



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Klinik und Poliklinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie
Klinikum rechts der Isar
Direktor: Prof. Dr. Dr. Klaus-Dietrich Wolff

Charakterisierung des Stammzellpotentials oraler Karzinomzellen

Katharina Helena Nentwig

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Dr. Klaus-Dietrich Wolff
2. Priv.-Doz. Dr. Anja C. Pickhard

Die Dissertation wurde am 10.01.2019 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.06.2019 angenommen.

Für meine Großmutter Erika Conrad

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis	1
2. Einleitung	4
2.1. Das orale Plattenepithelkarzinom	5
2.1.1. Allgemeine Grundlagen.....	5
2.1.2. Epidemiologie	6
2.1.3. Ätiologie und Risikofaktoren	7
2.1.4. Präkanzerosen	9
2.1.5. Klinik	11
2.1.6. Metastasierung.....	12
2.1.7. Differenzialdiagnosen.....	13
2.1.8. Diagnostik.....	13
2.1.9. Klassifikation.....	16
2.1.10. Therapie	19
2.1.11. Prognoseparameter	24
2.1.12. Rezidive	26
2.2. Histologie	26
2.3. Molekularbiologische Aspekte des oralen Plattenepithelkarzinoms.....	28
2.4. Die Rolle des Prozesses der EMT im Rahmen der Kanzerogenese.....	34
2.5. Epigenetik des oralen Plattenepithelkarzinoms	43
2.6. Ziel und Fragestellung	47
3. Material und Methoden	49
3.1. Allgemeine Ausstattung.....	49
3.1.1. Laborausstattung und Verbrauchsmaterialien	49
3.1.2. Allgemeine Chemikalien, Puffer, Lösungen	51
3.2. Immunhistochemie	52
3.3. Zellbiologische Methoden.....	54
3.3.1. Zellkultur	54
3.4. Immunfluoreszenzzytologische Methoden	61
3.4.1. Immunfluoreszenzzytologie	61
3.5. Molekularbiologische Methoden	63

3.5.1.	Expressionsanalyse Nukleinsäuren	63
3.5.2.	Proteinchemische Methoden	67
3.6.	Migrations- und Invasionsversuche	71
3.6.1.	Migrationsassay	71
3.6.2.	Invasionsassay	72
4.	Ergebnisse	73
4.1.	Einfluss der ATPase-Untereinheit CHD4 des NuRD-Komplexes auf das Stammzellpotential und Invasionsverhalten oraler Plattenepithelkarzinomzellen und die Expression von Integrin $\alpha\beta6$	74
4.1.1.	Immunhistochemische Untersuchung der Expression von Integrin $\alpha\beta6$ und CHD4	74
4.1.2.	CHD4 Expression und Überexpression in oralen Karzinomzellen und der Einfluss auf die Expression von Integrin $\alpha\beta6$	76
4.1.3.	CHD4 beeinflusst das Migrations- und Invasionsverhalten oraler Karzinomzellen	82
4.2.	Einfluss der ATPase-Untereinheit CHD4 auf die Expression des Stammzellmarkers Sox2	84
4.3.	Untersuchung von TGF-β und dem extrazellulären Matrixprotein Fibronectin als Einflussfaktor bei der Onkogenese und Metastasierung des oralen Plattenepithelkarzinoms	91
4.3.1.	Expression des extrazellulären Matrixproteins Fibronectin und TGF-β in Tumorgeweben	91
4.3.2.	Einfluss der Stimulanzen TGF-β und Fibronectin auf die Expression des Integrins $\alpha\beta6$ und Validierung der Ergebnisse mittels Invasions- und Migrationsversuchen	92
4.4.	Zusammenfassung der Ergebnisse	96
5.	Diskussion	98
5.1.	Methodik	99
5.1.1.	Zellkultur und Plasmidtransfektion	99
5.1.2.	Nachweis der Überexpression und Einfluss auf die Expression von $\alpha\beta6$ mittels Immunfluoreszenzzytologie, qRT-PCR und Western Blot	102

5.1.3.	Validierung der Ergebnisse mittels Invasions- und Migrationsassays	105
5.1.4.	Stimulation von Karzinomzellen und Transfektanten	106
5.2.	Einfluss der ATPase-Untereinheit CHD4 des NuRD-Komplexes auf das Stammzellpotential und Invasionsverhalten oraler Plattenepithelkarzinomzellen und die Expression von $\alpha v\beta 6$	107
5.3.	Einfluss der ATPase-Untereinheit CHD4 auf die Expression von Sox2 und funktionelle Konsequenzen	114
5.4.	Untersuchung von TGF- β und dem extrazelluläre Matrixprotein Fibronektin als Einflussfaktor bei der Onkogenese und Metastasierung des oralen Plattenepithelkarzinoms.....	117
5.5.	Ausblick.....	121
6.	Zusammenfassung	123
7.	Abbildungsverzeichnis	126
8.	Tabellenverzeichnis	127
9.	Literaturverzeichnis	128
10.	Publikationen	147
11.	Danksagung	148

1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AKT	PI3K, Phosphoinositid-3-Kinase
ATPase	Adenosintriphosphatasen
cDNA	Komplementäre DNA
CHD4	Chromodomain-Helicase-DNA-bindendes Protein 4
Cu ²⁺	Kupfer
d	Tag
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
EMT	Epitheliale-mesenchymale-Transition
FCS	Fetales Kälberserum
FN	Fibronektin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gy	Gray
HDAC	Histon-Deacetylasen
HNO	Hals-Nasen-Ohrenheilkunde
HNSCC	Plattenepithelkarzinom im Kopf- und Halsbereich
HPV	Humane Papillomviren
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IgG	Immunglobulin G
LAP	<i>Latency associated protein</i>
LUT	<i>Look-up-table</i>

mRNA	<i>Messenger RNA</i>
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
miRNA	Mikroribonukleinsäure
min	Minuten
MKG	Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie
ml	Milliliter
Mm	Millimeter
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MTA2	<i>Metastasis-associated protein 2</i>
ng	Nanogramm
ND	<i>Neck Dissection</i>
nm	Nanometer
NuRD	Nukleosomen-Remodellierungs und Deacetylase-Komplex
Oct4	<i>Octamer-binding transcription factor 4</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
qRT-PCR	<i>Quantitative real-time PCR</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
Sox2	<i>Sex determining region Y – Box 2</i>
Tab.	Tabelle
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
TGS	<i>Tris-glycine-SDS</i>
TNC	Tenascin
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor Beta</i>
TME	<i>Tumor Microenvironment</i>
TWEEN	Polyoxyethylen (20)-sorbitan-monolaurat

Abkürzungsverzeichnis

UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
V	Volt
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VN	Vitronektin
w	Woche
WT	Wildtyp

2. Einleitung

In den letzten Jahrzehnten konnte trotz diagnostischer und therapeutischer Fortschritte für Patienten mit oralen Plattenepithelkarzinomen keine wesentliche Prognoseverbesserung erzielt werden (Ghantous, Yaffi et al. 2015). Die Mortalitätsrate bleibt unverändert und die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt ungefähr 50% (Marsh, Suchak et al. 2011, Markopoulos 2012).

Eine hohe Invasivität und metastasierendes Wachstum sind häufig prognoselimitierend, sodass interdisziplinäre Therapieansätze wie radikale Operationen, mikrochirurgische Rekonstruktionen, Strahlentherapien, Chemotherapien, kombinierte Strahlen-Chemotherapien, Antikörper und Immuntherapien bislang ohne wesentlichen Erfolg im Gesamtüberleben blieben (Leemans, Braakhuis et al. 2011).

Um das orale Plattenepithelkarzinom besser charakterisieren zu können, wurden Tumorregister eingerichtet und das Klassifizierungssystem überarbeitet. Dennoch bleibt die individuelle Prognose der Patienten schwer vorhersagbar, weswegen neue diagnostische und therapeutische Möglichkeiten von großer Relevanz sind.

Im Rahmen der onkologischen Forschung zeigte sich, dass molekulare Mechanismen das Invasions- und Wachstumsverhalten von Karzinomzellen beeinflussen und eine wichtige Rolle im Rahmen der Kanzerogenese spielen. Für zahlreiche Karzinomentitäten wird die Therapie bereits auf molekulare Biomarker oder zielgerichtete Therapien aufgebaut, welche an das molekularbiologische Expressionsprofil der Karzinome angepasst sind.

Bekannt ist, dass auch beim oralen Plattenepithelkarzinom die Karzinogenese, Invasion und Metastasierung mit tumorbiologischen Alterationen wie der Epithelialen-Mesenchymalen-Transition (EMT) zusammenhängen. Diesem Prozess wird bereits eine wichtige Bedeutung im Prozess der Onkogenese verschiedener Karzinomentitäten zugeschrieben (Sato, Shames et al. 2012, Heerboth, Housman et al. 2015).

Diese zugrundeliegenden molekularbiologischen Mechanismen des oralen Plattenepithelkarzinoms sind allerdings bis dato nicht hinreichend geklärt, um

effiziente und gesicherte zielgerichtete Therapien ermöglichen zu können. Während genetische Veränderungen innerhalb des oralen Plattenepithelkarzinoms bereits beschrieben wurden, geraten epigenetische Veränderungen zunehmend in den Fokus onkologischer Forschung. Diese Veränderungen regulieren die Genexpression, ohne die DNA Sequenzen zu verändern (Shaw 2006). Die Untersuchung und Charakterisierung dieser epigenetischen Einflussfaktoren gewinnt zunehmend an Bedeutung und rückt in das Zentrum onkologischer Forschung.

Dabei ist insbesondere der Einfluss epigenetischer Mechanismen für die Entstehung des oralen Plattenepithelkarzinoms ein bisher nicht geklärter Aspekt. Eine genauere Charakterisierung des Stammzellpotentials oraler Karzinomzellen ist das Ziel dieser Arbeit, um eine mögliche Grundlage für diagnostische und therapeutische Fortschritte zu bieten.

2.1. Das orale Plattenepithelkarzinom

2.1.1. Allgemeine Grundlagen

Das orale Plattenepithelkarzinom (oral squamous cell carcinoma, OSCC) ist die häufigste, die Mundhöhle betreffende Neoplasie. Es macht 90% der Karzinome dieses Bereiches aus (Markopoulos 2012, Ghantous, Yaffi et al. 2015).

Es zählt zu den Kopf-Hals-Karzinomen, welche je nach Entstehungsort individuelle Besonderheiten aufweisen.

Die allgemeine Prognose dieser Karzinome ist oft schlecht, da die Erkrankung meist erst in einem fortgeschrittenen, metastasierten Stadium entdeckt wird. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt ungefähr 50%. Eine frühe Diagnosestellung ist ein essenzieller Faktor, um das Überleben und die Prognose positiv zu beeinflussen (Ghantous, Yaffi et al. 2015).

Gründe für die späte Diagnose sind meist eine initiale Fehldiagnose, mangelnde Sensibilität der Patienten oder auch der fehlende Gang zum Arzt (Scott, Grunfeld et al. 2006).

Auch wenn in den letzten Jahren Verbesserungen im Bereich der Diagnostik vorgenommen wurden, hat sich die Prognose der Patienten kaum verbessert. Einige Studien versuchten relevante Biomarker ausfindig zu machen, allerdings wurde bis dato kein spezifischer Marker für den klinischen Einsatz identifiziert (Ghantous, Yaffi et al. 2015).

2.1.2. Epidemiologie

Kopf-Hals-Karzinome sind die sechsthäufigste Karzinomerkrankung weltweit, mit mehr als 500.000 neuen Fällen jährlich (Parkin, Bray et al. 2005, Argiris, Karamouzis et al. 2008).

2-4% aller Karzinome weltweit sind orale Karzinome (Markopoulos 2012). Orale Karzinome und Kopf-Hals-Karzinome weisen eine sehr ähnliche Ätiologie auf. Zu den oralen Karzinomen zählen Karzinome im Bereich der Mundhöhle und des Rachenraums.

Die Inzidenz und Mortalität ist variabel und abhängig von der geographischen Region, vom Alter der Patienten und des Fortschritts der Erkrankung.

Karzinome des jüngeren Patientenkollektivs weisen oft ein aggressiveres Wachstumsverhalten als bei älteren Patienten auf (Ribeiro, Silva et al. 2009).

In den Hochrisikoländern, wie z.B. Indien, Sri Lanka, Bangladesch und Pakistan ist das orale Plattenepithelkarzinom der häufigste maligne Tumor bei Männern und der dritthäufigste maligne Tumor bei Frauen. In Indien beispielsweise hat es eine Prävalenz von 45% (Markopoulos 2012). In Europa zeigt das orale Plattenepithelkarzinom die höchste Inzidenz in Frankreich, gefolgt von Ungarn, der Slowakei und Slowenien (Warnakulasuriya 2009).

Die globale Variation der Inzidenz ist abhängig von zahlreichen Einflussfaktoren und Noxen, wie z.B. Nikotin und Alkohol. Diese Noxen tragen zu ca. 80% aller Kopf-Hals-Karzinome bei (Vigneswaran and Williams 2014).

Insgesamt zeigt sich bei dem Auftreten des oralen Plattenepithelkarzinoms eine sinkende Inzidenz. Dies hängt unter anderem mit einem sinkenden Nikotinkonsum zusammen.

Eine steigende Inzidenz zeigte sich in den letzten Jahren allerdings bei jüngeren Patienten und Patienten mit Zungenkarzinomen (Markopoulos 2012, Ghantous, Yaffi et al. 2015).

Weiterhin wurde eine stagnierende oder auch steigende Inzidenz bei HPV-abhängigen oropharyngealen Karzinomen, speziell den HPV-16 assoziierten Karzinomen, beschrieben. In Zukunft wird durch die neue HPV-Impfung jedoch von einem positiven Effekt auf die Inzidenz der HPV abhängigen Karzinome ausgegangen (Sturgis and Cinciripini 2007).

2.1.3. Ätiologie und Risikofaktoren

Die Inzidenzraten zeigen eine deutliche Abhängigkeit von der Herkunftsregion, dem sozioökonomischen Status und dem kulturellen Hintergrund (Santos, dos Santos et al. 2016).

Neben exogenen Noxen sind auch genetische Prädispositionen ursächlich für die Ätiogenese des oralen Plattenepithelkarzinoms.

Die Risikofaktoren unterscheiden sich je nach Alter des Kollektivs. Auf Grund ihres Alters stehen Noxen wie Alkohol, Rauchen oder Sonnenlichtexposition bei jungen Patienten nicht so sehr im Fokus wie bei älteren Patienten (Falaki, Dalirsani et al. 2011, Troeltzsch, Knosel et al. 2014).

Bei jüngeren Patienten haben Risikofaktoren wie die genetische Prädisposition, die Immunologie, Ernährungsgewohnheiten oder auch die Infektion mit HPV-16 großen Einfluss (Majchrzak, Szybiak et al. 2014, Santos, dos Santos et al. 2016). Ebenfalls bestehen Unterschiede hinsichtlich der Geschlechterverteilung: Bei älteren Patienten handelt es sich bevorzugt um Männer und bei jüngeren Patienten häufig um Frauen (Santos, dos Santos et al. 2016).

Die wichtigsten Risikofaktoren der westlichen Welt stellen insbesondere Alkohol und Nikotin dar (Altieri, Bosetti et al. 2002, Balaram, Sridhar et al. 2002, Chole, Patil et al. 2010, Zygogianni, Kyrgias et al. 2011, Markopoulos 2012). Bis zu 75% aller oraler Plattenepithelkarzinomfälle sind assoziiert mit dem Konsum von Tabak (Neville and Day 2002, Markopoulos 2012). Die beiden Faktoren Alkohol

und Nikotin potenzieren sich untereinander, sodass eine Kombination ein bis zu 15-fach erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines oralen Plattenepithelkarzinoms darstellt (Talamini, Bosetti et al. 2002, Ogden 2005). Dieser Effekt wird dadurch herbeigeführt, dass Alkohol das Eindringen der Karzinogene des Tabaks in die Mundschleimhaut begünstigt (Rodriguez, Altieri et al. 2004).

Der chronische Alkoholkonsum wirkt sich negativ auf die zellulären Reparaturmechanismen aus. Tabak enthält zahlreiche kanzerogene Stoffe, unter anderem Nitrosamine oder auch aromatische Amine.

Epidemiologische Studien zeigten, dass Raucher ein 5-9-fach erhöhtes Risiko haben, an einem oralen Plattenepithelkarzinom zu erkranken und ein bis zu 17-fach erhöhtes Risiko, wenn sie mehr als 80 Zigaretten am Tag rauchen (Neville 2002, Neville and Day 2002). Des Weiteren zeigte sich, dass Patienten, welche das Rauchen nach Diagnosestellung nicht aufgeben, ein bis zu 6-fach erhöhtes Risiko haben, ein Rezidiv im oberen aerodigestiven Trakt zu entwickeln (Silverman 1998, Neville and Day 2002)

Weitere Risikofaktoren anderer Kulturen sind unter anderem das Kauen von Betelnüssen (z.B. Indien und Taiwan) (Su, Yang et al. 2007), die Areca Nuss und Cannabis (Neville and Day 2002, Thavarajah, Rao et al. 2006).

Auch Snuff und Kautabak sind assoziiert mit einem erhöhten Risiko ein orales Plattenepithelkarzinom zu entwickeln. Patienten mit diesen Risikofaktoren tendieren dazu, die Karzinome häufig auf der bevorzugten Kauseite zu entwickeln.

Virale Infektionen wie EBV oder Hepatitis B sind mit dem oralen Plattenepithelkarzinom assoziiert und auch Infektionen mit HIV oder HPV-16 stehen mit Karzinomen im Bereich der Tonsillen oder des Oropharynx in Verbindung (Dahlstrom, Adler-Storthz et al. 2003, Carvalho, Nishimoto et al. 2005, Markopoulos 2012). HPV-unabhängige Regionen sind die vorderen zwei Drittel der Zunge, der Mundboden, der Gaumen, die Wangenschleimhaut, der Sulcus und die Gingiva (Vigneswaran and Williams 2014).

Weiterhin besteht ein erhöhtes Risiko bei Personen mit einem inkompetenten Immunsystem, z.B. bei Patienten mit HIV, organtransplantierten Patienten oder vorliegender Immunsuppression (Mehrotra and Yadav 2006, Kulkarni, Wadia et al. 2009). Patienten, welche unter einer Fanconi Anämie leiden, wiesen ebenfalls ein erhöhtes Risiko auf (Hamakawa, Nakashiro et al. 2008, Rethman, Carpenter et al. 2010).

2.1.4. Präkanzerosen

Ein Großteil der oralen Plattenepithelkarzinome entwickelt sich auf dem Boden von Präkanzerosen. Diese Vorläuferläsionen des oralen Plattenepithelkarzinoms sind morphologisch verändertes Gewebe, welches klinisch auffällig ist und sich vom gesunden umliegenden Gewebe unterscheidet. Diese Läsionen bergen ein erhöhtes Entartungsrisiko (Rethman, Carpenter et al. 2010). Die Literatur unterscheidet sich hinsichtlich der Entartungstendenz der Präkanzerosen. Sie variiert zwischen 5-18% der Fälle (Carreras-Torras and Gay-Escoda 2015). Moderate oder schwere Dysplasien haben eine Entartungstendenz von 11-36% in einer Zeit von ungefähr 33,6 Monaten (Saini and Poh 2013, Carreras-Torras and Gay-Escoda 2015).

Bei den Vorläuferläsionen kann es sich um Präkanzerosen oder auch epitheliale Dysplasien handeln, welche sich durch eine unterschiedliche Histologie differenzieren (Carreras-Torras and Gay-Escoda 2015).

Zu den Präkanzerosen zählen unter anderem die Erythroplakie oder auch die Leukoplakie. Sie bedürfen einer engmaschigen Kontrolle und können bei Veränderung die Entnahme von Probebiopsien notwendig machen.

Weitere Präkanzerosen stellen der orale Lichen planus, die Nikotinstomatitis, die Tabak pouch keratosis und die orale submuköse Fibrose dar (Warnakulasuriya, Johnson et al. 2007, Mishra 2012, Carreras-Torras and Gay-Escoda 2015).

Die orale Leukoplakie ist allerdings die häufigste Präkanzerose mit einer weltweiten Prävalenz von ca. 2,6% (Wang, Zhang et al. 2009, Hanken, Kraatz et al. 2013).

Bei der Leukoplakie handelt es sich um eine weißliche, nicht abwischbare umschriebene Veränderung der Mundschleimhaut, welche keiner anderen Erkrankung zugeordnet werden kann. Im Verlauf wird sie dicker und gegebenenfalls mit Fissuren durchzogen und entwickelt eine irreguläre Oberfläche.

Läsionen mit einer papillären Oberfläche werden auch als verruköse Leukoplakien bezeichnet (Neville and Day 2002).

Nach Hunter et al. transformieren ungefähr 2-5% der Leukoplakien zu einem oralen Plattenepithelkarzinom (Hunter, Parkinson et al. 2005).

Bei der Erythroplakie handelt es sich um einen klinischen und histologischen Prozess im Bereich der Mundschleimhaut. Die orale Erythroplakie erscheint oft als roter Fleck oder Plaque mit weicher Struktur. Der Mundboden, die laterale Zunge, das retromolare Dreieck oder auch der weiche Gaumen sind die häufigsten Entstehungsorte (Neville and Day 2002). Die Läsionen sind meist gut umschrieben und asymptomatisch. Gelegentlich beschreiben die Patienten ein brennendes Gefühl in diesem Bereich. Die Erythroplakie zeigt eine höhere Entartungstendenz als die Leukoplakie (Neville and Day 2002).

Bei der Erythroleukoplakie handelt es sich um eine Leukoplakie mit rötlichen Arealen.

Als weitere Präkanzerose ist die Nikotinstomatitis anzusehen. Hierbei handelt es sich um eine verdickte, hyperkeratotische Veränderung der Gaumenmukosa, welche am häufigsten mit dem Rauchen von Pfeifen assoziiert ist (Neville 2002). Gelegentlich entsteht eine fissurale Oberfläche der Veränderung. Hierbei markieren rote, punktuelle Veränderungen die gereizten Ausführungsgänge der kleinen Speicheldrüsen (Neville and Day 2002).

Die Tabak-Pouch-Keratitits entsteht auf dem Grund von Kautabak oder Snuff (Neville 2002). Diese Läsionen entstehen typischerweise im bukkalen oder vestibulären Vestibulum. In einem frühen Stadium imponieren faltige

Veränderungen, welche durch Dehnung des Gewebes ausgeglichen werden können. Fortgeschrittene Läsionen zeigen sich als grau-weißliche, verdickte Zonen mit deutlichen Falten und Fissuren (Neville and Day 2002).

2.1.5. Klinik

Die meist befallenen Regionen sind die Zunge, die Lippe oder auch der Mundboden, wobei der hintere laterale Rand der Zunge am häufigsten betroffen ist. Am zweithäufigsten ist der Mundboden betroffen. Danach folgen die Gingiva, bukkale Mukosa, die labiale Mukosa oder auch der harte Gaumen (Neville 2002, Neville and Day 2002). Auf diese Bereiche sollte bei der klinischen Untersuchung ein besonderes Augenmerk gelegt werden.

Zu den klinischen Symptomen sind zunächst die allgemeinen Symptome einer Karzinomerkrankung, wie Müdigkeit, Leistungsabfall, Appetitlosigkeit, Gewichtsabnahme oder Nachtschweiß zu nennen.

Das orale Plattenepithelkarzinom ist in frühen Stadien oft symptomlos. Einige Patienten berichten über die Entwicklung eines Brennens, Kribbelns oder anderen Gefühlssensationen in diesen Bereichen.

Daher sind die Früherkennung und das Screening, gerade bei Patienten mit Risikofaktoren von immenser Wichtigkeit.

Weitere Anzeichen für die Entwicklung eines oralen Plattenepithelkarzinoms können die unklare Lockerung der Zähne, beginnende Schluck- oder Sprechstörungen, Schmerzen, Sensibilitätsausfälle im Bereich der peripheren Hirnnerven oder auch Foetor ex ore sein.

Das orale Plattenepithelkarzinom kann sich aus klinisch unauffälligen Regionen der Mukosa entwickeln oder aber auch auf dem Boden von Präkanzerosen.

Diese Läsionen imponieren oft als weißliche oder rote flächige Veränderungen. Patienten bemerken die Neoplasie oft als nicht abheilenden Ulkus. In späteren Stadien kommen Symptome wie Blutungen, Zahnverlust, Dysphagie, Dysarthrie, Lymphnotenschwellungen oder auch Sensibilitätsausfälle hinzu (Neville and Day 2002).

Das orale Plattenepithelkarzinom erscheint meist als Ulcus mit fissuralen oder exophytischen Rändern. Es kann sich weiterhin als ein Knoten, als rote oder weißliche Läsion oder als Kombination von beiden zeigen. Es zeichnet sich durch fehlende Remission/Abheilung nach mehreren Wochen und gegebenenfalls geschwollenen Lymphknoten aus. Diese erscheinen oft hart und fixiert (Markopoulos 2012).

Läsionen, welche länger als 2 Wochen bestehen und keine Heilungstendenz zeigen, bedürfen der genaueren Abklärung durch einen Spezialisten.

2.1.6. Metastasierung

Die Metastasierung des oralen Plattenepithelkarzinoms erfolgt zunächst lymphogen entlang der zervikalen Halslymphknoten. Eine zervikale Schwellung kann somit ein mögliches Symptom darstellen. 40% der Patienten zeigen bereits initial zum Diagnosezeitpunkt eine zervikale Metastasierung, was mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (Byers, El-Naggar et al. 1998, Coatesworth and MacLennan 2002, Nieuwenhuis, Castelijns et al. 2002). Daher stellt die Untersuchung des Halses mit Abtasten der Lymphabflusswege einen obligaten Teil der klinischen Untersuchung dar.

Weiterhin metastasiert das orale Plattenepithelkarzinom häufig in die Lymphknoten der ipsilateralen Halsseite.

Des Weiteren können kontralaterale oder bilaterale Metastasen auftreten, besonders bei Karzinomen im Bereich des Zungengrundes, fortgeschrittenen Karzinomen oder Mittellinien überschreitenden Tumoren.

Karzinome der Unterlippe oder auch des Mundbodens metastasieren oft in die submentalen Lymphknoten.

Die Lymphknoten sind oft derb, rundlich und kaum verschieblich zum Untergrund tastbar (Neville and Day 2002).

Von einer extrakapsulären Ausbreitung spricht man, wenn das Karzinom die Kapsel des Lymphknotens durchbricht. Dies ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Neville and Day 2002).

Fernmetastasen treten am ehesten in der Lunge auf, wobei auch weitere Bereiche des Körpers betroffen sein können (Neville and Day 2002).

2.1.7. Differenzialdiagnosen

Mögliche Differenzialdiagnosen des oralen Plattenepithelkarzinoms stellen andere Ursachen für weiße, rote oder ulzerierende Läsionen dar, wie z.B. Prothesendruckstellen. Nicht selten werden orale Plattenepithelkarzinome übersehen, da sie als Prothesendruckstelle fehlgedeutet werden. Ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal ist allerdings die fehlende Abheilung bei längerer Prothesenkarenz.

Differentialdiagnostisch können neben dem oralen Plattenepithelkarzinom unter anderem auch Kieferhöhlenkarzinome, Lymphome oder Sarkome zu Schleimhautulzerationen führen.

Eine weitere Differenzialdiagnose stellen verruköse Karzinome dar. Hierbei handelt es sich um sind low-grade Varianten des oralen Plattenepithelkarzinoms, welche ungefähr 3% der invasiven Karzinome der Mundhöhle ausmachen (Bouquot 1998, Neville and Day 2002). Diese Karzinomentität ist assoziiert mit dem Konsum von Kautabak und entsteht meist im Bereich der bukkalen Mukosa oder im Bereich des Vestibulums. Sie imponieren als eine diffuse, verdickte Masse mit aufgeworfener oder papillärer Oberfläche. Die Läsion ist meistens weißlich. Sie wachsen meist langsam, exophytisch und gut differenziert und sind daher meist mit einer besseren Prognose als das orale Plattenepithelkarzinom assoziiert.

2.1.8. Diagnostik

Die frühzeitige Diagnose stellt das Hauptmerkmal einer suffizienten Therapie dar. Daher sind ein ausführliches und gezieltes Anamnesegespräch bei gefährdeten Patienten von großer Bedeutung. In diesem sollte besonderes Augenmerk auf die Risikofaktoren gelegt werden.

Das Basisscreening des Hauszahnarztes oder Hausarztes soll die Inspektion der gesamten Mundhöhle beinhalten und die Aufklärung des Patienten über die Anzeichen, Symptome und Risikofaktoren verbessert werden (Humphris, Freeman et al. 2004, McGurk and Scott 2010, Rethman, Carpenter et al. 2010, Wolff 2012).

Des Weiteren sollte zum Screening eine visuelle und taktile Untersuchung durchgeführt werden. Dies bezieht sich nicht nur auf Patienten mit einer ausgeprägten Noxenanamnese (Rethman, Carpenter et al. 2010).

Ein besonderes Augenmerk muss bei der klinischen Untersuchung auf Läsionen wie Tumore, Ulci, rote oder weißliche Plaque geachtet werden. Bei diesen sollte besonders die Erscheinungsform, wie Größe, Lokalisation, Farbe, Oberflächenstruktur oder Verschieblichkeit genauer untersucht werden.

Das orale Plattenepithelkarzinom imponiert oft derb oder hart und zeichnet sich durch mangelnde Verschieblichkeit gegenüber dem umliegenden Gewebe aus. Auf Grund bereits möglicher zervikaler Metastasierung müssen die Lymphknoten des Halses palpatorisch untersucht werden.

Näher untersucht werden sollten besonders Läsionen, welche seit mindestens zwei Wochen bestehen und keine Remission zeigen (Markopoulos 2012). Patienten mit diesen Mundschleimhautveränderungen sollten umgehend zur Abklärung an einen Spezialisten überwiesen werden (Wolff 2012).

In solchen klinisch suspekten Fällen sollte eine Biopsie des Befundes gewonnen werden (Markopoulos 2012).

Falls der hochgradige Verdacht auf ein orales Plattenepithelkarzinom besteht, sollte bereits vor der Biopsie eine Staginguntersuchung mittels CT/MRT erfolgen, um mögliche Artefakte zu vermeiden, eine genauere Klassifizierung zu ermöglichen und um Verfälschungen der Kontrastmittelanreicherung zu vermeiden.

Falls es in der CT zu ausgedehnten Überlagerungen durch Metallartefakte, kommt, wie beispielsweise durch prothetische Zahnversorgungen, stellt das MRT das bildgebende Verfahren der Wahl dar (Leslie, Fyfe et al. 1999, Wolff, Follmann et al. 2012, Wolff 2012).

Weiterhin sollte bei der Entnahme der Biopsien auf Proben aus dem Randbereich des Tumors geachtet werden, da sonst oft nekrotisches Gewebe erfasst wird, welches eine histologische Sicherung und Diagnose eines oralen Plattenepithelkarzinoms unmöglich macht. Im Rahmen der Probeentnahme und Weiterleitung in die Pathologie ist auf genaue Angaben und relevante Informationen zu achten und diese mitzuteilen (Wolff 2012)

Erhärtet sich der Verdacht eines oralen Plattenepithelkarzinoms, müssen die Patienten einer Hals-Nasen-Ohrenärztlichen Untersuchung und gegebenenfalls einer zusätzlichen Panendoskopie unterzogen werden, um das Auftreten synchroner Zweitkarzinome auszuschließen (Wolff 2012) (Kesting 2009).

Um eine mögliche Lymphknotenmetastasierung (N-Kategorie) radiologisch zu untersuchen, sollte im Rahmen des Stagings die gesamte Region von der Schädelbasis bis zur oberen Thoraxapertur mittels CT oder MRT untersucht werden (van den Brekel, Castelijns et al. 1993, Wolff 2012).

Weiterhin empfiehlt sich ein CT des Thorax, um mögliche Lungenmetastasen bei Patienten mit ausgedehnten Karzinomen (Stadium III oder IV) erfassen zu können (Arunachalam, Putnam et al. 2002, Wolff 2012).

Bislang hat sich eine Sentinel-Lymphknoten-Biopsie als nicht evident herausgestellt, um eine Neck Dissection zu vermeiden (Civantos, Zitsch et al. 2010, Wolff 2012).

Zwar entwickeln sich zunehmend neue diagnostische Mittel, wie die molekulare Analyse der zytologischer Ausstriche aus Speichelproben (Markopoulos, Michailidou et al. 2010), dennoch haben sich diese Methoden bislang noch nicht vollständig durchgesetzt und als effizient erwiesen.

Um weitere molekulare diagnostische Methoden zu entwickeln, bedarf es allerdings noch eines umfassenderen Verständnisses der Erkrankung.

2.1.9. Klassifikation

Das endgültige Staging erfolgt nach Begutachtung der klinischen Untersuchung, bildgebenden Verfahren, zytologischer Beurteilung und definitiver Histologie im Rahmen der Operation. Nach diesem ausführlichen Staging erfolgt die Klassifizierung der Karzinome.

Diese erfolgt für das orale Plattenepithelkarzinom anhand der Kriterien der Union Internationale Contre le Cancer (UICC). In dieser Klassifizierung werden die Tumore entsprechend ihrer TumorgroÙe (T), dem Lymphknotenbefall (N) und der Metastasierung (M) differenziert.

Da die Klassifizierung oft nicht eindeutig möglich ist, gibt es weitere Untergruppierungsmöglichkeiten durch zusätzliche Faktoren wie Differenzierungsgrad (G), Infiltrationstiefe, Lymphgefäßbefall (L), der Veneninvasion (V) oder auch dem R-Faktor (R), welcher den möglichen Verbleib von Tumorresten beschreibt. Weiterhin gibt es zusätzliche Kriterien wie das ECE-Kriterium im Rahmen des Lymphknotenbefalls. ECE-positive Karzinome haben hierbei die Kapsel bereits durchbrochen, ECE-negative Karzinome noch nicht. Die vorangestellten kleinen Buchstaben geben an, durch wen und wodurch die Klassifizierung erfolgte: cTNM nach der klinischen Untersuchung und z.B. pTNM nach histopathologischer Aufbereitung.

Daraus resultiert ein TNM-System, welches den Tumor nach seinem Ausprägungsgrad nach dem American Joint Committee on Cancer (AJCC) in verschiedene Stadien(0-IV) einteilt.

T-Klassifikation des Primärtumors (Tumorgroße)	
Tx	Primärtumor kann nicht ermittelt werden
Tis	Carcinoma in situ
T0	Kein Primärtumor nachweisbar
T1	Primärtumor ist <2cm und Invasionstiefe <5mm
T2	Primärtumor ist <2cm und Invasionstiefe >5mm aber <10mm Oder >2cm aber <4cm und Invasionstiefe <10mm
T3	Primärtumor ist >4cm im Durchmesser oder Invasionstiefe >10mm
T4a	Primärtumor infiltriert kortikalen Knochen, äußere Zungenmuskulatur, Kieferhöhle oder Gesichtshaut
T4b	Tumor infiltriert Spatium masticatorium, Processus pterygoideus, Schädelbasis oder umschließt Arteria carotis interna

Tabelle 1: T-Klassifikation des oralen Plattenepithelkarzinoms nach UICC-Kriterien 2017

N-Klassifikation (Lymphknotenbefall)	
Nx	Regionärer Lymphknotenbefall nicht beurteilbar
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase in einem solitären ipsilateralen Lymphknoten, ECE-
N2a	Metastase in einem solitären ipsilateralen Lymphknoten <3cm und ECE+ oder >3cm und <6cm und ECE-
N2b	Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten <6cm, ECE-
N2c	Metastasen in kontralateralen oder bilateralen Lymphknoten <6cm, ECE-
N3a	Eine Lymphknotenmetastase >6cm, ECE-
N3b	Metastase in einem oder mehreren Lymphknoten und ECE+

Tabelle 2: N-Klassifikation des oralen Plattenepithelkarzinoms nach UICC-Kriterien

M-Klassifikation (Fernmetastasen)	
Mx	Fernmetastasenstatus kann nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen nachweisbar
M1	Gesicherte Fernmetastase

Tabelle 3: M-Klassifikation des oralen Plattenepithelkarzinoms nach UICC-Kriterien

Stadium	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T1, T2	N1	M0
	T3	N0, N1	
IVa	T1, T2, T3	N2	M0
	T4a	N0, N1, N2	
IVb	T4b	Jedes N	M0
	Jedes T	N3	
IVc	Jedes T	Jedes N	M1

Tabelle 4: Tumorstadien nach UICC-Kriterien

2.1.10. Therapie

2.1.10.1. Chirurgische Therapie und Neck Dissection

Ein Hauptziel der operativen Tumorresektion stellt die vollständige Entfernung des Tumors dar, wobei dabei möglichst die Funktion der Strukturen erhalten bleiben soll.

Das Therapiekonzept wird für jeden Patienten individuell und unter Berücksichtigung seiner individuellen Situation erstellt (Parsons, Mendenhall et al. , Rodgers, Stringer et al. 1993, McMahon, O'Brien et al. 2003, Wolff, Follmann et al. 2012, Wolff 2012).

Essentiell ist vor allem die initiale Fallbesprechung innerhalb eines interdisziplinären Tumorboards unter Beteiligung verschiedener Fachdisziplinen, wie MKG, HNO, Strahlentherapie, Onkologie, Pathologie und Radiologie (Rodgers, Stringer et al. 1993, Wolff 2012).

Kurativ intendierte Therapieoptionen des oralen Plattenepithelkarzinoms stellen die chirurgische Therapie, Strahlentherapie in adjuvantem oder primärem Therapiekonzept, die Strahlentherapie mit Chemotherapie oder eine kombinierte Therapie aus den verschiedenen Möglichkeiten dar.

Die operative Therapie setzt sich aus folgenden Hauptelementen zusammen:

- Radikale Tumorresektion
- Neck Dissection (ND, Abb. 1), um eine mögliche Metastasierung des oralen Plattenepithelkarzinoms entlang der zervikalen Lymphabflusswege zu erfassen (Shah and Gil 2009, Ogawa, Matsuura et al. 2011)
- Defektverschluss/Rekonstruktion.

Da bei 20-40% der Patienten bei Diagnosesicherung bereits Lymphknotenmetastasen vorliegen, empfiehlt sich auch bei klinisch unauffälligen

Patienten (cN0), bei der histologischen Sicherung eines invasiven Karzinoms die Durchführung einer elektiven ND (Huang, Kang et al. 2008, D'Cruz, Siddachari et al. 2009, Wolff, Follmann et al. 2012).

Um die hohe Morbidität der radikalen ND zu minimieren, stellt die selektive ND eine gute operative Möglichkeit dar (Pagedar and Gilbert 2009).

Besteht bereits der klinische Verdacht auf Lymphknotenmetastasen (cN+), sollte eine adäquate Lymphknotenausräumung, das heißt in der Regel, eine modifizierte radikale ND vorgenommen werden (Spiro, Spiro et al. 1988, Bier 1994, Wolff, Follmann et al. 2012).

Intraoperativ lässt sich mittels Schnellschnittdiagnostik das Risiko einer R-1 oder RX-Status minimieren. Der Abstand der Resektionsränder zum Primärtumor soll mikroskopisch mindestens 3-5mm und mindestens 10mm vom tastbaren Tumorrand betragen.

Nach einer positiven Schnellschnittuntersuchung der Level II oder III der ND, sollte eine Erweiterung dieser auf die Level I-V stattfinden (Leslie, Fyfe et al. 1999, Wolff 2012).

Bei den eingesendeten Präparaten ist es von großer Relevanz, diese genau zu beschriften (z.B. mit Fadenmarkierungen nach dem Uhrprinzip) und die Informationen über die Lokalisation, Größe, Lage und weiteres an den Pathologen weiterzugeben, damit dieser den Tumor und die Resektate korrekt zuordnen kann. Gegebenenfalls sollte bei Unklarheiten mit dem Pathologen Rücksprache gehalten werden (Wolff 2012).

Falls dennoch innerhalb der ersten Operation die R0-Situation verfehlt wurde, sollte unbedingt eine Nachresektion erfolgen (Bailey, Blanchaert Jr et al. 2001, Wolff 2012).

Bei kleinen Karzinomen (Stadium I und II, ggf. auch III und IV) stellt die operative Therapie, gegebenenfalls mit rekonstruktiver Versorgung innerhalb derselben Operation die Therapieoption der ersten Wahl dar. Selbstverständlich nur, solange es der Allgemeinzustand des Patienten zulässt.

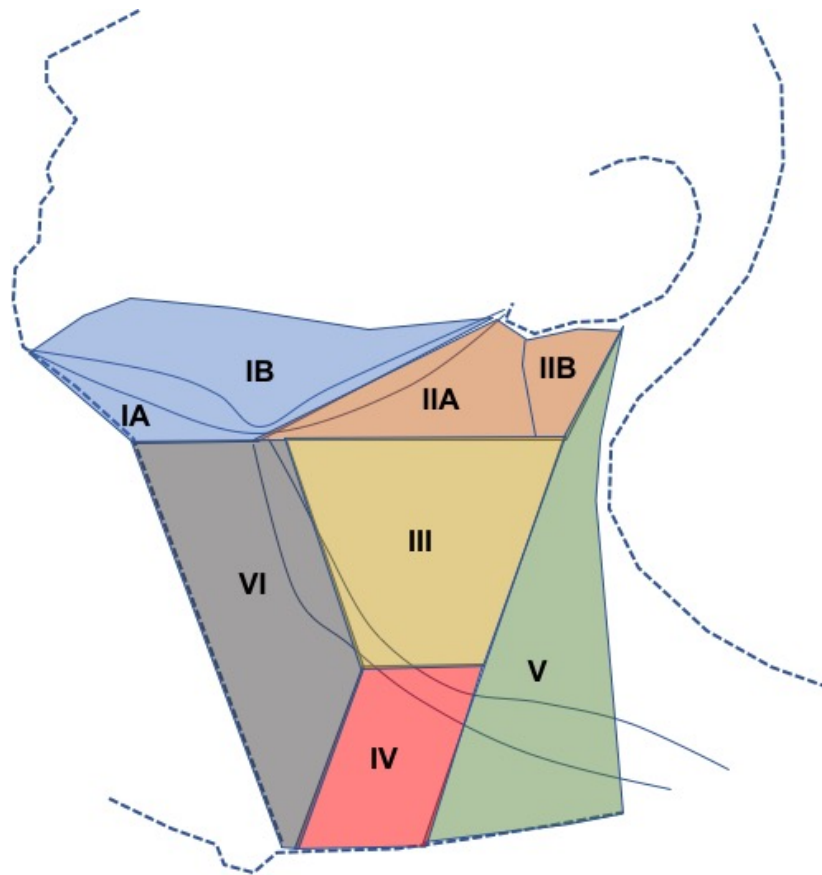


Abbildung 1: Anatomische Einteilung der Neck Dissection Level:

Ia/Ib: Submentale und submandibuläre Lymphknotengruppe

Iia/Iib: Mediale und laterale kranijuguläre Lymphknotengruppe

III: Mediojuguläre Lymphknotengruppe

IV: Kaudojuguläre Lymphknotengruppe

V: Lymphknotengruppe des lateralen Halsdreiecks

VI: Prä- und paratracheale Lymphknotengruppe

2.1.10.2. Rekonstruktion

Die rekonstruktive Versorgung des Entnahmedefektes sollte Teil des chirurgischen Konzeptes sein und die Planung unter Berücksichtigung der

onkologischen Gesamtsituation erfolgen (Villaret and Futran 2003, Suh, Sercarz et al. 2004, Wolff, Follmann et al. 2012).

Hierbei stellt sich die Rekonstruktion der Mundhöhle mit mikrochirurgisch anastomosierten Transplantaten als bewährte Methode dar. Diese erfolgt in Abhängigkeit von der individuellen Patientensituation schon im Rahmen der primären Operation (Chiarini, De Santis et al. 2002, Wolff 2012).

2.1.10.3. Adjuvante Therapie und neoadjuvante Therapie

Bei fortgeschrittenen Tumorstadien sollte eine postoperative Therapie angeschlossen werden (Rodgers, Stringer et al. 1993, Levendag, Nowak et al. 1996, dos Santos, Goncalves Filho et al. 2001, Wolff, Follmann et al. 2012). Diese beinhaltet eine Kombination der chirurgischen Therapie, der Radiotherapie und/oder der Chemotherapie.

Bei der Radiotherapie spielt eine gute Mundhygiene eine große Rolle, da mögliche Komplikationen die Mukositis, Xerostomie oder auch Osteonekrose sind. Daher sollte vor Beginn eine ausführliche zahnärztliche Fokussuche durchgeführt werden (Wolff 2012).

Die postoperative Therapie sollte wieder im Rahmen einer interdisziplinären Tumorkonferenz besprochen werden (Wolff, Follmann et al. 2012).

Als konservative therapeutische Optionen werden die (postoperative) Radiotherapie oder Radiochemotherapie bei T3/T4-Tumoren, kurzem Resektionsrand, perineuraler Invasion, Gefäßinvasion oder Lymphknotenmetastasierung empfohlen (Bernier, Domenge et al. 2004, Cooper, Pajak et al. 2004, Wolff, Follmann et al. 2012).

Hierbei ist die Gesamtdosis der Radiotherapie in der Regel unterteilt in individuelle Dosen. Die Bestrahlung erfolgt nach unterschiedlichen Konzepten; entweder fraktioniert (1.8-2.0 Gy pro Tag, 5d/w), akzeleriert (>10Gy/w) oder hyperfraktioniert (1.1-1.2 Gy 2mal am Tag). Bei Unterbrechung der Strahlentherapie zeigte sich eine Verschlechterung der Tumorkontrolle,

weswegen dies unbedingt vermieden werden sollte (Duncan, MacDougall et al. , Robertson, Robertson et al. 1998, Wolff 2012).

Die postoperative Strahlentherapie soll möglichst früh begonnen werden und innerhalb eines Zeitraumes von maximal 11 Wochen nach Abschluss der operativen Therapie beendet werden (Ang, Trotti et al. 2001, Awwad, Lotayef et al. 2002, Wolff 2012).

Bei Patienten mit einem erhöhten Risiko (Resektionsrand <5mm oder extrakapsuläres Wachstum) und Indikation zur Strahlentherapie, sollte die adjuvante Behandlung in Kombination mit Cisplatin erfolgen (Bataini, Bernier et al. 1988, Peters, Goepfert et al. 1993, Bernier, Domenge et al. 2004, Wolff 2012).

Im Falle eines bereits fortgeschrittenen und inoperablen Tumors, welcher allerdings noch nicht metastasiert ist, empfiehlt sich die primäre Radiochemotherapie und sollte der alleinigen Strahlentherapie vorgezogen werden (Pignon, Bourhis et al. 2000, Wolff 2012).

Hierbei sollte die Chemotherapie mit Cisplatin oder cisplatinhaltigen Kombinationen erfolgen (Wolff 2012).

Alternativ zu einer Radiochemotherapie kann eine Kombination der Strahlentherapie mit Cetuximab durchgeführt werden (Wolff 2012).

Cetuximab ist ein monoklonaler Antikörper, welcher als Inhibitor des epithelialen Wachstumsfaktors EGFR fungiert. Die Therapie mit Cetuximab gilt als molekulare zielgerichtete Therapie.

2.1.10.4. Palliative Therapie

Palliative Situationen entstehen, wenn die Tumorresektion auf Grund von anatomischen oder funktionellen Grenzen oder durch den Allgemeinzustand des Patienten keinen kurativen Therapieansatz mehr bietet.

In palliativen Situationen ist es essentiell, den Patienten best supportive Care und professionelle Hilfe bereits frühzeitig zur Verfügung zu stellen (Wolff, Follmann et al. 2012).

Weiterhin stellt eine palliative Strahlentherapie bei Patienten mit inkurablem Mundhöhlenkarzinom eine Therapieoption dar (Mohanti, Umapathy et al. 2004, Wolff 2012). Diese erfolgt oft hyperfraktioniert, um die Nebenwirkungen zu minimieren und bessere Ergebnisse in Bezug auf das Ansprechen der Therapie für die Lebensqualität zu erzielen (Agrawal, Frederick et al. 2011) . Ebenfalls können palliative chirurgische und/oder radiologisch-interventionelle Maßnahmen zur Verbesserung tumor-assoziiertes Begleitscheinungen in Erwägung gezogen werden (Laccourreye, Lawson et al. 1999, Paleri, Stafford et al. 2005, Wolff 2012).

Bei Patienten, welche sich in einem guten Allgemeinzustand und Leistungszustand befinden, stellt die palliative platinbasierte Chemotherapie in Kombination mit Cetuximab eine Therapieoption dar. Patienten mit reduziertem Allgemeinzustand können einer Monotherapie unterzogen werden, um die exzessive Toxizität der Kombinationstherapie zu vermeiden (Wolff 2012).

Doch auch, wenn die Chemotherapie mit palliativer Intention eine Ansprechrate zwischen 10-35% hat, gibt es keine Evidenz für eine Verlängerung des Gesamtüberlebens (Gibson, Li et al. 2005, Wolff, Follmann et al. 2012). Das Gleiche gilt für die palliative Radiotherapie.

2.1.11. Prognoseparameter

Die Prognose der Patienten wird zu einem großen Teil vom Diagnosezeitpunkt determiniert. Die Tumorausdehnung, das Vorliegen von Lymphknotenmetastasen oder auch Fernmetastasen limitieren das Gesamtüberleben (Leemans, Braakhuis et al. 2011).

Trotz Verbesserung der operativen Techniken und der Radiotherapie, welche die Standardtherapie darstellen, bleibt die Mortalitätsrate nahezu unverändert. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt ungefähr 50% (Marsh, Suchak et al. 2011, Markopoulos 2012).

Die beste Prognose besteht bei Patienten mit niedrigem Tumorstadium, gutem Differenzierungsgrad und fehlender Metastasierung. Weiterhin ist sie von vielen

Faktoren wie Behandlung oder der individuellen Compliance abhängig (de Araujo, Barboza et al. 2008).

Patienten, welche in einem frühen Tumorstadium diagnostiziert wurden, haben durch die Operation oder Strahlentherapie eine gute Prognose.

Patienten mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium erhalten die chirurgische Tumorresektion und Bestrahlung, ggf. kombiniert mit einer Chemo- oder Antikörpertherapie (Leemans, Braakhuis et al. 2011).

Viele Patienten, welche in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert werden, sterben innerhalb von 30 Monaten (Hill and Price 1994, Markopoulos 2012).

Versuche, die Effizienz der Radiotherapie, besonders in lokal fortgeschrittenen Karzinomen zu verbessern, beinhaltet auch eine fraktionierte Radiotherapie oder die kombinierte Chemotherapie (Mazeron, Tao et al. 2009, Markopoulos 2012).

Um die Prognose der Erkrankung einschätzen zu können, werden bei den Patienten die oben genannten Staginguntersuchungen durchgeführt, um sie entsprechend der TNM-Klassifizierung und UICC-Stadien einordnen zu können. Ein höheres TNM-Stadium korreliert mit einer schlechteren Prognose (Carinci, Pelucchi et al. 1998, Nishimaki, Kanda et al. 2002).

Weiterhin zeigte sich, dass ein höheres Grading ebenfalls mit einer schlechteren Prognose in Zusammenhang steht (Carinci, Pelucchi et al. 1998, Coatesworth and MacLennan 2002).

Prognosefaktoren stellen unter anderem auch der HPV-Status und die Noxenanamnese dar (Leemans, Braakhuis et al. 2011).

Ein Rezidiv ist ebenfalls ein negativer Prognosemarker.

Dies wird bestätigt durch Studien, welche zeigten, dass Patienten ohne Rezidiv eine 5-Jahres-Überlebensrate von bis zu 90% aufweisen können, wohingegen diese bei Patienten mit einem Rezidiv auf 30% sinkt (Camisasca, Silami et al. 2011). Rezidive führen zu einem schlechteren Überleben und einer deutlich

verminderten Lebensqualität, sodass sie zu einem zunehmend größeren Thema in der Forschung werden (Wang, Zhang et al. 2013).

2.1.12. Rezidive

Ein Fünftel aller Patienten mit oralen Plattenepithelkarzinomen haben im Laufe ihrer Erkrankung ein Lokalrezidiv. 76% innerhalb der ersten 2 Jahre und weitere 11% im 3. Jahr (Boysen, Lovdal et al. 1992, Wolff, Follmann et al. 2012).

Um diese schnellstmöglich zu erkennen, sollten regelmäßige Nachsorgetermine mit den Patienten vereinbart werden.

Diese erfolgen nach einem einheitlichen Schema, welches je nach Patient individualisiert werden kann. Im 1. und 2. Jahr findet die Tumornachsorge alle 3 Monate statt und im 3.-5. Jahr alle 6 Monate.

Im Rahmen der Nachsorgekontrollen soll auch die Lebensqualität und mögliche B-Symptomatik erfragt werden. Weiterhin sollte eine klinische Untersuchung der zervikalen Lymphknoten durch Palpation erfolgen. Nach dem 5. Jahr sollen übliche Früherkennungsmaßnahmen erfolgen (Wolff, Follmann et al. 2012).

Im Falle eines Rezidivs oder einer Nachresektion beginnt das Nachsorgeschema wieder von vorne.

2.2. Histologie

In den meisten Fällen handelt es sich bei intraoralen Malignomen um Plattenepithelkarzinome.

Sie entstammen dem mehrschichtigen Plattenepithel der oralen Mukosa (Tumuluri, Thomas et al. 2002, Rivera and Venegas 2014). Die Genese ist multifaktoriell bedingt und wird durch Noxen wie Alkohol, Tabak oder auch HPV beeinflusst (Markopoulos 2012).

Häufigste Entstehungsorte sind die Lippe, die Zungenränder und auch der Mundboden (Jerjes, Upile et al. 2010, Rivera and Venegas 2014).

Der Prozess der Kanzerogenese und ist charakterisiert durch die initiale Läsion der Zelle bis hin zur Bildung eines malignen Tumors (Hanahan and Weinberg 2000).

Während dieses Prozesses durchlaufen die Läsionen histologisch verschiedene Phasen bis zur Bildung eines invasiven Plattenepithelkarzinoms.

Je nach Erscheinungsform werden die Läsionen unterschiedlich eingeteilt. Zum einen anhand ihrer reaktiven epithelialen Veränderungen (wie Hyperkeratose, Hyperplasie oder Akanthose) und zum anderen anhand ihrer präneoplastischen Veränderungen (mild, moderat oder schwere Dysplasie) (Wang, Zhang et al. 2009, Rivera and Venegas 2014).

Weiterhin differenziert man hinsichtlich ihrer histologischen Erscheinung spindelzellige, adenosquamöse, basaloide, adenoide oder auch verruköse Formen (Böcker 2012).

Präkazerotische Läsionen sind unter anderem Leukoplakien oder Erythroplakien. Nicht alle reaktive Läsionen, potentiell maligne Läsionen oder auch Präkanzerosen werden zu einem oralen Plattenepithelkarzinom (Neville and Day 2002, Rivera and Venegas 2014).

Das orale Plattenepithelkarzinom entwickelt sich meist aus der Basalzellschicht heraus und entsteht als epitheliale Dysplasie. Es ist charakterisiert durch eine veränderte Proliferation dysplastischer Zellen in der Epithelschicht, welche zunehmend die Basalmembran zerstören. Die lokale Invasion des umgebenden Gewebes entsteht durch Einwachsen der veränderten Epithelzellen (Rivera and Venegas 2014). Dies führt zu lokaler Destruktion und bei Durchbrechen der Basalmembran zur Metastasierung.

Die histologische Beurteilung ist von großer Bedeutung für das Grading der Patienten, welches wichtige Informationen für die Therapie und Prognose der erkrankten Patienten liefert.

Das Plattenepithelkarzinom weist oftmals einen nicht klar definierten Differenzierungsgrad auf, welcher sich meist in dem Bereich zwischen G1-G3

bewegt. Im Gegensatz dazu weisen verruköse Karzinome oder papilläre Karzinome meist eine gute Differenzierung (G1) auf und adenosquamöse Plattenepithelkarzinome, Spindelzellkarzinome oder auch basaloide Plattenepithelkarzinome meist einen deutlich schlechteren Differenzierungsgrad (G3).

Hierbei beschreibt Grad 1 (G1) gut differenziertes Tumorgewebe, G2 mäßig differenziertes Tumorgewebe, G3 niedrig differenziertes Tumorgewebe und G4 undifferenziertes Tumorgewebe. Die Einteilung GX beschreibt Gewebe, dessen Differenzierungsgrad nicht bestimmt werden kann.

Gut differenzierte orale Plattenepithelkarzinome sind charakterisiert durch eine Hyperkeratose und Inflammation am Übergang des Epithels zum Tumorstroma. Undifferenzierte orale Plattenepithelkarzinome weisen keine klare Abgrenzung zwischen der Tumorinvasionsfront und der Gewebsinvasion auf (Rivera and Venegas 2014).

Malignitätsgrad	
Gx	Differenzierungsgrad nicht beurteilbar
G1	Gut differenziertes Gewebe
G2	Niedrig differenziertes Gewebe
G3	Schlecht differenziertes Gewebe
G4	Undifferenziertes Gewebe

Tabelle 5: Differenzierungsgrad nach Wittekind 2010

2.3. Molekularbiologische Aspekte des oralen Plattenepithelkarzinoms

Karzinome entstehen auf der Basis einer Akkumulation von genetischen und epigenetischen Aberrationen über mehrere Schritte, welche karzinom-assoziierte Signalwege regulieren und zahlreiche genetische Veränderungen umfassen.

Dies wurde bereits 2000 durch Hanahan und Weinberg in ‚Hallmarks of Cancer‘ beschrieben (Hanahan and Weinberg 2000).

Ähnlich wie bei anderen Karzinomen wird bei Kopf-Hals-Karzinomen davon ausgegangen, dass die Entwicklung über mehrere Schritte durch Anhäufung von Genexpressionsänderungen voranschreitet, was zu einem Wachstumsvorteil gegenüber den Nachbarzellen führt (Schmezer and Plass 2008).

Hierbei ist die Reihenfolge der DNA-Verluste oder –Zugewinne weniger relevant als die insgesamt angehäufte Zahl chromosomaler Veränderungen (Califano, van der Riet et al. 1996, Schmezer and Plass 2008).

Die Genveränderungen beziehen sich in der Regel auf Onkogene und Tumorsuppressorgene, welche unter anderem durch Mutationen oder epigenetische Veränderungen modifiziert werden. Dies kann entweder zu einer Inaktivierung oder Überexprimierung dieser führen (Choi and Myers 2008).

Verstärkt exprimierte oder hochregulierte Onkogene umfassen zum einen die Wachstumsfaktoren (EGFR), zum anderen Signaltransduktionsmechanismen wie Cyclin D1. Herunterregulierte sowie vermindert aktivierte Tumorsuppressorgene umfassen unter anderem p53, Ki-67 oder das Retinoblastomgen.

Weiterhin haben bei der Metastasierung und der Ausbreitung der Karzinome die Gene für E-cadherin, VEGF, TGF- β / α , MMP's, bestimmte Interleukine, die Gene weiterer Wachstumsfaktoren und die Gruppe der Integrine einen bedeutenden Einfluss (Haddad and Shin 2008).

Im Rahmen der Karzinogenese des oralen Plattenepithelkarzinoms haben Noxen wie Alkohol und Nikotin, chronische Entzündungen und virale Infektionen einen großen Einfluss und können, neben weiteren Faktoren, genetische Mutationen auf molekularbiologischer Ebene begünstigen. Die Akkumulation dieser Veränderung innerhalb der Zellen führt letztendlich zur Bildung eines oralen Plattenepithelkarzinoms.

Auf Grund von einer meist multilokulären Exposition der Patienten gegenüber diesen Noxen, kommt es häufig zu dem Phänomen multifokaler, syn- oder

metachroner Karzinome, auch ‚*field cancerisation*‘ genannt (Schmezer and Plass 2008).

Obwohl es sich in den meisten Fällen der Kopf-Hals-Karzinome um Plattenepithelkarzinome handelt und sich eine Homogenität in der Erkrankung vermuten lässt, stellte sich heraus, dass die Krankheitsgruppe unerwartet heterogen ist und zahlreiche Differenzen auf molekularbiologischer Ebene umfasst, welche bis dato nicht hinreichend geklärt sind (Leemans, J M Braakhuis et al. 2011).

Im Gegensatz zum oralen Plattenepithelkarzinom finden in der Therapie zahlreicher anderer Karzinomentitäten molekulare Biomarker und gezielte Therapeutika bereits großen Anklang und sind im Behandlungskonzept fest verankert. Dies setzt allerdings ein hinreichendes Verständnis der Erkrankung auf molekularbiologischer Ebene voraus.

Um in Bezug auf das orale Plattenepithelkarzinom das derzeitige Therapiekonzept der Tumorchirurgie durch spezifische molekulare Therapeutika ergänzen zu können, bedarf es eines tiefergehenden Verständnisses molekularbiologischer Mechanismen der Kanzerogenese, Invasion und Metastasierung. Ein weiterer Benefit dieses Verständnisses wäre auch eine möglicherweise bessere Einschätzung der Prognose der erkrankten Patienten. Dies ist zum derzeitigen Stand der Forschung ebenfalls nur bedingt möglich.

Das Expressionsprofil der karzinom-assoziierten Biomarker und Moleküle könnte somit einen großen Beitrag zur Erstellung individueller Behandlungskonzepte leisten und das *Outcome* der Patienten verbessern.

Eine große Rolle bei der Entstehung des oralen Plattenepithelkarzinoms spielt die Gruppe der Wachstumsfaktoren. Besonders der EGF-Rezeptor und seine Gruppe nehmen einen zentralen Stellenwert ein. Eine vermehrte Expression des EGFR-Rezeptors ist in zahlreichen Karzinomen nachgewiesen worden. Diese führt zu einer Stimulation der Zellteilung (Harari 2004). Es zeigte sich, dass die

Gruppe der EGFR assoziierten Karzinome eine erhöhte Rezidivrate aufwiesen (Murugan, Hong et al. 2008).

Als wichtiger, dem EGFR-Rezeptor nachgeschalteter Signalweg ist auch der PI3K, PTEN und AKT Signalweg zu sehen. Dieser trägt zu dem Prozess der Regulation der Apoptose, Proteinsynthese und Regulation von p53, einem bereits gut beschriebenen Tumorsuppressorgen, bei.

Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass Karzinome, um ihren erhöhten Nährstoff- und Oxygenierungsbedarf zu sichern, Prozesse der Neo-Angiogenese entwickeln. In der Regel geschieht dies durch die Produktion von Angiogenesefaktoren (Folkman 2002).

Den stärksten Induktor der Neoangiogenese stellt der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) dar (Kerbel 2008).

Studien assoziieren die VEGF-Expression mit der Prognose des HNSCC und weiterhin mit der Entwicklung von Lymphknotenmetastasen. Somit lässt sich eine Verbindung zwischen der VEGF-Expression und dem Outcome der Patienten vermuten. Allerdings ist hierbei ebenfalls tiefergehende Forschung nötig, um gezielte Therapien oder diagnostische Möglichkeiten zu entwickeln (Leemans, Braakhuis et al. 2011).

Bekannt ist auch der Einfluss von HPV-16 und seine Assoziation zur Onkogenese von Malignomen seit den 70er Jahren. Orale Plattenepithelkarzinome werden zu 20-25% durch HPV verursacht. Es handelt sich um einen Doppelstrang-DNA-Virus, welcher eine Hauptursache für einige Karzinomentitäten, unter anderem für das Cervixkarzinom darstellt (Walboomers, Jacobs et al. 1999, zur Hausen 2002, Leemans, Braakhuis et al. 2011). Es gibt mehr als 100 HPV-Subtypen, von denen sich einige als Hochrisikotypen herausstellten. Die Entstehung eines oralen Plattenepithelkarzinoms wird durch die Hochrisikoform Typ 16 begünstigt (Fakhry and Gillison 2006, Neufcoeur, Arafa et al. 2009).

Das Virus beinhaltet zwei Onkogene, E6 und E7, welche für die Inaktivierung von

p53 und das Retinoblastomgen verantwortlich sind. Sie führen so zu einer Störung des Zellzyklus, was den Anfang der HPV-assoziierten Karzinogenese darstellt (zur Hausen 2002, Leemans, J M Braakhuis et al. 2011). Weitere virusinduzierte genetische Veränderungen werden vermutet (Chung and Gillison 2009).

Es konnte gezeigt werden, dass HPV-16 in direkter Assoziation mit Kopf-Hals-Karzinomen steht und dass diese Karzinome mit einem besseren klinischen Outcome assoziiert sind (Gillison, Koch et al. 2000, Leemans, Braakhuis et al. 2011)

Gängige Tumormarker für die Untersuchung der Zellproliferation sind Ki-67 und p53.

Dem Protein Ki-67 wird eine Assoziation zu verschiedenen Karzinomentitäten zugeschrieben und konnte in unterschiedlichen Studien als prognostischer Marker identifiziert werden.

Ki-67 hat einen Einfluss auf das Zellwachstum und der Zellproliferation und wird in pathologischen Routineuntersuchungen als Proliferationsmarker verwendet.

Doch auch wenn Ki-67 eine Rolle als mögliches Zielprotein im Rahmen der Karzinomtherapie zugeschrieben wird und mit dem Risiko einer gesteigerten Karzinomprogression in Verbindung steht, zeigte sich, dass es im Rahmen des oralen Plattenepithelkarzinoms zu heterogen exprimiert wird, um sich klinisch durchsetzen zu können (Li 2015).

p53 ist ein Tumorsuppressorgen und beteiligt an Prozessen, wie der Zellzykluskontrolle, Apoptose und dem Erhalt der genetischen Stabilität (Rivera and Venegas 2014). Zudem sind Mutationen im Gen p53 in mehr als 50% der oralen Plattenepithelkarzinome nachgewiesen (van Houten, Tabor et al. 2002, Rivera and Venegas 2014).

Doch nicht nur die veränderte Expression einzelner Signalwege und Proteine trägt zu dem Prozess der Onkogenese bei. Vielmehr handelt es sich hierbei um

einen dynamischen Prozess zwischen intra- und interzellulären Prozessen. Die Tumorzellen verändern auch ihre Interaktion mit dem Stroma.

Ein Hauptcharakteristikum maligner Tumorzellen stellt die Infiltration des umliegenden Gewebes dar. Dieser Prozess basiert auf der Fähigkeit der entarteten Zellen, die extrazelluläre Matrix und die Basalmembran (BM) zwischen Endothel und Lamina propria zu zerstören, damit der Tumor sich ausbreiten und metastasieren kann.

Zunehmend erlangt man die Erkenntnis, dass die Tumorgenese und -progression nicht nur als zellautonomer Prozess determiniert ist, sondern auch durch ein geschwächtes Umfeld des Tumors - Tumor Microenvironment (TME) - begünstigt wird (Zhang and Liu 2013, Rivera and Venegas 2014).

Das TME beinhaltet zahlreiche Zellen, wie zum Beispiel Fibroblasten, Karzinom-Assoziierten Fibroblasten (CAFs), Endothelzellen, Makrophagen oder dendritische Zellen.

Für eine effektive Tumorkontrolle ist es daher notwendig, den Prozess als einen Komplex mit heterotypen multizellulären Interaktionen zwischen dem neu gebildeten und dem vorbestehenden Gewebe und somit als eine systemische Erkrankung zu betrachten.

Bis dato konnten keine spezifischen karzinom-assoziierten Gene ermittelt werden, welche in den Prozess der Invasion und Metastasierung des oralen Plattenepithelkarzinoms involviert sind und als diagnostische oder therapeutische Methode fungieren könnten (Leemans, J M Braakhuis et al. 2011). Allerdings konnte nachgewiesen werden, dass die Metastasierung unter anderem durch biologische Reize und Expressionsmuster verschiedener Faktoren vorangetrieben wird. Somit kann ein spezifisches Expressionsmuster im Primärtumor auf eine mögliche Metastasierung hinweisend sein (Roepman, Wessels et al. 2005). Dies legt die Vermutung nahe, dass die Remodellierung bestimmter Chromatine möglicherweise die frühe Metastasierung vorantreibt (Leemans, J M Braakhuis et al. 2011).

Hierbei bietet der Prozess der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) ein neues Forschungsfeld, welches im Zentrum dieser Arbeit steht (Heerboth, Housman et al. 2015). Auf diesen Prozess wird im Verlauf näher eingegangen.

Die heterogenen Ansatzpunkte in der Wissenschaft unterstreichen die Schwierigkeit, einzelne Proteine oder Prozesse als Hauptansatzpunkt zu determinieren. Vor allem molekulare zielgerichtete Therapien könnten bei dem oralen Plattenepithelkarzinom in Zukunft Relevanz erlangen. Möglich wäre ebenfalls die Anwendung von monoklonalen Antikörpern oder auch spezielle Gentherapien, welche nicht nur den Tumor gezielter angreifen, sondern auch die Nebeneffekte auf gesunde Körperzellen vermindern könnten (Markopoulos 2012).

Für die Identifizierung neuer Tumormarker und Therapieansätze bedarf es allerdings einem genaueren Verständnis molekularer Prozesse der verschiedenen Erkrankungsstufen (Schmezer and Plass 2008).

2.4. Die Rolle des Prozesses der EMT im Rahmen der Kanzerogenese

Die Karzinogenese, Tumorinvasion oder auch Metastasierung sind stark assoziiert mit molekularbiologischen Alterationen. Wichtig hierbei sind unter anderem spezifisch veränderte Proteinexpressionsmuster der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) (Thiery 2002, Chung, Parker et al. 2006).

Bei der EMT handelt es sich um einen biologischen Prozess, welcher eigentlich mit der Embryogenese assoziiert ist und während der Zelldifferenzierung unterdrückt wird. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass diese Mechanismen im Rahmen der Karzinogenese reaktiviert werden können.

Eine wichtige Erkenntnis der EMT ist, dass Zellen nicht nur die Möglichkeit der Zelldifferenzierung besitzen, sondern auch der Zell(de-)differenzierung. Sie besitzen die Fähigkeit, von einem epithelialen zu einem mesenchymalen Phänotyp zu wechseln (Abb. 2).

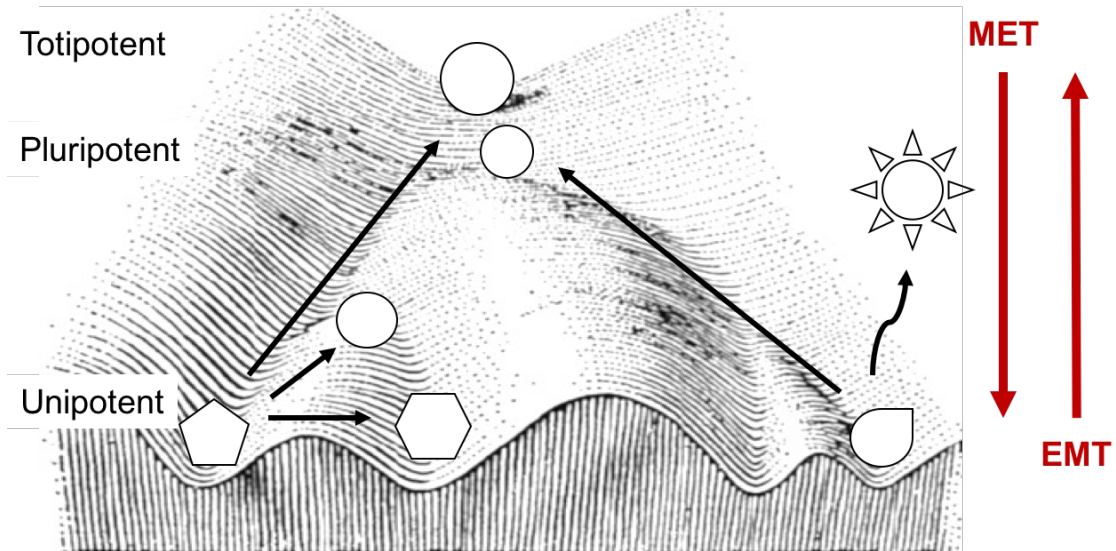


Abbildung 2: ‚Epigenetic landscape‘ und der Prozess der EMT.

Abbildung angelehnt an Conrad Hal Waddingtons Darstellung der zellulären Differenzierung. Dargestellt werden die unterschiedlichen Wege, welche eine Zelle im Rahmen ihrer Differenzierung einnimmt. Der Prozess der EMT beschreibt, dass Zellen nicht nur die Möglichkeit besitzen, sich nur unidirektional zu differenzieren. Vielmehr besitzen sie die Fähigkeit, sich ebenfalls zu dedifferenzieren und somit stammzellähnlichere Charakteristika einzunehmen. Eine zentrale Rolle hierbei nimmt die epigenetische Regulation der Genexpression ein. Im Verlauf wird auf epigenetische Regulationsmechanismen genauer eingegangen (Yamanaka 2009, Aranda-Anzaldo and Dent 2018).

Der Prozess der EMT steht im Kontext der Onkogenese in enger Assoziation zu Invasion und Metastasierung von Karzinomzellen, da differenzierte Epithelzellen kaum Möglichkeiten besitzen von ihrem Ursprungsgewebe zu dissoziieren, die Basalmembran zu durchbrechen und frei zu migrieren. Karzinomzellen, welche den Prozess der EMT durchlaufen haben, besitzen einen mesenchymaleren Charakter und haben die Möglichkeit von ihrem Primärtumor mit Zellen des Stromas zu interagieren und somit in das umliegende Gewebe zu migrieren (Weinberg 2007, Fu, Qin et al. 2011).

Die EMT wird mit einem späten Tumorstadium, der Progression und Metastasierung assoziiert (Boyer, Valles et al. 2000). In Studien zeigte sich, dass das Vorhandensein von EMT bei Kopf-Hals-Karzinomen mit schlechteren Prognosemarkern zusammenhängt (Chung, Parker et al. 2004, Chung, Parker et al. 2006)

Besonders in frühen Stadien der Metastasierung durchlaufen einige epitheliale Tumorzellen den Prozess der EMT. Dieser ist charakterisiert durch den Verlust epithelialer Polarität und Differenzierungsmarker wie E-Cadherin und β -Catenin und weiterhin durch den Gewinn an mesenchymalen Markern, wie N-Cadherin, Fibronectin und Vimentin, welche normalerweise von Zellen mesodermaler Herkunft exprimiert werden (Weinberg 2007) (Abb. 3).

Während der EMT nehmen vor allem die Integrine eine wichtige Position ein, was auf einen Einfluss dieser auf Migration und Invasion von Karzinomzellen vermuten lässt. Besonders dem Integrin $\alpha v \beta 6$ wird eine große Bedeutung zugeschrieben, auf welches im Verlauf genauer eingegangen wird.

Integrine beeinflussen die Zell-Zell-Interaktion über die Bindung an spezielle Proteine, welche der Karzinogenese Vorschub leisten. Vor allem ist hierbei der *transforming growth factor* β (TGF- β) zu nennen. Ihm wird sowohl eine anti-, als auch eine pro-onkogene Wirkung zugeschrieben.

Diese variiert je nach Zelltyp und dem Kontext der Karzinomzellen.

Zusätzlich zur veränderten Oberflächenstruktur der Zellen beinhaltet der Prozess der Dedifferenzierung eine Remodellierung der Chromatinstruktur, um Stammzellmarker wie Sox2, Oct4 und Nanog zu reaktivieren.

Der Prozess der Chromatinremodellierung umfasst ebenfalls Veränderungen auf epigenetischer Ebene. Epigenetische Veränderungen regulieren die Genexpression ohne die DNA Sequenzen zu verändern (Shaw 2006). Somit können sie unter anderem Tumorsuppressorgene herunterregulieren oder Protoonkogene verstärken.

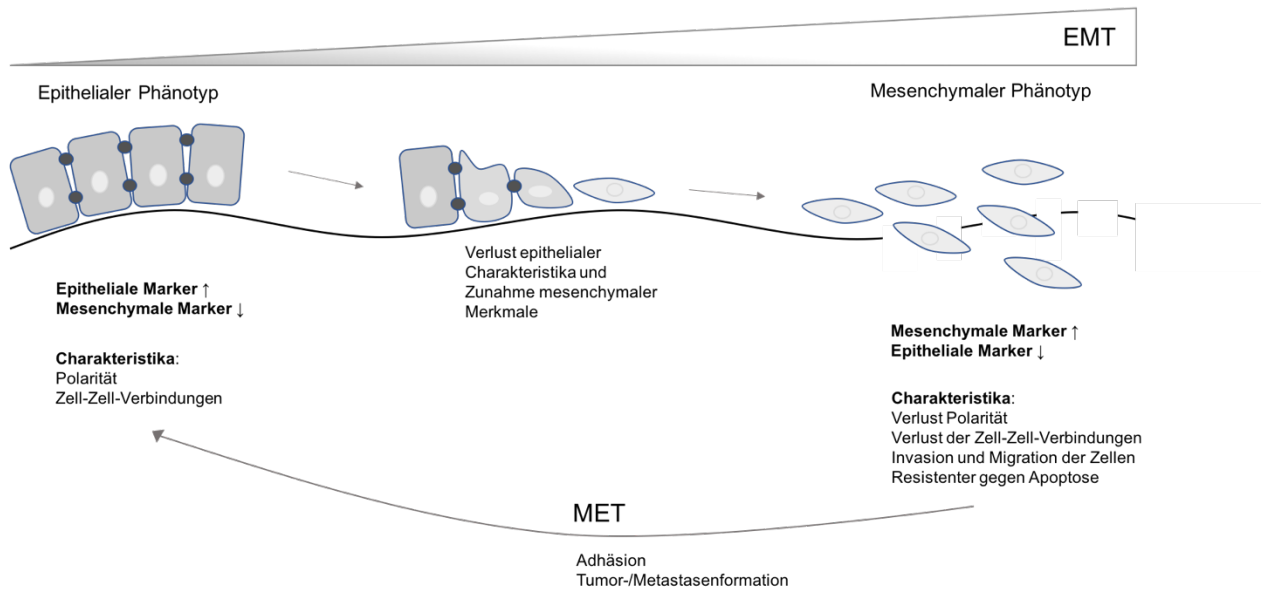


Abbildung 3: Prozess der EMT: Die EMT beinhaltet den Übergang polarer Epithelzellen in Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften. Während dieser Entwicklung verlieren die Zellen ihre epithelialen Charakteristika, ihre Zellkontakte, sowie epithelialen Marker (z.B. E-Cadherin) und gewinnen an mesenchymalen Merkmalen. Durch diesen Prozess können sie die Basalmembran überschreiten und migrieren. In ihrem Zielgebiet können sie über den umgekehrten Mechanismus ihre epithelialen Charakteristika wiedererlangen und unter anderem für Metastasen verantwortlich sein. (Adaptiert nach (Kalluri and Weinberg 2009))

2.4.1. Integrine und TGF- β im Kontext der EMT

Die Zelladhäsions- und Signalrezeptoren der Integrine haben einen Einfluss auf das korrekte Funktionieren individueller Zellen.

Sie sind ein wichtiger Mediator im Rahmen der Adhäsion zwischen der Zelle und ihrer Umgebung und der Zell-Zell-Kommunikation (Bandyopadhyay and Raghavan 2009).

Integrine sind heterodimere transmembranäre Glykoproteine, welche aus einer alpha- und einer beta-Untereinheit bestehen. Sie führen wichtige regulatorische Funktionen im Rahmen der Zelladhäsion, Migration/Invasion, Proliferation, dem Überleben und der Apoptose aus und spielen eine wichtige Rolle im Rahmen der EMT. Weiterhin sind sie in der Lage, bidirektional zu signalisieren und somit einen Austausch zwischen der extrazellulären Matrix und intrazellulären Molekülen zu ermöglichen (Calderwood 2004, Zhu, Zhu et al. 2013).

Integrine bilden eine Familie von Transmembranrezeptoren, welche extrazellulär an die extrazelluläre Matrix binden und intrazellulär ans Zytoskelett und somit die extrazelluläre Umgebung mit dem Zellinneren verbinden (Hynes 2002, Margadant and Sonnenberg 2010). Sie vermitteln so Zelladhäsion und Zellvermehrung/-verteilung, sowie Migration, Proliferation, Differenzierung und Remodellierung der extrazellulären Matrix (Margadant and Sonnenberg 2010). Sie haben Einfluss auf die Onkogenese verschiedener Karzinomentitäten und stehen im Zusammenhang mit einer gesteigerten Invasivität, was auf eine Assoziation zur Karzinogenese und Metastasierung schließen lässt (Sipos, Hahn et al. 2004, Hecht, Dolinski et al. 2008, Yang, Xu et al. 2008, Bandyopadhyay and Raghavan 2009).

Ein wichtiges Markerprotein im Rahmen der EMT stellt das Integrin $\alpha v \beta 6$ dar. Integrin $\alpha v \beta 6$ ist ein epithelspezifisches Integrin, welches einen Rezeptor für die extrazelluläre Matrixproteine Fibronectin (FN), Vitronectin (VN), Tenascin (TNC) und *latency associated protein* (LAP) des TGF- β bildet. In physiologischem adultem Epithelgewebe wird es nicht exprimiert, allerdings zeigte sich, dass es während des Prozesses der Wundheilung und Tumorgenese hochreguliert ist. Es konnte nachgewiesen werden, dass das Integrin $\alpha v \beta 6$ die Invasion moduliert, das Zellwachstum reguliert, Apoptose inhibiert, das invasive Wachstum und das Zellüberleben beeinflusst, die Expression der MMPs reguliert und TGF- $\beta 1$ aktiviert. In verschiedenen Untersuchungen zeigte sich, dass $\alpha v \beta 6$ die Karzinomprogression fördert. Eine gesteigerte Expression von $\alpha v \beta 6$ konnte in zahlreichen Karzinomen bereits bestätigt werden, wie zum Beispiel beim

Endometriumkarzinom, Basalzellkarzinom, Colonkarzinom, oder auch dem oralen Plattenepithelkarzinom (Bandyopadhyay and Raghavan 2009).

Damit $\alpha v \beta 6$ im Rahmen der klinischen Diagnostik oder für therapeutische Ansätze fungieren kann, bedarf es genauerer Untersuchungen über seine Wirkweise im Kontext der Onkogenese oraler Plattenepithelkarzinome.

Durch die Veränderungen der Oberflächenstrukturen der Zellen durch verschiedene Integrin-Expressionsprofile können die Zellen unterschiedlich auf Wachstumsreize und andere Faktoren, wie TGF- β reagieren und so Faktoren der Zelldifferenzierung und Karzinomproliferation exprimieren.

So kann beispielsweise $\alpha v \beta 6$ die inaktive Form von TGF- β (LAP) aktivieren, welches wiederum einen Anreiz zu dem Prozess der EMT liefert.

Im Rahmen der Aktivierung des pro-TGF- $\beta 1$ binden Integrine an die Prodomäne und setzen den TGF- β Wachstumsfaktor frei. In der Arbeit von Dong und Kollegen aus dem Jahr 2017 wird dieser Prozess beschrieben (Dong, Zhao et al. 2017).

TGF- β ist ein Zytokin und gehört zur Gruppe der *transforming-growth-factors*. Es ist ein Teil einer Wachstumsfaktorenfamilie, welche Zellwachstum, Adhäsion, Migration und Synthese und Apoptose der extrazellulären Matrix moduliert und ist unter anderem während der Embryogenese von großer Relevanz (Abb. 4) (Massague 1998, Rognoni 2014). Freies TGF- β bindet an seinen hoch affinen Rezeptor, welcher die Phosphorylierung von SMAD2/3 induziert und einen Komplex mit SMAD4 bildet, um in den Nukleus zu translozieren. Dort interagiert es mit zahlreichen Co-Aktivatoren und Repressoren und beeinflusst die Genexpression von z.B. Kollagenen. Über einen SMAD-unabhängigen Weg beeinflusst es neben weiteren Wegen die EMT. Es zeigt eine hohe Abhängigkeit von zellulärem Kontext und eine große Multifunktionalität: z.B. kann es Zellproliferation in Epithelzellen inhibieren, aber in Fibroblasten und Endothelzellen das Zellwachstum steigern (Guasch, Schober et al. 2007, Xiao, Du et al. 2012, Rognoni 2014). Weiterhin ist es für die Regulation von Zielgenen verantwortlich und hat einen Einfluss auf die Proteinsynthese, Zelladhäsion,

Proteinphosphorylierung oder auch Gentranskription. Es kann die Pluripotenz von Stammzellen und die Differenzierung anderer Zellen verstärken (Park 2011). In Karzinomzellen kann es prä-maligne Formen unterdrücken, aber gleichzeitig eine Konversion zum metastasierenden Typ fördern (Chaudhury and Howe 2009).

Oftmals wurde eine Herunterregulierung von TGF- β 1 beobachtet (Wang, Song et al. 1997, Huntley, Davies et al. 2004, Leemans, J M Braakhuis et al. 2011). Diese Herunterregulierung ist vermutlich mit dem Verlust des Chromosoms 18q assoziiert, welches SMAD2,3,4 und TGF- β 2 beinhaltet (Leemans, J M Braakhuis et al. 2011).

Der TGF- β Signalweg ist somit im Rahmen der Kanzerogenese von großer Bedeutung (Ikushima and Miyazono 2010, Leemans, Braakhuis et al. 2011). Allerdings ist die genaue Funktion von TGF- β im Rahmen der Kanzerogenese bislang noch sehr kontrovers beschrieben.

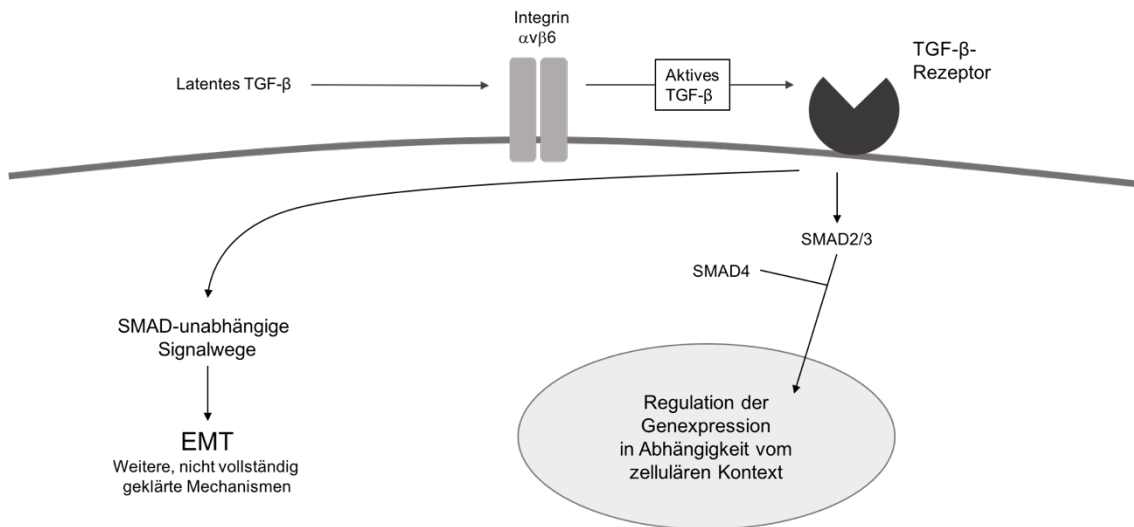


Abbildung 4: Wachstumsfaktor TGF- β : TGF- β ist ein wichtiger Bestandteil im Rahmen der Regulierung zellulärer Funktionen. Es steht im Zusammenhang mit der zellulären Differenzierung, Proliferation, Migration, Apoptose, Adhäsion, Angiogenese, Immunantwort und dem zellulären Überleben. Die Funktionen von TGF- β stehen in Abhängigkeit vom zellulären Kontext. Ihm wird sowohl pro- als auch anti-onkogenes Potential zugeschrieben. Im Rahmen der Kanzerogenese könnte TGF- β als möglicher prädiktiver Marker oder auch als Zielstruktur für diagnostische oder therapeutische Möglichkeiten dienen. Dies bedarf allerdings des genauen Verständnisses seines Wirkungsprofils in Abhängigkeit von der Tumorentität.

2.4.2. Sox2 im Rahmen der EMT

Eine weitere wichtige Funktion im Rahmen der zellulären (De-)Differenzierung und Reprogrammierung während der EMT wird dem Stammzellfaktor Sox2 (sex-determining region of Y) zugeschrieben (Takahashi and Yamanaka 2006, Weina and Utikal 2014).

Sox2 stellt einen Transkriptionsfaktor dar, welcher eine *high-mobility* Domäne (HMG) enthält, die DNA bindet. Sox2 kann als Aktivator oder Suppressor der Gentranskription wirken (Weina and Utikal 2014).

Derzeit bestehen unterschiedliche Theorien zum Einfluss von Sox2 auf das Tumorwachstum und die Metastasierung.

Die Expression des Stammzellfaktors Sox2 soll bei aggressiven Karzinomen reaktiviert sein und einen Indikator für eine gesteigerte Zellproliferation darstellen, welche wichtig für eine gesteigerte Invasivität und Metastasierung ist. Weiterhin ist Sox2 mit einer schlechteren Prognose der Patienten mit einem Kopf-Hals-Karzinom assoziiert und kann somit einen prognostischen Aussagewert einnehmen (Ben-Porath, Thomson et al. 2008).

Eine verstärkte Expression von Sox2 konnte bereits für orale Karzinomzellen und weitere Karzinomentitäten gezeigt werden (Freier, Knoepfle et al. 2010, Weina and Utikal 2014).

Nach Bayo et al. soll eine hohe Sox2 Expression die Tumorzellmotilität inhibieren und somit für eine bessere Prognose sprechen, wohingegen eine niedrige Sox2 Expression mit einer schlechteren Prognose assoziiert sein soll. Nach ihren Studien ist diese allerdings dadurch bedingt, dass Sox2 die Tumorzellmigration inhibiert und eine niedrige Sox2 Expression mit einem erhöhten Therapieversagen zusammenhängt (Bayo, Jou et al. 2015).

Die Rolle des Stammzellfaktors variiert von Karzinomentität zu Karzinomentität. Es fördert beispielsweise die Zellproliferation und das Tumorwachstum des oesophagealen Plattenepithelkarzinoms, wohingegen ihm im Rahmen von Lungenkarzinomen nicht nur eine zellproliferative und wachstumsfördernde Wirkung zugeschrieben wird, sondern auch eine Apoptose inhibierende und Zellüberleben fördernde Wirkung. Seine Wirkung entwickelt Sox2 über verschiedene Signalwege (Weina and Utikal 2014).

Weiterhin interagiert Sox2 mit weiteren Faktoren wie den Stammzellfaktoren Oct3/4 oder auch Nanog und ist im Zusammenspiel mit diesen an der Zelldifferenzierung beteiligt (Takahashi and Yamanaka 2006).

Allerdings ist bis dato der genaue Zusammenhang zwischen Sox2 und dem EMT-assoziierten Integrin $\alpha v \beta 6$ oder auch TGF- β nicht hinreichend geklärt, um klinische Relevanz zu erlangen.

Diese verschiedenen Theorien unterstreichen die Relevanz weiterer Untersuchungen zur Expression von Sox2 im oralen Plattenepithelkarzinom und die Auswirkung auf die Tumorzellmigration.

2.5. Epigenetik des oralen Plattenepithelkarzinoms

Neben genetischen Veränderungen oder externen Noxen gerät die Epigenetik zunehmend in den Fokus der Forschung zur Onkogenese des oralen Plattenepithelkarzinoms (Abb. 5).

Epigenetische Mechanismen umfassen Prozesse wie

- DNA-Methylierung
- Modifikation N-terminaler Histonenden
- veränderte Expression von miRNAs

Epigenetische Modifikationen tragen zu veränderten zellulären Mechanismen in oralen Präkanzerosen und Karzinomen bei (Hema, Smitha et al. 2017).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass epigenetische Regulationsmechanismen Schlüsselgene der Zellproliferation oder –differenzierung beeinflussen können und einen Einflussfaktor im Rahmen der Onkogenese des oralen Plattenepithelkarzinoms spielen.

Diese Erkenntnisse können eine Rolle im Rahmen des Stagings spielen oder auch einen therapeutischen Ansatzpunkt bieten (Shaw 2006).

Die *DNA-Methylierung* hat Einfluss auf den Prozess der Karzinogenese. Man versteht unter DNA-Methylierung die chemische Kopplung von Methylgruppen an bestimmte DNA-Nukleotide. Es können hierdurch bestimmte Gene inaktiviert oder auch aktiviert werden.

Die DNA-Hypomethylierung trägt zur Tumorgenese über verschiedene Mechanismen bei.

Zum einen wird eine chromosomale Instabilität über die Demethylierung von repetitiven DNA-Elementen erzeugt. Zum anderen können Protoonkogene über zufällige Demethylierung einiger stummer Promoterregionen reaktiviert werden. Weiterhin entstehen über DNA-Methylierung Imprinting-Defekte, welche zur Karzinogenese beitragen.

Der Prozess der Promoter-Hypermethylierung ist ein weiterer zentraler Faktor der Tumorgenese. Hierdurch wird die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die Promoterregion von Tumorsuppressoren gehemmt, was dazu führt, dass diese herunterreguliert werden (Gasche and Goel 2012).

Die *Histonmodifikationen* stellen einen weiteren Hauptaspekt der Onkogenese des oralen Plattenepithelkarzinoms dar. Diese epigenetischen Veränderungen finden meist am N-terminalen Ende innerhalb der vier Histonkomplexe H3, H4, H2A und H2B statt. Sie können auch an den C-terminalen Enden oder innerhalb des Nukleosomen-Kerns gefunden werden. Veränderungen der Histonstruktur beeinflussen die Kondensation des Chromatins und somit die Chromatinstruktur und die Transkription. Die Modifikationen umfassen Methylierung, Acetylierung, Ribosylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung und Sumoylierung spezifischer Anschnitte der Histonschwänze. Generell sind diese Prozesse reversibel und modifizieren die Tertiärstruktur der DNA. Heterochromatin wird häufig im Rahmen von neoplastischen Zellen beobachtet. Euchromatin eher bei normalen und gesunden Zellen. Die Histonmodifizierungen stehen in engem Zusammenhang mit der DNA-Methylierung, besonders beim Gen-Silencing von Tumorsuppressoren, was zu einer gesteigerten Tumorgenese führt (Gasche and Goel 2012).

Die *miRNAs* stellen eine Hauptgruppe an Regulatoren der epigenetischen Genexpression dar. miRNAs sind kleine RNA-Moleküle mit wichtigen regulatorischen Funktionen. Sie beeinflussen die Genexpression auf einer posttranskriptionellen Ebene, inhibieren die Proteinbildung durch fehlerhafte Regulation von miRNA-Ziel-Genen. Die miRNAs stellen ein relativ neues Feld der onkologischen Forschung dar. Dennoch wird ein Einfluss auf die

Onkogenese des oralen Plattenepithelkarzinoms vermutet (Gasche and Goel 2012).

Diese Prozesse tragen zur Remodellierung der Chromatinstruktur bei. Kontrolliert wird dieser durch verschiedene Proteine, unter anderem Histondeacetylasen (HDACs) oder ATPasen, welche in Proteinkomplexen organisiert sind.

Einen Hauptkomplex der epigenetischen Genregulation im Rahmen der EMT stellt der Nukleosomen-Remodellierungs und Deacetylase-Komplex (NuRD) dar. Er reguliert die Genexpression auf Chromatinebene (Lai and Wade 2011).

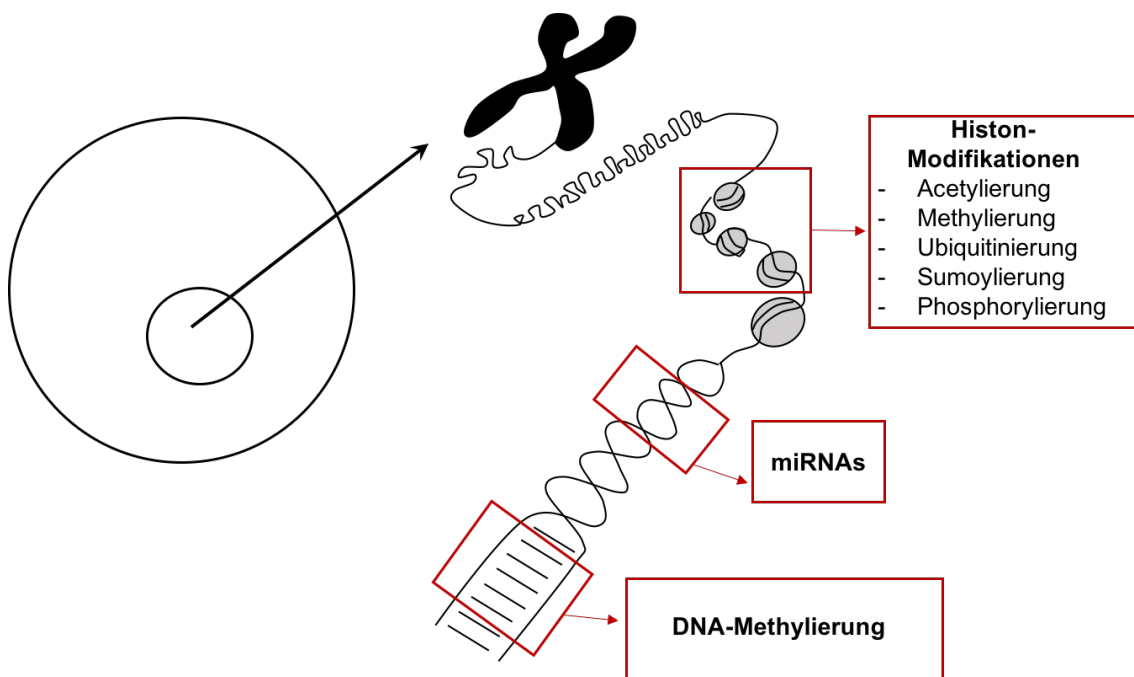


Abbildung 5: Epigenetische Mechanismen beeinflussen die Chromatinstruktur durch reversible Modifikationen. Die drei Hauptmechanismen umfassen Histonmodifikationen, DNA-Methylierung oder auch die miRNAs.

2.5.1. Die ATPase CHD4 des NuRD-Komplexes im Kontext der Onkogenese

Der Prozess der Chromatinremodellierung ist ein wichtiger Teil der Invasion und Metastasierung des oralen Plattenepithelkarzinoms.

Er wird durch chromatin-modifizierende Proteine, wie z.B. ATPasen vorangetrieben, welche in Komplexen aus mehreren Proteinen organisiert sind.

Ein Hauptproteinkomplex im Rahmen transkriptioneller Prozesse der EMT spielt der NuRD-Komplex (Lai and Wade 2011, dos Santos, Tosti et al. 2014) (Abb. 6). Er beinhaltet zwei wesentliche funktionelle Untereinheiten und verbindet die Histondeacetylase (HDAC) und chromatin-remodellierende-ATPase Aktivitäten über die Histondeacetylase (HDAC 1/2) und die ATPase CHD4 (*Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 4*) (Denslow and Wade 2007).

Wie und ob der NuRD-Komplex zum Prozess der Tumorgenese beiträgt ist abhängig vom jeweiligen Zelltyp. Weiterhin zeigte sich, dass die Umgebung und das transkriptionelle Programm des jeweiligen Zelltyps zur Erscheinungsform des NuRD-Komplexes beiträgt und seine Aktivität modifiziert (Lai and Wade 2011).

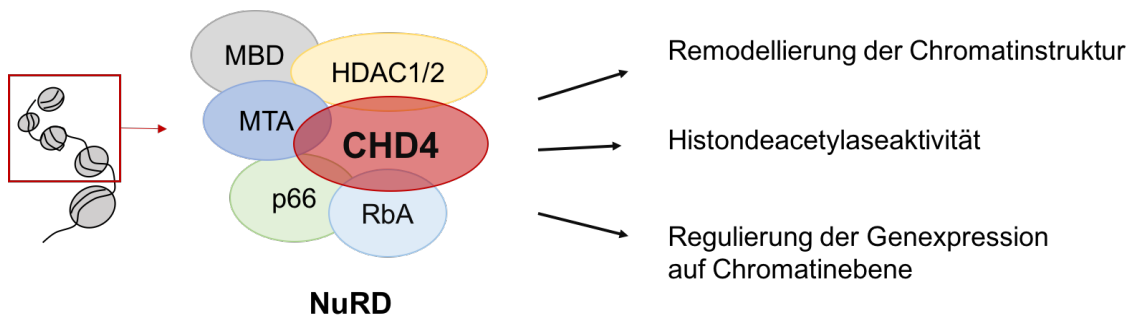


Abbildung 6: Abbildung des NuRD-Komplexes. Der NuRD-Komplex besteht aus 7 Untereinheiten: HDAC1/2, RbAp46/48, MTA, MBD, CHD3 und CHD4.

Die Erstbeschreibung der ATPase Untereinheit CHD4 des NuRD-Komplexes erfolgte im Rahmen von Untersuchungen zur Dermatomyositis (Seelig, Moosbrugger et al. 1995). Im Rahmen dieser Autoimmunerkrankung stellt CHD4

ein wichtiges Autoantigen dar (Zhang, LeRoy et al. 1998). Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit Dermatomyositis eine erhöhte Rate an malignen Tumoren aufweisen und ein Zusammenhang zu CHD4 besteht (Zhang, LeRoy et al. 1998). Häufigste maligne Tumore, welche in diesem Kontext assoziiert sind, sind das Ovarialkarzinom, Lungenkarzinom, Pankreaskarzinom, Colonkarzinom oder auch Lymphome (Hill, Zhang et al. 2001).

Die ATPase Aktivität von CHD4 wird durch Chromatin, allerdings nicht durch freie DNA oder Histone stimuliert (Denslow and Wade 2007). Die kombinierte Aktivität von HDAC und ATPase im NuRD-Komplex führt über die Bildung dicht gepackter, hypoacetylierter Nukleosomen zum *Gene silencing* (Denslow and Wade 2007). Weiterhin beinhaltet der NuRD-Komplex metastasierungs-assoziierte Proteingruppenbestandteile wie MTA1, MTA2 oder MTA3 (Denslow and Wade 2007). Diese modifizieren die funktionelle Spezifität des NuRD-Komplexes in Bezug auf seine Signalwege und molekularen Ziele (Fu, Qin et al. 2011).

Es konnte gezeigt werden, dass die Hauptkomponente des NuRD-Komplexes mit MTA2, RbAp46, Mi2 β und HDAC2 komplexiert ist. Weiterhin sind diese Komponenten essentiell für die NuRD-assoziierte Repression von E-Cadherin und Tumorzellmigration, Invasion und Metastasierung (Fu, Qin et al. 2011).

2.6. Ziel und Fragestellung

Die zugrundeliegende Fragestellung dieser Arbeit war, welche Faktoren den Stammzellcharakter von Karzinomzellen beeinflussen.

Hintergrund der Arbeit ist, dass trotz diagnostischer und therapeutischer Fortschritte in den letzten Jahrzehnten keine wesentliche Verbesserung hinsichtlich der Prognose für Patienten mit oralem Plattenepithelkarzinom erzielt wurde. Auch bei interdisziplinären Therapieansätzen sind invasiv und metastasierend wachsende Karzinomzellen häufig prognoselimitierend.

Molekulare Mechanismen beeinflussen die Karzinogenese und das

Invasionsverhalten oraler Karzinomzellen. Diese Prozesse, welche mit einem Fortschreiten der Erkrankung verbunden sind, sind weitestgehend ungeklärt. Daher gerät die Charakterisierung epigenetischer Einflussfaktoren zunehmend in das Zentrum onkologischer Forschung.

Die Identifikation der epigenetischen Regulationsmechanismen könnte der Entwicklung diagnostischer und therapeutischer Ansätze dienen.

Ziel der Arbeit war es, epigenetische Regulationsmechanismen des oralen Plattenepithelkarzinoms zu identifizieren und deren Einfluss auf das Invasions- und Migrationsverhalten der Karzinomzellen zu untersuchen.

Insbesondere wird hierbei auf folgende Aspekte ein Augenmerk gelegt:

- Die Rolle von CHD4/NuRD mittels CHD4 Überexpression in oralen Karzinomzellen zu identifizieren und den Einfluss auf die Expression des EMT-Markerproteins Integrin $\alpha v \beta 6$ und somit auf das Invasions- und Migrationsverhalten zu untersuchen
- Den Einfluss von TGF- β und dem extrazelluläre Matrixprotein Fibronectin auf CHD4-überexprimierende Zellen zu untersuchen und den Einfluss auf die Expression des Integrin $\alpha v \beta 6$ zu analysieren, um funktionelle Konsequenzen für das Invasionsverhalten oraler Plattenepithelkarzinomzellen abzugrenzen
- Den Einfluss der ATPase-Untereinheit CHD4 auf die Expression von Sox2 zu untersuchen

3. Material und Methoden

Ein Ethikvotum der Ethikkommission der Technischen Universität München für diese Studie liegt vor (Referenznummer: 571/16 s)

3.1. Allgemeine Ausstattung

3.1.1. Laborausstattung und Verbrauchsmaterialien

Allgemeine Laborausstattung und Materialien

Minispin Plus Zentrifuge, Eppendorf, Hamburg

Pipetten (10, 20, 100, 200, 1000 μ l), (Research Plus; Reference), Eppendorf, Hamburg

VortexGenie2T, Scientific Industries, Bohemia, New York, USA

Waage (Extend), Sartorius, Göttingen

DNA LoBind Tubes (1,5; 2ml), Eppendorf, Hamburg

Cellstar® Tubes (15, 50ml), Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich

Superfrost Plus® Gläser, Menzel GmbH, Braunschweig

Für Zellkultur, Transfektion und Stimulationsexperimente

Inkubator, Heracell 150i, Thermo Scientific Function Line, Firma Heaeus, Hanau

Mikroskop, Nikon, Melville, NY, USA

Wasserbad (Typ 1003), Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel

Sterile Bench (HeraSafe), Kendro, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Pipettierhilfe, elektrisch, Easypet 3, Eppendorf, Hamburg

Well-Platten (6, 24, 96 well), Fisher Scientific, Thermo Fisher Scientific, Waltham,

Massachusetts, USA

Pipettenspitzen für elektrische Pipette, Falcon™, Fisher Scientific, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Für die Immunfluoreszenzzytologie

Laser-Mikroskop Zeiss LSM 700, Zeiss, Jena

Nunc® Lab-Tek® Chamber Slide™ System, Sigma-Aldrich, ST.Louis, Missouri, USA

Deckgläser, Thermo Scientific®, Firma Menzel Gläser GmbH, Braunschweig

Für die Expressionsanalyse von Nukleinsäuren

BioPhotometerPlus, Eppendorf, Hamburg

LightCycler® Caroussel Centrifuge, Roche, Mannheim

LightCycler® Instrument, Roche, Mannheim

LightCycler® Capillaries, Roche, Mannheim

Pipettierhilfe (LightCycler® Centrifuge Adapters), Roche, Mannheim

Sterile PCR-Hood (auraPCR), Bioair, Euroclone, Pero, Italien

Ultraaschallhomogenisator (Sonopuls), Bandelin, Berlin

Küvetten Photometer

Für den Western Blot

ELISA Reader

Trans-Blot® Turbo™ Transfer System, Bio Rad, Hercules, Kalifornien, USA

Western Blot Tank (PerfectBlue™ Doppel-Gelsystem Twin S), Peqlab

Biotechnology GmbH, Erlangen

Für die Migrations- und Invasionsassays

Transwell Inserts, Sigma-Aldrich, ST. Louis, Missouri, USA

DAPI for nuclei acid staining, Sigma-Aldrich, ST Louis Missouri, USA

3.1.2. Allgemeine Chemikalien, Puffer, Lösungen

Puffer und Lösungen

Phosphat Buffered Saline (PBS (1x)), Gibco, LifeTechnologies™, Carlsbad, California, USA

TBST: 900ml Aqua dest.

1ml TWEEN

100ml 10-fach TBS: 87,7g NaCl, Sigma-Aldrich, ST. Louis, Missouri, USA

500ml 1M Tris HCl pH 8,0, Thermo Fisher, Waltham,

Massachusetts, USA

ad 1 Liter H₂O

TGS Laufpuffer 10-fach:

144g Glycin, Sigma-Aldrich, ST. Louis, Missouri, USA

30g Tris, Merck, Darmstadt, Germany

10g SDS, Merck, Darmstadt, Germany

ad 1 Liter H₂O

Kits und spezielle Reagenzien für die jeweilige Methode werden innerhalb der einzelnen Abschnitte angegeben.

3.2. Immunhistochemie

Reagenzien für die Immunhistochemie

Bovines Serum Albumin (BSA), Sigma-Aldrich, ST. Louis, Missouri, USA
Streptavidin Vectastain-Kit, Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA

Primärantikörper:

Anti- $\alpha\beta6$ Integrin monoklonaler Antikörper Klon #6,2A

Konzentration: 1,67mg/ml

Verdünnung:

Hersteller: BiogenIdec, Paul Weinreb (Weinreb et al., 2004)

Anti-CHD4 3F2/4

Konzentration: 0,5mg/ml

Verdünnung: 1:5000

Hersteller: Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich

Anti-Sox2 antibody (ab92494)

Konzentration: 0,2mg/ml

Verdünnung: 1:2000

Hersteller: Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich

Sekundärantikörper:

biotinylierter anti-mouse IgG Antikörper

Verdünnung: 1:200

Hersteller: Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA

Biotinylierter anti-rabbit IgG Antikörper

Verdünnung: 1:200

Hersteller: Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA

Die Immunhistochemie dient dazu, Proteine in histologischen Schnitten darzustellen. Das Gewebe für die immunhistochemischen Untersuchungen stammt aus intraoperativ asservierten Karzinomgeweben. Die Gewebeproben wurden mit Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und für histologische Untersuchungen auf Objektträger aufgetragen. Es wurden für jede Untersuchung mindestens 20 histologische Schnitte untersucht. Zur Vorbereitung des histologischen Materials wurden die Gewebeschnitte zunächst für 2 Mal 10min in Xylol entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (Prozentzahlen) und destilliertem Wasser für jeweils 3min rehydriert. Um das Austrocknen der Schnitte zu vermeiden, wurden alle folgenden Schritte in einer feuchten Kammer durchgeführt. Die Antigen-Demaskierung erfolgte mittels Citratpuffer in der Mikrowelle. Anschließend wurde die endogene Peroxidase blockiert, um unspezifische Hintergrundfärbungen zu vermeiden. Dazu wurden die Schnitte für 15min in 3% H₂O₂ getränkt. Es folgte ein Spülschritt (3 Mal 5min). Hierbei wurden die Schnitte für 10min in PBS gespült, um unspezifische Hintergrundfärbungen zu minimieren. Da die Antikörper nicht nur an dem zu untersuchenden Antigen binden, sondern möglicherweise auch an anderen Strukturen, mussten unspezifische Bindungen geblockt werden. Hierzu wurden die Schnitte für 30min mit goat Serum (30µl Serum + 1ml PBS-Puffer) inkubiert. Anschließend wurde die überschüssige Flüssigkeit vollständig vom Objektträger entfernt, ohne den Schnitt zu beschädigen. Nun erfolgte die Applikation des Erstantikörpers. Dieser wurde in entsprechender Konzentration mit PBS verdünnt und auf die Schnitte appliziert. Die Inkubationszeit des Erstantikörpers betrug eine Nacht im Kühlschrank. Am Folgetag wurden die Schnitte zunächst für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur gelagert, bevor die Applikation des Zweitantikörpers erfolgte. Zunächst wurden die histologischen Schnitte für jeweils 5 min dreimalig mit PBS gewaschen. Der Zweitantikörper wurde ebenfalls

in entsprechender Konzentration hinzugegeben und für 1h inkubiert. Es folgte ein Spülschritt (3 Mal 5min PBS). Nun wurde die Streptavidin-Enzym-Komplex-Lösung analog zu den Herstellerangaben appliziert und 45min inkubiert. Es folgte ein weiterer Spülschritt. Abschließend wurden die Schnitte mittels Diaminobenzidin inkubiert und für 5sek mit saurer Hämalaunlösung gegengefärbt.

Nun erfolgte nach 5-minütiger Wässerung die Dehydrierung durch die aufsteigende Alkoholreihe und Xylol. Abschließend worden die Schnitte mit Deckgläsern versiegelt.

Die semiquantitative Analyse der CHD4 und Sox2 Proteinexpression erfolgt mittels konventioneller immunhistologischer Färbung und Auswertung anhand eines modifizierten Remmele Scores.

3.3. Zellbiologische Methoden

3.3.1. Zellkultur

Zellkulturmedien und Reagenzien

Sulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Sigma-Aldrich, ST. Louis, Missouri, USA

Fetales Kälberserum (FCS), Gibco, LifeTechnologies™, Carlsbad, California, USA

Trypsin/EDTA Solution, Sigma-Aldrich, ST. Louis, Missouri, USA

DMSO, Merck, Darmstadt, Germany

I. Für humane Karzinomzellen (HN WT, BHY WT)

- 500ml DMEM Medium inklusive
- 50ml hitzeinaktiviertes FCS (10%)

II. Für transfizierte Zelllinien (HN-CHD4, HN-Sox2, BHY-CHD4, BHY-Sox2) zur Selektion

- 500ml DMEM Medium inklusive
- 50ml hitzeinaktiviertes FCS (20%) und
- 0,25g Genticin G418

III. Einfriermedium

- 80% FCS
- 20% DMSO

Zelllinien

HN:

- *DMSZ no.: ACC 417*
- *Human; orales Plattenepithelkarzinom*
- *Gewonnen aus dem Tumor eines 60-jährigen Japaners mit einem moderat differenzierten Plattenepithelkarzinom des weichen Gaumens. Die Zelllinie wurde aus einer zervikalen Lymphknotenmetastase gewonnen, welche 7 Jahre nach der Therapie des Primärtumors auftraten. Der Patient wies ebenfalls Lungen- und Hirnmetastasen auf*
- *Bezeichnung in der Arbeit: HN WT; transfiziert HN-CHD4 oder HN-Sox2*

3.3.1.1. Kultivierung der Zellen

Für in vitro Analysen werden Zellkulturstudien an Zelllinien des oralen Plattenepithelkarzinoms (HN, BHY) durchgeführt. Beide Zelllinien wurden über das DSMZ bezogen.

Die Zellen weisen einen epithelialen Charakter auf und wachsen adhärent als Monolayer.

Sie wurden im Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Arbeiten mit den Zelllinien wurden unter einer sterilen Arbeitsbank durchgeführt. Diese wurde vor und nach der Benutzung desinfiziert und in regelmäßigen Abständen gereinigt. Des Weiteren wurde das verwendete Zubehör entweder als steril verpackter Einmalartikel gekauft oder vorher in einer Autoklave sterilisiert.

Vor der Benutzung wurden alle Zellkulturmedien und Lösungen im Wasserbad vorgewärmt.

Als Nährmedium wurde Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) verwendet, mit einem Zusatz von 10% hitzeinaktiviertem fetalen Kälberserum (FCS). Vor den Versuchen wurde DMEM ohne FCS Zusatz verwendet, um die Zellen in eine Wachstumsphase zu bringen.

Um die stabile Transfektion aufrechtzuerhalten, wurde dem Nährmedium Genticin G418, in der Konzentration 0,5g/1000ml Medium, zugesetzt (Selektionsmedium).

Das Wachstum der Zellen wurde täglich unter einem Phasenkontrastmikroskop untersucht. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt und die Zellen zuvor mit PBS gewaschen.

Um die Zellen bei einer Konfluenz von 70-80% unter sterilen Bedingungen zu passagieren, wurde Trypsin/EDTA verwendet.

Die Lösung wurde zu den Zellen gegeben und im Anschluss erfolgte eine Inkubation im Brutschrank. Währenddessen wurde die Lösung der Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop kontrolliert.

Die gelösten Zellen wurden abzentrifugiert, in Medium resuspendiert und

anschließend aufgeteilt. Am Folgetag wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Überschüssige Zellen wurden eingefroren. Hierbei wurde die beim Lösen entstandene Zellsuspension nicht in Nährmedium, sondern in Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Anschließend wurden sie zeitnah auf -80°C eingelagert. Zur langfristigen Aufbewahrung wurden sie in flüssigem Stickstoff gelagert.

Um Zellen aus dem Gefrierschrank aufzutauen, wurden die eingefrorenen Zellen kurz bei Raumtemperatur aufgewärmt und vorsichtig ungewärmtes Nährmedium hinzugefügt. Die Suspension wurde aufgenommen und die Zellen in der Zentrifuge abzentrifugiert (1300rpm, 3min, 20°C). Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in frischem Zellkulturmedium resuspendiert und in unbeschichtete Zellkulturflaschen oder Well-Plates überführt.

3.3.1.2. Zellzählung

Um Zellzahlen bestimmen zu können, wurden die Zellen mittels Trypsin gelöst, abzentrifugiert und in 1ml DMEM Medium resuspendiert. Von der Zellsuspension wurden $10\mu\text{l}$ zu $90\mu\text{l}$ Trypanblau hinzugegeben und gemischt. Hiervon wurden $10\mu\text{l}$ in die Neubauer-Zählkammer gegeben und die Zelldichte mit Hilfe eines Mikroskops bestimmt.

Die Berechnung der Zellzahl erfolgte unter Berücksichtigung der ausgezählten Zellen pro Flächeneinheit der Zählkammer und der Verdünnung.

3.3.1.3. Stabile Transfektion von Sox2 und CHD4 in BHY und HN

Spezielle Reagenzien

Genticin (G418), Gibco, LifeTechnologies™, Carlsbad, Kalifornien, USA

Kits

Lipofectamine 3000® Reagent, Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA

Plasmide

*h**CHD4** Plasmid: pCS2+*

Konzentration: 1,82µg/µl

Hersteller: Rupp et Al., Germany

*PLPS-h**Sox2**-gfp*

Konzentration: 1,44µg/µl

Hersteller: Addgene, Cambridge, Massachusetts, USA

Die stabile Transfektion der Sox2 und CHD4 Plasmide erfolgte mit Hilfe des Lipofectamine 3000® Reagents. Dieses Verfahren basiert auf dem Prinzip der Lipofektion. Hierbei wird das genetische Material des Plasmids mit Hilfe von Liposomen in die Zellen eingebracht, indem sie mit der Zellmembran fusionieren. Dazu wurden mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer 300.000 Zellen abgezählt und auf 6-Well-Plates ausgesät. Die Zellen wurden 24h vor der Transfektion mit un-supplementiertem DMEM in eine Phase gebracht. Danach erfolgte die Transfektion mit dem Lipofectamine 3000® Reagent analog des Protokolls aus dem Kit (Abb. 7). Der Ansatz wurde vor Zugabe zu den Zellen 15min bei RT inkubiert.

Um die größtmögliche Transfektionskoeffizienz zu erzielen, wurden verschiedene Konzentrationen an Lipofectamine 3000® Reagent und DNA ausgetestet.

Folgende Ansätze fanden Verwendung:

Ansatz	Lipofectamine	DNA in μg
1	3,75	3
2	7,5	3
3	7,5	5

Tabelle 6: Verwendete Ansätze für die Transfektion

Die Zellen wurden 24h bei 37°C im Zellkulturschrank inkubiert, bevor die Lösung abgenommen und durch Kulturmedium ersetzt wurde. Nach erneutem Erreichen einer Konfluenz von ca. 90% wurde mit der Selektion begonnen. Hierzu wurde zuvor filtriertes Genticin (G418) in der Konzentration 0,5g/L Medium verwendet. Nach Ausbildung mikroskopisch sichtbarer Transfektantennester wurden diese bis zu einer Konfluenz von ca. 85% mit Genticin-haltigem Medium kultiviert und passagiert. Im Anschluss wurde wieder un-supplementiertes Nährmedium verwendet. Die transfizierten Zellen wurden im Anschluss entweder mittels qRT-PCR, IFC, Western Blot oder Migrationsassays weiterverwendet oder eingefroren.

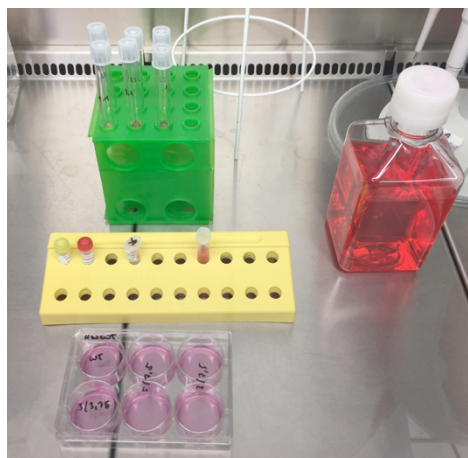


Abbildung 7: Transfektion der Plasmide mittels Lipofectamine 3000® Reagent

3.3.1.4. Stimulation der Kontrollzellen und Transfektanten

Stimulanzen

Active human TGF beta 1

Stock: 5ng/ml

Konzentration: 10 μ l/ml Medium

Hersteller: Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich

Fibronectin

Stock: 10 μ g/ml

Konzentration: 10 μ l/ml Medium

Hersteller: Sigma-Aldrich, ST.Louis, Missouri, USA

Um den Einfluss der Stimulation mit extrazellulären Matrixproteinen und TGF- β auf orale Karzinomzellen untersuchen zu können, wurden die Zellen erneut auf 6-Well-Plates ausgesät und mit TGF- β (5ng/ml) und Fibronectin (10ng/ml) für 24h stimuliert. Dazu wurden die Zellen 24h vor der Stimulation unter FCS-freiem DMEM-Medium in eine Phase gebracht.

Folgende Stimulationsansätze fanden Verwendung:

Kontrollzellen ohne Zusatz;

Fibronectin, TGF- β , TGF- β /Fibronectin;

Konzentrationsansätze:

TGF- β : 5 μ l/Well

Fibronectin: 5 μ l/Well

Nach Zugabe der Stimulanzen und 24-stündiger Inkubation wurden die Zellen für fortführende Untersuchungen wie qRT-PCR und Western Blot weiterverwendet.

3.4. Immunfluoreszenzzytologische Methoden

3.4.1. Immunfluoreszenzzytologie

Reagenzien für die Immunfluoreszenzzytologie

Paraformaldehyde, Sigma-Aldrich, ST.Louis, Missouri, USA

Saponin, Sigma-Aldrich, ST.Louis, Missouri, USA

Bovines Serum Albumin (BSA), Sigma-Aldrich, ST.Louis, Missouri, USA

Fibronectin, Sigma-Aldrich, ST.Louis, Missouri, USA

Primärantikörper:

Anti- $\alpha\beta6$ Integrin monoklonaler Antikörper Klon # 6,2A

Konzentration: 1,67mg/ml

Verdünnung: 1:1000

Hersteller: BiogenIddec, Paul Weinreb (Weinreb et al., 2004)

Anti-CHD4 Antibody (3F2/4)

Konzentration: 1mg/ml

Verdünnung: 1:500

Hersteller: Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich

Anti-Sox2 antibody (ab92494)

Konzentration: 0,195mg/ml

Verdünnung: 1:400

Hersteller: Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich

Sekundärantikörper:

Anti-mouse, Alexa Fluor® 488,

Verdünnung: 1:1000

Hersteller: Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA

Anti-rabbit Alexa Fluor® 568

Verdünnung: 1:1000

Hersteller: Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA

Die Immunfluoreszenzzytologie (IFC) dient der Untersuchung von Geweben oder Zellen durch Anfärben von Strukturen mit an Antikörper gekoppelten Farbstoffen. Für die IFC wurden 40.000 Zellen mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer auf fibronectinbeschichteten (FN 2µg/ml) Chamber Slides ausgesät und für 24h inkubiert.

Die Zellen wurden 3-mal mit PBS gewaschen und mit 2% PFA für 20min bei Raumtemperatur (RT) fixiert. Es folgten 3 Waschschrte mit PBS. Nun wurden die Zellen mit 0,05% Saponin für 10min permeabilisiert. Bei Oberflächenfärbungen wurden die Zellen nicht mit 0,05% Saponin permeabilisiert, um nur die extrazellulären Epitope anzufärben und die Lokalisation der Rezeptoren an der Zellmembran sichtbar zu machen. Es folgten erneut drei Waschschrte. Nun erfolgte ein Blocking-Schritt mit 2% BSA/PBS für 30min. Nach einem weiteren Spülschritt mit PBS wurden die Antikörper in der entsprechenden Verdünnung mit PBS auf die Chambers aufgetragen und für 2h bei RT inkubiert. Es folgten vier Waschschrte und die Applikation der jeweiligen fluoreszenzgekoppelten Zweitantikörper in entsprechender Verdünnung. Diese wurden auf die Chambers aufgetragen und lichtgeschützt für 45min bei RT inkubiert. Abschließend folgten 6 weitere Waschschrte mit PBS, um unspezifische Hintergrundfärbungen zu minimieren. Nun wurden die Kammern der Chamber Slides abgelöst und der Objektträger mit einem Deckglas versehen.

Die Visualisierung der fluoreszenzgekoppelten Proteine erfolgte mit dem Laser-Mikroskop. Der look-up-table (LUT) „orange-to-white“ der LSM scanning software Zen (Zeiss) wurde als Farbskala verwendet um die Fluoreszenzintensität quantifizieren zu können. Hohe Intensitäten waren hierbei weiß markiert, mittlere gelb und niedrige rot.

3.5. Molekularbiologische Methoden

3.5.1. Expressionsanalyse Nukleinsäuren

3.5.1.1. mRNA-Präparation aus Karzinomzellen

Kit:

RNeasy® Mini Kit, Quiagen, Venlo, Niederlande

RNase-Free DNase Sets, Quiagen, Venlo, Niederlande

Bei der RNA handelt es sich wie bei der DNA um eine Nukleinsäure, deren Funktion darin besteht, die genetischen Informationen und die Basenabfolge der DNA zu kopieren (Transkription) und diese in Proteine zu übersetzen (Translation).

Die mRNA-Präparation dient als Mittel zur Analyse einer Momentaufnahme der Zelltätigkeit zu einem bestimmten Zeitpunkt des Zellzyklus.

Die Isolierung der RNA erfolgte mittels Standardverfahren zur RNA Isolierung und Aufreinigung mit konventionellen Reagenzien und analog zum Protokoll aus dem RNeasy® Mini Kit.

HN und BHY Zellen wurden auf 6-Well-Plates ausgesät und 24h inkubiert. Nach Ausbildung eines Zellverbunds wurden die Zellen weitere 24h in Hungermedium kultiviert und je nach Untersuchung Stimulanzen wie FN, TNC oder TGF- β hinzugegeben.

Eine mögliche Verunreinigung durch RNAsen sollte unbedingt verhindert werden. Daher musste präzise, zügig, gekühlt (alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt) und sauber gearbeitet werden.

Die Funktionsweise des RNeasy® Mini Kits beruht auf einem Säulensystem mit Silica-Gel-Membranen innerhalb dieser Säulen.

Die RNA bindet hierbei durch die Zugabe von Ethanol zum Zelllysat an die Membran, wobei Verunreinigungen, DNA und Proteine herausgewaschen werden.

Die Microspinttechnologie in der MiniSpin Zentrifuge bildet eine weitere Grundlage dieses Kits.

Um zusätzlich Verunreinigungen der Probe zu verhindern, wurde ein DNase-Verdau mit Hilfe des RNase-Free DNase Sets analog zum dazugehörigen Protokoll durchgeführt.

Hierbei wurde die pulverförmige DNase I in 550µl RNase-freiem Wasser gelöst, um eine Stock Solution herzustellen.

Zum Ende des Aufreinigungsprozesses wurde die RNA mittels RNase freiem Wasser eluiert und die Konzentration photometrisch bestimmt.

3.5.1.2. RNA-Konzentrationsbestimmung

Die RNA-Konzentration wurde im Anschluss an die Isolierung photometrisch bestimmt. Das Photometer wurde geeicht, indem ein Leerwert mit 50µl RNase-freiem Wasser bestimmt wurde. Weiterhin wurde 1µl der eluierten RNA zu 49µl RNase-freiem Wasser gegeben und in die Küvette pipettiert und gemessen. Durch Bestimmung des eluierten Volumens konnte somit der Wert der Gesamtmenge der RNA errechnet werden.

Nach der RNA-Isolierung folgte stets die cDNA-Synthese. Übrige mRNA wurde zügig bei -80°C eingelagert.

3.5.1.3. Umschreibung der mRNA/Reverse Transkription

Kits:

*SuperScript™ III First-Strand Synthesis System, Thermo Fisher Scientific,
Waltham, Massachusetts, USA*

Zur reversen Transkription wurde das SuperScript™ III First-Strand Synthesis System verwendet. Die Umschreibung der mRNA erfolgte analog zum Protokoll des Super SuperScript™ III First-Strand Synthesis System in komplementäre DNA (cDNA). Anstelle spezifischer Primer wurden Random Hexamer Primer verwendet. Diese sind eine Mischung unterschiedlicher Oligonukleotide, welche verschiedene Sequenzen zur Bildung eines 6 Basen langen Abschnitts beinhalten. Diese beginnen die Synthese der cDNA, indem sie an jeweils komplementäre Stellen binden. Zur cDNA-Synthese wurde von jeder Probe 1 µg DNA eingesetzt. Die hierdurch gewonnenen Proben wurden zügig bei -20°C eingelagert oder direkt weiterverwendet.

3.5.1.4. Expressionsanalyse auf Ebene der Nucleinsäuren/real-time Polymerase Ketten-Reaktion

Kits

LightCycler®FastStart DNA Master SYBR Green I Kit, Roche, Basel, Schweiz

Primer

*RT² qPCR Primer Assay for Human **GAPDH**, PPH00150F-200, Qiagen, Hilden
RT² qPCR Primer Assay for Human **ITGB6**, PPH00630A-200, Qiagen, Hilden
RT² qPCR Primer Assay for Human **CHD4**, PPH02273A-200, Qiagen, Hilden
RT² qPCR Primer Assay for Human **Sox2**, PPH02471A-200, Qiagen, Hilden*

Bei der Polymerase Ketten-Reaktion (PCR) handelt es sich um eine in-vitro Methode zur Vervielfältigung selektiver Nukleinsäureabschnitte.

Die Methode basiert darauf, dass eine Verlängerung von oligonukleotiden stattfindet, welche homolog zu den Ziel-Nukleinsäureenden sind. Die DNA wird denaturiert und die Primer hybridisieren an die Enden der nun einzelsträngigen DNA. Durch die Taq-Polymerase findet eine Verlängerungsreaktion (Elongation) statt und synthetisiert die komplementären DNA-Stränge. Durch Wiederholung der Schritte der Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation findet eine exponentielle Amplifikation der DNA statt.

Hierdurch lassen sich unter anderem Gene nachweisen, welche zum Zeitpunkt der Isolierung der mRNA exprimiert wurden. Die Möglichkeit der Untersuchung spezifischer Gene besteht über die Verwendung spezifischer Primer.

Sehr wichtig ist es hierbei auf Sterilität zu achten, um mögliche Verunreinigungen durch RNasen zu vermeiden.

Die cDNA wurde durch quantitative real-time PCR anhand spezifischer Primer für das CHD4 und Sox2 Gen und für $\alpha\beta6$ mit Hilfe einer Standardkurve quantifiziert und auf das Housekeeping Gen GAPDH normalisiert.

Für die qRT-PCR verwendeten wir einen LightCycler™ und das LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I Kit.

Bei SYBR Green handelt es sich um einen unspezifischen Fluoreszenzfarbstoff, welcher sich an die neu synthetisierten DNA-Sequenzen anlagert und Fluoreszenzsignale aussendet, welche durch den LightCycler™ detektiert werden. Hierbei wird nach der Elongationsphase die Fluoreszenz gemessen und die Quantifizierung des PCR-Produkts ermöglicht.

Zur Kontrolle des PCR Durchgangs wurde eine Schmelzkurve verwendet. Eine identische Schmelzkurve der Positivkontrollen und der Proben diente als Nachweis dafür, dass nur der gewünschte DNA-Abschnitt vervielfältigt wurde.

Der Ablauf der PCR gliederte sich in verschiedene Phasen: Zunächst fand eine Erhöhung der Temperatur auf mindestens 65°C zur Denaturierung der Doppelstränge statt; es folgte die Anlagerung der Primer an die Einzelstränge unter Abkühlung und anschließend die Synthese von zwei Doppelstrang-DNA

aus einer Doppelstrang-DNA durch die DNA-Polymerase; Danach erfolgte die Wiederholung der Schritte zur Vervielfältigung der DNA.

Zunächst wurde der für die PCR notwendige Reaktionsansatz mit den Reagenzien aus dem Kit hergestellt. Dabei wurde stets gekühlt gearbeitet. Es wurde jeweils 20µl Reaktionsvolumen pro Kapillare hergestellt. Hierzu wurden 3 verschiedene Master Mix erstellt: Ein Master Mix für das zu untersuchende Gen, ein Master Mix für das Housekeeping Gen GAPDH und ein Master Mix für die Kontrollen (*No template control*, Negativkontrolle und Positivkontrolle).

Die Untersuchungen wurden in Tripletts durchgeführt. Je 18µl vom Master Mix wurde in die Glaskapillaren gegeben und pro Kapillare 2µl DNA ergänzt.

Die Kapillaren wurden bei 2000rpm für 15sek zentrifugiert und in das LightCycler™-Karussell gesetzt. Anschließend wurden das Karussell in das LightCycler™-Instrument übertragen, welches in der Lage ist, Hitze effizient zu übertragen. Es enthält eine Lichtquelle von 470nm und drei Filtersysteme, welche das Licht dreier verschiedener Wellenlängen erkennt.

Es erfolgten 60 Amplifikationszyklen und anschließend die Schmelzkurvenanalyse durch langsames Erhitzen auf 95°C, gefolgt vom Abkühlen des Gerätes. Über das entsprechende Computerprogramm war es möglich, den Fortschritt und die einzelnen Graphen der PCR nachzuvollziehen und anschließend auszuwerten. Die Versuche wurden jeweils mindestens drei Mal wiederholt.

3.5.2. Proteinchemische Methoden

3.5.2.1. Herstellung von Proteinlysaten und Proteinkonzentrationsbestimmung

Reagenzien

Lysepuffers (cOmplete™ Lysis-M), Sigma-Aldrich, ST.Louis, Missouri, USA

HN und BHY Zellen wurden auf 6-Well-Plates ausgesät und 24h inkubiert. Nach Ausbildung eines Zellverbundes wurden die Zellen weitere 24h in Hungermedium kultiviert und, je nach Untersuchung, Stimulanzen wie FN, TNC oder TGF- β hinzugegeben.

Nach 24h wurde das Medium entfernt, die Zellen 3-malig gewaschen und mit 300 μ l des Lysepuffers 5min im Brutschrank inkubiert und aus ihrem Verbund gelöst. Mit einem Cell-Scraper wurde das Lysat in Eppendorfgläser übertragen und für 5min bei RT und 10000rpm zentrifugiert.

Die Proteinbestimmung erfolgte nach dem BCA-Protokoll (Pierce). Hierbei bilden die Proteine mit Cu²⁺ in alkalischer Lösung einen Komplex (Biuret-Reaktion). Es entsteht ein violetter Farbkomplex dessen Absorption bei 595nm gemessen wird. Um die Proteinkonzentration zu bestimmen, wurde eine Eichkurve hergestellt und mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Analog wurde die Analyselösung hergestellt und 30min bei 37°C inkubiert. Es wurde der Proteingehalt der Analyselösung aus der Eichkurve bestimmt, indem der Extinktionswert bei 595nm mittels ELISA-Reader gemessen wurde. Anschließend wurde der Proteingehalt mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes aus dem Vergleich der Extinktion der Probe mit der aus den Standardwerten ermittelten Eichkurve ermittelt.

3.5.2.2. Expressionsanalyse auf Proteinebene

Reagenzien:

Roti®-Load1, reduzierend, 4x konzentriert, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Biotinylated Protein Ladder, Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA

TWEEN® 20 viscous liquid, Sigma-Aldrich, ST. Louis, Missouri, USA

Milchpulver, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Bovines Serum Albumin, Sigma-Aldrich, ST. Louis, Missouri, USA

10% Mini_PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels, Bio Rad, Hercules, Kalifornien, USA

*Trans-Blot® Turbo™ Mini Nitrocellulose Transfer Packs, Bio Rad, Hercules,
Kalifornien, USA*

Primärantikörper

Polyclonal Antibody to Integrin Beta 6 (ITGB6)

Konzentration: 200µg/ml

Verdünnung: 2:1000

Hersteller: Cloud Clone Corp., Katy, Texas, USA

Anti-CHD4 Antibody (3F2/4)

Konzentration: 1mg/ml

Verdünnung: 1:5000

Hersteller: Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich

Anti-HDAC1 Antibody (ab19845)

Konzentration: 0,1mg/ml

Verdünnung: 10:1000

Hersteller: Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich

Anti-Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

Konzentration: 500µg/ml

Verdünnung: 1:10.000

Hersteller: Cloud Clone Corp., Katy, Texas, USA

Anti-Sox2 Antibody (ab92494)

Konzentration: 0,195mg/ml

Verdünnung: 1:2500

Hersteller: Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich

Sekundärantikörper:

Goat-anti-mouse

Konzentration: 1mg/ml

Verdünnung: 1 μ l/10ml

Hersteller: Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA

Goat-anti-rabbit peroxidase

Konzentration: 1mg/ml

Verdünnung: 1 μ l/10ml

Hersteller: Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Anti-biotin HRP-linked Antibody

Größe: 1ml

Verdünnung: 1 μ l/10ml

Hersteller: Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA

Die Elektrophorese wurde in SDS-Polyacrylamidgelen durchgeführt, welche das Proteingemisch entsprechend der Molekularmasse der einzelnen Proteine separiert. Es wurden 10%-Acrylamid-Gele verwendet.

Je Probe wurde 60 μ g Protein verwendet. Weiterhin wurden zwei Molekulargewichtsmarker eingesetzt, ein sichtbarer Marker und ein biotinylierter Marker, welcher nur unter Kopplung mit einem biotinylierten Antikörper sichtbar wird.

Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 120V.

Für den Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran (PVDF) verwendeten wir Trans-Blot® Turbo™ Mini Nitrocellulose Transfer Packs und das Trans-Blot® Turbo™ Transfer System, welches den Vorgang des Blotens auf 7min reduzierte. Hierbei wurde das Gel auf die Membran aufgebracht und luftblasenfrei zwischen je drei Transferpuffer-getränkte Filterpapiere (Whatman-Papier) platziert. Der Transfer erfolgte im Semi-Dry-Verfahren bei 1,3A und 25V. Über Nacht wurde die Membran in Blocking-Puffer mit 5% Milchpulver in einem

Kühlschrank gelagert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren.

Es fanden verschiedene Antikörper zur Analyse der Proteinexpression Verwendung. Die sekundären Antikörper (anti-mouse oder anti-rabbit) detektieren die primären Antikörper. Die Primärantikörper wurden über Nacht im Kühlschrank bei 5°C inkubiert. Danach wurde 3-malig für 5min mit TBST

gewaschen. Der Sekundärantikörper ist Meerrettichperoxidase-gebunden und wurde in der Verdünnung 1:10.000 und gemeinsam mit Anti-Biotin in der Verdünnung 1:10.000 eingesetzt. Die Inkubation des Sekundärantikörpers erfolgte für 1h bei RT. Anschließend folgte ein weiterer Waschschrift.

Als Housekeeping-Gen wurde HDAC in der Konzentration 1µg/ml oder GAPDH in der Konzentration 1:10.000 verwendet.

Immunoblots wurden mit Chemiluminiszenz mittels ECLPlus und ECLadvance Western blot Detection Systems (*Amersham/GE Healthcare Europe GmbH, München, Germany*), entsprechend der Herstellerangaben visualisiert.

Die Versuche wurden jeweils mindestens drei Mal wiederholt.

3.6. Migrations- und Invasionsversuche

3.6.1. Migrationsassay

Um das Migrationsverhalten der Karzinomzellen und Transfektanten im Vergleich beurteilen zu können, wurden *Scratch assays* durchgeführt. Weiterhin wurde das Wachstumsverhalten der Zellen nach Stimulation mit extrazellulären Matrixproteinen wie Fibronectin (FN) und TGFβ beurteilt. Diese Untersuchung wurde angelehnt an das Protokoll *‘In vitro scratch assay: a convenient method and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro’* (Liang, Park et al. 2007) durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen in 6-Well-Plates ausgesät und in Nährmedium kultiviert bis sie einen *Monolayer* ausbildeten. Mit Hilfe einer 200ul Pipette wurde ein Kreuz in die Mitte der Wells durch die Zellen gekratzt. Zelldebris wurde anschließend mit PBS heruntergewaschen und die Zellen wieder mit 1ml

Medium aufgefüllt. In weiterführenden Untersuchungen wurden Fibronectin (10ng/ml), und TGF β (5ng/ml) hinzugegeben und die Zellen hiermit stimuliert. Unter dem Mikroskop wurden Markierungspunkte gesetzt, um bei den Aufnahmen stets die gleichen Ausschnitte miteinander vergleichen zu können. Nun wurde das initiale Foto gemacht und die Zellen zum Zeitpunkt des *Scratches* fotografiert. Die Zellen wurden im Inkubator kultiviert und alle 12h gewaschen, das Medium gewechselt und Fotos angefertigt. Bei den stimulierten Zellen wurde das Medium alle 24 h gewechselt und die Stimulanzen wieder hinzugegeben. Der Versuch galt als beendet, als der *Scratch* vollständig verschlossen war. Anschließend wurde das Migrationsverhalten durch Auflage eines Rasters auf die Aufnahmen ausgewertet und in Prozentwerten angegeben. Die Versuche wurden in mindestens drei Ansätzen vergleichend untersucht.

3.6.2. Invasionsassay

Materialien:

Transwell Inserts, Sigma-Aldrich, ST. Louis, Missouri, USA

DAPI for nuclei acid staining, Sigma-Aldrich, ST Louis Missouri, USA

Um das Invasionsverhalten der wild-typ Zellen im Vergleich zu den Transfektanten durch eine Membran zu untersuchen, wurden *Transwell-Migration-Assays* durchgeführt. Dieses Verfahren ist auch als (modifizierter) *Boyden Chamber Assay* bekannt. Es dient dazu, die Migration der Zellen durch die Basalmembran/Extrazelluläre Matrix zu simulieren.

Hierbei wurde eine konstante Zellzahl auf der Oberseite der Transwellmembran ausgesät und Medium auf beiden Seiten hinzugegeben. Wichtig war es, dass das Höhenlevel des Mediums auf beiden Seiten der Membran gleich hoch war, um mögliche Druckdifferenzen und deren Folgen zu vermeiden. Nach einer Inkubationszeit von 24h wurde das *Transwell-Insert* entfernt und übrige, nicht migrierte Zellen auf der Membranoberseite entfernt. Die migrierten Zellen auf der Unterseite wurden fixiert, mit DAPI angefärbt und die Anzahl mit Hilfe des

Fluoreszenzmikroskops ermittelt. Die Versuche wurden in mindestens drei Ansätzen vergleichend untersucht.

4. Ergebnisse

Immunhistochemische Voruntersuchungen zeigten eine Co-expression des Invasions-assoziierten Integrins $\alpha v\beta 6$ und der funktionellen Untereinheit CHD4 des NuRD-Komplexes im Bereich der Invasionsfront oraler Karzinomzellen. Hierdurch lässt sich ein funktioneller Zusammengang beider Proteine in proliferierenden und invasiven Karzinomzellen vermuten (Irimie, Ciocan et al. 2018). Eine funktionelle Regulation der Sox2 Expression durch CHD4 wurde bereits durch Nieberler et. al. beschrieben und lässt ebenfalls einen Zusammenhang zwischen Sox2 und $\alpha v\beta 6$ postulieren (Nieberler 2012). Auf dem Boden dieser Voruntersuchungen sollte durch diese Arbeit das Stammzellpotential oraler Karzinomzellen auf molekularbiologischer Ebene charakterisiert und die Zusammenhänge von $\alpha v\beta 6$, CHD4 und Sox2 genauer untersucht werden. Hierzu wurden die ATPase CHD4 und der Stammzellmarker Sox2 in in-vitro Zellkulturstudien an oralen Plattenepithelkarzinomzellen (HN) untersucht. Weiterhin wurde der Einfluss einer Missexpression von CHD4 und Sox2 auf das Verhalten der oralen Plattenepithelkarzinomzellen und die Invasion und Migration untersucht. Die Ergebnisse werden im Folgenden dargestellt.

4.1. Einfluss der ATPase-Untereinheit CHD4 des NuRD-Komplexes auf das Stammzellpotential und Invasionsverhalten oraler Plattenepithelkarzinomzellen und die Expression von Integrin $\alpha v \beta 6$

4.1.1. Immunhistochemische Untersuchung der Expression von Integrin $\alpha v \beta 6$ und CHD4

Zur Analyse der Expression der ATPase-Untereinheit CHD4 des NuRD-Komplexes und des Integrins $\alpha v \beta 6$ wurden Gewebeproben oraler Plattenepithelkarzinome und Gewebeproben gesunder Mundschleimhaut in Paraffin eingebettet und immunhistochemisch untersucht.

Um unspezifische Bindungen des Zweitantikörpers und somit falsch positive Ergebnisse ausschließen zu können, wurden Färbungen ohne Verwendung des Erstantikörpers durchgeführt.

Die immunhistochemischen Untersuchungen des Integrins $\alpha v \beta 6$ zeigten, dass es eine Grenze zwischen epithelialen Tumorzellen und mesenchymalen Stromazellen demarkiert (Abb. 8). Je näher die Zellen zur epithelial-mesenchymalen Grenze lokalisiert sind, desto stärker war das nachgewiesene Signal. Die stärkste Expression von $\alpha v \beta 6$ konnte in Zellen mit direktem Kontakt zur epithelial-mesenchymalen Grenze detektiert werden.

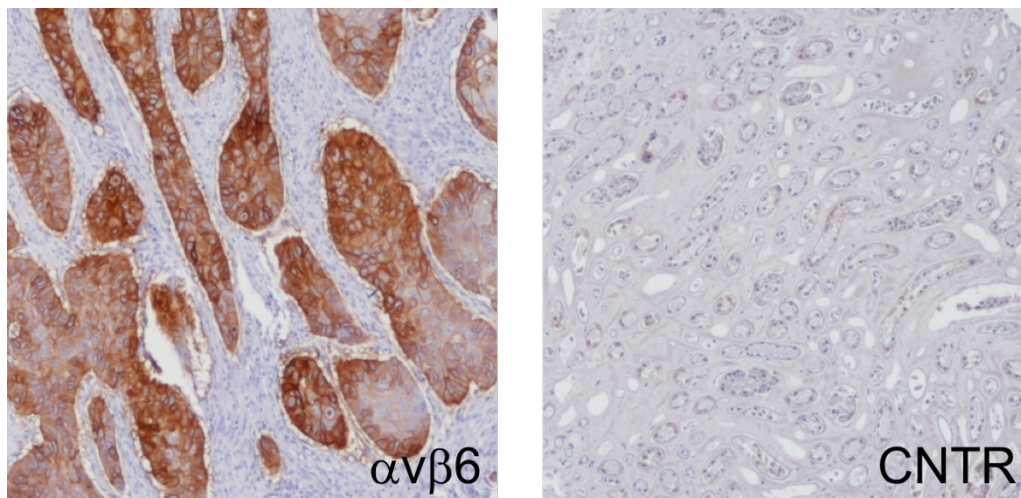


Abbildung 8: Immunhistochemische Darstellung des Integrins $\alpha 5 \beta 6$ in Karzinomgewebe und gesundem Gewebe.

Die ATPase CHD4 zeigte ein ähnliches Expressionsmuster, mit einer verstärkten Expression an der epithelial-mesenchymalen Grenze. Die Färbung mittels CHD4 war vor allem nukleär lokalisiert (Abb. 9).

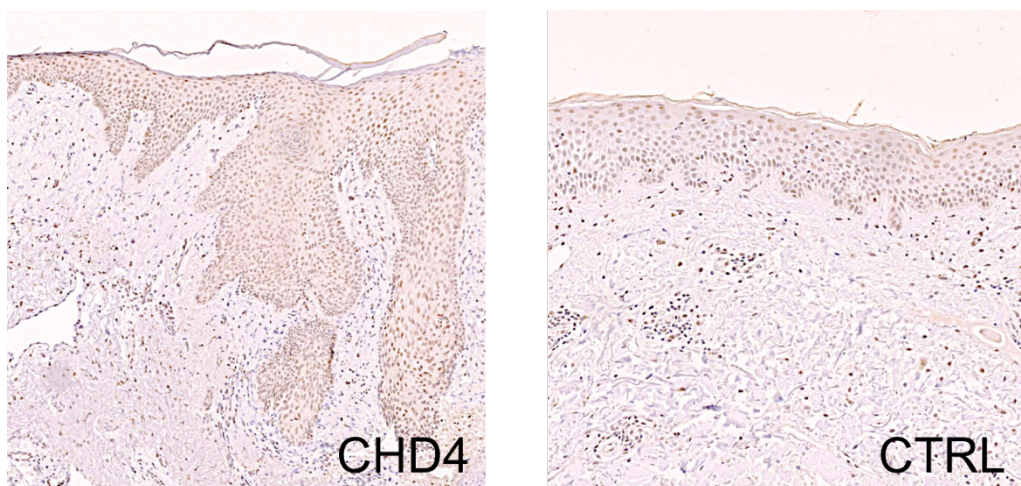


Abbildung 9: Immunhistochemische Darstellung der ATPase CHD4 in Karzinomgewebe und gesundem Gewebe.

Die Untersuchungen lassen auf Grund ihrer ähnlichen Lokalisation eine Assoziation zwischen der Expression des Integrins $\alpha 5 \beta 6$ und der funktionellen

Untereinheit CHD4 des NuRD-Komplexes vermuten. Besonders im Bereich der Invasionsfront oraler Karzinomzellen ließ sich eine verstärkte Expression nachweisen. Eine deutliche Expression der Marker wurde ebenfalls im Übergangsbereich der in das Stroma einwachsenden Zellen nachgewiesen.

Dies legt die Annahme nahe, dass epigenetische Chromatinremodellierung und Signalwege der epithelial-mesenchymalen-Transition eine Basis für die Karzinogenese und Karzinomzellmigration der oralen Karzinomzellen bilden und die ATPase CHD4 eine wichtige Rolle im Rahmen dieses Prozesses spielen und die Migration der Tumorzellen beeinflussen könnte.

Basierend auf diesem Ergebnis wurde durch in-vitro Zellkulturstudien der Zusammenhang zwischen CHD4 und $\alpha v \beta 6$ untersucht und die Auswirkung der Missexpression von CHD4 auf die $\alpha v \beta 6$ -Expression und die funktionellen Auswirkungen auf orale Karzinomzellen durch Invasions- und Migrationsassays untersucht.

4.1.2. CHD4 Expression und Überexpression in oralen Karzinomzellen und der Einfluss auf die Expression von Integrin $\alpha v \beta 6$

In Zellkulturstudien wurde CHD4 in oralen Karzinomzellen (HN) untersucht und mittels Plasmidtransfektion CHD4-überexprimierende HN-CHD4 entwickelt.

Die Zelllinie wurde mittels Lipofectamine® 3000 Reagent transfiziert. Bei der Lipofektion wird das genetische Material des Plasmids mit Hilfe von Liposomen durch Fusionierung mit der Zellmembran in die Zellen eingebracht.

Als Kontrolle wurden die HN Zellen nur mit dem Reagent und ohne ein Plasmid transfiziert.

Um die größtmögliche Transfektionskoeffizienz zu erzielen, wurden verschiedene Konzentrationen an Lipofectamine 3000® Reagent und DNA ausgetestet.

Als effizientesten Ansatz zeigten sich bei beiden Zelllinien die Ansätze 2 und 3. Der 1. Ansatz führte in keinem der Versuche zu dem gewünschten Ergebnis.

Bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 90% nach der Transfektion wurde mit der Selektion mittels Genticin (G418) begonnen. Nach Ausbildung der Transfektantennester wurden diese kultiviert, passagiert und für weitere Analysen verwendet (Abb. 10).

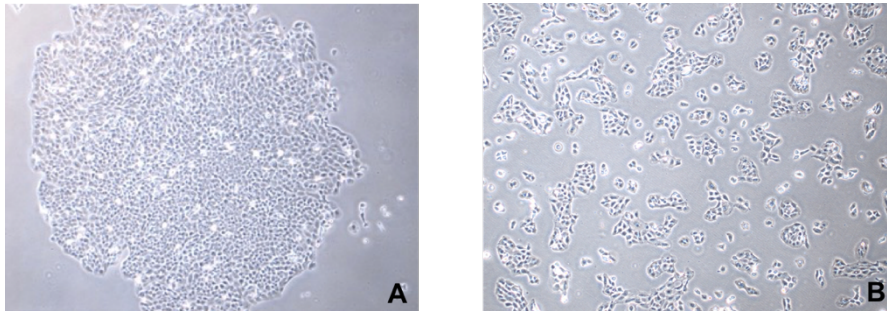


Abbildung 10: Ausbildung der Transfektantennester unter Selektion mit Genticin G418.

A Verwendung des *hCHD4* Plasmids und des Lipofectamine 3000® Reagents.

B Leere Transfektion. Alleinige Transfektion mit dem Lipofectamine 3000® Reagent.

In immunfluoreszenzzytologischen Analysen wurden nicht transfizierte HN WT Zellen und HN-CHD4 vergleichend untersucht. Es wurde die optimale Verdünnungskonzentration für den CHD4-Primärantikörper ermittelt. Die besten Ergebnisse wurden mit einer Verdünnung von 1:100 erzielt. Der Zweitantikörper wurde in der Konzentration 1:1000 eingesetzt. Bei jeder Untersuchung wurden wild-typ Zellen und Transfektanten vergleichend untersucht und weiterhin als Kontrolle eine Probe ohne Primärantikörper und eine Probe ohne Sekundärantikörper mitgeführt. Eine unspezifische Bindung konnte ausgeschlossen werden. Eine Autofluoreszenz der Zellen wurde durch das Mitführen einer Probe ohne Antikörper überprüft.

Immunfluoreszenzzytologische Untersuchungen zeigten qualitativ und quantitativ die Überexpression des CHD4 Proteins in HN-CHD4 im Vergleich zu HN WT Zellen (Abb. 11).

Als ATPase Untereinheit des NuRD-Komplexes ist CHD4 mit der Remodellierung des Chromatins assoziiert. Immunfluoreszenzzytologische Analysen mittels konfokaler Mikroskopie zeigten eine geringe nukleäre Expression von CHD4 in HN WT Zellen. CHD4-Transfektanten (HN-CHD4) zeigten im Vergleich mit HN WT Zellen einen intensiveren nukleären Fluoreszenzgrad als Zeichen einer Überexpression von CHD4.

In den mitgeführten Kontrollen zeigte sich keinerlei Fluoreszenz.

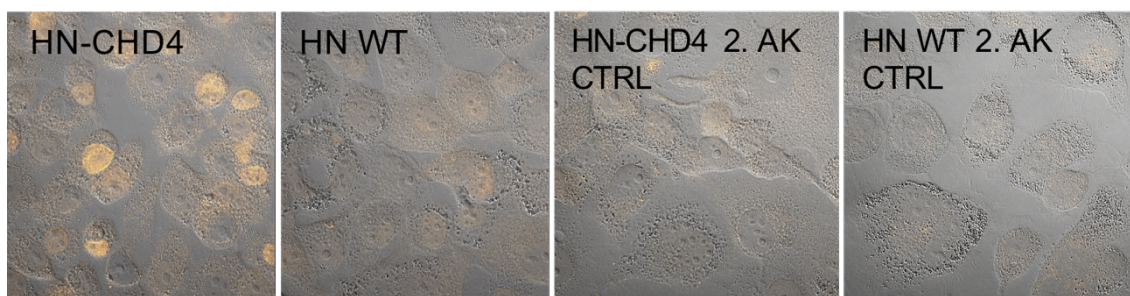


Abbildung 11: Immunfluoreszenzzytologischer Nachweis der Überexpression von CHD4: Im Gegensatz zu den HN WT Zellen war bei 70-80% der HN-CHD4 Zellen eine höhere Expression von CHD4 im Kern nachweisbar. In den mitgeführten Zweitantikörperkontrollen zeigten sich keine unspezifischen Bindungen des Zweitantikörpers.

Der Einfluss der Überexpression der ATPase CHD4 auf das Integrin $\alpha v \beta 6$ wurde semi-quantitativ mittels qRT-PCR und Western Blot untersucht.

In HN-CHD4 konnte die gesteigerte Expression von CHD4 bestätigt werden. Die Untersuchungen zeigten, dass die Überexpression von CHD4 in Abhängigkeit von der Plasmidkonzentration stand. Zellen, welche mit größeren DNA-Mengen transfiziert wurden, exprimierten mehr CHD4 (Abb. 12).

Die Überexpression der funktionellen Untereinheit CHD4 des NuRD-Komplexes korrelierte mit der vermehrten mRNA-Expression des Invasions-assoziierten Integrins $\alpha v \beta 6$ (Abb. 13).

In qRT-PCR-Untersuchungen wurde die Überexpression auf mRNA-Ebene bestätigt. Durch Verwendung spezifischer Primer wurde die Expression von CHD4 und $\alpha v\beta 6$ mittels qRT-PCR untersucht und auf das Haushaltsgen GAPDH normalisiert.

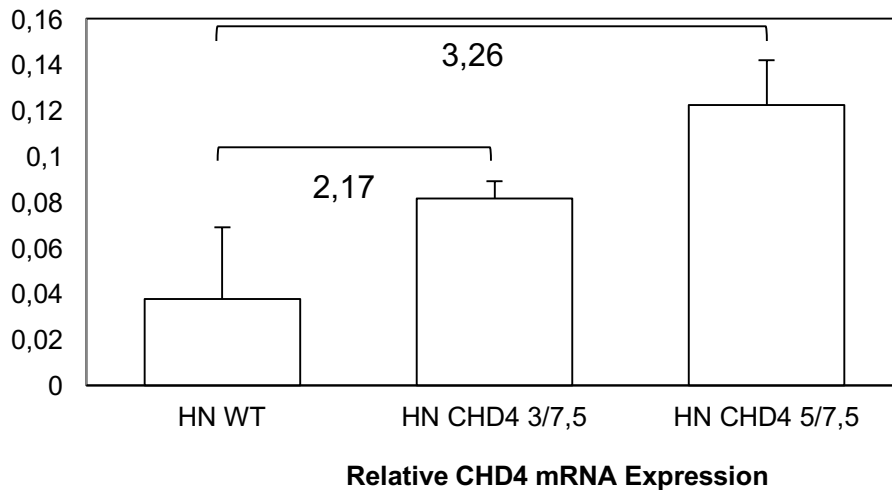


Abbildung 12: Plasmidkonzentrationsabhängige Überexpression in den CHD4-Transfektanten: Zellen, welche mit 3 μ g DNA transfiziert wurden, zeigten eine 2,17-fach gesteigerte Expression von CHD4 im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen. Weiterhin exprimierten die mit 5 μ g transfizierten Zellen 1,5-fach stärker CHD4 als die Zellen mit 3 μ g DNA und 3,26-fach stärker als HN WT-Zellen.

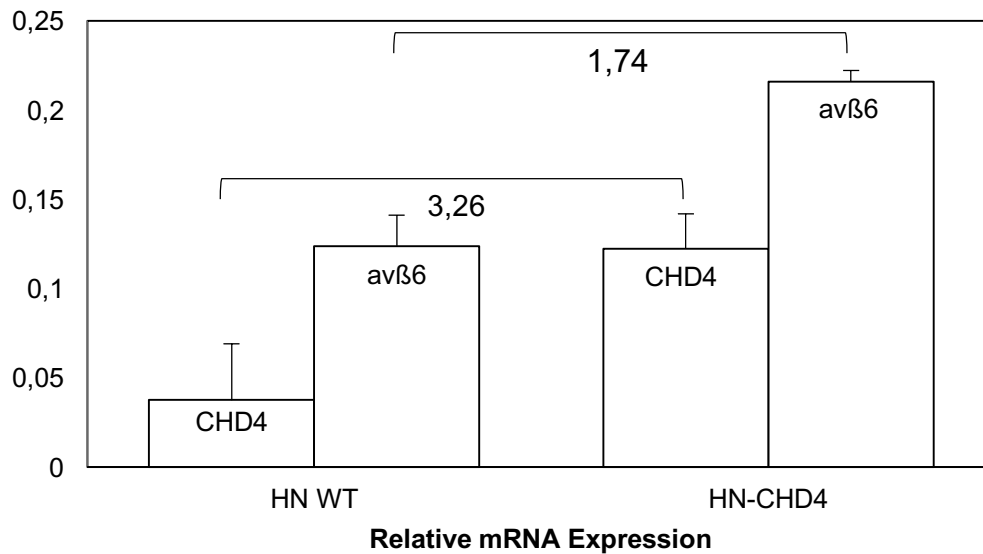


Abbildung 13: mRNA Expression von CHD4 und $\alpha v \beta 6$ im Vergleich in HN WT und HN-CHD4 Zellen mittels qRT-PCR. In den HN WT Zellen war CHD4 nachweisbar. Es bestätigte sich die erhöhte Expression in den HN-CHD4 Zellen. Diese zeigten eine 3,26-fache Steigerung der basalen CHD4-Expression. Bei der Analyse des Invasions-assoziierten Marker Proteins $\alpha v \beta 6$ zeigte sich ebenfalls eine deutliche Steigerung der Expression in den Transfektanten im Vergleich zu den HN WT. Es zeigte sich eine 1,74-fache Steigerung in den HN-CHD4 im Vergleich zu den HN WT Zellen.

Mittels Western Blot Analysen erfolgte eine Validierung der Expression von CHD4 und $\alpha v \beta 6$ auf Proteinebene.

Diese wurden auf das Haushaltsgen HDAC oder GAPDH normalisiert.

Die Zellen wurden mit Hilfe eines Lysepuffers gelöst und mit SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Anschließend wurden CHD4 und $\alpha v \beta 6$ im Western Blot untersucht. Hierbei wurde erneut die Überexpression von CHD4 in den HN-CHD4 Zellen im Vergleich zu den HN WT Zellen bestätigt. Ebenso wie die erhöhte Expression von $\alpha v \beta 6$ in den HN-CHD4-Zellen im Vergleich zu den HN WT-Zellen (Abb. 14).

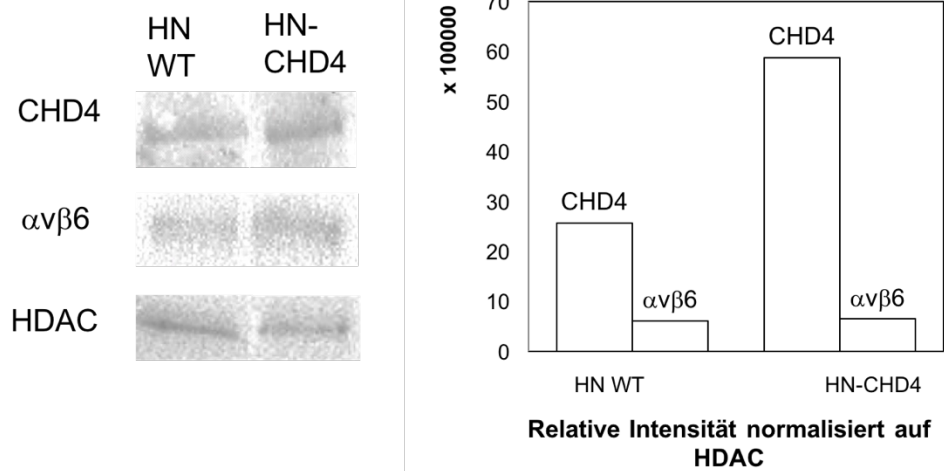


Abbildung 14: Vergleichende Untersuchung von HN WT und HN-CHD4 hinsichtlich der Expression von CHD4 und $\alpha v \beta 6$ mittels Western Blot: Die Expression von CHD4 wurde bei 218kD und $\alpha v \beta 6$ bei 135kD dargestellt. In dieser Analyse bestätigte sich die stärkere Expression von CHD4 und $\alpha v \beta 6$ in den Transfektanten in der Gegenüberstellung mit den HN WT Zellen. CHD4 wurde in den Transfektanten 2,3-fach stärker exprimiert als in den wild-typ Zellen. Die Überexprimierung von CHD4 in den Transfektanten korrelierte mit einer stärkeren $\alpha v \beta 6$ -Expression. $\alpha v \beta 6$ wurde in den HN-CHD4-Zellen 1,1-fach stärker exprimiert als in den HN WT-Zellen. Allerdings zeigte sich auf Proteinebene eine geringere Steigerung der Expression von $\alpha v \beta 6$ im Gegensatz zu den Ergebnissen der qRT-PCR.

4.1.3. CHD4 beeinflusst das Migrations- und Invasionsverhalten oraler Karzinomzellen

Um den Einfluss der CHD4-Überexpression auf das Wachstumsverhalten der Karzinomzellen zu untersuchen, wurden Invasions- und Migrationsversuche durchgeführt.

Hierfür wurde den Zellen ein einheitlicher Scratch zugefügt und das Überwachsen dieses Scratches über ein Zeitintervall untersucht. In Abständen von 12h wurden die Zellen untersucht und fotografisch dokumentiert.

HN WT Zellen und HN-CHD4 wurden hinsichtlich ihres Migrationsverhaltens und ihrer Migrationsgeschwindigkeit verglichen.

Die Migrations- und Invasionsassays bestätigten, dass die Überexpression von CHD4 mit konsekutiv erhöhter Expression von $\alpha v \beta 6$ das Migrations- und Invasionsverhalten oraler Karzinomzellen beeinflusst: HN-CHD4 Zellen wiesen ein gesteigertes Migrationsverhalten im Vergleich zu HN WT auf.

Im Migrationsassay zeigten die wild-typ Karzinomzellen nach 12h noch keine Migration, wohingegen der Scratch der Transfektanten zu diesem Zeitpunkt bereits zu 20% überwachsen war. Nach 24h zeigten sowohl die HN WT Zellen als auch die Transfektanten eine Steigerung der Migration, die HN WT Zellen migrierten allerdings deutlich langsamer. Zu diesem Zeitpunkt war der Scratch der wild-typ Zellen zu 18% besiedelt und der Scratch der Transfektanten bereits zu 40%. Nach 48h war der Scratch der Transfektanten vollständig besiedelt, wohin bei den wild-typ Zellen noch ca. 42% nicht bewachsen waren (Abb. 15).

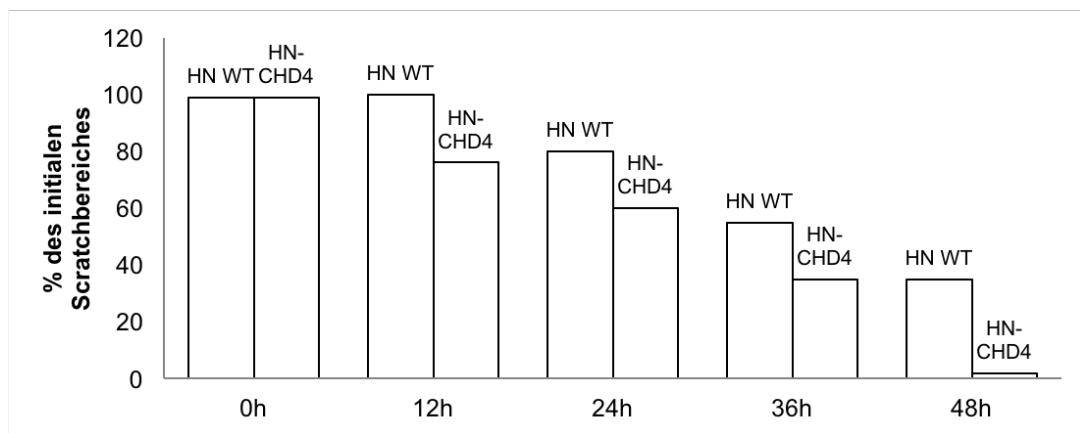
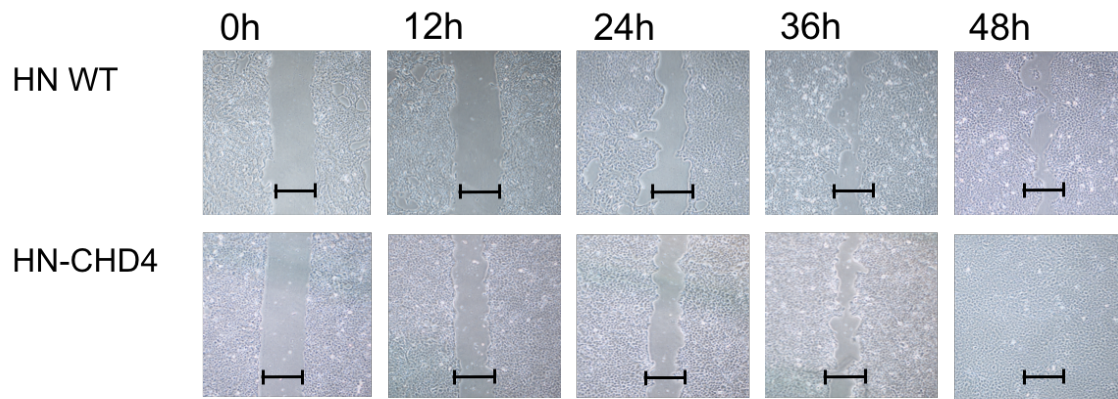


Abbildung 15: Migrationsverhalten der HN WT Zellen und HN-CHD4 Zellen im Vergleich: In dieser Untersuchung wurde gezeigt, dass die HN-CHD4 Transfektanten schneller konfluieren als die HN WT Zellen. Bereits nach 48h war der Scratch nicht mehr erkennbar.

In Invasionsversuchen wurde das gesteigerte Invasionsverhalten der HN-CHD4 Zellen ebenfalls bestätigt. Hierfür wurden mittels Transwell-Inserts HN WT und HN-CHD4 Zellen vergleichend untersucht. Die Zellen, welche die Membran durchwanderten, wurden mit DAPI angefärbt und ausgezählt (Abb.16).

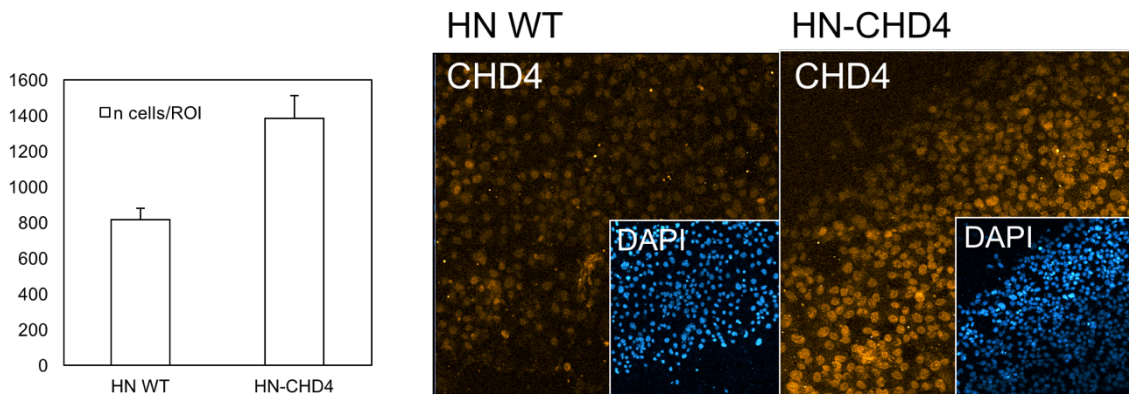


Abbildung 16: HN-CHD4 zeigen im Vergleich zu HN WT Zellen ein gesteigertes Invasionsverhalten. Repräsentative Darstellung der Zellzahl mittels DAPI. Es waren 1,7-fach mehr Zellen invasiv in der HN-CHD4 Gruppe als in der HN WT Zellgruppe.

4.2. Einfluss der ATPase-Untereinheit CHD4 auf die Expression des Stammzellmarkers Sox2

In immunhistochemischen Untersuchungen konnte eine räumliche und zeitliche Co-expression von CHD4 und Sox2 im Bereich der Invasionsgrenze abgegrenzt werden (Abb. 17). Dies weist auf einen funktionellen Zusammenhang beider Proteine in proliferierenden und invasiven Karzinomzellen hin.

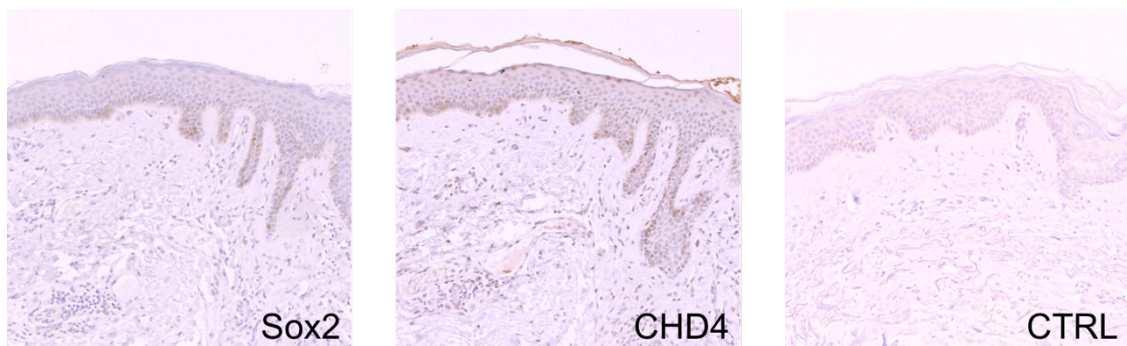


Abbildung 17: Immunhistochemische Darstellung des Stammzellfaktors Sox2 und der ATPase CHD4 im Vergleich.

Die Immunfluoreszenzzytochemie bestätigte die nukleäre Expression von CHD4 und Sox2 in einer HN Subpopulation (Abb. 18).

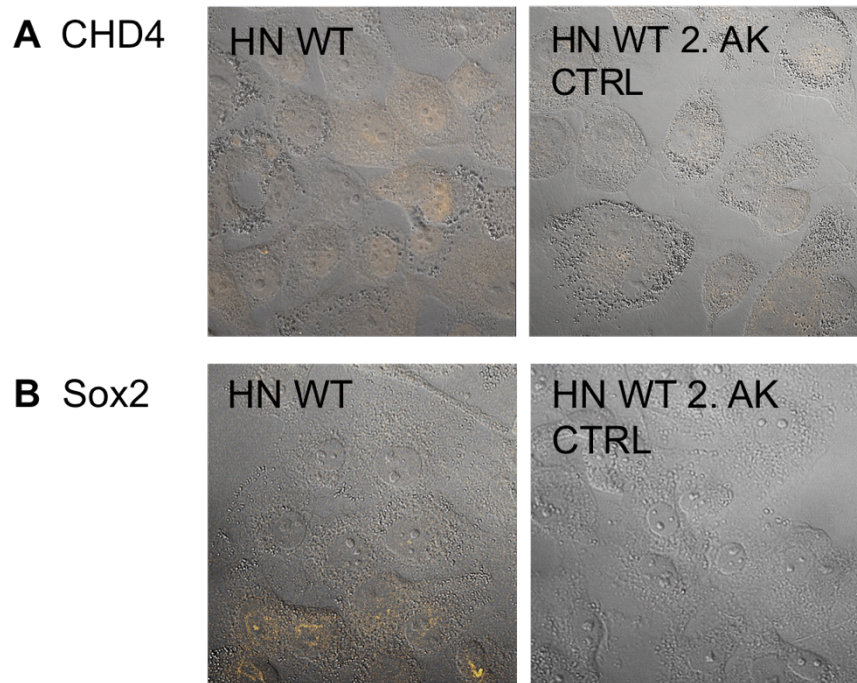


Abbildung 18: Immunfluoreszenzzytologische Analyse der Expression von CHD4 und Sox2 in HN WT. Es zeigte sich mittels konfokaler Mikroskopie eine geringe nukleäre Expression von CHD4 und Sox2 in HN WT Zellen.

In den mitgeführten Kontrollen zeigte sich keinerlei Fluoreszenz.

Weiterhin konnte durch die qRT-PCR gezeigt werden, dass eine Überexpression von CHD4 mRNA in HN-CHD4 Zellen in Abhängigkeit von der Plasmidkonzentration stand (Abb. 19).

Es zeigte sich ein variabler, dosisabhängiger Effekt der CHD4 Überexpression auf die Sox2 Expression.

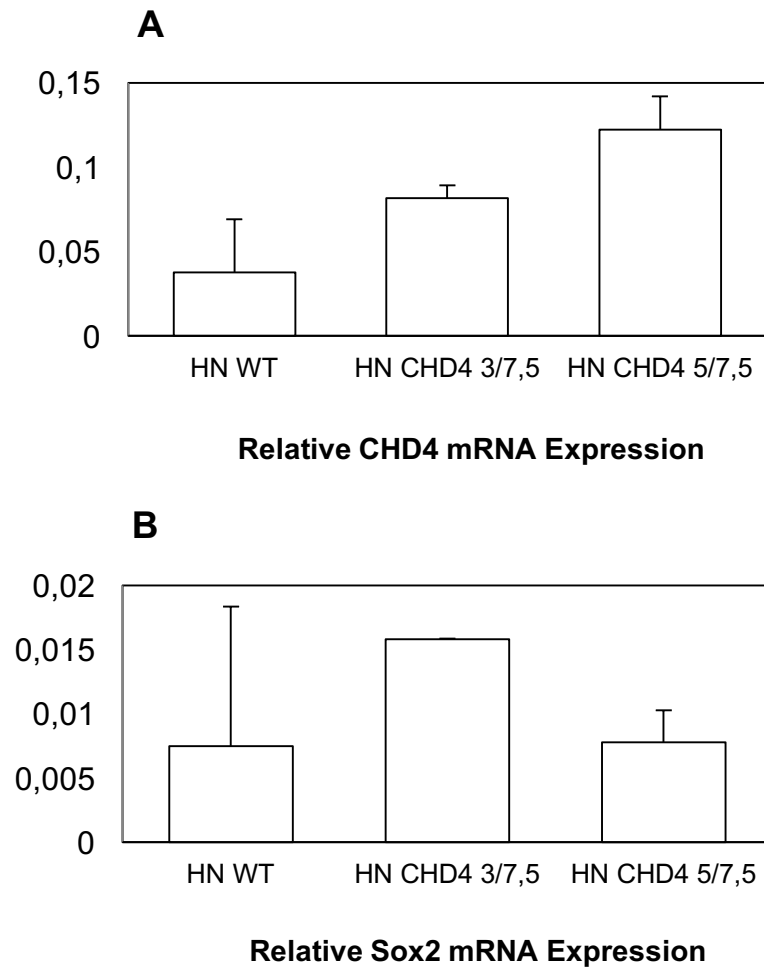


Abbildung 19:

A Überexpression von CHD4 mRNA in HN-CHD4 Zellen.

B Die Sox2 Expression in HN WT Zellen ist variabel. Die CHD4 Überexpression in HN-CHD4 Zellen (3/7,5) führt zu einer stabilen Induktion der Sox2 Expression. Diese ist, in Abhängigkeit erhöhter CHD4 Expressionslevel, dosisabhängig limitiert (5/7,5) und führt konsekutiv zur Reduktion der Sox2 Expression.

Mittels Western Blot Analysen erfolgte eine Validierung der Expression von Sox2 in den HN-CHD4 Zellen auf Proteinebene. Verwendet wurden stark überexprimierende CHD4 Transfektanten (3/7,5).

Diese wurden auf das Haushaltsgen HDAC oder GAPDH normalisiert.

Die Zellen wurden mit Hilfe eines Lysepuffers gelöst und mit SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Anschließend wurden Sox2 und CHD4 im Western Blot untersucht. Hierbei wurde erneut die Überexpression von CHD4 in den HN-CHD4 Zellen im Vergleich zu den wild-typ Karzinomzellen bestätigt. Ebenso zeigte sich eine geringere Steigerung der Sox2 Expression in den HN-CHD4-Zellen im Vergleich zu den HN WT-Zellen und der CHD4 Expression (Abb. 20).

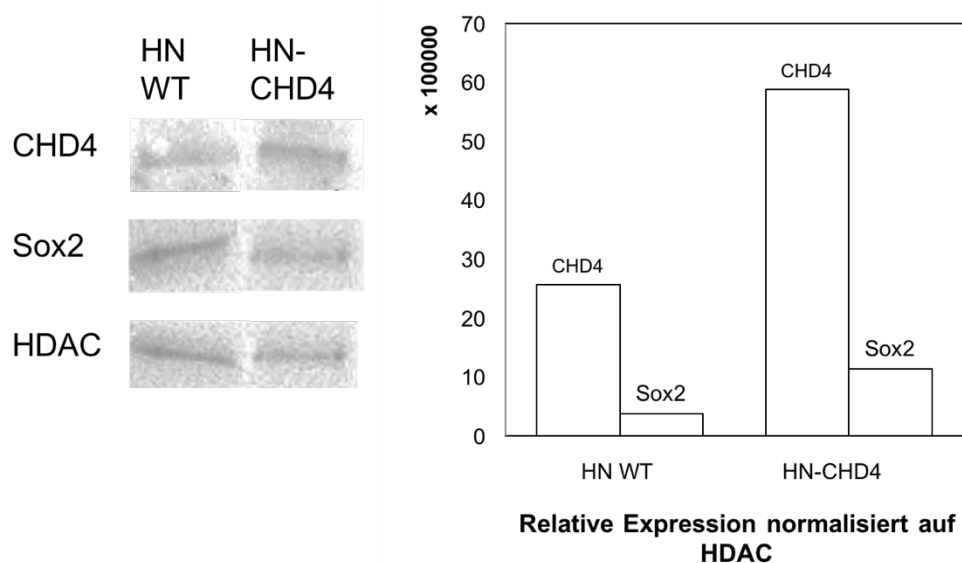


Abbildung 20: Western Blot Analyse der relativen Expression von CHD4 und Sox2 in gering differenzierten HN WT Zellen und HN-CHD4 Transfektanten, normalisiert auf die Expression von HDAC.

Um den Einfluss von Sox2 auf das Wachstum der Karzinomzellen genauer untersuchen zu können, wurde in Zellkulturstudien der Stammzellmarker Sox2 in oralen Karzinomzellen (HN) mittels Plasmidtransfektion überexprimiert (HN-Sox2) (Abb. 21).

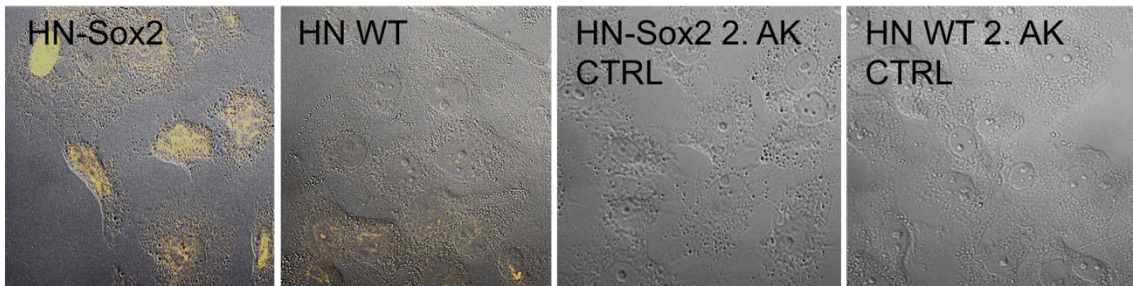


Abbildung 21: Immunfluoreszenzzytologischer Nachweis der Überexpression von Sox2: Im Gegensatz zu den HN WT Zellen war bei 75% der HN-Sox2 Zellen eine höhere Expression von Sox2 im Kern nachweisbar. In den mitgeführten Zweitantikörperkontrollen zeigten sich keine unspezifischen Bindungen des Zweitantikörpers.

Mittels qRT-PCR konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Expression von Sox2 mRNA in HN-Sox2 in Abhängigkeit von der Lipofectaminekonzentration stand (Abb. 22).

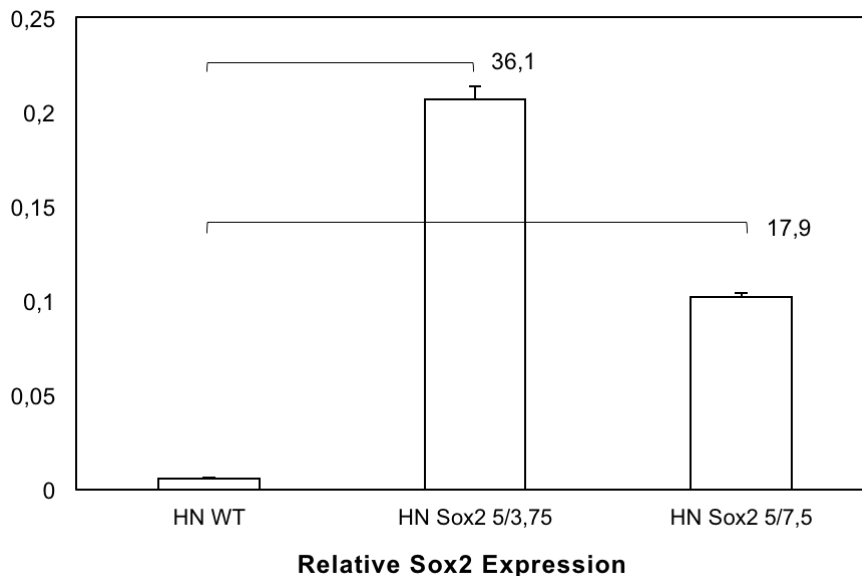


Abbildung 22: Plasmidkonzentrationsabhängige Überexprimierung in den Sox2-Transfektanten: Beide Versuchsreihen wurden mit 5µg DNA transfiziert. Die besten Ergebnisse wurden mit der Konzentration 5µg DNA und 3,75µg Lipofectamine erreicht. Mit dieser Zellreihe wurde weiterverfahren.

Um den Einfluss einer gesteigerten Sox2 Expression auf das Invasionsverhalten der Zellen abgrenzen zu können, wurden Invasionsassays durchgeführt (Abb. 23).

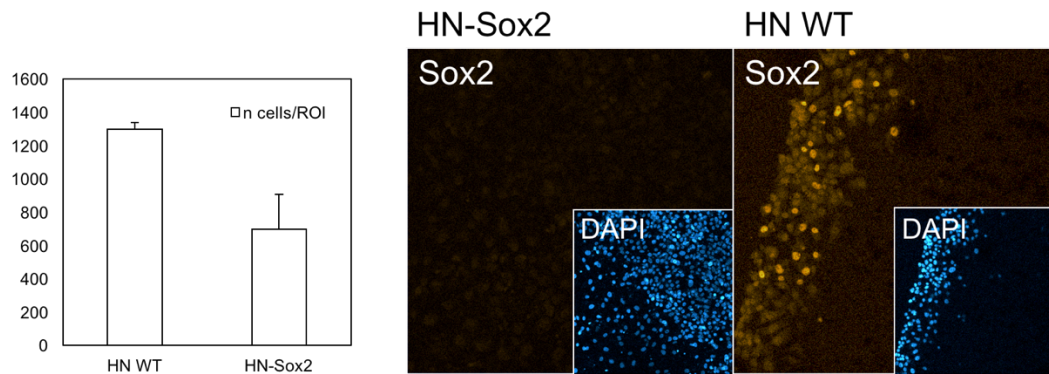


Abbildung 23: HN-Sox2 zeigen im Vergleich zu HN WT Zellen ein vermindertes Invasionsverhalten. Repräsentative Darstellung der Zellzahl mittels DAPI. Es waren nahezu halb so viele Zellen invasiv in der HN-Sox2 Gruppe im Vergleich zu der HN WT Zellgruppe.

Mittels Migrationsassays konnte ebenfalls eine langsamere Migration der HN-Sox2 Zellen im Vergleich zu den HN WT Zellen gezeigt werden (Abb. 24).

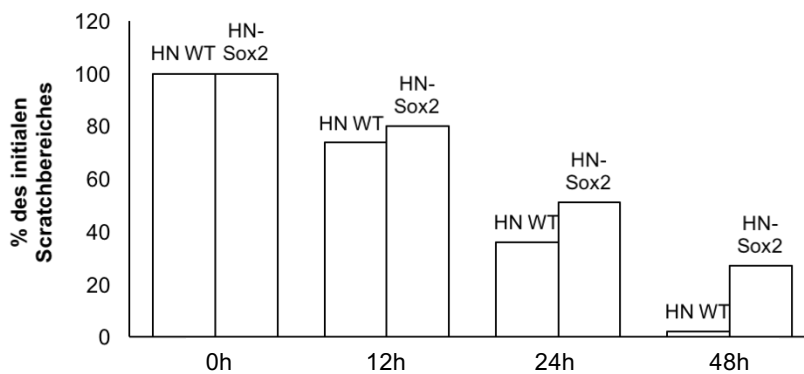
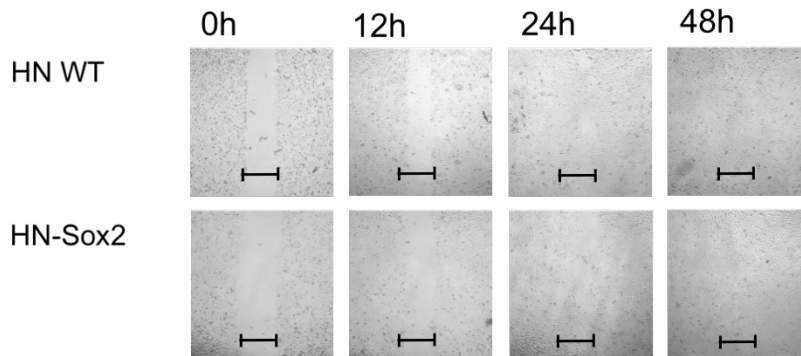


Abbildung 24: Migrationsverhalten der HN WT Zellen und HN-Sox2 Zellen im Vergleich: In dieser Untersuchung wurde gezeigt, dass die HN WT Zellen schneller konfluieren als die HN-Sox2 Zellen. Bereits nach 48h war der Scratch nicht mehr erkennbar, wohingegen bei den HN-Sox2 Zellen noch 27% des Scratches nicht bewachsen waren.

4.3. Untersuchung von TGF- β und dem extrazellulären Matrixprotein Fibronectin als Einflussfaktor bei der Onkogenese und Metastasierung des oralen Plattenepithelkarzinoms

4.3.1. Expression des extrazellulären Matrixproteins Fibronectin und TGF- β in Tumorgeweben

Im Fokus dieser Arbeit stand weiterhin die Analyse des Einflusses von TGF- β und dem extrazellulären Matrixprotein Fibronectin (FN) auf das Wachstums- und Migrationsverhalten oraler Karzinomzellen. Hierfür wurden HN WT, HN-CHD4 und HN-Sox2 vergleichend untersucht.

Zunächst wurde die Expression von TGF- β in immunhistochemischen Untersuchungen mit dem histomorphologischen Bild der Karzinominvasion vergleichend analysiert. Die Probenakquise erfolgte analog zu den vorherigen immunhistochemischen Untersuchungen.

Hierbei zeigte sich eine verstärkte Expression des Markers im Bereich der Invasionsgrenze im Vergleich zu gesundem Gewebe. Die Färbung war im Zytosol lokalisiert (Abb. 25).

Eine unspezifische Bindung konnte ausgeschlossen werden.

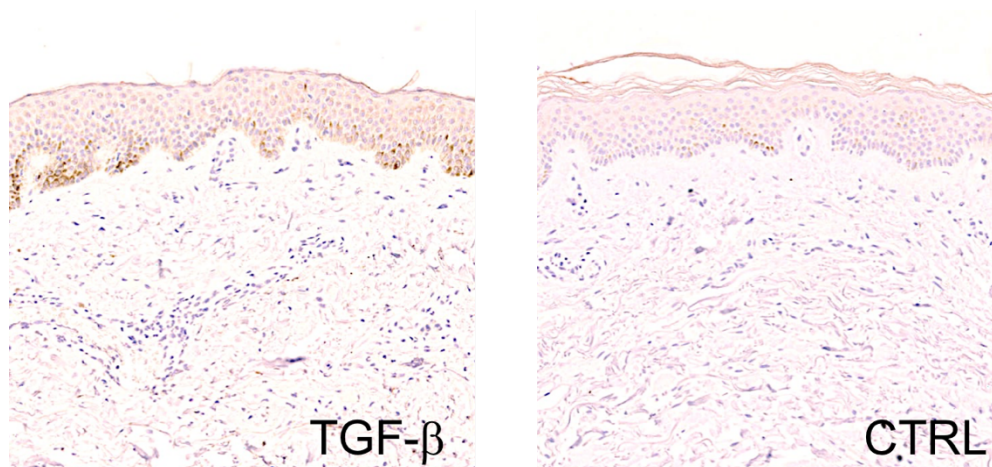


Abbildung 25: Immunhistochemische Darstellung des Zytokins TGF- β

4.3.2. Einfluss der Stimulanzen TGF- β und Fibronektin auf die Expression des Integrins $\alpha\beta 6$ und Validierung der Ergebnisse mittels Invasions- und Migrationsversuchen

In Zellkulturstudien wurden Karzinomzellen (HN WT und HN-CHD4) mit rekombinantem TGF- β und Fibronektin stimuliert und der Einfluss auf die Expression von Integrin $\alpha\beta 6$ semi-quantitativ mittels qRT-PCR und Western Blot untersucht.

Die Stimulation der Karzinomzellen führte in der qRT-PCR zu einer Induktion der Integrin $\alpha\beta 6$ Expression und zu einer Aktivierung der Integrin-assoziierten Signalkaskaden (Abb. 26).

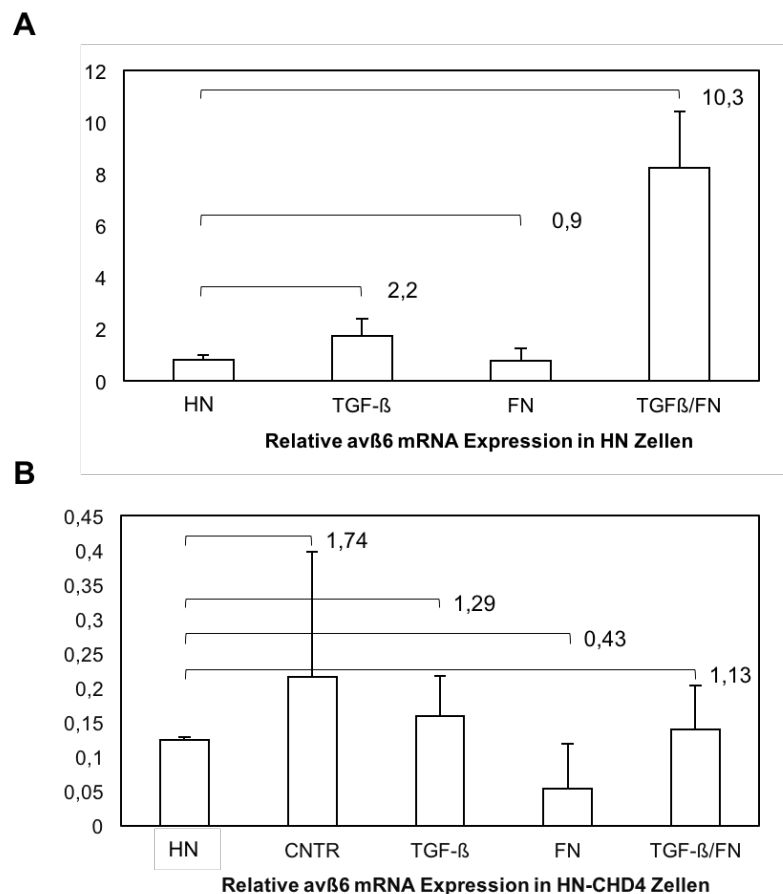


Abbildung 26:

A Relative Expression des Integrins $\alpha\beta 6$ in stimulierten und unstimulierten Tumorzellen (HN WT). Die Stimulation der Karzinomzellen mit TGF- β zeigte eine

2,19-fach gesteigerte Expression von $\alpha\beta6$. Eine Stimulation mit Fibronectin zeigte einen geringen Einfluss auf die Expression des Integrins. Den stärksten Einfluss zeigte eine Doppelstimulation, was zu einer 10,3-fach gesteigerten $\alpha\beta6$ Expression führte.

B *Relative Expression des Integrins $\alpha\beta6$ in stimulierten und unstimulierten Tumorzellen (HN-CHD4). Die CHD4 überexprimierenden Karzinomzellen zeigten eine 1,74-fach gesteigerte basale Expression von $\alpha\beta6$. Eine Stimulation der Zellen mittels TGF- β führte zu einer 1,29-fach gesteigerten $\alpha\beta6$ Expression im Vergleich zu HN WT Zellen. Die Stimulation mit Fibronectin zeigte keine Steigerung der Integrinexpression. Eine Doppelstimulation führte zu einer 1,13-fach gesteigerten $\alpha\beta6$ Expression.*

Mittels Western Blot Analysen erfolgte eine Validierung der Expression von $\alpha\beta6$ in stimulierten Tumorzellen auf Proteinebene.

Diese wurde analog zu den vorherigen Untersuchungen auf das Haushaltsgen GAPDH normalisiert.

Die Zellen wurden mit Hilfe eines Lysepuffers gelöst und mit SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Anschließend wurde $\alpha\beta6$ im Western Blot untersucht. Hierbei wurde erneut die Überexpression von $\alpha\beta6$ sowohl in den stimulierten HN WT Zellen als auch in den HN-CHD4 Zellen bestätigt (Abb. 27). Durch funktionelle Zellkulturstudien wurden die Ergebnisse für stimulierte HN WT Zellen mittels Migrationsversuchen validiert. Durch Stimulation der Karzinomzellen wurde eine gesteigerte Migration der oralen Plattenepithelkarzinomzellen beobachtet. (Abb. 28). Eine Doppelstimulation zeigte hierbei ebenfalls den stärksten Effekt auf die Karzinomzellmigration. Die Migrationsgeschwindigkeit war unter einer Doppelstimulation der HN Zellen 3,8-fach im Vergleich zu den HN WT Zellen gesteigert. Eine alleinige Stimulation mit Fibronectin bewirkte eine 2,2-fache Steigerung der Migration und die Stimulation mit TGF- β führte zu einer 2,4-fachen Steigerung.

Es konnte hierdurch bestätigt werden, dass eine vermehrte Expression von Integrin $\alpha\beta6$ mit einem gesteigerten Invasions- und Migrationsverhalten korrelierte.

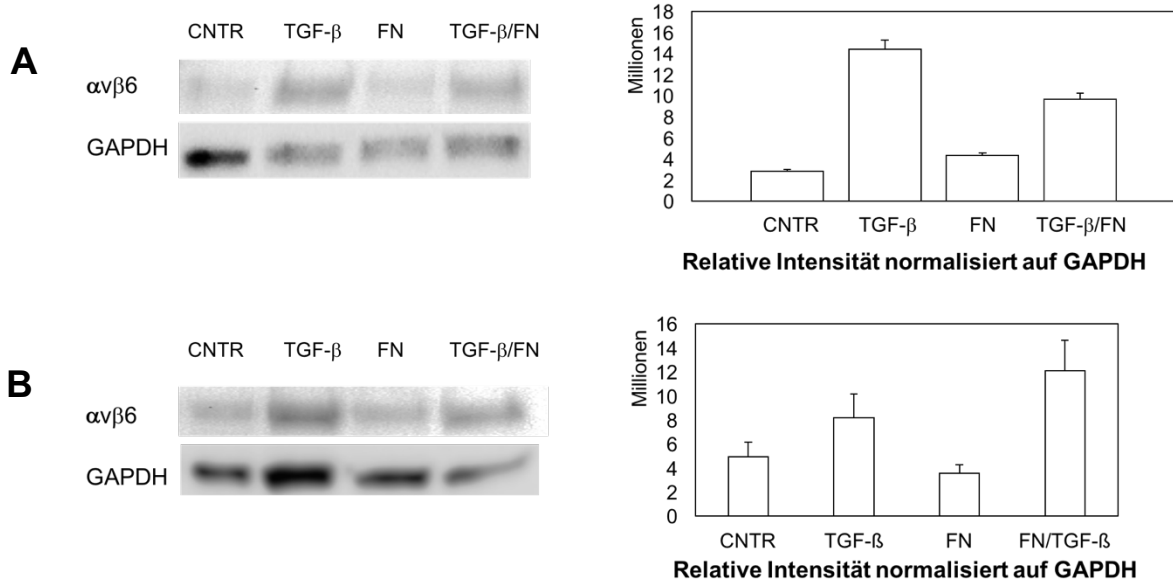


Abbildung 27: Vergleichende Western Blot Analyse.

A Expression von $\alpha\beta6$ in stimulierten HN WT Zellen

B Expression von $\alpha\beta6$ in HN-CHD4 Zellen.

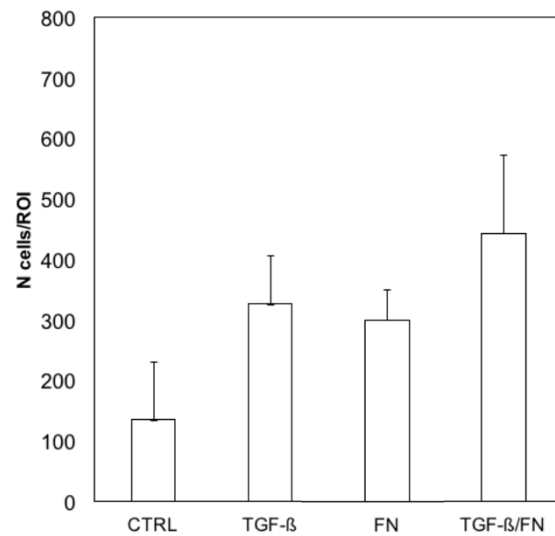


Abbildung 28: Migrations Assay: Stimulation der HN WT Zellen für 12h mit FN/TGF-β induziert die Invasion und Migration der Zellen. Die Stimulation der Karzinomzellen führte zu einer Induktion der Integrin $\alpha\beta6$ Expression und Aktivierung der Integrin-assoziierten Signalkaskaden. Dies führte zu einem gesteigerten Migrationsverhalten der Zellen.

4.4. Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend lassen sich folgende Ergebnisse aus den Untersuchungen ableiten, welche im nächsten Abschnitt diskutiert werden:

Einfluss der ATPase-Untereinheit CHD4 des NuRD-Komplexes auf das Stammzellpotential und Wachstumsverhalten oraler Karzinomzellen und Auswirkungen auf die Expression von $\alpha v\beta 6$:

- Die ATPase CHD4 und das Integrin $\alpha v\beta 6$ wurden verstärkt in oralen Plattenepithelkarzinomzellen nachgewiesen
- Mittels Western blot, qRT-PCR und Immunfluoreszenzzytologie wurde eine Überexpression von CHD4 in oralen Karzinomzelllinien im Vergleich zu wild-typ Karzinomzellen gezeigt
- CHD4-transfizierte Zellen zeigten eine veränderte Morphologie und ein gesteigertes Migrations- und Invasionsverhalten
- Die mRNA und Proteinexpression des Invasions-assoziierten Integrins $\alpha v\beta 6$ korrelierte mit der veränderten Morphologie der CHD4-transfizierten Karzinomzellen

Einfluss der ATPase-Untereinheit CHD4 auf die Expression des Stammzellmarkers Sox2:

- Immunhistochemisch konnte eine räumliche und zeitliche Co-expression von CHD4 und Sox2 im Bereich der Invasionsgrenze oraler Plattenepithelkarzinome nachgewiesen werden
- Es zeigte sich ein dosisabhängiger Effekt der CHD4-Überexpression auf die Sox2 Expression
- Hohe CHD4 Expressionslevel sind mit einer Reduktion der Sox2 Expression assoziiert
- Zellen mit einem hohen Sox2 Expressionslevel zeigten ein vermindertes Migrations- und Invasionsverhalten

Untersuchung von TGF- β und dem extrazellulären Matrixprotein Fibronectin als Einflussfaktor bei der Onkogenese und Metastasierung des oralen Plattenepithelkarzinoms:

- TGF- β und das Invasions-assoziierte Integrin $\alpha v \beta 6$ sind im Bereich der Invasionsfront co-exprimiert
- HN-CHD4 Zellen zeigten eine veränderte Reaktion auf extrazelluläre Stimulation mit TGF- β und FN. Dies zeigt eine Integration der integrin-vermittelten Signaltransduktion auf Chromatinebene
- Die stimulierten Zellen zeigten ein verstärktes Migrations- und Invasionsverhalten
- Den stärksten Effekt zeigte eine Doppelstimulation mit TGF- β und Fibronectin

5. Diskussion

Entwicklungsbiologische Prozesse und molekulare Veränderungen oraler Plattenepithelkarzinome, welche zu einem Fortschreiten der Karzinogenese führen, sind bis dato nicht hinreichend charakterisiert.

Veränderte Expressionsprofile können insbesondere die Invasion und Migration der Karzinomzellen beeinflussen.

Aus diesem Grund steht die Identifikation der molekularen Veränderungen im Zentrum onkologischer Forschung. Die hierdurch gewonnenen Erkenntnisse können einen möglichen Ansatzpunkt für verbesserte diagnostische und therapeutische Methoden sein (Schmezer and Plass 2008).

Ein Ziel dieser Studie war die Identifikation der Rolle der ATPase-Untereinheit CHD4 des NuRD-Komplexes. Im Fokus stand die Analyse des Einflusses einer CHD4 Überexpression auf das EMT-assoziierte Integrin $\alpha v \beta 6$. Weiterhin wurde der Einfluss von CHD4 auf die Expression des Stammzellfaktors Sox2 untersucht.

Ebenfalls Ziel der Studie war die Analyse des Einflusses von TGF- β und des extrazellulären Matrixproteins Fibronectin auf die Expression von $\alpha v \beta 6$ und das Migrationsverhalten oraler Karzinomzellen.

Hierzu wurden in-vitro Zellkulturstudien mit Zellen des oralen Plattenepithelkarzinoms (HN) durchgeführt. Es zeigte sich ein Zusammenhang zwischen einer gesteigerten Expression von CHD4 und einer Induktion der Integrin $\alpha v \beta 6$ Expression. Es konnte bestätigt werden, dass eine erhöhte Expression der ATPase CHD4 und einer konsekutiv erhöhten Expression des Invasions-assoziierten Integrins $\alpha v \beta 6$ mit einem gesteigerten Migrations- und Invasionsverhalten der Karzinomzellen korrelierte.

Weiterhin zeigte sich ein variabler, dosisabhängiger Effekt der CHD4 Überexpression auf die Sox2 Expression. Eine Überexpression der ATPase CHD4 des NuRD-Komplexes in HN-CHD4 Zellen führt zu einer stabilen Induktion der Sox2 Expression. Diese ist, in Abhängigkeit erhöhter CHD4

Expressionslevel, dosisabhängig limitiert und führte konsekutiv zur Reduktion der Sox2 Expression.

Eine Stimulation der Karzinomzellen mittels TGF- β und Fibronektin führte zu einer gesteigerten Integrin $\alpha v \beta 6$ Expression und einem verstärkten Migrationsverhalten der Zellen.

Diese Arbeit dient dem genaueren Verständnis der epigenetischen Veränderungen im Rahmen des Prozesses der Onkogenese und Karzinomzellmigration und wird im Folgenden kritisch beurteilt.

5.1. Methodik

Die in dieser Untersuchung gewählten Methoden und Techniken basierten alle auf gängigen Methoden der biologischen Grundlagenforschung wie Immunhistochemie, qRT-PCR oder Western Blot. Um sie an unsere Anforderungen anzupassen, wurden optimale Verdünnungen der eingesetzten Antikörper zuvor ausgetestet und standardisierte Protokolle zur Durchführung der Experimente erstellt. Dies dient der Minimierung von Fehlerquellen und weiterhin dem Erhalt reproduzierbarer Ergebnisse.

Im Rahmen der einzelnen angewandten Techniken müssen einige Aspekte kritisch beurteilt werden. Dies wird im Folgenden dargelegt.

5.1.1. Zellkultur und Plasmidtransfektion

Im Rahmen dieser Studie wurden experimentelle Zellkulturstudien durchgeführt. Die Versuche erfolgten auf der Basis von oralen Plattenepithelkarzinomzellen (HN).

Um reproduzierbare und valide Ergebnisse zu erzielen, galt es gewisse Standards einzuhalten und übliche Fehler zu vermeiden.

Die Zellen wurden unter standardisierten Bedingungen kultiviert und dienten für weiterführende in-vitro Untersuchungen.

(Karzinom-)Zelllinien sind für in-vitro Untersuchungen weit verbreitet, da sie relativ leicht in ihrer Handhabung sind. Es handelt sich dabei um ein in-vitro

Modell, da die Zellen aus ihrem physiologischen Kontext isoliert sind. Eine direkte Relevanz in Bezug auf den Patienten muss immer mit Einschränkungen betrachtet werden, da sie oft artifiziell und immortalisiert sind und durch häufiges Passagieren einer gewissen Selektion unterzogen werden und durch ihre isolierte Kultivierung die Eigenschaften des Ursprungskarzinoms nicht genau repräsentieren (Cree, Glaysher et al. 2010). Daher müssen hierdurch gewonnene Ergebnisse noch in-vivo bestätigt werden.

Zur Analyse der Fragestellungen eignet sich das Modell der Zellkultur dennoch hervorragend. Wie bereits in Studien gezeigt wurde, können durch in-vitro Untersuchungen an Zellkulturen Schlüsselprozesse wie Wachstum, Differenzierung oder Apoptose untersucht werden. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, genetische Veränderungen vorzunehmen um Funktionen spezifischer Gene zu untersuchen. Allerdings beschrieb die Arbeitsgruppe um Cruz bereits den Nachteil, dass die Zellkultur große manipulative Möglichkeiten aufweist und in ihrem Wachstum und ihrer Teilungsfähigkeit limitiert ist (Cruz, Enes et al. 2009).

Die kultivierten Zellen wurden unseren Studien zu Nutzen gemacht und bearbeitet und mittels qRT-PCR, Western Blot, Immunfluoreszenzzytologie und weiteren Untersuchungen analysiert.

Zellkulturen sind einfach zu kultivieren, wachsen schnell und generieren reproduzierbare Ergebnisse (Cree 2010). Essentiell für die Erlangung validierbarer Ergebnisse ist ein standardisiertes Protokoll der Zusätze, Kulturbedingungen und Handhabung der Zellen. Eine weitere Herausforderung stellt vor allem die sterile Kultivierung der Zellen dar, um Infektionen zu vermeiden. Ziel unserer Versuche war es, die Zellen ohne den Zusatz von Antibiotika zu kultivieren um weitere Störfaktoren zu eliminieren. Um bei der gleichzeitigen Kultivierung zweier Zelllinien eine Verwechslungsgefahr zu minimieren, wurden die Zellkulturflaschen, -platten- und -gefäße akribisch beschriftet.

Ein Hauptaugenmerk dieser Studie lag auf der Überexprimierung von CHD4. Diese erfolgte nach dem Prinzip der Transfektion via Lipofektion.

Die Plasmidtransfektion stellt eine gute Methode dar, die Funktion von Genen und Genprodukten in der Zelle zu untersuchen (Kim and Eberwine 2010), da die spontane Aufnahme von DNA in eukaryotische Zellen und eine konsekutive Expression im Nukleolus ein sehr ineffizienter Prozess ist (Felgner, Gadek et al. 1987). Unterschieden wird zwischen einer transienten und einer stabilen Transfektion. Bei der transienten Transfektion handelt es sich um ein zeitweises Einbringen eines Plasmids in eine Zelle. Die transfizierten Gene werden nur für einen gewissen Zeitraum exprimiert und gehen durch äußere Einflüsse oder auch die Zellteilung verloren (Chung, Parker et al. 2006).

Für die geplanten Analysen schien diese Form der Transfektion ungeeignet, da ein längerfristiger Einfluss auf die Karzinomzellmigration und -invasion untersucht werden sollte. Daher wurde das Verfahren der stabilen Transfektion gewählt.

Hierbei handelt es sich um das dauerhafte Einbringen von DNA in das Genom der Zelle.

Man unterscheidet verschiedene Möglichkeiten der stabilen Transfektion. Zum einen die biologische Methode, zu welcher die Lipofektion zählt, zum anderen chemische oder auch physikalische Methoden (Chung, Parker et al. 2006).

Da die chemische oder physikalische Methode leicht durch Störfaktoren beeinflussbar, zelltoxisch, schlecht reproduzierbar und oft ineffizient ist (Felgner, Gadek et al. 1987), wurde für die vorliegende Studie die Methode der Lipofektion gewählt. Hierbei interagieren Liposomen mit DNA und der Zellmembran. Die Liposomen verbinden sich spontan mit dem Plasmid und fusionieren mit der Zellmembran. Somit wird der Transfektionskomplex durch Endozytose in die Zelle aufgenommen. Es stellt eine simple, effektive, reproduzierbare und effizientere Methode dar (Felgner, Gadek et al. 1987).

Ein möglicher Nachteil der Methode ist, dass sie nicht bei allen Zelltypen durchführbar ist.

Im Falle der untersuchten HN Zellen war dies jedoch mit dem experimentell optimierten Verhältnis zwischen DNA und Lipofektamin möglich.

Zuvor wurde die Methode von unterschiedlichen Arbeitsgruppen für verschiedene Untersuchungen genutzt. Unter anderem haben Arbeitsgruppen

wie die Gruppe um Huang 2013 die Methode der Transfektion mittels Lipofektion verwendet, um den Einfluss der EMT bei der renalen Fibrose zu untersuchen (Huang, Liu et al. 2013).

Die Arbeitsgruppe um Bayo untersuchte mit Hilfe der Transfektion die Sox2 Expression und die Auswirkung einer verminderten Expression von Sox2 als möglichen Risikofaktor bei Kopf-Hals-Karzinompatienten (Bayo, Jou et al. 2015). Nach dem Studium verschiedener Literatur schien die Methode geeignet zu sein, um die Untersuchung spezifischer Faktoren der EMT und des Stammzellpotentials oraler Karzinomzellen durch Überexpression durchzuführen und den Einfluss auf das Verhalten oraler Karzinomzellen abzuzeichnen.

Im Fokus der vorliegenden Untersuchung stand die Überexpression der ATPase CHD4 und des Stammzellmarkers Sox2 und die Anfertigung eines anschließenden Genexpressionsprofils. Durch die abschließende Validierung der Ergebnisse mittels Migrations- und Invasionsassays lassen sich Aussagen hinsichtlich der Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten der transfizierten Zellen treffen.

Das Konzentrationsverhältnis von Lipid zu Nukleinsäure ist von Zelle zu Zelle variabel und muss vorher ausgetestet werden, um ein reproduzierbares Protokoll zu etablieren (Felgner, Gadek et al. 1987). In dieser Untersuchung wurden die besten Ergebnisse bei einer Konzentration von 5µg DNA und 3,75µg Lipofectamine® 3000 bei beiden Plasmidtransfektionen erzielt.

5.1.2. Nachweis der Überexpression und Einfluss auf die Expression von $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ mittels Immunfluoreszenzzytologie, qRT-PCR und Western Blot

Um die Auswirkungen einer Überexpression von CHD4 und Sox2 auf die Zelle zu untersuchen, wurden weiterführende Analysen durchgeführt. Die funktionellen Konsequenzen der Überexpression wurden mittels IFC, qRT-PCR und Western Blot analysiert.

5.1.2.1. Immunfluoreszenzzytologie

Bei der Methode der Immunfluoreszenzzytologie handelt es sich um eine Technik, um die Lokalisation von Antigenen oder Proteinen durch Antikörper zu visualisieren (Marchenko and Flanagan 2007). Sie basiert auf dem Prinzip, dass der Erstantikörper mit dem Antigen interagiert und der Zweitantikörper zur Visualisierung dieses Komplexes mittel konfokalem Mikroskop genutzt wird. Wichtig bei dieser Methode sind Kontrollen, um unspezifische Bindungen der Antikörper oder Autofluoreszenz zu vermeiden (Burry 2011).

Sie ist eine gute Methode, um die Überexpression von CHD4 in den Zellen sichtbar zu machen und die Wirkung der Transfektion zu validieren.

Eine Herausforderung stellen die verschiedenen Methoden und Protokolle zum Einsatz der Antikörper dar, welche dazu führten, dass die ideale Konzentration experimentell ermittelt werden musste und ein standardisiertes Protokoll zum Einsatz der Antikörper erstellt wurde (Burry 2011).

5.1.2.2. Quantitative real-time PCR

Die Methode der PCR wurde 1983 durch Dr. Kary Mullis entwickelt und etabliert (Mullis, Faloona et al. 1986). Das Grundprinzip blieb bestehen, doch sind bis heute einige Verbesserungen der Verfahren, wie die Real-Time-PCR hinzugekommen. Die Technik beruht darauf, dass man durch den Nachweis von RNA qualitativ bestimmte Gene in der Zelle darstellen kann. Vor der Polymerase-Kettenreaktion wird der Schritt der reversen Transkriptase vorgeschaltet zur Synthese der komplementären cDNA.

Um Nukleinsäuren nachzuweisen und zu quantifizieren, hat sich das Verfahren der Real-time PCR etabliert (Yilmaz 2012).

Der quantitative Nachweis von spezifischen Genexpressionen ist wesentlich, um basale zelluläre Mechanismen zu verstehen und Genexpressionsänderungen z.B. nach Stimulation nachzuweisen (Yilmaz 2012).

Es handelt sich hierbei um die sensitivste Methode zum Nachweis und zur Quantifizierung niedriger Mengen mRNA (Bustin 2000, Nolan, Hands et al. 2006).

Limitierenden Einfluss bei dieser Untersuchung kann eine mögliche Variabilität zwischen den Proben, Unterschiede hinsichtlich des Versuchsaufbaus und der Durchführung oder eine nicht standardisierte Normalisierung haben (Nolan, Hands et al. 2006).

Die PCR ist allerdings nur eine Momentaufnahme der Informationen zur Quantität der Transkription innerhalb einer Zelle und bedarf weiteren Untersuchungen, wie unter anderem der Proteinbestimmung (Nolan, Hands et al. 2006).

In dieser Studie wurde die Methode der qRT-PCR genutzt, um die Transfektionseffizienz zu validieren, die Konsequenzen einer Überexpression von CHD4 auf die Expression von $\alpha v \beta 6$ zu untersuchen und auch um die Auswirkungen der Stimulation mittels FN und TGF- β auf die Expression von $\alpha v \beta 6$ zu analysieren.

5.1.2.3. Western Blot

Um eine erhöhte Expression von CHD4 oder $\alpha v \beta 6$ als funktionelles Protein nachzuweisen, ist die PCR alleine nicht ausreichend. Es fehlt ein Nachweis auf Proteinebene.

Hierzu eignet sich die Technik des Western Blots. Diese erlaubt eine Quantifizierung der Proteinexpression (Mahmood and Yang 2012).

Der Western Blot ist eine wichtige Methode der Zell- und Molekularbiologie. Der Proteinnachweis basiert auf drei Hauptelementen: der Aufteilung nach der Proteingröße, dem Transfer auf eine solide Membran und der Visualisierung der Zielproteine durch Primär- und Sekundärantikörper (Mahmood and Yang 2012).

Auch wenn die Methode des Western Blots einfach erscheint, gibt es mögliche Problempunkte wie unerwartete Banden, keine Banden, zu schwache Signale, ein starker Hintergrund oder Flecken auf dem Blot. Gründe können unspezifische Bindungen der Antikörper an die Membran oder zu geringes Blocken unspezifischer Proteinbindungen an die Membran sein. Daher ist es von großer Wichtigkeit, ein genaues und reproduzierbares Protokoll zu etablieren und die ideale Antikörperkonzentration für die Visualisierung der Proteinbanden auszutesten.

5.1.3. Validierung der Ergebnisse mittels Invasions- und Migrationsassays

Motilität ist ein typisches Charakteristikum lebender Zellen. Zellmigration ist involviert bei der Embryonalentwicklung, Immunantwort, pathologischen Prozessen wie Metastasierung oder auch Entzündungen.

Da die Metastasierung bei Karzinompatienten die Haupttodesursache darstellt, rückt die Untersuchung von Zellmigration und –invasion zunehmend in den Fokus onkologischer Forschung.

Eine Voraussetzung für die Ausbreitung von Karzinomzellen durch den Körper ist die Passage der extrazellulären Matrix und somit die Überschreitung der Basalmembran (Justus, Leffler et al. 2014).

Um die funktionellen Konsequenzen der Überexpression von CHD4 und die damit einhergehende erhöhte Expression von $\alpha v\beta 6$ auf die Zellmigration und -invasion zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Studie Scratch Assays und Invasionsassays durchgeführt.

Scratch Assays sind eine einfache, kostengünstige und gut entwickelte Methode, um Zellmigration in vitro zu quantifizieren. Die Arbeitsschritte umfassen einen Scratch in einem Zellmonolayer und Aufnahmen zu Beginn und zu festgelegten Intervallzeitpunkten während der Zellwanderung, um die Migrationsrate der Zellen zu quantifizieren. Diese Methode ist geeignet, um Zell-Zell-Interaktionen, und Zell-Matrix-Interaktionen während der Wundheilung oder Karzinominvasion, simuliert durch den Scratch im Monolayer der Zellen, zu untersuchen. Die Methode basiert auf der Beobachtung, dass Zellen versuchen, in den nicht besiedelten Anteil der Kulturschale zu migrieren. Weiterhin lässt sich diese Methode erweitern, indem man genetisch veränderte und/oder stimulierte Zellen untersucht. Nachteile dieser Untersuchungsmethode sind, dass man keinen Konzentrationsgradienten hat, relativ lange für diese Untersuchung braucht und die Ergebnisse stark vom Zustand der Zellen abhängen. Weiterhin braucht man gut wachsende Zellen, um einen konfluenten Monolayer zu entwickeln. Vorteile

sind, dass man kein spezielles Equipment braucht und der Versuch relativ leicht durchführbar ist (Liang, Park et al. 2007).

Beim *Invasionsassay* handelt es sich um einen quantitativen in-vitro Zellinvasionsassay. Gewöhnlich basiert er auf dem Prinzip der Boyden Chamber/dem Boyden Assay System. Kommerziell erwerbliche Transwell Inserts für Multiwell-Platten, welche eine zell-permeable Membran enthalten, wurden für diese Untersuchung eingesetzt. Dadurch ist die Durchführung genauer und replizierbarer Invasionsassays möglich. Durch die Platzierung der Transwell-Plates in einer Zellkulturplatte entsteht ein 2-Kammern-System, welches durch die Membran separiert wird. Die Zellen werden auf einer Seite der Membran platziert und die Invasion wird quantifiziert durch Färbung und Zählung der Zellen, welche die permeable Membran passiert haben (Marshall 2011).

Eine Limitierung dieser Methode stellt dar, dass es schwierig ist, einen Zeitverlauf durch ein konventionelles Mikroskop darzustellen (Justus, Leffler et al. 2014).

Bei beiden Methoden ist es wichtig, dass die Charakteristika der Zelle im Vorherein untersucht werden, sodass ein spezifisches Zeitfenster zur Untersuchung gewählt werden kann (Justus, Leffler et al. 2014).

5.1.4. Stimulation von Karzinomzellen und Transfektanten

Um den Einfluss der extrazellulären Matrix, im speziellen Fibronectin und des Induktors der EMT TGF- β auf das Wachstumsverhalten oraler Karzinomzellen zu untersuchen und mögliche funktionelle Konsequenzen abzuzeichnen, wurden in Zellkulturstudien die Karzinomzellen (HN, BHY) mit TGF- β und Fibronectin stimuliert und der Einfluss auf die Expression von $\alpha v \beta 6$ untersucht.

Diese Methode ermöglicht es, das Ansprechen der Zellen auf die Stimulanzen zu untersuchen (Rognoni 2014). Hierdurch können sowohl die direkten Auswirkungen beobachtet, als auch Langzeitauswirkungen auf die Zellproliferation untersucht werden.

Wichtig war ein einheitliches Protokoll, um reproduzierbare und vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Dieses wurde durch Austestung verschiedener Methoden erstellt.

5.2. Einfluss der ATPase-Untereinheit CHD4 des NuRD-Komplexes auf das Stammzellpotential und Invasionsverhalten oraler Plattenepithelkarzinomzellen und die Expression von $\alpha\text{v}\beta\text{6}$

Ziel dieser Arbeit war es, das Stammzellpotential oraler Karzinomzellen tiefergehend zu charakterisieren. Im Fokus der Untersuchung stand hierbei die molekularbiologische Untersuchung des Einflusses von CHD4 des NuRD-Komplexes auf die Expression des Invasions-assoziierten Integrins $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ und somit auf das Wachstumsverhalten oraler Karzinomzellen.

Mit dem Progress der Karzinogenese und Tumorinvasion sind molekularbiologische Alterationen assoziiert.

Im Rahmen der onkologischen Forschung rückt der Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition EMT zunehmend in den Fokus.

Besonders spezifisch veränderten Proteinexpressionsmustern im Rahmen des Prozesses der EMT wird hierbei eine bedeutende Rolle zugeschrieben (Thiery 2002, Chung, Parker et al. 2006).

Hierbei handelt es sich um einen Prozess im Rahmen der Embryogenese, bei dem Zellen die Fähigkeit besitzen, von einem epithelialen zu einem mesenchymalen Phänotyp zu wechseln. Die EMT spielt eine wichtige Rolle im Rahmen der Karzinogenese und Progression verschiedener Karzinomentitäten. Eine Assoziation zur Tumorprogression und Metastasierung des oralen Plattenepithelkarzinoms wird ebenfalls vermutet.

Anfangsstadien dieses Prozesses sind gekennzeichnet durch einen Verlust der epithelialen Polarität und Differenzierungsmarkern der Zellen und durch einen Zugewinn an mesenchymalen Markern. Sie ermöglicht den Zellen die Interaktion

mit Stromazellen und die Invasion in das umliegende Gewebe, oder auch den Blutkreislauf und somit die Migration von ihrem Ursprungsort (Fu, Qin et al. 2011). Neben genetischen Veränderungen sind auch epigenetische Regulationsmechanismen der Genexpression bei den koordinierten Veränderungen auf Chromatinebene maßgeblich, um das biologische Verhalten von Zellen im Rahmen der EMT zu verstehen.

Ein epigenetischer Mechanismus ist die kovalente Modifikation N-terminaler Histonden und die ATP-abhängige Remodellierung der Chromatinstruktur. Ein zentraler Multiproteinkomplex, welcher diesen Mechanismus vermittelt, ist der NuRD-Komplex. Die Arbeit widmete sich der Frage, ob und wie die ATPase-Untereinheit CHD4 des NuRD-Komplexes Einfluss auf den Prozess der EMT nimmt.

Der NuRD-Komplex beinhaltet zwei wesentliche funktionelle Untereinheiten, die Histondeacetylase (HDAC 1/2) und chromatin-remodellierende-ATPase CHD4 (Denslow and Wade 2007).

Es zeigte sich, dass die Umgebung und das transkriptionelle Programm des jeweiligen Zelltyps zur Erscheinungsform des NuRD-Komplexes beiträgt und seine Aktivität modifiziert. Wie und ob der NuRD-Komplex zum Prozess der Tumorgenese beiträgt, ist abhängig vom jeweiligen Zelltyp (Lai and Wade 2011). Der CHD4/NuRD-Komplex wird in nahezu allen humanen Geweben exprimiert (Denslow and Wade 2007).

Ein Zusammenhang zwischen der ATPase CHD4 und der EMT im Rahmen der Onkogenese und Metastasierung verschiedener Karzinomentitäten, wie zum Beispiel dem Mammakarzinom, wurde in der Literatur bereits beschrieben (D'Alesio, Punzi et al. 2016).

Die Arbeitsgruppe um Xia 2017 zeigte, dass CHD4 eine Rolle im Rahmen der Tumorentstehung und Unterdrückung von Tumorsuppressorgenen im Rahmen des Colonkarzinoms spielt und somit zum Wachstum des Tumors beiträgt (Xia, Huang et al. 2017).

In Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Xu zum nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom konnte 2016 gezeigt werden, dass CHD4 eine Rolle im Rahmen

der Onkogenese spielt und im Vergleich zum gesunden Gewebe überexprimiert war. Diese Studie zeigte auch, dass eine Inhibition von CHD4 die Proliferation reduziert und die Apoptoserate steigerte. Im Rahmen des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms bestehen bereits mögliche therapeutische Ansätze (Xu, Liu et al. 2016).

Auf Grund des Zusammenhangs zwischen der EMT und der Onkogenese zahlreicher Karzinomentitäten und der essentiellen Rolle der ATPase CHD4 im Rahmen dieses Prozesses, lässt sich auch ein Zusammenhang zum oralen Plattenepithelkarzinom vermuten.

Mittels immunhistochemischen Untersuchungen konnte in dieser Studie eine Expression von CHD4 in Gewebeproben des oralen Plattenepithelkarzinoms nachgewiesen werden.

Eine verstärkte Expression lag besonders im Bereich der epithelial-mesenchymalen Grenze vor, was auf eine gesteigerte Expression im Bereich der Invasionsfront hinweisend ist.

Um einen Einfluss auf die Karzinomprogression, Invasion und Metastasierung untersuchen zu können, wurden weiterführende Zellkulturstudien durchgeführt und eine gesteigerte Expression via Plasmidtransfektion mit der Expression des Invasions-assoziierten Integrins $\alpha v \beta 6$ korreliert.

Bei dem Integrin $\alpha v \beta 6$ handelt es sich um ein epithelspezifisches Integrin, welches ein Dimer aus einer α - und einer β -Untereinheit besteht. Es bildet einen Rezeptor für spezielle extrazelluläre Matrixproteine und wird nur in epithelialen Zelltypen exprimiert (Bandyopadhyay and Raghavan 2009).

Bekannt ist, dass $\alpha v \beta 6$ in gesundem adultem Epithel herunterreguliert wird und während Prozessen der Wundheilung und Kanzerogenese oder Entwicklungsprozessen verstärkt exprimiert ist.

Weiterhin soll $\alpha v \beta 6$ die Invasion modulieren, die Apoptose inhibieren, die Expression von MMPs regulieren und TGF- β aktivieren (Breuss, Gallo et al. 1995, Bandyopadhyay and Raghavan 2009, Bandyopadhyay and Raghavan 2009).

Dies zeigte unter anderem die Arbeit von Thomas 2001, in welcher beschrieben wurde, dass eine erhöhte $\alpha v\beta 6$ Expression zu einer verstärkten Expression der MMP-9 und -2 bei Plattenepithelkarzinomen führt und somit deren Karzinominvasion und Migration fördert (Thomas, Lewis et al. 2001).

Integrin $\alpha v\beta 6$ wird bereits eine positive Rolle bei dem Prozess der Invasion und Progression des oralen Plattenepithelkarzinoms zugeschrieben und ist weiterhin assoziiert mit einem schlechteren Outcome und einer schlechteren Prognose für Patienten mit bestimmten Karzinomtypen, wie z.B. dem Colonkarzinom (Bates 2005, Thomas, Nystrom et al. 2006, Bandyopadhyay and Raghavan 2009). In dieser Studie zeigte sich auch ein klarer Zusammenhang zwischen einer erhöhten Expression von $\alpha v\beta 6$ und dem Prozess der EMT und es wurden neue therapeutische Ansätze im Bereich des Colonkarzinoms beschrieben (Bates 2005).

$\alpha v\beta 6$ ist weiterhin in verschiedenen Karzinomentitäten wie Brustkrebs, Lungenkrebs, dem oralen Plattenepithelkarzinom, dem spinözellulären Karzinom oder Ovarialkarzinomen hochreguliert (Ahmed, Pansino et al. 2002, Bandyopadhyay and Raghavan 2009).

Eine weitere Arbeit der Gruppe um Ramsay untersuchte 2007 verschiedene orale Plattenepithelkarzinomzelllinien mit unterschiedlichen $\alpha v\beta 6$ -Expressionsleveln und zeigte, dass eine verstärkte Tumorprogression mit einer verstärkten Expression von $\alpha v\beta 6$ assoziiert ist und zur Zellmotilität und Invasivität beiträgt (Ramsay, Keppler et al. 2007).

Eine vermehrte Expression von $\alpha v\beta 6$ konnte in Bezug auf verschiedene Karzinomentitäten bereits mit einer schlechteren Prognose korreliert werden (Thomas, Nystrom et al. 2006, Bandyopadhyay and Raghavan 2009).

Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass $\alpha v\beta 6$ eine Rolle bei der Tumorprogression, -migration und -invasion des oralen Plattenepithelkarzinoms spielt. Eine verstärkte Expression dieses Integrins lässt somit auf ein gesteigertes Migrations- und Invasionsverhalten der Plattenepithelkarzinomzellen schließen.

Um den Einfluss der CHD4 Expression auf die Invasion und den Prozess der EMT zu analysieren, habe ich die Expression von $\alpha v\beta 6$ als Marker in CHD4-überexprimierenden Karzinomzelltransfektanten analysiert.

Eine verstärkte Expression von $\alpha v\beta 6$ und CHD4 in Gewebeproben des oralen Plattenepithelkarzinoms konnte besonders im Bereich der epithelial-mesenchymalen Grenze aufgezeigt werden.

Sie werden somit besonders im Bereich der Invasionsfront exprimiert und sind räumlich und zeitlich co-exprimiert.

Mittels Western Blot und qRT-PCR wurde zudem die Expression von CHD4 und $\alpha v\beta 6$ in oralen Karzinomzelllinien (HN) bestätigt.

Die Ergebnisse der Immunhistochemie lassen auf einen möglichen Zusammenhang zwischen CHD4 und $\alpha v\beta 6$ schließen und weisen auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen der EMT-assoziierten Signaltransduktion und der epigenetischen Integration der Signale durch Remodellierung der Chromatinstruktur hin (Nentwig, Reuning et al. 2017).

Eine Expression von $\alpha v\beta 6$ im Bereich der Invasionsfront von oralen Plattenepithelkarzinomen und auch eine Hochregulation im Rahmen oraler Leukoplakien konnte bereits beschrieben werden (Hamidi, Salo et al. 2000, Thomas, Lewis et al. 2001).

Um diesen Einfluss genauer zu untersuchen, wurde in Zellkulturstudien mittels Plasmidtransfektion CHD4 in der oralen Plattenepithelkarzinomzelllinie HN stabil überexprimiert.

Die Überexpression von CHD4 konnte mittels Immunzytochemie, qRT-PCR und im Western Blot im Vergleich zu den HN WT Zellen validiert werden. Es zeigte sich, dass eine Überexpression von CHD4 in Abhängigkeit von der Plasmidkonzentration stand.

Mit der Bestätigung der Überexpression der ATPase CHD4 des NuRD-Komplexes kann von einer Zunahme der NuRD-Funktion ausgegangen werden, welche im Rahmen der zellulären (De-)Differenzierung, Onkogenese und Metastasierung eine zentrale Rolle spielt (Fu, Qin et al. 2011, Nentwig, Reuning et al. 2017)

In weiterführenden Analysen bestätigte sich eine konsekutiv gesteigerte $\alpha v\beta 6$ -Expression in den Transfektanten im Vergleich zu den wild-typ Karzinomzellen. Durch die gesteigerte Expression von $\alpha v\beta 6$ in CHD4-überexprimierenden Zellen habe ich ein gesteigertes Invasions- und Metastasierungsverhalten postuliert.

Um diesen Zusammenhang zu validieren, habe ich abschließend Invasions- und Migrationsversuche durchgeführt, welche bestätigten, dass die Überexpression von CHD4 mit konsekutiv erhöhter Expression von $\alpha v\beta 6$ das Migrations- und Invasionsverhalten der Karzinomzellen beeinflusst. Die HN-CHD4 Zellen zeigten im Vergleich zu den HN WT Zellen ein gesteigertes Proliferationsverhalten. Diese Ergebnisse lassen sich mit Analysen anderer Arbeitsgruppen zu verschiedenen Karzinomtypen vergleichen.

Diese Ergebnisse decken sich mit Untersuchungen zu anderen Karzinomentitäten, wie zum Beispiel dem Mammakarzinom. Die Forschungsgruppe um Fu untersuchte ebenfalls die Rolle des CHD4/NuRD Komplexes im Kontext der Karzinommetastasierung des Mammakarzinoms und zeigte auch, dass der TWIST/CHD4/NuRD-Komplex eine wichtige Rolle im Prozess der Karzinommetastasierung, vor allem der Invasion und Migration spielt (Fu, Qin et al. 2011). Dies konnte durch Studien bestätigt werden, welche zudem eine zentrale Rolle von CHD4 beim Mammakarzinoms zeigten und einen möglichen Ansatzpunkt für zielgerichtete Therapien beschreiben (D'Alesio, Punzi et al. 2016).

Auch bei Patienten mit Dermatomyositis konnte eine erhöhte Rate an malignen Karzinomen und ein Zusammenhang zu CHD4 nachgewiesen werden (Zhang, LeRoy et al. 1998). Im Rahmen der Autoimmunerkrankung Dermatomyositis wurde CHD4 erstmals beschrieben und stellt ein Autoantigen dar (Zhang, LeRoy et al. 1998). Weiterhin besteht eine Verbindung zwischen CHD4 und MTA2. MTA2 ist erhöht exprimiert in schnell teilenden Zellen und assoziiert mit einer erhöhten Metastasierung. Ein Zusammenhang zwischen CHD4 und MTA2 konnte ebenfalls im Rahmen der Dermatomyositis aufgezeigt werden, was ein Hinweis auf das erhöhte Karzinomrisiko darstellen kann (Airio, Pukkala et al. 1995).

Somit wurde durch diese Arbeit erstmals eine Überexpression von CHD4 in oralen Karzinomzellen hinreichend nachgewiesen und eine verstärkte Expression von $\alpha v \beta 6$ in CHD4-überexprimierenden Karzinomzellen aufgezeigt. Durch diese Ergebnisse kann auf eine gesteigerte Invasion und Metastasierung CHD4-überexprimierender Karzinomzellen geschlossen werden (Abb. 29).

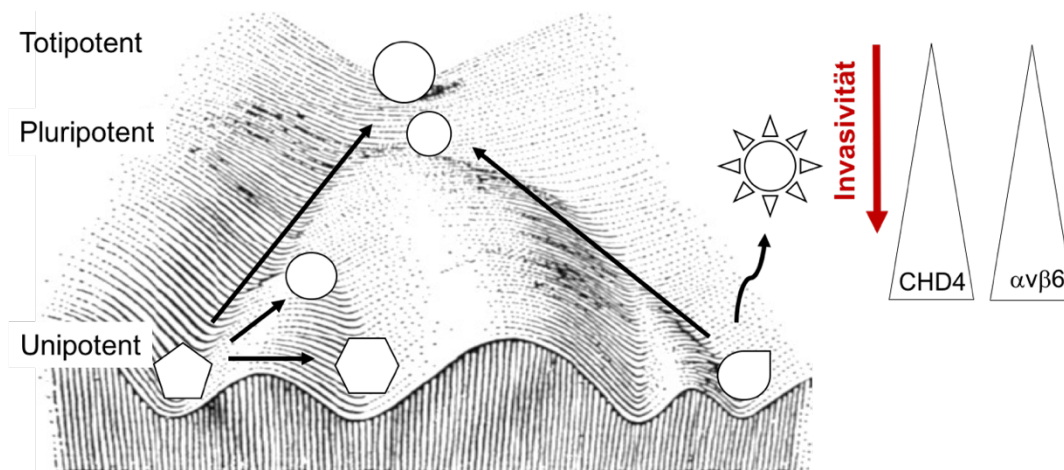


Abbildung 29: Eine Überexpression von CHD4 und eine konsekutiv erhöhte Expression von $\alpha v \beta 6$ führte in den durchgeführten Untersuchungen zu einer gesteigerten Invasion und Migration der Karzinomzellen.

Die Ergebnisse unserer Analysen bestätigen, dass CHD4 im Bereich der Onkogenese des oralen Plattenepithelkarzinoms eine große Rolle spielt und einen möglichen Ansatzpunkt für neue Therapiemöglichkeiten des oralen Plattenepithelkarzinoms bieten könnte. Um diesen Ansatz allerdings von in-vitro Zellkulturstudien in den klinischen Alltag übertragen zu können, bedarf es noch weitergehender Untersuchungen.

5.3. Einfluss der ATPase-Untereinheit CHD4 auf die Expression von Sox2 und funktionelle Konsequenzen

Eine weitere wichtige Funktion im Rahmen der zellulären (De-)Differenzierung und Reprogrammierung während des Prozesses der EMT wird dem Stammzellefaktor Sox2 zugeschrieben (Takahashi and Yamanaka 2006, Weina and Utikal 2014).

Sox2 stellt einen Transkriptionsfaktor dar, welcher als Aktivator oder als Suppressor der Gentranskription wirken kann.

Seine Wirkung entwickelt Sox2 über unterschiedliche Signalwege (Weina and Utikal 2014). Unter anderem interagiert Sox2 mit weiteren Faktoren wie den Stammzellefaktoren Oct3/4 oder auch Nanog und ist im Zusammenspiel mit diesen an der Zell(de-)differenzierung beteiligt (Takahashi and Yamanaka 2006).

Eine Expression von Sox2 konnte in einigen Untersuchungen bereits für orale Karzinomzellen und weitere Karzinomentitäten gezeigt werden (Freier, Knoepfle et al. 2010, Weina and Utikal 2014).

Die Expression des Stammzellefaktors Sox2 im oralen Plattenepithelkarzinom konnte mittels immunhistochemischen Untersuchungen von Karzinomgewebeprobe in dieser Studie bestätigt werden.

Durch zahlreiche Studien wurde bereits ein Zusammenhang zwischen Sox2 und der Tumorzellpathologie beschrieben (Bayo, Jou et al. 2015). Die zu Grunde liegenden pathophysiologischen Strukturen im Rahmen der Karzinogenese sind allerdings bis dato nicht hinreichend geklärt und bezüglich eines Zusammenhangs zwischen der Sox2 Expression und dem Outcome der Patienten gibt es widersprüchliche Ergebnisse.

Die Rolle des Stammzellefaktors variiert von Karzinomentität zu Karzinomentität und es gibt zum einen Analysen, die dem Stammzellefaktor Sox2 eine antiproliferative, ruhende Rolle im Prozess der Onkogenese zuschreiben und zum anderen Studien, welche Sox2 als proliferationsfördernden Einfluss beschreiben. Derzeit bestehen verschiedene Theorien zum Einfluss von Sox2 auf das Karzinomwachstum und die Metastasierung.

Als proliferationsfördernd und pro-onkogen wurde Sox2 im Rahmen von Untersuchungen verschiedener Karzinomentitäten beschrieben.

In Bezug auf plattenepitheliale Hauttumore wurde Sox2 durch die Forschungsgruppe um Boumahdi ein Zusammenhang zur Tumorinitiierung und dem Karzinomprogress zugeschrieben (Boumahdi, Driessens et al. 2014).

In Studien zum ösophageale Plattenepithelkarzinom nimmt Sox2 ebenfalls eine proliferationsfördernde Rolle ein und in Bezug auf Lungenkarzinome wird ihm zudem noch ein inhibierender Einfluss auf die Apoptose und proliferative Funktion zugeschrieben (Weina and Utikal 2014).

Weitere Untersuchungen zu Ovarialkarzinomen zeigten, dass eine erhöhte Expression von Sox2 zu einer verstärkten Migration und Invasion von Karzinomzellen führt (Wang, Ji et al. 2014).

Ebenfalls konnte ein proliferativer Effekt von Sox2 auf verschiedene Karzinomentitäten, wie z.B. das Glioblastom, Colonkarzinom, prostatakarzinom oder auch Brustkrebs nachgewiesen werden (Chen, Shi et al. 2008, Alonso, Diez-Valle et al. 2011, Jia, Li et al. 2011, Li, Du et al. 2013).

Eine hohe Sox2-Expression soll mit einer schlechteren Prognose, der Progression von Karzinomen und mit einem niedrigeren Differenzierungsgrad und stammzellähnlichen Phänotyp, im Kontext des Mammakarzinoms oder auch des Glioblastoms, verbunden sein (Rodriguez-Pinilla, Sarrio et al. 2007, Fang, Yoon et al. 2011, Wang, Ji et al. 2014).

Allerdings wurden auch inhibierende Effekte von Sox2 auf Karzinome beschrieben.

Die Gruppe um Otsubo beschrieb 2008, dass in Magenkarzinomen Sox2 herunterreguliert ist und das Zellwachstum inhibiert (Otsubo, Akiyama et al. 2008).

Auch in Bezug auf das Lungenkarzinom wurde ein umgekehrter Effekt von Sox2 beschrieben. Die Gruppe um Wilbertz beschrieb 2001, dass eine Überexpression von Sox2 in Zusammenhang mit einer besseren Prognose in Bezug auf das Lungenkarzinom besteht.

Eine Rolle von Sox2 bei der Pathogenese von plattenepithelialen Kopf-Hals-Karzinomen wurde bereits durch Ben-Porath 2008 beschrieben. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass einige stammzell-assoziierte Faktoren, wie Nanog oder auch Sox2 in schlecht differenzierten, aggressiven Karzinomen exprimiert werden (Ben-Porath, Thomson et al. 2008).

Weitergehend zeigte die Gruppe um Bayo in ihrer Studie 2015, dass eine erhöhte Expression von Sox2 in Kopf-Hals-Karzinomzellen die Zellmotilität inhibiert und eine niedrige Expression des Stammzellmarkers als ein Marker für Hochrisikopatienten mit einer hohen Wahrscheinlichkeit für Therapieversagen sind (Bayo, Jou et al. 2015).

Der Stammzellmarker Sox2 ist in dieser Arbeit mit einer schlechteren Prognose der Patienten mit einem Kopf-Hals-Karzinom assoziiert und nimmt somit einen prognostischen Aussagewert ein (Ben-Porath, Thomson et al. 2008).

Ein Zusammenhang zwischen einer vermehrten Expression von CHD4 und Sox2 bei oralen Plattenepithelkarzinomen ist bis dato nicht beschrieben worden.

In meiner Arbeit zeige ich, dass die CHD4 Überexpression in HN-CHD4 Zellen einen dosisabhängigen Effekt auf die Sox2 Expression hat. Dieser dosisabhängige Effekt wird durch CHD4 Expressionslevel und den biologischen Kontext beeinflusst. Hohe CHD4 Expressionslevel wurden in den Untersuchungen mit einer Reduktion der Sox2 Expression assoziiert. Somit könnte in Karzinomzellen eine hohe Expression von CHD4 via Reduktion von Sox2 auf ein vermehrtes Invasionsverhalten hinweisend sein (Abb. 30).

In Bezug auf das orale Plattenepithelkarzinom scheint eine hohe Expression von Sox2 mit einem ruhenderen Charakter der Zellen assoziiert zu sein.

In Zusammenschau verschiedener Studien liegt somit die Vermutung nahe, dass Sox2 überexprimierende Karzinomzellen eine geringere Differenzierung und stammzellähnlichere Charakteristika einnehmen können.

Um Sox2 allerdings für klinische Zwecke nutzbar zu machen, scheinen die Ergebnisse noch zu heterogen, um hierüber einen sicheren Einfluss auf die Onkogenese des oralen Plattenepithelkarzinoms nehmen zu können.

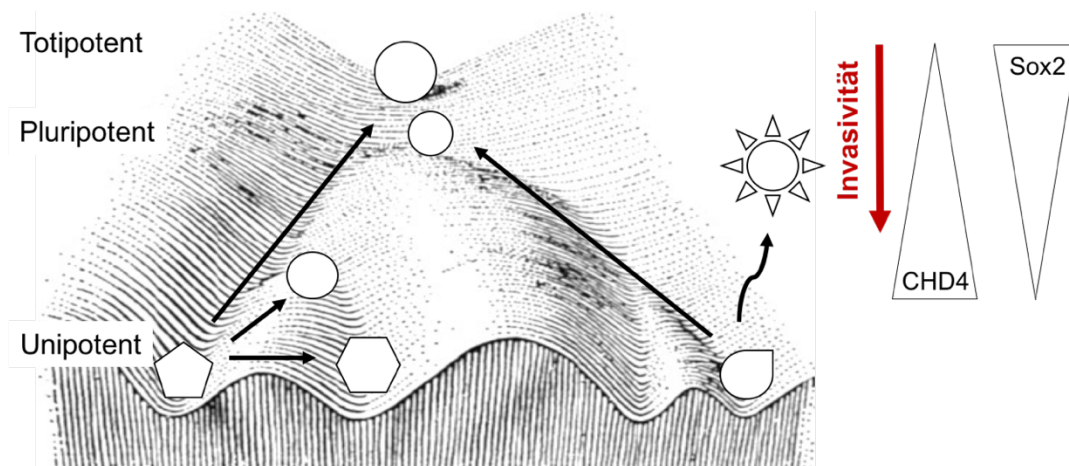


Abbildung 30: In den Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von CHD4 mit konsekutiver Reduktion von Sox2 zu einem gesteigerten Invasionsverhalten der Karzinomzellen führen kann. Bei der Regulation von Sox2 durch CHD4 liegt ein dosisabhängiger Effekt vor. Somit führt die Zunahme der CHD4 Expression zu einer Induktion der Sox2 Expression. Eine starke Erhöhung der CHD4 Expression hat eine regulative Verminderung der Sox2 Expression zur Folge.

5.4. Untersuchung von TGF- β und dem extrazelluläre Matrixprotein Fibronectin als Einflussfaktor bei der Onkogenese und Metastasierung des oralen Plattenepithelkarzinoms

Signalmoleküle der extrazellulären Matrix können den Prozess der EMT beeinflussen und der Karzinogenese, Karzinominvasion und Metastasierung Vorschub leisten.

Viele Aspekte des Zellverhaltens sind reguliert durch Interaktionen zwischen der Zelle und der extrazellulären Matrix und beinhalten Zellmigration, Zellwachstum, Differenzierung und die Regulation des Zellüberlebens (Hynes 1990, Sottile, Hocking et al. 2000).

Ungeklärt ist bis dato der Einfluss einer Zellstimulation mit TGF- β und dem extrazellulären Matrixprotein Fibronectin auf das Proliferationsverhalten oraler Plattenepithelkarzinomzellen. Diese Fragestellung war ein weiterer Aspekt dieser Studie.

Fibronectin gehört zu einer Gruppe von Glykoproteinen der extrazellulären Matrix.

Ihnen wird eine große Rolle im Rahmen der Zelladhäsion und der Kommunikation zwischen Zelle und extrazellulärer Matrix zugeschrieben (Ruoslahti 1984, Hynes 1990).

Einen wichtigen Schlüsselfaktor bei diesem Prozess stellen ebenfalls die Gruppe der Integrine dar. Diese Transmembranrezeptoren vermitteln eine Verbindung von extrazellulären Matrixproteinen, unter anderem auch Fibronectin und der Zelle (Ruoslahti 1984, Hynes 1992, Sottile, Hocking et al. 2000). Hierdurch wird eine Generierung intrazellulärer Signale erst ermöglicht.

Diese Signalwege können durch Wachstumsfaktoren stimuliert werden (Assoian 1997, Sottile, Hocking et al. 2000).

Eine Interaktion zwischen Integrinen und der extrazellulären Matrix sind essentiell für das Überleben der Zelle, da eine Unterbrechung dieser Verbindung zu einer Induktion der Apoptose der Zellen führen würde (Frisch and Francis 1994, Sottile, Hocking et al. 2000).

Sottile beschrieb 2000, dass eine Fibronectinabgabe in die extrazelluläre Matrix das Wachstum der Zelle stimuliert und die Interaktion von Fibronectin mit der Zelle eine zentrale Rolle bei der Regulation des adhäsions-abhängigen Zellwachstums spielt (Sottile, Hocking et al. 2000).

In zahlreichen Untersuchungen zur Wirkung auf verschiedene Karzinomentitäten wird Fibronectin eine stimulierende Wirkung auf das Wachstum und Überleben zugeschrieben.

Die Gruppe um Han beschrieb 2006 beispielsweise eine stimulierende Wirkung von Fibronectin auf das Wachstum und Überleben des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (Han, Khuri et al. 2006).

In Arbeiten zum Mammakarzinom wurde die Expression von Fibronektin in Karzinomzellen und dem Tumorstroma untersucht und ein Einfluss einer verstärkten Expression von Fibronektin auf die Prognose der Patienten gezeigt (Bae, Kim et al. 2013).

In Bezug auf Gallenblasenkarzinome wurde sogar eine Überexprimierung von Fibronektin mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Cao, Liu et al. 2015).

Das Zytokin TGF- β gehört zur Gruppe der transforming-growth-factors. Es spielt eine Rolle im Rahmen der EMT und der epithelialen Dedifferenzierung. Der Effekt des TGF- β Signals ist kontext- und zelltypabhängig (Margadant and Sonnenberg 2010).

Es gibt zahlreiche Hinweise, dass die Aktivierung des TGF- β -Signalwegs ein wichtiger Schlüsselfaktor im Rahmen der Invasion und Migration von Karzinomen ist, welcher die Invasion der Karzinomzellen durch das Stroma fördert (Bandyopadhyay and Raghavan 2009). Allerdings ist weiterhin ungeklärt, welche molekularen Mechanismen zu einer TGF- β induzierten Migration, Invasion und Metastasierung epithelialer Karzinome führen (Giehl and Menke 2006).

Im Rahmen der Onkogenese wurden TGF- β bislang sowohl pro- als auch antionkogene Eigenschaften zugeschrieben (Margadant and Sonnenberg 2010). Zudem ist nicht vollständig geklärt, welche Faktoren im tumorbiologischen Kontext das pro-onkogene Potential beeinflussen (Bandyopadhyay and Raghavan 2009).

Klar ist nur, dass TGF- β Zellstrukturen der Transkription beeinflusst, darunter auch Integrine und deren Liganden (Margadant and Sonnenberg 2010).

Integrine vermitteln im Rahmen von zahlreichen Prozessen wie Adhäsion, Teilung, Migration, Proliferation, Differenzierung und Remodellierung der extrazellulären Matrix (Margadant and Sonnenberg 2010)

Sie spielen eine große Rolle im Rahmen der Onkogenese verschiedener Karzinomentitäten und stehen im Zusammenhang mit einer gesteigerten Invasion (Sipos, Hahn et al. 2004, Hecht, Dolinski et al. 2008, Yang, Xu et al. 2008, Bandyopadhyay and Raghavan 2009).

Weiterhin sind sie an dem Prozess der TGF- β Freisetzung beteiligt (Dong, Zhao et al. 2017).

Dass eine Verbindung zwischen der Expression von Integrin $\alpha v \beta 6$ und TGF- β im Kontext der Wundheilung und Kanzerogenese besteht, wurde bereits 2010 durch Margadant und Sonnenberg aufgezeigt. Sie beschrieben, dass TGF- β die integrin-vermittelte Zelladhäsion und Migration durch Regulation der Integrinexpression, deren Liganden und Integrin-assoziierten Liganden beeinflusst. Ebenso wird TGF- β durch Integrine kontrolliert.

Ein Thema, welches bislang kontrovers diskutiert wurde.

Der reziproke TGF- β -Integrin Signalweg hat sowohl Bestand in physiologischen Prozessen als auch in pathologischen Prozessen, wie z.B. Karzinomen, Systemischer Sklerose, idiopathischer pulmonaler Fibrose oder COPD (Margadant and Sonnenberg 2010)

Beispielsweise wurde in Studien zum Ovarialkarzinom bereits gezeigt, dass nicht nur die $\alpha v \beta 6$ Expression erhöht ist, sondern diese auch zu einer Aktivierung des TGF- β -Signalwegs führen kann (Bristow, Baldwin et al. 1999, Munger, Huang et al. 1999, Ahmed, Pansino et al. 2002, Bandyopadhyay and Raghavan 2009). Weitestgehend unbekannt ist allerdings der umgekehrte Einfluss von TGF- β oder Fibronektin auf die $\alpha v \beta 6$ Expression.

Im Rahmen dieser Studie wurden in-vitro Zellkulturanalysen zum Wachstumsverhalten oraler Karzinomzellen bei Stimulation mittels Fibronektin und TGF- β durchgeführt. Hierbei wurde der Einfluss der Stimulation auf die Expression von $\alpha v \beta 6$ als Markerprotein der EMT untersucht und Migrationsversuche durchgeführt, um mögliche funktionelle Konsequenzen für das Invasionsverhalten von oralen Plattenepithelkarzinomzellen aufzuzeigen.

In Zellkulturstudien wurden Karzinomzellen (HN und HN-CHD4) mit TGF- β und Fibronektin stimuliert und der Einfluss auf die Expression von $\alpha v \beta 6$ untersucht.

Hierbei zeigte sich, dass eine Stimulation der Zellen zu einer Induktion der Integrin $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ Expression und zu einer Aktivierung der Integrin assoziierten Signalkaskade führte.

Weiterhin konnte mittels Migrationsversuchen der Invasions-steigernde Effekt einer verstärkten $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ Expression nachgewiesen werden.

Eine Doppelstimulation mit TGF- β und Fibronektin zeigte den deutlichsten Effekt auf die $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ Steigerung und hierdurch zu einem konsekutiv gesteigerten Migrationsverhalten.

Diese Ergebnisse weisen somit darauf hin, dass das Tumorstroma und spezifische Proteine der extrazellulären Matrix wichtige Einflussfaktoren für das invasive Karzinomwachstum des oralen Plattenepithelkarzinoms darstellen. Eine Limitation der Ergebnisse ist allerdings, dass es sich bei den Untersuchungen um reine in-vitro Zellkulturanalysen handelt. Die Ergebnisse bedürfen daher weitergehender Untersuchungen, um auf den humanen Organismus übertragen werden zu können.

Die Identifikation der Proteine, welche die Onkogenese und Metastasierung beeinflussen, kann jedoch für diagnostische und therapeutische Ansätze Relevanz erlangen.

5.5. Ausblick

Die vorliegenden Ergebnisse weisen einen Zusammenhang zwischen der Onkogenese und Metastasierung von oralen Karzinomzellen und dem Prozess der EMT unter Einfluss epigenetischer Genregulationsmechanismen auf. Besonders konnte ein Einfluss epigenetischer Regulationsmechanismen auf das Migrations- und Invasionsverhalten oraler Karzinomzellen gezeigt werden. Die ATPase CHD4 des Nukleosomen-Remodellierungs und Deacetylase (NuRD)-Komplexes und auch das Integrin $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ bieten einen möglichen Ansatzpunkt für diagnostische und therapeutische Ansätze. In der Therapie anderer Karzinomentitäten, wie dem Mammakarzinom konnte ein möglicher Nutzen von

$\alpha v\beta 6$ als Zielmolekül in Kombination mit weiteren Therapeutika bereits in Studien gezeigt werden (Moore, Thomas et al. 2014).

Weiterhin konnte eine stimulierende Wirkung von extrazellulären Matrixproteinen und TGF- β nachgewiesen werden. Einschränkend ist darauf hinzuweisen, dass es sich bei dieser Untersuchung um in-vitro Studien handelte und die Ergebnisse nicht uneingeschränkt auf den Organismus übertragbar sind. Dies bedarf weiterführender Untersuchungen mittels in-vivo Modellen.

Von Relevanz ist ebenfalls eine genauere Untersuchung des Stammzellfaktors Sox2. Dieser könnte durch Analysen ebenfalls einen möglichen Ansatzpunkt für das genauere Verständnis epigenetischer Mechanismen bei der Karzinogenese des oralen Plattenepithelkarzinoms sein.

6. Zusammenfassung

Orale Plattenepithelkarzinomen zählen zu den häufigsten oralen Neoplasien. Die allgemeine Prognose dieser Karzinome ist oft schlecht, da die Erkrankung meist erst in einem fortgeschrittenen, metastasierten Stadium entdeckt wird. Auch, wenn in den letzten Jahren Verbesserungen im Bereich der Diagnostik vorgenommen wurden, hat sich die Prognose der Patienten kaum verbessert.

Für zahlreiche Karzinomentitäten wird die Therapie bereits basierend auf molekulare Biomarker oder zielgerichtete Therapien aufgebaut, welche an das molekularbiologische Expressionsprofil der Karzinome angepasst sind.

Bekannt ist, dass auch beim oralen Plattenepithelkarzinom die Karzinogenese, Invasion und Metastasierung mit tumorbiologischen Alterationen wie der Epithelialen-Mesenchymalen-Transition (EMT) zusammenhängen.

Die zugrundeliegenden epigenetischen Regulationsmechanismen des oralen Plattenepithelkarzinoms sind allerdings bis dato nicht hinreichend geklärt, um effiziente und gesicherte gezielte Therapien ermöglichen zu können. Daher gewinnt die Untersuchung und Charakterisierung epigenetischer Einflussfaktoren im Rahmen der Onkogenese und Metastasierung zunehmend an Bedeutung und rückt in das Zentrum onkologischer Forschung.

Funktionelle Proteine, welche den Stammzellcharakter oraler Karzinomzellen beeinflussen, können von großer diagnostischer und therapeutischer Relevanz sein.

Die Kontrolle entwicklungsbiologischer Prozesse erfolgt unter anderem durch Regulation der Genexpression. Dies wird durch funktionelle Proteinkomplexe, wie den Nukleosomen Remodellierungs und Deacetylase (NuRD)-Komplex vermittelt.

Die zugrundeliegende Fragestellung dieser Arbeit war, welche Faktoren den Stammzellcharakter von Karzinomzellen beeinflussen, um epigenetische Regulationsmechanismen des oralen Plattenepithelkarzinoms zu identifizieren und deren Einfluss auf das Invasions- und Migrationsverhalten der Karzinomzellen zu untersuchen.

Insbesondere war die Untersuchung der Rolle von CHD4/NuRD mittels CHD4 Überexpression in oralen Karzinomzellen von großem Interesse und es wurde der Einfluss auf die Expression des EMT-Markerproteins Integrin $\alpha v\beta 6$ und somit auf das Invasions- und Migrationsverhalten untersucht.

Weiterhin wurde der Einfluss von TGF- β und dem extrazellulären Matrixprotein Fibronectin auf CHD4-überexprimierende Zellen und der Einfluss auf die Expression von Integrin $\alpha v\beta 6$ analysiert.

Zudem galt es, den Einfluss der ATPase-Untereinheit CHD4 auf die Expression von Sox2 zu untersuchen.

In funktionellen Zellkulturstudien wurde mittels Plasmidtransfektion CHD4/NuRD überexprimiert und der Einfluss dieser Missexpression auf die Karzinomzellinvasion untersucht. Mittels Western Blot wurde der Einfluss auf die Expression des Invasions-assoziierten Integrins $\alpha v\beta 6$ und den Stammzellmarker Sox2 analysiert.

Weiterhin wurden Karzinomzellen mit rekombinantem TGF- β und Fibronectin stimuliert und ebenfalls der Einfluss auf $\alpha v\beta 6$ untersucht.

Mittels Migrations- und Invasionsversuchen wurden die Ergebnisse validiert.

Durch Western Blot, qRT-PCR und Immunzytochemie wurde die Überexpression von CHD4/NuRD in oralen Karzinomzelllinien im Vergleich zu wild-typ Karzinomzellen bestätigt. CHD4-transfizierte Karzinomzellen zeigten eine veränderte Morphologie und ein verändertes Migrations- und Invasionsverhalten. Die mRNA und Proteinexpression des Invasions-assoziierten Integrins $\alpha v\beta 6$ korrelierte mit der veränderten Morphologie und dem Migrations- und Invasionsverhalten CHD4-transfizierter Karzinomzellen.

Immunhistologisch ist die räumliche und zeitliche Co-expression von CHD4 und Sox2 im Bereich der Invasionsgrenze auf einen funktionellen Zusammenhang beider Proteine in proliferierenden und invasiven Karzinomzellen hinweisend. Die ICC bestätigte die nukleäre Expression von CHD4 und Sox2 in einer HN-Subpopulation.

qRT-PCR zeigte eine Überexpression von CHD4 mRNA in HN-CHD4 Zellen in Abhängigkeit von der Plasmidkonzentration.

In HN-CHD4 Zellen resultierte ein dosisabhängiger Effekt der CHD4 Überexpression auf die Sox2 Expression.

In Bezug auf extrazelluläre Matrixproteine zeigte sich, dass TGF- β und Integrin $\alpha v\beta 6$ im Bereich der Invasionsfront co-exprimiert sind.

Die Stimulation von Karzinomzellen mittels TGF- β und Fibronectin führte zur Induktion der Integrin $\alpha v\beta 6$ Expression und Aktivierung der Integrin-assoziierten Signalkaskade. Eine vermehrte Expression von Integrin $\alpha v\beta 6$ korrelierte mit einem gesteigerten Migrations- und Invasionsverhalten von Karzinomzellen.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass epigenetische Regulationsmechanismen der Zell(de-)differenzierung einen Einfluss auf das Migrations- und Invasionsverhalten von Karzinomzellen haben können. Die ATPase-Untereinheit CHD4 des NuRD-Komplexes ist ein zentrales funktionelles Protein, das für diagnostische und therapeutische Ansätze dienen könnte. CHD4 scheint einen konservierten Regulationsmechanismus auf Sox2 zu haben. Hierbei scheint der Einfluss von CHD4 auf Sox2 einem dosisabhängigen Effekt zu unterliegen, welcher durch CHD4 Expressionslevel und den biologischen Kontext beeinflusst wird. Hohe CHD4 Level sind mit einer Reduktion der Sox2 Expression assoziiert, was zu einer gesteigerten Invasivität der dedifferenzierten Karzinomzellen führen kann.

Weiterhin stellen das Tumorstroma und spezifische Proteine der extrazellulären Matrix wichtige Einflussfaktoren für das invasive Karzinomwachstum dar.

Diese Identifikation der Proteine, welche die Onkogenese und Metastasierung beeinflussen, kann für diagnostisch und therapeutische Ansätze Relevanz erlangen.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomische Einteilung der Neck Dissection Level	21
Abbildung 2: Epigenetic landscape	35
Abbildung 3: Prozess der EMT	37
Abbildung 4: Wachstumsfaktor TGF- β	41
Abbildung 5: Epigenetische Mechanismen zur Beeinflussung der Chromatinstruktur	45
Abbildung 6: Der NuRD-Komplex	46
Abbildung 7: Transfektion der Plasmide	59
Abbildung 8: Immunhistochemische Darstellung des Integrins $\alpha v \beta 6$	75
Abbildung 9: Immunhistochemische Darstellung der ATPase CHD4	75
Abbildung 10: Ausbildung der Transfektantennester unter Selektion	77
Abbildung 11: Immunfluoreszenzzytologischer Nachweis der Überexpression von CHD4	78
Abbildung 12: Relative Darstellung der CHD4 mRNA Expression	79
Abbildung 13: mRNA Expression von CHD4 und $\alpha v \beta 6$ im Vergleich	80
Abbildung 14: Relative Darstellung der CHD4 und $\alpha v \beta 6$ Expression mittels Western Blot	81
Abbildung 15: Migrationsverhalten von HN WT und HN-CHD4 im Vergleich	83
Abbildung 16: Invasionsverhalten von HN WT und HN-CHD4 im Vergleich	84
Abbildung 17: Immunhistochemische Darstellung von Sox2 und CHD4 im Vergleich	84
Abbildung 18: Immunfluoreszenzzytologischer Nachweis von CHD4 und Sox2	85
Abbildung 19: Relative CHD4 und Sox2 Expression im Vergleich	86
Abbildung 20: Relative Darstellung der CHD4 und Sox2 Expression mittels Western Blot	87

Abbildung 21: Immunfluoreszenzzytologischer Nachweis der Überexpression von Sox2	88
Abbildung 22: Relative Sox2 mRNA Expression	88
Abbildung 23: Invasionsverhalten von HN WT und HN-Sox2 im Vergleich	89
Abbildung 24: Migrationsverhalten von HN WT und HN-Sox2 im Vergleich	90
Abbildung 25: Immunhistochemische Darstellung von TGF- β	91
Abbildung 26: Relative mRNA Expression von $\alpha v \beta 6$ in stimulierten und unstimulierten Zellen	92
Abbildung 27: Vergleichende Western Blot Analyse der $\alpha v \beta 6$ Expression in stimulierten und unstimulierten Zellen	94
Abbildung 28: Migrationsassay der stimulierten und unstimulierten Zellen	95
Abbildung 29: Höhere CHD4 und $\alpha v \beta 6$ Expression führt zu einer gesteigerten Invasion und Migration der Zellen	113
Abbildung 30: Eine erhöhte Expression von CHD4 führt zu einer Reduktion der Sox2 Expression	117

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: T-Klassifikation des oralen Plattenepithelkarzinoms	17
Tabelle 2: N-Klassifikation des oralen Plattenepithelkarzinoms	17
Tabelle 3: M-Klassifikation des oralen Plattenepithelkarzinoms	18
Tabelle 4: Tumorstadien nach UICC-Kriterien	18
Tabelle 5: Differenzierungsgrade nach Wittekind	28
Tabelle 6: Verwendete Ansätze für die Transfektion	59

9. Literaturverzeichnis

Agrawal, N., M. J. Frederick, C. R. Pickering, C. Bettegowda, K. Chang, R. J. Li, C. Fakhry, T. X. Xie, J. Zhang, J. Wang, N. Zhang, A. K. El-Naggar, S. A. Jasser, J. N. Weinstein, L. Trevino, J. A. Drummond, D. M. Muzny, Y. Wu, L. D. Wood, R. H. Hruban, W. H. Westra, W. M. Koch, J. A. Califano, R. A. Gibbs, D. Sidransky, B. Vogelstein, V. E. Velculescu, N. Papadopoulos, D. A. Wheeler, K. W. Kinzler and J. N. Myers (2011). "Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1." Science **333**(6046): 1154-1157.

Ahmed, N., F. Pansino, R. Clyde, P. Murthi, M. A. Quinn, G. E. Rice, M. V. Agrez, S. Mok and M. S. Baker (2002). "Overexpression of alpha(v)beta6 integrin in serous epithelial ovarian cancer regulates extracellular matrix degradation via the plasminogen activation cascade." Carcinogenesis **23**(2): 237-244.

Airio, A., E. Pukkala and H. Isomaki (1995). "Elevated cancer incidence in patients with dermatomyositis: a population based study." J Rheumatol **22**(7): 1300-1303.

Alonso, M. M., R. Diez-Valle, L. Manterola, A. Rubio, D. Liu, N. Cortes-Santiago, L. Urquiza, P. Jauregi, A. Lopez de Munain, N. Sampron, A. Aramburu, S. Tejada-Solis, C. Vicente, M. D. Odero, E. Bandres, J. Garcia-Foncillas, M. A. Idoate, F. F. Lang, J. Fueyo and C. Gomez-Manzano (2011). "Genetic and epigenetic modifications of Sox2 contribute to the invasive phenotype of malignant gliomas." PLoS One **6**(11): e26740.

Altieri, A., C. Bosetti, R. Talamini, S. Gallus, S. Franceschi, F. Levi, L. Dal Maso, E. Negri and C. La Vecchia (2002). "Cessation of smoking and drinking and the risk of laryngeal cancer." Br J Cancer **87**(11): 1227-1229.

Ang, K. K., A. Trotti, B. W. Brown, A. S. Garden, R. L. Foote, W. H. Morrison, F. B. Geara, D. W. Klotch, H. Goepfert and L. J. Peters (2001). "Randomized trial addressing risk features and time factors of surgery plus radiotherapy in advanced head-and-neck cancer." Int J Radiat Oncol Biol Phys **51**(3): 571-578.

Aranda-Anzaldo, A. and M. A. R. Dent (2018). "Landscaping the epigenetic landscape of cancer." Prog Biophys Mol Biol.

Argiris, A., M. V. Karamouzis, D. Raben and R. L. Ferris (2008). "Head and neck cancer." Lancet **371**(9625): 1695-1709.

Arunachalam, P. S., G. Putnam, P. Jennings, R. Messersmith and A. K. Robson (2002). "Role of computerized tomography (CT) scan of the chest in patients with newly diagnosed head and neck cancers." Clinical Otolaryngology & Allied Sciences **27**(5): 409-411.

Assoian, R. K. (1997). "Anchorage-dependent cell cycle progression." J Cell Biol **136**(1): 1-4.

Awwad, H. K., M. Lotayef, T. Shouman, A. C. Begg, G. Wilson, S. M. Bentzen, H. A. El-Moneim and S. Eissa (2002). "Accelerated hyperfractionation (AHF) compared to conventional fractionation (CF) in the postoperative radiotherapy of locally advanced head and neck cancer: influence of proliferation." British Journal of Cancer **86**(4): 517-523.

Bae, Y. K., A. Kim, M. K. Kim, J. E. Choi, S. H. Kang and S. J. Lee (2013). "Fibronectin expression in carcinoma cells correlates with tumor aggressiveness and poor clinical outcome in patients with invasive breast cancer." Human Pathology **44**(10): 2028-2037.

Bailey, J. S., R. H. Blanchaert Jr and R. A. Ord (2001). "Management of oral squamous cell carcinoma treated with inadequate excisional biopsy." Journal of Oral and Maxillofacial Surgery **59**(9): 1007-1010.

Balaram, P., H. Sridhar, T. Rajkumar, S. Vaccarella, R. Herrero, A. Nandakumar, K. Ravichandran, K. Ramdas, R. Sankaranarayanan, V. Gajalakshmi, N. Munoz and S. Franceschi (2002). "Oral cancer in southern India: the influence of smoking, drinking, paan-chewing and oral hygiene." Int J Cancer **98**(3): 440-445.

Bandyopadhyay, A. and S. Raghavan (2009). "Defining the role of integrin α v β 6 in cancer." Curr Drug Targets **10**(7): 645-652.

Bandyopadhyay, A. and S. Raghavan (2009). "Defining the Role of Integrin α β 6 in Cancer." Current drug targets **10**(7): 645-652.

Bataini, J. P., J. Bernier, B. Asselain, C. Lave, C. Jaulerry, F. Brunin and D. Pontvert (1988). "Primary radiotherapy of squamous cell carcinoma of the oropharynx and pharyngolarynx: tentative multivariate modelling system to predict the radiocurability of neck nodes." Int J Radiat Oncol Biol Phys **14**(4): 635-642.

Bates, R. C. (2005). "Colorectal cancer progression: integrin α v β 6 and the epithelial-mesenchymal transition (EMT)." Cell Cycle **4**(10): 1350-1352.

Bayo, P., A. Jou, A. Stenzinger, C. Shao, M. Gross, A. Jensen, N. Grabe, C. H. Mende, P. V. Rados, J. Debus, W. Weichert, P. K. Plinkert, P. Lichter, K. Freier and J. Hess (2015). "Loss of SOX2 expression induces cell motility via vimentin up-regulation and is an unfavorable risk factor for survival of head and neck squamous cell carcinoma." Mol Oncol **9**(8): 1704-1719.

Ben-Porath, I., M. W. Thomson, V. J. Carey, R. Ge, G. W. Bell, A. Regev and R. A. Weinberg (2008). "An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors." Nat Genet **40**(5): 499-507.

Bernier, J., C. Domenge, M. Ozsahin, K. Matuszewska, J. L. Lefebvre, R. H. Greiner, J. Giralt, P. Maingon, F. Rolland, M. Bolla, F. Cognetti, J. Bourhis, A. Kirkpatrick and M. van Glabbeke (2004). "Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer." N Engl J Med **350**(19): 1945-1952.

Bier, J. (1994). "Radical neck dissection versus conservative neck dissection for squamous cell carcinoma of the oral cavity." Recent Results Cancer Res **134**: 57-62.

Böcker, W. D., H. (2012). "Pathologie." Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH **5**: 1092.

Boumahdi, S., G. Driessens, G. Lapouge, S. Rorive, D. Nassar, M. Le Mercier, B. Delatte, A. Caauwe, S. Lenglez, E. Nkusi, S. Brohee, I. Salmon, C. Dubois, V. del Marmol, F. Fuks, B. Beck and C. Blanpain (2014). "SOX2 controls tumour initiation and cancer stem-cell functions in squamous-cell carcinoma." Nature **511**(7508): 246-250.

Bouquot, J. E. (1998). "Oral verrucous carcinoma. Incidence in two US populations." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **86**(3): 318-324.

Boyer, B., A. M. Valles and N. Edme (2000). "Induction and regulation of epithelial-mesenchymal transitions." Biochem Pharmacol **60**(8): 1091-1099.

Boysen, M., O. Lovdal, J. Tausjo and F. Winther (1992). "The value of follow-up in patients treated for squamous cell carcinoma of the head and neck." Eur J Cancer **28**(2-3): 426-430.

Breuss, J. M., J. Gallo, H. M. DeLisser, I. V. Klimanskaya, H. G. Folkesson, J. F. Pittet, S. L. Nishimura, K. Aldape, D. V. Landers and W. Carpenter (1995). "Expression of the beta 6 integrin subunit in development, neoplasia and tissue repair suggests a role in epithelial remodeling." Journal of Cell Science **108**(6): 2241-2251.

Bristow, R. E., R. L. Baldwin, S. D. Yamada, M. Korc and B. Y. Karlan (1999). "Altered expression of transforming growth factor-beta ligands and receptors in primary and recurrent ovarian carcinoma." Cancer **85**(3): 658-668.

Burry, R. W. (2011). "Controls for Immunocytochemistry: An Update." Journal of Histochemistry and Cytochemistry **59**(1): 6-12.

Bustin, S. A. (2000). "Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays." J Mol Endocrinol **25**(2): 169-193.

Byers, R. M., A. K. El-Naggar, Y. Y. Lee, B. Rao, B. Fornage, N. H. Terry, D. Sample, P. Hankins, T. L. Smith and P. J. Wolf (1998). "Can we detect or predict the presence of occult nodal metastases in patients with squamous carcinoma of the oral tongue?" Head Neck **20**(2): 138-144.

Calderwood, D. A. (2004). "Integrin activation." J Cell Sci **117**(Pt 5): 657-666.

Califano, J., P. van der Riet, W. Westra, H. Nawroz, G. Clayman, S. Piantadosi, R. Corio, D. Lee, B. Greenberg, W. Koch and D. Sidransky (1996). "Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization." Cancer Res **56**(11): 2488-2492.

Camisasca, D. R., M. A. Silami, J. Honorato, F. L. Dias, P. A. de Faria and Q. Lourenco Sde (2011). "Oral squamous cell carcinoma: clinicopathological features in patients with and without recurrence." ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec **73**(3): 170-176.

Cao, Y., X. Liu, W. Lu, Y. Chen, X. Wu, M. Li, X.-a. Wang, F. Zhang, L. Jiang, Y. Zhang, Y. Hu, S. Xiang, Y. Shu, R. Bao, H. Li, W. Wu, H. Weng, Y. Yen and Y. Liu (2015).

"Fibronectin promotes cell proliferation and invasion through mTOR signaling pathway activation in gallbladder cancer." Cancer Letters **360**(2): 141-150.

Carinci, F., S. Pelucchi, A. Farina, G. De Franciscis and C. Calearo (1998). "Extension as a prognostic factor in oropharyngeal cancer: largest mucosal dimension compared with number of (sub)sites involved." Br J Oral Maxillofac Surg **36**(6): 440-445.

Carreras-Torras, C. and C. Gay-Escoda (2015). "Techniques for early diagnosis of oral squamous cell carcinoma: Systematic review." Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal **20**(3): e305-e315.

Carvalho, A. L., I. N. Nishimoto, J. A. Califano and L. P. Kowalski (2005). "Trends in incidence and prognosis for head and neck cancer in the United States: a site-specific analysis of the SEER database." Int J Cancer **114**(5): 806-816.

Chaudhury, A. and P. H. Howe (2009). "The tale of transforming growth factor-beta (TGFbeta) signaling: a soigne enigma." IUBMB Life **61**(10): 929-939.

Chen, Y., L. Shi, L. Zhang, R. Li, J. Liang, W. Yu, L. Sun, X. Yang, Y. Wang, Y. Zhang and Y. Shang (2008). "The molecular mechanism governing the oncogenic potential of SOX2 in breast cancer." J Biol Chem **283**(26): 17969-17978.

Chiarini, L., G. De Santis, A. Bedogni and P. F. Nocini (2002). "Lining the mouth floor with prelaminate fascio-mucosal free flaps: clinical experience." Microsurgery **22**(5): 177-186.

- Choi, S. and J. N. Myers (2008). "Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy." J Dent Res **87**(1): 14-32.
- Chole, R. H., R. N. Patil, A. Basak, K. Palandurkar and R. Bhowate (2010). "Estimation of serum malondialdehyde in oral cancer and precancer and its association with healthy individuals, gender, alcohol, and tobacco abuse." J Cancer Res Ther **6**(4): 487-491.
- Chung, C. H. and M. L. Gillison (2009). "Human papillomavirus in head and neck cancer: its role in pathogenesis and clinical implications." Clin Cancer Res **15**(22): 6758-6762.
- Chung, C. H., J. S. Parker, K. Ely, J. Carter, Y. Yi, B. A. Murphy, K. K. Ang, A. K. El-Naggar, A. M. Zanation, A. J. Cmelak, S. Levy, R. J. Slebos and W. G. Yarbrough (2006). "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**(16): 8210-8218.
- Chung, C. H., J. S. Parker, G. Karaca, J. Wu, W. K. Funkhouser, D. Moore, D. Butterfoss, D. Xiang, A. Zanation, X. Yin, W. W. Shockley, M. C. Weissler, L. G. Dressler, C. G. Shores, W. G. Yarbrough and C. M. Perou (2004). "Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression." Cancer Cell **5**(5): 489-500.
- Civantos, F. J., R. P. Zitsch, D. E. Schuller, A. Agrawal, R. B. Smith, R. Nason, G. Petruzelli, C. G. Gourin, R. J. Wong, R. L. Ferris, A. El Naggar, J. A. Ridge, R. C. Paniello, K. Owzar, L. McCall, D. B. Chepeha, W. G. Yarbrough and J. N. Myers (2010). "Sentinel lymph node biopsy accurately stages the regional lymph nodes for T1-T2 oral squamous cell carcinomas: results of a prospective multi-institutional trial." J Clin Oncol **28**(8): 1395-1400.
- Coatesworth, A. P. and K. MacLennan (2002). "Squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: the prevalence of microscopic extracapsular spread and soft tissue deposits in the clinically NO neck." Head Neck **24**(3): 258-261.
- Cooper, J. S., T. F. Pajak, A. A. Forastiere, J. Jacobs, B. H. Campbell, S. B. Saxman, J. A. Kish, H. E. Kim, A. J. Cmelak, M. Rotman, M. Machtay, J. F. Ensley, K. S. C. Chao, C. J. Schultz, N. Lee and K. K. Fu (2004). "Postoperative Concurrent Radiotherapy and Chemotherapy for High-Risk Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck." New England Journal of Medicine **350**(19): 1937-1944.
- Cree, I. A., S. Glaysher and A. L. Harvey (2010). "Efficacy of anti-cancer agents in cell lines versus human primary tumour tissue." Curr Opin Pharmacol **10**(4): 375-379.
- Cruz, M., M. Enes, M. Pereira, M. Dourado and A. B. Sarmiento Ribeiro (2009). "[Experimental models in oncology: contribution of cell culture on understanding the biology of cancer]." Rev Port Pneumol **15**(4): 669-682.

D'Alesio, C., S. Punzi, A. Cicalese, L. Fornasari, L. Furia, L. Riva, A. Carugo, G. Curigliano, C. Criscitiello, G. Pruneri, P. G. Pelicci, M. Faretta, D. Bossi and L. Lanfrancone (2016). "RNAi screens identify CHD4 as an essential gene in breast cancer growth." Oncotarget **7**(49): 80901-80915.

D'Cruz, A. K., R. C. Siddachari, R. R. Walvekar, G. H. Pantvaidya, D. A. Chaukar, M. S. Deshpande, P. S. Pai and P. Chaturvedi (2009). "Elective neck dissection for the management of the N0 neck in early cancer of the oral tongue: need for a randomized controlled trial." Head Neck **31**(5): 618-624.

Dahlstrom, K. R., K. Adler-Storthz, C. J. Etzel, Z. Liu, L. Dillon, A. K. El-Naggar, M. R. Spitz, J. T. Schiller, Q. Wei and E. M. Sturgis (2003). "Human papillomavirus type 16 infection and squamous cell carcinoma of the head and neck in never-smokers: a matched pair analysis." Clin Cancer Res **9**(7): 2620-2626.

de Araujo, R. F., Jr., C. A. Barboza, N. K. Clebis, S. A. de Moura and L. Lopes Costa Ade (2008). "Prognostic significance of the anatomical location and TNM clinical classification in oral squamous cell carcinoma." Med Oral Patol Oral Cir Bucal **13**(6): E344-347.

Denslow, S. A. and P. A. Wade (2007). "The human Mi-2/NuRD complex and gene regulation." Oncogene **26**(37): 5433-5438.

Dong, X., B. Zhao, R. E. Iacob, J. Zhu, A. C. Koksai, C. Lu, J. R. Engen and T. A. Springer (2017). "Force interacts with macromolecular structure in activation of TGF- β ." Nature **542**: 55.

dos Santos, C. R., J. Goncalves Filho, J. Magrin, L. F. Johnson, A. Ferlito and L. P. Kowalski (2001). "Involvement of level I neck lymph nodes in advanced squamous carcinoma of the larynx." Ann Otol Rhinol Laryngol **110**(10): 982-984.

dos Santos, R. L., L. Tosti, A. Radzishenskaya, I. M. Caballero, K. Kaji, B. Hendrich and J. C. Silva (2014). "MBD3/NuRD facilitates induction of pluripotency in a context-dependent manner." Cell Stem Cell **15**(1): 102-110.

Duncan, W., R. H. MacDougall, G. R. Kerr and D. Downing "Adverse effect of treatment gaps in the outcome of radiotherapy for laryngeal cancer." Radiotherapy and Oncology **41**(3): 203-207.

Fakhry, C. and M. L. Gillison (2006). "Clinical implications of human papillomavirus in head and neck cancers." J Clin Oncol **24**(17): 2606-2611.

Falaki, F., Z. Dalirsani, A. Pakfetrat, A. Falaki, N. Saghravanian, T. Nosratzahi and M. Pazouki (2011). "Clinical and histopathological analysis of oral squamous cell

carcinoma of young patients in Mashhad, Iran: a retrospective study and review of literature." Med Oral Patol Oral Cir Bucal **16**(4): e473-477.

Fang, X., J. G. Yoon, L. Li, W. Yu, J. Shao, D. Hua, S. Zheng, L. Hood, D. R. Goodlett, G. Foltz and B. Lin (2011). "The SOX2 response program in glioblastoma multiforme: an integrated ChIP-seq, expression microarray, and microRNA analysis." BMC Genomics **12**: 11.

Felgner, P. L., T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold and M. Danielsen (1987). "Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(21): 7413-7417.

Folkman, J. (2002). "Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis." Semin Oncol **29**(6 Suppl 16): 15-18.

Freier, K., K. Knoepfle, C. Flechtenmacher, S. Pungs, F. Devens, G. Toedt, C. Hofele, S. Joos, P. Lichter and B. Radlwimmer (2010). "Recurrent copy number gain of transcription factor SOX2 and corresponding high protein expression in oral squamous cell carcinoma." Genes Chromosomes Cancer **49**(1): 9-16.

Frisch, S. M. and H. Francis (1994). "Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis." J Cell Biol **124**(4): 619-626.

Fu, J., L. Qin, T. He, J. Qin, J. Hong, J. Wong, L. Liao and J. Xu (2011). "The TWIST/Mi2/NuRD protein complex and its essential role in cancer metastasis." Cell Res **21**(2): 275-289.

Gasche, J. A. and A. Goel (2012). "Epigenetic mechanisms in oral carcinogenesis." Future oncology (London, England) **8**(11): 1407-1425.

Ghantous, Y., V. Yaffi and I. Abu-Elnaaj (2015). "[Oral cavity cancer: epidemiology and early diagnosis]." Refuat Hapeh Vehashinayim (1993) **32**(3): 55-63, 71.

Gibson, M. K., Y. Li, B. Murphy, M. H. Hussain, R. C. DeConti, J. Ensley and A. A. Forastiere (2005). "Randomized phase III evaluation of cisplatin plus fluorouracil versus cisplatin plus paclitaxel in advanced head and neck cancer (E1395): an intergroup trial of the Eastern Cooperative Oncology Group." J Clin Oncol **23**(15): 3562-3567.

Giehl, K. and A. Menke (2006). "Moving on: Molecular mechanisms in TGF β -induced epithelial cell migration." Signal Transduction **6**(5): 355-364.

Gillison, M. L., W. M. Koch, R. B. Capone, M. Spafford, W. H. Westra, L. Wu, M. L. Zahurak, R. W. Daniel, M. Viglione, D. E. Symer, K. V. Shah and D. Sidransky (2000). "Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers." J Natl Cancer Inst **92**(9): 709-720.

Guasch, G., M. Schober, H. A. Pasolli, E. B. Conn, L. Polak and E. Fuchs (2007). "Loss of TGFbeta signaling destabilizes homeostasis and promotes squamous cell carcinomas in stratified epithelia." Cancer Cell **12**(4): 313-327.

Haddad, R. I. and D. M. Shin (2008). "Recent advances in head and neck cancer." N Engl J Med **359**(11): 1143-1154.

Hamakawa, H., K. Nakashiro, T. Sumida, S. Shintani, J. N. Myers, R. P. Takes, A. Rinaldo and A. Ferlito (2008). "Basic evidence of molecular targeted therapy for oral cancer and salivary gland cancer." Head Neck **30**(6): 800-809.

Hamidi, S., T. Salo, T. Kainulainen, J. Epstein, K. Lerner and H. Larjava (2000). "Expression of $\alpha\beta 6$ integrin in oral leukoplakia." British Journal Of Cancer **82**: 1433.

Han, S., F. R. Khuri and J. Roman (2006). "Fibronectin stimulates non-small cell lung carcinoma cell growth through activation of Akt/mammalian target of rapamycin/S6 kinase and inactivation of LKB1/AMP-activated protein kinase signal pathways." Cancer Res **66**(1): 315-323.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.

Hanken, H., J. Kraatz, R. Smeets, M. Heiland, A. T. Assaf, M. Blessmann, W. Eichhorn, T. S. Clauditz, A. Grobe, A. Kolk and M. Rana (2013). "The detection of oral pre-malignant lesions with an autofluorescence based imaging system (VELscope) - a single blinded clinical evaluation." Head Face Med **9**: 23.

Harari, P. M. (2004). "Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology." Endocr Relat Cancer **11**(4): 689-708.

Hecht, J. L., B. M. Dolinski, H. A. Gardner, S. M. Violette and P. H. Weinreb (2008). "Overexpression of the $\alpha\beta 6$ integrin in endometrial cancer." Appl Immunohistochem Mol Morphol **16**(6): 543-547.

Heerboth, S., G. Housman, M. Leary, M. Longacre, S. Byler, K. Lapinska, A. Willbanks and S. Sarkar (2015). "EMT and tumor metastasis." Clinical and Translational Medicine **4**: 6.

Hema, K. N., T. Smitha, H. S. Sheethal and S. A. Mirnalini (2017). "Epigenetics in oral squamous cell carcinoma." Journal of Oral and Maxillofacial Pathology : JOMFP **21**(2): 252-259.

Hill, B. T. and L. A. Price (1994). "Lack of survival advantage in patients with advanced squamous cell carcinomas of the oral cavity receiving neoadjuvant chemotherapy prior to local therapy, despite achieving an initial high clinical complete remission rate." Am J Clin Oncol **17**(1): 1-5.

Hill, C. L., Y. Zhang, B. Sigurgeirsson, E. Pukkala, L. Mellekjær, A. Airio, S. R. Evans and D. T. Felson (2001). "Frequency of specific cancer types in dermatomyositis and polymyositis: a population-based study." Lancet **357**(9250): 96-100.

Huang, S., F. Liu, Q. Niu, Y. Li, C. Liu, L. Zhang, D. Ni and X. Pu (2013). "GLIPR-2 Overexpression in HK-2 Cells Promotes Cell EMT and Migration through ERK1/2 Activation." PLoS ONE **8**(3): e58574.

Huang, S. F., C. J. Kang, C. Y. Lin, K. H. Fan, T. C. Yen, H. M. Wang, I. H. Chen, C. T. Liao, A. J. Cheng and J. T. Chang (2008). "Neck treatment of patients with early stage oral tongue cancer: comparison between observation, supraomohyoid dissection, and extended dissection." Cancer **112**(5): 1066-1075.

Humphris, G. M., R. Freeman and H. M. Clarke (2004). "Risk perception of oral cancer in smokers attending primary care: a randomised controlled trial." Oral Oncol **40**(9): 916-924.

Hunter, K. D., E. K. Parkinson and P. R. Harrison (2005). "Profiling early head and neck cancer." Nat Rev Cancer **5**(2): 127-135.

Huntley, S. P., M. Davies, J. B. Matthews, G. Thomas, J. Marshall, C. M. Robinson, J. W. Eveson, I. C. Paterson and S. S. Prime (2004). "Attenuated type II TGF-beta receptor signalling in human malignant oral keratinocytes induces a less differentiated and more aggressive phenotype that is associated with metastatic dissemination." Int J Cancer **110**(2): 170-176.

Hynes, R. O. (1990). "Fibronectins." New York: Springer-Verlag

Hynes, R. O. (1992). "Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion." Cell **69**(1): 11-25.

Hynes, R. O. (2002). "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines." Cell **110**(6): 673-687.

Ikushima, H. and K. Miyazono (2010). "TGFbeta signalling: a complex web in cancer progression." Nat Rev Cancer **10**(6): 415-424.

Irimie, A. I., C. Ciocan, D. Gulei, N. Mehterov, A. G. Atanasov, D. Dudea and I. Berindan-Neagoie (2018). "Current Insights into Oral Cancer Epigenetics." International Journal of Molecular Sciences **19**(3): 670.

Jerjes, W., T. Upile, A. Petrie, A. Riskalla, Z. Hamdoon, M. Vourvachis, K. Karavidas, A. Jay, A. Sandison, G. J. Thomas, N. Kalavrezos and C. Hopper (2010). "Clinicopathological parameters, recurrence, locoregional and distant metastasis in 115 T1-T2 oral squamous cell carcinoma patients." Head Neck Oncol **2**: 9.

Jia, X., X. Li, Y. Xu, S. Zhang, W. Mou, Y. Liu, Y. Liu, D. Lv, C. H. Liu, X. Tan, R. Xiang and N. Li (2011). "SOX2 promotes tumorigenesis and increases the anti-apoptotic property of human prostate cancer cell." J Mol Cell Biol **3**(4): 230-238.

Justus, C. R., N. Leffler, M. Ruiz-Echevarria and L. V. Yang (2014). "In vitro Cell Migration and Invasion Assays." Journal of Visualized Experiments : JoVE(88): 51046.

Kalluri, R. and R. A. Weinberg (2009). "The basics of epithelial-mesenchymal transition." The Journal of Clinical Investigation **119**(6): 1420-1428.

Kerbela, R. S. (2008). "Tumor angiogenesis." N Engl J Med **358**(19): 2039-2049.

Kim, T. K. and J. H. Eberwine (2010). "Mammalian cell transfection: the present and the future." Analytical and Bioanalytical Chemistry **397**(8): 3173-3178.

Kulkarni, D. P., P. P. Wadia, T. N. Pradhan, A. K. Pathak and S. V. Chiplunkar (2009). "Mechanisms involved in the down-regulation of TCR zeta chain in tumor versus peripheral blood of oral cancer patients." Int J Cancer **124**(7): 1605-1613.

Laccourreye, O., G. Lawson, L. Muscatello, B. Biacabe, L. Laccourreye and D. Brasnu (1999). "Carbon dioxide laser debulking for obstructing endolaryngeal carcinoma: a 10-year experience." Ann Otol Rhinol Laryngol **108**(5): 490-494.

Lai, A. Y. and P. A. Wade (2011). "NuRD: A multi-faceted chromatin remodeling complex in regulating cancer biology." Nature reviews. Cancer **11**(8): 588-596.

Leemans, C., B. J M Braakhuis and R. H Brakenhoff (2011). The molecular biology of head and neck cancer.

Leemans, C. R., B. J. Braakhuis and R. H. Brakenhoff (2011). "The molecular biology of head and neck cancer." Nat Rev Cancer **11**(1): 9-22.

Leslie, A., E. Fyfe, P. Guest, P. Goddard and J. E. Kabala (1999). "Staging of Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity and Oropharynx: A Comparison of MRI and CT in T- and N-Staging." Journal of Computer Assisted Tomography **23**(1): 43-49.

Levendag, P. C., P. J. C. M. Nowak, M. J. C. van der Sangen, P. P. Jansen, W. M. H. Eijkenboom, A. S. T. Planting, C. A. Meeuwis and W. L. J. van Putten (1996). "Local Tumor Control in Radiation Therapy of Cancers in the Head and Neck." American Journal of Clinical Oncology **19**(5): 469-477.

Li, J., L. Du, Y. Yang, C. Wang, H. Liu, L. Wang, X. Zhang, W. Li, G. Zheng and Z. Dong (2013). "MiR-429 is an independent prognostic factor in colorectal cancer and exerts its anti-apoptotic function by targeting SOX2." Cancer Lett **329**(1): 84-90.

Li, L. T., Jiang, G., Chen, Q., Zheng, J.N. (2015). "Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (Review)." Molecular Medicine Reports **11**: 1566-1572.

Liang, C.-C., A. Y. Park and J.-L. Guan (2007). "In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro." Nat. Protocols **2**(2): 329-333.

Mahmood, T. and P.-C. Yang (2012). "Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting." North American Journal of Medical Sciences **4**(9): 429-434.

Majchrzak, E., B. Szybiak, A. Wegner, P. Pienkowski, J. Pazdrowski, L. Luczewski, M. Sowka, P. Golusinski, J. Malicki and W. Golusinski (2014). "Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma in young adults: a review of the literature." Radiol Oncol **48**(1): 1-10.

Marchenko, S. and L. Flanagan (2007). "Immunocytochemistry: Human Neural Stem Cells." Journal of Visualized Experiments : JoVE(7): 267.

Margadant, C. and A. Sonnenberg (2010). "Integrin-TGF-beta crosstalk in fibrosis, cancer and wound healing." EMBO Rep **11**(2): 97-105.

Markopoulos, A. K. (2012). "Current Aspects on Oral Squamous Cell Carcinoma." The Open Dentistry Journal **6**: 126-130.

Markopoulos, A. K., E. Z. Michailidou and G. Tzimagiorgis (2010). "Salivary markers for oral cancer detection." Open Dent J **4**: 172-178.

Marsh, D., K. Suchak, K. A. Moutasim, S. Vallath, C. Hopper, W. Jerjes, T. Upile, N. Kalavrezos, S. M. Violette, P. H. Weinreb, K. A. Chester, J. S. Chana, J. F. Marshall, I. R. Hart, A. K. Hackshaw, K. Piper and G. J. Thomas (2011). "Stromal features are predictive of disease mortality in oral cancer patients." J Pathol **223**(4): 470-481.

Marshall, J. (2011). Transwell® Invasion Assays. Cell Migration: Developmental Methods and Protocols. C. M. Wells and M. Parsons. Totowa, NJ, Humana Press: 97-110.

Massague, J. (1998). "TGF-beta signal transduction." Annu Rev Biochem **67**: 753-791.

Mazeron, R., Y. Tao, A. Lusinchi and J. Bourhis (2009). "Current concepts of management in radiotherapy for head and neck squamous-cell cancer." Oral Oncol **45**(4-5): 402-408.

McGurk, M. and S. E. Scott (2010). "The reality of identifying early oral cancer in the general dental practice." Br Dent J **208**(8): 347-351.

McMahon, J., C. J. O'Brien, I. Pathak, R. Hamill, E. McNeil, N. Hammersley, S. Gardiner and E. Junor (2003). "Influence of condition of surgical margins on local recurrence and disease-specific survival in oral and oropharyngeal cancer." British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery **41**(4): 224-231.

Mehrotra, R. and S. Yadav (2006). "Oral squamous cell carcinoma: etiology, pathogenesis and prognostic value of genomic alterations." Indian J Cancer **43**(2): 60-66.

Mishra, R. (2012). "Biomarkers of oral premalignant epithelial lesions for clinical application." Oral Oncol **48**(7): 578-584.

Mohanti, B. K., H. Umapathy, S. Bahadur, A. Thakar and S. Pathy (2004). "Short course palliative radiotherapy of 20 Gy in 5 fractions for advanced and incurable head and neck cancer: AllMS study." Radiother Oncol **71**(3): 275-280.

Moore, K. M., G. J. Thomas, S. W. Duffy, J. Warwick, R. Gabe, P. Chou, I. O. Ellis, A. R. Green, S. Haider, K. Brouillette, A. Saha, S. Vallath, R. Bowen, C. Chelala, D. Eccles, W. J. Tapper, A. M. Thompson, P. Quinlan, L. Jordan, C. Gillett, A. Brentnall, S. Violette, P. H. Weinreb, J. Kendrew, S. T. Barry, I. R. Hart, J. L. Jones and J. F. Marshall (2014). "Therapeutic targeting of integrin alphavbeta6 in breast cancer." J Natl Cancer Inst **106**(8).

Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn and H. Erlich (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1**: 263-273.

Munger, J. S., X. Huang, H. Kawakatsu, M. J. Griffiths, S. L. Dalton, J. Wu, J. F. Pittet, N. Kaminski, C. Garat, M. A. Matthay, D. B. Rifkin and D. Sheppard (1999). "The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis." Cell **96**(3): 319-328.

Murugan, A. K., N. T. Hong, Y. Fukui, A. K. Munirajan and N. Tsuchida (2008). "Oncogenic mutations of the PIK3CA gene in head and neck squamous cell carcinomas." Int J Oncol **32**(1): 101-111.

Nentwig, K., U. Reuning, P. Häusler, A. Kolk, M. Kesting, K. D. Wolff and M. Nieberler (2017). Epigenetische Reprogrammierung beeinflusst das Invasionsverhalten oraler Karzinomzellen.

Neufcoeur, P. E., M. Arafa, P. Delvenne and S. Saussez (2009). "[Involvement of human papillomavirus in upper aero-digestive tracts cancers]." Bull Cancer **96**(10): 941-950.

Neville, B. W. (2002). "Oral & maxillofacial pathology." **2nd Edition.**

Neville, B. W. and T. A. Day (2002). "Oral cancer and precancerous lesions." CA Cancer J Clin **52**(4): 195-215.

Neville, B. W. and T. A. Day (2002). "Oral Cancer and Precancerous Lesions." CA: A Cancer Journal for Clinicians **52**(4): 195-215.

Nieberler, M. (2012). "Function of the CHD4/Mi-2 β chromatin remodelling ATPase during neural development of *Xenopus laevis*." LMU München.

Nieuwenhuis, E. J., J. A. Castelijns, R. Pijpers, M. W. van den Brekel, R. H. Brakenhoff, I. van der Waal, G. B. Snow and C. R. Leemans (2002). "Wait-and-see policy for the NO neck in early-stage oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma using ultrasonography-guided cytology: is there a role for identification of the sentinel node?" Head Neck **24**(3): 282-289.

Nishimaki, T., T. Kanda, S. Nakagawa, S. Kosugi, T. Tanabe and K. Hatakeyama (2002). "Outcomes and prognostic factors after surgical resection of hypopharyngeal and cervical esophageal carcinomas." Int Surg **87**(1): 38-44.

Nolan, T., R. E. Hands and S. A. Bustin (2006). "Quantification of mRNA using real-time RT-PCR." Nature Protocols **1**: 1559.

Ogawa, T., K. Matsuura, K. Shiga, M. Tateda, K. Katagiri, K. Kato, S. Saijo and T. Kobayashi (2011). "Surgical treatment is recommended for advanced oral squamous cell carcinoma." Tohoku J Exp Med **223**(1): 17-25.

Ogden, G. R. (2005). "Alcohol and oral cancer." Alcohol **35**(3): 169-173.

Otsubo, T., Y. Akiyama, K. Yanagihara and Y. Yuasa (2008). "SOX2 is frequently downregulated in gastric cancers and inhibits cell growth through cell-cycle arrest and apoptosis." Br J Cancer **98**(4): 824-831.

Pagedar, N. A. and R. W. Gilbert (2009). "Selective neck dissection: a review of the evidence." Oral Oncol **45**(4-5): 416-420.

Paleri, V., F. W. Stafford and M. S. Sammut (2005). "Laser debulking in malignant upper airway obstruction." Head Neck **27**(4): 296-301.

Park, K. S. (2011). "Tgf-Beta family signaling in embryonic stem cells." Int J Stem Cells **4**(1): 18-23.

Parkin, D. M., F. Bray, J. Ferlay and P. Pisani (2005). "Global cancer statistics, 2002." CA Cancer J Clin **55**(2): 74-108.

Parsons, J. T., W. M. Mendenhall, S. P. Stringer, N. J. Cassisi and R. R. Million "An analysis of factors influencing the outcome of postoperative irradiation for squamous cell carcinoma of the oral cavity." International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics **39**(1): 137-148.

Peters, L. J., H. Goepfert, K. K. Ang, R. M. Byers, M. H. Maor, O. Guillaumondegui, W. H. Morrison, R. S. Weber, A. S. Garden, R. A. Frankenthaler and et al. (1993). "Evaluation of the dose for postoperative radiation therapy of head and neck cancer: first report of a prospective randomized trial." Int J Radiat Oncol Biol Phys **26**(1): 3-11.

Pignon, J. P., J. Bourhis, C. Domenge and L. Designe (2000). "Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer." Lancet **355**(9208): 949-955.

Ramsay, A. G., M. D. Keppler, M. Jazayeri, G. J. Thomas, M. Parsons, S. Violette, P. Weinreb, I. R. Hart and J. F. Marshall (2007). "HS1-associated protein X-1 regulates carcinoma cell migration and invasion via clathrin-mediated endocytosis of integrin alphavbeta6." Cancer Res **67**(11): 5275-5284.

Rethman, M. P., W. Carpenter, E. E. Cohen, J. Epstein, C. A. Evans, C. M. Flaitz, F. J. Graham, P. P. Hujoel, J. R. Kalmar, W. M. Koch, P. M. Lambert, M. W. Lingen, B. W. Oettmeier, Jr., L. L. Patton, D. Perkins, B. C. Reid, J. J. Sciubba, S. L. Tomar, A. D. Wyatt, Jr., K. Aravamudhan, J. Frantsve-Hawley, J. L. Cleveland and D. M. Meyer (2010). "Evidence-based clinical recommendations regarding screening for oral squamous cell carcinomas." J Am Dent Assoc **141**(5): 509-520.

Ribeiro, A. C., A. R. Silva, L. E. Simonato, L. M. Salzedas, M. L. Sundefeld and A. M. Soubhia (2009). "Clinical and histopathological analysis of oral squamous cell carcinoma in young people: a descriptive study in Brazilians." Br J Oral Maxillofac Surg **47**(2): 95-98.

Rivera, C. and B. Venegas (2014). "Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma (Review)." Oncology Letters **8**(1): 7-11.

Robertson, C., A. G. Robertson, J. H. Hendry, S. A. Roberts, N. J. Slevin, W. B. Duncan, R. H. MacDougall, G. R. Kerr, B. O'Sullivan and T. J. Keane (1998). "Similar decreases in local tumor control are calculated for treatment protraction and for interruptions in the radiotherapy of carcinoma of the larynx in four centers." Int J Radiat Oncol Biol Phys **40**(2): 319-329.

Rodgers, L. W., S. P. Stringer, W. M. Mendenhall, J. T. Parsons, N. J. Cassisi and R. R. Million (1993). "Management of squamous cell carcinoma of the floor of mouth." Head & Neck **15**(1): 16-19.

Rodriguez, T., A. Altieri, L. Chatenoud, S. Gallus, C. Bosetti, E. Negri, S. Franceschi, F. Levi, R. Talamini and C. La Vecchia (2004). "Risk factors for oral and pharyngeal cancer in young adults." Oral Oncol **40**(2): 207-213.

Rodriguez-Pinilla, S. M., D. Sarrio, G. Moreno-Bueno, Y. Rodriguez-Gil, M. A. Martinez, L. Hernandez, D. Hardisson, J. S. Reis-Filho and J. Palacios (2007). "Sox2: a possible driver of the basal-like phenotype in sporadic breast cancer." Mod Pathol **20**(4): 474-481.

Roepman, P., L. F. Wessels, N. Kettelarij, P. Kemmeren, A. J. Miles, P. Lijnzaad, M. G. Tilanus, R. Koole, G. J. Hordijk, P. C. van der Vliet, M. J. Reinders, P. J. Slootweg and F. C. Holstege (2005). "An expression profile for diagnosis of lymph node metastases from primary head and neck squamous cell carcinomas." Nat Genet **37**(2): 182-186.

Rognoni, E. (2014). "TGF β Stimulation Assay." Bio-protocol **4**(23):e1313.

Ruoslahti, E. (1984). "Fibronectin in cell adhesion and invasion." Cancer Metastasis Rev **3**(1): 43-51.

Saini, R. and C. F. Poh (2013). "Photodynamic therapy: a review and its prospective role in the management of oral potentially malignant disorders." Oral Dis **19**(5): 440-451.

Santos, H.-B.-d.-P., T.-K.-G. dos Santos, A.-R. Paz, Y.-W. Cavalcanti, C.-F.-W. Nonaka, G.-P. Godoy and P.-M. Alves (2016). "Clinical findings and risk factors to oral squamous cell carcinoma in young patients: A 12-year retrospective analysis." Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal **21**(2): e151-e156.

Sato, M., D. S. Shames and Y. Hasegawa (2012). "Emerging evidence of epithelial-to-mesenchymal transition in lung carcinogenesis." Respirology **17**(7): 1048-1059.

Schmezer, P. and C. Plass (2008). "Epigenetische Aspekte bei Karzinomen der Kopf-Hals-Region." HNO **56**(6): 594-602.

Scott, S. E., E. A. Grunfeld, J. Main and M. McGurk (2006). "Patient delay in oral cancer: a qualitative study of patients' experiences." Psychooncology **15**(6): 474-485.

Seelig, H. P., I. Moosbrugger, H. Ehrfeld, T. Fink, M. Renz and E. Genth (1995). "The major dermatomyositis-specific Mi-2 autoantigen is a presumed helicase involved in transcriptional activation." Arthritis Rheum **38**(10): 1389-1399.

Shah, J. P. and Z. Gil (2009). "Current concepts in management of oral cancer--surgery." Oral Oncol **45**(4-5): 394-401.

Shaw, R. (2006). "The epigenetics of oral cancer." International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery **35**(2): 101-108.

Silverman, S. J. (1998). "Etiology and Predisposing Factors." Oral Cancer: 7-24.

Sipos, B., D. Hahn, A. Carceller, J. Piulats, J. Hedderich, H. Kalthoff, S. L. Goodman, M. Kosmahl and G. Kloppel (2004). "Immunohistochemical screening for beta6-integrin subunit expression in adenocarcinomas using a novel monoclonal antibody reveals

strong up-regulation in pancreatic ductal adenocarcinomas in vivo and in vitro." Histopathology **45**(3): 226-236.

Sottile, J., D. C. Hocking and K. J. Langenbach (2000). "Fibronectin polymerization stimulates cell growth by RGD-dependent and -independent mechanisms." J Cell Sci **113 Pt 23**: 4287-4299.

Spiro, J. D., R. H. Spiro, J. P. Shad, R. B. Sessions and E. W. Strong (1988). "Critical assessment of supraomohyoid neck dissection." The American Journal of Surgery **156**(4): 286-289.

Sturgis, E. M. and P. M. Cinciripini (2007). "Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: an emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers?" Cancer **110**(7): 1429-1435.

Su, C. C., H. F. Yang, S. J. Huang and B. Lian le (2007). "Distinctive features of oral cancer in Changhua County: high incidence, buccal mucosa preponderance, and a close relation to betel quid chewing habit." J Formos Med Assoc **106**(3): 225-233.

Suh, J. D., J. A. Sercarz, E. Abemayor and et al. (2004). "Analysis of outcome and complications in 400 cases of microvascular head and neck reconstruction." Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery **130**(8): 962-966.

Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." Cell **126**(4): 663-676.

Talamini, R., C. Bosetti, C. La Vecchia, L. Dal Maso, F. Levi, E. Bidoli, E. Negri, C. Pasche, S. Vaccarella, L. Barzan and S. Franceschi (2002). "Combined effect of tobacco and alcohol on laryngeal cancer risk: a case-control study." Cancer Causes Control **13**(10): 957-964.

Thavarajah, R., A. Rao, U. Raman, S. T. Rajasekaran, E. Joshua, H. R and R. Kannan (2006). "Oral lesions of 500 habitual psychoactive substance users in Chennai, India." Arch Oral Biol **51**(6): 512-519.

Thiery, J. P. (2002). "Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression." Nat Rev Cancer **2**(6): 442-454.

Thomas, G. J., M. P. Lewis, I. R. Hart, J. F. Marshall and P. M. Speight (2001). "AlphaVbeta6 integrin promotes invasion of squamous carcinoma cells through up-regulation of matrix metalloproteinase-9." Int J Cancer **92**(5): 641-650.

Thomas, G. J., M. P. Lewis, S. A. Whawell, A. Russell, D. Sheppard, I. R. Hart, P. M. Speight and J. F. Marshall (2001). "Expression of the $\alpha\beta 6$ Integrin Promotes Migration and Invasion in Squamous Carcinoma Cells." Journal of Investigative Dermatology **117**(1): 67-73.

Thomas, G. J., M. L. Nystrom and J. F. Marshall (2006). "Alphavbeta6 integrin in wound healing and cancer of the oral cavity." J Oral Pathol Med **35**(1): 1-10.

Troeltzsch, M., T. Knosel, C. Eichinger, F. Probst, M. Troeltzsch, T. Woodlock, G. Mast, M. Ehrenfeld and S. Otto (2014). "Clinicopathologic features of oral squamous cell carcinoma: do they vary in different age groups?" J Oral Maxillofac Surg **72**(7): 1291-1300.

Tumuluri, V., G. A. Thomas and I. S. Fraser (2002). "Analysis of the Ki-67 antigen at the invasive tumour front of human oral squamous cell carcinoma." Journal of Oral Pathology & Medicine **31**(10): 598-604.

van den Brekel, M. W., J. A. Castelijns, H. V. Stel, R. P. Golding, C. J. Meyer and G. B. Snow (1993). "Modern imaging techniques and ultrasound-guided aspiration cytology for the assessment of neck node metastases: a prospective comparative study." Eur Arch Otorhinolaryngol **250**(1): 11-17.

van Houten, V. M., M. P. Tabor, M. W. van den Brekel, J. A. Kummer, F. Denkers, J. Dijkstra, R. Leemans, I. van der Waal, G. B. Snow and R. H. Brakenhoff (2002). "Mutated p53 as a molecular marker for the diagnosis of head and neck cancer." J Pathol **198**(4): 476-486.

Vigneswaran, N. and M. D. Williams (2014). "Epidemiological Trends in Head and Neck Cancer and Aids in Diagnosis." Oral and maxillofacial surgery clinics of North America **26**(2): 123-141.

Villaret, D. B. and N. A. Futran (2003). "The indications and outcomes in the use of osteocutaneous radial forearm free flap." Head Neck **25**(6): 475-481.

Walboomers, J. M., M. V. Jacobs, M. M. Manos, F. X. Bosch, J. A. Kummer, K. V. Shah, P. J. Snijders, J. Peto, C. J. Meijer and N. Munoz (1999). "Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide." J Pathol **189**(1): 12-19.

Wang, B., S. Zhang, K. Yue and X.-D. Wang (2013). "The recurrence and survival of oral squamous cell carcinoma: a report of 275 cases." Chinese Journal of Cancer **32**(11): 614-618.

Wang, D., H. Song, J. A. Evans, J. C. Lang, D. E. Schuller and C. M. Weghorst (1997). "Mutation and downregulation of the transforming growth factor beta type II receptor gene in primary squamous cell carcinomas of the head and neck." Carcinogenesis **18**(11): 2285-2290.

Wang, X., X. Ji, J. Chen, D. Yan, Z. Zhang, Q. Wang, X. Xi and Y. Feng (2014). "SOX2 enhances the migration and invasion of ovarian cancer cells via Src kinase." PLoS One **9**(6): e99594.

Wang, Z., B. Zhang, L. Jiang, X. Zeng, Y. Chen, X. Feng, Y. Guo and Q. Chen (2009). "RACK1, an excellent predictor for poor clinical outcome in oral squamous carcinoma, similar to Ki67." Eur J Cancer **45**(3): 490-496.

Warnakulasuriya, S. (2009). "Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer." Oral Oncol **45**(4-5): 309-316.

Warnakulasuriya, S., N. W. Johnson and I. van der Waal (2007). "Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa." J Oral Pathol Med **36**(10): 575-580.

Weina, K. and J. Utikal (2014). "SOX2 and cancer: current research and its implications in the clinic." Clinical and Translational Medicine **3**: 19-19.

Weinberg, R. A. (2007). "The Biology of Cancer." Garland Science.

Wolff, K.-D., M. Follmann and A. Nast (2012). "The Diagnosis and Treatment of Oral Cavity Cancer." Deutsches Ärzteblatt International **109**(48): 829-835.

Wolff, K. D. (2012). "AWMF Leitlinie Mundhöhlenkarzinom."

Xia, L., W. Huang, M. Bellani, M. M. Seidman, K. Wu, D. Fan, Y. Nie, Y. Cai, Y. W. Zhang, L. R. Yu, H. Li, C. A. Zahnow, W. Xie, R. W. Chiu Yen, F. V. Rassool and S. B. Baylin (2017). "CHD4 Has Oncogenic Functions in Initiating and Maintaining Epigenetic Suppression of Multiple Tumor Suppressor Genes." Cancer Cell **31**(5): 653-668.e657.

Xiao, L., Y. Du, Y. Shen, Y. He, H. Zhao and Z. Li (2012). "TGF-beta 1 induced fibroblast proliferation is mediated by the FGF-2/ERK pathway." Front Biosci (Landmark Ed) **17**: 2667-2674.

Xu, N., F. Liu, J. Zhou and C. Bai (2016). "CHD4 is associated with poor prognosis of non-small cell lung cancer patients through promoting tumor cell proliferation." European Respiratory Journal **48**(suppl 60).

Yamanaka, S. (2009). "Elite and stochastic models for induced pluripotent stem cell generation." Nature **460**: 49.

Yang, G. Y., K. S. Xu, Z. Q. Pan, Z. Y. Zhang, Y. T. Mi, J. S. Wang, R. Chen and J. Niu (2008). "Integrin alpha v beta 6 mediates the potential for colon cancer cells to colonize in and metastasize to the liver." Cancer Sci **99**(5): 879-887.

Yilmaz, A. O., H. I.; Alp, E.; Menevse, S. (2012). "Real-Time PCR for Gene Expression Analysis." <https://www.intechopen.com/books/polymerase-chain-reaction/real-time-pcr-for-gene-expression-analysis>.

Zhang, J. and J. Liu (2013). "Tumor stroma as targets for cancer therapy." Pharmacol Ther **137**(2): 200-215.

Zhang, Y., G. LeRoy, H. P. Seelig, W. S. Lane and D. Reinberg (1998). "The dermatomyositis-specific autoantigen Mi2 is a component of a complex containing histone deacetylase and nucleosome remodeling activities." Cell **95**(2): 279-289.

Zhu, J., J. Zhu and T. A. Springer (2013). "Complete integrin headpiece opening in eight steps." The Journal of Cell Biology **201**(7): 1053-1068.

zur Hausen, H. (2002). "Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application." Nat Rev Cancer **2**(5): 342-350.

Zygianni, A. G., G. Kyrgias, P. Karakitsos, A. Psyri, J. Kouvaris, N. Kelekis and V. Kouloulis (2011). "Oral squamous cell cancer: early detection and the role of alcohol and smoking." Head Neck Oncol **3**: 2.

10. Publikationen

Teile dieser Dissertationsarbeit wurden veröffentlicht:

Wissenschaftliche Veröffentlichung:

Epigenetische Reprogrammierung beeinflusst das Invasionsverhalten oraler Karzinomzellen.

K.Nentwig, U.Reuning, P.Häusler, A.Kolk, M.Kesting, K.D.Wolff, M.Nieberler
MKG-Chirurg (2017) 10: 284. <https://doi.org/10.1007/s12285-017-0119-0>

Diese Arbeit wurde mit dem DGMKG-Posterpreis 2017 ausgezeichnet.

11. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich noch bei einigen wichtigen Personen bedanken, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Dissertation nicht möglich gewesen wäre:

Mein Dank gilt zunächst meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Dr. Klaus-Dietrich Wolff, und dem Betreuer dieser Arbeit, Herrn Dr. Dr. Markus Nieberler.

Herrn Prof. Dr. Dr. Klaus-Dietrich Wolff danke ich für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und Apparaturen sowie die Möglichkeit, eine solche Arbeit anfertigen zu können.

Herrn Dr. Dr. Nieberler möchte ich für die ausgezeichnete Betreuung sowie für die Hilfestellung bei jeglichen Fragen bedanken.

Herzlichster Dank gilt auch Frau Anke Bengé für die Unterstützung bei labortechnischen Fragen, sowie Frau Prof. Dr. Ute Reuning für die sehr gute Zusammenarbeit.

Weiterhin möchte ich mich aufrichtig bei meinen jetzigen Kollegen der Klinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie bedanken.

Besonderer Dank gilt auch meiner Familie, vor allem meinen Eltern, sowie meinem Partner Nikolai Tschürtz, ohne die das Studium und diese Promotion nicht möglich gewesen wären.