Universitätsklinikum Ulm

Klinik für Hals-, Nasen, und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Hoffmann

Untersuchungen zur Expressionsregulation sowie Funktion zweier Kopf-Hals-Tumor-relevanter Onkogene: Bruton-Tyrosinkinase und Adenosinrezeptor 2B

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

von

Kristina Lesakova

geboren in Zell am See (Österreich)

2021

Amtierender Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Cornelia Brunner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Ole Ammerpohl

Tag der Promotion: 29.04.2022

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis……I
Abkürzungsverzeichnis……III

1 Einleitung 1
1.1 Kopf-Hals-Tumoren 1
1.2 Therapieprinzipien von Kopf-Hals-Tumoren 3
1.3 Epithelial-mesenchymale Transition 4
1.4 Epigenetik 6
1.5 Die Bruton-Tyrosinkinase 9
1.6 BTK in soliden Tumoren und die BTK-Isoformen 11
1.7 Die Rolle von Adenosin und Adenosinrezeptoren in soliden Tumoren 12
1.8 Ziele der Arbeit 16
2 Material und Methoden 17
2.1 Material 17
2.1.1 Zelllinien und Ethikvoten 17
2.1.2 Geräte, Materialien, Reagenzien und Programme 19
2.1.3 Western Blot – Puffer, Gele und Antikörper 28
2.1.4 PCR-Puffer 31
2.2 Methoden 32
2.2.1 Kultivierung und Handhabe von Zellen 32
2.2.2 Durchflusszytometrie 34
2.2.3 B-Zell-Isolation aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes 35
2.2.4 Proteinherstellung und Proteinquantifizierung 36
2.2.5 Western Blot 37
2.2.6 Sequenzauffindung des alternativen Promotors von *BTK* 40
2.2.7 DNA-Isolierung 40
2.2.8 Bisulfit-Konversion 41
2.2.9 PyroMark PCR 41
2.2.10 Pyrosequenzierung 45
2.2.11 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese 53
2.2.12 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion 53

2.2.13 Statistische Auswertungen 60
3 Ergebnisse 61
3.1 Effekt des ADORA2B-Antagonismus auf Wachstum und Morphologie der Zelllinie UD-SCC 1 61
3.2 Effekt des ADORA2B-Antagonismus auf die Expression von EMT-Markern - Analyse auf mRNA-Ebene 63
3.3 Effekt des ADORA2B-Antagonismus auf die Expression von EMT-Markern - Analyse auf Proteinebene 65
3.4 Effekt des ADORA2B-shRNA in UD-SCC 1 auf die Expression von EMT-Markern - Analyse auf Proteinebene 67
3.5 Effekt der BTK-Inhibition auf Wachstum und Morphologie der Zelllinie UD-SCC 1 69
3.6 Effekt der BTK-Inhibition auf die Expression von EMT-Markern - Analyse auf mRNA-Ebene 71
3.7 Effekt der BTK-Inhibition auf die Expression von EMT-Markern - Analyse auf Proteinebene 73
3.8 Charakterisierung des alternativen Promotors von *BTKp80* 75
3.9 Analyse des Methylierungsstatus der *BTKp80*-Promotorregion und Korrelation mit der BTK-Proteinexpression 76
4 Diskussion 80
4.1 Effekt des ADORA2B-Antagonismus auf die Morphologie der Zelllinie UD-SCC 1 81
4.2 Effekt der BTK-Inhibition auf Morphologie der Zelllinie UD-SCC 1 82
4.3 Einfluss der Onkogene ADORA2B und BTK auf EMT 83
4.4 Regulation der BTK-Expression durch Methylierung 97
5 Zusammenfassung 102
6 Literaturverzeichnis 104
7 Anhang 133
7.1 Beispielhafte PCR des *BTK Assays* 133
7.2 Danksagung 134
7.3 Tabellarischer Lebenslauf 135

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
ADORA2B	Adenosinrezeptor A2B
ADP	Adenosindiphosphat
AKTB	Beta (β)-Aktin
AMP	Adenosinmonophosphat
AP-1	Aktivator-Protein 1
AP-2	Apetala 2
APS	Adenosin 5‘-Phosphosulfat
ATP	Adenosintriphosphat
B2M	β2-microglobulin – β2-Mikroglobulin
BCA	Bicinchoninsäure
BCL-2	B-cell lymphoma 2 – B-Zelllymphom 2
BCL-2L1	B-cell lymphoma-2 like 1 – B-Zelllymphom 2 wie 1
BCR	B-cell-receptor - B-Zell Rezeptor
BOB1=Pou2af1	B-cell specific coactivator – B-Zell spezifischer Koaktivator
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BTK	Bruton’sche/Bruton-Tyrosinkinase
$CaCl_2$	Calciumchlorid
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of differentiation - Unterscheidungsgruppen
CDK4	Cyclin Dependent Kinase 4 – Zyklin-abhängige Kinase 4

cDNA	Complementary DNA – komplementäre DNA
CDP_CR3	CCAAT-displacement protein_cut repeats 3 – CCAAT Verlagerungs-Protein_Schnittwiederholung 3
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
ChIP-Seq	Kombinierte Chromatin-Immunpräzipitation und DNA-Sequenzierung
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
cm^2	Quadratzentimeter
CO_2	Kohlenstoffdioxid
Cp	Crossing point - Kreuzungspunkt
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats - gruppierte kurze palindromische Wiederholungen mit regelmäßigen Abständen
Ct	Cycle threshold - Zyklusschwellenwert
DAG	Diacylglycerol
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
dATPαS	Desoxyadenosin alpha(α)-thio Triphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium – Dulbecco’s Nährmedium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase

DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline – Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung
dsDNA	Doppelsträngige DNA
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ERBB2	Erythroblastic oncogene b2 - Erythroblasten Onkogen B2
ERC	European Research Council – Europäischer Forschungsrat
Ets	Transformation-spezifisch E26
ETS1	Erythroblasten Transformation-spezifisch 1
EZM	Extrazellulärmatrix
FACS	Fluorescence activated cell sorting – Fluoreszens aktivierte Zellsortierung/Durchflusszytometrie
FBS	Fetal bovine serum - Fetales Kälberserum
Fra-1	Fos related antigen 1 – Fos-verwandtes Antigen-1
FSC	Forward Scatter - Vorwärtsstreulicht
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gDNA	Genomische DNA
GRCh37/hg19	Genome Reference Consortium Human build 37/ Human Genome 19 – Genom Referenz Konsortium Menschenbau 37/ Humanes Genom 19
H	Histon
h	Stunden
H_2O	Destilliertes Wasser

H3K27ac	Histon 3 und Acetylierung an Lysin 27
HCl	Chlorwasserstoff
HDAC	Histon-Deacetylase
HEK293	Human Embryonic Kidney 293-Cells – Humane Emryonale Nieren 293-Zellen
HIF-1α	Hypoxie-induzierter-Faktor 1α
HM K	Hoch-methylierte Kontrolle
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma – Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs
HPRT1	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase 1
HPV	Humane Papillomviren
HRP	Horseradish peroxidase - Meerretichperoxidase
hTERT	Humane reverse Tranksriptase der Telomerase
HUGO	Human Genome Organization – Menschliches Genom Organisation
IgG	Immunglobulin G
IKK	IκB-Kinase – Inhibitor von κB-Kinase
IL	Interleukin
IP_3	Inositoltrisphosphat
JAK-STAT	Januskinase - Signal Transducers and Activators of Transcription - Signalgeber und Aktivator von Transkription
kDa	Kilodalton
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma
LE	Lichtemission

LNCaP	Lymph Node Carcinoma of the prostate – Lymphknotenkarzinom der Prostata
M	Mol
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting - Magnetische Sortierung von Zellen
MAPK	Mitogen-aktivierte-Proteinkinase
MET	Mesenchymal-epitheliale Transition
mg	Milligramm
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
MHC	Major histocompatibility complex - Haupthistokompatibilitäts-Komplex
min	Minuten
miRNA/miR	Mikro Ribonukleinsäure
ml	Milliliter
mM	Milimol
mM	Millimolar
MOE1	Human Mouth-Ordinary-Epithelium 1 – Humanes gewöhnliches Mundepithel 1
mRNA	Messenger ribonucleic acid – Boten-Ribonukleinsäure
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF-κB	Nuclear factor kappa (κ)-light-chain-enhancer of activated b cells – Nuklearer Faktor kappa (κ)-Leichtketten-Verstärker von aktivierten B-Zellen

ng	Nanogramm
NK	Natürliche Killerzelle
NM K	Niedrig-methylierte Kontrolle
NSCLC	Non small cell lung cancer – Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
OBF1	Oct-bindender Faktor 1
Oct1/Oct2	Organic cation transporter 1 or 2 – Organischer Kation-Transporter 1 bzw. 2
OSCC	Oral squamous cell carcinoma – Orales Plattenepithelkarzinom
PAGE	Precast Polyacrylamide Gel Electrophoresis – Anfertigung für Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells - mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PCR	Polymerase chain reaction – Polymerase-Kettenreaktion
PD-1	Programmed cell death protein 1 – Programmiertes Zelltod-Protein 1
PH	Pleckstrin-Homologie
PI3K	Phosphoinositid 3-kinase
PIP_3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKCβ	Proteinkinase Cβ
PLCγ2	Phospholipase C Gamma (γ) 2
pmol	Pikomol
PPi	Pyrophosphat
qRT-PCR	Quantitative real time (Echtzeit) PCR

RAF	rapidly accelerated fibrosarcoma – Rapid akzeleriertes Fibrosarkom
RAS	Rat sarcoma - Rattensarkom
Rb	Retinoblastom
rcf	Relative centrifugal force – Relative Zentrifugalbeschleunigung
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay - Radioimmunpräzipitationsassay
RNA	ribonucleic acid - Ribonukleinsäure
RNA-Pol-II	Ribonukleinsäure Polymerase II
RNase	Ribonukleasen
RPL13A	60S ribosomal Protein L13
RPL36A	60S ribosomal Protein L36
rpm	Revolutions per minute - Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute / RPMI-Zellkulturmedium
SDS	Sodiumdodecylsulphat
SH	SRC-Homologie
shRNA	Small hairpin RNA – kleine Haarnadel RNA
Sp1/3	Specificity protein 1/3 - Spezifitäts-Protein 1/3
SRC	Sarcoma and cellular – Sarkom und Zellulär
SSC	Side Scatter - Seitwärtsstreulicht
STAT	Signal transducer and activator of transcription – Signalüberträger und Aktivator von Transkription
TAE	Tris Azetat EDTA Puffer

TAK1	Transforming growth factor β activated kinase 1 – Transformierter Wachstumsfaktor β aktivierte Kinase 1
TBS	Tris-bufferd saline- Tris gepufferte Kochsalzösung
TBS-T	Tris-bufferd saline mit Tween 20
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TCR	T-cell-receptor - T-Zell-Rezeptor
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TGF-ß	Transforming growth factor β - Transformierender Wachstumsfaktor β
TH	Tec homology
T_H	T Helferzelle
TIGK	Telomerase Immortalized Gingival Keratinocytes – Telomerase immortalisierte Ginigiva-Keratinozyten
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
TNM	Tumor-Nodus-Metastase
T_{reg}	Regulatorische T-Zelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSS	Transcription start site - Transkriptionsstartpunkt
U	Unit / Enzymeinheit
UCSC	University of California Santa Cruz
UD-SCC	Universität Düsseldorf- Squamous cell carcinoma (Plattenepithelkarzinom)
V	Volt

VEGF	Vascular endothelial growth factor – Gefäß-Endothel-Wachstumsfaktor
xg	Mittlere Erdbeschleunigung
ZEB1/2	Zinc finger E-box-binding homeobox 1 or 2 – Zinkfinger E-box bindende Homeobox Protein 1 oder 2
α	Alpha
β	Beta
γ	Gamma
κ	Kappa
µl	Mikroliter
µM	Mikromol

Nomenklatur

In der vorliegenden Arbeit werden die Gene und Proteine entsprechend den Vorgaben des HUGO (Human Genome Organization) Gene Nomenklature Kommittees angegeben.

1 Einleitung

1.1 Kopf-Hals-Tumoren

Mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von unter 50 % gehören Kopf-Hals-Tumoren, trotz verschiedener Therapieansätze, wie Chemo- und Radiotherapie, zu den aggressivsten Tumoren weltweit [129]. Global gibt es jährlich geschätzte 550.000 Neuerkrankungen und 300.000 Todesfälle [92]. Kopf-Hals-Tumoren haben viele unterschiedliche anatomische Lokalisationen. Zu diesen zählen die Lippen, die Mund- und Kieferhöhle, die Nase und Nasennebenhöhle, der Oropharynx (Mundrachen), der Hypopharynx (unterer Teil des Rachens) und der Larynx (Kehlkopf) [230]. 90 % der Kopf-Hals-Tumoren sind Plattenepithelkarzinome. Auch wenn die Tumoren histologisch sehr homogen erscheinen, werden Kopf-Hals-Tumoren aufgrund ihrer verschiedenen Lokalisationen als heterogen betrachtet [129]. Diese Krebsart wird typischerweise, als die Erkrankung von älteren Menschen angesehen. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt zwischen 60 bis 70 Jahren. In den letzten 30 Jahren konnte jedoch beobachtet werden, dass weltweit immer mehr junge Patienten (< 40-45 Jahre) mit Kopf-Hals-Tumoren diagnostiziert werden [92]. Die Erkrankungsrate von Männern ist 2- bis 3-mal höher als von Frauen [98]. Weltweit bilden Nasopharynxtumore die sechsthäufigste Krebserkrankung unter Männern [23]. Die meisten Fälle von Lippen- und Mundhöhlenkarzinomen gibt es in Melanesien, Süd- und Zentralasien sowie Zentral- und Osteuropa, wohingegen nur niedrige Erkrankungsraten in Westafrika und Ostasien zu finden sind. Nasopharynxkarzinome treten zu 92 % vor allem in ökonomisch schlecht entwickelten Ländern auf [98].

Risikofaktoren für die Entwicklung von Kopf-Hals-Tumoren sind Rauchen und Alkohol. Infektionen mit onkogenen Viren, fördern die Entwicklung von Tumoren im Kopf-Hals-Bereich zusätzlich [129]. Der Konsum von Tabak und Alkohol wirkt dabei synergistisch [62]. Alkohol kann auf die Schleimhaut als Lösungsmittel wirken und macht diese durchlässiger für Karzinogene. Der Metabolit Acetaldehyd kann Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Addukte bilden, welche mit der DNA-Synthese und Reparatur interferieren [139]. Tabak enthält bis zu 50 bekannte Karzinogene, wie zum Beispiel polyzyklische Kohlenwasserstoffe und Nitrosamine. Nichtsdestotrotz entwickelt nur ein Bruchteil der Raucher eine Malignität [62].

Humane Papillomaviren (HPV) werden je nach Lokalisation des Tumors in ungefähr 25 % der Fälle gefunden. Die höchste Prävalenz von HPV-positiven Tumoren haben Plattenepithelkarzinome des Oropharynx. Dabei handelt es sich meistens um den Typ HPV 16 [109]. Mundhöhlenkarzinome bei Männern sind assoziiert mit einem jungen Alter beim ersten sexuellen Kontakt, einer hohen Anzahl an Sexualpartnern, Genitalwarzen in der Anamnese und das Praktizieren von Oralsex. HPV spielt bei jungen Nichtrauchern ohne exzessiven Alkoholkonsum eine große Rolle für die Entwicklung von Kopf-Hals-Tumoren [62, 92]. HPV-positive Patienten haben eine bessere Prognose als HPV-negative Patienten [61].

Je nach geografischer Lage können weitere Faktoren das Risiko für Kopf-Hals-Tumoren erhöhen. Eine Studie aus Taiwan zeigte eine höhere Prävalenz von oralen Tumoren an der Wangeninnenseite, vermutlich verursacht durch das in asiatischen Ländern übliche Kauen der Betelnuss [92].

Ein junges Erkrankungsalter kann oft mit einer vererbten Prädisposition für Malignitäten zusammenhängen. Dazu gehören erbliche Syndrome wie Lynch-II Syndrom, Bloom Syndrom, Fanconi-Anämie, Xeroderma pigmentosum, Ataxia telangiectasia, und das Li-Fraumeni Syndrom [219]. Die autosomal rezessiv vererbte Fanconi-Anämie wird durch Defekte in mindestens 11 Genen verursacht, welche für die Erkennung und Reparatur von DNA-Schäden zuständig sind. Patienten mit Fanconi-Anämie haben ein 500- bis 700-Fach erhöhtes Risiko ein Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich zu entwickeln. Ungefähr 14 % entwickeln einen Kopf-Hals-Tumor bis zum 40.Lebensjahr, trotz fehlender Alkohol- und Tabakbelastung. Hochrisiko HPV-Typen konnten bei den meisten Fanconi-Anämie Patienten gefunden werden. Man vermutet, dass der Gendefekt die Sensitivität für HPV-vermittelte Tumorentstehung erhöht [62].

1.2 Therapieprinzipien von Kopf-Hals-Tumoren

Für Kopf-Hals-Tumoren im frühen Stadium wird eine chirurgische oder strahlentherapeutische Therapie empfohlen. Bei fortgeschrittenen oder irresektablen Tumoren wird eine Chemotherapie kombiniert mit einer Strahlentherapie durchgeführt. Es ist belegt, dass die Gabe eines Chemotherapeutikums zur Strahlentherapie einen Überlebensvorteil bringt [6, 26]. Zu den vorwiegend eingesetzten Chemotherapeutika zählen Cisplatin, Carboplatin, 5-Fluorouracil, Mitomycin C und die Gruppe der Taxane. Diese werden entweder einzeln oder in Kombination verabreicht [224]. Folgende Therapiemodi werden in der Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren angewendet: Induktionschemotherapie, neoadjuvante und adjuvante sowie palliative Chemotherapie. Die oben genannten Chemotherapeutika zielen auf keine spezifische Zielstruktur in Kopf-Hals-Tumoren ab. Sie decken eine Vielzahl an organischen Molekülen ab, welche einen breiten zytotoxischen Effekt aufweisen [19, 36, 232].

Ein neuer Ansatz für die Behandlung von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region stellt die Immuntherapie dar. In den letzten Jahren wurden Immuncheckpoint-Inhibitoren entwickelt, welche über spezifische Antikörper die Immunantwort stärken. Die T-Zell-Aktivierung erfolgt entweder durch „Major-histocompatibility complex“ (MHC)-II einer antigenpräsentierenden Zelle oder MHC-I einer Virus-infizierten Zelle oder Tumorzelle. Der Programmed-Death-1-Rezeptor (PD-1) gehört zu den molekularen Kontrollpunkten und reguliert die T-Zell-Aktivierung negativ [163]. Der PD-1-Inhibitor Nivolumab wurde 2017 zur Therapie von Cisplatin-resistenten Plattenepithelkarzinomen zugelassen [47].

1.3 Epithelial-mesenchymale Transition

Die Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) ist ein reversibler und komplexer biologischer Prozess. Die von apikal nach basal gerichtete Zellpolarität der Epithelzellen geht verloren. Der adhäsive Phänotyp verändert sich zum mesenchymalen Phänotyp, welcher durch eine verstärkte Zellmigration und ein erhöhtes Invasionspotenzial charakterisiert ist. Es kommt zusätzlich zu einer Umgestaltung des Zytoskeletts und einer erhöhten Resistenz für Apoptose [101, 212]. Die EMT ist physiologisch und notwendig bei der Embryogenese und Wundheilung. Von einer pathologischen EMT können Nierenzellen, Hepatozyten, das Epithel der Linse des Auges, das Endothel oder Kardiomyozyten betroffen sein. Dies führt zu Fibrosierung der Organe [200]. Solide Tumoren nutzen den Prozess der EMT zur Progression und Metastasierung. Krebszellen können somit Stammzell-ähnliche Zellen generieren, welche neben einer erleichterten Metastasierung eine Therapieresistenz aufweisen [32].

Das Schlüsselereignis der EMT ist der Verlust von epithelialen Cadherin (E-Cadherin). Dieses sorgt gemeinsam mit α- oder β-Catenin normalerweise für einen stabilen Zell-Zell-Kontakt [193]. E-Cadherin und neuronales Cadherin (N-Cadherin) repräsentieren die klassischen Cadherine vom Typ I. Der Verlust von E-Cadherin führt zu Krebswachstum durch erhöhte Proliferation, Invasion und Metastasierung. Über Zell-Zell-Kontakte stimuliert N-Cadherin die Migration und Invasion von Zellen. Das heißt ein erniedrigtes E-Cadherin und erhöhtes N-Cadherin fördern die Progression eines Tumors [146, 147, 235]. Die E-Cadherin-Expression kann entweder direkt oder indirekt durch mit EMT im Zusammenhang stehenden Faktoren beeinflusst werden. Der direkte Inhibitor Snail bindet an den Promotor von *CDH1*, welches für E-Cadherin kodiert und unterdrückt somit die Expression von E-Cadherin. Snail spielt unter anderem eine sehr wichtige Rolle in physiologischen EMT-Prozessen, wie der Gastrulation und der Formation der Neuralleiste [32]. Snail und Slug gehören der Snail-Familie von Transkriptionsfaktoren an. Die Bindung an E-Boxen geschieht bei beiden Transkriptionsfaktoren über C-terminale Zinkfingerdomänen, welche beispielsweise zu einer unterdrückten E-Cadherin-Synthese beim Mammakarzinom führt [148, 149].

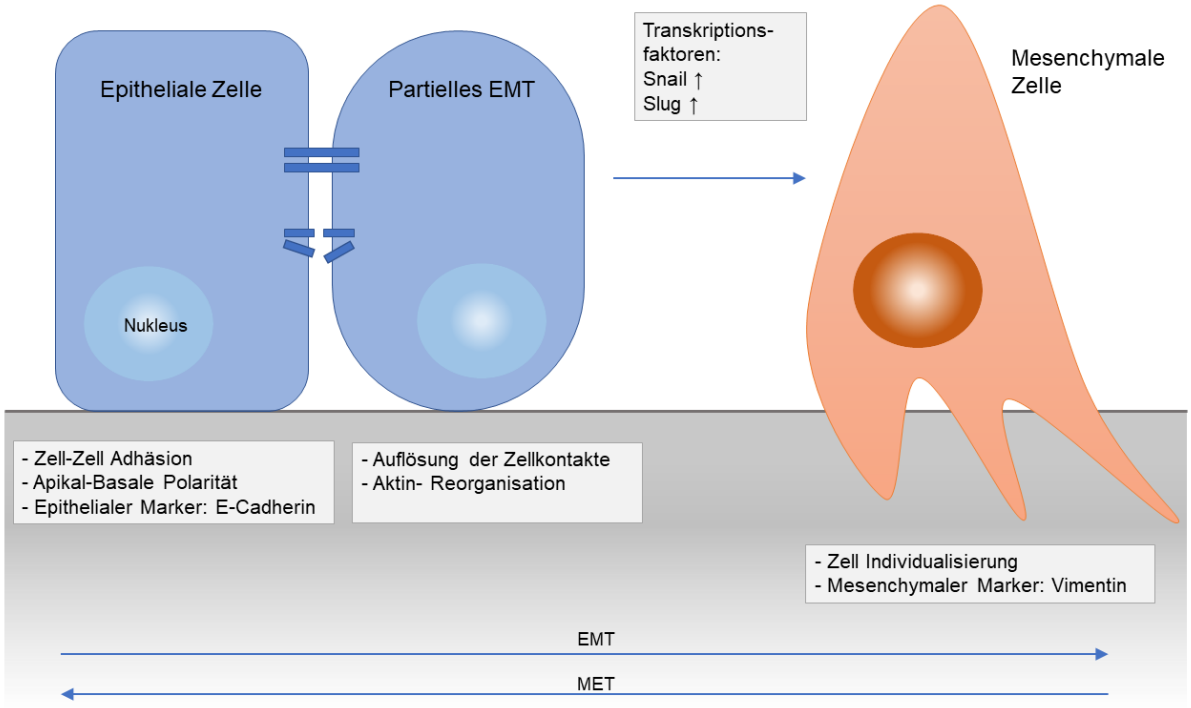


Abbildung 1: Zelluläre und molekulare Veränderungen assoziiert mit EMT

Links ist eine epitheliale intakte Zelle abgebildet, welche im Verlauf der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) ihre kubische Form verliert. Nach Aktivierung von Transkriptionsfaktoren entsteht eine nicht im Zellverband stehende mesenchymale Zelle, die durch die Basalmembran migrieren kann. Die mesenchymal-epitheliale Transition (MET) läuft in die gegenläufige Richtung ab. In diesem gegensätzlichen Prozess werden mesenchymale Zellen beispielsweise durch Zugewinn von Zell-Zell-Kontakten und einer apikal-basalen Zellpolarität zu epithelialen Zellen [110]. Abbildung erstellt mit Microsoft PowerPoint.

NF-κB (Nuclear factor kappa (κ)-light-chain enhancer of activated b cells) gilt als ein charakteristischer EMT-Induktor verschiedener solider Tumoren wie beispielsweise von Pankreas- oder Mammakarzinomen [90, 158]. Besonders Hoch-Risiko-Kopf-Hals-Tumoren sind mit einer Aktivierung von NF-κB-Signalwegen assoziiert [34]. Die NF-κB Untereinheit p65 beeinflusst speziell Snail, Slug und N-Cadherin [172, 229]. Typischerweise führt der Prozess der EMT zu einer vermehrten Expression mesenchymaler Marker, wie Vimentin, Snail, Slug und N-Cadherin. Werden sowohl epitheliale als auch mesenchymale Marker nachgewiesen, handelt es sich um einen intermediären Phänotyp der EMT. Das heißt, nur ein Teil der Zellen haben den Prozess von EMT vollständig durchlaufen (siehe Abbildung 1) [101]. Der mesenchymale Marker Vimentin ist stark mit Krebsprogression assoziiert und wird in Studien zur EMT häufig untersucht [17, 28, 118]. Vimentin kodiert für das

intermediäre Filament-Protein Typ III und bildet gemeinsam mit Mikrotubuli, Aktin und Mikrofilamenten das Zytoskelett. Es ist für die Erhaltung der Zellform und Integrität des Zytoplasmas, sowie für die Stabilisierung des Zytoplasmas verantwortlich [150].

1.4 Epigenetik

Epigenetische Modifikationen von DNA umfassen folgende 3 Mechanismen: DNA-Methylierung, Chromatinmodifikation und genomisches Imprinting. Die Methylierung findet an Cytosinen statt, welche sich 5‘ zu einem Guanosin befinden. Diese nennt man CpG (Cytosin-phosphatidyl-Guanin). Die Methylierung wird durch DNA-Methyltransferasen (DNMT) durchgeführt. CpGs sind im gesamten Genom unterrepräsentiert. Es gibt jedoch kurze Regionen, welche reich an CpGs sind und CpG-Inseln genannt werden [93]. Die Kriterien, die eine CpG-Insel erfüllen sollte, sind je nach Autor etwas anders definiert. Cross und Bird haben 1995 definiert, dass eine CpG-Insel ein Ausmaß an 500-1500 bp (Basenpaare) Länge und einem CpG-Verhältnis (beobachtet zu erwartet) von über 0,6 haben sollte. Diese CpG-Inseln sind häufig mit Promotoren assoziiert [37].
Die epigenetische Chromatinmodifikation betrifft Histone (H) wie H2A, H2B, H3 und H4. Am N-terminalen Ende der Histone können unterschiedliche Basenreste modifiziert werden [48]. Zu den Modifikationen zählen Methylierung, Phosphorylierung, Hydroxylierung und Ubiquitinylierung. Einer der wichtigsten Mechanismen ist die Acetylierung. Eine Lysin-Acetylierung führt beispielsweise zur Aktivierung der Genexpression, während eine Lysin-Methylierung meist zu einer Hemmung führt [108]. DNA-Methylierung und Histonmodifikation hängen bei der Beeinflussung der Genexpression eng miteinander zusammen. DNMTs rekrutieren Histon-Deacetylasen (HDAC), welche zu einer Histon-Deacetylierung und zur nachfolgenden transkriptionellen Unterdrückung führen. CpG-Insel-Promotor Methylierungen können zusätzlich Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen blockieren, wodurch die Bindung von Transkriptionsfaktoren verhindert wird. Somit führt die Methylierung von Promotoren (siehe Abbildung 2) zur Unterdrückung der Genexpressionen [93, 191].

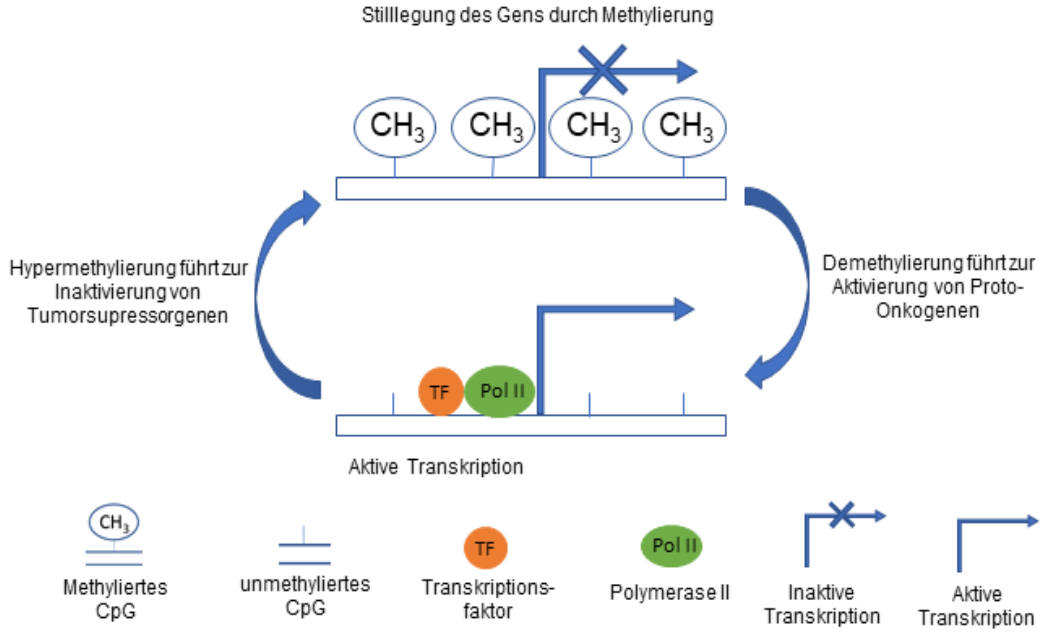


Abbildung 2: Einfluss von CpG-Methylierung auf Tumorgenese

Der Verlust der Methylierung der Promotoren von Proto-Onkogenen kann zur Aktivierung dieser und zur Krebsentstehung beitragen. Auf der anderen Seite können Tumorsuppressorgene durch Hypermethylierung inaktiviert werden [191]. Abbildung erstellt mit Microsoft PowerPoint. CH_3: Methylgruppe, CpG: Cytosin-phosphatidyl-Guanin, Pol II: Polymerase II, TF: Transkriptionsfaktor

Zum Zusammenhang von Methylierung und Genexpression gibt es einige Beispiele zu nennen. Es ist bekannt, dass das antiapoptotische Gen *BCL-2* („B-cell lymphoma 2“) bei chronisch lymphatischer Leukämie (CLL) niedrig methyliert und die Genexpression hoch ist [76]. Ein weiteres Beispiel für ein hypomethyliertes Gen ist *KRAS* (Kirsten Rat Sarcoma) bei Lungen- und Darmkrebs [54]. Das Retinoblastoma-Gen (*RB1*) ist das erste klassische Tumorsuppressorgen, welches in mehreren Fällen eine hypermethylierte CpG-Insel aufweist [68, 185]. Eines der wichtigsten regulatorischen Zellzyklusproteine ist p16. Der Verlust von p16 führt zu einer unkontrollierten Zellproliferation [114]. Eine Vielzahl von gut erforschten soliden Tumoren weisen eine Methylierung einer CpG-Insel in der 5‘ Region des p16 Gens auf. Eine Behandlung von Zelllinien, die ein hypermethyliertes p16 Allel aufweisen, mit dem demethylierendem Agens 5-Azacytidine, führt zu einer vermehrten Transkription von p16 [81, 132].

Alternative Promotoren

Die Komplexität des Säugetier-Proteoms wird unteranderem verursacht durch die Fähigkeit multiple Protein-Isoformen aus einem einzigen Genlokus zu bilden [222]. Eine Reihe verschiedener Mechanismen kann für eine veränderte Isoform-Expression ursächlich sein. Dazu gehören Prozesse, wie alternatives Splicing, die Nutzung von alternativen Startkodons, alternative Polyadenylierung und die Nutzung von alternativen Promotoren [42].

Alternative Promotoren sind lokalisiert innerhalb von Introns. Die Aktivierung führt über einen alternative Transkriptionsstartseite im Intron zur Expression alternativer RNA. Es handelt sich um eine „spatiotemporale" Genexpression [40, 42]. Dies bedeutet, dass in verschiedenen Zelltypen eines Organismus zu spezifischen Zeiten während der Entwicklung die Gene aktiviert werden [228].

Im Laufe der Evolution blieben nicht-kodierende Regionen mit wichtigen regulatorischen Funktionen erhalten und alternative Promotoren können als konservierte Regionen in Introns identifiziert werden. Genomweite Expressionsprofile sind für die Öffentlichkeit zugänglich und können weltweit genutzt werden, um Regionen mit potenziellen alternativen Promotoren und alternativen Exons zu identifizieren [122]. Kombinierte Analysen zu Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) und anschließend durchgeführten Next-Generation-DNA-Sequenzierungen der immunpräzipitierten DNA (ChIP-Seq) zeigen genomweit die Bindungsprofile von Histonmodifikationen und Transkriptionsfaktoren [105, 108]. Alternative Promotoren weisen typische Charakteristika für regulatorische Einheiten auf, welche in In-Silico-Analysen identifiziert werden können. Hochverdächtige regulatorische Regionen sind beispielsweise mit einem hohen Anteil an H3K27ac (Histon 3 und Acetylierung an Lysin 27) und RNA-Pol-II (Ribonukleinsäure Polymerase II) versehen [222]. Diese Regionen sind zusätzlich stark assoziiert mit CpG-Inseln [43].

Es stehen unterschiedliche Genom-Browser für eine In-Silico-Analyse zur Verfügung, wie zum Beispiel von der University of California Santa Cruz (UCSC: https://genome.ucsc.edu), vom European Research Council (ERC: https://ecrbrowser.dcode.org) oder von VISTA (http://genome.lbl.gov/vista) [72, 122, 130].

1.5 Die Bruton-Tyrosinkinase

Die Bruton'sche Tyrosinkinase (BTK) spielt eine wichtige Rolle in der B-Zell Entwicklung, Differenzierung und in weiteren Signalwegen. BTK ist für die Proliferation und das Überleben der B-Zellen notwendig. Die BTK-defiziente B-Lymphozyten können daher nicht reifen und keine Immunglobuline produzieren. Somit kann keine humorale Immunantwort stattfinden. Die daraus resultierende primäre Immundefizienz wird „X-linked-Agammagobulinämie" genannt [141].

Die BTK gehört zu der Tec-Familie der Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen und besteht aus mehreren konservierten Domänen. Am Amino-Terminus beinhaltet die „Pleckstrin-homology" (PH)-Domäne einige Phosphoinositid-Bindungsstellen. Die PH-Domäne erlaubt eine transiente Translokation der BTK vom Zytoplasma zur inneren Plasmamembran. Diese birgt Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP_3), welche durch die aktivierte Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) produziert wird. Die Translokation zur inneren Plasmamembran ist ein wichtiger Schritt für die Aktivierung der BTK, weil sie dadurch in räumliche Nähe zu Kinasen gelangt, die die BTK phosphorylieren und damit aktivieren kann [223]. Der PH-Domäne folgt die prolinreiche „Tec-homology" (TH)-Domäne. Diese gibt der BTK Stabilität. Am Carboxy-Terminus sind zwei „SRC-homology" (SRC: sarcoma and cellular; SH) - Domänen, SH2 und SH3, und eine C-Terminale-Kinase Domäne lokalisiert. SH2- und SH3-Domänen können mit prolinreichen Sequenzen oder phosphorylierten Tyrosinen interagieren [24].

Die komplexen Effekte der BTK-Aktivierung sind am besten in den Signalwegen des B-Zell-Rezeptors untersucht. Nach Aktivierung des B-Zell-Rezeptors wird die BTK-Kinasedomäne durch Kinasen der Src-Familie wie LYN und SYK (Lck/Yes „novel tyrosine kinase" bzw. „spleen tyrosine kinase") an der Position Y551 phosphoryliert. Die somit verstärkte katalytische Aktivität von BTK führt zur Autophosphorylierung an Position Y223 der SH3-Domäne [165]. Durch die PH-Domäne wird BTK zur inneren Plasmamembran transloziert, während PI3K zur selben Zeit PIP_3 erzeugt. Über die Kinasedomäne werden nachgeschaltete Faktoren wie die Phospholipase Cγ2 (PLCγ2) aktiviert. PLCγ2 produziert Inositol-Triphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG). Aufgrund einer Calciumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum, kommt es zu einem erhöhten intrazellulären Calciumspiegel. DAG führt zur Aktivierung von Proteinkinase Cβ (PKCβ).

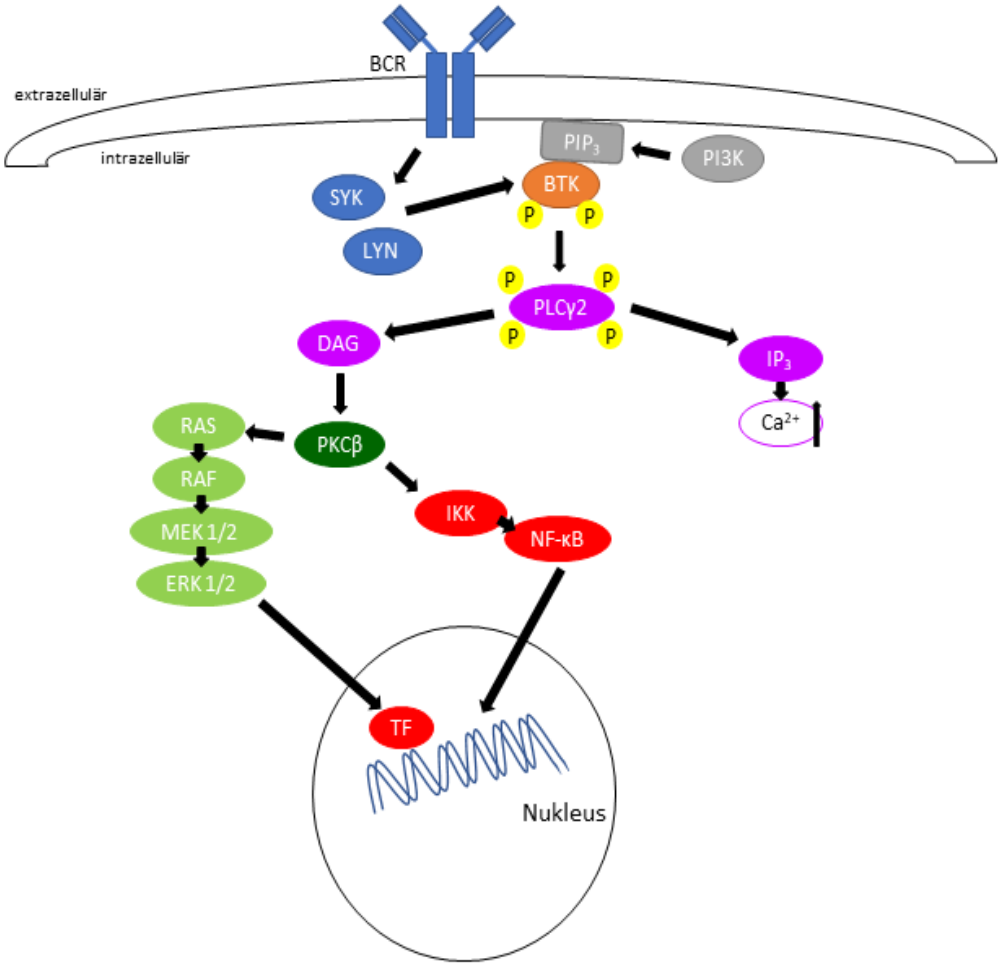


Abbildung 3: Signalwege des B-Zell-Rezeptors

Die Aktivierung des B-Zell Rezeptors (BCR) führt zur Aktivierung der BTK durch Bindung an PIP_3 an der inneren Zellmembran und Phosphorylierungen an einigen Tyrosinresten. Die BTK aktiviert stromabwärts Faktoren wie PLCγ2, was zu einer IP_3 und DAG Produktion führt. Über IP_3 steigt die Calciumkonzentration im Zytoplasma. Über DAG wird PKCβ und folglich der RAS/RAF/MEK/ERK-Signalweg aktiviert. PKCβ und ERK aktivieren einige Transkriptionsfaktoren (TF) und unter anderem NF-κB. [24, 57, 80, 107, 177 ,223]. Abbildung erstellt mit Microsoft PowerPoint.

BCR: B-Zell-Rezeptor, BTK: Bruton'sche Tyrosinkinase, Ca^{2+}: Calcium, DAG: Diacylglycerol, ERK: extracellular signal–regulated kinases, IKK: Inhibitor-κB-Kinase, IP_3: Inosintriphosphat, LYN: Lck/Yes novel tyrosine kinase, MEK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase, NF-κB: Nuclear faktor κ light chain enhancer of activated B cells, P: Phosphat, PIP_3: Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat, PI3K: Phosphoinositid-3-kinase, PLCγ2: Phospholipase Cγ2, PKCβ: Proteinkinase β, RAF: rapidly accelerated fibrosarcoma, RAS: Rat sarcoma, SYK: spleen tyrosine kinase, TF: Transkriptionsfaktor

Dies führt einerseits zur Aktivierung des Proliferation fördernden Signalwegs RAS/RAF/MEK/ERK (Rat sarcoma/ rapidly accelerated fibrosarcoma/ Mitogen-aktivierte Proteinkinase/ extracellular signal–regulated kinases), andererseits zur Aktivierung von NF-kB [57, 80]. Außerdem rekrutiert BTK weitere Proteine, welche die eigene Expression begünstigen und zu einer Reorganisation der Aktin-Filamente führen [177] (siehe Abbildung 3).

1.6 BTK in soliden Tumoren und die BTK-Isoformen

Verschiedene Forschungsgruppen zeigen, dass BTK in soliden Tumoren der Brust, der Prostata, des Kolons oder des Magens exprimiert wird. In Zelllinien von Mamma-, Prostata- und Magenkarzinomen kann sowohl auf mRNA-Ebene (Messenger Ribonukleinsäure), als auch auf Proteinebene eine Überexpression von BTK im Vergleich zu gesunden Zelllinien nachgewiesen werden [51, 66, 70, 107, 226]. Bei Prostatakarzinomen korreliert die BTK-Expression mit dem Differenzierungsgrad des Tumors. Ein invasives Prostatakarzinom weist eine höhere BTK-Expression auf als ein benigner Prostatatumor [70].

Es werden 3 verschiedene Isoformen von BTK unterschieden. Die Isoform p77 wird in sich normal entwickelnden B-Zellen sowie auch in weiteren Zelltypen des hämatopoetischen Systems exprimiert, während die zwei Isoformen p65 und p80 tumorassoziiert sind [51]. Die BTKp*80*-Isoform weist in soliden Tumoren in ihrer mRNA ein alternatives erstes Exon auf und wird von einem alternativen Promotor reguliert [51, 66, 107]. Es ist bekannt, dass die Aktivierung von alternativen Promotoren in Introns zur Expression von alternativen ersten Exons sowie zu einer veränderten transkriptionellen Aktivität in Introns führt [42, 222].

Das erste Exon (1C) der BTKp80-Isoform befindet sich in Mammakarzinomzellen vorgeschaltet vor dem Exon 1 der B-Zellspezifischen Isoform p77 genannt. Das Exon 1C weist 2 Startcodons auf. Wird das erste Startcodon genutzt kommt es zu einer Verlängerung von 34 Aminosäuren am Aminoterminalen-Ende des Proteins (Abbildung 4). Das Molekulargewicht des Proteins liegt bei 80 kDa (Kilodalton). Die BTKp80-Isoform entsteht durch alternatives Splicing am Ende des Exon 1C und an der Akzeptorstelle des beginnenden Exon 2. Somit ist das Exon 1A (der BTKp77-Isoform) nicht enthalten [51]. Dieselbe BTKp80-Isoform kann in Prostatakarzinomzellen identifiziert werden [107]. Die kürzere Isoform p65 kann in

Zelllinien und Tumorgewebe von Kolonkarzinomen nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen zeigen, dass die BTKp65-Isoform von einem alternativen Exon exprimiert wird, welches Exon 1b genannt wird. Dieses Exon ist stromaufwärts vom Exon der BTKp77-Isoform lokalisiert. Der BTKp65-Isoform fehlt ein großer Teil der PH-Domäne, sodass eine Rekrutierung zur inneren Plasmamembran nicht möglich ist. Deshalb geht man im Vergleich zur BTKp77-Isoform von einer anderen Regulation und Aktivierung der BTKp65-Isoform aus [66]. Wie die Aktivierung der BTKp80-Isoform erfolgt, ist ebenfalls noch unbekannt.

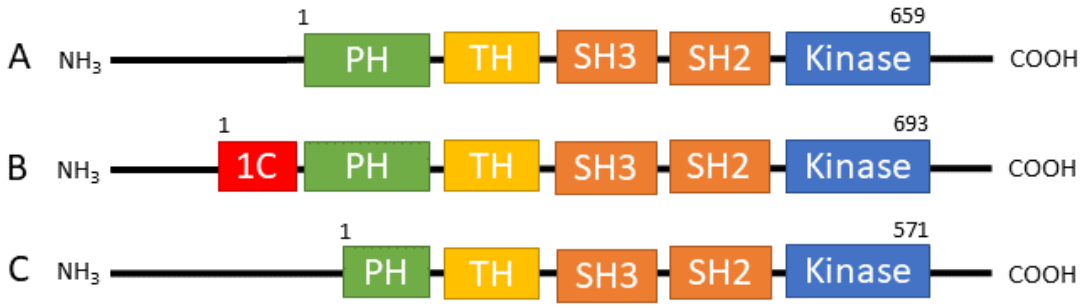


Abbildung 4: Schematischer Aufbau der BTK-Isoformen

A Die. BTKp77-Isoform, welche in B-Zellen und anderen hämatopoetischen Zellen exprimiert wird, enthält 659 Aminosäuren. Sie enthält alle Domänen, welche zuvor beschrieben wurden (siehe Kapitel 1.6). **B**. Die BTKp80-Isoform kommt beispielsweise bei Brust- und Prostatakrebs vor. Diese Isoform enthält eine 34 Aminosäuren lange Verlängerung am aminoterminalen Ende (NH_3) des Proteins. Dies führt zu einem molekularen Gewicht von 80 kDa. **C** Die BTKp65-Isoform besteht aus 571 Aminosäuren, verursacht durch den Verlust eines großen Teils der PH-Domäne. Dies beeinflusst möglicherweise die Translokation zur Membran und die Aktivierung. Eine andere Regulation und Aktivierung dieser Isoform wird vermutet [51, 66, 107]. Abbildung erstellt mit Microsoft PowerPoint. COOH: Carboxygruppe, NH_3: Ammoniak PH: Pleckstrin-Homologie, SH: SRC-Homologie, TH: Tec-Homologie, 1C: Exon 1C

1.7 Die Rolle von Adenosin und Adenosinrezeptoren in soliden Tumoren

Die Wechselwirkung von malignen Zellen und deren Mikromilieu leistet einen wesentlichen Beitrag zur Krebsentwicklung und Progression [9]. Adenosin bildet gemeinsam mit Adenosintriphosphat (ATP) einen wichtigen autokrinen und parakrinen Botenstoff [5]. Die Akkumulation von Adenosin in der Tumorumgebung führt zu einer Immunsuppression, welche begünstigend für die Entwicklung von

Neoplasien ist [192]. Zwei wichtige Prozesse der Immunevasion sind die intratumorale Differenzierung von inflammatorischen mononukleären Phagozyten vom Typ 1 (M1) zu immunregulierenden und Angiogenese fördernden mononukleären Phagozyten Typ 2 (M2), sowie die Infiltration des Tumors mit regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) [9]. Adenosin tritt nicht nur aufgrund des ischämischen und hypoxischen Tumormikromilieus vermehrt auf, sondern die Ausschüttung kann, während der Tumorprogression, auch aktiv durch spezifische genetische Mutationen verstärkt sein [117].

Die zwei Ektonukleotidasen CD39 und CD73 („Cluster of differentiation“ 39 und 73) bilden aus ATP Adenosin. Adenosin kann im Extrazellulärraum auf vier verschiedene Adenosinrezeptoren wirken: A1, A2A, A2B, und A3 Rezeptor [5]. A1 und A3 Rezeptoren sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren vom Gi-Typ („i“ steht für Inhibition), welche die Adenylatzyklase und die Produktion zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP) hemmen. Der A1 Rezeptorsubtyp wird, wie in Mammakarzinom-Zelllinien auf Tumorzellen exprimiert. Die Aktivierung führt zu einer vermehrten Proliferation durch Herunterregulierung von p27, einem Cyclin-abhängigen Kinase (CDK) Inhibitor und Hochregulierung von CDK4 [137]. Im Gegensatz dazu induziert die Aktivierung von A3-Rezeptoren auf Prostatazelllinien einen Zellzyklusarrest. Dies geschieht durch Herabregulierung von CDK4 und Cyclin D1 und die verstärkte Exprimierung von p53 [3]. A2A und A2B gehören zu den Gs-gekoppelten-Rezeptoren, welche die cAMP Synthese anregen („s“ steht für Stimulation) [5]. Die Aktivierung von A2A und A2B auf Immunzellen führt zu immunsuppressiven Effekten durch cAMP/PKA (Proteinkinase A) vermittelte Inhibition von NF-κB, TCR („T-cell-receptor“) und JAK-STAT („Januskinase/Signal transducer and activator of transcription“) Signalwegen [5]. Der A2A-Rezeptor ist für die verringerte zytotoxische Wirkung von T-Zellen und für die vermehrte Differenzierung von regulatorischen T-Zellen verantwortlich [88].

Die Stimulierung von A2B auf Monozyten führt zur Ausbildung von ungewöhnlichen dendritischen Zellen, welche einen veränderten Immunzell-Phänotyp aufweisen. Der dendritische Zell-Marker CD1a ist nur schwach exprimiert, während der Monozyten-Marker CD14 erhalten bleibt. Dieser kommt normalerweise nicht auf dendritischen Zellen vor [9].

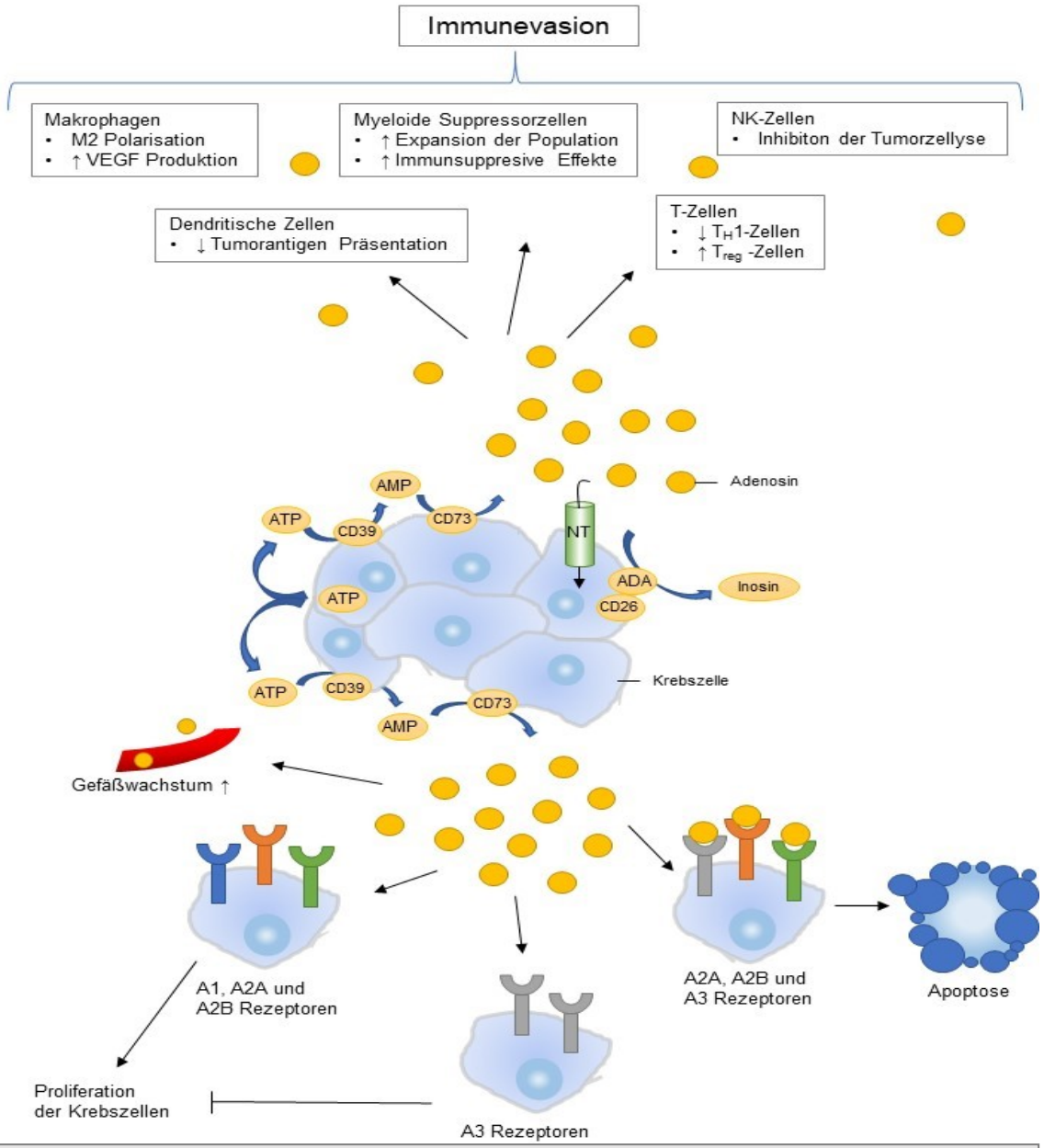


Abbildung 5: Bildung und Wirkung von Adenosin

Der Adenosin-Signalweg bildet eine immuntolerante Tumorumgebung, durch die Regulation von immun- und inflammatorischen Zellen, wie Makrophagen, Dendritischen Zellen, myeloide Suppressorzellen, T-Zellen und natürlichen Killerzellen. Die Signalwege von Adenosin regulieren Krebswachstum und Disseminierung durch den Eingriff in Zellproliferation, Apoptose und Angiogenese mithilfe von Adenosinrezeptoren, welche jeweils auf Krebszellen und Endothelzellen exprimiert sind. Solide Tumoren haben eine hohe Expression von CD39 und CD73 sowie eine niedrige Expression von Nukleosid-Transportern (NT), ecto-Adenosindeaminase und deren Kofaktor CD26, was zu einem erhöhten Adenosin vermittelten Signalen in der Tumorumgebung führt [9]. Abbildung erstellt mit Microsoft PowerPoint.

ADA: Adenosine Deaminase; AMP: Adenosinmonophosphat, ATP: Adenosintriphosphat CD: Cluster of Differantiation, M2: Makrophagen Typ 2, NK: Natürliche Killerzellen, T_H1: T-Helferzellen 1, T_{Reg}, regulatorische T-Zellen, VEGF: vascular endothelial growth factor

Diese ungewöhnlichen dendritischen Zellen fördern die Angiogenese durch erhöhte VEGF-Produktion (vascular endothelial growth factor) [9]. Akkumuliert Adenosin bei malignen Prozessen können Tumorzellen dem Immunsystem entfliehen (siehe Abbildung 5).

Neben der immunsuppressiven Effekte der A2B-Aktivierung auf Immunzellen sind für die Verbreitung eines Tumors bei der Expression von A2B auf Tumorzellen andere Signalwege verantwortlich [20]. Dazu gehört, dass die Aktivierung von ADORA2B (Adenosinrezeptor A2B) auf Tumorzellen zur Unterdrückung der Isoprenylierung des RAS-verwandten Protein 1 führt. Dies verhindert eine Zell-Zell-Adhäsion in Zelllinien von Brust-, Lungen- oder Pankreaskrebs [159].

Ein weiterer Mechanismus der zur vermehrten Zellproliferation, Invasivität und Motilität von Tumorzellen beiträgt, ist die Erhöhung der Fra-1-Komponente (FOS-related- antigen 1) des Transkriptionsfaktors AP-1 (Aktivator-Protein 1). Dies wurde in Mammakarzinom-Zellen festgestellt [46]. Außerdem wird die Beeinflussung der Metastasierung der Aktivierung von MAPK abhängigen Signalwegen zugeschrieben [20, 138]. In Osteosarkomzellen wird gezeigt, dass Apoptose durch den intrinsischen Signalweg über Herabregulierung von *BCL-2* und *BCL-2L1* („B-cell lymphoma 2 bzw. 2 like 1“*)* stimuliert wird*.* Adenosin kann somit die Proliferation, Apoptose und Metastasierung von Tumorzellen direkt beeinflussen [9]. Verschiedene Tumorentitäten, wie zum Beispiel Kolorektal- oder Prostatakarzinome, exprimieren Adenosinrezeptoren [113]. Der Rezeptor A2B wird immunhistochemisch erhöht in neoplastischen kolorektalen Gewebeproben im Vergleich zu gesunden Gewebeproben nachgewiesen. Western Blot und qRT-PCR („quantitative real time polymerase chain reaction“) Analysen ergeben, dass A2B besonders unter hypoxischen Bedingungen hochexprimiert wird [125]. In Prostatakarzinomzellen zeigen die gleichen Methoden nach Stimulierung des A2B-Rezeptors eine Erhöhung der Proliferation. Dieselbe Studie kann Proliferationsraten von Prostatakarzinom-Zelllinien durch den selektiven Antagonisten PSB-603 hemmen [234].

In Bezug auf Kopf-Hals-Tumoren wurde festgestellt, dass ADORA2B im Vergleich zu normalen oralen Keratinozyten auf mRNA- und Proteinebene in verschiedenen oralen Plattenepithelkarzinom (OSCC) Zelllinien hochreguliert ist. Bereits 24 Stunden (h) Inkubation von Plattenepithelzelllinien unter hypoxischen Bedingungen zeigt eine Hochregulierung von ADORA2B-mRNA. Außerdem senkt die gleiche

Gruppe die Proliferation der Tumorzellen durch eine Suppression von ADORA2B mittels einer shRNA („small hairpin“ Ribonukleinsäure) signifikant [82]. Ähnliche Ergebnisse werden bei der Kopf-Hals-Tumorzelllinie UD-SCC 1 (Universität Düsseldorf- squamous cell carcinoma 1) erreicht. Die ADORA2B-Suppression mithilfe einer shRNA führt zu einem verminderten Tumorwachstum, erniedrigten Proliferationsindex, sowie zur geringeren tumorinduzierten Vaskularisation [237].

1.8 Ziele der Arbeit

Da Kopf-Hals-Tumoren mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet sind, besteht ein hoher Forschungsbedarf zur Entwicklung neuer Therapien zur Behandlung dieser. Diese Arbeit befasst sich mit zwei Proteinen, nämlich ADORA2B und BTK, die kürzlich in unserer Arbeitsgruppe als Kopf-Hals-Tumoren relevante Onkogene beschrieben wurden.

Ziel dieser Arbeit war es:

1.) den Einfluss der Kopf-Hals Tumor assoziierten Onkogene auf den Prozess der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) zu untersuchen. Dieser Prozess ist gekennzeichnet durch den Verlust von epithelialen und den Zugewinn von mesenchymalen Eigenschaften, welche die Migration und Dissemination von soliden Tumoren erlauben [110].

2.) zu untersuchen, ob epigenetische Faktoren zur Expression von BTK in Kopf-Hals-Tumoren beitragen. Da eine Modifikation der Methylierung von Genen zu einer Veränderung der Genexpression führt [191], sollte diese hinsichtlich der Expression von BTK in Kopf-Hals Tumoren untersucht werden

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien und Ethikvoten

Plattenepithelkarzinom-Zelllinien vom Kopf-Hals-Bereich (Adhärente Zellen)

Tabelle 1 Adhärente Plattenepithelkarzinom-Zelllinien. *HPV: Humane Papillomaviren, UD-SCC: Universität Düsseldorf- squamous cell carcinoma, TNM: Tumorgröße – Anzahl befallener Nodi bzw. Lymphknoten - Metastasierung*

Zelllinie	Tumorlokalisation der Probe	Alter, Geschlecht	TNM	HPV-16 status
UD-SCC 1	Zungenspitze	64, männlich	T3N2bM0	negativ
UD-SCC 5	Supraglottis	44, männlich	T2N2cM0	negativ
UD-SCC 6	Zunge	64, männlich	T3N0M0	negativ

B-Zelllinien (Suspensionszellen)

Tabelle 2 Suspensionszelllinien. *ACC: American cellular corporation, ATCC: American Type Culture Collection, CRL: cell repository line, DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*

Name	ATCC/DSMZ Nummer	Ursprung
Namalwa	CRL-1432	B-Lymphoblasten eines Burkitt-Lymphoms Epstein-Barr Virus negativ
Ramos	CRL-1596	B-Lymphoblasten eines Burkitt-Lymphoms Epstein-Barr Virus negativ
Preb1	ACC-354	Humanes B-Zelllymphom

Probanden der CD19+ Isolation

Tabelle 3 Probanden der CD19+ Isolation. *CD: Cluster of differentiation*

Spender	Geschlecht	Alter (Jahre)	Verwendung
1	weiblich	34	Pyrosequenzierung
2	weiblich	65	Pyrosequenzierung und Western Blot
3	weiblich	24	Pyrosequenzierung und Western Blot
4	männlich	23	Western Blot

Ethikvoten

Die Zelllinien in Tabelle 1 wurden von primären Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs an der Universität Düsseldorf etabliert [116]. Ein entsprechendes Votum zur Nutzung dieser Zelllinien für experimentelle Zwecke lag der örtlichen Ethikkommission vor (Universität Ulm 219/17). Die in Tabelle 2 aufgeführten Zelllinien wurden kommerziell erworben. Die freiwilligen Blutspender (Tabelle 3) wurden über die experimentelle Nutzung der Zellen aufgeklärt. Ein entsprechendes Votum der örtlichen Ethikkommission lag vor (Universität Ulm 90/15).

2.1.2 Geräte, Materialien, Reagenzien und Programme

Tabelle 4 Verwendete Geräte unter Angabe des Unternehmens.

Geräte	Unternehmen
Biofuge pico (Zentrifuge)	Heraeus, Hanau, Deutschland
Centrifuge 5424 R (Zentrifuge)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5810 R (Zentrifuge)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Chemi Doc MP Imaging System (Western Blot Bildgebung)	Biorad Laboratories Inc, Hercules/Kalifornien, USA
Gallios Flow Cytometer (Durchflusszytometer)	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Hera freeze (-80°C) (Gefrierschrank)	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
Hera Safe Laminar flow hood (Sterile Werbank)	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
IKA MS 3 basic Kleinschüttler	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
Incubator Hera cell 250 (Inkubator)	Heraeus, Hanau, Deutschland
lab dancer S40 (Schüttler)	VWR International, Pennsylvania, USA
Labcycler Basic & Gradient (Thermocycler)	SensoQuest GmbH, Göttingen, Deutschland
LightCycler 96 (Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion	Roche, Basel, Schweiz
Mikroskop Olympus CK30	Olympus, Shinjuku, Tokio, Japan
Mikroskop Zeiss Axio Observer D1	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Multipipette Xstream Physio care concept	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Nano Quant Plate Tm (Platte zur Messung der DNA-Konzentration)	Tecan, Männedorf, Deutschland
Neolab rocking shaker DRS-12 (Schüttler)	NeoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Pipetus (Pippetierhelfer)	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland

Power Pac 300 (Spannungsgerät)	Biorad Laboratories Inc., Hercules/Kalifornien, USA
PowerPac Universal Power Supply PowerPac HV High-Voltage Power Supply (Spannungsgerät)	Biorad Laboratories Inc., Hercules/Kalifornien, USA
Premium NoFrost (-20°C) (Kühlschrank)	Liebherr, Bulle, Schweiz
Scotsman Frimont AF 80 (Eismaschine)	Scotsman Ice Srl, Mailand, Italien
SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulphat-Precast Polyacrylamide Gel Electrophoresis) Spannungsgeräte: Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell	Biorad Laboratories Inc., Hercules/Kalifornien, USA
see saw rocker SSL4 (Schüttler)	Stuart/Cole Parmer, Staffordshire, England
Stickstofftank	MIT Industriegase AG, Braunfels, Deutschland
TC 20 Automated Cell Counter (Automatischer Zellzähler)	Biorad Laboratories Inc., Hercules/Kalifornien, USA
Tecan infinite M200 Pro (Multimode-Platten-Reader)	Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz
Thermocycler peqSTAR 96X Universal Gradient	VWR International GmbH, Pennsylvania, USA
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Waage BP 2100 OCE	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5 Verbrauchsmaterial mit Angabe des Unternehmens

Material	Unternehmen
15 ml High-Clarity Polypropylene Conical Tube	Falcon A Corning Brand, Corning, New York, USA
5 ml Polystyrene Round Bottom Tube, BD Falcon	BD Biosciences Discovery Labware, Bedford, USA
50 ml Polypropylene Conical Tube	Falcon A Corning Brand, Corning, New York, USA
Amersham Protran 0,45 µM NC Nitrocellulose Blotting Membrane (Membran für Western Blot)	GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA
Art Tips (1000 µl) (Pipettenspitzen)	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
Cellstar, 100/20 mm (Zellkulturschale)	greiner bio one, Kremsmünster, Österreich
Combitips Advanced 0,5 ml (Pipettenspitzen)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Counting Slides, Dual Chamber for Cell Counter (Zählkammern)	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules/Kalifornien, USA
Dualfilter 10 µl M, PCR clean/sterile (Pipettenspitzen)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
EasySep Magnet (Magnet)	Stemcell Technologies, Vancouver, Kanada
Incubation Tray, transparent body and lid, 9x11 cm (Inkubationsbox)	Advansta Inc., Menlo Park, USA
Lab Equip, Test Tube 12 x 75 (Durchflusszytometrie-Tube)	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Leucosep Tube 50 ml, Conical Bottom, Porous Barrier	greiner bio one, Kremsmünster, Österreich
LightCycler 480 Multiwell Plate 96, white (Platte für quantitative Echtzeit Polymerasen-Kettenreaktion)	Roche, Basel, Schweiz

LightCycler 480 Sealing Foil (Klebefolie)	Roche, Basel, Schweiz
Microplate 96 Well, PS, F-Bottom (Chimney Well) Clear Non-Binding (Mikroplatte für Proteinmessung)	greiner bio one, Kremsmünster, Österreich
Microtube Biosphere plus Safe Seal 1,5 ml und 2,0 ml (Mikroreaktionsgefäß)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Nunc EasYFlask 75cm^2, Nunclon Delta Surface (Zellkulturflasche)	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
PCR SingleCap 8er – Soft Strips 0,2 ml, farblos (Mikroreaktionsgefäße)	Biozym Scientific GmbH, Hessisches-Oldendorf, Deutschland
PyroMark Q96 Cartridge (Kartusche)	Qiagen, Hilden, Deutschland
RT2 PCR Array Loading Reservoir (Beladungsreservoir)	Qiagen, Hilden, Deutschland
Safety Multifly 21G (Butterfly)	Sarstedt, Nümbrecht , Deutschland
SDS-PAGE- Gelkammer	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules/Kalifornien, USA
SDS-PAGE-Gelträger	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules/Kalifornien, USA
SDS-PAGE-Glasplatten	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules/Kalifornien, USA
S-Monovette 10 ml 9NC (Blutröhrchen)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Sterile 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml Stripette, serological Pipettes (Pipetten)	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
TipOne Pipette tips (10/20 µl, 100 µl, 200 µl) (Pipettenspitzen)	USA Scientific, Inc., Orlando, USA
Tissue Culture Flask 150cm^2 (Zellkulturflasche)	Falcon A Corning Brand, Corning, New York, USA

Medien, Puffer, Reagenzien

Tabelle 6 Verwendete Medien, Puffer und Reagenzien mit Angabe des Unternehmens

Medien, Puffer, Reagenzien	Unternehmen
4x Laemmli Sample Buffer (Lämmli-Puffer)	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules/Kalifornien, USA
Ammoniumpersulfat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ampuwa - destilliertes Wasser (H_2O)	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland
autoMACS Rinsing Solution + MACS BSA Stock Solution (Magnetic Activated Cell Sorting)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
AVL-292 (BTK-Inhibitor)	Axon Medchem B.V., Groningen, Niederlande
Biocoll Separating Solution (Separationsmedium)	Merck /Biochrom, Berlin, Deutschland
cOmplete Mini, Protease inhibitor cocktail tablets (Proteaseinhibitor)	Roche, Basel, Switzerland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium (+)4,5g/L-Glutamine, (+) L-Glutamine (-) Pyruvate add 10 % FBS (fetales Kälberserum) an 1 % Penicillin and Streptomycin	Gibco Life Technologies, Carlsbad, California, USA
DPBS, Dulbecco's Phosphate Buffer Saline, (-) $CaCl_2$, (-) $MgCl_2$ (Calciumchlorid, Magnesiumchlorid)	Gibco Life Technologies, Carlsbad, California, USA
Ethanol	Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, USA
FBS Superior (fetales Kälberserum)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Glycin	BioFroxx, Einhausen, Deutschland

Human high methylated genomic DNA (Hoch-methylierte DNA)	EpigenDx, Inc., Hopkinton, USA
Human low methylated genomic DNA (Niedrig-methylierte DNA)	EpigenDx, Inc., Hopkinton, USA
HyperLadder 100bp (Marker für Molekulargewicht)	Bioline GmbH, Luckenwalde, Deutschland
Isopropanol	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Kodan tinktur forte (Desinfektionsspray)	Schülke & Mayr, Norderstedt, Deutschland
Methanol	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Midori Green Advance (DNA Farbstoff)	Biozym, Hessisch-Oldendorf, Deutschland
PE-Cy™7 Mouse Anti-Human CD19 (CD19-Marker)	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA
PhosSTOP EASYPack (Dephoshorylierungsschutz)	Roche, Basel, Switzerland
Precision Plus Protein Standards-Dual Color Standards (Proteinmarker)	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules/Kalifornien, USA
Primer für qRT-PCR und Pyrosequenzierung	biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland
PSB-603 (ADORA2B-Antagonist)	Tocris Bioscience, Bristol, UK
Puromycin (2 mg/ml)	Merck /Biochrom, Berlin, Deutschland
PyroMark Annealing Buffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
PyroMark Binding Buffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
Restore PLUS Western Blot Stripping Buffer (Stripping-Puffer)	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
RIPA Lysis and Extraction Buffer (Radioimmunopräzipitations assay)	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1) (Acrylamid mix)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

RPMI Medium 1640 (+) L-Glutamine (Roswell Park Memorial Institute)	Gibco Life Technologies, Carlsbad, California, USA
SeaKem LE Agarose (Agarose-Pulver)	Lonza, Basel, Switzerland
Skim Milk powder (Magermilchpulver)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sodiumdodecylsulphat (SDS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Streptavidin Sepharose High Performance beads (Streptavidin-Beads)	GE Healthcare, Chicago, USA
SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Entwicklerlösung)	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris for molecular biology (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Trypan Blue Solution (0,4 %) (Trypanblau)	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Trypsin/EDTA Solution (Ethylendiamintetraessigsäure)	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Türks solution for leucocyte counting (Türks-Lösung)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tween 20 for molecular biology	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
ZellShield	Minerva Biolabs, Berlin, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, St.Louis, Missouri, USA

Kits

Tabelle 7 Verwendete Kits mit Angabe des Unternehmens

Kit	Unternehmen
AllPrep DNA/RNA Mini Kit (DNA- und RNA-Isolations Kit)	Qiagen, Hilden, Deutschland
EasySep Human B Cell Isolation Kit (CD19-Isolations-Kit)	Stemcell Technologies, Vancouver, Kanada
EpiTect Bisulfite Kit (Bisulfit-Konversions-Kit)	Qiagen, Hilden, Deutschland
Pierce BCA Protein Assay Kit (Kit für Proteinmessung)	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
PyroMark Gold Q96 Reagents (Kit für Pyrosequenzierung)	Qiagen, Hilden, Deutschland
PyroMark PCR Kit (Polymerasenkettenreation-Kit)	Qiagen, Hilden, Deutschland
QuantiNova Reverse Transcription Kit (Kit zur komplementär DNA-Umschreibung)	Qiagen, Hilden, Deutschland
QuantiNova SYBR Green PCR Kit (Kit für quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion)	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit (RNA-Isolierung)	Qiagen, Hilden, Deutschland

Software

Tabelle 8 Verwendete Software-Anwendungen mit Angabe des Unternehmens

Software	Unternehmen
GraphPad Software (Erstellung von Graphen und Statistikberechnung)	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
ImageLab (Western Blot Detektion und Quantifizierung)	BioRad Laboratories, Hercules, California, USA
Kaluza Analysesoftware (Durchflusszytometrie)	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Magellan Software (Proteinquantifizierung)	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
Microsoft Office 365 (Word, Excel, PowerPoint)	Microsoft, Redmond/Washington, USA
PyroMark Assay Design	Qiagen, Hilden, Deutschland
Tecan i-control 1.10 for infinite reader (DNA-Quantifizierung)	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
Zen 2.3 (Software des Mikroskops)	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland

2.1.3 Western Blot – Puffer, Gele und Antikörper

Tabelle 9 Upper und Lower Puffer. *H_2O: destilliertes Wasser, HCl: Chlorwasserstoff, SDS: Sodiumdodecylsulphat, Tris: Tris(hydroxymethyl)aminomethan*

Upper Puffer (500 ml) pH 6,8	Lower Puffer (1l) pH 8,8
0,5 M Tris (30,3g)	1,5 M Tris (181,7g)
0,4 % SDS (2g)	0,4 % SDS (4g)
350 ml H_2O	750 ml H_2O
pH einstellen mit HCl auf 6,8	pH einstellen auf 8,8
150 ml H_2O	250 ml H_2O

Tabelle 10 10x SDS Puffer und den Transferpuffer. *H_2O: destilliertes Wasser, HCl: Chlorwasserstoff, SDS: Sodiumdodecylsulphat, Tris: Tris(hydroxymethyl)aminomethan*

10x SDS Laufpuffer (1l)	Transferpuffer (2l)
30,3 g Tris	6 g Tris
144 g Glycin	28,8 g Glycin
10 g SDS	400 ml Methanol
1000 ml H_2O	1600 ml H_2O

Tabelle 11 TBS und TBS-T (Tris-buffered saline ohne und mit Tween 20) *H_2O: destilliertes Wasser, HCl: Chlorwasserstoff, NaCl: Natriumchlorid, SDS: Sodiumdodecylsulphat, Tris: Tris(hydroxymethyl)aminomethan*

10x TBS (1l)	TBS-T
0,2 M Tris (24,22 g)	100 ml 10x TBS
1,5 M NaCl (87,66 g)	900 ml H_2O
1 l H_2O	1 ml Tween
pH 7,5 mit HCl	

Tabelle 12 10 %iges Trenngel. *H_2O: destilliertes Wasser, SDS: Sodiumdodecylsulphat, TEMED: Tetramethylethylendiamin*

10 % Trenngel (10 ml)	Menge (ml)
H_2O	4,0
30 % Acrylamid mix (Rotiphorese Gel 30)	3,3
Lower Puffer (pH 8,8)	2,5
10 % SDS	0,1
10 % Ammoniumpersulfat	0,1
TEMED	0,004

Tabelle 13 12 %iges Trenngel. *H_2O: destilliertes Wasser, SDS: Sodiumdodecylsulphat, TEMED: Tetramethylethylendiamin*

12 % Trenngel (10 ml)	Menge (in ml)
H_2O	3,3
30 % Acrylamid mix (Rotiphorese Gel 30)	4,0
Lower Puffer (pH 8,8)	2,5
10 % SDS	0,1
10 % Ammoniumpersulfat	0,1
TEMED	0,004

Tabelle 14 Sammelgel. *H_2O: destilliertes Wasser, SDS: Sodiumdodecylsulphat, TEMED: Tetramethylethylendiamin*

4,5 % Sammelgel (5 ml)	Menge (in ml)
H_2O	3,4
30 % Acrylamid mix (Rotiphorese Gel 30)	0,83
Upper Puffer (pH 6,8)	0,63
10 % SDS	0,05
10 % Ammoniumpersulfat	0,05
TEMED	0,005

Tabelle 15 Western Blot Primärantikörper mit Angabe der Verdünnungen. *BSA: Bovines Serumalbumin, BTK: Bruton'sche Tyrosinkinase,*

Primärantikörper	Verdünnung	Unternehmen
AKTB (β-Aktin) (A2228)	1:5000 in 5 % Milch	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
BTK (DFS) sc-81735	1:200 in 5 % Milch	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA
E-Cadherin (4A2)	1:1000 in 5 % Milch	Cell Signaling, Cambridge, Vereinigtes Königreich
P65 (C-20)	1:1000 in 5 % Milch	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA
Phospho-p65 (Serin 536)	1:1000 in 5 % BSA	Cell Signaling, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Slug (C19G7)	1:1000 in 5 % BSA	Cell Signaling, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Snail (C15D3)	1:1000 in 5 % BSA	Cell Signaling, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Vimentin (V9)	1:1000 in 5 % Milch	Invitrogen, Rockford, USA

Tabelle 16 Western Blot Sekundärantikörper mit Angabe der Verdünnungen und des Unternehmens. *AB: Antibody, BSA: Bovines Serumalbumin, HRP: Horseradish peroxidase, IgG: Immunglobulin G*

Sekundärantikörper	Verdünnung	Unternehmen
Anti-mouse IgG HRP linked AB	1:1000 in 5 % Milch für E-Cadherin	Cell Signaling, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Mouse anti-rabbit secondary AB, HRP	1:5000 in 5 % BSA/ Milch	Thermo Scientific, Massachusetts, USA
Rabbit anti-mouse IgG secondary AB, HRP	1:5000 in 5 % BSA/ Milch 1:10.000 in 5 % Milch für β-Aktin	Thermo Scientific, Massachusetts, USA

2.1.4 PCR-Puffer

Tabelle 17 Anleitung zur Erstellung eines 50x TAE-Puffer. *EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure H_2O: destilliertes Wasser, HCl: Chlorwasserstoff, TAE: Tris Azetat EDTA Puffer, Tris: Trisamino-methan*

50x TAE-Puffer
2 M (242g) Tris
600 ml H_2O und verrühren
1 M (57 ml) konzentrierte Essigsäure
50 mM (100 ml 0,5 M EDTA-Puffer) EDTA
Auffüllen bis auf 1 l mit H_2O

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung und Handhabe von Zellen

Die Kultivierung von adhärenten Zellen und Suspensionszelllinien erfolgte bei allen Experimenten im Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C und 5 % CO_2.

Adhärente Zellen

Die HNSCC-Zelllinien (head and neck squamous cell carcinoma) wurden mit pyruvatfreiem Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM-Gibco Life Technologies) kultiviert. Diesem Medium wurden 10 % fetales Kälberserum (FBS-Biochrom) und 1 % ZellShield (Minerva Biolabs) zugesetzt. Gesplittet wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 80 - 90 %. Hierfür wurde Trypsin/EDTA (PAN Biotech) zur Ablösung der Zellen verwendet. Die Reaktion wurde mit einer angemessenen Menge an Medium gestoppt (Verhältnis ca. 1:1). Die Suspension wurde bei 250 xg (Mittlere Erdbeschleunigung) 5 min (Minuten) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurden die Zellen im frischen Medium resuspendiert. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 10.000-20.000 Zellen pro cm^2 neu ausgesät.
Zur Herstellung eines Zellpellets wurden die Zellen in 1 ml DPBS (Dulbecco`s phosphatgepufferte Salzlösung, Gibco Life Technologies) resuspendiert. Die in DPBS gelösten Zellen wurden in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt und bei 250 xg für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette entfernt. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Suspensionszelllinien

Als Kultivierungsmedium der Suspensionszelllinien diente Roswell Park Memorial Institute Zellkulturmedium 1640 (RPMI, Gibco Life Technologies) mit den Zusätzen 10 % fetales Kälberserum (Biochrom), 1 % ZellShield (Minerva Biolabs) und 0,5 ml einer 50 mM β-Mercaptoethanollösung (Sigma Aldrich). Bei einer Zellzahl von ungefähr 2 Millionen Zellen pro ml wurden die Zellen gesplittet und auf eine Zellzahl von 200.000 - 300.000 Zellen pro ml eingestellt.
Zur Herstellung eines Zellpellets wurden 3 - 6 Millionen Zellen benutzt. Diese wurden in ein 15 ml Falcon überführt und bei 250 xg für 5 min zentrifugiert. Der

Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in 1 ml DPBS gewaschen, resuspendiert und in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei 250 xg für 5 min. Der Überstand wurde mittels einer Pipette entfernt. Das Pellet wurde sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Behandlung der Zelllinie UD-SCC 1 mit dem ADORA2B-Antagonist PSB-603

Zunächst wurden die Zellen in eine 75 cm^2 Flasche mit einer Dichte von 15.000 Zellen pro cm^2 ausgesät und über Nacht anwachsen gelassen. Am folgenden Tag wurde die Behandlung mit dem ADORA2B-Antagonisten PSB-603 begonnen. Für eine 1 mM-Lösung wurde 1 mg PSB-603 (Tocris Bioscience) unter sterilen Bedingungen abgewogen und bei einem Molekulargewicht von 533,51 g in 1,87 ml Dimethylsulfoxid (DMSO-Merck KGaA) gelöst. Danach wurde entsprechend der Zielkonzentrationen von 2 µM, 5 µM und 10 µM mit für adhärenten Zelllinien verwendeten DMEM verdünnt.
Die Behandlung begann mit einem Wechsel des Mediums mit dem zuvor vorbereiteten Medium, welches nun PSB-603 enthielt. Die Zellen wurden nach 24 h und 48 h geerntet und ein Zellpellet hergestellt, wie zuvor beschrieben.
Für morphologischen Untersuchungen wurden die Zellen erst unbehandelt, dann nach 24 h und 48 h Behandlung mit höchster Konzentration (10 µM) PSB-603 unter dem Mikroskop Zeiss Axio Observer D1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH) betrachtet und mithilfe der Zen 2.3-Software in Schwarz/Weiß fotografiert.

Behandlung der Zelllinie UD-SCC 1 mit dem BTK-Inhibitor AVL-292

Für die Behandlung mit dem BTK-Inhibitor AVL-292 wurden runde Zellkultur-Schalen mit einer Fläche von 58 cm^2 verwendet. Die Zellen wurden auf 30.000 Zellen pro cm^2 ausgesät und über Nacht anwachsen gelassen.
Der pulverisierte Inhibitor AVL-292 (Axon Medchem B.V.) wurde in DMSO (Merck KGaA) gelöst. Es wurde eine 30 mM-Lösung unter sterilen Bedingungen hergestellt. Durch Verdünnung wurden Lösungen mit einer Konzentration von 20 mM und 10 mM angefertigt. Diese Lösungen wurden dann im Medium (DMEM) 1:1000 verdünnt. Für die Behandlung wurden folglich die Zielkonzentrationen von 30 µM, 20 µM und 10 µM verwendet. Da der BTK-Inhibitor AVL-292 lichtempfindlich ist,

wurde bei seiner Handhabung auf die Verwendung von künstlichen Lichtquellen verzichtet. Nachdem die Zellen über Nacht angewachsen waren, wurde das Medium durch frisches Medium mit zugegebenem BTK-Inhibitor bzw 0,1 % DMSO (für die Kontrolle) bei allen Zellen gewechselt. Die Zellen wurden nach 24 h und 48 h Behandlung geerntet und Zellpellets präpariert. Bis zur weiteren Verwendung wurden diese (siehe Kapitel 2.2.1) bei -80 °C gelagert.
Für morphologische Untersuchungen wurden die Zellen erst unbehandelt, dann nach 24 h und 48 h Behandlung mit höchster Konzentration (30 µM) AVL-292 unter dem Mikroskop Zeiss Axio Observer D1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH) betrachtet und mithilfe der Zen 2.3-Software (Carl Zeiss Microscopy GmbH) in Schwarz/Weiß fotografiert.

2.2.2 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können z.B. Zellen des Blutes unterschieden werden. Wenn ein Laserstrahl die Zellen passiert, entsteht eine Emission von optischen Signalen. Dabei entsteht ein Streulicht oder Fluoreszenzsignal, welches von einem Detektor ausgewertet wird. Das Maß für die Beugung des Lichts ist FSC (Forward Scatter) und für die Brechung des Lichts im rechten Winkel SSC (Side Scatter). Das Vorwärtslicht bzw. FSC ist von der Größe der Zellen abhängig, während das Seitwärtsstreulicht durch die Granularität (Größe und Struktur des Zellkerns, Vesikelmenge) beeinflusst wird. FACS (Fluorescence activated cell sorting) bedeutet Durchflusszytometrie mit fluoreszierenden Antikörpern und ermöglicht die Charakterisierung von Zellen in einer Probe anhand der Expression von bestimmten Molekülen [1, 60, 94]. Die Durchflusszytometrie wurde in der vorliegenden Arbeit unter anderem zur Analyse von shRNA (small hairpin Ribonukleinsäure) -transduzierten Zellen verwendet. Die UD-SCC 1 Zelllinie wurde mit einem ADORA2B-shRNA-Konstrukt transduziert, was zur Herunterregulation von ADORA2B führte (Daten nicht gezeigt). Als Kontrolle dienten scrambled-shRNA Zellen. Zusätzlich zur shRNA-Expression weisen die Vektoren Expressionskassetten für Puromycin und Rot fluoreszierendes Protein (RFP) auf. Mittels des Farbstoffs RFP konnten die transduzierten Zellen durchflusszytometrisch verfolgt werden. Die Zelllinien UD-SCC1-ADORA2B-shRNA und UD-SCC1-Scrambled-shRNA lagen vor Beginn der Arbeit bereits im Labor vor.

Vor Durchführung der Experimente wurden die transduzierten Zellen nochmals mittels Puromycin (3 µg/ml, Merck/Biochrom) selektioniert und die Selektionseffizienz mittels FACS verifiziert. Hierfür wurden 300.000 Zellen in ein FACS-Tube überführt und in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen (0,5 % BSA: Bovines Serumalbumin-Miltenyi Biotec GmbH in DPBS). Die Messung wurde mittels Gallios Flow Cytometer (Backman Coulter) durchgeführt (Daten nicht gezeigt).

2.2.3 B-Zell-Isolation aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes

B-Lymphozyten wurden aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) mithilfe des EasySep Human B Cell Isolation Kits (Stemcell Technologies) gewonnen und für Methylierungs- und Proteinanalsysen genutzt. Das Kit bedient sich des Prinzips der negativen Selektion. Die Aufreinigung von PBMCs wurde durch eine Zentrifugation durch ein hydrophiles Kolloid ermöglicht.
Für die PBMC-Isolierung wurden 50 ml Citrat-Blut einer gesunden Kontrollperson entnommen. Um alle Zellen zu erfassen, wurde das Blut nochmals 1 min bei 1000 xg herunterzentrifugiert. Es wurden 2 Leukosep-Tubes mit jeweils 15 ml des Separationsmediums Biocoll (Merck/Biochrom) vorbereitet und für 1 min bei 1000 xg zentrifugiert. Dies führt dazu, dass das Biocoll unter die poröse Trennscheibe gelangt, welche den folgenden Separationsvorgang der PBMCs von den restlichen unerwünschten Zellen wie Erythrozyten und Granulozyten erleichtert. Das Blut aus den 5 Citrat-Blutröhrchen wurde dann auf die 2 zuvor vorbereiteten Leukosep-Tubes zu etwa gleichen Teilen verteilt. Die Citrat-Blutröhrchen wurden mit DPBS ausgespült und die Blut-DPBS Mischung wurde ebenfalls in die Leukosep-Tubes überführt. Die zwei Tubes wurden 15 min bei 800 xg ohne Bremse zentrifugiert. Danach wurde die obere Schicht bestehend aus Plasma und Thrombozyten mit einer Pipette entfernt. Der verbliebene Teil, welcher die PBMCs beinhaltete, wurde in ein neues 50 ml Tube überführt und mit DPBS auf 50 ml aufgefüllt. Dieses Tube wurde für 10 min bei 1600 rpm (revolutions per minute) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 9,5 ml DPBS aufgenommen. Für eine automatische Zellzählung (TC 20 Automated Cell Counter -Biorad Laboratories Inc) wurden 10 µl entnommen und mit 10 µl Türks-Lösung (Merck KGaA) vermischt. Die ermittelte Zellzahl wurde für die Berechnung der Menge von MACS (Magnetic activated cell sorting) -Puffer genutzt, um eine

Suspension mit $5*10^7$ Zellen pro ml zu erhalten. Die Zellen wurden nochmals durch das Zentrifugieren für 10 min bei 1000 rpm gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und die zuvor berechnete Menge an MACS-Puffer wurde hinzugefügt
MACS-Puffer (1:20)

- 2,5 ml MACS BSA Stock Solution (Miltenyi Biotec GmbH)
- 47,5 ml auto MACS Rinsing Solution (Miltenyi Biotec GmbH)

Für die Isolierung von CD19 positiven Zellen wurden die Schritte aus dem Protokoll für EasySep (Stemcell-Catalog #180000) des EasySep Human B Cell Isolation Kits durchgeführt. Nach erfolgreicher Isolierung wurde die Reinheit der Zellen durchflusszytometrisch gemessen und mittels der Kaluza Analysesoftware (Beckman Coulter GmbH) überprüft. Dazu wurden 50 µl aus der Probe und 3 µl des Farbstoffes PE-CY 7 Mouse Anti-Human CD19 (BD Biosciences) in ein Test-Tube pipettiert und vermischt und die Messung mittels Gallios Flow Cytometer (Beckman Coulter GmbH) durchgeführt Die Probe galt als „rein", wenn mindestens 95 % der Zellen positiv für CD19 waren (Daten nicht gezeigt). Danach wurden die Zellen für 5 min bei 250 xg zentrifugiert und in 1 ml DPBS aufgenommen und in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt, um dann nochmals unter selben Bedingungen zentrifugiert zu werden. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in flüssigen Stickstoff schockgefroren und danach bei -80 °C gelagert.

2.2.4 Proteinherstellung und Proteinquantifizierung

Die Zusätze Proteaseinhibitor (Roche) und PhosStop (Roche) wurden zuvor in 10 ml RIPA-Puffer (Radioimmunoprecipitation assay, Thermo Scientific) gelöst (jeweils 1 Tablette/10 ml RIPA-Puffer, was einer Konzentration von 0,2 mM entspricht) Diese Mischung wurde für alle Protein-Extraktionsexperimente verwendet und wird im folgenden $RIPA^{++}$-Puffer genannt. Jedes Pellet wurde zunächst in 100-150 µl $RIPA^{++}$-Puffer resuspendiert und nachfolgend 20 min bei 4°C inkubiert, wodurch die Zellen lysiert wurden. Danach wurden die Proben bei 13000 x rcf (relative centrifugal force) für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und im flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Proteinquantifizierung

Zur Proteinmessung wurde das Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) verwendet. Unter Verwendung von Bicinchoninsäure (BCA) können Proteine quantitativ bestimmt werden. Zweiwertige Kupferionen (Cu^{+2}) binden an Peptidbindungen und werden bei alkalischem pH-Wert zu Cu^{+1} reduziert. Die Kupferionen bilden in Anwesenheit von BCA einen blau-violetten Farbstoffkomplex, welcher eine kolorimetrische Messung ermöglicht. Der wasserlösliche Komplex weist eine hohe Absorption bei 562 nm bei steigender Proteinkonzentration auf. Die Gesamtprotein-Konzentration kann dann im Vergleich zu einem Proteinstandard bestimmt werden [89, 157].
Zunächst wurde die Standardreihe mit RIPA^{++}-Puffer nach Anleitung des Herstellers vorbereitet. Die Proteinproben wurden stets 1:10 verdünnt. Es wurden 10 µl des Standards und 5 µl der zu analysierenden Proteinproben in eine 96-Well-Non-Binding-Platte (greiner bio one) vorgelegt. Die Reagenzien A und B wurden im Verhältnis 50:1 angemischt und 200 µl zu 10 µl Standard beziehungsweise 205 µl zu 5 µl der zu messenden Probe hinzugegeben. Es wurde ein einheitliches Volumen in den einzelnen Wells von 210 µl erreicht. Die Platte wurde kurz geschüttelt und dann bei 37 °C für 30 min inkubiert. Die Messung wurde mittels „Microplate-Reader“ (Tecan Trading AG) und mit Hilfe der Magellan Software (Tecan Trading AG) durchgeführt.

2.2.5 Western Blot

Proteingemische werden im elektrischen Feld nach dem Molekulargewicht (kDa bzw. Kilodalton) aufgetrennt. Dies geschieht mittels Sodium-Dodecyl–Sulfat Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Das Gel besteht aus Sammel- und Trenngel. Anschließend wird der Western Blot durchgeführt, indem die Proteine vom Gel auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen („geblottet“) werden. Ein Primärantikörper bindet an das gesuchte Protein. Ein Sekundärantikörper, welcher an das Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist, bindet an den Primärantikörper. Durch Zugabe des Substrats für die Meerrettich-Peroxidase findet eine chemische Reaktion statt, wodurch Licht emittiert wird. Dieser Prozess, auch Chemilumineszenz genannt, erlaubt den Nachweis des Proteins.

Es wurden in Abhängigkeit des Molekulargewichts der zu detektierenden Proteine 12 %ige und 10 %ige Trenngele gegossen. Das Trenn- und Sammelgel hatten eine Stärke von 1,5 mm. Alle Komponenten (siehe Tabelle 12 und 13) wurden in einem 50 ml Tube gemischt, mit einer Pipette auf dreiviertel der Höhe des Deckglases gegossen und zunächst mit Isopropanol (Sigma Aldrich) überschichtet. Nach Aushärtung des Trenngels wurde die Isopropanol-Schicht entfernt, mit destilliertem Wasser nachgespült und mit Filterpapier trocken getupft. Danach folgte die Vorbereitung des Sammelgels (siehe Tabelle 14). Nach dem Gießen des Sammelgels wurde sofort ein Kamm eingesetzt. Es wurden Kämme mit 10 oder 15 Taschen benutzt.

Während das Gel aushärtete wurden die Proteinproben vorbereitet. Eine angemessene Menge an Lämmli-Puffer (Bio-Rad Laboratories) wurde mit β-Mercaptoethanol (Sigma Aldrich) im Verhältnis 10:1 gemischt. Das β-Mercaptoethanol dient dazu, Disulfidbrücken zu trennen und die Tertiärstruktur des Proteins aufzulösen. Bei 20 µl Gesamtvolumen wurden 5 µl der 4-fach konzentrierten Lämmli-Lösung benutzt. Es wurden 20 µg oder 30 µg Protein eingesetzt. Um auf das Gesamtvolumen von 20 µl zu kommen, wurde die Probe mit RIPA^{++}-Puffer aufgefüllt. Nach kurzem Vortexen wurden die Proben zur vollständigen Denaturierung für 5 min bei 95°C im Thermoblock gekocht. Nach kurzem Entlüften des Reaktionsgefäßes wurden die Proben zentrifugiert (15 s, 13.000 x rpm, RT) und bis zur Beladung bei Raumtemperatur gelagert. Das Gel wurde in die Vorrichtung für die Elektrophorese eingespannt, die Kammer mit SDS Puffer befüllt und der Kamm entfernt. Es wurden 6 µl des Protein-Markers (Bio-Rad Laboratories) und 20 µl der jeweiligen Proben pipettiert. Die Auftrennung wurde bei einer elektrischen Spannung von 100 V begonnen, bis die Proben aus dem Sammelgel gelaufen sind. Danach wurde die Spannung auf 180 V erhöht, bis die gewünschte Auftrennung im Trenngel erfolgt ist.

Der Transfer von Proteinen aus dem Gel auf die Nitrocellulose-Membran wurde als „Wet-Transfer“ durchgeführt. Alle Komponenten, die sich später zwischen Anode und Katode befanden, wurden in Transferpuffer eingeweicht. Die Komponenten und der schematische Aufbau sind in Abbildung 6 dargestellt.



Abbildung 6: Schematischer Aufbau des Transfers

Abbildung erstellt mit PowerPoint.

Die Kammern wurden mit Transferpuffer auf das Maximum befüllt. Der Transfer wurde bei 4 °C und 70 V für 2 h durchgeführt.

Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran ausgebaut und in eine Box gegeben. Die nachfolgenden Schritte wurden auf einem Wipptisch durchgeführt. Die Membran wurde 3 Mal für 5 min in TBS-T (Tris buffer saline with tween 20-Tween 20-AppliChem) gewaschen (siehe Tabelle 6). Danach wurde abhängig vom Antikörper mit 5 % BSA (Miltenyi Biotec GmbH) in TBS-T oder 5 % Magermilchpulver (Sigma Aldrich) in TBS-T für eine Stunde geblockt. Das Blocken verhindert unspezifischen Bindungen der im Anschluss verwendeten Antikörper. Nach dem Blocken und Waschen wurde die Membran mit dem gewünschten Primärantikörper (siehe Tabelle 15) über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am folgenden Tag wurde die Membran 3 Mal für 5 min in TBS-T gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde je nach Primärantikörper in 5 % BSA in TBS-T oder 5 % Magermilchpulver in TBS-T verdünnt (siehe Tabelle 15 und 16) und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgten 3 weitere Waschschritte. Zur Detektion der Proteinbanden wurde die Membran mit 2 ml der Entwicklerlösung (SuperSignal West Dura - Thermo Scientific) gleichmäßig benetzt und für 5 min inkubiert. Dazu wurden der „Stable Peroxide Buffer“ und die „Luminol/Enhancer Solution“ 1:1 in einem Tube gemischt und auf die Membran gegeben. Die Membran wurde luftblasenfrei zwischen 2 Folien gelegt. Die Detektion erfolgte mithilfe des ChemiDoc MP Imaging Systems (Bio-Rad Laboratories). Die Belichtungszeiten betrugen zwischen 1 s und 20 min. Nach dem Entwickeln wurde die Membran 3 Mal in TBS-T gewaschen. Folgte eine Detektion eines weiteren Proteins ähnlichen Molekulargewichts, wurde die Membran mit einer „Stripping-Buffer-Lösung“ (Thermo Scientific) für 5 min inkubiert. Danach wurden 3 Waschritte in TBS-T und

eine Inkubation von einer halben Stunde mit 5 % BSA in TBS-T oder 5 % Magermilchpulver in TBS-T zum erneuten Blocken durchgeführt. Danach wurde die Membran mit dem nächsten Antikörper über Nacht, wie bereits beschrieben inkubiert. Zuletzt erfolgte die Detektion eines Housekeeping-Proteins als Ladekontrolle. Hierfür dienten Antikörper gerichtet gegen β-Aktin (AKTB), welcher auf den Membranen bei Raumtemperatur für 1 h inkubiert wurde. Es folgten 3 Waschschritte mit TBS-T, danach wurde der Sekundärantikörper (Tabelle 15) für 30 min hinzugegeben. Die Proteinexpression wurde wie oben bereits beschrieben detektiert.

2.2.6 Sequenzauffindung des alternativen Promotors von *BTK*

Der alternative Promotor für *BTK* wurde durch In-Silico-Analysen mithilfe des Genom-Browsers (http://genome-euro.ucsc.edu/ -April 2018) und der Datenbank für eukaryotische Promotoren (https://epd.vital-it.ch/index.php -April 2018) ermittelt. Es wurde das Tool „Regulation“ zum Anzeigen der CpG-Inseln verwendet. Über „Gene and Gene Predictions“ und „UCSC Alt Events“ gelangt man zu den Informationen über alternative Promotoren. Dies diente zur Identifizierung der Lage des Promotors, welche in dieser Arbeit näher beschrieben wird. Anschließend wurde mithilfe der PyroMark Assay Design Software 2.0 (Qiagen) geeignete Sequenzen und dazugehörige Primer aufgesucht, um die Methylierung des Promotors bzw. der Promotorregion zu untersuchen.

2.2.7 DNA-Isolierung

Für die DNA-Isolierung (Desoxyribonukleinsäure) wurden Pellets von 6 verschiedenen Tumorzelllinien und humanen B-Zellen verwendet. Es wurden die 3 Kopf-Hals-Tumorzelllinien UD-SCC 1, UD-SCC 5 und UD-SCC 6 verwendet (siehe Kapitel 2.1.1, Tabelle 1). Dazu kamen die Suspensionszelllinien Namalwa, Ramos und Preb1 (siehe Kapitel 2.1.1, Tabelle 2). Die DNA wurde mit Hilfe des AllPrep DNA/RNA Mini Kits (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers gewonnen. Danach wurde die DNA-Konzentration mittels der Nano Quant Platte und der Tecan icontrol 1.10 Software (Tecan Group AG) bestimmt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.2.8 Bisulfit-Konversion

Die Konversion von genomischer DNA mit Bisulfitsalzen erfolgte durch das EpiTect Bisulfite Conversion Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Die Behandlung der DNA mit Bisulfitsalzen führt dazu, dass nicht-methylierte Cytosine zu Uracil umgewandelt werden. Methylierte Cytosine bleiben unverändert. Anschließend muss die DNA aufgereinigt werden, um die Bisulfitsalze auszuwaschen. Für die Konversion wurden 1 µg oder 500 ng genomische DNA eingesetzt. Für die hoch-methylierte (HM K) und niedrig-methylierte Kontrolle (NM K) wurden immer 500 ng genomischer DNA verwendet. Bei diesen Kontrollen handelt es sich um technische Kontrollen der Firma EpigenDx, welche im gesamten Genom hoch-(>85 %) bzw. niedrig-(<5 %) methyliert sein sollten. Folgendes Programm wurde im Thermocycler peqSTAR 96X (VWR) durchgeführt (Tabelle 18):

Tabelle 18 Thermocycler-Programm für die Bisulfit-Konversion.

Schritt	Zeit (in min)	Temperatur (°C)
Denaturierung	5	99
Inkubation	25	60
Denaturierung	5	99
Inkubation	85	60
Denaturierung	5	99
Inkubation	175	60
Ende	Unbegrenzt	20

2.2.9 PyroMark PCR

Die Proben für die Pyrosequenzierung wurden mithilfe des PyroMark PCR Kits (Qiagen) amplifiziert. In den Tabellen 19 und 20 sind Angaben zu den entsprechenden PCR-Ansätzen aufgeführt, in der Tabelle 21 folgen Angaben zu den verwendeten PCR Bedingungen. Tabelle 22 und 23 fassen alle Angaben zu Primern und Grenzen der technischen Kontrollen getrennt für jeden Assay zusammen.

Tabelle 19 PCR-Ansatz für eine Reaktion des BTK alternativ Assays. *BTK: Bruton'sche Tyrosinkinase, DNA: Desoxyribonukleinsäure, $MgCl_2$: Magnesiumchlorid, F-Primer: Forward Primer, PCR: Polymerase-Kettenreaktion, RNase: Ribonukleasen, R-Primer: Reverse Primer*

Reagenz	Menge (µl)
RNase freies Wasser	7,0
Master Mix	12,5
CL-Reagenz	2,5
$MgCl_2$ (25 mM)	1,0
F-Primer (20 pmol/µl)	0,5
R-Primer (20 pmol/µl)	0,5
Bisulfit konvertierte DNA oder Kontrollen	1,0
Gesamtvolumen	25,0

Tabelle 20 PCR-Ansatz für eine Reaktion des BTK Assays*. BTK: Bruton'sche Tyrosinkinase, DNA: Desoxyribonukleinsäure, $MgCl_2$: Magnesiumchlorid, F-Primer: Forward Primer, PCR: Polymerase-Kettenreaktion, RNase: Ribonukleasen, R-Primer: Reverse Primer*

Reagenz	Menge (µl)
RNase freies Wasser	7,5
Master Mix	12,5
CL-Reagenz	2,5
$MgCl_2$ (25 mM)	0,5
F-Primer (20 pmol/µl)	0,5
R-Primer (20 pmol/µl)	0,5
Bisulfit konvertierte DNA oder Kontrollen	1,0
Gesamtvolumen	25,0

Tabelle 21 PCR-Programm des Thermocyclers. *BTK: Bruton'sche Tyrosinkinase, PCR: Polymerase-Kettenreaktion*

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen
	95	15 min	1
Annealing	94	30 s	45
	58 oder 60*	30 s	
	72	30 s	
	72	10 min	1
	4	Unbegrenzt	

**BTK alternativ Assay* 58°C/ *BTK Assay* 60°C

Tabelle 22 Angaben zu den verwendeten Primern, ihrer genomischen Lage (GRCh37/hg19), Größe des Amplifikats und den technischen Kontrollen für den BTK alternativ Assay. *BTK: Bruton'sche Tyrosinkinase, bp: Basenpaare, CpG: Cytosin-phosphatidyl-Guanin, chrX: Chromosom X, GRCh37/hg19: Genome Reference Consortium Human build 37/ Human Genome 19*

Forward	5'-AAGTAGGGGTGAGTGGATTAT-3' chrX:100645814-100645830
Reverse (5'-Biotinyliert)	3'-ATCCCACTTCCTCATAAAAAT-5' chrX:100645941-100645961
Sequenzierungsprimer (20 pmol/µl)	5'-GGAGTTTTTTTTTAAGTT-3' chrX:100645840-100645857
Analysierte Sequenz (Y = entweder C oder T)	5'-TTYGTTYGYGGTTTYGAATTGAGTTT TTTTAGTYGTTYGAGGGYGTTGYGTTGA GTTTTATATTTTATGATTGTTT-3' chrX:100645858-100645934
Amplifikatgröße (bp)	151
Minimum hoch-methylierte Kontrolle	85 %
Maximum niedrig-methylierte Kontrolle	10 %

Tabelle 23 Angaben zu den verwendeten Primern, ihrer genomischen Lage (GRCh37/hg19), Größe des Amplifikats und den technischen Kontrollen für den BTK Assay. *BTK: Bruton'sche Tyrosinkinase, bp: Basenpaare, CpG: Cytosin-phosphatidyl-Guanin, chrX: Chromosom X, GRCh73/hg19: Genome Reference Consortium Human build 37/ Human Genome 19*

Forward	5'-GTGATTTTGAGGTGGAATAGGA-3' chrX:100645614-100645635
Reverse (5'-Biotinyliert)	3'-ACTCCCCCTAAAAAATAATCCACTCACC-5' chrX:100645817-100645844
Sequenzierungsprimer (20 pmol/µl)	5'-GTAGAGTTTATTAAAAGAGATAAAG-3' chrX:100645751-100645776
Analysierte Sequenz (Y = entweder C oder T)	5'-TGAYGAAAYGTTGAAAGTTGYGG GGYGGGAGGAAGTYGGGGTGAGTGGATTA TTTTTTAGG-3' chrX:100645778-100645838
Amplifikatgröße (bp)	231
Minimum hoch-methylierte Kontrolle	90 %
Maximum niedrig-methylierte Kontrolle	10 %

Direkt nach der PCR wurden 5 µl des Produktes auf ein 2 prozentiges Agarose Gel aufgetragen, um den Erfolg der Amplifikation zu kontrollieren. Die Auftrennung erfolgte bei 180 V für 10-15 min. Nur wenn alle Proben inklusive hoch-methylierter und niedrig-methylierter Kontrolle eine deutliche Bande auf der erwarteten Höhe (*BTK alternativ Assay* 151 bp, *BTK Assay* 231 bp) zeigten und bei den Kontrollen mit destilliertem Wasser und genomischer/unkonvertierter DNA (im PCR-Ansatz statt Bisulfit-konvertierter DNA) keine Banden nachweisbar waren, wurden die Proben pyrosequenziert. Es wurden nur Proben mit einer starken Bande sequenziert (siehe Anhang, Abbildung 24).

2.2.10 Pyrosequenzierung

Das Prinzip lautet „Sequenzierung durch Synthese“. Die genomische DNA wurde Bisulfit konvertiert, wodurch alle nicht methylierten Cytosine nach der Reaktion als Uracil vorlagen. Mithilfe einer PCR wurde der zu analysierende DNA-Abschnitt amplifiziert. Die Aufreinigung der PCR-Produkte wurde mithilfe der VacuumPrep Workstation durchgeführt (siehe Seite 43 „Durchführung der Aufreinigung mit VacuumPrep Workstation“). Das doppelsträngige PCR-Produkt wurde durch NaOH (Natriumhydroxid) denaturiert. Der mit Biotin markierte Einzelstrang wurde an Streptavidin-Sepharosebead gebunden und damit immobilisiert (Abbildung 7, A und B). Unmarkierte Einzelsträngige wurden durch Waschen mittels Waschpuffer entfernt. Die biotinylierte einzelsträngige DNA wurde zu den Sequenzierprimern gegeben und bei Raumtemperatur inkubiert. Die Primer hybridisieren dadurch an den zu analysierenden DNA Strang.

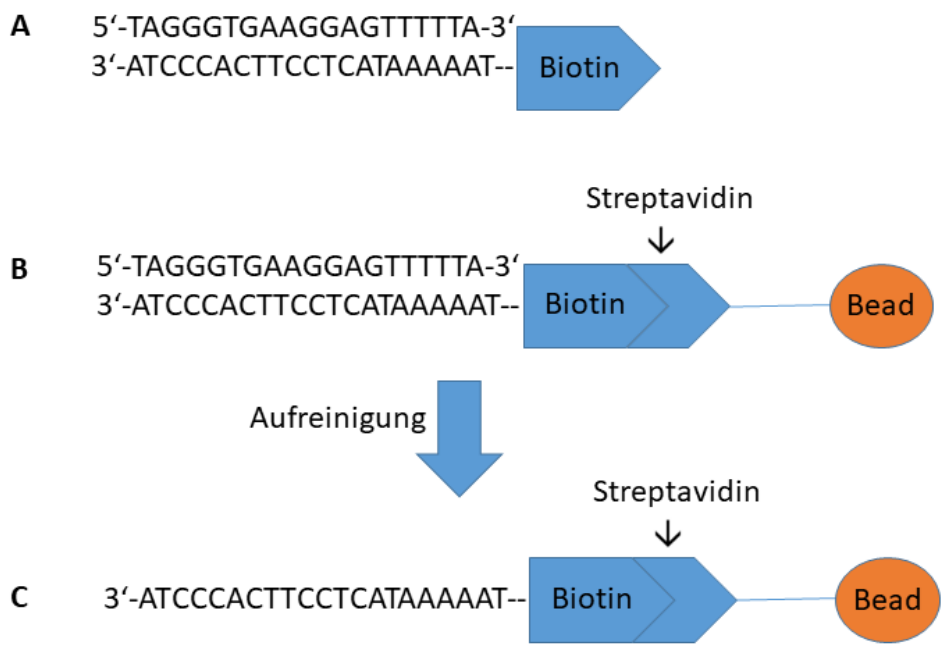
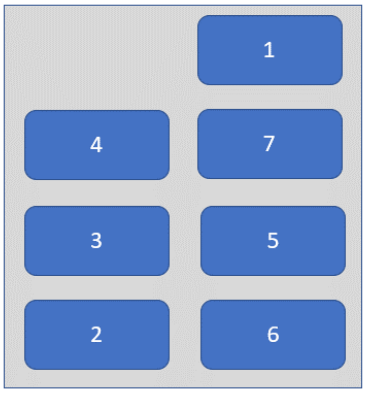


Abbildung 7 Biotinylierte Sequenz und Bindung an Streptavidin-Beads

A Doppelsträngige DNA nach PCR-Amplifikation **B** Bindung des Streptavidin-Beads an biotinyliertes 5‘-Ende **C** Immobilisierung des Beads durch einen Magneten und abwaschen des Komplementärstranges, um Einzelstränge zu erhalten [73]. Abbildung erstellt mit Microsoft PowerPoint. DNA: Desoxyribonukleinsäure, PCR: Polymerase-Kettenreaktion

Durchführung der Aufreinigung mit der VacuumPrep-Workstation

Zunächst wurden 20 µl der PCR-Produkte und 20 µl destilliertes Wasser in eine Eppendorf-Platte überführt. Eine Mischung aus 40 µl Binding Buffer (Qiagen) und 5 µl Streptavidin-Sepharosebeads (GE Healthcare) pro Well wurde in einem Beladungsreservoir vorbereitet. Mit einer Multikanal-Pipette wurden 43 µl pro Well aus der Mischung entnommen und in die Eppendorf-Platte zu den PCR-Produkt-Verdünnungen pipettiert. Die Platte wurde abgeklebt, auf einem Kleinschüttler (IKA-Werke GmbH & CO. KG) eingespannt und für 10 min auf höchster Stufe geschüttelt. Währenddessen wurde die Annealing-Platte bzw. Sequenzierplatte vorbereitet. Eine Mischung bestehend aus 40 µl Annealing-Buffer (Qiagen) und 0,5 µl Sequenzierungsprimer (biomers.net GmbH, Tabelle 22 und 23) pro Well wurde in einem Beladungsreservoir vorbereitet. Daraus wurden 43 µl pro Well mit einer Multikanal-Pipette aus dem Reservoir in die Sequenzierplatte transferiert. Die nun nachfolgend erwähnten Positionen beziehen sich auf die Abbildung 8. Die Sequenzierplatte wurde in die VacuumPrep-Workstation eingespannt (Position 6). Die Eppendorf-Platte wurde auf die Stäbe der Position 2 platziert. Die Vakuumstation wurde eingeschaltet und das Präptool auf Position 1 mit destilliertem Wasser durchgespült. Danach wurde das Tool in der Luft geschwenkt bevor es in die Eppendorf-Platte (Position 2) abgesenkt wurde. Die Beads wurden aufgenommen und die Aufreinigung begann mit dem Durchspülen mit Ethanol (Position 3). Das Tool wurde wieder geschwenkt und in die nächste Lösung mit 0,2 M NaOH (Position 4) gegeben. Die dritte Lösung bestand aus dem Waschpuffer Trometamol (1,3 g Tris auf 1 l destilliertes Wasser) auf Position 5. Danach wurde das Tool über die zuvor vorbereitete Sequenzierplatte gehalten. Das Vakuum wurde abgeschaltet und das Tool mit den Beads wurde in die Platte abgesenkt (Position 6). Die Beads lösten sich durch leichtes Rütteln. Somit wurden die PCR-Produkte zum Annealing-Mix überführt. Das Präptool wurde in die Schale mit destilliertem Wasser zum Waschen gegeben (Position 7).



1.) H_2O
2.) Eppendorf-Platte
3.) Ethanol
4.) Denaturierungslösung NaOH
5.) Waschpuffer Tris
6.) Sequenzierplatte
7.) H_2O

Abbildung 8 Schematischer Aufbau der VacuumPrep-Workstation

Die Zahlen 1-7 beschreiben die Reagenzien und zeigen die Reihenfolge, welche mit dem VakuumPrep-Tool bei der Aufreinigung der PCR-Produkte durchlaufen werden. Abbildung erstellt mit Microsoft PowerPoint. H_2O: destilliertes Wasser, NaOH: Natriumhydroxid, PCR: Polymerase-Kettenreaktion, Tris: Tris(hydroxymethyl)aminomethan

Die Eppendorf-Platte von Position 2 konnte verworfen werden, während die Sequenzierplatte (Position 7) vor dem Sequenzieren 2 min bei 85°C auf einer Heizplatte inkubiert wurde. Anschließend wurde die Sequenzierplatte auf Raumtemperatur abkühlt. Dies ermöglicht die Anlagerung der zuvor hinzugefügten Sequenzierungsprimer am Einzelstrang. Die PyroMark Q96 ID Software (Qiagen) berechnet die zu pipettierenden Mengen an Enzym, Substrat und der Nukleotide, welche in der „Pre Run Information“ eingesehen werden können. Diese Komponenten wurden in die Kartusche (Abbildung 9) pipettiert. Die Kartusche und die abgekühlte Sequenzierplatte wurden ins Gerät eingesetzt und die Sequenzierung gestartet.

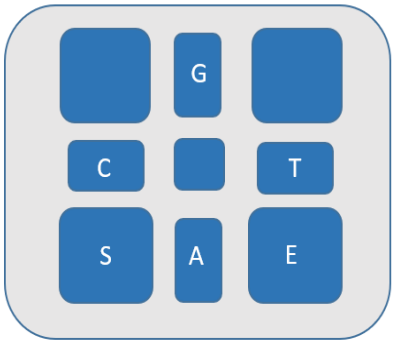


Abbildung 9 Schematischer Aufbau der Kartusche,
G=dGTP (Desoxyguanosintriphosphat), T=dTTP (Desoxythymidintriphosphat), E: Enzym, A= dATPαS (Desoxyadenosin α-thio Triphosphat), S: Substrat, C=dCTP (Desoxycytidintriphosphat) Abbildung erstellt mit Microsoft PowerPoint.

Chemische Reaktion der Pyrosequenzierung

Eine DNA-Polymerase bindet an den Sequenzierungsprimer und durch Einbau von Desoxynukleosidtriphosphaten (dATPαS: Desoxyadenosin α-thio Triphosphat, dGTP: Desoxyguanosintriphosphat, dCTP (Desoxycytidintriphosphat), dTTP: Desoxythymidintriphosphat) wird der komplementäre Strang synthetisiert. Statt dATP (Desoxyadenosintriphosphat) wird dATPαS verwendet, da die DNA-Polymerase diese effizient einbauen kann und es keine Interaktion mit der Luciferase gibt [176]. Der Einbau des komplementären Nukleotids führt zur Freisetzung von Pyrophosphat (PPi-Abbildung 10 A). Die ATP-Sulfurylase (APS) reagiert mit Pyrophosphat zu Adenosintriphosphat und Sulfat (Abbildung 10 B). Durch die Energie der ATP-Spaltung wird Luziferin zu Oxyluziferin umgesetzt und daraus resultiert ein Lichtsignal (Abbildung 10 C).

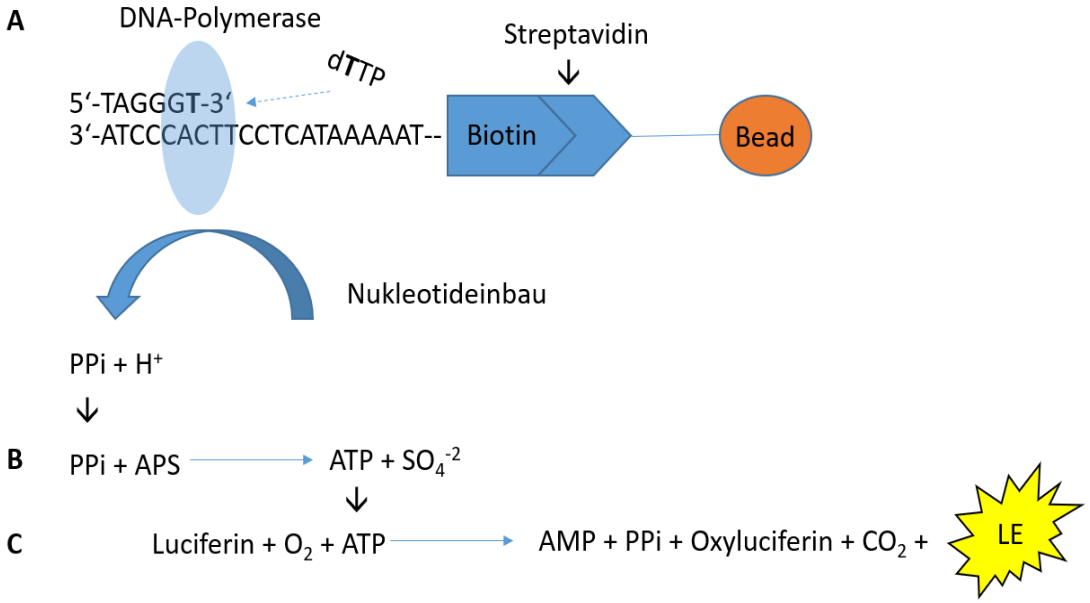


Abbildung 10 Chemische Reaktionen der Pyrosequenzierung

A Die DNA-Polymerase bindet an den neu synthetisierten Strang. Der Einbau des entsprechenden Desoxynukleotids (hier dTTP) führt zur Freisetzung von anorganischen Pyrophosphat (PPi), welches eine Kette an Enzymreaktionen in Gang setzt. **B** PPi und Adenosin 5'-Phosphosulfat (APS) reagieren zu Adenosintriphosphat (ATP) und Sulfat ($SO_4^{-2)}$) **C** ATP reagiert gemeinsam mit Sauerstoff (O_2) und Luciferin zu AMP, PPi, Oxyluciferin und Kohlenstoffdioxid (CO_2). Diese Reaktion führt zu einer messbaren Lichtemission (LE) [73]. Abbildung erstellt mit Microsoft PowerPoint. AMP: Adenosinmonophosphat, DNA: Desoxyribonukeinsäure, dTTP: Desoxythymidintri-phosphat, H^+: Wasserstoff, PPi: Pyrophosphat

Die Stärke der Lichtsignale (Peaks) ist proportional zur eingebauten Menge von Nukleotiden, wie in Abbildung 11 dargestellt. Die im Vorfeld durchgeführte Konversion von nicht methylierten Cytosinen (C) zu Uracil führte dazu, dass in der PCR statt mit Guanin (G), mit Adenin (A) das Basenpaar gebildet wird. In der Sequenzierung wird an dieser Stelle, sowohl Thymin als auch Cytosin eingespritzt (in der Abbildung 11 blau hinterlegt). Handelt es sich um eine nicht methylierte Stelle wird ein Thymin eingebaut. Weist diese Stelle eine Methylierung auf, wird ein Cytosin eingebaut. Dadurch wird das Verhältnis von methylierter zu unmethylierter Position durch das Verhältnis von eingebauten C zu T bzw. G zu A gelesen und anschließend als Prozentzahlen angegeben. Abbildung 11 zeigt eine beispielhafte Pyrogrammauswertung, in der die zu analysierenden Positionen blau hinterlegt

sind. An diesen Positionen sieht man Peaks des Nukleotids T, jedoch keine Peaks beim Nukleotid C. Folglich liegen hier zwei unmethylierte CpG-Positionen vor.

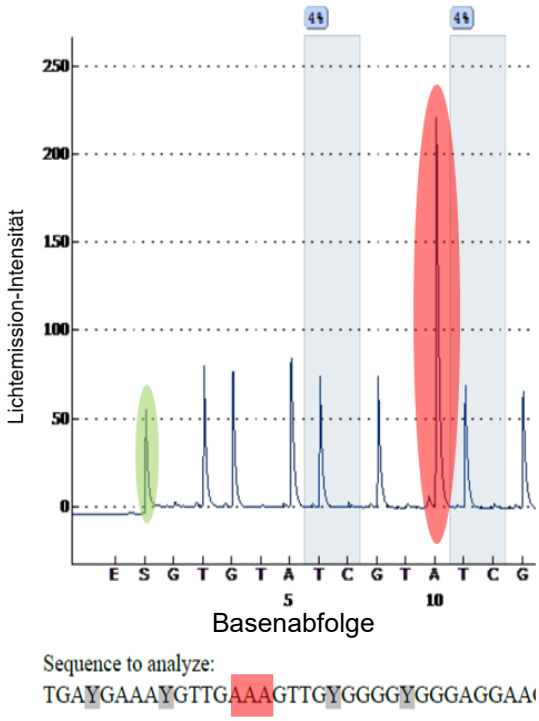


Abbildung 11 Exemplarische Sequenzierung des *BTK Assays*

Die erste Lichtemission (Peak) entsteht durch Einschuss von Substrat (grün markiert), In der „Sequence to analyze“ sind **in Hellblau** bzw. als „Y“ die zu analysierenden CpG-Positionen gekennzeichnet. **In Rot** ist eine Abfolge von 3 Nukleotiden gekennzeichnet. Sie generieren einen 3-Fach erhöhten Peak im Vergleich zu einem einzelnen Nukleotid. Abbildung erstellt mit PyroMark Software und modifiziert mit Microsoft PowerPoint. A: Adenin, BTK: Bruton’sche Tyrosinkinase, C: Cytosin, CpG: Cytosin-phosphatidyl-Guanin, E: Enzym, G: Guanin, S: Substrat, T: Thymin

Auswertung und Bewertung der Sequenzierungen

Die Bewertung der Pyrosequenzierung erfolgte mithilfe der PyroMark Q96 Software (Qiagen). Die angewandten Kriterien für eine erfolgreiche Pyrosequenzierung werden im Folgenden näher erläutert. Der Einbau eines Nukleotids sollte mindestens eine Einheit von 10 auf der Y-Achse (Lichtemission-Intensität) erreichen. Es erfolgte die Beurteilung, der Stärke der Lichtemission und ob die Peaks, proportional zur Anzahl der Nukleotide generiert wurden (Abbildung 12, blaue Pfeile). Die Software berechnet die statistisch wahrscheinlichen Signale und bildet diese in Histogrammen ab (Abbildung 12, blaue Pfeile). Dadurch kann beurteilt werden, ob die Peaks das berechnete Signal erreichen konnten. Um zusätzlich den Erfolg der Sequenzierung beurteilen zu können achtete man drauf, dass die Basislinie (Abbildung, 12 schwarze Pfeile) ein konstantes Niveau zeigte. In jedem Assay wurden zusätzlich Negativkontrollen der Analyse unterzogen, welche keine Peaks aufweisen durften. Dabei handelt es sich einerseits um die Bisulfitkonversionskontrolle (Abbildung 12, Orange hinterlegt), sowie um in die Reaktion eingespritzten Nukleotide, die nicht in der analysierenden Sequenz vorkommen (Abbildung 12, Violett hinterlegt)

Die Pyrogramme der mitgeführten technischen Kontrollproben (Hoch-methylierte Kontrolle - HM K, Niedrig-methylierte Kontrolle - NM K, genomische/unkonvertierte DNA - gDNA und Wasser bzw. H_2O) müssen die für den Assay erwarteten spezifischen Methylierungswerte und Peakmuster aufweisen. Je nach Assay wurden individuelle Grenzwerte für die technischen Kontrollen festgelegt (Tabelle 24-25). Die Kontrollen mit nicht-konvertierter genomischer DNA (gDNA) und die Wasser-Kontrolle durften keine spezifischen Peaks aufweisen. Erfüllten die Kontrollen diese Kriterien, handelte es sich um eine qualitativ gute Pyrosequenzierung und die DNA-Methylierung der zu analysierenden Proben wurde ausgewertet.

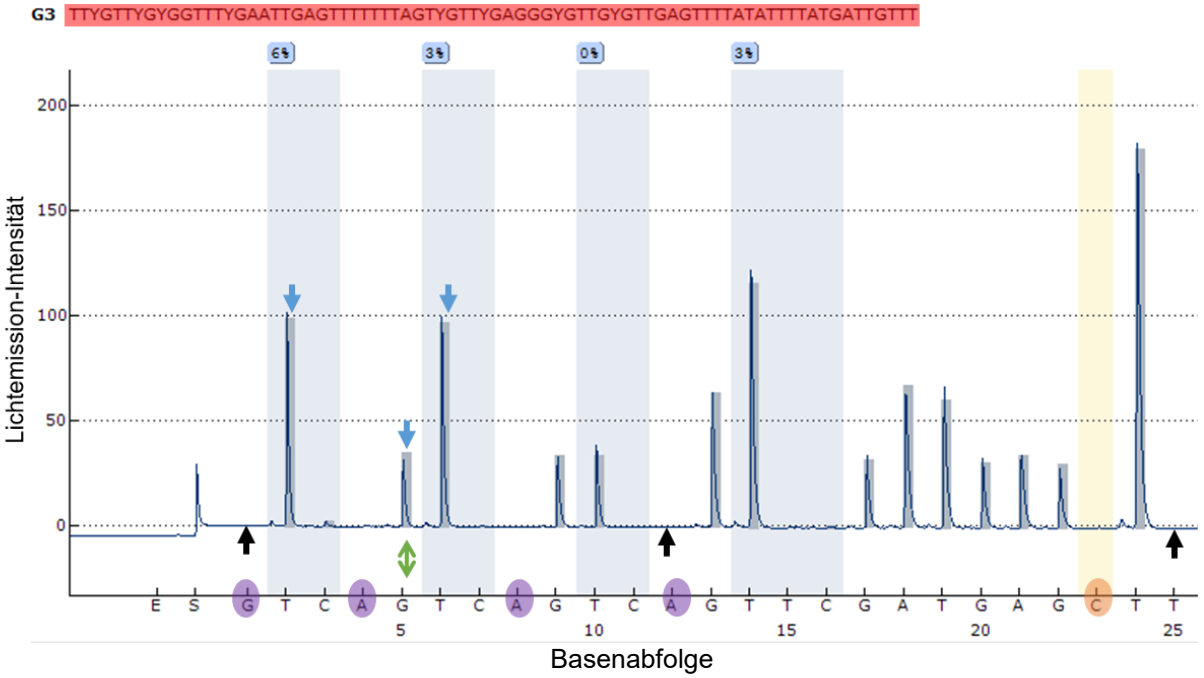


Abbildung 12 BTK alternativ Assay der Tumorzelllinie UD-SCC 6

Rot: Reihenfolge der Einspritzung der Nukleotide. **Blau:** hinterlegt sind 4 von 8 CpGs des *BTK alternativ Assays*. **Violett:** Negativkontrollen. **Orange**: Bisulfitikonversionskontrolle, **Blaue Pfeile**: Lichtemission im Bezug zu Histogrammen als Qualitätskontrolle der Sequenzierung, **Schwarze Pfeile**: Markierung der Basislinie, **Grüner Doppelpfeil**: Peak des einzelnen Nukleotids G ist größer als 10 Einheiten. Abbildung erstellt mit PyroMark Software und modifiziert mit Microsoft PowerPoint. A: Adenin, BTK: Bruton'sche Tyrosinkinase, C: Cytosin, CpG: Cytosin-phosphatidyl-Guanin, E: Enzym, G: Guanin, S: Substrat, T: Thymin, UD-SCC: Universität Düsseldorf- squamous cell carcinoma

2.2.11 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Die RNA (Ribonukleinsäure) wurde nach Anleitung des RNeasy Mini Kits (Qiagen) isoliert, anschließend in cDNA (komplementäre Desoxyribonukleinsäure) umgewandelt und für qRT-PCR (quantitative real time bzw. Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion) Analysen verwendet. Der optionale „DNase digestion“ Schritt wurde durchgeführt, um Verunreinigungen mit DNA zu verhindern. Zum Herauslösen der RNA aus der Säule wurden 50 µl RNase-freies Wasser benutzt. Die RNA wurde mit Hilfe der Nano Quant Platte über die Tecan icontrol 1.10 Software (Beckman Coulter GmbH) gemessen. Für die Herstellung von komplementärer DNA (cDNA) wurde das QuantiNova Reverse Transcription Kit (Qiagen) genutzt. Die Umschreibung in cDNA erfolgte nach Anleitung des im Kit mitgeführten Handbuches. Es wurden jeweils 1 µg RNA eingesetzt. Die zuvor gewonnene einzelsträngige RNA wurde in doppelsträngige cDNA umgeschrieben. Durch die Verwendung eines Oligo dT-Nukleotids (15-25 Desoxythymidine) als unspezifischen Primer konnte die DNA-Polymerase an den Poly-A-Schwanz binden und die RNA als Template zur Synthese eines komplementären Strangs nutzen. Zusätzlich verwendet das Kit sogenannte Random-Primer bzw. Hexamer-Oligonukleotide mit einer zufälligen Zusammensetzung von 6 Nukleotiden. Das „QuantiNova Reverse Transcription Enzyme“ hat eine hohe Affinität zur RNA und optimiert den Synthesevorgang. Nachdem die DNA-abhängige DNA-Polymerase gebunden hat, wird der komplementäre cDNA-Strang synthetisiert. Hier dienen unverdaute mRNA Reste als Primer [140].

2.2.12 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Die quantitative Echtzeit- (qRT: quantitative real time) Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde gewählt, um den Einfluss der ADORA2B-Antagonisierung bzw. BTK-Inhibition auf die Expression von EMT-Marker auf mRNA-Ebene zu untersuchen. Das Prinzip beruht auf der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR), welche während der Amplifikation in Echtzeit mithilfe von Fluoreszenzsignalen gemessen wird. Hierfür wurde SYBR Green I als DNA-Farbstoff verwendet. Die Quantifizierung der DNA wird durch ein Fluoreszenzsignal proportional zur PCR-Produktmenge erfasst. Der DNA-Farbstoffkomplex absorbiert blaues Licht (497 nm) und emittiert grünes Licht (520 nm). Große Vorteile von SYBR Green I sind die

Temperaturstabilität, die hohe Selektivität für dsDNA (Doppelsträngige DNA) und die hohe Sensitivität für niedrig exprimierte Transkripte. Um einen unspezifischen Anstieg der Fluoreszenz durch die Bildung von Primer-Dimeren (aneinandergebundene Primer) zu vermeiden, werden Primer von hoher Qualität benötigt [91].

Zu Beginn der qRT-PCR gibt es einen Anstieg der Fluoreszenz durch die Amplifikation des Produkts, welcher sich unterhalb eines Grenzwerts (threshold) befindet. Dieser Grenzwert ergibt sich durch die Variabilität der Basislinie. Bei Amplifikation von spezifischen PCR-Produkten akkumulieren Fluoreszenzsignale. Die Basislinie ist der Fluoreszenzhintergrund, welcher die Detektion von akkumulierenden Fluoreszenzsignalen verhindert. Ab einem gewissen Zyklus wird dieser Grenzwert überschritten. Dieser Zyklus wird „threshold cycle" (Ct) oder „cross point cycle" (Cp) genannt. Der Ct-Wert korreliert invers mit der initialen Menge an Template der Probe und wird während der exponentiellen Phase (Amplifikation der DNA) der PCR gemessen. Während der Reaktion werden die Komponenten der PCR verbraucht. Es kommt zu keiner weiteren Amplifikation des Templates. Dies spiegelt sich in einer Plateauphase wider [179].

Durchführung der Experimente zu qRT-PCR-Analysen

Es wurde die Expression der Gene *CDH1*, *CDH2*, *SNAI1*, *SNAI2* und *VIM* bei unbehandelten Zellen bzw. mit 0,1 % DMSO behandelten Zellen der Zelllinie UD-SCC 1 im Vergleich zu behandelten Zellen untersucht. Die Zellen wurden jeweils mit dem ADORA2B-Antagonisten PSB-603 und mit dem BTK-Inhibitor AVL-292 behandelt. Dazu wurden die Zellen auf eine Dichte von 15.000 Zellen pro cm^2 ausgesät. Für PSB-603 wurde eine Konzentration von 10 µM und ein Behandlungszeitraum von 24 h gewählt. Die Konzentration von AVL-292 betrug 30 µM über 24 h. Der ADORA2B-Antagonist PSB-603 und der BTK-Inhibitor AVL-292 wurden nach gleichem Schema, wie im Kapitel 2.2.1 beschrieben angesetzt. Die Zellen wurden geerntet und Zellpellets hergestellt (siehe Kapitel 2.2.1), welche bei -80 °C bis zur RNA-Isolierung gelagert wurden. Die RNA wurde wie in Kapitel 2.2.11 beschrieben isoliert und in cDNA umgeschrieben. Übersicht der untersuchten Gene in Tabelle 24.

Tabelle 24 Primer für die qRT-PCR mit Sequenzen, Produktgröße Schmelztemperatur (Tm) und GC-Gehalt. *A: Adenin, B2M: β2-Mikroglobulin, C: Cytosin, G: Guanin, GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, HPRT1: Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase 1, nt: Nukleotide, qRT-PCR: Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion, RPL13A: 60S ribosomal Protein L13, T: Thymin*

Gen	Produktgröße und Sequenz	Tm °C	GC %
CDH1 (E-Cadherin) *	99nt		
forward	5'-CGA GAG CTA CAC GTT CAC GG-3'	62	60
reverse	5'-GGG TGT CGA GGG AAA AAT AGG-3'	61	52
CDH2 (N-Cadherin) *	115nt		
forward	5'-AGC CAA CCT TAA CTG AGG AGT-3'	49	47
reverse	5'-GGC AAG TTG ATT GGA GGG ATG-3'	56	52
SNAI1 (Snail)*	120nt		
forward	5'-TCG GAA GCC TAA CTA CAG CGA-3'	54	52
reverse	5'-AGA TGA GCA TTG GCA GCG AG-3'	55	55
SNAI2 (Slug)*	66nt		
forward	5'-CGA ACT GGA CAC ACA TAC AGT G-3'	50	50
reverse	5'-CTG AGG ATC TCT GGT TGT GGT-3'	50	52
VIM (Vimentin)*	218nt		
forward	5'-GAC GCC ATC AAC ACC GAG TT-3'	55	55
reverse	5'-CTT TGT CGT TGG TTA GCT GGT-3'	51	47
HPRT1	95nt		
forward	5'-GAC CAG TCA ACA GGG GAC AT -3´	59	55
reverse	5'-GTG TCA ATT ATA TCT TCC ACA ATC AAG -3´	59	33
B2M	86nt		
forward	5'-TTC TGG CCT GGA GGC TAT -3´	60	58
reverse	5'-TCA GGA AAT TTG ACT TTC CAT TC -3´	59	35
RPL13A	99nt		
forward	5'-CCC CTG TTT CAA GGG ATA AGA -3'	60	48
reverse	5'-GACCATCAAGCACCAGGAC -3'	59	58
GAPDH	115nt		
forward	5'-GCTCTCTGCTCCTCCTGTTC-3'	59	60
reverse	5'-ACGACCAAATCCGTTGACTC-3'	59	50

*Quelle: Supplementary File: Wu, Yan et al. "Telomerase reverse transcriptase mediates EMT through NF-κB signaling in tongue squamous cell carcinoma." *Oncotarget* vol. 8,49 85492-85503. 14 Sep. 2017, doi:10.18632/oncotarget.20888 [240]

Die mRNA-Expression der untersuchten Gene wurden relativ zu den Housekeeping-Genen *HPRT1 (*Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase 1), *B2M* (β2-Mikroglobulin), *RPL13A* (60S ribosomal Protein L13) oder *GAPDH* (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) ermittelt.

Es wurden 3 unabhängige Experimente durchgeführt. Die Reaktionen erfolgten jeweils in Duplikaten. Der DNA-Farbstoff SYBR Green I wurde zur Detektion der Fluoreszenzsignale verwendet. Die Proben wurden, wie in der folgenden Tabelle 25 pipettiert und die Analyse wurde mit dem LightCycler 96 (Roche) durchgeführt (Tabelle 26).

Tabelle 25 Pipettierschema der qRT-PCR Proben pro Well. *cDNA: Komplementäre DNA, RNase: Ribonuklease, qRT-PCR: Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion*

Reagenz	Menge (µl)
SYBR Green I	10,0
Forward Primer (10 pM/µl)	0,6
Reverse Primer (10 pM/µl)	0,6
RNase free water	6,8
cDNA (1:10 Verdünnt)	2,0
Gesamtvolumen	20,0

Tabelle 26 Einstellung des LightCyclers96

Programm	Temperatur (°C)	Zeit(s)	Zyklen
Preinkubation	95	120	1
2 Stufen Amplifikation	95 60	2 10	45
Schmelzkurve	95 65 97	10 60 1	1

Effizienzberechnung und Quantifizierung der qRT-PCR Ergebnisse

Für die Genexpressionsanalyse wurde eine relative Quantifizierung durchgeführt, indem die Expression des untersuchten Gens bzw. Zielgens relativ zum Referenzgen (Housekeeping-Gen) berechnet wurde. Zur weiteren Optimierung der mRNA-Quantifizierung wurde die Effizienz der Ziel- und Referenzgene miteinberechnet. Für eine 100 prozentige Effizienz liegt ihr Wert bei 2, da sich in diesem Fall das Zielgen pro Zyklus verdoppelt. Es wurde eine Effizienz einer Reaktion von ≥ 1,8 angestrebt. War sie > 2, wurde sie mit einer Effizienz von 2 gleichgesetzt. Üblicherweise wird für die Effizienzberechnung eine Standardkurve aus unterschiedlichen Verdünnungsstufen erstellt [169]. Die Cp-Werte der Verdünnungen sind gegen die verwendete RNA Konzentration, die für die PCR verwendet wurde und die Steigung der Regressionslinie bestimmt worden. Folgende Geradenformel wurde zur Berechnung der Steigung bzw. „slope“ verwendet:

$$y = k * x + d$$

y: Abhängige Variable
k: Steigung
x: Unabhängige Variable
d: Abschnitt auf y-Achse bzw. erster Cp-Wert

Für *CDH1*, *SNAI1*, *HPRT1*, *RPL13A* und *GAPDH* wurde eine Effizienzberechnung mit einer Verdünnungsreihe von 1:5 durchgeführt. Für *CDH2*, *VIM* und *B2M* wurde eine Verdünnung von 1:10 gewählt (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurde die Effizienz anhand einer Geraden, welche zwischen mindestens 2 Punkten bzw. Verdünnungen definiert wurde, ermittelt. Die qRT-PCR Reaktionen wurden in Duplikaten durchgeführt. Aus Abbildung 13 können die Werte der Steigung k exemplarisch für einzelne Gene entnommen werden.

Zur Berechnung der Effizienz wurde anschließend folgende Formel verwendet:

$$Effizienz = 10^{\left(-\frac{1}{Steigung}\right)} \text{ [236]}$$

Aus den Duplikaten wurde zunächst ein Mittelwert gebildet. Danach wurde die Abweichung vom Mittelwert zum ersten und zum zweiten Replikat berechnet (ΔCp1 und ΔCp2). Dies wurde für alle Housekeeping-Gene und Zielgene durchgeführt. Anschließend wurde das Verhältnis (Ratio) mit Einberechnung der Effizienz getrennt für ΔCp1 und ΔCp2 berechnet. Die Formel zur Berechnung der ratio1 lautet wie folgt ($E_{Zielgen}$: Effizienz des Zielgens; $E_{Referenzgen}$: Effizienz des Housekeeping-Gens)

$$Ratio1 = \frac{(E_{Zielgen})^{\Delta\text{Cp1}-\text{Zielgen}}}{(E_{Referenzgen})^{\Delta\text{Cp1}-\text{Referenzgen}}}$$

Aus Ratio1 und Ratio2 (Einberechnung des ∆Cp2 Werts) wurde ein Mittelwert gebildet Diese Berechnungsweise beruht auf der relativen Quantifizierung nach Pfaffl [170]. Anschließend wurden die zuvor berechneten Mittelwerte der behandelten Zellen ins Verhältnis zu den Mittelwerten der unbehandelten Zellen gesetzt. Um die variierenden Mengen an eingesetzter RNA zu korrigieren, wurden die Proben relativ zu einem Referenz- bzw. Housekeeping-Gen normalisiert [169]. Dazu dienten die Housekeeping-Gene *RPL13*, *GAPDH*, *B2M* und *HPRT1.* Es wurden mehrerer Housekeeping-Gene verwendet, da es Schwankungen in der Regulation dieser geben kann.

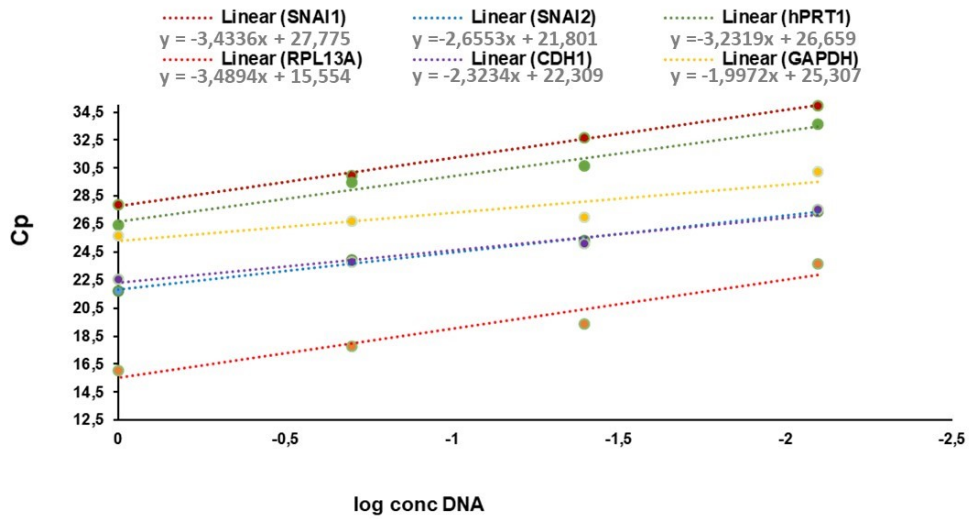


Abbildung 13 Exemplarische graphische Ermittlung der Amplifikations-effizienzen

Es wurden die Effizienzen der Zielgene und Housekeeping-Gene untersucht. RNA wurde aus der Zelllinie UD-SCC 1 isoliert und 1 µg in cDNA umgeschrieben. Eine cDNA Verdünnungsreihe wurde mit Gen-spezifischen Primern mittels qRT-PCR amplifiziert.

Die Darstellung zeigt Cp-Werte in Abhängigkeit der logarithmischen cDNA-Konzentration. Die Steigung wurde ermittelt, welche für die Effizienzberechnung verwendet wurde. Die Formeln sind in der Legende abgebildet. Graphen erstellt mit Microsoft Excel und modifiziert mit PowerPoint. cDNA: komplementäre Desoxyribonukleinsäure, conc: Konzentration, Cp: cross point cycle, GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, HPRT1: Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase 1, log: Logarithmus, qRT-PCR: Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion, RPL13A: 60S ribosomal Protein L13, UD-SCC: Universität Düsseldorf- squamous cell carcinoma

2.2.13 Statistische Auswertungen

Alle graphischen und statistischen Abbildungen und Werte wurden mit Hilfe des Programmes GraphPad Prism (GraphPad Software) erarbeitet. Es ist das Verhältnis von behandelten Zellen zu chemotherapeutisch unbehandelten Zellen bzw. mit Lösungsmittel DMSO behandelte Zellen dargestellt. Letztere wurden gleich eins gesetzt. Abgebildet sind alle Einzelwerte mit Mittelwert. Unterschiede wurden bei den qRT-PCR und Western Blot Experimenten, abhängig vom experimentellen Hintergrund von 6 Versuchen, mit Hilfe eines ungepaarten t-Test festgestellt. Bei mehr als 5 unabhängigen Experimenten kann ein t-Test verantwortet werden. Statistische Signifikanz des ungepaarten t-Test wurde durch Abstufungen wie folgt definiert: *P<0,05; **P<0,005; ***P<0,0005; ****P<0,0001. Bei nichtparametrischer Verteilung kam es zur Verwendung des Tests nach Mann und Whitney (****p<0,0001), um die zentrale Tendenz zweier unabhängiger Stichproben zu untersuchen. Um den Unterschied im Mittelwert zwischen 3 oder mehr Gruppen festzustellen, wurde „Dunns multiple comparison test“ angewendet (Signifikanz abhängig von p-Wert). Dieser Test wurde gewählt, wenn die Werte keiner normalen Verteilung folgten und gibt an, welche spezifischen Mittel von den anderen signifikant unterschiedlich sind.

3 Ergebnisse

3.1 Effekt des ADORA2B-Antagonismus auf Wachstum und Morphologie der Zelllinie UD-SCC 1

Es wurde untersucht, ob die Expression bzw. Aktivität von ADORA2B in Kopf-Hals-Tumor-Zellen der Zelllinie UD-SCC 1 einen Einfluss auf die EMT und Proliferation hat. Zu diesem Zweck wurden Zellen der Kopf-Hals-Tumor-Zelllinie UD-SCC 1 in einer Dichte von 20.000 Zellen pro cm^2 ausgesät und mit dem ADORA2B-Inhibitor PSB-603 (10 µM) für 24 bzw. 48 h behandelt (siehe Kapitel 2.2.1). Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Danach wurden die Zellen mikroskopisch beurteilt und fotografiert (Abbildung 14).

Die unbehandelten Zellen erschienen 24 h nach Aussaat flach, polygonal und ähnelten sich morphologisch (Abbildung 14 a). Zwischen den Zellen waren genug freie Flächen, man erkannte wenige sehr dünne Ausläufer (Abbildung 14d, rote Pfeile) und sternförmige Zellen (Abbildung 14 d, blauer Kreis). Diese spindelförmigen Zellen mit Ausläufern sind charakteristisch für mesenchymale Zellen. Die Zellen vermehrten sich optisch nach 24 h Behandlung (Abbildung 14b). Die dünnen Ausläufer bildeten sich vollständig zurück. Es wuchsen verstärkt epitheliale Zellen mit flacher polygonaler Form (Abbildung 14 e). In den Übersichtsaufnahmen bei 50-fachen Vergrößerung nahm die Zelldichte nach 48 h Behandlung mit ADORA2B-Antagonisten weiter zu (Abbildung 14 c). Die Zellen bildeten einen festen Zellverband und waren dicht aneinandergereiht (Abbildung 14 f, blaue Pfeile). Zellen mit einem starken mesenchymalen Charakter konnten nicht festgestellt werden. Es dominierten epitheliale Zellen mit kubischen bzw. polygonalen Aussehen. Insgesamt zeigte sich eine zeitabhängige Rückbildung der Zellausläufer und der sternförmigen Zellen nach PSB-603 Behandlung. Eine Inhibition der Zellproliferation konnte bei der Beurteilung der mikroskopischen Bilder nicht beobachtet werden. Die morphologischen Veränderungen wiesen darauf hin, dass eine Umkehr des EMT-Prozesses stattfand.

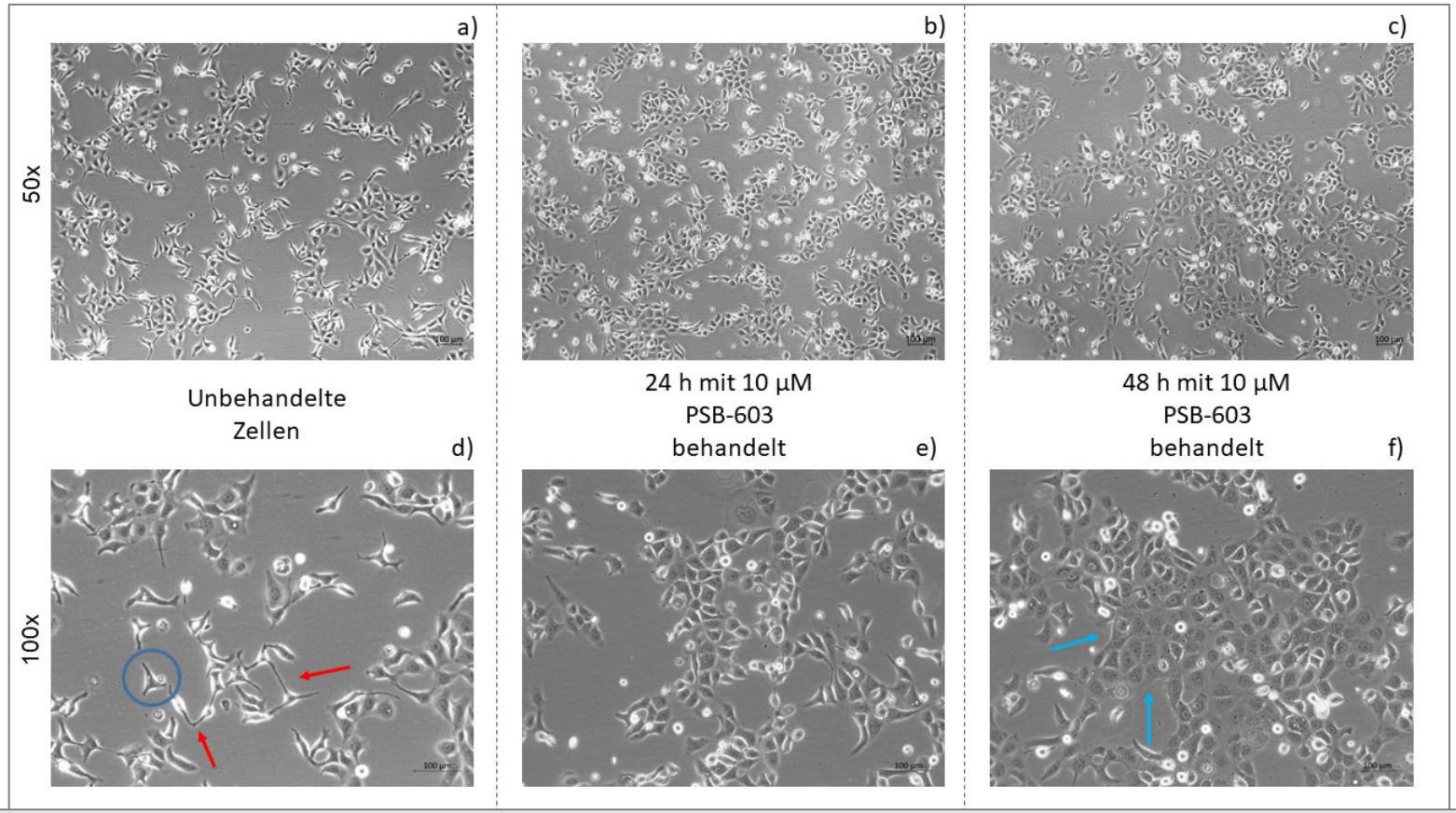


Abbildung 14 Morphologische Untersuchungen der Zelllinie UD-SCC 1 mittels Mikroskopie vor und nach ADORA2B-Antagonisierung

Erste Reihe (a-c) der Fotos in 50-Facher Vergrößerung und zweite Reihe (d-f) 100-Fach vergrößert. Erste Spalte: Unbehandelte Zellen, Zweite Spalte 24 h Behandlung mit 10 µM PSB-603, Dritte Spalte: 48 h Behandlung mit 10 µM PSB-603. **Blauer Kreis**: Sternförmige Zelle, **Rote Pfeile**: Dünne Ausläufer, **Blaue Pfeile**: Kompakte Zellverbände. Fotos aufgenommen in Schwarz/Weiß mit Mikroskop und der ZEN-Software, modifiziert mit Microsoft PowerPoint. ADORA2B: Adenosinrezeptor A2B, PSB-603: Selektiver ADORA2B-Antagonist, UD-SCC: Universität Düsseldorf- squamous cell carcinoma

3.2 Effekt des ADORA2B-Antagonismus auf die Expression von EMT-Markern - Analyse auf mRNA-Ebene

Nachdem morphologisch Hinweise auf eine mesenchymal-epitheliale Transition (MET) ersichtlich waren (Abbildung 14), untersuchten wir den Effekt von ADORA2B-Antagonisierung auf molekularer Ebene. Zu diesem Zweck wurde die Expression von EMT-spezifischen Markern, wie der epitheliale Marker *CDH1* (E-Cadherin) und die mesenchymalen Marker *CDH2* (N-Cadherin), *VIM* (Vimentin), *SNAI1* (Snail) und *SNAI2* (Slug) auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR untersucht. Die Kopf-Hals-Tumor-Zelllinie UD-SCC 1 wurde mit einer Konzentration von 10 µM PSB-603 für 24 h behandelt (siehe Kapitel 2.1.1, 2.2.1, 2.2.11 – 2.2.12). Bei der Kontrolle handelte es sich um unbehandelte Zellen. Alle Ergebnisse wurden relativ gegenüber 4 verschiedenen Housekeeping-Genen (*RPL13A, HPRT1, GAPDH, B2M*) normalisiert. Anschließend wurden die Ergebnisse der ADORA2B-Antagonist Behandlung ins Verhältnis zur Kontrolle gesetzt. Die Kontrolle wurde mit 1 gleichgesetzt. Die quantitative Auswertung beinhaltete jeweils 6 individuelle Experimente. Die statistischen Analysen wurden mit dem ungepaarten t-Test durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.13).

Die relative mRNA-Expression des epithelialen Markes *CDH1* zeigte im Vergleich zur Kontrolle bei keinem der 4 zur relativen Quantifizierung verwendeten Housekeeping-Gene eine signifikante Veränderung. *CDH1* tendierte im Vergleich zu *RPL13A* und *HPRT1* zu einer Erhöhung der relativen Expression (Abbildung 15 A). *CDH2* konnte durch die Behandlung mit ADORA2B-Antagonisten unter Verwendung der Housekeeping-Gene *RPL13A*, *GAPDH* und *B2M* signifikant um bis zu 52 % herunterreguliert werden (Abbildung 15 B). Der mesenchymale Marker *VIM* wies in den verschiedenen Analysen eine große Varianz auf und veränderte sich statistisch nicht signifikant. In einzelnen Experimenten war die relative Expression erheblich erhöht (Abbildung 15 C). Die Expression von *SNAI1* zeigte ebenfalls eine große Varianz und in Einzelfällen bemerkenswert erhöhte relative Expressionen, jedoch ohne statistische Signifikanz (Abbildung 15 D). Die relative Expression von *SNAI2* war nach Behandlung mit PSB-603 unter Einbeziehung des Housekeeping-Gens *GAPDH* zur relativen Quantifizierung signifikant um 30 % herunterreguliert. Dies konnte jedoch unter Verwendung der weiteren Housekeeping-Gene nicht verifiziert werden (Abbildung 16 E).

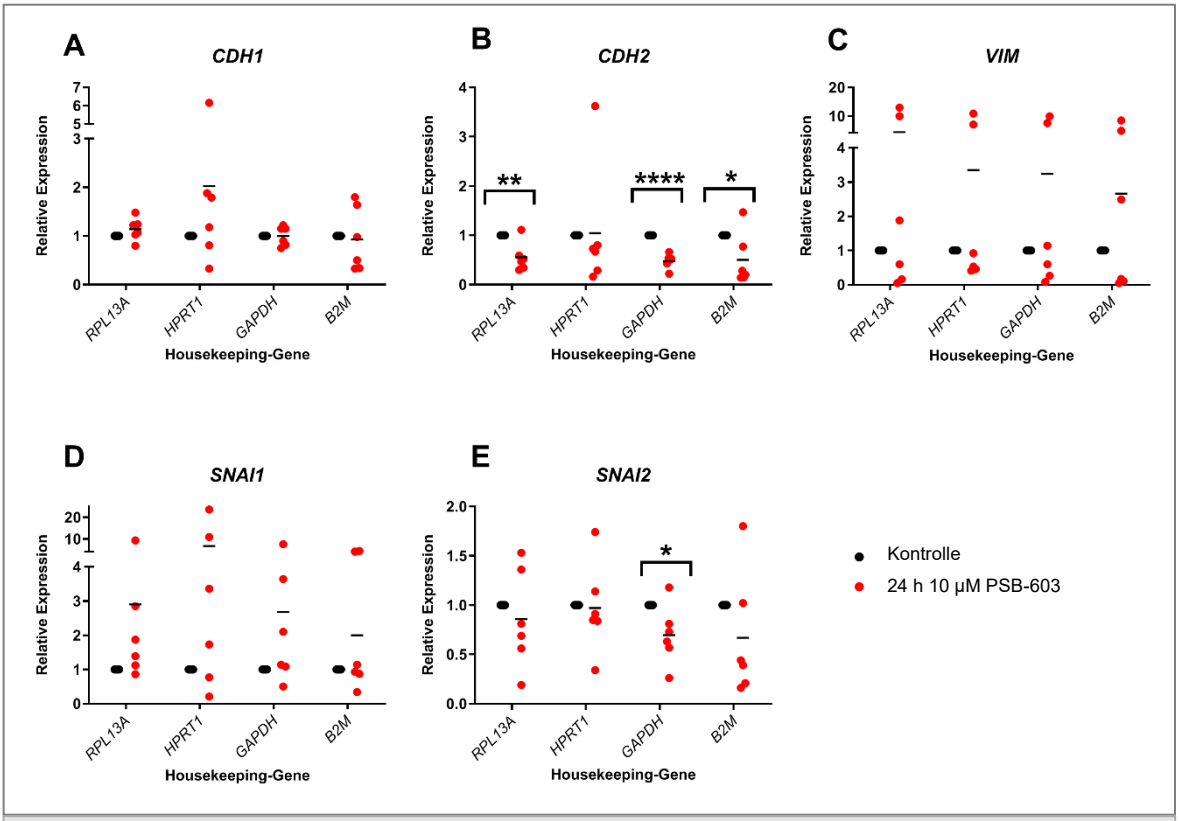


Abbildung 15: Expression von EMT-Markern nach ADORA2B-Antagonisierung auf mRNA-Ebene

A-E UD-SCC 1 wurde 24 h mit einer Konzentration von 10 µM von PSB-603 behandelt zum Nachweis einer Veränderung der Expression von EMT-Markern, *CDH1*, *CDH2*, *VIM*, *SNAI1* und *SNAI2* in einer qRT-PCR (n=6). Die Detektion erfolgte über ein Fluoreszenzsignal mithilfe von SYBR Green I. Die Cq-Werte wurden mit der ΔΔ^2-Methode und unter Einberechnung der Primereffizienzen relativ zur Expression 4 verschiedener Housekeeping-Genen (siehe x-Achse) normalisiert. Die Cq-Werte der behandelten Zellen wurden ins Verhältnis zur Kontrolle gesetzt. Die Graphen wurden mit GraphPad Prism erstellt und es sind alle Messwerte mit Mittelwert dieser dargestellt. Ungepaarter t-Test: *P<0,05; **P<0,005; ***P<0,0005; ****P<0,0001; ADORA2B: Adenosinrezeptor A2B, B2M: β2-Mikroglobulin, Cp: cross point cycle, EMT: Epithelial-mesenchymale Transition, GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, HPRT1: Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase 1, mRNA: messenger Ribonukleinsäure, n: Anzahl an Experimenten, PSB-603: Selektiver ADORA2B-Antagonist; qRT-PCR: Quantitative Echtzeit-Polymerasen-Kettenreaktion, RPL13A: 60S-ribosomal Protein L36; UD-SCC: Universität Düsseldorf- squamous cell carcinoma

3.3 Effekt des ADORA2B-Antagonismus auf die Expression von EMT-Markern - Analyse auf Proteinebene

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der selektiven ADORA2B-Antagonist PSB-603, eine Auswirkung auf die EMT-Genexpression der Zelllinie UD-SCC 1 hat (Abbildung 15). Für ein besseres Verständnis des Effekts der ADORA2B-Antagonisierung auf das Metastasierungspotenzial von Kopf-Hals-Tumoren, wurden zur Ergänzung der Genexpressions-Analysen auf mRNA-Ebene die entsprechenden EMT-spezifischen Proteine untersucht. Zusätzlich zu den Proteinen E-Cadherin, Vimentin, Snail, und Slug, wurde die Phosphorylierung der NF-κB Untereinheit p65 analysiert. Zur Analyse der EMT-spezifischen Proteine wurde die Methode des Western Blots genutzt. Die Plattenepithelzelllinie UD-SCC 1 wurde mit 3 (2 µM, 5 µM und 10 µM) verschiedenen Konzentrationen an PSB-603 für jeweils 24 h und 48 h in der Zellkultur inkubiert und anschließend wurden Proteine extrahiert (siehe Kapitel 2.1.1, 2.2.1, 2.2.4 und 2.2.5). Bei der Kontrolle handelte es sich um unbehandelte Zellen. Alle Ergebnisse wurden zum Housekeeping-Protein AKTB (β-Aktin) normalisiert. Anschließend wurden die Ergebnisse der ADORA2B-Antagonist Behandlung ins Verhältnis zur Kontrolle gesetzt. Die Kontrolle wurde mit 1 gleichgesetzt. Die quantitative Auswertung beinhaltete jeweils 6 individuelle Experimente. Der ungepaarte t-Test wurde für statistische Analysen verwendet (siehe Kapitel 2.2.13).

E-Cadherin zeigte nach PSB-603-Behandlung eine Hochregulierung. Diese war nach 24 h Behandlung stärker ausgeprägt als nach 48 h. Die statistischen Berechnungen ergaben jedoch keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 16 A). Die Proteinexpressionen des mesenchymalen Markers Vimentin zeigten starke Varianzen. Es konnte keine statistisch signifikante Veränderung der Expression im Vergleich zu Kontrolle beobachtet werden (Abbildung 16 B). Die relative Expression von Snail stieg mit zunehmender Konzentration an PSB-603, welche bei einer Konzentration von 2 und 5 µM nach 48 h Behandlung signifikant im Vergleich zur Kontrolle wurde (Anstieg von 35 bzw. 40 %). Eine Behandlung mit 10 µM PSB-603 für 48 h zeigte keine Veränderung der Snail-Proteinexpression (Abbildung 16 C).

Der Transkriptionsfaktor Slug, ein Repressor von E-Cadherin, zeigte ab einer Behandlung mit 5 µM sowohl nach 24 h als auch nach 48 h, eine verminderte Expression. Nach 24 h Behandlung der Zelllinie UD-SCC 1 mit dem ADORA2B-Antagonisten wies Slug bei einer Konzentration von 5 µM PSB-603 eine signifikante 25-prozentige Reduktion der Proteinexpression im Vergleich zur Kontrolle auf. Die Behandlung mit 10 µM über 24 und 48 h mit PSB-603 senkte die relative Expression von Slug relativ zur Kontrolle signifikant um ca. 50% (Abbildung 16 D).

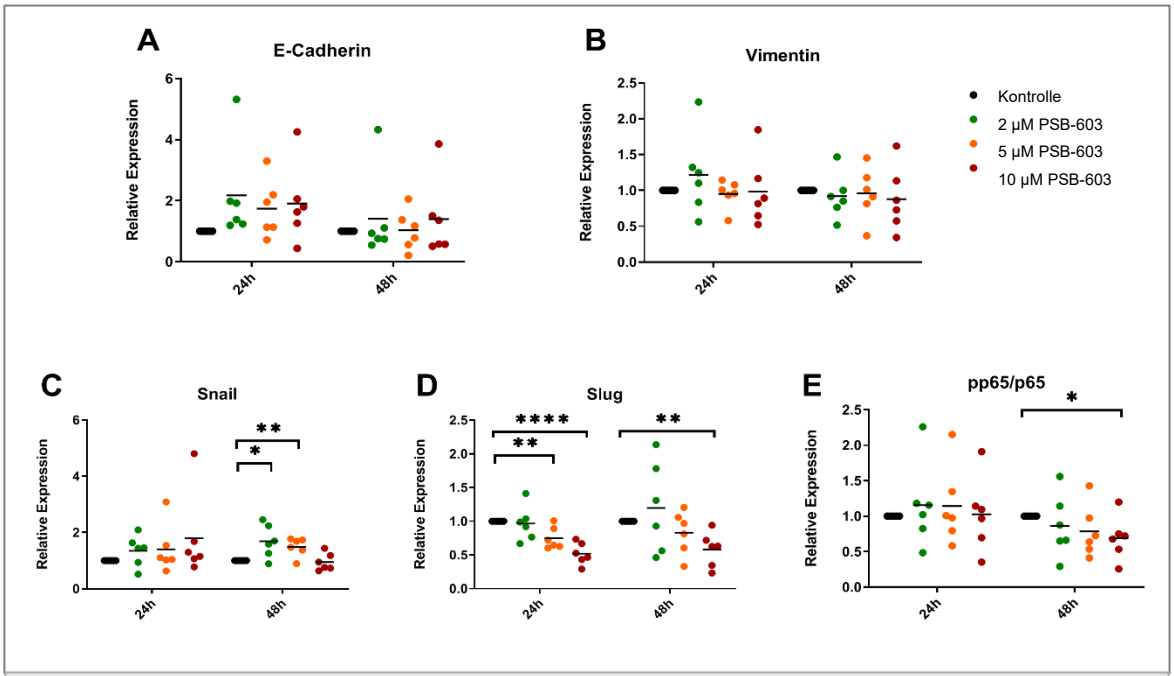


Abbildung 16: Expression von EMT-Markern und NF-κB-p65-Untereinheit nach ADORA2B-Antagonisierung in UD-SCC 1

A-E Graphische Darstellung nach Quantifizierung der Proteinexpressionen ausgewählter EMT-spezifischer Marker. Analyse der relativen Proteinexpression von E-Cadherin, Vimentin, Snail, Slug, und pp65/p65 unter zunehmender Konzentration an PSB-603 nach 24 und 48 h. Nachdem relativ zum Housekeeping-Protein (AKTB/β-Aktin) normalisiert wurde, wurden die Gen-Expressionswerte bei unterschiedlichen Konzentrationen von PSB-603 (2 µM, 5 µM, 10 µM) relativ zur unbehandelten Kontrolle ermittelt, deren Genexpression 1 gesetzt wurde. Die Graphen wurden mit GraphPad Prism erstellt. Es sind alle Messwerte und der dazugehörige Mittelwert dargestellt. Ungepaarter t-Test: *P<0,05; **P<0,005; ***P<0,0005; ****P<0,0001; ADORA2B: Adenosinrezeptor A2B, AKTB: β-Aktin, EMT: Epithelial mesenchymale Transition, NF-κB: Nuclear factor kappa (κ)-light-chain-enhancer of activated b cells, pp65: phospho-p65, PSB-603: Selektiver ADORA2B-Antagonist, UD-SCC: Universität Düsseldorf- squamous cell carcinoma.

Die Proteinexpression von phosphoryliertem NF-κB p65 war im Verhältnis zum p65 Gesamtprotein nach 24 h im Durchschnitt gleich zur Kontrolle. Nach 48 h war eine PSB-603-konzentrationsabhängige signifikante Verminderung der NF-κB p65 Expression zu beobachten. Die einzelnen Messungen zeigten jedoch eine starke Varianz (Abbildung 16 E).

3.4 Effekt des ADORA2B-shRNA in UD-SCC 1 auf die Expression von EMT-Markern - Analyse auf Proteinebene

Um einen direkten Effekt von ADORA2B auf das EMT-Geschehen zu untersuchen und unspezifische Effekte des ADORA2B-Antagonisten PSB-603 auszuschließen, wurden zusätzlich Zellen (UD-SCC 1) nach ADORA2B-Herunterregulation, mittels einer shRNA untersucht (siehe Kapitel 2.2.2). Die Herunterregulation der ADORA2B-Expression wurde in Vorexperimenten nachgewiesen (Daten nicht gezeigt, Johannes Dünser, Doktorarbeit).
E-Cadherin war in den ADORA2B-shRNA-Zellen im Durschnitt um ca. 40 % niedriger exprimiert als in den Kontrollzellen scrambled-shRNA (Abbildung 17 A). Der mesenchymale Marker Slug zeigte im Durchschnitt eine um 30 % niedrigere relative Expression, während Snail um 30 % hochreguliert wurde (Abbildung 17 B und 17 C). Das Verhältnis von pp65/p65 schien in shRNA-Zellen minimal höher zu sein als in scrambled-shRNA Zellen (Abbildung 17 D). Statistische Analysen durch den nicht-parametrischen Test nach Mann und Whitney ergaben jedoch keine signifikanten Ergebnisse (siehe Kapitel 2.2.13).

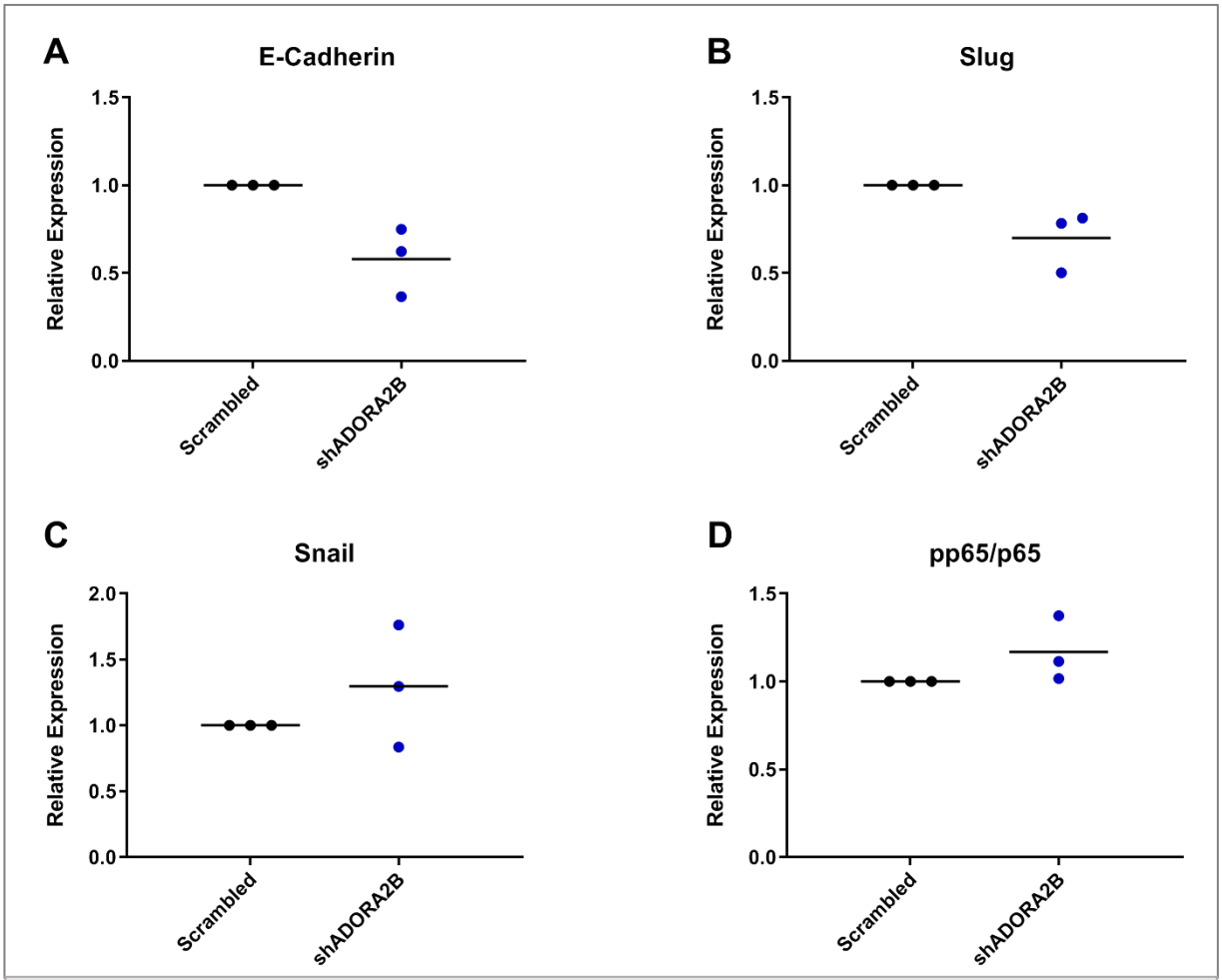


Abbildung 17: Expression von EMT-Markern und NF-κB-p65-Untereinheit in ADORA2B-shRNA-Zellen (UD-SCC 1)

A-D Graphische Darstellung der Western Blot Auswertung. Western Blot Bilder wurden mithilfe der ImageLab Software quantifiziert. Die „shADORA2B"-Werte wurden relativ zu den „Scrambled"-Werten berechnet, die in allen Experimenten 1 gesetzt wurden. Es wurden 3 unabhängigen Versuche durchgeführt. Dargestellt sind die Einzelwerte mit Mittelwert. Die Graphen wurden mit GraphPad Prism erstellt. ADORA2B: Adenosinrezeptor A2B, EMT: Epithelial-mesenchymale Transition, NF-κB: Nuclear factor kappa (κ)-light-chain-enhancer of activated b cells, pp65: phopho-p65, shRNA: small hairpin Ribonukleinsäure, UD-SCC: Universität Düsseldorf- squamous cell carcinoma.

3.5 Effekt der BTK-Inhibition auf Wachstum und Morphologie der Zelllinie UD-SCC 1

Zunächst wurde untersucht, ob die Expression bzw. Aktivität von BTK in Kopf-Hals-Tumor-Zellen einen Einfluss auf die Morphologie der Zellen hat, um erste Hinweise auf einen EMT-Prozess festzustellen. Zu diesem Zweck wurden Zellen der Kopf-Hals-Tumor-Zelllinie UD-SCC 1 in einer Dichte von 20.000 Zellen pro cm^2 ausgesät. Diese wurden entweder unbehandelt gelassen oder mit dem BTK-Inhibitor AVL-292 für 24 bzw. 48 h mit einer Konzentration von 30 µM behandelt (siehe Kapitel 2.2.1). Danach wurden die Zellen mikroskopisch beurteilt und fotografiert (Abbildung 18).
24 h nach Aussaat und ohne Behandlung erkannte man polygonal und spindelförmig erscheinende Zellen, welche sich morphologisch ähnelten (Abbildung 18 a). Man sah größere Abstände zwischen den Zellen und wenige Ausläufer (Abbildung 18 d). Nach 24 h Behandlung mit AVL-292 bekamen die Zellen eine zunehmend sternförmige Form (Abbildung 18 b). Das Netz an Zellen mit dünnen Ausläufern ähnelte mesenchymalen Zellen (Abbildung 18 e, blaue Pfeile). Mit zunehmender Inkubationszeit war in der 50-fachen Vergrößerung (Abbildung 18 b-c) im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abbildung 18 a) eine Ausdünnung der Zelldichte zu erkennen. Nach 48 h Behandlung mit AVL-292 war die Zellzahl optisch deutlich reduziert (Abbildung 18 c). Es blieben einzelne Zell-Inseln übrig (Abbildung 18 c, orangene Pfeile). Nach 48 h sah man außerdem kubische bzw. epithelial geformte Zellen, welche vermutlich fest miteinander verbunden waren (Abbildung 18 f). Mesenchymale Zellausläufer waren geringer ausgebildet.
Initial schien die Behandlung mit AVL-292 einen EMT-Prozess auszulösen, welcher nach 48 h wieder umkehrte und die Zellen erschienen mit epithelialem Charakter.

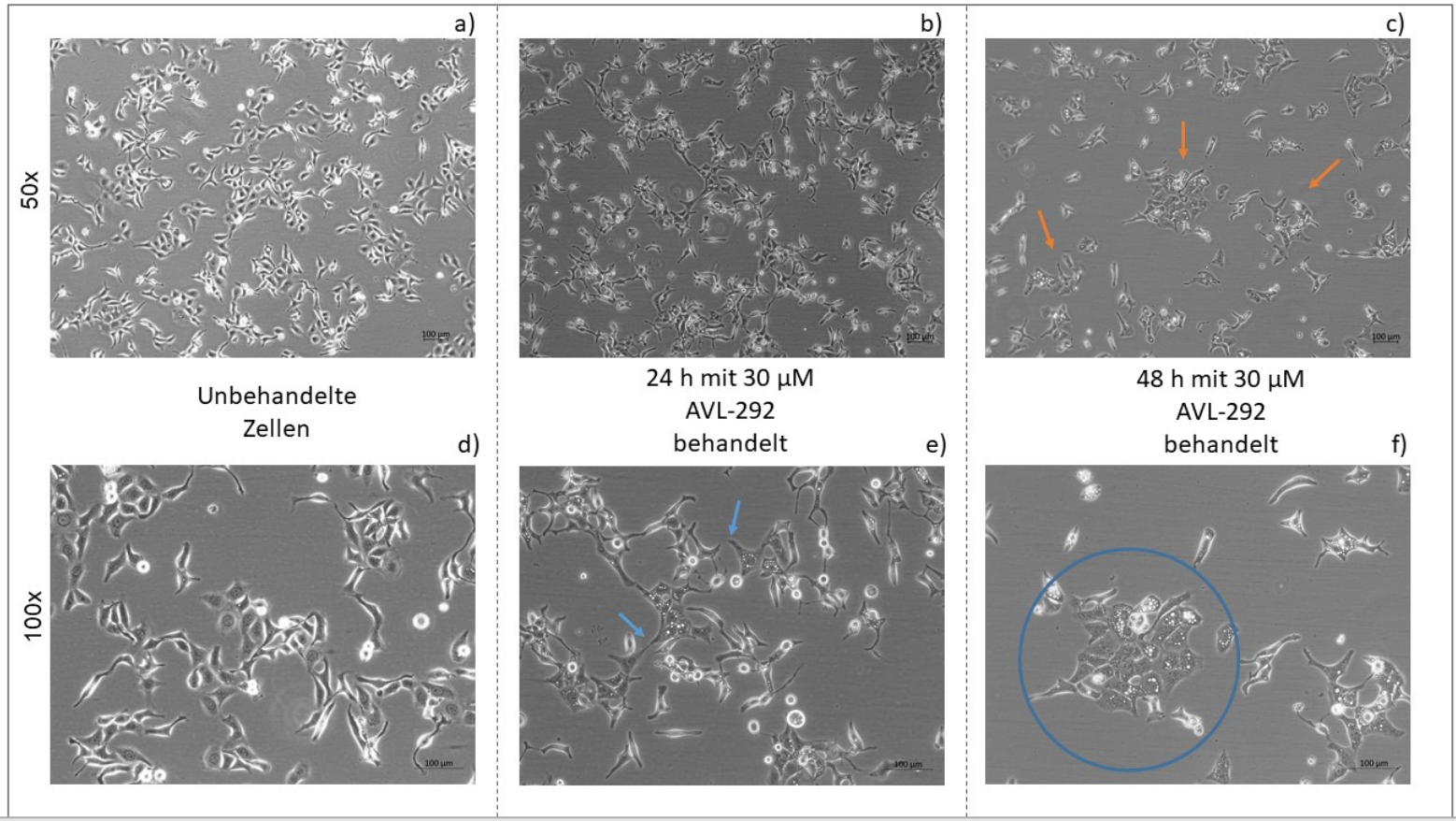


Abbildung 18: Morphologische Untersuchungen der Zelllinie UD-SCC 1 mittels Mikroskopie vor und nach BTK-Inhibition

Erste Reihe (a-c) der Fotos in 50-Facher Vergrößerung und zweiter Reihe (d-f) 100-Fach vergrößert. Erste Spalte: unbehandelte Zellen, Zweite Spalte: 24 h Behandlung mit 30 µM AVL-292, Dritter Spalte: 48 h Behandlung mit 30 µM AVL-292. **Orange Pfeile**: Zell-Inseln, **Blaue Pfeile**: Ausläufer, **Blauer Kreis**: Zellinsel; Fotos aufgenommen in Schwarz/Weiß mit Mikroskop und der ZEN Software, modifiziert mit Microsoft PowerPoint. BTK: Bruton'sche Tyrosinkinase, AVL-292: Selektiver BTK-Inhibitor, UD-SCC: Universität Düsseldorf- squamous cell carcinoma

3.6 Effekt der BTK-Inhibition auf die Expression von EMT-Markern - Analyse auf mRNA-Ebene

Um mehr Aufschluss über den Effekt der BTK-Inhibition auf das Invasions- und Metastasierungspotenzial von Kopf-Hals-Tumor-Zellen auf molekularer Ebene zu erhalten, wurden zusätzlich zu den morphologischen Untersuchungen (Abbildung 18) EMT-spezifische Gene auf mRNA-Ebene untersucht. Dazu wurde die Zelllinie UD-SCC 1 mit 30 µM BTK-Inhibitor AVL-292 für 24 h behandelt und RNA isoliert. Anschließend wurden mittels qRT-PCR die Expression der 5 Gene *CDH1*, *CDH2*, *VIM*, *SNAI1* und *SNAI2* untersucht. Als Housekeeping-Gene wurden *RPL13A, HPRT1*, *GAPDH* und *B2M* verwendet. Bei der Kontrolle handelte es sich um Zellen behandelt mit 0,1 % DMSO (siehe Kapitel 2.1.1, 2.2.1, 2.2.11 und 2.2.12). Anschließend wurden die Ergebnisse der BTK-Inhibitor-Behandlung ins Verhältnis zur Kontrolle gesetzt. Die Kontrolle wurde mit 1 gleichgesetzt. Die quantitative Auswertung beinhaltete jeweils 6 individuelle Experimente. Zur statistischen Analyse wurde der ungepaarte t-Test verwendet (siehe Kapitel 2.2.13).

Das Gen *CDH1* zeigte bei großer Varianz im Schnitt eine erhöhte relative Expression, wenn zur Relativierung der Genexpression die Housekeeping-Gene *HPRT1*, *GAPDH*, und *B2M* verwendet wurden. Diese Veränderungen waren jedoch nicht statistisch signifikant. Unter Verwendung des Housekeepers *RPL13A* zur Normalisierung der Expression blieb die relative *CDH1*-Expression annähernd unverändert (Abbildung 19 A). *CDH2* konnte nach BTK-Inhibition relativ zur Expression von *RPL13A* auf 28 % signifikant gesenkt werden. Dieser Effekt wurde unter Verwendung anderer Housekeeping-Gene zur Relativierung der Genexpression nicht gezeigt (Abbildung 19 B). Relativ zur Expression von *RPL13A*, *HPRT1*, und *GAPDH* war die Expression von *VIM* nach Behandlung mit AVL-292 signifikant hochreguliert. In Einzelfällen kam es zu einer erhöhten Expression um den Faktor 20 (Abbildung 19 C). Der E-Cadherin-Repressor *SNAI1* wurde unter Verwendung von *RPL13A*, *HPRT1* und *GAPDH* signifikant hochreguliert, während unter Verwendung des Housekeeping-Gens *B2M* eine Reduktion der relativen Expression stattfand (Abbildung 19 D). *SNAI2* zeigte unter Verwendung aller 4 Housekeeping-Gene zur Quantifizierung der relativen Genexpression eine

signifikant erniedrigte Expression. Unter Verwendung von *RPL13A* sank die Expression auf 25 % (Abbildung 19 E).

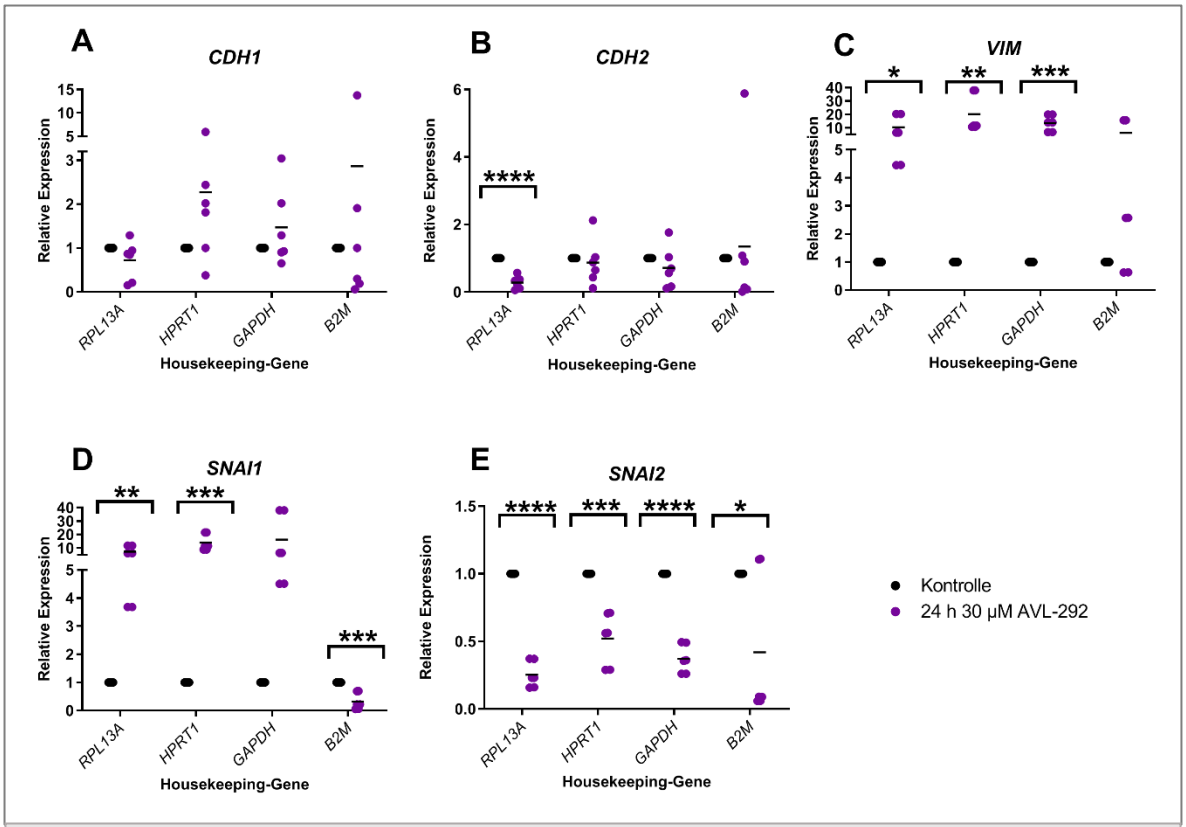


Abbildung 19: Expression von EMT–Markern nach BTK-Inhibition in UD-SCC1 auf mRNA-Ebene

A-E UD-SCC 1 behandelt mit einer Konzentration von 30 µM für 24 h von AVL-292 zum Nachweis einer Veränderung der Expression von EMT-Markern *CDH1*, *CDH2*, *VIM*, *SNAI1* und *SNAI2* in qRT-PCR Analysen. Detektion erfolgte über ein Fluoreszenzsignal mit Hilfe von SYBR Green I. Die relativen Genexpression wurde mittels der ΔΔ^2 Methode und unter Einberechnung der Primereffizienzen und unter Verwendung 4 verschiedener Housekeeping-Gene (siehe x-Achse) berechnet. Die relative Genexpression der behandelten Zellen wurde ins Verhältnis zur Kontrolle (mit 0,1 % DMSO behandelte Zellen) gesetzt, welche 1 gesetzt wurde. Graphen wurden mit GraphPad Prism erstellt. Es werden Einzelwerte mit Mittelwert dargestellt. Ungepaarter t-Test: *P<0,05; **P<0,005; ***P<0,0005; ****P<0,0001; AVL-292: selektiver BTK-Inhibitor, B2M: β2-Mikroglobulin, BTK: Bruton'sche Tyrosinkinase, Cp: cross point cycle, EMT: Epithelial-mesenchymale Transition, GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, HPRT1: Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase 1, mRNA: messenger Ribonukleinsäure, qRT-PCR: Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion, RPL13A: 60S-ribosomal Protein L36, UD-SCC: Universität Düsseldorf- squamous cell carcinoma.

3.7 Effekt der BTK-Inhibition auf die Expression von EMT-Markern - Analyse auf Proteinebene

Um die Genexpressionsanalyse der EMT-Gene mittels qRT-PCR (Abbildung 19) weiter zu vertiefen, wurde die Proteinexpression der Gene untersucht. Dazu wurden Zellen der Plattenepithelzelllinie UD-SCC 1 mit dem BTK-Inhibitor AVL-292 in 3 verschiedenen Konzentrationen (10 µM, 20 µM und 30 µM) über einen Zeitraum von 24 und 48 h behandelt. Als Kontrolle dienten Zellen, welche mit 0,1 % DMSO inkubiert wurden (siehe Kapitel 2.1.1, 2.2.1, 2.2.4 und 2.2.5). Proteinextrakte wurden präpariert und mittels Western Blot wurden die EMT-spezifischen-Proteine E-Cadherin, Snail, und Slug detektiert. Zusätzlich wurden pp65 und p65 detektiert, um die Phosphorylierung der NFκB-Untereinheit p65 zu untersuchen. Alle Ergebnisse wurden zum Housekeeping-Protein AKTB normalisiert. Anschließend wurden die Ergebnisse der BTK-Inhibition zur Kontrolle, welche 1 gesetzt wurde relativiert. Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des ungepaarten t-Tests (siehe Kapitel 2.2.13).

Die relative Expression von E-Cadherin zeigte im Vergleich zur Kontrolle mit steigender Konzentration an AVL-292 nach 24 h einen leichten Anstieg. Bei höchster Konzentration an Inhibitor stieg nach 48 h die relative Expression von E-Cadherin minimal an. Diese Veränderungen waren statistisch nicht signifikant (Abbildung 20 A). Snail, ein Repressor von E-Cadherin und mesenchymaler Marker zeigte nach 24 h einen deutlichen Anstieg der relativen Expression mit steigender Konzentration an Inhibitor. Die relative Expression von Snail verdoppelte sich im Vergleich zur Kontrolle nach 24 h Behandlung mit 10 µM AVL-292. Bei einer Konzentration von 20 µM stieg die Snail-Expression im Vergleich zur Kontrolle auf 3,0 und erreichte das Maximum bei 30 µM AVL-292 mit 3,14. Diese erhöhten relativen Expressionen waren statistisch signifikant. Eine 48 h andauernde Behandlung führt zu keinem signifikanten Unterschied der relativen Expression von Snail im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 20 B). Konzentrationsabhängig kam es nach 24 und 48 h relativ zur Kontrolle zu einer stark erniedrigten relativen Expression von Slug. Bereits 24 h Behandlung mit 20 µM senkte die relative Expression signifikant um 45 %. Mit 30 µM wurde eine signifikante Verminderung der relativen Expression von Slug um 52 % erreicht. Nach 48 h war Slug im Vergleich zur Kontrolle bei 20 µM um 33 % signifikant niedrigerer exprimiert und

30 µM senkte die relative Expression signifikant auf nur mehr 42 % (Abbildung 20 C). Die Ratio pp65/p65 zeigte relativ zur Kontrolle konzentrationsabhängig eine signifikante Erhöhung nach 48 h Behandlung mit AVL-292 (Abbildung 20 D).

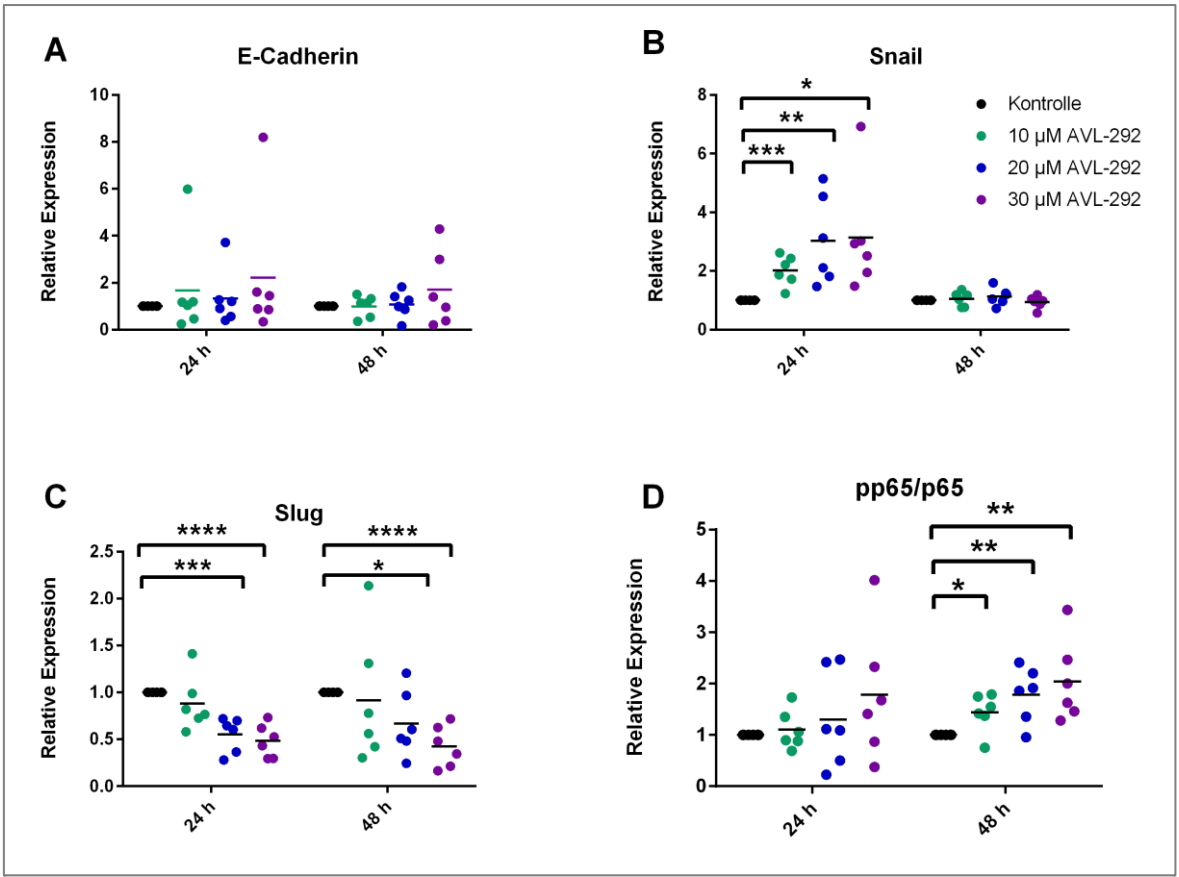


Abbildung 20: Expression von EMT–Markern und NF-κB-p65-Untereinheit nach BTK-Inhibition

A-D Graphische Darstellung nach Quantifizierung der Proteinexpression ausgewählter EMT-spezifischer Marker. Analyse der relativen Proteinexpression in UD-SCC 1 von E-Cadherin, Snail, Slug, und pp65/p65 unter zunehmender Konzentration an AVL-292 nach 24 und 48 h. Nachdem relativ zum Housekeeping-Protein (AKTB/β-Aktin) normalisiert wurde, wurden die Gen-Expressionswerte bei unterschiedlichen Konzentrationen von AVL-292 (10 µM, 20 µM, 30 µM) relativ zur, mit 0,1 % DMSO behandelten, Kontrolle ermittelt deren Genexpression 1 gesetzt wurde. Graphen wurden mit GraphPad Prism erstellt. Es sind alle erhobenen Einzelwerte mit Mittelwert dargestellt. Ungepaarter t-Test: *P<0,05; **P<0,005; ***P<0,0005; ****P<0,0001; AKTB: β-Aktin, AVL-292: Selektiver BTK-Inhibitor, BTK: Bruton'sche Tyrosinkinase, DMSO: Dimethylsulfoxid, EMT: Epithelial mesenchymale Transition, NF-κB: Nuclear factor kappa (κ)-light-chain-enhancer of activated b cells, pp65: phospho-p65, UD-SCC: Universität Düsseldorf-squamous cell carcinoma

3.8 Charakterisierung des alternativen Promotors von *BTKp80*

Die Regulation, welche zur Expression der BTK-Isoform p80 in soliden Tumoren führt, ist noch nicht vollständig geklärt. Eine Möglichkeit wäre die Konsequenz einer Demethylierung des Promotors. Dazu wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst der alternative Promotor mithilfe von UCSC Genome Browser identifiziert und genauer betrachtet (siehe Kapitel 2.2.6). BTK ist auf dem X-Chromosom codiert. Über den Unterpunkt „Regulation“ konnten „CpG-Island“ angezeigt werden. BTK weist 4 Transkriptionsvarianten auf, welche die 3 BTK-Isoformen p77 (B-Zell-spezifisch) und die tumorspezifischen Isoformen p65 und p80 enthalten (siehe Kapitel 1.6, Abbildung 4). Die Transkriptionsvariante 3 entspricht der Isoform p80 und ist die längste Isoform. Diese liegt in der Nähe einer CpG-Insel, welche den alternativen Promotor von p80 enthält. Über die Funktion „Gene and Gene Predictions“ gelangte man über den Unterpunkt „UCSC Alt Events“ dazu, sich alternative Promotoren anzeigen zu lassen. Dieser Schritt bestätigte, dass der alternative Promotor in der zuvor aufgefundenen CpG-Insel erhalten ist. Anschließend wurden Sequenzen und Primer mit der PyroMark Assay Design Software (Qiagen) für die Analyse der Methylierung gewählt. Abbildung 21 zeigt schematisch die untersuchte Stelle im Genom auf dem X-Chromosom, welche das *BTK*-Gen beinhaltet. Dargestellt ist die Isoform p80 welche in 3‘-5‘ Richtung kodiert ist. In der Gegenrichtung (5‘-3‘ Richtung) ist das Gen *RPL36A* kodiert. *BTKp80* ist 368 Basenpaare (bp) vom Gen *RPL36A* entfernt. Der alternative Promotor befindet sich im ersten Exon von *RPL36A*. Es wurden 2 Sequenzen untersucht. Der *BTK alternativ Assay* beinhaltet 8 CpGs des alternativen Promotors. Zusätzlich wurde ein Abschnitt mit 5 CpGs außerhalb des Promotors untersucht (*BTK Assay*). Diese 2 Abschnitte sind Teil einer CpG-Insel, welche in als grüner Balken in Abbildung 21 dargestellt ist. Zwischen dem ersten Exon von *RPL36A* und dem Exon 1C der BTK Isoform p80 liegen 368 bp. Der im Genome Browser beschriebene alternative Promotor ist 150 bp lang und ist ein Teil des ersten Exons von *RPL36A*. Die Entfernung vom alternativem Promotor zum Startkodon (ATG) des Exons 1C ist 483 bp. Der *BTK alternativ Assay* beinhaltete die in 5‘-3‘ Leserichtung erste Hälfte des beschriebenen alternativen Promotors und es wurden 8 CpGs analysiert (Abbildung 21).

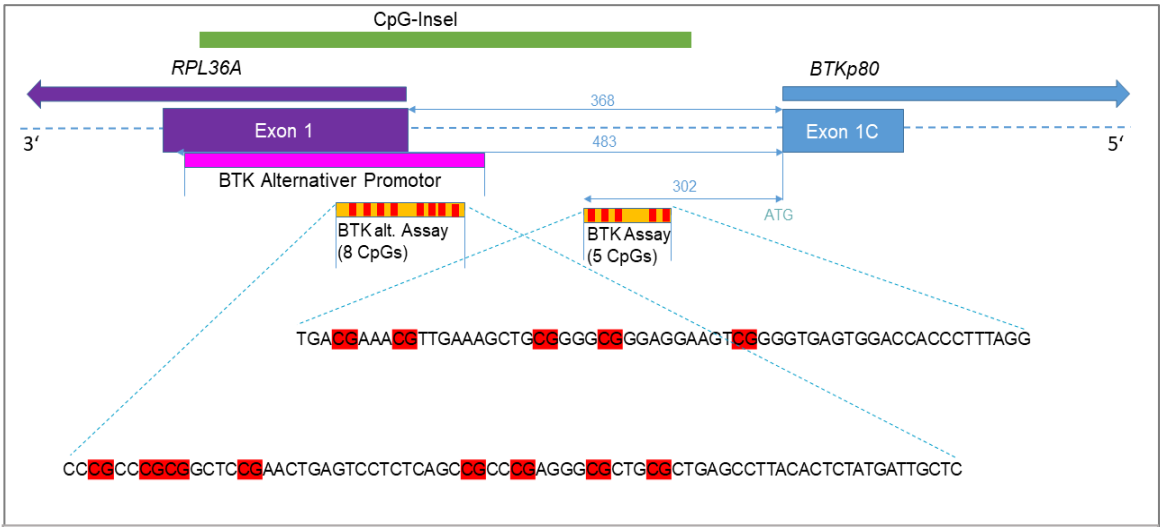


Abbildung 21: Schematische Darstellung des alternativen Promotors der *BTKp80*-Isoform

In 3'-5' Richtung ist die *BTKp80*-Isoform abgebildet, in der Gegenrichtung das Gen *RPL36A*. Dargestellt ist die Lage des alternativen Promotors (**Pinker Balken:** BTK alternativer Promotor). und zwei Sequenzen (**Gelbe Balken:** *BTK alternativ Assay* und *BTK Assay*), welche in einer Pyrosequenzierung auf den Methylierungsstatus in verschiedenen Zelllinien untersucht worden sind. (Untersuchte CpGs innerhalb der Sequenzen sind **Rot** markiert) Der **grüne Balken** stellt die CpG-Insel dar. Die Zahlen sind die Anzahl an bp zwischen den einzelnen Genabschnitten. Abbildung erstellt mit Microsoft PowerPoint. A: Adenin, alt.: Alternativ, BTK: Bruton'sche Tyrosinkinase, bp: Basenpaare, C: Cytosin, CpG: Cytosin-phosphatidyl-Guanin, G: Guanin, RPL36A: 60S ribosomal Protein L36, T: Thymin

3.9 Analyse des Methylierungsstatus der *BTKp80*-Promotorregion und Korrelation mit der BTK-Proteinexpression

Die folgenden Experimente wurden durchgeführt um zu ermitteln, ob die Regulation der Expression von *BTKp80* über eine Methylierung des Promotors stattfindet. Es wurden Zellen der HNSCC- (Head and neck squamous cell carcinoma) Zelllinien UD-SCC 1, UD-SCC 5 und UD-SCC 6 sowie von B-Zell-Tumorzelllinien (BZT-Zelllinien) Ramos, Namalwa und Preb1 geerntet und danach DNA und Proteinlysate isoliert. Dasselbe geschah mit B-Zellen, welche aus Blut gesunder Spender gewonnen wurden (siehe Kapitel 2.1.1 und 2.2.3). Die DNA wurde weiterverarbeitet (siehe Kapitel 2.2.7 bis 2.2.10) und die Methylierung des *BTK alternativ Assays* und *BTK Assays* (siehe Abbildung 21) mit Hilfe der Pyrosequenzierung untersucht. Die Proteinlysate dienten zu Expressionsanalysen im Western Blot (Abbildung 23).

Die Methylierungsergebnisse der 8 CpGs des *BTK alternativ Assays* wurden zusammengefasst und ein Mittelwert gebildet. Die Durchführung der Experimente folgte in 3 individuelle Wiederholungen mit jeweils 3 technischen Replikaten und in 2-maliger Ausführung. Alle auswertbaren Assays (Kriterien siehe Kapitel 2.2.10) wurden als Einzelwerte mit Mittelwert in der folgenden Grafik (Abbildung 22) dargestellt. Zur statistischen Auswertung wurden, bei nichtparametrischer Verteilung der Test von „Mann und Whitney“ und der „Dunns multiple comparison test“- Test verwendet (siehe Kapitel 2.2.13).

Zunächst wurde der *BTK alternativ Assay* durchgeführt, welcher einen Teil des vermuteten alternativen Promotors analysiert (*BTK alt. Assay*-siehe Abbildung 21). Dieser Assay analysierte 8 CpGs. Die Einzelwerte wiesen eine starke Abweichung vom Mittelwert auf. Die durchschnittliche Methylierung aller HNSCC-Zelllinien lag bei 26,63 %. BZT-Zelllinien waren durchschnittlich zu 18,33 % methyliert, die B-Zellen gesunder Spender zu 30,75 %. Dies ergab statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich von HNSCC zu Spender B-Zellen sowie BZT-Zelllinien im Vergleich zu Spender B-Zellen (Abbildung 22 A).

Die Region außerhalb des putativen alternativen Promotors (*BTK Assay*- siehe Abbildung 21) zeigte einen deutlicheren Unterschied in der Methylierung der Tumorzelllinien (HNSCC und BZT-Zelllinien) und der B-Zell-Kontrollzellen von 3 verschiedenen Spendern (Abbildung 22). Der *BTK Assay* analysierte 5 CpGs, welche näher zum ersten Exon von *BTKp80* liegen (Abbildung 21). In Abbildung 22 B wurde der Methylierungsstatus aller verwendeten Zelllinien und B-Zellen von 3 gesunden Probanden im *BTK Assay* individuell dargestellt. Alle Messungen wiesen minimale Abweichungen vom Mittelwert auf. Sowohl die HNSCC-Zelllinien (UD-SCC 1, UD-SCC 5, UD-SCC 6), als auch die B-Zelllinien (Ramos, Preb1, Namalwa) waren niedrig methyliert und der Methylierungswert von 10 % wurde nicht überschritten. Die durchschnittliche Methylierung der CpGs im *BTK Assay* von UD-SCC 1 lag bei 4,1 %, bei UD-SCC 5 waren es 5,0 % und UD-SCC 6 waren zu 5,4 % methyliert.

Die B-Zell-Tumorzelllinien zeigten im *BTK Assay* ähnlich niedrige Methylierungen. (Ramos: 5,5 %, Preb1: 5,6 % und Namalwa: 5,3 %). B-Zellen gesunder Spender hatten eine durchschnittliche Methylierung dieser Region von 40 %. Das heißt die Methylierung war bei B-Zellen gesunder Spender an dieser Stelle um bis zu 35 % höher. Es wurde zusätzlich statistisch untersucht, ob die Methylierung des *BTK*

Assays in Tumorzelllinien im Vergleich zu B-Zellen einer gesunden Kontrollperson signifikant unterschiedlich war. Dazu wurde der nicht parametrische Test nach Mann-Whitney durchgeführt. Alle Zelllinien wiesen im Vergleich zu B-Zellen gesunder Spender eine signifikant niedrigere Methylierung dieser Region auf (Abbildung 22 B).

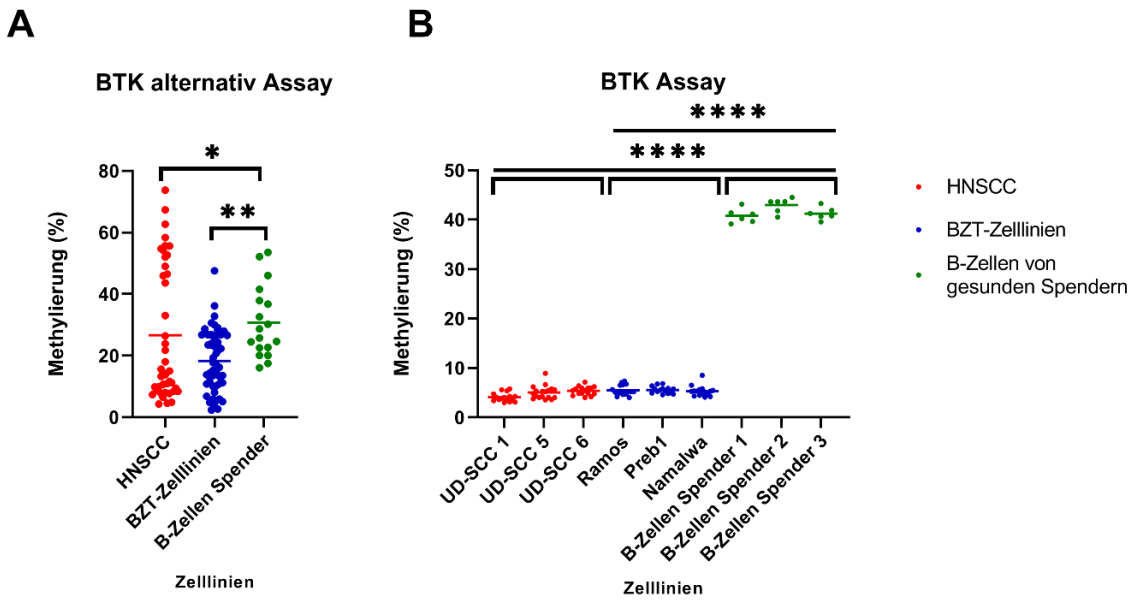


Abbildung 22: Methylierung des *BTK alternativ Assays* und des *BTK Assays*

Zwischen den 8 (BTK alternativ Assay) bzw. 5 CpGs (BTK Assay) (siehe Abbildung 21) wurde ein Mittelwert für die untersuchten Regionen gebildet. Die Punkte stellen Mehrfachbestimmungen jener Mittelwerte (bis zu 18 Bestimmungen pro Zelllinie oder Spender möglich) für die untersuchte Region dar. Zwischen den Mehfachbestimmungen wurde erneut ein Mittelwert gebildet, welcher im Diagramm abgebildet wird.

A Methylierungsstatus unterschiedlicher HNSCC- (**Rote Punkte:** UD-SCC 1, 5 und 6) und B-Zell-Zelllinien (**Blaue Punkte:** Ramos, Preb1 und Namalwa) und Spender B-Zellen (**grüne Punkte**) analysiert im *BTK alternativ Assay*. Es wurde der nicht parametrischer statistische Test „Dunns multiple comparison test„ durchgeführt (*p=0,0428, **p=0,0041). **B** Methylierungsstatus des BTK Promotors im BTK Assay unter Verwendung der Kopf-Hals-Tumor Zelllinien (UD-SCC 1, 5 und 6) sowie B-Zell-Zelllinien (Ramos, Preb1 und Namalwa) im Vergleich zu B-Zellen dreier B-Zell Spender. Es wurde der nicht parametrischer statistische Test nach Mann Whitney (****p<0,0001) durchgeführt. Graphen wurden mit GraphPad Prism erstellt. BTK: Bruton'sche Tyrosinkinase, BZT-Zelllinien: B-Zell-Tumorzelllinien, HNSCC: Head and neck squamous cell carcinoma, UD-SCC: Universität Düsseldorf- squamous cell carcinoma

Zur Expressionsanalyse der Isoform p80 und Isoform p77 wurden Proteinlysate aller Zelllinien und von CD19+-B-Zellen gesunder Spender hergestellt und im Western Blot analysiert (siehe Kapitel 2.2.1 und 2.2.3 bis 2.2.5).

In den HNSCC-Zelllinien UD-SCC 1, UD-SCC 5 und UD-SCC 6 wurde die Expression der Isoform p80 nachgewiesen. Ramos, Preb1 und Namalwa exprimierten zusätzlich noch die B-Zell-spezifische Isoform p77. B-Zellen gesunder Spender exprimierten nur die Isoform p77 und nicht p80 (Abbildung 23).

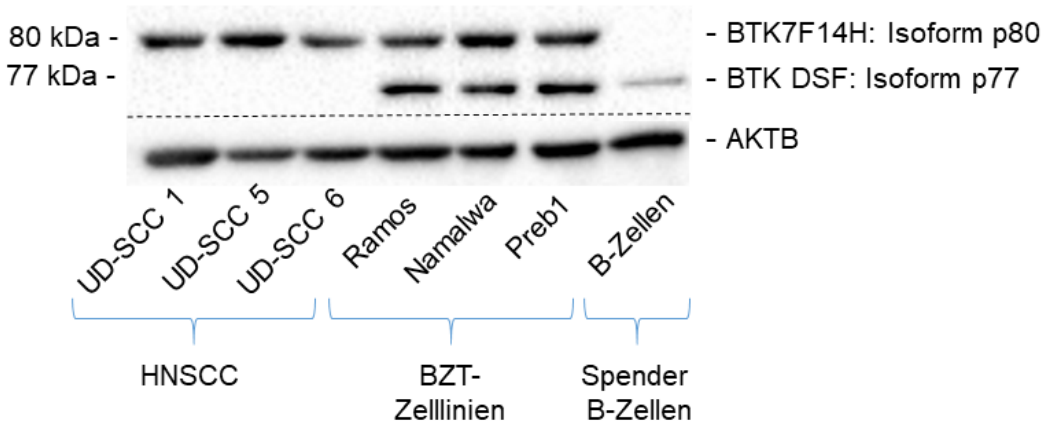


Abbildung 23: BTK-Isoformen p77 und p80 Expression im Western Blot

Proteinexpression der BTK-Isoformen p77 und p80 in HNSCC-Zelllinien, BZT-Zelllinien und B Zellen eines gesunden Spenders (n=3). Die Expression von p80 ist in allen Tumorzelllinien nachweisbar. Es ist keine BTKp80-Expression bei B-Zellen gesunder Spender detektierbar. Die BTK Isoform p77 ist nur in Tumor-B-Zelllinien sowie in B-Zellen gesunder Spender nachweisbar. Western Blot Aufnahmen erfolgten mit der ImageLab Software und die Detektion über eine Chemilumineszenzreaktion. Abbildung erstellt mit Microsoft PowerPoint. AKTB: β-Aktin, BTK: Bruton'sche Tyrosinkinase, BZT-Zelllinien: B-Zell-Tumorzelllinien, HNSCC: Head and neck squamous cell carcinoma, kDa: Kilodalton, n: Anzahl, UD-SCC: Universität Düsseldorf- – squamous cell carcinoma

4 Diskussion

Der Botenstoff Adenosin ist ein wichtiger autokriner und parakriner regulatorischer Faktor für neoplastisches Gewebe. Über Adenosinrezeptoren werden verschiedene Zellarten, wie Immunzellen oder Tumorzellen aktiviert. Durch Suppression des Immunsystems wird das Wachstum von Tumorzellen nicht behindert [9]. Der Adenosinrezeptor A2B (ADORA2B) wird in oralen Plattenepithelkarzinomen (OSCC) verstärkt exprimiert. Die Aktivierung von ADORA2B wirkt sich unter anderem positiv auf die Angiogenese aus und fördert neben vielen weiteren Prozessen das Wachstum des Tumors [5, 82]. Zur Ermittlung des Migrations- und Invasionspotenzials von Kopf-Hals-Tumoren wird in vielen Studien der Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) untersucht [181, 186, 240]. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des selektiven ADORA2B-Antagonisten PSB-603 auf Plattenepithelkarzinomzelllinie UD-SCC 1 hinsichtlich EMT morphologisch, auf mRNA-Ebene und auf Proteinebene untersucht (Abbildung 14-17).

Das zweite Onkogen, dem sich diese Arbeit widmete, war die Bruton'sche Tyrosinkinase (BTK). Die BTK wird in soliden Tumoren wie Prostata-, Kolon- oder Mammakarzinomen exprimiert. Unter anderem wurde auch in Kopf-Hals-Tumoren eine erhöhte BTK-Expression gefunden. Es ist bekannt, dass invasive Prostatakarzinome eine höhere BTK-Expressionsrate als benigne Formen haben [51, 66, 107]. Daher wollten wir mehr über den Einfluss dieses Onkogens auf den EMT-Prozess in Kopf-Hals-Tumoren erfahren.

Dazu wurde die Plattenepithelzelllinie UD-SCC 1 nach Behandlung mit dem selektiven BTK-Inhibitor AVL-292 morphologisch, in qRT-PCR Analysen und im Western Blot auf EMT-spezifische Veränderungen untersucht (Abbildung 18-20).

4.1 Effekt des ADORA2B-Antagonismus auf die Morphologie der Zelllinie UD-SCC 1

Die ersten Untersuchungen dieser Arbeit hinsichtlich des EMT-Prozesses stellte eine mikroskopische Beurteilung der Zelllinie UD-SCC 1 vor und nach Behandlung mit ADORA2B-Antagonisten dar.

Der Adenosinrezeptor A2B ist Gegenstand vieler Studien zu soliden Tumoren. ADORA2B-Antagonisten wirken beispielsweise toxisch auf Fra-1 (Fos related antigen 1) exprimierende Mammakarzinomzellen. Hier unterbindet sowohl die Stilllegung des Gens über inhibitorische Ribonukleinsäure, als auch die pharmakologische Blockade von ADORA2B die Formation von Filopodien und die Metastasierung in die Lunge [46]. In Kolorektalkarzinomzellen steigert der selektive ADORA2B-Antagonist PSB-603 die Sensitivität für eine Chemotherapie durch Veränderungen am zellulären Metabolismus mit einem akuten Anstieg von reaktiven Sauerstoffspezies [142]. Die hohe Selektivität von PSB-603 kann durch die Bindung an bestimmte Aminosäuren erklärt werden [215]. Der synergistische Effekt der ADORA2B-Blockade und Chemotherapie sollte auch in HNSCC (Head and neck squamous cell carcinoma) weiter untersucht werden. Außerdem ist bekannt, dass PSB-603 die Proliferation von Prostatakarzinomzellen signifikant hemmt [234]. Urothelkarzinome der Blase, welche eine hohe Expression von ADORA2B aufweisen, sind assoziiert mit einer schlechten Prognose. Die Blockade des Rezeptors verringert die Proliferation, Migration und Invasion der Urothelkarzinomzellen und hemmt den Zellzyklus in der G1-Phase [257]. Wilkat et al. zeigt, dass PSB-603 die Zellproliferation und Transmigration der HNSCC-Zelllinie UD-SCC 1 inhibiert. Außerdem werden ein Zellzyklusarrest und Apoptose induziert [237]. Die Studie dieser Arbeit zu morphologischer Veränderung der Zelllinie UD-SCC 1 bei Inkubation mit PSB-603 ergab wenig Aufschluss über die EMT (Abbildung 14). Der dynamische Prozess der EMT verändert epitheliale kubisch-polygonale Zellen zu mesenchymalen sternförmigen Zellen mit Ausläufern. Dieser Prozess ist reversibel und der gegenläufige Prozess wird mesenchymal-epitheliale Transition (MET) genannt [110]. In dieser Arbeit konnten vor und nach Behandlung der Zelllinie UD-SCC1 mit PSB-603 Formen beider Zellarten festgestellt werden. Es wurden sowohl epithelial als auch mesenchymal aussehende Zellen identifiziert, welche einer partiellen EMT entsprechen

(Abbildung 14). Um EMT-Prozesse besser zu visualisieren, müssten Immunhistochemie- bzw. Immunfluoreszenz-Untersuchungen mit EMT-Markern durchgeführt werden. Immunhistochemisch zeigt sich beispielsweise nach einem Knockdown des Enzyms CD73 in OSCC eine Anreicherung von E-Cadherin, während Slug, N-Cadherin und Vimentin nicht anfärbbar sind [181]. Primäre Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle, welche Immunhistochemisch ein partielles EMT nachweisen, sind mit Lymphknotenmetastasen assoziiert [164]. Passend dazu zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eine partielle EMT der Zelllinie UD-SCC 1, welche aus einem bereits in Lymphknoten metastasierten Primärtumor etabliert wurde.

4.2 Effekt der BTK-Inhibition auf Morphologie der Zelllinie UD-SCC 1

Der BTK Inhibitor Ibrutinib ist bereits von der „US Food and Drug Aministration-FDA“ zur Behandlung von B-Zell-Malignitäten, wie das Mantelzelllymphom und chronisch lymphatische Leukämie zugelassen [69, 80]. Die Wirkung von Ibrutinib wird vermehrt in soliden Tumoren wie Prostatakarzinomen, gynäkologischen Karzinomen und Hirntumoren wie das Glioblastom untersucht [133, 143]. Die Unterdrückung von BTK in Glioblastom-Zelllinien zeigt eine signifikant reduzierte Fähigkeit zur Formation von Kolonien oder Sphäroiden und Migration [233]. Ibrutinib inhibiert signifikant die Zellproliferation, Migration und Invasion von Prostatakarzinomzelllinien. Dies wird mithilfe von Wundheilungsassays gezeigt [259].

AVL-292 (Spebrutinib) ist ein oral bioverfügbares Acrylamid-Derivat mit potenter und irreversibler anti-BTK-Aktivität, der den B-Zell-Rezeptor-Signalweg durch eine kovalente Bindung an ein Cysteinrest von BTK stoppt. Dies inhibiert selektiv die Autophosphorylierung von BTK und die Aktivierung von PLCy2 (Phospholipase Cγ2) und andere Substrate stromabwärts von BTK in B-Zellen [49]. In den Prostatakarzinomzelllinien LNCaP (lymph node carcinoma of the prostate) und DU145 kann die Zellzahl mit einer Konzentration von 10 µM und 72 h Behandlung signifikant gesenkt werden [107].

Außerdem konnte in Prostatakarzinom-Zelllinien ein Einfluss von BTK-Inhibition auf Apoptosevorgänge durch die Erhöhung von Caspase 3 oder durch Annexin V Färbung festgestellt werden [107]. Unsere Gruppe konnte ähnliche Ergebnisse

bezüglich Apoptose und Wundheilung für HNSCC-Zelllinien mit dem BTK-Inhibitor AVL-292 erreichen (Anna-Rebekka Staufenberg, Doktorarbeit).
Die morphologischen Beobachtungen dieser Arbeit nach 24 und 48 h Behandlung mit BTK-Inhibitor AVL-292, ergaben eine optisch deutlich wahrzunehmende Reduktion der Zellen. Bezüglich EMT konnten Zellen mit epithelialen und mesenchymalen Eigenschaften festgestellt werden, welche einem partiellen EMT entsprechen (Abbildung 18). Eine Studie zu unbehandelten Plattenepithelkarzinomen der Nase zeigt eine erhöhte Expression von Slug, sowie eine erniedrigte E-Cadherin-Expression [197]. Die Auswirkung der BTK-Inhibition könnte weiter mithilfe von histologischen Untersuchungen, beispielsweise mit immunhistochemischen Färbung von EMT-Marker, wie E-Cadherin, Slug und Vimentin ergänzt werden.

4.3 Einfluss der Onkogene ADORA2B und BTK auf EMT

Die EMT wurde in der Plattenepithelzelllinie UD-SCC 1 unter Einbezug der Onkogene ADORA2B und BTK untersucht.
Cadherine spielen eine wichtige Rolle im EMT-Prozess. Eine signifikant erniedrigte Expression von *CDH2* bzw. N-Cadherin spricht für eine Umkehr des EMT-Geschehens. N-Cadherin ist dafür bekannt in EMT-Prozessen eine erhöhte Expression, im Zusammenhang mit dem Abfall von E-Cadherin, zu verzeichnen [249]. Diese Situation wird auch Cadherin-Switch genannt [235]. Der Verlust von E-Cadherin bzw. *CDH1* wird als Schlüsselereignis der EMT bezeichnet [193]. Gewebe von oralen Plattenepithelkarzinomen (OSCC) zeigen vermehrt einen EMT-Phänotyp im Vergleich zu gesunden oralen Mukosa. Dieser EMT-Phänotyp wurde durch erniedrigte E-Cadherin- und β-Catenin-Expression und die Überexpression von N-Cadherin charakterisiert [8]. Ein weiterer klassischer EMT-Marker ist das Intermediärfilament Vimentin. Präsent in mesenchymalen Zellen trägt es zur Kontrolle der Zellmotilität bei [53]. Microarray Analysen zeigten, dass bei Brustkrebspatientinnen nach Chemotherapie eine erhöhte Vimentin mRNA-Expression mit einer schlechten Prognose korrelierte. Unteranderem wird der Transkriptionsfaktor Slug durch Vimentin vermittelt [118].
Die Gene *VIM* (Vimentin) und *SNAI1* (Snail) sind in EMT-Prozessen hochreguliert und stark assoziiert mit Invasion und Migration von Tumoren [110].

Snail und Slug zählen zu den am besten und am meisten untersuchten EMT-assoziierten Transkriptionsfaktoren [101, 250]. Slug (*SNAI2*) gehört wie Snail (*SNAI1*) zu Zinkfingerproteinen, welche die Expression von E-Cadherin reprimieren [73]. Beispielsweise ist die Expression von *SNAI1* in Plattenepithelkarzinomen des Pharynx mit einem progressiven Krankheitsstadium verbunden [100].
NF-κB (Nuclear factor kappa (κ)-light-chain-enhancer of activated b cells) spielt eine wichtige Rolle in der Induktion von EMT und Invasion in soliden Tumoren wie Pankreas- oder Mammakarzinomen [90, 158]. Genexpression-Profile identifizierten EMT und die Aktivierung von NF-κB-Signalwegen als charakteristisch für Hoch-Risiko-HNSCC [34]. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit besonderer Fokus auf den NF-κB-Signalweg bzw. die zuvor genannten Gene, Transkriptionsfaktoren und Proteine gelegt.

AVL-292 und PSB-603 beeinflussen E-Cadherin nicht signifikant

Im Zusammenhang mit Kopf-Hals-Tumoren konnte gezeigt werden, dass die immunhistochemisch niedrige Expression von E-Cadherin in Gewebeproben von Patienten mit Plattenepithelkarzinom des Larynx, mit einer schlechten Differenzierung des Tumors korreliert [4]. Im Gegensatz dazu zeigt eine andere Studie, dass eine Überexpression von zytoplasmatischen und membrangebundenem E-Cadherin mit einem geringeren 3-Jahres-Überleben verbunden ist [67]. Dies widerspricht den in der Literatur üblichen Auffassung, dass eine hohe E-Cadherin-Expression die Zellen stabilisiert und Migration verhindert [212]. Die relative Expression von *CDH1* bzw. E-Cadherin zeigte weder nach Behandlung mit PSB-603 noch mit AVL-292 eine statistisch signifikante Erhöhung (Abbildung 15,16,19 und 20). Möglicherweise muss dies auch nicht unbedingt angestrebt werden. Beispielsweise führt eine Wiederherstellung von E-Cadherin in E-Cadherin negativen Mammakarzinom-Zellen zu keiner Umkehr der Morphologie vom mesenchymalen zu einem epithelialen Phänotyp [84]. Der Verlust von E-Cadherin ist nicht kausal für die Induktion von EMT. Der Mangel an E-Cadherin in der wenig malignen Mammakarzinom-Zelllinie MCF10A (MCF: Michigan Cancer Foundation) reicht nicht aus, um EMT einzuleiten [29]. In der epithelialen Zelllinie HB2 ist der E-Cadherin-Verlust eine Konsequenz der ERBB2-induzierten EMT (erythroblastic oncogene B2) [155]. Studien zum Ovarialkarzinom zeigten

kontroverse Ergebnisse in der Beziehung zwischen E-Cadherin-Expression und Malignität. Es werden sowohl hohe als auch niedrige E-Cadherin-Expressionen beschrieben [183]. Eine hohe E-Cadherin Expression in Metastasen inhibiert Apoptosevorgänge und verbessert das Überleben von Ovarialkarzinom-Zellen [39]. Sphäroide (gruppierte Tumorzellen), welche in der Peritonealflüssigkeit beim Ovarialkarzinom gefunden werden [189], tragen zur Metastasierung bei und weisen hohe Expressionen an Vimentin und niedrige Expressionen an E-Cadherin auf [167]. Die Studie von Chen et al. zeigt, dass die Zelllinie UD-SCC 1 in der 2D-Kultur bereits eine hohe relative E-Cadherin- (95,4 +/- 2,8 %) und niedrige relative Vimentin-Expression (12,5 +/- 2,5 %) aufweist [30]. Dies könnte die in dieser Arbeit nicht signifikanten Ergebnisse nach Behandlung mit AVL-292 und PSB-603 erklären (Abbildung 15-17 und 19-20). Multizelluläre, labortechnische hergestellte Tumorsphäroide der Zelllinie UD-SCC 1 weisen eine erhöhte Invasivität auf und enthalten vermehrt Vimentin positive Zellen [30]. Ihler F. et al konnte in Tumorsphäroiden von HPV negativen Plattenepithelkarzinom Zellen ein Verlust von E-Cadherin nachweisen [95]. Daher würden Experimente mit Sphäroiden und unter Verwendung von PSB-603 bzw. AVL-292 womöglich stärkeren Effekte auf die EMT-Marker E-Cadherin und Vimentin zeigen.

PSB-603 und AVL-292 beeinflussen NF-κB unterschiedlich – Einfluss des TGF-β Signalwegs ursächlich?

Die NF-κB-Proteinfamilie umfasst RelA (p65), RelB, c-Rel, p50 (p105 Vorläufer), p52 (p100 Vorläufer) [15]. Diese Proteine interagieren miteinander und bilden Homo- oder Heterodimere. Zusätzlich werden mit inhibitorischen Proteinen (IkB-Proteinen) Komplexe gebildet [145]. NF-κB wird über zwei verschiedene Signalwege reguliert. Dazu gehört der kanonische NF-κB essentielle Modulator (NEMO)-abhängige Signalweg und der nicht-kanonische NEMO-unabhängige Signalweg [190]. Das hier untersuchte RelA- (p65) Protein wird üblicherweise über den klassischen/kanonischen Weg aktiviert. Es liegt meist als Heterodimer mit p50 im Zytoplasma vor [63]. Die transkriptionelle Aktivität von NF-κB wird durch die Phosphorylierung über die Proteinkinase A (PKA) der p65 Untereinheit stimuliert [255]. Die Phosphorylierung findet an Serin- und Threoninresten statt. [33]. Eine Phosphorylierung am Serinrest (S) S536 führt zu einer Aktivierung der NF-κB

abhängigen Transkription [87]. Dieser Weg der Aktivierung wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, indem phosphoryliertes p65 (pp65) am Serin 536 im Verhältnis zu nicht-phosphorylierten p65 analysiert wurde (Abbildung 16-17 und 20). Wird p65 phosphoryliert, führt dies zu einer Konformationsänderung, welche Ubiquitinylierung, Stabilität und die Interaktion zu anderen Proteinen beeinflussen [135]. Das Heterodimer p50:c-Rel führt zur Transkription von beispielsweise *MYC* (Myelocytomatose) und *TGFB1* (transforming growth factor- B1 (β)). Diese fördern das Zellwachstum [184].

Die TGF-β-Signalwege lassen sich in den kanonischen SMAD-abhängigen und in den nicht-kanonischen bzw. SMAD-unabhängigen unterteilen [208]. Der nicht-kanonische Signalweg beinhaltet die weitere Regulation über extrazellulär regulierte Kinase (ERK), Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), AKT, RAS oder NF-κB [144, 254]. Die TGF-β-vermittelte EMT-Induktion aktiviert PI3K und AKT und verändert die E-Cadherin- und SMAD4-Expression [71, 162]. PI3K ist unteranderem bei der Aktivierung von BTK involviert [57]. Der SMAD-unabhängige TGF-β Signalweg wird über die TGF-β1 aktivierte Kinase 1 (TAK1) aktiviert. TAK1 kann den IKK-Komplex (IκB-Kinase) direkt phosphorylieren und NF-κB-Transkription aktivieren [10]. Die Gruppe von Huber M. zeigte, dass IKK2 abhängige NF-κB-Aktivierung essenziell für EMT und Metastasen ist. Die Behandlung von Mammakarzinomzellen mit TGF-β führte in einer Immunfärbung zur Ausbildung von spindelförmigen Vimentin positiven und E-Cadherin negativen Zellen [90]. Im Zusammenhang von E-Cadherin und dem NF-κB-Signalweg, wird an primären humanen mesothelialen Zellen gezeigt, dass über den p38-MAPK-Signalweg (Mitogen aktivierte Proteinkinase) die Suppression des TAK1-NF-κB-Signalwegs stattfindet und die E-Cadherin-Expression aufrechterhalten wird. Dies verhindert die Induktion von EMT [203]. Die E-Cadherin-Expression wurde in dieser Arbeit weder durch den BTK-Inhibitor noch durch den ADORA2B Antagonisten beeinflusst. Inwiefern die Herunterregulierung von NF-κB nach ADORA2B-Antagonisierung mit dem TGF-β-Signalweg zusammenhängt sollte weiter untersucht werden.

In manchen Kopf-Hals-Tumoren können der TGF-β Rezeptor II sowie TAK1 überexprimiert werden und die NF-κB-Untereinheit p65 wird aktiviert [59]. Die BTK aktiviert stromabwärts zahlreiche Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel NF-κB oder den nukleären Faktor von aktivierten T-Zellen (NF-AT) und Überlebenssignalkaskaden wie RAS/RAF/MEK/ERK und PI3K/AKT/mTor (RAF:

rapidly accelerated fibrosarcoma, mTOR: mammalian target of rapamycin) [141]. Dies widerspricht dem Ergebnis dieser Arbeit, welche bei BTK Inhibition eine signifikante Erhöhung von pp65/p65 zeigt. In anderen Studien konnten potenzielle „gain-of-function“ Mutationen beispielsweise beim Faktor PLCγ2 stromabwärts von BTK identifiziert werden [75, 239]. Diese Mutation kann die Aktivierung des NF-κB Signalwegs unabhängig von einer BTK-Aktivierung bzw. Inhibition beeinflussen [75]. Stromabwärts des BTK-Signalwegs kommen „gain of function“-Mutationen bei beispielsweise PKCβ (Proteinkinase Cβ) in Frage [57, 80]. Dieser Aspekt könnte eine Erklärung für die Ergebnisse dieser Arbeit sein und sollte weiter untersucht werden. Außerdem könnten qRT-PCR und Western Blot Experimente zu Genen und Proteinen des TGF-β Signalwegs, als wichtiger Aktivator des NF-κB Signalwegs, weiteren Aufschluss über die Wirkung des BTK-Inhibitors AVL-292 und des ADROA2B-Antagonisten PSB-603 auf den komplexen EMT-Prozess geben.

AVL-292 und PSB-603 bewirken eine überwiegend erhöhte Snail-Expression

Der Transkriptionsfaktor Snail (Genname: *SNAI1*) ist hauptsächlich als E-Cadherin-Repressor bekannt, welche über Bindung an dessen Promotor stattfindet [16]. Snail trägt in frühen Stadien bei Differenzierung der Zellen und in späten Stadien durch Invasion und Inflammation zur Malignität bei [124]. NF-κB bzw. p65 beeinflusst Snail sowohl über transkriptionelle als auch post-transkriptionelle Wege [229]. Bioinformatisch können NF-κB-Bindungsstellen an den Promotoren von Snail und Slug gefunden werden [173]. Die NF-κB/p65-Aktivierung führt zu einer verstärkten Snail Transkription [229]. Dieser Zusammenhang konnte in der vorliegenden Arbeit bei der BTK-Inhibition angedeutet gezeigt werden (Abbildung 20). Snail besitzt unter anderem einen Feedbackmechanismus, welcher durch Bindung an den eigenen Promotor die weitere Transkription von Snail hemmt [229]. Dieser Feedbackmechanismus könnte bei der 48 h andauernden Behandlung mit AVL-292 und der folgenden gleichbleibenden Proteinexpression von Snail im Vergleich zur Kontrolle eine Rolle gespielt haben (Abbildung 20). Die Expression von Snail ist außerdem assoziiert mit Chemotherapieresistenz für Cisplatin und 5-Fluorouracil in HNSCC und in NSCLC (non small cell lung cancer) [86]. Die Behandlungen mit AVL-292 und PSB-603 könnten folglich die Entstehung einer Chemotherapieresistenz möglicherweise unterstützen. Neben NF-κB aktivieren

zahlreiche andere Signalwege Snail, welche ergänzend untersucht werden sollten. Dazu zählen der TGF-β, WNT (Wingless -Int 1), Notch und Wachstumsfaktoren, die über Tyrosinkinase-Rezeptoren wirken [168].
In OSCC ist häufig die AKT/PKB Kinase Familie aktiviert [211]. Die Inhibition von *AKT* verringert NF-κB-Signale und führt zu MET mit erniedrigten Snail- und Twist-Expressionen [85]. Die Expression von nukleären Snail korreliert mit Lymphknoten- und Fernmetastasen in Mammakarzinomen und HNSCC [245]. Snail kooperiert mit dem SMAD3-SMAD4 Komplex, welcher über TGF- β die E-Cadherin-Expression unterdrückt [225]. TGF-β aktiviert außerdem ERK5-MAPK und inhibiert GSK3β. Dies führt zu einer Stabilisierung und erhöhten Aktivität von Snail [128]. Es bleibt unklar, welche Faktoren in dieser Arbeit zu einer überwiegend erhöhten Snail- bzw. *SNAI1*-Expression geführt haben.

Beeinflussen AVL-292 und PSB-603 die GSK-3?

Die Glycogensynthetase-Kinase-3 (GSK-3) beeinflusst neben der Glucosesynthese in der Leber und im Muskel viele weitere zelluläre Prozesse, wie Proliferation und Zelldifferenzierung [182]. Es werden 2 GSK-3-Gene unterschieden: GSK-3α und GSK-3β [83]. GSK-α ist vor allem für den Glucosestoffwechsel zuständig [127]. GSK-3β ist involviert in Entwicklungsprozesse des unreifen Gehirns, wie der Neurogenese, neuronale Migration, Differenzierung und Überleben [123]. Außerdem spielt GSK-3β eine große Rolle im Energiemetabolismus [174]. Eine Maus mit GSK-3β-Deletion ist nicht lange überlebensfähig [83]. GSK-3 ist zentral für multiple intrazelluläre Signalwege, welche über WNT/β-catenin, Sonic Hedgehog, Notch, Wachstumsfaktoren/Rezeptortyrosinkinasen (RTK) und G-Protein-gekoppelte Rezeptor Signale aktiviert werden [58]. Die GSK-3 ist ubiquitär vorhanden und in unstimulierten Zellen aktiv [83]. Die Regulation erfolgt über die Inhibierung der GSK-3-Aktivität über verschiedene Mechanismen, wie beispielsweise Phosphorylierung an Serinresten [206], Phosphorylierung an Threoninresten durch p38MAPK [216] oder durch Acetylierung [205, 207]. In Karzinomen erfolgt die Unterdrückung von GSK-3β über die häufig aktivierte WNT und PI3K [238]. In HNSCC wird abhängig von der Zelllinie bei GSK-3α/β-Inhibition das Wachstum und die Migration verringert [186]. Die GSK-3-Aktivität kann in einer Zelle herunterreguliert sein ohne, dass der Phosphorylierungsstatus der GSK-3-

Substrate verändert wird [182]. Ein Substrat der GSK-3 ist die NF-κB-Untereinheit p65 [207]. Die GSK-3 (beide Unterformen) inhibiert NF-κB und die Snail-Expression [12]. Eine Inhibition der GSK-3β führt zur Hochregulierung von Snail [128, 256]. In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl erhöhte relative mRNA-Expressionen als auch Proteinexpressionen von Snail nach BTK-Inhibition oder ADORA2B-Antagonisierung gefunden (Abbildung 15-16 und 19-20). Die GSK-3β-Inhibition führt zusätzlich zu einer reduzierten E-Cadherin- und erhöhten Vimentin-Expression in epithelialen Zellen von Haut- und Brustgewebe [12]. Die vorliegende Arbeit zeigte auf mRNA-Ebene, dass die BTK-Inhibition signifikant relative Expressionen von Vimentin (*VIM*) erhöhte (Abbildung 19). Folglich könnte die Aktivität der GSK-3β im Kontext der Experimente dieser Arbeit Einfluss auf die oben genannten Gene und Proteine gehabt haben, sowie insbesondere auf die NF-κB/p65-Aktivität. Ergänzende Experimente (z.B. Western Blot oder qRT-PCR) zur GSK-3-Expression und Phosphorylierung könnten weiteren Aufschluss über die diskrepanten EMT-Marker-Expressionen dieser Arbeit geben.

Grenzen der qRT-PCR und Regulation von Housekeeping-Genen in Tumoren

Die qRT-PCR ist eine in der Forschung häufig verwendete Methode für Genexpressionsanalysen. In der vorliegenden Arbeit ergaben sich insbesondere in Abbildung 19A (*RPL13A*) und 19D (*B2M*) erhebliche Diskrepanzen bezüglich der Expressionsstärke von Genen, wenn unterschiedliche Housekeeping-Gene zur Normalisierung verwendet werden. Bei einer qRT-PCR sollten vorzugsweise Housekeeping-Gene als endogene Kontrolle verwendet werden, welche eine konstante Expression aufweisen [74]. In dieser Arbeit wurden die in der Forschung häufig verwendete Housekeeping-Gene *HPRT1*, *B2M*, *GAPDH* und *RPL13A* gewählt. Die Literatur belegt, dass diese jedoch durch experimentelle Bedingungen beeinflusst werden können [41]. Dazu zählen beispielsweise insbesondere B2M und *HPRT1* [151, 198]. Spezifische Untersuchungen zur Stabilität von Housekeeping-Genen in einer in der Forschung häufig verwendeten Zelllinie (Human embryonale Kidney cells: HEK293) zeigten, dass *RPL13A* und *B2M* am wenigsten stabil sind [2]. In einer weiteren Studie zur Identifizierung geeigneter Housekeeping- Gene in HNSCC des Larynx zeigte sich B2M nicht geeignet [227]. Für das Housekeeping-Gene *GAPDH* hat sich herausgestellt, dass die Expression

in Tumorzellen aufgrund verschiedenster Faktoren dereguliert sein kann [252]. Eine Studie zur Identifizierung von verlässlichen Housekeeping-Genen in HNSCC zeigte, dass *GAPDH* in HNSCC variabel exprimiert wird und daher nicht als Referenz geeignet ist [161].
Somit hätte in der vorliegenden Arbeit eine sorgfältige Auswahl der Housekeeping-Gene im Vorfeld durchgeführt werden sollen, um konstante Ergebnisse zu erhalten. Dies hätte durch die Verwendung von einem oder mehreren verfügbaren Programmen zur Evaluation der Expressionsstabilität durchgeführt werden können. Dazu zählen der NormFinder, GeNorm oder BestKeeper [97, 161, 195].

Morphologische Umwandlung als Grundstein für eine veränderte Proteinexpression

Die morphologische Umwandlung von epithelialen Zellen zu mesenchymalen Zellen verändert die Kommunikation zu Proteinen der Extrazellulärmatrix (EZM) [77, 249]. In der vorliegenden Arbeit konnten bei mikroskopischen Untersuchungen der Zelllinie UD-SCC 1 nach PSB-603 bzw. nach AVL-292 Behandlung morphologische Veränderungen festgestellt werden (Abbildung 14 und 18).
In der EZM befindet sich eine latente Form von TGF-β [188]. TGF-β beeinflusst verstärkt die Zellen, welche von Veränderung der Zusammensetzung und Eigenschaften der EZM betroffen sind [213, 214]. Die veränderte Kommunikation der EZM-Proteine betrifft die Expression verschiedener Integrine [249]. Dies korreliert mit einer erhöhten Expression von Metalloproteinasen (MMP) [156] In epithelialen Zellen der Mamma werden MMPs als EMT-Induktoren entdeckt [35].
ERK-MAPK Signale verstärken die TGF-β-induzierte Transkription. Die E-Cadherin-Expression wird verstärkt unterdrückt, wenn N-Cadherin- und MMP-Expression aktiviert wird [65, 221]. Der TGF-β-SMAD Signalweg und β-Catenin beeinflussen, dass für die EMT-Progression benötigte Integrin α3β1, welches mit E-Cadherin interagiert [106]. Des Weiteren wird in EMT-Prozessen beispielweise das epitheliale Integrin α6β4 herunterreguliert [248]. Die relative Expression von N-Cadherin bzw. *CDH2* konnte sowohl durch den ADORA2B-Antagonisten als auch durch den BTK-Inhibitor auf mRNA-Ebene signifikant gesenkt werden, während *CDH1* (E-Cadherin) nicht signifikant beeinflusst wurde (Abbildung 15 und 19). Im Rahmen des EMT-Prozesses könnten folglich Experimente, welche die Expression von Integrinen und

MMPs betreffen, weiteren Aufschluss über die epithelialen Eigenschaften sowie EZM-Veränderungen der Zelllinie UD-SCC 1, beeinflusst durch BTK-Inhibition oder ADORA2B-Antagonisierung geben.

Die veränderte Zusammensetzung von Integrinen korreliert mit einer erhöhten Expression von MMPs [156]. MMP2 und MMP9 führen zu einer erhöhten Degradation von EZM und ermöglichen die Invasion der Zellen [156]. Weiters induziert beispielsweise MMP3 EMT durch Erhöhung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und folglich erhöhter *SNAI1*- bzw. Snail-Expression [178]. MMP3 führt ROS-abhängig zur Bindung der p65 NF-κB-Untereinheit an den Snail-Promotor und verstärkt dessen Transkription [35]. Dies würde zu den Ergebnissen dieser Arbeit in der Abbildung 20 passen. Eine Analyse der Expression von MMP3 müsste ergänzt werden.

Signifikant erniedrigte relative Expression von *CDH2* vs. signifikant erhöhte relative *SNAI1*-Expression

TWIST1 gehört zu den basic helix-loop-helix (bHLH) Transkriptionsfaktoren und zu den Hauptregulatoren der Ausdifferenzierung von Zellen zu einem spezifischen Zelltyp [168]. Durch Unterdrückung von nicht-kanonischen TFG-β-Signalwegen WNT/β-catenin und AKT, wird TWIST1-abhängige EMT in HNSCC inhibiert [231]. Der Transkriptionsfaktor TWIST1 kann unabhängig von Snail die E-Cadherin-Expression verringern [242, 246]. Des Weiteren wird die Expression von N-Cadherin ebenfalls durch TWIST1 unabhängig von Snail induziert [246, 247]. In der vorliegenden Arbeit konnten trotz erhöhter relativer Snail- bzw. *SNAI1*-Expression signifikant erniedrigte relative *CDH2*-Expressionen erreicht werden. Aus diesem Grund wäre eine zusätzliche Untersuchung von TWIST1 im Kontext der Versuche dieser Arbeit sinnvoll, um den EMT-Prozess besser zu definieren.

Der Transkriptionsfaktor Slug wird durch PSB-603 und AVL-292 signifikant beeinflusst

Die Überexpression von Slug korreliert nicht immer mit dem Verlust von E-Cadherin. Durch veränderte Sequenzen am Promotor von E-Cadherin kann die Bindung von Slug nicht stattfinden und die Repression fällt weg [7]. Die Slug-Expression konnte in den Experimenten dieser Arbeit, bei erhaltener E-Cadherin-Expression, signifikant verringert werden (Abbildung 15-17 und 19-20). Eine Studie zu Plattenepithelkarzinom des Ösophagus zeigt, dass bei erhaltener E-Cadherin-Expression das 5-Jahres-Überleben bei Slug-negativen Patienten besser ist als bei Slug-positiven [220]. Die Behandlung mit AVL-292 und PSB-603 könnte sich folglich durchaus positiv auf das Überleben auswirken.

Eine Studie unter Verwendung von Mammakarzinomzellen zeigt, dass NF-κB an den Slug-Promotor binden kann [173]. Die Blockade von NF-kB/p65 Aktivität durch Reduktion der Transkripte und Proteinexpression in aggressiven Mammakarzinom-Zelllinien führt zu einer niedrigeren Invasivität und Migration sowie eine Herunterregulierung von beispielsweise Slug, N-Cadherin und Heraufregulierung von E-Cadherin [173]. Die relativen Expressionen von Slug bzw. *SNAI2* und N-Cadherin bzw. *CDH2* konnten in dieser Arbeit teilweise signifikant gesenkt werden (Abbildung 15 und 16 sowie 19 und 20), jedoch konnte nur bei der ADORA2B-Antagonisierung eine erniedrigte relative Expression von pp65/p65 beobachtet werden.

Eine Überexpression von p65 wird in der Regel mit einer hohen Expression vom mesenchymalen EMT-Marker Slug assoziiert [202]. Eine Studie zu HNSCC vermutet, dass die Koexpression von p65 und Slug in keinem direkten molekularen Zusammenhang steht. NF-κB stabilisiert Slug über TNF-α (Tumornekrosefaktor-α) und induziert EMT in HNSCC. Es wird angenommen, dass dieser Prozess über einen Mediator stattfindet, welcher entweder über p65 oder TNF-α stattfindet [119]. Außerdem wird Slug über die Bindung an die Tumorsuppressoren p53 sowie p21 degradiert und die Zellinvasion wird unterdrückt [104]. Eine BTK-Inhibition führte zu einer signifikanten Erhöhung von relativen pp65/p65-Proteinexpression bei gleichzeitig signifikant erniedrigten relativen Expressionen von Slug in Western Blot bzw. *SNAI2* in qRT-PCR-Analysen (Abbildung 19-20). An dieser Stelle könnte

ergänzend untersucht werden, ob TNF-α als Mediator eine Rolle spielt oder ob Mutationen von Tumorsuppressoren zusätzlich die Ergebnisse beeinflusst haben.

Das Tumormikromilieu als mögliche Ursache für erhöhte relative Snail-Expressionen

Das Mikromillieu des Tumors fördert die Initiation von EMT. Hypoxie führt zu der Expression des Transkriptionsfaktors Hypoxia-inducible-factor-1α (HIF-1α). Die Ausbildung eines invasiven Phänotyps ist bei erhöhter Aktivität von HIF-1α, Twist und Snail zu beobachten [96, 246]. Immun- und Endothelzellen tragen durch Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen zum EMT-Prozess bei [110]. Inflammatorische Zytokine induzieren die Signalwege von NF-κB, welcher Snail und Zinc-finger-E-box-binding-homeobox- (ZEB) Expression direkt aktiviert [99]. Interleukin-6 (IL-6) führt in Mammakarzinomzellen in Kultur zur Verminderung von E-Cadherin und Erhöhung von N-Cadherin, Vimentin, Snail und Twist [204]. IL-6 erhöht die Snail-Expression über den STAT3-Signalweg und induziert EMT in HNSCC-Zellen [14]. Die Aktivierung des Adenosinrezeptors A2B erhöht den IL-6 Spiegel [55]. Eine Studie zum Heilungsprozess beim Herzinfarkt hat gezeigt, dass PSB-603 die IL-6-Produktion antagonisieren kann [21]. Es sollte daher untersucht werden, welchen Einfluss der ADORA2B-Antagonist PSB-603 in HNSCC auf IL-6-Spiegel hat. Möglicherweise könnte eine unzureichende Hemmung der IL-6-Produktion in den Experimenten mit PSB-603 dieser Arbeit die überwiegend erhöhten Snail-Expressionen erklären (Abbildung 15-16 und 19-20).
Es wird vermutet, dass die transkriptionelle Regulation von Vimentin über HIF-1α in Lungenkrebs ein potenzieller EMT-Induktor ist [103]. HIF-1 spielt eine wichtige Rolle bei der Expression von ADORA2B, denn Hypoxie in HNSCC führt zu einer erhöhten Expression des Rezeptors [82, 171]. Unter anderem führt Hypoxie in Stammzellen des Mammakarzinoms zu einer TNF-α-abhängigen Überexpression von Slug [201]. Allein die Kultivierung von epithelialen Zellen führt zu einer Heraufregulierung von Vimentin [17]. Nach 63 Tagen Kultivierung verlieren neoplastische orale Keratinozyten die Expression von E-Cadherin und gewinnen an Vimentin-Expression [28]. In einer anderen Studie werden variierende Expressionsintensitäten von Vimentin in OSCC gezeigt. Es können zusätzlich keine signifikanten Unterschiede für β-Catenin, E-Cadherin und Vimentin zwischen OSCC

mit und ohne Lymphknotenmetastasen beobachtet werden [14]. Da die Tumorumgebung sowie die Kultivierung einen großen Einfluss insbesondere auf verschiedene EMT-Marker haben kann, sollten sie stets berücksichtigt werden. In meinen Experimenten mit dem ADORA2B-Antagonisten PSB-603 wurden unbehandelter Zelllinien, statt mit dem Lösungsmittel DMSO behandelte Zellen, als Kontrollen verwendet. In den Experimenten zu EMT-Marker-Expression der ADORA2B-shRNA-Zellen bzw. scrambled-shRNA-Zellen der Zelllinie UD-SCC 1 fiel der Einfluss von DMSO als Störfaktor gänzlich weg. In Bezug auf Snail und Slug konnten ähnliche Ergebnisse, wie mit dem ADORA2B-Antagonisten PSB-603 beobachtet werden. E-Cadherin zeigte eine tendenziell niedrigere relative Expression in ADORA2B-shRNA-Zellen im Vergleich zu scrambled-shRNA-Zellen, während ppp65/p65 eine erhöhte relative Expression zeigte (Abbildung 17). Daraus folgt, dass die signifikant erniedrigte relative Expression von pp65/p65 im Vergleich zur Kontrolle in den Western Blot Experimenten möglicherweise durch den Einsatz von toxischen DMSO entstanden ist. Dies verdeutlich die Wichtigkeit einer korrekten Kontrolle.

MicroRNAs als wichtige Regulatoren der EMT – Einfluss auf einzelne EMT-Marker

MicroRNAs (miRNA/miR) sind kleine nicht-kodierende RNA-Moleküle und wichtige Regulatoren der EMT. Sie regulieren Gene über Bindung an die 3‘ untranslatierte Region der Ziel-mRNA und fördern die Degradation oder Verhindern die Translation [253]. Beispielsweise hemmt in Pankreaskarzinomzellen miR-546 die Vimentin-Expression und unterbindet die Invasion und Proliferation [258]. Eine andere Studie hat gezeigt, dass miR-22 sich als ein „EMT-Antagonist“ verhält. Die Expression der Transkriptionsfaktoren Snail und Slug wird inhibiert, die mRNA von Vimentin vermindert und die Expression von E-Cadherin mRNA erhöht [243]. Umgekehrt wird Migration und Invasion von malignen Zellen gefördert, wenn Vimentin die Funktion zahlreicher miRs blockiert, welche als Tumorsuppressoren fungieren [56]. Bei Mammakarzinomen führt eine erhöhte miR-9-Expression zur Unterdrückung von E-Cadherin und fördert die Ausbildung des mesenchymalen Phänotyps mit erhöhter Zellmigration und Invasion [126]. Die N-Cadherin-Expression kann durch miRNA beeinflusst werden. In fortgeschrittenen Karzinomen des Magens wird N-Cadherin

durch miR-194 unterdrückt [196]. Eine erhöhte Expression von miR-194 in mesenchymalen Leberkarzinomzellen führt zu einer verminderten N-Cadherin-Expression, Zellmigration und Invasion [131]. Es gibt eine abgeschlossene Phase-1-Studie bei Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren. Diese zeigte die Effektivität von MRX34, ein nachgeahmtes liposomales miR-34a, welches Snail-vermittelte EMT und den NOTCH-Signalweg in Pankreaskarzinomzellen inhibiert [18, 209]. Zusammenfassend haben miRs in soliden Tumoren einen Einfluss auf in dieser Arbeit untersuchten EMT-Marker. Bezüglich miRs in Kopf-Hals-Tumoren gibt es ebenso bereits einige Erkenntnisse. HNSCC mit niedrigem Spiegel von miRs der miR-200-Familie zeigen eine Heraufregulierung von ZEB1 und ZEB2 und eine konsekutive Reduktion von E-Cadherin mit EMT-Induktion [11]. Die Gruppe von Xu sieht eine Hochregulierung von miR-25 in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus mit signifikanter Korrelation von Lymphknotenmetastasen und Tumorstadium. Außerdem findet man einen direkten Zusammenhang von miR-25 und E-Cadherin bei der Induktion von Invasion und Migration [244]. Eine EMT-Induktion in HNSCC wird auch bei erniedrigten miR-138-Expressionen festgestellt. Neben Vimentin werden die EMT-assoziierten Gene ZEB2 und EZH2 (enhancer of zeste homologue 2) von miR-138 reguliert [121, 218].
Der Einfluss von miRNAs spielt eine erhebliche Rolle im EMT-Prozess und sollten ergänzend zu meinen Ergebnissen untersucht werden.

Schlussfolgerung

Zusammenfassend konnte weder bei den Experimenten zum Onkogen ADORA2B noch zu BTK eine genaue Aussage gemacht werden, ob EMT oder MET induziert wird. Generell gilt, wenn sowohl mesenchymale als auch epitheliale Marker exprimiert werden, befinden sich Zellen in einem Zwischenstadium oder partiellen EMT bzw. MET [110]. Der Ablauf von EMT ist dynamisch und besteht aus transienten und reversiblen Zuständen von EMT und MET. Diese wechseln sich auf ähnliche Weise in der Embryogenese ab [152, 154, 213]. In den Experimenten dieser Arbeit zu beiden Onkogenen wurden starke Überexpressionen der mesenchymalen Marker *VIM* und *SNAI1* gefunden. Dies würde für ein Fortschreiten des EMT-Prozesses sprechen. Andererseits wurden nach Behandlung mit AVL-292 und PSB-603 die Gene *CDH2* und *SNAI2* bzw. das Protein Slug signifikant herunterreguliert (siehe Abbildung 15-20). Eine Umkehr der EMT ist deshalb nicht

auszuschließen. Nur wenige Tumortypen (z.B. Karzinosarkome) durchlaufen den EMT-Prozess komplett von einer funktionalen epithelialen Zelle zu einer mesenchymalen Zelle. Die meisten Tumoren befinden sich in einem intermediären EMT-Zustand und erwerben nur einige mesenchymale Eigenschaften [153]. Einzelne Tumorbiopsien stellen eine Momentaufnahme dar und Zellen, welche eine EMT durchlaufen haben, werden selten erkannt. Dies liegt daran, dass Zellen immer wieder zwischen epithelialen und mesenchymalen Typen wechseln. Zusätzlich würden rein mesenchymale veränderte Zellen (am Endpunkt der EMT) im umgebenden mesenchymalen Stroma des Tumors nicht als solche erkannt werden [210]. Eine Gruppe aus Hamburg zeigte, dass in HNSCC der Transkriptionsfaktor Twist eine größere Rolle spielt als die mesenchymalen Marker Snail, Slug oder das Zinkfinger E-Box-bindende Homebox Protein 1 und 2 (ZEB1 und ZEB2) [64]. Diese Faktoren wurden ähnlich wie in dieser Arbeit diskrepant zueinander exprimiert.

Im Zusammenhang mit EMT in HNSCC können folglich noch zahlreiche andere Gene, Proteine und Signalwege untersucht werden, welche mehr Aufschluss über das Invasions- und Metastasierungspotenzial der HNSCC-Zelllinie UD-SCC 1 geben würden. In anderen Studien zu Kopfhalstumoren lagen zu dem Thema beispielsweise die Proteine β-catenin, TGF-β oder TAK1 im Fokus [8, 14, 59, 203]. Des Weiteren konnten die in dieser Arbeit diskutierten Proteine und Signalwege wie die GSK3, Integrine, MMPs und miRNAs als wichtige Einflussfaktoren der EMT in HNSCC festgestellt werden.

4.4 Regulation der BTK-Expression durch Methylierung

Die BTK kann in 3 verschiedenen Isoformen auftreten. Es ist bekannt, dass die Isoform p80 spezifisch in verschiedenen soliden Tumoren zu finden ist und vermutlich von einem alternativen Promotor reguliert wird [51]. Die epigenetische Modifikation der Methylierung wurde in der vermuteten Region des alternativen BTKp80-Promotors mit Hilfe der Pyrosequenzierung analysiert. Konkret wurde eine Sequenz des alternativen Promotors der Isoform p80 (*BTK alternativ Assay*) untersucht und zusätzlich eine Sequenz innerhalb der mit der BTK assoziierten CpG-Insel (*BTK Assay;* Abbildung 21-23). Dadurch konnten Hinweise zur Regulation der BTKp80 festgestellt werden.

Es gibt zahlreiche Transkriptionsfaktoren, die in der Region des vermuteten alternativen Promotors binden und die Transkription von der BTK beeinflussen können. Dazu gehören ETS-I (Erythroblast Transformation-specific 1), CDP_CR3 (CCAAT-displacement protein_cut repeats 3), Ets (Transformation-specific E26) und AP-2 (Apetala 2) [51]. In der Region des Promotors der Isoform p77 spielen für die Transkription die Transkriptionsfaktoren, wie Sp1/3 (specificity proteins), Sp1-B/Pu1, BOB1/OBF1 (B cell-specific coactivator / Oct-binding factor 1) und Oct1/Oct2 (organic cation transporter 1 bzw. 2) sowie NF-kB eine Rolle [25, 141].

Neueste Microarray- und Sequenzierungsanalysen zeigen, dass methylierte DNA einer verringerte DNA-Zugänglichkeit aufweist und dies mit einer Stilllegung von Genen korreliert [136]. Eine niedrige Methylierung behindert die Transkription nicht [13]. Die Transkription wird durch Blockade der Initiation oder Elongation des RNA-Polymerase-Komplexes verhindert. Dies kann nicht nur durch Methylierung, sondern auch beispielsweise über Interferenz eines über CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) generierten DNA-Identifizierungs-Komplex geschehen [175]. In zahlreichen CpG-Methylierungsexperimenten wird diese Methode genutzt, um an normalerweise niedrig methylierten Promotoren eine Methylierung mit einer Unterdrückung der Genexpression zu erreichen [120]. Ob ein Methylierungsunterschied von 4,12 % zwischen HNSCC und Spender-B-Zellen bzw. ein Unterschied von 12,42 % zwischen B-Zell-Tumorzelllinien und gesunden B-Zell-Spendern wirklich entscheidend ist für eine Veränderung der Expression auf Proteinebene (Abbildung 22 und 23), muss kritisch hinterfragt werden.

Die Detektionsgrenzen der DNA-Methylierung sind vom Pyrosequenzierungs-Assay abhängig und werden individuell festgelegt. Eine verlässliche Detektion ist laut Hersteller (Qiagen) ab 5 % für jede CpG-Position festgelegt. Daraus ergeben sich hoch- und niedrigmethylierte Grenzen von 5 bzw. 95 %. Die Abweichung zwischen den Replikaten ist gering und liegt meist unter 5 % [134]. In dieser Doktorarbeit wurden die Grenzen der technischen Kontrollen (hochmethylierten und niedrigmethylierten Kontrolle) auf 10 % bzw 15 % gesetzt. Die Ergebnisse des *BTK alternativ Assays* waren in den zahlreichen Messungen von gleichen Proben nicht konstant und die Abweichung zwischen Replikaten lag über 5 % (Abbildung 22 A). Große Methylierungsunterschiede zwischen Replikaten und die angepassten Grenzwerte sind folglich wichtige Einflussfaktoren für die Auswertung. Dadurch sind minimale Methylierungsunterschiede mit Vorsicht zu interpretieren.

Außerdem ist es unklar, inwieweit eine CpG methyliert sein muss, um Genexpression zu verringern. Viele Methoden zur DNA-Methylierung bzw. Demethylierung verändern den Methylierungsstatus der CpG-Inseln unzureichend, sodass nur mäßige Effekte bei der Genexpression beobachtet werden [111]. Beispielweise führt eine partielle Hypermethylierung des Imprinting-Locus Insulin-like-growth-factor-2 bei Mausembryos widererwarten zu keiner Veränderung des Körpergewichts [112]. Ob sich eine bestimmte CpG methylieren oder demethylieren lässt, ist abhängig von dem epigenetischen Status dieser bestimmten CpG. Der epigenetische Status wird durch die Histonmodifikation definiert, Zugänglichkeit der Chromosomen und der DNA-Sequenz selbst [111].

In Kopf-Hals-Karzinomen ist bekannt, dass eine globale Hypomethylierung zu einer Aktivierung von Proto-Onkogenen führt [13]. Nicht-kodierende und nicht-Promotor-spezifische Regionen in Plattenepithelkarzinomen der Speiseröhre sind deutlich niedriger methyliert als in Proben der umgebenden Schleimhaut bzw. im Vergleich zu Schleimhaut gesunder Probanden [115]. Mit dem *BTK Assay* wurde vermutlich eine Region außerhalb des Promotors bzw. eine nicht-kodierende Region untersucht. Es konnte ein Unterschied in der Methylierung von Tumorzellen (HNSCC im Vergleich zu B-Zellen und B-Zell-Tumorzellen im Vergleich zu B-Zellen) von fast 35% festgestellt werden (Abbildung 22 B). Der Vergleich mit B-Zell-Tumorzelllinien wurde gewählt, da in diesen Zellen neben der BTKp77-Isoform ebenfalls die BTKp80-Isoform exprimiert ist, wohingegen in primären B-Zellen lediglich allein die BTKp77-Isoform nachweisbar ist [24, 38, 177, 194, 241]. Daher

wurden ebenfalls B-Zellen gesunder Spender verwendet (Abbildung 23). Bei der Interpretation der Pyoresequencing-Ergebnisse ist zu beachten, dass Methylierungsmuster zwischen verschiedenen Geweben und unter Einfluss von Zellkulturbedingungen stark variieren können [160, 251]. In einer groß angelegten Studie wurden Methylierungsmuster zwischen Zelllinien und klinisch gewonnen Gewebsproben untersucht. Es wurde festgestellt, dass in Zelllinien gesehene Methylierungsunterschiede beim Vergleichen von Kontrollen von Gewebsproben deutlich geringer ausfielen. Dieser Unterschied könnte dadurch entstanden sein, dass bei einer Biopsie auch andere Zellen, wie beispielsweise Inflammatorische Zellen, gewonnen werden [50, 166].

Da die Daten der vorliegenden Studie zumindest vermuten lassen, dass epigenetische Prozesse bei der Regulation der BTKp80-Isoform eine Rolle spielen könnten, sollte in nachfolgenden Experimenten geeignetere Kontrollen verwendet werden, um Zelllinienartefakte auszuschließen. So sollten die HNSCC-Zelllinien mit Zelllinien, die gesundes Plattenepithel repräsentieren, wie die MOE1-Zellen [102] (Human Mouth-Ordinary-Epithelium 1) oder die hTERT-TIGKs-Zellen (Humane reverse Tranksriptase der Telomerase - Telomerase Immortalized Gingival Keratinocytes) der Organisation ATCC (American Type Culture Collection) verglichen werden. Zusätzlich sollte ein Vergleich von Tumorgewebe zu gesunden Plattenepithel gemacht werden. Möglicherweise können auch In-silico-Analysen unter Verwendung frei-zugänglicher Datenbanken von HNSCC-Patienten (The Cancer Genome Atlas - TCGA) helfen, die Frage nach der Regulation des BTKp80-Promotors durch Methylierung zu beantworten.

Außerdem muss die Korrelation zwischen Methylierung und Genexpression bzw. Proteinexpression kritisch hinterfragt werden, wie folgende Beispiele zeigen:

CDKN2A ist ein putatives Tumorsuppressorgen und eines der ersten Gene assoziiert mit Promotormethylierung in HNSCC [52, 180]. Das demethylierende Agens Decitabin führt zu einer Re-expression des Gens [217]. Andererseits zeigte überraschenderweise eine Studie zu Pyrosequenzierung und mRNA-Daten bei HNSCC eine hohe Genexpression bei hoher Promotormethylierung von *CDKN2A* bzw. p16. Dies wird zusätzlich immunhistochemisch bestätigt [187].

In Kolorektalkarzinomen ist die Methylierung des Gens *MLH1* besonders gut untersucht [27]. Es konnte gezeigt werden, dass nur die Methylierung proximaler Regionen relativ zur TSS (transcription start site) des Promotors von *MLH1* mit einer

verringerten Genexpression korrelierten [44, 45]. Über 60% der Studien zu *MLH1* haben unspezifische Regionen analysiert und haben möglicherweise eine falsche Assoziation zwischen Methylierung und Proteinexpression angenommen [27]. Diese Beispiele zeigen, dass Korrelationen zwischen Methylierung und Genexpression bzw. Proteinexpression kritisch betrachtet werden müssen.

Ob die in dieser Arbeit untersuchten Regionen relevant für die BTK-Genexpression sind, könnte über eine Induktion einer Methylierung überprüft werden. Es können direkt CpGs in Promotoren anvisiert werden oder exogen DNMTs (DNA-Methyltransferasen) rekrutiert werden, welche zu einer unspezifischen Methylierung führen [111]. Über die CRISPR Methode können beispielsweise endogene DNMT3A rekrutiert werden [199]. Die sogenannte SunTag-Strategie ermöglicht die Methylierung langstreckiger Promotorregionen. Eine Induktion einer Hypermethylierung von nicht-kodierende Regionen wurde bis jetzt nicht untersucht [111].

Neben der DNA-Methylierung können Histon-Modifikationen die Transkription beeinflussen. Die C-terminalen und N-terminalen Enden der Histone (H2A, H2B, H3 und H4) können sich unterschiedlichen post-translationalen Modifikationen wie, Acetelyierung, Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinylierung und ADP-Ribosylierung (Adenosindiphosphat) unterziehen [79]. Dadurch verändert sich die DNA-Zugänglichkeit [22]. Folgendes Beispiel: Eine Acetylierung vom Histon H3 an Lysin 27 am Promotor von der lncRNA (long non coding RNA) des Plazenta-spezifischen Proteins 2 (PLAC2) führt zur Heraufregulierung von PLAC2. Dies fördert die OSCC (oral squamous cell carcinoma) Progression über die Aktivierung vom Wnt/β-catenin Signalweg [31]. Um den Einfluss von Histon-Modifikationen auf den BTK-Promotor zu untersuchen könnten bioinformatische Analysen durchgeführt werden, mit anschließender Chromatin-Immunpräzipitation, zur Bestätigung einer Anreicherung eines veränderten Histons.

Zusammenfassend haben die Untersuchungen dieser Arbeit bezüglich der Methylierung des alternativen Promotors von *BTKp80* vielversprechende Ergebnisse gezeigt, die weiterhin verfolgt und durch weitere Experimente vervollständigt werden sollten. Um die Regulation über Methylierung zu erhärten, könnte man neben technischer Methylierung umgekehrt mit demethylierenden Agenzien prüfen, ob die Expression von BTKp80 bei B-Zellen aktiviert werden kann.

Schlussfolgerung

Die Region des alternativen Promotors der BTKp80 war in dieser Studie hypomethyliert und korrelierte scheinbar invers mit einer gesteigerten Proteinexpression. Folglich könnte dies ein Hinweis dafür sein, dass die Methylierung in der Regulation der BTK-Isoformen eine Rolle spielen könnte.
Weitere Untersuchungen zu anderen epigenetischen Modifikationen, wie beispielweise die Histone betreffend sind anzustreben, um die Regulation und Aktivierung von BTKp80 besser zu verstehen. Außerdem sollten die vorliegenden Ergebnisse durch Untersuchungen an Ursprungsgeweben ergänzt werden.
Es wäre denkbar, dass der Methylierungsstatus der BTK zum Screening von HNSCC oder prognostischen Zwecken verwendet werden könnte. Dazu benötigt es weitere Studien, die den Zusammenhang von BTK-Methylierung und der Entwicklung von Kopf-Hals-Tumoren untersuchen würden.

5 Zusammenfassung

Trotz der Fortschritte in den therapeutischen Konzepten der Behandlung solider Tumoren wie dem Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches (HNSCC– head neck squamous cell carcinoma), die sich hauptsächlich auf chirurgische, strahlen- und/oder chemotherapeutische Interventionen stützten, hat sich die 5-Jahres-Überlebensrate in den letzten 20 Jahren kaum verändert. Die Onkogene Bruton'sche Tyrosinkinase (BTK) und der Adenosinrezeptor 2B (ADORA2B) könnten in Zukunft im Rahmen einer zielgerichteten Chemotherapie anvisiert werden. Der BTK-Inhibitor „Ibrutinib" ist bereits zur Behandlung von Erkrankungen des hämatopoetischen Systems zugelassen. Der ADORA2B-Antagonist PSB-603 zeigte bereits in einigen Studien zu Prostatakarzinomen und HNSCCs vielversprechende Ergebnisse. Das Ziel dieser Arbeit war, weiteren Aufschluss über die Verwendung von BTK-Inhibitoren und ADORA2B-Antagonisten in HNSCC hinsichtlich des Einflusses auf die Metastasierung und Invasion zu bekommen. Solide Tumoren nutzen den Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) zur Migration von Krebszellen. Dieser Prozess wurde anhand der Expression EMT-spezifischer Gene (*CDH1* bzw. E-Cadherin, *CDH2* bzw. N-Cadherin, *VIM* bzw. Vimentin, *SNAI1* bzw. Snail, *SNAI2* bzw. Slug) im Vergleich zu behandelten (mit BTK-Inhibitor AVL-292 bzw. ADORA2B-Antagonist PSB-603) und unbehandelten Zellen der Zelllinie UD-SCC 1 näher untersucht. Zusätzlich wurde die Phosphorylierung von NF-κB Untereinheit p65 untersucht, da NF-κB ein Induktor von EMT ist (NF-κB: Nuclear factor kappa (κ)-light-chain-enhancer of activated b cells). Dazu wurden die Methoden der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR: quantitative-Real-Time-PCR) und der Western Blot verwendet.

Die Ergebnisse nach Einsatz des BTK-Inhibitors AVL-292 und des ADORA2B-Antagonisten PSB-603 lassen keine eindeutige Aussage bezüglich des EMT-Prozesses zu. Erwartet wurde eine Umkehr von EMT zu einer mesenchymal-epithelialen Transition (MET), welche durch erhöhte Expression von E-Cadherin und Verminderung der Expression von mesenchymalen Markern wie Vimentin, Snail und Slug charakterisiert ist. Die Ergebnisse zeigten viele Diskrepanzen, welche schlussendlich suggerierten, dass die Behandlungen mit AVL-292 bzw. PSB-603 zu einer Ausbildung eines intermediären EMT-Phänotypen führten. Unter

Verwendung des ADORA2B-Antagonisten stellte sich heraus, dass die sich Expressionen von NF-κB/p65 und Slug gegenseitig beeinflussen könnten. Es ist unklar, ob ein weiterer Mediator zwischengeschaltet ist. Interessant ist auch, dass die Aktivität von NF-κB/p65 bei der Behandlung mit einem BTK-Inhibitor nach 48 h einen signifikanten Anstieg aufwies. Dies resultiert normalerweise in einer Induktion von EMT. Dagegen spricht der signifikante Abfall der relativen Expression des mesenchymalen Markers Slug.
In vorherigen Studien kam hervor, dass im Zusammenhang mit HNSCC womöglich andere als die in dieser Arbeit untersuchten EMT Marker bzw. Signalwege eine Rolle spielen. Diese würden mehr Aufschluss über das Metastasierungs- und Invasionspotenzial geben.

Es sind 3 verschieden BTK Isoformen bekannt. BTKp77 ist die B-Zell spezifische Form, während BTKp80 und BTKp65 neuerdings in soliden Tumoren entdeckt wurden. Die Regulation der BTKp80-Isoform findet über einen alternativen Promotor statt, welcher Gegenstand dieser Arbeit wurde. Ziel war es die epigenetisch am häufigsten auftretende Modifikation, die Methylierung des alternativen Promotors zu untersuchen unter der Annahme, dass eine Demethylierung des Promotors stattfindet, die zu einer erhöhten Expression der BTK-Isoform p80 führt. Für diese Untersuchungen wurden die Methoden der Pyrosequenzierung und Western Blot-Analysen angewendet.
Die Analyse der vermuteten Region des alternativen Promotors von BTKp80 ergab bezüglich der Methylierung signifikante Unterschiede zwischen Tumorzelllinien und B-Zellen von gesunden Spendern. Es wurde eine fast 35 % niedrigere Methylierung des DNA-Bereiches mittels des *BTK Assays* in HNSCC-Zelllinien und B-Zell-Tumorzelllinien festgestellt im Vergleich zu B-Zellen gesunder Spender. Passend dazu wurde in Western Blot-Analysen eine starke BTKp80-Expression in Tumorzelllinien und eine fehlende BTKp80-Expression in gesunden B-Zellen gezeigt.
Die Ergebnisse der Pyrosequenzierung bezüglich der Methylierung des alternativen Promotors bzw. der Promotor-Region zeigten vielversprechende Ergebnisse, welche jedoch unter der Fehlerquote der Methode kritisch betrachtet werden müssen.

6 Literaturverzeichnis

1. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A: Flow cytometry: basic principles and applications. Crit. Rev. Biotechnol., 37: 163-176(2017)

2. Adeola F: Normalization of Gene Expression by Quantitative RT-PCR in Human Cell Line: comparison of 12 Endogenous Reference Genes. Ethiop J Health Sci, 28: 741-748(2018)

3. Aghaei M, Panjehpour M, Karami-Tehrani F, Salami S: Molecular mechanisms of A3 adenosine receptor-induced G1 cell cycle arrest and apoptosis in androgen-dependent and independent prostate cancer cell lines: involvement of intrinsic pathway. J. Cancer Res. Clin. Oncol., 137: 1511-1523(2011)

4. Akdeniz O, Akduman D, Haksever M, Ozkarakas H, Müezzinoglu B: Relationships between clinical behavior of laryngeal squamous cell carcinomas and expression of VEGF, MMP-9 and E-cadherin. Asian Pac. J. Cancer Prev., 14: 5301-5310(2013)

5. Allard, Bertrand|Beavis, Paul A|Darcy, Phillip K|Stagg, John: Immunosuppressive activities of adenosine in cancer. Current Opinion in Pharmacology, 29: 7-16(2016)

6. Al-Sarraf M, LeBlanc M, Giri P G, Fu K K, Cooper J, Vuong T, Forastiere A A, Adams G, Sakr W A, Schuller D E, Ensley J F: Chemoradiotherapy versus radiotherapy in patients with advanced nasopharyngeal cancer: phase III randomized Intergroup study 0099. J. Clin. Oncol., 16: 1310-1317(1998)

7. Alves C C, Carneiro F, Hoefler H, Becker K: Role of the epithelial-mesenchymal transition regulator Slug in primary human cancers. Front Biosci (Landmark Ed), 14: 3035-3050(2009)

8. Angadi P V, Patil P V, Angadi V, Mane D, Shekar S, Hallikerimath S, Kale A D, Kardesai S G: Immunoexpression of Epithelial Mesenchymal Transition Proteins E-Cadherin, β-Catenin, and N-Cadherin in Oral Squamous Cell Carcinoma. Int. J. Surg. Pathol., 24: 696-703(2016)

9. Antonioli L, Blandizzi C, Pacher P, Haskó G: Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. Nat. Rev. Cancer, 13: 842-857(2013)

10. Arsura M, Panta G R, Bilyeu J D, Cavin L G, Sovak M A, Oliver A A, Factor V, Heuchel R, Mercurio F, Thorgeirsson S S, Sonenshein G E: Transient activation of NF-kappaB through a TAK1/IKK kinase pathway by TGF-beta1 inhibits AP-1/SMAD signaling and apoptosis: implications in liver tumor formation. Oncogene, 22: 412-425(2003)

11. Babu J M, Prathibha R, Jijith V S, Hariharan R, Pillai M R: A miR-centric view of head and neck cancers. Biochim. Biophys. Acta, 1816: 67-72(2011)

12. Bachelder R E, Yoon S, Franci C, de Herreros A G, Mercurio A M: Glycogen synthase kinase-3 is an endogenous inhibitor of Snail transcription: implications for the epithelial-mesenchymal transition. J. Cell Biol., 168: 29-33(2005)

13. Bakhtiar S M, Ali A, Barh D: Epigenetics in head and neck cancer. Methods Mol. Biol., 1238: 751-769(2015)

14. Balasundaram P, Singh M K, Dinda A K, Thakar A, Yadav R: Study of β-catenin, E-cadherin and vimentin in oral squamous cell carcinoma with and without lymph node metastases. Diagn Pathol, 9: 145(2014)

15. Baldwin A S: The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. Annu. Rev. Immunol., 14: 649-683(1996)

16. Batlle E, Sancho E, Francí C, Domínguez D, Monfar M, Baulida J, García De Herreros A: The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. Nat. Cell Biol., 2: 84-89(2000)

17. Battaglia R A, Delic S, Herrmann H, Snider N T: Vimentin on the move: new developments in cell migration [version 1; peer review: 2 approved]. F1000Research, 7: 1796(2018)

18. Beg M S, Brenner A J, Sachdev J, Borad M, Kang Y, Stoudemire J, Smith S, Bader A G, Kim S, Hong D S: Phase I study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, administered twice weekly in patients with advanced solid tumors. Invest New Drugs, 35: 180-188(2017)

19. Bernier J, Cooper J S, Pajak T F, van Glabbeke M, Bourhis J, Forastiere A, Ozsahin E M, Jacobs J R, Jassem J, Ang K, Lefèbvre J L: Defining risk levels in locally advanced head and neck cancers: a comparative analysis of concurrent postoperative radiation plus chemotherapy trials of the EORTC (#22931) and RTOG (# 9501). Head Neck, 27: 843-850(2005)

20. Borea P A, Gessi S, Merighi S, Vincenzi F, Varani K: Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art. Physiological Reviews, 98: 1591-1625(2018)

21. Borg N, Alter C, Görldt N, Jacoby C, Ding Z, Steckel B, Quast C, Bönner F, Friebe D, Temme S, Flögel U, Schrader J: CD73 on T Cells Orchestrates Cardiac Wound Healing After Myocardial Infarction by Purinergic Metabolic Reprogramming. Circulation, 136: 297-313(2017)

22. Bowman G D, Poirier M G: Post-translational modifications of histones that influence nucleosome dynamics. Chemical Reviews, 115: 2274-2295(2015)

23. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel R L, Torre L A, Jemal A: Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin, 68: 394-424(2018)

24. Brunner C, Müller B, Wirth T: Bruton's Tyrosine Kinase is involved in innate and adaptive immunity. Histol. Histopathol., 20: 945-955(2005)

25. Brunner C, Wirth T: Btk expression is controlled by Oct and BOB.1/OBF.1. Nucleic Acids Res., 34: 1807-1815(2006)

26. Calais G, Alfonsi M, Bardet E, Sire C, Germain T, Bergerot P, Rhein B, Tortochaux J, Oudinot P, Bertrand P: Randomized trial of radiation therapy versus concomitant chemotherapy and radiation therapy for advanced-stage oropharynx carcinoma. J. Natl. Cancer Inst., 91: 2081-2086(1999)

27. Capel E, Fléjou J -, Hamelin R: Assessment of MLH1 promoter methylation in relation to gene expression requires specific analysis. Oncogene, 26: 7596-7600(2007)

28. Chaw S Y, Abdul Majeed A, Dalley A J, Chan A, Stein S, Farah C S: Epithelial to mesenchymal transition (EMT) biomarkers--E-cadherin, beta-catenin, APC and Vimentin--in oral squamous cell carcinogenesis and transformation. Oral Oncol., 48: 997-1006(2012)

29. Chen A, Beetham H, Black M A, Priya R, Telford B J, Guest J, Wiggins G A R, Godwin T D, Yap A S, Guilford P J: E-cadherin loss alters cytoskeletal organization and adhesion in non-malignant breast cells but is insufficient to induce an epithelial-mesenchymal transition. BMC Cancer, 14: 552(2014)

30. Chen C, Wei Y, Hummel M, Hoffmann T K, Gross M, Kaufmann A M, Albers A E: Evidence for epithelial-mesenchymal transition in cancer stem cells of head and neck squamous cell carcinoma. PLoS ONE, 6: e16466(2011)

31. Chen F, Qi S, Zhang X, Wu J, Yang X, Wang R: lncRNA PLAC2 activated by H3K27 acetylation promotes cell proliferation and invasion via the activation of Wnt/β-catenin pathway in oral squamous cell carcinoma. International Journal of Oncology, 54: 1183-1194(2019)

32. Chou Y, Yang M: Epithelial–mesenchymal transition-related factors in solid tumor and hematological malignancy. Journal of the Chinese Medical Association, 78: 438-445(2015)

33. Christian F, Smith E L, Carmody R J: The Regulation of NF-κB Subunits by Phosphorylation. Cells, 5: (2016)

34. Chung C H, Parker J S, Ely K, Carter J, Yi Y, Murphy B A, Ang K K, El-Naggar A K, Zanation A M, Cmelak A J, Levy S, Slebos R J, Yarbrough W G: Gene expression profiles identify epithelial-to-mesenchymal transition and activation of nuclear factor-kappaB signaling as characteristics of a high-risk head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Res., 66: 8210-8218(2006)

35. Cichon M A, Radisky D C: ROS-induced epithelial-mesenchymal transition in mammary epithelial cells is mediated by NF-kB-dependent activation of Snail. Oncotarget, 5: 2827-2838(2014)

36. Clark J R, Frei E: Chemotherapy for head and neck cancer: progress and controversy in the management of patients with M0 disease. Semin. Oncol., 16: 44-57(1989)

37. Cross S H, Bird A P: CpG islands and genes. Curr. Opin. Genet. Dev., 5: 309-314(1995)

38. da Cunha-Bang C, Niemann C U: Targeting Bruton's Tyrosine Kinase Across B-Cell Malignancies. Drugs, 78: 1653-1663(2018)

39. Davidson B, Berner A, Nesland J M, Risberg B, Berner H S, Tropè C G, Kristensen G B, Bryne M, Ann Florenes V: E-cadherin and alpha-, beta-, and gamma-catenin protein expression is up-regulated in ovarian carcinoma cells in serous effusions. J. Pathol., 192: 460-469(2000)

40. Davuluri R V, Suzuki Y, Sugano S, Plass C, Huang T H -: The functional consequences of alternative promoter use in mammalian genomes. Trends Genet, 24: 167-177(2008)

41. de Jonge, Hendrik J. M., Fehrmann R S N, de Bont, Eveline S. J. M., Hofstra R M W, Gerbens F, Kamps W A, de Vries, Elisabeth G. E., van der Zee, Ate G. J., te Meerman G J, ter Elst A: Evidence based selection of housekeeping genes. PLoS One, 2: e898(2007)

42. de Klerk E, 't Hoen, Peter A. C.: Alternative mRNA transcription, processing, and translation: insights from RNA sequencing. Trends Genet, 31: 128-139(2015)

43. Deaton A M, Bird A: CpG islands and the regulation of transcription. Genes Dev, 25: 1010-1022(2011)

44. Deng G, Chen A, Hong J, Chae H S, Kim Y S: Methylation of CpG in a small region of the hMLH1 promoter invariably correlates with the absence of gene expression. Cancer Res., 59: 2029-2033(1999)

45. Deng G, Peng E, Gum J, Terdiman J, Sleisenger M, Kim Y S: Methylation of hMLH1 promoter correlates with the gene silencing with a region-specific manner in colorectal cancer. Br. J. Cancer, 86: 574-579(2002)

46. Desmet C J, Gallenne T, Prieur A, Reyal F, Visser N L, Wittner B S, Smit M A, Geiger T R, Laoukili J, Iskit S, Rodenko B, Zwart W, Evers B, Horlings H, Ajouaou A, Zevenhoven J, van Vliet M, Ramaswamy S, Wessels L F A, Peeper D S: Identification of a pharmacologically tractable Fra-1/ADORA2B axis promoting breast cancer metastasis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 110: 5139-5144(2013)

47. Deutsche Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf-und Hals-Chirurgie: https://www.dgho.de/publikationen/stellungnahmen/fruehe-nutzenbewertung/nivolumab/nivolumab-plattenepithelkarzinom-kopf-hals-bereich-dgho-stellungnahme-20170922.pdf (27.10.2019)

48. Dupont C, Armant D R, Brenner C A: Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. Seminars in Reproductive Medicine, 27: 351-357(2009)

49. Eda H, Santo L, Cirstea D D, Yee A J, Scullen T A, Nemani N, Mishima Y, Waterman P R, Arastu-Kapur S, Evans E, Singh J, Kirk C J, Westlin W F, Raje N S: A novel Bruton's tyrosine kinase inhibitor CC-292 in combination with the proteasome inhibitor carfilzomib impacts the bone microenvironment in a multiple myeloma model with resultant antimyeloma activity. Leukemia, 28: 1892-1901(2014)

50. Ehrich M, Turner J, Gibbs P, Lipton L, Giovanneti M, Cantor C, van den Boom D: Cytosine methylation profiling of cancer cell lines. Proc Natl Acad Sci U S A, 105: 4844-4849(2008)

51. Eifert C, Wang X, Kokabee L, Kourtidis A, Jain R, Gerdes M J, Conklin D S: A novel isoform of the B cell tyrosine kinase BTK protects breast cancer cells from apoptosis. Genes Chromosomes Cancer, 52: 961-975(2013)

52. El-Naggar A K, Lai S, Clayman G, Lee J K, Luna M A, Goepfert H, Batsakis J G: Methylation, a major mechanism of p16/CDKN2 gene inactivation in head and neck squamous carcinoma. Am. J. Pathol., 151: 1767-1774(1997)

53. Eriksson J E, Dechat T, Grin B, Helfand B, Mendez M, Pallari H, Goldman R D: Introducing intermediate filaments: from discovery to disease. J. Clin. Invest., 119: 1763-1771(2009)

54. Feinberg A P, Vogelstein B: Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. Nature, 301: 89-92(1983)

55. Feoktistov I, Biaggioni I: Role of adenosine A(2B) receptors in inflammation. Adv. Pharmacol., 61: 115-144(2011)

56. Fite K, Gomez-Cambronero J: Down-regulation of MicroRNAs (MiRs) 203, 887, 3619 and 182 Prevents Vimentin-triggered, Phospholipase D (PLD)-mediated Cancer Cell Invasion. J. Biol. Chem., 291: 719-730(2016)

57. Fluckiger A C, Li Z, Kato R M, Wahl M I, Ochs H D, Longnecker R, Kinet J P, Witte O N, Scharenberg A M, Rawlings D J: Btk/Tec kinases regulate sustained increases in intracellular Ca2+ following B-cell receptor activation. EMBO J., 17: 1973-1985(1998)

58. Frame S, Cohen P: GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. Biochem. J., 359: 1-16(2001)

59. Freudlsperger C, Bian Y, Contag Wise S, Burnett J, Coupar J, Yang X, Chen Z, Van Waes C: TGF-β and NF-κB signal pathway cross-talk is mediated through TAK1 and SMAD7 in a subset of head and neck cancers. Oncogene, 32: 1549-1559(2013)

60. Fulwyler M J: Electronic separation of biological cells by volume. Science, 150: 910-911(1965)

61. Garbuglia A R: Human papillomavirus in head and neck cancer. Cancers (Basel), 6: 1705-1726(2014)

62. Gillison M L: Current topics in the epidemiology of oral cavity and oropharyngeal cancers. Head Neck, 29: 779-792(2007)

63. Giridharan S, Srinivasan M: Mechanisms of NF-κB p65 and strategies for therapeutic manipulation. J Inflamm Res, 11: 407-419(2018)

64. Göppel J, Möckelmann N, Münscher A, Sauter G, Schumacher U: Expression of Epithelial-Mesenchymal Transition Regulating Transcription Factors in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. Anticancer Res., 37: 5435-5440(2017)

65. Grände M, Franzen A, Karlsson J, Ericson L E, Heldin N, Nilsson M: Transforming growth factor-beta and epidermal growth factor synergistically stimulate epithelial to mesenchymal transition (EMT) through a MEK-dependent mechanism in primary cultured pig thyrocytes. J. Cell. Sci., 115: 4227-4236(2002)

66. Grassilli E, Pisano F, Cialdella A, Bonomo S, Missaglia C, Cerrito M G, Masiero L, Ianzano L, Giordano F, Cicirelli V, Narloch R, D'Amato F, Noli B, Ferri G L, Leone B E, Stanta G, Bonin S, Helin K, Giovannoni R, Lavitrano M: A novel oncogenic BTK isoform is overexpressed in colon cancers and required for RAS-mediated transformation. Oncogene, 35: 4368-4378(2016)

67. Greco A, De Virgilio A, Rizzo M I, Pandolfi F, Rosati D, de Vincentiis M: The prognostic role of E-cadherin and β-catenin overexpression in laryngeal squamous cell carcinoma. Laryngoscope, 126: 148(2016)

68. Greger V, Debus N, Lohmann D, Höpping W, Passarge E, Horsthemke B: Frequency and parental origin of hypermethylated RB1 alleles in retinoblastoma. Hum. Genet., 94: 491-496(1994)

69. Guha M: Imbruvica--next big drug in B-cell cancer--approved by FDA. Nat. Biotechnol., 32: 113-115(2014)

70. Guo W, Liu R, Bhardwaj G, Yang J C, Changou C, Ma A -, Mazloom A, Chintapalli S, Xiao K, Xiao W, Kumaresan P, Sanchez E, Yeh C -, Evans C P, Patterson R, Lam K S, Kung H -: Targeting Btk/Etk of prostate cancer cells by a novel dual inhibitor. Cell Death Dis, 5: e1409(2014)

71. Guo X, Wang X: Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways. Cell Res., 19: 71-88(2009)

72. Haeussler M, Zweig A S, Tyner C, Speir M L, Rosenbloom K R, Raney B J, Lee C M, Lee B T, Hinrichs A S, Gonzalez J N, Gibson D, Diekhans M, Clawson H, Casper J, Barber G P, Haussler D, Kuhn R M, Kent W J: The UCSC Genome Browser database: 2019 update. Nucleic Acids Res, 47: D853-D858(2019)

73. Hajra K M, Chen D Y -, Fearon E R: The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. Cancer Res., 62: 1613-1618(2002)

74. Hamalainen H K, Tubman J C, Vikman S, Kyrölä T, Ylikoski E, Warrington J A, Lahesmaa R: Identification and validation of endogenous reference genes for expression profiling of T helper cell differentiation by quantitative real-time RT-PCR. Anal Biochem, 299: 63-70(2001)

75. Hamasy A, Wang Q, Blomberg K E M, Mohammad D K, Yu L, Vihinen M, Berglöf A, Smith C I E: Substitution scanning identifies a novel, catalytically active ibrutinib-resistant BTK cysteine 481 to threonine (C481T) variant. Leukemia, 31: 177-185(2017)

76. Hanada M, Delia D, Aiello A, Stadtmauer E, Reed J C: bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Blood, 82: 1820-1828(1993)

77. Hansen S M, Berezin V, Bock E: Signaling mechanisms of neurite outgrowth induced by the cell adhesion molecules NCAM and N-cadherin. Cell. Mol. Life Sci., 65: 3809-3821(2008)

78. Harrington C T, Lin E I, Olson M T, Eshleman J R: Fundamentals of pyrosequencing. Arch. Pathol. Lab. Med., 137: 1296-1303(2013)

79. Hatziapostolou M, Iliopoulos D: Epigenetic aberrations during oncogenesis. Cellular and molecular life sciences: CMLS, 68: 1681-1702(2011)

80. Hendriks R W, Yuvaraj S, Kil L P: Targeting Bruton's tyrosine kinase in B cell malignancies. Nat. Rev. Cancer, 14: 219-232(2014)

81. Herman J G, Merlo A, Mao L, Lapidus R G, Issa J P, Davidson N E, Sidransky D, Baylin S B: Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. Cancer Res., 55: 4525-4530(1995)

82. Hiroki Kasama, Yosuke Sakamoto, Atsushi Kasamatsu, Atsushi Okamoto, Tomoyoshi Koyama, Yasuyuki Minakawa, Katsunori Ogawara, Hidetaka Yokoe, Masashi Shiiba, Hideki Tanzawa, Katsuhiro Uzawa: Adenosine A2b receptor promotes progression of human oral cancer. BMC Cancer, 15: 563(2015)

83. Hoeflich K P, Luo J, Rubie E A, Tsao M S, Jin O, Woodgett J R: Requirement for glycogen synthase kinase-3beta in cell survival and NF-kappaB activation. Nature, 406: 86-90(2000)

84. Hollestelle A, Peeters J K, Smid M, Timmermans M, Verhoog L C, Westenend P J, Heine A A J, Chan A, Sieuwerts A M, Wiemer E A C, Klijn J G M, van der Spek, Peter J., Foekens J A, Schutte M, den Bakker M A, Martens J W M: Loss of E-cadherin is not a necessity for epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer. Breast Cancer Res. Treat., 138: 47-57(2013)

85. Hong K, Kim J, Hong J, Yoon H, Lee J, Hong S, Hong S: Inhibition of Akt activity induces the mesenchymal-to-epithelial reverting transition with restoring E-cadherin expression in KB and KOSCC-25B oral squamous cell carcinoma cells. J. Exp. Clin. Cancer Res., 28: 28(2009)

86. Hsu D S, Lan H, Huang C, Tai S, Chang S, Tsai T, Chang C, Tzeng C, Wu K, Kao J, Yang M: Regulation of excision repair cross-complementation group 1 by Snail contributes to cisplatin resistance in head and neck cancer. Clin. Cancer Res., 16: 4561-4571(2010)

87. Huang B, Yang X, Lamb A, Chen L: Posttranslational modifications of NF-kappaB: another layer of regulation for NF-kappaB signaling pathway. Cell. Signal., 22: 1282-1290(2010)

88. Huang S, Apasov S, Koshiba M, Sitkovsky M: Role of A2a extracellular adenosine receptor-mediated signaling in adenosine-mediated inhibition of T-cell activation and expansion. Blood, 90: 1600-1610(1997)

89. Huang T, Long M, Huo B: Competitive Binding to Cuprous Ions of Protein and BCA in the Bicinchoninic Acid Protein Assay. Open Biomed Eng J, 4: 271-278(2010)

90. Huber M A, Azoitei N, Baumann B, Grünert S, Sommer A, Pehamberger H, Kraut N, Beug H, Wirth T: NF-κB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. Journal of Clinical Investigation, 114: 569-581(2004)

91. Hubert Zipper, Herwig Brunner, Jürgen Bernhagen, Frank Vitzthum: Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. Nucleic Acids Research, 32: e103(2004)

92. Hussein A A, Helder M N, de Visscher J G, Leemans C R, Braakhuis B J, de Vet, Henrica C. W., Forouzanfar T: Global incidence of oral and oropharynx cancer in patients younger than 45 years versus older patients: A systematic review. Eur. J. Cancer, 82: 115-127(2017)

93. Iacobuzio-Donahue C A: Epigenetic changes in cancer. Annu Rev Pathol, 4: 229-249(2009)

94. Ibrahim S F, van den Engh G: Flow cytometry and cell sorting. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 106: 19-39(2007)

95. Ihler F, Gratz R, Wolff H A, Weiss B G, Bertlich M, Kitz J, Salinas G, Rave-Fränk M, Canis M: Epithelial-Mesenchymal Transition during Metastasis of HPV-Negative Pharyngeal Squamous Cell Carcinoma. Biomed Res Int, 2018: 7929104(2018)

96. Imai T, Horiuchi A, Wang C, Oka K, Ohira S, Nikaido T, Konishi I: Hypoxia attenuates the expression of E-cadherin via up-regulation of SNAIL in ovarian carcinoma cells. Am. J. Pathol., 163: 1437-1447(2003)

97. Jacob F, Guertler R, Naim S, Nixdorf S, Fedier A, Hacker N F, Heinzelmann-Schwarz V: Careful selection of reference genes is required for reliable performance of RT-qPCR in human normal and cancer cell lines. PLoS One, 8: e59180(2013)

98. Jemal A, Bray F, Center M M, Ferlay J, Ward E, Forman D: Global cancer statistics. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 61: 69-90(2011)

99. Jing Y, Han Z, Zhang S, Liu Y, Wei L: Epithelial-Mesenchymal Transition in tumor microenvironment. Cell Biosci, 1: 29(2011)

100. Jouppila-Mättö A, Närkiö-Mäkelä M, Soini Y, Pukkila M, Sironen R, Tuhkanen H, Mannermaa A, Kosma V: Twist and snai1 expression in pharyngeal squamous cell carcinoma stroma is related to cancer progression. BMC Cancer, 11: 350(2011)

101. Kalluri R, Weinberg R A: The basics of epithelial-mesenchymal transition. J. Clin. Invest., 119: 1420-1428(2009)

102. Kibe T, Kishida M, Kamino M, Iijima M, Chen L, Habu M, Miyawaki A, Hijioka H, Nakamura N, Kiyono T, Kishida S: Immortalization and characterization of normal oral epithelial cells without using HPV and SV40 genes. Oral Science International, 8: 20-28(2011)

103. Kidd M E, Shumaker D K, Ridge K M: The role of vimentin intermediate filaments in the progression of lung cancer. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 50: 1-6(2014)

104. Kim J, Bae S, An S, Park J K, Kim E M, Hwang S, Kim W, Um H: Cooperative actions of p21WAF1 and p53 induce Slug protein degradation and suppress cell invasion. EMBO Rep., 15: 1062-1068(2014)

105. Kim T, Shiekhattar R: Architectural and Functional Commonalities between Enhancers and Promoters. Cell, 162: 948-959(2015)

106. Kim Y, Kugler M C, Wei Y, Kim K K, Li X, Brumwell A N, Chapman H A: Integrin alpha3beta1-dependent beta-catenin phosphorylation links epithelial Smad signaling to cell contacts. J. Cell Biol., 184: 309-322(2009)

107. Kokabee L, Wang X, Sevinsky C J, Wang W L W, Cheu L, Chittur S V, Karimipoor M, Tenniswood M, Conklin D S: Bruton's tyrosine kinase is a potential therapeutic target in prostate cancer. Cancer Biol. Ther., 16: 1604-1615(2015)

108. Kouzarides T: Chromatin modifications and their function. Cell, 128: 693-705(2007)

109. Kreimer A R, Clifford G M, Boyle P, Franceschi S: Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 14: 467-475(2005)

110. Lamouille S, Xu J, Derynck R: Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 15: 178-196(2014)

111. Lei Y, Huang Y, Goodell M A: DNA methylation and de-methylation using hybrid site-targeting proteins. Genome Biol., 19: 187(2018)

112. Lei Y, Zhang X, Su J, Jeong M, Gundry M C, Huang Y, Zhou Y, Li W, Goodell M A: Targeted DNA methylation in vivo using an engineered dCas9-MQ1 fusion protein. Nat Commun, 8: 16026(2017)

113. Li S, Huang S, Peng S: Overexpression of G protein-coupled receptors in cancer cells: involvement in tumor progression. Int. J. Oncol., 27: 1329-1339(2005)

114. Liggett W H, Sidransky D: Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. J. Clin. Oncol., 16: 1197-1206(1998)

115. Lima S C S, Hernández-Vargas H, Simão T, Durand G, Kruel C D P, Le Calvez-Kelm F, Ribeiro Pinto L F, Herceg Z: Identification of a DNA methylome signature of esophageal squamous cell carcinoma and potential epigenetic biomarkers. Epigenetics, 6: 1217-1227(2011)

116. Lin C J, Grandis J R, Carey T E, Gollin S M, Whiteside T L, Koch W M, Ferris R L, Lai S Y: Head and neck squamous cell carcinoma cell lines: established models and rationale for selection. Head Neck, 29: 163-188(2007)

117. Linden J: Adenosine metabolism and cancer. Focus on "Adenosine downregulates DPPIV on HT-29 colon cancer cells by stimulating protein tyrosine phosphatases and reducing ERK1/2 activity via a novel pathway". Am. J. Physiol., Cell Physiol., 291: 405(2006)

118. Liu C, Lin H, Tang M, Wang Y: Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. Oncotarget, 6: 15966-15983(2015)

119. Liu S, Shi L, Wang Y, Ye D, Ju H, Ma H, Yang W, Wang Y, Hu J, Deng J, Zhang Z: Stabilization of Slug by NF-κB is Essential for TNF-α -Induced Migration and Epithelial-Mesenchymal Transition in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells. Cellular Physiology and Biochemistry, 47: 567-578(2018)

120. Liu X S, Wu H, Ji X, Stelzer Y, Wu X, Czauderna S, Shu J, Dadon D, Young R A, Jaenisch R: Editing DNA Methylation in the Mammalian Genome. Cell, 167: 233-247.e17(2016)

121. Liu X, Wang C, Chen Z, Jin Y, Wang Y, Kolokythas A, Dai Y, Zhou X: MicroRNA-138 suppresses epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma cell lines. Biochem. J., 440: 23-31(2011)

122. Loots G, Ovcharenko I: ECRbase: database of evolutionary conserved regions, promoters, and transcription factor binding sites in vertebrate genomes. Bioinformatics, 23: 122-124(2007)

123. Luo J: The role of GSK3beta in the development of the central nervous system. Front Biol (Beijing), 7: 212-220(2012)

124. Lyons J G, Patel V, Roue N C, Fok S Y, Soon L L, Halliday G M, Gutkind J S: Snail up-regulates proinflammatory mediators and inhibits differentiation in oral keratinocytes. Cancer Res., 68: 4525-4530(2008)

125. Ma D, Kondo T, Nakazawa T, Niu D, Mochizuki K, Kawasaki T, Yamane T, Katoh R: Hypoxia-inducible adenosine A2B receptor modulates proliferation of colon carcinoma cells. Hum. Pathol., 41: 1550-1557(2010)

126. Ma L, Young J, Prabhala H, Pan E, Mestdagh P, Muth D, Teruya-Feldstein J, Reinhardt F, Onder T T, Valastyan S, Westermann F, Speleman F, Vandesompele J, Weinberg R A: miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. Nat. Cell Biol., 12: 247-256(2010)

127. MacAulay K, Doble B W, Patel S, Hansotia T, Sinclair E M, Drucker D J, Nagy A, Woodgett J R: Glycogen synthase kinase 3alpha-specific regulation of murine hepatic glycogen metabolism. Cell Metab., 6: 329-337(2007)

128. Marchetti A, Colletti M, Cozzolino A M, Steindler C, Lunadei M, Mancone C, Tripodi M: ERK5/MAPK is activated by TGFbeta in hepatocytes and required for the GSK-3beta-mediated Snail protein stabilization. Cell. Signal., 20: 2113-2118(2008)

129. Marur, Shanthi, MD|Forastiere, Arlene A., MD: Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. Mayo Clinic Proceedings, 91: 386-396(2016)

130. Mayor C, Brudno M, Schwartz J R, Poliakov A, Rubin E M, Frazer K A, Pachter L S, Dubchak I: VISTA : visualizing global DNA sequence alignments of arbitrary length. Bioinformatics, 16: 1046-1047(2000)

131. Meng Z, Fu X, Chen X, Zeng S, Tian Y, Jove R, Xu R, Huang W: miR-194 is a marker of hepatic epithelial cells and suppresses metastasis of liver cancer cells in mice. Hepatology, 52: 2148-2157(2010)

132. Merlo A, Herman J G, Mao L, Lee D J, Gabrielson E, Burger P C, Baylin S B, Sidransky D: 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. Nat. Med., 1: 686-692(1995)

133. Metzler J M, Burla L, Fink D, Imesch P: Ibrutinib in Gynecological Malignancies and Breast Cancer: A Systematic Review. Int J Mol Sci, 21: (2020)

134. Mikeska T, Felsberg J, Hewitt C A, Dobrovic A: Analysing DNA methylation using bisulphite pyrosequencing. Methods Mol. Biol., 791: 33-53(2011)

135. Milanovic M, Kracht M, Schmitz M L: The cytokine-induced conformational switch of nuclear factor κB p65 is mediated by p65 phosphorylation. Biochem. J., 457: 401-413(2014)

136. Miranda T B, Jones P A: DNA methylation: the nuts and bolts of repression. J. Cell. Physiol., 213: 384-390(2007)

137. Mirza A, Basso A, Black S, Malkowski M, Kwee L, Pachter J A, Lachowicz J E, Wang Y, Liu S: RNA interference targeting of A1 receptor-overexpressing breast carcinoma cells leads to diminished rates of cell proliferation and induction of apoptosis. Cancer Biol. Ther., 4: 1355-1360(2005)

138. Mittal D, Sinha D, Barkauskas D, Young A, Kalimutho M, Stannard K, Caramia F, Haibe-Kains B, Stagg J, Khanna K K, Loi S, Smyth M J: Adenosine 2B Receptor Expression on Cancer Cells Promotes Metastasis. Cancer Res, 76: 4372-4382(2016)

139. Mizumoto A, Ohashi S, Hirohashi K, Amanuma Y, Matsuda T, Muto M: Molecular Mechanisms of Acetaldehyde-Mediated Carcinogenesis in Squamous Epithelium. Int J Mol Sci, 18: (2017)

140. Moffitt A H: QuantiNova Reverse Transcription Kit Handbook June 2015:147(6). American Journal of Orthodontics & Dentofacial Orthopedics, 147: 795.e1-795.e2(2015)

141. Mohamed A J, Yu L, Bäckesjö C, Vargas L, Faryal R, Aints A, Christensson B, Berglöf A, Vihinen M, Nore B F, Smith C I E: Bruton's tyrosine kinase (Btk): function, regulation, and transformation with special emphasis on the PH domain. Immunol. Rev., 228: 58-73(2009)

142. Mølck C, Ryall J, Failla L M, Coates J L, Pascussi J, Heath J K, Stewart G, Hollande F: The A2b adenosine receptor antagonist PSB-603 promotes oxidative phosphorylation and ROS production in colorectal cancer cells via adenosine receptor-independent mechanism. Cancer Lett., 383: 135-143(2016)

143. Molina-Cerrillo J, Alonso-Gordoa T, Gajate P, Grande E: Bruton's tyrosine kinase (BTK) as a promising target in solid tumors. Cancer Treat. Rev., 58: 41-50(2017)

144. Mu Y, Gudey S K, Landström M: Non-Smad signaling pathways. Cell Tissue Res., 347: 11-20(2012)

145. Napetschnig J, Wu H: Molecular basis of NF-κB signaling. Annu Rev Biophys, 42: 443-468(2013)

146. NCBI CDH 2: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1000 (29.09.2019)

147. NCBI CDH1: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/999 (29.09.2019)

148. NCBI Slug: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6591 (29.09.2019)

149. NCBI Snail: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6615 (29.09.2019)

150. NCBI VIM: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7431 (29.09.2019)

151. Neumann H, Schmidt H, Cavalié A, Jenne D, Wekerle H: Major histocompatibility complex (MHC) class I gene expression in single neurons of the central nervous system: differential regulation by interferon (IFN)-gamma and tumor necrosis factor (TNF)-alpha. J Exp Med, 185: 305-316(1997)

152. Nieto M A: Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells. Science, 342: 1234850(2013)

153. Nieto M A, Cano A: The epithelial-mesenchymal transition under control: global programs to regulate epithelial plasticity. Semin. Cancer Biol., 22: 361-368(2012)

154. Nieto M A, Huang R Y, Jackson R A, Thiery J P: EMT: 2016. Cell, 166: 21-45(2016)

155. Nilsson G M A, Akhtar N, Kannius-Janson M, Baeckström D: Loss of E-cadherin expression is not a prerequisite for c-erbB2-induced epithelial-mesenchymal transition. Int. J. Oncol., 45: 82-94(2014)

156. Nisticò P, Bissell M J, Radisky D C: Epithelial-mesenchymal transition: general principles and pathological relevance with special emphasis on the role of matrix metalloproteinases. Cold Spring Harb Perspect Biol, 4: (2012)

157. Noble J E, Bailey M J A: Quantitation of protein. Meth. Enzymol., 463: 73-95(2009)

158. Nomura A, Majumder K, Giri B, Dauer P, Dudeja V, Roy S, Banerjee S, Saluja A K: Inhibition of NF-kappa B pathway leads to deregulation of epithelial-mesenchymal transition and neural invasion in pancreatic cancer. Lab. Invest., 96: 1268-1278(2016)

159. Ntantie E, Gonyo P, Lorimer E L, Hauser A D, Schuld N, McAllister D, Kalyanaraman B, Dwinell M B, Auchampach J A, Williams C L: An adenosine-mediated signaling pathway suppresses prenylation of the GTPase Rap1B and promotes cell scattering. Sci Signal, 6: ra39(2013)

160. Pai A A, Bell J T, Marioni J C, Pritchard J K, Gilad Y: A genome-wide study of DNA methylation patterns and gene expression levels in multiple human and chimpanzee tissues. PLoS Genet, 7: e1001316(2011)

161. Palve V, Pareek M, Krishnan N M, Siddappa G, Suresh A, Kuriakose M A, Panda B: A minimal set of internal control genes for gene expression studies in head and neck squamous cell carcinoma. PeerJ, 6: e5207(2018)

162. Papageorgis P: TGFβ Signaling in Tumor Initiation, Epithelial-to-Mesenchymal Transition, and Metastasis. J Oncol, 2015: 587193(2015)

163. Pardoll D M: The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. Nat. Rev. Cancer, 12: 252-264(2012)

164. Parikh A S, Puram S V, Faquin W C, Richmon J D, Emerick K S, Deschler D G, Varvares M A, Tirosh I, Bernstein B E, Lin D T: Immunohistochemical quantification of partial-EMT in oral cavity squamous cell carcinoma primary tumors is associated with nodal metastasis. Oral Oncol., 99: 104458(2019)

165. Park H, Wahl M I, Afar D E, Turck C W, Rawlings D J, Tam C, Scharenberg A M, Kinet J P, Witte O N: Regulation of Btk function by a major autophosphorylation site within the SH3 domain. Immunity, 4: 515-525(1996)

166. Paz M F, Fraga M F, Avila S, Guo M, Pollan M, Herman J G, Esteller M: A systematic profile of DNA methylation in human cancer cell lines. Cancer Res, 63: 1114-1121(2003)

167. Pease J C, Brewer M, Tirnauer J S: Spontaneous spheroid budding from monolayers: a potential contribution to ovarian cancer dissemination. Biol Open, 1: 622-628(2012)

168. Peinado H, Olmeda D, Cano A: Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? Nat. Rev. Cancer, 7: 415-428(2007)

169. Pfaffl M W: Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. BIOspektrum, 92-95(2004)

170. Pfaffl M W: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res., 29: e45(2001)

171. Philip K, Mills T W, Davies J, Chen N, Karmouty-Quintana H, Luo F, Molina J G, Amione-Guerra J, Sinha N, Guha A, Eltzschig H K, Blackburn M R: HIF1A up-regulates the ADORA2B receptor on alternatively activated macrophages and contributes to pulmonary fibrosis. FASEB J., 31: 4745-4758(2017)

172. Pires B R B, Mencalha A L, Ferreira G M, de Souza W F, Morgado-Díaz J A, Maia A M, Corrêa S, Abdelhay, Eliana S. F. W.: NF-kappaB Is Involved in the Regulation of EMT Genes in Breast Cancer Cells. PLoS ONE, 12: e0169622(2017)

173. Pires B R B, Mencalha A L, Ferreira G M, de Souza W F, Morgado-Díaz J A, Maia A M, Corrêa S, Abdelhay, Eliana S. F. W.: NF-kappaB Is Involved in the Regulation of EMT Genes in Breast Cancer Cells. PLoS ONE, 12: e0169622(2017)

174. Plyte S E, Hughes K, Nikolakaki E, Pulverer B J, Woodgett J R: Glycogen synthase kinase-3: functions in oncogenesis and development. Biochim. Biophys. Acta, 1114: 147-162(1992)

175. Qi L S, Larson M H, Gilbert L A, Doudna J A, Weissman J S, Arkin A P, Lim W A: Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. Cell, 152: 1173-1183(2013)

176. QIAGEN: https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=8e386d5a-08b7-4bae-bf0f-f38fcd84b9ff&lang=en (28.10.2019)

177. Qiu Y, Kung H J: Signaling network of the Btk family kinases. Oncogene, 19: 5651-5661(2000)

178. Radisky D C, Levy D D, Littlepage L E, Liu H, Nelson C M, Fata J E, Leake D, Godden E L, Albertson D G, Nieto M A, Werb Z, Bissell M J: Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. Nature, 436: 123-127(2005)

179. Raeymaekers L: Basic principles of quantitative PCR. Mol. Biotechnol., 15: 115-122(2000)

180. Reed A L, Califano J, Cairns P, Westra W H, Jones R M, Koch W, Ahrendt S, Eby Y, Sewell D, Nawroz H, Bartek J, Sidransky D: High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Res., 56: 3630-3633(1996)

181. Ren Z H, Lin C Z, Cao W, Yang R, Lu W, Liu Z Q, Chen Y M, Yang X, Tian Z, Wang L Z, Li J, Wang X, Chen W T, Ji T, Zhang C P: CD73 is associated with poor prognosis in HNSCC. Oncotarget, 7: 61690-61702(2016)

182. Robertson H, Hayes J D, Sutherland C: A partnership with the proteasome; the destructive nature of GSK3. Biochem Pharmacol, 147: 77-92(2018)

183. Rosso M, Majem B, Devis L, Lapyckyj L, Besso M J, Llauradó M, Abascal M F, Matos M L, Lanau L, Castellví J, Sánchez J L, Pérez Benavente A, Gil-Moreno A, Reventós J, Santamaria Margalef A, Rigau M, Vazquez-Levin M H: E-cadherin: A determinant molecule associated with ovarian cancer progression, dissemination and aggressiveness. PLoS One, 12: (2017)

184. Saitoh M, Miyazawa K: Transcriptional and post-transcriptional regulation in TGF-β-mediated epithelial-mesenchymal transition. J. Biochem., 151: 563-571(2012)

185. Sakai T, Toguchida J, Ohtani N, Yandell D W, Rapaport J M, Dryja T P: Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene. Am. J. Hum. Genet., 48: 880-888(1991)

186. Schulz L, Pries R, Lanka A S, Drenckhan M, Rades D, Wollenberg B: Inhibition of GSK3α/β impairs the progression of HNSCC. Oncotarget, 9: 27630-27644(2018)

187. Shaw R J, Hall G L, Lowe D, Liloglou T, Field J K, Sloan P, Risk J M: The role of pyrosequencing in head and neck cancer epigenetics: correlation of quantitative methylation data with gene expression. Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg., 134: 251-256(2008)

188. Sheppard D: Integrin-mediated activation of latent transforming growth factor beta. Cancer Metastasis Rev., 24: 395-402(2005)

189. Shield K, Ackland M L, Ahmed N, Rice G E: Multicellular spheroids in ovarian cancer metastases: Biology and pathology. Gynecologic Oncology, 113: 143-148(2009)

190. Shih V F, Tsui R, Caldwell A, Hoffmann A: A single NFκB system for both canonical and non-canonical signaling. Cell Res., 21: 86-102(2011)

191. Singal R, Ginder G D: DNA methylation. Blood, 93: 4059-4070(1999)

192. Sitkovsky M V, Kjaergaard J, Lukashev D, Ohta A: Hypoxia-adenosinergic immunosuppression: tumor protection by T regulatory cells and cancerous tissue hypoxia. Clin. Cancer Res., 14: 5947-5952(2008)

193. Smith, Ashley|Teknos, Theodoros N.|Pan, Quintin: Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma. Oral Oncology, 49: 287-292(2012)

194. Smith C I, Baskin B, Humire-Greiff P, Zhou J N, Olsson P G, Maniar H S, Kjellén P, Lambris J D, Christensson B, Hammarström L: Expression of Bruton's agammaglobulinemia tyrosine kinase gene, BTK, is selectively down-regulated in T lymphocytes and plasma cells. J. Immunol., 152: 557-565(1994)

195. Song W, Zhang W H, Zhang H, Li Y, Zhang Y, Yin W, Yang Q: Validation of housekeeping genes for the normalization of RT-qPCR expression studies in oral squamous cell carcinoma cell line treated by 5 kinds of chemotherapy drugs. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 62: 29-34(2016)

196. Song Y, Zhao F, Wang Z, Liu Z, Chiang Y, Xu Y, Gao P, Xu H: Inverse association between miR-194 expression and tumor invasion in gastric cancer. Ann. Surg. Oncol., 19 Suppl 3: 509(2012)

197. Stasikowska-Kanicka O, Wągrowska-Danilewicz M, Danilewicz M: Immunohistochemical Study EMT-Related Proteins in HPV-, and EBV-Negative Patients with Sinonasal Tumours. Pathol. Oncol. Res., 22: 781-788(2016)

198. Steen A M, Luthman H, Hellgren D, Lambert B: Levels of hypoxanthine phosphoribosyltransferase RNA in human cells. Exp Cell Res, 186: 236-244(1990)

199. Stepper P, Kungulovski G, Jurkowska R Z, Chandra T, Krueger F, Reinhardt R, Reik W, Jeltsch A, Jurkowski T P: Efficient targeted DNA methylation with chimeric dCas9-Dnmt3a-Dnmt3L methyltransferase. Nucleic Acids Res., 45: 1703-1713(2017)

200. Stone R C, Pastar I, Ojeh N, Chen V, Liu S, Garzon K I, Tomic-Canic M: Epithelial-mesenchymal transition in tissue repair and fibrosis. Cell Tissue Res., 365: 495-506(2016)

201. Storci G, Bertoni S, De Carolis S, Papi A, Nati M, Ceccarelli C, Pirazzini C, Garagnani P, Ferrarini A, Buson G, Delledonne M, Fiorentino M, Capizzi E, Gruppioni E, Taffurelli M, Santini D, Franceschi C, Bandini G, Bonifazi F, Bonafé M: Slug/β-catenin-dependent proinflammatory phenotype in hypoxic breast cancer stem cells. Am. J. Pathol., 183: 1688-1697(2013)

202. Storci G, Sansone P, Mari S, D'Uva G, Tavolari S, Guarnieri T, Taffurelli M, Ceccarelli C, Santini D, Chieco P, Marcu K B, Bonafè M: TNFalpha up-regulates SLUG via the NF-kappaB/HIF1alpha axis, which imparts breast cancer cells with a stem cell-like phenotype. J. Cell. Physiol., 225: 682-691(2010)

203. Strippoli R, Benedicto I, Foronda M, Perez-Lozano M L, Sánchez-Perales S, López-Cabrera M, Del Pozo M Á: p38 maintains E-cadherin expression by modulating TAK1-NF-kappa B during epithelial-to-mesenchymal transition. J. Cell. Sci., 123: 4321-4331(2010)

204. Sullivan N J, Sasser A K, Axel A E, Vesuna F, Raman V, Ramirez N, Oberyszyn T M, Hall B M: Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells. Oncogene, 28: 2940-2947(2009)

205. Sundaresan N R, Bindu S, Pillai V B, Samant S, Pan Y, Huang J, Gupta M, Nagalingam R S, Wolfgeher D, Verdin E, Gupta M P: SIRT3 Blocks Aging-Associated Tissue Fibrosis in Mice by Deacetylating and Activating Glycogen Synthase Kinase 3β. Mol. Cell. Biol., 36: 678-692(2015)

206. Sutherland C, Leighton I A, Cohen P: Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. Biochem. J., 296 (Pt 1): 15-19(1993)

207. Sutherland C: What Are the bona fide GSK3 Substrates? Int J Alzheimers Dis, 2011: 505607(2011)

208. Syed V: TGF-β Signaling in Cancer. J. Cell. Biochem., 117: 1279-1287(2016)

209. Tang Y, Tang Y, Cheng Y: miR-34a inhibits pancreatic cancer progression through Snail1-mediated epithelial-mesenchymal transition and the Notch signaling pathway. Sci Rep, 7: 38232(2017)

210. Tarin D, Thompson E W, Newgreen D F: The fallacy of epithelial mesenchymal transition in neoplasia. Cancer Res., 65: 5996-6001(2005)

211. Testa J R, Bellacosa A: AKT plays a central role in tumorigenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 98: 10983-10985(2001)

212. Thiery J P: Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. Nature Reviews Cancer, 2: 442-454(2002)

213. Thiery J P, Acloque H, Huang R Y J, Nieto M A: Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. Cell, 139: 871-890(2009)

214. Thiery J P, Sleeman J P: Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 7: 131-142(2006)

215. Thimm D, Schiedel A C, Sherbiny F F, Hinz S, Hochheiser K, Bertarelli D C G, Maass A, Müller C E: Ligand-specific binding and activation of the human adenosine A(2B) receptor. Biochemistry, 52: 726-740(2013)

216. Thornton T M, Pedraza-Alva G, Deng B, Wood C D, Aronshtam A, Clements J L, Sabio G, Davis R J, Matthews D E, Doble B, Rincon M: Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3beta inactivation. Science, 320: 667-670(2008)

217. Timmermann S, Hinds P W, Münger K: Re-expression of endogenous p16ink4a in oral squamous cell carcinoma lines by 5-aza-2'-deoxycytidine treatment induces a senescence-like state. Oncogene, 17: 3445-3453(1998)

218. Tong Z -, Cai M -, Wang X -, Kong L -, Mai S -, Liu Y -, Zhang H -, Liao Y -, Zheng F, Zhu W, Liu T -, Bian X -, Guan X -, Lin M C, Zeng M -, Zeng Y -, Kung H -, Xie D: EZH2 supports nasopharyngeal carcinoma cell aggressiveness by forming a co-repressor complex with HDAC1/HDAC2 and Snail to inhibit E-cadherin. Oncogene, 31: 583-594(2012)

219. Trizna Z, Schantz S P: Hereditary and environmental factors associated with risk and progression of head and neck cancer. Otolaryngol. Clin. North Am., 25: 1089-1103(1992)

220. Uchikado Y, Natsugoe S, Okumura H, Setoyama T, Matsumoto M, Ishigami S, Aikou T: Slug Expression in the E-cadherin preserved tumors is related to prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. Clin. Cancer Res., 11: 1174-1180(2005)

221. Uttamsingh S, Bao X, Nguyen K T, Bhanot M, Gong J, Chan J L -, Liu F, Chu T T, Wang L -: Synergistic effect between EGF and TGF-beta1 in inducing oncogenic properties of intestinal epithelial cells. Oncogene, 27: 2626-2634(2008)

222. Vacik T, Raska I: Alternative intronic promoters in development and disease. Protoplasma, 254: 1201-1206(2017)

223. Várnai P, Rother K I, Balla T: Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent membrane association of the Bruton's tyrosine kinase pleckstrin homology domain visualized in single living cells. J. Biol. Chem., 274: 10983-10989(1999)

224. Vermorken J B, Remenar E, van Herpen C, Gorlia T, Mesia R, Degardin M, Stewart J S, Jelic S, Betka J, Preiss J H, van den Weyngaert D, Awada A, Cupissol D, Kienzer H R, Rey A, Desaunois I, Bernier J, Lefebvre J: Cisplatin, fluorouracil, and docetaxel in unresectable head and neck cancer. N. Engl. J. Med., 357: 1695-1704(2007)

225. Vincent T, Neve E P A, Johnson J R, Kukalev A, Rojo F, Albanell J, Pietras K, Virtanen I, Philipson L, Leopold P L, Crystal R G, de Herreros A G, Moustakas A, Pettersson R F, Fuxe J: A SNAIL1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF-beta mediated epithelial-mesenchymal transition. Nat. Cell Biol., 11: 943-950(2009)

226. Wang J D, Chen X Y, Ji K W, Tao F: Targeting Btk with ibrutinib inhibit gastric carcinoma cells growth. Am J Transl Res, 8: 3003-3012(2016)

227. Wang X, He J, Wang W, Ren M, Gao S, Zhao G, Wang J, Yang Q: Validation of internal reference genes for relative quantitation studies of gene expression in human laryngeal cancer. PeerJ, 4: e2763(2016)

228. Wang X, Chen X, Yang Y: Spatiotemporal control of gene expression by a light-switchable transgene system. Nat Methods, 9: 266-269(2012)

229. Wang Y, Shi J, Chai K, Ying X, Zhou B P: The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis. Curr Cancer Drug Targets, 13: 963-972(2013)

230. Warnakulasuriya S: Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. Oral Oncol., 45: 309-316(2009)

231. Way T, Huang J, Chou C, Huang C, Yang M, Ho C: Emodin represses TWIST1-induced epithelial-mesenchymal transitions in head and neck squamous cell carcinoma cells by inhibiting the β-catenin and Akt pathways. Eur. J. Cancer, 50: 366-378(2014)

232. Weaver A, Flemming S, Kish J, Vandenberg H, Jacob J, Crissman J, Al-Sarraf M: Cis-platinum and 5-fluorouracil as induction therapy for advanced head and neck cancer. Am. J. Surg., 144: 445-448(1982)

233. Wei L, Su Y, Lin C, Chao T, Huang S, Huynh T, Jan H, Whang-Peng J, Chiou J, Wu A T H, Hsiao M: Preclinical investigation of ibrutinib, a Bruton's kinase tyrosine (Btk) inhibitor, in suppressing glioma tumorigenesis and stem cell phenotypes. Oncotarget, 7: 69961-69975(2016)

234. Wei Q, Costanzi S, Balasubramanian R, Gao Z, Jacobson K: A2B adenosine receptor blockade inhibits growth of prostate cancer cells. Purinergic Signalling, 9: 271-280(2013)

235. Wheelock M J, Shintani Y, Maeda M, Fukumoto Y, Johnson K R: Cadherin switching. J. Cell. Sci., 121: 727-735(2008)

236. Wiedemann,C Schulz, HL Weber, BHF: Quantitative Real-Time PCR - Eine Frage der Normalisierung. BIOspektrum, 10: 99-102(2004)

237. Wilkat M, Bast H, Drees R, Dünser J, Mahr A, Azoitei N, Marienfeld R, Frank F, Brhel M, Ushmorov A, Greve J, Goldberg-Bockhorn E, Theodoraki M, Doescher J, Laban S, Schuler P J, Hoffmann T K, Brunner C: Adenosine receptor 2B activity promotes autonomous growth, migration as well as vascularization of head and neck squamous cell carcinoma cells. Int. J. Cancer, (2019)

238. Woodgett J R: Judging a protein by more than its name: GSK-3. Sci. STKE, 2001: re12(2001)

239. Woyach J A, Furman R R, Liu T, Ozer H G, Zapatka M, Ruppert A S, Xue L, Li D H, Steggerda S M, Versele M, Dave S S, Zhang J, Yilmaz A S, Jaglowski S M, Blum K A, Lozanski A, Lozanski G, James D F, Barrientos J C, Lichter P, Stilgenbauer S, Buggy J J, Chang B Y, Johnson A J, Byrd J C: Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. N. Engl. J. Med., 370: 2286-2294(2014)

240. Wu Y, Bian C, Zhen C, Liu L, Lin Z, Nisar M F, Wang M, Bartsch J W, Huang E, Ji P, Yang L, Yu Y, Yang J, Jiang X, Zhong J L: Telomerase reverse transcriptase mediates EMT through NF-κB signaling in tongue squamous cell carcinoma. Oncotarget, 8: 85492-85503(2017)

241. Xia B, Qu F, Yuan T, Zhang Y: Targeting Bruton's tyrosine kinase signaling as an emerging therapeutic agent of B-cell malignancies. Oncol Lett, 10: 3339-3344(2015)

242. Xu J, Lamouille S, Derynck R: TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. Cell Res., 19: 156-172(2009)

243. Xu M, Li J, Wang X, Meng S, Shen J, Wang S, Xu X, Xie B, Liu B, Xie L: MiR-22 suppresses epithelial-mesenchymal transition in bladder cancer by inhibiting Snail and MAPK1/Slug/vimentin feedback loop. Cell Death Dis, 9: 209(2018)

244. Xu X, Chen Z, Zhao X, Wang J, Ding D, Wang Z, Tan F, Tan X, Zhou F, Sun J, Sun N, Gao Y, Shao K, Li N, Qiu B, He J: MicroRNA-25 promotes cell migration and invasion in esophageal squamous cell carcinoma. Biochem. Biophys. Res. Commun., 421: 640-645(2012)

245. Yang M -, Chang S -, Chiou S -, Liu C -, Chi C -, Chen P -, Teng S -, Wu K -: Overexpression of NBS1 induces epithelial-mesenchymal transition and co-expression of NBS1 and Snail predicts metastasis of head and neck cancer. Oncogene, 26: 1459-1467(2007)

246. Yang M, Hsu D S, Wang H, Wang H, Lan H, Yang W, Huang C, Kao S, Tzeng C, Tai S, Chang S, Lee O K, Wu K: Bmi1 is essential in Twist1-induced epithelial-mesenchymal transition. Nat. Cell Biol., 12: 982-992(2010)

247. Yang M, Wu M, Chiou S, Chen P, Chang S, Liu C, Teng S, Wu K: Direct regulation of TWIST by HIF-1alpha promotes metastasis. Nat. Cell Biol., 10: 295-305(2008)

248. Yang X, Pursell B, Lu S, Chang T, Mercurio A M: Regulation of beta 4-integrin expression by epigenetic modifications in the mammary gland and during the epithelial-to-mesenchymal transition. J. Cell. Sci., 122: 2473-2480(2009)

249. Yilmaz M, Christofori G: EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. Cancer Metastasis Rev., 28: 15-33(2009)

250. Zeisberg M, Neilson E G: Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. J. Clin. Invest., 119: 1429-1437(2009)

251. Zhang B, Zhou Y, Lin N, Lowdon R F, Hong C, Nagarajan R P, Cheng J B, Li D, Stevens M, Lee H J, Xing X, Zhou J, Sundaram V, Elliott G, Gu J, Shi T, Gascard P, Sigaroudinia M, Tlsty T D, Kadlecek T, Weiss A, O'Geen H, Farnham P J, Maire C L, Ligon K L, Madden P A F, Tam A, Moore R, Hirst M, Marra M A, Zhang B, Costello J F, Wang T: Functional DNA methylation differences between tissues, cell types, and across individuals discovered using the M&M algorithm. Genome Res, 23: 1522-1540(2013)

252. Zhang C, Wang Y Q, Jin G, Wu S, Cui J, Wang R: Selection of reference genes for gene expression studies in human bladder cancer using SYBR-Green quantitative polymerase chain reaction. Oncol Lett, 14: 6001-6011(2017)

253. Zhang J, Ma L: MicroRNA control of epithelial-mesenchymal transition and metastasis. Cancer Metastasis Rev., 31: 653-662(2012)

254. Zhang Y E: Non-Smad Signaling Pathways of the TGF-β Family. Cold Spring Harb Perspect Biol, 9: (2017)

255. Zhong H, Voll R E, Ghosh S: Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. Mol. Cell, 1: 661-671(1998)

256. Zhou B P, Deng J, Xia W, Xu J, Li Y M, Gunduz M, Hung M: Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. Nat. Cell Biol., 6: 931-940(2004)

257. Zhou Y, Chu X, Deng F, Tong L, Tong G, Yi Y, Liu J, Tang J, Tang Y, Xia Y, Dai Y: The adenosine A2b receptor promotes tumor progression of bladder urothelial carcinoma by enhancing MAPK signaling pathway. Oncotarget, 8: 48755-48768(2017)

258. Zhu S, He C, Deng S, Li X, Cui S, Zeng Z, Liu M, Zhao S, Chen J, Jin Y, Chen H, Deng S, Liu Y, Wang C, Zhao G: MiR-548an, Transcriptionally Downregulated by HIF1α/HDAC1, Suppresses Tumorigenesis of Pancreatic Cancer by Targeting Vimentin Expression. Mol. Cancer Ther., 15: 2209-2219(2016)

259. Zhu Z, Ling L, Qi L, Chong Y, Xue L: Bruton's Tyrosine Kinase (BTK) Inhibitor (Ibrutinib)-Suppressed Migration and Invasion of Prostate Cancer. Onco Targets Ther, 13: 4113-4122(2020)

7 Anhang

7.1 Beispielhafte PCR des *BTK Assays*

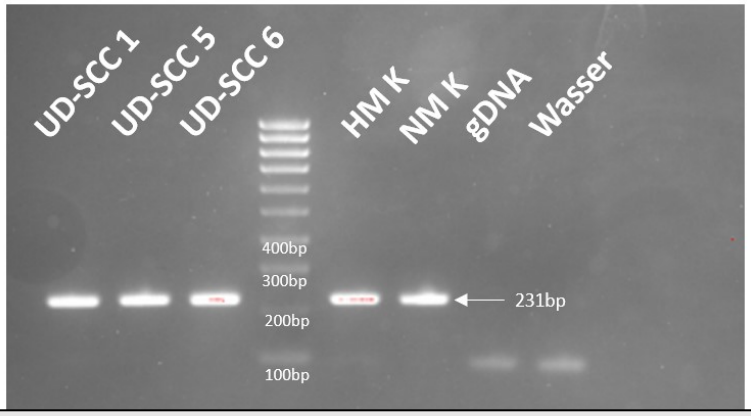


Abbildung 24: PCR-Amplifikate auf Agarose Gel des *BTK Assays*

Aufgetragen wurden Amplifikate der Proben UD-SCC 1, UD-SCC 5, UD-SCC 6, Ladder 100bp, hoch-methylierte Kontrolle (HM K), niedrig-methylierte Kontrolle (NM-K), genomische unkonvertierte DNA (gDNA), destilliertes Wasser (Wasser). Foto aufgenommen mit ImageLab Software und modifiziert mit Microsoft PowerPoint. BTK: Bruton'sche Tyrosinkinase, bp: Basenpaare DNA: Desoxyribonukleinsäure, gDNA: genomische DNA, PCR: Polymerase-Kettenreaktion, UD-SCC: Universität Düsseldorf- squamous cell carcinoma

7.2 Danksagung

Die Danksagung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

7.3 Tabellarischer Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.