisch und am Gaumen. Sie besitzt ein verhorntes Plattenepithel und eine dicke Lamina propria. Die sogenannte spezialisierte Schleimhaut ist am Zungenrücken lokalisiert und für die Geschmackswahrnehmung verantwortlich. Das mehrschichtige, unverhornte Plattenepithel (Abbildung 1 – links) hat meist mehr als 20 Zelllagen und wird in folgende vier Abschnitte unterteilt: Das Stratum basale (b) besteht aus einer Lage zylindrischer Zellen. Das Stratum parabasale (pb) ist mehrlagig und mit polygonaler Zellform. Es schließt sich das mehrschichtige Stratum intermedium (int) an, gefolgt vom Stratum superficiale (sup) mit pyknotischen Kernen und abgeplattetem Zelleib. Das verhornte, mehrschichtige Plattenepithel (Abbildung 1 – rechts) ist das typische Epithel der Epidermis und besteht aus Keratinozyten. Von innen nach außen unterscheidet man vier Schichten: Das Stratum basale (b), das Stratum spinosum (spin), das Stratum granulosum (gr) und das abschließende Stratum corneum (cor) mit einer variablen Anzahl von kernlosen, nicht mehr vitalen Hornzellen.

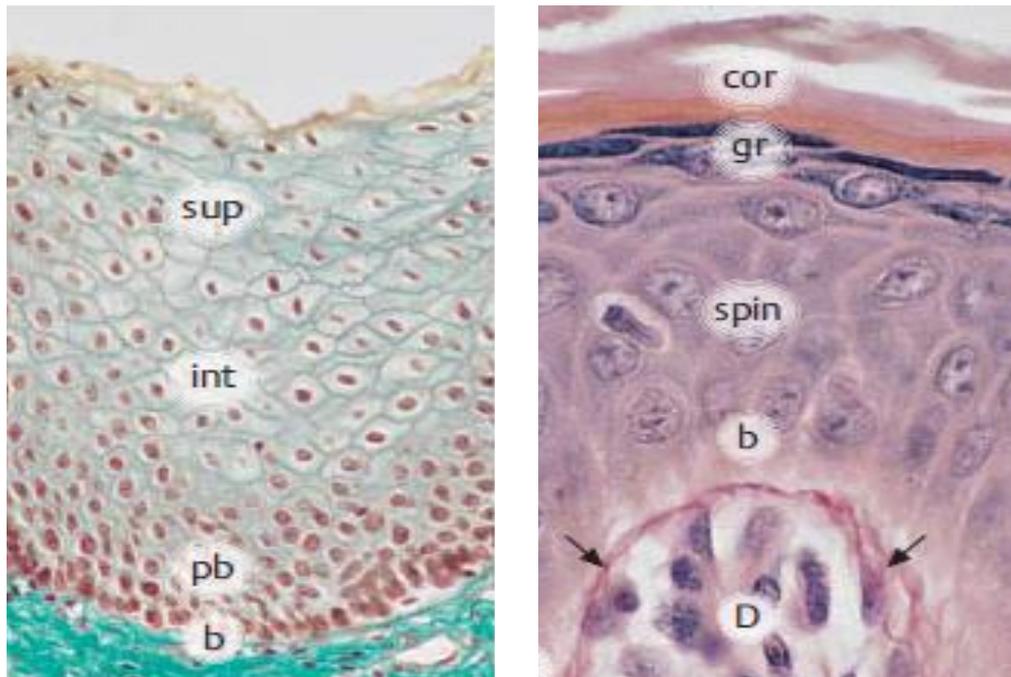


Abbildung 1: Aufbau des oralen mehrschichtigen, unverhornten (links) und des keratinisierten Plattenepithels (rechts). Die Pfeile im rechten Bild deuten auf die Basalmembran, D = bindegewebige Dermis (verändert nach Lüllmann-Rauch, 2012).

Das Epithel der Mundschleimhaut unterliegt einer ständigen Exfoliation. Der Ursprung liegt im Stratum basale, wo die Teilung der Basalzelle beginnt. Eine Tochterzelle persistiert dabei als Stammzelle in dieser Epithelschicht. Die anderen Zellen durchlaufen ein in ihrer Abfolge genau aufeinander abgestimmtes Programm der Differenzierung, während sie die oben beschriebenen Schichten von basal nach apikal passieren. Diese Differenzierung dauert circa 4–6 Wochen (Sterry, 2011).

1.1.3 Funktion der Mundschleimhaut

Neben der Unterstützung der motorischen Funktionen wie Sprechen, Schlucken und Kauen hat die Schleimhaut auch sekretorische, sinnesphysiologische, resorptive und protektive Aufgaben. Die sekretorischen Aufgaben werden von den Speicheldrüsen übernommen. Speichel ist nicht nur bei der Nahrungsaufbereitung von Bedeutung; er ist auch für die Sprachfunktion, die Mineralisation und Reinigung der Zähne sowie den

Schutz vor Infektionen, thermischen und chemischen Noxen, einschließlich Allergenen, zuständig. Nebst Muzinen und Alpha-Amylase werden weitere Eiweiße, darunter Enzyme und Immunglobuline, sowie Lipide, Glukose, Elektrolyte und Jod sezerniert. Die Resorptionsleistung der Mundschleimhaut ist für die schnelle Wirkstoffaufnahme in den Organismus verantwortlich und wird u. a. für die Pharmakotherapie genutzt. Des Weiteren dient die Mundschleimhaut als Schutzbarriere. Durch ihre feuchte Oberfläche ist sie widerstandsfähig gegenüber mechanischen Einwirkungen und schützt so die Atem- und Verdauungswege. Auf zellulärer Ebene werden immunologische Schutzfunktionen, z.B. von den Langerhans-Zellen, übernommen. Die Sekretion von Immunglobulin A (IgA) schützt vor dem Eindringen von Mikroorganismen in den Körper. Für die sensiblen und sensorischen Aufgaben der Schleimhaut finden sich freie Nervenendigungen, Thermo- und Mechanorezeptoren sowie die Geschmacksknospen auf der Schleimhautoberfläche (Gutwald et al., 2003).

Die gesunde Mundschleimhaut ist gut durchblutet, weist eine hell- bis dunkelrosa Färbung auf und ist von einem dünnen, klaren Speichelfilm überzogen. Veränderungen der Mundschleimhaut sind sehr vielschichtig und zeigen die unterschiedlichsten klinischen Erscheinungsbilder. Dem frühzeitigen Erkennen von potenziell malignen Veränderungen der Mundschleimhaut sowie die sofortige Einleitung entsprechender Maßnahmen bekommen somit zentrale Bedeutungen und können das Auftreten oraler Plattenepithelkarzinome verhindern.

1.2 Das orale Plattenepithelkarzinom

1.2.1 Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle – Definition

Laut WHO ist das Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC; orales Plattenepithelkarzinom) eine invasive, epitheliale Neubildung, welche unterschiedliche Differenzierungsgrade des Plattenepithels aufweisen kann. Es neigt zu einer frühzeitigen und extensiven Lymphknotenmetastasierung. Das OSCC tritt gehäuft – in Verbindung mit übermäßigem Alkohol- und Tabakkonsum – bei Erwachsenen in der fünften und sechsten Lebensdekade auf (Barnes et al., 2005).

Nach der internationalen statistischen Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme – 10. Revision, German Modification, Version 2015 (ICD-10-GM-2015) – werden alle bösartigen Neubildungen der Lippe, der Mundhöhle und des Pharynx unter dem Code C00-C14 angegeben (Tabelle 1).

Code	Beschreibung
C00	Bösartige Neubildung der Lippe
C01	Bösartige Neubildung des Zungengrundes
C02	Bösartige Neubildung sonstiger und nicht näher bezeichneter Teile der Zunge
C03	Bösartige Neubildung des Zahnfleisches
C04	Bösartige Neubildung des Mundbodens
C05	Bösartige Neubildung des Gaumens
C06	Bösartige Neubildung sonstiger und nicht näher bezeichneter Teile des Mundes
C07	Bösartige Neubildung der Parotis
C08	Bösartige Neubildung sonstiger und nicht näher bezeichneter großer Speicheldrüsen
C09	Bösartige Neubildung der Tonsille
C10	Bösartige Neubildung des Oropharynx
C11	Bösartige Neubildung des Nasopharynx
C12	Bösartige Neubildung des Recessus piriformis
C13	Bösartige Neubildung des Hypopharynx
C14	Bösartige Neubildung sonstiger und ungenau bezeichneter Lokalisationen der Lippe, der Mundhöhle und des Pharynx

Tabelle 1: Einteilung der oralen malignen Neoplasien nach ICD-10-GM-2015

1.2.2 Epidemiologie

Das Robert Koch-Institut (RKI) veröffentlichte im Jahr 2013 neue Daten zur Inzidenz und Mortalität von Krebserkrankungen in Deutschland. Im Jahr 2010 betrug die Neuerkrankungsrate 12 830. Daran betrug der Anteil von Männern 9 340 und der von Frauen 3 490 (RKI, 2013). Intraorale Karzinome umfassen in Deutschland 3,7 % aller malignen Krebserkrankungen bei Männern und 1,5 % bei Frauen. Wie in Abbildung 2 ersichtlich, liegen bei den Männern die Tumoren des Mundes und Rachens an der sechsten und bei den Frauen an der 15. Stelle (RKI, 2013).

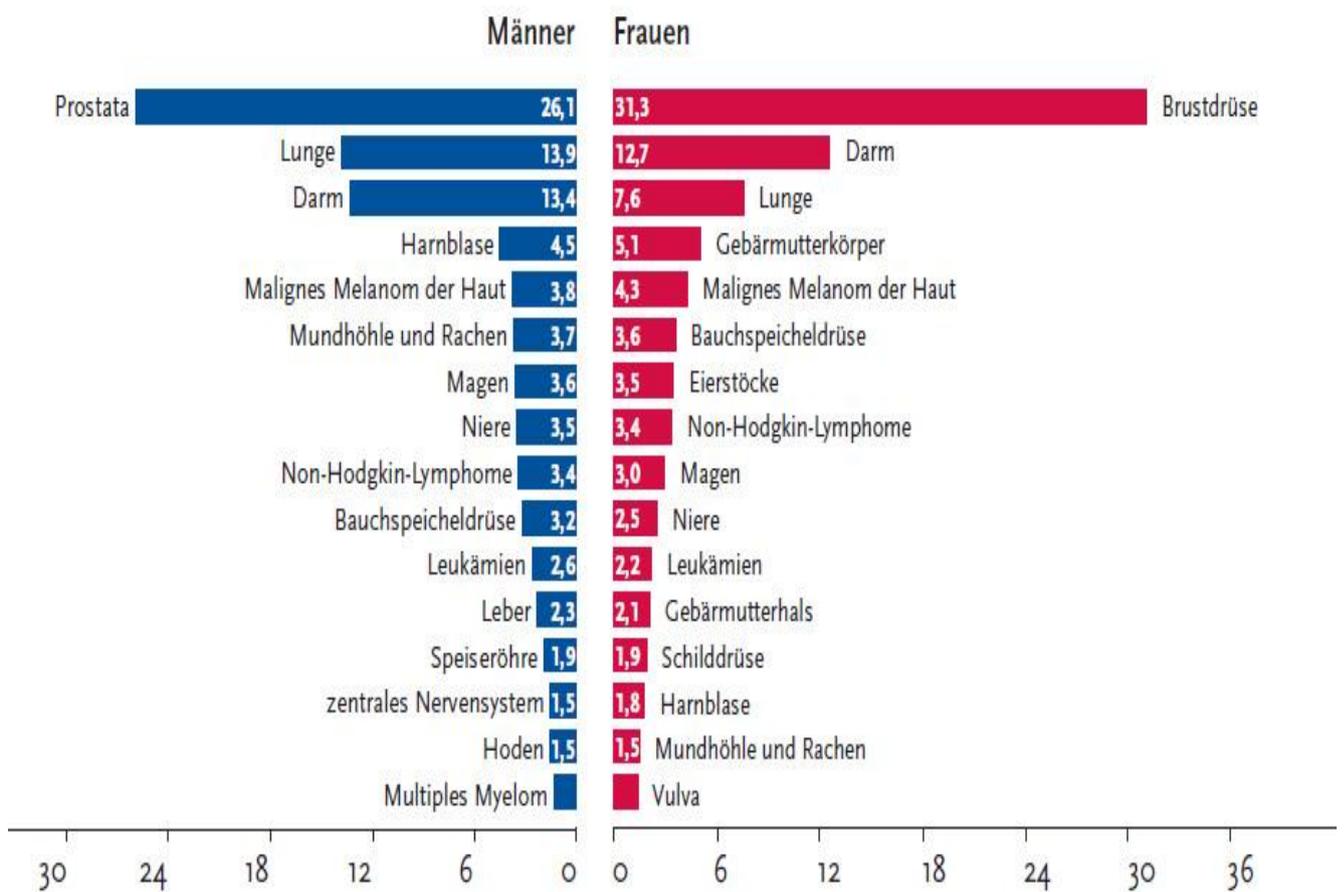


Abbildung 2: Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen bei Männern und Frauen (in Prozent) (RKI, 2013).

Nach Angaben des Statistischen Bundesamtes (Todesursachenstatistik, 2010) lag in Deutschland die Mortalität von oralen und oropharyngealen Karzinomen im Jahr 2010 bei den Männern bei 7,2/100 000 und bei den Frauen bei 1,8/100 000.

In Abbildung 3 ist ersichtlich, dass ab Beginn der Achtzigerjahre des letzten Jahrhunderts über einen Zeitraum von 24 Jahren die Neuerkrankungen sowohl bei den Männern als auch bei den Frauen zunahmen. Seit 2004 stellt sich aber eine rückläufige Tendenz für Neuerkrankungen bei den Männern dar. Bei den Frauen blieben die Raten nahezu gleichbleibend (RKI, 2010). Diese Stagnation in der Gruppe der Frauen ist vermutlich auf die Internalisierung von bisher typisch männlichen Verhaltensmustern, wie z.B. starkem Zigaretten- und Alkoholkonsum und den damit verbundenen Risikofaktoren, zurückzuführen.

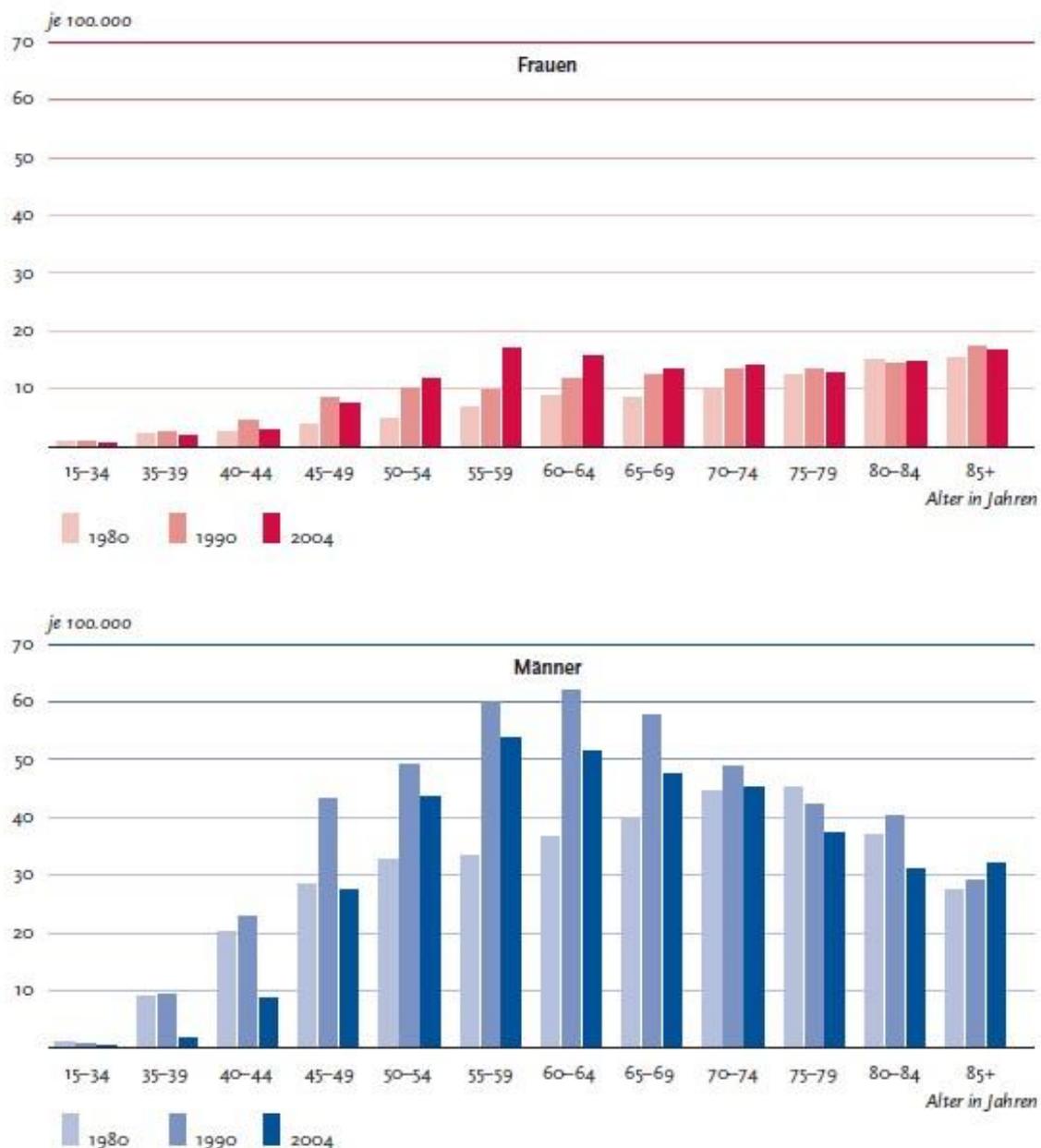


Abbildung 3: Alters- und geschlechtsspezifische Neuerkrankungsraten bei Männern und Frauen in Deutschland von 1980 bis 2004 (RKI, 2010).

Im internationalen Vergleich wurde eine hohe Inzidenz des Mundhöhlenkarzinoms auf dem indischen Subkontinent sowie in Australien, Frankreich, Südamerika (Brasilien) und Südafrika beobachtet (Abbildung 4) (Stewart und Kleihues, 2003). Bei den Männern liegt die höchste Inzidenzrate in Frankreich, während bei den Frauen das maximale Vorkommen in Indien festgestellt wurde (Stewart und Kleihues, 2003; Barnes et al., 2005).

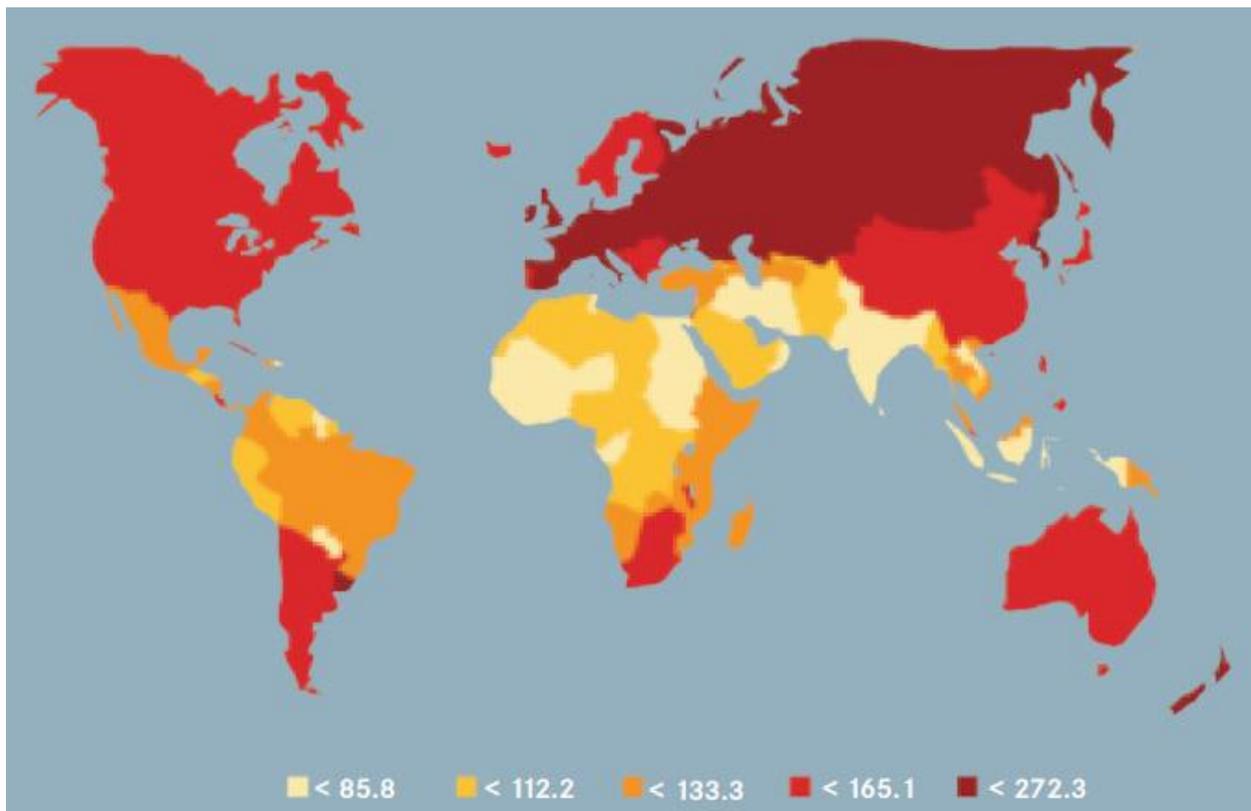


Abbildung 4: Globalinzidenz des Mundhöhlenkrebses bei Männern – altersstandardisiert pro 100 000 Einwohner und Jahr (aus Stewart und Kleihues, 2003).

1.2.3 Ätiologie

Man schätzt, dass das alleinige Rauchen von Zigaretten, Zigarren oder Pfeifen weltweit für etwa 41% der oralen und oropharyngealen Krebserkrankungen bei Männern und für 15% der Erkrankungen bei Frauen verantwortlich ist (Stewart und Kleihues, 2003). Eine jüngere Studie von Wienecke et al. (2014) bestätigte sogar den

deutlichen prozentualen Zuwachs auf 34% an Frauen in Deutschland, welche an tabakinduziertem Mundhöhlenkrebs leiden.

Zahlreiche Studien bestätigen, dass die Kombination aus Rauchen und hohem Alkoholkonsum zu den Hauptrisikofaktoren für bösartige Neubildungen des Mundes und des Rachens gehört (Figuero Ruiz et al., 2004; Altieri et al., 2002; Talamini et al., 2002). Im Tabakrauch befindet sich eine Vielzahl von Karzinogenen in Form von prozyklischen Kohlenwasserstoffen und Nitrosaminen. In Verbindung mit Alkohol ergibt sich ein multiplikativer oder synergistischer Effekt in Bezug auf diese Substanzen. Da durch Ethanol eine verstärkte Permeabilität der Mundschleimhaut erreicht wird, können sich vorgenannte Noxen viel stärker in die Gewebeschichten ausbreiten, was wiederum zu einer besonders starken Erhöhung des Krebsrisikos führt (Stewart und Kleihues, 2003; Blot et al., 1988).

Ein weiterer wichtiger Risikofaktor ist das Kauen der Areca-Nuss, welche im Allgemeinen als Betelnuss bezeichnet wird. Die Areca-Nuss wurde im Jahr 2003 von einer IARC-Experten-Gruppe (International Agency on Research for Cancer) als für den Menschen karzinogen deklariert (IARC, 2004). In Gegenden, in denen eine hohe Prävalenz zum Betelnusskauen besteht, wie z. B. in Indien, sind bis zu 50% der oralen Plattenepithelkarzinome darauf zurückzuführen (Balaram et al., 2002). Das Gefährliche am Betelnusskauen ist der direkte Kontakt zur oralen Mukosa und die lange Verweildauer in der Mundhöhle. Die enthaltenen Nitrosamine werden somit noch intensiver über die Schleimhäute aufgenommen.

Zudem wurde eine erhöhte Karzinomhäufigkeit bei unzureichendem Ernährungsverhalten beschrieben. Eine allgemeine Fehl- bzw. Mangelernährung, vor allem ein Defizit an Gemüse, Obst sowie Getreide- und Milchprodukten, stellt einen weiteren Risikofaktor für Mundhöhlenkrebs dar (Petridou, 2002).

Die Vernachlässigung der Mundhygiene wird ebenso als begünstigender Faktor gewertet (Balaram et al., 2002; Talamini et al., 2000). Ein schlechter Parodontal- und Zahnstatus verstärkt dabei die Ansammlung der exogenen chemischen Toxine aus Bakterien im Mundraum.

Weiterhin wird auch die Beteiligung von humanen Papillomviren für einige Unterarten der oralen PEC-Genese (Plattenepithelkarzinom-Genese) diskutiert (D'Souza et al., 2007; Herrero et al., 2003; Gillison et al., 2000)

1.2.4 Klinik und Tumorlokalisation

Das klinische Erscheinungsbild ist vielfältig und die Symptome in frühen Erkrankungsstadien sind oft atypisch. Die Mehrzahl der Patienten stellt sich erst in einem fortgeschrittenen Stadium vor, da zu diesem Zeitpunkt die klassischen Leitsymptome des manifesten Karzinoms auftreten. Mögliche Symptome sind hier Schmerzen, *Foetor ex ore*, Dysphagie, Sensibilitätsstörungen oder Paresen, nicht abheilende Ulzera, teilweise spontane Schleimhautblutungen oder Kieferklemme (Schwenzer et al., 2002). Unter Umständen können die Patienten auch die klassische B-Symptomatik mit Fieber, Leistungsabfall, ungewolltem Gewichtsverlust und Nachtschweiß aufweisen.

Häufig entsteht das orale PEC auf dem Boden einer oralen Leukoplakie (Scheifele et al., 1998), prinzipiell kann es aber auch auf normal erscheinender Mundschleimhaut entstehen (Cowan et al., 2001). Die Mehrzahl der Mundhöhlenkarzinome ist in der unteren Region der Mundhöhle lokalisiert. Mashberg et al. (1976) konnten in einer Studie nachweisen, dass der Mundboden, der Zungenrand und der weiche Gaumen als Prädilektionsstellen anzusehen sind.

1.2.5 Diagnostik

Für die frühzeitige Diagnosestellung ist primär die Inspektion der Mundhöhle durch einen Zahnarzt am wichtigsten. In der zahnärztlichen Praxis sollte bei verdächtigen Schleimhautläsionen zuerst die Basisdiagnostik durchgeführt werden. Diese beinhaltet neben der o.g. Inspektion die eingehende Anamnese, in der auch die tumorspezifischen Risikofaktoren, wie der Genuss der in Unterabschnitt 1.2.3 angesprochenen Suchtmittel, abgefragt werden müssen. Danach folgt die Palpation suspekter Areale und regionärer Lymphknoten. Eine histologische Diagnosesicherung erfolgt durch eine Probeexzision oder eine Biopsie (Schwenzer et al., 2002). Zusätzlich sollten noch konventionelle Röntgenaufnahmen, wie z.B. die Anfertigung einer Panoramaschichtaufnahme, erfolgen. Wenn sich in vorgenannten Untersuchungen der Verdacht auf das orale Plattenepithelkarzinom bestätigt, ist eine sofortige Überweisung in eine entsprechende Fachklinik nötig.

Dort erfolgt die weiterführende Diagnostik nach dem Leitlinienprogramm der Deutschen Krebsgesellschaft (Kunkel et al., 2010). Nachfolgende Untersuchungen betreffen die lokale und regionale Ausdehnung des Tumors sowie die Metastasensuche:

- Erfassen des HNO-Status
- Palpation und Sonografie des Halses
- Panendoskopie zum Ausschluss eines simultanen Zweitkarzinoms
- *Staging* (siehe Punkt 1.2.6)
- als Standardmethode wird eine Hals-CT (Computertomografie) oder MRT (Magnetresonanztomografie) angefertigt
- Röntgenthorax in zwei Ebenen
- Knochenszintigrafie zur Fernmetastasensuche im Skelettsystem
- Abdomen-Sonografie

Zur Beurteilung der Operationsfähigkeit erfolgen eine klinisch-chemische Laboruntersuchung, ein EKG, eine Spirometrie sowie ein anästhesiologisches und internistisches Konsil.

1.2.6 Staging und Tumorklassifikation

Zur Planung und Realisierung einer Tumorthherapie benötigt man noch weitere umfassende Informationen über das vorliegende Tumorleiden. Zum *Staging* wird international überwiegend die TNM-Klassifikation verwendet, welche u. a. von der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) und dem American Joint Committee on Cancer (AJCC) benutzt wird. Wie in den Tabellen 2 bis 4 ersichtlich, beschreibt T die Tumorgöße, N das Ausmaß des Lymphknotenbefalles und M das Vorhandensein von Fernmetastasen.

T-Klassifikation	Beschreibung
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
T2	Tumor mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 4 cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor mehr als 4 cm in größter Ausdehnung
T4	Lippe: Tumor infiltriert durch kortikalen Knochen, den N. alveolaris inferior, in Mundhöhlenboden oder in Haut (Kinn oder Nase)
T4a	Mundhöhle: Tumor infiltriert durch kortikalen Knochen in äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hyoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), Kieferhöhle oder Gesichtshaut
T4b	Lippe und Mundhöhle: Tumor infiltriert Spatium masticatorium, Processus pterygoideus oder Schädelbasis oder umschließt die A. carotis interna

Tabelle 2

N-Klassifikation	Beschreibung
Nx	regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen vorhanden
N1	Metastasen in solitärem ipsilateralem Lymphknoten, 3 cm oder weniger im größten Durchmesser
N2	Metastasen in solitärem ipsilateralem Lymphknoten, mehr als 3 cm, aber nicht mehr als 6 cm im größten Durchmesser, oder multipler ipsilateraler Lymphknotenbefall, oder bilateraler oder kontralateraler Lymphknotenbefall, in keinem Fall aber mehr als 6 cm im größten Durchmesser
N2a	Metastasen in solitärem ipsilateralem Lymphknoten, mehr als 3 cm, aber nicht mehr als 6 cm im größtem Durchmesser
N2b	Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6 cm im größten Durchmesser
N2c	Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6 cm im größten Durchmesser
N3	Metastasen in Lymphknoten, mehr als 6 cm im größten Durchmesser

Tabelle 3

M-Klassifikation	Beschreibung
Mx	Vorhandensein bzw. Fehlen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
M0	keine Fernmetastasen nachweisbar
M1	Fernmetastasen vorhanden

Tabelle 4

Tabellen 2 - 4: TNM-*Staging* der oralen Plattenepithelkarzinome (nach Greene et al, 2002).

Die Differenzierung wird durch das *Grading* beschrieben und ist ein Maß für die histologische Aggressivität eines Tumors. Es werden vier Entdifferenzierungsgrade (G1, G2, G3/4 und Gx) unterschieden. Je höher der Differenzierungsgrad, desto schlechter ist die Prognose, da Infiltration und Metastasierung in umgebende Strukturen zunehmen.

Zur Simplifizierung des komplexen TNM-Systems wurde von der UICC der Schweregrad der Erkrankung in vier Stadien unterteilt (Abbildung 5). Mit zunehmendem Stadium sinkt die Überlebensrate (Spiro, 1985).

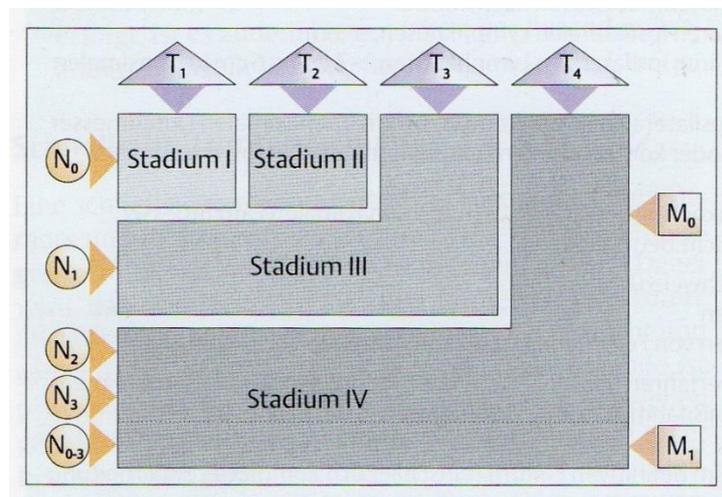
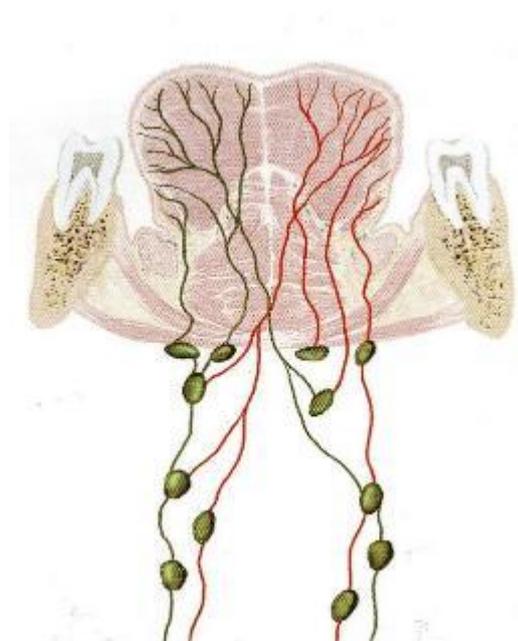


Abbildung 5: Stadieneinteilung gemäß den Richtlinien der UICC (aus Schwenzer et al., 2002).

1.2.7 Metastasierungswege

Wie schon in Punkt 1.2.4 erwähnt, befinden sich die Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose häufig im Stadium T3 oder T4 mit Metastasen in den Halslymphknoten oder Fernmetastasen. Dies betrifft mit 70 % am häufigsten die Männer. Etwa 40 % der Frauen können in einem früheren Stadium (T1) diagnostiziert werden. Dies ist wohl auf eine höhere Bereitschaft der Frauen, präventive Untersuchungen wahrzunehmen, zurückzuführen. Diese Unterschiede erklären zum Teil auch die niedrigen Überlebensraten von Männern.

Die Mundhöhlenkarzinome haben die Eigenschaft, zunächst lymphogen zu metastasieren, danach können aber auch hämatogene Fernmetastasen auftreten (Schwenzer et al., 2002). Der Lymphabfluss von Zunge und Mundboden erfolgt über die submentalen und submandibulären Lymphknotenstationen, die letztlich die Lymphknoten entlang der V. jugularis interna drainieren. Bei der chirurgischen Therapie ist zu beachten, dass sich die Lymphbahnen der Zunge und des Mundbodens kreuzen, ergo die Lymphflüssigkeit sowohl ipsi- als auch kontralateral abfließt (Abbildung 6). Nach dem Einbruch in das Blutgefäßsystem spricht man von einer hämatogenen Metastasierung. Die Tumorzellen werden im Kapillargebiet parenchymatöser Organe herausgefiltert und breiten sich dort in Form von



Organmetastasen aus. Am häufigsten ist eine hämatogene Absiedlung von Fernmetastasen in der Lunge zu beobachten (Jones et al., 1995; Osaki et al., 2000).

Abbildung 6: Lymphabfluss der Zunge (aus Schünke et al., Prometheus, Kopf und Neuroanatomie, 2006).

1.2.8 Therapie

Die drei wichtigsten Tumortheriesäulen bei der Behandlung von Mundhöhlenkarzinomen stellen die Chirurgie, die Bestrahlungs- und die Chemotherapie dar. Dabei hängt das therapeutische Vorgehen sowohl vom vorangegangenen *Tumorstaging* als auch von Begleiterkrankungen des Patienten ab. Zudem sollte vor Beginn jeglicher Tumorthherapie, insbesondere vor einer geplanten Strahlentherapie, obligatorisch eine Sanierung des Gebisses durch den Zahnarzt erfolgen (AWMF, 2012). Nachfolgende Maßnahmen sollten vor der

Bestrahlungstherapie durchgeführt werden, da sich sonst das Risiko von infizierten Knochennekrosen – induziert durch die ionisierende Strahlung – signifikant erhöht (DGZMK, 2002; Schwenger et al., 2002):

- Entfernung aller harten und weichen Beläge am Restzahnbestand
- Extraktion von avitalen, fortgeschritten PA-geschädigten, kariös zerstörten oder teilretinierten Zähnen und Wurzelresten mit Risiko zur Schlupfwinkelinfektion
- konservierende Therapie
- chirurgische Sanierung persistierender Epitheldefekte (Mukosaläsionen) sowie gegebenenfalls das Abtragen scharfer Knochenkanten

Die primär kurative Therapie des gut operablen Mundhöhlenkarzinoms (z. B. T1, N0) besteht in der vollständigen chirurgischen Resektion des Primärtumors unter Wahrung eines dreidimensionalen Sicherheitsabstandes von 1–2 cm im gesunden Gewebe und Ausräumung aller Lymphknoten (AWMF, 2012; Schwenger et al., 2002). Bei fortgeschrittenen Tumoren (T3 oder T4) hat sich ein multimodales chirurgisch-radio-chemotherapeutisches Vorgehen bewährt (Schwenger et al., 2002). Bei Patienten mit einem inkurablen Mundhöhlenkarzinom müssen palliative Maßnahmen zur Linderung der tumorbedingten Alteration herangezogen werden. Hierbei geht es darum, das Tumorwachstum zu bremsen, das Leben zu verlängern und die Lebensqualität möglichst lange aufrechtzuerhalten. Durch chirurgische und/oder radiologisch-interventionelle Maßnahmen sollen die Reduktion von Schmerzen, Blutungen und Dysphagie, die Sicherung der Kau- und Atemfunktion sowie die Entfernung von nekrotischen und bakteriell besiedelten Tumormassen sichergestellt werden (AWMF, 2012).

1.3 Tumorbilogie

1.3.1 Entstehung von Krebserkrankungen

Zur Entstehung und Erhaltung eines jeden Organismus ist eine sensibel eingestellte Symmetrie zwischen Zellteilung und Zelldegeneration wichtig, sodass jede Zelle einem hohen Selektionsdruck unterliegt. Eine Aufeinanderfolge von somatischen Mutationen, die zur Störung dieses Gleichgewichts führt, kann für die einzelne Zelle einen entscheidenden Selektionsvorteil bedeuten, auch wenn dies letztlich zur Schädigung des Gesamtorganismus führt. So wird Krebs zum Ergebnis eines mehrstufigen Prozesses von genetischen Fehlern und Veränderungen, deren Akkumulation im Inneren der Zelle zu ihrer Entartung führen kann (Cohen und Ellwein, 1991). Maligne entartete Zellen weisen oftmals sechs wesentliche Charakteristika auf, die in Abbildung 7 als Modell nach Hanahan und Weinberg (2000) dargestellt sind.

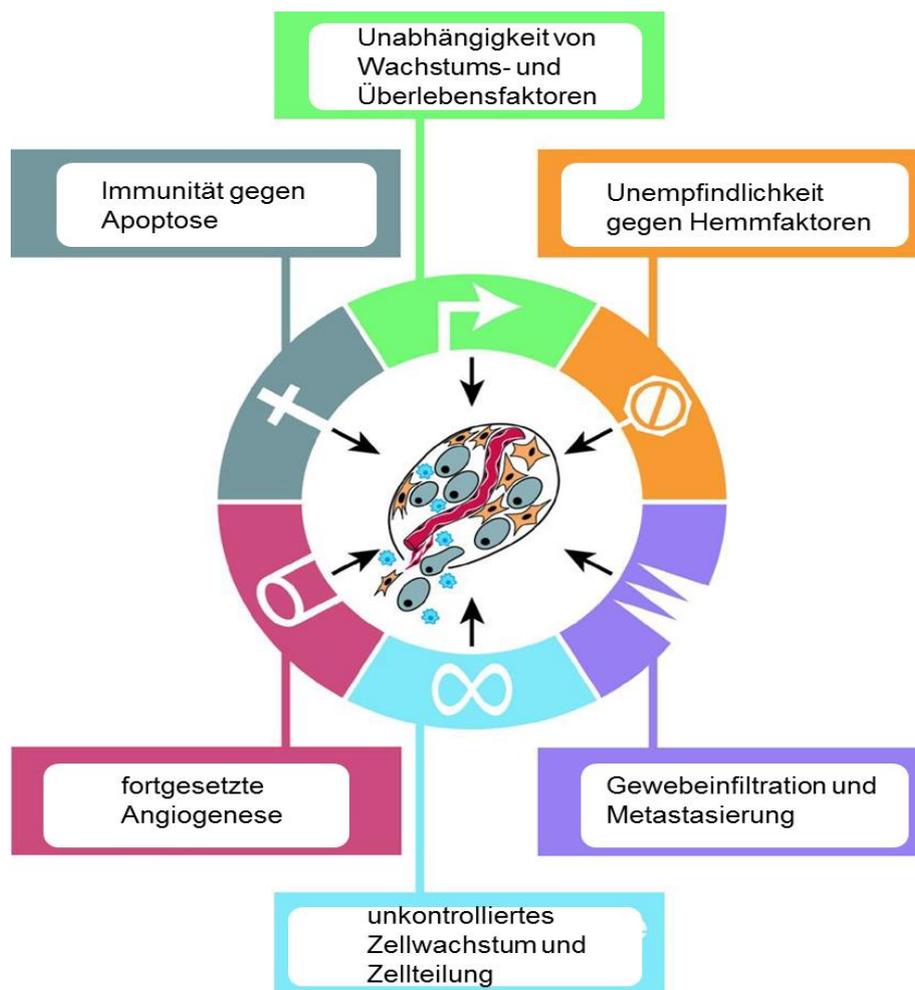


Abbildung 7: Erworbene Kompetenzen maligner entarteter Zellen (verändert nach Hanahan und Weinberg, 2000).

- Unabhängigkeit von Wachstums- und Überlebensfaktoren sowie fehlende Reaktion auf wachstumshemmende Signale: daraus resultiert ein unkontrolliertes autonomes Tumorwachstum
- unbegrenztes Wachstumspotenzial: durch reaktivierte Telomerase-Aktivität erhalten die Zellen das Potenzial zur unbegrenzten Replikation (McCaul et al., 2002)
- Apoptoseresistenz: mangelnde Fähigkeit zum programmierten Zelltod
- Dominanz von proangiogenetischen Faktoren: initiiert die Proliferation von Blutgefäßen und stellt so die Ernährung des Tumors sicher
- Verlust von Zelladhäsionsmolekülen: Einwanderung in benachbarte Strukturen oder Fortbewegung in weiter entfernte Regionen

Aufgrund dieser Eigenschaften sind Tumorzellen in Bezug auf ihre zelluläre Überlebensstrategie sehr erfolgreich, erreichen dadurch aber im Allgemeinen eine letale Schädigung des Gesamtorganismus.

1.3.2 Modell zur Karzinogenese

Krebs kann zum einen spontan und ohne äußere Einflüsse entstehen, zum anderen aber auch durch chemische, physikalische oder biologische Noxen induziert werden. Es ist allgemein üblich, die Tumorentstehung in die Phasen Initiation (Krebsentstehung), Promotion (Förderung) und Progression (Fortschreiten) aufzuteilen. Bei der Induktion durch die o.g. externen Noxen steht dabei am Anfang das irreversible Einwirken von mutagenen oder genotoxischen Stoffen auf die DNA. Dabei können Regulationsgene des Zellzyklus, wie z. B. die Protoonkogene, aktiviert und/oder die Tumorsuppressorgene inaktiviert werden. Kann dieser Schaden nicht repariert oder durch Apoptose ausgeschaltet werden, sodass die geschädigte Zelle proliferiert, spricht man von der Promotion. Dadurch entstehen präneoplastische Zellpopulationen mit identischen Mutationen. Zwischen der Phase der Promotion und der Progression, in welcher der Tumor klinisch manifest wird, vergehen meist mehrere Jahre. Man spricht hier auch von der Latenzzeit. In der Progressionsphase kommt es durch weitere Mutationen, zumeist wieder in zahlreichen Protoonkogenen die nun in Onkogene umgewandelt worden sind und in Tumorsuppressorgenen, zur eigentlichen

malignen Transformation. Für diese Phase sind aneuploide bösartige Neoplasien charakteristisch, andere Strukturen werden nicht mehr beachtet (Invasion) und es erfolgt eine Loslösung aus dem Zellverband und eine Metastasierung in andere Organe.

Wie oben erwähnt, können die Zielgene von potenziell Malignom induzierenden Noxen in zwei Hauptgruppen, die Onkogene und die Tumorsuppressorgene, unterteilt werden. Auch Gene, welche die Apoptose und die DNA-Reparatur regulieren, können an der Karzinogenese beteiligt sein. Im Rahmen dieser Arbeit werden die zwei bekanntesten Gensysteme, die Onkogene und die Tumorsuppressorgene, beispielhaft vorgestellt.

Onkogene entstehen z. B. durch Punktmutation, Amplifikation oder Translokation aus Protoonkogenen. Diese kodieren für Proteine, die Wachstum, Teilung und Differenzierung einer Zelle kontrollieren. Nach ihren physiologischen Funktionen lassen sich diese Proteine in folgende fünf Gruppen einteilen:

- Wachstumsfaktoren: z. B. EGF (epidermal growth factor) oder FGF (fibroblast growth factor)
- Wachstumsfaktor-Rezeptoren: EGFR (epidermal growth factor receptor 1), z. B. verantwortlich für Mamma- und Ovarial-Karzinom (Oda et al., 2005)
- GTP-bindende Proteine: Ras-Familie, u. a. verantwortlich für Kolon-, Lungen- und Blasen-Karzinome sowie Melanome (Lowy und Willumsen, 1993)
- Nukleäre Transkriptionsfaktoren: MYC-Familie, z. B. verantwortlich für das Burkitt-Lymphom (Evan und Littlewood, 1993)
- Zellzyklus-Regulatoren: Cyklin E oder Cyklin-abhängige Kinasen (CDK), u. a. verantwortlich für Glioblastome oder Sarkome (Galderisi et al., 2003)

Onkogene verhalten sich immer dominant, d. h., die Wirkungsausprägung tritt schon bei Veränderung eines Allels ein.

Beispielhaft wird hier aus der Gruppe der Onkogene der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) beschrieben. EGFR ist ein Transmembran-glykoprotein und ein Mitglied der Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen. Die Aktivierung von EGFR induziert dessen Autophosphorylierung und die Rekrutierung von Signalmolekülen, woraus eine nachgeschaltete Aktivierung des G-Proteins Ras

resultiert (Hackel et al., 1999). Ras stimuliert das Zellwachstum und verhindert die Apoptose. Bei 75 % der OSCC-Fälle wurde eine Überexpression des EGFR-Gens beobachtet. Dies lässt darauf schließen, dass EGFR als biologischer Marker infrage kommt, um Hochrisikogruppen frühzeitig zu identifizieren und spezifische prophylaktische Therapien einleiten zu können (Mahendra et al., 2014).

Die Transformation einer normalen Zelle in eine Krebszelle geht auch mit dem Funktionsverlust eines oder mehrerer Tumorsuppressorgene einher. Die von ihnen kodierten Proteine wirken als Negativregulatoren der Zellproliferation, weswegen eine negative Fehlregulation unkontrolliertes Zellwachstum begünstigt. Tumorsuppressorgene blockieren die Genexpression von Wachstumsfaktoren mit daraus resultierender Hemmung oder Arretierung des Zellzyklus. Darauf folgen der Beginn von Reparaturmechanismen und die Fortführung des Zellzyklus bei reversiblen Schaden. Bei irreversiblen DNA-Schaden wird die Apoptose eingeleitet. Anders als bei den Onkogenen müssen bei Tumorsuppressorgenen beide Allele mutiert (rezessiv) sein, damit es zu einer entarteten Funktion kommt.

Eines der meist beforschten Tumorsuppressorgene ist das p53-Protein; es wurde im Jahr 1979 das erste Mal identifiziert und ist in vielen Typen von entarteten Zellen in erhöhter Menge messbar (Lane und Crawford, 1979; Linzer und Levine, 1979). Seinen Namen trägt das TP53-Gen nach seinem Produkt, dem nukleären Phosphoprotein p53 mit einem Molekulargewicht von 53 kDa und es befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 (Region 17p13.1). Die Hauptaufgabe von p53 besteht darin, die Integrität des Genoms zu sichern. Die Rolle als „Wächter des Genoms“ wird p53 aufgrund seiner regulierenden Eigenschaften bei der Genexpression nach DNA-Schädigung, der Zellzykluskontrolle, der Apoptoseinduktion oder der DNA-Reparatur zugeschrieben (Lane, 1992). In gesunden Zellen ist p53 in geringen Mengen vorhanden, bei Schäden in der DNA akkumuliert es jedoch in der Zelle, was verschiedene Konsequenzen impliziert. Wenn ein Konzentrationsanstieg von p53 früh im Zellzyklus stattfindet, aktiviert es beim Übergang von der G₁-Phase in die S-Phase einen Kontrollpunkt, der den Zellzyklus arretiert, bis der Schaden repariert ist. Ist die DNA irreparabel geschädigt, aktiviert p53 u. a. den Apoptoseregulator BAX, welcher der Bcl-2-Proteinfamilie angehört, und löst so den programmierten Zelltod aus (Chao und Korsmeyer, 1998). TP53 ist in bis zu 50 % aller malignen Neoplasien durch Mutationen inaktiviert (Soussi und Lozano, 2005). Das Vorliegen von TP53-Mutationen

bedeutet für die Betroffenen oftmals eine schlechtere Prognose und ein vermindertes Therapieansprechen. Es kann somit auch im oralen Plattenepithelkarzinom als wichtiger prognostischer Faktor angesehen werden (Francis et al., 2013; Tanuma, 2010).

Ferner gehört auch der Cyklin-abhängige-Kinase-Inhibitor 2A, auch p16 genannt, zu den Tumorsuppressorgenen. Er ist ein Protein, das durch seine starke Bindung an die Enzyme CDK4 und CDK6 den Zellzyklus reguliert. Mutationen im CDKN2A-Gen, aber auch eine verringerte oder deaktivierte p16-Expression durch DNA-Methylierung sind im OSCC bis zu 70% auszumachen. Das hohe Auftreten von inaktivem p16 deutet darauf hin, dass dieses Protein eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Mundhöhlenkrebs spielt (Hardisson, 2003).

Für den OSCC-spezifischen Karzinogenese-Mechanismus ist zudem der *Loss of Heterozygosity* (LOH = Allelverlust) charakteristisch. Califano et al. entwickelten bereits im Jahr 1996 ein vorläufiges Modell zur Tumorprogression für das Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich. Diesem Modell nach können LOHs in der 9p-Region bereits in gutartiger Mukosa und Vorläuferläsionen des OSCC beobachtet werden. Es folgen Allelverluste in den Bereichen 3p und 17p bei Dysplasien sowie Deletionen auf den Loci 11q, 13q und 14q bei einem *Carcinoma in situ*. Mit einem invasiven Tumor sind Verluste in den Regionen 6p, 8p und 4q assoziiert (Califano et al., 1996). Abbildung 8 beschreibt die schrittweise Progression von der normalen über die dysplastische orale Mukosa bis hin zum manifesten OSCC, gestaffelt in frühe und späte Stadien der Tumorentwicklung. Die Progression wird durch Akkumulation der genetischen Veränderungen bestimmt. Verschiedene Studien konnten diesen mehrstufigen Prozess nachweisen (Mao et al., 2004).

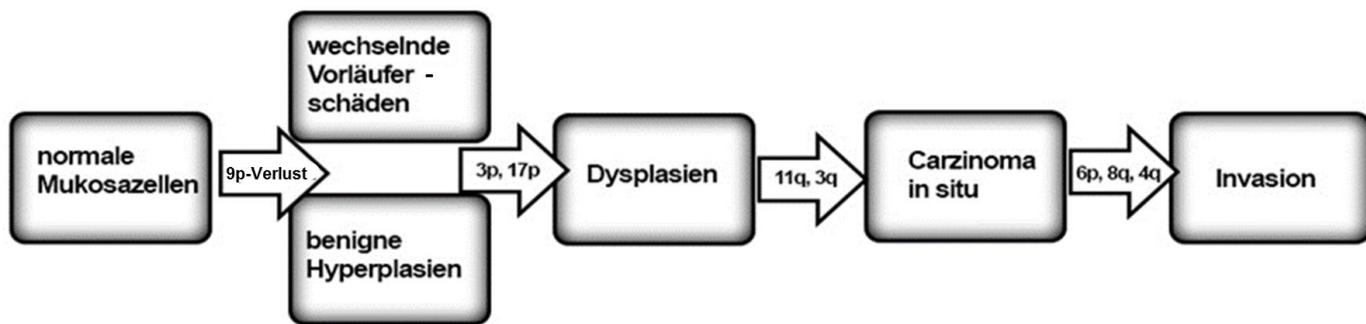


Abbildung 8: Modell der genetischen Progression bei Tumoren im Kopf-Hals-Bereich (verändert nach Califano et al., 1996).

1.4 Zelladhäsion und Cadherine

1.4.1 Zelladhäsion und Zelladhäsionsmoleküle

Die Zelladhäsion stellt ein grundlegendes Strukturmerkmal multizellulärer Organismen dar und ist unerlässlich für die Entstehung übergeordneter Strukturen, wie z. B. die Spezialisierung zu Geweben oder Organen. In tierischen Zellen wird die Zelladhäsion durch eine Reihe von integralen Membranproteinen bewirkt, welche die Interaktion zwischen benachbarten Zellen oder von Zellen und der sie umgebenden extrazellulären Matrix vermitteln. Bei der Vermittlung der Adhäsion spielen vier verschiedene Hauptfamilien eine größere Rolle: die Selektine, die Integrine, die Immunglobuline und die Cadherin-Superfamilie.

1.4.2 Cadherin-Superfamilie

Cadherine sind Calcium-abhängige glykosylierte Transmembranproteine, welche erstmals durch die Arbeitsgruppe von Takeichi entdeckt und nachgewiesen wurden (Takeichi, 1990; Yoshida-Noro et al., 1984; Takeichi et al., 1981). Bis dato sind über 100 Cadherine identifiziert worden. Diese lassen sich aufgrund ihrer Struktur und Genetik in fünf Subklassen unterteilen: klassische Typ-I-Cadherine, klassische Typ-II-Cadherine, desmosomale Cadherine, Protocadherine und Cadherin-Verwandte (Nollet et al., 2000; Yagi und Takeichi, 2000).

1.4.2.1 Klassische Cadherine

Die Vertreter der klassischen Cadherine sind z. B. das E- und das N-Cadherin sowie das in dieser Arbeit untersuchte P-Cadherin. Ihre Nomenklatur richtet sich häufig nach dem Gewebe, aus dem sie isoliert wurden oder in dem ihre Expression sehr stark ist. So findet man das E-Cadherin in den meisten Epithelien, das N-Cadherin vorwiegend in neuronalem Gewebe und das P-Cadherin in der Plazenta und Epidermis von Mäusen (Nose und Takeichi, 1986). Lokalisiert sind Cadherine vor allem in den Zonulae adherentes und besitzen ein ungefähres Molekulargewicht von 120 kDa. Sie bestehen aus einem relativ großen extrazellulären Segment, einer Transmembrandomäne sowie einer kleineren zytoplasmatischen Domäne (Abbildung 9). Die extrazelluläre Domäne, in welcher sich das N-terminale Ende befindet, besteht aus fünf Tandem-Domänen (EC1–EC5 = extrazelluläre Cadherin-Domänen) gleicher Größe und Struktur. Diese sogenannten ECs haben jeweils eine Länge von circa 110 Aminosäuren, zeigen eine dreidimensionale Faltung und weisen eine große Ähnlichkeit mit der Immunglobulin-Domäne auf (Niessen et al., 2011; Shapiro et al., 1995). Zwischen den einzelnen Domänen liegen Ca^{2+} -Bindungsstellen. Erst durch die Anwesenheit von Calcium-Ionen bleibt der extrazelluläre Anteil so starr, wie es für die Adhäsion erforderlich ist (Pertz et al., 1999). Typ-I-Cadherine besitzen eine konservierte Histidin-Alanin-Valin-Sequenz (HAV) in ihrer ersten Cadherin-Domäne, welche eine zentrale Rolle bei der homophilen Cadherin-Cadherin-Bindung spielt (Takeichi, 1990). Der Transmembrandomäne folgt ein etwa 150 Aminosäuren umfassender hochkonservierter zytoplasmatischer Anteil, über den die extrazelluläre Domäne mit dem Zytoskelett verbunden ist (Abbildung 9). Dieser als C-Terminus bezeichnete Anteil bindet direkt an verschiedene zytoplasmatische Proteine aus der Gruppe der Catenine. Das β -Catenin bindet direkt an den distalen Anteil der zytoplasmatischen Cadherin-Domäne, wo es als Anker für das α -Catenin fungiert, welches selbst nicht direkt mit dem Cadherin-Molekül verbunden ist. Das β -Catenin ist via α -Catenin mit dem Zytoskelett verknüpft. Ferner ist es auch an Übertragungsprozessen des Wnt/Wingless-Pathways beteiligt, welcher u. a. eng mit der Embryogenese, Organogenese und Tumorgenese verbunden ist (Wodarz und Nusse, 1998; Miller und Moon, 1996). Das p120-Catenin, auch δ -Catenin genannt, bindet an die Juxtamembranregion, wo es die Zellmigration und die Aktivität von

Transkriptionsfaktoren reguliert. Zudem stabilisiert es die Cadherine in der Zellmembran (Anastasiadis und Reynolds, 2000).

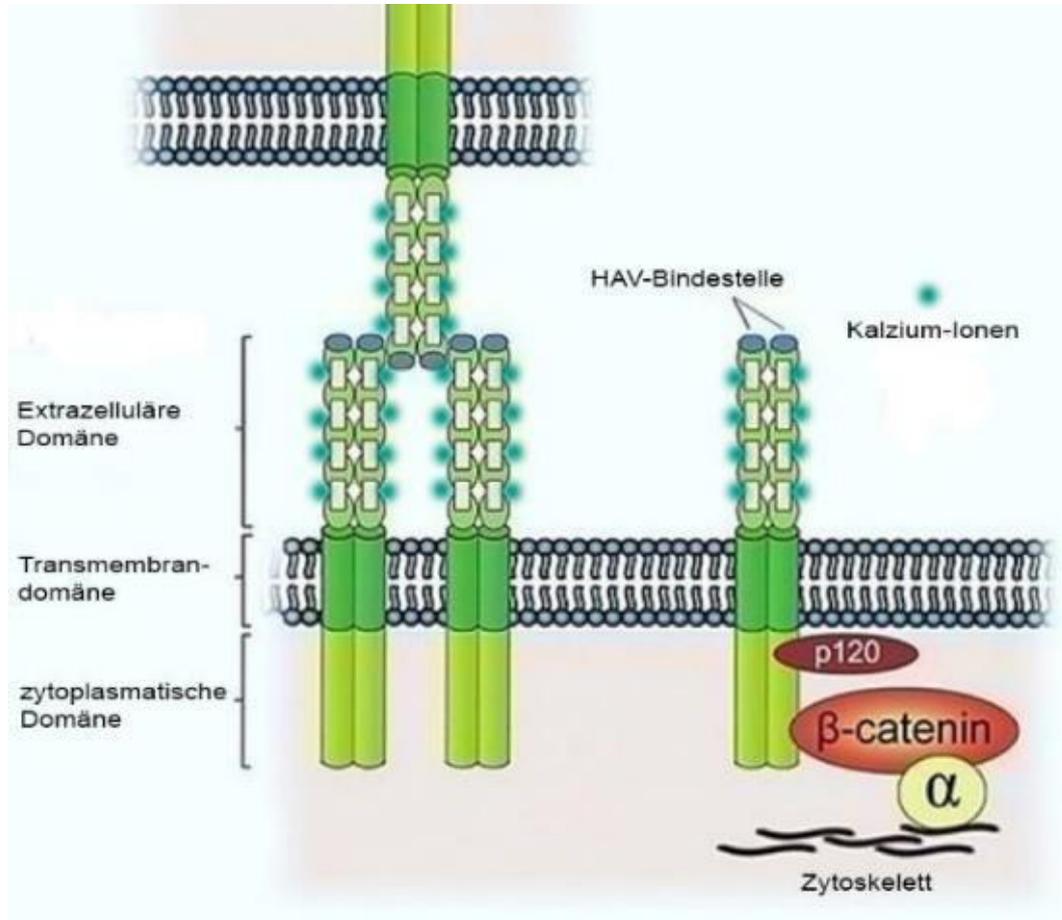


Abbildung 9: Schema der Molekülstruktur der Typ-I-Cadherine (verändert nach Lyon et al., 2011). Quelle: <https://www.bioscience.org/2011/v16/af/3711/fig2.jpg> (14. März 2015)

1.4.2.2 P-Cadherin

Gegenstand dieser Arbeit ist P-Cadherin vom klassischen Typ I und soll im Folgenden näher beschrieben werden.

Nose und Takeichi entdeckten im Jahr 1986 erstmals, dass P-Cadherin in der Maus-Plazenta exprimiert wird, und vermuteten, dass es dort die Funktion erfüllt, den Embryo in die Gebärmutter Schleimhaut zu integrieren und mit ihr zu verankern.

Eine wichtige Rolle spielt P-Cadherin auch in der Morphogenese der Epidermis, es ist in der suprabasalen Schicht der Hautzellen zu finden (Hirai et al., 1989a; Hirai et al., 1989b; Shimoyama et al., 1989a).

P-Cadherin hat große Ähnlichkeit mit E-Cadherin. Dennoch ist die Expression von P-Cadherin im Vergleich zu E-Cadherin im Epithel auf basale und suprabasale Epithelschichten beschränkt, was neben den bekannten redundanten Funktionen auch auf eine spezifische Rolle von P-Cadherin schließen lässt. Über die Rolle von P-Cadherin bei der Krebsentstehung im Allgemeinen und im Speziellen beim OSCC ist im Gegensatz zu E-Cadherin noch nicht viel bekannt. In verschiedenen Studien, welche die Funktion von E-Cadherin untersuchten, wurde gezeigt, dass ein direkter Zusammenhang zwischen einer Verringerung von E-Cadherin und dem Invasionspotenzial und der Progression von vielen epithelialen Tumoren, einschließlich dem OSCC, besteht (Birchmeier et al., 1995; Downer und Speight, 1993). Zudem konnte vielfach eine reduzierte E-Cadherin-Expression bei schlecht differenzierten OSCC-Zellen beobachtet werden (Mattijssen et al., 1993). Zu einem Verlust der Zelladhäsion kommt es außerdem durch die proteolytische Abspaltung der zytoplasmatischen Domäne durch die Gamma-Sekretase-Aktivität von Presenilin-1 (Halbleib und Nelson, 2006).

Die Studien, die es bis dato über P-Cadherin gibt, sagen aus, dass es in der gesunden oralen Mukosa ausschließlich in basalen und suprabasalen Keratinozyten zu finden ist (Muñoz-Guerra et al., 2005; Lo Muzio et al., 2004). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass es im OSCC in verminderter Form vorliegt und somit zum invasiven Potenzial des Mundhöhlenkarzinoms beiträgt (Muñoz-Guerra et al., 2005; Bauer et al., 2008; Bauer et al., 2009). Es konnte weiterhin aufgezeigt werden, dass das Expressionsmuster von P-Cadherin mit dem Grad der Differenzierung korreliert (Lo Muzio et al., 2004). Gut differenzierte Karzinomzellen zeigten eine normale oder eine hochregulierte P-Cadherin-Expression, während schlecht differenzierte OSCC-Zellen eine reduzierte P-Cadherin-Expression vorwiesen (Lo Muzio et al., 2005; Lo Muzio et al., 2004; Bauer et al., 2008). Auch Aussagen zu den Überlebensraten beim OSCC können mithilfe der P-Cadherin-Expression getroffen werden. Patienten mit einer fehlenden P-Cadherin-Expression haben signifikant schlechtere Überlebenschancen und kürzere tumorfreie Intervalle als OSCC-Patienten mit einer vorhandenen P-Cadherin-Expression (Lo Muzio et al., 2005; Lo Muzio et al., 2004). In Melanomzellen

konnte erstmals im Jahr 2005 eine trunkierte Form des P-Cadherins detektiert werden (Bauer et al., 2005). Es handelt sich um ein 50 kDa (Pcad50) großes Fragment des sonst 120 kDa großen P-Cadherins. Diese verkürzte Form beeinflusst die homophile Interaktion zwischen den einzelnen Cadherinen und spielt eine Rolle in der Progression des malignen Melanoms, da es die Zelladhäsion negativ beeinflusst (Bauer et al., 2005). Bauer et al. konnten drei Jahre später nachweisen, dass diese trunkierte Form des P-Cadherins auch im OSCC vorhanden ist. Während in gut differenzierten OSCC-Zellen sowohl das Volllänge-P-Cadherin als auch das trunkierte P-Cadherin gefunden wurden, war in entdifferenzierten OSCC-Zellen ausschließlich Pcad50 eruierbar. Dies lässt den Schluss zu, dass das Volllänge-P-Cadherin während der Progression des OSCC trunkiert wird und dies zu verminderter Gewebeintegrität führt. Daraus wiederum resultiert eine erleichterte Zelltrennung und Migration im OSCC (Bauer et al., 2008). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine induzierte Expression des Volllänge-P-Cadherins die Glykogensynthase-Kinase 3 beta (GSK-3beta) aktiviert, was unmittelbar zu einer Inaktivierung von Snail führt. Snail fungiert als Inhibitor der E-Cadherin-Expression. Dieser Mechanismus der GSK-3beta-Aktivierung initiiert die Reexpression von E-Cadherin und die Umkehr von OSCC-Zellen vom mesenchymalen zum epithelialen Phänotyp (Bauer et al., 2009).

1.5 Gamma-Sekretase

Die Gamma-Sekretase ist ein aus 4 Untereinheiten bestehender Proteinkomplex und ein integrales Membranprotein. Die Protease-Untereinheit des Komplexes schneidet Transmembranproteine innerhalb ihrer Transmembrandomäne (TMD). Im Jahr 1993 verwendete man erstmals die Bezeichnung „Gamma-Sekretase“, um deren proteolytische Aktivität zu beschreiben (De Strooper et al., 2012). Ihr bekanntestes Substrat ist das Amyloid-Precursor-Protein (APP), welches sie in ihrer Transmembrandomäne spaltet (Haass und Selkoe, 1993). Bei der Gamma-Sekretase handelt es sich um einen aus vier Untereinheiten bestehenden Proteinkomplex: Presenilin-1 (PSEN1 bzw. PS-1) oder Presenilin-2 (PSEN2 bzw. PS-2), Nicastrin, Stabilisationsfaktor APH-1 und Presenilin-Enhancer 2 (PEN-2), die vermutlich in einer 1:1:1:1-Stöchiometrie im Komplex vorliegen (Abbildung 10) (Sato et al., 2007). Die vier

Untereinheiten sind integrale Membranproteine und essenziell sowie ausreichend für die Gamma-Sekretase-Aktivität (Kimberly et al., 2003).

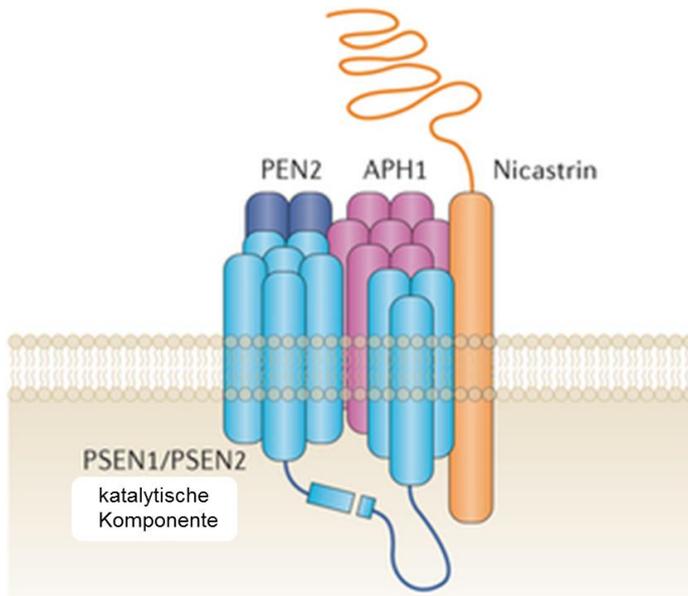


Abbildung 10: Schematische Abbildung des Gamma-Sekretase-Komplexes, bestehend aus den vier Untereinheiten: Presenilin-1 oder -2 (PSEN1/PSEN2), Nicastrin, Stabilisationsfaktor APH1 und Presenilin-Enhancer 2 (PEN2) (verändert nach Andersson und Lendahl, 2014).

Quelle: <http://www.nature.com/nrd/journal/v13/n5/images/nrd4252-i2.jpg> (10. November 2015)

1.5.1 Komponenten des Gamma-Sekretase-Komplexes

1.5.1.1 Presenilin

Um die komplizierte Struktur des Membran-Protein-Komplexes verstehen zu können, muss man die Membrantopologie der Einzelkomponenten genauer beschreiben. Die beiden Homologe Presenilin-1 (im Folgenden PS-1 genannt) und Presenilin-2 (im Folgenden PS-2 genannt) sind integrale Membranproteine, weisen etwa 63 % Sequenzidentität auf und durchspannen die Membran mehrfach (Rogaev et al., 1995; De Strooper et al., 2012). Sie besitzen eine 9-TMD-Topologie, wobei der N-Terminus ins Zytosol und der C-Terminus ins Lumen ragt (Laudon et al., 2005; Oh und Turner, 2005). Preseniline stellen die katalytische Untereinheit der Gamma-Sekretase dar und sind Aspartatproteasen (Shearman et al., 2000; Wolfe et al., 1999a). Die katalytischen Aspartate befinden sich innerhalb der Membran, in den TMDs 6 und 7 (Wolfe et al., 1999b; Kimberly et al., 2000). Weiterhin sind Preseniline am intrazellulären

Proteintransport, an der Regulation des β -Catenin-Signalweges und an der Calcium-Homöostase im endoplasmatischen Retikulum beteiligt (Naruse et al., 1998; Tu et al., 2006). Die Gamma-Sekretase-Aktivität lässt sich durch Inhibitoren gegen Aspartatproteasen hemmen (Shearman et al., 2000; Wolfe et al., 1999a).

1.5.1.2 Nicastrin, APH-1 und PEN-2

Nicastrin ist ein Typ-I-Membranprotein, welches die Membran einmal durchkreuzt. Es besitzt eine große extrazelluläre Domäne, welche stark glykosyliert und während des Reifungsprozesses der Gamma-Sekretase noch fest gefaltet ist (Shirotani et al., 2003). Es ist als Interaktionspartner von PS-1 und PS-2 beschrieben (Yu et al., 2000). APH-1 ist ein 7-TMD-Protein, dessen N-Terminus und C-Terminus sich jeweils auf der luminalen und zytoplasmatischen Seite befinden (Fortna et al., 2004). Es scheint vor allem der Stabilisierung des Komplexes zu dienen (LaVoie et al., 2003). PEN-2 ist mit einem Molekulargewicht von 12 kDa die kleinste Untereinheit des Gamma-Sekretase-Komplexes und durchzieht die Membran wie eine Haarnadel, ergo durchkreuzt diese zweimal. Sowohl der N- als auch der C-Terminus befinden sich auf der luminalen Seite (Crystal et al., 2003). Die funktionelle Bedeutung von PEN-2 liegt in der Reifung und Stabilisierung des Gamma-Sekretase-Komplexes.

1.5.2 Substrate der Gamma-Sekretase

Seit der ursprünglichen Entdeckung, dass APP ein Substrat des Presenilin-abhängigen Gamma-Sekretase-Komplexes ist, wurden mindestens 90 weitere Proteine gefunden, die von diesem Enzym-Komplex proteolytisch gespalten werden (Haapasalo und Kovacs, 2011). Ein besonders bedeutsames Substrat ist Notch, das für die Zelldifferenzierung und -erneuerung von großer Bedeutung ist (De Strooper et al., 1999). Weitere wichtige Substrate neben APP und Notch sind u. a. die Zelladhäsionsmoleküle CD44, N- und E-Cadherin sowie eine Reihe von Wachstumsfaktoren wie z. B. Erb-B4 (Lammich et al., 2002; Marambaud et al., 2002; Marambaud et al., 2003; Yarden und Sliwkowski, 2001). Letztere regulieren die Zellproliferation und -differenzierung.

1.5.2.1 Der Notch-Signalweg

Die am besten untersuchte biologische Funktion der Gamma-Sekretase ist ihre wichtige Rolle bei der Aktivierung von Notch-Rezeptoren durch regulierte intramembrane Proteolyse (RIP) (Hass et al., 2009). Dieser Signalweg ermöglicht die Zell-Zell-Kommunikation benachbarter Zellen durch die Interaktion vom Notch-Rezeptor auf der Oberfläche der einen Zelle und dessen membranständigen Liganden „Delta“ oder „Jagged“ auf der Oberfläche der anderen Zelle (Gray et al., 1999). Dies ist besonders wichtig während der Embryogenese und für die Zelldifferenzierung (Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Der Notch-Rezeptor wird dreimal proteolytisch geschnitten; das erste Mal im Golgi-Apparat und danach zwei weitere Male, nachdem Delta gebunden hat. Zuerst wird die extrazelluläre Domäne nahe der Plasmamembran abgespalten (Hass et al., 2009). Dann wird der zytoplasmatische Teil des membranständigen Notch-Rezeptors durch Presenilin-1 abgetrennt und diffundiert in den Zellkern, wo das Fragment in einem Komplex mit anderen Regulatorproteinen an das CSL-Protein (Kombination von CBF-1, Suppressor of Hairless und Lag-1) bindet und so die Expression von Notch-Response-Genen reguliert (Hass et al., 2009).

Störungen im Notch-Signalweg können verschiedene pathologische Prozesse, wie z.B. Entwicklungsstörungen und Tumoren, zur Folge haben. Eine Assoziation zwischen einem fehlregulierten Notch-Signalweg und der Tumorgenese wurde erstmals bei der akuten lymphatischen T-Zell-Leukämie (T-ALL) festgestellt (Ellisen et al., 1991). Eine fehlregulierte Expression von Notch-Rezeptoren und -Liganden wurde auch in soliden Tumoren, wie z. B. Lungen-, Bauchspeicheldrüsen-, Gebärmutterhals- und Prostatakrebs, beobachtet (Westhoff et al., 2009; Weijzen et al., 2002; Miyamoto et al., 2003; Zayzafoon et al., 2004). Zudem konnten Studien zeigen, dass die Hochregulation des Notch-Signalweges zu einem malignen Phänotyp des Plattenepithelkarzinoms im Kopf-, Hals- und Mundhöhlenbereich führen kann (Ha et al., 2003; Snijders et al., 2005).

1.6 Fragestellung

An der schlechten Prognose bei Tumoren der Kopf-Hals-Region hat in sich den letzten Jahren nur wenig geändert. Trotz der Identifikation der einleitend dargestellten relevanten Zelladhäsionsmoleküle sind die Kenntnisse über deren genaue Funktionen während der komplexen Vorgänge der Karzinogenese gerade bei den oralen Karzinomen noch sehr lückenhaft. Auch in der Literatur existieren bisher nur verhältnismäßig wenige Informationen über die Rolle und Bedeutung von P-Cadherin im OSCC.

Die Beteiligung von P-Cadherin an der Tumorentwicklung im oralen Plattenepithelkarzinom ist deswegen seit mehreren Jahren Gegenstand intensiver Untersuchungen der Forschungsabteilung der Klinik- und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universität Regensburg. Man beschäftigt sich hauptsächlich mit der Frage, wie sich die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen und die zugehörigen Signalwege während der Progression des oralen Plattenepithelkarzinoms verändern.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, wie die P-Cadherin-Prozessierung und das P-Cadherin-Expressionsmuster in Gewebeproben von erkrankten Patienten (kranke primäre orale Keratinozyten = OSCC-POKs) und in Zelllinien eines Plattenepithelkarzinoms des Kopf-Hals-Bereichs (PCI-Zellen) von der Gamma-Sekretase beeinflusst wird. Vergleichend wurden dazu von Kontrollgruppen gesunde Gewebeproben (gesunde primäre orale Keratinozyten = gesunde POKs) bzw. primäre humane orale Keratinozyten (HOKs) untersucht. Das Ziel der Studie ist es zu prüfen, ob durch Inhibition der katalytischen Untereinheit der Gamma-Sekretase, Presenilin-1, die Funktion von P-Cadherin verändert wird und dadurch bestimmte differenzielle Expressions- und Proliferationsprofile zwischen kranken und gesunden Zell- und Gewebepopulationen identifiziert werden können. Dies könnte wichtig für die frühzeitige Diagnose des oralen PEC, die prognostische Einschätzung sowie für die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten sein.

Die Untersuchungen dieser Dissertation sollen einen Beitrag zur Aufklärung der Rolle von P-Cadherin bei der Invasion und Metastasierung des oralen Plattenepithelkarzinoms leisten. Zudem soll durch die vorliegende Studie das Verständnis der Zelladhäsion im Bereich der Tumorprogression erweitert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkulturmethoden

2.1.1 Verwendete Zelllinien

Für die Experimente wurden humane Plattenepithelkarzinomzelllinien (OSCC = Oral Squamous Cell Carcinoma) und zur Kontrolle gesunde humane orale Keratinozyten (HOKs) verwendet.

Die verwendeten OSCC-Zelllinien PCI 1, 4A, 9, 13, 52 und 68 wurden von Prof. T. L. Whiteside (University of Pittsburgh Cancer Institute, Pittsburgh, Pennsylvania, USA) bezogen. Sie stammen, wie in Tabelle 5 aufgezeigt, von verschiedenen Plattenepithelkarzinomen in der Mundhöhle ab.

Zelllinien	Tumorlokalisation	pTNM
PCI-1	Larynx	T2N0M0
PCI-4A	Zungengrund	T3N0M0
PCI-9	Zungengrund	T4N3M0
PCI-13	Retromolares Dreieck	T4N1M0
PCI-52	Aryepiglottische Falte	T2N0M0
PCI-68	Zunge	T4N0M0

Tabelle 5: Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Plattenepithelkarzinomzelllinien (Bauer et al., 2008; Heo et al., 1989).

Die humanen oralen Keratinozyten (HOKs) wurden von ScienCell (Carlsbad, California, USA) bezogen. Laut Hersteller wurden die Zellen aus humaner fötaler oraler Mukosa isoliert.

2.1.2 Gewinnung primärer oraler Keratinozyten aus gesundem Randgewebe des oralen Plattenepithelkarzinoms

Die von uns verwendeten primären OSCC-Organokulturen (OSCC-POKs) stammen aus Resektionen, die an der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Regensburg, durchgeführt wurden. Zur Isolierung gesunder primärer oraler Keratinozyten wurde gesundes orales mukosales OSCC-Randgewebe (gesunde POKs) im Rahmen einer Biopsie bzw. gesundes Gewebe aus den Alveolen bei Zahnextraktionen entnommen und verarbeitet. Zur Isolierung der Gewebe wurden diese über Nacht mit 0,04 % Trypsin (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) verdaut. Am folgenden Tag wurde diese Reaktion durch Zugabe von 0,0125 % Trypsin-Inhibitor (Invitrogen) abgestoppt. Das jeweilige Epithel wurde mit einem Skalpell von der Submukosa abgetrennt, in Medium aufgenommen und in beschichtete Zellkulturflaschen (BD Falcon, Heidelberg, Deutschland) verteilt. Um undifferenzierte Keratinozyten aus den isolierten Zellen zu filtern, wurden diese nach Erreichen einer Konfluenz von 70 % durch sequenzielle Filtrierung nach ihrer Größe aufgetrennt. Ein 30-µm-Filter (Partec GmbH, Görlitz, Deutschland) entfernte zunächst die großen, differenzierten Keratinozyten. Nach einer erneuten Filtration durch einen 20-µm-Filter (Partec GmbH) wurde eine Zellpopulation aus primären Keratinozyten erhalten, welche eine Größe von $\leq 20 \mu\text{m}$ aufwies.

2.1.3 Kultur der Zelllinien

2.1.3.1 Kultur der OSCC-Zelllinien

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten OSCC-Zellen wurden bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und anschließend in eine T75-cm²-Kulturflasche (Corning Incorporated, Corning, New York, USA), befüllt mit einem Volumen von 8 ml Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM, Pan-Biotech, Aidenbach, Deutschland), überführt. Zu je 500 ml DMEM wurden 10 % fötales Kälberserum (FKS) (Gibco, Karlsruhe, Deutschland), 1 % L-Glutamin (Gibco) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Gibco) zugegeben. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank (Thermo Scientific Inc., Schwerte, Deutschland) bei 37 °C und unter 5 % CO₂. Ein Wechsel des Mediums erfolgte alle zwei Tage.

2.1.3.2 Kultur der HOK-Zellen, gesunden POKs und OSCC-POKs

Die Adhäsion und das Wachstum von Zellen kann durch Beschichtung der Zellkulturgefäße mit Adhäsionsfaktoren positiv beeinflusst werden. Somit wurden die Kulturflaschen vor dem Aussäen der o. g. Zellen für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit rekombinantem humanem Typ-1-Kollagen (Coating Matrix Kit von Gibco) beschichtet.

Das Auftauen und Aussäen der HOK-Zellen wie auch die Inkubation und der Medienwechsel der HOKs sowie der gesunden und kranken POK-Zellen erfolgten analog zu den OSCC-Zellen. Als Kulturmedium diente EpiLife-Medium (Gibco), versetzt mit 1 % *EpiLife Defined Growth Supplement* (Gibco).

2.2 Proteinchemische Methoden

2.2.1 Proteinisolierung aus Zellen

Die Zelllinien wurden zur Durchführung der Experimente in 6-Well-Kulturschalen (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) ausgesät. Die Isolierung der Proteine wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

1. Absaugen des Kulturmediums
2. Waschen mit PBS-Puffer (phosphate-buffered saline-Puffer) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA)
3. Zugabe von 0,5 ml 0,04 % Trypsin (PAA, Cölbe, Deutschland) pro Well
4. nach circa 2 Minuten Zugabe von 1 ml Medium, um die Trypsin-Reaktion abzustoppen
5. Überführung der Zellsuspension in ein 15-ml-Falcon (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland)
6. Zentrifugation (Hättich, Bäch, Schweiz) bei 1200 rpm (revolutions per minute) für 5 Minuten
7. Absaugen des Überstandes und Resuspendierung in 1 ml PBS-Puffer

8. Überführung der Zellen in ein 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und sofortige Kühlung auf 4 °C
9. 5 Minuten Zentrifugation bei 2500 rpm und 4 °C
10. Entfernung des Überstandes und Resuspendierung des Zellpellets in 200 µl RIPA-Puffer (Radioimmunoprecipitation assay-Puffer) (Sigma-Aldrich)
11. Aufschluss der Zellen mittels Ultraschallbeschallung (Bandelin, Berlin, Deutschland) für 20 Sekunden in 2 Zyklen bei einer Amplitude von 75 %
12. 15-minütiges Eisbad mit Vortexen alle 3–4 Minuten
13. 10-minütige Zentrifugation (Eppendorf) bei 13 000 rpm und 4 °C
14. Abnahme des Überstandes (Zelllysat), Überführung in ein 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß und Lagerung im Eisbad

Das Zelllysat wurde bei -20 °C eingefroren oder sofort verwendet.

2.2.2 Die Messung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Zelllysate erfolgte mittels der BCA-Methode, welche von Smith und Mitarbeitern entwickelt wurde (Smith et al., 1985). Das entwickelte Detektionssystem verknüpft die Biuret-Reaktion mit Bicinchoninsäure (BCA). Dabei reagieren zunächst zweiwertige Kupfer-Ionen quantitativ mit Protein zu einwertigen Kupfer-Ionen. Diese ergeben mit der Bicinchoninsäure einen violetten Farbstoff, dessen Absorption bei 562 nm photometrisch detektiert werden kann (Abbildung 11).

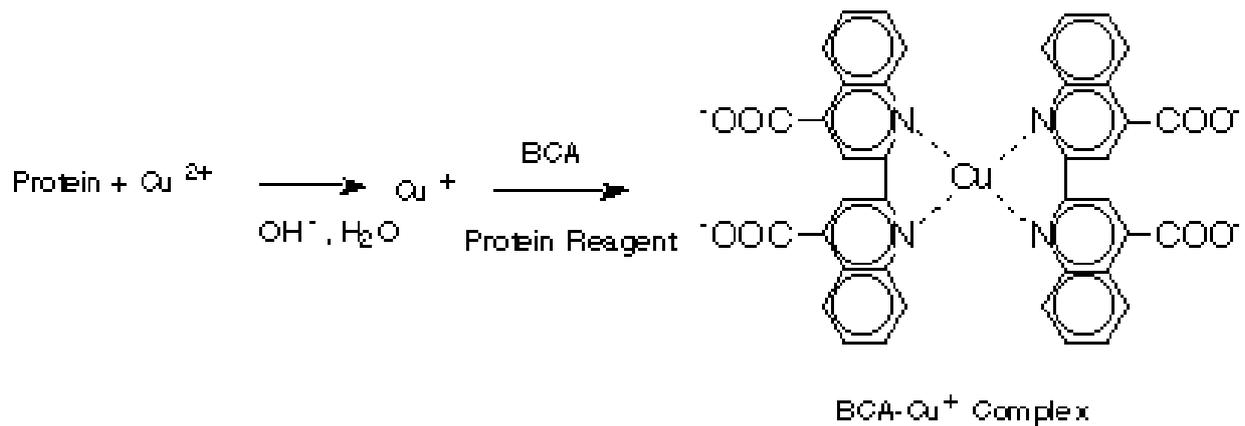


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Bildung eines Kupfer(II)-Komplexes bei der Biuret-Reaktion. Quelle: <http://www.nugizentrum.de/experimente/biochemie/protein-bestimmung/allgemeines/zusatzinfo.html> (14. März 2015)

Die Proteinkonzentration wurde mithilfe des *BCA Protein Assay Kit* (Merck, Darmstadt, Deutschland) ermittelt. Für den Test wurden 200 µl des BCA-Reagenzes (BCA-Lösung : 4% Kupfersulfat = 50:1) mit 10 µl des BCA-Standards sowie 10 µl des Zelllysates für 30 Minuten bei 37 °C in einer 96-Well-Platte (Greiner) inkubiert. Anschließend erfolgte die photometrische Messung bei 562 nm (Tecan GENios Microplate Reader, Männedorf, Schweiz; Software Magellan).

2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

2.2.3.1 Prinzip der SDS-PAGE

Die SDS-PAGE ist eine Art Molekularsieb, welches aus langen Polymeren des Acrylamids, quervernetzt durch Bisacrylamid, besteht. Bei der SDS-PAGE können Proteingemische nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden (Laemmli, 1970). Dies wird durch die Zugabe von Natriumdodecylsulfat (engl.: sodium dodecyl sulfate – SDS) erreicht. SDS ist ein starkes anionisches Tensid und besitzt die Fähigkeit, Eigenladungen von Proteinen zu überdecken, sodass die Moleküle im elektrischen Feld zur Anode wandern (Roy et al., 2014). Dies geschieht beim 5-minütigen Erhitzen der Proben auf 95 °C im SDS-haltigen Ladepuffer. Dabei werden die Proteine denaturiert und mit einem konstant negativen Masse-Ladungs-Verhältnis versehen,

sodass nun die Wanderungsgeschwindigkeit vorrangig durch die Kettenlänge proportional zur Molekülmasse bestimmt wird. Größere Proteine werden also im Gel stärker zurückgehalten als kleinere Proteine.

Für die Denaturierung wurde den Proben Laemmli-Puffer (Roth, Karlsruhe, Deutschland) zugesetzt, welcher Glycerin, Bromphenolblau und Beta-Mercaptoethanol enthält (Laemmli, 1970). Bromphenolblau wandert aufgrund seiner physikalischen Eigenschaften immer vor der Proteinfront und zeigt somit den Fortschritt der Elektrophorese an. Glycerin verhindert eine Durchmischung mit dem Elektrodenpuffer. Um die Proteine in eine Lauffront zu bringen, durchlaufen sie zuerst ein Sammelgel mit geringerer Maschendichte, bevor sie im Trenngel mit höherer Maschendichte nach ihrer Größe aufgetrennt werden (Abbildung 12).

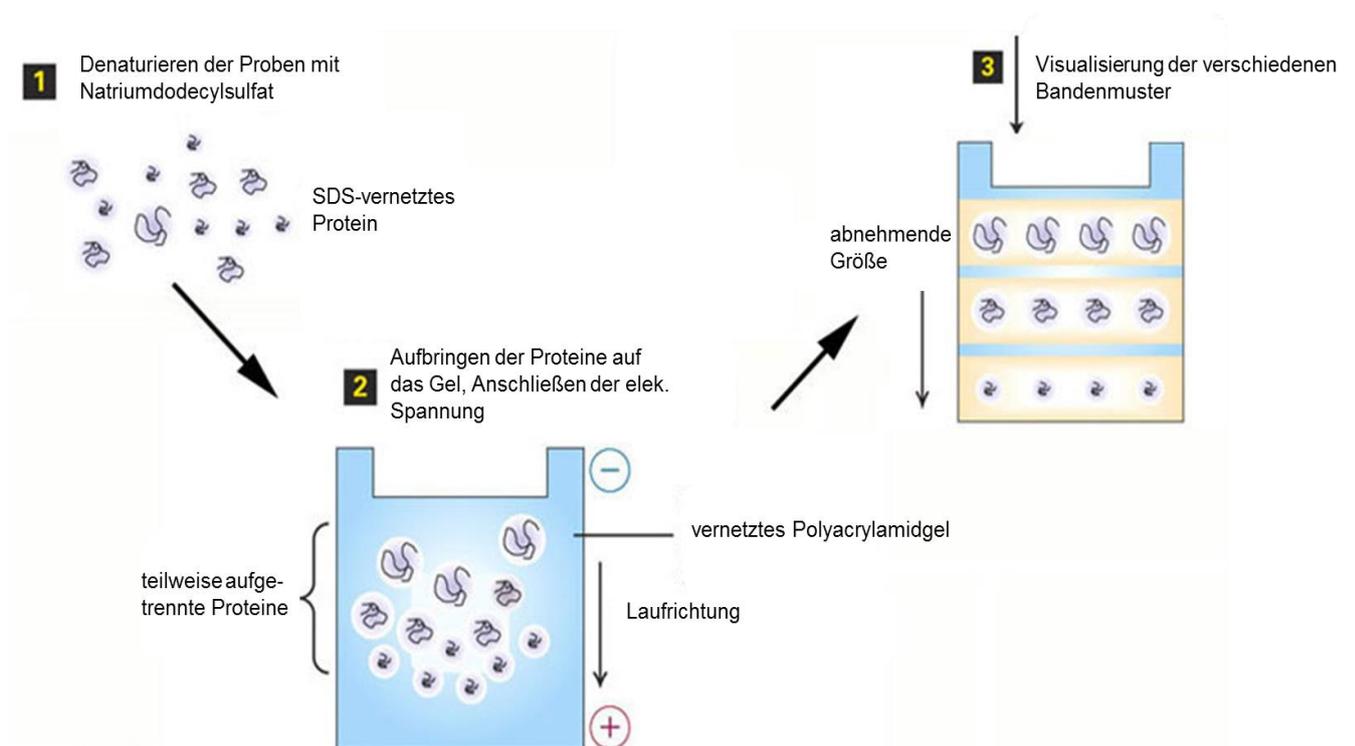


Abbildung 12: Schematische Darstellung der elektrophoretischen Proteintrennung in einem Polyacrylamidgel (verändert).

Quelle: <http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/255/255tech/mcb3.32.SDS.elect.jpg>
(14.März 2015)

2.2.3.2 Herstellung und Gießen des Trenn- und Sammelgels

Zur Herstellung des Trenngels (10 % oder 15 %) wurden die in Tabelle 6 angegebenen Agenzien verwendet, wobei TEMED (Tetramethylethyldiamin) (Sigma-Aldrich) erst zum Schluss zugegeben wurde, um den Polymerisationsvorgang zu starten. Das Trenngel wurde dann sofort in die vorbereitete Gelgießkammer überführt und nachfolgend mit 1 ml Isopropanol überschichtet, um einen Kontakt des Trenngels mit Sauerstoff auszuschließen, da Sauerstoff die Bildung freier Radikale während der Polymerisation verhindert und daher die Polymerisation verzögert. Zudem wird durch die Zugabe des Isopropanols eine horizontale Oberfläche des Trenngels erreicht. Nach erfolgter Polymerisation wurde das Isopropanol dekantiert und das Sammelgel (4 %) (Tabelle 7) über das Trenngel geschichtet. Zur Ausformung von Ladetaschen wurde vor der Polymerisation ein Kunststoffkamm in das Sammelgel eingesetzt. Nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels wurde das Gel mit den Glasplatten in die Gelkammer eingesetzt, die Kammer mit Elektrodenpuffer (Tabelle 8) aufgefüllt, der Kamm entfernt und die Taschen mit Elektrodenpuffer gespült.

Trenngel	Menge bei 10 %	Menge bei 15 %
Aqua dest. (Merck Millipore)	3,6 ml	2,35 ml
40 % Acrylamid (Bio-Rad)	2,5 ml	3,75 ml
1 M Tris-HCl pH 8,8 (Merck)	3,75 ml	3,75 ml
10 % SDS (Roth)	100 µl	100 µl
10 % APS	50 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl

Tabelle 6: Pipettierschema Trenngel (1 Gel)

Sammelgel	Menge
Aqua dest.	2,85 ml
40 % Acrylamid	375 µl
1 M Tris-HCl pH 6,8	450 µl
10 % SDS	37,5 µl
10 % APS	25 µl
TEMED	3,5 µl

Tabelle 7: Pipettierschema Sammelgel (1 Gel)

Elektrodenpuffer pH 8,5	Menge
Tris-HCl pH 8,5	50 mM
Glycin (Merck) mit Aqua dest. auf 1 Liter auffüllen	40 mM

Tabelle 8: Lösung für Elektrophoresepuffer (1 Liter)

Vor dem Auftragen der Proben auf das Gel wurde die Proteinlösung im Verhältnis 1:4 mit Laemmli-Puffer versetzt und der Ansatz für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Danach wurden die Proben mit einer Pipette in die Geltaschen aufgetragen. Als Proteingrößenstandard wurde in die linke Spur 10 µl SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) aufgetragen. Die Zusammensetzung des Markers ist in Abbildung 13 dargestellt.

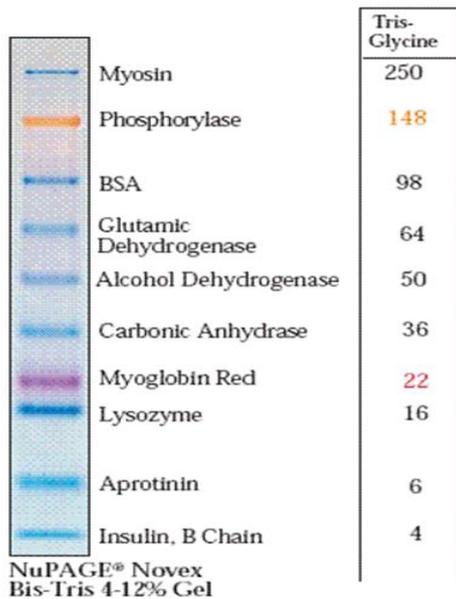


Abbildung 13: Zusammensetzung des SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Protein Standards der Firma Invitrogen.

Quelle:

<https://www.lifetechnologies.com/de/de/home/references/protocols/proteins-expression-isolation-and-analysis/sds-page-protocol/pre-stained-protein-standards-seeblue-plus2-protein-standard.html> (14. März 2015)

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte für circa eine Stunde bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA pro Gel.

2.2.4. Western-Blot-Analyse

2.2.4.1 Tank-Blot-Verfahren

Nach beendeter Elektrophorese wurde das gesamte Gel ausgespannt, die Glasplatte abgenommen und das Sammelgel abgetrennt und verworfen. Die Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) (Roche, Penzberg, Deutschland) und das Whatman-Papier (Roth) wurden auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten. Das Filterpapier, die Schwammpolster und die Membran wurden in Blotpuffer (Tabelle 9) geschwenkt und, wie in Abbildung 14 dargestellt, luftblasenfrei zu einem „Blot-Sandwich“ zusammengefügt. Dieses Sandwich wurde zusammen mit einem Kühlakku in die mit Blotpuffer aufgefüllte Elektrophoresekammer eingespannt. Der Transfer der Proteine erfolgte für 1,5 Stunden bei einer Stromstärke von 140 mA.

Blotpuffer pH 8,5	Menge
Tris-HCl pH 8,5	50 mM
Glycin	40 mM
Methanol (Merck) mit Aqua dest. auf 1 Liter auffüllen	10 %

Tabelle 9: Lösung für Blotpuffer (1 Liter)

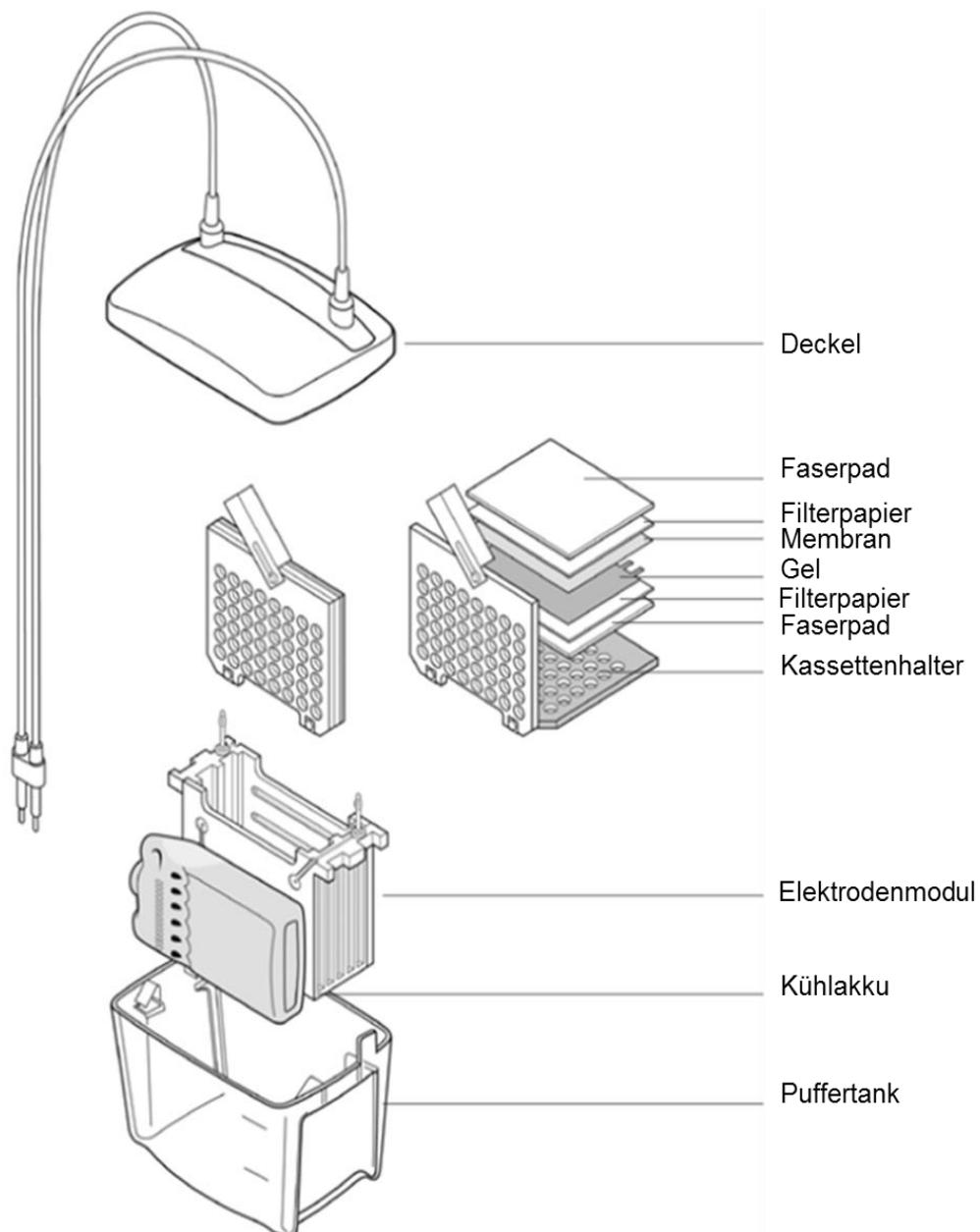


Abbildung 14: Schematischer Aufbau der Blotapparatur für einen Tank-Blot der Firma Bio-Rad (verändert nach Firma Bio-Rad).

Quelle: <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/M1703930.pdf> (14. März 2015)

2.2.5 Nachweis von Proteinen auf Western Blots mittels Antikörpern

2.2.5.1 Prinzip der Immundetektion

Auf der Membran lassen sich einzelne Proteine mithilfe eines spezifischen Primärantikörpers nachweisen. Zudem wird ein Sekundärantikörper benötigt, welcher gegen den Primärantikörper gerichtet ist (Towbin et al., 1979). An diesen sekundären Antikörper ist das Enzym Meerrettich-Peroxidase (Horseradish-Peroxidase – HRP) gekoppelt. HRP oxidiert in Anwesenheit von Wasserstoff-Peroxid Luminol (Abbildung 15) (Everse et al., 2000). Bei dieser Reaktion wird Luminol kurzfristig in einen angeregten Zustand versetzt. Beim Zurückfallen in den Grundzustand wird die freiwerdende Energie in Form von Lichtquanten emittiert. Dieses emittierte Licht reicht z.B. aus, um Röntgenfilme zu schwärzen.

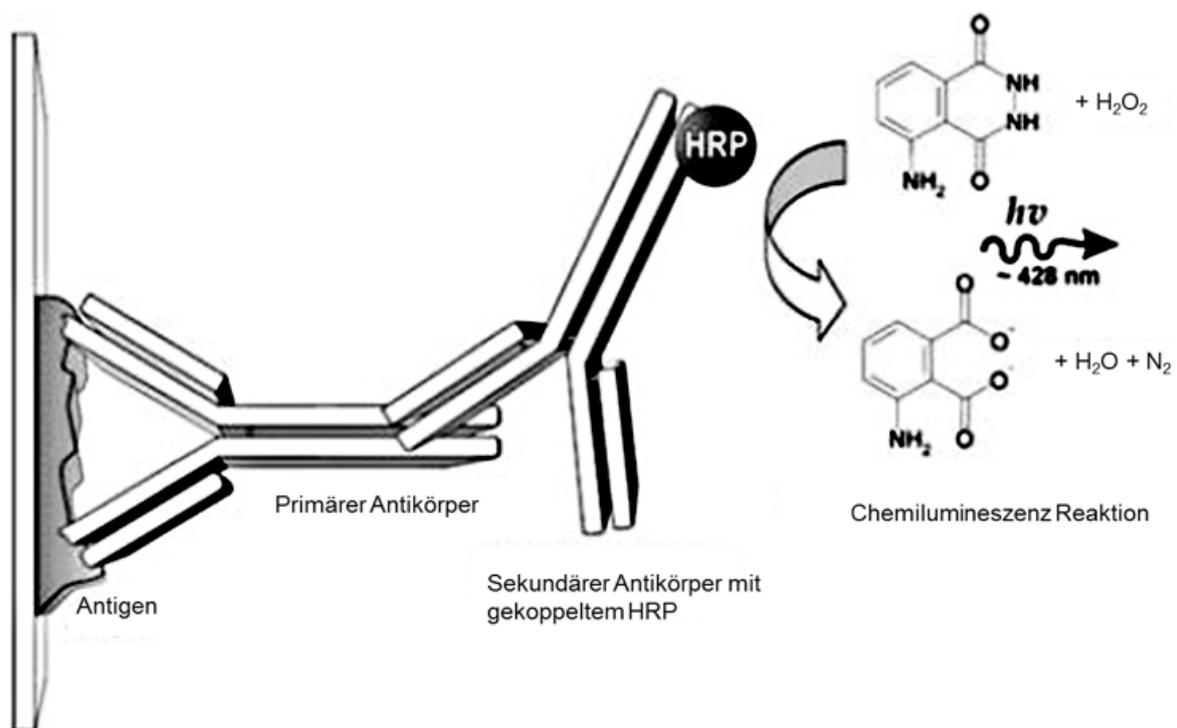


Abbildung 15: Ablauf der Chemilumineszenz-Reaktion mithilfe der Antikörperdetektion. Quelle: http://de.wikipedia.org/wiki/Western_Blot#mediaviewer/File:ECL.jpg (14.März 2015)

2.2.5.2 Blockieren der Membran und Immunfluoreszenzfärbung

Nach abgeschlossenem Transfer wurde die Membran aus der Blotapparatur entnommen, 1 Stunde in eine 5%ige Rinderserumalbumin-Lösung (bovine serum albumin – BSA) (Biomol, Hamburg, Deutschland) in TBST-Waschpuffer (Tris-buffered saline mit 0,05 % Tween 20) eingelegt und bei Raumtemperatur geschwenkt. Dies ist notwendig, um eine unspezifische Bindung des Primärantikörpers an die Membran zu verhindern (Jansohn und Rothhämel, 2012). Nachdem die Membran dreimal 5 Minuten in TBST gewaschen worden war, wurde sie mit dem entsprechenden Primärantikörper über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Als Ladekontrolle wurde ein Antikörper gegen das Haushaltsgen Beta-Aktin (Tabelle: spezifische Antikörper) verwendet.

Danach schlossen sich erneut drei 5-minütige Waschvorgänge mit TBST-Waschpuffer an, um die ungebundenen Antikörper zu entfernen. Die Membran wurde mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach diesem Prozess wurde der Blot wieder dreimal mit TBST gewaschen, bevor die Detektion mit Roti®-Lumin (Roth) erfolgte.

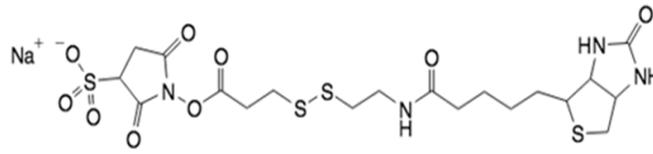
2.2.6 Biotinylierung

2.2.6.1 Prinzip der Biotinylierung

Die Biotinylierung ist ein chemisches Verfahren zur Markierung von Molekülen, welches die Fähigkeit des Biotins (Vitamin H) nutzt, sich an Zellproteine zu binden. Nachfolgend profitiert man von der sehr hohen Affinität des Biotins, sich an das basische Glykoprotein Avidin bzw. Streptavidin, welches hydrophobe Taschen als spezifische Biotin-Bindungsstellen aufweist, zu binden. Diese spezifische, hochaffine Bindung macht man sich in der Immunologie bei Nachweisreaktionen, wie z. B. der Antikörperkopplung, zunutze (Harlow und Lane, 1999).

2.2.6.2 Biotinylierung der Zelloberflächenproteine

Zur Biotinylierung der Zelloberflächenproteine wurde der *Pierce® Cell Surface Protein Isolation Kit* (Pierce, Rockford, Illinois, USA) verwendet (Abbildung 16). Das Kulturmedium wurde verworfen und die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen pro Flasche mit 10 ml EZ-Link® Sulfo-NHS-SS-Biotin versetzt und 30 Minuten bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Nach Zugabe von je 500 µl *Quenching*-Lösung zu jeder Flasche, was zum Abstoppen der Reaktion diente, wurden die Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland) abgelöst und der Inhalt aller Flaschen in ein 50-ml-Reagenzröhrchen überführt. Die Zellen wurden 3 Minuten bei 650 RZB (Relative Zentrifugalbeschleunigung) zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit TBS-Puffer (Tris-buffered saline) wurden die Zellen mit 500 µl Lysepuffer lysiert. Zum Aufschluss der Zellen wurden diese zusätzlich mit Ultraschall behandelt (Amplitude 15 %, 5 Zyklen, je 1 Sekunde). Anschließend erfolgte für 30 Minuten eine weitere Inkubation auf Eis. Das Zelllysate wurde daraufhin für 2 Minuten bei 10 000 RZB und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß mit einer Säule überführt. Zur Isolation der biotinylierten Proteine wurden nun 500 µl der NeutrAvidin-Agarose-Lösung in die Säule gegeben und 1 Minute bei 1000 RZB zentrifugiert. Ein dreimaliger Waschvorgang mit 500 µl Waschpuffer und eine 1-minütige Abzentrifugation bei 1000 RZB schlossen sich an. Es folgte eine 1-stündige Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Überkoprotator (Roth). Im Anschluss erfolgte der vorgenannte Wasch- und Zentrifugationsschritt für weitere 4 Male. Für die Extraktion wurden die Proteine mit 50 mM No-Weigh™ Dithiothreitol (DTT), in SDS-PAGE-Laemmli-Puffer, versetzt und 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Überkoprotator inkubiert. Es folgte ein 2-minütiger Zentrifugationsschritt bei 1000 RZB. Nach Zugabe von 50 µl Bromphenolblau wurde das Eluat sofort verwendet oder bei 4 °C aufbewahrt.



chemische Struktur von Sulfo-NHS-SS-Biotin

Verfahrensweise:

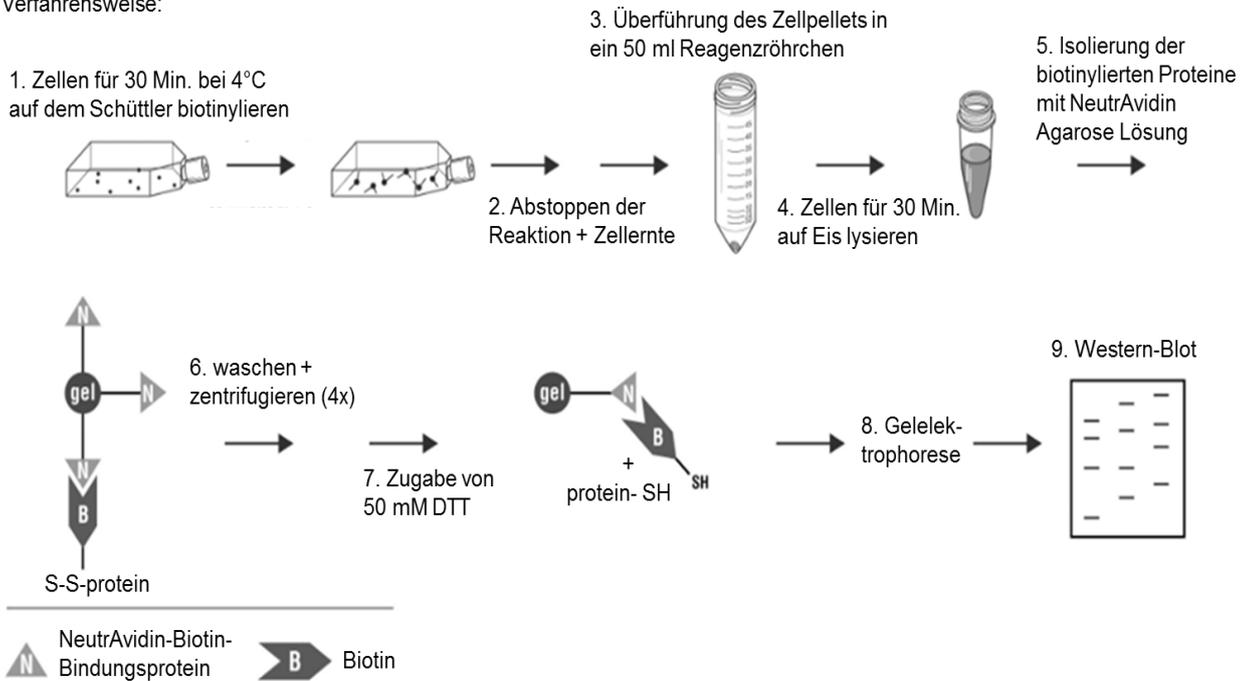


Abbildung 16: Verändertes Übersichtsprotokoll zur Isolierung der Zelloberflächenproteine der Firma Pierce®. Quelle:

https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011518_Pierce_Cell_Surface_Protein_Isolat_UG.pdf (14. März 2015)

2.3 Immunhistochemie

2.3.1 Prinzip der indirekten Immunfluoreszenzfärbung

Mit der Immunfluoreszenzfärbung können Proteine oder andere Strukturen mithilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern in Zellen sichtbar gemacht werden. Es kann bestimmt werden, in welchem Zellkompartiment das gesuchte Protein lokalisiert ist. Bei der indirekten Immunfluoreszenz wird ein spezifischer Primärantikörper gegen das Protein eingesetzt (Karp, 2005). Im zweiten Schritt wird ein fluoreszierender Sekundärantikörper aufgetragen, der sich gegen den Primärantikörper richtet. Die fluoreszierenden Eigenschaften der Sekundärantikörper beruhen auf deren Kopplung an einen Alexa-Farbstoff wie z. B. Alexa488 (grün), Alexa546 (gelb) oder Alexa633 (rot). Diese haben verschiedene Anregungs- und Emissionsspektren (die Anregungswellenlänge ist im Namen impliziert), weshalb man in ein und demselben Präparat zwei oder mehr Proteine gleichzeitig nachweisen kann.

2.3.1.1 Kultivierung von Zellen für die Immunfluoreszenzfärbung

Für die Immunfluoreszenzfärbungen wurden jeweils 50 000 Zellen auf Objektträgern (BD) in kleinen und genau abgegrenzten Kammern kultiviert (*Chamber Slides*). Für den mikroskopischen Einsatz wurde der Kammeraufsatz entfernt, was die Untersuchung eines intakten Monolayers ermöglichte.

2.3.1.2 Fixierung und Permeabilisierung von Zellen

Die auf den Objektträgern gewachsenen Zellen wurden kurz mit PBS gewaschen, danach erfolgte die Fixierung mit 4 % Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich) für 10 Minuten. Es schlossen sich drei Waschschrte mit PBST (phosphate buffered saline mit 0,1 % Tween 20) an. Danach wurden die Zellen 5 Minuten mit Triton-X-100-Lösung (Sigma-Aldrich) bei Raumtemperatur inkubiert. Die Permeabilisierung der Zytoplasmamembran mittels Triton-X-100 garantiert die Zugänglichkeit der Antikörper ins Innere der Zellen. Nach der Permeabilisierung wurden die Zellen dreimal 5 Minuten in PBST gewaschen und konnten danach für die indirekte Immunfluoreszenz verwendet werden.

2.3.1.3 Blockieren der Objektträger und Immunfluoreszenzfärbung

Die fixierten Zellen wurden in eine feuchte Kammer für die Antikörperinkubation überführt und 1 Stunde bei 37 °C mit 5 % *normal goat serum* (NGS) (Sigma-Aldrich) in PBST inkubiert, um eine unspezifische Antikörperbindung zu verhindern. Nachfolgend wurde der Primärantikörper aufgebracht und der Objektträger über Nacht bei 4 °C gelagert. Nach dreimaligem Waschen in PBST erfolgten die Applikation des Sekundärantikörpers und eine erneute Inkubation in der feuchten Kammer für wiederum 1 Stunde bei 37 °C. Die Zellen wurden danach nochmals mit PBST gewaschen. Die aufgesetzten Kammern wurden entfernt und die Zellkerne wurden mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) angefärbt, welches sich im *Vectashield Mounting Medium* (Vector Laboratories, Peterborough, UK) befindet. Die Zellen wurden dann mit einem Deckglas bedeckt und bei 4 °C lichtgeschützt aufbewahrt. Als Negativkontrolle wurde bei jeder Immunfluoreszenzfärbung eine Inkubation ohne Primärantikörper durchgeführt.

Zum Mikroskopieren der gefärbten Zellen wurde das Mikroskop Olympus BX 61 (Olympus, Hamburg, Deutschland) verwendet.

2.4 Durchflusszytometrie und Zellzyklusanalysen

2.4.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur Analyse der Quantität und Qualität von Einzelzellen in Suspensionen, basierend auf deren Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften (Herzenberg et al., 1976; Shapiro, 2003). Zur Analyse werden die Zellen als Einzelsuspension durch die Technik der hydrodynamischen Fokussierung – hintereinander in einer Reihe – durch eine Flusszelle (*Flow cell*) geleitet und beim Durchfließen von der Seite mit einem gebündelten Laserlicht angestrahlt. Das dabei entstehende Streulicht oder Fluoreszenzsignal wird von Detektoren ausgewertet. Die Zelle streut das Licht in verschiedene Richtungen. Je nachdem in welchem Winkel man das Streulicht misst, erhält man verschiedene Informationen. Wie in Abbildung 17 ersichtlich, ist die Vorwärtsstreuung (FSC = *Forward Scatter*) ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und somit proportional zur Zellgröße. Das

Seitwärtsstreulicht (SSC = *Side Scatter*) ist wiederum ein Maß für die Lichtbrechung im rechten Winkel und erfasst die Granularität der Zelle.

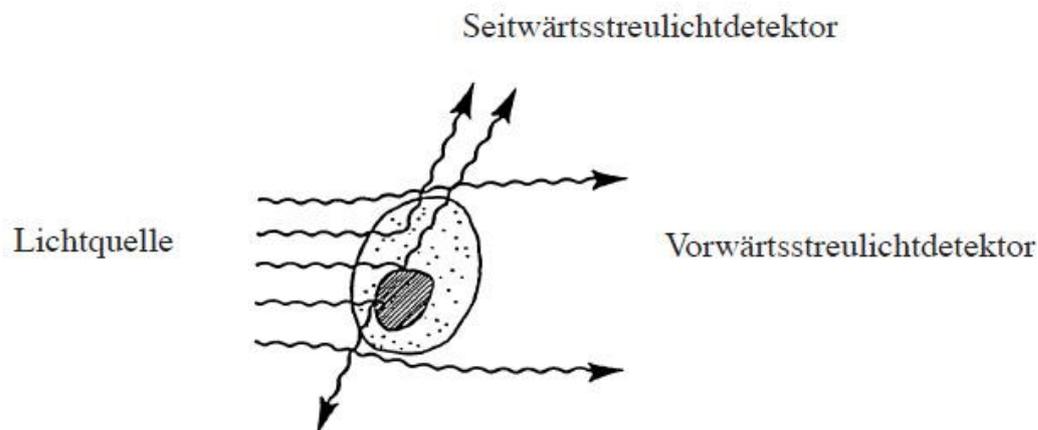


Abbildung 17: Schematische Darstellung der Lichtstreuung einer Zelle mit Zellkern im FACS (Fluorescence activated cell sorting).
Quelle: <http://www.bd.com/resource.aspx%3FIDX%3D31055> (14. März 2015)

Neben der Streulichtinformation lässt sich nach Markierung der Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpern auch die Expression spezifischer Proteine detektieren. Ein Molekül mit fluoreszierenden Eigenschaften absorbiert Lichtenergie in einem Bereich, der charakteristisch für diese Verbindung ist. Die Energie des absorbierten Lichts hebt ein Elektron des Moleküls auf einen höheren Energielevel. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe der überschüssigen Energie in Form von Photonen auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die Menge der emittierten Photonen, welche detektiert werden, verhält sich proportional zur Menge an markierten Molekülen oder Antikörpern pro Zelle.

2.4.2 Zellzyklus

Jede sich teilende Zelle durchläuft einen geordneten Zellzyklus, durch den ein geregelter Ablauf von Zellwachstum, DNA-Synthese sowie Kern- und Zellteilung gewährleistet wird. Pro Zellzyklus werden vier Phasen durchlaufen, die als G₁-, S-, G₂- und M-Phase bezeichnet werden (Howard et al., 1953). In der S-Phase (Synthese-Phase) erfolgt die DNA-Synthese, in der M-Phase (Mitose-Phase) finden die

Chromosomentrennung und die Zellteilung statt. In den G-Phasen (*Gap*-Phasen, gap = Lücke) wird der Zellzyklus über Restriktionspunkte genau kontrolliert. Damit wird verhindert, dass die nächste Zellzyklusphase begonnen wird, bevor die vorhergehende Phase beendet ist.

2.4.2.1 Zellsynchronisation

Zunächst wurden 2×10^5 Zellen/Well in 6-Well-Kulturschalen ausgesät und für 12 Stunden kultiviert. Um die Zellen zu synchronisieren, folgte eine 24-stündige Kultivierung ohne fötales Kälberserum (FKS) (Cooper, 1991; Davis et al., 2001). Danach wurde den Zellen Medium mit FKS zugegeben, was den synchronen Wiedereintritt von der G_0 -Phase in den Zellzyklus bewirkt (Meloch und Pouysségur, 2007). Mit Ausnahme der Kontrollproben wurden alle Zellen mit FKS-haltigem Serum, unter Zugabe von $2,34 \mu\text{mol/l}$ (1:9000) bzw. $1,4 \mu\text{mol/l}$ (1:15 000) Gamma-Sekretase-Inhibitor (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), versehen. Der Kontrollzellkultur wurde FKS-haltiges Serum unter Zugabe von 55 % DMSO in H_2O in entsprechender Konzentration zugegeben.

2.4.2.2 Ernten und Fixieren der Zellen

Bei der Zellernte und Fixation wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

1. Absaugen des Mediums
2. Überschichtung mit PBS, Schwenken und erneutes Absaugen
3. Zugabe von Accutase (PAA)
4. nach Ablösung der Zellen Abstoppen der Accutase mit 2 ml Medium
5. Überführung in ein 15-ml-Reagenzgefäß und Zentrifugation für 5 Minuten bei 1200 rpm
6. Verwerfen des Überstandes und Resuspendierung in 10 ml kaltem Medium
7. Zellzahlbestimmung mit Neubauer-Zählkammer

8. Aliquotierung von 10^6 Zellen/Reagenzgefäß
9. Zentrifugation bei 800 rpm für 5 Minuten
10. Resuspendierung der Zellen in 5 ml kaltem PBS mit 2 % BSA
11. Zentrifugation bei 800 rpm für 5 Minuten
12. Abnahme des Überstandes und Fixation mit 300 µl eiskaltem Methanol-Aceton (3:1) (Merck)
13. Inkubation auf Eis für 10 Minuten
14. Überführung des Überstandes in sterile 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße
15. Zentrifugation bei 1000 rpm für 2 Minuten
16. erneutes Waschen des Zellpellets mit kaltem PBS/2 % BSA
17. Zentrifugation bei 1000 rpm für 2 Minuten

2.4.2.3 RNase-Verdau und Propidiumiodidfärbung

Zunächst wurden die Zellen zweimal mit PBS/2 % BSA gewaschen und 5 Minuten bei 300 RZB zentrifugiert. Darauf folgte, unter Zugabe von 50 µl RNase (Invitrogen), eine 60-minütige Inkubation im 37 °C warmen Wasserbad (GFL, Burgwedel, Deutschland). Dies ist nötig, um die RNA zu entfernen, da sich Propidiumiodid (Sigma-Aldrich) in doppelsträngiger RNA und DNA gleichermaßen einbaut, wodurch die DNA-Messwerte verfälscht werden.

Nach der Inkubation im Wasserbad erfolgte die Zugabe von 25 µl Propidiumiodidlösung zu jeweils 10^6 Zellen. Propidiumiodid (PI) ist ein fluoreszierender Nukleinsäureinterkalator. Unter Zugabe von PI kann man den DNA-Gehalt von Zellen messen (Tas und Westerneng, 1981). Wenn PI an DNA gebunden ist, hat es ein Absorptionsmaximum bei 535 nm und ein Emissionsmaximum bei 617 nm. PI kann u. a. im Argon-Ionen-Laser angeregt und so im FL2-Kanal des Durchflusszytometers detektiert werden.

2.4.2.4 Zellzyklusanalysen im FACS

Die Zellzyklusanalyse erfolgte im FACSCalibur™ von BD (Heidelberg, Deutschland). Die Auswertung erfolgte mithilfe der Software FlowJo (FlowJo, LLC, Ashland, Oregon, USA).

In einem *Dot-Plot* (Punktdiagramm), in dem der *Forward Scatter* (FSC) gegen den *Side Scatter* (SSC) aufgetragen wird (Abbildung 18 A), wurde mithilfe eines speziellen grafischen Verfahrens, dem *Gating* (Eingrenzung), die Punktwolke der Einzelzellen eingegrenzt (Abbildung 18 B). Damit wird die Fluoreszenzintensität der Einzelzellpopulation gesondert dargestellt und die Zellzyklusanalyse optimiert, da Zelltrümmer und Verklumpungen vorab ausgeschlossen werden (Abbildung 18 B). Das Messergebnis wird dann in ein Histogramm (Abbildung 19) eingetragen, welches die Fluoreszenz des gewünschten Bereiches darstellt. Von diesen eingegrenzten Zellen wurden in den Messungen jeweils 10 000–30 000 im FL2-Detektor erfasst.

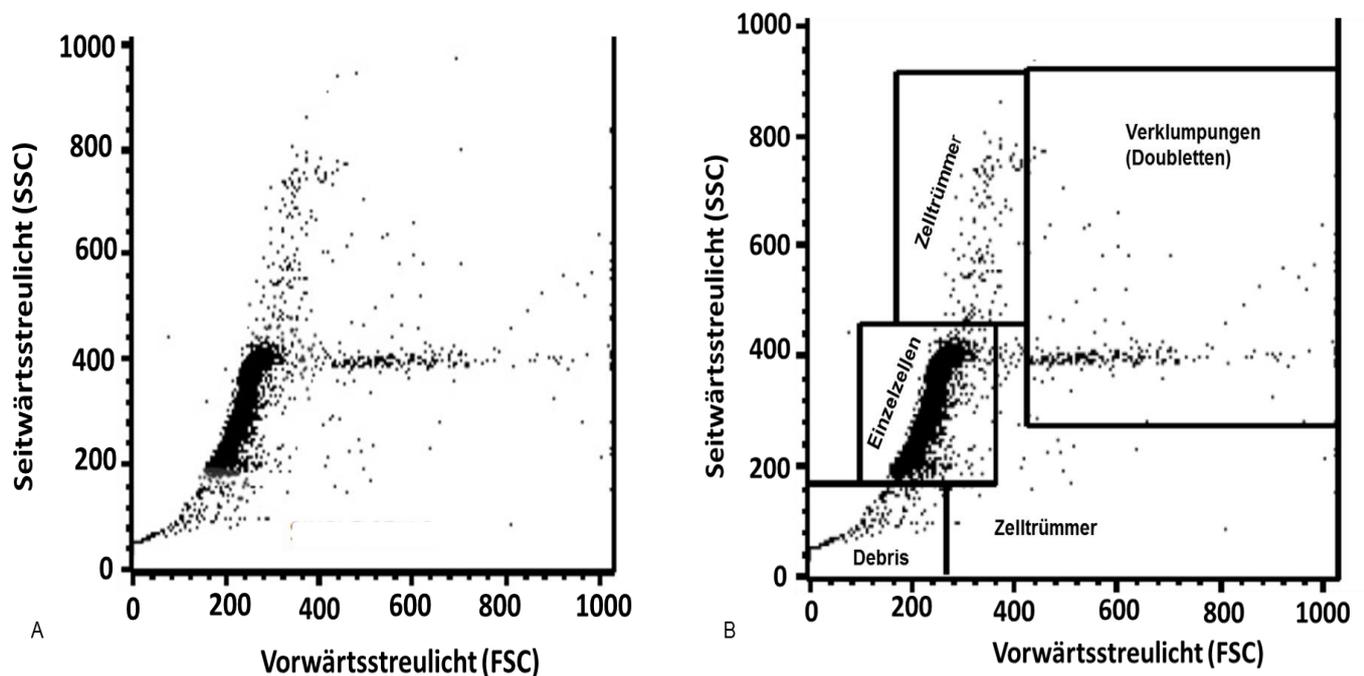


Abbildung 18: A – Schematische Darstellung eines Dot-Plots, B – Dot-Plot mit eingegrenzten Zellen (verändert).

Quelle: https://www.lerner.ccf.org/services/flow/documents/Cell_Cycle_Basics.pdf (18. Dezember 2015)

Abbildung 19 zeigt den Zusammenhang zwischen einem DNA-Histogramm und dem Zellzyklus auf. Das rechte Bild gibt den klassischen Verlauf eines Zellzyklus wieder, im linken Bild sind diese Zellzyklusphasen im Histogramm aufgetragen. Der erste Peak stellt die G₀/G₁-Phase (ruhende Zellen) und der zweite Peak die G₂-Phase dar. Dazwischen liegt die S-Phase (DNA-Synthese). Auf der x-Achse befindet sich der Messbereich für die Fluoreszenzintensität von PI, welche der DNA-Menge entspricht. Auf der y-Achse ist die Anzahl der gezählten Zellen abgebildet.

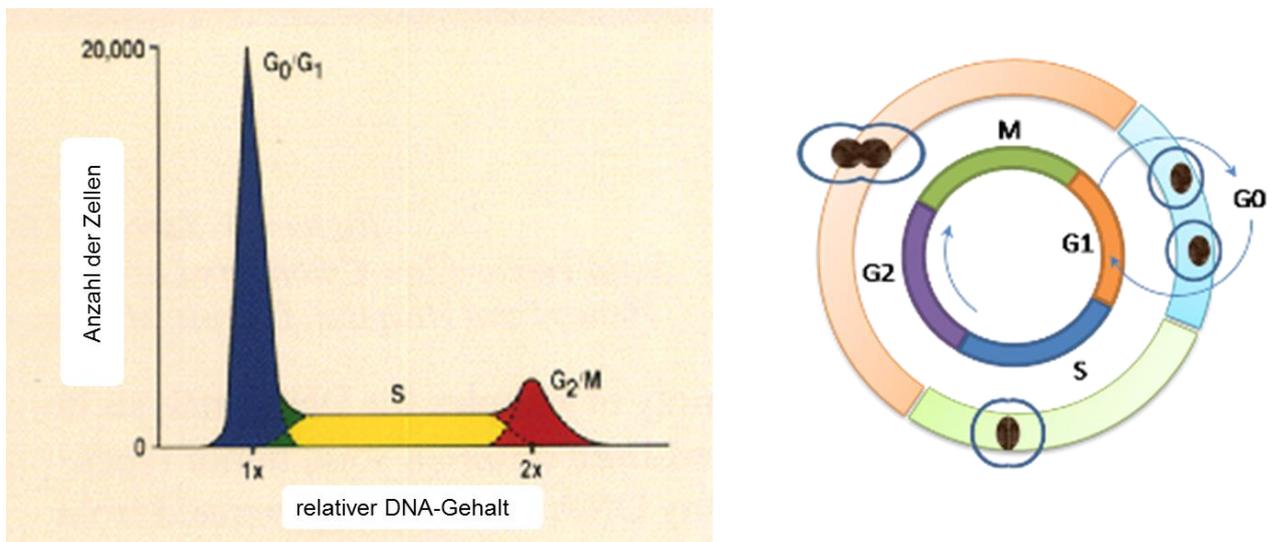


Abbildung 19: Die rechte Grafik veranschaulicht die schematische Darstellung eines regulären Zellzyklus, das linke Bild zeigt ein Histogramm mit eingezeichneten Zellzyklusphasen (verändert).

Quelle: links – <http://www.cyto.purdue.edu/cdroms/cyto1/6/bd/2facs3.gif>, rechts – <http://uic.igc.gulbenkian.pt/fc-courses.php> (17. Dezember 2015)

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis von P-Cadherin in Zelllysaten aus humanen oralen Keratinozyten (HOKs), Oral Squamous Cell Carcinoma-Zellen (OSCCs) und primären oralen Keratinozyten aus gesunder Mukosa (gesunde POKs) wie auch aus Geweben von Patienten mit oralem Plattenepithelkarzinom (OSCC-POKs)

P-Cadherin ist in der gesunden oralen Mukosa in der basalen und suprabasalen Zellschicht zu finden und sorgt über die Ausbildung von homophilen Cadherin-Cadherin-Interaktionen für den interzellulären Zusammenhalt (Muñoz-Guerra et al., 2005; Lo Muzio et al., 2004). Mehrere Studien konnten nachweisen, dass im oralen Plattenepithelkarzinom eine reduzierte Expression sowohl des Volllänge-P-Cadherins als auch des trunkierten P-Cadherins vorliegt und somit die Invasion und Metastasierung im OSCC begünstigt wird (Muñoz-Guerra et al., 2005; Bauer et al., 2008; Bauer et al., 2009; Cavallaro und Christofori, 2004). Es lag also in unserem Interesse herauszufinden, was diese verminderte Expression von P-Cadherin und den damit verbundenen Verlust der Zelladhäsion im erkrankten Gewebe des oralen Plattenepithelkarzinoms hervorruft. Daher wurde auf der Grundlage von unterschiedlichen proteinchemischen Methoden und mittels Durchflusszytometrie versucht, die verantwortlichen Faktoren für die Trunkierung von P-Cadherin festzustellen. Verschiedene Proteasen spalten die Cadherine während der Tumorgenese (Berx und van Roy, 2009; Marambaud et al., 2002). Da die Gamma-Sekretase zur Gruppe der intramembranös schneidenden Aspartatproteasen gehört, stand diese im Fokus unserer Untersuchungen (Wolfe et al., 1999a). Es sollte geklärt werden, welche Rolle die Gamma-Sekretase bei der Trunkierung von P-Cadherin spielt.

3.1.1 P-Cadherin-Expressionsmuster in der Western-Blot-Analyse

Um die Expression von P-Cadherin untersuchen zu können, wurden aus verschiedenen Patientengeweben – zum einen aus OSCC-Gewebe (OSCC-POKs), zum anderen aus gesunder oraler Mukosa (gesunde POKs) – primäre orale Keratinozyten isoliert und einer Western-Blot-Expressionsanalyse unterzogen. Der Western Blot in Abbildung 20 zeigt eine Immunbande des Volllänge-P-Cadherins mit

einem Molekulargewicht von 100 kDa (deglykosyliert) und 120 kDa (glykosyliert) nur in den gesunden POK-Zellen. Bei den OSCC-POKs dagegen konnte keine Volllänge-P-Cadherin-Expression detektiert werden. Weiterhin konnte in allen untersuchten Zelllinien die trunkierte Form von P-Cadherin (Pcad50), mit der dafür charakteristischen Bande bei 50 kDa, nachgewiesen werden (Abbildungen 20 und 21) (Bauer et al., 2005). Lediglich bei den humanen oralen Keratinozyten (HOKs) und den Plattenepithelkarzinomzelllinien in Abbildung 21 zeigte sich ein variierendes Expressionsmuster. Nur die OSCC-Zelllinie PCI 1 zeigte eine starke P-Cadherin-Bande bei 120 kDa, während PCI 4A und PCI 52 jeweils nur ein sehr schwaches Signal bei 120 kDa (2. und 3. Bande) aufzeigten. Wie erwartet, konnte eine signifikante Expression von Volllänge-P-Cadherin in den HOKs auf Proteinebene verzeichnet werden (Abbildung 21). Die 100-kDa-Form von P-Cadherin konnte in Abbildung 20 nur bei den gesunden POK-Zellen und in Abbildung 21 bei den HOKs und interessanterweise in schwacher Form noch bei der OSCC-Zelllinie PCI 1 beobachtet werden.

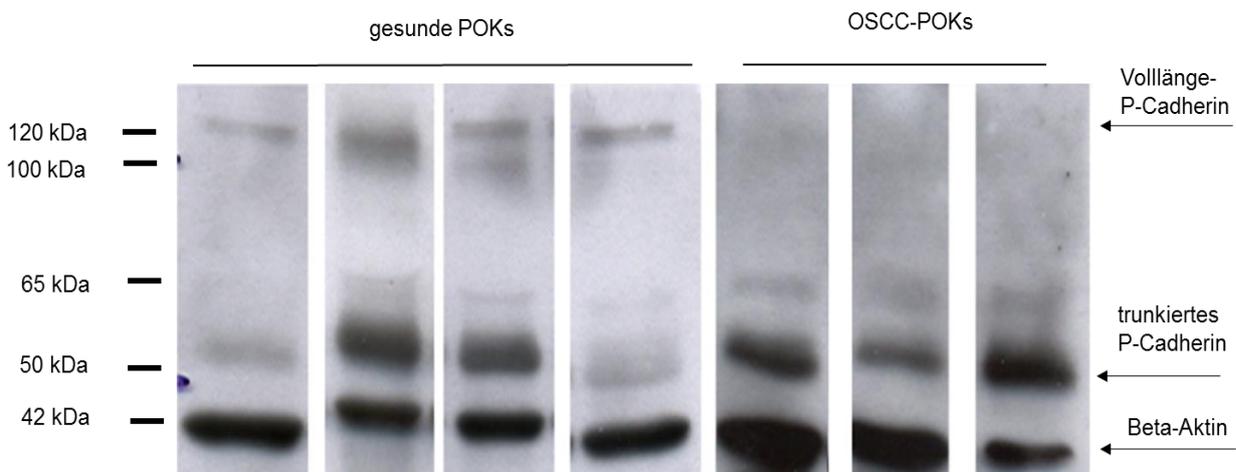


Abbildung 20: Western-Blot-Analysen von gesunden und OSCC-POKs. Das Experiment zeigt deutliche Banden von Volllänge-P-Cadherin (100 kDa, 120 kDa) nur in den gesunden POK-Zellen. Die 50-kDa-Banden von trunkiertem P-Cadherin sind sowohl in gesunden als auch in OSCC-POKs zu finden. Die Ladekontrolle wurde mit Beta-Aktin durchgeführt.

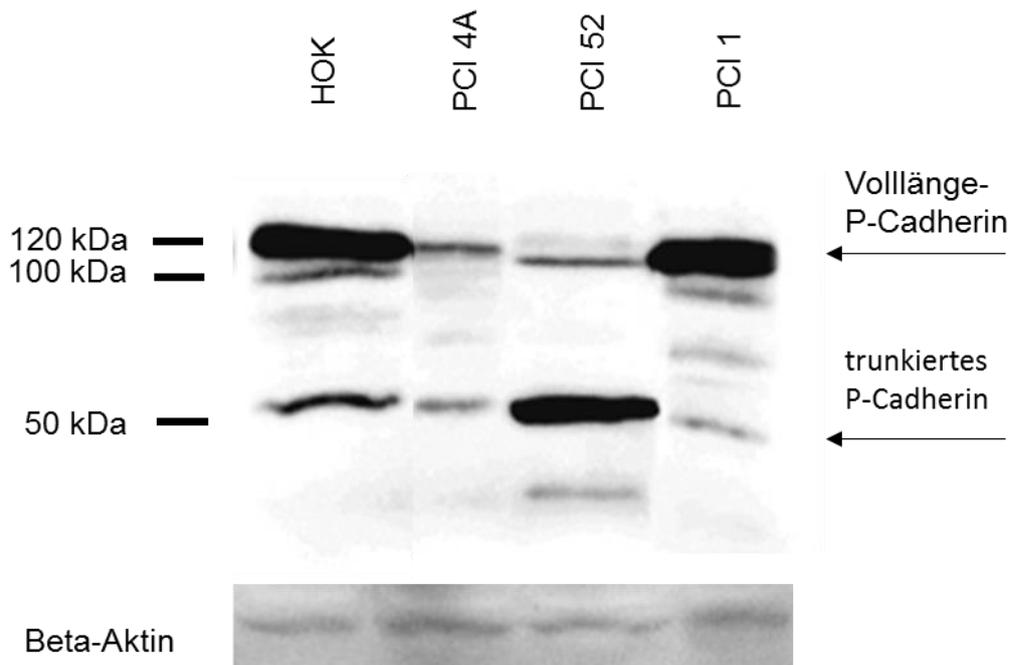


Abbildung 21: Immundetektion von P-Cadherin mithilfe der Western-Blot-Analyse in HOKs und exemplarisch in den OSCC-Zelllinien PCI 4A, PCI 52 und PCI 1. Bei den HOK-Zellen wird die 120-kDa- (oberer Pfeil) und die unglykosylierte 100-kDa-Form von P-Cadherin exprimiert, während bei den PCI-Zellen ein unterschiedliches P-Cadherin-Expressionsmuster gezeigt werden konnte. Auch hier konnte in allen Zelltypen die Pcad50-Form detektiert werden.

3.2 Presenilin-1-Expression in gesunden humanen oralen Keratinozyten und Plattenepithelkarzinomzellen

Zu einem Verlust der Zelladhäsion kommt es durch die proteolytische Abspaltung der zytoplasmatischen Domäne der Cadherine durch die Gamma-Sekretase-Aktivität des Presenilin-1 (Halbleib und Nelson, 2006). Presenilin-1 ist im aktiven Zentrum des Multienzymkomplexes der Gamma-Sekretase lokalisiert und als eine von vier katalytischen Untereinheiten bekannt. Da PS-1 im Rahmen des Gamma-Sekretase-Komplexes ko-reguliert ist und maßgeblich zu deren Aktivität beiträgt, sollte die Proteinmenge von PS-1 detektiert werden (Wolfe et al., 1999a). Die Untersuchungen

der Expression von Presenilin-1 erfolgten für HOK-Zellen sowie für alle vorhandenen OSCC-Zelllinien.

3.2.1 Western-Blot-Analyse mit einem Antikörper gegen Presenilin-1

Die Western-Blot-Analyse mit einem Antikörper gegen Presenilin-1 zeigte bei allen untersuchten OSCC-Zelllinien deutliche Banden bei einem Molekulargewicht von circa 18 kDa auf (Abbildung 22). Die Position der Banden stimmt mit der zu erwartenden molekularen Masse von Presenilin-1 von 18 kDa überein. Im Gegensatz zu den OSCC-Zellen exprimieren die gesunden HOK-Zellen signifikant weniger Presenilin-1, welches im Gesamtproteinlysate nachgewiesen werden konnte (Abbildung 22 – rechts).

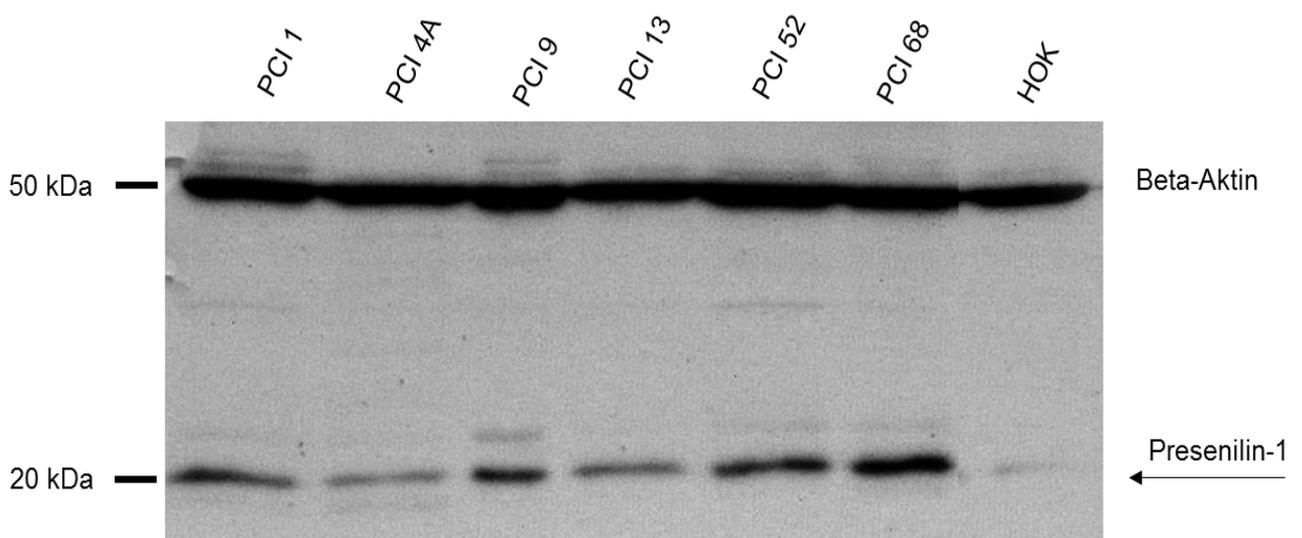


Abbildung 22: Western-Blot-Analyse der Presenilin-1-Expression. Bei den HOKs (rechte Spur) fällt das Detektionssignal bei 20 kDa deutlich schwächer aus. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied in der Intensität im Vergleich zu den OSCC-Zelllinien.

3.3 Die Auswirkung der Gamma-Sekretase-Inhibition auf die Expression und Funktion von P-Cadherin

In den Abschnitten 3.1 und 3.2 wurde zum einen der teilweise oder gesamte Verlust von Volllänge-P-Cadherin und zum anderen die erhöhte Presenilin-1-Expression in den Zelllysaten von OSCC-Patientengeweben und OSCC-Zelllinien bestätigt. In den nachfolgenden Versuchen sollte festgestellt werden, ob die Gamma-Sekretase-Aktivität eine Auswirkung auf das Expressionsmuster von P-Cadherin hat. Dazu wurde mithilfe eines Gamma-Sekretase-Inhibitors (GSI) der Einfluss der Gamma-Sekretase auf die Prozessierung von P-Cadherin analysiert.

3.3.1 Modulation der P-Cadherin-Expression nach Inkubation mit Gamma-Sekretase-Inhibitor I (GSI-I)

Um zu beweisen, dass die Gamma-Sekretase die P-Cadherin-Prozessierung im OSCC moduliert, wurden die OSCC-Zellen PCI 13 und PCI 68 sowie zur Kontrolle gesunde HOK-Zellen mit 2,5 μ M bzw. 10 μ M GSI-I behandelt und mittels Western-Blot-Analyse ausgewertet.

Nach Hemmung der Gamma-Sekretase-Aktivität in den Zelllysaten der OSCC-Zelllinien PCI 13 und PCI 68, erkennt man die Expression einer relativ gleichmäßigen Menge an glykosyliertem P-Cadherin bei 120 kDa (Abbildung 23 – oberer Pfeil). Bei den PCI-68-Zellen erfolgte zudem mit zunehmender GSI-I-Konzentration ein Anstieg der Expression an unglykosyliertem P-Cadherin bei 100 kDa (Abbildung 23 – rechts). Die Zugabe von 2,5 μ M bzw. 10 μ M GSI-I zur PCI-13-Zelllinie ergab das dosisabhängige Auftreten einer 100-kDa- bzw. einer 110-kDa-P-Cadherin-Form (Abbildung 23 – links).

Die gesunden HOK-Zellen wurden analog zu den OSCC-Zellen mit DMSO, 2,5 μ M bzw. 10 μ M GSI-I und zusätzlich mit Medium versehen. In Abbildung 24 ist ersichtlich, dass die P-Cadherin-Expressionssignale der Spuren 1 und 2 bei 120 kDa im Vergleich mit den Spuren 3 und 4 visuell am deutlichsten hervortreten. Auch sind bei den mit Medium bzw. DMSO behandelten Zellen die unglykosylierte 100-kDa-Form und die 110-kDa-Form am deutlichsten detektierbar. Die Zugabe von 2,5 μ M bzw. 10 μ M GSI-

I (Spuren 3 und 4) führte zu einer konzentrationsabhängigen Abschwächung der Signalintensität in den Spuren 3 und 4 und somit auch zu einer geringeren Expressionsstärke aller P-Cadherin-Formen (Pcad100, Pcad110 und Pcad120).

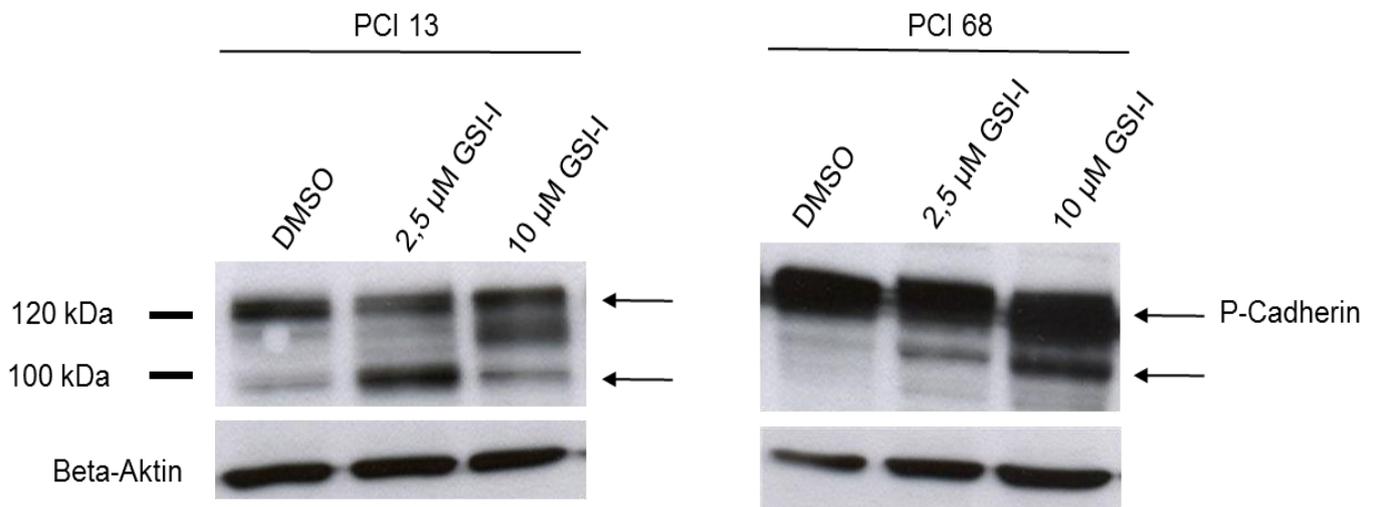


Abbildung 23: Western-Blot-Analyse mit einem Antikörper gegen den N-Terminus von P-Cadherin bei den Zelllinien PCI 13 und PCI 68. Nach Gamma-Sekretase-Inhibition zeigt sich eine konzentrationsabhängige Veränderung des Molekulargewichts von P-Cadherin.

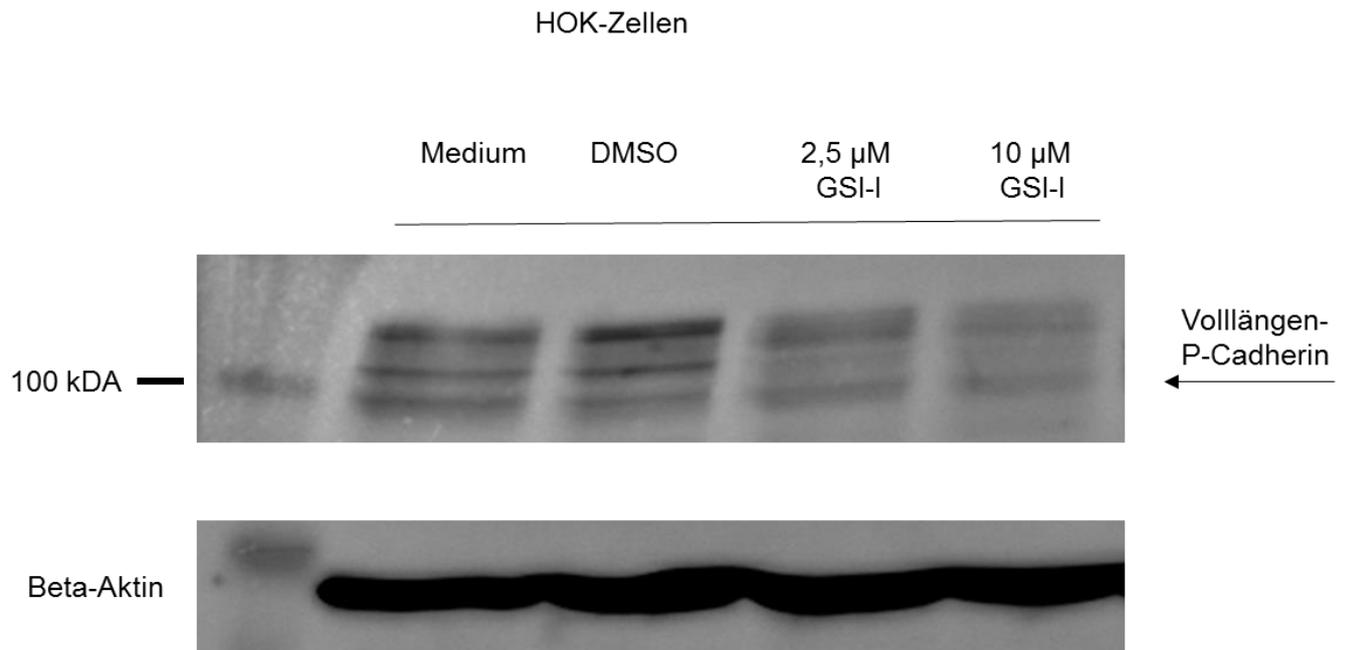


Abbildung 24: Western-Blot-Analyse der P-Cadherin-Expression in HOK-Zellen. Nach Inkubation mit Gamma-Sekretase-Inhibitor sind nur geringe konzentrationsabhängige Intensitätsunterschiede in den Banden ersichtlich.

3.4 Nachweis des Einflusses der Gamma-Sekretase-Aktivität auf die Expression und Lokalisation von P-Cadherin mithilfe von immunzytochemischen Färbungen

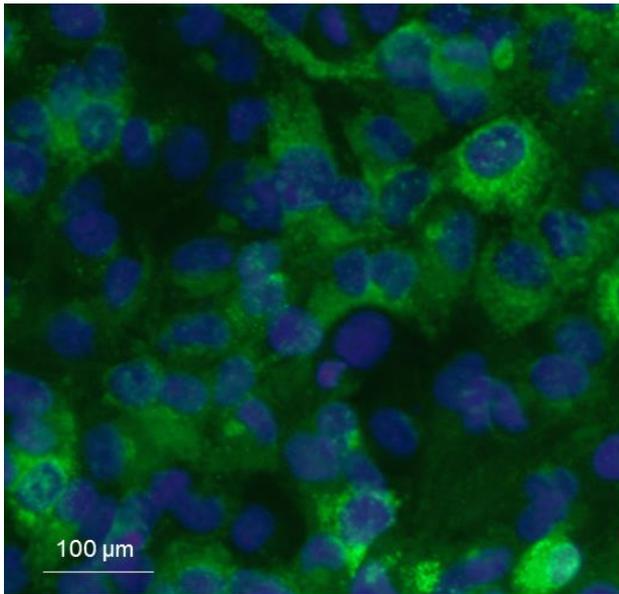
Nachdem in OSCC-Zellen durch Western-Blot-Analyse eine konzentrationsabhängige Zunahme an Volllänge-P-Cadherin nach Behandlung mit Gamma-Sekretase-Inhibitor-I gezeigt werden konnte (siehe Unterabschnitt 3.3.1), sollte dies durch immunzytochemische Färbungen verifiziert werden. Die kranken OSCC-POKs, die erworbenen OSCC-Zelllinien sowie die gesunden HOK-Zellen wurden, wie im Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben, einmal als Kontrolle mit DMSO und einmal mit Gamma-Sekretase-Inhibitor-I behandelt und nachfolgend mit Mouse-Anti-P-Cadherin-Antikörper (1:1000) gefärbt. Alle Immunfluoreszenzfärbungen wurden unter gleichen Bedingungen angefertigt und die Bilder mit gleichen Belichtungszeiten und gleicher Verstärkung aufgenommen.

3.4.1 P-Cadherin-Färbung in OSCC-Zellen mit und ohne Gamma-Sekretase-Inhibitor-I

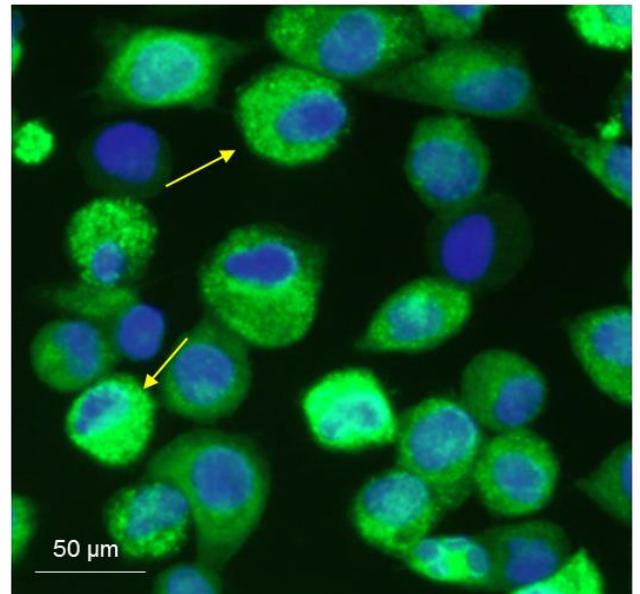
In Abbildung 25 sind die immunzytochemischen Färbungen der P-Cadherin überexprimierenden Zelllinie PCI 52 – kultiviert mit 0,5 mM CaCl_2 und 5 μM DMSO (links) bzw. 0,5 mM CaCl_2 und 5 μM GSI-I (rechts) – dargestellt. Während man bei den mit DMSO behandelten Kontrollzellen nur eine mäßige P-Cadherin-Akkumulation (grün gefärbt) um den Zellkern herum erkennen kann, ist nach Inkubation mit GSI-I eine deutliche Zunahme der Expression von P-Cadherin ersichtlich. Gekennzeichnet ist dies durch eine gut sichtbare stärkere, intensivere und homogenere Färbung (Pfeile) um die Zellkerne herum (Abbildung 25 – rechts).

Diese P-Cadherin-Ansammlung ist auch bei der OSCC-Zelllinie PCI 68 ersichtlich und in der Abbildung 26 dargestellt. Man erkennt auch hier, analog zu den PCI 52-Zellen, eine P-Cadherin-Zunahme nach Gamma-Sekretase-Inhibition, mit einem Anstieg der Volllänge-P-Cadherin-Akkumulation um die Zellkerne herum (Pfeile).

Die Abbildungen 25 und 26 zeigen in beiden Fällen, dass das P-Cadherin nach Inhibition der Gamma-Sekretase-Aktivität um den Zellkern herum signifikant zunimmt.

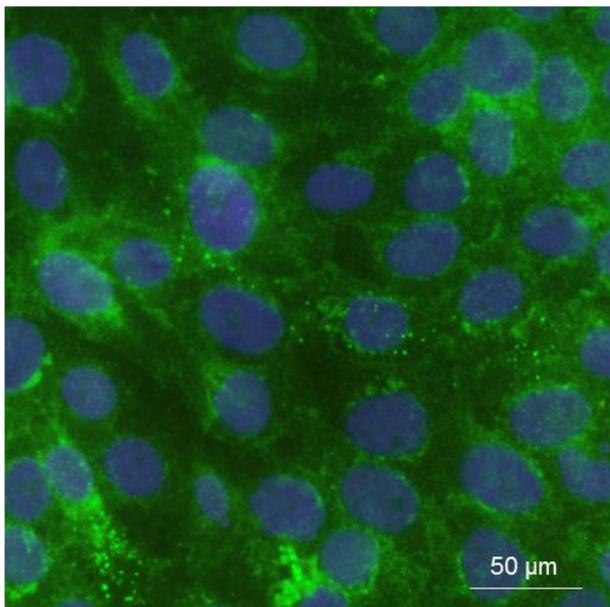


Zelllinie PCI 52 mit 0,5 mM CaCl
und 5 μM DMSO

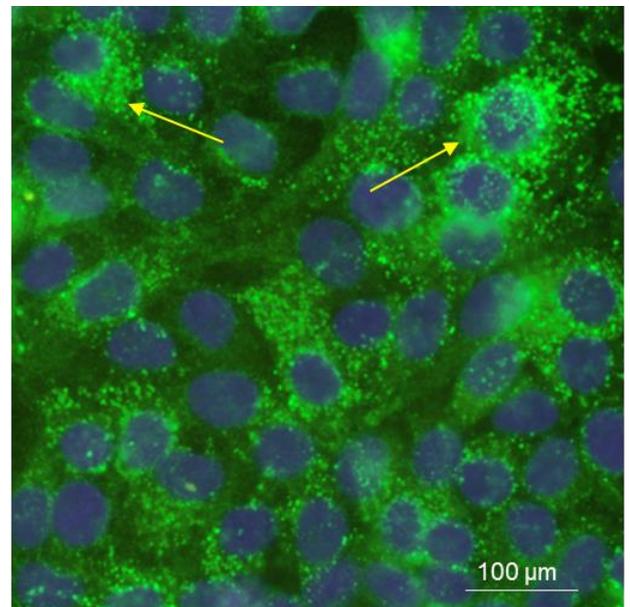


Zelllinie PCI 52 mit 0,5 mM CaCl und
5 μM Gamma-Sekretase-Inhibitor

Abbildung 25: Lokalisation von P-Cadherin in der undifferenzierten P-Cadherin überexprimierenden Zelllinie PCI 52 (Pfeile), versetzt mit 0,5 mM CaCl und 5 μM DMSO (links) bzw. 0,5 mM CaCl und 5 μM GSI-I (rechts).



OSCC-Zelllinie PCI 68
mit 5 μM DMSO



OSCC-Zelllinie PCI 68 mit 5 μM Gamma-
Sekretase-Inhibitor

Abbildung 26: Nachweis von P-Cadherin in der OSCC-Zelllinie PCI 68 nach Inkubation mit 5 μM GSI-I (rechts). Die Kontroll-PCI-68-Zellen wurden mit 5 μM DMSO inkubiert (links).

3.4.2 Immunzytochemische Färbung von P-Cadherin in HOKs – mit und ohne Gamma-Sekretase-Inhibitor-I

Die Abbildungen 27 A–C zeigen Aufnahmen der gesunden HOK-Zellen, versetzt mit 5 μM Gamma-Sekretase-Inhibitor-I. Die HOK-Kontrollzellen der Abbildungen 28 A–C wurden mit 5 μM DMSO inkubiert.

Die mit 5 μM GSI-I behandelten Zellen (Abbildung 27) zeigen eine starke Fluoreszenz; man erkennt eine intensive zytoplasmatische P-Cadherin-Färbung (hellgrüne Areale). Die Ausschnittsvergrößerungen in den Abbildungen 27 B und C zeigen je ein entsprechendes Beispiel dieser Fluoreszenzintensität.

Die Aufnahmen der HOK-Zellen, die entsprechend mit DMSO behandelt wurden (Abbildung 28), zeigen im Vergleich zu den inhibierten Zellen eine etwas schwächere, jedoch immer noch kräftige Fluoreszenz mit eher randständiger Betonung und zusätzlicher vesikulärer Färbung (Abbildung 28 B).

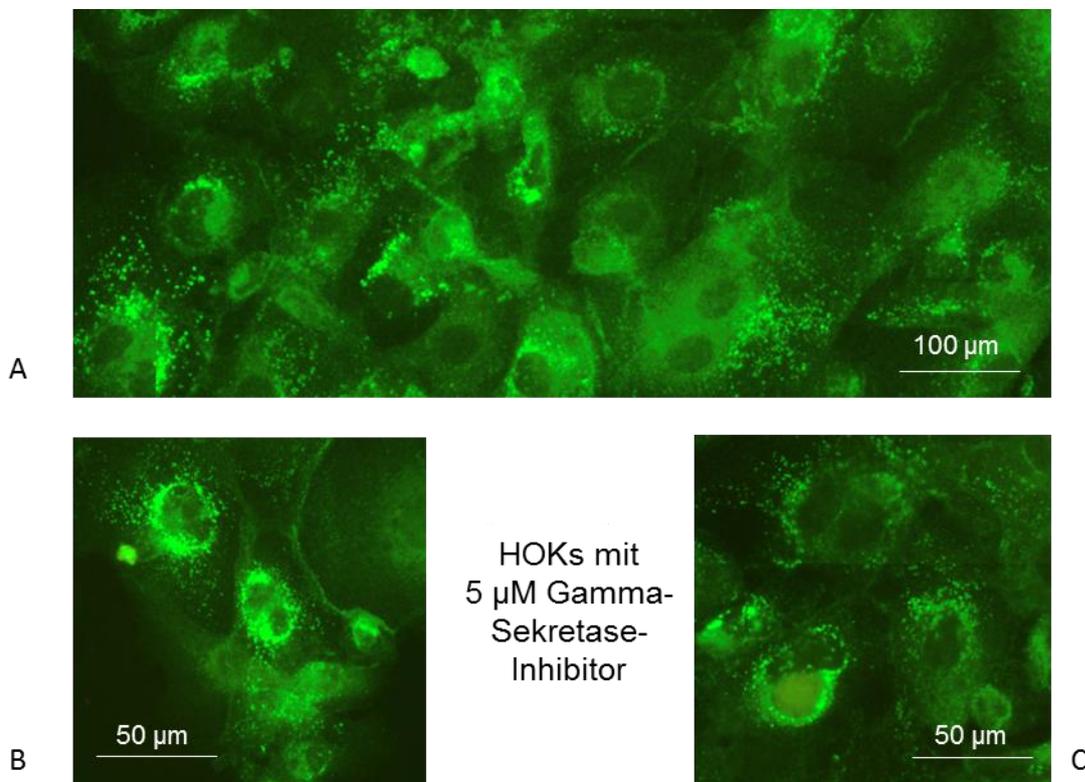


Abbildung 27: Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis der P-Cadherin-Expression in HOK-Zellen, nach Inhibition mit 5 μM Gamma-Sekretase-Inhibitor.

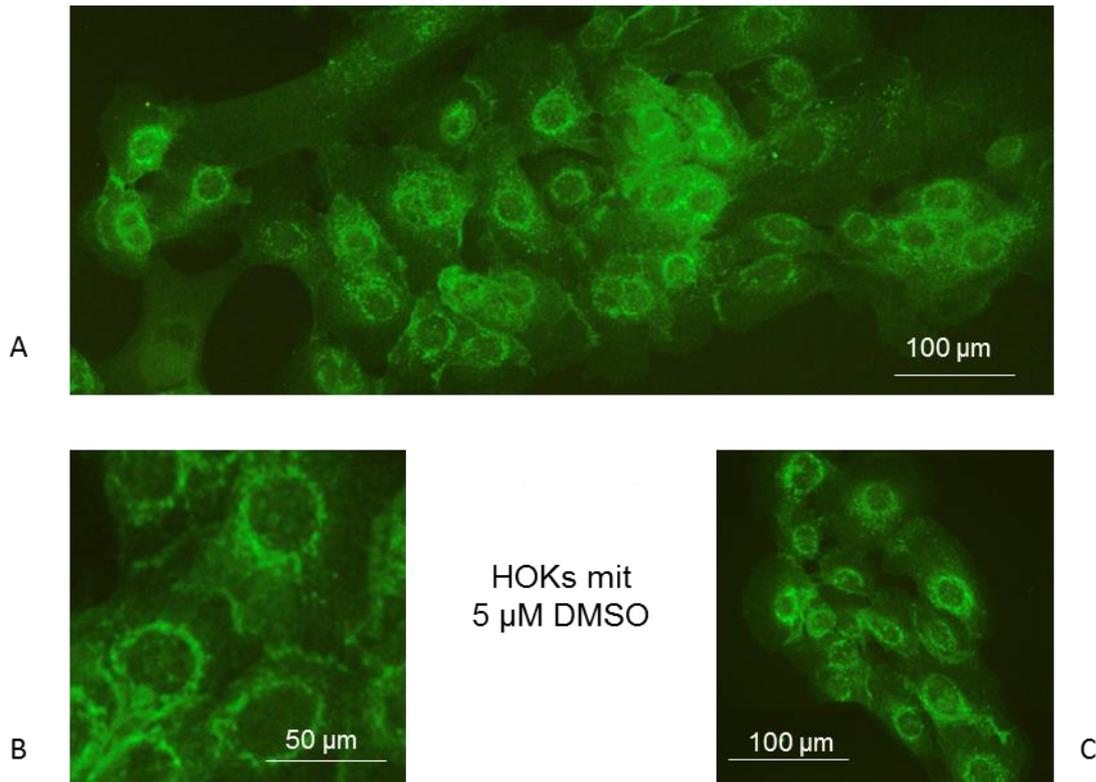


Abbildung 28: Verteilung von P-Cadherin in HOK-Zellen, versetzt mit 5 µM DMSO, Nachweis mittels Immunfluoreszenzfärbung.

3.5 Nachweis von Presenilin-1 in der Membranfraktion von HOKs und OSCC-Zellen

Anhand der in Unterabschnitt 3.2.1 aufgeführten Beobachtung, dass die Expression von PS-1 in Ganzzelllysaten des OSCC hochreguliert ist, setzten wir uns zum Ziel, die genaue Lokalisation von Presenilin-1 in OSCC- und HOK-Zellen zu untersuchen. Es stellte sich die Frage, ob sich das Presenilin-1 verstärkt an den Zellmembranen befindet oder ob es eher im Zytoplasma und um den Nukleus akkumuliert. Um dies festzustellen, wurde die Biotinylierung (siehe Unterabschnitt 2.2.6 „Material und Methoden“) der Membranfraktion von gesunden HOK-Zellen sowie von den OSCC-Zelllinien PCI 1, PCI 68 und PCI 52 durchgeführt. In den Western-Blot-Analysen wurden jeweils 200 µg Membranlysate eingesetzt.

3.5.1 Presenilin-1-Expressionsmuster in der Western-Blot-Analyse der Membranfraktion von OSCC- und HOK-Zellen

In der von uns durchgeführten Western-Blot-Analyse trat bei der Detektion von Presenilin-1 die Bande der HOK-Membranfraktion am stärksten hervor. Dieses Erscheinungsbild ist typisch für eine reguläre Expression von Presenilin-1 an der Zellmembran (Abbildung 29 – rechts).

Interessanterweise exprimierten im Gegensatz dazu die OSCC-Zellen PS-1 an der Membran sehr schwach. Deutlich ist dies am Abfall des Immunsignals, bei gleichem Stoffmengenauftrag von 200 µg, in den Banden der Membranfraktionen der OSCC-Zellen von PCI 1 über PCI 52 bis hin zum fast völligen Verschwinden der Bande bei PCI 68 ersichtlich (Abbildung 29 – Spuren 1–3). Dies deutet auf eine Herunterregulation bzw. ein vollständiges Fehlen von Presenilin-1 an der Zellmembran von OSCC-Zellen hin.

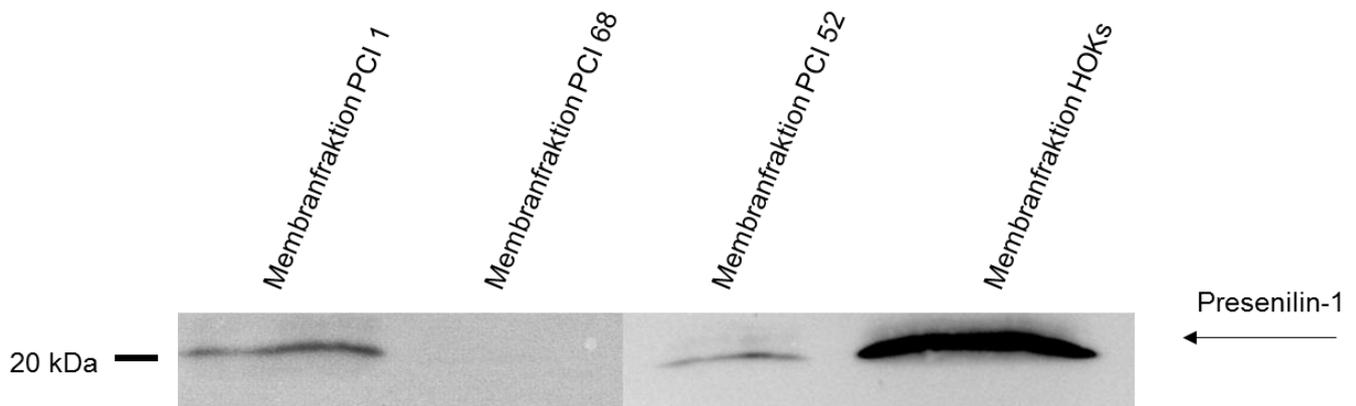


Abbildung 29: Western-Blot-Analyse der Membranfraktionen der OSCC-Zellen PCI 1, PCI 68 und PCI 52 sowie der gesunden HOK-Zellen. Die OSCC-Zellen zeigen im Vergleich zu den normalen oralen Keratinozyten eine deutlich schwächere Presenilin-1-Expression an der Membran.

3.6 Proliferationsanalysen im Durchflusszytometer

Um einen potenziellen Einfluss der Gamma-Sekretase bzw. deren Hemmung auf den Verlauf der Proliferation bei HOK- und OSCC-Zellen untersuchen zu können, wurden Zellzyklusmessungen im Durchflusszytometer durchgeführt. Dabei wurde zuerst in Voruntersuchungen ermittelt, wann die jeweiligen Zelllinien nach Synchronisation wieder in die S-Phase eintreten. Unsere Erkenntnisse zum idealen Messzeitpunkt, zu dem sich die Zellen in der S-Phase befinden, stützen sich auf weit über 50 durchgeführte Vormessungen. Die definitiven Versuche zur Zellzyklusanalyse wurden zu den Zeitpunkten 3 und 7 Stunden (bei OSCCs) bzw. 14 Stunden (bei HOKs) nach Inkubation mit GSI-I bzw. DMSO (2,34 $\mu\text{mol/l}$ (1:9000) und 1,4 $\mu\text{mol/l}$ (1:15000)) durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen geerntet, mit Propidiumiodid (PI) versetzt und im FACS gemessen. PI ist ein fluoreszierender Nukleinsäureinterkalator, nach Zugabe von PI kann somit der DNA-Gehalt von Zellen gemessen werden. Es wurden die OSCC-Zelllinien PCI 4A, PCI 9 und PCI 13 sowie zum Vergleich die HOK-Zelllinie verwendet.

3.6.1 Zellzyklusanalysen der HOK-Zellen

In Abbildung 30 A (links) und in Tabelle 10 (2. Spalte) kann man erkennen, dass die Zellzyklusmessungen der Kontrollzellen (HOKs, DMSO: 1:9000) im Mittel eine Rate für die sich in der G_1 -Phase befindenden Zellen, in der diese noch den einfachen DNA-Satz haben, von 54,82% (1. Peak) ergab. Während der Synthese-Phase (S-Phase, Plateau zwischen 1. und 2. Peak) ergab sich ein Prozentsatz von 21,43%; in dieser Phase verdoppeln die Zellen ihre DNA. Und in der G_2 -Phase (2. Peak), in welcher die DNA bereits verdoppelt vorliegt und sich die Zellen in der Mitose befinden, ergab sich ein Wert von 28,41%. Signifikant weniger Zellen in der S-Phase wiesen die mit GSI-I (1:9000) behandelten HOK-Zellen auf. Hier fiel der Wert bei Messung des Zellzyklus nach 14 Stunden in der S-Phase im Mittel auf 10,92% (Abbildung 30 A – rechts, Tabelle 10 – 3. Spalte). Die Werte für die Zellen in der G_1 - und G_2 -Phase blieben weitgehend stabil. Eine starke Verzögerung beim Übergang der Zellen in die S-Phase konnte ebenfalls bei Behandlung der HOK-Zellen mit 1:15000 DMSO bzw. GSI-I gezeigt werden. Die mit DMSO (1:15000) behandelten HOKs zeigten in der Analyse

21,17% Zellen in der S-Phase (Abbildung 30 B – links, Tabelle 10 – Spalte 4). Im Gegensatz dazu befanden sich nur 6,34% der mit GSI-I (1:15 000) behandelten Zellen in der S-Phase (Abbildung 30 B – rechts, Tabelle 10 - Spalte 5). Zudem konnte bei den mit GSI-I (1:15 000) behandelten Zellen prozentual ein höherer Anteil der sich in den Phasen G₁ und G₂ befindlichen HOKs verzeichnet werden.

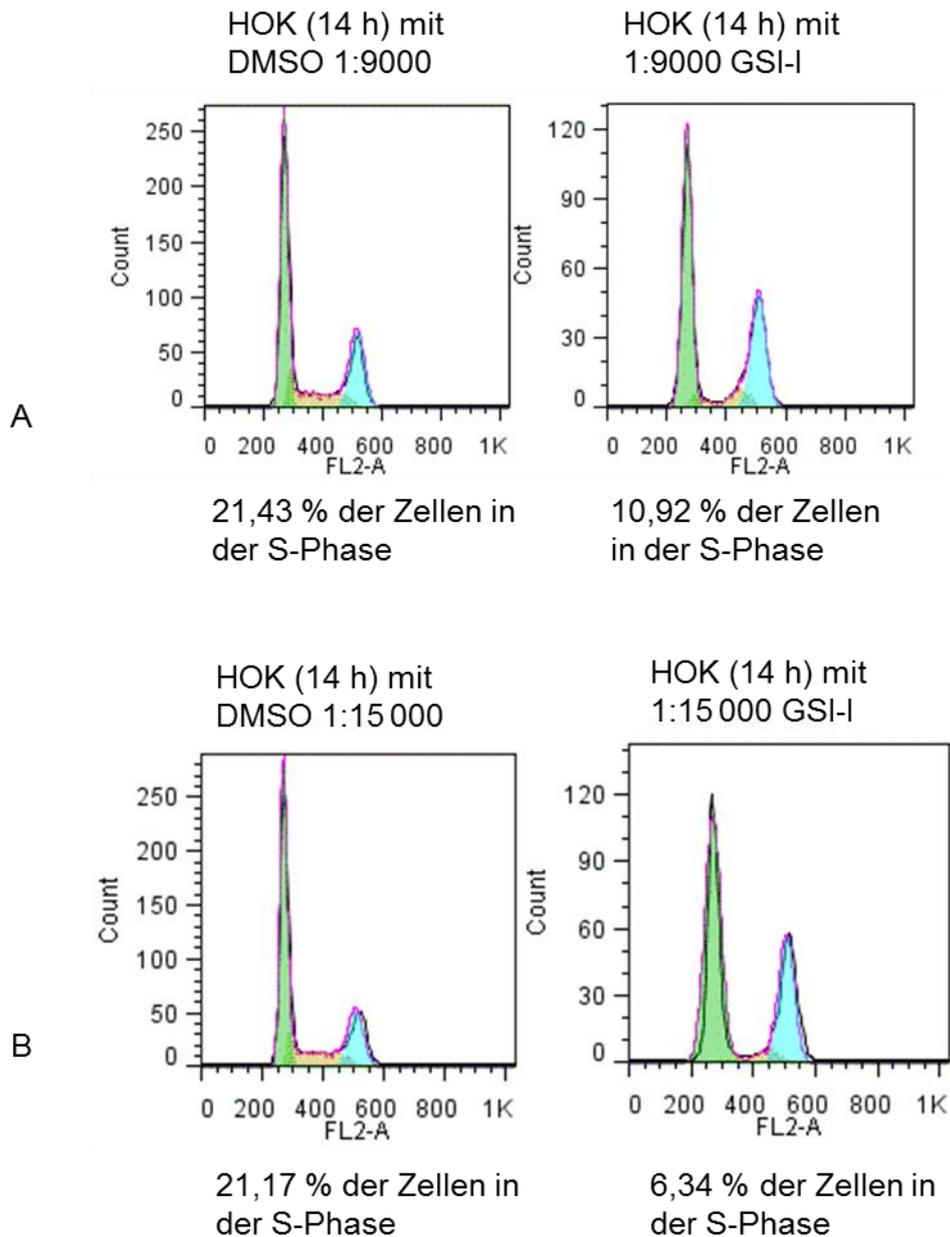


Abbildung 30: Einfluss von GSI-I auf den Zellzyklus von gesunden HOKs.

HOKs inkubiert für 14 h mit: _____ Phase:	DMSO 1:9000	GSI 1:9000	DMSO 1:15 000	GSI 1:15 000
G ₁ -Phase	54,82 %	54,16 %	55,8 %	73,96 %
S-Phase	21,43 %	10,92 %	21,17 %	6,34 %
G ₂ -Phase	28,41 %	34,37 %	21,38 %	35,64 %

Tabelle 10: Tabellarische Übersicht in Prozent – HOK-Zellen in der G₁-, S- und G₂-Phase nach Inkubation für 14 Stunden mit DMSO bzw. GSI-I mit den Verdünnungen 1:9000 (2,34 µmol/l) und 1:15 000 (1,4 µmol/l).

3.6.2 Zellzyklusanalysen der OSCC-Zellen

Die zum Vergleich durchgeführten durchflusszytometrischen Analysen der OSCC-Zelllinien PCI 4A, PCI 9 und PCI 13 zeigten, dass nach Inhibition mit GSI-I kein Unterschied zu den mit DMSO behandelten OSCC-Zellen festzustellen war. In den analog zu den HOKs durchgeführten Messungen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen inhibierten und nicht inhibierten Zellen festgestellt werden.

Beispielhaft soll hier die FACS-Analyse von PCI 4A (Abbildung 31, Tabelle 11 – Zeile 2) erläutert werden, die Werte der Messungen der OSCC-Linien PCI 9 und PCI 13 sind ausführlich in Tabelle 11 dargestellt. Die Inkubation von PCI 4A für 3 Stunden mit DMSO bzw. GSI-I (mit den beiden Verdünnungen 1:9000 und 1:15 000) ergab folgende Prozentsätze für die sich in der Synthese-Phase befindenden Zellen:

- 1:9000/DMSO → 4,9 % (Abbildung 31 – links)
- 1:9000/GSI-I → 5,34 % (Abbildung 31 – rechts)
- 1:15 000/DMSO → 7,31 %
- 1:15 000/GSI-I → 5,25 %

Somit konnte lediglich eine sehr geringe Abweichung sowohl in der S-Phase als auch in der G₁- und G₂-Phase festgestellt werden (Tabelle 11). Wie in Tabelle 11 (Zeile 3) abgebildet, sind auch bei den 7-stündigen Behandlungen von PCI 4A mit DMSO bzw. GSI-I (1:9000 bzw. 1:15 000) nur sehr geringe Unterschiede in allen Zellzyklusphasen zu erkennen (Histogramme nicht abgebildet).

Dieser Trend setzte sich auch für die OSCC-Zelllinien PCI 9 und 13 fort. In Tabelle 11 sind die Werte von PCI 9 und PCI 13, inkubiert für 3 und 7 Stunden mit DMSO bzw. GSI-I (1:9000), in Prozent dargestellt. Auch hier ließen die Messungen erkennen, dass in keiner Zyklusphase ein signifikanter Unterschied zwischen inhibierten und nicht inhibierten Zellen feststellbar war (Histogramme nicht abgebildet). Einzig zwei marginale Schwankungen ließen sich bei den mit 1:15 000 DMSO bzw. GSI-I versetzten PCI 9-Zellen feststellen (Tabelle 11 – Spalten 4 + 5 und Zeilen 4 + 5). Hier ergaben sich bei der Inkubation für 3 Stunden etwas höhere prozentuale Diskrepanzen in der G₁-Phase. Bei der Inkubation für 7 Stunden erstrecken sich die gemessenen Unterschiede auf die G₁- und die S-Phase; damit kamen nur diese beiden letzteren genannten Werte (Tabelle 11 – Spalten 4 + 5 und Zeile 5) denen der entsprechend behandelten HOKs sehr nahe (Tabelle 10 - Spalten 4 + 5 und Zeilen 2 + 3).

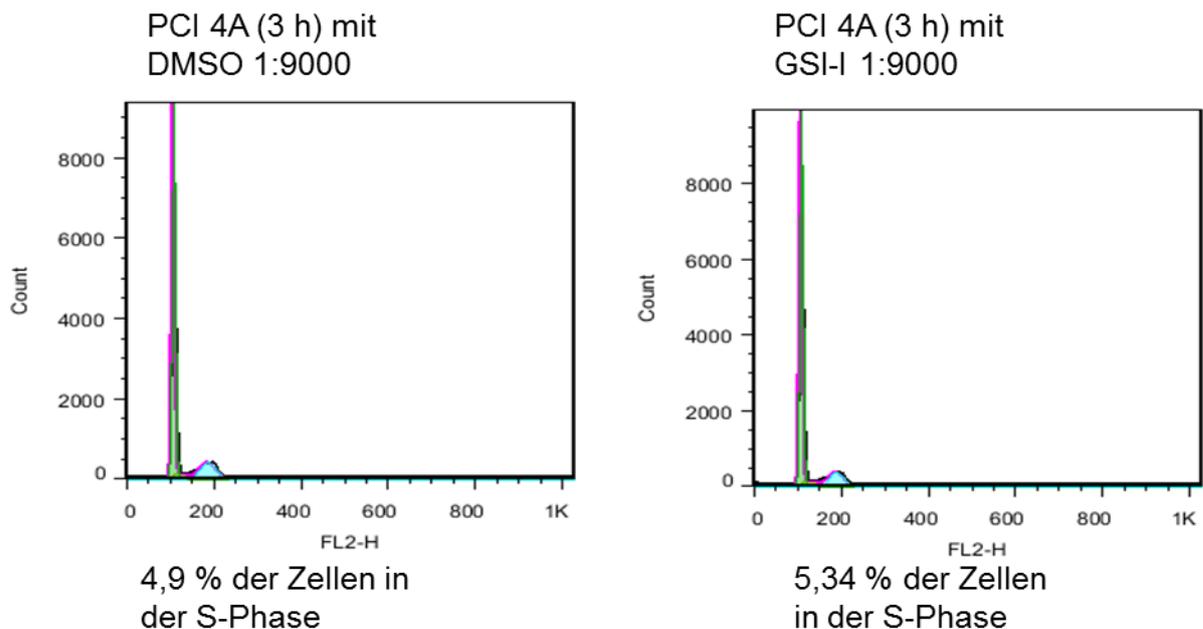


Abbildung 31: Histogramme der OSCC-Zelllinie PCI 4A nach 3-stündiger Inkubation mit DMSO bzw. GSI-I mit der Verdünnung 1:9000 (2,34 µmol/l).

PCI-Zellen/ inkubiert für	DMSO 1:9000	GSI-I 1:9000	DMSO 1:15 000	GSI-I 1:15 000
4A / 3 h mit	G ₁ : 76,23 % S: 4,9 % G ₂ : 17,61 %	G ₁ : 79,53 % S: 5,34 % G ₂ : 13,91 %	G ₁ : 79,92 % S: 7,31 % G ₂ : 9,62 %	G ₁ : 80,73 % S: 5,25 % G ₂ : 13,01 %
4A / 7 h mit	G ₁ : 74,23 % S: 10,33 % G ₂ : 14,49 %	G ₁ : 72,82 % S: 10,44 % G ₂ : 15,04 %	G ₁ : 74,02 % S: 16,57 % G ₂ : 8,65 %	G ₁ : 74,53 % S: 12,74 % G ₂ : 11,16 %
9 / 3 h mit	G ₁ : 80,49 % S: 2,59 % G ₂ : 12,75 %	G ₁ : 77,46 % S: 4,88 % G ₂ : 13,98 %	G ₁ : 54,12 % S: 17,98 % G ₂ : 14,75 %	G ₁ : 70,21 % S: 10,13 % G ₂ : 12,87 %
9 / 7 h mit	G ₁ : 72,09 % S: 10,6 % G ₂ : 12,31 %	G ₁ : 72,43 % S: 9,01 % G ₂ : 13,36 %	G ₁ : 57,18 % S: 19,48 % G ₂ : 15,05 %	G ₁ : 73,61 % S: 9,97 % G ₂ : 11,51 %
13 / 3 h mit	G ₁ : 69,76 % S: 12,32 % G ₂ : 14,53 %	G ₁ : 67,79 % S: 13,3 % G ₂ : 14,09 %	n/a	n/a
13 / 7 h mit	G ₁ : 69,85 % S: 15,28 % G ₂ : 13,69 %	G ₁ : 70,87 % S: 13,24 % G ₂ : 14,92 %	n/a	n/a

Tabelle 11: Tabellarische Übersicht in Prozent – PCI-Zellen 4A, 9 und 13 in allen Phasen des Zellzyklus nach Inkubation für 3 bzw. 7 Stunden mit DMSO bzw. GSI-I mit den Verdünnungen 1:9000 (2,34 µmol/l) und 1:15 000 (1,4 µmol/l).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass ein Akkumulieren der HOK-Zellen in der Synthese-Phase des Zellzyklus durch Behandlung mit Gamma-Sekretase-Inhibitor-I reduziert werden konnte. Bei allen OSCC-Zelllinien konnte kein signifikanter Inhibitionseffekt beobachtet werden.

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Ergebnisse

P-Cadherin zählt zur Gruppe der Zelladhäsionsmoleküle und ist für die interzelluläre Adhäsion mitverantwortlich. Die Fähigkeit, stabile Adhäsionsverbindungen zu bilden, stellt einen wichtigen Faktor für die Organisation und bei der Entwicklung von Organismen dar. Das Vorhandensein oder Fehlen von Adhäsionsmolekülen wird mit Tumorprogression, -invasion und -metastasierung in Verbindung gebracht. Cadherine sind nicht nur an der Vermittlung der interzellulären Adhäsion beteiligt, sie erleichtern auch die Signaltransduktion und beeinflussen mehrere andere wichtige biologische Prozesse, wie z. B. die zelluläre Motilität, die Proliferationsaktivität und die Apoptose (Cowin, 1994; Hermiston und Gordon, 1995). Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte u. a. die eingehende Analyse des Verteilungsmusters von P-Cadherin in den Zellen des oralen Plattenepithelkarzinoms und gesundem oralen Gewebe. Ein weiteres Anliegen dieser Promotion war es zu untersuchen, welche Auswirkungen die Presenilin-1-Expression auf P-Cadherin hat und welche Folgen sich diesbezüglich für die Zelladhäsion von oralen Plattenepithelkarzinomzellen ergeben.

4.1.1 Expressionsmuster von P-Cadherin in gesunden POKs, OSCC-POKs, OSCC-Zelllinien und HOKs

Unser Ziel war es zunächst, die genauen Expressionsmuster von P-Cadherin, zum einen in gesunden Geweben (HOKs und gesunden POKs) und zum anderen in Geweben des Plattenepithelkarzinoms (OSCC-POKs und OSCC-Zelllinien), mittels Western-Blot-Analyse darzustellen. Dabei konzentrierten wir uns zunächst auf das von Shimoyama et al. beschriebene Volllänge-P-Cadherin mit einem Molekulargewicht von 120 kDa (im Folgenden Pcad120 genannt) und 3 NH₂-gekoppelten Glykosylierungsstellen (Shimoyama, 1989 b). Diese Form von P-Cadherin konnten wir anhand eines starken Bandensignals in den gesunden POKs, in HOKs und in der PCI-1-Zelllinie nachweisen (Abbildungen 20 und 21). Ein sehr schwaches Pcad120-Bandensignal konnte auch bei den undifferenzierten OSCC-Zelllinien PCI 4A und PCI 52 detektiert werden. Somit gehen unsere Ergebnisse mit denen anderer wissenschaftlicher Arbeiten konform. Bauer et al. (2013) zeigten eine konstante

Expression des Volllänge-P-Cadherins in den Proteinextrakten der normalen oralen Schleimhaut, gesunden primären oralen Keratinozyten, HOK-Zellen und teilweise auch in primären oralen Keratinozyten, die aus Primärtumoren des Plattenepithelkarzinoms isoliert wurden. Auch decken sich unsere Ergebnisse bezüglich der Pcad120-Expression in OSCC-Zelllinien mit der Studie von Bauer et al. (2008). Dort wurde die Volllänge-120-kDa-Form in HOK-Zellen und in drei OSCC-Zelllinien (PCI 1, PCI 13 und PCI 68) nachgewiesen. Bauer et al. wiesen in der gleichen Studie auch nach, dass genau diese drei o. g. Zelllinien noch in der Lage sind zu differenzieren. Lo Muzio et al. (2004) detektierten eine starke Volllänge-P-Cadherin-Expression sowohl in normaler oraler Mukosa als auch in zwei Gewebeproben aus gut differenzierten Tumoren. In oralen Karzinomen konnten Sakaki et al. (1994) zeigen, dass eine reduzierte P-Cadherin-Expression signifikant mit dem Grad der Dedifferenzierung ansteigt. Insbesondere in gut differenzierten oralen Karzinomen scheint die P-Cadherin-Expression ähnlich wie in gesunder Mundschleimhaut hochreguliert zu sein, während in niedrig differenzierten oralen Plattenepithelkarzinomen die Expression homogen reduziert vorliegt (Williams et al., 1998). Bagutti et al. (1998) hingegen zeigten, dass keine Korrelation zwischen der P-Cadherin-Expression und dem Grad der Differenzierung in Tumorzellen des OSCC besteht. Diesen Zusammenhang konnten wir in unseren Forschungen jedoch nicht bestätigen, da auch unsere Volllänge-P-Cadherin exprimierende OSCC-Zelllinie PCI 1 als differenziert gilt.

Unsere Ergebnisse wiesen zudem auch Parallelen zu den Forschungen von Bauer et al. (2013) bezüglich der Detektion der 100-kDa-Form (im Folgenden Pcad100 genannt) von P-Cadherin auf. Die Forschungsgruppe konnte durch massenspektrometrische Analysen und nach Behandlung mit dem Glykosylierungsinhibitor Tunicamycin die 100-kDa-Form als unglykosyliertes Volllänge-P-Cadherin identifizieren (Bauer et al., 2013). Diese unglykosylierte Pcad100-Variante konnten wir in den HOK-Zellen, in gesunden POKs und auch in der OSCC-Zelllinie PCI 1 nachweisen (Abbildungen 20 und 21). Das gleiche Resultat zeigten Bauer et al. (2013) und wiesen noch zusätzlich die unglykosylierte P-Cadherin-Form nach Inhibition der PS-1/Gamma-Sekretase-Aktivität, in den OSCC-PCI-Zellen 68 und 13 sowie auch in kranken OSCC-POKs nach. Zudem könnte man spekulieren, dass Lo Muzio et al. in ihrer Studie von 2004 ebenso schon diese Pcad100-Form in ihren Western-Blot-Analysen detektiert haben könnten, da sie von P-Cadherin-Banden im Bereich von 90 kDa bis ~115 kDa berichteten.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die trunkierte P-Cadherin-Form mit einem Molekulargewicht von 50 kDa (im Folgenden Pcad50 genannt) in allen von uns untersuchten Primärzellen sowie auch in allen Zelllinien exprimiert wird. Bauer et al. detektierten diese trunkierte Form erstmals im Jahr 2005 in malignen Melanomzellen und vermuteten, dass diese sezernierte Form des P-Cadherins eine Rolle als Regulator der homophilen Interaktion zwischen den einzelnen P-Cadherin-Molekülen spielt. In der nachfolgenden Studie von 2008 zeigten Bauer und Kollegen, dass sich diese trunkierte Form des P-Cadherins in Zelllysaten differenzierter, vermehrt aber in Zelllysaten entdifferenzierter Plattenepithelkarzinomzelllinien der Mundhöhle findet. Da wir die Pcad50-Form mittels Antikörper auch in allen Geweben und zusätzlich noch in gesunden und in kranken POKs nachweisen konnten, können wir die Aussagen von Bauer et al. (2008) bezüglich des Verteilungsmusters der trunkierten P-Cadherin-Form nur bestätigen und zusätzlich bezüglich der primären oralen Keratinozyten (gesund und krank) noch erweitern. Offensichtlich scheinen trunkierte Proteinvarianten sehr wichtige Faktoren bezüglich des Fortschreitens von Krebserkrankungen darzustellen. In der Literatur werden die sezernierten Proteinfragmente mit der Regulierung der vermittelten Zelladhäsion und veränderten morphogenetischen Prozessen während der mesenchymalen Zelldifferenzierung in Verbindung gebracht (Tschan et al., 2003; Kawaguchi et al., 1999). Die Pcad50-Variante könnte somit eine veränderte Reaktion des homophilen Zusammenspiels von membranständigem P-Cadherin hervorrufen, wodurch es zu einer Abnahme der interzellulären Kontakte mit anschließender höherer Invasionsbereitschaft der betreffenden entarteten Zellen kommen könnte.

In den von uns durchgeführten Untersuchungen und den oben beschriebenen Studien wurde ausschließlich auf P-Cadherin eingegangen. Darüber hinaus existieren aber zahlreiche Publikationen, die sich im Speziellen mit E-Cadherin, dem am besten untersuchten Vertreter der klassischen Cadherine, beschäftigten, sodass im Folgenden noch einmal in verkürzter Form und vergleichend in Bezug auf P-Cadherin auf diese Studien eingegangen werden soll. E- und P-Cadherin spielen eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der epithelialen Struktur. Sie werden aber in unterschiedlichen Regionen des Epithels exprimiert. E-Cadherin wird in allen epithelialen Schichten exprimiert, während P-Cadherin ausschließlich in der basalen und suprabasalen Zellschicht, dem proliferativen Kompartiment des Epithels, exprimiert wird (Muñoz-Guerra et al., 2005; Lo-Muzio et al., 2004; Molès und Watt,

1997; Fujita et al., 1992). In Hauttumoren zeigen beide Cadherine eine Deregulation ihrer Expression, wenn auch unterschiedlichen Grades. Shirahama et al. (1996) zeigten in malignen Tumoren der Haut eine Reduktion von E-Cadherin bei gleichzeitig erhöhter P-Cadherin-Expression. Auch im OSCC konnte eine erniedrigte E-Cadherin-Expression beobachtet werden (Schipper et al., 1991). Einige Autoren nehmen an, dass E-Cadherin die Funktion eines Invasions-Suppressor-Moleküls hat, da der Verlust von E-Cadherin die Invasion ins benachbarte Gewebe ermöglicht bzw. begünstigt (Mareel et al., 1995; Smith und Pignatelli, 1997). Weiterführende Untersuchungen müssen zeigen, ob sich diese Annahme auch für P-Cadherin bestätigt.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass sich die Expression von P-Cadherin im gesunden bzw. erkrankten Gewebe erheblich voneinander unterscheidet. Man kann also davon ausgehen, dass die Expression und auch die Funktion von P-Cadherin nicht unwesentlich von Faktoren wie Differenzierungs-, Invasions- oder Metastasierungsgrad eines malignen Tumors beeinflusst werden. Zudem stellt P-Cadherin als Zelladhäsionsmolekül einen allgemeinen Parameter dar, der scheinbar bei allen Prozessen der Zellinteraktion im gesunden Epithel und im OSCC-Gewebe zugegen ist. Somit ist der Nachweis aller vorgestellten P-Cadherin-Formen (Pcad120, Pcad100 und Pcad50) nicht zwingend tumorspezifisch, da diese in allen Geweben vorkommen. Trotzdem sollten aberrante Expressionsmuster kritisch durch weiterführende Diagnostik von z. B. einer prämaligen dysplastischen Veränderung abgegrenzt werden.

4.1.2 Erhöhte Expression von unglykosyliertem P-Cadherin (Pcad100) nach Hemmung der Gamma-Sekretase-Aktivität in OSCC-Zellen

Der Gamma-Sekretase-Inhibitor ist u. a. dafür bekannt, dass er die proteolytische Spaltung des β -Amyloids hemmt, welches eine Rolle in der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit spielt (Imbimbo, 2008). Darüber hinaus ist er an der Steuerung einer Vielzahl von Zellprozessen beteiligt (Wolfe, 2010).

In der Studie von Bauer et al. (2013) wurden OSCC-Zelllinien mit Gamma-Sekretase-Inhibitor behandelt und zeigten danach eine erhöhte Expression von unglykosyliertem P-Cadherin (Pcad100). Mittels Western-Blot-Analysen konnte in der vorliegenden

Arbeit die Präsenz einer erhöhten Expression der 100-kDa-P-Cadherin-Variante in den OSCC-Zelllinien PCI 13 und PCI 68 nach Inhibition mit dem Gamma-Sekretase-Inhibitor-I bestätigt werden. Zusätzlich konnte in unserer Analyse gezeigt werden, dass bei den HOK-Zellen keine gesteigerte Expression der Pcad100-Form nach Inhibition vorliegt. Bauer et al. (2013) wiesen zudem nach, dass sich mit zunehmender P-Cadherin-Expression auch die Zelladhäsion verbesserte. Dies wiederum spiegelte sich in einem reduzierten invasiven Verhalten der OSCC-Zellen wider (Bauer et al., 2013). Marambaud et al. (2002) zeigten, dass die Aktivität der Gamma-Sekretase die Prozessierung von E-Cadherin reguliert. Im Gegensatz zu den Kontrollzellen zeigten die mit GSI-I behandelten, E-Cadherin-transfizierten und Presenilin-positiven Fibroblasten eine signifikante Zunahme an E-Cadherin (Marambaud et al., 2002). Dies deutet darauf hin, dass die PS-1-assoziierte Gamma-Sekretase-Aktivität in den E-Cadherin-Metabolismus involviert ist. Weiterhin wurden die durch die Gamma-Sekretase induzierte Spaltung von E-Cadherin und die daraus resultierende Lösung der Adhärenzverbindungen beschrieben (Marambaud, et al., 2002). Dazu induzierten sie, in Abwesenheit oder Gegenwart von GSI, einen Calcium-Einstrom in A431-Zellen. Die Zellen, die nicht mit GSI behandelt wurden, zeigten eine Abnahme an zytoskelettständigem E-Cadherin. Auch konnten Marambaud et al. (2002) beobachten, dass zwei weitere klassische Cadherine, N- und VE-Cadherin, ebenso durch das Gamma-Sekretase-System gespalten werden. Han et al. (2009) untersuchten die Wirkung von GSI auf das Wachstum von Brustkrebszellen. Sie waren in der Lage, durch Zugabe von GSI Apoptose infolge einer Proteasomhemmung zu induzieren und die Gamma-Sekretase-Aktivität zu reduzieren (Han et al., 2009). Auch Rasul et al. (2009) stellten den durch GSI induzierten G₂/M-Phase-Arrest und Apoptose in Brustkrebszelllinien fest. Die Hemmung des Proteasoms durch GSI bei der Tumorthherapie stellt also ein wichtiges Ziel bei der Behandlung dar. Es ist jedoch zu bedenken, dass die Gamma-Sekretase-Inhibitoren neben der Gamma-Sekretase noch andere Proteasen inhibieren können, die an einer Vielzahl von wichtigen Zellfunktionen beteiligt sind. Somit haben die Gamma-Sekretase-Inhibitoren *in vivo* auch eine Vielzahl an schädlichen Nebenwirkungen, wie in zahlreichen klinischen Studien nachgewiesen wurde (Marambaud et al., 2002; Shih und Wang, 2007). Zum Beispiel hatte die Behandlung mit GSIs über einen längeren Zeitraum gastrointestinale Toxizitäten und auch Immunsuppressionen zur Folge, welche sich

auf eine Beeinträchtigung des Notch-Signalweges zurückführen lassen (De Strooper et al., 2012; Wolfe, M., 2010).

Wie oben erwähnt, sind unsere Ergebnisse bezüglich des Auftauchens einer erhöhten Menge an unglykosyliertem P-Cadherin (Pcad100) nach Inhibition mit GSI-I vergleichbar mit denen von Bauer et al. (2013). Wie in Abbildung 23 gut ersichtlich ist, erfolgte eine dosisabhängige Hochregulation der Expression der unglykosylierten 100-kDa-Form von P-Cadherin in den OSCC-Zelllinien. Auch in den HOK-Zellen (Abbildung 24) und den gesunden POKs (Abbildung 20) konnte auf Proteinebene die Pcad100-Variante detektiert werden. Im Vergleich dazu konnte bei den unbehandelten OSCC-POKs (Abbildung 20) kein unglykosyliertes P-Cadherin im Western Blot identifiziert werden. Prinzipiell ist aber das Gleichgewicht zwischen unglykosylierten und N-glykosylierten Cadherinen sehr wichtig für stabile Zell-Zell-Kontakte. Liwosz et al. (2006) konnten erstmals nachweisen, dass sowohl die Menge als auch die Zusammensetzung der N-Glykane die Stabilität der Adhärenzverbindungen und deren Assoziation mit dem Zytoskelett beeinflusst. Die Studie beweist, dass das Vorhandensein einer reduzierten Anzahl von komplexen N-Glykanen für stabile E-Cadherin-Verbindungen unerlässlich ist (Liwosz et al., 2006). Auch konnte in oralen Plattenepithelkarzinomzellen gezeigt werden, dass die zelluläre Auflösung der Kontakte und die Tumordinvasion stark mit dem Grad von N-glykosyliertem E-Cadherin in Verbindung stehen (Liwosz et al., 2006). Bestätigt werden diese Ergebnisse auch durch Nita-Lazar et al. (2009), die in ihrer Studie veranschaulichten, dass eine abnormale N-Glykosylierung von E-Cadherin dessen Fähigkeit reduziert, stabile Adhärenzverbindungen in oralen Krebszellen zu bilden. Auch konnten Liu et al. in ihrer Studie von 2013 belegen, dass eine Fehlregulation der N-Glykosylierung zu frühzeitigen Vorgängen in der Pathogenese des oralen Plattenepithelkarzinoms führt.

Die dargestellten Ergebnisse rechtfertigen somit die Aussage, dass sich sowohl die Aktivität der Gamma-Sekretase als auch die Menge an unglykosyliertem und glykosyliertem P-Cadherin auf die proteolytische Prozessierung sowie die Funktion und die Anzahl der stabilen Zellkontakte auswirkt, indem die Spaltung von Volllänge-P-Cadherin gefördert und die Tumorprogression im OSCC begünstigt wird.

4.1.3 Verstärkte P-Cadherin-Expression bei OSCC-Zellen nach Behandlung mit GSI-I – Nachweis in der Immunfluoreszenzfärbung

Analog zu den vorgenannten Ergebnissen und der Diskussion bezüglich des Auftauchens der erhöhten Pcad100-Expression in OSCC-Zellen im Western Blot konnten wir zudem durch Immunfluoreszenzfärbungen die Hochregulation der P-Cadherin-Expression gut visuell darstellen. Es ist bekannt, dass die Gamma-Sekretase-Inhibitoren (GSIs) in der Forschung verwendet werden, um die Produktion des β -Amyloids zu inhibieren, um so die Alzheimer-Erkrankung zu behandeln. GSIs hemmen nichtkompetitiv durch bisher noch unbekannte Mechanismen die proteolytische Aktivität der Gamma-Sekretase (Barthet et al., 2011). Die signifikante Zunahme der P-Cadherin-Expression nach Inhibition mit GSI-I kann man in unseren Färbungen der entarteten Zellen PCI 52 und PCI 68, im Vergleich zu den mit DMSO behandelten Kontrollzellen, deutlich erkennen (Abbildungen 25 und 26). Betrachtet man unsere Färbungsmuster, stellt sich insgesamt ein sehr ähnliches Bild wie in anderen Arbeiten auf diesem Gebiet dar. Marambaud et al. (2002) leisteten mit der ersten Arbeit in diesem Bereich einen bedeutenden Beitrag. Sie untersuchten den Zusammenhang zwischen der E-Cadherin-Spaltung und der Aktivität der Gamma-Sekretase. Sie behandelten mit E-Cadherin transfizierte PS-1-positive Mausfibroblasten mit dem selektiven GSI L-685,458 und beobachteten anschließend eine erhöhte zelluläre E-Cad/CTF1-Expression (E-Cadherin/C-terminales Fragment 1) im Western Blot. Zudem blockierte der Inhibitor das Auftauchen eines weiteren, 33 kDa großen E-Cadherin-Fragments (E-Cad/CTF2 (E-Cadherin/C-terminales Fragment 2)), was beweist, dass dieses trunkierte Fragment durch die Spaltung der Gamma-Sekretase-Aktivität aus E-Cadherin erzeugt wird. Auch die durch GSI gehemmte Degradation von Volllänge-E-Cadherin konnten sie in dieser Studie nachweisen (Marambaud et al., 2002). In der Folgestudie von Marambaud et al. (2003) wiesen sie dann auch die Inhibition eines löslichen 35-kDa-Fragmentes von N-Cadherin (N-Cad/CTF2 (N-Cadherin/C-terminales Fragment 2)) durch den Gamma-Sekretase-Inhibitor L-685,458 nach, was wiederum zur Hemmung der Solubilisierung von Cateninen führt. Eine erhöhte Präsenz von E- oder N-Cad/CTF2 steht im Zusammenhang mit der Auflösung von Cadherin-Adhärenzverbindungen und führt letztlich zum Verlust von Zell-Zell-Verbindungen (Parisiadou, 2004). Eine Erweiterung zur Studie von Marambaud (2003) stellt die Arbeit von Barthet et al. (2011) dar. Hier

konnte die Inhibition von N-Cad/CTF2 nach einer konzentrationsabhängigen Zugabe des Gamma-Sekretase-Inhibitors DAPT (N-[N-(3, 5-difluorphenacetyl)-l-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester) in den kortikalen Neuronen von Ratten nachgewiesen werden. Des Weiteren konnten Frank und Hostetter in ihrer Studie von 2006 zeigen, dass in den Lysaten von Darmepithelzellen ein 35 kDa großes Teilstück von E-Cadherin nach Zugabe der Gamma-Sekretase-Inhibitoren L-685,455 und auch DAPT akkumuliert. Unsere Ergebnisse reihen sich somit in eine Vielzahl von Studien ein, welche die proteolytische Aktivität der Gamma-Sekretase mittels Inhibitoren untersuchten.

Die u.a. durch die Gamma-Sekretase-Aktivität hervorgerufene verminderte Expression von Cadherin-Adhäsionsmolekülen spielt eine ernstzunehmende Rolle bei der Tumorprogression, da dies den malignen Zellen erlaubt, ihren Ursprungsort zu verlassen, in Blut- und Lymphgefäße einzudringen und schließlich zu metastasieren (Muñoz-Guerra et al., 2005). Aufgrund der bereits publizierten Ergebnisse und da sich die unterschiedlichen Depositionsmuster in unseren Färbungen gut im OSCC und in gesunder Schleimhaut aufzeigen lassen, kann man davon ausgehen, dass eine aberrante P-Cadherin-Expression verschiedene Aufgaben beim Prozess der malignen Entartung übernimmt. Somit kann man Veränderungen in der P-Cadherin-Expression als einen potenziell prognostischen Marker ansehen, der u.a. Auslöser für Keratinozytenatypien oder prä-maligne Veränderungen in der Karzinogenese des oralen Plattenepithelkarzinoms sein kann.

4.1.4 Unterschiedliche Lokalisation der Presenilin-1-Expression in OSCC- und HOK-Zellen

Die Cadherine werden durch die Gamma-Sekretase-Aktivität von Presenilin-1 proteolytisch gespalten; somit steht die Präsenz oder das Fehlen von PS-1 im Verhältnis zum Verlust der Zelladhäsion. In Abhängigkeit von seiner Lokalisation hat PS-1 eine große Anzahl unterschiedlicher Funktionen (Hass et al., 2009). Betrachtet man sich die Verteilung von PS-1 auf Zellebene, so ist das Protein hauptsächlich im endoplasmatischen Retikulum, im Golgi-Apparat sowie in intrazellulären Vesikeln lokalisiert (Cook et al., 1996; Kovacs et al., 1996; Efthimiopoulos et al., 1998). Im endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat ist PS-1 an der geregelten

intramembranösen Proteolyse von Proteinen (RIP) beteiligt und spaltet dadurch u. a. auch Transmembranproteine, wie das P-Cadherin, an den Schnittstellen ihrer transmembranen und zytosolischen Domänen (Hass et al., 2009). Bei der Bildung von Zell-Zell-Kontakten akkumuliert PS-1 an den interzellulären Zelloberflächen, dies führt zu einer Komplexierung von CAJs (cadherin-based adherens junctions) und somit zu stabilen Zell-Zell-Verbindungen (Georgakopoulos et al., 1999; Marambaud et al., 2002 und 2003; Parisiadou et al., 2004).

Um die genaue Lokalisation von PS-1 in OSCC- und HOK-Zellen zu untersuchen, führten wir Western-Blot-Analysen mit einem Antikörper gegen PS-1 durch. Wir detektierten eine Überexpression von PS-1 in allen OSCC-Ganzzelllysaten (Abbildung 22 – Spuren 1–6). In HOK-Ganzzelllysaten zeigte sich ein entgegengesetztes Ergebnis, da hier ein signifikant niedrigeres PS-1-Bandensignal detektiert wurde (Abbildung 22 – Spur 7). Anhand dieser neuen Beobachtung, dass PS-1 in Ganzzelllysaten des OSCC überexprimiert ist, setzten wir uns zum Ziel, die Lokalisation von PS-1 in OSCC- und HOK-Zellen an deren Membranfraktionen zu ermitteln. Dazu untersuchten wir die biotinylierten Membranfraktionen der drei OSCC-Zelllinien PCI 1, 52 und 68 auf PS-1-Expression. Als Kontrollgewebe fungierten die gesunden HOKs. Hierbei war PS-1 in der Membran des tumorösen Gewebes in Relation zu den HOK-Zellen signifikant niedriger exprimiert (Abbildung 29), was im Kontrast zu den Ergebnissen der Ganzzelllysate-Analysen steht. In Bezug auf das vorher Erwähnte hat unsere Studie Neuheitswert, da es bislang nicht gelang, die Anwesenheit von PS-1 in den integralen Anteilen der Plasmamembran mittels Biotinylierung oder Anti-PS-1-Antikörper nachzuweisen (Georgakopoulos et al., 1999). Besonders bemerkens- und erwähnenswert ist hierbei die Tatsache, dass in den Ganzzelllysaten der OSCC-Zelllinien mehr PS-1 als in den HOKs, jedoch im Gegensatz dazu an der Membranfraktion der HOKs mehr PS-1 als in den Membranen der OSCC-Zellen exprimiert zu werden scheint. Man kann also zu dem Schluss kommen, dass PS-1 in OSCC-Zellen eine unterschiedliche Lokalisation aufweist und die Überexpression von PS-1 in den Ganzzelllysaten des oralen Plattenepithelkarzinoms vermutlich zu einer fehlerhaften Prozessierung von P-Cadherin und folglich zu einer Dissoziation von Cadherin-Cadherin-Verbindungen führen kann. Bestätigt wird diese Aussage dadurch, dass wir in den Gesamtproteinlysaten der gesunden HOK-Zellen signifikant weniger PS-1 detektierten, dafür aber eine umso höhere Expression an der HOK-Membranfraktion.

Denn wie eingangs erwähnt, ist in der Literatur allgemein bekannt, dass das membrangebundene PS-1 an der Aufrechterhaltung der interzellulären Kontakte und somit maßgeblich an der Bewahrung einer gesunden epithelialen Struktur beteiligt ist.

Bisher gibt es zwei weitere Studien, die unsere Ergebnisse bestätigen. Song et al. wiesen erstmals im Jahr 2012 eine erhöhte PS-1-Expression in Zelllinien und Primärtumorgewebe aus oralen Plattenepithelkarzinomen nach. Diese Überexpression war zudem mit einer Erhöhung des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) verbunden. EGFR gehört wie P-Cadherin zur Gruppe der Transmembranglykoproteine. Die erhöhte PS-1-Expression im OSCC aktiviert EGFR und induziert dessen Autophosphorylierung sowie die Rekrutierung von Signalmolekülen, woraus eine nachgeschaltete Aktivierung des G-Proteins Ras resultiert (Hackel et al., 1999). Ras stimuliert das Zellwachstum und verhindert die Apoptose, was wiederum zur Tumorgenese beiträgt. Im Falle der Kopf- und Halskarzinomzellen von Song et al. (2012) führte die Herunterregulierung von PS-1 zu einer signifikanten Verringerung des EGFR-mRNA-Spiegels. Auch wurde über die Modulation von EGFR durch Presenilin-1 – sei es durch Störung des Degradationsprozesses oder durch Hemmung des transkriptionellen EGFR-Regulators – in embryonalen Fibroblasten der Maus berichtet (Rocher-Ros et al., 2010; Zhang et al., 2007; Repetto et al., 2007). In Übereinstimmung mit unserem Nachweis der Presenilin-1-Überexpression in OSCC-Zellen steht noch die Studie von Bauer et al. (2013). Dort wurde in Lysaten von OSCC-Zelllinien und OSCC-POKs eine erhöhte Presenilin-1-Expression detektiert. Gesunde POKs zeigten auch hier ein gegenteiliges Expressionsmuster.

Hieraus ergibt sich, dass die Funktion des hochregulierten PS-1 in der Zelle mit gleichzeitiger Abnahme der Zelladhäsion im oralen Plattenepithelkarzinom noch genauer untersucht werden muss. Durch fortführende Analysen muss geklärt werden, in welchem Zusammenhang die Rolle der PS-1-Lokalisation mit der Funktionalität und Stabilität der Zelladhäsion steht. Die bisher vorliegenden Daten jedoch attestieren dem membrangebundenen PS-1 eine Rolle als Bindungsprotein und als Regulator der *In-vitro*-Cadherin-Funktion.

4.1.5 Unveränderte Proliferationsaktivität der OSCC-Zellen nach Behandlung mit GSI-I

Die Fehlregulation des Zellzyklus ist eines der Merkmale bei der Entstehung von oralen Plattenepithelkarzinomen. Daher ist es eine vielversprechende Strategie in der Krebstherapie, in diese Maladaptation einzugreifen. Wir richteten somit unser Augenmerk auf die Zellkinetik seitens des Proliferationsverhaltens im oralen PEC und analysierten dieses mittels Durchflusszytometrie.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die gesunden HOK-Zellen nach Behandlung mit Gamma-Sekretase-Inhibitor-I eine verzögerte Proliferationsaktivität aufweisen (Abbildung 30). Diese retardierte Proliferation führt ihrerseits zu einer verminderten Proteinneusynthese, welche eine verringerte Expression von wichtigen Zellzyklusproteinen zur Folge hat. Dadurch wird ein langsamer, aber beständiger Zellzyklusarrest in der gesunden oralen Schleimhaut ausgelöst. In der Literatur ist dies hinreichend bekannt und diskutiert, wobei an dieser Stelle nur drei Studien exemplarisch genannt werden sollen. Paris et al. (2005) untersuchten z. B. die verlangsamte Zellproliferation nach Versatz mit GSI und die unterdrückte Neubildung von Kapillarstrukturen im Aorten-Ring-Modell der Angiogenese. Vujovic et al. (2007) bestätigten ebenfalls die durch GSI induzierte herabgesetzte Proliferationsaktivität bei humanen mesenchymalen Stammzellen und eine veränderte Differenzierung *in vitro*. Und auch in neuronalen Stammzellen von Ratten konnte die durch GSI inhibierte Zellvermehrung bestätigt werden (Cai et al., 2008).

Bei den OSCC-Zellen ließen sich regulatorische Effekte durch die Hemmung der Gamma-Sekretase hingegen nicht beobachten (Abbildung 31, Tabelle 10). Auch hier erfüllt die vorliegende Abhandlung die Kriterien des Neuigkeitswertes. Andere Studien mit Proliferationsanalysen an Tumorzellen belegen, dass durch Behandlung mit GSI durchaus eine Inhibition der Zellproliferation erreicht werden konnte. So bestätigten Inoue et al. (2011) das Eingreifen in den Zellzyklus mit Reduktion des Invasionspotenzials an Zelllinien des Mundhöhlenkarzinoms. In menschlichen Hepatomzelllinien wurde durch Behandlung mit GSI die Tumorzellproliferation durch Unterdrückung des Notch-Signalweges gehemmt (Suwanjonee et al., 2008). Und Du et al. (2013) konnten die Proliferation in Zellen des Pankreaskarzinoms unter GSI-Zugabe – durch Apoptoseförderung – erfolgreich unterdrücken. Darüber hinaus konnten durch GSI das Zellwachstum und die Gefäßneubildung in humanen

Glioblastomzellen und bei menschlichen Lungen-Adenokarzinomen in xenotransplantierten Nacktmäusen gehemmt werden (Paris et al., 2005). Kritisch zu betrachten ist dabei, dass in den vorgenannten Studien jedoch andere und unterschiedliche Methoden (u. a. RT-PCR, Annexin staining oder CCK8-Assay) zur Messung der Zellproliferation angewandt wurden, was die abweichenden Ergebnisse zu unserer Studie erklären könnte. Es sollte auch nicht unerwähnt bleiben, dass laut Bedal et al. (2014) unsere verwendeten OSCC-Zelllinien eine erhöhte Integrin-Linked-Kinase-Aktivität (ILK) besitzen. Diese gesteigerte ILK-Aktivität führt vermutlich zu einer aberranten Expression von membrangebundenem PS-1 in den OSCC-Zellen (siehe Unterabschnitt 4.1.4). Dies wiederum könnte dazu führen, dass der inhibitorische Effekt von GSI-I ausbleibt und es somit auch zu keiner Veränderung im Proliferationsverhalten bei Zellen des oralen PEC kommt. Zudem konnte die ILK-Überexpression im oralen Plattenepithelkarzinom im Zusammenhang mit einer veränderten N-Cadherin- und einer herunterregulierten E-Cadherin-Expression, bei gleichzeitigem gesteigertem Tumorinvasionspotenzial, nachgewiesen werden (Zhao et al., 2012). Wie in Unterabschnitt 4.1.4 schon diskutiert wurde, ist auch nicht zu vergessen, dass wir eine signifikant erhöhte intrazelluläre PS-1-Expression, jedoch eine extrem reduzierte PS-1-Expression an der Membran der Plattenepithelkarzinomzelllinien nachweisen konnten. Dies lässt vermuten, dass der Gamma-Sekretase-Inhibitor-I nicht so gut für das Innere einer Zelle zugänglich ist und somit seine Funktion, ergo die Hemmung der Gamma-Sekretase-Aktivität, im Zellinneren höchstwahrscheinlich nicht vollständig entfalten kann. Unterstützt wird diese These dadurch, dass wir, wie oben erwähnt, bei den HOK-Zellen durch den Einsatz von GSI-I eine erfolgreiche Inhibition der Gamma-Sekretase-Aktivität und dadurch eine verzögerte Proliferation erreichen konnten, da hier eindeutig mehr Presenilin-1 an der Zellmembran der HOKs detektiert werden konnte (siehe Unterabschnitt 4.2.4). Man muss sich somit die Frage stellen, welche anderen Arzneistoffe anstelle des Gamma-Sekretase-Inhibitors-I in der Lage sind, das Auftreten einer zu hohen intrazellulären Presenilin-1-Expression zu hemmen. An dieser Stelle lässt sich zudem vermuten, dass die außergewöhnlich hohe im Inneren der OSCC-Zelle vorzufindende Presenilin-1-Konzentration gegebenenfalls die Interaktion des P-Cadherins und dessen Transport zur Zellmembran negativ beeinflusst und somit eine unerwünschte P-Cadherin-Akkumulation im Zellinneren mit anschließendem Zelladhäsionsverlust im Extrazellularraum hervorgerufen wird. Auch zusätzliche andere Proteine, die für die

Verschmelzung der Transportvesikel von P-Cadherin mit der Zelloberfläche verantwortlich sind, könnten durch den auffallend hohen Anteil an Presenilin-1 im Zellinneren in ihrer Funktion gestört werden, sodass die ordnungsgemäße Vesikelfusion mit der Membran unter Umständen gar nicht mehr ausgeübt werden kann. Betrachtet man die vorgenannten Punkte, so lässt sich daraus womöglich auch auf eine veränderte Signaltransduktion zwischen den Zellen schließen. Diese Übermittlungsprozesse, mittels derer die Zellen z. B. auf äußere Reize reagieren, diese umwandeln, als Signal in das Zellinnere weiterleiten und über eine Signalkette zum zellulären Effekt führen, laufen vermutlich in den erkrankten Tumorzellen anders ab als in den HOK-Zellen.

Die Frage, warum eine Arretierung des Zellzyklus im erkrankten Gewebe des OSCC durch den Gamma-Sekretase-Inhibitor-I nicht möglich ist, lässt sich abschließend noch nicht vollständig und eindeutig beantworten. Dazu bedarf es noch weiterer Untersuchungen, welche ihr Augenmerk zum einen auf die Lokalisation des intrazellulär überexprimierten Presenilin-1 – mit der Folge einer wahrscheinlichen aberranten Prozessierung von P-Cadherin – und zum anderen auf die gesteigerte ILK-Aktivität im oralen Plattenepithelkarzinom legen müssen.

4.2 Diskussion der Materialien und Methoden

4.2.1 Verwendete Primär- und Tumorzelllinien

Die von uns verwendeten primären OSCC-Organokulturen (OSCC-POKs) stammen aus Resektionen, die an der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Regensburg, durchgeführt wurden. Indikationen waren jeweils maligne Erkrankungen der Mundhöhle und des Oropharynx. Zur Isolierung gesunder primärer oraler Keratinozyten wurde gesundes orales mukosales Gewebe (gesunde POKs) aus den Randzonen von OSCC-Patienten entnommen und verarbeitet. Wir entschieden uns für diesen zusätzlichen Forschungsschritt, da Primärzellen gegenüber permanenten Zelllinien den Vorteil haben, dass sie wesentlich besser das *In-vivo*-Verhalten der Zellen widerspiegeln. Viele physiologische Vorgänge lassen sich nur in Primärzellen beobachten, da bei ihnen die morphologischen und molekularen Eigenschaften noch erhalten sind (Lin et al., 2007). Als Nachteile sind die beträchtliche Heterogenität der Zellpopulation, die schwierige Gewinnung, die komplexen

Ansprüche der Zellen, z. B. an das Nährmedium, und ihre schwerere Manipulierbarkeit anzusehen (Cree et al., 2010; Lin et al., 2007). Die von uns verwendeten Tumorzelllinien PCI 1, 4A, 9, 13, 52 und 68 sind Plattenepithelkarzinomzelllinien der Mundhöhle und des Oropharynx und wurden vom Labor von Professor Whiteside (University of Pittsburgh Cancer Institute, Pittsburgh, Pennsylvania, USA) zur Verfügung gestellt und von Heo et al. (1989) beschrieben. Die humanen oralen Keratinozyten (HOKs) wurden käuflich erworben. Laut Hersteller wurden die HOK-Zellen aus humaner fötaler oraler Mukosa isoliert. Die Verwendung von Zelllinien ist in der Krebsforschung weitverbreitet und bietet einige Vorteile, welche in unsere Entscheidungsfindung, diese zu nutzen, mit einfließen. Die Überlegenheit der o. g. Zellkulturen ergibt sich daraus, dass sie nach etablierten Verfahren gewonnen werden, aus der Probenhomogenität und selbstverständlich auch aus den niedrigen Kosten (Lin et al., 2007). Als nachteilig anzusehen ist die Sorge, dass sich *in vitro* wachsende Tumorzellen an ihre Kulturmilieu anpassen und somit genetische und phänotypische Unterschiede zu ihrem Ursprungstumor auftreten können, was wiederum die Bedeutung für die Patientenergebnisse infrage stellt (Cree et al., 2010; Lin et al., 2007).

4.2.2 Western-Blot-Analysen

Zellen können mittels verschiedener Messverfahren wie z. B. der Western-Blot-Technik, der Immunfluoreszenzfärbung und der Durchflusszytometrie bestimmt und analysiert werden. Alle Verfahren bieten individuelle Vor- und Nachteile und erlauben es, die Zellen auf ihre verschiedenen Funktionen hin zu untersuchen.

Die Western-Blot-Analyse erlaubt die Messung der Expression und die Quantifizierung von Proteinen aus komplexen Proteingemischen oder Homogenaten und stellt ein anerkanntes Verfahren zur Untersuchung und Identifizierung von Proteinen dar (Kurien und Scofield, 2006; Westermeier, 1997). In mehreren Teilbereichen unserer Studie sollte untersucht werden, inwieweit sich die Zielproteine in den Zelllinien auch auf Translationsebene nachweisen lassen. Die angewandte Methode der Western-Blot-Analyse wurde von uns ausgewählt, da sie gegenüber alternativen Techniken einige Vorteile bietet. Die gesuchten Moleküle werden nicht in einem Gel verteilt, sondern auf die Oberfläche einer Membran geblottet und können so aufgrund der leichteren Zugänglichkeit für spezifische Antikörper wesentlich besser detektiert

werden. Somit sind Proteine, die schwer zu markieren sind oder leicht degradiert werden, im Immunoblot einfacher nachweisbar (Geckeler und Eckstein, 1998). Zeitgleich können mit diesem Verfahren zusätzliche Informationen, z. B. über die Abwesenheit und Größe des detektierten Proteins, eingeholt werden (Taylor et al., 2013). Nachteile des Western Blots sind, dass er zeitaufwendig ist und Erfahrung des Experimentators voraussetzt. Dies beinhaltet u. a. die Optimierung der Versuchsbedingungen bezogen auf jeden Schritt des Western-Blot-Verfahrens, von der Probenvorbereitung und dem Beladen des SDS-PAGE-Gels, über den Proteintransfer, die primäre und sekundäre Antikörperselektion und die Inkubation bis hin zu den Waschschritten sowie die densitometrische Analyse (Taylor et al., 2013). Um versuchsbedingten Fehlerquellen wie z. B. einem unspezifischen Hintergrund oder zusätzlichen Banden vorzubeugen, wurde die Membran nach dem Transfer für eine Stunde in eine 5%ige BSA-Lösung in TBST-Waschpuffer eingelegt und bei Raumtemperatur geschwenkt (Jansohn und Rothhämel, 2012). Der verwendete RIPA-Puffer zur Proteinextraktion enthält die ionischen Detergenzien SDS und Natriumdeoxycholat als aktive Bestandteile und ermöglichte eine effiziente Zellyse und Solubilisierung unter Vermeidung von Proteinabbau und Interferenzen mit der Immunreaktivität und der biologischen Aktivität (Ngoka, 2008).

Die Auftrennung der Probenlysate erfolgte unter Zugabe von Laemmli-Puffer, welcher für die Protein-Denaturierung in der SDS-PAGE als etabliert gilt (Laemmli, 1970). Bei der Anfertigung der Trenngele wurden die Molekulargewichte von Presenilin-1 (18 kDa) und P-Cadherin (120 kDa) berücksichtigt und die jeweils unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen gewählt. Mit einem 15%igen Trenngel wurde der Trennbereich von 10–60 kDa (Presenilin-1) und mit einem 10%igen Gel der Trennbereich von 30–120 kDa (P-Cadherin) abgedeckt (Jansohn und Rothhämel, 2012).

4.2.3 Immunfluoreszenzfärbungen

Die Immunfluoreszenz ist ein schnelles, einfaches Verfahren zum Antikörpernachweis und zeichnet sich durch hohe Sensitivität aus. Sie basiert auf der Anregung von Fluorochromen durch Licht bestimmter Wellenlänge (Geckeler und Eckstein, 1998). Es können die direkte und die indirekte Immunfluoreszenz unterschieden werden. Die direkte Immunfluoreszenz stellt eine Einschritt-Färbung dar, da mit Direktfluorochrom-

markierten Antikörpern gearbeitet wird. Dadurch ist zwar eine schnelle Auswertung möglich, jedoch stellt sich manchmal eine zu schwache Fluoreszenzintensität für eine weitergehende Beurteilung dar. Wir entschieden uns daher für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung, bei der Primärantikörper aus verschiedenen Spezies spezifisch ihr jeweiliges Antigen und die mit Fluorochromen beladenen Sekundärantikörper wiederum spezifisch ihre Primärantikörper detektieren. Durch die Bildung eines Netzwerks aus Primär- und Sekundärantikörpern auf der Zelloberfläche verbessert sich die Membran-Antigen-Expression, was zu einem erhöhten Fluoreszenzsignal führt (Lamvik et al., 2001). Der Gefahr einer unspezifischen Primärantikörperbindung wirkten wir mit einer 1-stündigen Inkubation bei 37 °C mit 5 % *normal goat serum* in PBST entgegen. Als zusätzliche aussagekräftige Negativkontrolle wurde bei jeder Färbung je eine separate Probe ohne Primärantikörper behandelt, angefärbt und mit ausgewertet. Die Objektträger wurden lichtdicht gelagert, um einem schnellen Ausbleichen aufgrund der Instabilität der Fluoreszenzfarbstoffe vorzubeugen. Zu bedenken ist, dass manche Zellen auch eine gewisse Eigenfluoreszenz zeigen, die durch das Färben und Permeabilisieren noch verstärkt werden kann; dies kann folglich auch zu falsch positiven Ergebnissen führen. Ein weiterer Nachteil der indirekten Immunfluoreszenz ist die relativ ungenaue Korrelation zwischen der Intensität der Reaktion und der tatsächlich vorhandenen Menge an Antigen. Diese Methode lässt somit nur eine semiquantitative Beurteilung über die Anzahl an Antigenen pro Zelle zu.

4.2.4 Durchflusszytometrie

Um die Auswirkungen der von uns durchgeführten *In-vitro*-Behandlungen auf den Zellzyklus zu untersuchen, führten wir die Bestimmung des DNA-Gehaltes in den Zellen mittels Durchflusszytometrie durch. Die Durchflusszytometrie ist ein effizientes, effektives Verfahren zur quantitativen und qualitativen Bestimmung fluoreszenzmarkierter Partikel bzw. Zellen (Herzenberg et al., 1976; Shapiro, 2003). Zu ihren Vorteilen zählen die Automatisierung, die Schnelligkeit und die hohe Anzahl an gemessenen Zellen (> 10000); weiterhin ihre Präzision bei der Analyse und beim Sortieren der Zellen sowie die Möglichkeit der Multi-Parameteranalyse. Als nachteilig sind die zeitlich begrenzte Untersuchbarkeit der Proben und die

Nichtreproduzierbarkeit der Messungen anzusehen. Zudem hat man keine visuelle Kontrolle über die gemessenen Zellen und es sind keine Aussagen bezüglich morphologischer Parameter möglich. Im Umgang mit dem Durchflusszytometer ist ein absolut normiertes Vorgehen nach festgelegtem Protokoll notwendig. Unter anderem wurde von uns in weit über 50 Vorversuchen die Justierung des Gerätes mithilfe von Positiv- und Negativproben festgelegt. Alle weiteren Messungen wurden mit diesen Parametern durchgeführt, um einer fehlenden Vergleichbarkeit aller weiteren Analyseergebnisse vorzubeugen. Um die Oberflächenproteine der mit GSI-I behandelten Zellen möglichst unversehrt und intakt zu erhalten, führten wir die Zellablösung mit Accutase durch. Gegenüber dem gebräuchlichen Trypsin zeigt Accutase ein weitaus schonenderes Ablöseprofil. Im Gegensatz zur Trypsin-Behandlung beeinflusst Accutase nicht signifikant die Proliferationsrate und ist weniger schädlich für die Zellen (Bajpai et al., 2008). Weiterhin kann es zu beträchtlichen Einschränkungen bei den Messungen durch Zellagglomerate oder Dubletten kommen. Diese Dublettenbildung führt dazu, dass signifikant weniger Zellen für die DNA-Messung zur Verfügung stehen und keine aussagekräftigen Ergebnisse zustande kommen. Entgegenwirken konnten wir diesen Verklumpungen, indem wir die Zellproben bis zur Messung von Zeit zu Zeit sanft vortexten. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde von uns Propidiumiodid (PI), ein stöchiometrisch bindender Farbstoff, ausgewählt. An DNA gebunden weist er gleichzeitig eine höhere Quantenausbeute auf, die eine Quantifizierung der DNA mit gutem Signal-Rausch-Verhältnis ermöglicht (Sack et al., 2007).

5 Zusammenfassung

Die Therapieergebnisse fortgeschrittener Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle haben sich in den letzten Jahren – trotz moderner chirurgischer und rekonstruktiver Therapiemethoden sowie interdisziplinärer Behandlungskonzepte – nur partiell verbessert. Folglich bedürfen die Mechanismen von Wachstum und Differenzierung des OSCC (Oral Squamous Cell Carcinoma) als potenziell neoplastischen Herkunftsepithels dringlicher Erklärung. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Presenilin-1 (PS-1) eine entscheidende Rolle bei der Prozessierung und Lokalisation von P-Cadherin spielt und somit generell mit der malignen Transformation und Tumorprogression im oralen Plattenepithelkarzinom verbunden ist. Sowohl in Western-Blot-Analysen als auch durch Messungen der Proliferationsaktivität und in immunhistochemischen Untersuchungen ließen sich grundsätzliche Unterschiede, verglichen mit den HOK- und gesunden POK-Zellen, in der Verteilung und der Expression von P-Cadherin in Zellen des oralen Plattenepithelkarzinoms beobachten. In Immunoblots wurde der Nachweis unterschiedlicher P-Cadherin-Proteinvarianten erbracht. Dabei konnte als Hauptvariante in gesunden primären oralen Keratinozyten (gesunde POKs) und in humanen oralen Keratinozyten (HOKs) Volllänge-P-Cadherin mit einem Molekulargewicht von 120 kDa (Pcad120) detektiert werden. In den OSCC-Zelllinien PCI 13 und 68 ermittelten wir nach Inhibition der Gamma-Sekretase eine weitere deglykosylierte Proteinvariante von 100 kDa (Pcad100). Mit zunehmender Entdifferenzierung des OSCC-Zellgewebes wird verstärkt Pcad50 exprimiert. Bei den Expressionsuntersuchungen zum PS-1-Verteilungsmuster konnten wir bedeutende Unterschiede bezüglich dessen Lokalisation feststellen. In OSCC-Ganzzelllysaten konnte eine PS-1-Überexpression ermittelt werden. Im Gegensatz dazu wurde festgestellt, dass sich PS-1 vermindert an der Membran der erkrankten Zellen, jedoch verstärkt an der Membranfraktion von gesunden HOK-Zellen befindet. Auf immunhistochemischer Basis konnte von uns eine Zunahme der P-Cadherin-Expression bei OSCC-Zellen nach Behandlung mit Gamma-Sekretase-Inhibitor-I aufgezeigt werden. Unsere durchgeführten Messungen zum Zellproliferationsverhalten nach Behandlung mit Gamma-Sekretase-Inhibitor-I gingen bei den HOKs mit einem Verlust der Proliferationsaktivität einher, während sich in den OSCC-Zellen keine Arretierung des Zellzyklus detektieren ließ. Trotz unserer umfangreichen Untersuchungen zu P-Cadherin im oralen Plattenepithelkarzinom ist

die differenzielle Expression seiner Varianten (Pcad50, Pcad100 und Pcad120) sowie die Rolle von PS-1 bei der Prozessierung von P-Cadherin noch immer nicht vollständig verstanden und die exakte Aufgabe im Prozess der Tumorentwicklung noch nicht abschließend geklärt. Eine Aussage über den Zusammenhang zwischen der P-Cadherin-Expression sowie -Prozessierung und dem tumorbiologischen Verhalten im OSCC war bislang nur eingeschränkt möglich, da bei den meisten bereits publizierten Untersuchungen keine differenzielle Betrachtung von P-Cadherin mit Bezug auf die Gamma-Sekretase-Aktivität erfolgte. Hier besitzen unsere Ergebnisse Neuigkeitswert. Mit der vorliegenden Arbeit konnte daher ein Anfang und Überblick über die Rolle von P-Cadherin in der Genese des oralen Plattenepithelkarzinoms gewonnen werden. Jedoch muss die P-Cadherin-Grundlagenforschung noch vertieft werden. Ein fundiertes Wissen über die physiologischen Funktionen von P-Cadherin in der gesunden und erkrankten Zelle könnte der Schlüssel zum Verständnis seiner Aufgabe in der Karzinogenese des oralen Plattenepithelkarzinoms sein.

6 Literaturverzeichnis

Altieri, A., Bosetti, C., Talamini, R., Gallus, S., Franceschi, S., Levi, F., Dal Maso, L., Negri, E., La Vecchia, C., 2002, Cessation of smoking and drinking and the risk of laryngeal cancer. *British Journal of Cancer* 87, 1227 – 1229.

Anastasiadis, P., Reynolds, A., 2000, The p120 catenin family: complex roles in adhesion, signaling and cancer. *Journal of Cell Science* 113, 1319 – 1334.

Anderrson, E., Lendahl, U., 2014, Therapeutic modulation of Notch signaling — are we there yet? *Nature Reviews Drug Discovery* 13, 357 – 378.

Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M., Lake, R., 1999, Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284, 770 - 776.

AWMF- Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften, 2012, Leitlinienprogramm der Onkologie, Mundhöhlenkarzinom "Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms" Version 2.0. http://leitlinienprogramm-onkologie.de/uploads/tx_sbdownloader/S3-Mundhoehlenkarzinom-OL-Langversion_.pdf (05.11.15)

Bagutti, C., Speight, P., Watt, F., 1998, Comparison of integrin, cadherin, and catenin expression in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *J Pathol* 186, 8 - 16.

Bajpai, R., Lesperance, J., Kim, M., Terskikh, A., 2008, Efficient propagation of single cells accutase-dissociated human embryonic stem cells. *Molecular Reproduction and Development* 75, Issue 5, 818 – 827.

Balaram, P., Sridhar, H., Rajkumar, T., Vaccarella, S., Herrero, R., Nandakumar, A., Ravichandran, K., Ramdas, K., Sankaranarayanan, R., Gajalakshmi, V., Muñoz, N., Franceschi, S., 2002, Oral Cancer in Southern India: The Influence of Smoking, Drinking, Paan-Chewing and oral Hygiene. *International Journal of Cancer* 98, 440 – 445.

Barnes, L., Eveson, J., Reichart, P., Sidransky, D., 2005, WHO – Classification of Tumors, Pathology & Genetics, Head and Neck Tumors, IARC Press: Lyon.

Barthet, G., Shioi, J., Shao, Z., Ren, Y., Georgakopoulos, A., Robakis, N., 2011, Inhibitors of γ -secretase stabilize the complex and differentially affect processing of amyloid precursor protein and other substrates. *FASEB J.* 25, 2937 – 2946.

- Bauer, K., Dowejko, A., Bosserhoff, A., Reichert, T., Bauer, J., 2009, P-cadherin induces an epithel-like phenotype in oral squamous cell carcinoma by GSK-3beta-mediated Snail phosphorylation. Carcinogenesis Vol. 3, No. 10, 1781 – 1788.**
- Bauer, R., Dowejko, A., Driemel, O., Bosserhoff, A., Reichert, T., 2008. Truncated P-cadherin is produced in oral squamous cell carcinoma. FEBS Journal 275, 4198 - 4210.**
- Bauer, R., Hein, R., Bosserhoff, A., 2005, A secreted form of P-cadherin is expressed in malignant melanoma. Experimental Cell Research, Volume 305, Issue 2, 418 – 426.**
- Bedal, K., Grassel, S., Oefner, P., Reinders, J., Reichert, T., Bauer, R., 2014, Collagen XVI Induces Expression of MMP9 via Modulation of AP-1 Transcription Factors and Facilitates Invasion of Oral Squamous Cell Carcinoma. PLoS ONE 9(1): e86777.**
- Berx, G., van Roy, F., 2009, Involvement of Members of the Cadherin Superfamily in Cancer. Cold Spring Harb Perspect Biol 2009;1: a003129.**
- Birchmeier, W., Hülsken, J., Behrens, J., 1995, E-cadherin as an invasion suppressor. Ciba Found Symp. 189, 124 – 136.**
- Blot, W., McLaughlin, J., Winn, S., Austin, D., Greenberg, R., Preston-Martin, S., Bernstein, L., Schoenberg, J., Stemhagen, A., Fraumeni, J., 1988, Smoking and Drinking in Relation to Oral and Pharyngeal Cancer. Cancer Research 48, 3282 - 3287.**
- Cai, L., Lin, L., Hu, J., Zheng, Z., 2008, Effects of gamma-secretase inhibitor N-(3, 5-difluorophenacetyl-L-alanyl)-S-phenylglycine t-butyl ester on proliferation and differentiation of neural stem cells. Zhonghua Yi Xue Za Zhi. 88, 480 - 483.**
- Califano, J., van der Riet, P., Westra, W., Nawroz, H., Clayman, G., Piantadosi, S., Corio, R., Lee, D., Greenberg, B., Koch, W., Sidransky, D., 1996, Genetic Progression Model for Head and Neck Cancer: Implications for Field Cancerization. CANCER RESEARCH 56, 2488 - 2492.**
- Cavallaro, U., Christofori, G., 2004, Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. Nat Rev Cancer 4, 118 - 132.**
- Chao, D., Korsmeyer, S., 1998, BCL-2 family: regulators of cell death. Annu Rev Immunol. 16, 395 - 419.**

Cohen, S., Ellwein, L., 1991, Genetic Errors, Cell Proliferation, and Carcinogenesis. *CANCER RESEARCH* 51, 6493 – 6505.

Cook, D., Sung, J., Golde, T., Felsenstein, K., Wojczyk, B., Tanzi, R., Trojanowski, J., Lee, V., Doms, R., 1996, Expression and analysis of presenilin 1 in a human neuronal system: localization in cell bodies and dendrites. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 9223 – 9228.

Cooper, S., 1991, *Bacterial Growth and Division*, San Diego: Academic Press, Inc..

Cowan, C., Gregg, T., Napier, S., McKenna, S., Kee, F., 2001, Potentially malignant oral lesions in Northern Ireland: a 20-year population-based perspective of malignant transformation. *Oral Diseases* 7, 18 – 24.

Cowin, P., 1994, Unraveling the cytoplasmic interactions of the cadherin superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* '91, 10759 – 10761.

Cree, I., Glaysher, S., Harvey, A., 2010, Efficacy of anti-cancer agents in cell lines versus human primary tumour tissue. *Current opinion in pharmacology* 10, 1 - 5.

Crystal, A., Morais, V., Pierson, T., Pijak, D., Carlin, D., Lee, V., Doms, R., 2003. Membrane topology of γ -secretase component PEN-2. *J Biol Chem* 278, 20117 – 20123.

Davis, L., Barbera, M., McDonnell, A., McIntyre, K., Sternglanz, R., Jin, Q., Loidl, J., Engebrecht, J., 2001. The *Saccharomyces cerevisiae* MUM2 gene interacts with the DNA replication machinery and is required for meiotic levels of double strand breaks. *Genetics* 157, 1179 – 1189.

De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J., Schroeter, E., Schrijvers, V., Wolfe, M., Ray, W., Goate, A., Kopan, R., 1999. A presenilin-1-dependent γ -secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 398, 518 – 522.

De Strooper, B., Iwatsubo, T., Wolfe, M., 2012, Presenilins and γ -Secretase: Structure, Function, and Role in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2, 1 – 43.

DGZMK - Deutsche Gesellschaft für Zahn- Mund- und Kieferheilkunde, 2002, Wissenschaftliche Stellungnahme zur Zahnärztliche Betreuung von Patienten mit tumortherapeutischer Kopf-Hals-Bestrahlung. DZZ 57, 509 – 511.

Downer, C., Speight, P., 1993, E-cadherin expression in normal, hyperplastic and malignant oral epithelium. Eur J Cancer B Oral Oncol. 4, 303 - 305.

D'Souza, G., Kreimer, A., Viscidi, R., Pawlita, M., Fakhry, C., Koch, W., Westra, W., Gillison, M., 2007, Case–Control Study of Human Papillomavirus and Oropharyngeal Cancer. New England Journal of Medicin 356, 1944 - 56.

Du, X., Li, Y., Zhou, Z., Yang, L., Zhang, M., 2013, Suppressive effects of gamma-secretase inhibitor DAPT on the proliferation of pancreatic cancer cells. Sichuan Da Xue Bao Yi Xue Ban. 44, 699 - 702.

Efthimiopoulos, S., Floor, E., Georgakopoulos, A., Shioi, J., Cui, W., Yasothornsrikul, S., Hook, V., Wisniewski, T., Buee, L., Robakis, N., 1998, Enrichment of presenilin 1 peptides in neuronal large dense-core and somatodendritic clathrin-coated vesicles. J Neurochem. 71, 2365 - 2372.

Ellisen, L., Bird, J., West, D., Soreng, A., Reynolds, T., Smith, S., Sklar, J., 1991, TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. Cell 66, 649 – 661.

Evan, G., Littlewood, T., 1993, The role of c-myc in cell growth. Current Opinion in Genetics & Development, Volume 3, 44 – 49.

Everse, J., Everse, K.E., Grisham B.M., 2000, Peroxidases in Chemistry and Biology, 2. Auflage, Boca Raton, CRC Press, Inc..

Figuro Ruiz, E., Ángeles Carretero Peláez, M., Cerero Lapedra, R., Esparza Gómez, G., Alberto Moreno López, L., 2004, Effects of the consumption of alcohol in the oral cavity: relationship with oral cancer. Med Oral 9, 14 - 23.

Fortna, R., Crystal, A., Morais, V., Pijak, D., Lee, V., Doms, R., 2004. Membrane topology and nicastrin-enhanced endoproteolysis of APH-1, a component of the γ -secretase complex. J Biol Chem 279, 3685 – 3693.

Francis, G., Kumar, U., Nalinakumari, K., Jayasree, K., Kannan, S., 2013, Accumulation of inactive p53 protein in oral squamous cell carcinoma: stabilization by protein interaction. *European Journal of Oral Sciences* Volume 121, Issue 1, 21 – 28.

Frank, C., Hostetter, M., 2006, Cleavage of E-cadherin: a mechanism for disruption of the intestinal epithelial barrier by *Candida albicans*. *Transl Res.* 49, 211 - 222.

Fujita, M., Fujii, K., Horiguchi, Y., Takeichi, M., Imamura, S., 1992, Expression of cadherin cell adhesion molecules during human skin development: morphogenesis of epidermis, hair follicles and eccrine sweat ducts. *Arch Dermatol Res.* 284, 159 - 66.

Galderisi, U., Jori F., Giordano, A., 2003, Cell cycle regulation and neural differentiation. *Oncogene* 22, 5208 - 5219.

Geckeler, K., Eckstein, H., 1998, *Bioanalytische und Biochemische Labormethoden.* 1. Auflage, Wiesbaden: Springer Fachmedien Wiesbaden Verlag.

Georgakopoulos, A., Marambaud, P., Efthimiopoulos, S., Shioi, J., Cui, W., Li, H., Schütte, M., Gordon, R., Holstein, G., Martinelli, G., Mehta, P., Friedrich, V., Robakis, N., 1999, Presenilin-1 Forms Complexes with the Cadherin/Catenin Cell–Cell Adhesion System and Is Recruited to Intercellular and Synaptic Contacts. *Molecular Cell*, Vol. 4, 893 – 902.

Gillison, M., Koch, W., Capone, R., Spafford, M., Westra, W., Wu, L., Zahurak, M., Daniel, R., Viglione, M., Symer, D., Shah, K., Sidransky, D., 2000, Evidence for a Causal Association Between Human Papillomavirus and a Subset of Head and Neck Cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 92, No. 9, 709 – 720.

Gray, G., Mann, R., Mitsiadis, E., Henrique, D., Carcangiu, M., Banks, A., Leiman, J., Ward, D., Ish-Horowitz, D., Artavanis-Tsakonas, S., 1999, Human ligands of the Notch receptor. *Am J Pathol.* 154, 785 - 794.

Greene, F., Page, D., Fleming, I., Fritz, A., Balch, C., Haller, D., Morrow, M., 2002, *AJCC Cancer Staging Manual*, 6. Auflage, New York: Springer Verlag.

Gutwald, R., Gellrich, N., Schmelzeisen, R., 2003, *Einführung in die zahnärztliche Chirurgie und Implantologie.* 2. Auflage, Köln: Deutscher Zahnärzte Verlag.

- Ha**, P., Benoit, N., Yochem, R., Sciubba, J., Zahurak, M., Sidransky, D., Pevsner, J., Westra, W., Califano, J., 2003, A transcriptional progression model for head and neck cancer. *Clin Cancer Res.* 9, 3058 - 3064.
- Haapasalo**, A., Kovacs, D., 2011, The Many Substrates of Presenilin/ γ -Secretase. *Journal of Alzheimer's Disease* 25, 3 - 28.
- Haass**, C., Selkoe, D., 1993, Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide. *Cell* 75, 1039 - 1042.
- Hass**, M., Sato, C., Kopan, R., Zhao, G., 2009, Presenilin: RIP and Beyond. *Semin Cell Dev Biol.* 20, 201 – 210.
- Hackel**, P., Zwick, E., Prenzel, N., Ullrich, A., 1999, Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Curr Opin Cell Biol.* Volume 11, Issue 2, 184 - 189.
- Halbleib**, J., Nelson, W., 2006, Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes & Development* 20, 3199 – 3214.
- Han**, J., Ma, I., Hendzel, M., Allalunis-Turner, J., 2009, The cytotoxicity of γ -secretase inhibitor I to breast cancer cells is mediated by proteasome inhibition, not by γ -secretase inhibition. *Breast Cancer Res* 11, R57.
- Hanahan**, D., Weinberg, R., 2000, The Hallmarks of Cancer. *Cell*, Vol. 100, 57 – 70.
- Hardisson**, D., 2003, Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 260, 502 – 508.
- Harlow**, E., Lane, D., 1999, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*. 1. Auflage, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Heo**, D., Snyderman, C., Gollin, S., Pan, S., Walker, E., Deka, R., Barnes, E., Johnson, J., Herberman, R., Whiteside, T., 1989, Biology, Cytogenetics, and Sensitivity to Immunological Effector Cells of New Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Lines. *Cancer Research* 49, 5167 - 5175.
- Hermiston**, M., Gordon, J., 1995, In vivo analysis of cadherin function in the mouse intestinal epithelium: essential roles in adhesion, maintenance of differentiation, and regulation of programmed cell death. *The Journal of Cell Biology* 129, 489 – 506.

Herrero, R., Castellsagué, X., Pawlita, M., Lissowska, J., Kee, F., Balaram, P., Rajkumar, T., Sridhar, H., Rose, B., Pintos, J., Fernández, L., Idris, A., Sánchez, M., Nieto, A., Talamini, R., Tavani, A., Bosch, X., Reidel, U., Snijders, P., Meijer, c., Viscidi, R., Muñoz, N., Franceschi, S., 2003, Human Papillomavirus and Oral Cancer: The International Agency for Research on Cancer Multicenter Study. *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 95, 1773 – 1783.

Herzenberg, L., Sweet, R., Herzenberg, L., 1976, Fluorescence activated cell sorting. *Scientific American* 234, 108 - 117.

Hirai, Y., Nose, A., Kobayashi, S., Takeichi, M., 1989a, Expression and role of E- and P-cadherin adhesion molecules in embryonic histogenesis. I. Lung epithelial morphogenesis. *Development* 105, 263 – 270.

Hirai, Y., Nose, A., Kobayashi, S., Takeichi, M., 1989b, Expression and role of E- and P-cadherin adhesion molecules in embryonic histogenesis. II. Skin morphogenesis. *Development* 105, 271 – 277.

Howard, A., Pelc, S.R., 1953, Synthesis of Desoxyribonuclein Acid in Normal and Irradiated Cells and its Relation to Chromosome Breakage. *Heredity* 6, 261- 273.

IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2004, Volume 85, Betel-quid and Areca-nut Chewing and Some Areca-nut-derived Nitrosamines. Lyon.

Imbimbo, B., 2008, Therapeutic potential of gamma-secretase inhibitors and modulators. *Curr Top Med Chem.* 8, 54 - 61.

Inoue, H., Ohnishi, Y., Shoji, Y., Nakajima, M., Kakudo, K., 2011, Effects of a gamma secretase inhibitor on the proliferation and invasiveness of oral squamous cell carcinoma cell lines. *Asian Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 1 – 6.

Jansohn, M., Rothhämel, S., 2012, *Gentechnische Methoden*, 5. Auflage, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

Jones, A., Morar, P., Phillips, D., Field, J., Husband, D., Helliwell, T., 1995, Second Primary Tumors in Patients with Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer* Vol. 75, No. 6, 1343 – 1353.

Karp, G., 2005, *Molekulare Zellbiologie*, 1. deutsche Auflage, Berlin: Springer Verlag.

- Kawaguchi**, J., Takeshita, S., Kashima, T., Imai, T., Machinami, R., Kudo, A., 1999, Expression and function of the splice variant of the human cadherin-11 gene in subordination to intact cadherin-11. *J Bone Miner Res* 14, 764 – 775.
- Kimberly**, W., Xia, W., Rahmati, T., Wolfe, M., Selkoe, D., 2000, The transmembrane aspartates in presenilin 1 and 2 are obligatory for gamma-secretase activity and amyloid beta-protein generation. *J Biol Chem.* 275, 3173 - 3178.
- Kimberly**, W., LaVoie, M., Ostaszewski, B., Ye, W., Wolfe, M., Selkoe, D., 2003, γ -Secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, aph-1, and pen-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Volume 100, No. 11, 6382 – 6387.
- Kovacs**, D., Fausett, H., Page, K., Kim, T., Moir, R., Merriam, D., Hollister, R., Hallmark, O., Mancini, R., Felsenstein, K., Hyman, B., Tanzi, R., Wasco, W., 1996, Alzheimer-associated presenilins 1 and 2: neuronal expression in brain and localization to intracellular membranes in mammalian cells. *Nat Med.* 2, 224 - 229.
- Kunkel**, M., Hertrampf, K., 2010, Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). S2k-Leitlinie: Diagnostik und Management von Vorläuferläsionen des oralen Plattenepithelkarzinoms in der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde.
- Kurien**, B., Scofield, R., 2006. Western blotting. *Methods* 38, 283 – 293.
- Laemmli**, U., 1970, Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680 – 685.
- Lammich**, S., Okochi, M., Takeda, M., Kaether, C., Capell, A., Zimmer, A., Edbauer, D., Walter, J., Steiner, H., Haass, C., 2002, Presenilin-dependent intramembrane proteolysis of CD44 leads to the liberation of its intracellular domain and the secretion of an A β -like peptide. *J Biol Chem.* 277, 44754 – 44759.
- Lamvik**, J., Hella, H., Liabakk, N., Halaas, O., 2001, Nonlabeled secondary antibodies augment/maintain the binding of primary, specific antibodies to cell membrane antigens. *Cytometry* 45, 187 - 193.
- Lane**, D., 1992, p53, guardian of the genome. *Nature* 358, 15 – 16.
- Lane**, D., Crawford, L., 1979, T antigen is bound to a host protein in SY40-transformed cells. *Nature* 278, 261 – 263.

Laudon, H., Hansson, E., Melén, K., Bergman, A., Farmery, M., Winblad, B., Lendahl, U., von Heijne, G., Näslund, J., 2005, A nine-transmembrane domain topology for presenilin 1. *J Biol Chem.* 280, 35352 – 35360.

LaVoie, M., Fraering, P., Ostaszewski, B., Ye, W., Kimberly, W., Wolfe, M., Selkoe, D., 2003, Assembly of the gamma-secretase complex involves early formation of an intermediate subcomplex of Aph-1 and nicastrin. *J Biol Chem.* 278, 37213 - 37222.

Lin, C., Grandis, J., Carey, T., Gollin, S., Whiteside, T., Koch, W., Ferris, R., Lai, S., 2007, Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cancer Cell Lines: Established Models and Rationale for Selection. *Head Neck* 29, 163 – 188.

Linzer, D., Levine, A., 1979, Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17, 43 - 52.

Liu, L., Sengupta, P., Jamal, B., Yang, H., Bouchie, M., Lindner, V., Varelas, X., Kukuruzinska, M, 2013, N-glycosylation induces the CTHRC1 protein and drives oral cancer cell migration. *J Biol Chem.* 288, 20217 - 20227.

Liwoz, A., Lei, T., Kukuruzinska, M., 2006, N-Glycosylation Affects the Molecular Organization and Stability of E-cadherin Junctions. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL.* 281, 23138 – 23149.

Lo Muzio, L., Pannone, G., Mignogna, M., Staibano, S., Mariggio, M., Rubini, C., Procaccini, M., Dolci, M., Bufo, P., De Rosa, G., Piattelli, A., 2004, P-cadherin expression predicts clinical outcome in oral squamous cell carcinomas. *Histology and Histopathology* 19, 1089 – 1099.

Lo Muzio, L., Campisi, G., Farina, A., Rubini, C., Pannone, G., Serpico, R., Laino, G., De Dillo, A., Carinci, F., 2005, P-cadherin expression and survival rate in oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study. *BMC Cancer* 5, 63.

Lowy, R., Willumsen, B., 1993, Function and Regulation of RAS. *Annu Rev Biochem.* 62, 851 - 91.

Lüllmann-Rauch, R., 2012, Taschenlehrbuch Histologie. 4. Auflage, Stuttgart: Thieme Verlag.

Lyon, C., Mill, C., Tsaousi, A., Williams, H., George, S., 2011, Regulation of VSMC behavior by the cadherin-catenin complex. *Frontiers in Bioscience* 16, 644 - 673.

Mahendra, A., Shreedhar, B., Kamboj, M., Singh, A., Singh, A., Agrawal, A., Kumar, S., Kabiraj, A., 2014, Epidermal Growth Factor Receptor Protein: A Biological Marker for Oral Precancer and Cancer. *Journal of Dental Surgery* Volume 2014, Article ID 158709, 7 pages.

Mao, L., Hong, W., Papadimitrakopoulou, V., 2004, Focus on head and neck cancer. *Cancer Cell* Volume 5, Issue 4, 311 – 316.

Mareel, M., Bracke, M., Van Roy, F., 1995, Cancer metastasis: negative regulation by an invasion-suppressor complex. *Cancer Detect Prev.* 19, 451 – 464.

Marambaud, P., Shioi, J., Serban, G., Georgakopoulos, A., Sarner, S., Nagy, V., Baki, L., Wen, P., Efthimiopoulos, S., Shao, Z., Wisniewski, T., Robakis, N., 2002, A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *EMBO J.* 21, 1948 - 1956.

Marambaud, P., Wen, P., Dutt, A., Shioi, J., Takashima, A., Siman, R., Robakis, N., 2003, A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1/epsilon-cleavage of N-cadherin is inhibited by PS1 FAD mutations. *Cell* 114, 635 - 645.

Mashberg, A., Meyers, H., 1976, Anatomical site and size of 222 early asymptomatic oral squamous cell carcinomas. *Cancer* 37, 2149 – 2157.

Mattijssen, V., Peters, H., Schalkwijk, L., Manni, J., van't Hof-Grootenboer, B., de Mulder, P., Ruiter, D., 1993, E-cadherin expression in head and neck squamous-cell carcinoma is associated with clinical outcome. *Int J Cancer.* 55, 580 - 585.

McCaul, J., Gordon, K., Clark, L., Parkinson E., 2002, Telomerase inhibition and the future management of head-and-neck cancer. *Lancet Oncol.* Vol. 3, No.5, 280 - 288.

Meloch, S., Pouyssegur, J., 2007, The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* 26, 3227 - 3239.

Miller, J., Moon, R., 1996, Signal transduction through β -catenin and specification of cell fate during embryogenesis. *GENES & DEVELOPMENT* 10, 2527 – 2539.

Miyamoto, Y., Maitra, A., Ghosh, B., Zechner, U., Argani, P., Iacobuzio-Donahue, C., Sriuranpong, V., Iso, T., Meszoely, I., Wolfe, M., Hruban, R., Ball, D., Schmid, R., Leach, S., 2003, Notch mediates TGF alpha-induced changes in epithelial differentiation during pancreatic tumorigenesis. *Cancer Cell* 3, 565 - 576.

Molès, J., Watt, F., 1997, The Epidermal Stem Cell Compartment: Variation in Expression Levels of E-Cadherin and Catenins Within the Basal Layer of Human Epidermis. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 45, 867 – 874.

Muñoz-Guerra, M., Marazuela, E., Fernández-Contreras, M., Gamallo, C., 2005, P-Cadherin Expression Reduced in Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity: An Indicator of Poor Prognosis. *Cancer* 103, 960 – 969.

Naruse, S., Thinakaran, G., Luo, J., Kusiak, J., Tomita, T., Iwatsubo, T., Qian, X., Ginty, D., Price, D., Borchelt, D., Wong, P., Sisodia, S., 1998, Effects of PS1 deficiency on membrane protein trafficking in neurons. *Neuron*. 21, 1213 - 1221.

Niessen, C., Leckband, D., Yap, A., 2011, Tissue Organization by Cadherin Adhesion Molecules: Dynamic Molecular and Cellular Mechanism of Morphogenetic Regulation. *Physiol Rev* 91, 691 – 731.

Nita-Lazar, M., Noonan, V., Rebutini, I., Walker, J., Menko, A., Kukuruzinska, M., 2009, Overexpression of DPAGT1 leads to aberrant N-glycosylation of E-cadherin and cellular discohesion in oral cancer. *Cancer Res.* 69, 5673 – 5680.

Nollet, F., Kools, P., van Roy, F., 2000, Phylogenetic Analysis of the Cadherin Superfamily allows Identification of Six Major Subfamilies Besides Several Solitary Members. *J. Mol. Biol.* 299, 551 – 572.

Ngoka, L., 2008, Sample prep for proteomics of breast cancer: proteomics and gene ontology reveal dramatic differences in protein solubilization preferences of radioimmunoprecipitation assay and urea lysis buffers. *Proteome Science* 6, 1 – 24.

Nose, A., Takeichi, M., 1986, A Novel Cadherin Cell Adhesion Molecule: Its Expression Patterns Associated with Implantation and Organogenesis of Mouse Embryos. *The Journal of Cell Biology*, Volume 103, 2649 – 2658.

Oda, K., Matsuoka, Y., Funahashi, A., Kitano H., 2005, A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Molecular Systems Biology* 1, 2005 - 2010.

Oh, Y., Turner, R., 2005, Evidence that the COOH terminus of human presenilin 1 is located in extracytoplasmic space. Am J Physiol Cell Physiol. 289, C576 – C581.

Orban, B., Sicher, H., 1946, The oral mucosa. J Dent Educ. 10, 94 - 100.

Osaki, T., Yoneda K., Yamamoto T., Kimura T., Matuoka H., Sakai H., Ryoke K., 2000, Clinical investigation on pulmonary metastasis of head and neck carcinomas. Oncology 59, 196-203.

Paris, D., Quadros, A., Patel, N., DelleDonne, A., Humphrey, J., Mullan, M., 2005, Inhibition of angiogenesis and tumor growth by beta and gamma-secretase inhibitors. Eur J Pharmacol. 514, 1 - 15.

Parisiadou, L., Fassa, A., Fotinopoulou, A., Bethani, I., Efthimiopoulos, S., 2004, Presenilin 1 and Cadherins: Stabilization of Cell-Cell Adhesion and Proteolysis-Dependent Regulation of Transcription. Neurodegenerative Dis 1, 184 – 191.

Pertz, O., Bozic, D., Koch, A., Fauser, Ch., Brancaccio, A., Engel, J., 1999, A new crystal structure, Ca²⁺ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. The EMBO Journal Vol.18 No.7, 1738 – 1747.

Petridou, E., Zavras, A., Lefatzis, D., Dessypris, N., Laskaris, G., Dokianakis, G., Segas, J., Douglas, C., Diehl, S., Trichopoulos, D., 2002, The role of diet and specific micronutrients in the etiology of oral carcinoma, Cancer Volume 94, Issue 11, 2981 – 2988.

Rasul, S., Balasubramanian. R., Filipovic, A., Slade, M., Yague, E., Coombes, R., 2009, Inhibition of gamma-secretase induces G2/M arrest and triggers apoptosis in breast cancer cells. Br J Cancer 100, 1879 - 1888.

Repetto, E., Yoon, I., Zheng, H., Kang, D., 2007, Presenilin 1 regulates epidermal growth factor receptor turnover and signaling in the endosomal-lysosomal pathway. J Biol Chem. 282, 31504 – 31516.

RKI - Robert Koch-Institut (Hrsg.), 2010, Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Berlin.

RKI - Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg)., 2013, Krebs in Deutschland 2009/2010, 9. Ausgabe, Berlin.

Rocher-Ros, V., Marco, S., Mao, J., Gines, S., Metzger, D., Chambon, P., Balmain, A., Saura, C. , 2010, Presenilin modulates EGFR signaling and cell transformation by regulating the ubiquitin ligase Fbw7. *Oncogene* 29, 2950 – 2961.

Rogaev, E., Sherrington, R., Rogaeva, E., Levesque, G., Ikeda, M., Liang, Y., Chi, H., Lin, C., Holman, K., Tsuda, T., et al., 1995, Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 376, 775 – 8.

Roy, S., Kumar V., 2014, A Practical Approach on SDS PAGE for Separation of Protein. *International Journal of Science and Research*, Volume 3 Issue 8, 955 - 960.

Sack, U., Tárnok, A., Rothe, G., 2007, *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. Basel: Karger.

Sakaki, T., Wato, M., Kaji, R., Mushimoto, K., Shirasu, R., Tanaka, A., 1994, Correlation of E- and P-cadherin expression with differentiation grade and mode of invasion in gingival carcinoma. *Pathol Int.*, 44, 280 - 286.

Sato, T., Diehl, T., Narayanan, S., Funamoto, S., Ihara, Y., De Strooper, B., Steiner, H., Haass, C., Wolfe, M., 2007, Active gamma-secretase complexes contain only one of each component. *J Biol Chem.*, Volume 282, No. 47, 33985 – 33993.

Scheifele, C., Reichart, P., 1998. Oral leukoplakia in manifest squamous epithelial carcinoma. A clinical prospective study of 101 patients. *Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie* 2, 326 - 30.

Schipper, J., Frixen, U., Behrens, J., Unger, A., Jahnke, K., Birchmeier, W., 1991, E-cadherin expression in squamous cell carcinomas of head and neck: inverse correlation with tumor dedifferentiation and lymph node metastasis. *Cancer Res.* 51, 6328 - 6337.

Schünke, M., Schulte, E., Schumacher, U., Voll, M., Wesker, K., 2006, *Prometheus – Kopf und Neuroanatomie*, Stuttgart: Thieme Verlag.

Schwenzer, N., Ehrenfeld, M., 2002, Zahn- Mund- Kiefer-Heilkunde: Spezielle Chirurgie, Lehrbuch zur Aus- und Weiterbildung. 3. Auflage, Stuttgart: Thieme Verlag.

Shapiro, H., 2003, Practical Flow Cytometry. 4. Auflage, New York: Wiley Liss.

Shapiro, L., Kwong, P., Fannon, A., Colman, D., Hendrickson, W., 1995, Considerations on the folding topology and evolutionary origin of cadherin domains. Proc Natl Acad Sci USA 92 (15): 6793 – 6797.

Shearman, M., Beher, D., Clarke, E., Lewis, H., Harrison, T., Hunt, P., Nadin, A., Smith, A., Stevenson, G., Castro, J., 2000, L-685,458, an aspartyl protease transition state mimic, is a potent inhibitor of amyloid beta-protein precursor gamma-secretase activity. Biochemistry, Volume 39, No. 30, 8698 - 8704.

Shih, I., Wang, T., 2007, Notch Signaling, γ -Secretase Inhibitors, and Cancer Therapy. Cancer Res 67, 1879 – 1882.

Shimoyama, Y., Hirohashi, S., Hirano, S., Noguchi, M., Shimosato, Y., Takeichi, M., Abe, O., 1989 a, Cadherin Cell-Adhesion Molecules in Human Epithelial Tissues and Carcinomas. CANCER RESEARCH 49, 2128 – 2133.

Shimoyama, Y., Yoshida, T., Terada, M., Shimosato, Y., Abe, O., Hirohashi, S., 1989 b, Molecular Cloning of a Human Ca^{2+} -dependent Cell-Cell Adhesion Molecule Homologous to Mouse Placental Cadherin: Its Low Expression in Human Placental Tissues. The Journal of Cell Biology 109, 1787 – 1794.

Shirahama, S., Furukawa, F., Wakita, H., Takigawa, M., 1996, E- and P-cadherin expression in tumor tissues and soluble E-cadherin levels in sera of patients with skin cancer. J Dermatol Sci. 13, 30 -36.

Shirotani, K., Edbauer, D., Capell, A., Schmitz, J., Steiner, H., Haass, C., 2003. γ -Secretase activity is associated with a conformational change of nicastrin. J Biol Chem 278, 16474 – 16477.

Smith, P., Krohn, R., Hermanson, G., Mallia, A., Gartner, F., Provenzano, M., Fujimoto, E., Goeke, N., Olson, B., Klenk, D., 1985, Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal. Biochem. 76 - 85.

Smith, M., Pignatelli M., 1997, The molecular histology of neoplasia: the role of the cadherin/catenin complex. Histopathology 31, 107 – 111.

Snijders, A., Schmidt, B., Fridlyand, J., Dekker, N., Pinkel, D., Jordan, R., Albertson, D., 2005, Rare amplicons implicate frequent deregulation of cell fate specification pathways in oral squamous cell carcinoma. *Oncogene* 24, 4232 - 4242.

Song, X., Xia, R., Cui, Z., Chen, W., Mao, L., 2012, Presenilin 1 is frequently overexpressed and positively associates with EGFR expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck Oncol.* 4, 47.

Soussi, T., Lozano, G., 2005, p53 mutation heterogeneity in cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* Volume 331, Issue 3, 834 – 842.

Spiro, R., 1985, The management of neck nodes in head and neck cancer: a surgeon's view. *Bull. N.Y. Acad. Med.* 61, 629 - 637

Statistisches Bundesamt, Amtliche Todesursachenstatistik, 2010, Wiesbaden. <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html;jsessionid=625188ECC03A9C13061A1ABCB08B643C.cae2#Tabellen>

Sterry, W., 2011, *Kurzlehrbuch Dermatologie*. Stuttgart: Thieme Verlag.

Stewart, B., Kleihues, P., 2003, *World Cancer Report*, IARC Press: Lyon.

Suwanjune, S., Wongchana, W., Palaga, T., 2008, Inhibition of gamma-secretase affects proliferation of leukemia and hepatoma cell lines through Notch signaling. *Anticancer Drugs.* 19, 477 - 486.

Takeichi, M., 1990, Cadherins: A molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu. Rev. Biochem.* 59, 237 – 252.

Takeichi, M., Atsumi, T., Yoshida, C., Uno, K., Okada, T., 1981, Selective adhesion of embryonal carcinoma cells and differentiated cells by Ca²⁺-dependent sites. *Developmental Biology* 87, Issue 2, 340 – 350.

Talamini, R., Bosetti, C., La Vecchia, C., Dal Maso, L., Levi, F., Bidoli, E., Negri, E., Pasche, C., Vaccarella, S., Barzan, L., Franceschi, S., 2002, Combined effect of tobacco and alcohol on laryngeal cancer risk: a case-control study. *Cancer Causes Control* 13, 957-964.

Tanuma, J., Izumo, T., Hirano, M., Oyazato, Y., Hori, F., Umemura, E., Shisa, H., Hiai, H., Kitano, M., 2010, FGFR4 polymorphism, TP53 mutation, and their combinations are prognostic factors for oral squamous cell carcinoma. *ONCOLOGY REPORTS* 23, 739 – 744.

Tas, J., Westerneng, G., 1981, Fundamental aspects of the interaction of propidium diiodide with nuclei acids studied in a model system of polyacrylamide films. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, Vol. 29, No. 8, 929 - 936.

Taylor, S., Berkelman, T., Yadav, G., Hammond, M., 2013, A Defined Methodology for Reliable Quantification of Western Blot Data. *Mol Biotechnol* 55, 217 – 226.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 4350 - 4354.

Tschan, M., Fischer, K., Fung, V., Pirnia, F., Borner, M., Fey, M., Tobler, A., Torbett, B., 2003, Alternative splicing of the human cyclin D-binding Myb-like protein (hDMP1) yields a truncated protein isoform that alters macrophage differentiation patterns. *J Biol Chem* 278, 42750 – 42760.

Tu, H., Nelson, O., Bezprozvanny, A., Wang, Z., Lee, S., Hao, Y., Serneels, L., De Strooper, B., Yu, G., Bezprozvanny, I., 2006, Presenilins form ER Ca²⁺ leak channels, a function disrupted by familial Alzheimer's disease-linked mutations. *Cell* 126, 981 - 993.

Vujovic, S., Henderson, S., Flanagan, A., Clements, M., 2007, Inhibition of gamma-secretases alters both proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells. *Cell Prolif.* 40, 185 - 195.

Weijzen, S., Rizzo, P., Braid, M., Vaishnav, R., Jonkheer, S., Zlobin, A., Osborne, B., Gottipati, S., Aster, J., Hahn, W., Rudolf, M., Siziopikou, K., Kast, W., Miele, L., 2002, Activation of Notch-1 signaling maintains the neoplastic phenotype in human Ras-transformed cells. *Nat Med.* 8, 979 - 986.

Westermeier, R., 1997, *Electrophoresis in practise; a guide to methods and applications of DNA and protein separations*, 2. Edition, Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH.

- Westhoff**, B., Colaluca, I., D'Ario, G., Donzelli, M., Tosoni, D., Volorio, S., Pelosi, G., Spaggiari, L., Mazzarol, G., Viale, G., Pece, S., Di Fiore, P., 2009, Alterations of the Notch pathway in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 22293 – 22298.
- Wienecke**, A., Barnes, B., Lampert, T., Kraywinkel, K., 2014, Changes in cancer incidence attributable to tobacco smoking in Germany, 1999-2008. *International Journal of Cancer* 134, 682 - 691.
- Williams**, H., Sanders, D., Jankowski, J., Landini, G., Brown, A., 1998, Expression of cadherins and catenins in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 27, 308 - 317.
- Wodarz**, A., Nusse, R., 1998, Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 14, 59 - 88.
- Wolfe**, M., 2010, Structure, Mechanism and Inhibition of γ -Secretase and Presenilin-Like Proteases. *Biol Chem.* 391, 839 – 847.
- Wolfe**, M., Xia, W., Moore, C., Leatherwood, D., Ostaszewski, B., Rahmati, T., Donkor, I., Selkoe, D., 1999a, Peptidomimetic probes and molecular modeling suggest that Alzheimer's gamma-secretase is an intramembrane-cleaving aspartyl protease. *Biochemistry*, Volume 38, No. 15, 4720 - 4727.
- Wolfe**, M., Xia, W., Ostaszewski, B., Diehl, T., Kimberly, W., Selkoe, D., 1999b, Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* 398, 513 – 517.
- Yagi**, T., Takeichi, M., Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. *GENES & DEVELOPMENT* 14, 1169 - 1180.
- Yarden**, Y., Sliwkowski, M., 2001, Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2, 127 - 137.
- Yoshida-Noro**, C., Suzuki N., Takeichi M., 1984. Molecular nature of the calcium-dependent cell-cell adhesion system in mouse teratocarcinoma and embryonic cells studied with a monoclonal antibody. *Development Biology* 101, Issue 1, 19 - 27.

Yu, G., Nishimura, M., Arawaka, S., Levitan, D., Zhang, L., Tandon, A., Song, Y., Rogaeva, E., Chen, F., Kawarai, T., Supala, A., Levesque, L., Yu, H., Yang, D., Holmes, E., Milman, P., Liang, Y., Zhang, D., Xu, D., Sato, C., Rogaev, E., Smith, M., Janus, C., Zhang, Y., Aebbersold, R., Farrer, L., Sorbi, S., Bruni, A., Fraser, P., St George-Hyslop, P., 2000, Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing. *Nature* 407, 48 - 54.

Zayzafoon, M., Abdulkadir, S., McDonald, J., 2004, Notch signaling and ERK activation are important for the osteomimetic properties of prostate cancer bone metastatic cell lines. *J Biol Chem.* 27, 3662 - 3670.

Zhang, Y., Wang, R., Liu, Q., Zhang, H., Liao, F., Xu, H., 2007, Presenilin/gamma-secretase-dependent processing of beta-amyloid precursor protein regulates EGF receptor expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 10613 – 10618.

Zhao, D., Tang, X., Yang, K., Liu, J., Ma, X., 2012, Over-expression of integrin-linked kinase correlates with aberrant expression of Snail, E-cadherin and N-cadherin in oral squamous cell carcinoma: implications in tumor progression and metastasis. *Clin Exp Metastasis.* 29, 957 - 969.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

AJCC	American Joint Committee on Cancer
AK	Antikörper
APP	Amyloid precursor protein
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA	bicinchoninic acid
BSA	Bovines-Serumalbumin
CAJ	cadherin-based adherens junctions
CDK	cyclin-dependent kinases
CT	Computertomografie
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DAPT	N-[N-(3, 5-difluorphenacetyl)-l-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
EC	extrazelluläre Cadherindomäne
E-Cad/CTF1	E-Cadherin/C-terminales Fragment 1
E-Cad/CTF2	E-Cadherin/C-terminales Fragment 2
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
FACS	fluorescence activated cell sorting
FGF	fibroblast growth factor
FKS	Fötale Kälberserum
FSC	forward scatter
GSI-I	Gamma-Sekretase-Inhibitor-I
GSK-3beta	Glycogen synthase kinase 3 beta
GTP	Guanosintriphosphat
HAV	Histidin-Alanin-Valin-Sequenz
H ₂ O	Wasser

HOK	humane orale Keratinozyten
HRP	Horseradish-Peroxidase
IARC	International Agency on Research for Cancer
IgA	Immunglobulin A
kDa	kilo Dalton
LOH	loss of heterozygosity
mRNA	messenger ribonucleic acid
MRT	Magnetresonanztomografie
N-Cad/CTF2	N-Cadherin/C-terminales Fragment 2
n/a	Not available
NGS	normal goat serum
OSCC	oral squamous cell carcinoma
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PBST	PBS mit 0,1 % Tween 20
PEC	Plattenepithelkarzinom
PEN-2	Presenilin-Enhancer 2
PI	Propidiumiodid
POK	primäre, orale Keratinozyten
PS-1	Presenilin-1
PS-2	Presenilin-2
PSEN-1	Presenilin-1
PSEN-2	Presenilin-2
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Ras	Rat sarcoma
RIP	regulierte intramembrane Proteolyse
RIPA	radioimmunoprecipitation assay
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	ribonucleic acid
rpm	revolutions per minute
RZB	Relative Zentrifugalbeschleunigung
SDS	sodium dodecyl sulfate
SSC	side scatter

TBS	Tris buffered saline
TBST	TBS mit 0,05 % Tween 20
TEMED	Tetramethylethylenediamin
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UICC	Union Internationale Contre le Cancer

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der oralen malignen Neoplasien nach ICD-10-GM-2015.....	4
Tabellen 2 - 4: TNM- <i>Staging</i> der oralen Plattenepithelkarzinome.....	11/12
Tabelle 5: Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Plattenepithelkarzinomzelllinien.....	30
Tabelle 6: Pipettierschema Trenngel (1 Gel).....	36
Tabelle 7: Pipettierschema Sammelgel (1 Gel).....	37
Tabelle 8: Lösung für Elektrophoresepuffer (1Liter).....	37
Tabelle 9: Lösung für Blotpuffer (1 Liter).....	39
Tabelle 10: Tabellarische Übersicht in Prozent - HOK-Zellen in der G ₁ -, S- und G ₂ -Phase nach Inkubation mit GSI-I.....	65
Tabelle 11: Tabellarische Übersicht in Prozent – PCI-Zellen 4A, 9 und 13 in allen Phasen des Zellzyklus nach Inkubation mit GSI-I.....	67

7.3 Abbildungsverzeichnis und -nachweise

Abbildung 1: Aufbau des oralen, mehrschichtigen unverhornten und des keratinisierten Plattenepithels.....2

Lüllmann-Rauch, R., 2012, Taschenlehrbuch Histologie. 4. Auflage, Stuttgart: Thieme Verlag.

Abbildung 2: Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen bei Männern und Frauen5

RKI - Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.), 2013, Krebs in Deutschland 2009/2010, 9. Ausgabe, Berlin.

Abbildung 3: Alters- und geschlechtsspezifische Neuerkrankungsraten bei Männern und Frauen in Deutschland von 1980 bis 2004.....6

RKI - Robert Koch-Institut (Hrsg.), 2010, Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Berlin.

Abbildung 4: Globalinzidenz des Mundhöhlenkrebses bei Männern – altersstandardisiert pro 100.000 Einwohner und Jahr.....7

Stewart, B., Kleihues, P., 2003, World Cancer Report, IARC Press: Lyon.

Abbildung 5: Stadieneinteilung gemäß den Richtlinien der UICC.....13

Schwenzer, N., Ehrenfeld, M., 2002, Zahn- Mund- Kiefer-Heilkunde: Spezielle Chirurgie, Lehrbuch zur Aus- und Weiterbildung. 3. Auflage, Stuttgart: Thieme Verlag.

Abbildung 6: Lymphabfluss der Zunge.....14

Schünke, M., Schulte, E., Schumacher, U., Voll, M., Wesker, K., 2006, Prometheus – Kopf und Neuroanatomie, Stuttgart: Thieme Verlag.

Abbildung 7: Erworbene Kompetenzen maligne entarteter Zellen.....16

verändert nach Hanahan, D., Weinberg, R., 2000, The Hallmarks of Cancer. Cell, Vol. 100, 57 – 70.

Abbildung 8: Modell der genetischen Progression bei Tumoren im Kopf-Hals-Bereich.....	21
verändert nach Califano, J., van der Riet, P., Westra, W., Nawroz, H., Clayman, G., Piantadosi, S., Corio, R., Lee, D., Greenberg, B., Koch, W., Sidransky, D., 1996, Genetic Progression Model for Head and Neck Cancer: Implications for Field Cancerization. CANCER RESEARCH 56, 2488 - 2492.	
Abbildung 9: Schema der Molekülstruktur der Typ-I-Cadherine.....	23
verändert nach Lyon, C., Mill, C., Tsaousi, A., Williams, H., George, S., 2011, Regulation of VSMC behavior by the cadherin-catenin complex. Frontiers in Bioscience 16, 644 - 673. https://www.bioscience.org/2011/v16/af/3711/fig2.jpg , (14.03.15)	
Abbildung 10: Schematische Abbildung des Gamma-Sekretase-Komplexes.....	26
verändert nach Anderrson, E., Lendahl, U., 2014, Therapeutic modulation of Notch signalling — are we there yet? Nature Reviews Drug Discovery 13, 357 – 378. http://www.nature.com/nrd/journal/v13/n5/images/nrd4252-i2.jpg , (10.11.15)	
Abbildung 11: Schematische Darstellung der Bildung eines Kupfer(II)-Komplexes bei der Biuret-Reaktion.....	34
http://www.nugi-zentrum.de/experimente/biochemie/proteinbestimmung/allgemeines/zusatzinfo.html , (14.03.15)	
Abbildung 12: Schematische Darstellung der elektrophoretischen Proteintrennung in einem Polyacrylamidgel.....	35
http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/255/255tech/mcb3.32.SDS.elect.jpg , (14.03.15)	
Abbildung 13: Zusammensetzung des SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Protein Standards der Firma Invitrogen.....	38
https://www.lifetechnologies.com/de/de/home/references/protocols/proteins-expression-isolation-and-analysis/sds-page-protocol/pre-stained-protein-standards-seeblue-plus2-protein-standard.html , (14.03.15)	

Abbildung 14: Schematischer Aufbau der Blotapparatur für einen Tank-Blot der Firma Bio-Rad.....	39
http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/M1703930.pdf , (14.03.15)	
Abbildung 15: Ablauf der Chemilumineszenzreaktion mithilfe der AK-detektion.....	40
http://de.wikipedia.org/wiki/Western_Blot#mediaviewer/File:ECL.jpg , (14.03.15)	
Abbildung 16: Verändertes Übersichtsprotokoll zur Isolierung der Zelloberflächenproteine der Firma Pierce®.....	43
https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011518_Pierce_Cell_Surface_Protein_Isolat_UG.pdf , (14.03.15)	
Abbildung 17: Schematische Darstellung der Lichtstreuung einer Zelle mit Zellkern im FACS.....	46
http://www.bd.com/resource.aspx%3FIDX%3D31055 , (14.03.15)	
Abbildung 18: A - Schematische Darstellung eines Dot-Plots, B – Dot-Plot mit eingegrenzten Zellen.....	49
https://www.lerner.ccf.org/services/flow/documents/Cell_Cycle_Basics.pdf , (18.12.15)	
Abbildung 19: Schematische Darstellung Zellzyklus und Histogramm mit Zellzyklusphasen.....	50
links - http://www.cyto.purdue.edu/cdroms/cyto1/6/bd/2facs3.gif , rechts - http://uic.igc.gulbenkian.pt/fc-courses.php , (17.12.15)	
Abbildung 20: Western-Blot-Analysen von gesunden- und OSCC-POKs.....	52
eigene Abbildung	
Abbildung 21: Immundetektion von P-Cadherin mithilfe der Western-Blot-Analyse in HOKs und exemplarisch in den OSCC-Zelllinien PCI 4A, PCI 52 und PCI 1.....	53
eigene Abbildung	
Abbildung 22: Western-Blot-Analyse der Presenilin-1 Expression.....	54
eigene Abbildung	

Abbildung 23: Western-Blot-Analyse mit einem Antikörper gegen den N-Terminus von P-Cadherin bei den Zelllinien PCI 13 und 68.....	56
eigene Abbildung	
Abbildung 24: Western-Blot-Analyse der P-Cadherin-Expression in HOK-Zellen.....	57
eigene Abbildung	
Abbildung 25: Lokalisation von P-Cadherin in der undifferenzierten P-Cadherin überexprimierenden Zelllinie PCI 52.....	59
eigene Abbildung	
Abbildung 26: Nachweis von P-Cadherin in der OSCC-Zelllinie PCI 68 nach Inkubation mit 5 µM GSI-I.....	59
eigene Abbildung	
Abbildung 27: Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis der P-Cadherin-Expression in HOK-Zellen.....	60
eigene Abbildung	
Abbildung 28: Verteilung von P-Cadherin in HOK-Zellen, versetzt mit 5 µM DMSO, Nachweis mittels Immunfluoreszenzfärbung.....	61
eigene Abbildung	
Abbildung 29: Western-Blot-Analyse der Membranfraktionen von OSCC-Zellen PCI 1, PCI 68 und PCI 52 sowie der gesunden HOK-Zellen.....	62
eigene Abbildung	
Abbildung 30: Einfluss von GSI-I auf den Zellzyklus von gesunden HOKs.	64
eigene Abbildung	
Abbildung 31: Histogramme der OSCC-Zelllinie PCI 4A.....	66
eigene Abbildung	

7.4 Antikörperliste

P-Cadherin Western-Blots	<p>1. AK: Purified Mouse Anti-P-Cadherin, 1:1000 (BD Biosciences)</p> <p>2. AK: Stabilized Goat Anti-Mouse IgG, Peroxidase Conjugated, 1:1000 (Thermo Scientific)</p> <p>Haushaltsantigen: Rabbit Anti-beta Aktin, 1:15 000 (Abcam)</p>
Presenilin-1 Western-Blots	<p>1. AK: Presenilin 1 Rabbit Monoclonal Antibody (Rabbit – Anti Presenilin), 1:1000 (Epitomics)</p> <p>2. AK: Stabilized Goat Anti-Rabbit IgG, Peroxidase Conjugated, 1:3000 (Thermo Scientific)</p> <p>Haushaltsantigen: Rabbit Anti-beta Aktin, 1:15 000 (Abcam)</p>
P-Cadherin Immunfluoreszenzfärbungen	<p>1. AK: Purified Mouse Anti-P-Cadherin, 1:100 (BD Biosciences)</p> <p>2. AK: Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor® 488 grün conjugate, 1:5000 (Thermo Scientific)</p>

7.5 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher an keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

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

Bettina Ragab

7.6 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert, für die Möglichkeit meine Dissertation an der Klinik der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universität Regensburg durchzuführen und auf höchstem Niveau an der aktuellen Forschung teilzuhaben, bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn PD Dr. Richard Bauer für die Bereitstellung dieses höchst interessanten Themas. Vielen Dank für die Überlassung der Untersuchungsmethoden, dein fachliches Wissen, dein persönliches Engagement, deine Geduld und das mir entgegengebrachte Vertrauen. Auch für die kritischen und äußerst konstruktiven, wertvollen inhaltlichen Anmerkungen bei der Auswertung der vorliegenden Arbeit und das mühevollen Korrekturlesens möchte ich mich herzlich bei dir bedanken.

Großer Dank gebührt meiner Doktorandenvorgängerin Frau Dr. Karin Bauer für ihre freundliche, uneingeschränkte und geduldige Bereitschaft bei der Einweisung und Einarbeitung in die Arbeitsmethoden. Herzlichen Dank auch an Frau Brigitta Hauer für die tatkräftige Unterstützung und die angenehme Zusammenarbeit im Labor.

Darüber hinaus gilt mein Dank meiner Familie und allen die mir während des Studiums oder auf dem Weg dorthin geholfen haben.