

**Aus der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische
Gesichtschirurgie der Universität Würzburg**

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. A. C. Kübler

**Einfluss von HGF/c-Met
auf das Tumormikromilieu in
Kopf-Hals-Karzinomen**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Nicola Anna Klenk

aus Nürnberg

Würzburg, November 2018



Referent: Prof. Dr. Dr. Alexander Kübler

Korreferent: Prof. Dr. Uwe Gbureck

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 15.07.2019

Die Promovendin ist Zahnärztin

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	
1 EINLEITUNG	1
1.1 Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Ätiologie	2
1.1.3 Therapiekonzepte.....	3
1.2 HGF/c-Met-Signalweg	7
1.2.1 Hintergrund, molekularer Aufbau und physiologische Funktion.....	7
1.2.2 Bedeutung von HGF/c-Met in Kopf-Hals-Karzinomen	10
1.3 Immun-Checkpoint-Protein PD-L1	13
1.4 Glukose-Metabolismus in Tumorzellen.....	15
1.5 Fragestellung.....	18
2 MATERIAL UND METHODEN	19
2.1 Material.....	19
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	19
2.1.2 Puffer.....	21
2.1.3 Wachstumsfaktoren, Inhibitoren und Antikörper.....	22
2.1.4 Geräte	24
2.1.5 Software	26
2.2 Methoden.....	27
2.2.1 Zelllinien und Medien	27
2.2.2 Zellzählung.....	28
2.2.3 Zytotoxizitäts-Test (Kristallviolett).....	29
2.2.4 Western Blot zum Nachweis von phosphoryliertem c-Met-Rezeptor	30
2.2.5 Durchflusszytometrie zum Nachweis von PD-L1	34
2.2.5.1 c-Met-Inhibition mit PHA-665752	34
2.2.5.2 c-Met-Inhibition mit RNA-Interferenz.....	35
2.2.6 Messung der basalen Glykolyse am Seahorse-Gerät	36

2.2.7	Statistik.....	39
3	ERGEBNISSE	40
3.1	Zytotoxizitäts-Test mit PHA-665752	40
3.2	Western Blot zum Nachweis von phosphoryliertem c-Met-Rezeptor.....	43
3.3	Durchflusszytometrie zum Nachweis von PD-L1 nach HGF-Stimulation	45
3.3.1	c-Met-Inhibition mit PHA-665752.....	45
3.3.2	c-Met-Inhibition mit RNA-Interferenz	47
3.4	Messung der basalen Glykolyse nach HGF-Stimulation.....	51
4	DISKUSSION	54
4.1	Zytotoxizität und Funktionalität des Tyrosinkinase-Inhibitors PHA-665752	55
4.2	c-Met-Aktivierung nach HGF-Stimulation.....	56
4.3	Einfluss von HGF/c-Met auf PD-L1 in Kopf-Hals-Karzinomen	57
4.4	Einfluss von HGF/c-Met auf den Glukose-Metabolismus in Kopf-Hals-Karzinomen.....	60
4.5	Fazit.....	62
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	64
6	LITERATURVERZEICHNIS	66
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	78
	TABELLENVERZEICHNIS	79
	ANHANG.....	
	DANKSAGUNG.....	
	LEBENS LAUF.....	

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µl	Mikroliter
µg	Mikrogramm
2-DG	2-Deoxy-D-Glucose
A	Ampere [A]
Abs	Absorption
Akt	Proteinkinase B
APC	Allophycocyanin
ASR	Age Standardised Rate
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
C _{max}	Maximal-Konzentration
c-Met	cyto-Mesenchymal-epithelial-transition (Receptor)
c-Src	cellular-sarcoma, Tyrosinkinase Src
DGMKG	Deutsche Gesellschaft für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF/EGFR	Epidermal Growth Factor/Epidermal Growth Factor Receptor
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FDA	Food and Drug Administration, USA
FDG-PET	¹⁸ F-Deoxy-Glucose-Positronen-Emission-Tomographie
FI	Fluoreszenzintensität
For	Foretinib
GLUT	Glukosetransporter, diverse
glycoPER	Glycolytic Proton Efflux Rate
Gab1	Grb2-associated-binding protein 1
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
GSK3β	Glykogensynthase-Kinase 3

H ⁺	Proton
HAI-1	Hepatocyte Growth Factor Activator Inhibitor-Type 1
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HNSCC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma
HPV	Humanes Papilloma Virus
IARC	International Agency for Research on Cancer
IC ₅₀	half maximal (50%) inhibitory concentration
IGF-I	Insulin-like Growth Factor-Type I
INHANCE	International Head And Neck Cancer Epidemiology
IL-6	Interleukin-6
IPT	Immunoglobulin-Plexin-Transkriptions(-Domäne)
K _d	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
KHT	Kopf-Hals-Tumor
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MCT	Monocarboxylat-Transporter
MET	Gen, das für c-Met codiert
mg	Milligramm
mM	Millimol
M	Mol
ml	Milliliter
ng	Nanogramm
PD-1/PD-L1	Programmed Death (Receptor)-1/Programmed Death-Ligand 1
PE	Phycoerythrin
PER	Proton Efflux Rate
PG	Prostaglandin
PHA	PHA-665752
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
p-Met	phosphorylierter c-Met Rezeptor (Protein)
pmol	Pikomol
PSI	Plexin-Semaphorin-Integrin(-Domäne)
Rot/AA	Rotenon/Antimycin A (Inhibitoren der Atmungskette)

RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SD	Standard Deviation
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SEMA	Domäne aus Semaphorinen
siRNA	small interfering Ribonucleicacid
Stabw	Standardabweichung
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
TNF	Tumornekrosefaktor
TNM	Tumor-Nodus-Metastasen(-Klassifikation)
WSS	Western Stock Solution

1 EINLEITUNG

1.1 Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region

1.1.1 Epidemiologie

Im Jahr 2012 erkrankten weltweit schätzungsweise 686.328 Menschen an einem Kopf-Hals-Tumor, sodass er zu den am häufigsten vorkommenden Tumoren auf der Welt gezählt wird (FERLAY J et al., 2013). Ungefähr 90% aller Kopf-Hals-Tumoren sind dabei histopathologisch Plattenepithelkarzinome (MARUR et al., 2008). In der englischsprachigen Fachliteratur ist für Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region der Begriff *head and neck squamous cell carcinoma* mit der Abkürzung HNSCC etabliert und wird deshalb auch in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Am häufigsten ist bei HNSCC das Schleimhautepithel der Mundhöhle und Lippen (300.373) betroffen, weniger häufig Larynx (156.877), Pharynx (142.387) und Nasopharynx (86.691). Deutschland zählte ebenfalls im Jahr 2012 um die 19.955 Neuerkrankungen und steht damit in Europa an zweiter Stelle. Die in diesem Absatz aufgeführten Daten wurden im Rahmen des Globocan-Projektes der IARC Cancer Base gesammelt, um die Inzidenz, Prävalenz und Mortalität der weltweit häufigsten Krebserkrankungen, verglichen nach Alter, Geschlecht und geographischer Verteilung, exemplarisch für das Jahr 2012 zu ermitteln. Der Inzidenz-Vergleich zwischen den Geschlechtern verdeutlicht, dass Männer (513.100) dabei wesentlich häufiger betroffen waren als Frauen (173.224) und das Risiko an einem Kopf-Hals-Tumor zu erkranken, ab dem 45. Lebensjahr, deutlich ansteigt. Die geographische Verteilung zeigt, dass Asien (~396.000 Fälle) und Europa (~140.000 Fälle) zusammen mehr als 75% der weltweiten Inzidenz im Jahr 2012 einnehmen, während Amerika (15,4%), Afrika (5,8%) und Ozeanien (0,9%) einen bedeutend geringeren Anteil bilden. Bei der Beurteilung muss berücksichtigt werden, dass die Qualität und Quantität der lokalen Datenregistrierung in den verschiedenen Nationen sehr different ist (FERLAY J et al., 2013).

GARAVELLO et al. (2010) analysierten WHO-Daten zur Sterblichkeitsrate in Folge von Mundhöhlenkarzinomen, und das Ergebnis zeigte, dass diese in der Europäischen Union, nach einem Anstieg in den 1980er Jahren, zwischen 1993 und 2004 gesunken ist, wobei 2004 die Sterblichkeit der Männer mit einer nach Altersgruppen standardisierten Rate (ASR) von 6,1/100.000 weit über der der Frauen (ASR 1,1/100.00) lag. Aktuellere Daten aus dem Globocan-Projekt von 2012 zeigen jedoch eine erneut angehobene Sterblichkeitsrate von 7,6/100.000 beim männlichen und 1,4/100.000 beim weiblichen Geschlecht (FERLAY J et al., 2013). Diese Zahlen verdeutlichen, dass die Erforschung neuer therapeutischer Ansatzpunkte dringend notwendig ist.

1.1.2 Ätiologie

Wie bereits erörtert, variiert die Inzidenz bei HNSCC statistisch gesehen nach geographischer Herkunft, Alter und Geschlecht. Weiterhin ist die Inzidenz abhängig von der quantitativen und qualitativen Aussetzung relevanter Risikofaktoren. Die INHANCE Vereinigung kam zu dem Ergebnis, dass der karzinogene Effekt von Tabak- und Alkoholkonsum mit 72% die Hauptursache für die Erkrankung an einem HNSCC ist. Von diesen sind 4% der Karzinome nur durch Alkoholgenuss, 33% durch Tabakkonsum und 35% durch eine Kombination beider Faktoren verursacht worden. Die Haupteckentnis war, dass ein kombinierter Tabak- und Alkoholkonsum einen „[...] mehr als multiplikatoren Effekt auf das HNSCC-Erkrankungsrisiko [...]“ (S.547) ausmacht (HASHIBE et al., 2009). Somit können reiner Tabakkonsum, sowie eine Kombination mit Alkohol, als die Hauptrisikofaktoren hervorgehoben werden. Diese Aussage wird von zahlreichen Studien belegt (GOLDENBERG et al., 2004; MIZUMOTO et al., 2017; MAASLAND et al., 2014). Bereits eine frühere Studie von HASHIBE et al. (2007) verdeutlichte die besonders karzinogene Wirkung von Tabak vor Alkohol, indem sie den durch Rauchen verursachte HNSCC in einer Gruppe von Nichttrinkern und durch Alkohol verursachte HNSCC in einer Gruppe von Nichtrauchern untersuchte. Das Ergebnis war, dass sich bei den Nichttrinkern durch Rauchen ein 2,31-fach höheres Erkrankungsrisiko ergab und umgekehrt, fast 25% der HNSCC vermutlich gar nicht entstanden wären, wenn

die Personen nicht geraucht hätten. Bei den Nichtrauchern, die aber Alkohol konsumieren, gab es nur eine relevante Korrelation zur Entstehung von HNSCC, wenn die Personen regelmäßig große Alkoholmengen konsumiert hatten (HASHIBE et al., 2007). Auch eine Infektion mit dem Humanen Papillomavirus (HPV), vor allem mit dem Subtyp HPV16, kann das Risiko für ein orales Plattenepithelkarzinom erhöhen. Anhaltspunkte hierfür ergeben sich aus einer amerikanischen Studie von LEWIS et al. (2015), die auch zeigte, dass besonders Männer mittleren Alters und Nichtraucher betroffen sind. Die Prognose von HNSCC in Korrelation mit einer HPV-Infektion ist oft als gut zu bewerten, allerdings kann sie sich durch die Aussetzung weiterer Risikofaktoren, z.B. Tabakkonsum, verschlechtern. Das Protein p16 gilt in diesem Fall als eindeutiger Tumormarker. In 31,5% aller oralen HNSCC wurde HPV DNA gefunden, davon war es zu 82,2% das HPV16 (NDIAYE et al., 2014). Die Fakten wurden zum Teil im Review von Pezzuto et al. für einen Überblick des aktuellen Wissensstands sehr gut zusammengefasst (PEZZUTO et al., 2015).

1.1.3 Therapiekonzepte

Der Therapiestandard bei einem Kopf-Hals-Karzinom besteht bis heute aus der operativen Entfernung, sowie gegebenenfalls Radio- und Chemotherapie. Welche Methode angewendet wird oder ob eine Kombination nötig ist, richtet sich nach dem TNM- bzw. UICC-Stadium, sowie u.a. nach Alter und Allgemeinzustand des Patienten (DGMKG, 2012; MARUR et al., 2016). Bei einem frühen Tumorstadium (T1-T2) und Resektabilität empfiehlt die S3-Leitlinie „Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms 2012“ der Deutschen Gesellschaft für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie (DGMKG) eine Primärresektion des Tumors, mit dem Ziel eines R0-Status (Hinweis: z. Zt. läuft eine Überprüfung der Leitlinien).

Je nach Lymphknotenbefall wird außerdem eine modifizierte radikale oder selten eine radikale Neck Dissection durchgeführt (DE ZINIS et al., 2006). Aber auch bei klinisch unauffälligem Lymphknotenstatus ist es gerechtfertigt, elektiv die supraomohyoidalen Level I-III zu entfernen, um prophylaktisch etwaige

Mikrometastasen zu beseitigen, wie eine retrospektive Studie von THIELE et al. (2012) bestätigen konnte.

Eine Tumorsektion kann jedoch durch die Tumorgöße, sowie Gewebefiltration limitiert sein und muss mit postoperativen Funktionseinschränkungen abgewogen werden. Im Falle eines fortgeschrittenen Stadiums (T3-T4), positiven Resektionsrändern und Vorhandensein von Metastasen reicht eine rein chirurgische Entfernung nicht aus, sodass eine postoperative Radiotherapie mit etwa 66 Gray angeschlossen werden sollte, in den meisten Fällen als kombinierte Radiochemotherapie (DGMKG, 2012). Denn laut COOPER et al. (2004) bewirkt eine Kombination im Vergleich zur alleinigen Radiatio, eine Verbesserung in lokaler Kontrolle und progressionsfreiem Zeitraum, sowie eine erhöhte Gesamtüberlebensrate (ADELSTEIN et al., 2003; DENIS et al., 2004). Eine Bestrahlung kann in seltenen Fällen im Frühstadium kurativ angewendet werden oder dient neoadjuvant bei sehr großen Tumoren einer präoperativen Verkleinerung (MARUR et al., 2008). Aufgrund der hohen Bestrahlung auf umliegende Strukturen, wie Speicheldrüsen, Pharynxmuskulatur etc. leiden die meisten Patienten anschließend u.a. unter Xerostomie, sowie Dysphagie und müssen längerfristig durch eine Magensonde ernährt werden (LANGENDIJK et al., 2008; VLACICH et al., 2014).

Wie bereits erwähnt, wird eine Chemotherapie bei fortgeschrittenem Tumorstadium (T3/T4) als kombinierte adjuvante Radiochemotherapie angewendet, da nachgewiesen wurde, dass eine neoadjuvante bzw. adjuvante Chemo-Einzeltherapie hinsichtlich der Überlebensrate bei oralen Plattenepithelkarzinomen keinen Vorteil hat (DGMKG, 2012; LICITRA et al., 2003). Durch die Chemotherapeutika wird der Tumor strahlensensibler. Diese basieren meist auf platinhaltigen Inhaltstoffen, in der Regel Cisplatin. (FORASTIERE et al., 2001; LAMONT et al., 2001). Eine Gemeinsamkeit aller Chemotherapeutika sind die zahlreichen Nebenwirkungen, wie eine hohe Nephro-, Neuro-, Myelo- und Ototoxizität (RIVELLI et al., 2015; SHIN et al., 2001).

Aufgrund der belastenden Nebenwirkungen durch Bestrahlung und Chemotherapie, sowie dem Anspruch nach gezielteren Anti-Tumor-Strategien,

wurden in den letzten Jahren die Therapiemöglichkeiten um zwei weitere Therapiesäulen, die sogenannte zielgerichtete („targeted“) Tumor- und die Immuntherapie, erweitert. Da die Website des US-amerikanischen National Cancer Institut die aktuellsten allgemeinen Informationen und wissenschaftlichen Erkenntnisse zu diesen Therapien enthält, wird sich im Folgenden auf deren Inhalt berufen.

Für die zielgerichtete Tumorthherapie wird klinisch nach prognostischen Markern, wie z.B. Mutationen und Überexpressionen von Molekülen, welche für Wachstum und Ausbreitung von Zellen verantwortlich sind, gesucht. Es werden Medikamente verabreicht, die durch Blockierung dieser Moleküle, das Tumorstadium hemmen sollen. Somit ist im Gegensatz zur klassischen Chemotherapie (z.B. Cisplatin), die auf alle sich schnell teilenden Zellen einwirkt und als cytotoxisches Reagenz die Zellen abtötet (s. vorheriger Absatz), die Wirkungsweise hier eher cytostatisch (NATIONAL-CANCER-INSTITUTE, 2018b). In HNSCC ist ein solches Zielmolekül beispielsweise der Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), ein Tyrosinkinase-Rezeptor. Da EGFR in Kopf-Hals-Karzinomen zu ca. 90% überexprimiert und für das Tumorstadium verantwortlich ist, wurde er bereits in zahlreichen Studien als vielversprechender Angriffspunkt untersucht (GRANDIS et al., 1993; KOZAKIEWICZ et al., 2018).

Als Medikamente kommen u.a. monoklonale Antikörper und Tyrosinkinase-Inhibitoren infrage. Cetuximab, ein FDA-geprüfter Antikörper der EGFR blockiert, ist momentan die einzige zugelassene zielgerichtete Tumorthherapie für HNSCC. VERMORKEN et al. (2008) wiesen eine verlängerte Überlebenszeit durch Cetuximab und Chemotherapie von 10,1 Monaten gegenüber 7,4 Monaten durch reine Chemotherapie nach. Zudem konnten BONNER et al. (2010) in einer Phase III-Studie zeigen, dass die mittlere Überlebenszeit durch die Behandlung mit Cetuximab und Radiotherapie 49 Monate und mit Radiotherapie alleine 29,3 Monate betrug, sowie eine 5-Jahres Gesamtüberlebensrate von 45,6% gegenüber 36,4% erreicht wurde. Trotz der hohen EGFR-Expressionsrate in HNSCC, war die Cetuximab-Monotherapie in einer klinischen Studie von VERMORKEN et al. (2008) nur bei 10-13% der Patienten erfolgreich.

Die erzielten Erfolge sind nur gering, aufgrund einer häufig bestehenden Resistenz gegenüber Cetuximab in Kopf-Hals-Karzinomen (BRAND et al., 2011). Verschiedene Untersuchungen deuten darauf hin, dass - neben der Aktivierung anderer Rezeptor-Tyrosinkinasen - der HGF/c-Met Signalweg für die Cetuximab-Resistenz verantwortlich ist (WHEELER et al., 2008; TEPPER et al., 2016). MADDOZ-GURPIDE et al. (2015) konnten einen Zusammenhang herstellen zwischen einem geringen Therapieerfolg nach Cetuximab Therapie bei Rezidiv-Patienten und einer gesteigerten HGF/c-Met-Aktivität. Ein Teilaspekt der zielgerichteten Tumortherapie ist die Behandlung mit Medikamenten, die auf den Stoffwechsel des Tumors wirken. Da die Hauptenergiequelle der Tumorzellen Glukose ist, beeinflussen jene hauptsächlich den Glukosestoffwechsel der Tumoren. Ziel ist hier den Tumorzelltod durch die Verminderung der Energiezufuhr herbeizuführen, welche für die unkontrollierte Proliferation der malignen Zellen notwendig ist (SANDULACHE et al., 2011; ELF et al., 2014; ZHANG et al., 2014).

Die Immuntherapie beinhaltet u.a. Checkpoint-Inhibitoren und unterstützt das körpereigene Immunsystem dahingehend, Tumorzellen effektiver zu beseitigen. Denn diese entziehen sich dem Immunsystem durch vielfältige Mechanismen, wodurch ein unkontrolliertes Tumorwachstum möglich wird. Immuntherapeutika können hierbei z.B. die eigene Immunabwehr stärken oder auch Tumorzellen markieren, damit sie von den Immunzellen besser erkannt werden (NATIONAL-CANCER-INSTITUTE, 2018a). In HNSCC gilt besonders das Immun-Checkpoint-Protein PD-L1 als vielversprechender Angriffspunkt (MUELLER et al., 2017; ROLFES et al., 2018). Nach entsprechenden Erkenntnissen, die aus Studien mit anderen Karzinomen erlangt wurden, wird nun auch in HNSCC ein Zusammenhang zwischen der HGF/c-Met-Signalachse und PD-L1 und damit dem Immunsystem, diskutiert (BALAN et al., 2015; HARTMANN et al., 2016).

Seit einiger Zeit ist im Rahmen der „neuen“ Therapiekonzepte das Tumormikromilieu in den Fokus der Forschungen gerückt. Es umgibt die eigentlichen Tumorzellen und hat durch seine Rolle in Tumormetabolismus und Unterwanderung der Immunabwehr eine maßgebliche Bedeutung in der Tumorgenese (BALAN et al., 2015; HARTMANN et al., 2016; WANG et al., 2017).

Um die Wirkung der Medikamente in der zielgerichteten Tumor- und Immuntherapie zu verbessern, müssen zunächst vielfältige Mechanismen auf molekularer Ebene genauer analysiert und verstanden werden.

In der vorliegenden Arbeit werden hiervon zwei Teilaspekte näher beleuchtet. *In vitro* soll untersucht werden, ob der HGF/c-Met-Signalweg die PD-L1-Expression und den Glukosemetabolismus in HNSCC beeinflusst. Aus diesem Grund werden im Folgenden die HGF/c-Met-Signalachse, das Immun-Checkpoint-Protein PD-L1 und der Glukosemetabolismus, sowie aktuelle wissenschaftliche Erkenntnisse ausführlich beschrieben, um die mögliche Relevanz von HGF/c-Met als molekularen Angriffspunkt in der Therapie von Kopf-Hals-Karzinomen zu erörtern.

1.2 HGF/c-Met-Signalweg

1.2.1 Hintergrund, molekularer Aufbau und physiologische Funktion

Der Hepatocyte Growth Factor (HGF) ist bereits seit den 1980er Jahren bekannt. Zeitweilig wurden verschiedene Begrifflichkeiten für das gleiche Molekül verwendet (scatter factor, tumor cytotoxic factor, HGF; STOKER et al., 1987). Erst 1991 erkannte man, dass die entschlüsselten Funktionen von vermeintlich verschiedenen Faktoren, ein und demselben Molekül zuzuschreiben waren, dem Hepatozyten-Wachstumsfaktor (BOTTARO et al., 1991; SHIMA et al., 1991; FURLONG et al., 1991). HGF wurde ursprünglich aus Lebergewebe isoliert, um das besondere Regenerationsverhalten zu erforschen. Es zeigte sich jedoch, dass der Hepatozyten-Wachstumsfaktor, nicht wie ursprünglich gedacht nur in der Leber vorkommt, sondern in zahlreichen weiteren Organen eine essentielle Rolle spielt. Beispielsweise wirkt er proliferativ und regenerativ in Nierenzellen, β -Zellen des Pankreas, sowie in Hautzellen; letztere zeigten eine verminderte Wundheilung bei ausgeschaltetem c-Met-Rezeptor (CHMIELOWIEC et al., 2007; MA et al., 2009; ROCCISANA et al., 2005). In der Embryogenese ist HGF/c-Met u.a. für die Entwicklung der Leber (SCHMIDT et al., 1995), Skelettmuskulatur (WEBSTER et al., 2013), sowie Neuralinduktion (STREIT et al., 1995), Gefäßbildung (GALLO et al., 2015) und Blutzell-Differenzierung (FEHLNER-GARDINER et al., 1999)

zuständig. In der Leber wurde am Tiermodell zudem eine anti-apoptotische und -inflammatorische Wirkung gezeigt (GIEBELER et al., 2009).

HGF ist ein Protein, das in aktivem Zustand aus 697 Aminosäuren besteht, die heterodimer in einer alpha- und beta-Kette angeordnet sind. Es wird zunächst als pro-HGF von Tumor-assoziierten, stromalen Fibroblasten parakrin sezerniert (TASHIRO et al., 1990) und erst durch zwei Abspaltungsvorgänge zum reifen HGF umgewandelt (NAKA et al., 1992; SHIMOMURA et al., 1992). Hauptsächlich beteiligt ist hierbei die Protease HGF-A, die wiederum durch Thrombin aus der Gerinnungskaskade aktiviert wird (MIYAZAWA et al., 1993; SHIMOMURA et al., 1992; MIYAZAWA, 2010). Positiv auf die HGF-Expression wirken außerdem einige proinflammatorische Zytokine (Interleukin 1- β , PG E2 und I2; TAKAMI et al., 2004), während HAI-1 einen proteolytischen Effekt hat (KATAOKA et al., 2003).

In zahlreichen Studien wurde belegt, dass HGF mit dem sogenannten c-Met (cyto mesenchymal epithelial transition) -Rezeptor ein spezifisches Ligand-Rezeptor-System bildet (STOKER et al., 1987; BOTTARO et al., 1991; GHERARDI et al., 2006). Der c-Met Rezeptor ist eine Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK), die vom MET Proto-Onkogen codiert wird (BOTTARO et al., 1991).

Die RTK besteht aus einer kleinen extrazellulären α - und einer größeren transmembranen β -Kette. Letztere ist, wie in Abb. 1 abgebildet, in diverse Domänen unterteilt (PARK et al., 1987). Der Fokus soll hier auf der extrazellulären Sema- und IPT- (Immunglobulin-Plexin-Transkriptions-) Domäne, sowie der intrazellulären Tyrosinkinase- und Multifunktionalen-Bindungs-Domäne liegen, da diese für die Bindung bzw. Aktivierung des c-Met-Rezeptors durch HGF essentiell sind.

Der Ligand HGF bindet extrazellulär an den c-Met-Rezeptor: die α -Kette des HGFs dockt dabei mit hoher Affinität an die IPT-Domäne an, während die β -Kette mit niedriger Affinität an die Sema-Domäne bindet und für die eigentliche Aktivierung sorgt (MATSUMOTO et al., 1998). Die hierfür wichtigen Strukturen sind Tyrosin-Reste an der intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne. Sobald HGF bindet, dimerisiert die c-Met-RTK und es kommt zur Autophosphorylierung an Tyr1234 und Tyr1235, was letztlich zur Aktivierung führt (FERRACINI et al., 1991; ZHEN et al., 1994).

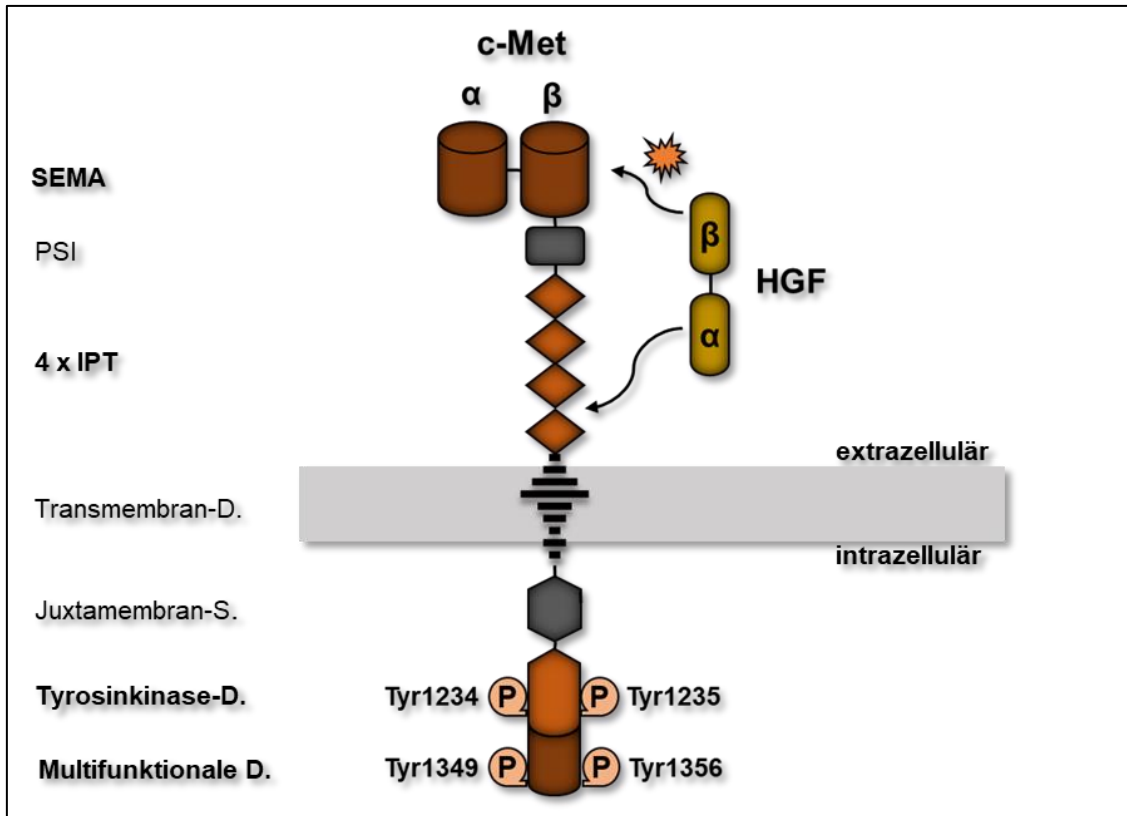


Abbildung modifiziert nach Szturz et al., 2017;

Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von ELSEVIER

Abb. 1 Aufbau des c-Met-Rezeptors und seinem Liganden HGF

c-Met besteht aus einer extrazellulären α - und einer transmembranen β -Kette. Letztere ist weiter unterteilt in diverse Domänen (D.) Die fettgedruckten Domänen sind essentiell für die Bindung und Aktivierung von c-Met durch HGF.

HGF ist ebenfalls aus einer α - und einer β -Kette aufgebaut. α dockt mit hoher Affinität an die IPT-Domäne und sorgt dadurch für eine stabile Verbindung zum Rezeptor, während β mit niedriger Affinität an die β -SEMA-Domäne bindet und für die eigentliche Aktivierung des Rezeptors sorgt.

Im Folgenden werden Tyr1349 und Tyr1356 phosphoryliert, die mit Adapterproteinen wie Gab1 und Grb2 in Verbindung stehen und mithilfe von Enzymen der Signaltransduktion vielfältige Signalkaskaden auslösen. Beispiele hierfür sind die Signalwege PI3K/Akt, Ras/Raf (MAPK) und STAT3. Alle fördern Zellwachstum, sowie Migration und verhindern Apoptose (WEIDNER et al., 1996; PONZETTO et al., 1993; TRUSOLINO et al., 2010).

1.2.2 Bedeutung von HGF/c-Met in Kopf-Hals-Karzinomen

Neben dieser essentiellen physiologischen Funktion in Embryogenese, Wundheilung und Regeneration, spielt der HGF/c-Met-Signalweg auch eine Rolle in der Tumorgenese. HGF wird dabei nicht von den Tumorzellen selbst, sondern von Tumor-assoziierten Fibroblasten parakrin sezerniert (KNOWLES et al., 2009). Giordano et al. zeigten bereits 1989 eine c-Met-Überexpression in der Magentumorzelllinie GTL-16. Seitdem wurden c-Met-Aberrationen in zahlreichen epithelialen Tumoren entdeckt, u.a. in Nieren-, Schilddrüsen- und Ovarialkarzinomen (NATALI et al., 1996; RUCO et al., 1996; TAPPER et al., 2001). Kurze Zeit später wurde nachgewiesen, dass auch in Kopf-Hals-Karzinomen eine veränderte c-Met-Signaltransduktion über die gewöhnlichen Molekülkaskaden zu unkontrollierter Proliferation, verstärkter Zellmotilität und -invasion führt, während die Apoptose gehemmt wird und damit die Tumorgenese fördert (FURGE et al., 2000). Diese veränderte Signaltransduktion entsteht heterogen u.a. durch Genmutationen und -amplifikationen, sowie Überexpression und Interaktion mit anderen Signalwegen:

Mutationen in der Tyrosinkinase-Domäne des c-Met-Rezeptors treten bei HNSCC, laut einer Übersichtsarbeit von SZTURZ et al. (2017), mit ca. 8% relativ häufig auf und können zu einer erhöhten katalytischen Aktivität führen. DI RENZO et al. (2000) wiesen als erste einen direkten Zusammenhang zwischen einer Mutation im MET-Onkogen und dem Übergang vom Primärtumor zu Lymphknotenmetastasen in Kopf-Hals-Tumoren nach. Im Tumormodell identifizierten sie die Mutation Y1235D, durch die es zu einer veränderten Regulation des c-Met-Rezeptors kommt, sodass dieser ständig aktiv bleibt. Die in den Metastasen vorkommenden Zellen enthielten dabei zu 50% die Y1235D Mutation, während nur 2-6% der Primärtumorzellen diese vorwiesen. Ihre Versuche ergaben, dass Zellen mit c-Met-Mutationen während der Tumorgenese das größte Wachstum zeigen.

Amplifikationen des MET-Onkogens sind mit 0-4% in Kopf-Hals-Karzinomen eher selten, während eine Überexpression sowohl von c-Met mit 41-82% (SZTURZ et al., 2017) als auch HGF mit ~45% sehr häufig vorkommt (SEIWERT et al., 2009). Eine c-Met-Überexpression kann vermutlich zur Ligand-unabhängigen

Autoaktivierung führen und dadurch den proliferativen Effekt zusätzlich steigern (WICKRAMASINGHE et al., 2005; KOSCHUT et al., 2016). Eine Analyse von SZTURZ et al. (2017) resultierte in der wichtigen Erkenntnis, dass mehrheitlich eine Korrelation zwischen HGF/c-Met-Überexpression und fortgeschrittenen Tumorstadien, sowie Lymphknotenmetastasen nachgewiesen werden konnte (MORELLO et al., 2001; KNOWLES et al., 2009). Dies unterstützt die Aussage von Di Renzo (2000), dass eine Dysregulation der c-Met-Signaltransduktion vermutlich erst in späteren Stadien der Tumorgenese vorkommt und in vielen Fällen eine schlechtere Prognose für den Patienten bedeutet.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Interaktion mit anderen Ligand-Rezeptor-Systemen. HGF/c-Met teilt sich verschiedene Signalwege mit diesen, sodass ein hochkomplexes Netzwerk mit einem enormen Wirkspektrum entsteht. Ein Beispiel ist der Epidermal-Growth-Factor (EGF), der den Rezeptor EGFR aktiviert, und mit c-Met die gleichen Signalwege, z.B. MAPK (Ras/Raf/Mek/Erk) und PI3K/Akt/mTor, auslöst (HSIEH et al., 2007). Diese Interaktion ist, wie bereits erwähnt, vermutlich eine Ursache für die Cetuximab-Resistenz in Kopf-Hals-Karzinomen, das nur EGFR blockiert, sodass die wachstumsfördernden Signalwege über c-Met weiter ablaufen können (WHEELER et al., 2008). Eine Wechselwirkung mit der Tyrosinkinase c-SRC, durch Aktivierung von c-Met in Abwesenheit von HGF, wird außerdem als Ursache für eine Erlotinib-Resistenz diskutiert, sodass laut STABILE et al. (2013) eine Kombination mit einem c-Met-Inhibitor die Wirkung von Erlotinib verbessern könnte.

Neben den Tumorzellen selbst, spielt aber auch das umgebende Mikromilieu, das aus einem Geflecht von Fibroblasten, Immunzellen, Blutgefäßen und extrazellulärer Matrix besteht, eine wichtige Rolle für das Tumorwachstum (SPILL et al., 2016). Es wurde bereits für verschiedene Tumorarten gezeigt, dass HGF/c-Met auch zahlreiche Immunzellen, die Angiogenese, sowie den Stoffwechsel in den Tumorzellen und damit auch das Tumormikromilieu beeinflusst (SULPICE et al., 2009; ZHAO et al., 2015; NATAN et al., 2014). Wichtig ist auch, dass HGF nicht von den Tumorzellen selbst, sondern von Fibroblasten im Tumormikromilieu parakrin sezerniert wird (KNOWLES et al., 2009). In Abb. 2 ist der HGF/c-Met-Signalweg und seine pathologische Rolle in Tumoren dargestellt.

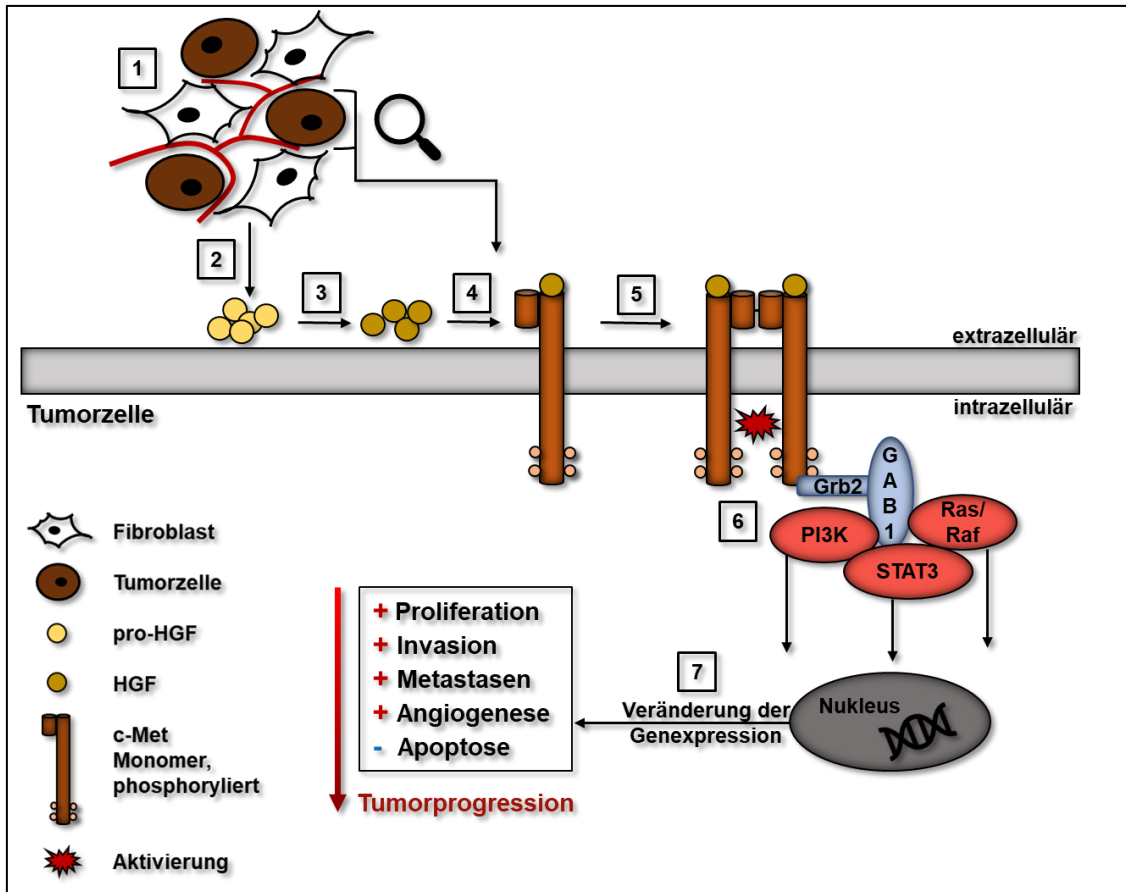


Abbildung modifiziert nach Hartmann et al., 2016; Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von AACR (American Association for Cancer Research)

Abb. 2 Der HGF/c-Met-Signalweg in Tumoren im Allgemeinen

(1) Tumorgewebe mit Tumorzellen, eingebettet in ein Geflecht aus Tumor-assoziierten Fibroblasten, Blutgefäßen und weiteren stromalen Zellarten (nicht dargestellt), dem Tumormikromilieu.

(2) Die Fibroblasten sezernieren parakrin pro-HGF, das zu reifem HGF umgewandelt wird (3). Die Funktion des HGF/c-Met-Signalwegs soll am Beispiel eines Tumorzell-Schemas detaillierter dargestellt werden:

(4) Sobald HGF an ein c-Met Monomer bindet, kommt es zur Dimerisierung des Rezeptors (5). (6) Die anschließende Autophosphorylierung der vier Tyrosinreste (Abb. 1) führt zur c-Met-Aktivierung. Adapterproteine wie Grb2 und GAB1 nutzen die Tyrosinreste als Bindestelle und vermitteln die Auslösung von Signalkaskaden. Durch HGF/c-Met werden am häufigsten PI3K, STAT3, Ras/Raf aktiviert, die durch Veränderung der Genexpression (7) zu gesteigertem Zellwachstum, Metastasen und Angiogenese, sowie verminderter Apoptose führen und damit die Tumorgenese fördern.

Über den Einfluss von HGF/c-Met auf das Mikromilieu und etwaige Wechselwirkungen mit dem Immunsystem in Kopf-Hals-Karzinomen ist allerdings noch wenig bekannt. Im Folgenden soll deshalb ein möglicher Zusammenhang von HGF/c-Met mit dem Immunsystem und Glukosemetabolismus im Tumormikromilieu näher beleuchtet werden.

1.3 Immun-Checkpoint-Protein PD-L1

Im Hinblick auf das Immunsystem spielt das Immun-Checkpoint-Protein PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1), wie BLANK et al. (2005) in ihrem Review zusammenfassen, eine wichtige Rolle in der Hemmung des Immunsystems durch T-Zellinaktivierung. Dies ist neben anderen eine wesentliche Strategie, die Tumorzellen entwickelt haben, um sich dem Immunsystem zu entziehen. Es ist bekannt, dass T-Zellen je nach Bedarf sowohl positiv also auch negativ reguliert werden können (CHEN et al., 2013). Eine Negativ-Stimulation der (zytotoxischen) T-Zellen erfolgt zum Beispiel durch PD-L1 und seinen zugehörigen Rezeptor PD-1 (KEIR et al., 2008), wobei PD-L1 pathologisch auf der Tumorzelloberfläche und PD-1 auf T-Zellen vorkommt. Eine Interaktion der beiden Moleküle führt zur Inaktivierung der T-Zelle, sodass die Tumorzelle letztendlich nicht vom Immunsystem beseitigt wird (Abb. 3; BLANK et al., 2005).

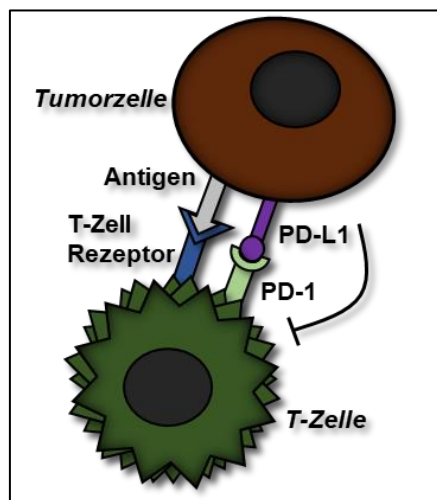


Abbildung modifiziert nach Blank et al., 2005;

Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature

Abb. 3 Interaktion von PD-L1 und PD-1 hemmt die T-Zell-Aktivierung

Tumorzellen unterwandern das Immunsystem u.a. durch die Inaktivierung von T-Zellen und verhindern damit, dass sie durch die Immunabwehrzellen beseitigt werden. Dies geschieht über den Immun-Checkpoint PD-1/PD-L1.

PD-1 sitzt auf zahlreichen Immunzellen, während PD-L1 pathologisch auf der Oberfläche von Tumorzellen vorkommt. Nachdem eine T-Zelle an ein Antigen auf der Tumorzelloberfläche andockt, bindet PD-L1 an PD-1, hemmt dadurch die Aktivierung der T-Zelle und verhindert dadurch gleichzeitig den eigenen Abbau.

PD-L1 wird auch auf der Zelloberfläche von gesunden Körperzellen exprimiert, zum Beispiel in der Kornea oder Plazenta, und bietet hier einen physiologischen Schutz vor einer Überreaktion des Immunsystems (JEON et al., 2018; ENNINGA et al., 2018). Die PD-L1-Expression korreliert mit einer verringerten Überlebensrate bei Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen (MUELLER et al., 2017). In der Tumorthherapie stellt PD-L1 somit für Kopf-Hals-Karzinome und u.a. auch Nierenzellkarzinome ein interessantes Target dar (MUELLER et al., 2017; TAUBE et al., 2014).

Ein Einfluss von HGF/c-Met auf die Regulation von PD-L1 konnte bisher nur im Nierenkarzinom gezeigt werden. BALAN et al. (2015) wiesen nach, dass in Nierenkarzinomen eine HGF-Stimulation die PD-L1-Expression erhöht. Wie bereits erläutert, ist bekannt, dass PD-L1 auch in Kopf-Hals-Karzinomen (s.o.) verstärkt exprimiert ist. Die bisher gesammelten Erkenntnisse rechtfertigen, den Einfluss von HGF/c-Met auf die Expression von PD-L1 in Kopf-Hals-Karzinomen zu untersuchen.

1.4 Glukose-Metabolismus in Tumorzellen

Ein zweiter Aspekt ist der Glukose-Metabolismus der Tumorzellen, der einen entscheidenden Einfluss auf das Mikromilieu hat. Grundsätzlich gibt es, wie allgemein bekannt, zwei Wege der Energiegewinnung mithilfe von Glukose: Zum einen die Glykolyse, die bei Sauerstoffmangel eigenständig abläuft, und Glukose über mehrere Schritte in Pyruvat und schließlich Laktat, H^+ und ATP abgebaut wird. Zum anderen kann, bei vorhandenem Sauerstoff, das Pyruvat aus der Glykolyse in der nachfolgenden mitochondrialen Atmungskette (Zellatmung) anschließend zu CO_2 , H_2O und ATP abgebaut werden. Gesunde Körperzellen betreiben mit Sauerstoff normalerweise Zellatmung, da sie hierdurch die meiste Energie in Form von ATP erhalten.

In Tumorzellen ist der Glukose-Metabolismus im Vergleich zu gesunden Zellen modifiziert, es tritt der sogenannte Warburg-Effekt auf: Trotz vorhandenem Sauerstoff betreiben die Tumorzellen hauptsächlich Glykolyse (WARBURG et al., 1927; 1956). Dies erscheint zunächst paradox, jedoch gewährleistet die Glykolyse dafür eine besonders schnelle Energiebeschaffung, die die Tumorzellen aufgrund ihrer hohen Proliferationsrate dringend benötigen (PEDERSEN, 2007). Um ihren erhöhten Energiebedarf zu decken, ist die Glukoseaufnahme der malignen Zellen deutlich gesteigert (CAIRNS et al., 2011). Dieses Phänomen wird zur Diagnostik mittels ^{18}F -Deoxy-Glucose Positronen-Emission-Tomographie (FDG-PET) genutzt (BARRON et al., 2016).

Aufgrund der gesteigerten Glykolyse, kommt es außerdem zu hohen Laktatkonzentrationen im Tumormikromilieu. Dies sorgt für einen veränderten Gradienten, sodass das „eigene“ Laktat, das durch die Glykolyse in der T-Zelle entsteht, nicht mithilfe von Protonen-Monocarboxylat-Transportern (MCT) exportiert werden kann, da dies Gradienten-gesteuert ist (HALESTRAP et al., 1999). FISCHER et al. (2007) legten dar, dass durch die Laktatakkumulation, der Stoffwechsel der T-Zellen aus dem Gleichgewicht gerät und für eine T-Zell-Inaktivierung sorgt (Abb. 4).

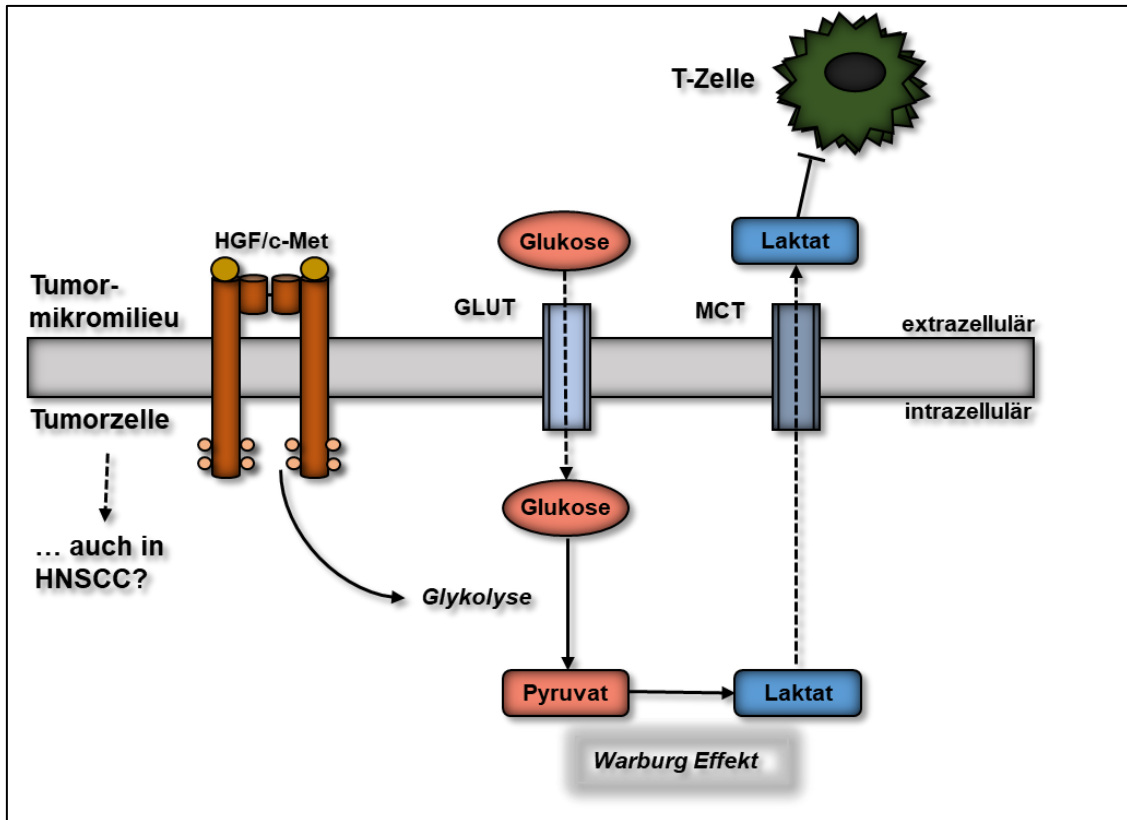


Abbildung modifiziert nach Hartmann et al., 2016; Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von AACR (American Association for Cancer Research)

Abb. 4 Einfluss von HGF/c-Met auf den Glukosemetabolismus in Tumorzellen

HGF/c-Met steigert neben anderen Wachstumsfaktoren durch vielfältige Mechanismen die Glykolyse in Tumorzellen, denn aufgrund der hohen Teilungsrate haben diese einen hohen Energiebedarf. Hierfür wird vermehrt Glukose über Glukosetransporter (GLUT) in die Zelle aufgenommen und zu Pyruvat abgebaut. Dieses wird anschließend in Laktat umgewandelt und mit MCT-1-Transportern ins Tumormikromilieu gepumpt. Dort kommt es infolge der gesteigerten Glykolyse zu einer Laktatakkumulation. Die T-Zellen werden hierdurch geschädigt. Denn weil im Mikromilieu bereits viel Laktat vorhanden ist, können die Gradienten-gesteuerten Laktat-Transporter der T-Zellen das Laktat, das durch die „eigene“ Glykolyse entsteht, nicht mehr heraus transportieren.

Für einige Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel EGF oder IGF-I (Insulinlike-Growth-Factor), gibt es Hinweise, dass sie den Warburg-Effekt fördern, indem sie den PI3K-Signalweg aktivieren (BARRON et al., 2016; WONG et al., 2010). Insbesondere dessen Downstream-Moleküle Akt und Ras spielen hier eine Rolle: Akt steigert vermutlich die Expression von Glukosetransportern wie GLUT-1 und sorgt für eine Translokation von GLUT-4 in die Zellmembran, um die Glukoseaufnahme zu erhöhen (BARTHEL et al., 1999; MANNING et al., 2007). Für das Ras-Molekül wurde ebenfalls nachgewiesen, dass es in die Hochregulation

von Glykolyse und Erhöhung der GLUT-1 Expression involviert ist (YUN et al., 2009).

Allerdings konnte ein Einfluss von HGF auf die Glykolyse bisher nur in einem Modell für Brustkrebs und Lungenkarzinom nachgewiesen werden. KAPLAN et al. (2000) wiesen im Mammakarzinom-Modell nach, dass nach HGF-Stimulation die Glukoseaufnahme und Laktatproduktion ansteigt. DE ROSA et al. (2015) zeigten für das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom, dass eine Hemmung des c-Met-Rezeptors durch den Tyrosinkinase-Inhibitor PHA-665752 zu einer verminderten Aktivität der Hexokinase-2, einem essentiellen Enzym der Glykolyse, führte.

Die kumulativen Fakten aus anderen Tumormodellen legen einen Zusammenhang zwischen HGF/c-Met und der Regulation der Glykolyse im Mikromilieu von Kopf-Hals-Karzinomen nahe.

1.5 Fragestellung

Vor dem Hintergrund des geschilderten Kenntnisstandes sollen in der vorliegenden Arbeit folgende Aspekte *in vitro* untersucht werden:

- Aktiviert das verwendete HGF-Protein den c-Met-Rezeptor in den vorliegenden Kopf-Hals-Tumorzellen? Kommt es zu einer Phosphorylierung an den Tyrosinresten Tyr1234/1235 des c-Met-Rezeptors?
- Verwendung eines c-Met-spezifischen Tyrosinkinase-Inhibitors (PHA-665752): Wie verhält sich dieser im verwendeten System bezüglich Toxizität und Funktionalität?
- Findet auf der Zelloberfläche der ausgewählten etablierten Kopf-Hals-Tumorzellen nach HGF-Stimulation eine Hochregulierung des Immun-Checkpoint-Proteins PD-L1 statt?
- Führt eine HGF-Stimulation in Kopf-Hals-Tumorzellkultur zu einer gesteigerten Glykolyse?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Tab. 1 Chemikalien und Reagenzien

Name	Hersteller
APS (= Ammoniumperoxodisulfat) 10% in dH ₂ O	Carl Roth, Karlsruhe
Aqua dest.	Hausleitung
Casy Ton	Omni Life Science, Bremen
Color Prestained Protein Standard Broad Range 11-245 kD	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
DC Protein Assay Kit Enthält Reagenzien A, B und S	Bio-Rad Laboratories, USA
DMSO Dimethyl Sulphoxide Hybri Max	Sigma Life Science, Merck, Darmstadt
Gel-Blotting-Paper Roti-PVDF	Carl Roth, Karlsruhe
Glukose (Pulver) = D(+)-Glucose #G7021	Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt
Glycin (Pulver)	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol (=2-Propanol) 99,8%	Carl Roth, Karlsruhe
Kristallviolett-Lösung 0,5g Kristallviolett (Art. T123.1) + 100ml Methanol + 400ml VE H ₂ O	Carl Roth, Karlsruhe
L-Glutamin-Lösung 200mM #59202C	Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt

MATERIAL UND METHODEN

Name	Hersteller
Lipofectamine RNAi Max Reagent (Ref. 13778-100)	invitrogen by life technologies,
Methanol 98%	Sigma Aldrich, USA
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
NaCl (Pulver)	Carl Roth, Karlsruhe
Nitrocellulose Blotting-M. NCA2	GE Healthcare, USA
Opti-MEM, Reduced Serum Media	Thermo Fisher Scientific, USA
Phenolrot-freies Medium: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D5030-1L)	Sigma Life Science, Merck, Darmstadt
Pierce ECL Western Blotting Substrate for HRP: Peroxide Solution Luminol Enhancer Solution	Thermo Fisher Scientific, USA
Protein Assay Standard II	Bio-Rad Laboratories, USA
Pyruvat-Lösung 100mM #S8636	Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1) 30% Acrylamid-Bisacrylamidlösung	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure rauchend 37%	Merck, Darmstadt
SDS ultra-pure	Carl Roth, Karlsruhe
TEMED p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Tris(Tris-(hydroxymethyl)- aminomethane) 99,8%	Sigma Aldrich, USA
Trypsin-EDTA Lösung 10%, in dH2O	Biochrom, Merck, Darmstadt
Tween 20, Tensid	Carl Roth, Karlsruhe

2.1.2 Puffer

Tab. 2 Puffer

Name und Zusammensetzung	
<p>1x PBS = DPBS Dulbecco's Phosphate Buffered Saline; (+) CaCl₂, (+) MgCl₂ Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA</p>	<p>Hepes Puffer #9105.3 Carl Roth, Karlsruhe</p>
<p>Western Stock Solution (WSS-Puffer) 10 mM Tris-HCl pH 7,6 5 mM EDTA 50 mM NaCl 30 mM Na₄P₂O₇ 50 mM NaF 1 mM Na₃VO₃ 1% Triton x-1000</p>	<p>+ Proteaseinhibitor Complete Easypack (Ref. 04693116001) + Phosphatase Inhibitor PhosStop Easypack (Ref. 04906837001), Roche, Schweiz</p>
<p>Probenpuffer 20% Glycerin (10ml) 4% SDS ultrapure 125 mM Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane) 3% 1,4-Dithiothreit Bromphenolblau, wenige Körner auf 50ml mit dH₂O auffüllen</p>	<p>Western-Puffer (10 x) 1,9 M Glycin 0,25 M Tris ad 1 Liter dH₂O</p>
<p>Sammelgelpuffer (4x) 0,5 M Tris 0,015 M SDS pH 6,8 mit HCl ad 500ml dH₂O</p>	<p>Trenngelpuffer (4x) 1,5 M Tris 0,015 M SDS pH 8,8 mit HCl ad 500ml dH₂O</p>

MATERIAL UND METHODEN

Name und Zusammensetzung	
Laufpuffer (1x) 100ml 10x Western-Puffer 900ml H ₂ O 5ml 20% SDS	Blot-Puffer (1x) 100ml 10x Western-Puffer 700ml dH ₂ O 200ml Methanol 1,5ml 20% SDS
1 x TBS 100ml 10 x TBS 900ml dH ₂ O	10 x TBS 0,2 M Tris 1,7 M NaCl 1l H ₂ O pH 7,6
TBS Tween (div. Konzentrationen) 1xTBS + 0,01% Tween 20 1xTBS + 0,05% Tween 20 1xTBS + 0,1% Tween 20	Stripping-Puffer (pH 2,2) 200 mM Glycin 3,47 mM SDS 2,5ml Tween 20 250ml dH ₂ O

Hinweis: Wenn nicht anders angegeben, wurden die Inhaltsstoffe von der Firma Carl Roth bezogen.

2.1.3 Wachstumsfaktoren, Inhibitoren und Antikörper

Tab. 3 Wachstumsfaktoren, Inhibitoren und Antikörper

Name	Hersteller
HGF 80kDa (PHG054) Stocklösung 50µg/ml	gibco by life technologies, Thermo Fisher Scientific, USA
Foretinib (GSK 1363029) Stocklösung 50mM	Selleckchem, München
PHA-665752 (CatNo S1070) MW: 641.61, 5mg, Pty >99%	Selleckchem, München

MATERIAL UND METHODEN

Name	Hersteller
c-Met siRNA I SignalSilence® #6618	Cell Signaling Technology, USA
c-Met siRNA II SignalSilence® #6622	
Control siRNA (Unconjugated) SignalSilence® #6568	
Protease Inhibitor Complete Easypack (Ref. 04693116001), Phosphatase Inhibitor PhosStop Easypack (Ref. 04906837001)	Roche, Schweiz
Rotenon/Antimycin A (Rot/AA) #R8875/#A8674	Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt
2-Deoxy-D-Glucose (2-DG) #D8375	Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt
Human HGF R/c-MET Monoclonal Mouse IgG1, Clone #95106, PE conjugated Antibody	R&D Systems, USA
CD274 (PD-L1, B7-H1) mAb, MIH1, APC conjugated	eBioscience, Thermo Fisher Scientific, USA
ISO Kontrolle: Mouse IgG1 K ISO Control, APC Clone P3.6.2.81	eBioscience, USA
Phospho-Met Primärantikörper: XP® Rabbit mAb (Tyr1234/1235) (D26) Sekundärantikörper, HRP-linked: Anti-Rabbit IgG #7074	Cell Signaling Technology, USA

Name	Hersteller
Alpha-Tubulin Primärantikörper: Tubulin alpha Ab-2 (DM1A), Mouse mAb Sekundärantikörper, HRP-linked: Polyclonal Rabbit, Anti-Mouse Ig	Neo Markers, USA Dako, Jena

2.1.4 Geräte

Tab. 4 Geräte

Name	Hersteller
Accurpette	VWR, USA
Brutschrank Hera Cell 150i	Thermo Fisher Scientific, USA
Cellstar Tubes 15/50ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
ChemiDoc Imaging System	Bio-Rad Laboratories, USA
Durchflusszytometer CASY, Modell TT	Schärfe System, Reutlingen
Durchflusszytometer, BD FACS Calibur	BD Bioscience, USA
Elektroblotter PerfectBlue Sedec S52-1010, semi-dry, Spannungsgerät PeqPower 250V	VWR, USA
Gelkammer (Western Blot): Doppelgelsystem, PerfectBlue, Twin S, Peqlab Gelgröße 10x10cm, 8 Glasplatten, 2 Kämme 0,8mm 12 Zähne, 2 Spacer Sets, Giesbasis	VWR, USA

MATERIAL UND METHODEN

Name	Hersteller
Kühlschrank	Liebherr, Schweiz
Lichtmikroskop IT 404	VWR, USA
Nunc MicroWell 96 F W/Lid Nunclon D SI	Thermo Fisher Scientific, Dänemark
Nunc Multidish 12 steril Nuncleon D SI	Thermo Fisher Scientific, Dänemark
pH-Meter inoLab	WTW, Xylem Analytics, USA
Photometer Infinite F50	Tecan Group Ltd, Schweiz
Seahorse XF96 Analyzer	Agilent Technologies, USA
Seahorse XFe96 FluxPaks (inc. mini): 96-Well-XF Cell Culture Microplate Sensor Cartridge, Calibrant	Agilent Technologies, USA
Sterilbank Safe 2020	Thermo Scientific, Dänemark
Tissue Culture Plates, 6 Wells steril	VWR, USA
Ultraschall-Stab, Modell 4010	Branson Europe, Dietzenbach
Vakuumsaugsystem AA 04	HLC by Ditabis, Pforzheim
Vortexer Genie 2	Scientific Industries, USA
Wasserbad VWB 26	VWR, USA
Wippschüttler Mini-Rocker MR 3	A. Hartenstein, Würzburg
Wippschüttler Rocker, 2D	VWR, USA
Zellschaber, Cell Scraper (1/Sleeve Länge 230mm, Blade Wide 13mm)	SPL Life Science, Korea
Zentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg

MATERIAL UND METHODEN

Name	Hersteller
Zentrifuge Universal 320 50ml Rotor/Plattenrotor	Hettich AG, Schweiz

2.1.5 Software

Tab. 5 Software

Name	Hersteller
BD CellQuest Pro (Durchflusszytometrie Messung)	BD Bioscience, USA
Excel	Microsoft, USA
FlowJo V10.1 (Durchflusszytometrie Auswertung)	FlowJo, USA
GraphPad Prism 6.04	GraphPad Software, USA
Magellan™ F50 Data Analysis Software	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Seahorse XF Glycolytic Rate Assay Report Generator	Agilent Technologies, USA
Seahorse Wave Desktop 2.6	Agilent Technologies, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zelllinien und Medien

In allen aufgeführten Versuchen wurden etablierte, adhärent wachsende Tumorzellen aus Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region verwendet. Bis auf Detroit562, die aus Metastasen in der Pleura stammen, erfolgte die Entnahme aus dem jeweiligen Primärtumor (ATCC, 2018). HaCaT, humane Keratinozyten, dienten als Kontroll-Zelllinie. Tab. 6 bietet eine Übersicht über die verschiedenen Zelllinien und ihre Herkunft.

Tab. 6 Zelllinien und ihr Entnahmeort aus einem Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals Region

Name	Entnahmeort	Firma
Detroit562	Pharynx Metastasen, Pleura	Head and Neck Cancer Panel (TCP-1012) American Type Culture Collection (ATCC), USA
FaDu	Pharynx	
SCC9	Zunge	
SCC25	Zunge	
A253	Glandula submandibularis	
HaCaT	Humane Keratinozyten Zelllinie, als Kontrolle	CLS Cell Lines Service, Eppelheim

Die Kultivierung der Tumorzellen erfolgte bei einer Temperatur von 37°C und einer CO₂-Konzentration von 5% im Brutschrank. Zweimal pro Woche wurden sie, in einem für jede Zelllinie festgelegten Verhältnis (siehe Tab. 7), gesplittet und mit frischem Medium in eine neue Kulturflasche übersiedelt.

Alle verwendeten Medien, ihre Zusammensetzung und Zusätze sind in Tab. 7 aufgelistet. Sofern nicht anders gekennzeichnet, wurden alle Medien mit 10% fetalen Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) angesetzt.

Tab. 7 Verwendete Zellmedien und ihre Zusammensetzung

Zelllinie	Medium-Zusammensetzung	Splitten	Hersteller
Detroit562/ FaDu	MEM Alpha + 10% FCS + 1% P/S	1:3 1:5	Gibco by life technologies, Thermo Fisher Scientific, USA
SCC9/ SCC25	DMEM/F12 (+ Hepes) + 10% FCS + 1% P/S + 5µl Hydrocortison	1:2,5 1:2	
A253	McCoy´s 5 A + 10% FCS + 1% P/S	1:5	
HaCaT	DMEM + 10% FCS + 1% P/S	1:4	

2.2.2 Zellzählung

Um in allen Experimenten zu gewährleisten, dass in jedem Versuchsansatz die gleiche Anzahl an Zellen vorliegt, startete jeder Versuch mit einer Zellzählung durch das CASY-Durchflusszytometer. Dafür wurden 10µl Zellsuspension der jeweiligen Linie mit 10ml CASY-Ton gemischt. Die Messung der Zellkonzentration erfolgte durch Spannungsmessung in der Messkapillare des CASY-Zytometers. Je nach benötigter Zellkonzentration pro Milliliter, wurde die Suspension mit Medium verdünnt.

2.2.3 Zytotoxizitäts-Test (Kristallviolett)

Der Zytotoxizitäts-Test diente der Überprüfung von Funktionalität und Toxizität des c-Met Tyrosinkinase-Inhibitors PHA-665752 in verwendeter Zellkultur.

Pro Zelllinie wurden 100µl in eine eigene 96-Well Platte ausgesät. Die Zellkonzentration betrug 100.000 Zellen/ml. Um Verdunstung zu vermeiden, wurden alle äußeren Wells mit reinem Zellmedium befüllt. Es standen somit 60 Wells je Zelllinie für einen Versuchsansatz zur Verfügung.

Nach 24h Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden je drei Reihen (=Triplikat; 30 Wells) mit PHA-665752 (C_{max} 60µM) und Foretinib (C_{max} 24µM) inhibiert. Hierfür wurden die Inhibitorlösungen auf einer 96-Well Platte mit PBS in 10 Schritten im Verhältnis 1:2 ausverdünnt und anschließend 50µl aus jedem Well analog dazu auf die Zellen übertragen. Die Inhibitoren wurden dreifach konzentriert angesetzt, damit nach Verdünnung mit der Zellsuspension noch die gewünschte C_{max} vorliegt.

Die Auswertung erfolgte nach 48h mithilfe Kristallviolett-Färbung (FLICK et al., 1984). Das Medium wurde entfernt und 50µl Kristallviolettlösung pro Well aufgetragen. Nach 15min erfolgte ein dreimaliges Waschen der Platten mit destilliertem Wasser, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Die Platten wurden anschließend für mindestens 3h getrocknet.

Um für die Messung der Absorption das Kristallviolett zu lösen, wurden 100µl Methanol (98%) pro Well appliziert. Im Photometer erfolgte die Messung der Absorption bei 595nm, um eine Veränderung der Zellzahl nachzuweisen.

Der Versuch wurde viermal wiederholt. Für jede Zelllinie wurden Mittelwerte und Standardabweichung aus den Triplikaten eines Versuchs berechnet. Die Ergebnisse wurden mithilfe von GraphPad Prism normiert, indem der höchste Absorptions-Wert als 100% und der niedrigste als 0% definiert wurde. Anschließend erfolgte die Ermittlung der IC₅₀-Werte mittels nichtlinearer Regression aus den jeweiligen Kurven. Hierfür wurde die GraphPad Prism-Anwendung „log(inhibitor) vs. normalized response--variable slope“ angewendet, die die Formel $y=100/(1+10^{((\text{Log}IC_{50}-x)*\text{HillSlope}))})$ enthält. Aus den IC₅₀-Werten der einzelnen Versuche wurde der Mittelwert gebildet und die Standardabweichung berechnet.

2.2.4 Western Blot zum Nachweis von phosphoryliertem c-Met-Rezeptor

Zwei Milliliter der jeweiligen Zellen wurden mit einer Konzentration von 250.000/ml in eine 6-Well Platte ausgesät. Nach 24h Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ erfolgte die Stimulation der Zellen mit 50ng/ml HGF und Inhibition mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor PHA-665752. Für jede Zelllinie wurde 1ml Nährmedium mit 1µl der HGF Stocklösung (50µg/ml), sowie eine weitere Probe mit 1µl HGF und 0,5µM PHA-665752 frisch angesetzt und zusätzlich jeweils eine Kontrollprobe mit reinem Medium. Nach 30min Stimulation bei 4°C, wurde das Medium abgesaugt und die Proben zum Abstoppen der Reaktion mit kaltem PBS gewaschen. Die Zellyse und Proteinisolierung erfolgte durch einen eigens hergestellten Lyse-Puffer (WSS-Puffer). Zu Versuchsbeginn wurden 10ml dieses WSS-Puffers mit je einer Tablette einer Phosphatase-Inhibitor-/ und einer Proteinase-Inhibitor-Mischung komplettiert und bis zum Einsatz bei 4°C gekühlt. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit 100µl des WSS-Puffers durch einen Schaber gelöst, in 1,5ml-Reaktionsgefäße überführt und sofort gekühlt. Mithilfe eines Ultraschallstabs wurden die Proben homogenisiert (Einstellung: min/sec; 20s On; 20s Off; Amplitude von 14%).

Die Proteinkonzentration im Zellysate wurde mithilfe des auf der Lowry-Methode (LOWRY et al., 1951) basierenden DC Protein Assay Kits von BioRad ermittelt. Als Kontrolle diente eine Standardlösung (1,6 mg/ml) von BioRad, die im Verhältnis 1:2 mit WSS-Puffer ausverdünnt wurde. Je 5µl einer Zellprobe oder Standardverdünnung wurden in einer 96-Well Platte doppelt aufgetragen und anschließend aus dem BioRad DC Protein Assay Kit pro Well 25µl Reagenz A' (hergestellt aus 1ml Reagenz A und 20µl Reagenz S), sowie 200µl Reagenz B hinzugefügt. Die Proben wurden daraufhin im Photometer 20s geschüttelt und 15min bei Raumtemperatur stehengelassen. Abschließend wurde die Absorption der Proben bei 750nm gemessen.

Die Proteinkonzentrationen wurden durch Verdünnung mit WSS-Puffer angeglichen, sodass Proben derselben Zelllinie gleich viel Protein enthielten. 20µl der Proben wurden mit 4µl SDS-Probenpuffer versetzt.

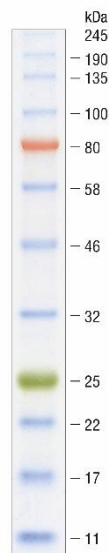
Im Folgenden wurden die Proteine gelelektrophoretisch mittels SDS-PAGE entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Für das Trenngel wurden die Komponenten in angegebener Reihenfolge angesetzt und zügig in die

Gelkammer pipettiert (Tab. 8). Die Oberfläche wurde für einen geraden Abschluss mit wenigen Tropfen Isopropanol (99,8%) benetzt. Nach Entfernen des Isopropanols wurde das Sammelgel hergestellt, über das Trenngel aufgetragen und ein Probenkamm eingesetzt.

Tab. 8 Komponenten der SDS-PAGE

	12% Trenngel		6% Sammelgel	
Puffer	Trenngel-Puffer	5,5ml	Sammelgel-Puffer	3,5ml
30% Acrylamid-Bisacrylamidlösung		8,8ml		2,8ml
dH ₂ O		7,8ml		7,6ml
10% APS		374µl		168µl
Temed p.a.		30,8µl		14µl

Nach dem Befüllen der Gelkammer mit Laufpuffer erfolgte das Beladen der Geltaschen mit 23µl je Probe. Als Marker wurden 10µl des Color Prestained Protein Standards, mit Standardproteinen von 11-245 kDa, verwendet (Abb. 5). Die Laufzeit der Gelelektrophorese betrug 1,5h bei 0,07 A für zwei Gele.



Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von New England Biolabs

Abb. 5 Color Prestained Protein Standard, 11-245 kDa

Anschließend wurden die Proteine in einer Blot-Apparatur nach dem Semidry-Verfahren auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Die Laufzeit betrug 2h bei 0,12A für zwei Membranen.

Das Blocken der noch freien Proteinbindestellen auf der Membran wurde für mindestens 1h auf dem Wippschüttler mittels Milchpulverlösung (5g Milchpulver in 100ml 1xTBS) durchgeführt.

Als Primärantikörper kam ein Antikörper gegen alpha-Tubulin als Ladekontrolle und ein Antikörper gegen den phosphorylierten c-Met-Rezeptor (Phospho-Met-Antikörper) zum Einsatz, der laut Herstellerangaben nur eine Phosphorylierung an Tyr1234/1235 des c-Met-Rezeptors erkennt, die wiederum essentiell für die Aktivierung der Tyrosinkinase ist. Da das Molekulargewicht des c-Met-Rezeptors bei ca. 140 kDa und bei alpha-Tubulin bei ca. 50 kDa liegt, wurden die Membranen entsprechend geteilt und mit 10µl einer Phospho-Met-beziehungsweise 2,5µl einer alpha-Tubulin-Antikörperlösung in je 10ml 1xTBS über Nacht bei 4°C auf einem Rollmischer inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Membranen mit 1xTBS dreimal 5min auf dem Wippschüttler gewaschen. Zur Visualisierung der Proteine wurden Sekundärantikörper verwendet, die mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase markiert sind. Hierfür kamen für Phospho-Met 3µl monoklonaler Anti-Kaninchen-Antikörper und für alpha-Tubulin 2,2µl polyklonaler Anti-Maus-Antikörper in jeweils 20ml 1xTBS zum Einsatz. Die Membranen wurden einzeln in je 10ml Sekundärantikörperlösung für maximal 1-1,5h auf dem Wippschüttler inkubiert. Danach wurden die Blots dreimal á 20 min in 1xTBS Tween gewaschen, die Phospho-Met-Membran mit 0,01 % Tween, während die alpha-Tubulin-Membran 0,05% benötigt. Kurz vor der Entwicklung wurde das Pierce ECL Western Blotting Substrat für die Meerrettich-Peroxidase nach Herstellerangaben angemischt. Jeder Blot wurde einzeln für 2min im Substrat durch leichtes Schwenken inkubiert. Die unmittelbar stattfindende Lichtemission durch die Chemilumineszenz-Reaktion wurde mithilfe des ChemiDoc-Imaging-Systems registriert und in digitale Bildinformation transferiert. Die Phospho-Met Membranen wurden 2h belichtet. Für die alpha-Tubulin-Ladekontrolle reichte eine Belichtung von 60s aus.

Für eine Gesamt-Met-Kontrolle wurden die Membranen anschließend mit einem Stripping-Puffer behandelt. Um das Substrat zu entfernen, wurden die Blots dreimal á 5min in 0,1% 1xTBS Tween gewaschen, anschließend zweimal á 10min in Stripping-Puffer inkubiert. Es folgte zweimaliges Waschen in 1xTBS für je 10min. Nach zweimal 5min Waschen in 0,1% 1xTBS Tween wurden die Membranen mit Milchpulver für mind. 1h geblockt (siehe oben) und über Nacht mit 10µl Gesamt-Met-Antikörperlösung, 10µl Tween-20 und 5% Milchpulver in 10ml 1xTBS bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Membranen mit 1xTBS dreimal 5 min auf dem Wippschüttler gewaschen. Als Sekundärantikörper kamen 2,2µl des polyklonalen Anti-Maus-Antikörpers in 20ml 1xTBS zum Einsatz. Die Membranen wurden einzeln in je 10ml Sekundärantikörperlösung für maximal 1-1,5h auf dem Wippschüttler inkubiert. Danach wurden die Membranen dreimal á 20 min in 0,05% 1xTBS Tween gewaschen. Kurz vor der Entwicklung wurde das Pierce ECL Western Blotting Substrat für die Meerrettich-Peroxidase nach Herstellerangaben angemischt und die Blots, wie für Phospho-Met oben beschrieben, mithilfe des ChemiDoc-Imaging-Systems entwickelt. Die Belichtungszeit betrug 1h.

2.2.5 Durchflusszytometrie zum Nachweis von PD-L1

Die Expression von PD-L1 auf der Zelloberfläche wurde mithilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. Durch dieses Verfahren sollte der Einfluss des Wachstumsfaktors HGF auf die Expression von PD-L1 auf der Zelloberfläche der Zelllinien Detroit562 und FaDu untersucht werden. Für eine Gegenprobe wurde der c-Met-Rezeptor pharmakologisch mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor PHA-665752 und in einem zweiten Ansatz auf genetischer Ebene mittels RNA-Interferenz gehemmt. Von jeder Probe wurden 10.000 Zellen gemessen.

2.2.5.1 c-Met-Inhibition mit PHA-665752

An Tag 1 wurden in einer 6-Well Platte (drei Wells pro Zelllinie) 375.000 Zellen/ml, mit 2ml Medium pro Well, ausgesät und für 24h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

An Tag 2 wurde nach einem Wechsel des Mediums jeweils ein Well ausschließlich mit 50ng/ml HGF und eines mit HGF und zusätzlich 0,5µM PHA-665752 behandelt. Jeweils ein Well wurde als Kontrolle unbehandelt belassen. Nach 48h Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂, wurden die Zellen pro Well mit 2ml auf 37°C vorgewärmten PBS gewaschen und mit 0,5ml ebenfalls vorgewärmten Trypsin-EDTA zum Ablösen im Brutschrank für 10-15min inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Zellen in je 1,5ml kaltes PBS aufgenommen, in 2ml Reaktionsgefäße übertragen und sofort gekühlt. Die Zellen wurden 2min bei 20.238g abzentrifugiert und das entstehende Pellet in 200µl PBS aufgenommen. Da für die Messung im Durchflusszytometer die Hälfte der Proben mit zwei verschiedenen Antikörpern, dem APC-konjugierten CD274 PD-L1-Antikörper und einer APC-konjugierten Isotyp-Kontrolle gefärbt werden sollten, wurde jede Probe auf zwei Wells einer 96-Well Platte mit Rundböden aufgeteilt und 2min bei 5.520g zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde jede Probe in 200µl PBS, mit 1µl PD-L1- bzw. Isotyp-Kontrollantikörper, resuspendiert und 30min bei 4°C inkubiert. Es folgten zwei erneute Zentrifugier- und Waschschrte mit 200µl PBS. Für die Messung wurden die Zellen in 400µl PBS aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt.

2.2.5.2 c-Met-Inhibition mit RNA-Interferenz

Detroit562 und FaDu wurden mit je zwei verschiedenen c-Met-siRNAs (Signal Silence Met-siRNA I/II) und einer Kontroll-siRNA transfiziert. Je siRNA wurden in 1,5ml Reaktionsgefäßen 100µl Opti MEM sowie 2µl siRNA vermengt, jeweils 100µl Opti MEM mit 6µl Lipofectamin hinzugegeben und 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Reaktionsansatz wurde ins Well gegeben und mit 2ml der jeweiligen Zellsuspension (625.000 Zellen/ml) versetzt.

Nach 48h Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 2ml PBS gewaschen und mit 0,5ml vorgewärmtem Trypsin-EDTA abgelöst. Anschließend wurde die Reaktion mit 2ml Medium abgestoppt. Die Zellsuspensionen wurden in 50ml-Röhrchen aufgenommen, bei 600g für 5 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Zellen jedes Wells wurden in 6ml Medium aufgenommen, auf zwei Wells einer neuen 6-well Platte verteilt und für 3h im Brutschrank inkubiert. Pro Zelllinie und siRNA wurde ein Well mit 50ng/ml HGF (3µl 50µg/ml Stammlösung pro Well) für 48h stimuliert, eines diente als Kontrolle und blieb unbehandelt.

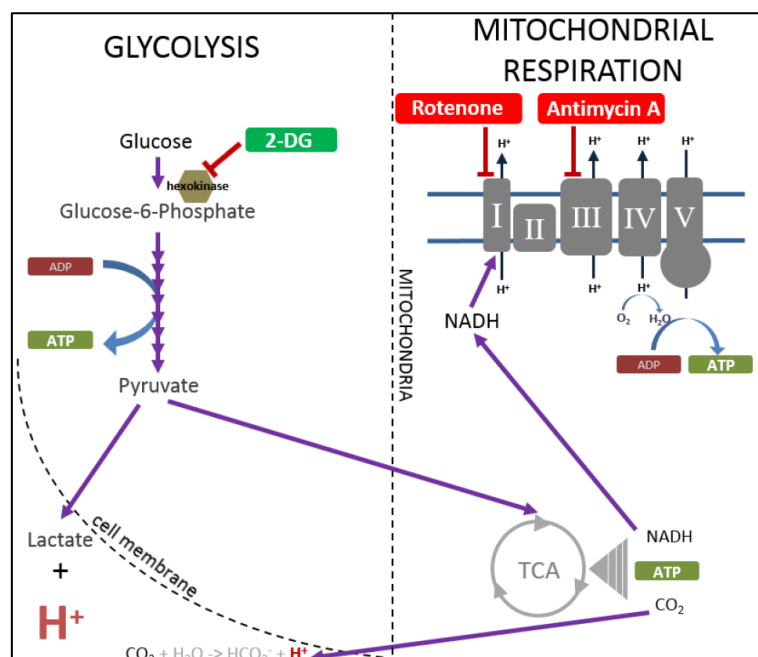
Für die Messung im Durchflusszytometer wurde eine Doppelfärbung der Proben mit Farbstoff-gekoppelten Antikörpern nach Herstellerempfehlung durchgeführt. PD-L1 wurde mit dem APC-konjugierten CD274 mAb und c-Met mit PE-konjugiertem HGF-R/c-Met Ab angefärbt. Als Negativkontrolle wurden alle Proben einmal ungefärbt belassen. Für die Einstellung der Kompensation wurde eine Probe zusätzlich mit jeweils nur einem der beiden Antikörpern gefärbt.

Für die Färbung wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 2ml PBS pro Well gewaschen. Die Zellen wurden mit 0,5ml des vorgewärmten Trypsin-EDTAs abgelöst, in 1,5ml PBS aufgenommen und bei 20.238g 2min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellpellets in 200µl PBS resuspendiert und 100µl je Probe in eine 96-Well Platte mit Rundboden überführt. Die Zellen wurden für 2min bei 1.520g abzentrifugiert. Jede Probe wurde mit 1µl des PD-L1 Antikörpers und 2,5µl des c-Met-Antikörpers in je 200µl PBS versetzt, 30min bei 4°C inkubiert und anschließend erneut zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschrte mit 200µl PBS. Für die abschließende Messung im Durchflusszytometer wurden die Zellen in 400µl PBS aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt.

2.2.6 Messung der basalen Glykolyse am Seahorse-Gerät

Die Methode des Seahorse XF Glycolytic Rate Assays soll im Folgenden erläutert werden, die Informationen beziehen sich hierbei auf die Benutzeranweisung des Herstellers (AGILENTTECHNOLOGIES, 2017). Der Seahorse-Analyser dient der Messung der Glykolyse in lebenden Zellen.

Wie in Abb. 6 dargestellt, kommt es sowohl durch die Glykolyse als auch die mitochondriale Atmungskette zu einer H⁺-Bildung, respektive -Ausstrom, was *in vitro* zu einer extrazellulären Ansäuerung des Mediums führt.



Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von Agilent Technologies

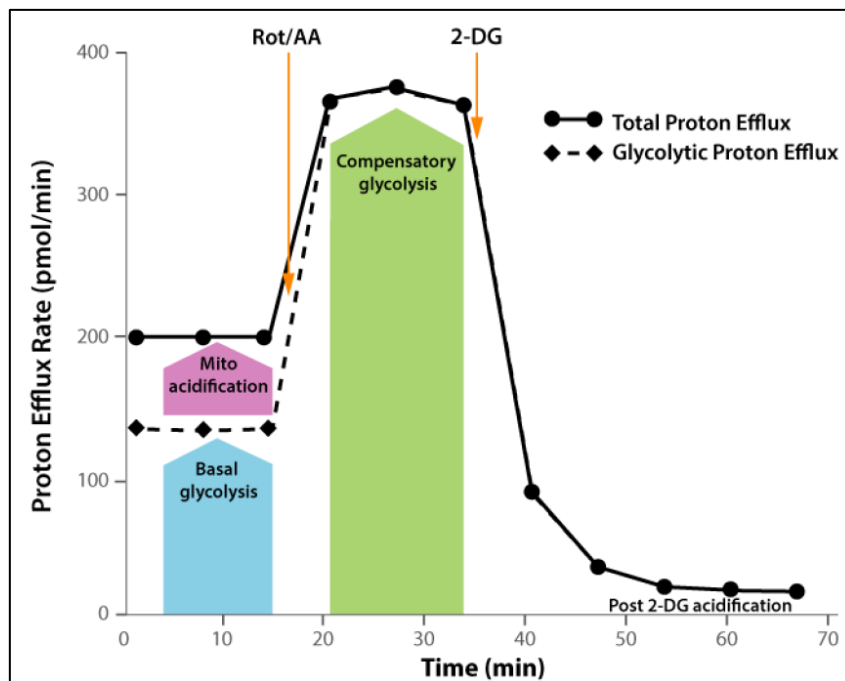
Abb. 6 Extrazelluläre Ansammlung von H⁺ durch Glykolyse und mitochondriale Atmungskette

Nach Ablauf der Glykolyse wird Pyruvat entweder in Laktat und H⁺ oder in der mitochondrialen Atmungskette zu CO₂ umgewandelt, das anschließend hydratisiert wird. Beide Prozesse führen zu einer extrazellulären Ansäuerung (H⁺).

Der H⁺-Ausstrom (Proton Efflux Rate = PER) wird, wie in Abb. 7 abgebildet, zunächst für beide Wege in Echtzeit registriert. Da Tumorzellen aufgrund des Warburg-Effekts nur basale Glykolyse zur Energiegewinnung betreiben, wird im zweiten Messstadium die Atmungskette durch die Inhibitoren Rotenon und Antimycin-A (Rot/AA) gehemmt. Dadurch kommt es zu einem kompensatorischen Anstieg der Glykolyse, um den Energiebedarf weiterhin zu

decken. Mithilfe der O_2 -Verbrauchsrate kann nun der Anteil der mitochondrialen H^+ -Bildung berechnet werden. Indem dieser Anteil vom Gesamt- H^+ -Ausstrom (PER) subtrahiert wird, erhält man den glykolytischen H^+ -Ausstrom (Glycolytic Proton Efflux Rate = glycoPER). Das Absinken des PER nach Injektion von 2-Deoxy-D-Glucose (2-DG), das durch kompetitive Hemmung der Hexokinase die Glykolyse hemmt, beweist, dass der H^+ -Ausstrom vorher durch die Glykolyse verursacht wurde.

Die Höhe des glycoPER erlaubt damit eine Aussage darüber, wie sich die Glykolyse im Tumorstoffwechsel in Echtzeit verändert.



Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von Agilent Technologies

Abb. 7 Messstadien des Seahorse Glycolytic Rate Assays

Vorbereitung der Zellen für die Messung am Seahorse-Gerät

An Tag 1 wurden von jeder Zelllinie, Detroit562/FaDu, $80\mu\text{l}$ in jeweils 30 Wells einer speziellen 96-Well Mikroplatte (XF Cell Culture Microplate) ausgesät und über Nacht bei 37°C und $5\% \text{CO}_2$ inkubiert. Die Konzentration betrug 187.000 Zellen/ml. An Tag 2 wurden jeweils 10 Wells einer Zelllinie unbehandelt belassen, nur mit 50ng/ml HGF stimuliert oder mit 50ng/ml HGF und $0,5\mu\text{M}$ PHA-665752

behandelt und für weitere 48h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Vor der Messung musste eine Sensor-Kassette (Sensor-Cartridge) in einem CO₂-freien Inkubator mit Kalibrierungslösung für 24h bei 37°C hydratisiert werden.

An Tag 4 erfolgt die eigentliche Messung mithilfe des Seahorse XF96 Analyser. Es wurde die Benutzeranweisung von AGILENTTECHNOLOGIES (2017) bezüglich des Ablaufs und Konzentrationsangaben befolgt, allerdings Reagenzien von anderen Herstellern verwendet (s. Materialtabelle). 830mg des Phenolrot-freien Mediums wurden mit 100ml Millipore dH₂O gelöst und mit folgenden Zusätzen versetzt:

Tab. 9 Zusätze für das Phenolrot-freie Medium

Reagenz	Konzentration
Hepes	5 mM
Glucose	10 mM
L-Glutamin	2 mM
Pyruvat	1 mM

Nach dem Erwärmen des Mediums auf 37°C wurde der pH auf 7,4 eingestellt. Die Zellen in der Mikrotiterplatte wurden anschließend mit 200µl des neuen Mediums gewaschen und mit 180µl bei 37°C ohne CO₂ 60min inkubiert.

Die Stammlösungen der Inhibitoren Rot/AA wurden gemeinsam in 600µl Medium von 100mM auf 50mM und in einem zweiten Schritt mit 2700µl Medium auf 5mM verdünnt. Die 2-DG Stocklösung wurde mit 1500µl Medium auf 500mM verdünnt. Die Sensor-Kassette enthält für jedes Well 4 Öffnungen zur Injektion von Lösungen (=Port A-D). Port A wurde jeweils mit 20µl Rot/AA und Port B mit 22µl 2-DG beladen und die Kassette 30min im XF96-Analyser kalibriert. Port C/D wurden nicht benötigt. Kurz vor der Messung wurde ein weiteres Mal das Medium auf den Zellen gegen 180µl frisches Medium ausgetauscht. Anschließend wurde die Messung der Glykolyse in Echtzeit gestartet.

Für eine Normalisierung der Proben wurde abschließend ein Kristallviolett-Test mit Messung der Absorption bei 595nm im Photometer durchgeführt.

2.2.7 Statistik

Die statistische Analyse erfolgte mit Microsoft Excel und GraphPad Prism. Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt. Ein für die Gesamtheit der Wiederholungen repräsentatives Ergebnis wird im Ergebnisteil der Arbeit präsentiert. Wenn möglich wird zusätzlich eine Zusammenfassung aller Wiederholungen gezeigt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Zytotoxizitäts-Test mit PHA-665752

Der Zytotoxizitätstest diente zur Überprüfung der Toxizität und Funktionalität des Tyrosinkinase-Inhibitors PHA-665752 (PHA) in den verwendeten Tumorzelllinien. Für die anstehenden Versuche sollte eine Wirkstoffkonzentration ermittelt werden, die für die Zellen noch tolerabel ist. Foretinib, ein Tyrosinkinase-Inhibitor (TKI) aus früheren Versuchen mit breiterem Wirkspektrum, wurde zum Vergleich herangezogen.

In Abb. 8 ist jeweils ein typisches Versuchsergebnis für jede Zelllinie zu sehen. In Relation zur Wirkstoffkonzentration, ist hier der Mittelwert der relativen Zellzahl (PHA-665752: rot; Foretinib: schwarz) aus drei Wiederholungen innerhalb eines Versuchs logarithmisch dargestellt. Für einen Vergleich wurden die Ergebnisse mithilfe von GraphPad Prism normiert, indem der höchste Wert jeweils als 100% und der niedrigste als 0% definiert wurde.

Nach Inhibition der sechs Zelllinien mit PHA-665752 oder Foretinib für 48h, verringerte sich in beiden Versuchsreihen die relative Zellzahl mit zunehmender Wirkstoffkonzentration. Ein zytotoxischer Effekt durch PHA war, im Vergleich zu Foretinib, erst ab höheren Konzentrationen erkennbar.

Da für beide Inhibitoren eine Dosis-Wirkungsabhängigkeit vorlag, wurden die IC_{50} -Werte mittels nichtlinearer Regression ermittelt. Tab. 10 und Abb. 9 fassen die, aus den Kurven von vier unabhängigen Versuchen erhaltenen, IC_{50} -Mittelwerte zusammen. Bei Betrachtung der beiden Graphiken, wird die unterschiedliche Kinetik der Inhibitoren deutlich, da die IC_{50} -Werte bei allen Zelllinien für PHA-665752 deutlich höher lagen als für Foretinib. Nur bei A253 liegt der IC_{50} -Wert für Foretinib mit $6,68\mu M$ ähnlich hoch wie für PHA.

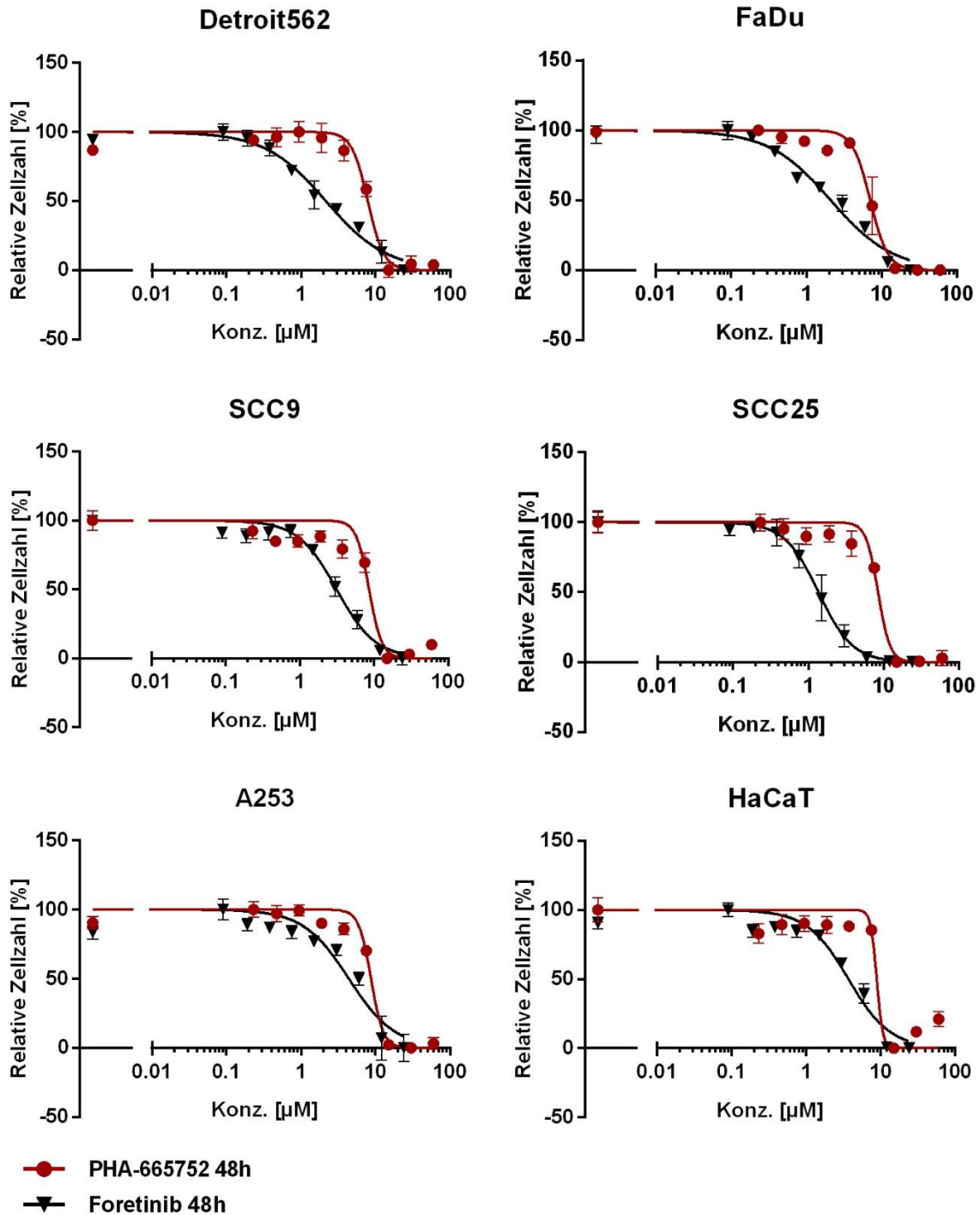


Abb. 8 Zytotoxizitäts-Test nach Inhibition mit PHA-665752/Foretinib für 48h

Auf der y-Achse ist die relative Zellzahl der jeweiligen Zelllinie in Prozent und auf der x-Achse die Konzentration in μM für PHA-665752 (rot) und Foretinib (schwarz) logarithmisch aufgetragen. Dargestellt ist der Mittelwert aus jeweils drei Wiederholungen innerhalb eines Versuchs. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

ERGEBNISSE

Tab. 10 Übersicht IC₅₀-Mittelwerte und -Standardabweichung nach Inhibition mit PHA-665752/Foretinib [µM]

Zelllinie	Wirkstoff	IC ₅₀ Mittelwert	IC ₅₀ Stabw
Detroit562	PHA-665752	7,80	0,75
	Foretinib	2,29	0,73
FaDu	PHA-665752	8,13	1,71
	Foretinib	2,56	1,01
SCC9	PHA-665752	7,83	1,27
	Foretinib	3,06	1,00
SCC25	PHA-665752	9,22	1,26
	Foretinib	1,77	0,53
A253	PHA-665752	9,38	1,36
	Foretinib	6,68	2,26
HaCaT	PHA-665752	8,18	4,05
	Foretinib	3,59	0,67

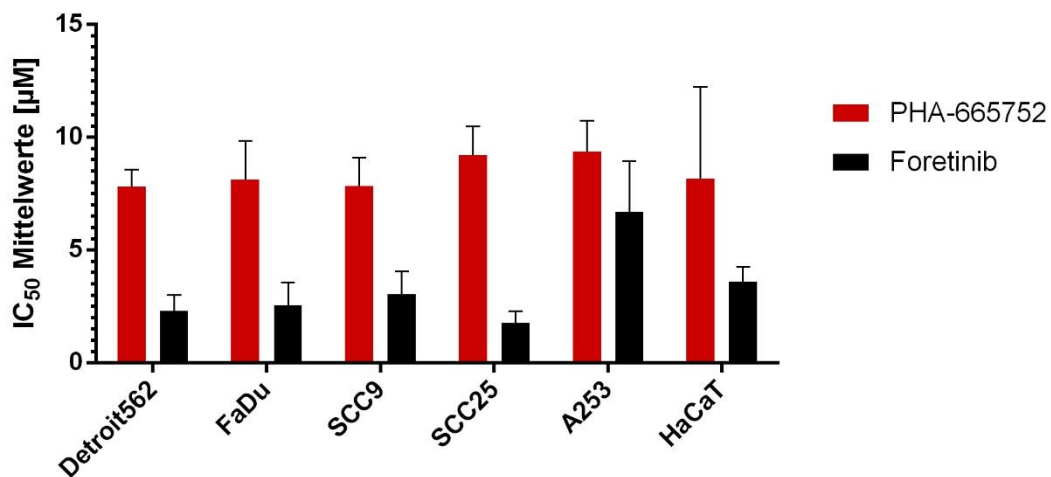


Abb. 9 Übersicht IC₅₀-Mittelwerte und -Standardabweichung nach Inhibition mit PHA-665752/Foretinib [µM]

Die IC₅₀-Werte wurden mittels nichtlinearer Regression aus den Kurven ermittelt und aus vier unabhängigen Versuchen für jede Zelllinie in Mittelwerten zusammengefasst. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

3.2 Western Blot zum Nachweis von phosphoryliertem c-Met-Rezeptor

Mithilfe des Western Blots sollte nachgewiesen werden, ob das verwendete HGF zur Phosphorylierung des c-Met-Rezeptors führt.

Die Zelllinien wurden für 30min bei 4 °C mit 50ng/ml HGF oder 50ng/ml HGF und 0,5µM PHA-665752 (PHA) stimuliert oder als Kontrolle unbehandelt belassen. Es wurden verschiedene Antikörper verwendet, wobei mithilfe des Phospho-Met-Antikörpers eventuell vorhandener phosphorylierter c-Met-Rezeptor und mithilfe des Gesamt-Met-Antikörpers die Gesamt-Rezeptormenge auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden sollte. Der α -Tubulin-Antikörper diente als Proteinladekontrolle. Sofern das verwendete HGF in diesem System funktioniert, wird eine sichtbare Proteinbande für den phosphorylierten c-Met-Rezeptor (p-Met) bei der HGF stimulierten Probe erwartet. Keine Banden sollten bei der unbehandelten Kontrolle zu sehen sein, da HGF nicht von den Tumorzellen selbst sezerniert wird, sowie bei der zusätzlich mit PHA inhibierten Probe, da hier die relevante Phosphorylierungsstelle an Tyr1234 und Tyr1235 des c-Met-Rezeptors blockiert wird.

Das Ergebnis in Abb. 10 ist exemplarisch für die durchgeführten Western Blots. Die Gesamt-Met-Kontrolle zeigt, dass innerhalb einer Zelllinie gleich viel c-Met-Rezeptor vorhanden ist, unabhängig vom Phosphorylierungszustand. Die α -Tubulin-Ladekontrolle bestätigt, dass innerhalb einer Zelllinie gleichviel Protein aufgetragen wurde. Nur bei SCC9 wurde das Protein nicht gleichmäßig aufgetragen.

Bei Betrachtung der mit Phospho-Met-Antikörper behandelten Blots fällt auf, dass bei den Zelllinien Detroit, FaDu, A253, SCC9 und SCC25 nur bei den HGF stimulierten Proben eine Proteinbande für den phosphorylierten c-Met-Rezeptor vorhanden ist. Für SCC9 ist auch bei der HGF und PHA stimulierten Probe eine schwache Bande für p-Met zu sehen (Abb. 10 unten). Dies könnte darin begründet sein, dass in diesem Fall mehr c-Met-Rezeptor vorhanden ist oder mehr Protein bei der Gelherstellung aufgetragen wurde. Allerdings wurde in weiteren Versuchen trotz gleicher Auftragung ebenfalls dieser Effekt nachgewiesen. Für HaCaT konnte kein c-Met-Rezeptor nachgewiesen werden,

ERGEBNISSE

weder mit dem Phospho-Met-, noch mit dem Gesamt-Met-Antikörper. Auch α -Tubulin ließ sich nicht nachweisen. Da die Bestimmung der Proteinkonzentration für HaCaT stets einen sehr geringen Wert ergab, könnte die Ursache hierfür sein, dass zu wenig Protein für einen erfolgreichen Versuch isoliert werden konnte.

Im Anhang sind die Original-Blots inklusive Marker abgebildet: p-Met und Gesamt-c-Met haben eine erwartete Größe von 145kDa und liefen zwischen den Markerbanden 135 und 190kDa. α -Tubulin hat eine erwartete Größe von 55kDa und lief zwischen den Banden 46 und 58kDa.

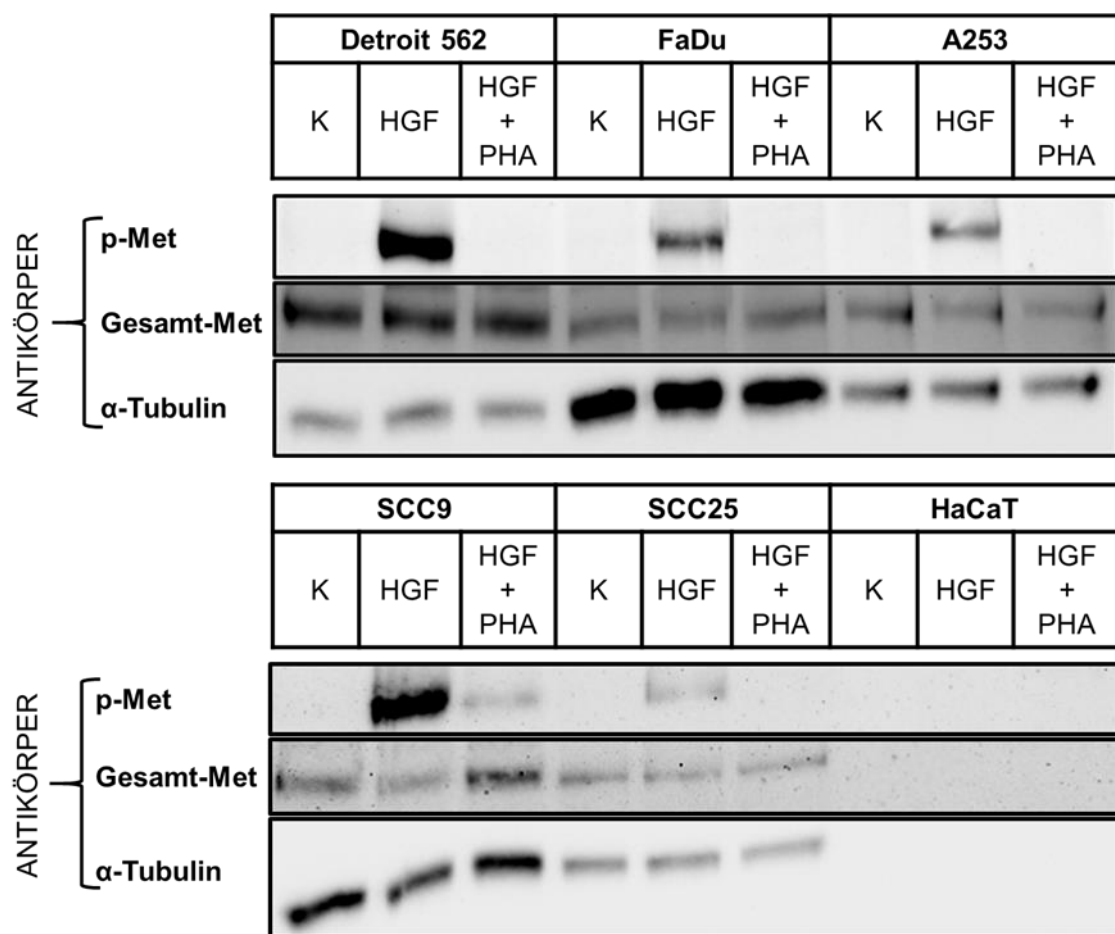


Abb. 10 Western Blot zum Nachweis von phosphoryliertem c-Met-Rezeptor

Die Zelllinien wurden für 30min mit 50ng/ml HGF oder 50ng/ml HGF und 0,5 μ M PHA stimuliert oder unbehandelt gelassen (K). Links sind die verwendeten Sekundär-Antikörper aufgelistet: ein Phospho-Met-Antikörper zum Nachweis von phosphoryliertem c-Met-Rezeptor, sowie ein Gesamt-Met- (Rezeptorkontrolle) und α -Tubulin-Antikörper (Ladekontrolle).

3.3 Durchflusszytometrie zum Nachweis von PD-L1 nach HGF-Stimulation

Mithilfe der Durchflusszytometrie wurde der Einfluss von HGF auf die Konzentration des Immun-Checkpoint Proteins PD-L1 auf der Zelloberfläche von Detroit562 und FaDu untersucht. Um zu überprüfen, ob ein Effekt tatsächlich durch die HGF-Stimulation hervorgerufen wird, wurden zwei verschiedene Versuchsansätze durchgeführt. Zum einen wurde der c-Met-Rezeptor pharmakologisch mit PHA-5665752 inhibiert, zum anderen wurde genetisch, mittels RNA-Interferenz, die Rezeptor-Expression verringert.

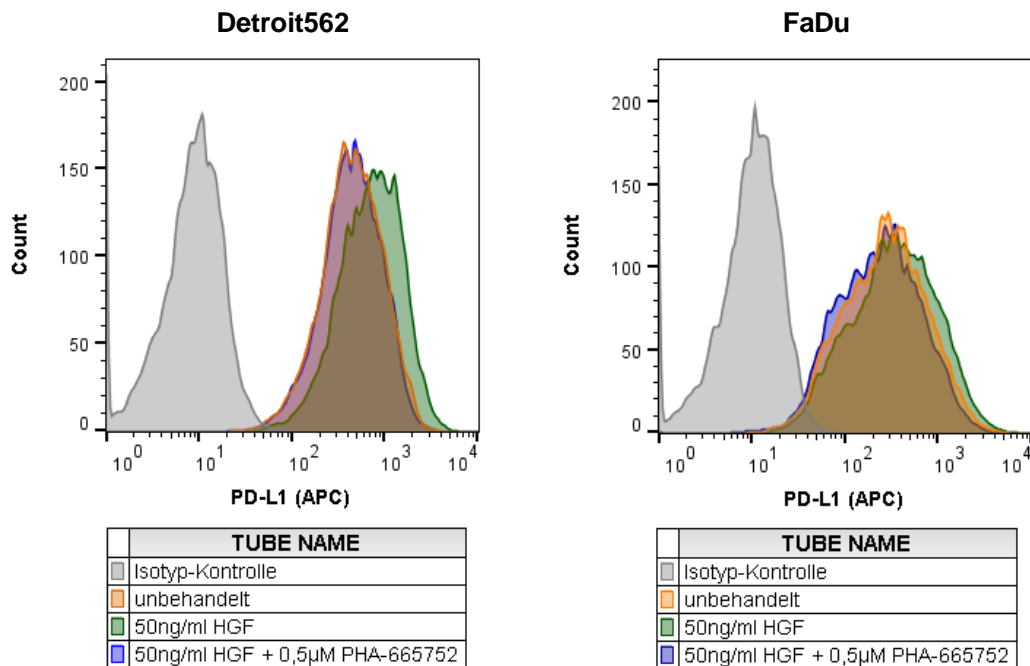
3.3.1 c-Met-Inhibition mit PHA-665752

Die Zelllinien Detroit562 und FaDu wurden entweder mit 50ng/ml HGF oder zur Gegenprobe mit HGF und 0,5µM PHA-665752 (PHA) für 48h stimuliert. Die Kontrolle blieb unbehandelt. Für die Messung wurden die Zellen spezifisch mit einem APC-Antikörper gegen PD-L1 oder einer APC-Isotyp-Kontrolle gefärbt. Wie oben beschrieben, sollte untersucht werden, ob sich die Menge an PD-L1 auf der Zelloberfläche nach HGF-Stimulation erhöht. Das heißt in der durchflusszytometrische Messung sollte die Fluoreszenzintensität (FI) für PD-L1 erhöht bzw. nach zusätzlicher Inhibition mit PHA im Vergleich zur nur mit HGF behandelten Probe vermindert sein.

PD-L1 war eindeutig auf der Zelloberfläche nachzuweisen. Die Histogramme in Abb. 11A zeigen die mittlere FI für PD-L1 auf der Zelloberfläche von Detroit562 und FaDu. Für Detroit (links) nimmt die FI nach Stimulation mit HGF (grün) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (orange) zu, während eine zusätzliche Inhibition mit PHA (blau) die Zunahme hemmt. Die HGF-Stimulation bewirkt also eine Erhöhung der mittleren Fluoreszenzintensität für PD-L1 und dieser Effekt konnte durch Inhibition mit PHA-665752 gehemmt werden. Für FaDu (rechts) fiel gegenüber Detroit562 die Zunahme der FI nach HGF-Stimulation etwas geringer aus.

In Abb. 11B wurden die Ergebnisse quantifiziert und normiert dargestellt, indem die unbehandelte Kontrolle als 100% definiert wurde. Die Zunahme der relativen Intensität für PD-L1 nach HGF-Stimulation ist im Vergleich zur unbehandelten Probe signifikant ($p=0,001$; $\alpha=0,05$). Für FaDu fiel in allen Versuchen der Effekt durch HGF geringer aus als in Detroit562 und war nicht signifikant.

A



B

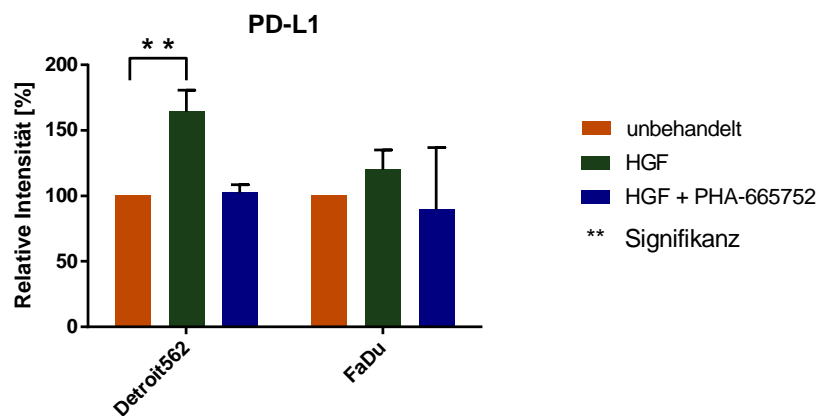


Abb. 11 Stimulation mit HGF führt zu erhöhter PD-L1-Konzentration auf der Zellmembran

A) Aufgetragen ist auf der y-Achse die Zellzahl (counts) und auf der x-Achse die relative Fluoreszenzintensität für PD-L1 (APC-Färbung). Die Zelllinien Detroit562 und FaDu wurden mit 50ng/ml (grün) oder 50ng/ml HGF und 0,5µM PHA-665752 (blau) behandelt und mit einem APC-konjugierten PD-L1 spezifischen Antikörper gefärbt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (orange) und mit einer Isotyp-Kontrolle gefärbte unstimulierte Zellen (grau).

B) Quantifizierung von Versuchen wie in A) dargestellt. Aufgetragen ist die Änderung der relativen Fluoreszenzintensität (PD-L1) der behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

** Signifikanz: p-Wert=0,001; $\alpha=0,05$; n \geq 4.

3.3.2 c-Met-Inhibition mit RNA-Interferenz

Die Zellen waren hier unbehandelt oder mit 50ng/ml HGF stimuliert und wurden jeweils mit unspezifischer Kontroll-siRNA oder c-Met-siRNA I bzw. II transfiziert. Für die Messung wurden die Zellen mit einem APC-Antikörper gegen PD-L1 oder einem PE-Antikörper gegen c-Met spezifisch gefärbt.

Zunächst musste der Erfolg der siRNA-Transfektion, also eine verminderte c-Met-Expression, überprüft werden. Eine durchflusszytometrische Analyse auf c-Met ergab, dass die relative Fluoreszenzintensität (FI) nach Behandlung mit spezifischer siRNA I/II, durch Abbau der Rezeptor-mRNA, im Vergleich zur Kontroll-siRNA behandelten Probe, abnahm (Abb. 12). Die siRNA-Transfektion war demnach erfolgreich.

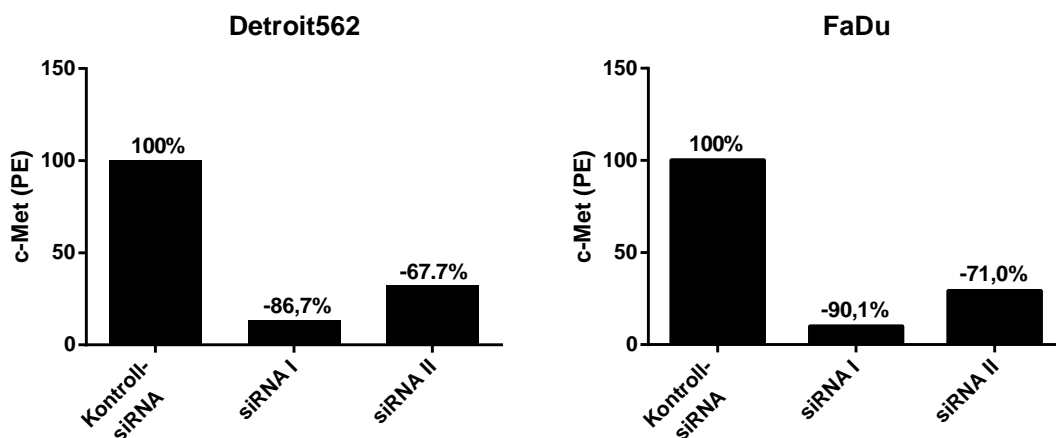


Abb. 12 Transfektionskontrolle: c-Met-Rückgang nach Behandlung mit c-Met-siRNA I/II
 Analyse der Fluoreszenzintensität für c-Met (c-Met (PE)) in den Zelllinien Detroit562 und FaDu, jeweils nach Transfektion mit spezifischer siRNA I/II oder Kontroll-siRNA. Dargestellt sind die Messungen aus einem Versuch der jeweiligen Zelllinie. Die Ergebnisse wurden normiert (Kontroll-siRNA behandelte Probe = 100%). Die Prozentzahlen geben den c-Met-Rückgang in Relation zur Kontroll-siRNA behandelten Probe an.

Primär sollte hier ebenfalls untersucht werden, ob sich die Menge an PD-L1 auf der Zelloberfläche nach HGF-Stimulation verändert. Das heißt, in der durchflusszytometrischen Messung sollte die FI für PD-L1 erhöht bzw. nach Transfektion mit spezifischer c-Met-siRNA I/II vermindert sein.

Die Histogramme eines typischen Versuchs in Abb. 13A zeigen auf der x-Achse die FI für PD-L1 auf der Zelloberfläche von Detroit562. Diese nimmt nach

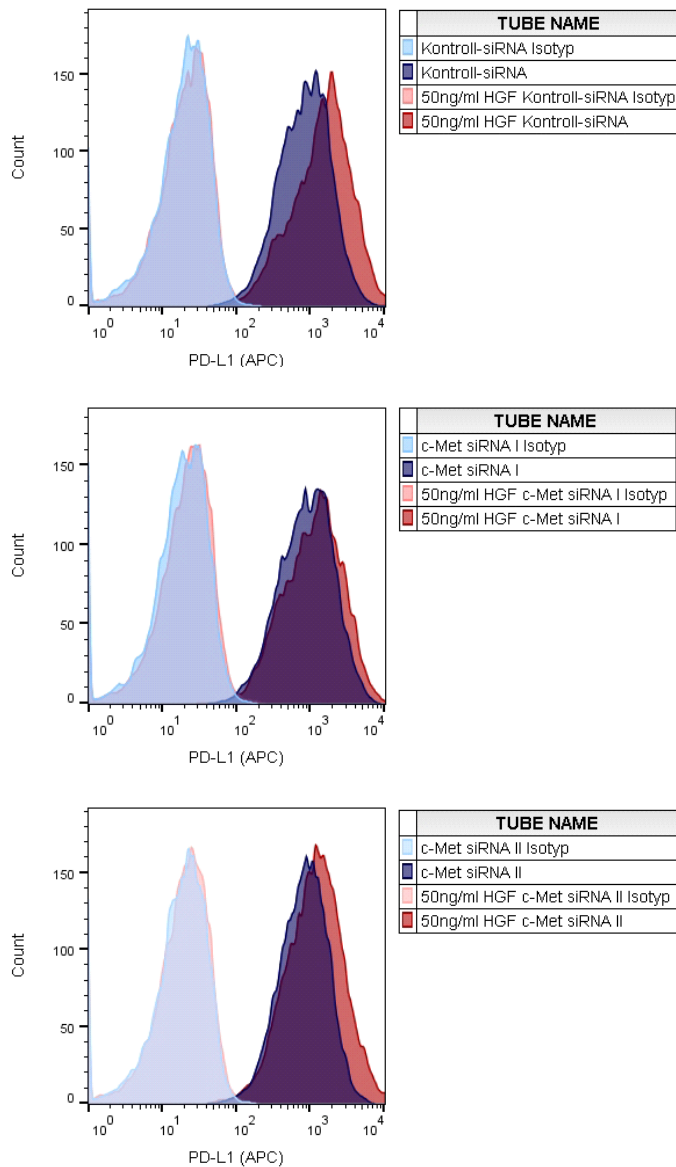
Transfektion mit unspezifischer Kontroll-siRNA (Bild oben) nach HGF-Stimulation (dunkelrot) im Vergleich zur unbehandelten Probe (dunkelblau) zu, während dieser Effekt nach Behandlung mit c-Met-siRNA I und II (mittig/unten), durch die genetische Rezeptor-Blockierung, verringert werden konnte.

Die Ergebnisse wurden in Abb. 13B normiert dargestellt, indem jeweils der höchste Wert der unbehandelten Proben als 100% definiert wurde. Die Abbildungen zeigen jeweils ein typisches Ergebnis pro Zelllinie. Der beschriebene Effekt war auch bei der Zelllinie FaDu (Abb. 14) zu erkennen, fiel jedoch etwas geringer aus.

Da die gemessene Fluoreszenzintensität für die Menge an PD-L1 auf der Zelloberfläche steht, war der Wachstumsfaktor HGF für die Zunahme des Immun-Checkpoint-Proteins PD-L1 auf den Kopf-Hals-Tumorzellen Detroit562 und FaDu verantwortlich. Eine Stimulation mit HGF bewirkte dort eine Zunahme der PD-L1 Konzentration, während dieser Effekt durch eine Transfektion der Zellen mit spezifischer c-Met-siRNA I und II gehemmt werden konnte.

Detroit562

A



B

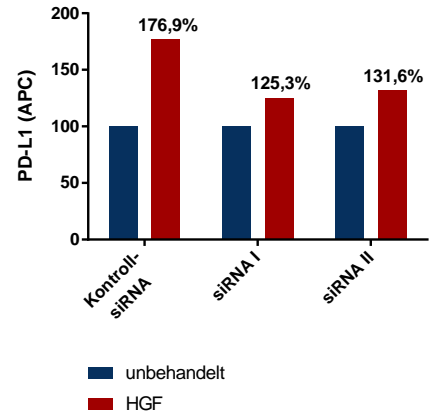


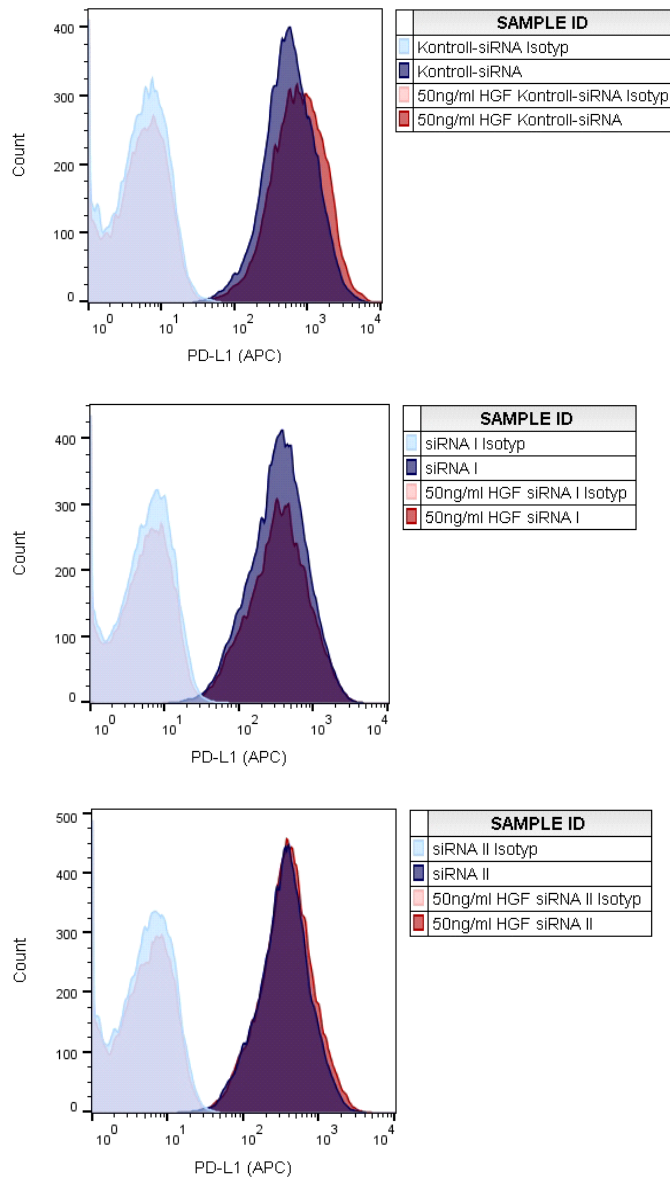
Abb. 13 c-Met-siRNA I/II verringert Zunahme von PD-L1 nach HGF-Stimulation auf der Zelloberfläche von Detroit562

A) Histogramme: Aufgetragen sind die Zellzahl (counts, y-Achse) und die APC-Fluoreszenzintensität für PD-L1 (x-Achse) auf der Zelloberfläche. Die Proben waren unbehandelt (dunkelblau) oder mit HGF stimuliert (dunkelrot) und wurden jeweils mit unspezifischer Kontroll-siRNA (oben) oder c-Met-siRNA I (mittig) bzw. II (unten) transfiziert (Transfektionskontrolle siehe Abb. 12). Entsprechende Isotyp-Kontrollen sind in hellblau/hellrot dargestellt.

B) Normierung der in A dargestellten Messungen (unbehandelte siRNA-Probe = 100%). Die Proben sind farblich analog zu A) gekennzeichnet.

FaDu

A



B

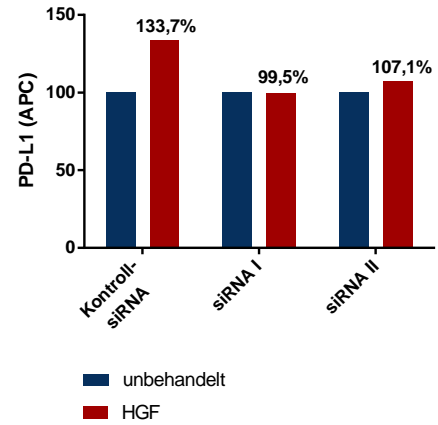


Abb. 14 c-Met-siRNA I/II verringert Zunahme von PD-L1 nach HGF-Stimulation auf der Zelloberfläche von FaDu

A) Histogramme: Aufgetragen sind die Zellzahl (counts, y-Achse) und die APC-Fluoreszenzintensität für PD-L1 (x-Achse) auf der Zelloberfläche. Die Proben waren unbehandelt (dunkelblau) oder mit HGF stimuliert (dunkelrot) und wurden jeweils mit unspezifischer Kontroll-siRNA (oben) oder c-Met-siRNA I (mittig) bzw. II (unten) transfiziert (Transfektionskontrolle siehe Abb. 12). Entsprechende Isotyp-Kontrollen sind in hellblau/hellrot dargestellt.

B) Normierung der in A dargestellten Messungen (unbehandelte siRNA-Probe = 100%). Die Proben sind farblich analog zu A) gekennzeichnet.

3.4 Messung der basalen Glykolyse nach HGF-Stimulation

Mithilfe des Seahorse XF96 Analyzer wurde der Gesamt-H⁺-Ausstrom in der Zellkultur gemessen und, nach Subtraktion der mitochondrial verursachten Ansäuerung, der Anteil der Ansäuerung durch die basale Glykolyse ermittelt.

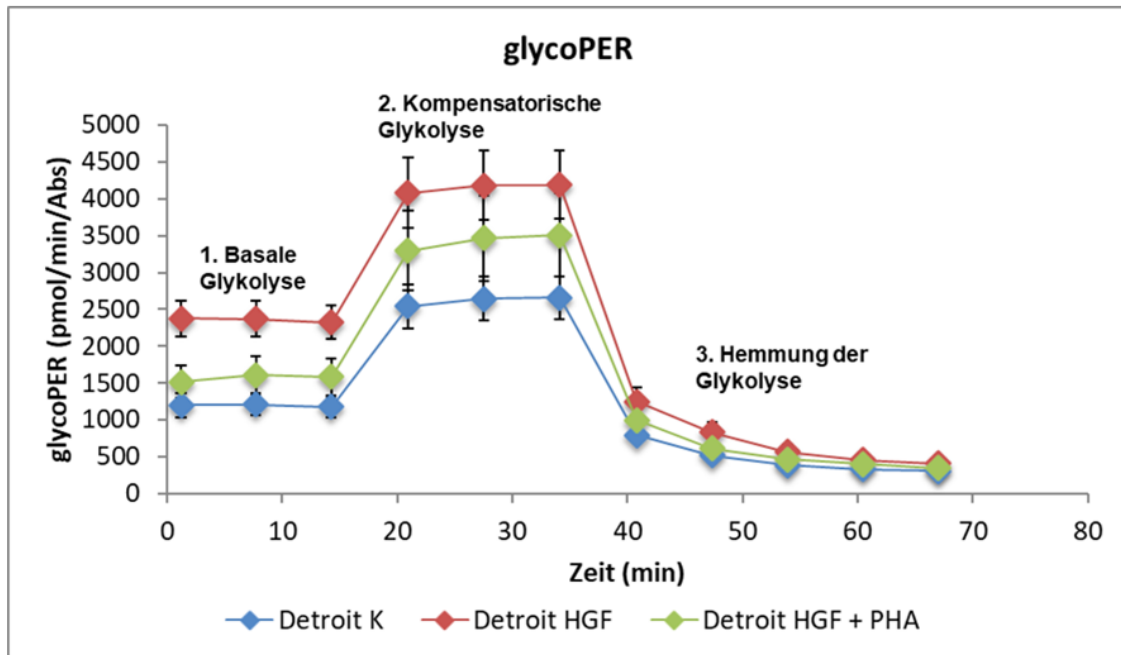
Die Graphen in Abb. 15A und Abb. 16A verbildlichen den Verlauf der Glykolyse in den Zelllinien Detroit562 und FaDu in Echtzeit. Dieser verhält sich analog der im Methodenteil vorgestellten Messstadien: Das 1. Messstadium zeigt den glykolytischen H⁺-Ausstrom unter Normalbedingungen. Dieser steigt nach Hemmung der Atmungskette im 2. Messstadium kompensatorisch an und fällt nach Hemmung der Glykolyse zur Gegenprobe im 3. Messstadium ab.

Auffällig ist in Abb. 15A, dass der H⁺-Ausstrom bei den mit HGF (rot) stimulierten Detroit562-Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (blau) im 1. Messstadium erhöht ist, die Zellen also deutlich mehr Glykolyse betreiben. Der im Verhältnis erhöhte H⁺-Ausstrom bleibt auch nach Hemmung der Atmungskette bestehen. Die zusätzliche Inhibition der Zellen mit PHA-665752 bewirkt eine Hemmung der Glykolyse. In den Balkendiagrammen in Abb. 15 ist mit Zahlenwerten dargestellt, wie sich die einzelnen Zellproben während der Messung der basalen Glykolyse (B) und der kompensatorischen Glykolyse (C) verhalten haben. Der H⁺-Ausstrom durch die basale Glykolyse in den HGF stimulierten Zellen (rot) verdoppelt sich nahezu im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (blau). Während der kompensatorisch erhöhten Glykolyse bleibt der Wert der HGF stimulierten Zellen um den Faktor 1,58 erhöht.

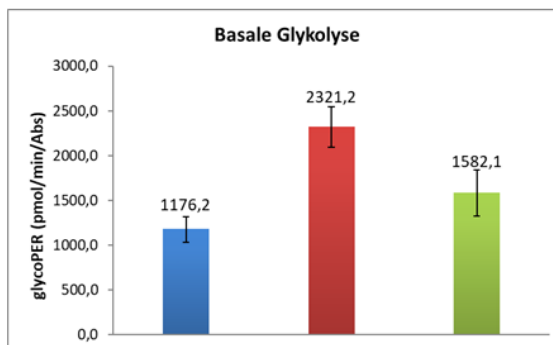
In Abb. 16A ist ein typisches Ergebnis für die Zelllinie FaDu dargestellt. Zu Beginn (Abb. 16B) ist der H⁺-Ausstrom der HGF stimulierten Zellen (rot) im Vergleich zur Kontrolle (K, blau) um den Faktor 1,11 erhöht und nach Inhibition mit PHA-665752 (grün) erniedrigt. Während des kompensatorischen Anstiegs der Glykolyse bleibt er um den Faktor 1,04 erhöht (Abb. 16C).

Zusammengefasst, führte demnach die HGF-Stimulation in den verwendeten Kopf-Hals-Tumorzellen zu einer gesteigerten Glykolyse. Bei Detroit562 konnte hierbei ein ausgeprägter Effekt beobachtet werden, während bei FaDu sich die Glykolyse nur geringfügig erhöhte.

A



B



C

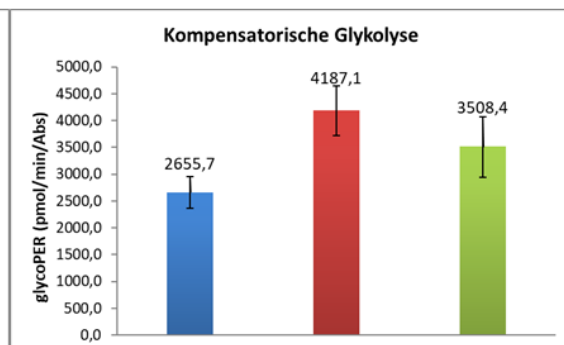
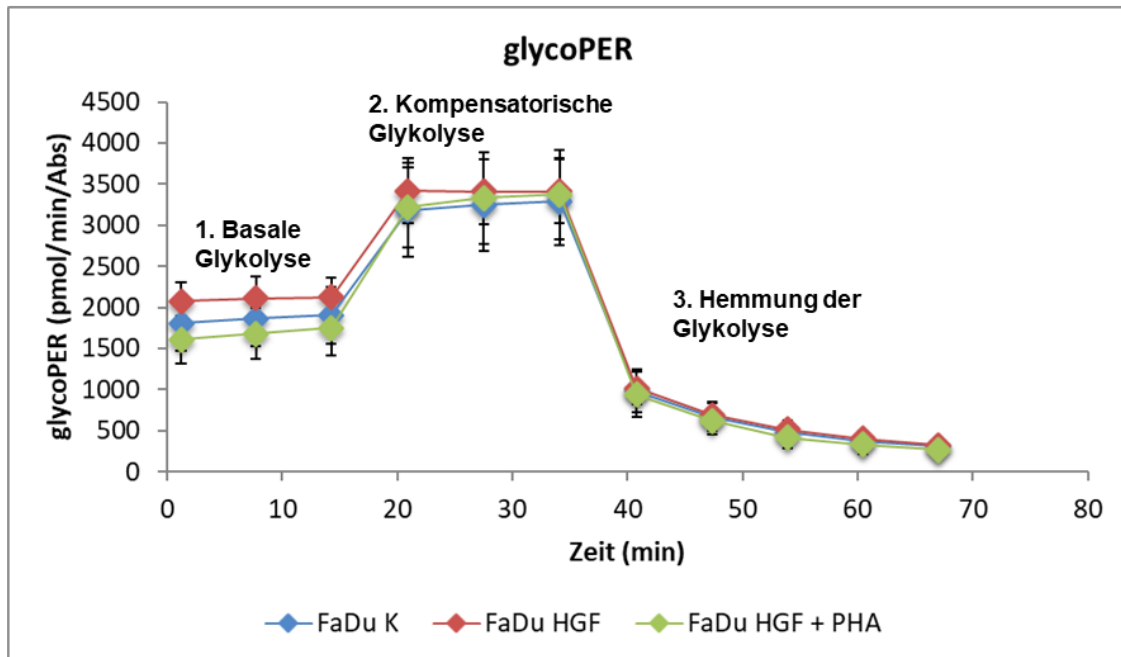


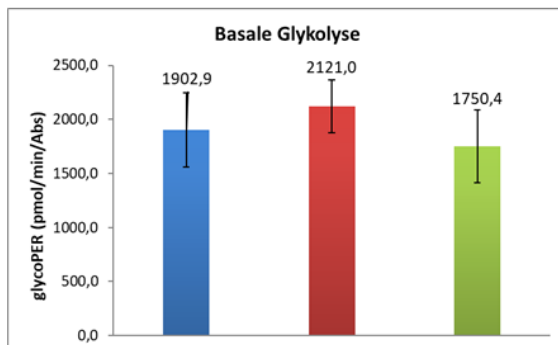
Abb. 15 Veränderung des glykolytischen H⁺-Ausstroms (glykoPER) in Echtzeit nach HGF-Stimulation in Detroit562

A) Die Proben waren unbehandelt (K, blau), mit 50ng/ml HGF stimuliert (rot) oder zusätzlich inhibiert mit 0,5µM PHA-665752 (grün). Der Verlauf stellt drei Messstadien dar.
 B) Anteil der basalen Glykolyse am glykolytischen Protonenausstrom im 1. Messstadium
 C) Kompensatorische Glykolyse nach Hemmung der Atmungskette im 2. Messstadium.
 Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung (SD) an.

A



B



C

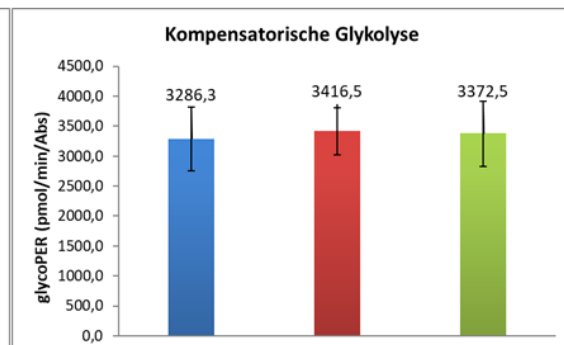


Abb. 16 Veränderung des glykolytischen H⁺-Ausstroms (glycoPER) in Echtzeit nach HGF-Stimulation in FaDu

A) Die Proben waren unbehandelt (K, blau), mit 50ng/ml HGF stimuliert (rot) oder zusätzlich inhibiert mit 0,5µM PHA-665752 (grün). Der Verlauf stellt drei Messstadien dar.

B) Anteil der basalen Glykolyse am glykolytischen Protonenausstrom im 1. Messstadium

C) Kompensatorische Glykolyse nach Hemmung der Atmungskette im 2. Messstadium.

Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung (SD) an.

4 DISKUSSION

Die 5-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit einem Mundhöhlen- bzw. Pharynx-Karzinom bewegt sich seit über 20 Jahren, trotz Fortschritten in Diagnostik und Therapie, nur zwischen 50 und 65% (JEMAL et al., 2008; SIEGEL et al., 2018). Zudem sind die konventionellen Therapiemöglichkeiten mit erheblichen Funktionseinschränkungen und Nebenwirkungen verbunden (LANGENDIJK et al., 2008; RIVELLI et al., 2015).

Diese Fakten zeigen, wie wichtig eine Evaluation von neuen Therapieansätzen ist, die auch das Immunsystem und den Tumormetabolismus im Fokus haben, um die Überlebenschancen und auch die postoperative Lebensqualität zu verbessern. Die Zielgruppe neuer Therapieverfahren im onkologischen Bereich sind derzeit vorwiegend palliative Patienten, für die es nur noch wenige oder keine Therapieoptionen mehr gibt (SEIWERT et al., 2005; MARUR et al., 2008; XING et al., 2016; SIEGEL et al., 2018).

Wie für verschiedene andere Malignome, wurde der HGF/c-Met-Signalweg ebenfalls als ein relevanter Faktor für die Tumorgenese in Kopf-Hals-Karzinomen identifiziert. Hierbei wurden bislang vor allem pathologische Mechanismen in den Tumorzellen selbst, wie Mutationen und Überexpression von c-Met bzw. HGF, ausführlich untersucht (SZTURZ et al., 2017; ARNOLD et al., 2017). Allerdings besteht ein Tumor, neben den eigentlichen Tumorzellen, zu einem wesentlichen Anteil auch aus dem sogenannten Tumormikromilieu. Die hier stattfindenden Prozesse sind insbesondere in immunologischer und metabolischer Hinsicht interessant und beeinflussen die Tumorgenese in bedeutender Art und Weise (SPILL et al., 2016; ZHAO et al., 2015; NATAN et al., 2014). HGF wird von Fibroblasten parakrin sezerniert (KNOWLES et al., 2009) und beeinflusst im Tumormikromilieu, wie bereits in anderen Tumormodellen nachgewiesen wurde, verschiedene tumorfördernde Mechanismen. Wie eingangs beschrieben, konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Nierentumorzellen nach HGF/c-Met-Aktivierung mithilfe des Immun-Checkpoint-Proteins PD-L1 die Immunzellen im Tumormikromilieu negativ beeinflussen (BALAN et al., 2015). Darüber hinaus wird für HGF/c-Met ein Zusammenhang mit einem gesteigerten Glukosestoffwechsel in diversen Malignomen diskutiert (KAPLAN et al., 2000; DE ROSA et al., 2015).

Durch das vermehrt anfallende Laktat werden die Immunzellen im Mikromilieu zusätzlich geschädigt und somit in ihrer Aktivierung gehemmt (FISCHER et al., 2007).

Vor diesem Hintergrund wurde in dieser Arbeit der Einfluss von HGF/c-Met auf das Immun-Checkpoint-Protein PD-L1 und den Glukosemetabolismus im Tumormikromilieu von Kopf-Hals-Karzinomen untersucht. Im Vergleich zu anderen Ligand/Rezeptor-Wechselwirkungen ist die Bindung zwischen HGF und c-Met sehr spezifisch, da HGF der einzige bekannte Ligand für c-Met ist (BOTTARO et al., 1991; BIRCHMEIER et al., 2003). Somit kann angenommen werden, dass die gezeigten Reaktionen tatsächlich durch die HGF-Stimulation verursacht wurden.

Im Folgenden sollen die Ergebnisse vor dem Hintergrund des aktuellen Wissensstands diskutiert werden. In zwei Vorversuchen wurden zunächst die Versuchsbedingungen überprüft.

4.1 Zytotoxizität und Funktionalität des Tyrosinkinase-Inhibitors PHA-665752

Der Zytotoxizitätstest diente zur Analyse der Toxizität des Tyrosinkinase-Inhibitors (TKI) PHA-665752 (PHA). Es sollte, in Kombination mit den in 4.2 diskutierten Western Blots, eine Konzentration des Inhibitors gefunden werden, bei der in den verwendeten Tumorzelllinien keine erhöhte Toxizität vorliegt, aber dennoch eine wirksame Inhibition stattfindet.

PHA ist laut DAVIS et al. (2011) selektiver für die c-Met-Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) und hat zudem eine höhere Affinität im Vergleich zu Foretinib (K_d PHA 0,27 vs. K_d For 1,4). Aufgrund dieser Eigenschaften wurde er ausgewählt, um zu gewährleisten, dass die Hemmung sich auf den gewünschten Signalweg konzentriert und damit eine aussagekräftige Gegenprobe zu einer Stimulation des c-Met-Rezeptors mit HGF bildet.

Im Zytotoxizitätstest ergaben die IC_{50} -Werte im Vergleich eine geringere Zytotoxizität nach Behandlung mit PHA als mit Foretinib. PHA hat eine höhere Affinität als Foretinib, weshalb die Zytotoxizität im Vergleich zur Foretinib eigentlich stärker ausfallen müsste. Jedoch lagen in den verwendeten Zelllinien

die IC₅₀-Werte von PHA deutlich über denen von Foretinib. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass laut DAVIS et al. (2011), PHA sehr spezifisch für die c-Met-RTK ist, während Foretinib durch eine viel geringere Spezifität und damit Selektivität charakterisiert ist und folglich deutlich mehr Tyrosinkinase in den Zellen hemmen könnte. Vor diesem Hintergrund kann man vermuten, dass zwischen erhöhter Tyrosinkinase-Selektivität und verringerter Zytotoxizität ein Zusammenhang besteht.

Für die folgenden Versuche wurde eine PHA-665752-Konzentration von 0,5µM gewählt, da hier nur ein geringer zytotoxischer Effekt zu sehen war.

4.2 c-Met-Aktivierung nach HGF-Stimulation

Im nächsten Schritt wurde im Western Blot überprüft, ob rekombinantes HGF c-Met aktiviert. Als Kontrolle wurde mit 0,5µM PHA inhibiert. Die Phosphorylierung des Rezeptors an Tyr1234/1235 wird gemeinhin als aktivierter Zustand verstanden und wurde auch in den vorliegenden Experimenten untersucht (FERRACINI et al., 1991; ZHEN et al., 1994).

Wie in der Literatur beschrieben, bewirkte auch in den hier verwendeten HNSCC-Zelllinien HGF eine c-Met-Aktivierung durch Phosphorylierung des Rezeptors (NALDINI et al., 1991; ZHEN et al., 1994). Alle Zelllinien, bis auf HaCaT, zeigten nach HGF-Stimulation eine Proteinbande für den phosphorylierten und damit aktivierten c-Met-Rezeptor (p-Met). Wie bereits in anderen Publikationen gezeigt, variiert die Gesamtproteinmenge für c-Met zwischen den Zelllinien zum Teil erheblich (KNOWLES et al., 2009).

Bei Detroit562 war der Effekt nach HGF-Stimulation besonders hoch. Eine Ursache hierfür könnte sein, dass Detroit562-Zellen aus Fernmetastasen in der Pleura entnommen wurden (ATCC, 2018) und laut DI RENZO et al. (2000) und SZTURZ et al. (2017) eine c-Met-Überexpression häufig mit fortgeschrittenen Tumorstadien und Metastasen korreliert. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass in metastatischen Zellen der tumorfördernde Effekt durch HGF/c-Met besonders ausgeprägt sein könnte.

Validiert wurde dieses Ergebnis durch die Inhibition von c-Met mit PHA-665752, um zu zeigen, dass die HGF-Stimulation c-Met-spezifisch war. CHRISTENSEN et

al. (2003) konnten zeigen, dass PHA-665752 die Phosphorylierung in der ATP-Bindetasche, der für die Aktivierung entscheidenden Tyrosin-Reste (Tyr1234/1235 und Tyr1349) an der c-Met-Tyrosinkinase-Domäne, inhibiert. Sie stimulierten Zelllinien aus verschiedenen Karzinomen ebenfalls für 30min mit HGF oder HGF und PHA-665752 und konnten als erste *in vitro* einen anti-karzinogenen Effekt durch die c-Met-Inhibition mit PHA-665752 feststellen. Die besondere Spezifität von PHA-665752 gegenüber dem c-Met-Rezeptor, wurde ebenfalls von CHRISTENSEN et al. (2003) nachgewiesen, die eine „50-fach [höhere] Selektivität von PHA-665752 für c-Met“ (S. 7347) feststellen konnten, in einer Gegenüberstellung mit anderen TKI.

Im Fall von SCC9 ist dennoch auch nach Inhibition mit PHA-665752 noch eine Bande für p-Met zu sehen. Da das Signal für p-Met nach reiner HGF-Stimulation, trotz geringem Gesamt-Met-Protein, sehr ausgeprägt ist, könnte man hier als Grund vermuten, dass HGF bei dieser Zelllinie eine ausgeprägte Rezeptor-aktivierende-Wirkung hat und die TKI-Konzentration nicht ausreicht, um die Phosphorylierung durchweg zu hemmen. CHRISTENSEN et al. (2003) berichten außerdem von einer sich teilweise deutlich unterscheidenden Wirkung von PHA-665752 je nach Zelllinie.

4.3 Einfluss von HGF/c-Met auf PD-L1 in Kopf-Hals-Karzinomen

Im Rahmen der Hauptversuche wurden verschiedene immunologische und metabolische Auswirkungen des HGF/c-Met-Signalwegs in Kopf-Hals-Tumorzellen untersucht. In den beiden folgenden Kapiteln sollen die Ergebnisse jeweils diskutiert werden.

Zunächst wurde mithilfe der Durchflusszytometrie der Einfluss von HGF auf die Konzentration des Immun-Checkpoint-Proteins PD-L1 auf der Zelloberfläche von Detroit562 und FaDu untersucht. Hierbei wurden zwei Kontrollen benutzt, um zu überprüfen, ob die PD-L1-Veränderung c-Met-spezifisch war. Es wurde entweder die Phosphorylierung des c-Met-Rezeptors mit dem spezifischen TKI PHA-665752 inhibiert oder die c-Met-mRNA mittels RNA-Interferenz degradiert.

Obwohl PHA-665752, wie bereits erläutert, sehr c-Met-spezifisch wirkt, hat die genetische Blockierung mittels RNA-Interferenz dennoch eine größere

Aussagekraft. Denn wie in der durchflusszytometrischen Analyse nach c-Met zu sehen ist, bestand nach Transfektion mit c-Met-spezifischer siRNA eine deutlich sichtbare Verringerung der Rezeptorkonzentration auf der Zellmembran. Nach Hemmung mit PHA-665752, kann der Rezeptor jedoch weiterhin gebildet werden und wird nur in seiner Aktivierung gehemmt. Gleichwohl konnte mit beiden Kontrollvarianten erfolgreich bestätigt werden, dass die Stimulation mit HGF die Ursache für die PD-L1-Hochregulation ist.

Bisher wurden zwar zahlreiche Erkenntnisse zur Rolle von HGF/c-Met in verschiedenen Tumoren, u.a. auch Kopf-Hals-Karzinomen gewonnen, dennoch ist zum Einfluss auf das Immunsystem nur wenig bekannt gewesen. BALAN et al. (2015) konnten bisher als einzige Forschungsgruppe die Hochregulation des Immun-Checkpoint-Proteins PD-L1 durch HGF/c-Met nachweisen und zwar in Nierentumorzellen. Sie identifizierten Ras als vermittelndes Signalmolekül für die Zunahme von PD-L1 nach c-Met-Aktivierung. Ras ist bekannt für seine proliferative Wirkung in Nierenkarzinomen, sowie neben weiteren Tumoren auch in HNSCC, wie bereits einleitend erwähnt (FUJITA et al., 1988; FURGE et al., 2000). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte nun die Hochregulation von PD-L1 infolge von HGF-Stimulation auch in Kopf-Hals-Tumorzellen nachgewiesen werden. In beiden Untersuchungen konnte für die Zelllinien Detroit562 und FaDu gezeigt werden, dass nach HGF-Stimulation die Konzentration von PD-L1 auf der Zelloberfläche zunimmt.

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, sowie zur zusätzlich mit PHA-665752 inhibierten Probe war die PD-L1-Konzentration bei Detroit562 signifikant erhöht. Im Unterschied hierzu war bei FaDu die Erhöhung der PD-L1-Konzentration nach HGF-Stimulation nicht signifikant.

Auch nach Transfektion der Zellen mit Kontroll-siRNA, war nach Behandlung mit HGF die Konzentration von PD-L1 auf der Zelloberfläche im Vergleich zur unbehandelten, sowie zur c-Met-siRNA und HGF behandelten Probe, erhöht. Wie im vorherigen Versuch war der Effekt bei Detroit562 im Unterschied zu FaDu deutlich stärker. Die siRNA I inhibierte hierbei, durch die verminderte Genexpression von c-Met, die PD-L1-Zunahme in Relation zur siRNA II in größerem Ausmaß. Ursächlich könnten hierfür strukturelle Unterschiede der

beiden siRNAs sein und damit eine differente Wirkung auf die Degradation der c-Met-mRNA (CHANG et al., 2011).

Nach einer Beurteilung beider Versuche im Zusammenhang wird deutlich, dass Detroit562 offensichtlich stärker auf HGF anspricht als FaDu. Wie bereits beim Western Blot angedeutet, könnte hierfür die Herkunft dieser Tumorzelllinie aus Pharynx-Metastasen in der Pleura ursächlich sein. Da schon Fernmetastasen vorhanden waren, befand sich bei diesem Tumorpatienten das Karzinom folglich in fortgeschrittenem Stadium. Diese korrelieren häufig mit einer Überexpression von c-Met (DI RENZO et al., 2000; SZTURZ et al., 2017). Interessant ist auch, wie PD-L1 möglicherweise reguliert wird.

LI et al. (2016) beschrieben, dass die PD-L1-Expression in Mammakarzinom-Zellen durch N-Glykosylierung, sowie Ubiquitinierung mittels Phosphorylierung posttranslational moduliert wird. Sie zeigten zunächst, dass die sogenannte Glykogen-Synthase-Kinase-3 β (GSK3 β) PD-L1 bindet und durch Phosphorylierung dessen Proteasom-Abbau bewirkt. PD-L1 ist in Tumorzellen hauptsächlich N-glykosyliert (STANLEY, 2011; LI et al., 2016). Diese N-Glykosylierung wiederum führt laut detaillierteren Untersuchungen dazu, dass die Interaktion mit GSK3 β gehemmt und PD-L1 dadurch stabilisiert wird, sodass glykosyliertes PD-L1 vermindert degradiert wird. Für EGF, Ligand der EGFR-Tyrosinkinase, konnte zudem gezeigt werden, dass er durch die Inaktivierung der GSK3 β den PD-L1-Abbau hemmt (LI et al., 2016). Dieser Effekt wäre auch bei HGF, ebenfalls Ligand einer Tyrosinkinase, denkbar. Im Kontext mit einer arbeitsgruppeninternen Untersuchung (unveröffentlichte Ergebnisse), die bei hochreguliertem PD-L1 nach HGF-Stimulation keine Änderung auf mRNA-Ebene nachweisen konnte, wäre eine PD-L1-Regulation auf posttranslationaler Ebene durch die genannten Prozesse im verwendeten Kopf-Hals-Tumormodell denkbar und könnte untersucht werden.

Die in der vorliegenden Arbeit erbrachten Ergebnisse tragen zum besseren Verständnis der Funktion des Mikromilieus in der Tumorgenese bei und sprechen dafür, dass die HGF/c-Met-Achse vor dem Hintergrund aktueller immunonkologischer Forschung (bspw. Nivolumab, Pembrolizumab, u.a.m.) einen vielversprechenden Angriffspunkt darstellt.

Nivolumab greift direkt am PD-1-Rezeptor an, um die Inaktivierung der T-Zellen zu verhindern. In einer klinischen Phase III-Studie von FERRIS et al. (2016) wurden bei Kopf-Hals-Karzinom-Patienten mit Metastasen oder Rezidiven durch Immuntherapie mit Nivolumab, im direkten Vergleich mit einer Standard-Chemotherapie in Einzeldosen (Cetuximab, Methotrexat oder Docetaxel), bereits Erfolge erzielt: durch Nivolumab verlängerte sich die mittlere Lebenszeit im Vergleich zu Standardtherapie von 5,1 auf 7,5 Monate. Eine laufende Phase III-Studie mit einer Kombination aus Nivolumab und Radiatio in der adjuvanten Therapie ist vielversprechend (CLINICALTRIALS.GOV et al., NCT03349710).

Im Zusammenhang mit den hier erzielten Ergebnissen wäre nach Entwicklung eines funktionierenden Medikaments, dass den HGF/c-Met-Signalweg hemmt, eine Kombination mit einem PD-1-Antikörper wie Nivolumab denkbar.

4.4 Einfluss von HGF/c-Met auf den Glukose-Metabolismus in Kopf-Hals-Karzinomen

Das Ziel einer zweiten Untersuchung war es, mithilfe der Glykolyse-Messung am Seahorse-Gerät herauszufinden, wie HGF/c-Met den Glukose-Metabolismus im Tumormikromilieu von Kopf-Hals-Karzinomen beeinflusst.

Allgemein bekannt ist, dass aufgrund des Warburg-Effekts in Tumoren, die Glukose primär durch die aerobe Glykolyse metabolisiert wird und dies folglich zu stark erhöhter Glukoseaufnahme und damit auch zu gesteigerter Laktatansammlung führt (WARBURG et al., 1927; HALESTRAP et al., 1999).

Während für einige Wachstumsfaktoren, wie EGFR und IGF-I, bereits eine Warburg-Effekt fördernde Wirkung in zahlreichen Karzinomen, u.a. auch Kopf-Hals-Karzinomen, gezeigt wurde (BARRON et al., 2016; XU et al., 2017), konnte ein Zusammenhang zwischen HGF/c-Met und der Glykolyse in Tumoren, bisher nur im Mammakarzinom und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom nachgewiesen werden (KAPLAN et al., 2000; DE ROSA et al., 2015).

Im Rahmen der hier durchgeführten Versuche, konnte am Seahorse-Gerät gezeigt werden, dass eine HGF-Stimulation in den Kopf-Hals-Tumorzelllinien Detroit562 und FaDu zu einer gesteigerten Glykolyse führt. Die Hemmung mit dem c-Met-TKI PHA-665752 validierte dieses Ergebnis. Eine Blockierung der

Atmungskette mittels spezifischer Inhibitoren führte zu einem kompensatorischen Anstieg der Glykolyse, wobei die Unterschiede in der Glykolyse bestehen blieben. Dies bestätigte, dass der Einfluss von HGF tatsächlich auf die Glykolyse beschränkt ist. Die anschließende Hemmung der Glykolyse mit einem Glukoseanalogon sicherte wiederum, dass der kompensatorische Anstieg des H^+ -Ausstrom Glykolyse-bedingt war.

Wie anhand der aufgeführten Ergebnisse zu sehen ist, hat die Beurteilung des Glukosestoffwechsels mittels Seahorse gegenüber der bisher gängigen Laktatmessung den entscheidenden Vorteil, dass in Echtzeit analysiert werden kann, wie Glykolyse und Oxidative Phosphorylierung auf die Zugabe von Substrat bzw. Hemmstoffen reagieren und damit abgelesen werden kann, welche Substanzen Einfluss auf den Glukose-Metabolismus haben (AGILENTTECHNOLOGIES, 2017).

Die gezeigten Ergebnisse tragen zum besseren Verständnis des HGF/c-Met-Signalwegs und seiner Bedeutung im Mikromilieu von Kopf-Hals-Karzinomen bei. Denn obwohl schon seit einiger Zeit ein Zusammenhang zwischen verändertem Stoffwechsel und Tumorwachstum bekannt ist, existieren bisher für Kopf-Hals-Karzinome keine anwendbaren Medikamente, die auf den Stoffwechsel wirken (KUMAR et al., 2018). Die HGF/c-Met-Signalachse stellt somit einen weiteren Angriffspunkt für die Hemmung des Glukosestoffwechsels in Kopf-Hals-Karzinomen dar.

Die kürzlich veröffentlichte Studie von KUMAR et al. (2018) stellte ebenfalls einen Einfluss von HGF auf die Glykolyse in Kopf-Hals-Karzinomen fest und bekräftigt damit die in der vorliegenden Arbeit erlangten Erkenntnisse. Zudem gelang es Ihnen, eine direkte Verbindung zwischen Kopf-Hals-Tumorzellen und den Fibroblasten des Tumormikromilieus aufzuzeigen. Diese beeinflussen sich gegenseitig, indem die Fibroblasten HGF sezernieren, welches in Kopf-Hals-Tumorzellen zu einer Veränderung des Glukosemetabolismus führt und damit zur Tumor-Proliferation beiträgt. Die Tumorzellen schütten wiederum den sogenannten Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) aus, der die Fibroblasten-Proliferation fördert. Das durch die gesteigerte Glykolyse anfallende Laktat, wirkt auf die Fibroblasten besonders wachstumsfördernd (KUMAR et al., 2018).

Wie nun mehrfach erwähnt, führt die durch den Warburg-Effekt hochregulierte Glykolyse zu einer extrazellulären Laktatakkumulation. FISCHER et al. (2007) stellten bereits fest, dass der hohe Laktatlevel und der dadurch abfallende pH-Wert, für eine T-Zellaktivierung sorgen. Diese Erkenntnis wurde etwas später von GOETZE et al. (2011) erweitert, die nachweisen konnten, dass hohe Laktatmengen die Monozyten-Einwanderung, sowie die Ausschüttung der Zytokine Tumornekrosefaktor (TNF) und Interleukin-6 (IL-6), zwei wichtigen Molekülen der Immunabwehr, hemmen. Zusammenhängend betrachtet, schlagen diese Aussagen eine Brücke zwischen Glukosemetabolismus und Immunabwehr und bestärken damit die essentielle Rolle des Tumormikromilieus in Kopf-Hals-Karzinomen.

4.5 Fazit

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche legen dar, dass in den verwendeten Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinien eine HGF-Stimulation zu einer Hochregulation des Immun-Checkpoint-Protein PD-L1 und zu einer gesteigerten Glykolyse führt. Diese Ergebnisse tragen zum besseren Verständnis der molekular-onkologischen Mechanismen der Tumorgenese in Kopf-Hals-Karzinomen bei und sind somit interessant im Hinblick auf die Entwicklung neuer zielgerichteter Therapeutika, mit HGF/c-Met als Angriffspunkt. Diese, gegen HGF/c-Met gerichteten Medikamente, könnten eventuell in Kombination mit bisher getesteten Immuntherapeutika (z.B. Nivolumab) oder monoklonalen Antikörpern (z.B. Cetuximab) verabreicht werden, um deren Wirkung zu unterstützen (MADOZ-GURPIDE et al., 2015).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind auch insofern interessant, da die Stärke der HGF-abhängigen Effekte offenbar in Zusammenhang mit dem Expressionslevel von c-Met steht. Aus den Arbeiten von DI RENZO et al. (2000) und SZTURZ et al. (2017) ist bekannt, dass die c-Met-Expression in Metastasen höher ist als im Primärtumor. Dies ist klinisch relevant, da Patienten mit lokoregionären und/oder Fernmetastasen in aller Regel eine systemische Therapie erhalten. Eine Kombination aus Immuntherapie und gezielter Hemmung

der HGF/c-Met-Signalachse ist vor dem Hintergrund der genannten Erkenntnisse daher plausibel.

Auch wenn die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse vielversprechend sind, muss beachtet werden, dass es sich bei diesen ausschließlich um *in vitro*-Daten handelt.

In zukünftigen Versuchen sollten die Ergebnisse der Durchflusszytometrie im Western Blot überprüft werden. Mit dieser Methode könnte eine nach HGF-Stimulation erhöhte PD-L1-Expression auf der Zelloberfläche von Kopf-Hals-Tumorzellen ebenfalls nachgewiesen werden. In Tumorbiopsien könnte im weiteren Verlauf überprüft werden, ob eine HGF/c-Met-Überexpression mit einer erhöhten PD-L1-Expression korreliert. Nachdem außerdem erfolgreich gezeigt werden konnte, dass HGF in den verwendeten HNSCC-Zelllinien zu einer gesteigerten Glykolyse führt, muss nun geklärt werden, welche Enzyme an diesem Effekt beteiligt sind. Hierfür wäre ein Western Blot verschiedener Glykolyse-relevanter Proteine erwägenswert. Zudem könnte in einer Kokultur mit T-Zellen gezeigt werden, ob bei erhöhter Glykolyse die T-Zellen tatsächlich vermindert aktiviert werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Der HGF/c-Met-Signalweg wurde bereits seit vielen Jahren als ein wesentlicher Faktor in der Tumorgenese von Kopf-Hals-Karzinomen diskutiert. Allerdings lag der Fokus bisher nur auf den Tumorzellen selbst. In letzter Zeit wurde jedoch mehr über das umgebende Tumormikromilieu und seine bedeutende Rolle in der Tumorprogression bekannt. In anderen Tumormodellen wurde bereits gezeigt, dass der HGF/c-Met-Signalweg eine immunologische und metabolische Wirkung auf das Tumormikromilieu hat. Eine Signal-Aktivierung führte zu einer Zunahme des Immun-Checkpoint-Proteins PD-L1 auf der Tumorzelloberfläche. PD-L1 bewirkt wiederum eine Hemmung des Immunsystems, indem es die T-Zell-Aktivierung im Mikromilieu verhindert und somit die Tumorzellen nicht vom Immunsystem erkannt und beseitigt werden können.

Außerdem wurde gezeigt, dass HGF/c-Met eine Glykolyse-steigernde Wirkung auf Tumorzellen hat und durch die Energiezufuhr indirekt zu einer hohen Proliferationsrate beiträgt. Ein Nebeneffekt ist hier, dass das durch die hochregulierte Glykolyse anfallende Laktat im Tumormikromilieu akkumuliert und dadurch die T-Zellen der Immunabwehr zusätzlich schädigt.

Um auch den Einfluss von HGF/c-Met auf das Tumormikromilieu von Kopf-Hals-Karzinomen zu prüfen, wurden zwei etablierte Zelllinien (Detroit562 und FaDu), aus humanen Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region, für die Versuchsreihen in der vorliegenden Arbeit herangezogen.

Die Durchflusszytometrie ergab, dass nach HGF-Stimulation die Menge an PD-L1 auf der Zelloberfläche beider Tumorzelllinien im Vergleich zur unbehandelten Probe zunahm. Bei Detroit562 war die Zunahme signifikant. Als Kontrolle wurde zusätzlich mit zwei verschiedenen Hemmprinzipien (PHA-665752 und c-Met-siRNA) das HGF-Signal unterbunden. Zusammen konnte damit bestätigt werden, dass die Zunahme von PD-L1 durch die Zugabe von HGF ausgelöst wurde. Mit Hilfe eines Verfahrens zur Messung des Glykolyse-bedingten Protonenausstroms, konnte festgestellt werden, dass eine Behandlung mit HGF in Detroit562 und FaDu zu einer gesteigerten Glykolyse führt.

ZUSAMMENFASSUNG

Auffällig war, dass sowohl beim durchflusszytometrischen Nachweis von PD-L1, als auch bei der Messung der Glykolyse, nach HGF-Stimulation bei Detroit562 im Vergleich zu FaDu ein deutlich größerer Effekt zu sehen war. Ein Zusammenhang könnte darin bestehen, dass die Detroit562-Tumorzellen aus Metastasen stammen. Aus anderen Vorarbeiten ist bekannt, dass Metastasen eine höhere Expression des HGF-Rezeptors c-Met zeigen. Eine im Vergleich zu FaDu höhere c-Met-Expression in Detroit562 kann zu einem stärkeren HGF-Signal und damit zu einem stärkeren Effekt auf nachfolgende Prozesse führen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erweitern unser Verständnis bezüglich des HGF/c-Met-Signalwegs und zeigen, dass eine simultane Hemmung der PD-1/PD-L1-Achse und des HGF/c-Met-Signalwegs synergistische Effekte haben könnte.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Adelstein, D. J., Li, Y., Adams, G. L., Wagner, H., Jr., Kish, J. A., Ensley, J. F., et al. (2003). An intergroup phase III comparison of standard radiation therapy and two schedules of concurrent chemoradiotherapy in patients with unresectable squamous cell head and neck cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 21(1), 92-98. doi:10.1200/JCO.2003.01.008
- Agilent Technologies. (2017). *Agilent Seahorse XF Glycolytic Rate Assay User Manual (PDF); User GuideKit 103344-100*. Retrieved from Santa Clara, Kalifornien, USA: <https://www.agilent.com/search/?Ntt=Agilent%20Seahorse%20XF%20Glycolytic%20Rate%20Assay%20Kit&redirect=0> (Access Date: 06.11.2018). 24pp.
- Arnold, L., Enders, J., & Thomas, S. M. (2017). Activated HGF-c-Met Axis in Head and Neck Cancer. *Cancers (Basel)*, 9(12). doi:10.3390/cancers9120169
- ATCC (2018). Head and Neck Cancer Panel (ATCC® TCP-1012™). Retrieved from: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/Cells_and_Microorganisms/Cell_Lines/Human/Tumor_Cell_Panels/Panels_by_Tissue_Type/Head_and_Neck_Cancer_Cell_Panel/TCP-1012.aspx#generalinformation (Access Date: 11.03.2018).
- Balan, M., Mier y Teran, E., Waaga-Gasser, A. M., Gasser, M., Choueiri, T. K., Freeman, G., et al. (2015). Novel roles of c-Met in the survival of renal cancer cells through the regulation of HO-1 and PD-L1 expression. *J Biol Chem*, 290(13), 8110-8120. doi:10.1074/jbc.M114.612689
- Barron, C. C., Bilan, P. J., Tsakiridis, T., & Tsiani, E. (2016). Facilitative glucose transporters: Implications for cancer detection, prognosis and treatment. *Metabolism*, 65(2), 124-139. doi:10.1016/j.metabol.2015.10.007
- Barthel, A., Okino, S. T., Liao, J., Nakatani, K., Li, J., Whitlock, J. P., Jr., et al. (1999). Regulation of GLUT1 gene transcription by the serine/threonine kinase Akt1. *J Biol Chem*, 274(29), 20281-20286.
- Birchmeier, C., Birchmeier, W., Gherardi, E., & Vande Woude, G. F. (2003). Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(12), 915-925. doi:10.1038/nrm1261
- Blank, C., Gajewski, T. F., & Mackensen, A. (2005). Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*, 54(4), 307-314. doi:10.1007/s00262-004-0593-x
- Bonner, J. A., Harari, P. M., Giralt, J., Cohen, R. B., Jones, C. U., Sur, R. K., et al. (2010). Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *Lancet Oncol*, 11(1), 21-28. doi:10.1016/S1470-2045(09)70311-0

- Bottaro, D. P., Rubin, J. S., Faletto, D. L., Chan, A. M., Kmieciak, T. E., Vande Woude, G. F., et al. (1991). Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science*, 251(4995), 802-804.
- Brand, T. M., Iida, M., & Wheeler, D. L. (2011). Molecular mechanisms of resistance to the EGFR monoclonal antibody cetuximab. *Cancer Biol Ther*, 11(9), 777-792.
- Cairns, R. A., Harris, I. S., & Mak, T. W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer*, 11(2), 85-95. doi:10.1038/nrc2981
- Chang, C. I., Kim, H. A., Dua, P., Kim, S., Li, C. J., & Lee, D. K. (2011). Structural diversity repertoire of gene silencing small interfering RNAs. *Nucleic Acid Ther*, 21(3), 125-131. doi:10.1089/nat.2011.0286
- Chen, L., & Flies, D. B. (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol*, 13(4), 227-242. doi:10.1038/nri3405
- Chmielowiec, J., Borowiak, M., Morkel, M., Stradal, T., Munz, B., Werner, S., et al. (2007). c-Met is essential for wound healing in the skin. *J Cell Biol*, 177(1), 151-162. doi:10.1083/jcb.200701086
- Christensen, J. G., Schreck, R., Burrows, J., Kuruganti, P., Chan, E., Le, P., et al. (2003). A selective small molecule inhibitor of c-Met kinase inhibits c-Met-dependent phenotypes in vitro and exhibits cytoreductive antitumor activity in vivo. *Cancer Res*, 63(21), 7345-7355.
- ClinicalTrials.gov, & Squibb, B.-M. (NCT03349710, 07.09.2018). A Randomized, Double-blind, Placebo-controlled, Phase 3 Study of Nivolumab or Nivolumab Plus Cisplatin, in Combination With Radiotherapy in Participants With Cisplatin Ineligible and Cisplatin Eligible Locally Advanced Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck (SCCHN). Retrieved from <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03349710?cond=HNSCC+nivolumab+radiation&rank=2> (Access Date: 12.09.2018).
- Cooper, J. S., Pajak, T. F., Forastiere, A. A., Jacobs, J., Campbell, B. H., Saxman, S. B., et al. (2004). Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*, 350(19), 1937-1944. doi:10.1056/NEJMoa032646
- Davis, M. I., Hunt, J. P., Herrgard, S., Ciceri, P., Wodicka, L. M., Pallares, G., et al. (2011). Comprehensive analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat Biotechnol*, 29(11), 1046-1051. doi:10.1038/nbt.1990
- De Rosa, V., Iommelli, F., Monti, M., Fonti, R., Votta, G., Stoppelli, M. P., et al. (2015). Reversal of Warburg Effect and Reactivation of Oxidative Phosphorylation by Differential Inhibition of EGFR Signaling Pathways in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*, 21(22), 5110-5120. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-0375
- De Zinis, L. O., Bolzoni, A., Piazza, C., & Nicolai, P. (2006). Prevalence and localization of nodal metastases in squamous cell carcinoma of the oral

- cavity: role and extension of neck dissection. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 263(12), 1131-1135. doi:10.1007/s00405-006-0128-5
- Denis, F., Garaud, P., Bardet, E., Alfonsi, M., Sire, C., Germain, T., et al. (2004). Final results of the 94-01 French Head and Neck Oncology and Radiotherapy Group randomized trial comparing radiotherapy alone with concomitant radiochemotherapy in advanced-stage oropharynx carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 22(1), 69-76. doi:10.1200/JCO.2004.08.021
- DGMKG et al., (2012). <007_100OL_mundhohlenkarzinom_kurz_11-2012.pdf> AWMF-Register-Nummer 007-100OL. Retrieved from <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/007-100OL.html> (Access Date: 06.11.2018), 38pp.
- Di Renzo, M. F., Olivero, M., Martone, T., Maffe, A., Maggiora, P., Stefani, A. D., et al. (2000). Somatic mutations of the MET oncogene are selected during metastatic spread of human HNSC carcinomas. *Oncogene*, 19(12), 1547-1555. doi:10.1038/sj.onc.1203455
- Elf, S. E., & Chen, J. (2014). Targeting glucose metabolism in patients with cancer. *Cancer*, 120(6), 774-780. doi:10.1002/cncr.28501
- Enninga, E. A. L., Harrington, S. M., Creedon, D. J., Ruano, R., Markovic, S. N., Dong, H., et al. (2018). Immune checkpoint molecules soluble program death ligand 1 and galectin-9 are increased in pregnancy. *Am J Reprod Immunol*, 79(2). doi:10.1111/aji.12795
- Fehlner-Gardiner, C. C., Cao, H., Jackson-Boeters, L., Nakamura, T., Elliott, B. E., Uniyal, S., et al. (1999). Characterization of a functional relationship between hepatocyte growth factor and mouse bone marrow-derived mast cells. *Differentiation*, 65(1), 27-42. doi:10.1046/j.1432-0436.1999.6510027.x
- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. (2013). GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet], Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Retrieved from <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 25.04.2018
- Ferracini, R., Longati, P., Naldini, L., Vigna, E., & Comoglio, P. M. (1991). Identification of the major autophosphorylation site of the Met/hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem*, 266(29), 19558-19564.
- Ferris, R. L., Blumenschein, G., Jr., Fayette, J., Guigay, J., Colevas, A. D., Licitra, L., et al. (2016). Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med*, 375(19), 1856-1867. doi:10.1056/NEJMoa1602252
- Fischer, K., Hoffmann, P., Voelkl, S., Meidenbauer, N., Ammer, J., Edinger, M., et al. (2007). Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood*, 109(9), 3812-3819. doi:10.1182/blood-2006-07-035972

- Flick, D. A., & Gifford, G. E. (1984). Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. *J Immunol Methods*, *68*(1-2), 167-175.
- Forastiere, A., Koch, W., Trotti, A., & Sidransky, D. (2001). Head and neck cancer. *N Engl J Med*, *345*(26), 1890-1900. doi:10.1056/NEJMra001375
- Fujita, J., Kraus, M. H., Onoue, H., Srivastava, S. K., Ebi, Y., Kitamura, Y., et al. (1988). Activated H-ras oncogenes in human kidney tumors. *Cancer Res*, *48*(18), 5251-5255.
- Furge, K. A., Zhang, Y. W., & Vande Woude, G. F. (2000). Met receptor tyrosine kinase: enhanced signaling through adapter proteins. *Oncogene*, *19*(49), 5582-5589. doi:10.1038/sj.onc.1203859
- Furlong, R. A., Takehara, T., Taylor, W. G., Nakamura, T., & Rubin, J. S. (1991). Comparison of biological and immunochemical properties indicates that scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable. *J Cell Sci*, *100* (Pt 1), 173-177.
- Gallo, S., Sala, V., Gatti, S., & Crepaldi, T. (2015). Cellular and molecular mechanisms of HGF/Met in the cardiovascular system. *Clin Sci (Lond)*, *129*(12), 1173-1193. doi:10.1042/CS20150502
- Garavello, W., Bertuccio, P., Levi, F., Lucchini, F., Bosetti, C., Malvezzi, M., et al. (2010). The oral cancer epidemic in central and eastern Europe. *Int J Cancer*, *127*(1), 160-171. doi:10.1002/ijc.25019
- Gherardi, E., Sandin, S., Petoukhov, M. V., Finch, J., Youles, M. E., Ofverstedt, L. G., et al. (2006). Structural basis of hepatocyte growth factor/scatter factor and MET signalling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(11), 4046-4051. doi:10.1073/pnas.0509040103
- Giebeler, A., Boekschoten, M. V., Klein, C., Borowiak, M., Birchmeier, C., Gassler, N., et al. (2009). c-Met confers protection against chronic liver tissue damage and fibrosis progression after bile duct ligation in mice. *Gastroenterology*, *137*(1), 297-308, 308 e291-294. doi:10.1053/j.gastro.2009.01.068
- Giordano, S., Ponzetto, C., Di Renzo, M. F., Cooper, C. S., & Comoglio, P. M. (1989). Tyrosine kinase receptor indistinguishable from the c-met protein. *Nature*, *339*(6220), 155-156. doi:10.1038/339155a0
- Goetze, K., Walenta, S., Ksiazkiewicz, M., Kunz-Schughart, L. A., & Mueller-Klieser, W. (2011). Lactate enhances motility of tumor cells and inhibits monocyte migration and cytokine release. *Int J Oncol*, *39*(2), 453-463. doi:10.3892/ijo.2011.1055
- Goldenberg, D., Lee, J., Koch, W. M., Kim, M. M., Trink, B., Sidransky, D., et al. (2004). Habitual risk factors for head and neck cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg*, *131*(6), 986-993. doi:10.1016/j.otohns.2004.02.035
- Grandis, J. R., & Tweardy, D. J. (1993). Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are

- early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res*, 53(15), 3579-3584.
- Halestrap, A. P., & Price, N. T. (1999). The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J*, 343 Pt 2, 281-299.
- Hartmann, S., Bhola, N. E., & Grandis, J. R. (2016). HGF/Met Signaling in Head and Neck Cancer: Impact on the Tumor Microenvironment. *Clin Cancer Res*, 22(16), 4005-4013. doi:10.1158/1078-0432.ccr-16-0951
- Hashibe, M., Brennan, P., Benhamou, S., Castellsague, X., Chen, C., Curado, M. P., et al. (2007). Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J Natl Cancer Inst*, 99(10), 777-789. doi:10.1093/jnci/djk179
- Hashibe, M., Brennan, P., Chuang, S. C., Boccia, S., Castellsague, X., Chen, C., et al. (2009). Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 18(2), 541-550. doi:10.1158/1055-9965.EPI-08-0347
- Hsieh, A. C., & Moasser, M. M. (2007). Targeting HER proteins in cancer therapy and the role of the non-target HER3. *Br J Cancer*, 97(4), 453-457. doi:10.1038/sj.bjc.6603910
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Murray, T., et al. (2008). Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*, 58(2), 71-96. doi:10.3322/CA.2007.0010
- Jeon, S., Rowe, A. M., Carroll, K. L., Harvey, S. A. K., & Hendricks, R. L. (2018). PD-L1/B7-H1 Inhibits Viral Clearance by Macrophages in HSV-1-Infected Corneas. *J Immunol*, 200(11), 3711-3719. doi:10.4049/jimmunol.1700417
- Kaplan, O., Firon, M., Vivi, A., Navon, G., & Tsarfaty, I. (2000). HGF/SF activates glycolysis and oxidative phosphorylation in DA3 murine mammary cancer cells. *Neoplasia*, 2(4), 365-377.
- Kataoka, H., Miyata, S., Uchinokura, S., & Itoh, H. (2003). Roles of hepatocyte growth factor (HGF) activator and HGF activator inhibitor in the pericellular activation of HGF/scatter factor. *Cancer Metastasis Rev*, 22(2-3), 223-236.
- Keir, M. E., Butte, M. J., Freeman, G. J., & Sharpe, A. H. (2008). PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*, 26, 677-704. doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331
- Knowles, L. M., Stabile, L. P., Egloff, A. M., Rothstein, M. E., Thomas, S. M., Gubish, C. T., et al. (2009). HGF and c-Met participate in paracrine tumorigenic pathways in head and neck squamous cell cancer. *Clin Cancer Res*, 15(11), 3740-3750. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-3252

- Koschut, D., Richert, L., Pace, G., Niemann, H. H., Mely, Y., & Orian-Rousseau, V. (2016). Live cell imaging shows hepatocyte growth factor-induced Met dimerization. *Biochim Biophys Acta*, 1863(7 Pt A), 1552-1558. doi:10.1016/j.bbamcr.2016.04.015
- Kozakiewicz, P., & Grzybowska-Szatowska, L. (2018). Application of molecular targeted therapies in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Lett*, 15(5), 7497-7505. doi:10.3892/ol.2018.8300
- Kumar, D., New, J., Vishwakarma, V., Joshi, R., Enders, J., Lin, F., et al. (2018). Cancer-Associated Fibroblasts Drive Glycolysis in a Targetable Signaling Loop Implicated in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Progression. *Cancer Res*, 78(14), 3769-3782. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-1076
- Lamont, E. B., & Vokes, E. E. (2001). Chemotherapy in the management of squamous-cell carcinoma of the head and neck. *Lancet Oncol*, 2(5), 261-269. doi:10.1016/S1470-2045(00)00320-X
- Langendijk, J. A., Doornaert, P., Verdonck-de Leeuw, I. M., Leemans, C. R., Aaronson, N. K., & Slotman, B. J. (2008). Impact of late treatment-related toxicity on quality of life among patients with head and neck cancer treated with radiotherapy. *Journal of Clinical Oncology*, 26(22), 3770-3776. doi:10.1200/JCO.2007.14.6647
- Lewis, A., Kang, R., Levine, A., & Maghami, E. (2015). The New Face of Head and Neck Cancer: The HPV Epidemic. *Oncology (Williston Park)*, 29(9), 616-626.
- Li, C. W., Lim, S. O., Xia, W., Lee, H. H., Chan, L. C., Kuo, C. W., et al. (2016). Glycosylation and stabilization of programmed death ligand-1 suppresses T-cell activity. *Nat Commun*, 7, 12632. doi:10.1038/ncomms12632
- Licitra, L., Grandi, C., Guzzo, M., Mariani, L., Lo Vullo, S., Valvo, F., et al. (2003). Primary chemotherapy in resectable oral cavity squamous cell cancer: a randomized controlled trial. *Journal of Clinical Oncology*, 21(2), 327-333. doi:10.1200/JCO.2003.06.146
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1), 265-275.
- Ma, H., Saenko, M., Opuko, A., Togawa, A., Soda, K., Marlier, A., et al. (2009). Deletion of the Met receptor in the collecting duct decreases renal repair following ureteral obstruction. *Kidney Int*, 76(8), 868-876. doi:10.1038/ki.2009.304
- Maasland, D. H., van den Brandt, P. A., Kremer, B., Goldbohm, R. A., & Schouten, L. J. (2014). Alcohol consumption, cigarette smoking and the risk of subtypes of head-neck cancer: results from the Netherlands Cohort Study. *BMC Cancer*, 14, 187. doi:10.1186/1471-2407-14-187

- Madoz-Gurpide, J., Zazo, S., Chamizo, C., Casado, V., Carames, C., Gavin, E., et al. (2015). Activation of MET pathway predicts poor outcome to cetuximab in patients with recurrent or metastatic head and neck cancer. *J Transl Med*, 13, 282. doi:10.1186/s12967-015-0633-7
- Mahon, P. B., Payne, J. L., MacKinnon, D. F., Mondimore, F. M., Goes, F. S., Schweizer, B., et al. (2009). Genome-wide linkage and follow-up association study of postpartum mood symptoms. *Am J Psychiatry*, 166(11), 1229-1237. doi:10.1176/appi.ajp.2009.09030417
- Manning, B. D., & Cantley, L. C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, 129(7), 1261-1274. doi:10.1016/j.cell.2007.06.009
- Marur, S., & Forastiere, A. A. (2008). Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment. *Mayo Clin Proc*, 83(4), 489-501. doi:10.4065/83.4.489
- Marur, S., & Forastiere, A. A. (2016). Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clin Proc*, 91(3), 386-396. doi:10.1016/j.mayocp.2015.12.017
- Matsumoto, K., Kataoka, H., Date, K., & Nakamura, T. (1998). Cooperative interaction between alpha- and beta-chains of hepatocyte growth factor on c-Met receptor confers ligand-induced receptor tyrosine phosphorylation and multiple biological responses. *J Biol Chem*, 273(36), 22913-22920.
- Miyazawa, K. (2010). Hepatocyte growth factor activator (HGFA): a serine protease that links tissue injury to activation of hepatocyte growth factor. *FEBS J*, 277(10), 2208-2214. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07637.x
- Miyazawa, K., Shimomura, T., Kitamura, A., Kondo, J., Morimoto, Y., & Kitamura, N. (1993). Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for a human serine protease responsible for activation of hepatocyte growth factor. Structural similarity of the protease precursor to blood coagulation factor XII. *J Biol Chem*, 268(14), 10024-10028.
- Mizumoto, A., Ohashi, S., Hirohashi, K., Amanuma, Y., Matsuda, T., & Muto, M. (2017). Molecular Mechanisms of Acetaldehyde-Mediated Carcinogenesis in Squamous Epithelium. *Int J Mol Sci*, 18(9). doi:10.3390/ijms18091943
- Morello, S., Olivero, M., Aimetti, M., Bernardi, M., Berrone, S., Di Renzo, M. F., et al. (2001). MET receptor is overexpressed but not mutated in oral squamous cell carcinomas. *J Cell Physiol*, 189(3), 285-290. doi:10.1002/jcp.10010
- Mueller, T., Braun, M., Dietrich, D., Aktekin, S., Hoft, S., Kristiansen, G., et al. (2017). PD-L1: a novel prognostic biomarker in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, 8(32), 52889-52900. doi:10.18632/oncotarget.17547
- Naka, D., Ishii, T., Yoshiyama, Y., Miyazawa, K., Hara, H., Hishida, T., et al. (1992). Activation of hepatocyte growth factor by proteolytic conversion of a single chain form to a heterodimer. *J Biol Chem*, 267(28), 20114-20119.

- Naldini, L., Vigna, E., Narsimhan, R. P., Gaudino, G., Zarnegar, R., Michalopoulos, G. K., et al. (1991). Hepatocyte growth factor (HGF) stimulates the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by the proto-oncogene c-MET. *Oncogene*, 6(4), 501-504.
- Natali, P. G., Prat, M., Nicotra, M. R., Bigotti, A., Olivero, M., Comoglio, P. M., et al. (1996). Overexpression of the met/HGF receptor in renal cell carcinomas. *Int J Cancer*, 69(3), 212-217. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19960621)69:3<212::AID-IJC11>3.0.CO;2-9
- Natan, S., Tsarfaty, G., Horev, J., Haklai, R., Kloog, Y., & Tsarfaty, I. (2014). Interplay Between HGF/SF-Met-Ras Signaling, Tumor Metabolism and Blood Flow as a Potential Target for Breast Cancer Therapy. *Oncoscience*, 1(1), 30-38.
- National-Cancer-Institute. (2018a, 24.05.2018). Immunotherapy to treat cancer. Retrieved from <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/immunotherapy> (Access Date: 08.08.2018).
- National-Cancer-Institute. (2018b, 26.07.2018). Targeted Cancer Therapies. Retrieved from <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/targeted-therapies/targeted-therapies-fact-sheet> (Access Date: 08.08.2018)
- Ndiaye, C., Mena, M., Alemany, L., Arbyn, M., Castellsague, X., Laporte, L., et al. (2014). HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol*, 15(12), 1319-1331. doi:10.1016/S1470-2045(14)70471-1
- Park, M., Dean, M., Kaul, K., Braun, M. J., Gonda, M. A., & Vande Woude, G. (1987). Sequence of MET protooncogene cDNA has features characteristic of the tyrosine kinase family of growth-factor receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(18), 6379-6383.
- Pedersen, P. L. (2007). Warburg, me and Hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers' most common phenotypes, the "Warburg Effect", i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen. *J Bioenerg Biomembr*, 39(3), 211-222. doi:10.1007/s10863-007-9094-x
- Pezzuto, F., Buonaguro, L., Caponigro, F., Ionna, F., Starita, N., Annunziata, C., et al. (2015). Update on Head and Neck Cancer: Current Knowledge on Epidemiology, Risk Factors, Molecular Features and Novel Therapies. *Oncology*, 89(3), 125-136. doi:10.1159/000381717
- Ponzetto, C., Bardelli, A., Maina, F., Longati, P., Panayotou, G., Dhand, R., et al. (1993). A novel recognition motif for phosphatidylinositol 3-kinase binding mediates its association with the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor. *Mol Cell Biol*, 13(8), 4600-4608.
- Rivelli, T. G., Mak, M. P., Martins, R. E., da Costa e Silva, V. T., & de Castro, G., Jr. (2015). Cisplatin based chemoradiation late toxicities in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Discov Med*, 20(108), 57-66.

- Roccisana, J., Reddy, V., Vasavada, R. C., Gonzalez-Pertusa, J. A., Magnuson, M. A., & Garcia-Ocana, A. (2005). Targeted inactivation of hepatocyte growth factor receptor c-met in beta-cells leads to defective insulin secretion and GLUT-2 downregulation without alteration of beta-cell mass. *Diabetes*, *54*(7), 2090-2102.
- Rolfes, V., Idel, C., Pries, R., Plotze-Martin, K., Habermann, J., Gemoll, T., et al. (2018). PD-L1 is expressed on human platelets and is affected by immune checkpoint therapy. *Oncotarget*, *9*(44), 27460-27470. doi:10.18632/oncotarget.25446
- Ruco, L. P., Ranalli, T., Marzullo, A., Bianco, P., Prat, M., Comoglio, P. M., et al. (1996). Expression of Met protein in thyroid tumours. *J Pathol*, *180*(3), 266-270. doi:10.1002/(SICI)1096-9896(199611)180:3<266::AID-PATH658>3.0.CO;2-Q
- Sandulache, V. C., Ow, T. J., Pickering, C. R., Frederick, M. J., Zhou, G., Fokt, I., et al. (2011). Glucose, not glutamine, is the dominant energy source required for proliferation and survival of head and neck squamous carcinoma cells. *Cancer*, *117*(13), 2926-2938. doi:10.1002/cncr.25868
- Schmidt, C., Bladt, F., Goedecke, S., Brinkmann, V., Zschiesche, W., Sharpe, M., et al. (1995). Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature*, *373*(6516), 699-702. doi:10.1038/373699a0
- Seiwert, T. Y., & Cohen, E. E. (2005). State-of-the-art management of locally advanced head and neck cancer. *Br J Cancer*, *92*(8), 1341-1348. doi:10.1038/sj.bjc.6602510
- Seiwert, T. Y., Jagadeeswaran, R., Faoro, L., Janamanchi, V., Nallasura, V., El Dinali, M., et al. (2009). The MET receptor tyrosine kinase is a potential novel therapeutic target for head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*, *69*(7), 3021-3031. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2881
- Shima, N., Nagao, M., Ogaki, F., Tsuda, E., Murakami, A., & Higashio, K. (1991). Tumor cytotoxic factor/hepatocyte growth factor from human fibroblasts: cloning of its cDNA, purification and characterization of recombinant protein. *Biochem Biophys Res Commun*, *180*(2), 1151-1158.
- Shimomura, T., Ochiai, M., Kondo, J., & Morimoto, Y. (1992). A novel protease obtained from FBS-containing culture supernatant, that processes single chain form hepatocyte growth factor to two chain form in serum-free culture. *Cytotechnology*, *8*(3), 219-229.
- Shin, D. M., Khuri, F. R., Glisson, B. S., Ginsberg, L., Papadimitrakopoulou, V. M., Clayman, G., et al. (2001). Phase II study of paclitaxel, ifosfamide, and carboplatin in patients with recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer*, *91*(7), 1316-1323.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2018). Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*, *68*(1), 7-30. doi:10.3322/caac.21442

- Spill, F., Reynolds, D. S., Kamm, R. D., & Zaman, M. H. (2016). Impact of the physical microenvironment on tumor progression and metastasis. *Curr Opin Biotechnol*, *40*, 41-48. doi:10.1016/j.copbio.2016.02.007
- Stabile, L. P., He, G., Lui, V. W., Thomas, S., Henry, C., Gubish, C. T., et al. (2013). c-Src activation mediates erlotinib resistance in head and neck cancer by stimulating c-Met. *Clin Cancer Res*, *19*(2), 380-392. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-1555
- Stanley, P. (2011). Golgi glycosylation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *3*(4). doi:10.1101/cshperspect.a005199
- Stoker, M., Gherardi, E., Perryman, M., & Gray, J. (1987). Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature*, *327*(6119), 239-242. doi:10.1038/327239a0
- Streit, A., Stern, C. D., They, C., Ireland, G. W., Aparicio, S., Sharpe, M. J., et al. (1995). A role for HGF/SF in neural induction and its expression in Hensen's node during gastrulation. *Development*, *121*(3), 813-824.
- Sulpice, E., Ding, S., Muscatelli-Groux, B., Berge, M., Han, Z. C., Plouet, J., et al. (2009). Cross-talk between the VEGF-A and HGF signalling pathways in endothelial cells. *Biol Cell*, *101*(9), 525-539. doi:10.1042/BC20080221
- Szturz, P., Raymond, E., Abitbol, C., Albert, S., de Gramont, A., & Faivre, S. (2017). Understanding c-MET signalling in squamous cell carcinoma of the head & neck. *Crit Rev Oncol Hematol*, *111*, 39-51. doi:10.1016/j.critrevonc.2017.01.004
- Takami, Y., Kanasaki, K., Tsubouchi, H., Ishii, T., Yamamoto, I., & Gohda, E. (2004). Inhibition of hepatocyte growth factor induction in human dermal fibroblasts by interleukin-1 and its prevention by interferon-gamma. *Biochem Biophys Res Commun*, *325*(3), 676-682. doi:10.1016/j.bbrc.2004.10.093
- Tapper, J., Kettunen, E., El-Rifai, W., Seppala, M., Andersson, L. C., & Knuutila, S. (2001). Changes in gene expression during progression of ovarian carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*, *128*(1), 1-6.
- Tashiro, K., Hagiya, M., Nishizawa, T., Seki, T., Shimonishi, M., Shimizu, S., et al. (1990). Deduced primary structure of rat hepatocyte growth factor and expression of the mRNA in rat tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *87*(8), 3200-3204.
- Taube, J. M., Klein, A., Brahmer, J. R., Xu, H., Pan, X., Kim, J. H., et al. (2014). Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clin Cancer Res*, *20*(19), 5064-5074. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-3271
- Tepper, S. R., Zuo, Z., Khattri, A., Hess, J., & Seiwert, T. Y. (2016). Growth factor expression mediates resistance to EGFR inhibitors in head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*, *56*, 62-70. doi:10.1016/j.oraloncology.2016.03.008

- Thiele, O. C., Seeberger, R., Flechtenmacher, C., Hofele, C., & Freier, K. (2012). The role of elective supraomohyoidal neck dissection in the treatment of early, node-negative oral squamous cell carcinoma (OSCC): a retrospective analysis of 122 cases. *J Craniomaxillofac Surg*, 40(1), 67-70. doi:10.1016/j.jcms.2011.02.001
- Trusolino, L., Bertotti, A., & Comoglio, P. M. (2010). MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(12), 834-848. doi:10.1038/nrm3012
- Vermorken, J. B., Herbst, R. S., Leon, X., Amellal, N., & Baselga, J. (2008). Overview of the efficacy of cetuximab in recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck in patients who previously failed platinum-based therapies. *Cancer*, 112(12), 2710-2719. doi:10.1002/cncr.23442
- Vermorken, J. B., Mesia, R., Rivera, F., Remenar, E., Kawecki, A., Rottey, S., et al. (2008). Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med*, 359(11), 1116-1127. doi:10.1056/NEJMoa0802656
- Vlacich, G., Spratt, D. E., Diaz, R., Phillips, J. G., Crass, J., Li, C. I., et al. (2014). Dose to the inferior pharyngeal constrictor predicts prolonged gastrostomy tube dependence with concurrent intensity-modulated radiation therapy and chemotherapy for locally-advanced head and neck cancer. *Radiother Oncol*, 110(3), 435-440. doi:10.1016/j.radonc.2013.12.007
- Wang, M., Zhao, J., Zhang, L., Wei, F., Lian, Y., Wu, Y., et al. (2017). Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *J Cancer*, 8(5), 761-773. doi:10.7150/jca.17648
- Warburg, O. (1956). On respiratory impairment in cancer cells. *Science*, 124(3215), 269-270.
- Warburg, O., Wind, F., & Negelein, E. (1927). The Metabolism of Tumors in the Body. *J Gen Physiol*, 8(6), 519-530.
- Webster, M. T., & Fan, C. M. (2013). c-MET regulates myoblast motility and myocyte fusion during adult skeletal muscle regeneration. *PLoS One*, 8(11), e81757. doi:10.1371/journal.pone.0081757
- Weidner, K. M., Di Cesare, S., Sachs, M., Brinkmann, V., Behrens, J., & Birchmeier, W. (1996). Interaction between Gab1 and the c-Met receptor tyrosine kinase is responsible for epithelial morphogenesis. *Nature*, 384(6605), 173-176. doi:10.1038/384173a0
- Wheeler, D. L., Huang, S., Kruser, T. J., Nechrebecki, M. M., Armstrong, E. A., Benavente, S., et al. (2008). Mechanisms of acquired resistance to cetuximab: role of HER (ErbB) family members. *Oncogene*, 27(28), 3944-3956. doi:10.1038/onc.2008.19

- Wickramasinghe, D., & Kong-Beltran, M. (2005). Met activation and receptor dimerization in cancer: a role for the Sema domain. *Cell Cycle*, 4(5), 683-685. doi:10.4161/cc.4.5.1688
- Wong, K. K., Engelman, J. A., & Cantley, L. C. (2010). Targeting the PI3K signaling pathway in cancer. *Curr Opin Genet Dev*, 20(1), 87-90. doi:10.1016/j.gde.2009.11.002
- Xing, Y., Zhang, J., Lin, H., Gold, K. A., Sturgis, E. M., Garden, A. S., et al. (2016). Relation between the level of lymph node metastasis and survival in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer*, 122(4), 534-545. doi:10.1002/cncr.29780
- Xu, Q., Zhang, Q., Ishida, Y., Hajjar, S., Tang, X., Shi, H., et al. (2017). EGF induces epithelial-mesenchymal transition and cancer stem-like cell properties in human oral cancer cells via promoting Warburg effect. *Oncotarget*, 8(6), 9557-9571. doi:10.18632/oncotarget.13771
- Yun, J., Rago, C., Cheong, I., Pagliarini, R., Angenendt, P., Rajagopalan, H., et al. (2009). Glucose deprivation contributes to the development of KRAS pathway mutations in tumor cells. *Science*, 325(5947), 1555-1559. doi:10.1126/science.1174229
- Zhang, D., Li, J., Wang, F., Hu, J., Wang, S., & Sun, Y. (2014). 2-Deoxy-D-glucose targeting of glucose metabolism in cancer cells as a potential therapy. *Cancer Lett*, 355(2), 176-183. doi:10.1016/j.canlet.2014.09.003
- Zhao, L., Wu, Y., Xie, X. D., Chu, Y. F., Li, J. Q., & Zheng, L. (2015). c-Met identifies a population of matrix metalloproteinase 9-producing monocytes in peritumoural stroma of hepatocellular carcinoma. *J Pathol*, 237(3), 319-329. doi:10.1002/path.4578
- Zhen, Z., Giordano, S., Longati, P., Medico, E., Campiglio, M., & Comoglio, P. M. (1994). Structural and functional domains critical for constitutive activation of the HGF-receptor (Met). *Oncogene*, 9(6), 1691-1697.

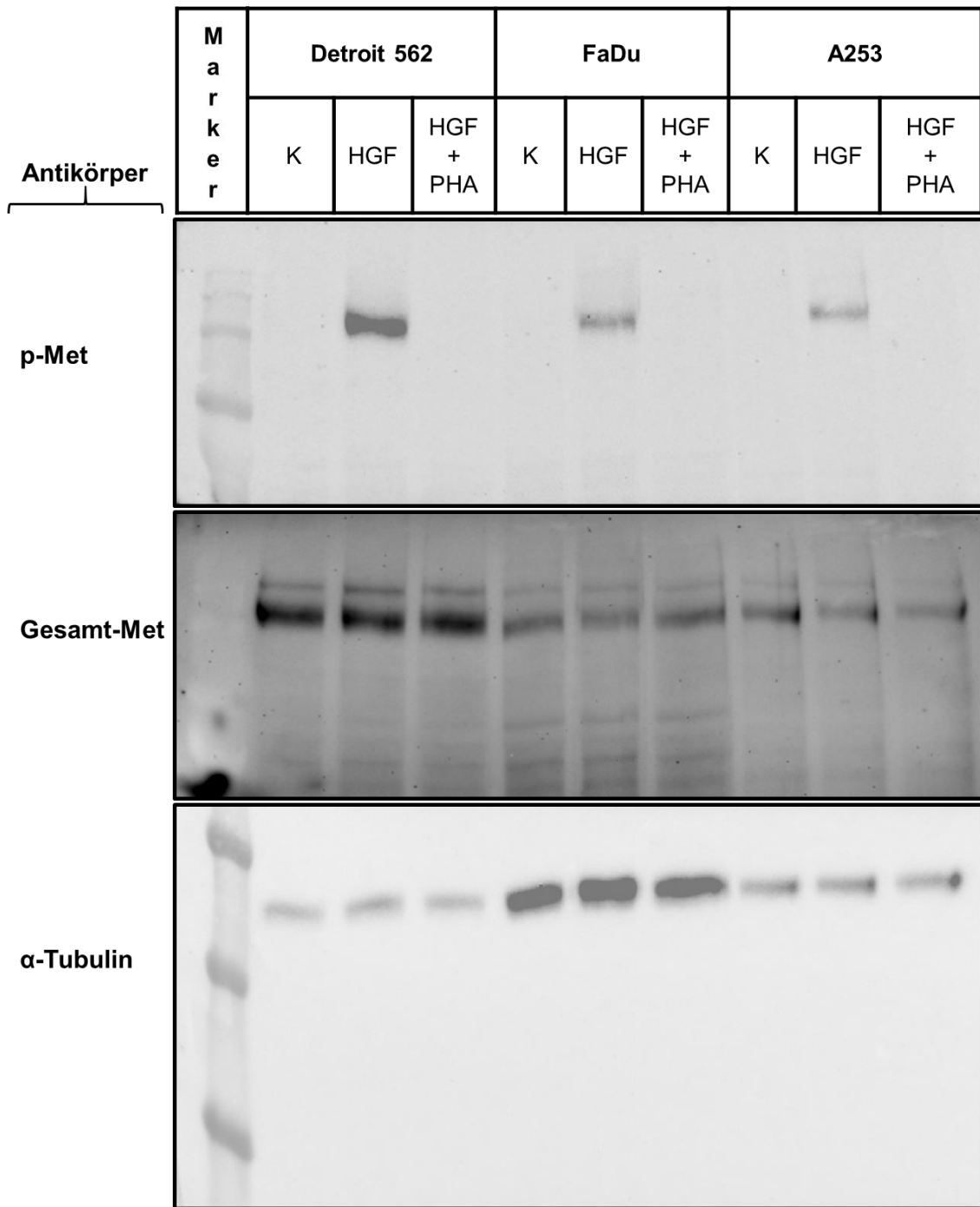
ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1	Aufbau des c-Met-Rezeptors und seinem Liganden HGF	9
Abb. 2	Der HGF/c-Met-Signalweg in Tumoren im Allgemeinen	12
Abb. 3	Interaktion von PD-L1 und PD-1 hemmt die T-Zell-Aktivierung	13
Abb. 4	Einfluss von HGF/c-Met auf den Glukosemetabolismus in Tumorzellen.....	16
Abb. 5	Color Prestained Protein Standard, 11-245 kDa	31
Abb. 6	Extrazelluläre Ansammlung von H ⁺ durch Glykolyse und mitochondriale Atmungskette	36
Abb. 7	Messstadien des Seahorse Glycolytic Rate Assays	37
Abb. 8	Zytotoxizitäts-Test nach Inhibition mit PHA-665752/Foretinib für 48h	41
Abb. 9	Übersicht IC ₅₀ -Mittelwerte und -Standardabweichung nach Inhibition mit PHA-665752/Foretinib [μM]	42
Abb. 10	Western Blot zum Nachweis von phosphoryliertem c-Met-Rezeptor	44
Abb. 11	Stimulation mit HGF führt zu erhöhter PD-L1 Konzentration auf der Zellmembran	46
Abb. 12	Transfektionskontrolle: c-Met-Rückgang nach Behandlung mit c-Met-siRNA I/II	47
Abb. 13	c-Met-siRNA I/II verringert Zunahme von PD-L1 nach HGF-Stimulation auf der Zelloberfläche von Detroit562	49
Abb. 14	c-Met-siRNA I/II verringert Zunahme von PD-L1 nach HGF-Stimulation auf der Zelloberfläche von FaDu.....	50
Abb. 15	Veränderung des glykolytischen H ⁺ -Ausstroms (glykoPER) in Echtzeit nach HGF-Stimulation in Detroit562	52
Abb. 16	Veränderung des glykolytischen H ⁺ -Ausstroms (glykoPER) in Echtzeit nach HGF-Stimulation in FaDu	53

TABELLENVERZECHNIS

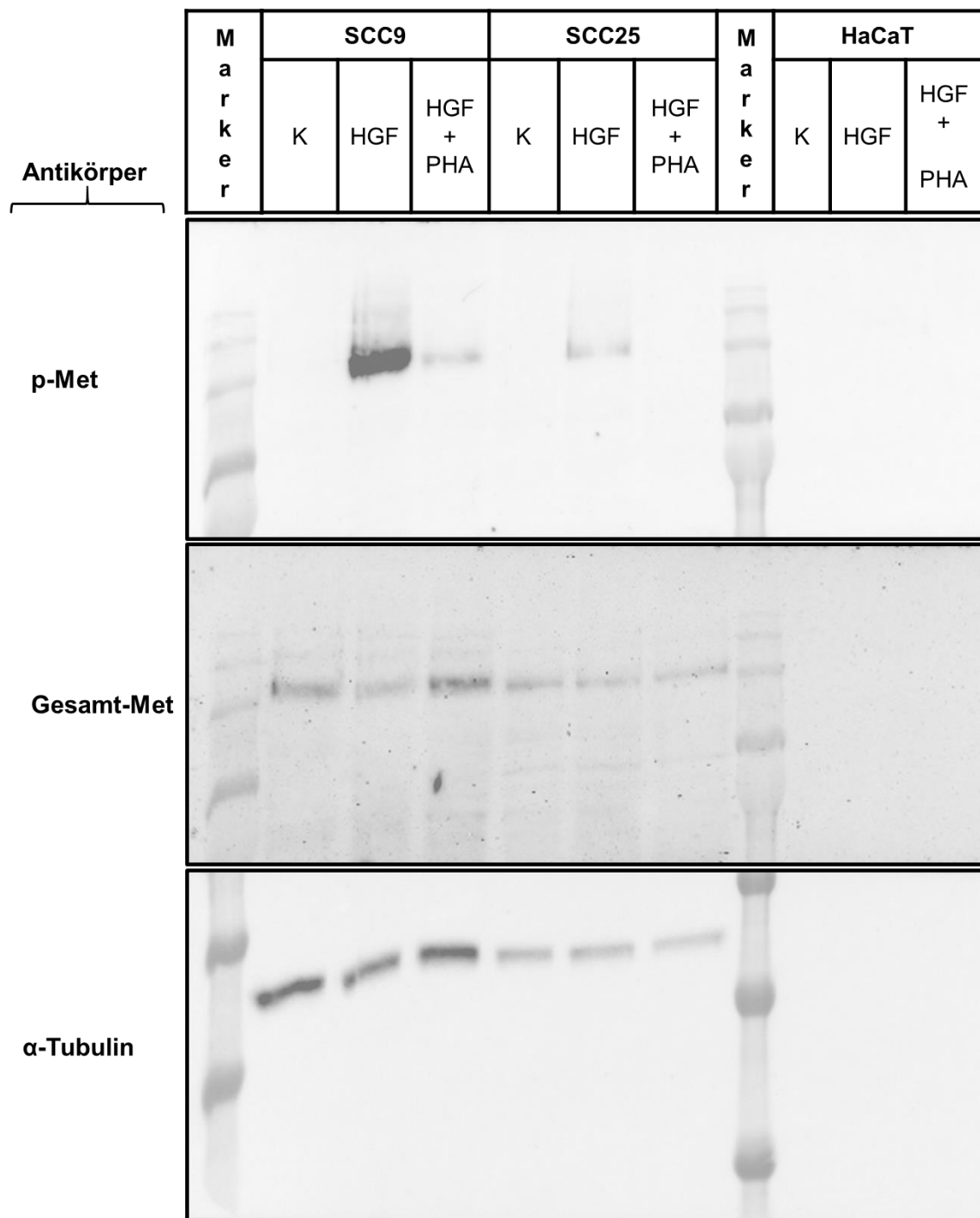
Tab. 1	Chemikalien und Reagenzien.....	19
Tab. 2	Puffer.....	21
Tab. 3	Wachstumsfaktoren, Inhibitoren und Antikörper.....	22
Tab. 4	Geräte	24
Tab. 5	Software	26
Tab. 6	Zelllinien und ihr Entnahmeort aus einem Plattenepithelkarzinom der Kopf-Hals Region	27
Tab. 7	Verwendete Zellmedien und ihre Zusammensetzung.....	28
Tab. 8	Komponenten der SDS-PAGE	31
Tab. 9	Zusätze für das Phenolrot-freie Medium.....	38
Tab. 10	Übersicht IC ₅₀ -Mittelwerte und -Standardabweichung nach Inhibition mit PHA-665752/Foretinib [µM]	42

ANHANG



Anhang 1

Original Western Blot der Zelllinien Detroit, FaDu und A253



Anhang 2 Original Western Blot der Zelllinien SCC9, SCC25 und HaCaT

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Dr. Alexander Kübler, Direktor der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Würzburg, danke ich für die Möglichkeit in seiner Klinik die vorliegende Arbeit anfertigen zu dürfen, sowie für die Bereitstellung des Labors und der benötigten Mittel.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Dr. Stefan Hartmann für die Überlassung dieses hochinteressanten Themas, aber vor allem für die großartige fachliche und menschliche Betreuung während der Zeit als Doktorandin. Ich bin sehr dankbar und froh, von einem so engagierten Doktorvater betreut worden zu sein, der immer ein offenes Ohr hatte und sich stets zeitnah um die Organisation kümmerte. Für seine berufliche und private Zukunft mit seiner Familie wünsche ich ihm nur das Beste.

Des Weiteren gilt mein herausragender Dank Frau Dr. Verena Boschert, die mich in der Zeit im Labor und darüber hinaus stets sehr gewissenhaft mit ihrem unerschöpflichen Wissen und ihrer liebenswerten Art unterstützt und begleitet hat.

Rückblickend hätte ich mir insgesamt keine bessere Betreuung in der Zeit als Doktorandin wünschen können.

Frau Prof. Dr. Kathleen Wermke möchte ich ganz herzlich danken, für Ihre hervorragende Betreuung im Rahmen des Doktorandenseminars und darüber hinaus.

Herrn Dr. Axel Seher danke ich für die administrative Leitung des Wissenschaftlichen Labors der Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie. An dieser Stelle möchte ich mich auch sehr bei Frau Margit Schleyer und Frau Irina Kucerov für die herzliche Unterstützung während der praktischen Phase im Labor bedanken.

Frau Prof. Dr. Almut Schulze des Lehrstuhls für Biochemie und Molekularbiologie, danke ich für die Bereitstellung des Seahorse XF Analyzers, sowie Frau Sudha Janaki-Raman für die zeitaufwendige Einweisung.

Bei Frau Prof. Dr. Heike Walles und Frau Sabine Gätzner des Lehrstuhls für Tissue Engineering und Regenerative Medizin, sowie bei Herrn Christian Linden und Herrn Priv.-Doz. Dr. Niklas Beyersdorf (IZKF-Serviceeinheit für Konfokale

Mikroskopie und Zellsortierung), möchte ich mich für die Nutzung des jeweiligen Durchflusszytometers bedanken.

Mein größter Dank gilt jedoch meinen Eltern und meinem Bruder, für ihre unerschöpfliche Geduld und ihr motivierendes Lob während meines gesamten Zahnmedizinstudiums und der Promotion.

