

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

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

**Der Einfluss des Hepatocyte growth factors auf die PD-L1-Expression  
in Kopf-Hals-Karzinomen: Die Bedeutung des MAPK-, AKT- und  
STAT3-Signalwegs**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Anwar Aljasem

aus Raqa (Ar Raqqa/Syrien)

Würzburg, 07.2024

Referent: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Alexander C. Kübler

Korreferent: Prof. Dr. Uwe Gbureck

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 22.07.2024

Der Promovend ist Arzt und Zahnarzt

## Inhaltsverzeichnis

|             |   |           |
|-------------|---|-----------|
| <b>1</b>    | <b><i>Einleitung</i></b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>1.1</b>  | <b>Kopf-Hals-Karzinome</b> .....  | <b>1</b>  |
| 1.1.1       | Epidemiologie .....   | 1         |
| 1.1.2       | Ätiologie.....  | 2         |
| 1.1.3       | Klassifikation.....   | 3         |
| 1.1.4       | Therapie.....   | 7         |
| <b>1.2</b>  | <b>HGF/c-Met Signalweg</b> .....  | <b>12</b> |
| <b>1.3</b>  | <b>Immuncheckpoint PD-1/PD-L1</b> .....   | <b>15</b> |
| <b>1.4</b>  | <b>Ziel der Arbeit</b> .....  | <b>17</b> |
| <b>2</b>    | <b><i>Material</i></b> .....  | <b>18</b> |
| <b>2.1</b>  | <b>Zellkulturmedien und Zusätze</b> .....   | <b>18</b> |
| <b>2.2</b>  | <b>Reagenzien und Chemikalien</b> .....   | <b>18</b> |
| <b>2.3</b>  | <b>Verbrauchsmaterialien</b> .....  | <b>20</b> |
| <b>2.4</b>  | <b>Puffer</b> .....   | <b>22</b> |
| <b>2.5</b>  | <b>Wachstumsfaktoren, Inhibitoren und Primer</b> .....                                | <b>23</b> |
| <b>2.6</b>  | <b>Geräte</b> .....   | <b>24</b> |
| <b>2.7</b>  | <b>Software</b> .....   | <b>26</b> |
| <b>3</b>    | <b><i>Methodik</i></b> .....  | <b>28</b> |
| <b>3.1</b>  | <b>Zellkultur</b> .....   | <b>28</b> |
| <b>3.2</b>  | <b>Zellzählung</b> .....  | <b>29</b> |
| <b>3.3</b>  | <b>Zellviabilitätsassay</b> .....   | <b>30</b> |
| <b>3.4</b>  | <b>Stimulation mit HGF, ERK1/2-Inhibitor, AKT-Inhibitor und STAT3 Inhibitor</b> ..... | <b>31</b> |
| <b>3.5</b>  | <b>Stimulation mit HGF und Trametinib</b> .....                                       | <b>31</b> |
| <b>3.6</b>  | <b>Erk1/2-Inhibtion mittels RNA-Interferenz</b> .....                                 | <b>32</b> |
| <b>3.7</b>  | <b>Western Blot</b> .....   | <b>33</b> |
| 3.7.1       | Probenvorbereitung.....   | 33        |
| 3.7.2       | SDS-PAGE und Proteintransfer .....  | 34        |
| 3.7.3       | Immundetektion .....  | 36        |
| <b>3.8</b>  | <b>Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)</b> .....                            | <b>38</b> |
| 3.8.1       | RNA-Extraktion .....  | 39        |
| 3.8.2       | Reverse Transkription (cDNA-Synthese) .....   | 39        |
| 3.8.3       | qPCR.....   | 40        |
| <b>3.9</b>  | <b>Durchflusszytometrie</b> .....   | <b>41</b> |
| <b>3.10</b> | <b>Auswertung und Statistik</b> .....   | <b>42</b> |
| <b>4</b>    | <b><i>Ergebnisse</i></b> .....  | <b>43</b> |

|            |  |            |
|------------|--|------------|
| <b>4.1</b> | <b>Western Blot zum Nachweis der Rolle der Signalwege (MAPK/ERK, PI3K/AKT und STAT3) bei der erhöhten PD-L1-Expression nach HGF-Stimulation.....</b>                                       | <b>43</b>  |
| 4.1.1      | FaDu-Zelllinie.....  | 43         |
| 4.1.2      | Detroit562-Zelllinie.....  | 46         |
| 4.1.3      | SCC9-Zelllinie.....  | 49         |
| 4.1.4      | SCC154-Zelllinie.....  | 51         |
| 4.1.5      | Schlussfolgerung zur Rolle der intrazellulären Signalwege bei der durch HGF-Stimulation erhöhten PD-L1-Expression.....   | 54         |
| <b>4.2</b> | <b>ERK1/2 Inhibition mit RNA-Interferenz.....</b>  | <b>55</b>  |
| 4.2.1      | Quantitative PCR zum Nachweis der RNA-Interferenz von ERK1/2-mRNA.....   | 55         |
| 4.2.2      | Western Blot zum Nachweis der ERK1/2-Abnahme nach Einsatz spezifischer siRNA und zur Untersuchung des Einflusses von ERK1/2 auf den Anstieg der PD-L1-Expression nach HGF-Stimulation..... | 58         |
| <b>4.3</b> | <b>Die Wirkung von Trametinib auf PD-L1.....</b>   | <b>60</b>  |
| 4.3.1      | Zellviabilitätsassay mit Trametinib.....   | 60         |
| 4.3.2      | Western Blot zum Nachweis des Trametinib-Einflusses auf die HGF-vermittelte Erhöhung der PD-L1-Konzentration.....  | 61         |
| 4.3.3      | Western Blot zum Nachweis des Trametinib-Einflusses auf PD-L1 und die untersuchte Signalwege allein und in Kombination mit HGF.....  | 65         |
| 4.3.4      | Durchflusszytometrie zum Nachweis der HGF induzierten, MAPK/ERK vermittelten Expression von PD-L1 mittels Trametinib.....  | 66         |
| <b>5</b>   | <b><i>Diskussion</i>.....</b>  | <b>68</b>  |
| 5.1        | <b>Die Rolle von intrazellulären Signalwegen bei der HGF-vermittelten Konzentrationserhöhung von PD-L1.....</b>  | <b>69</b>  |
| 5.2        | <b>Der MAPK-Signalweg.....</b>   | <b>72</b>  |
| 5.3        | <b>Fazit und Ausblick.....</b>   | <b>76</b>  |
| <b>6</b>   | <b><i>Zusammenfassung</i>.....</b>   | <b>79</b>  |
| <b>7</b>   | <b><i>Literaturverzeichnis</i>.....</b>  | <b>81</b>  |
|            | <b><i>Appendix</i>.....</b>  | <b>93</b>  |
|            | <b><i>I Abkürzungsverzeichnis</i>.....</b>   | <b>93</b>  |
|            | <b><i>II Abbildungsverzeichnis</i>.....</b>  | <b>96</b>  |
|            | <b><i>III Tabellenverzeichnis</i>.....</b>   | <b>98</b>  |
|            | <b><i>IV Lebenslauf</i>.....</b>   | <b>99</b>  |
|            | <b><i>V Publikationen</i>.....</b>   | <b>100</b> |

# 1 Einleitung

## 1.1 Kopf-Hals-Karzinome

### 1.1.1 Epidemiologie

Das "Kopf-Hals-Karzinom" (eng.: "head and neck cancer", HNC) ist ein Sammelbegriff für Karzinome, die im Bereich von Mundhöhle, Pharynx, Larynx, Speicheldrüsen und Nasennebenhöhlen auftreten. Histologisch umfassen die aus dem Schleimhautepithel des Aerodigestivtrakts entstehenden Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs (eng.: "head and neck squamous cell carcinoma", HNSCC) über 90 % aller HNCs. Aufgrund unterschiedlicher Pathogenesen und molekularbiologischen Eigenschaften können sie in HPV-positive und HPV-negative Karzinome (HPV=Humane Papillomviren) unterteilt werden [1].

Mit rund 650.000 Neuerkrankungen und 350.000 Toten jährlich stand 2002 HNC weltweit auf Rang sechs der häufigsten Tumorerkrankungen [2]. In 2018 stieg die Zahl der neuen Fälle auf 890.000 und die der Toten auf 460.000 [3]. Die jährliche Inzidenz im Zeitraum von 1990 bis 2017 zeigt weltweit eine Abnahme bei Karzinomen von Larynx und Nasopharynx und einen Anstieg bei Karzinomen von Oropharynx, Lippe und Mundhöhle [4], wobei das mittlere Erkrankungsalter bei 60 Jahren liegt [5].

Die Inzidenz, Mortalität und Prognose des HNC unterscheiden sich weltweit je nach Region, Geschlecht und Tumorlokalisation [6]. Die höchste Inzidenz der Lippen- und Mundhöhlenkarzinome wurde 2012 mit 22.9 neuen Fällen pro 100.000 Einwohner in Melanesien registriert, Süd- und Zentralasien registrierten 9.9 neue Fälle pro 100.000 Einwohner [7]. Die 5-Jahres-Überlebensrate verbesserte sich in allen Stadien von 54.7 % im Zeitraum von 1992-1996 auf 65.9 % im Zeitraum von 2002-2006. Am meisten profitierten die Patienten mit HPV-positivem Karzinom und am wenigsten die Patienten in der Altersgruppe über 75 Jahre [8].

In Deutschland wurden 2016 13.789 Neuerkrankungen und 5.457 Todesfälle an Karzinomen in Mundhöhle und Pharynx registriert [9]. Männer erkrankten insgesamt

häufiger als Frauen [10, 11]. Von 1999 bis 2016 stieg bei Männern die jährliche Inzidenz von 17.0 auf 17.6 pro 100.000 Männer und die Mortalität sank von 8.4 auf 7.0 pro 100.000 Männern. Bei Frauen stieg ebenfalls die Inzidenz von 4.7 auf 6.5 pro 100.000 Frauen, die Mortalität schwankte in diesem Zeitraum zwischen 1,6 und 2,0 pro 100.000 Frauen [9].

### 1.1.2 Ätiologie

Die Entstehung von HNC wird durch mehrere Risikofaktoren getriggert. Die Bedeutung des Tabak- und Alkoholkonsums analysierte 2009 eine Fall-Kontroll-Studie aus Amerika und 17 europäischen Ländern mit 11.221 Fällen und 16.168 Kontrollen und kam zum Ergebnis, dass 72% des Gesamterkrankungsgeschehens auf den Tabak- und Alkoholkonsum zurückzuführen ist. Darunter sind 4% der Fälle auf den Alkoholkonsum allein, 33% der Fälle auf den Tabakkonsum allein und 35% der Fälle auf den kombinierten Konsum der beiden Substanzen zurückzuführen. Weiter variierte der Anteil nach Lokalisation und Geschlecht, 89 % der Kehlkopfkzinome, 72 % der Pharynxkarzinome und 64% der Mundhöhlenkarzinome sind dem Konsum der beiden Substanzen geschuldet. Bei Männern beträgt das zuschreibbare Risiko 74 % und bei Frauen 57% der HNC-Erkrankung [12]. In einer weiteren Studie wird der individuelle Risikoanstieg durch kombinierten Konsum von Tabak und Alkohol multiplikativ auf das 35-fache geschätzt [13].

Eine Assoziation zwischen HPV-Infektion und HNSCC ist nachgewiesen, vor allem im Oropharynx [14]. Dabei ist der HPV-Subtyp 16 mit über 90% der HPVs der Hauptvertreter [15]. Die Pathogenese liegt in der Unterregulierung der Tumorsuppressoren p53 und Retinoblastom-Protein durch die virale Proteine E6 und E7 zugrunde [16]. Die Sexualübertragbarkeit dieser Viren in Kombination mit einer symptomlosen Infektion sorgt schlussendlich für eine ansteigende Inzidenz in Menschen jüngeren Alters [17].

Der Anteil der HPV-assoziierten HNSCC-Fälle wurde 2019 in einer Metanalyse untersucht. 42.62% der gesamten HNSCC-Fälle sind HPV-positiv, davon sind 50.47% im Oropharynx und 24.14% in der Mundhöhle lokalisiert [18]. Eine weitere Assoziation zwischen dem EBV (Epstein-Barr-Virus) und dem Plattenepithelkarzinom, hauptsächlich im Nasopharynx, ist beschrieben [19].

Als weitere Risikofaktoren gelten der Konsum von Betelnüssen [20], der neben der Luftverschmutzung [21] die überdurchschnittliche Inzidenz im asiatischen Raum [22] erklären kann, und das Leiden an der genetischen Erkrankung Fanconi-Anämie, bei der das Risiko für Malignitätsentstehung im Kopf-Hals-Bereich auf das 500- bis 700-fache ansteigt [23].

Schlechte Mundhygiene und unausgewogene Ernährung begünstigen zusätzlich die Entstehung eines Plattenepithelkarzinoms in der Mundhöhle [24, 25].

### 1.1.3 Klassifikation

HNSCCs entstehen selten ohne Präkanzerosen [26]. Diese präsentieren sich in Form von Schleimhautläsionen und werden als OPMD (orale Läsion mit potenzieller Malignität, eng.: "Oral potentially malignant disorders", OPMDs) bezeichnet, da sie ein potentielles Risiko besitzen, sich in maligne Neoplasien umzuwandeln. Sie treten in unterschiedlicher Morphologie und Ausprägung auf. Beschrieben sind orale Leukoplakien, Erythroplakien, orale submuköse Fibrosen, palatinale Läsionen bei Rauchern, oraler Lichen planus, orale Lichenoid-Reaktion, Graft-versus-Host-Reaktion (GvHD) als Abstoßungsreaktion bei Stammzelltransplantationen, oraler Lupus Erythematoses sowie hereditär veranlagte Erkrankungen wie Dyskreatosis congenita und Epidemolysis bullosa. Die Cheilitis actinica befällt die Lippen und gilt als fakultative Präkanzerose des Lippenkarzinoms [27, 28]. Die Epidemiologie und das Risiko der Malignitätsentstehung unterscheiden sich erheblich innerhalb der OPMDs. Das häufigste OPMD ist die Leukoplakie [29] mit einer globalen Prävalenz von 2.6 % der Menschen [30]. Eine systematische Übersichtsarbeit, die die maligne Transformationsrate der Leukoplakie und die begünstigenden Risikofaktoren auswertete, fand heraus, dass durchschnittlich 3,5 % der Leukoplakien mit einer breiten Spannweite zwischen 0.13% und 34 % der Leukoplakien eine maligne Umwandlung erfährt. Diese Transformation wird durch fortgeschrittenes Alter, weibliches Geschlecht, Überschreitung einer Fläche von 200 mm<sup>2</sup>, fehlende Homogenität und erhöhten Dysplasiegrad begünstigt [31]. Die Erythroplakien zählen zu den obligaten Präkanzerosen und treten mit einer länderabhängigen Prävalenz von 0.02 bis 0.83 % der Bevölkerung eher selten auf [32]. Sie neigen zu einer schnellen Progression und

Malignitätsentwicklung. Eine histologische Begutachtung von 58 oralen Erythroplakien zeigte, dass 9 % eine moderate bis milde Dysplasie, 40 % eine schwere Dysplasie und 51% ein bereits invasives Karzinom darstellten [33].

Die Dysplasie ist ein histologischer Befund und gemeinsames Merkmal vieler OPMDs, die die WHO (Weltgesundheitsorganisation) in drei Stadien klassifiziert: geringe, moderate und schwere Dysplasie. Bei bereits stattgefundenener Transformation wird die Dysplasie als *Tis* (Tumor in situ) bezeichnet. Das Risiko der Malignitätsentstehung steigt dabei mit der Schwere der Dysplasie [34]. 2017 wurde ein neues binäres Klassifikationssystem entwickelt, indem Dysplasien in geringe und schwerere Grade eingestuft werden [35].

Die Klassifikation von malignen Tumoren werden international nach der anatomischen Ausbreitung und Metastasierung einheitlich in das TNM-System eingestuft (Staging). Zusätzlich werden diese Tumoren histologisch nach Abweichungsgrad von den normalen Geweben in einem Grading-Schema eingestuft (Grading). Patienten profitieren anhand dieser Klassifikationen bei der interdisziplinären Therapieplanung und Prognoseeinschätzung, international ermöglicht das einheitliche System den wissenschaftlichen Austausch und Vergleich [36].

Das Grading-System beruht auf dem Differenzierungsgrad der Neoplasien. Sie werden in gut (G1), mäßig bzw. moderat (G2), niedrig bzw. schlecht differenziert (G3) und undifferenziert (G4) eingeteilt [37]. Umso schlechter der Differenzierungsgrad ist, desto größer ist die Abweichung vom normalen Gewebe, und desto schlechter ist die Prognose [38].

Der Name der TNM-Klassifikation der internationalen Vereinigung gegen Krebserkrankungen (eng.: "Union for International Cancer Control", UICC) setzt sich aus den englischen Abkürzungen für die drei Kriterien zusammen, nach denen die malignen Tumoren in die UICC-Stadien eingeteilt werden: T von Tumor für die Tumorausdehnung, N von Nodes für Lymphknotenbefall und M von Metastasis für das Vorliegen von Fernmetastasen. Die hämatologischen malignen Erkrankungen haben ihre eigene Klassifikation, da es sich um systemische maligne Erkrankungen handelt.



Die Einteilung wird von der UICC herausgegeben, in Tabelle Nr.1 ist die aktuelle Einteilung (8. Auflage) dargestellt [39].

**Tabelle 1: Tumorstadien nach UICC-Kriterien [39].**

|           |                        |              |    |
|-----------|------------------------|--------------|----|
| Stage 0   | Tis                    | N0           | M0 |
| Stage I   | T1                     | N0           | M0 |
| Stage II  | T2                     | N0           | M0 |
| Stage III | T3<br>T1, T2, T3       | N0<br>N1     | M0 |
| Stage IVA | T4a<br>T1, T2, T3, T4a | N0, N1<br>N2 | M0 |
| Stage IVB | Jede T<br>T4b          | N3<br>Jede N | M0 |
| Stage IVC | Jede T                 | Jede N       | M1 |

#### T-Klassifikation

- TX: Primärtumor kann nicht beurteilt werden
- T0: Kein Hinweis auf Primärtumor
- Tis: Carcinoma in situ, Tumor im Ursprung
- T1: Größte Tumorausdehnung  $\leq 2$  cm, Invasionstiefe  $\leq 5$  mm
- T2: Größte Tumorausdehnung  $\leq 2$  cm, Invasionstiefe  $> 5$  mm und  $\leq 10$  mm  
ODER Tumor  $> 2$  cm aber  $\leq 4$  cm, und Invasionstiefe  $\leq 10$  mm
- T3: Größte Tumorausdehnung  $> 4$ cm ODER jeder Tumor Invasionstiefe  $> 10$  mm
- T4: Infiltration in Nachbarstrukturen

#### N-Klassifikation

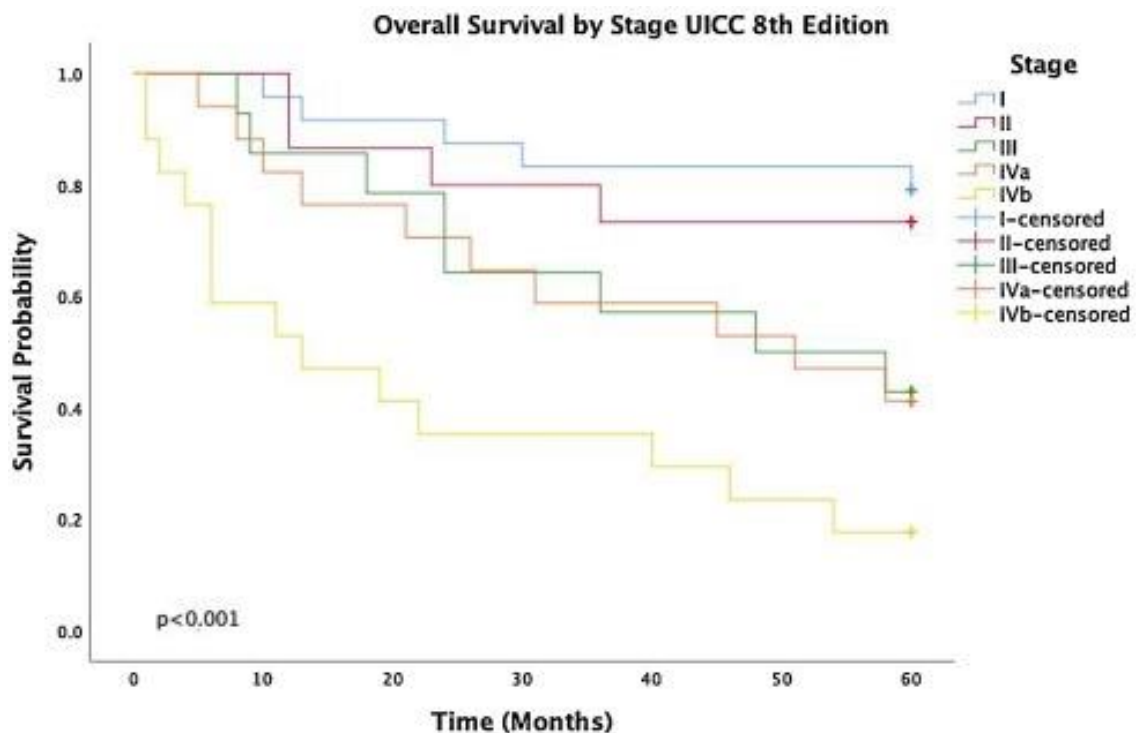
- NX: Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
- N0: Keine regionären Lymphknotenmetastasen
- N1: Metastase in solitärem ipsilateralem Lymphknoten bis 3cm und ENE (-)
- N2a: Metastase in solitärem ipsilateralen Lymphknoten bis 3 cm und ENE (+) oder Metastase in solitärem ipsilateralen Lymphknoten 3 bis 6 cm und ENE (-)
- N2b: Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, keiner größer als 6 cm und ENE (-)
- N2c: Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, keiner größer als 6 cm und ENE (-); N3a: Metastase in solitärem Lymphknoten größer 6 cm und ENE (-)
- N3b: Metastase in solitärem ipsilateralen Lymphknoten größer 3 cm und ENE (+); ODER Metastase in multiplen ipsilateralen, kontralateralen oder bilateralen Lymphknoten, davon mindestens eine ENE (+); oder Metastase in einem solitären kontralateralen Lymphknoten, 3 cm oder kleiner und ENE (+)

\*ENE: eng.:“extranodal extension,,-extranodales Wachstum

#### M-Klassifikation

- MX: Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
- M0: Keine Fernmetastasen
- M1: Fernmetastase(n)

Die UICC-Stadien Einteilung wurde entwickelt und modifiziert, um neben der Therapie die bessere Einschätzung der Prognose und des Tumorverhaltens zu erlauben. Die Abbildung Nr.1 in der Studie von D.M. McGoldrick et al. 2020 stellt den Zusammenhang zwischen dem Stadium und der Überlebensrate der Mundhöhlenkarzinome dar [40].



**Abbildung 1: Überlebensrate nach UICC-Stadien der 8. Auflage der TNM-Klassifikation.** Die X-Achse stellt die Zeit in Monaten nach Diagnosestellung dar, die Y-Achse stellt die relative Überlebensrate dar. Je höher das UICC-Stadium ist, desto kleiner die Überlebensrate im Zeitverlauf. Abbildung entnommen aus McGoldrick, D. [40] mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

#### 1.1.4 Therapie

Die S3-Leitlinien der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF), Deutschen Krebsgesellschaft (DKG) und Deutschen Krebshilfe (DKH) empfehlen neben dem UICC-Stadium die Patientenbedingungen (Alter, Morbidität), die Lebensqualität und die Erwartung der Patienten bei der Therapieentscheidung in Betracht zu beziehen. Verschiedene Therapieansätze können sinnvoll sein (Chirurgie, Strahlentherapie und medikamentöse Tumorthherapie), die dauerhafte oder möglichst lange Tumorkontrolle mit Erhaltung oder Wiederherstellung der ästhetischen und funktionellen Aspekte wie Artikulation, Phonation, Kau- und Schluckfunktion verfolgen [41]. Dabei kann der HRQOL-Parameter (Gesundheitsbezogene Lebensqualität, eng.: "Health related Quality of Life") die Überlebensrate bei Verfolgung eines kurativen Ansatzes beeinflussen [42]. Der HRQOL-Parameter wird anhand sogenannter EORTC QLQ-C30 (europäische Organisation für

Forschung und Behandlung von Krebs Fragebogen zur Lebensqualität, eng.: “European Organisation for Research and Treatment of Cancer, health-related quality of life questionnaire“) bestimmt, welcher aus 30 Fragen besteht und den Status des physischen, kognitiven und emotionalen Zustandes neben weiteren Symptomen wie Schmerzen, Erschöpfung, Übelkeit und Atemnot der Befragten erhebt [43].

#### 1.1.4.1 Chirurgie, Radiatio, Chemotherapie

Die Therapie der Mundhöhlenkarzinome basiert auf drei Säulen: der chirurgischen Resektion, der Strahlentherapie und der medikamentösen Tumorthherapie (Chemotherapie, zielgerichtete Therapie und Immuntherapie). Bei einer kurativ gerichteten Behandlung können die drei Ansätze kombiniert oder, abgesehen von der Chemotherapie, einzeln angewendet werden [41].

Für die Therapieauswahl und die Prognose ist das Vorliegen von Metastasen bei Mundhöhlenkarzinomen entscheidend [44]. Die Überlegenheit der chirurgischen Resektion gegenüber der Radiotherapie ist im frühen T1-2 Stadium nicht nachgewiesen. Hier sind das Nebenwirkungsprofil und die posttherapeutische Lebensqualität entscheidender [45]. Allerdings können in diesen Stadien Lymphknotenmetastasen vorhanden sein [46], die die Prognose unabhängig von dem Behandlungsansatz des primären Tumors (Resektion vs. Radiation) verschlechtern [47], daher ist eine elektive Neck Dissection auch bei frühen Stadium gerechtfertigt, selbst bei klinisch negativen Lymphknotenbefund [48]. Hier führt eine elektive Neck Dissection zur Senkung der Rezidivrate und zur Erhöhung der Überlebensrate und des progressionsfreien Intervalls im Vergleich zu der therapeutischen Neck Dissection [49].

Bei lokal fortgeschrittenen Tumoren T3-T4 profitieren die Patienten von kombinierter radio-chirurgischer Therapie, im Vergleich zu alleiniger Strahlentherapie [50]. Die empfohlene Bestrahlungsdosis des Tumors sollte kumulativ 65 Gy betragen, konventionell wird diese täglich auf 1,8-2 Gy in fünf Tagen der Woche fraktioniert [51]. Eine kombinierte adjuvante Radiochemotherapie vor allem mit Cisplatin-haltigen Zytostatika erhöht signifikant die Überlebensrate im Vergleich zur alleinigen Radiotherapie [52-54].

#### 1.1.4.2 Zielgerichtete Therapie (molecular targeted therapy)

EGFR (Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor, eng.: “Epidermal growth factor receptor) ist ein Tyrosinkinase-Rezeptor (TKR), der zu der ErbB-Familie gehört, welche eine zentrale Rolle beim Erhalt der physiologischen Zellfunktion übernimmt. Mutationen und Überexpression dieses Rezeptors führen zur Tumorentwicklung [55]. Eine EGFR-Überexpression ist in über 90% der HNSCCs zu finden [56]. Daher bietet der monoklonale Antikörper Cetuximab gegen EGFR als Tyrosinkinase-Inhibitor (TKI) eine parallele Möglichkeit zu der Erstlinientherapie oder eine weitere Option bei Versagen der Erstlinientherapie (Rezidiv oder Metastasen) an. Dafür erhielt Cetuximab 2004 in der EU und 2006 in der USA die Zulassung [57].

Eine kombinierte Behandlung von Cetuximab mit der Radiotherapie konnte gegen die alleinige Radiotherapie das Gesamtüberleben bei lokal fortgeschrittenen Tumoren des Kopf- und Halsbereiches von 29.3 Monate auf 49.0 Monate verlängern [58]. Darüber hinaus belegte die Extreme-Studie, dass die Erweiterung der Chemotherapie (Platin und Fluoruracil) mit Cetuximab bei rezidierten oder metastasierten HNSCC die Überlebenszeit von 7.4 auf 10.1 Monate, das progressionsfreie Intervall von 3.3 auf 5.6 Monate verlängert und die Ansprechrate von 20 % auf 35% erhöht. Somit gilt das Extreme-Therapieprotokoll neben dem Einsatz des Immuncheckpoint-Inhibitors Pembrolizumab bis heute als Standardtherapie bei rezidierten und metastasiertem HNSCC [59]. Der Prozess der Entscheidungsfindung zwischen den beiden Wirkstoffen ist im nächsten Kapitel beschrieben.

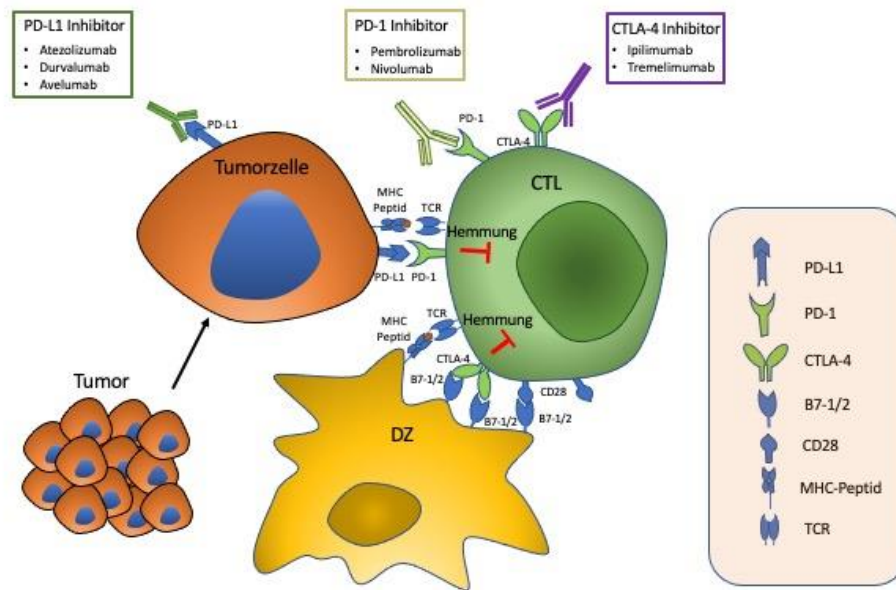
Trotzdem hat die gezielte Therapie gegen EGFR nicht die erwarteten Erfolge gezeigt. Gegen Cetuximab als auch andere EGFR-Inhibitoren wie zum Beispiel Erlotinib, Gefitinib oder Afatinib verfügten die Tumoren bereits über eine primäre internistische Resistenz oder entwickelten im Laufe der Therapie eine sekundäre bzw. erworbene Resistenz [60, 61].

Unter Cetuximab-Therapie zeigte sich, dass HNSCC-Patienten mit aktiviertem HGF/c-MET-Signalweg schlechtere Prognosen aufwiesen [62]. Untersuchungen bei Lungenkarzinomen zeigten, dass die Amplifikation des MET-Onkogens, welches für den

c-MET Rezeptor kodiert, einen der Mechanismen zur Entwicklung einer Resistenz gegen Gefitinib oder Erlotinib darstellt [63, 64].

#### 1.1.4.3 Immuntherapie

Die Rolle des Immunsystems in der Tumorthherapie hat der New Yorker Chirurg William B. Coley in der zweiten Hälfte des 18. Jahrhunderts erkannt. Mittels einer bakteriellen Impfung, als *Coley's Toxine* bekannt, versuchte er im Jahr 1891 das Immunsystem inoperabler Patienten zu stimulieren [65]. Er erreichte mit seinem Ansatz eine Heilungsrate von über 10 % seiner Patienten und gilt als Pionier der Immuntherapie [66]. Bis heute findet die antitumorale Immuntherapie durch Aufheben der Blockaden des Immunsystems mit monoklonalen Antikörper an bestimmten Immuncheckpoints wie CTLA-4 (eng.:“ cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4,,) (Ipilimumab und Tremelimumab), PD-1(eng.:“ Programmed cell death protein 1,,) (Pembrolizumab und Nivolumab) und PD-L1(eng.:“ Programmed cell death protein ligand 1,,) (Atezolizumab, Durvalumab und Avelumab) eine breite Verwendung. In Abbildung Nr. 2 sind diese Immuncheckpoints mit ihren Inhibitoren vereinfacht dargestellt. Allerdings können die Patienten wie bei TKRIs primäre Resistenzen besitzen oder solche entwickeln [67].



**Abbildung 2: Immuncheckpoint-Inhibitoren.** Die antigenpräsentierenden Zellen (APC) präsentieren der naiven T-Zelle Antigene der Tumorzellen. Die Immunantwort wird über CD28 und den TCR (T-Zell-Rezeptor) eingeleitet und über CTLA-4 und die regulatorischen T-Zellen unterdrückt. Durch CTLA-4 Blockade mit Ipilimumab oder Tremelimumab erfolgt eine stärkere Immunantwort. Weiter können die Tumorzellen durch Bildung von PD-L1 direkt die zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) über PD-1 hemmen. PD-L1 Inhibitoren (Atezolizumab, Avelumab und Durvalumab) und PD-1 Inhibitoren (Pembrolizumab und Nivolumab) entziehen den Tumorzellen diesen Weg. (CTL: zytotoxische T-Lymphozyten, DC: Dendritische Zellen, TCR: T-Zell-Rezeptor) [68]. (Abbildung erstellt und modifiziert nach [68]).

Das erste zugelassene Immuntherapeutikum für HNSCC war Nivolumab. In der Phase-III-Studie Check-Mate-141 zeigte Nivolumab seine Überlegenheit gegenüber Docetaxel, Methotrexat oder Cetuximab bei HNSCC-Patienten, welche Progression unter platinhaltiger Therapie innerhalb der ersten sechs Monate erfahren hatten. Unter Nivolumab konnte gegenüber den alternativen Therapien die Überlebensrate nach 12 Monaten erhöht werden (36.0 % gegen 16.6 %), die gesamte Überlebenszeit verlängert werden (7.5 Monate gegen 5.1 Monate) und die Häufigkeit von schweren Nebenwirkungen dritten und vierten Grades reduziert werden (13.1 % gegen 35.1 %). Die progressionsfreien Intervalle waren bei den alternativen Therapien jedoch minimal höher (2.3 Monate gegen 2.0 Monate) [69]. Ein Update der Check-Mate-141-Studie nach 24.2 Monaten bestätigte weiterhin die Überlegenheit von Nivolumab mit 16 % Überlebensrate gegenüber den alternativen Therapien mit 6.0 % unabhängig von der PD-L1 Expressionsrate und dem HPV-Status [70]. Eine weitere multizentrische Studie konnte die Ergebnisse der Check-Mate-141-Studie untermauern. Darüber hinaus wird von einem höheren progressionsfreien Intervall von 3.9 Monaten berichtet, sodass sich

Nivolumab als Zweitlinientherapie bei Versagen einer platinhaltigen Chemotherapie durchsetzen konnte [71].

In der Phase-III-KEYNOTE-048 Studie wurde die Gabe von Cetuximab mit Chemotherapie nach Extreme-Schema mit Pembrolizumab allein oder in Kombination mit Chemotherapie (Platinum und 5-FU) bei rezidierten oder metastasierten HNSCCs verglichen. Zudem wurden die Patienten nach dem kombinierten positiven Score (CPS), mit dem der prozentuale Anteil PD-L1-positiver Tumor- und Immunzellen zu den gesamten Tumorzellen bestimmt wird, und ihrem HPV16-Status eingeteilt. Pembrolizumab allein verbesserte gegenüber dem Extreme-Schema die Überlebenszeit von Patienten mit  $CPS > 1$  um 2 Monate (12.3 gegenüber 10.3 Monate) und von Patienten mit  $CPS > 20$  um 4.2 Monate (14.9 gegenüber 10.7 Monate). In Kombination mit Chemotherapie verbesserte Pembrolizumab ebenfalls die Überlebenszeit im Vergleich zum Extreme-Schema bei Patienten mit  $CPS > 1$  um 3.2 Monate (13.6 gegen 10.4) und bei Patienten mit  $CPS > 20$  um 3.7 Monate (14.7 gegen 11.0). Bei Patienten mit  $CPS < 1$  konnte weder eine Behandlung mit Pembrolizumab allein noch in Kombination mit Chemotherapie das progressionsfreie Überleben verbessern. Grad 3 und 4 Nebenwirkungen traten bei Behandlung mit Pembrolizumab allein in 55 %, bei Behandlung mit Pembrolizumab in Kombination mit Chemotherapie in 85 % und bei Cetuximab mit Chemotherapie in 83 % der Patienten auf. Die Todesfälle betragen in der gleichen Reihenfolge 8 %, 12 % und 10 % der Patienten [72].

Die AWMF für Onkologie hat sich aufgrund dieser Studienergebnisse in der neuen S3-Leitlinie für das Mundhöhlenkarzinom für die Behandlung mit Pembrolizumab allein oder in Kombination mit Chemotherapie bei  $CPS > 1$  und Cetuximab in Kombination mit Chemotherapie bei  $CPS < 1$  bei rezidierten oder metastasierten HNSCC als Standardtherapie ausgesprochen [41].

## 1.2 HGF/c-Met Signalweg

Das Glykoprotein c-MET ist ein transmembranöser Tyrosinkinase-Rezeptor (TKR), der erstmals 1984 als Onkogen entdeckt [73] und ein Jahr später als Tyrosinkinase identifiziert wurde [74]. Sein Molekulargewicht beträgt 190 kD und er besteht aus zwei



Ketten,  $\alpha$ -Kette (50 kD) und  $\beta$ -Kette (145 kD) [75]. Die  $\alpha$ -Kette befindet sich komplett extrazellulär und ist mit dem N-Terminus der extrazellulären Domäne der  $\beta$ -Kette über eine Disulfid-Brücke verbunden. Die Tyrosinkinase-Aktivität befindet sich am intrazellulären C-Terminus der  $\beta$  Kette [75, 76]. Immunhistologisch ist c-MET in mehreren epithelialen Zelltypen nachgewiesen, wie Zellen der Leber, des Magens und des Darms. Positive Färbung zeigten ebenfalls epitheliale Zellen des Endometriums, des Ovars und die basalen Keratinozyten der Speiseröhre und der Epidermis. Darüber hinaus wurde nur die c-MET-spezifische mRNA ohne Proteinnachweis in der Schilddrüse, Pankreas und Plazenta gefunden [77]. 1991 wurde sein Ligand Scatter Factor (SF) /Hepatocyte Growth factor (HGF) identifiziert [78], der in den Epithelien des mesenchymalen Bindegewebes freigesetzt wird. HGF übt dabei eine parakrine Funktion auf die Epithelzellen aus. In der Embryonalphase umfasst seine Funktion die Proliferation, Differenzierung, Strukturausbildung und Bewegung der Epithelzellen verschiedener Organe in Form einer Epithelial-Mesenchymalen-Transition (EMT) [79, 80]. In erwachsenen Alter spielt HGF eine Rolle bei der Wundheilung [81] und der Regeneration der Haut und der Leber [82].

Analog zur Epithelial-Mesenchymalen-Transition (EMT) in der Embryogenese aktivieren Tumorzellen unterschiedlicher Entitäten c-MET, um in das benachbarten Gewebe einzuwachsen und Fernmetastasen zu bilden [83, 84].

Im Tumormikromilieu (TME) findet die c-MET-Aktivierung entweder in einer parakrinen Weise statt, wie es bei HNSCC beschrieben ist, wobei die Freisetzung durch Fibroblasten erfolgt [85] (Abbildung Nr. 3), oder in einer autokrinen Weise, wenn die Tumorzellen selbst HGF freisetzen, welches an den Rezeptor c-MET auf der Zelloberfläche bindet. Der autokrine Aktivierungsweg ist im Magenkarzinom [86] und Glioblastom [87] beschrieben.

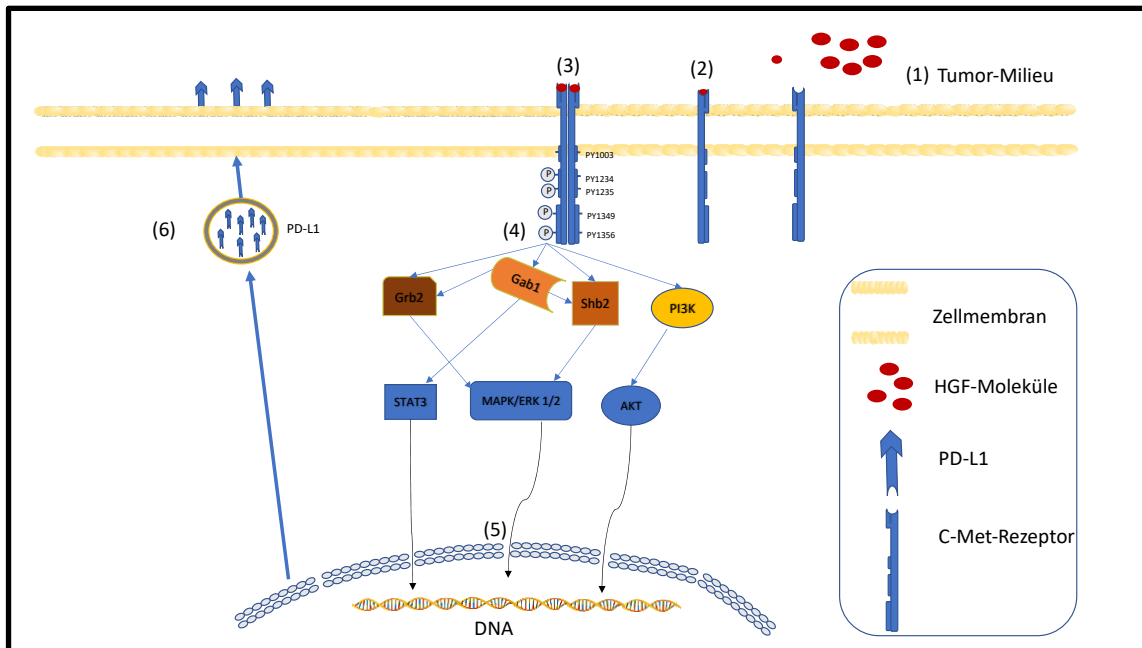
Die Aktivierung ist in Gang gesetzt, wenn sich zwei c-MET-Moleküle aneinanderlagern, nachdem ihr Ligand HGF an sie gebunden hat. Diese Dimerisierung veranlasst intrazellulär eine Phosphorylierungskaskade über die katalytischen Tyrosin-Moleküle Tyr1234 und Tyr1235 und letztendlich, mittels der Phosphorylierung an Tyr1349 und Tyr1356 des C-Terminus, die Aktivierung des Rezeptors. Die Phosphorylierung des

juxtamembranären Tyrosinrests 1003 dient dagegen der Ubiquitinierung des TKR c-MET und damit dem Abbau des Rezeptors nach Aktivierung [80, 88].

Die Phosphorylierung von Tyr1349 und Tyr1356 ermöglicht die Anlagerung und Phosphorylierung weiterer intrazellulären Proteine wie Gab1, Grb2, Shp2, PI3K und weiterer Proteine [80, 89]. Letztendlich kommt es dadurch zur Aktivierung verschiedener Signalwege (RAS/MAPK, PI3K/AKT und STAT3), wie in Abbildung Nr. 3 gezeigt ist [88, 90].

Ferner kann c-MET mit EGFR und weiteren EGF-Rezeptoren wie HER3 (eng.: "human epidermal growth factor receptor,") interagieren und sich gegenseitig aktivieren [89, 91]. In vitro wurden aus NSCLC- (eng.: "Non-small-cell-lung carcinoma") und HNSCC-Zellen Cetuximab-resistente Zelllinien entwickelt, die basierend auf Heterodimerbildung mit EGFR eine erhöhte Aktivität der TKRs HER2, HER3 und c-MET zeigten [92]. In einer Untersuchung von metastasierten CRC (Kolorektales Karzinom) konnte gezeigt werden, dass nach einer anti-EGFR-Therapie der Anteil an MET-Onkogen-Amplifikationen signifikant höher ist, so dass man annehmen könnte, dass diese MET-Onkogen-Amplifikationen erworben werden können und eine wichtige Rolle der Resistenzbildung bei Anti-EGFR-Therapie darstellen [93].

Ebenso führte beim Glioblastom eine EGFR-Inhibition in Maus-Modellen zur Überexpression und Aktivierung des TKR c-MET [94]. Mutation, Amplifikation und am häufigsten Hochregulation von c-MET sind ebenfalls bei HNSCC beschrieben [95].



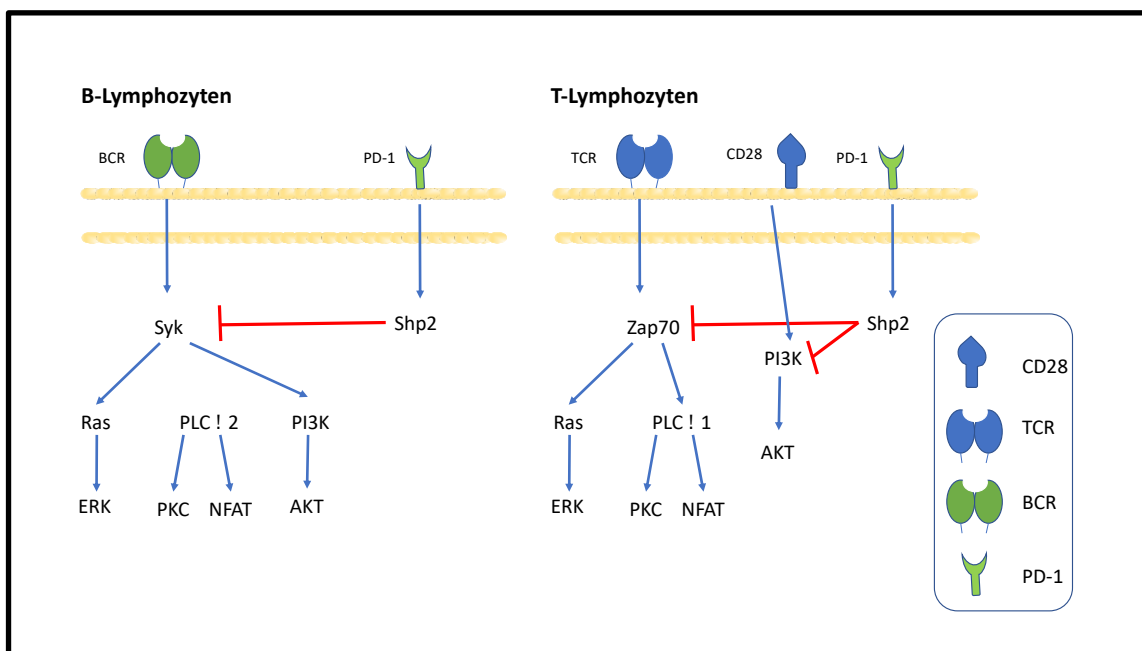
**Abbildung 3: HGF/c-MET-Signalweg.** Die Stromazellen im Tumor-Milieu setzen Pro-HGF frei, welches zu HGF aktiviert wird (1). HGF bindet an den c-Met-Rezeptor (2). Je zwei HGF/c-Met Rezeptoren bilden Dimere, dies aktiviert die Tyrosinkinase-Aktivität an der intrazellulären  $\beta$ -Domäne des c-Met-Rezeptors (3). Weitere Signalproteine wie Gab1, Grb2 und Shb2 werden aktiviert (4), die eine Aktivierungskette über PI3K/AKT, RAS/RAF (MAPK) und STAT3 auslösen. Über diese Signalwege werden Transkriptionsfaktoren aktiviert (5), die die PD-L1-Expression in den Kopf-Hals-Karzinomen induzieren [96] (6). Welche Rolle diese einzelne Signalwege in dieser PD-L1-Expression spielen, soll in dieser Arbeit aufgedeckt werden. (Abbildung erstellt und modifiziert nach [90])

### 1.3 Immuncheckpoint PD-1/PD-L1

PD-L1 gehört zur B7-Rezeptorfamilie [97] und wird auf der Oberfläche von aktivierten Lymphozyten, antigenpräsentierenden Zellen, reifen und unreifen dendritischen Zellen, IFN- $\gamma$  behandelten Monozyten und follikulären dendritischen Zellen exprimiert [98]. Weiter ist PD-L1 im Organsystem verbreitet und befindet sich auf Zellen verschiedener Organe wie der vorderen Augenkammer, des Gehirns und der Hoden [99], des mikrovaskulären Endothels [100] und weiteren Geweben [101]. Auf Tumorzellen unterschiedlicher Entitäten ist ebenfalls PD-L1 präsentiert [102]. Sein Rezeptor PD-1 ist auf aktivierten T-Zellen, B-Zellen, natürlichen Killerzellen und myeloischen Zellen exprimiert. Über die Interaktion zwischen PD-L1 und PD-1 wird die Aktivität der B- und T-Zellen reguliert und die Inflammation im jeweiligen Gewebe verhindert [103].

In Plattenepithelkarzinomen von Kopf und Hals ist von besonders erhöhter PD-L1 Expression berichtet worden [104].

Die Bindung von PD-1 an PD-L1 führt zur B- und T-Zell-Hemmung und dämpft die Immunantwort. Das geschieht, indem die gleichzeitig zur T-Zellrezeptoraktivierung stattfindende PD-L1/PD-1 Bindung zur Phosphorylierung eines intrazellulären ITS-Motivs im PD-1-Rezeptor (eng.: "immunreceptortyrosinbased switch motif") führt. Dies veranlasst die Rekrutierung der SHP-2 (eng.: "Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2"), die ihrerseits zur Dephosphorylierung bzw. Unterregulierung von Schlüsselsignalmolekülen (Syk und PI3K in den B-Lymphozyten [105], Zap70 und PI3K in den T-Lymphozyten [106]) führt, sodass keine Signalweiterleitung stattfindet bzw. die Immunantwort der B- und T-Zellen unterbleibt (Abb. 4) [107].



**Abbildung 4: PD-1 Signalweg in B- und T-Zellen.**

In den B-Lymphozyten vermittelt das dem B-Zellrezeptor (BCR) nachgeschaltete Signalmolekül Syk die Immunantwort. Die PD1/PD-L1 Bindung führt zur Hemmung des proximalen Schlüsselmoleküls Syk mithilfe der rekrutierten SHP-2. In den T-Lymphozyten wird die Immunantwort über andere Signalmoleküle (Zap70 und PI3K) vermittelt, die durch T-Zellrezeptor (TCR) und CD28aktiviert werden, diese werden ebenfalls nach PD-L1/PD-1 Bindung über rekrutierte SHP-2 dephosphoryliert und somit gehemmt [102] (Abbildung erstellt nach [102]).

## 1.4 Ziel der Arbeit

Trotz enormer Entwicklung der medikamentösen Therapie bleibt die chirurgische Intervention der entscheidende Baustein eines kurativen Therapieansatzes bei Kopf-Hals-Tumoren. Die zielgerichteten medikamentösen Therapien scheitern zum größten Teil an primären und sekundären Resistenzen, wobei von einer Aktivierung des c-MET-Rezeptors berichtet wird (siehe Kapitel 1.2). Unsere Arbeitsgruppe konnte den immunsuppressiven Einfluss von HGF auf das TME durch Hochregulation des Immuncheckpoint-Liganden PD-L1 nachweisen. Darauf aufbauend soll in dieser Arbeit anhand von vier HNSCC-Zelllinien der intrazelluläre Zusammenhang zwischen HGF/c-MET und der Expression von PD-L1 genauer untersucht werden. Folgende Fragen sollten dabei beantwortet werden:

- Welche intrazellulären Signalwege (RAS/MAPK, PI3K/AKT oder STAT3) werden in den HNSCC-Zelllinien durch HGF aktiviert?
- Welche Rolle spielen diese Signalwege bei dem durch HGF vermittelten Anstieg der PD-L1-Expression?

## 2 Material

### 2.1 Zellkulturmedien und Zusätze

**Tabelle 2: Zellkulturmedien und Zusätze:**

| <b>Name</b>                            | <b>Hersteller</b>  |
|--|--|
| MEM Alpha Medium (1x)                  | Thermo Fisher Scientific Life Technologies, Darmstadt, Deutschland |
| McCoy's 5A Medium (1x)                 | Thermo Fisher Scientific Life Technologies, Darmstadt, Deutschland |
| DMEM/F12 (1:1) (1x)                    | Thermo Fisher Scientific Life Technologies, Darmstadt, Deutschland |
| Fetal Bovine Serum                     | Thermo Fisher Scientific Life Technologies, Darmstadt, Deutschland |
| Penicillin/Streptomycin                | Thermo Fisher Scientific Life Technologies, Darmstadt, Deutschland |
| Dulbecco's Phosphate-Buffe- red Saline | Thermo Fisher Scientific Life Technologies, Darmstadt, Deutschland |
| Trypsin/EDTA Solution (0,5%/0,2%)      | Biochrom AG, Berlin, Deutschland                                   |
| Hydrocortison                          | Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt                                    |
| L-Glutamin (200 mM)                    | Thermo Fisher Scientific Life Technologies, Darmstadt, Deutschland |

### 2.2 Reagenzien und Chemikalien

**Tabelle 3: Reagenzien und Chemikalien:**

| <b>Name</b>        | <b>Hersteller</b>       |
|--------------------|-------------------------|
| Trypanblau (0,4 %) | NanoEntek, Seoul, Korea |

|  |  |
|--|--|
| APS (= Ammoniumperoxodisulfat) 10%<br>in dH2O  | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland  |
| Aqua dest.   | Hausleitung  |
| Color Prestained Protein Standard Broad<br>Range 11-245 kD   | New England Biolabs, Frankfurt a.M.,<br>Deutschland                                    |
| DC Protein Assay Kit<br>Enthält Reagenzien A, B und S  | Bio-Rad Laboratories, Heidelberg,<br>Deutschland                                       |
| DMSO<br>Dimethyl Sulphoxide Hybri Max  | Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt  |
| Isopropanol (=2-Propanol) 99,8%  | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland  |
| Kristallviolett-Lösung<br>0,5g Kristallviolett (Art. T123.1) + 100ml<br>Methanol<br>+ 400ml VE H2O | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland  |
| Lipofectamine RNAi Max Reagent (Ref.<br>13778-100)   | Invitrogen by Thermo Fisher Scientific<br>Life Technologies, Darmstadt,<br>Deutschland |
| Methanol 98%   | Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt,<br>Deutschland  |
| Milchpulver  | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland  |
| Bovines Serum Albumin  | Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt,<br>Deutschland  |
| Nitrozellulose Blotting-M. NCA2  | GE Healthcare, München, Deutschland  |
| Opti-MEM, Reduced Serum Media  | Thermo Fisher Scientific Life<br>Technologies GmbH, Darmstadt,<br>Deutschland          |
| Pierce ECL Western Blotting Substrate<br>for HRP<br>Peroxide Solution<br>Luminol Enhancer Solution | Thermo Fisher Scientific Life<br>Technologies GmbH, Darmstadt,<br>Deutschland          |

|   |  |
|---|--|
| Protein Assay Standard II                                       | Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland   |
| Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)<br>30% Acrylamid-Bisacrylamidlösung | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland            |
| Salzsäure rauchend 37%  | Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt, Deutschland |
| SDS ultra-pure  | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland            |
| TEMED p.a.  | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland            |
| Tris(Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane) 99,8%                   | Sigma Aldrich, Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Tween 20, Tensid  | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland            |
| Stripping-Puffer  | Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland            |
| RNeasy Mini Kit   | Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland             |
| Quanti Tect Reverse Transcription                               | Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland             |
| Quanti Tect SYBR Green PCR Kit                                  | Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland             |

### 2.3 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien**

| <b>Name</b>                                 | <b>Hersteller</b>   |
|---|---|
| Serologische Pipette, PS10                  | A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland                              |
| Serologische Pipette, PS25                  | A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland GmbH                         |
| Pasteurpipetten aus Glas                    | Brand GmbH, Wertheim, Deutschland                                       |
| Objekttäger für EVE™ Zellzähler             | NanoEntek, Seoul, Korea   |
| Nunc™ MicroWell™ 96- Well Mikrotiterplatten | Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland |



|  |   |
|--|---|
| Nunc <sup>TM</sup> MicroWell <sup>TM</sup> 96- Well- Conical Bottom Mikrotiterplatten, (V-Boden) | Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland   |
| Nunc <sup>TM</sup> Zellkultur-Multischalen 12-Well-Platten                                       | Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland   |
| Nunc <sup>TM</sup> Zellkultur-Multischalen 6-Well-Platten  | Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland   |
| 96-Well-Platten PCR  | BIO-RAD Laboratories Gmb, München, Deutschland                            |
| Reaktionsgefäße 1,5 ml   | SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland                                 |
| Reaktionsgefäße 2 ml   | SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland                                 |
| Pipettenspitzen 1000 µl  | Gilson®, Limburg-Offenheim, Deutschland                                   |
| Pipettenspitzen 20-300 µl epT.I.P.S.   | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland  |
| Pipettenspitzen 0,1-10 µl  | Gilson®, Limburg-Offenheim, Deutschland                                   |
| FACS Röhrchen 5ml Tubes 75x12mm, PS  | SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland                                 |
| Falcons Cellstar® Tubes  | Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland                               |
| Petrischalen Nunc <sup>TM</sup> Zell- kultur Petrischalen  | Thermo Fisher Sci- entific Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Zellkulturflaschen Nunc <sup>TM</sup> EasYFlask <sup>TM</sup> 75cm <sup>2</sup>                  | Thermo Fisher Sci entific Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland  |

|                                     |   |
|-------------------------------------|---|
| Zellschaber Cell Scraper            | SPL Life sciences Wien, Österreich                            |
| B. Braun Sterican Einmalkanülen     | B. Braun SE, Melsungen, Deutschland                           |
| BD discardit II spritze 5 ml        | Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA                         |
| zetMedica® Labor-und Kosmetiktücher | ZVG Zellstoff-Vertriebs-GmbH & Co. KG., Troidorf, Deutschland |

## 2.4 Puffer

**Tabelle 5: Puffer**

| Name                                | Zusammensetzung  |
|-------------------------------------|--|
| 1x DPBS                             | DPBS Dulbecco's Phosphate Buffered Saline; (+) CaCl <sub>2</sub> , (+) MgCl <sub>2</sub> gibco by life technologies, Thermo Fisher Scientific, USA   |
| Western Stock Solution (WSS-Puffer) | 10 mM Tris-HCl pH 7,6<br>5 mM EDTA<br>50 mM NaCl<br>30 mM Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 50 mM NaF<br>1 mM Na <sub>3</sub> V <sub>0</sub> 3 1% Triton x-1000                    |
| 6x SDS-Probenpuffer                 | 20% Glycerin (10ml)<br>4% SDS ultrapure<br>125 mM Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane)<br>3% 1,4-Dithiothreit Bromphenolblau,<br>wenige Körner auf 50ml mit dH <sub>2</sub> O<br>auffüllen |
| Western-Puffer (10 x)               | 1,9 M Glycin<br>0,25 M Tris<br>1 Liter dH <sub>2</sub> O   |

|                                  |   |
|----------------------------------|---|
| Sammelgelpuffer (4x)             | 0,5 M Tris<br>0,015 M SDS<br>pH 6,8 mit HCl<br>500ml dH2O                 |
| Trenngelpuffer (4x)              | 1,5 M Tris<br>0,015 M SDS<br>pH 8,8 mit HCl<br>500ml dH2O                 |
| Laufpuffer (1x)                  | 100ml 10x Western-Puffer<br>900ml H2O<br>5ml 20% SDS                      |
| Blot-Puffer (1x)                 | 100ml 10x Western-Puffer<br>700ml dH2O<br>200ml Methanol<br>1,5ml 20% SDS |
| 1 x TBS                          | 100ml 10 x TBS<br>900ml dH2O  |
| 10 x TBS                         | 0,2 M Tris<br>1,7 M NaCl<br>1l H2O pH 7,6                                 |
| TBS Tween (div. Konzentrationen) | 1xTBS + 0,1% Tween 20   |

## 2.5 Wachstumsfaktoren, Inhibitoren und Primer

**Tabelle 6: Medikamente, Inhibitoren und Primer**

| <b>Medikament</b>         | <b>Hersteller</b>   |
|---------------------------|---|
| HGF (PHG054)              | Gibco by life technologies, Thermo Fisher Scientific, USA |
| PHA-665752 (CatNo. S1070) | Selleckchem, München, Deutschland                         |
| Trametinib (CatNo. S2673) | Selleckchem, München, Deutschland                         |

|   |                                   |
|---|-----------------------------------|
| MK-2206 (CatNo. S1078)  | Selleckchem, München, Deutschland |
| S3I-201 (CatNo. S1155)  | Selleckchem, München, Deutschland |
| SCH772984 (CatNo. S7101)                                      | Selleckchem, München, Deutschland |
| Proteaseinhibitor cOmplete Easypack<br>(Ref. 04693116001)     | Roche, Schweiz                    |
| Phosphatase Inhibitor PhosStop<br>Easypack (Ref. 04906837001) | Roche, Schweiz                    |
| Control siRNA (Unconjugated)<br>SignalSilence® #6568          | Cell Signaling, Danvers, USA      |
| SignalSilence® p44/42 MAPK (Erk1/2)<br>siRNA #6560            | Cell Signaling, Danvers, USA      |
| ERK 1 Primer (QuantiTect Primer<br>Assay)                     | Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland  |
| ERK 2 Primer (QuantiTect Primer<br>Assay)                     | Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland  |
| β-Actin Primer (QuantiTect Primer<br>Assay)                   | Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland  |

## 2.6 Geräte

**Tabelle 7: Geräte**

| <b>Bezeichnung</b> | <b>Name</b>                              | <b>Hersteller</b>   |
|--------------------|--|---|
| Brutschrank        | HERAcell 150i CO2<br>Incubator           | Thermo Fisher Scientific Life<br>Technologies, Darmstadt,<br>Deutschland      |
| Sterilbank         | SFE 2020                                 | Thermo Fisher Scientific Life<br>Technologies GmbH, Darmstadt,<br>Deutschland |
| Zentrifuge         | Universal 320 50ml<br>Rotor/Plattenrotor | Hettich AG, Schweiz   |

|                           |   |   |
|---------------------------|---|---|
| Zentrifuge                | 5415R   | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland                |
| Zellzähler                | EVE™ Automated Cell Counter   | NanoEntek, Seoul, Korea                           |
| Mikroskop                 | Olympus CK 40   | Olympus Optical Co. GmbH, Gerstetten, Deutschland |
| Photometer                | Infinite® F50 / Robotic ELISA plate reader  | Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz                |
| Wippschüttler             | Rocking Platform  | VWR International GmbH, Bruchsal, Deutschland     |
| Wippschüttler             | Mini Rocker MR-1  | BioSan, Riga, Lettland                            |
| Durchflusszytometer       | BD FACS Calibur   | BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland            |
| Ultraschall-Homogenisator | Branson SLPt Sonicator  | Branson Ultrasonic, USA                           |
| Netzgerät                 | PeqPower 250  | VWR, USA  |
| Elektroblotter            | PerfectBlue S, semi-dry,  | VWR, USA  |
| Gelkammer                 | Doppelgelsystem,<br>PerfectBlue, Twin S, Peqlab<br><br>Gelgröße 10x10cm,<br>Glasplatten<br><br>Kamm, 0,8mm 12 Zähne<br><br>2 Spacer Sets<br><br>Giesbasis | VWR, USA  |
| ChemiDoc Imaging System   | ChemiDoc MP Imaging System  | BIO-RAD Laboratories GmbH, München, Deutschland   |

|                      |   |  |
|----------------------|---|--|
| Absauganlage         | HLC by Ditabis                            | Ditabis Digital Biomedical Imaging System AG, Pforzheim, Deutschland |
| Thermomixer          | ThermoShaker TS- 100                      | BioSan, Riga, Lettland   |
| PCR Maschine         | PCR Maschine CFX Connect Real-Time System | BIO-RAD Laboratories GmbH, München, Deutschland                      |
| Spectrophotometer    | Nano Drop 2000c                           | PeQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland                    |
| Wasserbad            | Julabo EC-5 Bad Umwälzthermostat          | Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland                                   |
| Pipettierhilfe       | Accu- Jet Pro                             | Brand GmbH, Wertheim, Deutschland                                    |
| Umwälzthermostat     | MB-5                                      | Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland                                   |
| Reagenzglasschüttler | Vortex Genie® 2 Mixer                     | Fisherscientific by Thermo Fisher Scientific, USA                    |

## 2.7 Software

**Tabelle 8: Software**

| <b>Name</b>                           | <b>Hersteller</b>   |
|---------------------------------------|---|
| Magellan™ F50 Data Analysis Software  | Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz                                    |
| Excel                                 | Microsoft, USA  |
| ImageJ und Fiji (Fiji is just ImageJ) | GitHub, San Francisco, USA  |
| PRISM                                 | GraphPad Software, USA  |
| NanoDrop 2000                         | Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| CFX Manager™                          | Bio-Rad Laboratories, USA   |

|  |  |
|--|--|
| BD CellQuest Pro (Durchflusszytometrie<br>Messung) | BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland |
| FlowJo V10.1 (Durchflusszytometrie<br>Auswertung)  | FlowJo, USA                            |

### 3 Methodik

#### 3.1 Zellkultur

Die verwendeten Zelllinien stammen entweder direkt aus Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region oder deren Metastasen. Alle verwendeten Zellen wachsen adhärent und als einschichtige Kulturen bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> in Kultur- bzw. Nährmedium im Brutschrank. Sowohl die Inkubation als auch die Bearbeitung der Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen. Abhängig von der Proliferationsrate und Konfluenz wurden die Zellen in einer bestimmten Menge (Inokulum) passagiert bzw. subkultiviert. Die Zellen wurden mithilfe von Trypsin/EDTA-Lösung in Suspension gebracht, dazu musste das verbrauchte Medium aus der Kulturflasche entfernt und die Zellkultur mit DPBS abgespült werden. Der Zellrasen wurde mit 3 ml vorgewärmten 0,05 % Trypsin/EDTA 0,02 % Lösung bedeckt und für 10 bis maximal 30 min im Brutschrank inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden mit 7 ml frischem Kulturmedium versetzt. Eine passende Menge der Suspension (siehe Tabelle 9) wurde mit 10 ml frischen Medium verdünnt und zurück in die Kulturflasche gegeben. Die restliche Zellsuspension wurde zur Zählung und für die anschließenden Versuche verwendet. Tabelle 9 zeigt den Entnahmeort, Hersteller und die passende Menge zur Subkultivierung der jeweiligen Zelllinie.

**Tabelle 9: Zelllinien mit ihrem Ursprungsort, Verdünnung für die Subkultur und Hersteller**

| <b>Zelllinie</b> | <b>Ursprungsort</b> | <b>Verdünnung für Subkultur</b> | <b>Hersteller</b>  |
|------------------|---------------------|---------------------------------|--|
| FaDu             | Pharynx             | 1:5                             | Head and Neck Cancer Panel (TCP-1012) American Type Culture Collection (ATCC), USA |
| Detroit562       | Pharynx             | 1:3                             |  |
| SCC9             | Zunge               | 1:2,5                           |  |
| SCC154           | Zunge               | 1:4                             |  |



Die Basalmedien wurden mit 10 % fetalen Kälberserum (FCS) und 1 % Pencillin/Streptomycin (P/S) versetzt. Zusätzlich wurden die Zellen regelmäßig mittels PCR auf Mycoplasmen-Kontamination getestet. Die weiteren Bestandteile der aufbereiteten Zellkulturmedien, die für die Zelllinien ideale Wachstumsbedingungen bieten, sind in der Tabelle 10 nach Zelllinie geordnet aufgeführt.

**Tabelle 10: Zusammensetzung der Zellkulturmedien**

| <b>Zelllinie</b> | <b>Kulturmedienzusammensetzung</b>                           |
|------------------|--|
| FaDu             | MEM Alpha + 10% FCS + 1% P/S                                 |
| Detroit562       |  |
| SCC9             | DMEM/F12 (+ Hepes) + 10% FCS<br>+ 1% P/S + 5µl Hydrocortison |
| SCC154           | MEM Alpha + 10% FCS + 1% P/S + 2 mM L-glutamine              |

### 3.2 Zellzählung

In der für die Experimente benutzen Zellsuspension wurde die Zellzahl routinemäßig bestimmt. Hierzu wurde 20 µl Zellsuspension entnommen und in einem 1:1 Verhältnis mit Trypanblau vermischt. 20 µl der gefärbten Zellsuspension wurde in die Zählkammer des Einweg-Objektträgers appliziert. Der Objektträger wurde in das bildbasierte automatische Zellzähler-Gerät (EVE automated cell counter) eingeführt. Dann wurde die Schärfe auf dem Bildschirm manuell eingestellt und für jede Zelllinie eine bestimmte Einstellung für die Zellgröße, Sensitivität und Form gewählt (siehe Tabelle 11). Das Gerät übernimmt die Zählung und zeigt die Konzentration der Zellen auf dem Bildschirm in Zellen/ml und den Anteil der toten Zellen an.

**Tabelle 11: Einstellung des EVE Automated cell counter je nach Zelllinie**

| Zelllinie                  | Sensitivität<br>(Farbintensität im<br>Vergleich zum<br>Hintergrund ) | Zellgröße in $\mu\text{m}$ |         | Rundheit in<br>Prozent |
|----------------------------|--|----------------------------|---------|------------------------|
|                            |  | Minimal                    | Maximal |                        |
| Fadu<br>Detroit562<br>SCC9 | 5  | 8                          | 40      | 80                     |
| SCC154                     | 7  | 5                          | 40      | 50                     |

### 3.3 Zellviabilitätsassay

In 60 Nöpfe einer 96-Well-Mikrotiterplatte wurden jeweils 8.000 Zellen in 100  $\mu\text{l}$  Medium ausgesät. Die Randnöpfe wurden mit reinem Medium ohne Zellen befüllt. Nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden 50  $\mu\text{l}$  eines in DPBS vorbereiteten Inhibitors (Trametinib oder PHA-665752) zugegeben. In die erste Spalte wurde die Ausgangskonzentration bzw. die höchste Konzentration von 60  $\mu\text{M}$  gegeben und davon ausgehend erfolgte in die Spalten nach rechts eine kontinuierliche Übertragung des Inhibitors in einer  $\log_2$  Verdünnung, wie in Tabelle 12 exemplarisch gezeigt. In die letzte mit Zellen befüllte Spalte wurde zur Kontrolle reines DPBS zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 48h (37°C, 5%  $\text{CO}_2$ ) wurden die Zellen mit Kristallviolett-Lösung gefärbt. Dazu wurde das Medium von den Zellen abgenommen, in jeden Napf 50  $\mu\text{l}$  Kristallviolett-Lösung gegeben, und die Platte für 15 Minuten auf dem Wippschüttler geschwenkt. Das überschüssige Kristallviolett in den Nöpfen wurde durch Waschen der Platten in destilliertem Wasser entfernt, und die Platte für mindestens 5 Stunden zum Trocknen bei Raumtemperatur inkubiert. Mit 100  $\mu\text{l}$  Methanol (98 %) pro Napf wurden die gefärbten Zellen durch 10 minutiges Schütteln auf einem Wippschüttler aufgelöst und die Absorption photometrisch bei 595 nm Wellenlänge mit dem Infinite F50 (Fa TECAN) bestimmt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels MS Excel und GraphPad Prism. Von jeder Wirkstoffkonzentration wurden Dreifachwerte bestimmt (siehe Tabelle 12).

**Tabelle 12: Zellviabilitätsassay, Konzentrationsübersicht einer 96-Well-Mikrotiterplatte in  $\mu\text{M}$**

|            |    |    |    |     |      |       |       |       |       |       |  |
|------------|----|----|----|-----|------|-------|-------|-------|-------|-------|--|
|            |    |    |    |     |      |       |       |       |       |       |  |
| Trametinib | 60 | 30 | 15 | 7,5 | 3,75 | 1,875 | 0,938 | 0,419 | 0,209 | 0,000 |  |
|            | 60 | 30 | 15 | 7,5 | 3,75 | 1,875 | 0,938 | 0,419 | 0,209 | 0,000 |  |
|            | 60 | 30 | 15 | 7,5 | 3,75 | 1,875 | 0,938 | 0,419 | 0,209 | 0,000 |  |
| PHA-665752 | 60 | 30 | 15 | 7,5 | 3,75 | 1,875 | 0,938 | 0,419 | 0,209 | 0,000 |  |
|            | 60 | 30 | 15 | 7,5 | 3,75 | 1,875 | 0,938 | 0,419 | 0,209 | 0,000 |  |
|            | 60 | 30 | 15 | 7,5 | 3,75 | 1,875 | 0,938 | 0,419 | 0,209 | 0,000 |  |
|            |    |    |    |     |      |       |       |       |       |       |  |

Die Randnäpfe enthalten reines Medium. In den mittleren Näpfen wurden 8000 Zellen pro Napf ausgesät, nach 24 h mit den angegebenen Wirkstoffkonzentrationen behandelt (Reihe 2,3 und 4 mit Trametinib, Reihe 5, 6 und 7 mit PHA-665752) und für weitere 48 Stunden inkubiert.

### 3.4 Stimulation mit HGF, ERK1/2-Inhibitor, AKT-Inhibitor und STAT3

#### Inhibitor

Für die Behandlung mit verschiedenen spezifischen Kinase-Inhibitoren wurden in einer 12-Well-Platte 300.000 Zellen in 1 ml des entsprechenden Nährmediums ausgesät. Nach 24 Stunden Inkubation wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen mit 1 ml DPBS gewaschen. Es wurde neues Medium mit 25 ng/ml HGF bzw. 25 ng/ml HGF in Kombination mit verschiedenen Kinase-Inhibitoren (1  $\mu\text{M}$  SCH772984 als ERK1/2-Inhibitor, 1  $\mu\text{M}$  MK-2206 als AKT-Inhibitor und 100  $\mu\text{M}$  S3I-201 als STAT3-Inhibitor) zugegeben. Zur Kontrolle wurden Zellen nur mit Medium behandelt. Die Zellen wurden für 4 h oder 24 h inkubiert, dann wurden die Zellen wie im Kapitel 3.7 beschrieben für den Western Blot vorbereitet.

### 3.5 Stimulation mit HGF und Trametinib

Für die Behandlung mit HGF und Trametinib wurden 600.000 Zellen in 2 ml Medium in den Napf einer 6-Well-Platte ausgesät. Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurde der

Überstand der Zellen abgesaugt und die Zellen mit 2 ml DPBS gewaschen. Es wurde neues Medium mit 25 ng/ml HGF bzw. 25 ng/ml HGF in Kombination mit 25 nM Trametinib zugegeben. Zur Kontrolle wurden Zellen nur mit Medium behandelt. Die Zellen wurden für 4 oder 24h inkubiert und für den Western Blot (siehe Kapitel 3.7) oder nur nach 24 h Inkubation für die Durchflusszytometrie (siehe Kapitel 3.9) vorbereitet. Für weiteren Versuch wurden die behandelten Proben nach 24 h Inkubation mit 25 nM Trametinib allein und in Kombination mit 25 ng/ml HGF behandelt und nach 24 h und 72 h für den Western Blot (siehe Kapitel 3.7) vorbereitet.

### 3.6 Erk1/2-Inhibition mittels RNA-Interferenz

Die beiden MAP-Kinasen, (eng.:“ mitogen activated protein kinase,„) ERK1 und ERK2 besitzen eine Sequenzähnlichkeit von 84 %. Sie werden zudem parallel aktiviert und teilen sich mehrere Funktionen in der Zelle, sodass sie unter der gemeinsamen Bezeichnung ERK1/2 zusammengefasst werden [120].

Der Einsatz von spezifischer siRNA ermöglicht den Abbau der mRNA von ERK1 und ERK2. Bei Abnahme der zur Verfügung stehenden mRNA nimmt die Proteinbiosynthese ab. Da somit weniger Protein zur Verfügung steht, kann dies Auswirkungen auf die durch ERK1/ERK2 ausgeführten Funktionen in der Zelle haben.

Zum Abbau der Erk1/2 mRNA mittels RNA-Interferenz wurden die Zellen ausgesät und zeitgleich mit der spezifischen siRNA transfiziert. Nach der Zellzahlbestimmung wurde eine Zellsuspension auf 600.000/ml Zellen verdünnt und in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen im Brutschrank zur Vorbereitung der Transfektionslösung bereitgestellt. Die Werkbank samt Pipetten und Reagenzienstände wurden sorgfältig desinfiziert. Mit frischen Handschuhen und Verbrauchsmaterial wurde der Transfektionsansatz wie folgt vorbereitet:

Für jedes ml einer Zellsuspension wurde 100 µl serum-reduziertes Medium (Opti-MEM) mit 1 µl siRNA (10 µM ERK1/2 siRNA oder Kontroll-siRNA) und 3 µl Lipofectamin (RNAiMAX) vorbereitet. Die siRNA und das Lipofectamin wurden zuerst getrennt in 50 µl Opti-MEM vorbereitet, dann vermischt und für 10 bis 15 min bei Raumtemperatur belassen. Auf den Boden einer 6-Well-Platte wurden 200 µl dieses

Transfektionsansatzes mit 2 ml Zellsuspension aufgetragen und durch lineare Bewegung verteilt.

Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen mit DPBS gewaschen. Sowohl die mit ERK1/2-siRNA transfizierten wie auch die mit der Kontroll-siRNA transfizierten Zellen wurden für 48h mit 50 ng/ml HGF oder mit 2 ml reinem Kulturmedium behandelt und anschließend für Western Blot (siehe Kapitel 3.7) oder qPCR (siehe Kapitel 3.8) vorbereitet.

### 3.7 Western Blot

In dieser Arbeit wurden verschiedene Schlüsselproteine von intrazellulären Signalwegen (STAT3, AKT und ERK1/2) generell aber auch speziell in ihrem phosphoryliertem bzw. aktiviertem Zustand mittels SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidelektrophorese) und anschließendem Western Blot nachgewiesen, um ihre Rolle bei der Erhöhung der PD-L1 Expression nach c-MET-Aktivierung aufdecken zu können.

#### 3.7.1 Probenvorbereitung

Das Medium der für den Western Blot ausgesäten Zellen wurde abgesaugt und die Zellen mit 2 ml kalten DPBS abgewaschen. Die Zellen wurden in jeweils 110 µl kalten Lyse-Puffer abgeschabt und sofort gekühlt. Der Lyse-Puffer wurde im Voraus vorbereitet, hier wurde in 10 ml WSS-Puffer (Western Stock Solution) jeweils eine Tablette Phosphatase- und Protease-Inhibitor aufgelöst und im Kühlschrank kaltgehalten. Der Zellaufschluss erfolgte mit Hilfe eines Ultraschall-Homogenisators. Hierfür wurde die Spitze der Ultraschallsonde im Mikroreaktionsgefäß mit der Probe platziert, die Probe für 20 Sekunden mit vertikalen Bewegungen bei 20 kHz und einer Amplitudenregelung von 14 % beschallt und anschließend wieder gekühlt gelagert.

Um eine vergleichbare Proteinkonzentration in allen Proben zu erzielen, wurden die Proteinkonzentration nach der Lowry-Methode (Lowry et al., 1951) bestimmt. Dazu wurde das DC Protein Assay Kit von BioRad verwendet. Für die Messung wurden von

jeder Probe zwei Mal 5 µl in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Zur Kontrolle stand eine Standardlösung (1,6 mg/ml) von BioRad zur Verfügung, daraus wurden durch eine schrittweise 1:1 Verdünnung mit WSS-Puffer drei weitere Kontrollproben hergestellt. Von den vier Kontrollen wurden ebenfalls 5 µl jeweils zweimal in die 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Sowie die Kontrollen als auch die Proben wurden jeweils mit 25 µl einer vorbereiteten Lösung (A') versetzt, welche aus 1 ml Reagenz (A) und 20 µl Reagenz (S) des DC-Protein-Kits besteht. Zusätzlich wurden in einem nächsten Schritt zu jeder Probe 200 µl Reagenz (B) des DC-Protein-Kits hinzugefügt. Die Mikrotiterplatte wurde für 20 Sekunden im Mikrotiterplatten-Photometer (Infinite F50 von TECAN) geschüttelt und für 15 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur belassen. Anschließend erfolgte die photometrische Messung bei 750 nm Wellenlänge. Die Auswertung erfolgte über die Computerprogramme Magellan F50 und MS Excel. Mithilfe der so bestimmten und gemittelten Absorptionswerte wurden die Probenmengen so angeglichen, dass von jeder Probe die gleiche Proteinmenge auf das SDS-Gel aufgetragen wurde. Proben mit zu hohem Proteingehalt wurden entsprechend mit WSS-Puffer verdünnt.

Die angeglichenen Proben wurden mit 6xSDS-Probenpuffer versetzt (1x konzentriert eingesetzt) und für 5 min im 95° C heißen Wasserbad denaturiert.

### 3.7.2 SDS-PAGE und Proteintransfer

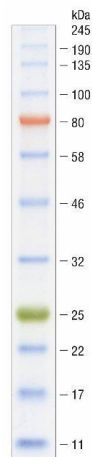
Die Bestandteile für das Trenngel wurden zusammengemischt (Tabelle 14), zwischen zwei SDS-PAGE-Platten gegossen und das Gel mit einer kleinen Menge Isopropanol (99,5 %) überschichtet. Nachdem das Trenngel auspolymerisiert war, wurde das Isopropanol entfernt, die Sammelgelmischung (Tabelle 14) eingegossen und der Probenkamm eingesteckt.

Nachdem die Polymerisation beendet war, wurde der Probenkamm entfernt und Laufpuffer in die Kammern der Elektrophoreseapparatur eingefüllt. Von jeder Probe wurden 20 µl auf das Gel aufgetragen. Mindestens in eine der 12 Taschen wurde 8 µl Proteinmarker (Color Prestained Proteinstandard, 11-245) (Abb. 5) aufgetragen. Die

SDS-PAGE erfolgte zuerst für ~ 10 min bei 0,02 A pro Gel, bis die Proben das Sammelgel passiert hatten, anschließend für ~50 min bei 0,035 A pro Gel.

**Tabelle 14: Zusammensetzung des Polyacrylamidgels**

|                                  | 12% Trenngel          | 6% Sammelgel         |
|----------------------------------|-----------------------|----------------------|
| Puffer                           | Trenngel-Puffer 5,5ml | Sammelgel-puffer 3,5 |
| 30% Acrylamid-Bisacrylamidlösung | 8,8 ml                | 2,8 ml               |
| dH2O                             | 7,8 ml                | 7,6 ml               |
| 10% APS                          | 374 µl                | 168 µl               |
| Temed p.a.                       | 30,8 µl               | 14 µl                |



**Abbildung 5: Color Prestained Protein Standard, 11-245 kDa** Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von England Biolabs

Nach der SDS-PAGE wurde das Gel aus den Glasplatten befreit und in der Mitte eines Transfer-Sandwichs, das aus vier in Blotpuffer getränkten Filterpapieren und einer Nitrozellulose-Membran bestand, auf der Blot-Apparatur aufgebracht. Die Nitrozellulose-Membran lag dabei in Richtung des positiven Pols der Apparatur direkt unterhalb des SDS-Gels. Zur Proteinübertragung wurde eine Stromstärke von 0,06 A pro Gel für 2 Stunden angewendet.

### 3.7.3 Immundetektion

Nach der Proteinübertragung wurde die Nitrozellulose-Membran in 5% Milchpulver-TBS-Lösung auf einem Wippschüttler eine Stunde geschwenkt. Danach wurde die Membran in einem 50 ml-Reaktionsröhrchen mit 5 ml Primärantikörper-Lösung (Tabelle 15) auf dem Rollmischer über Nacht bei 4° C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Membran entnommen und dreimal für 5 Minuten mit TBS/0,1% Tween auf dem Wippschüttler gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem in TBS gelöstem Sekundärantikörper (Tabelle 16) für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Wippschüttler. Es folgten drei weitere Waschschrirte für jeweils 20 Minuten mit TBS/0,1% Tween. Luminol- und Peroxid-Reagenzien (Pierce ECL Western Blotting Substrat) wurden in einem 1:1 Verhältnis vermischt und mit der Membran für 2 min inkubiert. Unmittelbar danach wurde die Lichtemission durch das ChemiDoc-Imaging-System detektiert und digitalisiert.

Für die Detektion weiterer Proteine (maximal zwei weitere) wurde die Membran für 10 min auf dem Wippschüttler im Stripping Puffer geschwenkt, danach wurde die Membran 5 Mal jeweils 5 Minuten mit TBS gewaschen. Anschließend konnte die Membran nach einem erneuten Blockierungsschritt (eine Stunde in 5% Milchpulver-TBS-Lösung) mit weiteren Antikörpern inkubiert werden.



**Tabelle 15: Primär-Antikörper**

| Primär- AK      | Verdünnung | Primär-AK-Lösung                               | Art       | Molekulargewicht des Zielproteins | Hersteller                                    |
|-----------------|------------|--|-----------|-----------------------------------|---|
| PD-L1 (13684)   | 1:1000     | (5% Milchpulver + 0,1% Tween) in 1x TBS        | Kaninchen | 40-50 kDa                         | Cell Signaling, Danvers, USA                  |
| P-Erk1/2 (4370) | 1:2000     | (5% Milchpulver + 0,1% Tween) in 1x TBS<br>TBS | Kaninchen | 42, 44 kDa                        | Cell Signaling, Danvers, USA                  |
| Erk1/2 (9107)   | 1:2000     | (5% Milchpulver + 0,1% Tween) in 1x TBS        | Maus      | 42, 44 kDa                        | Cell Signaling, Danvers, USA                  |
| P-Akt (4060)    | 1:1000     | (5% BSA + 0,1% Tween) in 1x TBS                | Kaninchen | 60 kDa                            | Cell Signaling, Danvers, USA                  |
| Akt (4691)      | 1:1000     | (5% Milchpulver + 0,1% Tween) in 1x TBS        | Kaninchen | 60 kDa                            | Cell Signaling, Danvers, USA                  |
| P-Stat3 (9145)  | 1:500      | (5% BSA + 0,1% Tween) in 1x TBS                | Kaninchen | 79, 86 kDa                        | Cell Signaling, Danvers, USA,<br>Danvers, USA |

|                |        |   |           |            |                              |
|----------------|--------|---|-----------|------------|------------------------------|
| Stat3 (9139)   | 1:500  | (5% Milchpulver + 0,1% Tween) in 1x TBS | Maus      | 79, 86 kDa | Cell Signaling, Danvers, USA |
| MEK 1/2 (3958) | 1:1000 | (5% Milchpulver + 0,1% Tween) in 1x TBS | Kaninchen | 45 kDa     | Cell Signaling, Danvers, USA |
| Vinculin(1390) | 1:1000 | (5% Milchpulver+ 0,1% Tween) in 1x TBS  | Kaninchen | 124 kDa    | Cell Signaling, Danvers, USA |

**Tabelle 16: Sekundär-Antikörper**

| Sekundär-AK                                     | Verdünnung | Sekundär-AK-Lösung | Art       | Hersteller                   |
|---|------------|--------------------|-----------|------------------------------|
| Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulin/HRP | 1:10000    | TBS                | Kaninchen | Dako, Dänemark               |
| Anti-rabbit IgG, HRP linked Antibody (7074S)    | 1:4000     | TBS                | Ziege     | Cell Signaling, Danvers, USA |

### 3.8 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Um den Erfolg der in Kapitel 3.6 beschriebenen Transfektion mit ERK1/2-siRNA nachweisen zu können, wurde die RNA der transfizierten Zellen extrahiert, mithilfe von Primern die mRNA zu cDNA amplifiziert und diese mittels qPCR analysiert.

Zur Kontrolle der Transfektion erfolgte keine Stimulation der Zellen. Das Medium wurde 48 Stunden nach der Transfektion gegen frisches Medium ausgetauscht. Nach weiteren 48 Stunden wurden die Zellen nach einem Waschschrift mit DPBS mit 0,5 ml Trypsin/EDTA Lösung abgelöst und mit 1,5 ml DPBS versetzt.

### 3.8.1 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion wurde mit dem RNeasy Mini Kit der Firma QIAGEN nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Zellen wurden 5 Minuten bei 300 g zentrifugiert und mittels einer 0,9 mm-Injektionskanüle mit 5 ml sterilen Spritze durch mehrmaliges Auf- und Absaugen in 350 µl RLT-Puffer resuspendiert. Es wurde 350 µl 70 % Ethanol hinzugefügt und das Gemisch auf eine RNeasy Mini-Säule überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt von 15 Sekunden bei 8000 g wurde der Durchlauf verworfen und die Membran in der Mini-Säule mit 700 µl RW1 Buffer durch 15 Sekunden Zentrifugation bei 8000 g gewaschen. Nach 2 weiteren Waschschriften mit 500 µl RPE-Puffer für 15 Sekunden und 2 Minuten Zentrifugation bei 8000 g wurde die Säule in ein frisches Mikroreaktionsgefäß gesetzt und die RNA mit 40 µl RNase-freiem Wasser durch 60 Sekunden Zentrifugation bei 8000 g von der Säule eluiert.

Die Proben wurden für die Versuchsdauer kühl gehalten und die Temperatur der Zentrifuge auf 4° C eingestellt.

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration in den Proben wurde ein Absorptionsspektrum von 220-350 nm aufgenommen (NanoDrop™ 2000/2000c, ThermoFischer) und quantitativ und qualitativ beurteilt. Die Absorption bei 260 nm wurde als Maß für die RNA-Konzentration herangezogen. Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zur Absorption bei 280 nm wurde bestimmt um die Reinheit der Proben zu kontrollieren.

### 3.8.2 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Die gewonnene RNA wurden mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Es wurde das Quantitect Reverse

Transcription-Kit (QIAGEN®, Venlo, Niederlande) verwendet, bei dem noch in der Lösung vorhandene DNA durch eine Behandlung mit DNase entfernt wird. 1 µg RNA wurde mit 12 µl RNase-freiem Wasser versetzt, 2 µl DNA Wipeout-Puffer (QIAGEN®, Venlo, Niederlande) zugegeben und für 2 Minuten bei 42° C inkubiert. Ein Mastermix bestehend aus 1µl Reverse Transkriptase, 1µl RT-Primer-Mix und 4 µl RT-Puffer (QIAGEN®, Venlo, Niederlande) pro Probe wurde zugefügt, und der Reaktionsansatz bei 42° C für 15 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde durch eine weitere Inkubation für 3 Minuten bei 95° C gestoppt. Die synthetisierte cDNA wurde mit RNase-freiem Wasser auf eine Konzentration von 1,8 ng/µl eingestellt.

### 3.8.3 qPCR

Von jeder Probe wurden jeweils 11 µl cDNA ( $\cong$  20 ng cDNA) in 6 Näpfe einer 96-Well-PCR-Mikrotiterplatte pipettiert. In je zwei der 6 Näpfe wurde jeweils 1,5 µl Primer von einem der drei verwendeten Primer (für ERK 1, Erk 2 und  $\beta$ -Actin als Haushaltgen) pipettiert. Zusätzlich wurde zu jedem Napf 12,5 µl QuantiTect® SYBR® Green Master Mix (QIAGEN®, Venlo, Niederlande) gegeben, so dass das gesamte Endvolumen 25 µl betrug. Die 96- PCR -Well-Mikrotiterplatte wurde vor der qPCR mit einer zugehörigen Klebefolie abgedeckt.

Die qPCR wurde mithilfe des Bio-Rad CFX Connect Real-Time Systems (Bio Rad, München, Deutschland) durchgeführt. Der Ablauf der Reaktion ist in Tabelle 17 dargestellt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte nach der delta delta ct Methode mit Hilfe der Software Excel (Microsoft Office) [108].

**Tabelle 17: qPCR-Programm**

| Phase      | Schritt 1<br>(Intialisierung) | Schritt 2<br>(Denaturierung)                   | Schritt 3<br>(Annealing) | Schritt 4<br>(Elongation) |
|------------|-------------------------------|--|--------------------------|---------------------------|
| Temperatur | 95° C                         | 94° C  | 54° C                    | 72° C                     |
| Dauer      | 15 Min                        | 15 Sek   | 30 Sek                   | 30 Sek                    |
|            |                               | Schritt 2 bis Schritt 4 wird 40 mal wiederholt |                          |                           |

Mit der  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Methode wurde die relative Änderung der untersuchten mRNA quantifiziert [109]. Die Differenz zwischen dem Ct-Wert der zu untersuchenden mRNA (ERK1/2-mRNA) und der Haushaltsprotein-mRNA (Actin-mRNA) wurde in der jeweiligen Zellprobe als  $\Delta CT$  angegeben [ $\Delta CT = Ct(\text{ERK1/2-mRNA}) - Ct(\text{Actin-mRNA})$ ]. Diese Differenz war nach siRNA-Transfektion, aufgrund des Abbaus der zu untersuchenden mRNA, in den behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen vergrößert.

Die Subtraktion der Differenz in den Kontrollzellen von der Differenz der behandelten Zellen ergab den  $\Delta\Delta CT$ -Wert [ $\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{behandelte Zellen}) - \Delta CT(\text{Kontrollproben})$ ]. Aus der Formel  $[(2^{-\Delta\Delta CT}) * 100]$  ergab sich die relative mRNA-Abnahme im Vergleich zur Kontrollprobe (100 %).

### 3.9 Durchflusszytometrie

Hier wurde der Effekt von HGF und HGF mit gleichzeitiger Trametinib-Behandlung auf das PD-L1-Protein auf der Zelloberfläche der Tumorzellen untersucht.

Der Versuch wurde mit den Zelllinien Detroit562 und SCC154, wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben, durchgeführt. Nach 24 Stunden Inkubation mit HGF bzw. HGF und Trametinib und einem Waschschriff mit 2 ml DPBS wurden die Zellen mit 0,5 ml Trypsin/EDTA abgelöst und in 1,5 ml kaltem DPBS überführt. Nach 2 min Zentrifugation bei 400 g wurden die Zellen in 400  $\mu\text{l}$  kalter 0,5 % BSA/DPBS-Lösung aufgenommen und nochmals zentrifugiert. Das Pellet wurde wieder in 400  $\mu\text{l}$  0,5 % BSA/DPBS aufgenommen und die Zellsuspension jeweils in 2 Näpfe einer 96-Well-Mikrotiterplatte (mit V-Boden) aufgeteilt. Die 96-Well-Mikrotiterplatte wurde für 5 Minuten bei 1500 g zentrifugiert. Der Überstand der Zellen wurde entfernt und die Zellen des einen Napfes zur Kontrolle in 200  $\mu\text{l}$  0,5% BSA/DPBS aufgenommen. Die Zellen des zweiten Napfes wurden zur Immunfärbung in 200  $\mu\text{l}$  der APC-PD-L1-Antikörper-Lösung (1:200 5% BSA/DPBS) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 30 Minuten im Kuhlschriff (4° C) wurde die 96-Well-Mikrotiterplatte bei 1500 g zentrifugiert und der Überstand entsorgt. Danach folgten 2 weitere Waschschriffe mit jeweils 200  $\mu\text{l}$  0,5% BSA/DPBS.

Zur Messung wurden die Zellen in 500 µl 5% BSA/DPBS aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Für die gesamte Zeit wurden die Zellen auf Eis gekühlt.

Unmittelbar vor der Messung wurden die Proben auf dem Vortexmischer kurz vermischt und im Durchflusszytometer gemessen. Es wurde eine Zellzahl von 10.000 Zellen pro Messung angestrebt. Die generierten Daten wurden anschließend mit der Software FlowJo eingelesen und bearbeitet. Dabei konnte die mittlere Fluoreszenzintensität aller untersuchten Zellen ermittelt werden. Diese mittlere Intensität nimmt bei Zunahme von PD-L1 auf der Zelloberfläche zu und umgekehrt. Um auszuschließen, dass eine durch die Behandlung der Zellen hervorgerufene Änderung der Größe oder Granularität Einfluss auf die Messung nimmt, wurde jede Probe zusätzlich ungefärbt gemessen.

### 3.10 Auswertung und Statistik

Die Quantifizierung und Bearbeitung der Western Blot-Signale erfolgte mithilfe der Software ImageJ [110]. Die Signale wurden mit Hilfe der Signale des Haushalt-Proteins angeglichen und in Relation zur Kontrolle gesetzt. Die phosphorylierte Proteinform wurde an das Signal für die gesamte Menge des jeweiligen Proteins angeglichen. Die Western Blot-Bilder wurden mit Hilfe der erweiterten Software Fiji (Distribution von Image J) quantifiziert. Die mathematischen Operationen ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) wurde mit der Software MS-Excel ausgeführt und die statistische Analyse (ungepaarter einseitiger t-Test) der Ergebnisse, die mindestens dreimalig durchgeführt wurden, wurde mit der Software Prism (GraphPad, USA) durchgeführt. Auch die bildliche Darstellung der Ergebnisse in Balkendiagramme erfolgte mit Prism. Wenn möglich wird, zusätzlich zu einem repräsentativen Einzelergebnis, eine Zusammenfassung der Einzelergebnisse gezeigt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Western Blot zum Nachweis der Rolle der Signalwege (MAPK/ERK, PI3K/AKT und STAT3) bei der erhöhten PD-L1-Expression nach HGF-Stimulation

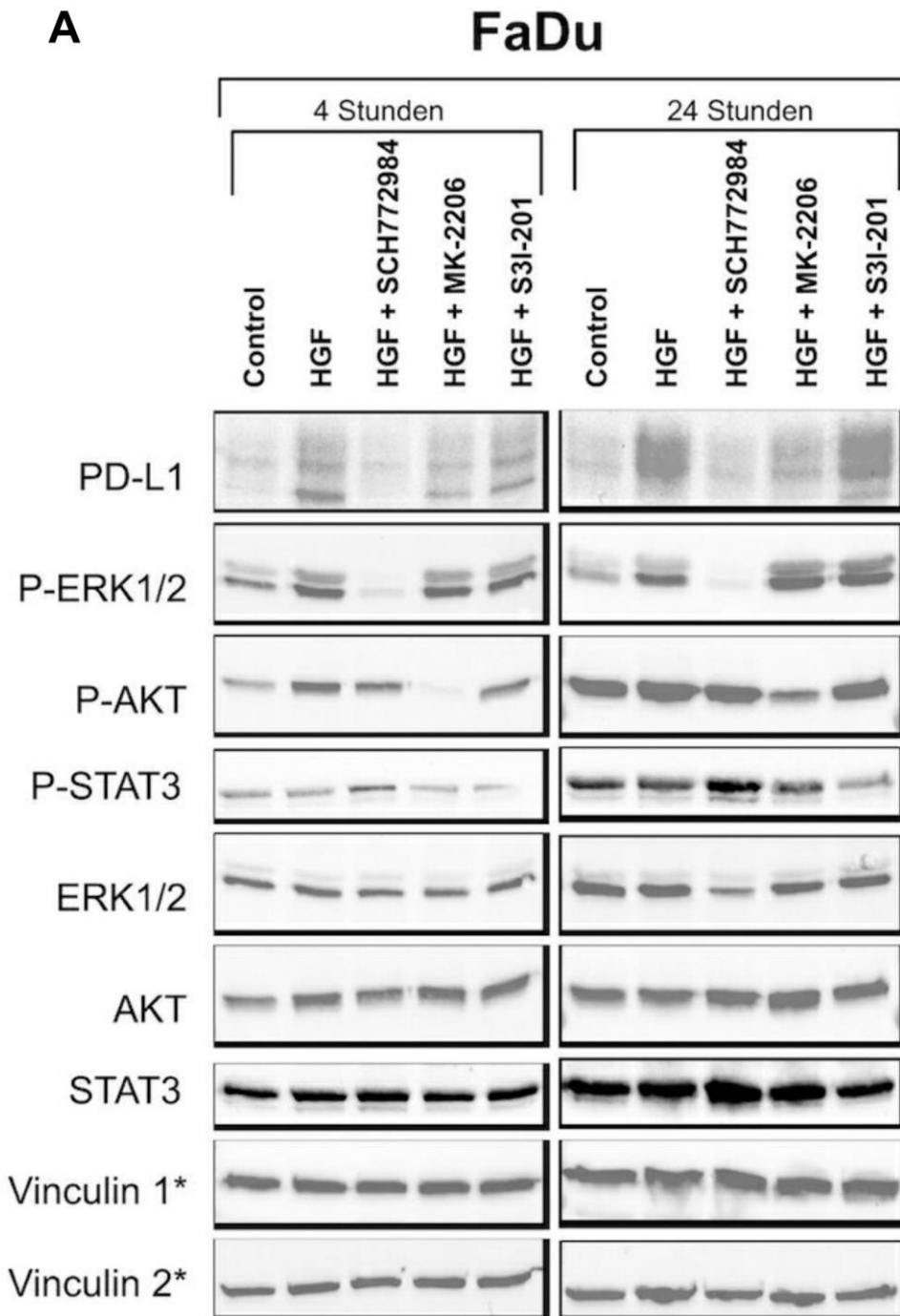
In den ersten Versuchen wurden von jeder Zelllinie fünf Ansätze ausgesät. Der erste Ansatz blieb unbehandelt und diente als Kontrolle. Die zweite Probe wurde mit 50 ng/ml HGF behandelt, um den Einfluss auf die untersuchten Signalwege im Zusammenhang mit der Expression von PD-L1 nachzuvollziehen. Die restlichen drei Proben wurde simultan mit HGF und einem spezifischen Inhibitor, der sich gegen einen von drei Signalwegen richtet, behandelt. Der MAPK/ERK-Signalweg wurde mit dem ERK1/2-Inhibitor SCH772984 [111], der PI3K/AKT-Signalweg mit dem AKT-Inhibitor MK-2206 [112] und der STAT3-Signalweg mit dem STAT3-Inhibitor S3I-201 [113] inhibiert.

Nach 4 bzw. 24 h Inkubation bei 37°C wurden mittels Western Blot das Protein PD-L1 und die phosphorylierten Formen der Signalproteine STAT3, AKT und ERK1/2 detektiert. Zum Vergleich wurde ebenso die Gesamtproteinmenge der Signalproteine detektiert. Das Signal des Proteins Vinculin diente als Ladekontrolle.

#### 4.1.1 FaDu-Zelllinie

Die FaDu-Zelllinie zeigte (Abb. 6) nach der Stimulation mit HGF im Vergleich zu der Kontrollprobe überall einen Anstieg von PD-L1 und P-ERK1/2. Die Phosphorylierung von AKT war 4 h nach HGF-Zugabe erhöht, nach 24 h war diese Phosphorylierung mit der Kontrollprobe vergleichbar, dies könnte an der mit der Zeit abnehmenden HGF-Stimulation und der zunehmenden Phosphorylierung von AKT in der Kontrollprobe liegen. Der ERK1/2-Inhibitor konnte die Phosphorylierung von ERK1/2 und den PD-L1-Anstieg verhindern. Zusätzlich ließ sich beobachten, dass die Hemmung des AKT-Signalwegs neben der erwarteten P-AKT-Reduktion zu einer partiellen Hemmung des PD-L1-Anstiegs führte. Beim STAT3-Signalweg konnte kein direkter Zusammenhang zur HGF-Stimulation oder der PD-L1-Expression festgestellt werden. HGF-Stimulation

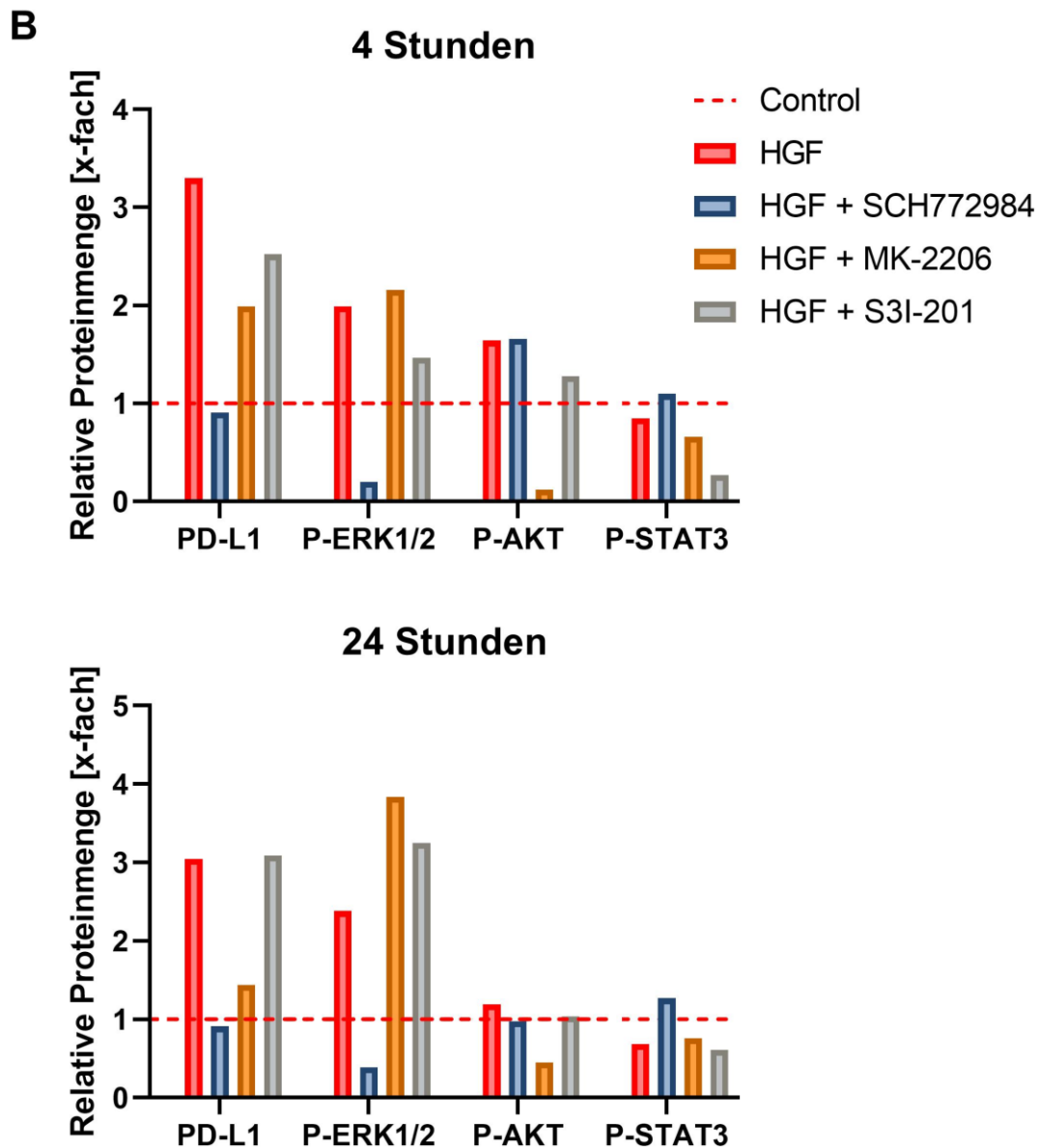
fürte nicht zu einem Anstieg der STAT3-Phosphorylierung und die Zugabe des entsprechenden Inhibitors konnte zwar die Menge an nachgewiesenem P-STAT3 reduzieren, allerdings ohne Einfluss auf die nachgewiesene Menge von PD-L1.



**Abbildung 6: Western Blot zum Nachweis der Rolle der MAPK/ERK, PI3K/AKT und STAT3-Signalwege bei der erhöhten PD-L1-Expression nach HGF-Stimulation in FaDu.** A) Links sind die nachgewiesenen Proteine bzw. Protein-Varianten angegeben, oberhalb das Behandlungsschema (SCH772984= ERK1/2-Inhibitor, MK-2206= AKT-Inhibitor, S3I-201= STAT3-Inhibitor) mit der jeweiligen Inkubationszeit. HGF-Behandlung führt zu einem Anstieg von PD-L1 und P-ERK. Das Signal



von P-AKT ist nach 4 h HGF-Stimulation erhöht. Der PD-L1-Anstieg wird durch ERK1/2-Hemmung komplett und durch AKT-Hemmung partiell verhindert. Vinculin\*1: Ladekontrolle für PD-L1, P- ERK1/2, ERK1/2 und STAT3. Vinculin\*2: Ladekontrolle für P-AKT, AKT und P-STAT3.

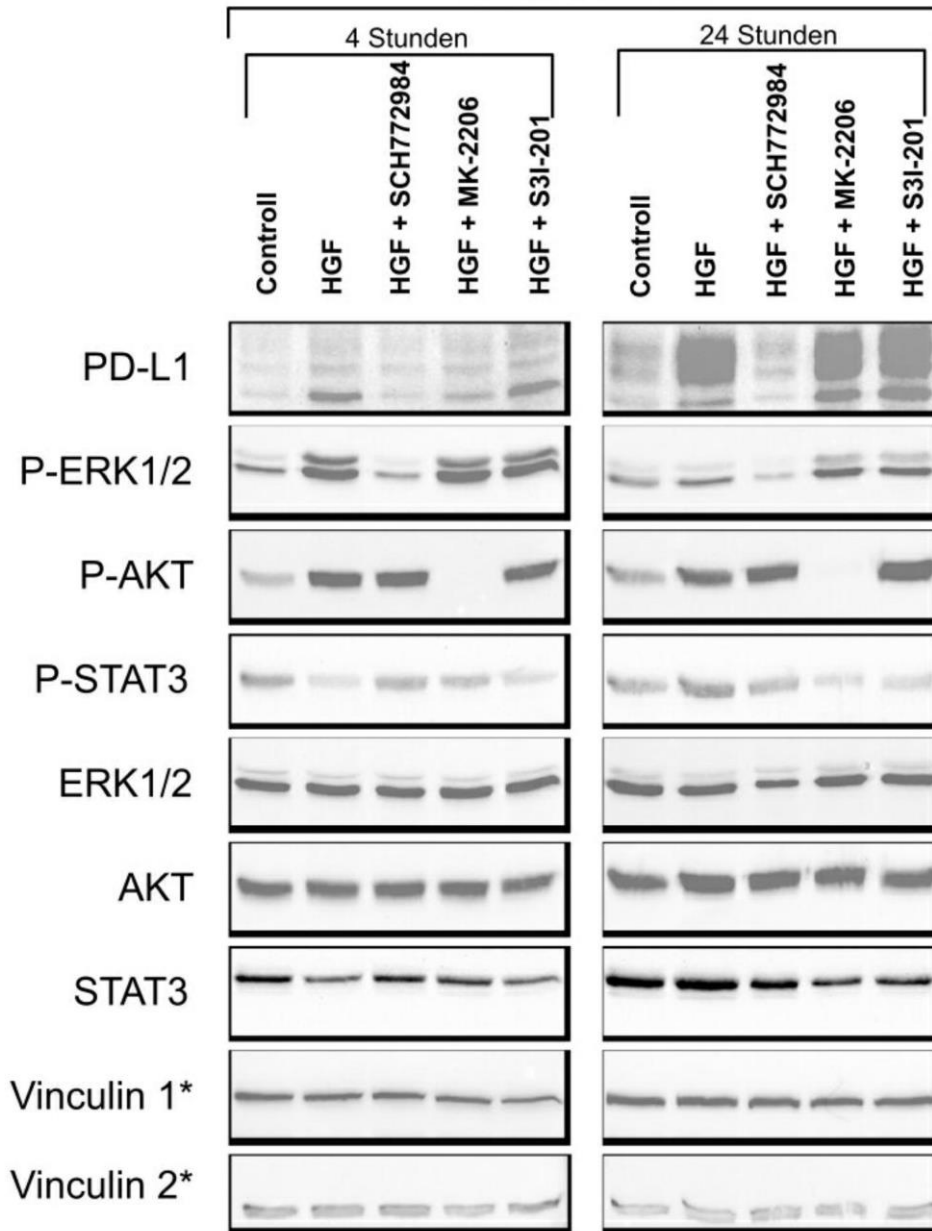


**Abbildung 6: Western Blot zum Nachweis der Rolle der MAPK/ERK, PI3K/AKT und STAT3-Signalwege bei der erhöhten PD-L1-Expression nach HGF-Stimulation in FaDu.** B) Balkendiagramm der mit ImageJ quantifizierten Signale des in A gezeigten Blots. Die Angleichung erfolgte an das jeweilige Signal für Vinculin und die Normierung zum Signal der jeweiligen Kontrolle. Zusätzlich wurden die Signale für phosphorylierte Proteinformen an die jeweiligen Signale für das gesamte Protein angeglichen.

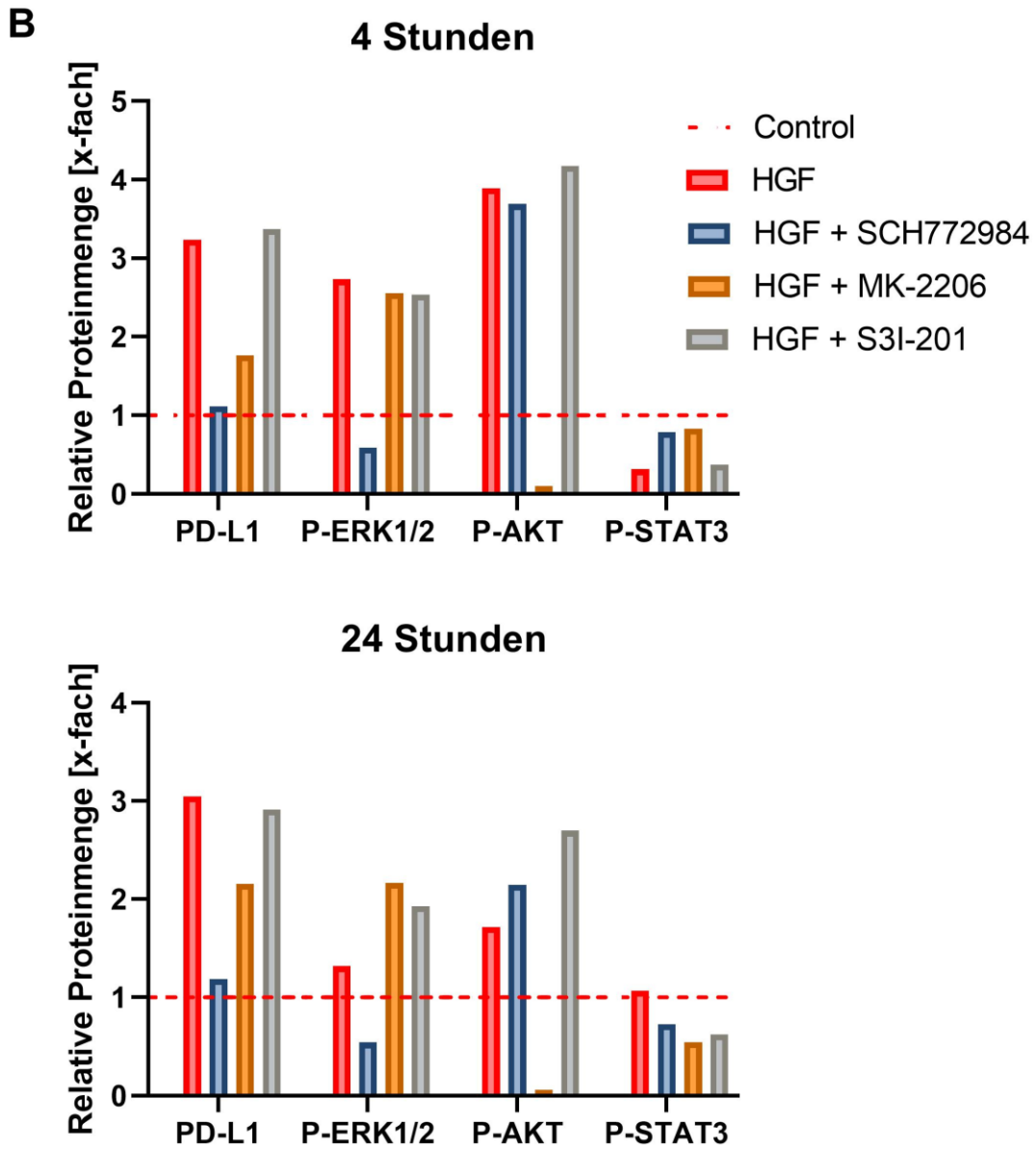
#### 4.1.2 Detroit562-Zelllinie

Der MAPK/ERK-Signalweg dirigierte ebenfalls in der Detroit562-Zelllinie den durch HGF induzierten Anstieg der PD-L1-Expression (Abb. 7). Nach 4 h HGF-Stimulation ließ sich eine verstärkte Phosphorylierung von ERK1/2 nachweisen, nach 24 h war die Menge an phosphoryliertem Protein in der Kontrollprobe und den HGF stimulierten Proben wieder auf dem gleichen Niveau. Zugabe von ERK1/2-Inhibitor verhinderte neben dem Anstieg von P-ERK1/2 auch den Anstieg der PD-L1-Konzentration. Der AKT-Signalweg wurde durch HGF aktiviert, feststellbar am Anstieg des nachgewiesenen P-AKT. Die AKT-Hemmung führte entsprechend zu einem stark verringerten Nachweis an P-AKT und zu einem teilweise verringerten Anstieg der durch HGF hervorgerufenen erhöhten PD-L1-Konzentration.

Die Menge an nachgewiesenem P-STAT3 war zwar geringer in der mit HGF stimulierten und auch in der gleichzeitig mit Inhibitor behandelten Probe, jedoch korrespondierte dies mit einer gleichzeitigen Abnahme des STAT3-Gesamtproteins. Eine Aktivierung dieses Signalwegs durch HGF oder ein Einfluss der Inhibition ließ sich also nicht nachweisen. Ein Einfluss des STAT3-Inhibitors auf die HGF-induzierte PD-L1-Zunahme ließ sich ebenfalls nicht feststellen.

**A****Detroit562**

**Abbildung 7: Western Blot zum Nachweis der Rolle der MAPK/ERK, PI3K/AKT und STAT3-Signalwege bei der erhöhten PD-L1-Expression nach HGF-Stimulation in Detroit562.** A) Links sind die nachgewiesenen Proteine bzw. Protein-Varianten angegeben, oberhalb das Behandlungsschema (SCH772984= ERK1/2-Inhibitor, MK-2206= AKT-Inhibitor, S3I-201= STAT3-Inhibitor) mit der jeweiligen Inkubationszeit. HGF führt zu einem Anstieg von PD-L1 und P-AKT. Das Signal von P-ERK1/2 ist nach 4 h HGF-Stimulation erhöht. Der PD-L1-Anstieg wird durch ERK1/2-Hemmung komplett und durch AKT-Hemmung partiell verhindert. Vinculin\*1: Ladekontrolle für PD-L1, P- ERK1/2, ERK1/2 und STAT3. Vinculin\*2: Ladekontrolle für P-AKT, AKT und P-STAT3.



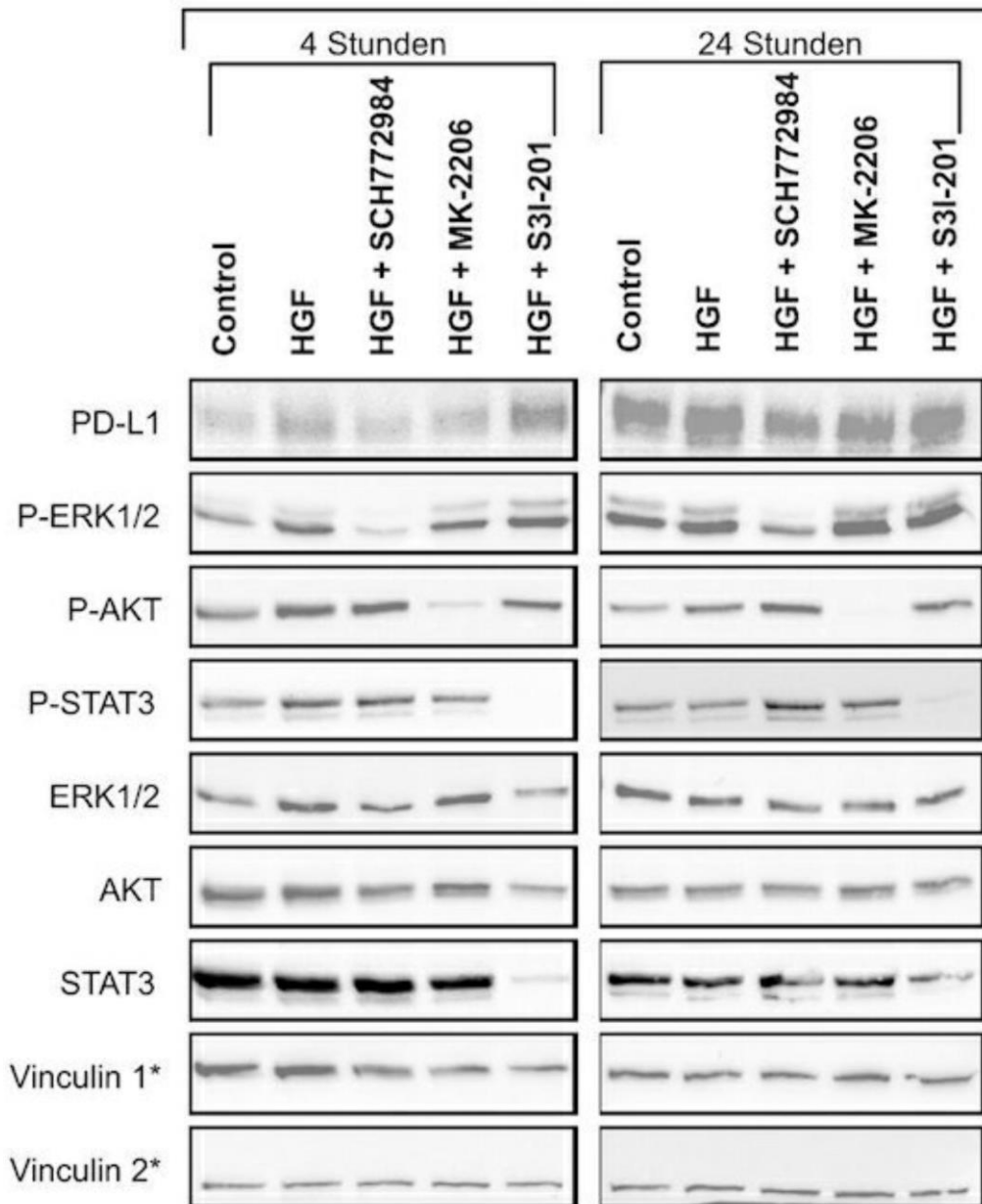
**Abbildung 7: Western Blot zum Nachweis der Rolle der MAPK/ERK, PI3K/AKT und STAT3-Signalwege bei der erhöhten PD-L1-Expression nach HGF-Stimulation in Detroit562. B)** Balkendiagramm der mit ImageJ quantifizierten Signale des in A gezeigten Blots. Die Angleichung erfolgte an das jeweilige Signal für Vinculin und die Normierung zum Signal der jeweiligen Kontrolle. Zusätzlich wurden die Signale für phosphorylierte Proteinformen an die jeweiligen Signale für das gesamte Protein angeglichen.

#### 4.1.3 SCC9-Zelllinie

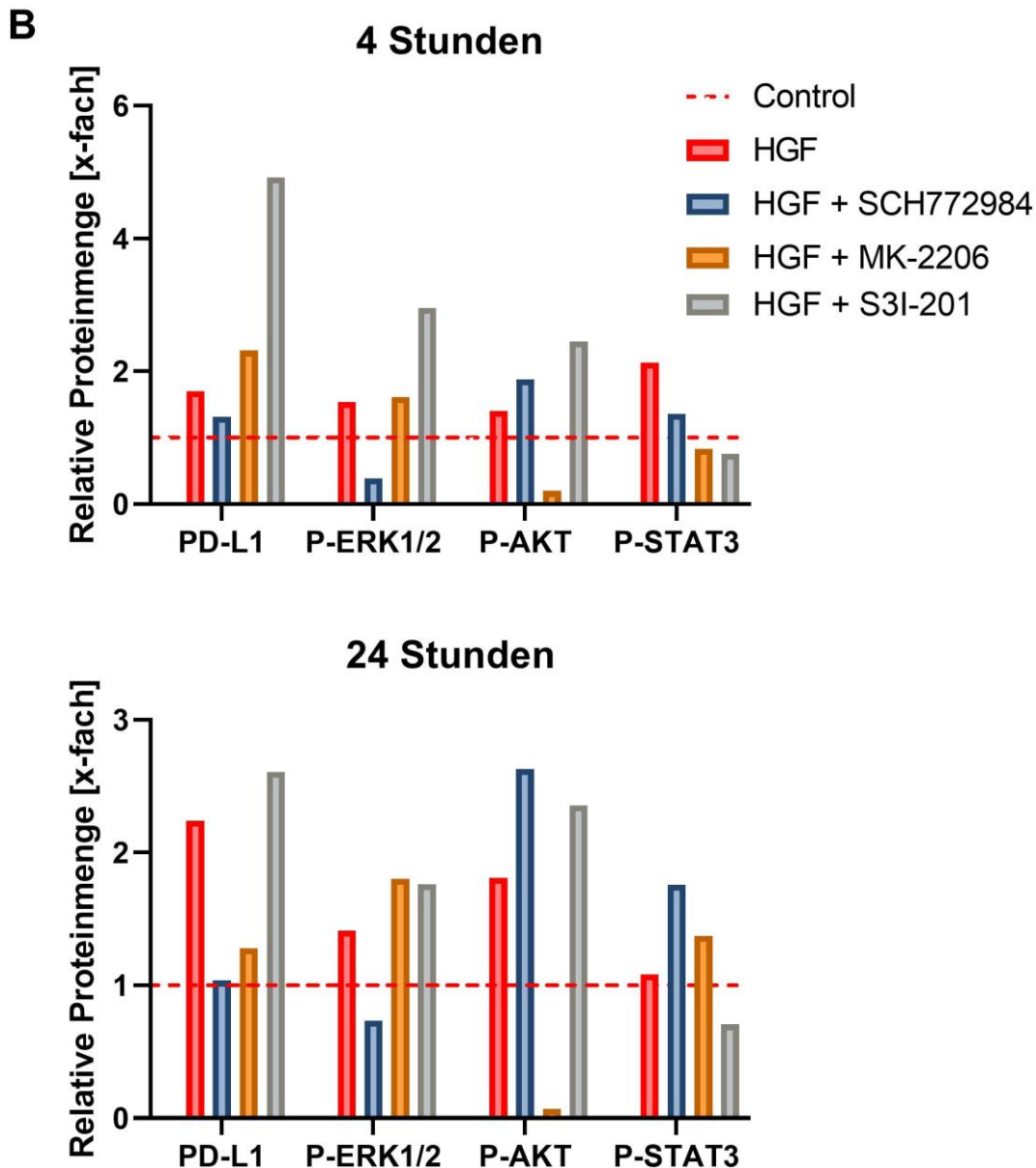
Die SCC9-Zelllinie zeigte innerhalb der ersten vier Stunden nach HGF-Behandlung eine Erhöhung von PD-L1 und eine Aktivierung des MAPK/ERK-, AKT- und eingeschränkt auch des STAT3-Signalwegs (Abb. 8). Nach 24 h blieben die durch HGF erhöhte PD-L1-Konzentration und der aktive MAPK/ERK- und AKT-Signalweg erhalten. Zusätzlich nahm PD-L1 und P-ERK1/2 in der Kontrollprobe erkennbar zu. Trotz der exzessiven PD-L1-Expression in der unbehandelten Probe ließ sich jedoch der PD-L1-Anstieg durch HGF, als auch dessen vollständige bzw. partielle Hemmung durch Inhibition der MAPK/ERK- und AKT-Signalwege nachvollziehen. Das Einsetzen des STAT3-Inhibitors bewirkte bei Konzentration von 100  $\mu$ M eine Unterdrückung des gesamten STAT3-Proteins, ohne jedoch Einfluss auf PD-L1 zu nehmen. Diese Wirkung auf die gesamte STAT3-Proteinmenge konnte nur in dieser Zelllinie beobachtet werden.

**A**

**SCC9**



**Abbildung 8: Western Blot zum Nachweis der Rolle der MAPK/ERK, PI3K/AKT und STAT3-Signalwege bei der erhöhten PD-L1-Expression nach HGF-Stimulation in SCC9.** A) Links sind die nachgewiesenen Proteine bzw. Protein-Varianten angegeben, oberhalb das Behandlungsschema (SCH772984= ERK1/2-Inhibitor, MK-2206= AKT-Inhibitor, S3I-201= STAT3-Inhibitor) mit der jeweiligen Inkubationszeit. HGF führt zu einem Anstieg von PD-L1 und P-AKT. P-ERK1/2 ist nach 4 h HGF-Stimulation erhöht. PD-L1 Anstieg wird durch ERK1/2-Hemmung komplett und durch AKT-Hemmung partiell verhindert. Vinculin\*1 dient als Proteinladekontrolle für PD-L1, P- ERK1/2, ERK1/2 und STAT3. Vinculin\*2 dient als Proteinladekontrolle für P-AKT, AKT und P-STAT3.



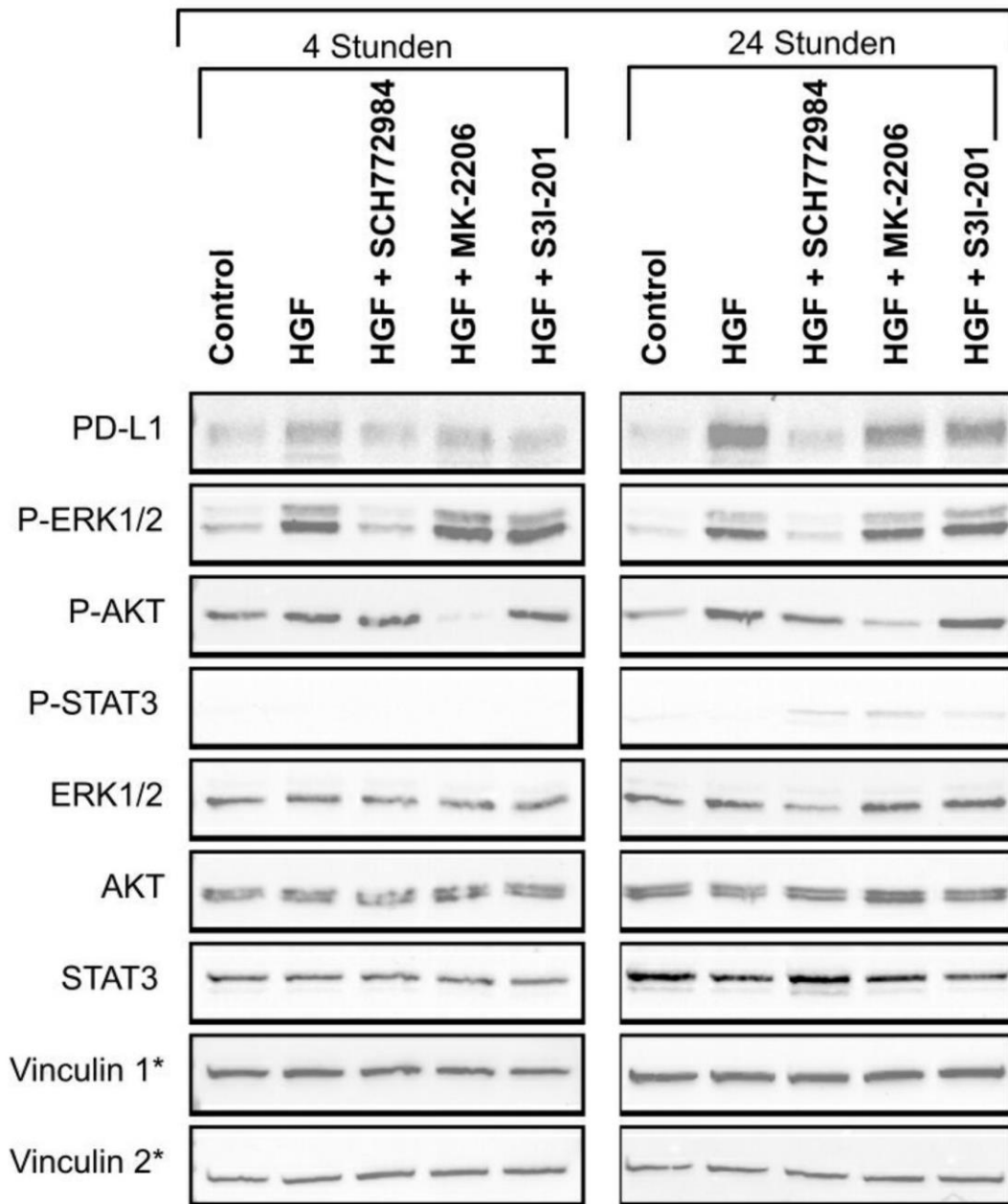
**Abbildung 8: Western Blot zum Nachweis der Rolle der MAPK/ERK, PI3K/AKT und STAT3-Signalwege bei der erhöhten PD-L1-Expression nach HGF-Stimulation in SCC9.** B) Balkendiagramm der mit ImageJ quantifizierten Signale des in A gezeigten Blots. Die Angleichung erfolgte an das jeweilige Signal für Vinculin und die Normierung zum Signal der jeweiligen Kontrolle. Zusätzlich wurden die Signale für phosphorylierte Proteinformen an die jeweiligen Signale für das gesamte Protein angeglichen.

#### 4.1.4 SCC154-Zelllinie

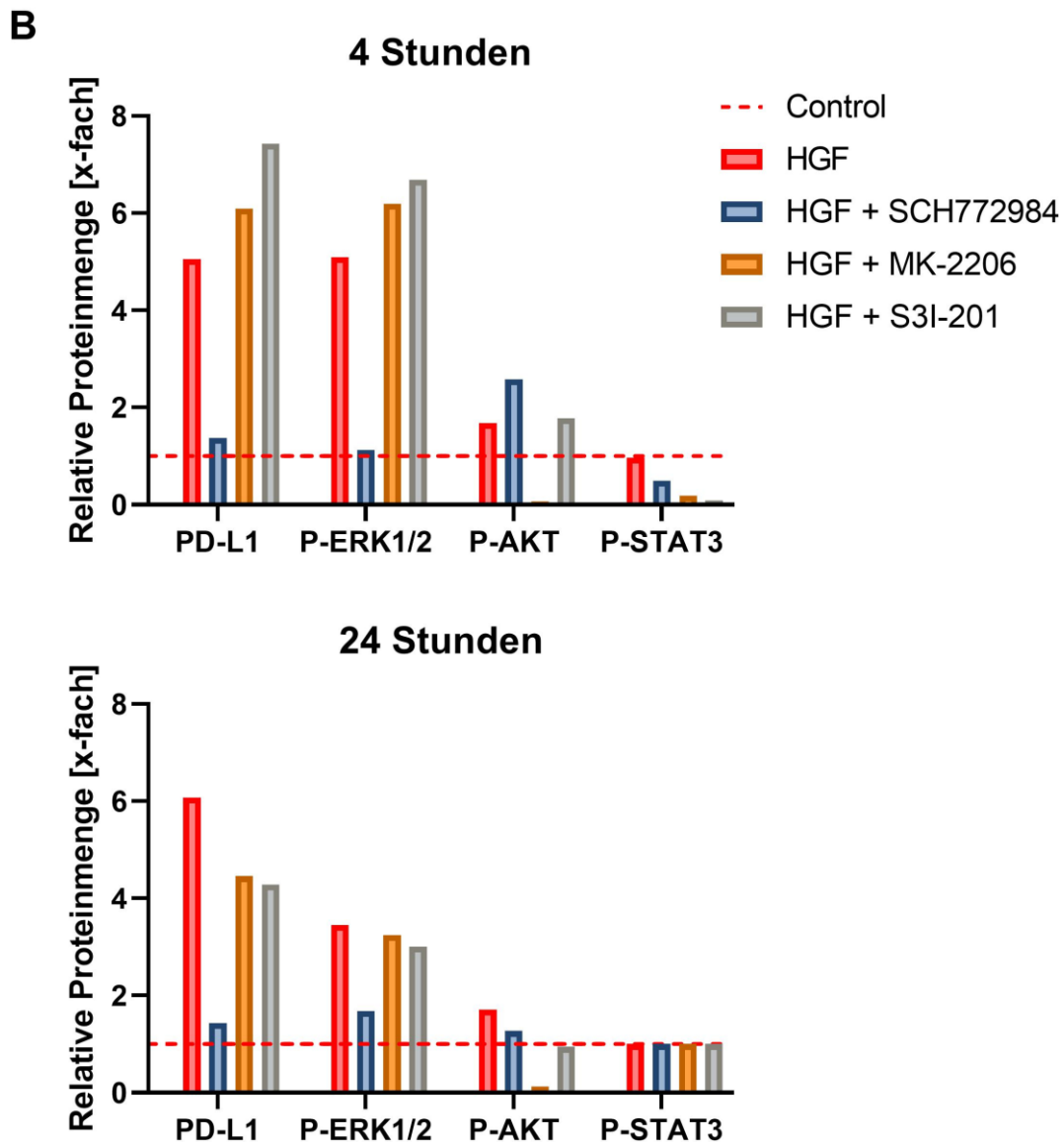
Die Zellen der SCC154-Zelllinie zeigten in der Kontrollprobe ein schwaches PD-L1-, P-ERK- und P-AKT-Signal und kein P-STAT3-Signal (Abb. 9). Eine HGF-Behandlung

bewirkte nach 4 h einen PD-L1-Anstieg, eine MAPK/ERK- und eine geringfügige AKT-Signalweg-Aktivierung. Nach 24 h war dieser Anstieg nur noch bei PD-L1 und P-ERK1/2 festzustellen und nur in den ERK1/2 inhibierten Proben war eine Hemmung des PD-L1-Anstieg bei HGF-Stimulation zu beobachten. AKT- und STAT3-Inhibitoren verhinderten nur nach 24 Stunden den PD-L1-Anstieg partiell, allerdings konnte eine Hemmung der STAT3-Aktivität durch den Inhibitor bei der grundsätzlich nur marginalen Aktivität des Signalwegs nicht nachgewiesen werden.



**A****SCC154**

**Abbildung 9: Western Blot zum Nachweis der Rolle der MAPK/ERK, PI3K/AKT und STAT3-Signalwege bei der erhöhten PD-L1-Expression nach HGF-Stimulation in SCC154.** A) Links sind die nachgewiesenen Proteine bzw. Protein-Varianten angegeben, oberhalb das Behandlungsschema (SCH772984= ERK1/2-Inhibitor, MK-2206= AKT-Inhibitor, S3I-201= STAT3-Inhibitor) mit der jeweiligen Inkubationszeit. HGF führt zu einem Anstieg von PD-L1 und P-ERK. P-AKT ist nur nach 4 h HGF-Stimulation erhöht. Der PD-L1-Anstieg wird durch ERK1/2-Hemmung komplett und durch AKT-Hemmung partiell verhindert. Vinculin\*1: Proteinladekontrolle für PD-L1, P- ERK1/2, ERK1/2 und STAT3. Vinculin\*2: Proteinladekontrolle für P-AKT, AKT und P-STAT3.



**Abbildung 9: Western Blot zum Nachweis der Rolle der MAPK/ERK, PI3K/AKT und STAT3-Signalwege bei der erhöhten PD-L1-Expression nach HGF-Stimulation in SCC154. B)**

Balkendiagramm der mit ImageJ quantifizierten Signale des in A gezeigten Blots. Die Angleichung erfolgte an das jeweilige Signal für Vinculin und die Normierung zum Signal der jeweiligen Kontrolle. Zusätzlich wurden die Signale für phosphorylierte Proteinformen an die jeweiligen Signale für das gesamte Protein angeglichen.

#### 4.1.5 Schlussfolgerung zur Rolle der intrazellulären Signalwege bei der durch HGF-Stimulation erhöhten PD-L1-Expression

Die Versuche zeigten, dass HGF in den vier untersuchten Zelllinien den MAPK/ERK- und AKT-Signalweg, jedoch nicht den STAT3-Signalweg aktiviert.

Abgesehen von der Zelllinie SCC154, bei der phosphoryliertes STAT3-Protein nicht nachgewiesen werden konnte, zeigten alle untersuchten Zelllinien eine basale Aktivität der drei Signalwege, erkennbar durch den Nachweis der entsprechend phosphorylierten Proteinformen.

Der HGF-induzierten PD-L1-Anstieg wird bei allen untersuchten Zelllinien hauptsächlich durch eine Aktivierung des MAPK/ERK-Signalweg herbeigeführt, da eine zielgerichtete Blockade dieses Signalwegs den Anstieg vollständig verhindern konnte.

## 4.2 ERK1/2 Inhibition mit RNA-Interferenz

Im ersten Teil des Versuchs wurde mit quantitativer PCR diese Abnahme auf der mRNA-Ebene nachgewiesen. Im zweiten Teil wurde mit dem Western Blot diese Abnahme auf der Protein-Ebene detektiert und desweiteren der Einfluss auf die PD-L1-Expression mit und ohne HGF-Stimulation evaluiert.

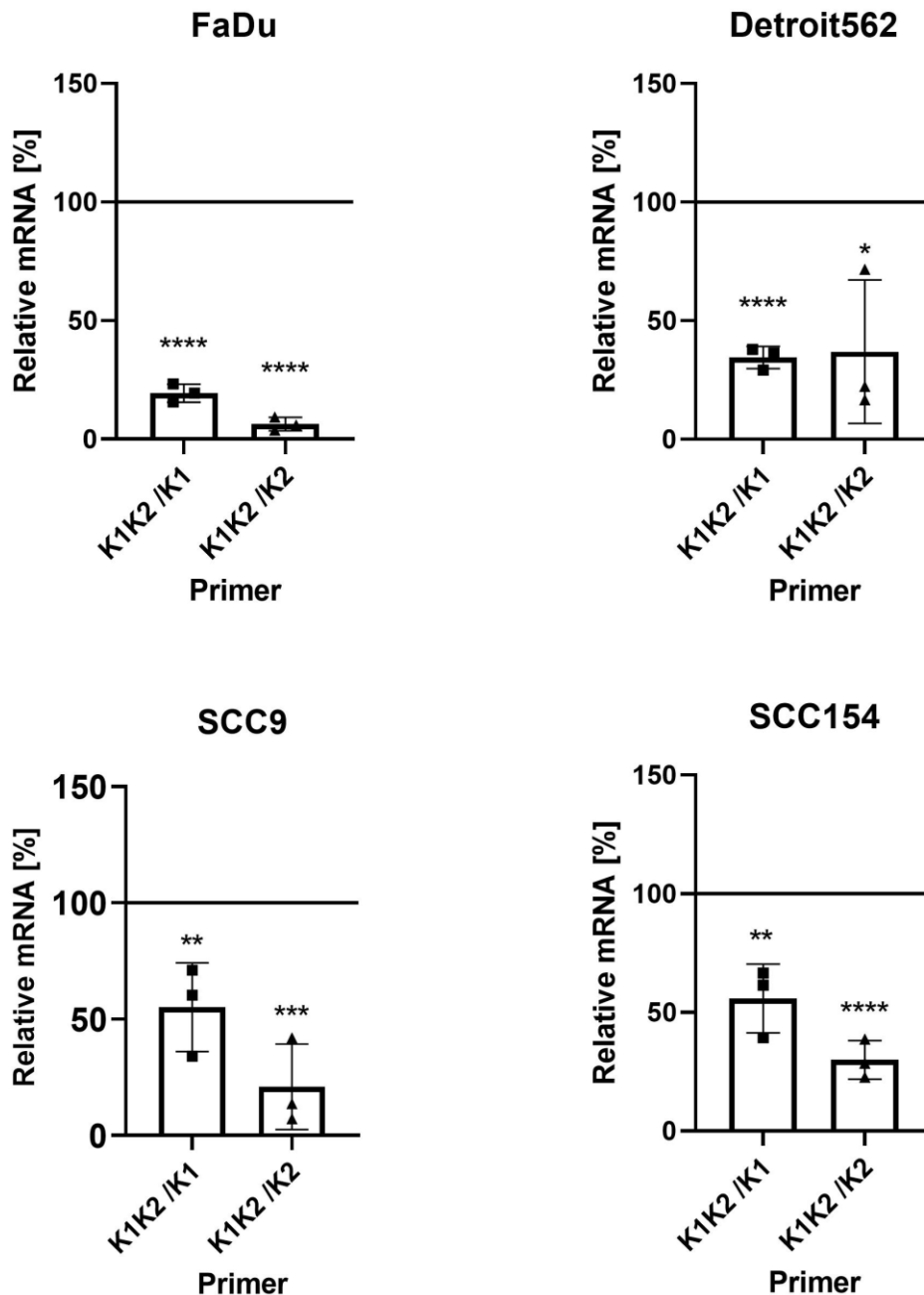
### 4.2.1 Quantitative PCR zum Nachweis der RNA-Interferenz von ERK1/2-mRNA

Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen sind im Balkendiagramm mit Standardabweichung (Abb. 10) dargestellt und zeigen, dass die ERK1-mRNA und ERK2-mRNA Menge im Vergleich zu den mit Kontroll-siRNA behandelten Proben überall signifikant abnahmen. Die Abnahme variierte bei identischen siRNA-Konzentrationen und Versuchsbedingungen zwischen den beiden mRNAs (ERK1-mRNA und ERK2-mRNA) und auch zwischen den vier Zelllinien.

Die Reduktion der ERK1-mRNA war am höchsten in der FaDu-Zelllinie mit  $80,853 \% \pm 3,11 \%$  und am geringsten in der SCC9-Zelllinie mit  $42,65 \% \pm 12,615 \%$ . Detroit562 und SCC154 erreichten eine Reduktion von  $65,5 \% \pm 3,818 \%$  und  $44,19 \% \pm 11,826 \%$ . Der ERK2-mRNA Abbau präsentierte sich insgesamt höher als der ERK1-mRNA Abbau, außer in der Detroit562 Zelllinie. Die höchste Reduktion konnte in FaDu mit  $93,64 \% \pm 2,262 \%$  und die geringste in Detroit562 mit  $63,092 \% \pm 24,706 \%$  verzeichnet werden.

In SCC9 und SCC154 war eine Reduktion von  $75,44 \% \pm 17,33 \%$  bzw.  $70,043 \% \pm 6,643 \%$  festzustellen.

Zudem konnte beobachtet werden, dass die Zellpopulationen bei Behandlung mit ERK1/2-siRNA nach 4 Tagen keine Konfluenz erreichten (nicht dargestellt). Sowohl nach 48 h bei Medienwechsel und Stimulation als auch nach 96 Stunden bei Probenentnahme wurde in den Zellkulturen eine reduzierte Adhärenz und ein erhöhter Anteil toter Zellen beobachtet (nicht dargestellt). Diese Auswirkung der Transfektionsbehandlung war bei den vier Zelllinien unterschiedlich stark ausgeprägt. Das könnte dadurch erklärt werden, dass bei einer Unterschreitung einer bestimmten ERK1/2-Proteinmenge die Zellen essenzielle Funktionen nicht mehr aufrechterhalten können.



**Abbildung 10: Ergebnisse der qPCR zum Nachweis der Reduktion von ERK1- und ERK2- mRNA nach Transfektion mit ERK1/2-spezifischer siRNA.** Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung in Relation zur mit Kontroll-siRNA behandelten Probe (100%) aus drei voneinander unabhängigen Versuchen. Die relative Abnahme der mRNA wurde mit Hilfe der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode bestimmt. FaDu: ERK1-mRNA: 80 %, ERK2-mRNA: 93 %, Detroit562: ERK1-mRNA: 65 %, ERK2-mRNA: 63 %, SCC9: ERK 1 mRNA: 42 %, ERK 2 mRNA: 75 %, SCC154: ERK 1 mRNA: 44 %, ERK 2 mRNA: 70 %. K1K2/K1: Transfektion mit ERK1/2-siRNA und Verwendung des ERK1-Primers  
K1K2/K2: Transfektion mit ERK1/2-siRNA und Verwendung des ERK2-Primers  
P-Wert (ungepaarter einseitiger t-Test): <0,05 = signifikant\*, <0,01 = signifikant\*\*, <0,001= sehr signifikant\*\*\*, <0,0001 = stark signifikant\*\*\*\*.

#### 4.2.2 Western Blot zum Nachweis der ERK1/2-Abnahme nach Einsatz spezifischer siRNA und zur Untersuchung des Einflusses von ERK1/2 auf den Anstieg der PD-L1-Expression nach HGF-Stimulation

Hier wurden die Zellen nach Transfektion und Stimulation für den Western Blot wie in Kapitel 3.7 beschrieben aufbereitet. Die Abbildung 11 A zeigt den Zusammenhang exemplarisch an einem von drei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen. Die Ergebnisse aller Versuche wurden mit ImageJ quantifiziert, mit Hilfe der Ladekontrolle ausgeglichen und in Relation zur Kontrollprobe gesetzt (100%). Die Mittelwerte mit Standardabweichung wurden in einem Balkendiagramm (Abb. 11 B) dargestellt. Durch die eingesetzte ERK1/2-spezifische siRNA wurde überall signifikant weniger ERK1/2 Protein synthetisiert. Die Proteinabnahme ist mit den Ergebnissen der quantitativen PCR (Kapitel 4.2.1) vergleichbar. Unabhängig davon ob ERK1/2-spezifische oder Kontroll-siRNA verwendet wurde, zeigten die Zellen ohne vorherige HGF-Stimulation keinen Unterschied in der PD-L1 Expression. Der Einsatz von ERK1/2-spezifischer siRNA hemmte jedoch den PD-L1-Anstieg, der bei den mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen in Anwesenheit von HGF festzustellen ist.

Diese Ergebnisse bestätigen den in den vorherigen Versuchen festgestellten Einfluss des MAPK/ERK-Signalweg auf die HGF vermittelte PD-L1 Erhöhung in HNSCC Zellen.

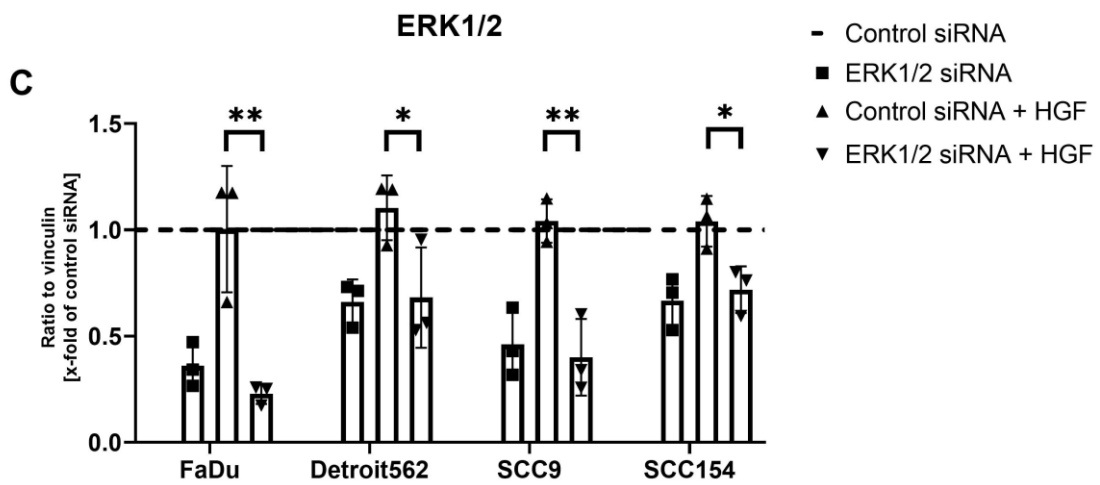
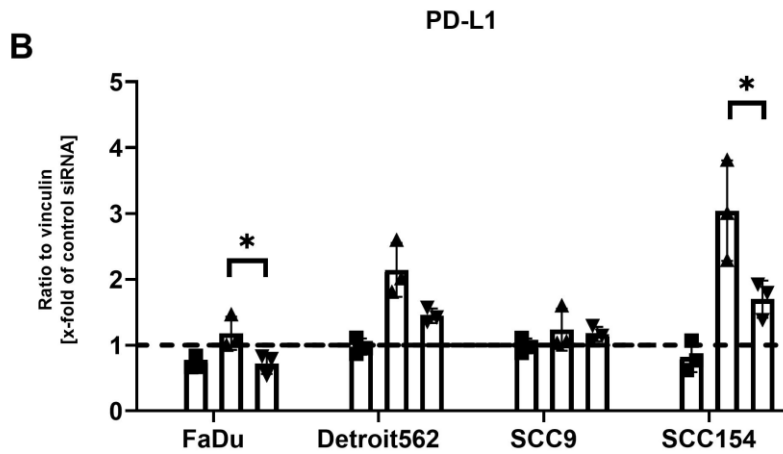
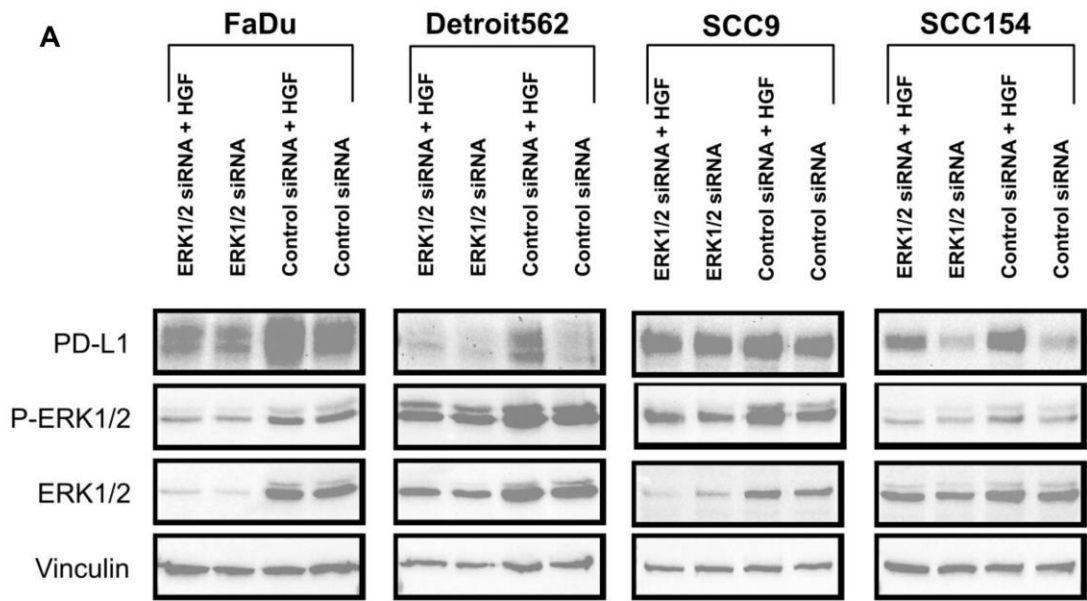


Abbildung 11: Western Blot zum Nachweis der ERK1/2-Abnahme nach Einsatz spezifischer siRNA und zur Untersuchung des Einflusses von ERK1/2 auf den Anstieg der PD-L1-Expression nach HGF-

### **Stimulation.**

A) Links sind die nachgewiesenen Proteine angegeben, oberhalb das Behandlungsschema mit der jeweiligen Inkubationszeit. ERK1/2-siRNA konnte die Proteinmenge von ERK1/2 überall signifikant reduzieren. Der PD-L1-Anstieg bei HGF-Zugabe ist im Vergleich zu der mit Control-siRNA transfizierten Probe entsprechend eingeschränkt.

B+C) Balkendiagramm der Signalquantifizierung von PD-L1 und ERK1/2 mit ImageJ aus drei voneinander unabhängigen Versuchen. Die Werte sind mit dem Haushaltprotein (Vinculin) ausgeglichen und in Relation mit der Probe (Control-siRNA) gesetzt, die linear im Diagramm abgebildet ist.

P-value (ungepaarter einseitiger t-Test): <0,05 = signifikant\*, <0,01 = signifikant\*\*, <0,001= sehr signifikant\*\*\*, < 0,0001 = starksignifikant\*\*\*\*.

## 4.3 Die Wirkung von Trametinib auf PD-L1

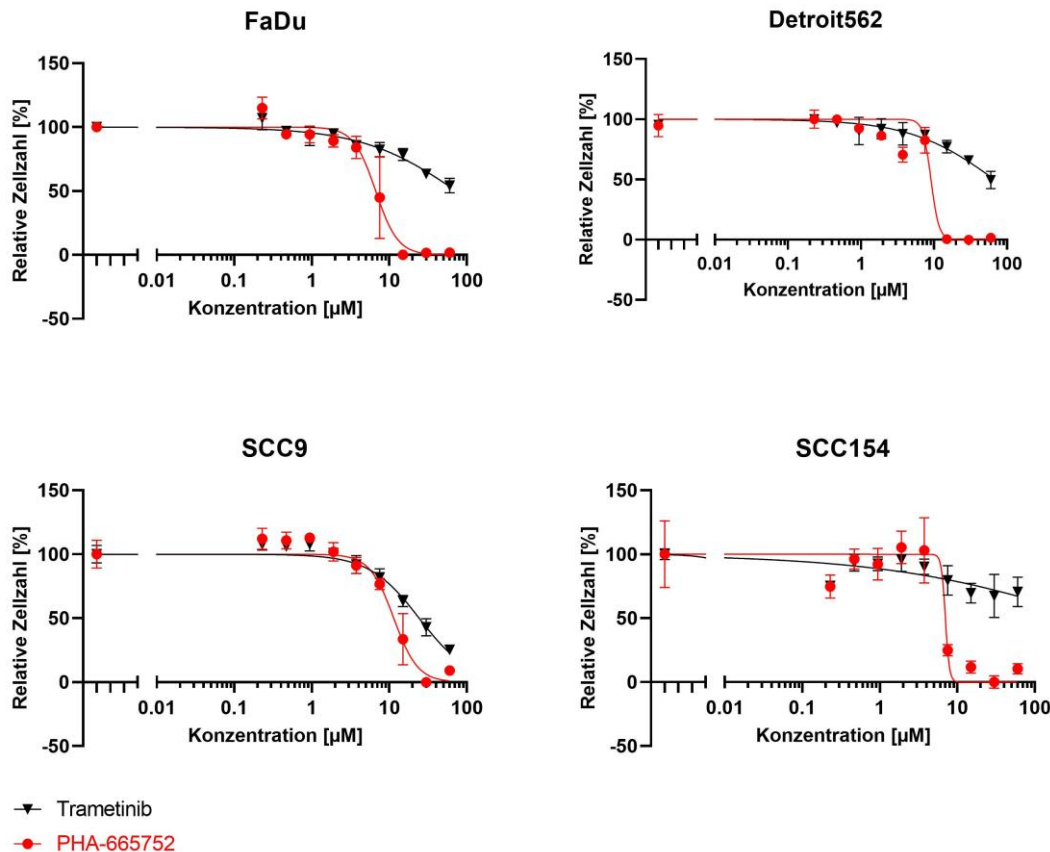
Klinisch kann die Hemmung des MAPK/ERK-Signalwegs mit mehreren Inhibitoren auf unterschiedliche Stufen stattfinden. Trametinib hemmt durch direkte Bindung an MEK1 und MEK2 deren eigene Phosphorylierung und ihre Kinaseaktivität, somit wird die durch Wachstumsfaktoren hervorgerufener Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 verhindert [114]. Mehrere Studien evaluieren die Wirkung von Trametinib in weiteren Tumorerkrankungen und in Kombination mit KRAS-Inhibitoren, RAF-Inhibitoren, Autophagie-Inhibitoren und ICIs [115]. Daher wurde Trametinib in dieser Arbeit zur MAPK-Signalweg-Blockade herangezogen.

### 4.3.1 Zellviabilitätsassay mit Trametinib

Die Versuche erfolgten mit einer Ausgangskonzentration von 60  $\mu$ M. Der c-MET-TKI PHA-665752, der bei der gleichen Ausgangskonzentration in vorangegangenen Untersuchungen getestet wurde, wurde zum Vergleich herangezogen. Eine halbmaximale Reduktion der Zellzahl erreicht Trametinib bei den Zelllinien FaDu, Detroit562 und SCC9. Die schwächste Hemmung hat Trametinib auf die SCC154 Zelllinie ausüben können. Eine Proliferationshemmung durch PHA und Trametinib konnte erst ab 1,875  $\mu$ M beobachtet werden. Bis 60  $\mu$ M konnte durch Trametinib in keiner der vier Zelllinien ein für eine Dosis-Wirkungs-Kurve typischer, sigmoidaler Kurvenverlauf (Abb. 12) beobachtet werden. Nur bei dem c-MET-TKI PHA-665752 war dies der Fall. Unterhalb der Konzentration von 1  $\mu$ M zeigte Trametinib keine nennenswerte Proliferationshemmung oder einen toxischen Effekt, sodass die aus der



Literatur bekannte Trametinib-Konzentration zur Hemmung der MEK1/2-Kinase von 25 nM für die nachfolgenden Versuche eingesetzt wurde [116].



**Abbildung 12: Zellviabilitätsassay mit Trametinib (schwarz) und PHA-665752 (rot) für 48 Stunden.** Auf der x-Achse ist die Konzentration in  $\mu\text{M}$  bei Ausgangskonzentration von  $60 \mu\text{M}$  und  $\log_2$  Reihenverdünnung aufgetragen, auf der y-Achse die relative Zellzahl in Prozent. Bei PHA-665752 konnte ein sigmoidaler Kurvenverlauf nachgewiesen werden, bei Trametinib nicht. Bei der für weitere Versuche verwendeten Konzentration (25 nM) zeigte Trametinib keinen toxischen Effekt.

#### 4.3.2 Western Blot zum Nachweis des Trametinib-Einflusses auf die HGF-vermittelte Erhöhung der PD-L1-Konzentration

Mittels Behandlung der vier untersuchten Zelllinien mit HGF allein und in Kombination mit Trametinib für 4 und 24 Stunden sollte der Effekt von Trametinib auf die HGF-vermittelte Erhöhung der PD-L1-Expression untersucht werden. Dies erfolgte durch den Nachweis von PD-L1 in den entsprechenden Proben im Western Blot. Zusätzlich sollte durch den Nachweis von P-MEK1/2 und P-ERK1/2 die Aktivität des MAPK/ERK-Signalweg in den Zellen bestimmt werden und dadurch die direkte Wirkung von

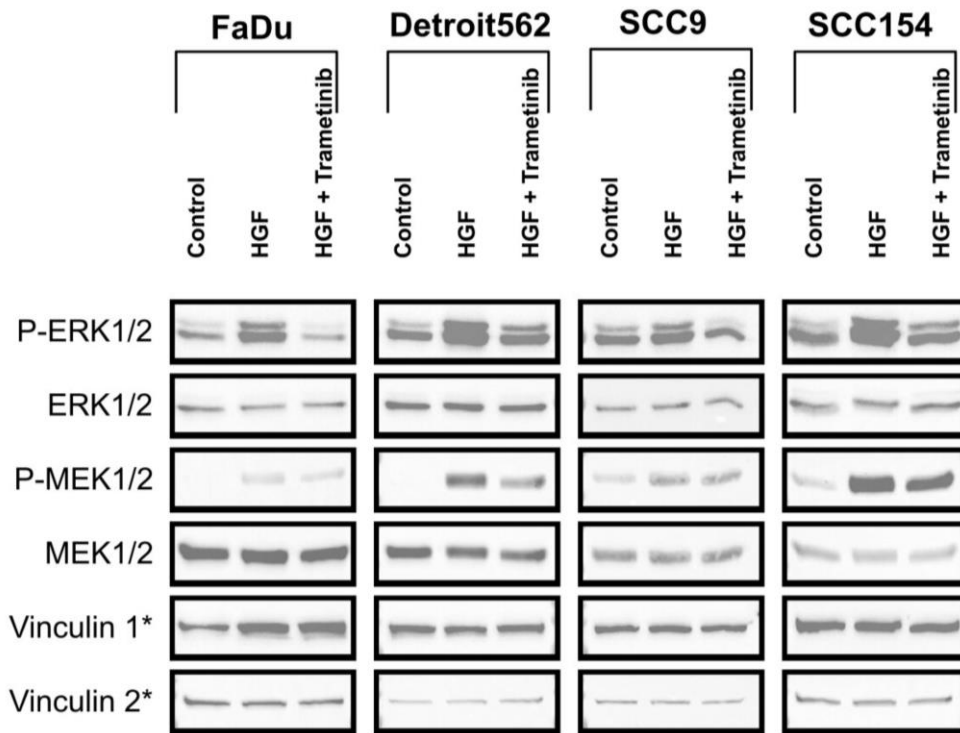
Trametinib auf die Zellen nachgewiesen werden. Exemplarisch für mehrere Versuche zeigt Abb. 13 A und B die Wirkung von HGF als extrazellulärer Stimulus. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle stieg nach 4 Stunden die Phosphorylierung von MEK1/2 und ERK1/2 überall deutlich an. Von Detroit562 abgesehen blieb dieser Anstieg bei den Kontrollproben auch nach 24 Stunden erhalten.

Als weitere Reaktion auf die HGF-Stimulation zeigten alle Zelllinien nach 24 Stunden einen Anstieg der PD-L1-Konzentration (Abb. 13 B).

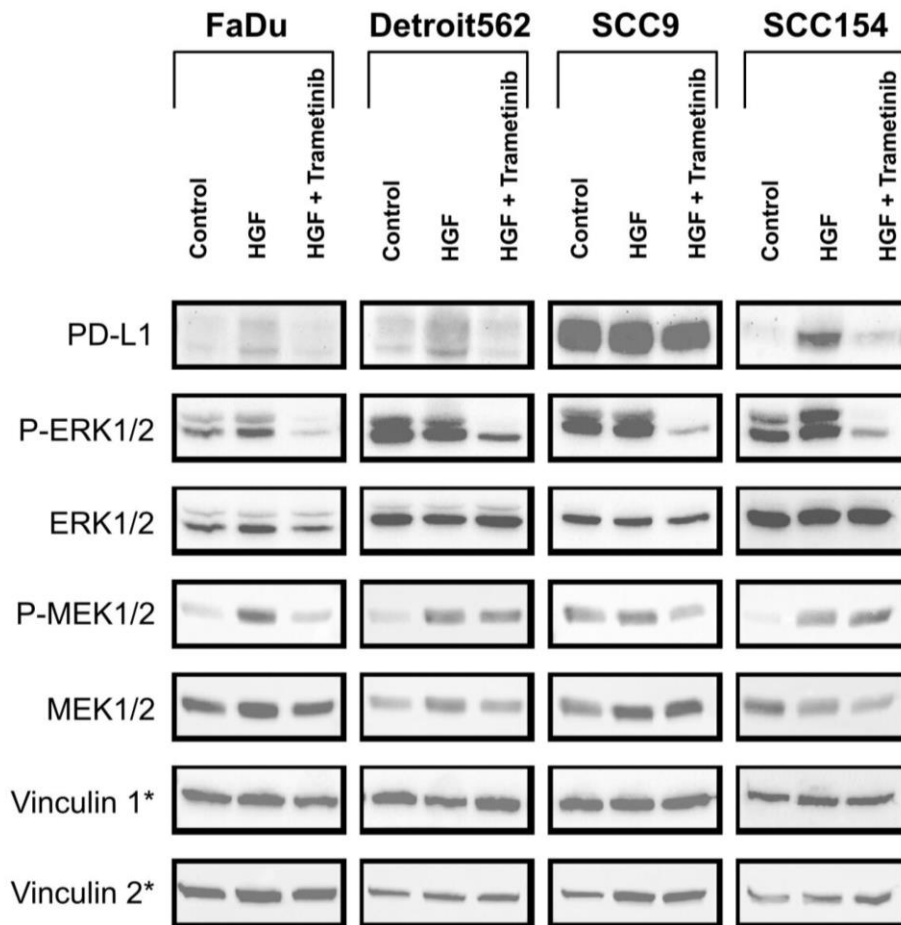
Zwar verhindert Trametinib die Phosphorylierung von MEK1/2 und ERK1/2, allerdings ließ sich seine Wirkung auf die Phosphorylierung von MEK1/2 bei dieser Konzentration (25 nM) nach 24 Stunden bei den Zelllinien Detroit562 und SCC154 nicht nachweisen. Die Hemmung von P-ERK1/2 erzielte Trametinib nach 4 h (Abb. 13 A) und nach 24 h (Abb. 13 B) bei allen untersuchten Linien. Dadurch hemmte Trametinib den HGF induzierten PD-L1 Anstieg.

Der Zusammenhang zwischen P-ERK 1/2 und PD-L1 nach alleiniger Behandlung mit HGF und in Kombination mit Trametinib lässt sich an der Quantifizierung von drei unabhängigen Versuchen (Abb.13 C und D) gut erkennen. Die MAPK-Signalweg-Aktivierung mit HGF und die Hemmung durch Trametinib ist signifikant bis stark signifikant in den vier Zelllinien. Die HGF vermittelte Erhöhung der PD-L1-Expression und deren Hemmung durch Trametinib ist in FaDu, Detroit562 und SCC9 signifikant bis stark signifikant. Die untersuchten Zelllinien zeigten in den Kontrollproben eine unterschiedlich ausgeprägte basale PD-L1-Expression und Unterschiede in der Aktivität des MAPK-Signalwegs. Ein direkter Zusammenhang zwischen MAPK-Signalweg-Aktivität und PD-L1 Expression in der Kontrolle konnte ohne Stimulation nicht festgestellt werden. Diese Beobachtung konnte ebenfalls beim ERK1/2-siRNA-Versuch gemacht werden.

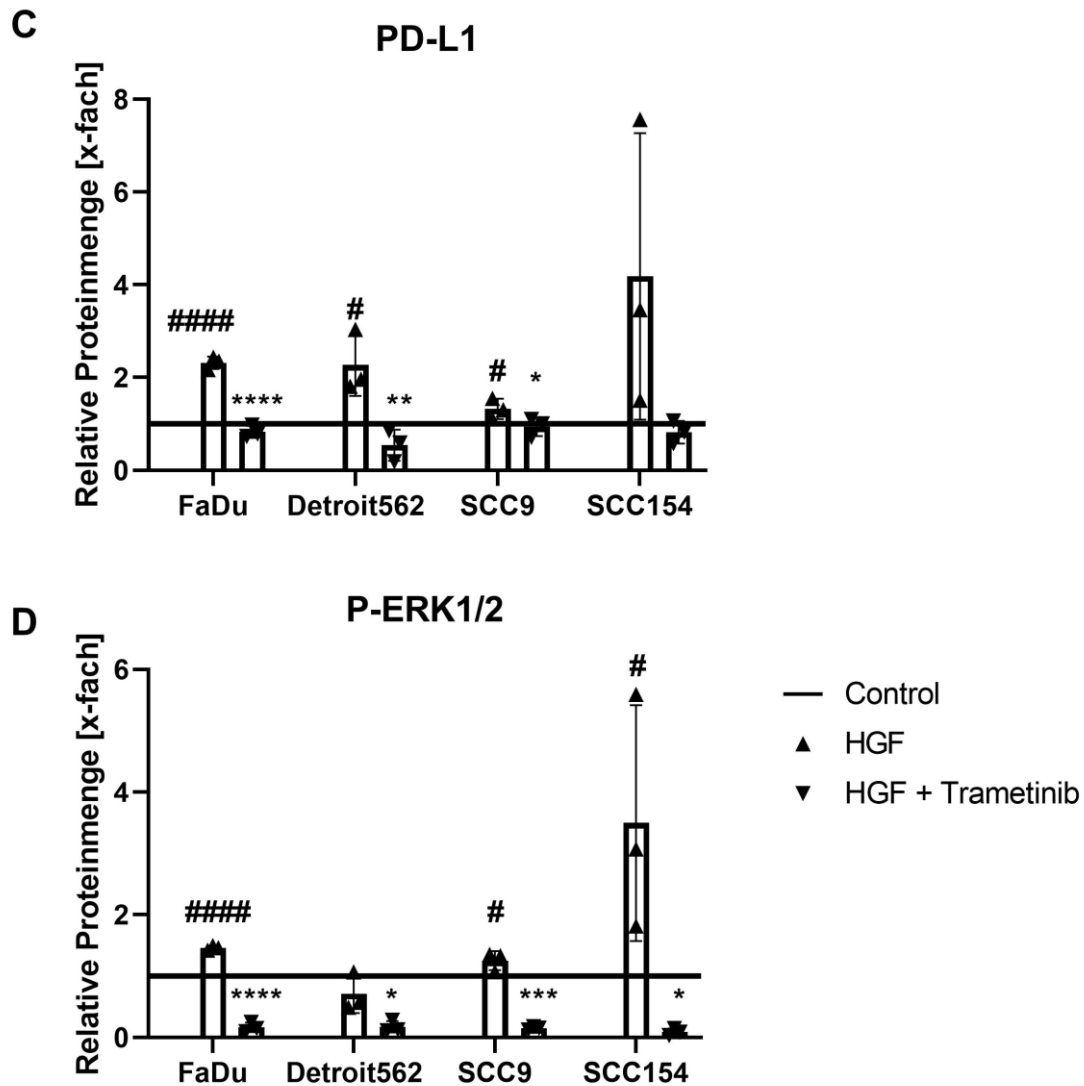
**A**



**B**



**Abbildung 13: Western Blot zum Nachweis der Rolle des MAPK/ERK-Signalwegs bei der erhöhten PD-L1-Expression nach HGF-Stimulation.** Links sind die nachgewiesenen Proteine bzw. Proteinvarianten angegeben, oberhalb das Behandlungsschema in den vier Zelllinien nach 4 h (A) und 24 h (B). HGF-Stimulation führt zu einem Anstieg von PD-L1, P-ERK und P-MEK. Der PD-L1-Anstieg wird durch ERK1/2-Hemmung mittels Trametinib verhindert. Vinculin 1\*: Proteinladekontrolle für PD-L1, P-ERK 1/2 und ERK 1/2. Vinculin 2\*: Proteinladekontrolle für P-MEK 1/2 und MEK1/2.



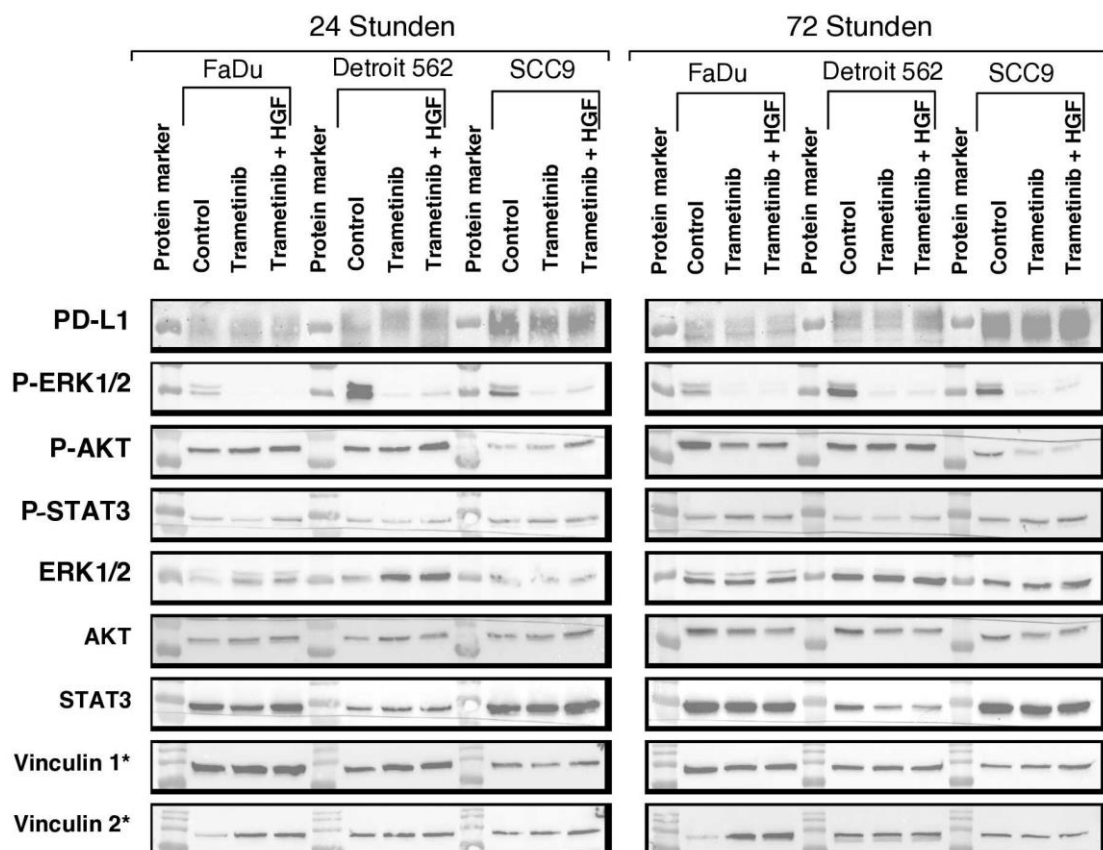
**Abbildung 13: Western Blot zum Nachweis der Rolle des MAPK/ERK-Signalwegs bei der erhöhten PD-L1-Expression nach HGF-Stimulation.** Balkendiagramm der Signalquantifizierung von PD-L1 (C) und ERK1/2 (D) nach 24 h HGF-Stimulation mit ImageJ. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei voneinander unabhängigen Versuchen. Die Werte wurden mit Hilfe des Haushaltsprotein Vinculin angeglichen und in Relation zur unbehandelten Probe gesetzt (Linie bei Wert 1).

P-Wert im Vergleich zur Kontrollgruppe (ungepaarter einseitiger t-Test): <0,05 = signifikant #, <0,01 = signifikant ##, <0,001 = sehr signifikant ###, <0,0001 = stark signifikant ####.

P-Wert im Vergleich zur HGF-Gruppe (ungepaarter einseitiger t-Test): <0,05 = signifikant\*, <0,01 = signifikant\*\*, <0,001 = sehr signifikant\*\*\*, <0,0001 = stark signifikant\*\*\*\*.

### 4.3.3 Western Blot zum Nachweis des Trametinib-Einflusses auf PD-L1 und die untersuchte Signalwege allein und in Kombination mit HGF

Zur Kontrolle der in 4.3.2 gezeigten Ergebnisse ollten die direkten Auswirkungen einer Behandlung mit Trametinib alleine oder in Kombination mit HGF auf die PD-L1 Expression und die drei Signalwege in FaDu, Detroit562 und SCC9 untersucht werden. Die Wirkung von Trametinib auf den MAPK/ERK Signalweg ließ sich an der deutlichen Reduktion von P-ERK1/2 beobachten (Abb. 14), die bis 72 h nach Zugabe anhielt. Im Vergleich zur Kontrolle zeigte Trametinib allein und mit HGF keinen Einfluss auf die PD-L1-Expression. Darüber hinaus zeigte Trametinib keine Wirkung auf die weiteren Signalwege (PI3K/AKT und STAT3). Nach 72 Stunden konnte eine Reduktion von P-AKT bei FaDu und SCC9 bei den mit Trametinib behandelten Proben werden. Dies hatte jedoch keinen Einfluss auf PD-L1.

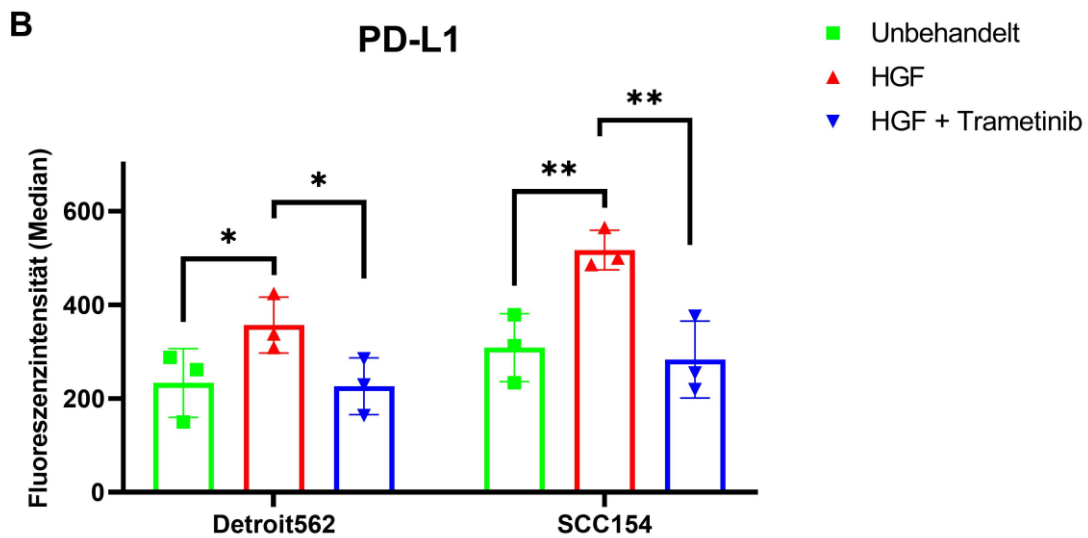
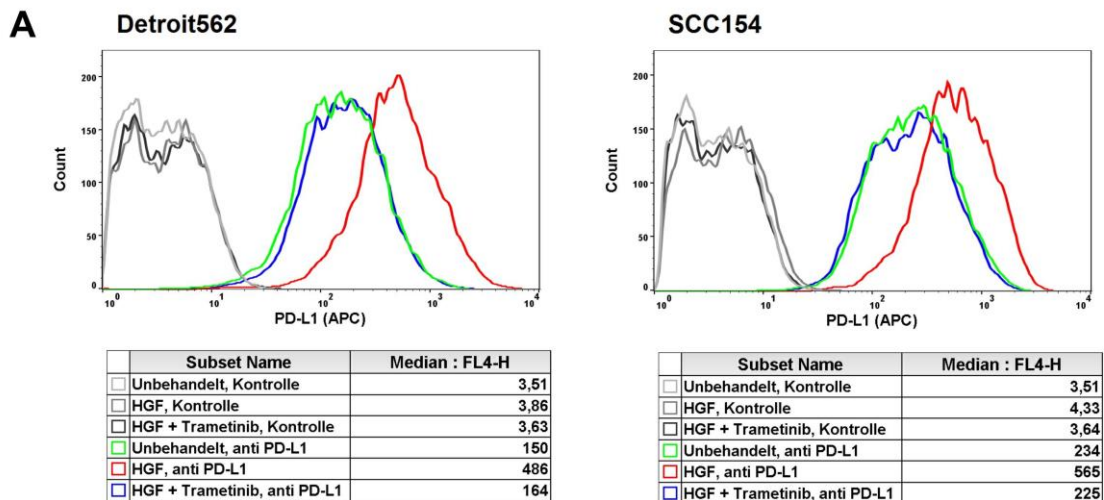


**Abbildung 14: Western Blot zum Nachweis der PD-L1-Expression bei Trametinib und Trametinib mit HGF nach 24 und 72 Stunden.** Links sind die nachgewiesenen Proteine bzw. Protein-Varianten angegeben, oberhalb das Behandlungsschema mit Zelllinien. Im Vergleich zur Kontrolle lässt sich keine Änderung der PD-L1 Expression bei Trametinib Behandlung allein oder in Kombination mit HGF feststellen. Trametinib hemmte überall die Phosphorylierung von ERK1/2. Vinculin 1\*:

Proteinladekontrolle für PD-L1 und ERK 1/2. Vinculin 2\*: Proteinladekontrolle für P-ERK 1/2, AKT, P-AKT, STAT3 und P-STAT3

#### 4.3.4 Durchflusszytometrie zum Nachweis der HGF induzierten, MAPK/ERK vermittelten Expression von PD-L1 mittels Trametinib

Ein typisches Versuchsergebnis zeigt die Abbildung 15 A. Bei Behandlung mit HGF kommt es zu einer Verschiebung der Fluoreszenzintensität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Der nachgewiesene Unterschied in der mittleren Fluoreszenzintensität zeigt, dass sowohl Detroit562 und SCC154 initial PD-L1 auf der Zelloberfläche exprimieren (grüne Kurven im Vergleich zu entsprechenden ungefärbten Kontrollen). Die Verschiebung der Kurve hin zu noch höheren Fluoreszenzwerten nach HGF-Stimulation (rote Kurven) impliziert eine höhere Konzentration von PD-L1-Protein auf der Zelloberfläche. Diese Zunahme konnte durch Zugabe von Trametinib verhindert werden (blaue Kurve). In einem Balkendiagramm (Abb. 15 B) wurden die Mittelwerte aus den mittleren Intensitätswerten (Median der Fluoreszenzintensität) mehrerer unabhängiger Versuche dargestellt. Sowohl die Zunahme von PD-L1 bei HGF-Stimulation als auch das Ausbleiben dieser Zunahme bei gleichzeitiger Behandlung mit HGF und Trametinib ist bei beiden Zelllinien signifikant.



**Abbildung 15: Durchflusszytometrie zum Nachweis der PD-L1-Zunahme bei HGF-Stimulation und der PD-L1-Abnahme bei Trametinib-Zugabe auf der Zelloberfläche der Zelllinien Detroit562 und SCC154.**

A) Histogramme: Aufgetragen sind die Zellzahl (count, y-Achse) und die APC-Fluoreszenzintensität für PD-L1 (x-Achse) auf der Zelloberfläche. Die Proben waren unbehandelt (grün), oder mit HGF stimuliert (rot) oder mit HGF und Trametinib behandelt (blau). Die entsprechenden ungefärbten Kontrollen sind in Grautönen dargestellt.

B) Balkendiagramm aus den Mittelwerten der Mediane der Fluoreszenzintensität mehrerer unabhängiger Versuche mit zugehöriger Standardabweichung.

P-Wert (ungepaarter einseitiger t-Test): <0,05 = signifikant\*, <0,01 = signifikant\*\*.

## 5 Diskussion

GLOBOCAN (Global Cancer Observatory) schätzte 2018 weltweit die Zahl der erstmalig diagnostizierten Krebserkrankung der Lippen, Mundhöhle und Pharynx auf 657.438 Fälle und die Zahl an Fällen mit tödlichem Ausgang auf 336.360 [117]. In Deutschland meldete das Zentrum für Krebsregisterdaten (ZfKD) im gleichen Jahr rund 14.310 Neudiagnosen und 5.412 Sterbefälle mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 62 % für Frauen und 52 % für Männer. 84 % dieser Tumoren konnten histologisch als HNSCC bestimmt werden [118]. Im Zeitraum von 2008 bis 2018 stieg die Inzidenz von HNSCC um 36.5 % [119]. Bei der Behandlung von HNSCC erfahren im Augenblick die zielgerichtete medikamentöse Therapie und die Immuntherapie die größte Entwicklung. Dadurch ergeben sich Fragen zu Patientenselektion, Kombinationsmöglichkeiten, Einsatzzeitpunkten und Resistenzmechanismen, die zu beantworten sind [120].

Der Tyrosinkinase-Rezeptor EGFR zeigt häufig eine erhöhte Aktivität bei HNSCC, was mit einer schlechten Prognose assoziiert ist. Hier konnte Cetuximab als ein gegen EGFR gerichteter Antikörper in der Kombination mit Chemotherapie und Radiotherapie begrenzte Fortschritte erzielen [121], da intrinsische und erworbene Resistenzen den Benefit limitieren. Diese Resistenzen können aufgrund von EGFR-Mutationen [122] oder durch Aktivierung von intrazellulären Signalwegen wie des RAS/ERK-Signalwegs durch RAS-Protein-Überexpression [123] oder -Mutation [124], des AKT-Signalwegs [125] oder STAT3-Signalwegs [126] und weiteren Signalwegen, auftreten [127]. Zudem wurde bei Cetuximab-resistenten Zellen eine erhöhte Aktivität weiterer TKRs wie HER2, HER3 und c-MET beobachtet [92].

Weitere Hoffnungsträger in der Therapie des HNSCC sind die ICIs. Sowohl Nivolumab als auch Pembrolizumab, welche PD-1 blockieren und die Interaktion mit seinem Ligand PD-L1 verhindern, sind zugelassen [128]. Hier ist die Ansprechrate bei beiden Wirkstoffen wie bei TKIs aufgrund von Resistenzen niedrig und liegt für Nivolumab bei 13,3 % [129] und für Pembrolizumab bei 18 % [130].

Im TME machen sich die Tumorzellen die extrazellulären Stimuli und Zytokine über exprimierte Rezeptoren und zelluläre Signalwege zunutze, um ein immunsuppressives



Milieu zu bilden, sodass sie sich ungehindert fortentwickeln können [131]. Beispielsweise wurde in HNC eine Erhöhung der PD-L1-Expression durch Zytokine wie Interferon  $\gamma$  (INF  $\gamma$ ) und Wachstumsfaktoren wie den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) über den EGFR beschrieben [132], sodass ein kombinierter Therapieansatz (Cetuximab + Pembrolizumab) vielversprechend erscheint [133].

In letzter Zeit wird ebenfalls vom immunsuppressiven Einfluss des TKR c-MET auf das TME berichtet [134]. Die Erweiterung der zielgerichteten Therapie gegen c-MET in der HNSCC scheint vom Erfolg und wird klinisch geprüft [135]. Das besondere Interesse an diesem Signalweg im Falls von HNSCC ergibt sich daraus, dass c-MET mit seinem Ligand HGF in HNSCC überexprimiert und im Zusammenhang mit einer schlechteren Prognose und der Ausbildung von Resistenzen gegen Cetuximab steht [62]. Zudem stehen in den Tumorzellen Mutation und Amplifikation von c-MET in Zusammenhang mit der PD-L1-Expression im malignen Melanom [136] und NSCLC [137]. Unsere Arbeitsgruppe hat in HNSCCs ebenfalls eine induzierte PD-L1-Expression über HGF/c-MET feststellen können [138]. Ein Aufdecken der intrazellulären Mechanismen, die HGF/cMET und PD-L1 bei HNSCC verbinden, kann einen tieferen Einblick in die Regulationsmechanismen der PD-L1-Expression geben und somit neben der gezielten Therapie eine alternative Option nahelegen [139].

Aus den genannten Hintergründen beschäftigte sich diese Arbeit mit den Signalwegen MAPK/ERK, PI3K/AKT und STAT3 bei HNSCC anhand von vier etablierten Zelllinien. Dabei wurde untersucht, wie diese Signalwege auf HGF-Stimulation reagieren und ihre Rolle bei der Regulation der PD-L1-Expression aufgezeigt.

## 5.1 Die Rolle von intrazellulären Signalwegen bei der HGF-vermittelten Konzentrationserhöhung von PD-L1

Die Regulation der PD-L1-Expression kann auf unterschiedlichen Ebenen stattfinden, sowohl über genomische Mechanismen als auch über transkriptionelle, posttranskriptionelle und posttranslationale Mechanismen. Durch Zytokine und Wachstumsfaktoren wird die Expression über die intrazellulären Signalwege reguliert

[140]. Darüber hinaus ist die Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege einer der Mechanismen, worüber die Tumorzellen ihre Progression und Resistenzbildung vorantreiben, wie bei HNSCC [141], NSCLC [142] und malignen Melanomen mit BRAF-Mutation [143].

In der Einleitung ist beschrieben, wie HGF über c-MET in einer Kettenreaktion verschiedene onkologische Signalwege (MAPK/ERK1/2, PI3K/AKT, STAT3) aktiviert [144]. Der Einfluss der HGF/c-MET Aktivierung auf die intrazellulären Signalwege konnte in dieser Arbeit mittels Western Blot belegt werden. Die Stimulation mit HGF bewirkt eine Aktivierung der MAPK- und PI3K-AKT-Signalwege. Eine weitere Studie bestätigt das präsentierte Ergebnis und belegt, dass HGF in HNSCC über c-MET die AKT- und MAPK-Signalwege aktivieren kann [145].

Es wurde parallel evaluiert, welchen Einfluss diese Aktivierung auf die PD-L1-Expression hat, da die PD-L1-Expression einen etablierten Parameter für die Prognose und therapeutische Vorgehensweise in mehreren Tumorentitäten darstellt. Als negativer Prognose-Indikator gilt die erhöhte PD-L1-Expression bei NSCLC [146], Ösophaguskarzinom [147], Magenkarzinom [148], Bauchspeicheldrüsenkarzinom [149] und bei weiteren Entitäten [150]. Im HNSCC wurde von einem negativen Zusammenhang berichtet [151], dies wurde jedoch in einer Meta-Analyse widerlegt [152]. Für die Therapieauswahl ist die PD-L1-Expression weiterhin essentiell, um das Ansprechen auf dessen Inhibitoren, vorherzusagen und den Einsatz der Inhibitoren zu rechtfertigen, wie bei Pembrolizumab bei HNSCC [153], NSCLC [154], dem Urothelkarzinom [155] und weiteren Entitäten [156, 157]. Dies ergibt sich nicht nur daraus, dass der Nachweis auf Tumorzellen auf eine mögliche Interaktion zwischen PD-L1 und PD-1 im TME hinweist, sondern auch weil die PD-L1-Expression mit der antitumoralen Aktivität der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in der TME korreliert [156]. Allerdings kann die PD-L1-Expression je nach Tumor konstitutiv vorhanden sein, oder im Laufe der Tumorentwicklung induziert werden [158].

Bei den in Kapitel 4.3.3 dargestellten Ergebnissen wurden die Proteinkonzentrationen in allen Proben der vier Zelllinien angeglichen und im Western Blot gemeinsam detektiert, sodass sowohl die unterschiedlichen Level der PD-L1-Expression innerhalb der untersuchten Zelllinien als auch die eindeutige Induktion der Expression durch HGF nachgewiesen werden konnte.

Durch die Blockade der drei onkologischen Signalwege mit spezifischen Inhibitoren wurde ebenfalls der Zusammenhang zwischen den intrazellulären Signalwegen nach HGF-Stimulation und der PD-L1-Induktion nachgewiesen. Der Anstieg von PD-L1 nach HGF-Stimulation konnte nahezu vollständig durch einen ERK1/2-Inhibitor verhindert werden. Das legt nahe, dass der MAPK-Signalweg die größere Bedeutung für die HGF-induzierte PD-L1-Expression hat. Weiter konnte gezeigt werden, dass AKT-Inhibition den PD-L1-Anstieg zum Teil hemmen kann.

Im EBV-positiven NPC (Nasopharynxkarzinom) ist eine Induktion der PD-L1-Expression über die Signalwege STAT3, MAPK und NF- $\kappa$ B beschrieben [159]. Ähnlich verhält sich NSCLC mit EGFR-Mutationen und TKI-Resistenzen. Dort induziert HGF über MAPK- und AKT-Signalwege die PD-L1-Expression. Zugleich übernimmt der MAPK-Signalweg die bedeutendere Rolle [160]. Weitere Untersuchungen an zwei Zelllinien des HCC (Hepatozelluläres Karzinom) zeigten, dass Cisplatin über den c-MET Rezeptor die PD-L1-Expression steigert. Diesen Anstieg steuern die MAPK- und AKT-Signalwege gleichermaßen. Zu bemerken ist, dass in dieser Studie die Menge an PD-L1-Protein ansteigt, jedoch ein Anstieg der PD-L1-mRNA erst später nachzuweisen ist [161]. Entsprechend zu diesen Ergebnissen zeigten die Western Blots (Abb. 6-9) in den hier verwendeten HNSCC Zelllinien einen PD-L1-Protein-Anstieg innerhalb von 4 Stunden nach HGF-Stimulation. Der schnelle Anstieg weist auf einen posttranslationalen Effekt hin. Er könnte durch die Kinase GSK3 $\beta$  (GLycogen Synthase Kinase 3 $\beta$ ) hervorgerufen werden, welche durch Phosphorylierung PD-L1 für seinen proteasomalen Abbau markiert [162] und durch eine über HGF vermittelte Aktivierung der AKT- und MAPK-Signalwege direkt inhibiert wird [163]. HGF bewirkt die festgestellte PD-L1-Akkumulation bei dieser Signalkaskade also nur indirekt.

Bei HCC-Zelllinien ist jedoch ein anderer Zusammenhang beschrieben, dort wird von einer negativen Korrelation zwischen c-MET und PD-L1 ausgegangen. GSK3 $\beta$  wird direkt über c-MET aktiviert und veranlasst mittels Phosphorylierung den proteasomalen Abbau von PD-L1 [164]. Diese gegensätzlichen Ergebnisse demonstrieren die Heterogenität verschiedener Tumorerkrankungen.

Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen lässt sich darüber hinaus kein Zusammenhang zwischen STAT3-Aktivität und HGF-Stimulation oder PD-L1-Expression feststellen. Obwohl die eingesetzte Konzentration von 100  $\mu$ M S3I-201 eine

Hemmung der STAT3-Aktivität in der FaDu- und Detroit562-Zelllinie erzielen konnte, war in der SCC 9-Zelllinie nach der Behandlung mit dem Inhibitor das STAT3-Protein kaum mehr nachweisbar. Ein Effekt auf weitere Proteine kann somit nicht ausgeschlossen werden. Eine Aktivität des STAT3-Signalwegs, trotz erfolgreichem Nachweis des STAT3 Proteins, konnte in der SCC154-Zelllinie nicht festgestellt werden.

Durch die ausgeglichene Proteinkonzentration und simultane Detektion konnte eine variierende Expression und Aktivität der Signalwege zwischen den vier untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden, dabei blieb die Reaktion auf die HGF-Stimulation jedoch einheitlich. Zusätzlich konnte die Aktivitätsentwicklung anhand der phosphorylierten Form der Proteine dieser Signalwege im Laufe der Versuchszeit nach 4 h und 24 h gezeigt werden. Der PI3K/AKT-Signalweg konnte mit HGF bis auf in der FaDu-Zelllinie nach 24 h überall stimuliert werden. Die ERK1/2 Phosphorylierung konnte ebenfalls bis auf die Detroit562- und SCC9-Zelllinien nach 24h im Vergleich zur Kontrollgruppe gesteigert werden. Die intrinsische Aktivierung der Kontrollgruppe, die negative Rückkopplung nach Aktivierung und Internalisierung von c-MET nach Stimulierung können dazu beitragen, dass die Stimulation nach 24 h abnimmt.

## 5.2 Der MAPK-Signalweg

Der erste in dieser Arbeit aufgeführte Versuch (siehe Kapitel 4.1) sollte aufzeigen, über welche der drei Signalwege die erhöhte PD-L1-Expression nach HGF-Stimulation herbeigeführt wird. Die Betrachtung der Kontroll-Proben, der HGF-behandelten und der HGF/SCH772984-behandelten Proben in allen untersuchten Zelllinien zu zwei verschiedenen Zeitpunkten zeigte deutlich, dass die PD-L1-Expression bei HGF-Stimulation hauptsächlich über den MAPK-Signalweg gesteuert ist.

Der MAPK-Signalweg übernimmt essenzielle Funktionen in der Zelladhäsion, im Zellzyklus, bei der Migration, dem Überleben, der Differenzierung, dem Metabolismus, der Proliferation und der Transkription. Dysregulation mit Daueraktivierung innerhalb dieser Kaskade gehen mit Tumorentstehungen und Progression einher, dabei ist letztendlich ERK1/2 aktiviert bzw. phosphoryliert und wird in den Zellkern transloziert.

Die Signale werden in die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie Elk1, c-Fos, c-MYC und Fra1, übersetzt [165]. In einem Drittel der Tumorerkrankungen ist der MAPK-Signalweg dereguliert [166]. Der Anteil an Mutationen innerhalb des RAS/MAPK-Signalwegs wird bei HNSCC auf 18 % geschätzt [167].

Über den MAPK-Signalweg, welcher aus drei nacheinander geschalteten Kinasen besteht, werden mehrere extrazelluläre Signale transduziert. Die Signalweitergabe an ERK1/2, auch MAP-Kinase genannt, wird über MEK1/2 vermittelt, der als MAPK-Kinase oder MAP2K bezeichnet wird. MEK1/2 wird wiederum über das höher geordnete RAF-Protein, auch als MAPKK-Kinase oder MAP3K bekannt, aktiviert, welches durch membrangebundenes RAS-Protein phosphoryliert wird [168].

Um die Bedeutung des MAPK-Signalweg in der HGF/PD-L1 Achse zu bestätigen, wurden die Zellen mit ERK1/2-spezifischer siRNA transfiziert. Nach 4 Tagen Inkubationszeit konnte sowohl mittels quantitativer PCR auf der mRNA-Ebene, als auch mittels Western Blot auf der Protein-Ebene eine signifikante Reduktion an ERK1/2 erzielt werden. Der Level an PD-L1 veränderte sich durch alleiniges Knock-down von ERK1/2 nicht. Damit konnte gezeigt werden, dass die ERK1/2-Abnahme alleine keinen Einfluss auf die PD-L1-Expression hat, allerdings reagierten die Zellen auf HGF-Stimulation mit einem eingeschränkten PD-L1-Anstieg (Abb. 11).

Obwohl die ERK1/2-Reduktion und der Effekt auf die PD-L1-Expression nachvollziehbar war, war diese Reduktion bei einheitlicher Versuchsdurchführung innerhalb der Zelllinien unterschiedlich ausgeprägt. Dies kann an der unterschiedlichen Bedeutung und Regulation des ERK1/2 Proteins in der einzelnen Zelllinie und an der einheitlichen Inkubationszeit für 4 Tage liegen. Zum Beispiel zeigte eine RNA Interferenz-Studie in zwei Zelllinien des Ovarialkarzinoms (HeyC2 und KGN), dass bei einer Zelllinie (HeyC2) am vierten Tag ein Wiederanstieg des ERK1/2 Proteins stattfand, während bei der anderen Zelllinien eine Reduktion noch am fünften Tag erhalten blieb [169].

Klinisch findet die Hemmung dieses Signalwegs mithilfe von niedermolekularen Inhibitoren statt, welche die Kernelemente des MAPK-Signalwegs (RAS, RAF, MEK

und ERK) umfassen. Zu den zugelassene Inhibitoren dieses Signalwegs bei Tumorerkrankungen gehört der Multikinase-Inhibitor Sorafenib, der neben C-RAF und B-RAF die weitere Kinasen VEGFR, PDGFR $\beta$ , FLT3 und C-KIT inhibiert und die Zulassung in den USA für die Behandlung des Nierenkarzinoms (2005) [170] und des Hepatozellulären Karzinoms (2007) [171] erhielt. Weitere Inhibitoren sind Vemurafenib und Dabrafenib (selektive B-RAF-Inhibitoren), welche für die Behandlung des malignen Melanoms mit BRAF V600 Mutation zugelassen sind [172, 173]. Zwar liegt die Ansprechrate auf die selektiven B-RAF-Inhibitoren bei 80 %, jedoch entwickeln diese Patienten innerhalb von 6-7 Monaten Resistenzen, die wiederum in ERK1/2 Reaktivierung resultieren [174]. Zudem entwickeln Patienten bei dieser Therapie aufgrund paradoxer MAPK-Signalweg-Aktivierung Hauttumoren, vor allem Plattenepithelkarzinome der Haut und Kerathoakanthome [175]. Dem kann durch simultane Inhibition des MEK-Proteins vorgebeugt werden [176]. Zum Beispiel wird der MEK-Inhibitor Trametinib eingesetzt, welcher als Monotherapie oder in Kombination mit Dabrafenib beim malignen Melanom und NSCLC bei B-RAF V600 Mutation zugelassen wurde [177].

ERK1/2-Inhibitoren gewinnen aufgrund einer häufigen Reaktivierung des Signalweges bei Resistenzentwicklung mehr Aufmerksamkeit, sodass sich mehrere Inhibitoren in der klinischen Evaluation befinden [178].

Trotz der Effektivität und der guten Verträglichkeit erreichen die niedermolekularen Inhibitoren wegen Resistenzentwicklungen selten eine Heilung [179, 180]. Dies gilt im Speziellen für das Kopf-Hals-Karzinom, da hier regelhaft keine einzelne *driver mutation* vorliegt, sondern eine große Zahl unterschiedlicher Mutationen die Tumorentstehung und -progression begünstigen [181].

Zur Hemmung des MAPK-Signalwegs der untersuchten Zelllinien wurde in dieser Arbeit der MEK-Inhibitor Trametinib eingesetzt. In *in vitro*-Untersuchungen erzielte 25 nM Trametinib eine ausreichende Hemmung [116]. Die Europäische Arzneimittel-Agentur (EMA) gab im Zulassungsreport für Trametinib eine präklinische Zielkonzentration von 10.4 nM an [177]. Innerhalb dieser Konzentrationen zeigten die hier verwendeten Zelllinien keine Proliferationshemmung oder einen toxischen Effekt, erst bei höherer Konzentration reagierte die SCC9-Zelllinie. Noch weniger empfindlich reagierten die FaDu-, Detroit562- und SCC154-Zelllinie.

Ein aktiver und deregulierter MAPK-Signalweg bei mutiertem RAS-Protein und erhöhtem P-ERK1/2 könnte in Zusammenhang mit primären Resistenzen gegen Cetuximab und Radiotherapie bei HNSCC stehen [123, 124]. Diese Resistenzen bzw. Aktivierung des RAS/MAPK-Signalwegs kann durch reduzierte Expression von DUSP5 (eng.:“ Dual specificity protein phosphatase 5,,) und DUSP6 (eng.:“ Dual specificity protein phosphatase 6,,), welche ERK1/2 negativ regulieren, oder erhöhte Expression von AURKB (eng.:“ Aurora kinase B,,), welches die Mitose der Zellen reguliert, zustande kommen [182].

Die Blockade von HGF/c-MET könnte in einer kombinierten Therapie eine Möglichkeit darstellen, um eine Hemmung der MAPK und AKT-Signalwege zu erreichen [145, 183]. Eine Hemmung beider Signalwege geht mit einer reduzierten Proliferation einher [184]. Eine Untersuchung an HNSCC-Tumorzellen von HNSCC-Patienten zeigte zudem, dass eine Erweiterung der molekularen Therapie auf weitere Signalmoleküle wie AXL, Met und VEGFR in Kombination mit Trametinib von Nutzen sein könnte [185]. In einer randomisierten Phase-II-Studie, die den präoperativen Einsatz von Trametinib bei HNSCC bewertet, konnte eine Tumorreduktion bei 65 % der Patienten beobachtet werden [186].

Trametinib hat in dieser Arbeit die Phosphorylierung von P-ERK1/2 signifikant verhindert, jedoch konnte die P-MEK-Hemmung nicht überall beobachtet werden (siehe Western Blots, Abb. 13). Präklinische Studien mit Trametinib zeigten, dass die Hemmung von P-ERK1/2 nicht bei allen Zelllinien von P-MEK-Hemmung begleitet ist. Dies wurde bei den ersten Untersuchungen von Trametinib festgestellt und damit argumentiert, dass Trametinib im MEK1/2 Protein nur eine Phosphorylierungsstelle (S217) der beiden (S217 und S221) blockiert [187, 188]. Eine weitere Erklärung kann die fehlende negative Rückkopplung an das RAS- und RAF-Protein innerhalb des Signalweges bei ERK-Inhibition liefern, was bei Tumoren mit aktiven TKR, welche häufiger bei HNSCC zu finden ist, zu beobachten ist [189]. Dennoch konnte Trametinib über die P-ERK-Hemmung den durch HGF vermittelten PD-L1-Anstieg verhindern (Kapital 4.3.3).

Kang et al. zeigten in einer Untersuchung an HNSCC-Zelllinien, inklusive FaDu und Detroit562 einerseits, dass die kombinierte Inhibition von MEK1/2 und PD-L1 die Anti-Tumor-Aktivität verbesserte, andererseits wurde berichtet, dass eine 72 h-Behandlung mit Trametinib alleine ausreicht um über den STAT3-Signalweg eine PD-L1-Expression zu

verursachen [190]. Daher wurde eine Stimulation mit Trametinib über 72 h in drei Zelllinien, die in vorausgehenden Versuchen eine P-STAT3-Aktivität zeigten, durchgeführt. In den Western Blot-Ergebnissen konnte weder eine P-STAT3-Erhöhung, noch eine signifikante Konzentrationsänderung von PD-L1 durch die Trametinib-Behandlung festgestellt werden (Abb. 14) und somit die Ergebnisse von Kang et al. nicht bestätigt werden. Dennoch beweist Trametinib in diesem Versuch seine Wirkung, indem es die Phosphorylierung von ERK1/2 langanhaltend hemmt.

Die Ergebnisse der Western Blots und die hemmende Wirkung von Trametinib auf die HGF-vermittelte PD-L1-Expression konnten mittels Durchflusszytometrie mit intakten Zellen der Linien Detroit562 und SCC154 verifiziert werden (Abb. 15).

Obwohl oft von Therapieresistenzen bei aktiver MAPK-Kinase berichtet wird, zeigte eine Studie ein längeres Überleben bei HNSCC-Patienten mit Mutation im MAPK-Signalweg unabhängig vom HPV-Status. Bei einer gleichzeitigen Mutation des Tumorsuppressors TP53, welche häufig bei HPV-negativen HNSCC anzutreffen ist und mit schlechter Prognose assoziiert sein sollte, ist das Überleben sogar am längsten. Zudem wurde gezeigt, dass eine Mutation im MAPK-Signalweg sich einerseits hemmend auf die Phosphorylierung des TKR ErbB3 auswirkt, andererseits aber mit einer stärkeren Rekrutierung von CD8+ T-Zellen einhergeht [191]. So könnte die Entschlüsselung des Aktivierungsmechanismus des MAPK-Signalwegs im Zusammenhang mit dem TKRs und die Expression von Immuncheckpoints helfen, die Patientenselektion und die medikamentöse Therapieauswahl und -kombination zu optimieren.

### 5.3 Fazit und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die Aktivierung der MAPK- und AKT-Signalwege durch HGF über den c-MET-Rezeptor bei HNSCC [141]. Sowohl die Aktivierung dieser Signalwege, als auch die Überexpression von HGF/c-MET stehen in Zusammenhang mit Resistenzentwicklungen [192, 193]. Zudem konnte bewiesen werden, dass der MAPK-Signalwege für die Regulation der PD-L1-Expression bei c-MET-Aktivierung eine entscheidende Rolle spielt.



Ausgehend von diesen Ergebnissen wäre eine Erweiterung der gezielten EGFR-Inhibierung denkbar. So könnte zusätzlich die MAPK- und AKT-Signalweg-Aktivierung vorab verhindert werden, indem c-Met und/oder die MAPK- oder Akt Signalwege bei Resistenzen gehemmt werden. Ein kombinierter Einsatz der TKI und ICI ist ebenfalls zu prüfen.

Beide Ansätze befinden sich für verschiedene Tumorentitäten in der präklinischen und klinischen Evaluation [180, 194, 195]. Die IMspire150-Studie zeigte erhöhtes progressionsfreies Überleben (15.1 gegenüber 10.6 Monate) in fortgeschrittenen BRAF-V600 positiven Melanomen, wenn der PD-L1 Antikörper Atezolizumab mit den TKIs Vemurafenib und Cobimetinib kombiniert wird [196]. In fortgeschrittenen HER2-positiven Magenkarzinomen profitierten die Patienten durch die Erweiterung die TKI Trastuzumab und die Chemotherapie mit dem PD-1-Inhibitor Pembrolizumab. Hier stieg die objektive Response-Rate von 51.9% auf 74.4% [197]. Auch die Kombination von TKIs und ICI bei metastasiertem Nierenkarzinom ist von Vorteil für die Patienten [198]. Ein erster Schritt zur Erprobung dieser Ansätze für HNSCC wäre eine Überprüfung auf Synergie bei verschiedenen Wirkstoffkombinationen *in vitro*.

Die untersuchten Zellen zeigten einen schnellen Anstieg von PD-L1. Hier sollte überprüft werden, wie stark weitere Regulationsmechanismen in der PD-L1-Expression involviert sind, ob GSK3 $\beta$  dafür zuständig ist und ob die Aktivierung dieser Kinase den PD-L1-Anstieg auf der posttranslationalen Ebene hemmen kann bzw. deren Ausschaltung eine Induktion bewirken kann. Weiter sollte untersucht werden, ob eine Wechselwirkung zwischen PD-L1, weiteren TKR und deren intrazellulären Signalwegen bei HNSCC besteht. In Zelllinien des Lungenkarzinoms und des malignen Melanoms konnte ein direkter Einfluss von PD-L1 auf c-MET und den MAPK-Signalweg festgestellt werden. PD-L1-Induktion mit INF- $\gamma$  bewirkte eine Steigerung von P-MET, dagegen ging die PD-L1-Hemmung mit einer Abnahme von P-MET und P-ERK einher. Hier konnte bei der PD-L1-Hemmung eine Zunahme der Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B (PTP1B) beobachtet werden, welche c-MET negativ reguliert [199].

Klinisch ist wichtig zu evaluieren, wie Mutationen und die Aktivität der MAPK- und PI3K/AKT-Signalwege die Wirksamkeit und die Resistenzentwicklung bei der zielgerichteten Therapie und der Immuntherapie beeinflussen, und ob diese als Kriterien

neben der PD-L1-Expression in die Patientenselektion bei der Therapieauswahl einfließen sollten.

## 6 Zusammenfassung

Die zielgerichtete Therapie und die Immuncheckpoint-Inhibitoren haben die Tumorthherapie revolutioniert. Während erstere die Tumorzellen gezielt angreift, verhindern letztere die Hemmung des Immunsystems durch Immuncheckpoints, um eine robuste Immunantwort zu erreichen. Zusätzlich ist das Nebenwirkungsprofil bei direktem Vergleich mit der konventionellen Chemotherapie günstiger. Beim HNSCC werden beide Ansätze angewendet. Cetuximab ist ein monoklonaler Antikörper, der sich gegen EGFR, welcher bei HNSCC überexprimiert ist, richtet. Nivolumab und Pembrolizumab richten sich gegen das Immuncheckpoint-Protein PD-1. Nach wie vor sind die Resistenzen, sowohl die initialen als auch die erworbenen, die größte zu überwindende Herausforderung. Aufbauend auf dem Ergebnis vorangegangener Arbeiten, die zeigen konnten, dass HGF über c-MET die Expression des Immuncheckpointliganden PD-L1 steigert, setzt sich diese Arbeit weiter mit den intrazellulären nachgeschalteten Signalwegen nach c-MET Aktivierung auseinander. Dies ist von besonderem Interesse, weil diese Signalwege ebenfalls für die Resistenzentwicklung verantwortlich sein können, zeitgleich können diese im Rahmen der zielgerichteten Therapie gezielt inhibiert werden.

Um den HGF-Einfluss auf die intrazellulären Signalwege zu prüfen, wurden vier etablierte HNSCC-Zelllinien herangezogen.

Im ersten Teil der Arbeit wurden die 4 HNSCC-abgeleitete Zelllinien mit HGF stimuliert und mittels Western Blot der PD-L1-Anstieg und die Phosphorylierungsänderung der Schlüsselproteine der einzelnen Signalwege nachgewiesen. Daraus ergab sich, dass HGF die MAPK- und PIK3/AKT-Signalwege aktiviert. Während eine kombinierte Blockade des MAPK-Signalwegs den PD-L1-Anstieg vollständig verhindern konnte, hemmte die PIK3/AKT-Blockade den PD-L1-Anstieg nur partiell.

Im zweiten Teil wurde mit siRNA der hauptsächlich für den PD-L1-Anstieg zuständige MAPK-Signalweg unterbunden, was mittels quantitativer PCR auf der mRNA-Ebene nachgewiesen werden konnte. Mittels Western Blot konnte entsprechend gezeigt werden, dass der PD-L1-Anstieg trotz HGF-Stimulation bei nicht funktionsfähigem MAPK-Signalweg eingeschränkt war.

Weiter wurde der Effekt mit dem Medikament Trametinib, das im Rahmen der zielgerichteten Therapie bei malignem Melanom und NSCLC für die MAPK-Signalweg-Hemmung zugelassen ist, evaluiert. Sowohl im Western Blot als auch in der Durchflusszytometrie konnte bestätigt werden, dass Trametinib den HGF-induzierten Anstieg von PD-L1 signifikant blockiert.

Darüber hinaus konnte im Rahmen der Western Blot-Versuche gezeigt werden, dass die Signalwege und die PD-L1-Expression in den Zelllinien unterschiedlich aktiv bzw. hoch waren. Unter den vier Zelllinien zeigte die FaDu-Zelllinie eine erhöhte PI3K/AKT-Aktivität, Detroit562 und SCC9 eine erhöhte MAPK-Aktivität. Die PD-L1-Expression war in der SCC9-Zelllinie am höchsten.

Die Arbeit zeigt eine einheitliche Reaktion der HNSCC-Zelllinien auf den Wachstumsfaktor HGF, welcher im Tumormilieu von HNSCC oft in hoher Konzentration vorhanden ist. Neben dem EGFR-Antikörper (Cetuximab) kann eine kombinierte Hemmung entweder von c-MET oder von den nachgeschalteten Signalwegen MAPK und PI3K/AKT bei Resistenzen, Progression oder Unverträglichkeiten eine Möglichkeit für eine wirksamere Therapie von HNSCC darstellen. Ein Screening der Signalwege und deren Aktivierungsmechanismen könnte bei Resistenzen oder bei einem Rezidiv/Progress dazu beitragen, gezielt die alternative Aktivierung zu hemmen und möglicherweise die Wirksamkeit einer Immuncheckpointblockade zu verbessern.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Bhat, G.R., R.G. Hyole, and J. Li, *Head and neck cancer: Current challenges and future perspectives*. Adv Cancer Res, 2021. **152**: p. 67-102.
2. Argiris, A., et al., *Head and neck cancer*. The Lancet, 2008. **371**(9625): p. 1695-1709.
3. Goon, P., et al., *Viral and Clinical Oncology of Head and Neck Cancers*. Current Oncology Reports, 2022. **24**(7): p. 929-942.
4. Aupérin, A., *Epidemiology of head and neck cancers: an update*. Curr Opin Oncol, 2020. **32**(3): p. 178-186.
5. Guntinas-Lichius, O., et al., *Trends in epidemiology and treatment and outcome for head and neck cancer: A population-based long-term analysis from 1996 to 2011 of the Thuringian cancer registry*. Oral Oncology, 2014. **50**(12): p. 1157-1164.
6. Simard, E.P., L.A. Torre, and A. Jemal, *International trends in head and neck cancer incidence rates: Differences by country, sex and anatomic site*. Oral Oncology, 2014. **50**(5): p. 387-403.
7. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. International journal of cancer, 2015. **136**(5): p. E359-E386.
8. Pulte, D. and H. Brenner, *Changes in survival in head and neck cancers in the late 20th and early 21st century: a period analysis*. The oncologist, 2010. **15**(9): p. 994.
9. Jansen, L., et al., *Mundhöhlen-und Pharynxkarzinome: Inzidenz, Mortalität und Überleben in Deutschland*. Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz, 2021: p. 1-10.
10. Rettig, E.M. and G. D'Souza, *Epidemiology of head and neck cancer*. Surg Oncol Clin N Am, 2015. **24**(3): p. 379-96.
11. Defossez, G., et al., *Cancer incidence and mortality trends in France over 1990-2018 for solid tumors: the sex gap is narrowing*. BMC Cancer, 2021. **21**(1): p. 726.
12. Hashibe, M., et al., *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 Epidemiology and Prevention Biomarkers, 2009. **18**(2): p. 541-550.
13. Blot, W.J., et al., *Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer*. Cancer research, 1988. **48**(11): p. 3282-3287.
14. D'Souza, G., et al., *Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer*. N Engl J Med, 2007. **356**(19): p. 1944-56.
15. Herrero, R., et al., *Human Papillomavirus and Oral Cancer: The International Agency for Research on Cancer Multicenter Study*. JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 2003. **95**(23): p. 1772-1783.
16. Kim, S.M., *Human papilloma virus in oral cancer*. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg, 2016. **42**(6): p. 327-336.
17. Marur, S., et al., *HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic*. The lancet oncology, 2010. **11**(8): p. 781-789.

18. Götz, C., et al., *Detection of HPV infection in head and neck cancers: Promise and pitfalls in the last ten years-a meta-analysis*. *Molecular and clinical oncology*, 2019. **10**(1): p. 17-28.
19. Tsang, C.M., et al. *Translational genomics of nasopharyngeal cancer*. in *Seminars in cancer biology*. 2020. Elsevier.
20. Garg, A., P. Chaturvedi, and P.C. Gupta, *A review of the systemic adverse effects of areca nut or betel nut*. *Indian journal of medical and paediatric oncology: official journal of Indian Society of Medical & Paediatric Oncology*, 2014. **35**(1): p. 3.
21. Wong, I.C.K., Y.-K. Ng, and V.W.Y. Lui, *Cancers of the lung, head and neck on the rise: perspectives on the genotoxicity of air pollution*. *Chinese journal of cancer*, 2014. **33**(10): p. 476.
22. Lee, Y.C.A., et al., *Tobacco smoking, alcohol drinking, betel quid chewing, and the risk of head and neck cancer in an East Asian population*. *Head & neck*, 2019. **41**(1): p. 92-102.
23. Velleuer, E. and R. Dietrich, *Fanconi anemia: young patients at high risk for squamous cell carcinoma*. *Molecular and cellular pediatrics*, 2014. **1**(1): p. 1-6.
24. Guha, N., et al., *Oral health and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck and esophagus: results of two multicentric case-control studies*. *American journal of epidemiology*, 2007. **166**(10): p. 1159-1173.
25. Freedman, N.D., et al., *Fruit and vegetable intake and head and neck cancer risk in a large United States prospective cohort study*. *International journal of cancer*, 2008. **122**(10): p. 2330-2336.
26. Reibel, J., *Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics*. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 2003. **14**(1): p. 47-62.
27. Warnakulasuriya, S., *Clinical features and presentation of oral potentially malignant disorders*. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*, 2018. **125**(6): p. 582-590.
28. Warnakulasuriya, S., et al., *Oral potentially malignant disorders: A consensus report from an international seminar on nomenclature and classification, convened by the WHO Collaborating Centre for Oral Cancer*. *Oral diseases*, 2021. **27**(8): p. 1862-1880.
29. van der Waal, I., *Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management*. *Oral Oncology*, 2009. **45**(4): p. 317-323.
30. Petti, S., *Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review*. *Oral Oncology*, 2003. **39**(8): p. 770-780.
31. Warnakulasuriya, S. and A. Ariyawardana, *Malignant transformation of oral leukoplakia: a systematic review of observational studies*. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 2016. **45**(3): p. 155-166.
32. Reichart, P.A. and H.P. Philipsen, *Oral erythroplakia—a review*. *Oral Oncology*, 2005. **41**(6): p. 551-561.
33. Shafer, W.G. and C.A. Waldron, *Erythroplakia of the oral cavity*. *Cancer*, 1975. **36**(3): p. 1021-8.
34. Pindborg, J.J., et al., *Histological Typing of Cancer and Precancer of the Oral Mucosa: In Collaboration with LH Sobin and Pathologists in 9 Countries*. 2012: Springer Science & Business Media.

35. El-Naggar, A.K., J.K. Chan, and J.R. Grandis, *WHO classification of head and neck tumours*. 2017.
36. Buser, K., *Einteilung und Klassifikation maligner Tumoren*, in *Onkologische Krankenpflege*. 2017, Springer. p. 29-36.
37. Sobin, L.H., M.K. Gospodarowicz, and C. Wittekind, *TNM classification of malignant tumours*. 2011: John Wiley & Sons.
38. Boxberg, M., et al., *Tumour budding activity and cell nest size determine patient outcome in oral squamous cell carcinoma: proposal for an adjusted grading system*. *Histopathology*, 2017. **70**(7): p. 1125-1137.
39. Wittekind, C., *TNM: Klassifikation maligner Tumoren*. 2016: John Wiley & Sons.
40. McGoldrick, D., et al., *Validation of the UICC 8th edition staging of oral cavity squamous cell carcinoma in a UK cohort*. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2021. **59**(1): p. 76-81.
41. Der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF) , d.D.K.e.V.D.u.d.D.K., *leitlinie Mundhöhlenkarzinom*. 2021, Office des Leitlinienprogrammes Onkologie.
42. Rogers, S., et al., *Quality of life, cognitive, physical and emotional function at diagnosis predicts head and neck cancer survival: analysis of cases from the Head and Neck 5000 study*. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 2020: p. 1-9.
43. Aaronson, N.K., et al., *The European Organization for Research and Treatment of Cancer QLQ-C30: a quality-of-life instrument for use in international clinical trials in oncology*. *J Natl Cancer Inst*, 1993. **85**(5): p. 365-76.
44. Layland, M.K., D.G. Sessions, and J. Lenox, *The influence of lymph node metastasis in the treatment of squamous cell carcinoma of the oral cavity, oropharynx, larynx, and hypopharynx: N0 versus N+*. *Laryngoscope*, 2005. **115**(4): p. 629-39.
45. Mendenhall, W.M., et al., *Is radiation therapy a preferred alternative to surgery for squamous cell carcinoma of the base of tongue?* *J Clin Oncol*, 2000. **18**(1): p. 35-42.
46. Berger, M., et al., *Occurrence of cervical lymph node metastasis of maxillary squamous cell carcinoma - A monocentric study of 171 patients*. *J Craniomaxillofac Surg*, 2015. **43**(10): p. 2195-9.
47. Lee, N.C., et al., *Patterns of failure in high-metastatic node number human papillomavirus-positive oropharyngeal carcinoma*. *Oral oncology*, 2018. **85**: p. 35-39.
48. Doll, C., et al., *Pattern of cervical lymph node metastases in squamous cell carcinoma of the upper oral cavity - How to manage the neck*. *Oral Oncol*, 2022. **130**: p. 105898.
49. D'Cruz, A.K., et al., *Elective versus therapeutic neck dissection in node-negative oral cancer*. *New England Journal of Medicine*, 2015. **373**(6): p. 521-529.
50. Bahadur, S., et al., *Results of radiotherapy with, or without, salvage surgery versus combined surgery and radiotherapy in advanced carcinoma of the hypopharynx*. *The Journal of Laryngology & Otology*, 2002. **116**(1): p. 29-32.

51. Mazon, J., et al., *Iridium 192 implantation of T1 and T2 carcinomas of the mobile tongue*. International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics, 1990. **19**(6): p. 1369-1376.
52. Cooper, J.S., et al., *Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck*. New England Journal of Medicine, 2004. **350**(19): p. 1937-1944.
53. Pignon, J., et al., *Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data*. The Lancet, 2000. **355**(9208): p. 949-955.
54. Blanchard, P., et al., *Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): a comprehensive analysis by tumour site*. Radiotherapy and oncology, 2011. **100**(1): p. 33-40.
55. Normanno, N., et al., *Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer*. Gene, 2006. **366**(1): p. 2-16.
56. Grandis, J.R. and D.J. Tweardy, *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 research, 1993. **53**(15): p. 3579-3584.
57. Concu, R. and M. Cordeiro, *Cetuximab and the Head and Neck Squamous Cell Cancer*. Curr Top Med Chem, 2018. **18**(3): p. 192-198.
58. Bonner, J.A., et al., *Radiotherapy plus Cetuximab for Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck*. New England Journal of Medicine, 2006. **354**(6): p. 567-578.
59. Vermorken, J.B., et al., *Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer*. N Engl J Med, 2008. **359**(11): p. 1116-27.
60. Byeon, H.K., M. Ku, and J. Yang, *Beyond EGFR inhibition: multilateral combat strategies to stop the progression of head and neck cancer*. Experimental & molecular medicine, 2019. **51**(1): p. 1-14.
61. Wheeler, D.L., E.F. Dunn, and P.M. Harari, *Understanding resistance to EGFR inhibitors-impact on future treatment strategies*. Nat Rev Clin Oncol, 2010. **7**(9): p. 493-507.
62. Madoz-Gúrpide, J., et al., *Activation of MET pathway predicts poor outcome to cetuximab in patients with recurrent or metastatic head and neck cancer*. J Transl Med, 2015. **13**: p. 282.
63. Engelman, J.A., et al., *MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling*. Science, 2007. **316**(5827): p. 1039-43.
64. Bean, J., et al., *MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(52): p. 20932-7.
65. Coley, W.B., *The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the Streptococcus erysipelas and the Bacillus prodigiosus)*. Proc R Soc Med, 1910. **3**(Surg Sect): p. 1-48.
66. Wiemann, B. and C.O. Starnes, *Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective*. Pharmacol Ther, 1994. **64**(3): p. 529-64.
67. Bagchi, S., R. Yuan, and E.G. Engleman, *Immune Checkpoint Inhibitors for the Treatment of Cancer: Clinical Impact and Mechanisms of Response and Resistance*. Annu Rev Pathol, 2021. **16**: p. 223-249.



68. Ayoub, N., K. Al-Shami, and R. Yaghan, *Immunotherapy for HER2-positive breast cancer: Recent advances and combination therapeutic approaches*. Breast Cancer: Targets and Therapy, 2019. **Volume 11**: p. 53-69.
69. Ferris, R.L., et al., *Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck*. N Engl J Med, 2016. **375**(19): p. 1856-1867.
70. Ferris, R.L., et al., *Nivolumab vs investigator's choice in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: 2-year long-term survival update of CheckMate 141 with analyses by tumor PD-L1 expression*. Oral Oncol, 2018. **81**: p. 45-51.
71. Vasiliadou, I., et al., *Safety and Treatment Outcomes of Nivolumab for the Treatment of Recurrent or Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Retrospective Multicenter Cohort Study*. Cancers (Basel), 2021. **13**(6).
72. Burtneess, B., et al., *Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study*. Lancet, 2019. **394**(10212): p. 1915-1928.
73. Cooper, C.S., et al., *Characterization of human transforming genes from chemically transformed, teratocarcinoma, and pancreatic carcinoma cell lines*. Cancer Res, 1984. **44**(1): p. 1-10.
74. Dean, M., et al., *The human met oncogene is related to the tyrosine kinase oncogenes*. Nature, 1985. **318**(6044): p. 385-388.
75. Giordano, S., et al., *Biosynthesis of the protein encoded by the c-met proto-oncogene*. Oncogene, 1989. **4**(11): p. 1383-8.
76. Giordano, S., et al., *Tyrosine kinase receptor indistinguishable from the c-met protein*. Nature, 1989. **339**(6220): p. 155-156.
77. Prat, M., et al., *The receptor encoded by the human C-MET oncogene is expressed in hepatocytes, epithelial cells and solid tumors*. International Journal of Cancer, 1991. **49**(3): p. 323-328.
78. Bottaro, D.P., et al., *Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product*. Science, 1991. **251**(4995): p. 802-4.
79. Sonnenberg, E., et al., *Scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor, the c-met tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between mesenchyme and epithelia during mouse development*. Journal of Cell Biology, 1993. **123**(1): p. 223-235.
80. Birchmeier, C., et al., *Met, metastasis, motility and more*. Nature reviews Molecular cell biology, 2003. **4**(12): p. 915-925.
81. Chmielowiec, J., et al., *c-Met is essential for wound healing in the skin*. The Journal of cell biology, 2007. **177**(1): p. 151-162.
82. Borowiak, M., et al., *Met provides essential signals for liver regeneration*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2004. **101**(29): p. 10608-10613.
83. Yang, J. and R.A. Weinberg, *Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis*. Developmental cell, 2008. **14**(6): p. 818-829.
84. Graveel, C.R., D. Tolbert, and G.F.V. Woude, *MET: a critical player in tumorigenesis and therapeutic target*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2013. **5**(7): p. a009209.

85. Knowles, L.M., et al., *HGF and c-Met participate in paracrine tumorigenic pathways in head and neck squamous cell cancer*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(11): p. 3740-50.
86. Toiyama, Y., et al., *Co-expression of hepatocyte growth factor and c-Met predicts peritoneal dissemination established by autocrine hepatocyte growth factor/c-Met signaling in gastric cancer*. International Journal of Cancer, 2012. **130**(12): p. 2912-2921.
87. Xie, Q., et al., *Hepatocyte growth factor (HGF) autocrine activation predicts sensitivity to MET inhibition in glioblastoma*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012. **109**(2): p. 570-575.
88. Weidner, K.M., et al., *Interaction between Gab1 and the c-Met receptor tyrosine kinase is responsible for epithelial morphogenesis*. Nature, 1996. **384**(6605): p. 173-176.
89. Lai, A.Z., J.V. Abella, and M. Park, *Crosstalk in Met receptor oncogenesis*. Trends in cell biology, 2009. **19**(10): p. 542-551.
90. Hartmann, S., N.E. Bhola, and J.R. Grandis, *HGF/Met signaling in head and neck cancer: impact on the tumor microenvironment*. Clinical Cancer Research, 2016. **22**(16): p. 4005-4013.
91. Dulak, A.M., et al., *HGF-independent potentiation of EGFR action by c-Met*. Oncogene, 2011. **30**(33): p. 3625-3635.
92. Wheeler, D.L., et al., *Mechanisms of acquired resistance to cetuximab: role of HER (ErbB) family members*. Oncogene, 2008. **27**(28): p. 3944-56.
93. Raghav, K., et al., *MET amplification in metastatic colorectal cancer: an acquired response to EGFR inhibition, not a de novo phenomenon*. Oncotarget, 2016. **7**(34): p. 54627-54631.
94. Jun, H.J., et al., *Acquired MET expression confers resistance to EGFR inhibition in a mouse model of glioblastoma multiforme*. Oncogene, 2012. **31**(25): p. 3039-50.
95. Szturz, P., et al., *Understanding c-MET signalling in squamous cell carcinoma of the head & neck*. Crit Rev Oncol Hematol, 2017. **111**: p. 39-51.
96. Klenk, N.A., *Einfluss von HGF/c-Met auf das Tumormikromilieu in Kopf-Hals-Karzinomen*  
*Influence of HGF/c-Met on the tumor microenvironment in head and neck cancer*. 2019.
97. Freeman, G.J., et al., *Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation*. J Exp Med, 2000. **192**(7): p. 1027-34.
98. Brown, J.A., et al., *Blockade of Programmed Death-1 Ligands on Dendritic Cells Enhances T Cell Activation and Cytokine Production*. The Journal of Immunology, 2003. **170**(3): p. 1257-1266.
99. Wang, L.-L., et al., *The roles of the PD-1/PD-L1 pathway at immunologically privileged sites*. American Journal of Reproductive Immunology, 2017. **78**(2): p. e12710.
100. Eppihimer, M.J., et al., *Expression and regulation of the PD-L1 immunoinhibitory molecule on microvascular endothelial cells*. Microcirculation, 2002. **9**(2): p. 133-45.
101. Keir, M.E., et al., *PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity*. Annual Review of Immunology, 2008. **26**(1): p. 677-704.

102. Zhu, X. and J. Lang, *Soluble PD-1 and PD-L1: predictive and prognostic significance in cancer*. *Oncotarget*, 2017. **8**(57): p. 97671-97682.
103. Sharpe, A.H. and K.E. Pauken, *The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway*. *Nature Reviews Immunology*, 2018. **18**(3): p. 153-167.
104. Zheng, A., et al., *PD-L1 promotes head and neck squamous cell carcinoma cell growth through mTOR signaling*. *Oncol Rep*, 2019. **41**(5): p. 2833-2843.
105. Okazaki, T., et al., *PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(24): p. 13866-71.
106. Sheppard, K.A., et al., *PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKCtheta*. *FEBS Lett*, 2004. **574**(1-3): p. 37-41.
107. Patel, S.P. and R. Kurzrock, *PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy*. *Mol Cancer Ther*, 2015. **14**(4): p. 847-56.
108. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
109. Winer, J., et al., *Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase–polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro*. *Analytical biochemistry*, 1999. **270**(1): p. 41-49.
110. Gallo-Oller, G., R. Ordoñez, and J. Dotor, *A new background subtraction method for Western blot densitometry band quantification through image analysis software*. *J Immunol Methods*, 2018. **457**: p. 1-5.
111. Morris, E.J., et al., *Discovery of a novel ERK inhibitor with activity in models of acquired resistance to BRAF and MEK inhibitors*. *Cancer Discov*, 2013. **3**(7): p. 742-50.
112. Hirai, H., et al., *MK-2206, an allosteric Akt inhibitor, enhances antitumor efficacy by standard chemotherapeutic agents or molecular targeted drugs in vitro and in vivo*. *Mol Cancer Ther*, 2010. **9**(7): p. 1956-67.
113. Siddiquee, K., et al., *Selective chemical probe inhibitor of Stat3, identified through structure-based virtual screening, induces antitumor activity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(18): p. 7391-6.
114. Wright, C.J.M. and P.L. McCormack, *Trametinib: First Global Approval*. *Drugs*, 2013. **73**(11): p. 1245-1254.
115. Khan, Z.M., et al., *Structural basis for the action of the drug trametinib at KSR-bound MEK*. *Nature*, 2020. **588**(7838): p. 509-514.
116. Manchado, E., et al., *A combinatorial strategy for treating KRAS-mutant lung cancer*. *Nature*, 2016. **534**(7609): p. 647-51.
117. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. *CA Cancer J Clin*, 2018. **68**(6): p. 394-424.
118. Krebsregisterdaten, D.Z.f. *Krebs in Mundhöhle und Rachen*. 2021; Available from: [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/kid\\_2021/kid\\_2021\\_c00\\_c14\\_mundhoehle\\_rachen.pdf?\\_blob=publicationFile](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2021/kid_2021_c00_c14_mundhoehle_rachen.pdf?_blob=publicationFile).

119. McDermott, J.D. and D.W. Bowles, *Epidemiology of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas: Impact on Staging and Prevention Strategies*. Current Treatment Options in Oncology, 2019. **20**(5): p. 43.
120. Kitamura, N., et al., *Current Trends and Future Prospects of Molecular Targeted Therapy in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*. International Journal of Molecular Sciences, 2021. **22**(1): p. 240.
121. Taberna, M., M. Oliva, and R. Mesía, *Cetuximab-Containing Combinations in Locally Advanced and Recurrent or Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*. Front Oncol, 2019. **9**: p. 383.
122. Nair, S., et al., *Novel EGFR ectodomain mutations associated with ligand-independent activation and cetuximab resistance in head and neck cancer*. PLoS One, 2020. **15**(2): p. e0229077.
123. Saki, M., M. Toulany, and H.P. Rodemann, *Acquired resistance to cetuximab is associated with the overexpression of Ras family members and the loss of radiosensitization in head and neck cancer cells*. Radiother Oncol, 2013. **108**(3): p. 473-8.
124. Rampias, T., et al., *RAS/PI3K crosstalk and cetuximab resistance in head and neck squamous cell carcinoma*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(11): p. 2933-46.
125. Silva-Oliveira, R.J., et al., *AKT can modulate the in vitro response of HNSCC cells to irreversible EGFR inhibitors*. Oncotarget, 2017. **8**(32): p. 53288-53301.
126. Sen, M., et al., *Targeting Stat3 abrogates EGFR inhibitor resistance in cancer*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(18): p. 4986-96.
127. Picon, H. and A.K. Guddati, *Mechanisms of resistance in head and neck cancer*. Am J Cancer Res, 2020. **10**(9): p. 2742-2751.
128. Tosoni, A., et al., *Immunotherapy in head and neck cancer: evidence and perspectives*. Immunotherapy, 2017. **9**(16): p. 1351-1358.
129. Ferris, R.L., et al., *Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck*. New England Journal of Medicine, 2016. **375**(19): p. 1856-1867.
130. Mehra, R., et al., *Efficacy and safety of pembrolizumab in recurrent/metastatic head and neck squamous cell carcinoma: pooled analyses after long-term follow-up in KEYNOTE-012*. British Journal of Cancer, 2018. **119**(2): p. 153-159.
131. Venkatesiah, S.S., et al., *Immunology of Oral Squamous Cell Carcinoma-A Comprehensive Insight with Recent Concepts*. Life (Basel), 2022. **12**(11).
132. Concha-Benavente, F., et al., *Identification of the Cell-Intrinsic and-Extrinsic Pathways Downstream of EGFR and IFN $\gamma$  That Induce PD-L1 Expression in Head and Neck Cancer* EGFR/IFN $\gamma$ -Mediated PD-L1 Expression Is JAK2–STAT1 Dependent. Cancer research, 2016. **76**(5): p. 1031-1043.
133. Sacco, A.G., et al., *Pembrolizumab plus cetuximab in patients with recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma: an open-label, multi-arm, non-randomised, multicentre, phase 2 trial*. Lancet Oncol, 2021. **22**(6): p. 883-892.
134. Papaccio, F., et al., *HGF/MET and the Immune System: Relevance for Cancer Immunotherapy*. International Journal of Molecular Sciences, 2018. **19**(11): p. 3595.

135. Bauman, J.E., et al., *Randomized phase II trial of ficlatuzumab with or without cetuximab in pan-refractory, advanced head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC)*. Journal of Clinical Oncology, 2021. **39**(15\_suppl): p. 6015-6015.
136. Song, K.Y., et al., *Correlation of MET and PD-L1 Expression in Malignant Melanoma*. Cancers (Basel), 2020. **12**(7).
137. Yoshimura, K., et al., *Elucidation of the relationships of MET protein expression and gene copy number status with PD-L1 expression and the immune microenvironment in non-small cell lung cancer*. Lung Cancer, 2020. **141**: p. 21-31.
138. Boschert, V., et al., *HGF-Induced PD-L1 Expression in Head and Neck Cancer: Preclinical and Clinical Findings*. International Journal of Molecular Sciences, 2020. **21**(22): p. 8770.
139. Ju, X., et al., *Regulation of PD-L1 expression in cancer and clinical implications in immunotherapy*. Am J Cancer Res, 2020. **10**(1): p. 1-11.
140. Cha, J.-H., et al., *Mechanisms Controlling PD-L1 Expression in Cancer*. Molecular Cell, 2019. **76**(3): p. 359-370.
141. Arnold, L., J. Enders, and S.M. Thomas, *Activated HGF-c-Met Axis in Head and Neck Cancer*. Cancers (Basel), 2017. **9**(12).
142. Yano, S., et al., *Hepatocyte growth factor induces gefitinib resistance of lung adenocarcinoma with epidermal growth factor receptor-activating mutations*. Cancer Res, 2008. **68**(22): p. 9479-87.
143. Straussman, R., et al., *Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion*. Nature, 2012. **487**(7408): p. 500-4.
144. Yi, M., et al., *Regulation of PD-L1 expression in the tumor microenvironment*. Journal of Hematology & Oncology, 2021. **14**(1): p. 10.
145. Knowles, L.M., et al., *HGF and c-Met Participate in Paracrine Tumorigenic Pathways in Head and Neck Squamous Cell Cancer*. Clinical Cancer Research, 2009. **15**(11): p. 3740-3750.
146. Zhang, J., et al., *Circulating PD-L1 in NSCLC patients and the correlation between the level of PD-L1 expression and the clinical characteristics*. Thorac Cancer, 2015. **6**(4): p. 534-8.
147. Chen, L., et al., *B7-H1 expression associates with tumor invasion and predicts patient's survival in human esophageal cancer*. Int J Clin Exp Pathol, 2014. **7**(9): p. 6015-23.
148. Hou, J., et al., *Correlation between infiltration of FOXP3+ regulatory T cells and expression of B7-H1 in the tumor tissues of gastric cancer*. Exp Mol Pathol, 2014. **96**(3): p. 284-91.
149. Nomi, T., et al., *Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(7): p. 2151-7.
150. Ohaegbulam, K.C., et al., *Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway*. Trends Mol Med, 2015. **21**(1): p. 24-33.
151. Müller, T., et al., *PD-L1: a novel prognostic biomarker in head and neck squamous cell carcinoma*. Oncotarget, 2017. **8**(32): p. 52889-52900.
152. Yang, W.F., et al., *The prognostic role of PD-L1 expression for survival in head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis*. Oral Oncol, 2018. **86**: p. 81-90.

153. Ghanizada, M., et al., *The effects of checkpoint inhibition on head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review*. Oral Oncol, 2019. **90**: p. 67-73.
154. Reck, M., et al., *Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1–Positive Non–Small-Cell Lung Cancer*. New England Journal of Medicine, 2016. **375**(19): p. 1823-1833.
155. Balar, A.V., et al., *First-line pembrolizumab in cisplatin-ineligible patients with locally advanced and unresectable or metastatic urothelial cancer (KEYNOTE-052): a multicentre, single-arm, phase 2 study*. The Lancet Oncology, 2017. **18**(11): p. 1483-1492.
156. Ott, P.A., et al., *T-Cell–Inflamed Gene-Expression Profile, Programmed Death Ligand 1 Expression, and Tumor Mutational Burden Predict Efficacy in Patients Treated With Pembrolizumab Across 20 Cancers: KEYNOTE-028*. Journal of Clinical Oncology, 2019. **37**(4): p. 318-327.
157. Daud, A.I., et al., *Programmed Death-Ligand 1 Expression and Response to the Anti-Programmed Death 1 Antibody Pembrolizumab in Melanoma*. J Clin Oncol, 2016. **34**(34): p. 4102-4109.
158. Ribas, A. and S. Hu-Lieskovan, *What does PD-L1 positive or negative mean?* J Exp Med, 2016. **213**(13): p. 2835-2840.
159. Fang, W., et al., *EBV-driven LMP1 and IFN- $\gamma$  up-regulate PD-L1 in nasopharyngeal carcinoma: Implications for oncotargeted therapy*. Oncotarget, 2014. **5**(23): p. 12189-202.
160. Peng, S., et al., *EGFR-TKI resistance promotes immune escape in lung cancer via increased PD-L1 expression*. Molecular Cancer, 2019. **18**(1): p. 165.
161. Zhang, Z.S., et al., *HGF/c-MET pathway contributes to cisplatin-mediated PD-L1 expression in hepatocellular carcinoma*. Cell Biology International, 2021. **45**(12): p. 2521-2533.
162. Li, C.-W., et al., *Glycosylation and stabilization of programmed death ligand-1 suppresses T-cell activity*. Nature Communications, 2016. **7**(1): p. 12632.
163. Cohen, P. and S. Frame, *The renaissance of GSK3*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2001. **2**(10): p. 769-776.
164. Li, H., et al., *MET Inhibitors Promote Liver Tumor Evasion of the Immune Response by Stabilizing PDL1*. Gastroenterology, 2019. **156**(6): p. 1849-1861.e13.
165. Alexander, P., et al., *The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2011. **1813**(9): p. 1619-1633.
166. Dhillon, A.S., et al., *MAP kinase signalling pathways in cancer*. Oncogene, 2007. **26**(22): p. 3279-3290.
167. Johnson, D.E., et al., *Head and neck squamous cell carcinoma*. Nature reviews Disease primers, 2020. **6**(1): p. 1-22.
168. Niault, T.S. and M. Baccarini, *Targets of Raf in tumorigenesis*. Carcinogenesis, 2010. **31**(7): p. 1165-1174.
169. Steinmetz, R., et al., *Mechanisms Regulating the Constitutive Activation of the Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) Signaling Pathway in Ovarian Cancer and the Effect of Ribonucleic Acid Interference for ERK1/2 on Cancer Cell Proliferation*. Molecular Endocrinology, 2004. **18**(10): p. 2570-2582.
170. Kane, R.C., et al., *Sorafenib for the treatment of advanced renal cell carcinoma*. Clinical cancer research, 2006. **12**(24): p. 7271-7278.

171. Llovet, J.M., et al., *Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma*. N Engl J Med, 2008. **359**(4): p. 378-90.
172. Bollag, G., et al., *Vemurafenib: the first drug approved for BRAF-mutant cancer*. Nature Reviews Drug Discovery, 2012. **11**(11): p. 873-886.
173. Ballantyne, A.D. and K.P. Garnock-Jones, *Dabrafenib: First Global Approval*. Drugs, 2013. **73**(12): p. 1367-1376.
174. Chapman, P.B., *Mechanisms of Resistance to RAF Inhibition in Melanomas Harboring a BRAF Mutation*. American Society of Clinical Oncology Educational Book, 2013(33): p. e80-e82.
175. Lacouture, M.E., et al., *Induction of cutaneous squamous cell carcinomas by RAF inhibitors: cause for concern*. J Clin Oncol, 2012. **30**(3): p. 329-330.
176. Su, F., et al., *RAS mutations in cutaneous squamous-cell carcinomas in patients treated with BRAF inhibitors*. N Engl J Med, 2012. **366**(3): p. 207-15.
177. Use, C.f.M.P.f.H., *Mekinist; Overview*. 2014, European Medicines Agency.
178. Roskoski Jr, R., *Targeting ERK1/2 protein-serine/threonine kinases in human cancers*. Pharmacological research, 2019. **142**: p. 151-168.
179. Samatar, A.A. and P.I. Poulikakos, *Targeting RAS-ERK signalling in cancer: promises and challenges*. Nature Reviews Drug Discovery, 2014. **13**(12): p. 928-942.
180. Redmond, K.L., et al. *Overcoming resistance to targeted therapies in cancer*. in *Seminars in oncology*. 2015. Elsevier.
181. Pérez Sayáns, M., et al., *Comprehensive Genomic Review of TCGA Head and Neck Squamous Cell Carcinomas (HNSCC)*. J Clin Med, 2019. **8**(11).
182. Boeckx, C., et al., *Overcoming cetuximab resistance in HNSCC: the role of AURKB and DUSP proteins*. Cancer Lett, 2014. **354**(2): p. 365-77.
183. Xu, H., et al., *Dual Blockade of EGFR and c-Met Abrogates Redundant Signaling and Proliferation in Head and Neck Carcinoma Cells*. Clinical Cancer Research, 2011. **17**(13): p. 4425-4438.
184. Peng, X., et al., *Co-targeting PI3K/Akt and MAPK/ERK pathways leads to an enhanced antitumor effect on human hypopharyngeal squamous cell carcinoma*. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2019. **145**(12): p. 2921-2936.
185. Vigoda, M., et al., *Functional proteomics of patient derived head and neck squamous cell carcinoma cells reveal novel applications of trametinib*. Cancer Biol Ther, 2022. **23**(1): p. 310-318.
186. Uppaluri, R., et al., *Biomarker and Tumor Responses of Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma to Trametinib: A Phase II Neoadjuvant Window-of-Opportunity Clinical Trial*. Clinical Cancer Research, 2017. **23**(9): p. 2186-2194.
187. Gilmartin, A.G., et al., *GSK1120212 (JTP-74057) is an inhibitor of MEK activity and activation with favorable pharmacokinetic properties for sustained in vivo pathway inhibition*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(5): p. 989-1000.
188. Yoshida, T., et al., *Identification and characterization of a novel chemotype MEK inhibitor able to alter the phosphorylation state of MEK1/2*. Oncotarget, 2012. **3**(12): p. 1533-45.
189. Pratilas, C.A., et al., *(V600E)BRAF is associated with disabled feedback inhibition of RAF-MEK signaling and elevated transcriptional output of the pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(11): p. 4519-24.

190. Kang, S.H., et al., *Inhibition of MEK with trametinib enhances the efficacy of anti-PD-L1 inhibitor by regulating anti-tumor immunity in head and neck squamous cell carcinoma*. *Oncoimmunology*, 2019. **8**(1): p. e1515057.
191. Ngan, H.L., et al., *MAPK pathway mutations in head and neck cancer affect immune microenvironments and ErbB3 signaling*. *Life Sci Alliance*, 2020. **3**(6).
192. Huang, L. and L. Fu, *Mechanisms of resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors*. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2015. **5**(5): p. 390-401.
193. Gusenbauer, S., et al., *Erk2 but not Erk1 regulates crosstalk between Met and EGFR in squamous cell carcinoma cell lines*. *Molecular Cancer*, 2015. **14**(1): p. 54.
194. Ribas, A., et al., *PD-L1 blockade in combination with inhibition of MAPK oncogenic signaling in patients with advanced melanoma*. *Nat Commun*, 2020. **11**(1): p. 6262.
195. Choi, H., et al., *Pulsatile MEK Inhibition Improves Anti-tumor Immunity and T Cell Function in Murine Kras Mutant Lung Cancer*. *Cell Rep*, 2019. **27**(3): p. 806-819.e5.
196. Gutzmer, R., et al., *Atezolizumab, vemurafenib, and cobimetinib as first-line treatment for unresectable advanced BRAFV600 mutation-positive melanoma (IMspire150): primary analysis of the randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial*. *The Lancet*, 2020. **395**(10240): p. 1835-1844.
197. Janjigian, Y.Y., et al., *The KEYNOTE-811 trial of dual PD-1 and HER2 blockade in HER2-positive gastric cancer*. *Nature*, 2021. **600**(7890): p. 727-730.
198. Laccetti, A.L., et al., *Combination antiangiogenic tyrosine kinase inhibition and anti-PD1 immunotherapy in metastatic renal cell carcinoma: A retrospective analysis of safety, tolerance, and clinical outcomes*. *Cancer Medicine*, 2021. **10**(7): p. 2341-2349.
199. Lu, S., et al., *PD-L1 positively regulates MET phosphorylation through inhibiting PTP1B*. *Cancer Sci*, 2021. **112**(5): p. 1878-1887.



## Appendix

### I Abkürzungsverzeichnis

|        |  |
|--------|--|
| µl     | Mikroliter   |
| A      | Ampere   |
| APC    | Antigen-presenting cell, Antigen-präsentierende Zelle                          |
| AURKB  | Aurora kinase B  |
| AWMF   | Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen<br>Fachgesellschaften |
| BCR    | B-Cell-Receptor  |
| BSA    | Bovines serum albumin  |
| bzw.   | beziehungsweise  |
| bspw.  | beispielsweise   |
| C      | Celsius  |
| CPS    | Combined positive score, kombinierter positiver Punktzahl                      |
| CRC    | Kolorektales Karzinom  |
| CTLA-4 | cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4                                    |
| CTL    | Zytotoxische T-Lymphozyten, cytotoxic T-lymphocyt                              |
| cDNA   | Komplementäre DNA  |
| DKG    | Deutsche Krebsgesellschaft   |
| DKH    | Deutsche Krebshilfe  |
| DNA    | Desoxyribonukleinsäure, desoxyribonucleic acid                                 |
| DC     | Dendritische Zellen  |
| DUSP 5 | Dual specificity protein phosphatase 5   |
| DUSP 6 | Dual specificity protein phosphatase 5   |
| EBV    | Epstein Barr Virus   |
| EDTA   | Ethylendiamintetraessigsäure (Ethylendiamintetraacetat)                        |
| EGF    | Epidermal growth factor, Epidermaler Wachstumsfaktor                           |

|                |  |
|----------------|--|
| EGFR           | Epidermal growth factor receptor, Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor               |
| EMT            | Epithelial-Mesenchymale Transition   |
| EMA            | Europäische Arzneimittelagentur  |
| ENE            | Extranodal extension, extranodales Wachstum  |
| ERK            | Extracellular signal regulated kinases   |
| FCS            | Fötale Kälberserum   |
| FSC            | Forward scatter, Vorwärts-Streuung   |
| g              | g-Kraft (Erdbanziehung)  |
| GSK3 $\beta$   | Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$   |
| Gy(Gray)       | Maßeinheit der durch ionisierende Strahlung verursachten Energiedosis                |
| GVHD           | Graft-versus-host disease, Graft-versus-Host-Reaktion                                |
| HCC            | Hepatozelluläres Karzinom  |
| HER            | human epidermal growth factor receptor, Humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor |
| HGF            | Scatter Factor/Hepato-Growthfactor, Hepatozelluärer Wachstumsfaktor                  |
| HNC            | Head and neck cancer, Kopf-Hals-Karzinomen   |
| HNSCC          | Head and neck squamous cell carcinoma, Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom              |
| HPV            | Humane Papillomviren   |
| HQROL          | Health related Quality of Life, Lebensqualität                                       |
| ICIs           | Immune Checkpoint Inhibitors   |
| INF $\gamma$   | Interferon $\gamma$  |
| MAPK           | Mitogen activated protein kinase   |
| ml             | Milliliter   |
| mRNA           | Boten-RNA, messenger RNA   |
| NF- $\kappa$ B | nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells                     |
| ng             | Nanogramm  |
| nM             | Nanomolar  |
| nm             | Nanometer  |
| NPC            | Nasopharynxkarzinom  |
| NSCLC          | Non-small-cell-lung carcinoma, Nicht-kleinzellige Lungenkarzinom                     |

|               |  |
|---------------|--|
| Nr.           | Nummer   |
| OPMD          | Oral potentially malignant disorders, orale Läsion mit potentieller Malignität |
| PD-1          | Programmed cell death protein 1  |
| PDGFR $\beta$ | Platelet-derived growth factor receptor beta                                   |
| PD-L1         | Programmed cell death protein ligand 1   |
| PCR           | Polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion                           |
| PI3K          | Phosphoinositid-3-Kinasen  |
| P/S           | Penicillin/Streptomycin  |
| PTP1B         | Protein-tyrosine phosphatase 1B  |
| RNA           | Ribonukleinsäure, Ribonucleic acid   |
| RT-PCR        | Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion                                |
| SCC           | Side Scatter, seitliche Streuung   |
| SF/HGF        | Scatter Factor/Hepato-Growthfactor, Hepatozelluärer Wachstumsfaktor            |
| SHP-2         | Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2                          |
| siRNA         | small interfering RNA  |
| STAT          | Signal transducer and activator of transduction                                |
| Syk           | spleen tyrosine kinase   |
| TCR           | T-Cell-Rezeptor  |
| Tis           | Carcinoma in situ, Tumor im Ursprung   |
| TKI           | Tyrosinkinase-Inhibitor  |
| TKR           | Tyrosinkinase-Rezeptor   |
| TME           | Tumor mikroenviroment, Tumormikroumilieu                                       |
| TNF $\alpha$  | Tumornekrose Faktor $\alpha$   |
| Treg          | regulatorische T-Zellen  |
| UICC          | Union for International Cancer Control   |
| WHO           | World Health Organisation, Weltgesundheitsorganisation                         |
| VEGFR         | vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor                              |
| Zap70         | Zeta-chain-associated protein kinase 70  |

## II Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1 Überlebensrate nach UICC Stadien der 8. Auflage der TNM-Klassifikation
- Abbildung 2 Immuncheckpoint- Inhibitoren
- Abbildung 3 HGF/c-MET- Signalweg
- Abbildung 4 PD-1 Signalweg in der B- und T-Zellen
- Abbildung 5 Color Prestained Protein Standard, 11-245 kDa
- Abbildung 6 Western Blot zum Nachweis der Rolle der MAPK/ERK, PI3K/AKT und STAT3-Signalwege bei der erhöhten PD-L1-Expression nach HGF-Stimulation in FaDu
- Abbildung 7 Western Blot zum Nachweis der Rolle der MAPK/ERK, PI3K/AKT und STAT3-Signalwege bei der erhöhten PD-L1-Expression nach HGF-Stimulation in Detroit562
- Abbildung 8 Western Blot zum Nachweis der Rolle der MAPK/ERK, PI3K/AKT und STAT3-Signalwege bei der erhöhten PD-L1-Expression nach HGF-Stimulation in SCC9
- Abbildung 9 Western Blot zum Nachweis der Rolle der MAPK/ERK, PI3K/AKT und STAT3-Signalwege bei der erhöhten PD-L1-Expression nach HGF-Stimulation in SCC154
- Abbildung 10 Ergebnisse der qPCR zum Nachweis der Reduktion von ERK1- und ERK2- mRNA nach Transfektion mit ERK1/2- spezifischer siRNA
- Abbildung 11 Western Blot zum Nachweis der ERK1/2-Abnahme nach Einsatz spezifischer siRNA und zur Untersuchung des Einflusses von ERK1/2 auf den Anstieg der PD-L1-Expression nach HGF-Stimulation
- Abbildung 12 Zellviabilitätsassay mit Trametinib (schwarz) und PHA-6657752 (rot) für 48 Stunden
- Abbildung 13 Western Blot zum Nachweis der Rolle des MAPK/ERK-Signalwegs bei der erhöhten PD-L1-Expression nach HGF-Stimulation.
- Abbildung 14 Western Blot zum Nachweis der PD-L1-Expression bei Trametinib und Trametinib mit HGF nach 24 und 72 Stunden.

Abbildung 15 Durchflusszytometrie zum Nachweis der PD-L1-Zunahme bei HGF-Stimulation und der PD-L1-Abnahme bei Trametinib-Zugabe auf der Zelloberfläche der Zelllinien Detroit562 und SCC154.

### III Tabellenverzeichnis

|            |   |
|------------|---|
| Tabelle 1  | Tumorstadien nach UICC-Kriterien  |
| Tabelle 2  | Zellkulturmedien und Zusätze  |
| Tabelle 3  | Reagenzien und Chemikalien  |
| Tabelle 4  | Verbrauchsmaterialien   |
| Tabelle 5  | Puffer  |
| Tabelle 6  | Medikamente, Inhibitoren und Primer   |
| Tabelle 7  | Geräte  |
| Tabelle 8  | Software  |
| Tabelle 9  | Zelllinien mit ihrem Ursprungsort, Verdünnung für die Subkultur und Hersteller                |
| Tabelle 10 | Zusammensetzung des Polyacrylamidgels   |
| Tabelle 11 | Einstellung des EVE Automated cell counter je nach Zelllinie                                  |
| Tabelle 12 | Zellviabilitätsassay, Konzentrationsübersicht einer 96-Well-Mikrotiterplatte in $\mu\text{M}$ |
| Tabelle 13 | Behandlungsschema der Proben in einer 6-Well-Titerplatte                                      |
| Tabelle 14 | Die Pufferzusammensetzung der SDS-Page  |
| Tabelle 15 | Primär-Antikörper   |
| Tabelle 16 | Sekundär-Antikörper   |
| Tabelle 17 | qPCR-Programm   |

## **IV Lebenslauf**

## **V Publikationen**

Boschert, V.; Teusch, J.; Aljaseem, A.; Schmucker, P.; Klenk, N.; Straub, A.; Bittrich, M.; Seher, A.; Linz, C.; Müller-Richter, U.D.A.; Hartmann, S. HGF-Induced PD-L1 Expression in Head and Neck Cancer: Preclinical and Clinical Findings. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 8770. <https://doi.org/10.3390/ijms21228770>