Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie des Universitätsklinikums Ulm

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Thomas K. Hoffmann

Analyse des Einflusses von Adenosin auf Plattenepithelkarzinomzelllinien etabliert von Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches

- Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm -

von Dr. med. Max Wilkat geboren in Bocholt vorgelegt im Jahr 2020



Veröffentlichungen

Ergebnisse aus dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen:

M. Wilkat, H. Bast, R. Drees, J. Dünser, A. Mahr, N. Azoitei, R. Marienfeld, F. Frank, M. Brhel, A. Ushmorov, J. Greve, E. Goldberg-Bockhorn, M. N. Theodoraki, J. Doescher, S. Laban, P. J. Schuler, T. K. Hoffmann, C. Brunner: *Adenosine receptor* 2B activity promotes autonomous growth, migration as well as vascularization of head and neck squamous cell carcinoma cells. International Journal of Cancer. 147(1): 202-217. 2020 Jul 1. doi: 10.1002/ijc.32835. Epub 2020 Jan 9. PMID: 31846065. (2020) [93] unter Creative Commons Attribution 4.0 International License, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0

Kongressbeiträge:

M. Wilkat, F. Frank, N. Azoitei, P. J. Schuler, S. Laban, T. K. Hoffmann and C. Brunner: *Analysis of the influence of adenosine on HNSCC cell lines*. Poster auf dem Deutschen Krebskongress 2018 in Berlin

M. Wilkat, F. Frank, N. Azoitei, P. J. Schuler, S. Laban, T. K. Hoffmann and C. Brunner: *Analysis of the influence of adenosine on HNSCC cell lines*. Poster auf der 89. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e.V., Bonn **2018** in Lübeck

Inhaltsverzeichnis

InhaltsverzeichnisI
Abkürzungsverzeichnis III
1 Einleitung 1 -
1.1 Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches 1
1.2 Das adenosinerge System und seine Rolle in der Tumorbiologie 4 -
1.3 Zielsetzung 7 ·
2 Material und Methoden 9 -
2.1 Material. -9 2.1.1 Zelllinien. -9 2.1.2 Primer und Sonden -12 2.1.3 Antikörper -14 2.1.4 Adenosinrezeptor-Liganden -15 2.1.5 Zellkulturmedien -15 2.1.6 Puffer und Lösungen -15 2.1.7 Kits und Längenstandards -17 2.1.8 Reagenzien und Chemikalien -17 2.1.9 Geräte -20 2.1.10 Verbrauchsmaterialien -21 2.1.11 Software -22
2.2 Methoden- 242.2.1 Kultivierung von immortalisierten Zelllinien- 242.2.2 RT-PCR- 242.2.3 Durchflusszytometrie- 292.2.4 Western-Blot- 302.2.5 Proliferationsassay- 322.2.6 Scratch-Assay- 332.2.7 Transwell-Assay- 342.2.8 Messung der VEGF-Sekretion- 362.2.9 Statistik- 37
 3 Ergebnisse 41 - 3.1 Expressionsanalyse der key-players im adenosinergen System 41 - 3.1.1 CD39 und CD73 41 -

3.1.2 Adenosinrezeptoren	46 -
3.2 Analyse des Einflusses von ADORA-Liganden auf Eigenschaften der	
Tumorprogression	50 -
3.2.1 Proliferationsassavs	- 50 -
3 2 2 Scratch-Assays	- 53 -
3 2 3 Transwell-Assays	- 55 -
3.2.4 VEGE-Sekretion	- 57 -
5.2.7 VLOI-SCRICHOIL	
3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse	58 -
4 Diskussion	60 -
4.1 Ektonukleotidasen CD39 und CD73	60 -
4.2 Adenosinrezeptoren ADORA1, -2A, -2B und -3	62 -
4.3 Einfluss von ADORA2B-Liganden auf tumorprogressive Eigenschaften v konstitutive Aktivität von ADORA2B	und 64 -
	01
4.4 Schlussbetrachtung und Ausblick	66 -
	(0)
5 Zusammentassung	69 -
6 Literaturverzeichnis	71 -
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	82 -
Danksagungen	89 -
Lebenslauf	90 -

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADO	Adenosin
ADORA	Adenosinrezeptor
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua bidest.	aqua bidestillata
ATCC	American type culture collection
ATP	Adenosintriphosphat
B2M	β2-Mikroglobulin
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
CAM	chorioallantoic membrane assay
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
CT	cycle threshold
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4
CX	Chemotherapie
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonucleotidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECL	enhanced chemiluminescence

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
engl.	englisch
ENT	equilibrative nucleoside transporter
ERK	extracellular signal-regulated kinase
et al.	et alii
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FBS	Fetal bovine serum
FDA	Food and drug administration
g	Wert der Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
ggf.	gegebenenfalls
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HER	Humaner Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HNSCC	head and neck squamous cell carcinoma
HPRT1	Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1
HPV	Humanes Papillomavirus
HRP	horseradishperoxidase
IFN-γ	Interferon-gamma
IL	Interleukin
IP3	Inositoltrisphosphat
LH	Luteinisierendes Hormon
mRNA	messenger RNA
MTT	Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide
n.a.	nicht angegeben
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
ND	Neck dissection
nt	Nukleotide
OSCC	oral squamous cell carcinoma
PAA	Polyacrylamid

PBS	phosphate buffered saline
PBS-T	phosphate buffered saline mit Tween
PCR	polymerase chain reaction
PD-1	programmed cell death protein 1
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
RIPA	radioimmunoprecipitation assay
RNA	ribonucleic acid
RPL13a	Ribosomal Protein L13a
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
rRNA	ribosomal RNA
RT	Radiotherapie
RT-qPCR	reverse transcription quantitative polymerase chain reaction
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
siRNA	silencing RNA
Tab.	Tabelle
TAE	tris base, acetic acid, EDTA
TBS	TRIS buffered saline
TBS-T	TRIS buffered saline mit Tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
Tm	Schmelztemperatur
TNF	tumor necrosis factor
TNM	tumor nodus metastasis
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer RNA
TSH	Thyreoida-stimulierends Hormon
u. a.	unter anderem
US	United States
v. a.	vor allem
VEGF	vascular endothelial growth factor
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

Nukleobasen

Adenin	А	Cytosin	С	Guanin G	Thy	/min	Т
Aminosäurei	1						
Alanin	Ala	А		Leucin	Leu	L	
Arginin	Arg	R		Lysin	Lys	Κ	
Asparagin	Asn	Ν		Methionin	Met	М	
Asparaginsäu	re Asp	D		Phenylalanin	Phe	F	
Cystein	Cys	С		Prolin	Pro	Р	
Glutamin	Gln	Q		Serin	Ser	S	
Glutaminsäur	e Glu	Е		Threonin	Thr	Т	
Glycin	Gly	G		Tryptophan	Trp	W	
Histidin	His	Н		Tyrosin	Tyr	Y	
Isoleucin	Ile	Ι		Valin	Val	V	

Einheiten

0	Grad	1	Liter
°C	Grad Celsius	m	Meter
°K	Grad Kelvin	min	Minute
А	Amper	mol	Mol
bar	Bar	М	Mol/Liter
Da	Dalton	rpm	Rotationen pro Minute
g	Gramm	S	Sekunde
h	Stunde	V	Volt

Dekadische Vorsilben

10 ³	10-1	10 ⁻²	10-3	10-6	10-9	10 ⁻¹²
kilo (k)	dezi (d)	centi (c)	milli (m)	mikro (µ)	nano (n)	piko (p)

1 Einleitung

1.1 Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches

Krebserkrankungen des Kopf-Hals-Bereiches umfassen eine Reihe von malignen Tumoren, die ihren Ursprung aus dem oberen Aerodigestivtrakt nehmen. Dabei handelt es sich histopathologisch in über 90% der Fälle um Plattenepithelkarzinome - sogenannte HNSCCs (engl. <u>h</u>ead and <u>n</u>eck <u>s</u>quamous <u>c</u>ell <u>c</u>arcinoma<u>s</u>), welche von den entsprechenden Schleimhäuten der Mundhöhle, des Kehlkopfes, des Rachens, der Nasenhaupt- und Nasennebenhöhlen ausgehen [90].

Je nach anatomischer Lokalisation lässt sich eine unterschiedliche Ätiologie identifizieren mit entsprechenden vorherrschenden Risikofaktoren [82]. Als Hauptrisikofaktor für alle HNSCCs gelten Tabak- und Alkoholkonsum. Je nach Art des konsumierten Tabaks bzw. des Alkohols und der Häufigkeit des Konsums steigt das Risiko für die Entwicklung eines HNSCCs um das 10- bis 100-fache [82]. Insbesondere für die Lokalisationen der Mundhöhle, des Hypopharynx und des Larynx spielt der Tabak- und Alkoholkonsum eine entscheidende Rolle. Weiterhin gelten der Konsum von Betelnüssen und eine schlechte Mundhygiene als Risikofaktor für Mundhöhlenkarzinome, berufliche Exposition gegenüber Isopropanol, polyzyklische aromatische Hydrocarbonen und u. a. Schwefelsäuren sowie gastro-ösophagealer Reflux gelten als zusätzliche Risikofaktoren für Larynxkarzinome, Holzstaub als Risikofaktor für Nasopharynxkarzinome. Neben der Exposition gegenüber bestimmten Konsumgütern bzw. Chemikalien wie Tabak und Alkohol und den weiteren oben genannten gelten vor allem auch Virusinfektionen als Risikofaktor für die Entstehung von HNSCCs und gewinnen dabei zunehmend an Bedeutung. Dabei spielen humane Papillomaviren (HPV) für das Oropharynxkarzinom und das Eppstein-Barr-Virus (EBV) für das Nasopharynxkarzinom eine Rolle [82].

Das Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches gehörte im Jahr 2015 zu den 15 häufigsten Krebsarten weltweit [19], dabei sind Männer im Verhältnis 2:1 bis 4:1 häufiger betroffen als Frauen. Gemessen an der 5-Jahres-Prävalenz ist HNSCC die sechsthäufigste Krebsart innerhalb der weltweiten männlichen Population [20]. Im Jahr 2015 lag die globale Inzidenz beider Geschlechter zusammen bei 932.000 Neuerkrankungen (410.000 Lippen- und Mundhöhlenkarzinome, 238.000 Larynxkarzinome, 123.000 Nasopharynxkarzinome und 161.000 weitere Pharynxkarzinome) [19], wobei die Inzidenz von HNSCCs zwischen 2005 und 2015 um eine Rate von 33,0% (im Falle der Lippen- und Mundhöhlenkarzinome) bis 16,5% (im Fall der Nasopharynxkarzinome) zugenommen hat. Die globale Mortalität betrug im Jahr 2015 insgesamt 379.000 Todesfälle [19].

Werden HNSCCs in den frühen Stadien der Erkrankung entdeckt, so bestehen gute Chancen auf eine kurative Therapie. Allerdings wird die Erkrankung in ca. der Hälfte der Fälle erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert. Dabei haben 40% bereits regionale Lymphknotenmetastasen und werden somit als Stadium IVa oder IVb klassifiziert, weitere 10% präsentieren sich bereits mit Fernmetastasierung und müssen somit dem Stadium IVc zugeteilt werden [56]. Die Prognose der Erkrankung hängt wesentlich von der Tumorlokalisation, dem HPV-Status und insbesondere dem Stadium ab [17]. Daher zeigen HNSCCs trotz zunehmenden modernen Therapieansätzen insgesamt eine schlechte Prognose mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 50%, welche oft mit lokoregionalem Rezidiv und Fernmetastasierung assoziiert ist [90].

Zur Behandlung von HNSCCs gehört heutzutage eine Kombination aus Chirurgie, Strahlentherapie und Chemotherapie [57]. Dabei hängt es vom vorliegenden Tumorstadium ab, welches Therapieregime vorrangig verfolgt wird [56, 67]. In frühen Stadien wird eine chirurgische Intervention oder alternativ eine Radiatio als alleinige Behandlung durchgeführt. Ist die Erkrankung lokal fortgeschritten, so werden Chirurgie und Strahlentherapie kombiniert und ggf. durch eine meist platin-basierte Chemotherapie ergänzt [56, 67]. Bei Fernmetastasierung wird auf eine Chemotherapie zurückgegriffen, welche bei gutem Allgemeinzustand des Patienten als Kombinationschemotherapie einen kurativen Ansatz verfolgt, während bei reduziertem Allgemeinzustand eher auf eine Therapie mit einem einzelnen Chemotherapeutikum im Sinne einer ,best supportive care' zurückgegriffen wird [56, 67].

In neuster Zeit wurden neben diesen etablierten Therapiekonzepten neue Therapieansätze entwickelt und erprobt. Dabei fokussierte sich die Forschung auf den immunsuppressiven Charakter des Mikromilieus, welches HNSCCs um sich etablieren [18]. Dieses Mikromilieu erlaubt den HNSCCs das wirtseigene Immunsystem zu umgehen und somit Proliferation, Angiogenese und Metastasierung des Tumors zu fördern. Die sogenannte Immuntherapie zielt darauf ab, das supprimierte Immunsystem wieder zu aktivieren und gegen den Tumor zu richten [24, 69]. Dieser neue Ansatz einer Immuntherapie hat sich mittlerweile in verschiedenen Studien als wirksam erwiesen und scheint sich daher zunehmend als weitere Säule im Repertoire der HNSCC-Therapien zu etablieren. Die Vorreiter auf dem Gebiet der Immuntherapie sind die sogenannten Immuncheckpoint-Inhibitoren [21, 63], welche auf die negativen Regulatoren der T-Zell-Immunfunktion abzielen, deren bekanntesten Vertreter das CTLA-4 (engl. cytotoxic T-lymphocyteassociated antigen 4) und das PD-1 (engl. programmed cell death protein 1) sind [7]. Die Funktionsweise der Immuncheckpoint-Inhibitoren beruht darauf, die inhibierende Interaktion zwischen auf den T-Lymphozyten befindlichem CTLA-4 bzw. PD-1 und deren Liganden zu stören und hierdurch die tumorinduzierte Immunsuppression zu verhindern. Ein Prototyp der Immuncheckpoint-Inhibitoren im Falle des PD-1 ist beispielsweise Pembrolizumab, ein monoklonaler Antikörper gegen PD-1 auf T-Lymphozyten, vertrieben als KEYTRUDA durch das US-amerikanische Pharmaunternehmen MSD Merck Sharp & Dohme Corporation mit Sitz in Kenilworth in New Jersey [59]. Pembrolizumab hat im August des Jahres 2016 die Zulassung für die Behandlung von Platin-refraktären HNSCC-Rezidiven bzw. -Fernmetastasen durch die US-amerikanische FDA (engl. food and drug administration) erhalten, nachdem sich in einer nicht randomisierten, mehrere Kohorten umfassenden Phase-Ib-Studie zu Pembrolizumab (KEYNOTE-012 [83]) bei einer akzeptablen Verträglichkeit und Sicherheit des Medikamentes eine Wirksamkeit bezüglich der Tumoransprechrate zeigte [45]. So ergab sich bei 174 untersuchten Patienten, die unter einer Krankheitsprogression unter bzw. nach einer Platinbasierten Chemotherapie eines rezidivierenden bzw. metastasierten Plattenepithelkarzinoms des Kopf-Hals-Bereiches litten, eine ,objective response rate' von 16% mit einer vollständigen Remission von 5% [45]. Dabei war die Dauer des Ansprechens bei 23 von den 28 ansprechenden Patienten länger als 6 Monate. Die Sicherheit von Pembrolizumab wurde an insgesamt 192 an HNSCC erkrankten Patienten evaluiert, wobei das Nutzen-Risiko-Profil als akzeptabel eingestuft wurde [45]. Als Auflage der beschleunigten Zulassung von Pembrolizumab wurde die Durchführung einer randomisierten Phase-III-Studie festgesetzt, welche gegenwärtig unter dem Namen KEYNOTE-040 [84] von MSD Merck Sharp & Dohme Corporation durchgeführt wird und das Gesamtüberleben von Patienten mit rezidivierendem oder metastasiertem HNSCC unter Pembrolizumab im Vergleich zu der Standardtherapie untersucht.

Neben dem Feld der Immuncheckpoint-Inhibitoren gibt es weitere Ansätze im Bereich der Immuntherapie [24, 69], welche die verschiedenen Mechanismen und Abläufe während der Interaktion zwischen Tumorgewebe und Immunsystem als Grundlage für die Entwicklung neuer Therapien untersuchen. Neben einer Aktivierung und Expansion von Immunzellen mit Immunsystem-inhibierender Aktivität sowie einer Reduktion der Tumorimmunogenität spielt während dieser Interaktion auch die Ausschüttung immunsuppressiver Faktoren eine Rolle bei der Tumorevasion vor dem Immunsystem. Unter diesen immunsupprimierenden Faktoren ist das Purinnukleosid Adenosin ins Fokus des wissenschaftlichen, onkologischen Interesses gerückt [2].

1.2 Das adenosinerge System und seine Rolle in der Tumorbiologie

Adenosin ist als Namensgeber zentraler Bestandteil des adenosinergen Systems, welches in der Tumorbiologie eine wichtige Rolle zu spielen scheint, deren Ausmaß durch neuste Forschungsbemühungen zunehmend verstanden wird [2, 77]. Adenosin ist ein Purinnukleosid, welches zum einen als Baustein von RNA in der Proteinbiosynthese und zum anderen als Baustein von ATP im Energiestoffwechsel der Zelle ubiquitär im menschlichen Körper vorhanden ist. Adenosin findet sich im extrazellulären Raum zum einen durch die Ausschleusung von intrazellulärem Adenosin über spezifische bidirektionale Transporter, sogenannte ENT1 und ENT2 (engl. equilibrative nucleoside transporter), die dem Konzentrationsgefälle entsprechend die intra- und extrazellulären Konzentrationen angleichen [22]. Zum anderen entsteht extrazelluläres Adenosin durch die zweischrittige Degradierung von extrazellulärem ATP. Dabei wird ATP zunächst zu AMP degradiert durch sogenannte Ektonukleosidtriphosphatdiphosphohydrolasen. Bekanntester wichtigster Vertreter ist das Oberflächenenzym Ektonukleosidtriphosphatund diphosphohydrolase 1 (Gen-Name: ENTPD1), welches CD39 (engl. cluster of differentiation 39) genannt wird. AMP wird im Anschluss weiter dephosphoryliert durch die Ekto-5'-Nukleotidase CD73 (Gen-Name: NT5E). Dabei scheint der die Umsetzungsrate limitierende Schritt die Degradierung von AMP zu Adenosin durch CD73 zu sein [15]. Interessanterweise wurde für verschiedene Entitäten solider Tumore gezeigt, dass CD73 auf den Tumorzellen überexprimiert vorliegt, was mit einer erhöhten Tumorprogression einherging, so z.B. für Schilddrüsenkarzinome [40], Mammakarzinome [102] und kolorektale Karzinome [95]. Es konnte auch gezeigt werden, dass die tumorbegünstigende Wirkung entscheidend von der enzymatischen Aktivität von CD73 abhängt [77]. Daher stellt sich die Frage, ob dieser tumorfördernde Effekt von CD73 durch eine erhöhte extrazelluläre Adenosinkonzentration im Tumormikromilieu hervorgerufen wird.

Es ist bekannt, dass es unter Stressbedingungen für die Zelle wie Ischämie und Hypoxie zum einen zu exzessivem Energieverbrauch gleichbedeutend mit ATP-Verbrauch und konsekutiver intrazellulärer Adenosinanflutung und zum anderen zu Zelluntergang mit ATP-Freisetzung kommt [70, 97, 104]. Durch die beiden oben beschriebenen, sich hieran anschließenden Prozesse steigt die extrazelluläre Adenosinkonzentration schlussendlich um bis das 100-fache an [46, 70]. Ischämie und Hypoxie sind in neoplastischem Gewebe häufig anzutreffen, da die ungebremste Proliferation der tumorinduzierten Neovaskularisation und Angiogenese vorauseilt. Daher ist die extrazelluläre Konzentration von Adenosin in neoplastischem Gewebe im Vergleich zu gesundem Gewebe relativ hoch [5, 6].

Das extrazellulär in erhöhter Konzentration vorliegende Adenosin kann als endogener Agonist an sogenannten Adenosinrezeptoren (ADORA) diese aktivieren und somit Wirkungen auf Zellen ausüben. Die Familie der Adenosinrezeptoren umfasst vier bekannte Subtypen: ADORA1, ADORA2A, ADORA2B und ADORA3 [22]. Diese vier Rezeptoren sind strukturell verwandt und teilen eine vergleichsweise hohe Affinität zu Adenosin. Neben diesem endogenen Agonisten gibt es eine Reihe weiterer Moleküle, welche als Liganden mit unterschiedlichen Spezifitäten, Affinitäten und intrinsischen Aktivitäten an den 4 ADORA-Subtypen binden und in der pharmakologischen Forschung zur weiteren Charakterisierung der Adenosinrezeptoren dienten [22, 23]. Bei den Adenosin-Rezeptoren handelt es sich um G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Als solche tauschen sie nach extrazellulärer Bindung eines Agonisten das GDP eines heterotrimeren G-Proteins gegen ein GTP aus und aktivieren es somit [87]. Das hierdurch aktivierte G-Protein zerfällt in seine α - und seine $\beta\gamma$ -Untereinheit, welche wiederum andere Enzyme wie beispielsweise die Adenylatcyclase oder die Phospholipase C aktivieren, wodurch schließlich ,second messenger'-Systeme angesteuert werden. Welche Art von Effekt hervorgerufen wird, hängt somit von der Art des Liganden, vom Rezeptortyp und -besetzungsdichte bzw. verteilung sowie von den durch die Signaltransduktion intrazellulär angesteuerten ,down stream targets' ab [30].

Die vier ADORA-Subtypen zeigen im menschlichen Körper ganz unterschiedliche Verteilungen [22]. Der ADORA2A ist beispielsweise auf verschiedenen Leukozyten hoch exprimiert, unter anderem auf T-Lymphozyten [22]. Hier führt eine Aktivierung des ADORA2A durch extrazelluläres Adenosin über ein Gs-Protein zu einer Aktivierung der

Adenylatcyclase und somit zu einer Akkumulation von cAMP in der Immunzelle, was schließlich in einer reduzierten Ausschüttung von proinflammatorischen Mediatoren wie IFN- γ , TNF- α und IL-6 und damit in einer reduzierten Immunantwort mündet [65]. Dieser Mechanismus soll unter physiologischen Bedingungen nach beispielsweise traumatischen oder entzündlichen Gewebeschäden und konsekutiver ischämischer Hypoxie mit steigenden extrazellulären Adenosinkonzentrationen als negativer ,feedback loop' eine überschießende Immunreaktion verhindern und dadurch vor zusätzlichem, immunologisch bedingtem Gewebeschaden schützen [65]. Genau diesen Mechanismus machen sich solide Neoplasien wie auch HNSCCs zu Nutze, indem sie durch die Induktion von regulatorischen T-Zellen, sogenannte iTreg-Zellen, welche mit CD39 und CD73 ausgestattet sind und somit zusätzliches Adenosin im Tumormikromilieu generieren, ADORA2A-positive Effektor-T-Zellen supprimieren und somit das Tumorgewebe vor einer adäquaten Immunantwort schützen [91, 92]. Daher gilt der ADORA2A auf Immunzellen als weiterer Immuncheckpoint, ähnlich wie CTLA-4 und PD-1 (siehe oben unter 1.1), dessen Inhibition durch ADORA2A-Antagonisten die Evasion des Tumors vor dem Immunsystem stoppen und somit als weiteres Angriffsziel bei der Immuntherapie von soliden Tumoren dienen könnte [49].

Interessanterweise werden sowohl Adenosinrezeptoren als auch CD39 und CD73 von Tumorzellen selbst exprimiert [5]. Neben dem Effekt der Immunsuppression wurde daher auch ein direkter Effekt von Adenosin auf die Tumorzellen selbst beobachtet. So kann Adenosin beispielsweise das Tumorwachstum stimulieren oder inhibieren, abhängig von dem vornehmlich exprimierten Rezeptorprofil und von der vorliegenden Tumorentität [5, 64].

So ist beispielsweise in verschiedenen *in vitro*-Studien beschrieben, dass u.a. die Aktivierung von ADORA1 bei Mammakarzinomzellen zu erhöhter Proliferation führt [61] und die Hemmung durch einen ADORA1-Antagonisten zur Induktion von Apoptose [10, 11].

Für Mammakarzinomzellen ist weiterhin ein protumerogener Effekt bei Aktivierung von ADORA2A beschrieben [16, 28]. Im Gegensatz hierzu zeigt eine Aktivierung von ADORA2A bei Colonkarzinomzelllinien einen Apoptose induzierenden Effekt [96]. Sogar noch widersprüchlicher sind die Ergebnisse einer Studie zu Melanomzelllinien: hier zeigte sich durch ADORA2A-Aktivierung eine Reduktion der Zellviabilität und der Zellklonformation, während die Zellproliferation gleichzeitig zunahm [60].

Für ADORA2B finden sich überwiegend Berichte von tumorfördernden Effekten auf die entsprechenden Zelllinien nach Aktivierung, so z.B. für Mammakarzinome [8, 12, 43, 62], Colonkarzinome [55], Melanome [35, 62], Prostatakarzinome [62, 89], Harnblasenurothelkarzinome [8, 103] und sogar für Karzinome der Mundhöhle [37].

Für ADORA3 sind in der Literatur wiederum pro- als auch antitumerogene Effekte je nach betrachteter Entität beschrieben. So zeigte eine Aktivierung von ADORA3 eine vermehrte Induktion von Apoptose bei Lungenkarzinomzellen [39] und Prostatakarzinomzellen [1], während eine Inhibierung von ADORA3 bei Harnblasenkarzinomzellen ebenfalls zum Zelltod führte [38].

Aus all diesen Daten ergibt sich der Hinweis, dass das adenosinerge System verschiedene direkte Auswirkungen auf die Tumorprogression hat und diese für jede Tumorentität speziell betrachtet werden müssen. Welche Rolle das adenosinerge System bei HNSCCs spielt, ist nach aktueller Forschungslage nicht geklärt, weshalb sich die vorliegende Arbeit mit dieser Fragestellung eingehender beschäftigt.

1.3 Zielsetzung

Das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit war ein tieferes, grundlegendes Verständnis des adenosinergen Systems in der Tumorbiologie von HNSCCs und seine Rolle bei der Tumorprogression zu erlangen.

Dabei wurde in dieser laborexperimentellen *in vitro*-Studie mit zwölf immortalisierten, adhärent wachsenden Zelllinien gearbeitet, welche sich von humanen Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches unterschiedlicher Lokalisation in unterschiedlichen klinischen Stadien ableiten (siehe Tab. 2 unter 2.1.1).

Zunächst sollte das Expressionsmuster der ,key players' des adenosinergen Systems in den zwölf HNSCC-Zelllinien charakterisiert werden - namentlich CD39, CD73, ADORA1, ADORA2A, ADORA2B und ADORA3.

Zur Bestimmung des Expressionsprofils auf RNA-Ebene sollte das Verfahren der reversen Transkription mit end-point- und quantitativer real-time-PCR kombiniert werden. Die Expression auf Proteinebene sollte mit Hilfe von Durchflusszytometrie und Western-Blots untersucht werden. Weiterhin sollte die Tumorprogression unter Beeinflussung des adenosinergen Systems analysiert werden. Dabei sollten verschiedene Assays zur Anwendung kommen, welche die Kernmerkmale einer soliden Neoplasie - namentlich Proliferation und Wachstum, Migration, Invasion und Metastasierung sowie Angiogenese und Neovaskularisation eingehender untersuchen.

Im Hinblick auf einen möglichen therapeutischen Nutzen lassen sich durch die in der vorliegenden Arbeit gewonnen Erkenntnisse über die adenosinerge Achse in HNSCCs möglicher Weise neue Ziele identifizieren, die zukünftig als innovative Angriffspunkte während der spezifischen Therapie von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches dienen könnten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Ein positives Ethikvotum zur Verwendung der hier beschriebenen Zelllinien liegt vor (#219/17). In der vorliegenden Arbeit wurde mit immortalisierten Zelllinien gearbeitet, welche sich von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches ableiten (siehe Tab. 2). Es handelt sich dabei um humane, permanente, adhärente Zellen, die in Zellkulturflaschen mit dem Zellkulturkomplettmedium DMEM ohne Pyruvat mit Zusatz von FBS (10%) und Penicillin/Streptomycin (1%) im Brutschrank bei 37 °C und bei 5% CO₂ kultiviert wurden.

Weitere humane Zelllinien (siehe Tab. 1) kamen als Kontrolle bei den verschiedenen Experimenten zum Einsatz. All diese Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen mit dem Zellkulturkomplettmedium RPMI und Zusatz von FBS (10%) und Penicillin/Streptomycin (1%) im Brutschrank bei 37 °C und bei 5% CO₂ kultiviert.

Tab. 1Immortalisierte humaneZelllinien verschiedenen Ursprungs, welche als Kontrolle beiverschiedenen Experimenten der vorliegenden Arbeit dienten

ATCC: American Type Culture Collection

Nama	ATCC-	7 all ant/Ungerman as going ha	Zellkultur-	
name	Nummer	Zenart/Orsprungsgewebe	Anforderungen	
DU145	HTB-81	Prostata-Karzinom (Hirnmetastase)	adhärent	
PC-3	CRL-1435	Prostata-Karzinom (Knochenmetastase)	adhärent	
LNCaP	CRL-1740	Prostata-Karzinom	adhärent	
(Klon FGC)		(Lymphknotenmetastase)		
HEK293	CRL-1573	Nierengewebe eines Embryos	adhärent	
PANC-1	CRL-1469	Pankreaskarzinom	adhärent	
NAMALWA	CRL-1432	B-Lymphoblast bei Burkitt Lymphom	in Suspension	
BCL2 JURKAT	CRL-2899	T-Lymphozyt bei akuter T-Zell-Leukämie	in Suspension	

Tab. 2 Immortalisierte Zelllinien ausgehend von humanen Plattenepithelkarzinomen aus dem Kopf-Hals-Bereich modifiziert nach Lansford et al.: *Chapter 28 Head* and Neck Cancers. In: Masters JRW, Palsson B (Hrsg) Human Cell Culture, Bd II, 1. Aufl, Kluwer Academic Publishers: 185–255 (1999) [44] und Hoffmann et al.: *Alterations* in the p53 pathway and their association with radio- and chemosensitivity in head and neck squamous cell carcinoma. Oral oncology 44: 1100–1109 (2008) [33] Aufgeführt sind Name der Zelllinie, Alter (in Jahren) und Geschlecht (m: männlich; w: weiblich) des Patienten, TNM-Klassifikation (T: Tumor; N: Nodus; M: Metastase) und Stadium der Erkrankung, Differenzierungsgrad (G), HPV-16- (humanes Papillomavirus 16) und p53-Status des Tumors, Entnahmestelle der Probe, Läsionstyp und primäre Lokalisation des Tumors sowie vorhergehende Therapien (ND: Neck Dissection; RT: Radiotherapie; CX: Chemotherapie). n.a.: nicht angegeben

Zelllinie	Alter,	TNM	Stadium	Grad	HPV-16	p53	Probeentnahmestelle	Läsionstyp	Primäre	vorhergehende
	Geschlecht								Lokalisation	Therapie
UDSCC1	64 m	T3N2bM0	IV	G3	negativ	mutiert	vordere Zunge	primär	Tonsilla lingualis	n.a.
UDSCC2	58 m	T3N3M0	IV	G3	positiv	Wildtyp	Sinus piriformis	primär	Sinus piriformis	n.a.
UDSCC3	45 m	T2N2cM0	IV	G3	negativ	mutiert	Lymphknoten	Metastase	supraglottisch	ND + RT
ebsees	15 11	121020010	1,	05	negutiv	mutert	Lympiknoten	Wetastase	(Aryknorpel)	
UDSCC5	44 m	T1N1M0	III	G3	negativ	mutiert	supraglottisch	primär	Zunge	keine
UDSCC6	64 m	T3N0M0	IV	G3	negativ	mutiert	Zunge	primär	Zunge	keine
UDSCC8	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	negativ	mutiert	n.a.	n.a.	Larynx	n.a.
UMSCC10A	57 m	T3N0M0	III	G1-2	negativ	mutiert	Stimmband	primär	Stimmband	keine
UMSCC11B	65 m	T2N2aM0	IV	n.a.	negativ	mutiert	supraglottisch	persistierend	supraglottisch	СХ
UMSCC17B	47 w	T1N0M0	Ι	G1-2	negativ	Wildtyp	Halsweichgewebe	lokal invasiv	supraglottisch	RT
UMSCC22B	58 w	T2N1M0	III	G2	negativ	mutiert	Halsmetastase	Metastase	Hypopharynx	keine
UTSCC24A	41 m	T2N0M0	III	G2	negativ	mutiert	Zunge	primär	Zunge	keine
UTSCC50	70 m	T2N0	III	G3	negativ	mutiert	Larynx	Rezidiv	Glottis	RT (vor 12 Jahren)

Darüber hinaus wurden humane, aus Tonsillengewebe von nicht an einer Neoplasie erkrankten Patienten isolierte, CD19+ B-Zellen als Kontrolle für die Analyse der CD39und CD73-Expression verwendet. Weiterhin wurden humane primäre Chondrozyten isoliert aus Nasenseptumknorpel als Kontrolle während der PCR-Analysen eingesetzt. Diese beiden Zellarten fanden sich in den Beständen des Forschungslabors der Universitätsklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde Ulm (Ethikvotum #90/15 und #152/08).

Weiterhin wurde Frischgewebe eines humanen Glioblastoms in Form von Gefrierschnitten als Kontroll-Gewebe für die end-point PCR verwendet, welches freundlicherweise durch Herrn Prof. Dr. Ralf Marienfeld, Leiter der Molekularpathologie des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Ulm, zur Verfügung gestellt wurde (Ethikvotum #276/13).

2.1.2 Primer und Sonden

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer wurden mit Hilfe des online verfügbaren Primer-Designtools Universal ProbeLibrary von Roche Diagnostics [85] konstruiert und durch die Firma biomers.net GmbH (Ulm) erstellt. In Tab. 3 sind Sequenzen und weitere Details der verwendeten Primer aufgelistet.

Tab. 3 Informationen zu verwendeten Primern (Teil 1)

Aufgeführt sind Name des untersuchten Zielgens (*ADORA*: adenosine receptor), Amplicon-Größe in Nucleotidanzahl (nt) und Verwendung des entsprechenden Primerpaares (endpoint polymerase chain reaction (end point PCR) oder quantitative polymerase chain reaction (qPCR)) sowie Nukleotidsequenz (A: Adenosin; C: Cytosin; G: Guanin; T:Thymin), Primerlänge in Nucleotidanzahl (Länge in nt), Schmelztemperatur in Grad Celsius (Tm in °C) und prozentualer Gehalt an Guanin-Cytosin-Basenpaaren (GC%) des jeweiligen Primers (forward und reverse).

Zielgen	Amplicon-Größe - Verwendung/Sequenz	Länge	Tm	GC%
ADORA1	367 nt – verwendet für endpoint PCR			
forward	5'-CTA CCT AAT CCG CAA GCA GC-3'	20	58,78	55,00
reverse	5'-GTC ATC AGG CCT CTC TTC TGG-3'	21	59,86	57,14
ADORA2A	245 nt – verwendet für endpoint PCR			
forward	5'-AAC CTG CAG AAC GTC ACC A-3'	19	59,48	52,63
reverse	5'-GTC ACC AAG CCA TTG TAC CG-3'	20	59,20	55,00
ADORA2B	518 nt – verwendet für endpoint PCR			
forward	5'-GTG CCA CCA ACA ACT GCA CAG AAC-3'	24	65,23	54,17
reverse	5'-CTG ACC ATT CCC ACT CTT GAC ATC-3'	24	61,16	50,00
ADORA2B	140 nt – verwendet für qPCR			
forward	5'-TCC CCG TGA CCA AAC TTT TA-3'	20	56,97	45,00
reverse	5'-TGA CTT CTA CGG CTG CCT CT-3'	20	60,61	55,00
ADORA3	338 nt – verwendet für endpoint PCR			
forward	5'-CAC CAC CTT CTA TTT CAT TGT CTC T-3'	25	58,82	40,00
reverse	5'-GGT ACT CTG AGG TCA GTT TCA TGT T-	25	60 51	44.00
	3'	23	00,51	,00

Tab. 4 Informationen zu verwendeten Primern (Teil 2)

Aufgeführt sind Name des untersuchten Zielgens (*B2M*: beta-2-microglobulin; *CD*: cluster of differentiation; *GAPDH*: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *HPRT1*: hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *RPL13A*: ribosomal protein L13a), Amplicon-Größe in Nucleotidanzahl (nt) und Verwendung des entsprechenden Primerpaares (endpoint polymerase chain reaction (end point PCR) oder quantitative polymerase chain reaction (qPCR)) sowie Nukleotidsequenz (A: Adenosin; C: Cytosin; G: Guanin; T:Thymin), Primerlänge in Nucleotidanzahl (Länge in nt), Schmelztemperatur in Grad Celsius (Tm in °C) und prozentualer Gehalt an Guanin-Cytosin-Basenpaaren (GC%) des jeweiligen Primers (forward und reverse).

Zielgen	Amplicon-Größe - Verwendung/Sequenz	Länge	Tm	GC%
B2M	86 nt – verwendet für qPCR			
forward	5'-TTC TGG CCT GGA GGC TAT-3'	18	57,16	55,56
reverse	5'-TCA GGA AAT TTG ACT TTC CAT TC-3'	23	55,39	34,78
CD39	60 nt – verwendet für qPCR			
forward	5'-TCC ATA GCC TTA ATC AGG ATG C-3'	22	57,71	45,45
reverse	5'-CCA GTT TAG AAT GCG AGG CTA-3'	21	57,82	47,62
<i>CD73</i>	111 nt – verwendet für qPCR			
forward	5'-CCA GTC CAC TGG AGA GTT CC-3'	20	59,39	60,00
reverse	5'-CGA CAC TTG GTG CAA AGA AC 3'	20	57,89	50,00
GAPDH	115 nt – verwendet für endpoint PCR			
forward	5'-GCT CTC TGC TCC TCC TGT TC-3'	20	59,82	60,00
reverse	5'-ACG ACC AAA TCC GTT GAC TC-3'	20	59,21	50,00
HPRT1	95 nt – verwendet für qPCR			
forward	5'-GAC CAG TCA ACA GGG GAC AT-3'	20	59,31	55,00
reverse	5'-GTG TCA ATT ATA TCT TCC ACA ATC	27	57,06	33,33
	AAG-3'			
RPL13A	114 nt – verwendet für qPCR			
forward	5'-CGG ACC GTG CGA GGT AT-3'	17	58,79	64,71
reverse	5'-CAC CAT CCG CTT TTT CTT GTC-3'	21	58,07	47,62

2.1.3 Antikörper

Es wurden folgende, kommerziell erhältliche Antikörper verwendet:

Anti-Adenosine A2b Receptor polyclonal	Abcam plc, Cambridge
goat antibody, ab40002	
Anti-β-Actin monoclonal mouse antibody,	Sigma-Aldrich, St. Louis
Clone AC-74	
Polyclonal Donkey anti-Goat IgG (H+L)	Thermo Fischer Scientific GmbH,
Secondary Antibody, HRP Conjugate	Rockford
Polyclonal Rabbit anti-Mouse IgG (H+L)	Thermo Fischer Scientific GmbH,
Secondary Antibody, HRP Conjugate	Rockford
CD39 Monoclonal Antibody (eBioA1	eBioscience, San Diego
(A1)), PE-Cyanine7	
CD73 Monoclonal Antibody (AD2),	eBioscience, San Diego
eFluor 450	
Mouse IgG1 kappa Isotype Control,	eBioscience, San Diego
PE-Cyanine7	
Mouse IgG1 kappa Isotype Control,	eBioscience, San Diego
eFluor 450	

2.1.4 Adenosinrezeptor-Liganden

Als Liganden der Adenosinrezeptoren kamen die in Tab. 4 genannten Substanzen zum Einsatz.

Tab. 5 Verwendete Adenosinrezeptorliganden

NECA: 5'-N-ethylcarboxamidoadenosine; IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry; DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium; RPMI: Roswell Park Memorial Institute Medium; DMSO: Dimethylsulfoxid

Substanz	IUPAC Name	gelöst in	kommerziell erhältlich	
Adenosin	9-β-D-Ribofuranosyladenin	DMEM/RPMI	Sigma-Aldrich, St. Louis	
NECA	1-(6-Amino-9H-purin-9-yl)-1-deoxy-	DMSO	Tocris Bioscience, Bristol	
	N-ethyl-β-D-Ribofuranuronamid	DIVISO		
PSB603	8-[4-[4-(4-Chlorophenzyl)piperazid-	DMSO	Tocris Bioscience Bristol	
	1-sulfonyl)phenyl]]-1-propylxanthin	DIVISO	Toens Dioscience, Dristor	

2.1.5 Zellkulturmedien

Zur Kultivierung der verschiedenen Zelllinien kamen folgende Zellkulturmedien zur Anwendung: pyruvatfreies Gibco DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Life Technologies GmbH, Darmstadt) für alle Plattenepithelkarzinmozelllinien des Kopf-Hals-Bereiches und Gibco RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium, Life Technologies GmbH, Darmstadt) für alle übrigen verwendeten Zelllinien (siehe auch 2.1.1). Dabei wurden jeweils FBS (10%) (Biochrom GmbH, Berlin) und Penicillin/Streptomycin (1%) (PAN Biotech GmbH, Aidenbach) hinzugefügt. Für die verschiedenen Zellexperimente wurde teilweise das FBS wie jeweils angegeben auf 1-5% reduziert oder durch BSA (0,1-1%) (PAA Laboratories GmbH, Pasching) ersetzt.

2.1.6 Puffer und Lösungen

Blocking-Lösung:

• 5 g Milchpulver; 100 ml TBS-T

4x Laemmli-Reduktionspuffer:

 2,4 ml TRIS; 0,8 g SDS; 4 ml Glycerin; 0,1 mg Bromphenolblau; 1 ml β-Mercaptoethanol ad 10 ml Aqua bidest.

10x Laufpuffer für SDS-PAGE:

• 30,3 g TRIS; 144 g Glycin; 10 g SDS ad 1 l Aqua bidest.

10x PBS (engl. <u>phosphate buffered saline</u>):

2 g KCl; 2 g KH₂PO₄; 80 g NaCl; 11,4 g Na₂HPO₄(7H₂O) ad 1 l Aqua bidest. (pH 7,2 - 7,4)

10x PBS-T (engl. <u>phosphate buffered saline tween</u>):

• 11PBS; 1 ml Tween

RIPA-Puffer (engl. <u>radioimmunoprecipitation assay</u>):

 50 mM TRIS; 1 mM EDTA; 100 mM NaCl; 1% Triton X-100; 0,5% Natriumdesoxycholat; 0,1% SDS; 1 mM PMSF; 1 mM DTT (pH 7,5), pro 10 ml Puffer 1 Tablette Protease Inhibitor (cOmplete Mini, Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche, Basel) und 1 Tablette Phopshatase (PhosSTOP EASYpack, Roche, Basel)

TAE-Puffer für Agarose-Gel (engl. tris base, acetic acid, EDTA):

• 242 g TRIS; 57 ml Essigsäure; 18,6 g EDTA ad 1 l Aqua bidest. (pH 8,3)

10x TBS (engl. tris buffered saline):

• 88 g NaCl; 12 g TRIS; 680 mg NaN₃ ad 1 l Aqua bidest. (pH 8,0)

10x TBS-T (engl. <u>tris buffered saline tween</u>):

• 11TBS; 1 ml Tween

Transferpuffer für Blotting:

• 6 g TRIS; 28,8 g Glycin; 400 ml Methanol ad 2 l Aqua bidest.

Trenngel 12,5% ig für SDS-PAGE:

 4 ml Trenngelpuffer; 5 ml Polyacrylamid; 160 μl APS; 16 μl TEMED; 7 ml Aqua bidest.

Trenngelpuffer für SDS-PAGE:

• 181,7 g TRIS; 4 g SDS ad 1 l Aqua bidest. (pH 8,8)

Sammelgel 4,5%ig für SDS-PAGE:

 2 ml Sammelgelpuffer; 0,9 ml Polyacrylamid; 100 µl APS; 10 µl TEMED; 5,1 ml Aqua bidest.

Sammelgelpuffer für SDS-PAGE:

• 30,3 g TRIS; 2 g SDS ad 500 ml Aqua bidest. (pH 6,8)

2.1.7 Kits und Längenstandards

Coomasie Protein Assay	Thermo Scientific, Waltham
Human VEGF ELISA Kit	Life Technologies, Carslbad
HyperLadder 100 bp	Bioline GmbH, Luckenwalde
Precision Plus Protein Dual Color	BioRad Laboratories GmbH, Darmstadt
Standards	
Protein Marker VI (10-245) pre-stained	AppliChem, Darmstadt

2.1.8 Reagenzien und Chemikalien

10x AMV Puffer	New England Biolabs, Frankfurt am Main
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
5x DNA loading buffer	Bioline GmbH, Luckenwalde
Acrylamid 4K-Solution (40%)	AppliChem, Darmstadt
Agarosepulver SeKem LE	Lonza Rockland, Rockland
Ammonium persulfat (APS) 10 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ampuwa	Fresenius Kabi, Bad Homburg

AMV Reverse Transkriptase (10U/μl) Aqua bidestilliert β-Mercaptoethanol Bovine Serum Albumin (BSA) CellTiter 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Chloroform cOmplete Mini, Protease Inhibitor Cocktail Dimethylsulfoxid (DMSO) Dithiothreitol (DTT) DNAse dNTPs (10 mM) Dulbecco's PBS

Essigsäure Ethanol 99,8%ig Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) **FBS** Superior FlowClean Cleaning agent Formaldehydlösung 3,5-3,7% ig (HCHO) mit Methanol stabilisiert Gel Loading purple Gentamycin 7,5 mg/ml Glycerin (C₃H₈O₃) Glycin ($C_2H_5NO_2$) IsoFlow Sheath Fluid Isopropanol Iso-Septol Kaliumchlorid (KCl) Kaliumdihydrogenphospat (KH₂PO₄) Methanol (CH₄O) 99,8% ig Midori Green Advance DNA Stain Milch Pulver N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine

New England Biolabs, Frankfurt am Main Klinikum Apotheke, Universität Ulm Sigma-Aldrich, St. Louis PAA Laboratories GmbH, Pasching Promega Corporation, Madison Sigma-Aldrich, St. Louis Roche, Basel Sigma-Aldrich, St. Louis Sigma-Aldrich, St. Louis Roche GmbH, Mannheim GE Healthcare, München Gibco/Invitrogen/ Life Technologies GmbH, Darmstadt Sigma-Aldrich, St. Louis Sigma-Aldrich, St. Louis AppliChem, Darmstadt Biochrom GmbH, Berlin Beckmann Coulter Life Sciences, Brea Otto Fischer GmbH & Co. KG, Saarbrücken BioLabs New England GmbH, Ipswich PAA Laboratories GmbH, Pasching Sigma-Aldrich, St. Louis Sigma-Aldrich, St. Louis Beckmann Coulter Life Sciences, Brea Sigma-Aldrich, St. Louis Klinikum Apotheke, Universität Ulm Merck KGaA, Darmstadt Merck KGaA, Darmstadt Sigma-Aldrich, St. Louis NIPPON Genetics Europe GmbH, Dueren Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

(TEMED)

Natriumazid (NaN₃) Natriumchlorid (NaCl) Natriumdeosxycholat Natriumdodecylsulfat (SDS) 10%ig Natronlauge (NaOH) 1 N Lösung PBS-Tabletten

PCR RedMastermix (2x) Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) PhosSTOP EASYpack Ponceau S QIAzol Lysis Reagent Random Hexamer Primer (0,2 μ g/ μ l) **Restore PLUS Western Blot Stripping** Buffer RNase free water RNAsin plus RNAse Inhibitor (20U) RQ1 10x Reaktionspuffer **RQ1** DNAse Salzsäure (HCl) 1 N Lösung SensiFAST SYBR No-ROX Stop Solution SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate Trishydroxymethylaminomethane (TRIS) TritonX100 Trizma base Trypan Blau Lösung Tween 20

Typsin-EDTA

Sigma-Aldrich, St. Louis Sigma-Aldrich, St. Louis Sigma-Aldrich, St. Louis Sigma-Aldrich, St. Louis Merck KGaA, Darmstadt Gibco/Invitrogen/ Life Technologies GmbH, Darmstadt Genaxxon bioscience GmbH, Ulm Sigma-Aldrich, St. Louis Roche, Basel Sigma-Aldrich, St. Louis Qiagen N.V., Venlo Promega Corporation, Madison Thermo Scientific, Waltham

Qiagen N.V., Venlo Promega Corporation, Madison Promega Corporation, Madison Promega Corporation, Madison J.T.Baker Deutschland, Griesheim Bioline GmbH, Luckenwalde Promega Corporation, Madison Thermo Scientific, Waltham

Affymetrix, Santa Clara Sigma Aldrich, St. Louis Sigma-Aldrich, St. Louis Sigma-Aldrich, St. Louis AppliChem, Darmstadt PAN-Biotech, Aidenbach

2.1.9 Geräte

Axio Observer D1 Fluoreszenz Mikroskop Beleuchtungseinrichtung HXP 120 C Biorad-Thermocycler Centrifuge 5424 R Centrifuge 5810 ChemiDoc MP Imaging System Cooler Digital pH Meter 525

Gallios Flow Cytometer HERA cell 150 Brutschrank Hera freeze HPU 586B Tiefkühlschrank

HERA safe Airflow Infinite M200 pro Plattenlesegerät Lab Dancer Vortexgerät Labcycler LightCycler 96 Instrument Magnetrührer IKAMAG RET Megafuge 1.0R Mikrowelle Mini VE Vertical Electrophoresis System Multipette Xstream Pipetboy plus **Pipetman Pipetten** Pipette Easypet Power PAC 300 Power PAC Universal Premium Kühl-Gefrierkombination CP 405 Semy-Dry Transfer Unit Blotkammer **TE77 PWR**

Carl Zeiss AG, Oberkochen Carl Zeiss AG, Oberkochen Bio-Rad Laboratories GmbH, München Eppendorf AG, Hamburg Eppendorf AG, Hamburg Bio-Rad Laboratories GmbH, München Robert Bosch GmbH WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim Beckmann Coulter Life Sciences, Brea Heraeus Holding GmbH, Hanau Kendro Laboratory Products GmbH, Hamburg Thermo Scientific, Waltham Tecan Group AG, Männedorf VWR International GmbH. Darmstadt SensoQuest GmbH, Göttingen Hoffmann-La Roche AG, Basel IKA[®]-Werke GmbH & Co. KG, Staufen Heraeus Holding GmbH, Hanau Severin Elektrogeräte, Sundern Hoefer, Inc., Holliston Eppendorf AG, Hamburg Integra biosciences GmbH, Fernwald Gilson, Inc., Middleton Eppendorf AG, Hamburg Bio-Rad Laboratories GmbH, München Bio-Rad Laboratories GmbH, München Liebherr-Hausgeräte Ochsenhausen GmbH, Ochsenhausen GE Healthcare, München

Stuart See-Saw Rocker SSL4 Schwenker Thermomixer comfort Vacusafe comfort Varifuge 3.0 R Zentrifuge Vortex-Genie 2 Waage BP 2100 S Waage BP 211 D Wasserbad 1003 Zählkammer Cole-Parmer, Staffordshire Eppendorf AG, Hamburg INTEGRA Biosciences GmbH, Konstanz Heraeus Holding GmbH, Hanau Scientific industries, Inc., New York Sartorius, Göttingen Sartorius, Göttingen GFL GmbH, Burgwedel Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen

2.1.10 Verbrauchsmaterialien

Aerodisc [®] Syringe Filter	Pall GmbH, Dreieich
Amersham Protran 0,45 µm Nitrozellulose	GE Healthcare, Chalfont St. Giles
Blotting Membran	
Biosphere Filter Tips 10 µl type	SARSTEDT AG & Co., Nürmbrecht
Biosphere Filter Tips 100 µl type	SARSTEDT AG & Co., Nürmbrecht
Biosphere Filter Tips 1000 μl type	SARSTEDT AG & Co., Nürmbrecht
Biosphere Filter Tips 200 µl type	SARSTEDT AG & Co., Nürmbrecht
Cell Scraper 16 cm	SARSTEDT AG & Co., Nürmbrecht
Cellstar tissue culture dishes	Greiner Bio-One International AG,
	Kremsmünster
Combitips advanced 0,1/0,2/1/5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Deckgläser 12 mm Durchmesser	VWR International GmbH, Darmstadt
Disposable Spatulus	VWR International GmbH, Darmstadt
Falcon-Röhrchen Polysterol 15 ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes
Falcon-Röhrchen Polysterol 50 ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes
Filter Paper	GE Healthcare, Chalfont St. Giles
Flow Cytometer Test tube	Beckmann Coulter Life Sciences, Brea
Immersionsöl	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Injekt Spritze Luer 10ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Kupfernetzchen	Plano GmbH, Wetzlar

Küvetten Polystyrol Labortücher

Lens cleaning tissue LightCycler 480 Multiwell Plate 96 MikroPlatte 96-Loch Objektträger Parafilm "M" laboratory film Präzisionswischtücher

Rundbodenröhrchen Polystyrol 15 ml Rundbodenröhrchen Polystyrol 5 ml Safe lock tubes 1,5 ml Sterican Kanüle Stripette® 10 ml Stripette® 25 ml Stripette® 5 ml SubQ-Spritze 1 ml Tork[®] Wiper 420 Centerfold Roll Transwell 12-Lochplatte für Zelleinsätze Transwell-Einsätze 8 µm Porengröße Vernichtungsbeutel Watteholzstäbchen Zellkulturflasche 12,5/25/80/150/175 cm² Zellkulturplatte Multiwell 6/12/24/96 Vertiefungen

SARSTEDT AG & Co., Nürmbrecht Hakle-Kimberly Deutschland GmbH, Mainz Whatman GmbH, Dassel Hoffmann-La Roche AG, Basel Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster VWR International GmbH, Darmstadt Brand GmbH & Co., Wertheim Hakle-Kimberly Deutschland GmbH, Mainz Becton Dickinson, Franklin Lakes Becton Dickinson, Franklin Lakes Eppendorf AG, Hamburg B. Braun Melsungen AG, Melsungen Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam Becton Dickinson, Franklin Lakes SCA Hygiene Products GmbH, Mannheim Falcon Corning Inc, Corning Falcon Corning Inc, Corning SARSTEDT AG & Co., Nürmbrecht Applimed SA, Châtel-St-Denis Falcon Corning Inc, Corning Falcon Corning Inc, Corning

2.1.11 Software

Axio Vision 40 Version 4.8.1.0 Image Lab Version 5.2.1 Kaluza Analysis Version 1.3.14026.13330 LightCycler 96 Version 1.1.0.1320 Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH, Jena Bio-Rad Laboratories GmbH, München Beckmann Coulter Life Sciences, Brea Hoffmann-La Roche AG, Basel Magellan Version 7.1 Microsoft Office Excel 2003

Microsoft Office Powerpoint 2003

Tecan i-control Version 3.4.2.0

Tecan Group AG, Männedorf Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim Tecan Group AG, Männedorf

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von immortalisierten Zelllinien

Die verschiedenen Zelllinien wurden in Zellkulturmedium (siehe 2.1.1) im Brutschrank Incubator Hera cell 150 (Heraeus Holding GmbH, Hanau) bei 5 % CO₂ und bei 37 °C in 12,5-150 cm² großen Zellkulturflaschen (Falcon Corning Inc, Corning) kultiviert und nach Ausbildung eines lückenlosen Zellrasens alle 2-3 Tage unter einer Sterilwerkbank HeraSafe Laminar flow hood (Thermo Scientific, Waltham) gesplittet. Hierfür wurde das Medium abgegossen und die Zellen einmal mit PBS-Puffer (Gibco Life Technologiers, Carlsbad) gewaschen. Danach wurde auf den Zellrasen eine Trypsin/EDTA-Lösung (PAN Biotech, Aidenbach) gegeben. Nach einer Einwirkzeit von 5 min ließen sich die Zellen vom Flaschenboden ablösen. Die trypsinierten Zellen wurden in Zellkulturmedium aufgenommen und bei 200 x g für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wurde mit dem Zellkulturmedium resuspendiert und die Anzahl der Zellen mit Hilfe von 0,04% iger Trypan Blau Lösung (Sigma Aldrich, St. Louis) in einer Neubauer-Zählkammer (Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen) unter dem Mikroskop bestimmt. Je nach Experiment wurden die Zelllinien mit einer Konzentration von 1-3x10⁴ Zellen/cm² in einer Zellkulturflasche bzw. auf einer Zellkulturplatte ausgesät, damit am Folgetag Monolayer-Kulturen für die verschiedenen Experimente (RT-PCR, Durchflusszytometrie, Western-Blot, Proliferationsassay, Scratch-Assay, Transwell-Assay, VEGF-ELISA) zur Verfügung standen.

2.2.2 RT-PCR

Um die Transkriptionsraten der Gene *CD39*, *CD73*, *ADORA1*, *ADORA2A*, *ADORA2B*, und *ADORA3* zu analysieren, wurden die Methoden der RT-PCR (engl. reverse transcriptionpolymerase chain reaction) und der end-point PCR bzw. der qPCR (engl. quantitativepolymerase chain reaction) miteinander kombiniert.

Material und Methoden

2.2.2.1 RNA-Isolierung

Die Zellen eines Monolayers wurden geerntet und das Zellpellet in 1 ml QIAzol Lysis Reagent (Qiagen N.V., Venlo) mit Hilfe einer SubQ-Spritze (Becton Dickinson, Franklin Lakes) resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben und nach mehrmaligem Invertieren weitere 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben 15 min bei 4 °C mit 13.000 rpm zentrifugiert. Die klare obere Phase wurde danach in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt und 500 µl Isopropanol hinzugegeben. Diese Probe wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor erneut für 15 min bei 4 °C mit 13.000 rpm zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml 4 °C kaltem, 80%igem Ethanol gewaschen. Hiernach wurde erneut bei 4 °C für 5 min mit 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit Ampuwa resuspendiert. Die so isolierte RNA konnte bis zur Durchführung der reversen Transkription bei -80 °C aufbewahrt werden.

2.2.2.2 cDNA-Synthese: RT-PCR

Zunächst wurde die Konzentration der isolierten RNA mit Hilfe des Tecan Infinite M200 Pro (Tecan, Männedorf) bestimmt. Dann wurden die Proben mit Aqua bidest. so verdünnt, dass 1 µg RNA in einem Volumen von 9,5 µl gelöst waren. Hierzu wurden je 1 µl RQ1 DNAse (Promega Corporation, Madison), 1 µl RQ1 10x Reaktionspuffer (Promega Corporation, Madison) und 0,5 µl RNAsin plus RNAse Inhibitor (20U) (Promega Corporation, Madison) hinzugegeben. Der DNA-Verdau fand im Labcycler (SensoQuest GmbH, Göttingen) bei 37 °C für 30 min statt. Danach wurde 1 µl Stop Solution (Promega Corporation, Madison) hinzugegeben und für weitere 10 min bei 65 °C im Labcycler belassen, um den DNA-Verdau zu beenden. Im Anschluss wurden 1 µl random Hexamer Primer (0,2 µg/µl) (Promega Corporation, Madison) hinzugegeben und für 10 min bei 70 °C im Labcycler und danach für weitere 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, um ein Annealing der Primer herbeizuführen. Anschließend wurden je 2 µl AMV Reverse Transkriptase (10U/µl) (New England Biolabs, Frankfurt am Main), 10x AMV Puffer (New England Biolabs, Frankfurt am Main) und 10 mM dNTPs (GE Healthcare, München) hinzugegeben und für 1 h bei 42 °C in den Labcycler gestellt, um die Polymerase-Reaktion ablaufen zu lassen. Die gewonnene cDNA konnte bei -20 °C für die spätere end point PCR bzw. qPCR gelagert werden.

2.2.2.3 end-point PCR und Agarose-Gel

Um die Transkripte der Adenosinrezeptorgene *ADORA1, ADORA2A, ADORA2B,* und *ADORA3* und des Haushaltsgens *GAPDH* nachzuweisen, wurde eine end-point PCR mit spezifischen Primern (biomers.net GmbH, Ulm) und cDNA der jeweils untersuchten Zelllinie durchgeführt und das Amplifikationsprodukt zur elektrophoretischen Auftrennung auf ein Agarose-Gel aufgetragen.

Das Amplifikationsgemisch der end-point PCR bestand aus je 1 μ l ,forward' und ,reverse' Primer (10 μ M), 10 μ l PCR RedMastermix (2x) (Genaxxon bioscience GmbH, Ulm), 7 μ l Aqua bidest. und 1 μ l unverdünnter cDNA (50 ng/ μ l) der jeweils untersuchten Zelllinie in einem Gesamtvolumen von 20 μ l. Die Proben wurden mit folgendem Protokoll in einem Labcycler (SensoQuest GmbH, Göttingen) amplifiziert:

Tab. 6 Amplifikationsprotokoll für die end-point PCR (englisch polymerase chain reaction)

Arbeitsschritte	Zeit	Temperatur	Anstiegsrate
Initiale Denaturierung	2 min	95 °C	5,0 °C/s
Amplifikation (35 Zyklen)			
Denaturierung	30 s	95 °C	5,0 °C/s
Primerhybridisierung			
für ADORA1, 2A und 3	30 s	60 °C	5,0 °C/s
für ADORA2B und GAPDH	30 s	59 °C	5,0 °C/s
Elongation	40 s	72 °C	5,0 °C/s
Cooling	7 min	72 °C	5,0 °C/s

Zur Auftrennung der Amplifikationsprodukte wurde ein 1,8%iges Agarose-Gel verwendet. Zur Herstellung des Agarose-Gels wurde zunächst Agarosepulver SeKem LE (Lonza Rockland, Rockland) und TAE-Puffer gemischt und in der Mikrowelle aufgekocht. Nachdem das Gemisch auf unter 50 °C auf dem Magnetrührer abgekühlt war, wurden 5 µl Midori Green Advance DNA Stain (NIPPON Genetics Europe GmbH, Dueren) pro 100 ml Gel hinzugefügt. Daraufhin wurde das Gel in eine waagerechte Elektrophorese-Kammer gegossen und ein Kamm als Platzhalter für die Taschen eingefügt. Nach Aushärtung des Gels wurde es in ein mit 1 x TAE-Laufpuffer gefülltes Elektrophoresebad gelegt und die Taschen wurden jeweils mit den Amplifikationsprodukten bzw. dem Marker beladen. Die Elektrophorese wurde bei 20 A pro 5 cm Gel-Länge gestartet. Als die Front der Proben entsprechend weit gelaufen war (nach ca. 2-4 h), wurde der Lauf beendet und das Gel wurde unter dem ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) mit Hilfe der Software ImageLab (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) abgelichtet und ausgewertet. Die Ergebnisse wurden mit der Software Microsoft Office Powerpoint 2003 (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim) zu Abbildungen zusammengestellt.

2.2.2.4 qPCR

Zur Quantifizierung der Transkripte wurde die qPCR in einem LightCycler 96 Instrument (Hoffmann-La Roche AG, Basel) durchgeführt, wobei spezifische Primer (siehe 2.1.3) für *CD39*, *CD73*, *ADORA1*, *ADORA2A*, *ADORA2B*, und *ADORA3* (biomers.net GmbH, Ulm) und cDNA der jeweils untersuchten Zelllinie benutzt wurden.

Das Amplifikationsgemisch bestand aus je 0,5 μ l ,forward' und ,reverse' Primer (10 μ M), 5 μ l SensiFAST SYBR No-ROX (Bioline GmbH, Luckenwalde) und 4 μ l cDNA (50 ng/ μ l) 1:10 bzw. 1:100 (5-0,5 ng/ μ l) verdünnt, in einem Gesamtvolumen von 10 μ l. Die Proben wurden mit folgendem Protokoll amplifiziert:

Arbeitsschritte	Zeit	Temperatur	Anstiegsrate
Initiale Denaturierung	2 min	95 °C	4,4 °C/s
Amplifikation (40 Zyklen)			
Denaturierung	5 s	95 °C	4,4 °C/s
Primerhybridisierung	10 s	60 °C	2,2 °C/s
Elongation	10 s	72 °C	4,4 °C/s
Analyse der Schmelzkurve			
Denaturierung	10 s	95 °C	4,4 °C/s
Primerhybridisierung	60 s	65 °C	2,2 °C/s
Melting	1 s	97 °C	0,2 °C/s
Cooling	30 s	37 °C	2,2 °C/s

Tab. 7 Amplifikationsprotokoll für die qPCR (englisch quantitative polymerase chain reaction)
Die arithmetische Auswertung erfolgte mit der Software LightCycler 96, Version 1.1.0.1320 (Hoffmann-La Roche AG, Basel). Hierbei wurden die gemessenen Fluoreszenzsignale gegen die Zyklusanzahl in einem Graphen aufgetragen, wodurch sich die Amplifikationskurve ergab. Aus dieser Kurve wurde der sogenannte C_T-Wert (engl. cycle threshold) bestimmt. Der C_T-Wert gab den Zyklus an, bei dem das gemessene Fluoreszenzsignal einen bestimmten Schwellenwert oberhalb der Hintergrundfluoreszenz überstieg. Der CT-Wert war antiproportional zur vorliegenden Kopienanzahl des Zielgens zu Beginn der Amplifikation. Mithilfe der $2^{-\Delta\Delta C}$ _T -Methode, wie von Livak und Schmittgen beschrieben [53], konnte aus den ermittelten C_T-Werten die Expressionsrate des Zielgens quantifiziert werden. Hierzu wurden allerdings endogene Referenzgene benötigt, die als interne Kontrolle eine möglichst konstante Expression zeigten und gegen die die Expression des Zielgens normalisiert wurden. Dazu dienten die Haushaltsgene RPL13A, *B2M* und *HPRT1*. Zur Zulässigkeit der Anwendung der $2^{-\Delta\Delta C}$ _T -Methode ist eine annährend gleiche Amplifikationseffizienz des Zielgens und des Referenzgens Voraussetzung. Dies wurde durch entsprechende Primerdesigns gewährleistet und durch Vergleich der ΔC_{T} -Werte in verschiedenen Probenverdünnungen validiert. Weiterhin wird ein Kalibrator als Vergleichsprobe benötigt, zu dem die Expression des Zielgens in der untersuchten Probe in Relation gesetzt werden kann. Zur Bestimmung der Expressionsraten von CD39 und CD73 in den verschiedenen HNSCCs wurden CD19+ B-Zellen aus Tonsillengewebe von nicht an einer Neoplasie erkrankten Patienten als Kalibrator benutzt, während für die Bestimmung der Expressionsraten von ADORA2B in den verschiedenen HNSCCs DU145 als Kalibrator genutzt wurde.

Insgesamt wurde die relative Expressionsrate der untersuchten Zielgene als Mittelwert aus jeweils in Duplikaten gemessenen Werten aus insgesamt drei unabhängigen Experimenten bestimmt. Darüber hinaus wurden die entsprechenden Standardabweichungen berechnet. Die Normalisierung, Kalibrierung sowie die Mittelwert- und Standardabweichungsberechnung wurden mit der Software Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim) durchgeführt. Mit Hilfe der Software Microsoft Office Powerpoint 2003 (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim) wurden die Ergebnisse in Abbildungen zusammengestellt.

2.2.3 Durchflusszytometrie

Um die Enzyme CD39 und CD73 an der Zelloberfläche der verschiedenen Zelllinien nachzuweisen, wurde die Methode der Durchflusszytometrie, gelegentlich auch FACS genannt (engl. <u>f</u>luorescence-<u>a</u>ctivated <u>c</u>ell <u>sorting</u>), verwendet. Hierzu wurden die geernteten Zellen in 5 ml PBS-Puffer aufgenommen und gleichmäßig auf 5 FACS-Röhrchen verteilt. Es wurden bis zu 5 x 10⁶ Zellen pro Röhrchen eingesetzt. Diese wurden bei 12.000 rpm für 7 min runterzentrifugiert. Der Überstand wurde durch Abschütten verworfen und das Zellpellet in dem im Röhrchen verbliebenen Tropfen PBS-Puffer gelöst. Hierzu wurden jeweils 3 µl der mit Fluorochromen gekoppelten CD39- bzw. CD73-Antikörper und der entsprechenden ISO-Kontroll-Antikörper gemäß folgendem Schema gegeben.

Tab. 8 Schema der Färbungen der Durchflusszytometrie-Proben

Es wurden folgende Antikörper verwendet: mit PE-Cyanine 7 gekoppelte CD39-Antikörper (CD39-AK), mit PE-Cyanine 7 gekoppelte ISO-Kontrollantikörper, mit eFluor 450 gekoppelte CD73-Antikörper (CD73-AK) und mit eFluor 450 gekoppelte ISO-Kontrollantikörper. CD: cluster of differentiation

	Probe	CD39	CD73
		(PE-Cyanine7)	(eFluor 450)
1	nicht markiert	-	-
2	CD39-Färbung	3 μl CD39-AK	3 μl ISO-Kontrolle
3	CD73-Färbung	3 µl ISO-Kontrolle	3 μl CD73-AK
4	ISO-Typen-Kontrolle	3 µl ISO-Kontrolle	3 μl ISO-Kontrolle
5	CD39/CD73-Doppelfärbung	3 μl CD39-AK	3 μl CD73-AK

Die Antikörper wurden für 30 min bei 4 °C im Dunklen inkubiert. Danach wurde jeweils 1 ml PBS-Puffer in die Röhrchen gegeben, bei 12.000 rpm für 7 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschschritt wurde noch einmal wiederholt. Danach wurden die Zellen in 250 µl PBS-Puffer resuspendiert und im Gallios Flow Cytometer (Beckmann Coulter Life Sciences, Brea) durchgemessen. Mit Hilfe der Software Kaluza Analysis (Beckmann Coulter Life Sciences, Brea) wurde zunächst eine Punktewolke (engl. dotplot) erstellt, welche für jede Zelle die Signale des Vorwärtsstreulichts (FSC - engl. <u>f</u>orward <u>sc</u>atter) und des Seitwärtsstreulichts (SSC - engl. <u>s</u>ide <u>sc</u>atter) angibt. In dieser Punktewolke konnte ein sogenanntes Gate definiert werden, um nur die lebenden Zellen in die weitere Analyse einzuschließen. Von den so ausgewählten Zellen wurden die Fluoreszenzsignale der verschiedenen Färbungen der Probe in einem Histogramm aufgetragen und die mittlere Fluoreszenzintensität von CD39 und CD73 bestimmt. Alle mittleren Fluoreszenzintensitäten der verschiedenen Proben wurden mit Hilfe der Software Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim) in einem Graphen dargestellt.

2.2.4 Western-Blot

Der Gehalt des translatierten Proteins ADORA2B in den Zelllinien im Verhältnis zu β -Actin wurde mit Hilfe von Western-Blots bestimmt.

2.2.4.1 Probenvorbereitung

Für die Herstellung des Ganzzelllysats wurden die zu lysierenden Zellen für 10 min mit RIPA auf Eis inkubiert. Danach wurde mit 13.000 rpm bei 4 °C für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt und bei - 20 °C aufbewahrt.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit der Methode nach Bradford. Dabei wurde 1 ml Coomassie Protein Assay Reagent (Thermo Scientific, Waltham) mit jeweils 2 ml der Proben bzw. der BSA-Standard-Verdünnungen oder RIPA als Leerprobe gemischt. Die Mischungen wurden für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proben in eine 96-Loch-Platte (Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster) pipettiert und die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm im Plattenlesegerät Infinite M200 Pro (Tecan, Männedorf) gemessen. Durch das Auftragen der bekannten Konzentrationen der Standardverdünnungen gegen die gemessene Absorption konnte eine Standardkurve erstellt werden, mit deren Hilfe die Proteinkonzentrationen der Proben bestimmt werden konnten. Die Proben wurden mit RIPA verdünnt, sodass die Proteinmenge in allen Proben 20 µg in einem Volumen von 15 µl betrug. Nun waren die Proben für eine SDS-PAGE (engl. <u>s</u>odium <u>d</u>odecyl <u>s</u>ulfate poly<u>a</u>crylamide gel <u>e</u>lectrophoresis) vorbereitet.

Material und Methoden

2.2.4.2 SDS-PAGE

Die Reagenzien für das Trenngel (siehe 2.1.6) wurden gemischt, in die Gelkammer pipettiert und mit 100%igem Isopropanol überschichtet. Sobald das Gel auspolymerisiert war, wurde das Isopropanol durch Abgießen und Trockentupfen mit Filterpapier entfernt. Das Trenngel wurde mit dem Sammelgel (siehe 2.1.6) überschichtet und ein Kamm während des Auspolymerisierens des Sammelgels zum Formen der Taschen für die Proben eingelegt. Den Proben wurden 5 μ l 4-fach konzentrierter Laemmli-Puffer hinzugegeben. Anschließend wurden sie für 5 min bei 95 °C erhitzt. Die Proben kühlten auf Eis ab. Nach kurzem Anzentrifugieren wurden die einzelnen Proben sowie der Proteingrößenmarker auf das Gel aufgetragen. Die Kammer wurde mit 1 x Laufpuffer aufgefüllt und die Elektrophorese gestartet. Der Lauf erfolgte für die ersten 15 min bei 100 V und danach für ca. 1 h bei 120 V, bis die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte.

2.2.4.3 Blotting

Im Anschluss an die SDS-PAGE wurden durch das Blotting die im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Blotting-Membran (GE Healthcare, Chalfont St. Giles) transferiert. Hierzu wurde die Blotting-Kammer nach folgendem Schema aufgebaut, wobei alle Komponenten zuvor für 5 min in 4 °C kaltem Transferpuffer eingelegt wurden:

- Anode
- Schwämmchen
- 3 Filterpapiere
- Trenngel mit aufgetrennten Proteinproben
- Nitrozellulose-Blotting-Membran
- 3 Filterpapiere
- Schwämmchen
- Kathode

Die Transferkammer wurde mit 4 °C kaltem Transferpuffer aufgefüllt und mit einem Eisblock unter Magnetrührung zur Kühlung versehen. Der Transfer wurde für ca. 1 h bei 100 V durchgeführt.

2.2.4.4 Blocking und Hybridisierung

Zunächst wurde die Membran 3 x 5 min mit TBS-T gewaschen. Im Anschluss wurde zur Vermeidung von unspezifischen Proteinbindungen die Nitrozellulose-Membran für 1 h mit 5% iger Milch in TBS-T inkubiert. Je nach untersuchtem Protein (ADORA2B oder β -Actin) wurden nun verschiedene Antikörper als Primärantikörper in 5% iger Milch verdünnt zu der Membran hinzugegeben und über Nacht bei 4 °C unter Schwenken inkubiert. Danach folgte ein Waschschritt von 3 x 5 min mit TBS-T. Der Sekundärantikörper wurde, ebenfalls in 5% iger Milch verdünnt, für 1 h bei Raumtemperatur hinzugegeben. Im Anschluss wurden überschüssige Antikörper durch einen erneuten Waschschritt von 3 x 5 min mit TBS-T entfernt.

2.2.4.5 Detektion

Die Immunkonjugate auf der Nitrozellulose-Membran wurden mit Hilfe von ECL (engl. enhanced chemiluminescence) detektiert. Dabei diente das SuperSignal West Dura Substrate (Thermo Scientific, Waltham) als Substrat für das antikörpergekoppelte HRP-Enzym (engl. <u>horseradishperoxidase</u>) und die entstehende elektromagnetische Strahlung konnte unter dem ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) als Proteinbande auf dem Blot detektiert werden. Die Exposition erfolgte in der Regel für weniger als 10 min. Die Bilddaten konnten mit der Software ImageLab (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) quantitativ ausgewertet und mit der Software Microsoft Office Powerpoint 2003 (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim) zu Abbildungen zusammengestellt werden.

2.2.5 Proliferationsassay

Zur Messung der Proliferationsrate der verschiedenen HNSCC-Zelllinien unter ADORA2B-Modulation wurden Proliferationsassays durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen in der Zählkammer gezählt und in einer 96-Lochplatte in Zellkulturmedium (10% FBS) ausgesät, sodass sich jeweils 1.000-2.000 Zellen je nach untersuchter Zelllinie in einer Vertiefung befanden. Zusätzlich zu diesen Proben wurden Verdünnungsreihen von

1.000 bis 10.000 Zellen pro Vertiefung angesetzt. Danach wurden die Zellen für 24 h im Brutschrank bei 5 % CO2 und bei 37 °C inkubiert. Zu den Verdünnungsreihen wurden nach den ersten 24 h je 20 µl CellTiter 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega Corporation, Madison) gegeben und für zwei weitere Stunde im Brutschrank inkubiert. Hierauf wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 490 nm im Plattenlesegerät Infinite M200 Pro (Tecan Group AG, Männedorf) gemessen. Durch das Auftragen der bekannten Zellzahlen der Verdünnungsreihen gegen die gemessenen Absorptionen konnte eine Standardkurve erstellt werden, mit deren Hilfe die Zellzahlen der Proben zu den verschiedenen Zeitpunkten bestimmt werden konnten. Diese Standardkurve wurde für jede Zelllinie und für jeden Proliferationsassay separat erstellt. Das Medium der eigentlichen Probevertiefungen wurde nach den ersten 24 h gewechselt und mit Medium (1% FBS), welches entweder DMSO als Kontrolle oder eine in DMSOgelöste Testsubstanz (NECA oder PSB) in aufsteigenden Konzentrationsreihen enthielt, ersetzt. Der Zeitpunkt des Mediumwechsels wurde als 0 h-Zeitpunkt festgelegt. In den folgenden 72 h wurden alle 24 h jeweils 20 µl CellTiter 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega Corporation, Madison) zu den Proben gegeben, für zwei weitere Stunde im Brutschrank inkubiert und danach die Absorption bei einer Wellenlänge von 490 nm im Plattenlesegerät Infinite M200 Pro (Tecan Group AG, Männedorf) gemessen. Mit Hilfe der zuvor ermittelten Standardkurve konnten die gemessenen Absorptionen in die entsprechenden Zellzahlen zurückgerechnet werden. Pro Experiment wurden für jeden Zeitpunkt und für jede Testsubstanz-Konzentration jeweils vier Vertiefungen angesetzt. Aus insgesamt bis zu drei unabhängigen Experimenten wurden für jede Zelllinie jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichungen der über die Absorption errechneten Zellzahlen mit Hilfe der Software Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim) bestimmt und in einer Abbildung mit Hilfe von Microsoft Office Powerpoint 2003 (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim) dargestellt.

2.2.6 Scratch-Assay

Zur Messung der Rate der Zellmigration und der Proliferation der verschiedenen HNSCC-Zelllinien unter ADORA2B-Modulation wurden sogenannte Scratchassays, auch Wundheilungsassays genannt, durchgeführt. Hierzu wurden die verschiedenen Zelllinien in

12-Lochplatten in einer Dichte von 30.000 Zellen pro cm² in Zellkulturmedium (10% FBS) ausgesät und über Nacht im Brutschrank bei 5 % CO2 und bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag war in der Regel ein konfluenter Monolayer ausgebildet. War dies nicht der Fall, wurden die Platten nach einem Mediumwechsel weitere 24 h bebrütet, bis sich ein konfluenter Monolayer ausgebildet hatte. Daraufhin wurde mit einer 1000 µl-Pipettenspitze ein einzelner, gerade verlaufender Kratzer manuell in den Monolayer gekratzt. Im Anschluss wurde das Medium abgesaugt, der Monolayer zweimal vorsichtig mit PBS gewaschen und anschließend 2 ml neues Medium (1% FBS) pro Vertiefung dazugegeben, welches entweder DMSO als Kontrolle oder eine in DMSO-gelöste Testsubstanz (NECA und/oder PSB) enthielt. Im Falle der Koinkubation mit NECA und PSB, wurde das PSB erst 20 min nach der NECA-Zugabe hinzugefügt. Bei den einfachen Konditionen (nur DMSO, NECA oder PSB) wurde entsprechend mehr DMSO hinzugegeben, um die DMSO Konzentrationen in allen Konditionen gleich zu halten. Daraufhin wurden die Platten im Brutschrank inkubiert. Jeweils 12 h, 24 h und 48 h später wurden die Platten unter dem Mikroskop betrachtet und von dem wieder konfluierenden Monolayer Aufnahmen gemacht. Dabei wurden je 3 Bilder (oben, mittig und unten in der Vertiefung) pro Vertiefung und Zeitpunkt gemacht. Pro Kondition (DMSO, NECA, NECA+PSB, PSB) wurden je Experimentdurchlauf jeweils drei Vertiefungen angesetzt. Insgesamt wurden bis zu drei unabhängige Experimente pro Zelllinie durchgeführt. In jedem Bild wurden mit Hilfe der Software Axio Vision 40 (Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH, Jena) drei Distanzen (oben, mittig und unten im Bild) zwischen den konfluierenden Zellfronten gemessen. Aus allen gemessenen Distanzen wurden mit Hilfe der Software Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim) die Mittelwerte und Standardabweichungen für jede Kondition und für jeden Zeitpunkt berechnet und in einer Abbildung mit Hilfe von Microsoft Office Powerpoint 2003 (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim) dargestellt.

2.2.7 Transwell-Assay

Zur Messung der Rate der Zellmigration der verschiedenen HNSCC-Zelllinien unter ADORA2B-Modulation wurden sogenannte Transwell-Assays durchgeführt. Hierzu wurden spezielle 12-Lochplatten (Falcon Corning Inc, Corning) verwendet, die eine Insertion von Transwell-Filtern erlaubten (Falcon Corning Inc, Corning). Hierdurch entstanden eine obere und eine untere Kammer, die durch eine Polycarbonat-Membran mit 8 µm großen Poren getrennt waren.

Nachdem die Zellen aus den Zellkulturflaschen trypsiniert und runterzentrifugiert waren, wurden sie mit Medium, welches anstelle von FBS 0,1% iges BSA (PAA Laboratories GmbH, Pasching) enthielt, durch Resuspendieren und Runterzentrifugieren zweimal gewaschen. Danach wurden die Zellen erneut in 0,1% igem BSA-Medium resuspendiert und gezählt. 1x10⁶ Zellen gelöst in 0,5 ml 0,1% igem BSA-Medium wurden in die obere Kammer der Vertiefung einer Transwellplatte gegeben. In die untere Kammer wurde 1 ml Medium mit 10% FBS gegeben. Zusätzlich wurden in beide Kammern entweder DMSO, NECA, NECA+PSB oder PSB. Im Falle der Koinkubation mit NECA und PSB, wurde das PSB erst 20 min nach der NECA-Zugabe hinzugefügt. Bei den einfachen Konditionen (nur DMSO, NECA oder PSB) wurde entsprechend mehr DMSO hinzugegeben, um die DMSO Konzentrationen in allen Konditionen gleich zu halten. Die Platten wurden für 16 h über Nacht im Brutschrank bei 5 % CO₂ und bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium aus der oberen und der unteren Kammer abpipettiert und eine 3,7%ige Formaldehydlösung zur Fixierung für 20 min hinzugegeben. Danach wurde die Formaldehydlösung verworfen und die Filter durch Schwenken in drei mit Aqua bidest. gefüllten Bechergläsern gewaschen. Im Anschluss wurden alle Zellen aus der oberen Kammer durch vorsichtiges Wischen mit Wattestäbchen über die Polycarbonat-Membran entfernt. Danach wurden die Filter durch Schwenken in drei mit Aqua bidest. gefüllten Bechergläsern erneut gewaschen. Daraufhin wurde in Aqua bidest. gelöstes, 1% iges DAPI in beide Kammern gegeben und die Zellen somit für 20 min gefärbt. Im Anschluss wurden die Filter durch Schwenken in drei mit Aqua bidest. gefüllten Bechergläsern erneut gewaschen und in einer neuen Platte unter dem Fluoreszenzmikroskop Axio Observer D1 (Carl Zeiss AG, Oberkochen) mikroskopiert. Dabei wurden 10 Bilder über den gesamten Filter verteilt gemacht und die durch die DAPI-Färbung erkennbaren Zellkerne in diesen Bildern gezählt. Pro Kondition und Versuchsdurchlauf wurden jeweils zwei Filter angesetzt und ausgewertet. Pro Zelllinie wurde das Experiment dreimal durchgeführt. Aus allen Zahlen der gezählten Zellkerne in einem Bild wurden mit Hilfe der Software Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim) die Mittelwerte und Standardabweichungen für jede Kondition und für jede Zelllinie berechnet und in einer Abbildung mit Hilfe von Microsoft Office Powerpoint 2003 (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim) dargestellt.

2.2.8 Messung der VEGF-Sekretion

Zur Messung der VEGF-Sekretion der verschiedenen HNSCC-Zelllinien unter ADORA2B-Modulation wurden die Überstände von Zellkulturen durch ELISA-Assays auf den Gehalt von VEGF untersucht. Hierzu wurden zunächst die Zellen mit Medium (10% FBS) in 12-Lochplatten mit einer Dichte von 25.000 Zellen pro cm² ausgesät und über Nacht im Brutschrank bei 5 % CO2 und bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und durch 2 ml frisches Medium (1% FBS) pro Vertiefung ersetzt, welches entweder DMSO als Kontrolle oder in DMSO gelöstes PSB (1 μ M) als Testsubstanz enthielt. Der Zeitpunkt des Mediumwechsels war als 0 h-Zeitpunkt definiert. Alle 24 h über insgesamt 96 h beginnend mit 0 h wurden jeweils 300 µl Überstand pro Vertiefung entnommen und bei -80 °C eingefroren. Die 12-Lochplatte wurde während der gesamten Zeit im Brutschrank bei 5 % CO2 und bei 37 °C inkubiert. Nachdem alle Überstände gesammelt waren, wurde das Human VEGF-ELISA-Kit (Life Technologies, Carlsbad) gemäß der Anleitung des Herstellers mit den gesammelten Proben durchgeführt. Dabei wurden die 96 Vertiefungen der ELISA-Platte, an deren Böden VEGF-Antikörper gegen humanes VEGF mit deren Fc-Teil gebunden waren, zunächst mit 50 µl kiteigenem Inkubationspuffer befüllt. Hierzu wurden Vertiefung pro jeweils 50 µl Standardverdünnungspuffer des Kits und zusätzlich 50 µl der entsprechenden Proben hinzugegeben. Zusätzlich wurden Vertiefungen mit 100 µl von Verdünnungen des humanen VEGFs mit bekannten Konzentrationen von 1.500 pg/ml bis zu 23,5 pg/ml befüllt und dienten zusammen mit einer Leerprobe bei der späteren Auswertung als Standardverdünnungen. Die fertig befüllte ELISA-Platte wurde mit Folie abgeklebt und im Dunkeln bei Raumtemperatur für 2 h inkubiert. Anschließend wurde die Folie entfernt und die Inhalte der Vertiefungen durch vorsichtiges Absaugen verworfen. Es folgten 4 Waschschritte mit dem kiteigenen Waschpuffer. Danach wurden in jede Vertiefung jeweils 100 µl des Biotin-konjugierten Antikörpers gegen humanes VEGF gegeben, die Platte mit einer Folie abgeklebt und im Dunkeln bei Raumtemperatur für 1 h inkubiert. Anschließend wurde die Folie entfernt und die Inhalte der Vertiefungen wiederum verworfen, worauf 4 Waschschritte mit dem kiteigenen Waschpuffer folgten. Daran anschließend wurden die Vertiefungen mit jeweils 100 µl Streptavidin HRP-Lösung des Kits befüllt, die Platte mit einer Folie abgeklebt und im Dunkeln bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Danach wurde die Folie entfernt, die Inhalte der Vertiefungen wiederum verworfen und 4 Waschschritte mit dem kiteigenen Waschpuffer durchgeführt. Im Anschluss wurden die

Vertiefungen mit jeweils 100 µl stabilisiertem Chromogen des Kits befüllt, die Platte mit einer Folie abgeklebt und im Dunkeln bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Anschließend wurden weitere 100 µl der Stop-Lösung des Kits hinzugegeben und die Absorption der Vertiefungen der Platte im Plattenlesegerät Infinite M200 Pro (Tecan Group AG, Männedorf) bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Unter Verwendung der Software Magellan (Tecan Group AG, Männedorf) wurde durch ein 4-Parameter-Algorithmus gemäß der Kit-Anleitung des Herstellers und mit Hilfe der Leerprobe sowie der bekannten Standardverdünnungen des humanen VEGF eine Standardkurve ermittelt, wodurch die gemessene Absorption der untersuchten Proben in die absolute VEGF-Konzentration in pg/ml umgerechnet werden konnte. Je Versuchsdurchlauf wurden jeweils zwei Proben pro Kondition und Zeitpunkt entnommen und auf den Gehalt von VEGF durch das ELISA-Kit untersucht. Insgesamt wurde das Experiment für jede untersuchte Zelllinie dreimal wiederholt. Für alle erhobenen Werte wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen pro Kondition und Zeitpunkt für jede untersuchte Zelllinie mit Hilfe der Software Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim) berechnet und mit der Software Microsoft Office Powerpoint 2003 (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim) in Abbildungen dargestellt.

2.2.9 Statistik

Die erhobenen Daten aus den verschiedenen Experimenten wurden statistisch mithilfe der Software Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim) ausgewertet und mit der Software Microsoft Office Powerpoint 2003 (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim) zu Abbildungen zusammengestellt.

2.2.9.1 qPCR

Die arithmetische Auswertung erfolgte mit der Software LightCycler 96, Version 1.1.0.1320 (Hoffmann-La Roche AG, Basel). Die anschließende Quantifizierung der relativen Genexpression erfolgte mit der $2^{-\Delta\Delta C}$ _T -Methode wie von Livak und Schmittgen beschrieben [53]. Dabei wurden die PCR-Signale der untersuchten Gene (*CD39*, *CD73* und *ADORA2B*) gegen die Haushaltsgene *RPL13A*, *B2M* und *HPRT1* normalisiert und mit

den Proben der CD19+ B-Zellen aus Tonsillengewebe von nicht an einer Neoplasie erkrankten Patienten bzw. von DU145 kalibriert (siehe 2.2.2.4). Aus jeweils in Duplikaten gemessenen Werten aus insgesamt drei unabhängigen Experimenten wurden die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen berechnet.

2.2.9.2 Proliferationsassays

Es wurden insgesamt bis zu drei unabhängige Experimente pro Zelllinie durchgeführt (3 Experiment-Durchläufe für UDSCC1, UDSCC5, PC-3 und NAMALWA, 2 Experiment-Durchläufe für UDSCC2 und UDSCC6, 1 Experiment-Durchlauf für UDSCC3 und UMSCC10A). Pro Experiment wurden für jeden Zeitpunkt und für jede Testsubstanz und deren Konzentration jeweils vier Vertiefungen angesetzt. Zu den entsprechenden Zeitpunkten (24 h, 48 h und 72 h) wurde nach MTT-Zugabe und Inkubation für 1 h die Absorption bei 450 nm gemessen. Die gemessenen Absorptionen wurden in Zellzahlen umgerechnet anhand von Standardkurven. Diese Standardkurven wurden für jedes Experiment einzeln erstellt. Dabei wurden mit Hilfe von Microsoft Excel die gemessenen Absorptionen gegen die bekannten Zellzahlen in einem Graphen aufgetragen und eine Regressionsgerade durch die Werte gelegt, für welche die entsprechende Formel sowie das Bestimmtheitsmaß berechnet wurde. Anhand dieser Formel der Regressionsgeraden konnte die Umrechnung der Absorptionen in die Zellzahlen für die entsprechenden Experimente erfolgen. Aus allen so errechneten Werten der Zellzahlen wurden jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichungen bestimmt. Darüber hinaus wurden studentische zweiseitige zwei-Stichproben-t-Tests (Student's t-Test) durchgeführt, um zu bestimmen, ob jeweils zu einem bestimmten betrachteten Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den Zellzahlen der Proben der DMSO-Kontrolle und denen der Proben der betrachteten PSB-Konzentrationen vorlag. Dabei wurde von einer homoskedastischen Streuung der Werte ausgegangen. Es wurden die Signifikanzwerte bestimmt und in der Abbildung entsprechend mit * bei p<0,05 und ** bei p<0,01 markiert.

2.2.9.3 Scratch-Assays

Es wurden insgesamt bis zu drei unabhängige Experimente pro Zelllinie durchgeführt (3 Experiment-Durchläufe für UDSCC1, UDSCC5, 2 Experiment-Durchläufe für PC-3, 1 Experiment-Durchlauf für UDSCC2, UDSCC3 und UDSCC6). Pro Experiment wurden für jede der vier Konditionen (DMSO, NECA, NECA+PSB, PSB) jeweils drei Vertiefungen einer 12-Lochplatte angesetzt. Jeweils zum Zeitpunkt 0h, 12 h, 24 h und 48 h nach Hinzugabe der Testsubstanz wurden die Platten unter dem Mikroskop betrachtet und von dem wieder konfluierenden Monolayer Aufnahmen gemacht. Dabei wurden je 3 Bilder (oben, mittig und unten in der Vertiefung) pro Vertiefung und Zeitpunkt gemacht. In jedem Bild wurden mit Hilfe der Software Axio Vision 40 (Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH, Jena) drei Distanzen (oben, mittig und unten im Bild) zwischen den konfluierenden Zellfronten gemessen. Dabei wurde jede gemessene Distanz der 12 h-, 24 h- und 48 h-Zeitpunkte durch die korrespondierende Distanz zum 0 h-Zeitpunkt aus dem entsprechenden Bereich der entsprechenden Vertiefung geteilt und in Prozent dargestellt. Jeder berechnete Wert wurde von 1 abgezogen, um den Wert der abgeschlossenen Wundheilung zu erhalten. Aus allen Prozentwerten für die abgeschlossene Wundheilung wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen für jede Kondition und für jeden Zeitpunkt bestimmt. Darüber hinaus wurden studentische zweiseitige zwei-Stichproben-t-Tests (Student's t-Test) durchgeführt, um zu bestimmen, ob jeweils zu einem bestimmten betrachteten Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den Prozentwerten der abgeschlossenen Wundheilung in der DMSO-Kontrolle gegenüber denen der anderen Konditionen vorlag. Dabei wurde von einer homoskedastischen Streuung der Werte ausgegangen. Es wurden die Signifikanzwerte bestimmt und in der Abbildung entsprechend mit * bei p<0,05 und ** bei p<0,01 markiert.

2.2.9.4 Transwell-Assays

Es wurden insgesamt drei unabhängige Experimente pro Zelllinie (UDSCC1, UDSCC5 und PC-3) durchgeführt. Pro Versuchsdurchlauf und für jede der vier Konditionen (DMSO, NECA, NECA+PSB, PSB) wurden jeweils zwei Filter angesetzt und ausgewertet. Dabei wurden 10 Bilder über den gesamten Filter verteilt gemacht und die durch die DAPI-Färbung erkennbaren transmigrierten Zellkerne in diesen Bildern gezählt. Aus allen Zahlen der gezählten Zellkerne in einem Bild die Mittelwerte und Standardabweichungen für jede Kondition und für jede Zelllinie berechnet. Die berechneten Werte wurden durch die entsprechenden Werte für die DMSO-Kontrolle geteilt und somit in Prozent von der DMSO-Kontrolle angegeben. Darüber hinaus wurden studentische zweiseitige zwei-Stichproben-t-Tests (Student's t-Test) durchgeführt, um zu bestimmen, ob jeweils zu einem bestimmten betrachteten Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den Prozentwerten der migrierten Zellen in der DMSO-Kontrolle gegenüber denen der anderen Konditionen vorlag. Dabei wurde von einer homoskedastischen Streuung der Werte ausgegangen. Es wurden die Signifikanzwerte bestimmt und in der Abbildung entsprechend mit * bei p<0,05 und ** bei p<0,01 markiert.

2.2.9.5 VEGF-ELISA

Insgesamt wurde das Experiment für jede untersuchte Zelllinie (UDSCC1, UDSCC5, PC-3 und NAMALWA) dreimal wiederholt. Pro Versuchsdurchlauf wurden jeweils zwei Proben pro Kondition (DMSO und PSB) und Zeitpunkt (0 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h) entnommen und auf den Gehalt von VEGF durch das ELISA-Kit untersucht. Nach Durchführung aller Schritte des ELISA-Kits konnte die Absorption der Vertiefungen der ELISA-Platte im Tecan Infinite M200 Pro (Tecan, Männedorf, Schweiz) bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen werden. Unter Verwendung der Software Magellan (Tecan Group AG, Männedorf) wurde durch ein 4-Parameter-Algorithmus gemäß der Kit-Anleitung des Herstellers und mit Hilfe der Leerprobe sowie der bekannten Standardverdünnungen des humanen VEGF eine Standardkurve ermittelt, wodurch die gemessene Absorption der untersuchten Proben in die absolute VEGF-Konzentration in pg/ml umgerechnet werden konnte. Für alle erhobenen Werte wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen pro Kondition und Zeitpunkt berechnet. Darüber hinaus wurden studentische zweiseitige zwei-Stichproben-t-Tests (Student's t-Test) durchgeführt, um zu bestimmen, ob jeweils zu einem bestimmten betrachteten Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den berechneten Werten der VEGF-Konzentration in der DMSO-Kontrolle gegenüber denen der PSB-Probe vorlag. Dabei wurde von einer homoskedastischen Streuung der Werte ausgegangen. Es wurden die Signifikanzwerte bestimmt und in der Abbildung entsprechend mit * bei p<0,05 und ** bei p<0,01 markiert.

3 Ergebnisse

3.1 Expressionsanalyse der key-players im adenosinergen System

Um den Einfluss von Adenosin auf Plattenepithelkarzinomzelllinien etabliert von Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches zu analysieren, wurde zunächst ein Expressionsprofil der Schlüsselrollengene im Adenosinstoffwechsel erstellt. Hierbei dienen CD39 und CD73 als Proteine auf der Zelloberfläche zur extrazellulären Bereitstellung von Adenosin durch schrittweise Degradierung von ATP über ADP zu Adenosin. Das so entstehende Adenosin kann an den Rezeptoren ADORA1, ADORA2A, ADORA2B und ADORA3 Wirkungen auf die Zellen ausüben. Die Expressionsanalyse dieser verschiedenen Gene erfolgte auf mRNA-Ebene durch PCR-Analysen und auf Protein-Ebene durch FACS- bzw. Western-Blot-Analysen.

3.1.1 CD39 und CD73

Zunächst wurde die relative mRNA-Expressionsrate von *CD39* und *CD73* für die 12 HNSCC-Zelllinien bestimmt. Dazu wurde die gesamte mRNA einer Zelllinie isoliert, mit Hilfe einer reversen Transkriptase in cDNA transkribiert und unter Verwendung spezifischer Primerpaare die untersuchte mRNA-Sequenz durch das Verfahren der Real Time-PCR amplifiziert und in Relation zu den Haushaltsgenen *RPL13A*, *B2M* und *HPRT1* jeweils nach der $2^{-\Delta\Delta C}$ T -Methode quantifiziert. CD19+ B-Zellen wurden bereits als doppelt positiv für CD39 und CD73 identifiziert [71]. Daher dienten aus gesundem humanem Tonsillengewebe isolierte CD19+ B-Zellen als Referenzprobe. Die Anzahl der Transkripte der untersuchten Zelllinien in Relation zu den Transkripten der Referenzprobe ist in Abb. 1 dargestellt. Es zeigte sich, dass keine der untersuchten 12 HNSCC-Zelllinien Transkripte von *CD39* über der Detektionsgrenze erstellten. Auch die anderen Kontrollzelllinien DU145, PC-3, LNCap und NAMALWA, die sich alle von malignen Zellen ableiten, produzierten keine detektierbaren Transkripte von *CD39*. Für *CD73* wurden Transkriptionsraten der HNSCCs detektiert, die zum Teil um das Vielfache erhöht waren im Vergleich zu CD19+ B-Zellen (siehe Abb. 1B). Dabei ergaben sich je nach Haushaltsgen, welches für die Normalisierung benutzt wurde, Unterschiede in der *CD73*-Expressionsstärke. Insgesamt war die Expressionsrate von *CD73* jedoch für alle betrachteten Haushaltsgene für fast alle der 12 untersuchten HNSCC-Zelllinien im Vergleich zu den CD19+ B-Zellen erhöht. UDSCC5, UMSCC10A und UTSCC24A gehörten dabei zu den Zellen mit der höchsten Expressionsrate. UDSCC1, UDSCC8 und UTSCC50 zeigten eine im Vergleich zu den anderen HNSCC-Zelllinien eine eher niedrige Expressionsrate, während UDSCC3 als einzige eine sehr niedrige Expressionsrate zeigte, welche unter der Referenzexpressionsrate der CD19+ B-Zellen lag.

Auf Translationsebene konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. In der Durchflusszytometrie zeigte die Fluoreszenzintensität der mit PE-Cyanine7 gekoppelten anti-CD39-Antikörper markierten Zellen aller 12 HNSCC-Zelllinien ähnliche hohe Werte wie die Isotypen-Kontrollen und die nicht markierten Zellen (siehe Abb. 2). Somit exprimierte keine der 12 HNSCC-Zelllinien CD39 auf ihrer Oberfläche. CD73 fand sich den Ergebnissen der Durchflusszytometrie nach auf allen Zelloberflächen der HNSCC-Zelllinien in unterschiedlicher Intensität. Dabei korrelierte die Expressionsstärke auf Transkriptionsebene der einzelnen Zelloberfläche in den meisten Fällen (siehe Abb. 3). UMSCC22B und UTSCC50 zeigten jedoch verglichen mit den Transkriptionsraten relativ hohe Fluoreszenzintensitäten für CD73 in der Durchflusszytometrie. UDSCC3 war wie auch auf Translationsebene die einzige HNSCC-Zelllinie, deren Expression von CD73 unter dem Referenzwert der CD19+ B-Zellen lag.



Abb. 1 Transkriptionsanalyse von *CD39* und *CD73* in HNSCCs mit Hilfe von RT-qPCR (modifiziert nach Wilkat et al [93] unter Creative Commons Attribution 4.0 International License, <u>https://creativecommons.org/licenses/by/4.0</u>)

Es ist die relative Expressionsstärke von *CD39* (**A**) und *CD73* (**B**) jeweils normalisiert gegen die Haushaltsgene *RPL13A* (blau), *B2M* (grün) und *HPRT1* (grau) für die 12 untersuchten Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinien (HNSCCs), 3 Prostatakarzinom-Zelllinien (DU145, PC-3, LNCap) und die B-Zelllinie NAMALWA im Vergleich zu aus humanem Tonsillengewebe isolierten CD19+ B-Zellen dargestellt. Dabei wurde die Anzahl der mRNA-Transkripte relativ zu der Anzahl der mRNA-Transkripte der CD19+ B-Zellen dargestellt, welche auf den Wert 1 gesetzt wurden (türkis hinterlegt). Es ist jeweils der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten aufgetragen sowie die Standardabweichung als Fehlerbalken.



Abb. 2 Expressions analyse von *CD39* in HNSCCs mittels RT-qPCR und FACS-Analyse (modifiziert nach Wilkat et al [93] unter Creative Commons Attribution 4.0 International License, <u>https://creativecommons.org/licenses/by/4.0</u>)

A Es ist die relative Expressionsstärke von *CD39* normalisiert und gemittelt gegen die Haushaltsgene *RPL13A*, *B2M* und *HPRT1* für die 12 untersuchten Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinien (HNSCCs), 3 Prostatakarzinom-Zelllinien (DU145, PC-3, LNCap) und die B-Zelllinie NAMALWA im Vergleich zu aus humanem Tonsillengewebe isolierten CD19+ B-Zellen dargestellt. Dabei wurde die Anzahl der mRNA-Transkripte relativ zu der Anzahl der mRNA-Transkripte der CD19+ B-Zellen dargestellt, welche auf den Wert 1 gesetzt wurden. Es ist jeweils der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten aufgetragen sowie die Standardabweichung als Fehlerbalken.

B Oben ist die relative Fluoreszenzintensität der mit PE-Cyanine7 gekoppelten anti-CD39-Antikörpern markierten Zellen (grün), der mit Isotypen-Antikörper markierten Zellen als Kontrolle für unspezifische Antikörperbindungen (blau) und der nicht markierten Zellen (rot) gegen den prozentualen Anteil der untersuchten Zellen aufgetragen. Es sind beispielhaft die Ergebnisse der Kopf-Hals-Karzinomzelllinien UDSCC1, -2 und -3 dargestellt. Unten ist die mittlere relative Fluoreszenzintensität des PE-Cyanine7 gekoppelten anti-CD39-Antikörpers für die untersuchten 12 Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinien (HNSCCs), 3 Prostatakarzinom-Zelllinien (DU145, PC-3, LNCap), die B-Zelllinie NAMALWA und aus humanem Tonsillengewebe isolierte CD19+ B-Zellen dargestellt, wobei der Wert für die CD19+ B-Zellen auf 1 gesetzt wurde und die Werte der übrigen Zelllinien in Relation dazu dargestellt wurden.



Abb. 3 Expressions analyse von *CD73* in HNSCCs mittels RT-qPCR und FACS-Analyse (modifiziert nach Wilkat et al [93] unter Creative Commons Attribution 4.0 International License, <u>https://creativecommons.org/licenses/by/4.0</u>)

A Es ist die relative Expressionsstärke von *CD73* normalisiert und gemittelt gegen die Haushaltsgene *RPL13A*, *B2M* und *HPRT1* für die 12 untersuchten Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinien (HNSCCs), 3 Prostatakarzinom-Zelllinien (DU145, PC-3, LNCap) und die B-Zelllinie NAMALWA im Vergleich zu aus humanem Tonsillengewebe isolierten CD19+ B-Zellen dargestellt. Dabei wurde die Anzahl der mRNA-Transkripte relativ zu der Anzahl der mRNA-Transkripte der CD19+ B-Zellen dargestellt, welche auf den Wert 1 gesetzt wurden. Es ist jeweils der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten aufgetragen sowie die Standardabweichung als Fehlerbalken.

B Oben ist die relative Fluoreszenzintensität der mit eFluor 450 gekoppelten anti-CD73-Antikörpern markierten Zellen (grün), der mit Isotypen-Antikörper markierten Zellen als Kontrolle für unspezifische Antikörperbindungen (blau) und der nicht markierten Zellen (rot) gegen den prozentualen Anteil der untersuchten Zellen aufgetragen. Es sind beispielhaft die Ergebnisse der Kopf-Hals-Karzinomzelllinien UDSCC1, -2 und -3 dargestellt. Unten ist die mittlere relative Fluoreszenzintensität des eFluor 450 gekoppelten anti-CD73-Antikörpers für die untersuchten 12 Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinien (HNSCCs), 3 Prostatakarzinom-Zelllinien (DU145, PC-3, LNCap), die B-Zelllinie NAMALWA und aus humanem Tonsillengewebe isolierte CD19+ B-Zellen dargestellt, wobei der Wert für die CD19+ B-Zellen auf 1 gesetzt wurde und die Werte der übrigen Zelllinien in Relation dazu dargestellt wurden.

Ergebnisse

3.1.2 Adenosinrezeptoren

Um zu analysieren, welche der vier bekannten Adenosinrezeptoren *ADORA1*, 2B, 2A und 3 durch die HNSCC-Zelllinien exprimiert werden, wurde zunächst eine end-point-PCR durchgeführt. Hierbei wurde die gesamte mRNA einer Zelllinie isoliert, mit Hilfe einer reversen Transkriptase in cDNA transkribiert und unter Verwendung spezifischer Primerpaare die untersuchte mRNA-Sequenz durch das Verfahren der endpoint-PCR amplifiziert. Die Amplifikationsprodukte wurden auf einem 1,8%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Midori Green DNA Färbung sichtbar gemacht (siehe Abb. 4). Neben den 4 Adenosinrezeptoren wurde auch das Haushaltsgen *GAPDH* als interne Kontrolle amplifiziert. Als Positivkontrolle dienten aus humanem Tonsillengewebe isolierte CD19+ B-Zellen für *ADORA1*, die T-Zelllinie Jurkat für *ADORA2A*, die drei Prostata-Karzinomzelllinien DU145, PC-3, und LNCap für *ADORA2B* [89] und aus Gefrierschnitten aufbereitetes humanes Glioblastomgewebe für *ADORA3*. Es zeigte sich, dass alle 12 untersuchten HNSCC-Zelllinien ausschließlich *ADORA2B* in detektierbaren Mengen transkribierten. Weiterhin zeigte sich, dass die Burkitt-Lymphom-Zelllinie NAMALWA keinen der 4 Adenosinrezeptoren exprimierte.

Zusätzlich wurde die Expressionsstärke von ADORA2B für die einzelnen Zelllinien quantifiziert. Hierzu wurde unter Verwendung spezifischer Primerpaare die untersuchte mRNA-Sequenz durch das Verfahren der Real Time-PCR amplifiziert und in Relation zu den Haushaltsgenen RPL13A, B2M und HPRT1 jeweils nach der $2^{-\Delta\Delta C}T$ -Methode normalisiert. Da drei Prostatakarzinomzelllinien, darunter DU145, bereits als positiv für ADORA2B identifiziert wurden [89], diente DU145 als Referenzprobe. Die Anzahl der Transkripte der untersuchten Zelllinien in Relation zu den Transkripten der Referenzprobe DU145 ist in Abb. 5 dargestellt. Es bestätigte sich, dass alle der untersuchten 12 HNSCC-Zelllinien Transkripte von ADORA2B über der Detektionsgrenze erstellten. Dabei ergaben sich je nach Haushaltsgen, welches für die Normalisierung benutzt wurde, Unterschiede in der ADORA2B-Expressionsstärke. Insgesamt war die Expressionsrate von ADORA2B jedoch für alle der 12 untersuchten HNSCC-Zelllinien im Vergleich zu DU145 gleich hoch oder höher. Darunter zeigten UDSCC5, UMSCC10A, UMSCC11B und UMSCC17B die höchsten Transkriptionsraten unter den HNSCCs. PC-3 war im Vergleich zu DU145 stark positiv für ADORA2B und zeigte Expressionsraten, die bis um das Achtfache höher lagen. NAMALWA zeigte keinerlei ADORA2B-Expression.



Abb. 4 Transkriptionsanalyse von Adenosinrezeptoren in HNSCCs in der endpoint-PCR (modifiziert nach Wilkat et al [93] unter Creative Commons Attribution 4.0 International License, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0)

Dargestellt sind die in 1,8%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennten und durch Midori Green-Färbung sichtbar gemachten PCR-Amplifikationsprodukte aus 12 untersuchten Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinien, drei Prostata-Zelllinien (DU145, PC-3 und LNCap), der B-Zelllinie NAMALWA, aus humanen Tonsillengewebe isolierten CD19+ B-Zellen (ADORA1 Kontrolle), der T-Zelllinie Jurkat (ADORA2A Kontrolle), einem aufbereitetem Gefrierschnitt von Glioblastomgewebe (ADORA3 Kontrolle) sowie H₂O als Negativkontrolle. Für jede untersuchte Zellprobe wurden standardisierte PCR-Amplifikationen mit spezifischen Primern für die vier Adenosinrezeptoren (ADORA) 1, 2A, 2B und 3 sowie das Haushaltsgen GAPDH durchgeführt, die Größe des Amplifikationsproduktes der untersuchten Gene ist in den Kästen wiedergegeben (bp: Basenpaare). Zusätzlich wurden DNA-Stränge bekannter Basenpaarenlänge als Komigrationsstandard aufgetragen.





Abb. 5 Transkriptionsanalyse von *ADORA2B* in HNSCCs mit Hilfe von RT-qPCR (modifiziert nach Wilkat et al [93] unter Creative Commons Attribution 4.0 International License, <u>https://creativecommons.org/licenses/by/4.0</u>)

Es ist die relative Expressionsstärke von *ADORA2B* normalisiert gegen die Haushaltsgene *RPL13A* (blau), *B2M* (grün) und *HPRT1* (grau) für die 12 untersuchten Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinien (HNSCCs), 3 Prostatakarzinom-Zelllinie (DU145, PC-3, LNCap) und die B-Zelllinie NAMALWA im Vergleich zu der Prostatakarzinom-Zelllinie DU145 dargestellt. Dabei wurde die Anzahl der mRNA-Transkripte relativ zu der Anzahl der mRNA-Transkripte von DU145 dargestellt, welche auf den Wert 1 gesetzt wurden (türkis hinterlegt). Die Werte der y-Achse wurden logarithmisch dargestellt. Es ist jeweils der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten aufgetragen sowie die Standardabweichung als Fehlerbalken.

Weiterhin wurde die Expressionsrate von *ADORA2B* auf Translationsebene bestimmt. Hierzu wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt (siehe Abb. 6). Dabei konnten die Ergebnisse aus der RT-qPCR bestätigt werden. Es zeigte sich, dass alle HNSCCs *ADORA2B* in unterschiedlich starkem Ausmaß translatierten. Dabei korrelierte die Expressionsstärke auf Translations- und auf Transskriptionsebene miteinander. UDSCC5 zeigte hierbei unter allen HNSCCs die größte Expressionsrate, UTSCC50 die niedrigste, während UDSCC1 eine mittlere Expressionsrate zeigte. PC-3 zeigte eine besonders hohe Expressionsrate, die die Expressionsrate von UDSCC5 bis um das Dreifache überstieg. Daher diente PC-3 in den Experimenten des folgenden Kapitels als Positivkontrolle. NAMALWA zeigte auf der Transkriptionsebene wie auch auf der Translationsebene keine detektierbare Expression von *ADORA2B* und diente daher als Negativkontrolle in den folgenden Experimenten.



Abb. 6 Expressions analyse von *ADORA2B* in HNSCCs mittels RT-qPCR und Western-Blot (modifiziert nach Wilkat et al [93] unter Creative Commons Attribution 4.0 International License, <u>https://creativecommons.org/licenses/by/4.0</u>)

A Es ist die relative Expressionsstärke von *ADORA2B* normalisiert und gemittelt gegen die Haushaltsgene *RPL13A*, *B2M* und *HPRT1* für die 12 untersuchten Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinien (HNSCCs), die Prostatakarzinom-Zelllinie PC-3 und die B-Lymphomzelllinie NAMALWA im Vergleich zu der Prostatakarzinom-Zelllinie dargestellt. Dabei wurde die Anzahl der mRNA-Transkripte relativ zu der Anzahl der mRNA-Transkripte der Prostatakarzinom-Zelllinie DU145 (nicht abgebildet) dargestellt, welche auf den Wert 1 gesetzt wurden. Es ist jeweils der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten aufgetragen sowie die Standardabweichung als Fehlerbalken.

B Oben sind die Banden der Western-Blot-Analyse abgebildet: Es wurden Ganzzelllysate der 12 untersuchten Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinien (HNSCCs), der Prostatakarzinom-Zelllinie PC-3 und der B-Lymphomzelllinie NAMALWA aufgetragen und mit Primärantikörpern für ADORA2B (39 kDa) und β -Actin (42 kDa) als loading control markiert.

Unten ist die relative Proteinexpression von ADORA2B für o.g. Zellen dargestellt. Hierbei wurden die Banden des Western-Blots densitometrisch ausgewertet und ADORA2B gegen β -Actin normalisiert.

3.2 Analyse des Einflusses von ADORA-Liganden auf Eigenschaften der Tumorprogression

In den vorangegangenen Experimenten zeigte sich, dass die 12 untersuchten HNSCC-Zelllinien von den bekannten 4 Subtypen der Adenosinrezeptoren nur ADORA2B exprimierten. Im Folgenden wurde untersucht, welchen Einfluss ADORA2B auf die Tumorprogression hat. Hierzu wurde die Aktivität von ADORA2B durch spezifische Liganden moduliert. Hierbei wurden 3 Liganden verwendet:

- Adenosin der physiologische Agonist an den Adenosinrezeptoren
- NECA ein Adenosinrezeptor-Agonist mit einer ähnlichen Struktur wie Adenosin und zusätzlicher 5'-Modifizierung der Ribose, wodurch eine höhere chemische Stabilität erreicht wird
- PSB603 ein inverser Agonist, welcher im gebundenen Zustand den Rezeptor in seiner inaktiven Konformation stabilisiert

Unter Verwendung dieser drei Liganden zur Modulation der ADORA2B-Aktivität wurden unterschiedliche tumorprogressive Eigenschaften der Zelllinien untersucht, hierunter die Proliferation, Migration und Angiogenese. Dazu wurden verschiedene Assays durchgeführt, deren Ergebnisse im Folgenden vorgestellt werden.

3.2.1 Proliferationsassays

Zur Analyse des Einflusses von ADORA2B auf die Proliferation der HNSCC-Zelllinien wurden MTT-Assays unter Modulation der ADORA2B-Aktivität durch Hinzufügen von ADORA2B-Liganden durchgeführt. Es wurden HNSCC-Zelllinien unter normoxischen Bedingungen kultiviert. Durch Hinzugabe von MTT und photometrischer Messung wurde die Zellzahl zu verschiedenen Zeitpunkten über 72 Stunden bestimmt.

Dabei zeigte sich, dass Adenosin in verschiedenen Konzentrationen mit Werten zwischen 0 bis 1 mM keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferationsrate hatte (siehe Abb.7). Lediglich eine maximale Konzentration von 10 mM zeigte eine signifikant reduzierte Proliferationsrate. Dies wurde sowohl für die HNSCC-Zelllinien UDSCC1 und UDSCC5 und für die Prostatakarzinomzelllinie PC-3 beobachtet, welche alle ADORA2B exprimieren, als auch für die ADORA2B-negative B-Zell-Lymphomzelllinie NAMALWA. Somit ist die reduzierte Proliferationsrate bei einer Konzentration von 10 mM ADO eher auf eine toxische, ADORA2B unabhängige Wirkung zurückzuführen.



Abb. 7 Adenosin hat keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferationsrate von HNSCCs (modifiziert nach Wilkat et al [93] unter Creative Commons Attribution 4.0 International License, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0)

Aufgetragen ist die Zellzahl der untersuchten Zelllinie gegen die Zeit in Stunden. Es wurden die zwei Kopf-Hals-Karzinomzelllinien (HNSCC) UDSCC1 und -5, die B-Zell-Lymphomzelllinie NAMALWA sowie die Prostatakarzinomzelllinie PC-3 untersucht. Die Zellen wurden unter normoxischen Bedingungen mit Zellkulturmedium unter Zusatz von 1%igem FBS kultiviert. Zusätzlich wurde H₂O als Kontrolle (schwarz) oder in H₂O gelöstes ADO (Adenosin) aufsteigender Konzentrationen (hell- bis dunkelblau) hinzugegeben. Die Zellzahl wurde durch einen MTT-Assay photometrisch zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h, 48 h und 72 h bestimmt. Es ist jeweils der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten aufgetragen sowie die Standardabweichung als Fehlerbalken. **: signifikant im Vergleich zur Kontrolle mit p<0,01

Unter Verwendung von PSB603 in dem gleichen Versuchsaufbau zeigte sich die Proliferationsrate aller HNSCC-Zelllinien reduziert (siehe Abb. 8). Die Proliferationsratenreduktion war dabei konzentrationsabhängig und zeigte sich bei stark ADORA2B-positiven Zelllinien wie UDSCC5 und der Positivkontrolle PC-3 bereits bei PSB603-Konzentrationen von 1 μ M signifikant mit einem p-Wert von weniger als 0,01. Bei weniger stark ADORA2B-positiven Zelllinien wie UDSCC2 und -3 war die Reduktion der Proliferationsrate nach 24 Stunden erst bei höheren PSB603-Konzentration von 5 μ M signifikant, wurde jedoch nach 72 Stunden auch bei niedrigeren PSB603-Konzentrationen von 1 bis 2,5 μ M signifikant mit einem p-Wert von weniger als 0,01.





Aufgetragen ist die Zellzahl der untersuchten Zelllinie gegen die Zeit in Stunden. Es wurden die sechs Kopf-Hals-Karzinomzelllinien (HNSCC) UDSCC1, -2, -3, -5, -6 und UMSCC10A, die B-Zell-Lymphomzelllinie NAMALWA sowie die Prostatakarzinomzelllinie PC-3 untersucht. Die Zellen wurden unter normoxischen Bedingungen mit Zellkulturmedium unter Zusatz von 1%igem FBS kultiviert. Zusätzlich wurde DMSO als Kontrolle (schwarz) oder in DMSO gelöstes PSB (PSB603) aufsteigender Konzentrationen (hell- bis dunkelgrün) hinzugegeben. Die Zellzahl wurde durch einen MTT-Assay photometrisch zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h, 48 h und 72 h bestimmt. Es ist jeweils der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten aufgetragen sowie die Standardabweichung als Fehlerbalken. *: signifikant im Vergleich zur Kontrolle mit p<0,05; **: signifikant im Vergleich zur Kontrolle mit p<0,01 NAMALWA zeigte als ADORA2B-negative Kontrolle keine reduzierte Proliferationsrate unter PSB603-Konzentrationen von bis zu 5 μ M. Lediglich bei hohen Konzentrationen von 10 μ M war die Proliferationsrate von NAMALWA signifikant reduziert. Dies deutet auf eine PSB603 induzierte und durch ADORA2B vermittelte Reduktion der Proliferationsrate von HNSCCs bei niedrigen Konzentrationen hin, während eine hohe PSB603-Konzentration vermutlich zusätzlich über eine toxische, nicht ADORA2B-vermittelte Wirkung zu einer reduzierten Proliferationsrate führt.

3.2.2 Scratch-Assays

Um das Proliferations- und Migrationsverhalten der HNSCC-Zelllinien unter ADORA2B-Modulation zu untersuchen, wurden sogenannte Scratch- bzw. Wundheilungsassays durchgeführt. Hierbei wurde durch Kratzen mit der Spitze eines Pipettenaufsatzes eine Wunde in einem konfluenten Monolayer appliziert. Die Zellen wurden daraufhin unter normoxischen Bedingungen und unter Zugabe von DMSO als Kontrolle bzw. NECA, NECA+PSB603 oder PSB603 kultiviert. Alle 12 Stunden über insgesamt 48 Stunden wurde der Scratch bzw. die Wunde unter dem Lichtmikroskop betrachtet und die abgeschlossene Wundheilung unter den verschiedenen Bedingungen miteinander verglichen (siehe Abb. 9). Es wurden verschiedene HNSCC-Zelllinien untersucht sowie PC-3 als ADORA2B-positive Kontrollzelllinie. NAMALWA konnte in diesem Versuch nicht als Negativkontrolle dienen, da es sich hierbei um eine in Suspension wachsende Zelllinie handelt, der Versuchsaufbau aber ein adhärentes Wachstum voraussetzt.

Es zeigte sich, dass die Wundheilung unter NECA schneller voranschritt im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Je nach betrachteter Zelllinie war der Unterschied zum Teil signifikant mit einem p-Wert von weniger als 0,05 bis 0,01. PSB603 führte dagegen zu einer signifikant reduzierten Wundheilungsrate bei allen untersuchten HNSCC-Zelllinien sowie der ADORA2B-positiven Kontrolle PC-3. Bei 48 Stunden zeigte sich bei allen Zellen eine signifikant reduzierte Wundheilungsrate mit einem p-Wert von weniger als 0,01. Gerade bei den stark ADORA2B-positiven Zelllinien UDSCC5 und PC-3, sowie bei der stark proliferierenden Zelllinie UDSCC1, welche im Vergleich zu anderen Zelllinien eine grundsätzlich erhöhte Proliferationsrate aufweist, zeigte sich ein starker inhibierender Effekt von PSB603 auf die Wundheilung, welcher bereits nach 12 Stunden signifikant war.



A. Wundheilungsprozess von UDSCC5 über die Zeit zu verschiedenen Konditionen

Zeit

Abb. 9 PSB603 verlangsamt die Wundheilung von HNSCCs in Scratch-Assays (modifiziert nach Wilkat et al [93] unter Creative Commons Attribution 4.0 International License, <u>https://creativecommons.org/licenses/by/4.0</u>)

Es wurden die fünf Kopf-Hals-Karzinomzelllinien (HNSCC) UDSCC1, -2, -3, -5, und -6 sowie die Prostatakarzinomzelllinie PC-3 untersucht. Die Zellen wurden unter normoxischen Bedingungen mit Zellkulturmedium unter Zusatz von 1% igem FBS kultiviert. Zusätzlich wurde DMSO als Kontrolle (schwarz) oder in DMSO gelöstes NECA (blau), NECA+PSB (grau) oder PSB (grün) jeweils mit einer Konzentration von 1 µM hinzugegeben. Der Durchmesser der Wunde wurde unter einem Lichtmikroskop zu den Zeitpunkten 0 h, 12 h, 24 h und 48 h bestimmt (h: Stunden).

A Es sind lichtmikroskopische Aufnahmen einer Wunde in einem Monolayer von UDSCC5 dargestellt zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h und 48 h nach Setzen des Kratzers und unter den verschiedenen Konditionen.

B Es ist die abgeschlossene Wundheilung in % gegen die Zeit in h aufgetragen. Es ist jeweils der Mittelwert aus bis zu drei unabhängigen Experimenten aufgetragen sowie die Standardabweichung als Fehlerbalken.
*: signifikant im Vergleich zur Kontrolle mit p<0,05; **: signifikant im Vergleich zur Kontrolle mit p<0,01

Bei Koinkubation mit NECA und PSB603, wobei das PSB603 20 min nach NECA hinzugefügt wurde, zeigte sich ebenfalls eine signifikant reduzierte Wundheilungsrate. Diese war ebenso bei den stark ADORA2B-positiven Zelllinien UDSCC5 und PC-3 sowie der stark proliferierenden Zelllinie UDSCC1 bereits nach 12 Stunden signifikant mit einem p-Wert von weniger als 0,01. Somit konnte der Zusatz von NECA den stark inhibierenden Effekt von PSB603 nicht aufheben.

3.2.3 Transwell-Assays

Zur Analyse des Einflusses von ADORA2B auf die Migration der HNSCC-Zelllinien wurden Transmigrations-Assays durchgeführt unter ADORA2B-Modulation durch Liganden. Hierbei diente ein Zellkultursystem mit einem speziellen Versuchsaufbau, bei welchem zwei Kammern durch eine Polycarbonat-Membran mit 8 µm großen Poren voneinander getrennt wurden, als Barriere, welche von den Zellen nur mittels Migration überwunden werden konnte. Dabei wurden die untersuchten Zellen in die obere Kammer gegeben, während ein in die untere Kammer gegebenes Zellkulturmedium mit 10%igem FBS als Chemoattraktans für ein Signal zur zielgerichteten Migration der Zellen diente. Nach 16 Stunden im Brutschrank wurden die Zellen fixiert und alle in der oberen Kammer verbliebenen Zellen mit einem Wattestäbchen entfernt. Die Zellkerne der in die untere migrierten Zellen wurden mittels **DAPI-Färbung** dem Kammer unter Fluoreszenzmikroskop dargestellt und statistisch ausgewertet (siehe Abb. 10).

Unter NECA zeigte sich für UDSCC5 und für PC-3 eine signifikant erhöhte Migrationsrate im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, wobei sich für UDSCC5 ein p-Wert von weniger als 0,05, für PC-3 ein p-Wert von weniger als 0,01 ergab. Für UDSCC1 war keine erhöhte Migrationsrate unter NECA zu beobachten. PSB603 führte dagegen bei allen drei untersuchten Zelllinien zu einer signifikanten Reduktion der Migrationsrate. Die Reduktion im Falle von UDSCC1 betrug mehr als 20%, für UDSCC5 und PC-3 sogar über 60%. Es fiel daher ein Zusammenhang zwischen der Expressionsstärke von ADORA2B und der Höhe der Reduktion der Migrationsrate unter PSB603 auf. Wurde zu PSB603 zusätzlich NECA hinzugefügt, so war die Migrationsrate weiterhin signifikant reduziert im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Allerdings wurde durch Zugabe von NECA die Reduktion der Migrationsrate durch PSB603 signifikant vermindert, sodass NECA einen Teil des inhibierenden Effektes von PSB603 aufheben konnte.



A. Migrierte Zellen in der DAPI-Färbung

B. Prozent migrierter Zellen verglichen zur DMSO-Kontrolle



Abb. 10 PSB603 verringert die Migrationsrate von HNSCCs in Transwell-Assays (modifiziert nach Wilkat et al [93] unter Creative Commons Attribution 4.0 International License, <u>https://creativecommons.org/licenses/by/4.0</u>)

Es wurden die zwei Kopf-Hals-Karzinomzelllinien (HNSCC) UDSCC1 und -5 sowie die Prostatakarzinomzelllinie PC-3 untersucht. Es wurde ein Zweikammersystem verwendet, welches die Transmigration von Zellen durch eine Polycarbonat-Membran mit 8 μm großen Poren erlaubt. In die obere Kammer wurden die Zellen mit FBS-freiem, 0,1%igem BSA-Medium gegeben, die untere Kammer wurde mit 10%igem FBS versetztem Zellkulturmedium gefüllt. Zusätzlich wurde DMSO als Kontrolle (schwarz) oder in DMSO gelöstes NECA (blau), NECA+PSB (grau) oder PSB (grün) jeweils mit einer Konzentration von 1 μM hinzugegeben. Die Platten wurden für 16 h unter normoxischen Bedingungen kultiviert und anschließend mit Hilfe einer DAPI-Färbung und einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

A Es sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der transmigrierten UDSCC5-Zellen in der DAPI-Färbung unter den verschiedenen Konditionen dargestellt.

B Es sind die migrierten Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle in % für die untersuchten Zelllinien aufgetragen. Es ist jeweils der Mittelwert aus bis zu drei unabhängigen Experimenten aufgetragen sowie die Standardabweichung als Fehlerbalken. *: signifikant im Vergleich zur Kontrolle mit p<0,05; ** (schwarz): signifikant im Vergleich zur Kontrolle mit p<0,01; ** (rot): signifikant im Vergleich zu NECA+PSB mit p<0,01

Ergebnisse

3.2.4 VEGF-Sekretion

Zur Untersuchung, ob ADORA2B auch an den Vorgängen der Angiogenese Einfluss hat, wurde die spontane VEGF-Sekretionsrate unter ADORA2B-Modulation untersucht. Hierzu wurden die Zellen über 96 Stunden unter Zusatz von DMSO als Kontrolle bzw. in DMSO gelöstes PSB603 jeweils mit einer Konzentration von 1 μ M im Brutschrank unter normoxischen Bedingungen kultiviert. Alle 24 Stunden wurde ein Überstand gesammelt und die Konzentration von VEGF mittels ELISA untersucht (siehe Abb. 11).

Hierbei zeigte sich, dass alle vier untersuchten Zelllinien VEGF spontan sezernierten und dass dessen Konzentration über die Zeit anstieg. Für UDSCC5, welche unter den Zelllinien die mit Abstand höchste spontane VEGF-Sekretionsrate zeigte, wurden ab 24 Stunden erste detektierbare Konzentrationen von VEGF beobachtet. Die anderen Zelllinien zeigten erste detektierbare VEGF-Konzentrationen ab 48 Stunden der Kultivierung.





Es sind die VEGF-Konzentrationen in pg/ml für die DMSO-Kontrolle und die PSB603-Probe aufgetragen für die untersuchten Zelllinien zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h (VEGF: vascular endothelial growth factor; h: Stunden). Es wurden die zwei Kopf-Hals-Karzinomzelllinien (HNSCC) UDSCC1 und -5, die Prostatakarzinomzelllinie PC-3 sowie die B-Zelllymphomzelllinie NAMALWA untersucht. Die Zellen wurden unter normoxischen Bedingungen mit Zellkulturmedium unter Zusatz von 1%igem FBS kultiviert und je 1 μ M DMSO als Kontrolle oder in DSMO gelöstes PSB603. Zu den gegebenen Zeitpunkten wurden Überstände abgenommen und mittels ELISA die Konzentration von VEGF bestimmt. Es ist jeweils der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten aufgetragen sowie die Standardabweichung als Fehlerbalken. *: signifikant im Vergleich zur Kontrolle des entsprechenden Zeitpunktes mit p<0,05; **:

Unter Zugabe von PSB603 zeigte sich, dass die VEGF-Sekretion ab 48 Stunden signifikant reduziert war für die ADORA2B-positiven Zelllinien UDSCC1, -5 und PC-3. Dabei ergab sich im Vergleich der Zelllinien ein Zusammenhang zwischen der ADORA2B-Expressionsstärke und der Signifikanz der Reduktion der VEGF-Sekretion unter PSB603. Für PC-3, welches die höchste ADORA2B-Expressionsstärke zeigte, konnte unter PSB603 eine signifikante Reduktion ab 48 Stunden mit einem p-Wert von weniger als 0,01 beobachtet werden, während für UDSCC5 der p-Wert der Reduktion unter PSB603 ab 48 Stunden weniger als 0,05 betrug. UDSCC1 zeigte eine signifikante Reduktion unter PSB603 mit einem p-Wert weniger als 0,05 bei 48 Stunden als auch bei 72 Stunden.

NAMALWA, die ADORA2B-negative Kontrollzelllinie, zeigte keinen signifikanten Unterschied der VEGF-Sekretionsrate unter PSB603 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Dies legt nahe, dass die Reduktion der VEGF-Sekretionsrate von UDSCC1, -5 und PC-3 unter PSB603 ADORA2B-vermittelt stattfand.

3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit konnte auf RNA- und auf Proteinebene gezeigt werden, dass die 12 untersuchten HNSCC-Zelllinien kein CD39, jedoch CD73 auf ihrer Oberfläche exprimieren (siehe Abb. 12). Ob sie in der Lage zur Phosphohydrolyse von ATP zu AMP bzw. Adenosin sind, wurde nicht untersucht.

Weiterhin zeigte die Expressionsanalyse der Adenosinrezeptoren, dass unter den 4 bekannten Subtypen ADORA1, -2A, -2B und -3 lediglich der Subtyp ADORA2B von allen 12 HNSCC-Zelllinien in detektierbarem Maße produziert wird. Allerdings zeigten die einzelnen Zelllinien eine unterschiedliche starke ADORA2B-Expression, die bis um das Vierfache voneinander abwich.

Die Analyse des Einflusses von Adenosinrezeptorliganden auf die Tumorprogression ergab, dass der natürliche Agonist Adenosin zu keiner signifikanten Änderung der Proliferationsrate führte. NECA, ein Adenosinrezeptoragonist mit einer chemisch stabileren Struktur als Adenosin, konnte die Proliferations- und Migrationsrate der HNSCC-Zelllinien erhöhen, wobei das Ausmaß der Erhöhung mit der Expressionsstärke von ADORA2B korrelierte. PSB603 als ADORA2B-spezifischer, inverser Agonist führte zu einer signifikanten Reduktion der Proliferations-, Migrations- und VEGF-Sekretionsrate. Auch unter zusätzlicher Gabe von NECA zu PSB603 war die Proliferations- und Migrationsrate weiterhin signifikant reduziert. Die Tatsache, dass ein inverser Agonist einen starken inhibierenden Effekt auf die Tumorprogression zeigt, während Agonisten keinen bis nur einen geringen steigernden Effekt haben, deutet auf die Möglichkeit hin, dass ADORA2B als konstitutiv aktivierter Rezeptor in den untersuchten HNSCC-Zelllinien vorliegt.



Abb. 12 Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse

Die untersuchten Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinien (HNSCC) exprimieren kein CD39 (violettes Oberflächenmolekül) auf ihrer Oberfläche, jedoch CD73 (pinkfarbenes Oberflächenmolekül). CD39 dient als Oberflächenenzym zur Degradierung von ATP (Adenosintriphosphat) zu AMP (Adenosinmonophosphat), während CD73 zur Degradierung von AMP zu ADO (Adenosin) dient. Ob CD73 eine enzymatische Aktivität zur Phosphohydrolyse von AMP zu ADO zeigt, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

Von den vier Adenosinrezeptor-Subtypen ADORA1 (grüner Rezeptor), ADORA2A (gelber Rezeptor), ADORA2B (orangefarbener Rezeptor) und ADORA3 (brauner Rezeptor) exprimieren HNSCC-Zelllinien lediglich den Subtyp ADORA2B.

Der Zusatz von ADO, dem natürlichen Agonisten an ADORA2B, hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferationsrate der HNSCC-Zelllinien. NECA, ein chemisch stabilerer Agonist an ADORA2B, zeigte einen geringen positiven Effekt auf die Proliferations- und Migrationsrate der HNSCC-Zelllinien. PSB603 als inverser Agonist an ADORA2B zeigte einen starken inhibierenden Einfluss auf die Proliferations-, Migrations- und VEGF-Sekretionsrate mit einem hohen Signifikanzniveau. Dies deutet darauf hin, dass ADORA2B als konstitutiv aktivierter Rezeptor (markiert mit gelbem *) in HNSCC-Zelllinien vorliegen könnte.

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der Analyse des adenosinergen Systems in Zelllinien, welche sich von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches ableiteten, und dessen Einfluss auf die Tumorprogression dieser Zelllinien. Dabei wurde zunächst das Expressionsprofil der key players in diesem System, namentlich die beiden Ektonukleotidasen CD39 und CD73 sowie die vier Adenosinrezeptorsubtypen ADORA1, -2A, -2B und -3, bestimmt. Dabei zeigte sich, dass CD39 weder auf RNA- noch auf Protein-Ebene von den 12 untersuchten HNSCC-Zelllinien exprimiert wird, während CD73 überexprimiert und auf der Zelloberfläche zu finden ist. Weiterhin wurde gezeigt, dass von den vier Adenosinrezeptoren ADORA1, -2A und -3 unterhalb der Nachweisgrenze lagen. Lediglich ADORA2B wurde nachgewiesen, wobei sich die Expressionsstärken innerhalb der untersuchten HNSCC-Zelllinien um den Faktor 4 unterschieden. In weiteren Experimenten wurde gezeigt, dass Liganden an ADORA2B zu unterschiedlichen Effekten auf die Tumorprogression führten. So zeigte Adenosin keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation der HNSCC-Zelllinien, während NECA die Proliferations- und Migrationsrate steigern konnte. PSB603 als inverser Agonist führte zu einer signifikanten Reduktion der Proliferations-, Migrations- und VEGF-Sekretionsrate. Dies deutete auf eine möglicherweise konstitutiv erhöhte Aktivität von ADORA2B in HNSCC-Zelllinien hin.

Die erhobenen Daten sollen im Folgenden näher diskutiert werden.

4.1 Ektonukleotidasen CD39 und CD73

CD39 war in den 12 untersuchten HNSCC-Zelllinien weder auf RNA- noch auf Proteinebene nachweisbar. CD73 wurde jedoch von allen HNSCC-Zelllinien exprimiert. Dabei schwankte die Expressionsstärke abhängig von dem Haushaltsgen, gegen welches normalisiert wurde. Im Falle von *HPRT-1* beispielsweise ergaben sich geringere Expressionsraten als bei der Normalisierung gegen *RPL13A* oder *B2M*. Dies könnte an den unterschiedlichen Expressionsraten der Haushaltsgene als solche liegen, die gewissen

Schwankungen in der Expression unterliegen. Weiterhin können die Expressionsraten von Haushaltsgenen im Tumorstoffwechsel verändert sein und müssen nicht einer konstant hohen Expression unterliegen [74]. Unabhängig davon war die Expressionsrate von CD73 aller 12 untersuchten HNSCC-Zelllinien deutlich erhöht im Vergleich zu aus gesundem humanem Tonsillengewebe isolierten CD19+ B-Zellen, welche bereits als doppelt positiv für CD39 und CD73 identifiziert wurden [71] und somit als Positiv-Kontrolle dienten.

Somit zeigten die HNSCC-Zelllinien eine Überexpression von CD73, was durch Ren et al. ebenfalls gezeigt wurde und mit einer erhöhten Metastasierungsrate und einem schlechteren klinischen Outcome assoziiert werden konnte [68]. Im Gegensatz dazu zeigte CD39 eine Expression unterhalb der Detektionsgrenze. Da es unter hypoxischen Bedingungen zu einer verstärkten CD39-Expression kommt [32], könnte die beobachtete CD39-Defizienz auf die normoxischen Zellkulturbedingungen, unter denen die Experimente durchgeführt wurden, zurückgeführt werden. Trotzdem scheint die eingangs erwähnte, übliche Achse der Adenosin-Generierung durch die konsekutive Degradierung von im Tumormikromilieu vorliegendem ATP über ADP zu AMP durch CD39 und weiter zu Adenosin durch CD73 in den untersuchten HNSCC-Zelllinien eingeschränkt zur Verfügung zu stehen. Daher stellt sich die Frage, ob die eingeschränkte Nutzbarkeit dieser Achse auf Grund des vorliegenden CD39-Mangels zu einer Aufhebung der tumorbegünstigenden Wirkung von CD73 bei HNSCC-Zelllinien führt. Da die tumorbegünstigende Wirkung von CD73 von der enzymatischen Aktivität von CD73 und somit von der schlussendlich entstehenden erhöhten extrazellulären Konzentrationen von Adenosin abhängt [77], ergibt sich die Konsequenz, dass ein ausreichendes Angebot an AMP vorliegen muss, damit CD73 Adenosin generieren und so tumorfördernd wirken kann. Es ist durchaus denkbar, dass trotz CD39-Defizienz auch bei HNSCC-Zelllinien ein ausreichendes Angebot an AMP generiert werden kann. Denn neben der üblichen CD39/CD73-Achse ist ein weiterer adenosinerger Weg beschrieben, welcher die Bereitstellung von AMP ermöglicht und in der schlussendlichen Degradierung zu Adenosin durch CD73 als gemeinsame Endstrecke mündet. Hierbei handelt es sich um den CD38/CD203a/CD73-Pfad [34], welcher es ermöglicht, NAD zu AMP zu degradieren [54]. Ob HNSCC-Zelllinien hierzu in der Lage sind ist unklar. Alternativ könnte auf anderen Zellen vorhandenes CD39 über einen sogenannten diskontinuierlichen Pfad weiterhin die CD39/CD73-Achse im Tumormikromilieu bedienen. So ist beispielsweise bekannt, dass periphere humane regulatorische T-Zellen CD39 exprimieren und das extrazelluläre Mikromilieu in HNSCCs mitgestalten [72]. Überdies ist, wie einleitend

beschrieben, die Degradation von AMP zu Adenosin durch CD73 (siehe unter 1.2) der die Umsetzungsrate limitierende Schritt [15] und daher scheint es aus tumorbiologischer Perspektive zielführend für das Tumorgewebe zu sein, diese Limitierung durch Überexpression von CD73 aufzuheben um die Adenosin-Generierung zu fördern.

Andererseits ist beschrieben, dass CD73 auch unabhängig von seiner enzymatischen Aktivität tumorfördernd insbesondere im Hinblick auf Invasion und Metastasierung wirkt. So wurde gezeigt, dass unabhängig vom Adenosinpfad CD73 über Adhäsionen und Interaktionen mit der Extrazellulärmatrix [81, 100] und über Aktivierung der EGFR-Signalkaskade [27, 101] tumorfördernd auf humane Mamma- und Cervixkarzinome wirkt. Sogar einen Einfluss auf die HER-Signalkaskade wurde bei Kolonkarzinomen beschrieben [9].

In jedem Fall scheint CD73 eine zentrale Rolle in der Krebsentwicklung zu spielen [26, 98] und gilt aktuell als vielversprechendes, strategisches Ziel bei der Entwicklung neuer Therapien für Krebserkrankungen [3, 4, 76, 99]. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellte Überexpression von CD73 in HNSCC-Zelllinien deutet daraufhin, dass dies auch für Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches zutreffen könnte.

4.2 Adenosinrezeptoren ADORA1, -2A, -2B und -3

Es zeigte sich, dass von den bekannten vier Adenosinrezeptor-Subtypen nur ADORA2B von den 12 untersuchten HNSCC-Zelllinien exprimiert wird.

Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Ren et al. [68]. In der genannten Studie konnte neben ADORA2B auch eine Expression von ADORA2A und ADORA3 für HNSCC-Zelllinien nachgewiesen werden. Weiterhin wurde festgestellt, dass CD73 die Invasion und Metastasierung von HNSCC-Zelllinien durch Aktivierung von ADORA3 fördert, während ADORA2A und ADORA2B keinen Einfluss auf die genannten Prozesse hatten. Die Diskrepanz zwischen den hier dargestellten Ergebnissen und der Studie von Ren et al. könnte auf die unterschiedlichen Zelllinien, die während der Experimente verwendet wurden, zurückzuführen sein. Die von Ren et al. vorwiegend verwendete Zelllinie CAL-27 leitet sich von einem Plattenepithelkarzinom der Zunge eines 56 Jahre alten, kaukasischen Patienten im fortgeschrittenen Tumorstadium ab [68]. UDSCC6 und UTSCC24A leiten sich ebenfalls von einem Plattenepithelkarzinom der Zunge im fortgeschrittenen Stadium ab (siehe Tab. 2) und zeigten, wie alle der hier untersuchten

Diskussion

HNSCC-Zelllinien, eine Expression nur von ADORA2B. Daher ist in Betracht zu ziehen, dass es trotz gleicher Tumorentität - aktuell klinisch klassifiziert durch anatomische Lokalisation und Tumorstadium - trotzdem zu unterschiedlichen Expressionsmustern kommen kann auf Grund der durch die Karzinogenese bedingte Diversität innerhalb der heterogenen Gruppe der HNSCCs [31, 36, 80].

Trotz alledem zeigte sich in der vorliegenden Arbeit eine Homogenität innerhalb der 12 untersuchten Zelllinien bezüglich der Überexpression von ADORA2B. Ähnlich wie bei CD73 gab es auch für ADORA2B in der RT-qPCR unterschiedlich starke Expressionsraten unter den 12 HNSCC-Zelllinien, welche auch innerhalb einer untersuchten Zelllinie je nach untersuchtem Haushaltsgen, gegen das normalisiert wurde, schwankte. Allerdings waren die ADORA2B-Expressionsraten von allen untersuchten HNSCC-Zelllinien deutlich erhöht im Vergleich zu DU145, eine Prostata-Karzinomzelllinie, für die bereits eine ADORA2B-Überexpression gezeigt werden konnte [89]. Im Gegensatz zu der oben genannten Studie von Ren et al. [68] berichten Kasama et al. über ähnliche Ergebnisse [37]. Kasama et al. untersuchten OSCCs (engl. oral squamous cell carcinoma) und konnten zeigen, dass ADORA2B sowohl in Zelllinien, welche sich von OSCCs ableiteten, als auch in primären OSCCs eine signifikant erhöhte Expression im Vergleich zu oralen Keratinozyten bzw. vergleichbarem gesundem oralen Gewebe zeigte. Weitere Experimente dieser Studie zeigten, dass die Expressionsrate von ADORA2B in OSCC-Zelllinien unter Hypoxie sogar zusätzlich erhöht war und identifizierten HIF-1 (engl. hypoxia inducible factor 1) als ein downstream-Ziel, über welches ADORA2B als möglicher Schlüsselregulator die Progression von OSCCs förderte.

In der Literatur findet sich wie einleitend beschrieben (siehe unter 1.2) eine Reihe von weiteren Veröffentlichungen zu verschiedenen soliden Tumoren außerhalb des Kopf-Hals-Bereiches, die ADORA2B eine Tumor-fördernde Rolle über verschiedene Signalwege zuschreiben. Unter diesen finden sich Harnblasenurothelkarzinome [8, 103], Mammakarzinome [8, 12, 43, 62], Colonkarzinome [55], Prostatakarzinome [89] sowie Melanome [35, 62]. Die hier beschriebene erhöhte Expressionsrate von ADORA2B deutet darauf hin, dass ADORA2B bei HNSCCs ebenfalls eine wichtige Rolle spielen könnte. Welche Funktion ADORA2B dabei ausübt und welche Signalwege angesprochen werden, ist jedoch noch nicht verstanden. Daher konzentrierte sich die vorliegende Arbeit im Weiteren auf die onkogene Funktion von ADORA2B in HNSCCs.
4.3 Einfluss von ADORA2B-Liganden auf tumorprogressive Eigenschaften und konstitutive Aktivität von ADORA2B

Zur weiteren Analyse der Rolle von ADORA2B in der Tumorprogression der untersuchten HNSCC-Zelllinien wurden Zellexperimente unter ADORA2B-Modulation durch Hinzufügen von Molekülen, die als Liganden an ADORA2B agieren, durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass der endogene Ligand Adenosin, der als unspezifischer Agonist mit der im Vergleich zu den anderen Adenosinrezeptoren niedrigsten Affinität an ADORA2B agiert [22], keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferationsrate der HNSCC-Zelllinien hatte. Unter NECA-Einfluss, ein ADORA-Agonist mit einer im Vergleich zu Adenosin erhöhten Affinität an allen Adenosinrezeptoren und einer erhöhten chemischen Stabilität, zeigte sich eine erhöhte Proliferations- und Migrationsrate. Wurde PSB603, ein spezifischer inverser Agonist an ADORA2B, hinzugefügt, so zeigte sich eine signifikante Reduktion der Proliferations-, Migrations- und VEGF-Sekretionsrate.

Diese Beobachtung lässt sich durch das Konzept des inversen Agonismus und der konstitutiven Aktivität von Rezeptoren erklären. Gemäß dem ,Two-state model of receptor activation' nach Leff [47] liegt ein Rezeptor in zwei möglichen Konformationen vor: in der einen ist er aktiv und in der Lage, durch beispielsweise G-Proteinbindungen auf der intrazellulären Seite Signalkaskaden zu aktivieren, während er in der anderen Konformation inaktiv ist. Liganden sind in der Lage, an den Rezeptor zu binden und diesen in seiner aktiven oder inaktiven Konformation zu stabilisieren. Während ein reiner Agonist den Rezeptor in seiner aktiven Konformation stabilisiert, stabilisiert ein inverser Agonist den Rezeptor in seiner inaktiven Konformation. Der neutrale Antagonist bindet an den Rezeptor ohne dabei seine Konformation zu ändern. Durch die Bindung blockiert er lediglich die Ligandenbindungsstelle für einen möglichen endogenen Agonisten. Dementsprechend entfalten Liganden nur einen Effekt, wenn sie die Konformation des Rezeptors ändern. Liegt dieser bereits konstitutiv in seiner aktiven Konformation vor, so wird ein reiner Agonist keinen wesentlichen Effekt zeigen. Ein inverser Agonist wird allerdings die durch die konstitutive Aktivität hervorgerufene erhöhte baseline-Aktivität des Rezeptors reduzieren und dadurch einen entsprechenden inhibierenden Effekt auf die Signaltransduktion hervorrufen. Dieses Modell kann die beobachteten Effekte von Adenosin/NECA als Agonisten und PSB603 als inversen Agonisten an ADORA2B in HNSCC-Zelllinien erklären. Zur weiteren Analyse muss man hierbei einen Blick auf die

Signalkaskaden werfen, welche ADORA2B anstößt. ADORA2B gilt dabei als pleiotroper G-Protein-gekoppelter Rezeptor [22, 23, 50, 51], der sowohl an die Gs-Untereinheit als auch an die G_q-Untereinheit binden kann. Die G_s-Untereinheit generiert über Aktivierung der Adenylatcyclase cAMP, während Gq die Phospholipase C aktiviert und so zur Akkumulation von IP3 führt. Weiterführend von diesen beiden G-Protein-vermittelten Wegen werden eine Reihe von Signalwegen angesprochen, die zum Teil ganz unterschiedliche Effekte nach sich ziehen können. Diese Effekte hängen stark vom beobachteten Zelltyp, dessen Ausstattung und vornehmlich aktivierter Signalkaskade ab. So wurde beispielsweise gezeigt, dass cAMP über verschiedene Signalkaskaden einen Einfluss auf ERK1/2, einen wichtigen Regulator der Zellproliferation, nimmt [13, 79]. Dabei führten erhöhte cAMP-Level beispielsweise in Fibroblasten zu einer Inhibierung von ERK [94], während sie in Osteoblasten zu einer Aktivierung von ERK führten [25]. In weiterführenden Studien untersuchte unsere Arbeitsgruppe [93] die cAMP-Konzentration in HNSCC-Zelllinien und konnte zeigen, dass eine erhöhte baseline-Konzentration von cAMP vorlag, welche unter PSB603 signifikant reduziert wurde. Experimente zur Untersuchung bezüglich weiterer downstream-Ziele von cAMP, wie beispielsweise eine Aktivierung einer Proteinkinase A und möglicher konsekutiver Phosphorylierung von ERK1/2 sowie die Untersuchung des durch die Gq-Untereinheit angestoßenen Pfades, stehen dabei noch aus.

Die beobachtete erhöhte baseline-Konzentration von cAMP und die Reduktion dieser durch den inversen ADORA2B-Agonisten PSB603 [93] unterstreicht die oben beschriebene Überlegung einer möglicherweise vorliegenden konstitutiven Aktivität von ADORA2B in HNSCC-Zelllinien. Die Arbeitsgruppe Vecchio et al. [86] konnte ein ähnliches Konzept einer ligandenunabhängigen, konstitutiven Aktivität von ADORA2B und einer damit verbundenen Förderung der Zellproliferation bei Prostatakarzinomen beobachten. In dieser Studie wurde gezeigt, dass in den untersuchten Prostatakarzinom-Zelllinien eine erhöhte baseline-Konzentration von cAMP vorlag, welche unter Zugabe von endogener Adenosin-degradierender Adenosindesaminase keine Änderung erfuhr. Weiterhin zeigte die cAMP-baseline-Konzentration unter Zugabe von PSB603 eine signifikante Reduktion [86]. Dies zeigt, dass die erhöhte baseline-Konzentration von cAMP nicht durch eine erhöhte Konzentration von extrazellulärem endogenem Adenosin hervorgerufen wird, sondern wahrscheinlich einer konstitutiven, ligandenunabhängigen Aktivität von ADORA2B zugeschrieben werden muss, welche durch den inversen Agonismus von PSB603 inhibiert werden kann. In weiteren Experimenten untersuchten Vecchio et al. den von ADORA2B über die G_q-Untereinheit vermittelten alternativen Pfad über Phospholipase C und IP₃-Akkumulation, wobei sich hier kein Hinweis auf eine konstitutiv erhöhte Aktivität dieses Pfades zeigte [86]. Vecchio et al. diskutieren, dass sich die konstitutiv erhöhte Aktivität eines G-Protein gekoppelten Rezeptors über nur einen vornehmlich genutzten Pfad manifestieren kann [73, 86], wie es beispielsweise für die gain-of-function Mutation des LH-Rezeptors bei der Pubertas praecox [52] und bei der den Hyperthyreoidismus verursachenden Mutation des TSH-Rezeptors [41] beobachtet wurde. G-Protein gekoppelte Rezeptoren wie die Adenosinrezeptoren zeigen aber auch in Abwesenheit einer Mutation bestimmte Stufen erhöhter Aktivität [48, 66], z.B. durch spontane Isomerisierung oder Oligomerisierung bei Überexpression [23]. Daher könnte die beobachtete Überexpression von ADORA2B in den HNSCC-Zelllinien bereits zu einer erhöhten konstitutiven Aktivität führen.

Ob ADORA2B eine konstitutiv erhöhte Aktivität in HNSCC hat, was mögliche auslösende Mechanismen für eine solche konstitutiv erhöhte Aktivität sein könnten und welche Signalwege hierdurch angesprochen werden, ist allerdings zum jetzigen Zeitpunkt unklar und bedarf weiteren Forschungsbemühungen.

4.4 Schlussbetrachtung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde das adenosinerge System in 12 HNSCC-Zelllinien untersucht. Dabei zeigte sich, dass die zur Adenosingenerierung in Tumoren häufig beschriebene CD39/CD73-Achse bei vorliegender CD39-Defizienz nicht zur Verfügung steht. Zur Klärung inwieweit das hier beschriebene, hoch-regulierte CD73 auf der Zelloberfläche der HNSCC-Zelllinien direkten Einfluss auf die Tumorprogression hat, sind sicherlich ergänzende Experimente erforderlich. Zum einen ist die Regulierung der CD73-Expression ungeklärt. Jüngst veröffentlichte Studien identifizierten microRNA als Transkriptionsfaktoren die auf posttranskriptionaler Ebene die Expression von CD73 regulieren [42, 75]. Zum anderen ist die Funktionsweise von CD73 nicht abschließend geklärt. Zur Untersuchung, ob neben der reinen Generierung von Adenosin noch andere tumorfördernde Mechanismen durch CD73 bestehen, bedarf es weiterer Experimente, welche beispielsweise die Tumorprogression unter CD73-Inhibition mit Hilfe des CD73-spezifischen Antagonisten APCP oder CD73-Inhibierung vorgestellt [14, 29, 88].

Weiterhin zeigte sich in der vorliegenden Arbeit, dass ADORA2B von den vier Adenosinrezeptor-Subtypen als einziger in den 12 untersuchten HNSCC-Zelllinien überexprimiert wird und eine wichtige Rolle bei der Tumorprogression von HNSCC-Zelllinien einnimmt. Die Inhibierung von ADORA2B durch den spezifischen inversen Agonisten PSB603 löste eine gehemmte Proliferations-, Migrations- und VEGF-Sekretionsrate der HNSCC-Zelllinien *in vitro* aus.

In Folgeexperimenten wurde die durch ADORA2B-Inhibierung hervorgerufene, gestörte Proliferation weiter charakterisiert [93]. Dabei zeigte sich, dass es zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase durch eine Herunterregulierung von Cyclin D1 kommt. Weiterhin kam es zu einer Erhöhung proapoptotischer Proteine wie Caspase 9 und einer Reduktion antiapoptotischer Proteine wie Bcl-xl. Dies unterstreicht, dass ADORA2B über verschiedene Ansätze in den Zellzyklus eingreift und eine mögliche Schlüsselrolle innerhalb der Tumorbiologie von HNSCCs innehaben könnte.

Die beobachteten Effekte von ADORA2B auf Proliferation und Angiogenese *in vitro* konnten dabei auf ein *in vivo*-Modell übertragen werden [93]. In sogenannten CAM-Assays (engl. <u>c</u>horio <u>a</u>llantoic <u>m</u>embrane), welche als gut etabliertes Tumor-Xenograft-Model zur Untersuchung von Tumorzellwachstum und Angiogenese *in vivo* gelten, wurde unter Verwendung von Hühnereiern gezeigt, dass sich eine Inhibierung von ADORA2B sowohl durch PSB603 als auch durch spezifische siRNA negativ auf die Proliferation und Angiogenese *in vivo* auswirkte. Dabei kam es zu einer makroskopisch sichtbar reduzierten Tumorformation unter ADORA2B-Inhibition als auch zu einem signifikant reduzierten Proliferationsindex, welcher durch Ki-67-positive Zellen ermittelt wurde, und reduzierter tumorinduzierter Vaskularisierung, welche durch eine Desmin-Färbung bestimmt wurde [93].

Es wurde auf Grund der vorliegenden Ergebnisse eine möglich konstitutive Aktivität von ADORA2B in HNSCC-Zelllinien diskutiert [93]. Dabei stehen Experimente bezüglich möglicher downstream-Ziele von ADORA2B noch aus. Es wurde diskutiert, dass durch ADORA2B als pleiotroper GPCR potenziell G-Proteine mit den Untereinheiten G_s sowie G_q eine Rolle in der Signaltransduktion spielen und über cAMP-Erhöhung und Akkumulation von IP₃ weitere downstream Ziele wie beispielsweise die Kinasen ERK1/2 angesteuert werden. Die hier beobachtete Interaktion von ADORA2B mit der VEGF-Sekretionsrate der HNSCCs deutet daraufhin, dass die hypoxische Signalkaskade mit dem Transkriptionsfaktor HIF-1 in zentraler Rolle ebenfalls von Bedeutung sein könnte, insbesondere da die extrazelluläre Konzentration von Adenosin in hypoxischem Mikromilieu, wie es beispielsweise in soliden Tumoren anzutreffen ist, stark ansteigt [22, 70]. Kasama et al. identifizierten einen Zusammenhang zwischen der Regulierung von HIF-1 und ADORA2B in OSCCs [37]. Dabei war unter hypoxischen Bedingungen die Expression von ADORA2B deutlich erhöht. Weiterhin war HIF-1 in erhöhter Konzentration nachweisbar, allerdings war die Konzentration von HIF-1 in shADORA2B transfizierten Zellen signifikant reduziert, was auf eine transkriptorische Regulation von HIF-1 durch ADORA2B hinweist. Im Gegensatz dazu fanden Lan et al. [43] in ihrer Studie zu Mammakarzinomzelllinien, dass unter Hypoxie die Expression von ADORA2B vermittelt durch HIF-1 zunahm. Hier wurde also die Expression von ADORA2B durch HIF-1 reguliert. Ob ADORA2B durch HIF-1 reguliert wird, ob es sich vice versa verhält oder ob ggf. beides zutrifft und es zu einer sich selbst verstärkenden Schleife bezüglich der ADORA2B-/HIF-1-Expression in HNSCC-Zelllinien kommt, ist nicht geklärt. Auch die Frage, ob ein möglicher Zusammenhang zwischen HIF-1 und den anderen angesprochenen Signalkaskaden besteht und inwieweit ADORA2B möglicherweise eine zentrale Rolle einnimmt, bedarf weiterer Forschungsbemühungen und wäre sicherlich ein interessanter Ansatz für sich anschließende Projekte.

In der vorliegenden Studie wurde herausgearbeitet, dass das adenosinerge System eine direkte Rolle für die Tumorprogression von HNSCC-Zelllinien spielt und dabei insbesondere CD73 und ADORA2B interessante Ziele darstellen, an denen neue Therapiekonzepte für die spezifische Behandlung von HNSCC in Zukunft ansetzen könnten.

5 Zusammenfassung

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches - auch HNSCC genannt (engl. head and neck squamous cell carcinoma) - stellen eine schwerwiegende neoplastische Erkrankung mit globaler Prävalenz dar und gehören zu den sechsthäufigsten Krebserkrankungen in der männlichen Population weltweit. Trotz etablierter Therapieregime bestehend aus Chirurgie, Radiatio und Chemotherapie beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate nur ca. 50%, welche häufig auf lokoregionäre Rezidive oder Fernmetastasierungen auf Grund einer späten Diagnosestellung in fortgeschrittenen Stadien zurückzuführen ist. Gerade für diese fortgeschrittenen Stadien werden daher dringend neue Therapieansätze benötigt. Im aktuellen Forschungsinteresse steht dabei die Immuntherapie, welche die durch den Tumor unterhaltende Evasion des Tumors vor dem wirtseigenen Immunsystem zu inhibieren versucht, um dadurch die Tumorprogression zu verhindern. Als ein Mechanismus bei der Tumorevasion wurde dabei die Ausschüttung des immunsupprimierenden Faktors Adenosin identifiziert. Es wurden jedoch auch direkte protumerogene Effekte von Adenosin auf Tumorzellen bestimmter Entitäten beobachtet. Welche Rolle Adenosin bei HNSCC-Zellen spielt, ist jedoch noch ungeklärt. Daher befasste sich die vorliegende Arbeit mit der Charakterisierung des adenosinergen Systems in zwölf Zelllinien, die sich von HNSCCs ableiten.

Bei den laborexperimentellen Arbeiten kamen Expressionsanalysen mit Hilfe von Polymerasekettenreaktionen, Durchflusszytometrie und Western Blots sowie funktionelle Zellassays zur Untersuchung von Proliferation, Migration und spontaner VEGF-Sekretion (engl. <u>v</u>ascular <u>e</u>ndothelial growth <u>factor</u>) zur Anwendung.

Das adenosinerge System besteht u.a. aus den Ektonukleotidasen CD39 und CD73 (engl. <u>c</u>luster of <u>d</u>ifferentiation), welche im extrazellulären Raum ATP (<u>A</u>denosin<u>trip</u>hosphat) zu AMP (<u>A</u>denosin<u>m</u>ono<u>p</u>hosphat) und schlussendlich zu Adenosin degradieren. Weiterhin spielen die vier Adenosinrezeptoren ADORA1, ADORA2A, ADORA2B und ADORA3 eine Rolle.

In den untersuchten zwölf HNSCC-Zelllinien zeigte sich, dass alle CD73 auf ihrer Zelloberfläche überexprimierten, während eine Expression von CD39 nicht nachzuweisen war. Es wurde diskutiert, dass dadurch die klassische Achse der Adenosingenerierung durch die Tumorzellen alleine nicht bedient werden kann, allerdings gibt es Möglichkeiten

über andere enzymatische Pfade oder diskontinuierliche Pfade unter Zuhilfenahme anderer Zellen innerhalb des Tumormikromilieus signifikante extrazelluläre Adenosinkonzentrationen trotz CD39-Defizienz zu erreichen. Weiterhin wurde ein tumorfördernder Effekt von CD73 unabhängig von seiner enzymatischen Aktivität für andere Tumorentitäten beschrieben, was prinzipiell auch bei HNSCCs der Fall sein könnte. Im Weiteren wurde gezeigt, dass von allen Adenosinrezeptor-Subtypen ausschließlich ADORA2B exprimiert wird. Dabei zeigte sich auf RNA- (engl. ribonucleic acid) als auch auf Proteinebene eine Überexpression für alle zwölf untersuchten Zelllinien, wobei die Transkriptions- und die Translationsraten miteinander korrelierten. In den folgenden Experimenten wurden die Proliferation, Migration und spontane VEGF-Sekretion unter ADORA2B-Modulation analysiert. Dabei kamen der endogene Agonist Adenosin, der im Vergleich chemisch stabilere Agonist NECA sowie der inverse Agonist PSB603 zum Einsatz. Hierbei zeigte sich, dass die Agonisten nur einen geringen positiven bis keinen Effekt auf die oben genannten untersuchten Eigenschaften hatten, während der inverse Agonist PSB603 eine signifikante Inhibition dieser Prozesse nach sich zog. Es wurde diskutiert, dass ein solcher Effekt durch eine möglicherweise vorliegende konstitutive Aktivität von ADORA2B zu erklären sei, welche bereits bei Karzinomen der Mundhöhle beschrieben wurde. Weiterhin wurde darauf hingewiesen, dass die hier dargestellten Ergebnisse in Folgestudien bereits weiter charakterisiert wurden und sich unter anderem in in vivo-Untersuchungen in Tumor-Xenograft-Modellen in Hühnereiern bestätigten.

Zusammenfassend konnte die vorliegende Arbeit zeigen, dass HNSCC-Zelllinien bestimmte ,key players' des adenosinergen Systems exprimieren und diese Einfluss auf die Tumorprogression haben. Insbesondere die Inhibition von ADORA2B konnte als ein potentielles vielversprechendes strategisches Angriffsziel zur Tumorsuppression herausgearbeitet werden. Daher scheint ein weiteres Forschungsbemühen zu dem adenosinergen System bei HNSCCs lohnenswert, da sich hieraus innovative Impulse zur Entwicklung spezifischer Therapien für Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches zukünftig ergeben könnten.

6 Literaturverzeichnis

- Aghaei M, Panjehpour M, Karami-Tehrani F, Salami S: Molecular mechanisms of A3 adenosine receptor-induced G1 cell cycle arrest and apoptosis in androgen-dependent and independent prostate cancer cell lines. Journal of cancer research and clinical oncology 137: 1511–1523 (2011)
- Allard B, Beavis PA, Darcy PK, Stagg J: *Immunosuppressive activities of adenosine in cancer*. Current opinion in pharmacology 29: 7–16 (2016)
- Allard D, Allard B, Gaudreau P-O, Chrobak P, Stagg J: CD73-adenosine. Immunotherapy 8: 145–163 (2016)
- 4. Allard D, Chrobak P, Allard B, Messaoudi N, Stagg J: *Targeting the CD73-adenosine axis in immuno-oncology*. Immunology letters (**2018**)
- 5. Andrade Mello P de, Coutinho-Silva R, Savio LEB: *Multifaceted Effects of Extracellular Adenosine Triphosphate and Adenosine in the Tumor-Host Interaction and Therapeutic Perspectives.* Frontiers in immunology 8: 1526 (2017)
- Blay J, White TD, Hoskin DW: The extracellular fluid of solid carcinomas contains immunosuppressive concentrations of adenosine. Cancer research 57: 2602–2605 (1997)
- Buchbinder EI, Desai A: CTLA-4 and PD-1 Pathways. American journal of clinical oncology 39: 98–106 (2016)
- Cekic C, Sag D, Li Y, Theodorescu D, Strieter RM, Linden J: Adenosine A2B receptor blockade slows growth of bladder and breast tumors. Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950) 188: 198–205 (2012)
- Cushman SM, Jiang C, Hatch AJ, Shterev I, Sibley AB, Niedzwiecki D, Venook AP, Owzar K, Hurwitz HI, Nixon AB: *Gene expression markers of efficacy and resistance to cetuximab treatment in metastatic colorectal cancer*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 21: 1078–1086 (2015)
- Dastjerdi MN, Rarani MZ, Valiani A, Mahmoudieh M: The effect of adenosine A1 receptor agonist and antagonist on p53 and caspase 3, 8, and 9 expression and apoptosis rate in MCF-7 breast cancer cell line. Research in pharmaceutical sciences 11: 303–310 (2016)

- Dastjerdi MN, Valiani A, Mardani M, Ra MZ: Adenosine A1 receptor modifies P53 expression and apoptosis in breast cancer cell line Mcf-7. Bratislavske lekarske listy 117: 242–246 (2016)
- 12. Desmet CJ, Gallenne T, Prieur A, Reyal F, Visser NL, Wittner BS, Smit MA, Geiger TR, Laoukili J, Iskit S, Rodenko B, Zwart W, Evers B, Horlings H, Ajouaou A, Zevenhoven J, van Vliet M, Ramaswamy S, Wessels LFA, Peeper DS: *Identification of a pharmacologically tractable Fra-1/ADORA2B axis promoting breast cancer metastasis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110: 5139–5144 (2013)
- Dumaz N, Marais R: Integrating signals between cAMP and the RAS/RAF/MEK/ERK signalling pathways. Based on the anniversary prize of the Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie Lecture delivered on 5 July 2003 at the Special FEBS Meeting in Brussels. The FEBS journal 272: 3491–3504 (2005)
- Dumontet C, Peyrottes S, Rabeson C, Cros-Perrial E, Géant PY, Chaloin L, Jordheim LP: *CD73 inhibition by purine cytotoxic nucleoside analogue-based diphosphonates*. European journal of medicinal chemistry 157: 1051–1055 (2018)
- Dunwiddie TV, Diao L, Proctor WR: Adenine nucleotides undergo rapid, quantitative conversion to adenosine in the extracellular space in rat hippocampus. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 17: 7673–7682 (1997)
- Etique N, Grillier-Vuissoz I, Lecomte J, Flament S: Crosstalk between adenosine receptor (A2A isoform) and ERalpha mediates ethanol action in MCF-7 breast cancer cells. Oncology reports 21: 977–981 (2009)
- Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, Forastiere A, Gillison ML: Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. Journal of the National Cancer Institute 100: 261–269 (2008)
- Ferris RL: Immunology and Immunotherapy of Head and Neck Cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 33: 3293–3304 (2015)
- 19. Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM, Barregard L, Bhutta ZA, Brenner H, Dicker DJ, Chimed-Orchir O, Dandona R, Dandona L, Fleming T, Forouzanfar MH, Hancock J, Hay RJ, Hunter-Merrill R, Huynh C, Hosgood HD, Johnson CO, Jonas JB, Khubchandani J, Kumar GA, Kutz M, Lan Q, Larson HJ, Liang X, Lim SS, Lopez

AD, MacIntyre MF, Marczak L, Marquez N, Mokdad AH, Pinho C, Pourmalek F, Salomon JA, Sanabria JR, Sandar L, Sartorius B, Schwartz SM, Shackelford KA, Shibuya K, Stanaway J, Steiner C, Sun J, Takahashi K, Vollset SE, Vos T, Wagner JA, Wang H, Westerman R, Zeeb H, Zoeckler L, Abd-Allah F, Ahmed MB, Alabed S, Alam NK, Aldhahri SF, Alem G, Alemayohu MA, Ali R, Al-Raddadi R, Amare A, Amoako Y, Artaman A, Asayesh H, Atnafu N, Awasthi A, Saleem HB, Barac A, Bedi N, Bensenor I, Berhane A, Bernabé E, Betsu B, Binagwaho A, Boneya D, Campos-Nonato I, Castañeda-Orjuela C, Catalá-López F, Chiang P, Chibueze C, Chitheer A, Choi J-Y, Cowie B, Damtew S, das Neves J, Dey S, Dharmaratne S, Dhillon P, Ding E, Driscoll T, Ekwueme D, Endries AY, Farvid M, Farzadfar F, Fernandes J, Fischer F, G/Hiwot TT, Gebru A, Gopalani S, Hailu A, Horino M, Horita N, Husseini A, Huybrechts I, Inoue M, Islami F, Jakovljevic M, James S, Javanbakht M, Jee SH, Kasaeian A, Kedir MS, Khader YS, Khang Y-H, Kim D, Leigh J, Linn S, Lunevicius R, El Razek HMA, Malekzadeh R, Malta DC, Marcenes W, Markos D, Melaku YA, Meles KG, Mendoza W, Mengiste DT, Meretoja TJ, Miller TR, Mohammad KA, Mohammadi A, Mohammed S, Moradi-Lakeh M, Nagel G, Nand D, Le Nguyen Q, Nolte S, Ogbo FA, Oladimeji KE, Oren E, Pa M, Park E-K, Pereira DM, Plass D, Qorbani M, Radfar A, Rafay A, Rahman M, Rana SM, Søreide K, Satpathy M, Sawhney M, Sepanlou SG, Shaikh MA, She J, Shiue I, Shore HR, Shrime MG, So S, Soneji S, Stathopoulou V, Stroumpoulis K, Sufiyan MB, Sykes BL, Tabarés-Seisdedos R, Tadese F, Tedla BA, Tessema GA, Thakur JS, Tran BX, Ukwaja KN, Uzochukwu BSC, Vlassov VV, Weiderpass E, Wubshet Terefe M, Yebyo HG, Yimam HH, Yonemoto N, Younis MZ, Yu C, Zaidi Z, Zaki MES, Zenebe ZM, Murray CJL, Naghavi M: Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015. JAMA oncology 3: 524-548 (2017)

- Forman D, Ferlay J: Chapter 1.1 The global and regional burden of cancer. In: Stewart BW, Wild CP (Hrsg) World Cancer Report 2014, 1. Aufl., World Health Organization, Geneva: 16–53 (2014)
- Forster MD, Devlin M-J: Immune Checkpoint Inhibition in Head and Neck Cancer. Frontiers in oncology 8: 310 (2018)
- Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J: International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. Pharmacological reviews 53: 527–552 (2001)

- 23. Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Linden J, Müller CE: International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update. Pharmacological reviews 63: 1–34 (2011)
- 24. Fuereder T: Immunotherapy for head and neck squamous cell carcinoma. Memo 9: 66–69 (2016)
- 25. Fujita T, Meguro T, Fukuyama R, Nakamuta H, Koida M: New signaling pathway for parathyroid hormone and cyclic AMP action on extracellular-regulated kinase and cell proliferation in bone cells. Checkpoint of modulation by cyclic AMP. The Journal of biological chemistry 277: 22191–22200 (2002)
- 26. Gao Z-w, Dong K, Zhang H-z: *The roles of CD73 in cancer*. BioMed research international 2014: 460654 (2014)
- Gao Z-w, Wang H-P, Lin F, Wang X, Long M, Zhang H-z, Dong K: CD73 promotes proliferation and migration of human cervical cancer cells independent of its enzyme activity. BMC cancer 17: 135 (2017)
- Gessi S, Bencivenni S, Battistello E, Vincenzi F, Colotta V, Catarzi D, Varano F, Merighi S, Borea PA, Varani K: *Inhibition of A2A Adenosine Receptor Signaling in Cancer Cells Proliferation by the Novel Antagonist TP455*. Frontiers in pharmacology 8: 888 (2017)
- Ghalamfarsa G, Rastegari A, Atyabi F, Hassannia H, Hojjat-Farsangi M, Ghanbari A, Anvari E, Mohammadi J, Azizi G, Masjedi A, Yousefi M, Yousefi B, Hadjati J, Jadidi-Niaragh F: *Anti-angiogenic effects of CD73-specific siRNA-loaded nanoparticles in breast cancer-bearing mice.* Journal of cellular physiology 233: 7165–7177 (2018)
- 30. Hamm HE: *The many faces of G protein signaling*. The Journal of biological chemistry 273: 669–672 (**1998**)
- 31. Hammerman PS, Hayes DN, Grandis JR: *Therapeutic insights from genomic studies of head and neck squamous cell carcinomas*. Cancer discovery 5: 239–244 (**2015**)
- 32. Hatfield SM, Kjaergaard J, Lukashev D, Belikoff B, Schreiber TH, Sethumadhavan S, Abbott R, Philbrook P, Thayer M, Shujia D, Rodig S, Kutok JL, Ren J, Ohta A, Podack ER, Karger B, Jackson EK, Sitkovsky M: Systemic oxygenation weakens the hypoxia and hypoxia inducible factor 1α-dependent and extracellular adenosine-mediated tumor protection. Journal of molecular medicine (Berlin, Germany) 92: 1283–1292 (2014)

- 33. Hoffmann TK, Sonkoly E, Hauser U, van Lierop A, Whiteside TL, Klussmann JP, Hafner D, Schuler P, Friebe-Hoffmann U, Scheckenbach K, Erjala K, Grénman R, Schipper J, Bier H, Balz V: Alterations in the p53 pathway and their association with radio- and chemosensitivity in head and neck squamous cell carcinoma. Oral oncology 44: 1100–1109 (2008)
- 34. Horenstein AL, Chillemi A, Zaccarello G, Bruzzone S, Quarona V, Zito A, Serra S, Malavasi F: A CD38/CD203a/CD73 ectoenzymatic pathway independent of CD39 drives a novel adenosinergic loop in human T lymphocytes. Oncoimmunology 2: e26246 (2013)
- 35. Iannone R, Miele L, Maiolino P, Pinto A, Morello S: Blockade of A2b adenosine receptor reduces tumor growth and immune suppression mediated by myeloid-derived suppressor cells in a mouse model of melanoma. Neoplasia (New York, N.Y.) 15: 1400–1409 (2013)
- 36. Jou A, Hess J: Epidemiology and Molecular Biology of Head and Neck Cancer.
 Oncology research and treatment 40: 328–332 (2017)
- 37. Kasama H, Sakamoto Y, Kasamatsu A, Okamoto A, Koyama T, Minakawa Y, Ogawara K, Yokoe H, Shiiba M, Tanzawa H, Uzawa K: Adenosine A2b receptor promotes progression of human oral cancer. BMC cancer 15: 563 (2015)
- 38. Kim H, Kang JW, Lee S, Choi WJ, Jeong LS, Yang Y, Hong JT, Yoon DY: A3 adenosine receptor antagonist, truncated Thio-Cl-IB-MECA, induces apoptosis in T24 human bladder cancer cells. Anticancer research 30: 2823–2830 (2010)
- 39. Kim S-J, Min H-Y, Chung H-J, Park E-J, Hong J-Y, Kang Y-J, Shin D-H, Jeong LS, Lee SK: Inhibition of cell proliferation through cell cycle arrest and apoptosis by thio-Cl-IB-MECA, a novel A3 adenosine receptor agonist, in human lung cancer cells. Cancer letters 264: 309–315 (2008)
- 40. Kondo T, Nakazawa T, Murata S-I, Katoh R: *Expression of CD73 and its ecto-5'*nucleotidase activity are elevated in papillary thyroid carcinomas. Histopathology 48: 612–614 (**2006**)
- 41. Kopp P, van Sande J, Parma J, Duprez L, Gerber H, Joss E, Jameson JL, Dumont JE, Vassart G: *Brief report*. The New England journal of medicine 332: 150–154 (**1995**)
- Kordaß T, Osen W, Eichmüller SB: Controlling the Immune Suppressor. Frontiers in immunology 9: 813 (2018)
- 43. Lan J, Lu H, Samanta D, Salman S, Lu Y, Semenza GL: *Hypoxia-inducible factor 1*dependent expression of adenosine receptor 2B promotes breast cancer stem cell

enrichment. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (2018)

- Lansford CD, Grenman R, Bier H, Somers KD, Kim SY, Whiteside TL, Clayman GL, Welkoborsky H-J, Carey TE: *Chapter 28 Head and Neck Cancers*. In: Masters JRW, Palsson B (Hrsg) *Human Cell Culture*, Bd II, 1. Aufl, Kluwer Academic Publishers: 185–255 (1999)
- Larkins E, Blumenthal GM, Yuan W, He K, Sridhara R, Subramaniam S, Zhao H, Liu C, Yu J, Goldberg KB, McKee AE, Keegan P, Pazdur R: *FDA Approval Summary*. The oncologist 22: 873–878 (2017)
- Latini S, Bordoni F, Pedata F, Corradetti R: *Extracellular adenosine concentrations* during in vitro ischaemia in rat hippocampal slices. British journal of pharmacology 127: 729–739 (1999)
- 47. Leff P: *The two-state model of receptor activation*. Trends in pharmacological sciences 16: 89–97 (**1995**)
- 48. Lefkowitz RJ, Cotecchia S, Samama P, Costa T: *Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins*. Trends in pharmacological sciences 14: 303–307 (**1993**)
- Leone RD, Lo Y-C, Powell JD: A2aR antagonists: Next generation checkpoint blockade for cancer immunotherapy. Computational and structural biotechnology journal 13: 265–272 (2015)
- 50. Linden J: *Molecular approach to adenosine receptors*. Annual review of pharmacology and toxicology 41: 775–787 (**2001**)
- 51. Linden J, Thai T, Figler H, Jin X, Robeva AS: *Characterization of human A(2B)* adenosine receptors. Molecular pharmacology 56: 705–713 (**1999**)
- 52. Liu G, Duranteau L, Carel JC, Monroe J, Doyle DA, Shenker A: Leydig-cell tumors caused by an activating mutation of the gene encoding the luteinizing hormone receptor. The New England journal of medicine 341: 1731–1736 (1999)
- 53. Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods (San Diego, Calif.) 25: 402–408 (2001)
- Longhi MS, Robson SC, Bernstein SH, Serra S, Deaglio S: Biological functions of ecto-enzymes in regulating extracellular adenosine levels in neoplastic and inflammatory disease states. Journal of molecular medicine (Berlin, Germany) 91: 165–172 (2013)

- 55. Ma D-F, Kondo T, Nakazawa T, Niu D-F, Mochizuki K, Kawasaki T, Yamane T, Katoh R: *Hypoxia-inducible adenosine A2B receptor modulates proliferation of colon carcinoma cells*. Human pathology 41: 1550–1557 (2010)
- Marur S, Forastiere AA: *Head and neck cancer*. Mayo Clinic proceedings 83: 489– 501 (2008)
- 57. Marur S, Forastiere AA: *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*. Mayo Clinic proceedings 91: 386–396 (2016)
- 58. Masters JRW, Palsson B: *Human Cell Culture* II, 1. Aufl, Kluwer Academic Publishers (**1999**)
- 59. Merck Sharp & Dohme Corp., a subsidiary of Merck & Co., Inc.: *KEYTRUDA https://www.keytruda.com/* (Zugriff am 08.12.2018 um 20:00 Uhr)
- Merighi S, Mirandola P, Milani D, Varani K, Gessi S, Klotz K-N, Leung E, Baraldi PG, Borea PA: Adenosine receptors as mediators of both cell proliferation and cell death of cultured human melanoma cells. The Journal of investigative dermatology 119: 923–933 (2002)
- 61. Mirza A, Basso A, Black S, Malkowski M, Kwee L, Pachter JA, Lachowicz JE, Wang Y, Liu S: RNA interference targeting of A1 receptor-overexpressing breast carcinoma cells leads to diminished rates of cell proliferation and induction of apoptosis. Cancer biology & therapy 4: 1355–1360 (2005)
- Mittal D, Sinha D, Barkauskas D, Young A, Kalimutho M, Stannard K, Caramia F, Haibe-Kains B, Stagg J, Khanna KK, Loi S, Smyth MJ: *Adenosine 2B Receptor Expression on Cancer Cells Promotes Metastasis*. Cancer research 76: 4372–4382 (2016)
- 63. Moskovitz J, Moy J, Ferris RL: *Immunotherapy for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*. Current oncology reports 20: 22 (**2018**)
- 64. Ohana G, Bar-Yehuda S, Barer F, Fishman P: *Differential effect of adenosine on tumor and normal cell growth.* Journal of cellular physiology 186: 19–23 (2001)
- 65. Ohta A, Sitkovsky M: Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. Nature 414: 916–920 (2001)
- 66. Parra S, Bond RA: *Inverse agonism.* Current opinion in pharmacology 7: 146–150 (2007)
- 67. Pfister DG, Ang K-K, Brizel DM, Burtness BA, Busse PM, Caudell JJ, Cmelak AJ, Colevas AD, Dunphy F, Eisele DW, Gilbert J, Gillison ML, Haddad RI, Haughey BH,

Hicks WL, Hitchcock YJ, Kies MS, Lydiatt WM, Maghami E, Martins R, McCaffrey T, Mittal BB, Pinto HA, Ridge JA, Samant S, Schuller DE, Shah JP, Spencer S, Weber RS, Wolf GT, Worden F, Yom SS, McMillian NR, Hughes M: *Head and neck cancers, version 2.2013. Featured updates to the NCCN guidelines.* Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN 11: 917–923 (**2013**)

- 68. Ren Z-H, Lin C-Z, Cao W, Yang R, Lu W, Liu Z-Q, Chen Y-M, Yang X, Tian Z, Wang L-Z, Li J, Wang X, Chen W-T, Ji T, Zhang C-P: *CD73 is associated with poor prognosis in HNSCC*. Oncotarget 7: 61690–61702 (2016)
- 69. Rothschild U, Muller L, Lechner A, Schlösser HA, Beutner D, Läubli H, Zippelius A, Rothschild SI: *Immunotherapy in head and neck cancer scientific rationale, current treatment options and future directions*. Swiss medical weekly 148: w14625 (2018)
- 70. Rudolphi KA, Schubert P, Parkinson FE, Fredholm BB: *Adenosine and brain ischemia*. Cerebrovascular and brain metabolism reviews 4: 346–369 (**1992**)
- 71. Saze Z, Schuler PJ, Hong C-S, Cheng D, Jackson EK, Whiteside TL: Adenosine production by human B cells and B cell-mediated suppression of activated T cells. Blood 122: 9–18 (2013)
- 72. Schuler PJ, Saze Z, Hong C-S, Muller L, Gillespie DG, Cheng D, Harasymczuk M, Mandapathil M, Lang S, Jackson EK, Whiteside TL: *Human CD4+ CD39+ regulatory T cells produce adenosine upon co-expression of surface CD73 or contact with CD73+ exosomes or CD73+ cells.* Clinical and experimental immunology 177: 531–543 (2014)
- Seifert R, Wenzel-Seifert K: Constitutive activity of G-protein-coupled receptors. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology 366: 381–416 (2002)
- 74. Sharan RN, Vaiphei ST, Nongrum S, Keppen J, Ksoo M: Consensus reference gene(s) for gene expression studies in human cancers. Cellular oncology (Dordrecht) 38: 419–431 (2015)
- 75. Song Y, Song C, Yang S: Tumor-Suppressive Function of miR-30d-5p in Prostate Cancer Cell Proliferation and Migration by Targeting NT5E. Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals 33: 203–211 (2018)
- 76. Stagg J: *The double-edge sword effect of anti-CD73 cancer therapy*. Oncoimmunology 1: 217–218 (**2012**)
- 77. Stagg J, Smyth MJ: *Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer*. Oncogene 29: 5346–5358 (2010)

- 78. Stewart BW, Wild CP: *World Cancer Report 2014,* 1. Aufl, World Health Organization, Geneva (2014)
- 79. Stork PJS, Schmitt JM: Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. Trends in cell biology 12: 258–266 (2002)
- Tabatabaeifar S, Kruse TA, Thomassen M, Larsen MJ, Sørensen JA: Use of next generation sequencing in head and neck squamous cell carcinomas. Oral oncology 50: 1035–1040 (2014)
- 81. Terp MG, Olesen KA, Arnspang EC, Lund RR, Lagerholm BC, Ditzel HJ, Leth-Larsen R: Anti-human CD73 monoclonal antibody inhibits metastasis formation in human breast cancer by inducing clustering and internalization of CD73 expressed on the surface of cancer cells. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) 191: 4165–4173 (2013)
- Thompson LDR: Chapter 5.8 Head and neck cancers. In: Stewart BW, Wild CP (Hrsg) World Cancer Report 2014, 1. Aufl, World Health Organization, Geneva: 422–431 (2014)
- 83. U. S. National Library of Medicine ClinicalTrials.gov: KEYNOTE-012 https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT01848834 (Zugriff am 08.12.2018 um 20:30 Uhr)
- 84. U. S. National Library of Medicine ClinicalTrials.gov: KEYNOTE-040 https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02252042 (Zugriff am 08.12.2018 um 20:35 Uhr)
- 85. Universal ProbeLibrary RD: https://lifescience.roche.com/en_de/brands/universalprobe-library.html (Zugriff am 07.08.2017 um 18:23 Uhr)
- 86. Vecchio EA, Tan CYR, Gregory KJ, Christopoulos A, White PJ, May LT: Ligand-Independent Adenosine A2B Receptor Constitutive Activity as a Promoter of Prostate Cancer Cell Proliferation. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 357: 36–44 (2016)
- Vetter IR, Wittinghofer A: *The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions*. Science (New York, N.Y.) 294: 1299–1304 (2001)
- 88. Viviani LG, Piccirillo E, Cheffer A, Rezende L de, Ulrich H, Carmona-Ribeiro AM, Amaral AT-d: *Be Aware of Aggregators in the Search for Potential Human ecto-5'-Nucleotidase Inhibitors*. Molecules (Basel, Switzerland) 23 (2018)

- Wei Q, Costanzi S, Balasubramanian R, Gao Z-G, Jacobson KA: A2B adenosine receptor blockade inhibits growth of prostate cancer cells. Purinergic signalling 9: 271–280 (2013)
- 90. Whiteside TL: *Head and Neck Carcinoma Immunotherapy*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 24: 6–13 (**2018**)
- 91. Whiteside TL, Mandapathil M, Schuler P: *The role of the adenosinergic pathway in immunosuppression mediated by human regulatory T cells (Treg)*. Current medicinal chemistry 18: 5217–5223 (2011)
- 92. Whiteside TL, Schuler P, Schilling B: *Induced and natural regulatory T cells in human cancer*. Expert opinion on biological therapy 12: 1383–1397 (**2012**)
- 93. Wilkat M, Bast H, Drees R, Dünser J, Mahr A, Azoitei N, Marienfeld R, Frank F, Brhel M, Ushmorov A, Greve J, Goldberg-Bockhorn E, Theodoraki MN, Doescher J, Laban S, Schuler PJ, Hoffmann TK, Brunner C: Adenosine receptor 2B activity promotes autonomous growth, migration as well as vascularization of head and neck squamous cell carcinoma cells. Int J Cancer 147(1): 202-217 (2020)
- 94. Wu J, Dent P, Jelinek T, Wolfman A, Weber MJ, Sturgill TW: Inhibition of the EGFactivated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate. Science (New York, N.Y.) 262: 1065–1069 (1993)
- 95. Wu R, Chen Y, Li F, Li W, Zhou H, Yang Y, Pei Z: Effects of CD73 on human colorectal cancer cell growth in vivo and in vitro. Oncology reports 35: 1750–1756 (2016)
- 96. Yasuda Y, Saito M, Yamamura T, Yaguchi T, Nishizaki T: Extracellular adenosine induces apoptosis in Caco-2 human colonic cancer cells by activating caspase-9/-3 via A(2a) adenosine receptors. Journal of gastroenterology 44: 56–65 (2009)
- 97. Zetterström T, Vernet L, Ungerstedt U, Tossman U, Jonzon B, Fredholm BB: Purine levels in the intact rat brain. Studies with an implanted perfused hollow fibre. Neuroscience letters 29: 111–115 (1982)
- 98. Zhang B: CD73 promotes tumor growth and metastasis. Oncoimmunology 1: 67–70 (2012)
- 99. Zhang B: *Opportunities and challenges for anti-CD73 cancer therapy*. Immunotherapy 4: 861–865 (2012)
- 100.Zhi X, Chen S, Zhou P, Shao Z, Wang L, Ou Z, Yin L: RNA interference of ecto-5'nucleotidase (CD73) inhibits human breast cancer cell growth and invasion. Clinical & experimental metastasis 24: 439–448 (2007)

- 101.Zhi X, Wang Y, Yu J, Yu J, Zhang L, Yin L, Zhou P: Potential prognostic biomarker CD73 regulates epidermal growth factor receptor expression in human breast cancer. IUBMB life 64: 911–920 (2012)
- 102.Zhou X, Zhi X, Zhou P, Chen S, Zhao F, Shao Z, Ou Z, Yin L: *Effects of ecto-5'*nucleotidase on human breast cancer cell growth in vitro and in vivo. Oncology reports 17: 1341–1346 (**2007**)
- 103.Zhou Y, Chu X, Deng F, Tong L, Tong G, Yi Y, Liu J, Tang J, Tang Y, Xia Y, Dai Y: The adenosine A2b receptor promotes tumor progression of bladder urothelial carcinoma by enhancing MAPK signaling pathway. Oncotarget 8: 48755–48768 (2017)
- 104.Zimmermann H: *Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides*. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology 362: 299–309 (**2000**)

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Transkriptionsanalyse von CD39 und CD73 in HNSCCs mit Hilfe von RT-qPCR Abb. 1 -43-(modifiziert nach Wilkat et al [93] unter Creative Commons Attribution 4.0 International License, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0) Es ist die relative Expressionsstärke von CD39 (A) und CD73 (B) jeweils normalisiert gegen die Haushaltsgene RPL13A (blau), B2M (grün) und HPRT1 (grau) für die 12 untersuchten Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinien (HNSCCs), 3 Prostatakarzinom-Zelllinien (DU145, PC-3, LNCap) und die B-Zelllinie NAMALWA im Vergleich zu aus humanem Tonsillengewebe isolierten CD19+ B-Zellen dargestellt. Dabei wurde die Anzahl der mRNA-Transkripte relativ zu der Anzahl der mRNA-Transkripte der CD19+ B-Zellen dargestellt, welche auf den Wert 1 gesetzt wurden (türkis hinterlegt). Es ist jeweils der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten aufgetragen sowie die Standardabweichung als Fehlerbalken.
- Abb. 2 Expressions analyse von *CD39* in HNSCCs mittels RT-qPCR und FACS-Analyse -44-(modifiziert nach Wilkat et al [93] unter Creative Commons Attribution 4.0 International License, <u>https://creativecommons.org/licenses/by/4.0</u>)

A Es ist die relative Expressionsstärke von *CD39* normalisiert und gemittelt gegen die Haushaltsgene *RPL13A*, *B2M* und *HPRT1* für die 12 untersuchten Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinien (HNSCCs), 3 Prostatakarzinom-Zelllinien (DU145, PC-3, LNCap) und die B-Zellinie NAMALWA im Vergleich zu aus humanem Tonsillengewebe isolierten CD19+ B-Zellen dargestellt. Dabei wurde die Anzahl der mRNA-Transkripte relativ zu der Anzahl der mRNA-Transkripte der CD19+ B-Zellen dargestellt, welche auf den Wert 1 gesetzt wurden. Es ist jeweils der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten aufgetragen sowie die Standardabweichung als Fehlerbalken.

B Oben ist die relative Fluoreszenzintensität der mit PE-Cyanine7 gekoppelten anti-CD39-Antikörpern markierten Zellen (grün), der mit Isotypen-Antikörper markierten Zellen als Kontrolle für unspezifische Antikörperbindungen (blau) und der nicht markierten Zellen (rot) gegen den prozentualen Anteil der untersuchten Zellen aufgetragen. Es sind beispielhaft die Ergebnisse der Kopf-Hals-Karzinomzelllinien UDSCC1, -2 und -3 dargestellt. Unten ist die mittlere relative Fluoreszenzintensität des PE-Cyanine7 gekoppelten anti-CD39-Antikörpers für die untersuchten 12 Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinien (HNSCCs), 3 Prostatakarzinom-Zelllinien (DU145, PC-3, LNCap), die B-Zelllinie NAMALWA und aus humanem Tonsillengewebe isolierte CD19+ B-Zellen dargestellt, wobei der Wert für die CD19+ B-Zellen auf 1 gesetzt wurde und die Werte der übrigen Zelllinien in Relation dazu dargestellt wurden.

Abb. 3 Expressions analyse von *CD73* in HNSCCs mittels RT-qPCR und FACS-Analyse -45-(modifiziert nach Wilkat et al [93] unter Creative Commons Attribution 4.0

International License, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0)

A Es ist die relative Expressionsstärke von *CD73* normalisiert und gemittelt gegen die Haushaltsgene *RPL13A*, *B2M* und *HPRT1* für die 12 untersuchten Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinien (HNSCCs), 3 Prostatakarzinom-Zelllinien (DU145, PC-3, LNCap) und die B-Zellinie NAMALWA im Vergleich zu aus humanem Tonsillengewebe isolierten CD19+ B-Zellen dargestellt. Dabei wurde die Anzahl der mRNA-Transkripte relativ zu der Anzahl der mRNA-Transkripte der CD19+ B-Zellen dargestellt, welche auf den Wert 1 gesetzt wurden. Es ist jeweils der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten aufgetragen sowie die Standardabweichung als Fehlerbalken.

B Oben ist die relative Fluoreszenzintensität der mit eFluor 450 gekoppelten anti-CD73-Antikörpern markierten Zellen (grün), der mit Isotypen-Antikörper markierten Zellen als Kontrolle für unspezifische Antikörperbindungen (blau) und der nicht markierten Zellen (rot) gegen den prozentualen Anteil der untersuchten Zellen aufgetragen. Es sind beispielhaft die Ergebnisse der Kopf-Hals-Karzinomzelllinien UDSCC1, -2 und -3 dargestellt. Unten ist die mittlere relative Fluoreszenzintensität des eFluor 450 gekoppelten anti-CD73-Antikörpers für die untersuchten 12 Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinien (HNSCCs), 3 Prostatakarzinom-Zelllinien (DU145, PC-3, LNCap), die B-Zelllinie NAMALWA und aus humanem Tonsillengewebe isolierte CD19+ B-Zellen dargestellt, wobei der Wert für die CD19+ B-Zellen auf 1 gesetzt wurde und die Werte der übrigen Zelllinien in Relation dazu dargestellt wurden.

Abb. 4 Transkriptionsanalyse von Adenosinrezeptoren in HNSCCs in der endpoint-PCR -47-(modifiziert nach Wilkat et al [93] unter Creative Commons Attribution 4.0 International License, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0)

> Dargestellt sind die in 1,8%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennten und durch Midori Green-Färbung sichtbar gemachten PCR-Amplifikationsprodukte aus 12 untersuchten Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinien, drei Prostata-Zelllinien (DU145, PC-3 und LNCap), der B-Zelllinie NAMALWA, aus humanen Tonsillengewebe isolierten CD19+ B-Zellen (ADORA1 Kontrolle), der T-Zelllinie Jurkat (ADORA2A Kontrolle), einem aufbereitetem Gefrierschnitt von Glioblastomgewebe (ADORA3 Kontrolle) sowie H₂O als Negativkontrolle. Für jede untersuchte Zellprobe wurden standardisierte PCR-Amplifikationen mit spezifischen Primern für die vier Adenosinrezeptoren (ADORA) 1, 2A, 2B und 3 sowie das Haushaltsgen GAPDH durchgeführt, die Größe des Amplifikationsproduktes der untersuchten Gene ist in den Kästen wiedergegeben (bp: Basenpaare). Zusätzlich wurden DNA-Stränge bekannter Basenpaarenlänge als Komigrationsstandard aufgetragen.

Abb. 5 Transkriptionsanalyse von ADORA2B in HNSCCs mit Hilfe von RT-qPCR -48-(modifiziert nach Wilkat et al [93] unter Creative Commons Attribution 4.0 International License, <u>https://creativecommons.org/licenses/by/4.0</u>)
Es ist die relative Expressionsstärke von ADORA2B normalisiert gegen die Haushaltsgene RPL13A (blau), B2M (grün) und HPRT1 (grau) für die 12 untersuchten Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinien (HNSCCs), 3 Prostatakarzinom-Zelllinien (DU145, PC-3, LNCap) und die B-Zelllinie NAMALWA im Vergleich zu der Prostatakarzinom-Zelllinie DU145 dargestellt. Dabei wurde die Anzahl der mRNA-Transkripte relativ zu der Anzahl der mRNA-Transkripte von DU145 dargestellt, welche auf den Wert 1 gesetzt wurden (türkis hinterlegt). Die Werte der y-Achse wurden logarithmisch dargestellt. Es ist jeweils der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten aufgetragen sowie die Standardabweichung als Fehlerbalken.

Abb. 6 Expressions analyse von *ADORA2B* in HNSCCs mittels RT-qPCR und Western-Blot -49-(modifiziert nach Wilkat et al [93] unter Creative Commons Attribution 4.0 International License, <u>https://creativecommons.org/licenses/by/4.0</u>)

A Es ist die relative Expressionsstärke von *ADORA2B* normalisiert und gemittelt gegen die Haushaltsgene *RPL13A*, *B2M* und *HPRT1* für die 12 untersuchten Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinien (HNSCCs), die Prostatakarzinom-Zelllinie PC-3 und die B-Lymphomzelllinie NAMALWA im Vergleich zu der Prostatakarzinom-Zelllinie dargestellt. Dabei wurde die Anzahl der mRNA-Transkripte relativ zu der Anzahl der mRNA-Transkripte der Prostatakarzinom-Zelllinie DU145 (nicht abgebildet) dargestellt, welche auf den Wert 1 gesetzt wurden. Es ist jeweils der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten aufgetragen sowie die Standardabweichung als Fehlerbalken.

B Oben sind die Banden der Western-Blot-Analyse abgebildet: Es wurden Ganzzelllysate der 12 untersuchten Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinien (HNSCCs), der Prostatakarzinom-Zelllinie PC-3 und der B-Lymphomzelllinie NAMALWA aufgetragen und mit Primärantikörpern für ADORA2B (39 kDa) und β -Actin (42 kDa) als loading control markiert.

Unten ist die relative Proteinexpression von ADORA2B für o.g. Zellen dargestellt. Hierbei wurden die Banden des Western-Blots densitometrisch ausgewertet und ADORA2B gegen β-Actin normalisiert.

Abb. 7Adenosin hat keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferationsrate von HNSCCs-51-(modifiziert nach Wilkat et al [93] unter Creative Commons Attribution 4.0International License, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0)

Aufgetragen ist die Zellzahl der untersuchten Zelllinie gegen die Zeit in Stunden. Es wurden die zwei Kopf-Hals-Karzinomzelllinien (HNSCC) UDSCC1 und -5, die B-Zell-Lymphomzelllinie NAMALWA sowie die Prostatakarzinomzelllinie PC-3 untersucht. Die Zellen wurden unter normoxischen Bedingungen mit Zellkulturmedium unter Zusatz von 1% igem FBS kultiviert. Zusätzlich wurde H₂O als Kontrolle (schwarz) oder in H₂O gelöstes ADO (Adenosin) aufsteigender Konzentrationen (hell- bis dunkelblau) hinzugegeben. Die Zellzahl wurde durch einen MTT-Assay photometrisch zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h, 48 h und 72 h bestimmt. Es ist jeweils der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten aufgetragen sowie die Standardabweichung als Fehlerbalken. **: signifikant im Vergleich zur Kontrolle mit p<0,01

Abb. 8 PSB603 reduziert die Proliferationsrate von HNSCCs signifikant (modifiziert nach -52-Wilkat et al [93] unter Creative Commons Attribution 4.0 International License, https://creativecommons.org/licenses/by/4.0) Aufgetragen ist die Zellzahl der untersuchten Zelllinie gegen die Zeit in Stunden. Es wurden die sechs Kopf-Hals-Karzinomzelllinien (HNSCC) UDSCC1, -2, -3, -5, -6 und UMSCC10A, die B-Zell-Lymphomzelllinie NAMALWA sowie die Prostatakarzinomzelllinie PC-3 untersucht. Die Zellen wurden unter normoxischen Bedingungen mit Zellkulturmedium unter Zusatz von 1% igem FBS kultiviert. Zusätzlich wurde DMSO als Kontrolle (schwarz) oder in DMSO gelöstes PSB (PSB603) aufsteigender Konzentrationen (hell- bis dunkelgrün) hinzugegeben. Die Zellzahl wurde durch einen MTT-Assay photometrisch zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h, 48 h und 72 h bestimmt. Es ist jeweils der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten aufgetragen sowie die Standardabweichung als Fehlerbalken. *: signifikant im Vergleich zur Kontrolle mit p<0,05; **: signifikant im Vergleich zur Kontrolle mit p<0,01

Abb. 9 PSB603 verlangsamt die Wundheilung von HNSCCs in Scratch-Assays (modifiziert -54nach Wilkat et al [93] unter Creative Commons Attribution 4.0 International License, <u>https://creativecommons.org/licenses/by/4.0</u>)

> Es wurden die fünf Kopf-Hals-Karzinomzelllinien (HNSCC) UDSCC1, -2, -3, -5, und -6 sowie die Prostatakarzinomzelllinie PC-3 untersucht. Die Zellen wurden unter normoxischen Bedingungen mit Zellkulturmedium unter Zusatz von 1%igem FBS kultiviert. Zusätzlich wurde DMSO als Kontrolle (schwarz) oder in DMSO gelöstes NECA (blau), NECA+PSB (grau) oder PSB (grün) jeweils mit einer Konzentration von 1 μM hinzugegeben. Der Durchmesser der Wunde wurde unter einem Lichtmikroskop zu den Zeitpunkten 0 h, 12 h, 24 h und 48 h bestimmt (h: Stunden).

> A Es sind lichtmikroskopische Aufnahmen einer Wunde in einem Monolayer von UDSCC5 dargestellt zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h und 48 h nach Setzen des Kratzers und unter den verschiedenen Konditionen.

B Es ist die abgeschlossene Wundheilung in % gegen die Zeit in h aufgetragen. Es ist jeweils der Mittelwert aus bis zu drei unabhängigen Experimenten aufgetragen sowie die Standardabweichung als Fehlerbalken.
*: signifikant im Vergleich zur Kontrolle mit p<0,05; **: signifikant im Vergleich zur Kontrolle mit p<0,01

Abb. 10 **PSB603 verringert die Migrationsrate von HNSCCs in Transwell-Assays (modifiziert** -56nach Wilkat et al [93] unter Creative Commons Attribution 4.0 International License, <u>https://creativecommons.org/licenses/by/4.0</u>)

> Es wurden die zwei Kopf-Hals-Karzinomzelllinien (HNSCC) UDSCC1 und -5 sowie die Prostatakarzinomzelllinie PC-3 untersucht. Es wurde ein Zweikammersystem verwendet, welches die Transmigration von Zellen durch eine Polycarbonat-Membran mit 8 μm großen Poren erlaubt. In die obere Kammer wurden die Zellen mit FBS-freiem, 0,1%igem BSA-Medium gegeben, die untere Kammer wurde mit 10%igem FBS versetztem Zellkulturmedium gefüllt. Zusätzlich wurde DMSO als Kontrolle (schwarz) oder in DMSO gelöstes NECA (blau), NECA+PSB (grau) oder PSB (grün) jeweils mit einer Konzentration von 1 μM hinzugegeben. Die Platten wurden für 16 h unter normoxischen Bedingungen kultiviert und anschließend mit Hilfe einer DAPI-Färbung und einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

A Es sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der transmigrierten UDSCC5-Zellen in der DAPI-Färbung unter den verschiedenen Konditionen dargestellt.

B Es sind die migrierten Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle in % für die untersuchten Zelllinien aufgetragen. Es ist jeweils der Mittelwert aus bis zu drei unabhängigen Experimenten aufgetragen sowie die Standardabweichung als Fehlerbalken. *: signifikant im Vergleich zur Kontrolle mit p<0,05; ** (schwarz): signifikant im Vergleich zur Kontrolle mit p<0,01; ** (rot): signifikant im Vergleich zu NECA+PSB mit p<0,01

Abb. 11 **PSB603 verringert signifikant die VEGF-Sekretion der HNSCCs (modifiziert nach** -57-Wilkat et al [93] unter Creative Commons Attribution 4.0 International License, <u>https://creativecommons.org/licenses/by/4.0</u>)

> Es sind die VEGF-Konzentrationen in pg/ml für die DMSO-Kontrolle und die PSB603-Probe aufgetragen für die untersuchten Zelllinien zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h (VEGF: vascular endothelial growth factor; h: Stunden). Es wurden die zwei Kopf-Hals-Karzinomzelllinien (HNSCC) UDSCC1 und -5, die Prostatakarzinomzelllinie PC-3 sowie die B-Zelllymphomzelllinie NAMALWA untersucht. Die Zellen wurden unter normoxischen Bedingungen mit Zellkulturmedium unter Zusatz von 1%igem FBS kultiviert und je 1 μ M DMSO als Kontrolle oder in DSMO gelöstes PSB603. Zu den gegebenen Zeitpunkten wurden Überstände abgenommen und mittels ELISA die Konzentration von VEGF bestimmt. Es ist jeweils der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten aufgetragen sowie die Standardabweichung als Fehlerbalken. *: signifikant im Vergleich zur Kontrolle des entsprechenden Zeitpunktes mit p<0,05; **: signifikant im Vergleich zur Kontrolle des entsprechenden Zeitpunktes mit p<0,01

Abb. 12 Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse

Die untersuchten Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinien (HNSCC) exprimieren kein CD39 (violettes Oberflächenmolekül) auf ihrer Oberfläche, jedoch CD73 (pinkfarbenes Oberflächenmolekül). CD39 dient als Oberflächenenzym zur Degradierung von ATP (Adenosintriphosphat) zu AMP (Adenosinmonophosphat), während CD73 zur Degradierung von AMP zu ADO (Adenosin) dient. Ob CD73 eine enzymatische Aktivität zur Phosphohydrolyse von AMP zu ADO zeigt, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Von den vier Adenosinrezeptor-Subtypen ADORA1 (grüner Rezeptor), ADORA2A (gelber Rezeptor), ADORA2B (orangefarbener Rezeptor) und ADORA3 (brauner Rezeptor) exprimieren HNSCC-Zelllinien lediglich den Subtyp ADORA2B.

Der Zusatz von ADO, dem natürlichen Agonisten an ADORA2B, hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferationsrate der HNSCC-Zelllinien. NECA, ein chemisch stabilerer Agonist an ADORA2B, zeigte einen geringen positiven Effekt auf die Proliferations- und Migrationsrate der HNSCC-Zelllinien. PSB603 als inverser Agonist an ADORA2B zeigte einen starken inhibierenden Einfluss auf die Proliferations-, Migrations- und VEGF-Sekretionsrate mit einem hohen Signifikanzniveau. Dies deutet darauf hin, dass ADORA2B als konstitutiv aktivierter Rezeptor (markiert mit gelbem *) in HNSCC-Zelllinien vorliegen könnte.

-59-

- Tab. 1
 Immortalisierte humane Zelllinien verschiedenen Ursprungs, welche als Kontrolle
 -9

 bei verschiedenen Experimenten der vorliegenden Arbeit dienten
 ATCC: American Type Culture Collection
- Tab. 2 Immortalisierte Zelllinien ausgehend von humanen Plattenepithelkarzinomen aus -10dem Kopf-Hals-Bereich modifiziert nach Lansford et al.: Chapter 28 Head and Neck Cancers. In: Masters JRW, Palsson B (Hrsg) Human Cell Culture, Bd II, 1. Aufl, Kluwer Academic Publishers: 185–255 (1999) [44] und Hoffmann et al.: Alterations in the p53 pathway and their association with radio- and chemosensitivity in head and neck squamous cell carcinoma. Oral oncology 44: 1100–1109 (2008) [33] Aufgeführt sind Name der Zelllinie, Alter (in Jahren) und Geschlecht (m: männlich; w:

weiblich) des Patienten, TNM-Klassifikation (T: Tumor; N: Nodus; M: Metastase) und Stadium der Erkrankung, Differenzierungsgrad (G), HPV-16- (humanes Papillomavirus 16) und p53-Status des Tumors, Entnahmestelle der Probe, Läsionstyp und primäre Lokalisation des Tumors sowie vorhergehende Therapien (ND: Neck Dissection; RT: Radiotherapie; CX: Chemotherapie). n.a.: nicht angegeben

Tab. 3Informationen zu verwendeten Primern (Teil 1)

Aufgeführt sind Name des untersuchten Zielgens (*ADORA*: adenosine receptor), Amplicon-Größe in Nucleotidanzahl (nt) und Verwendung des entsprechenden Primerpaares (endpoint polymerase chain reaction (end point PCR) oder quantitative polymerase chain reaction (qPCR)) sowie Nukleotidsequenz (A: Adenosin; C: Cytosin; G: Guanin; T:Thymin), Primerlänge in Nucleotidanzahl (Länge in nt), Schmelztemperatur in Grad Celsius (Tm in °C) und prozentualer Gehalt an Guanin-Cytosin-Basenpaaren (GC%) des jeweiligen Primers (forward und reverse).

Tab. 4Informationen zu verwendeten Primern (Teil 2)

Aufgeführt sind Name des untersuchten Zielgens (*B2M*: beta-2-microglobulin; *CD*: cluster of differentiation; *GAPDH*: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *HPRT1*: hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; *RPL13A*: ribosomal protein L13a), Amplicon-Größe in Nucleotidanzahl (nt) und Verwendung des entsprechenden Primerpaares (endpoint polymerase chain reaction (end point PCR) oder quantitative polymerase chain reaction (qPCR)) sowie Nukleotidsequenz (A: Adenosin; C: Cytosin; G: Guanin; T:Thymin), Primerlänge in Nucleotidanzahl (Länge in nt), Schmelztemperatur in Grad Celsius (Tm in °C) und prozentualer Gehalt an Guanin-Cytosin-Basenpaaren (GC%) des jeweiligen Primers (forward und reverse).

Tab. 5 Verwendete Adenosinrezeptorliganden

NECA: 5'-N-ethylcarboxamidoadenosine; IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry; DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium; RPMI: Roswell Park Memorial Institute Medium; DMSO: Dimethylsulfoxid

- Tab. 6
 Amplifikationsprotokoll für die end-point PCR (englisch polymerase chain reaction)
 -26
- Tab. 7Amplifikationsprotokoll für die qPCR (englisch quantitative polymerase chain -27-
reaction)

-13-

-12-

-15-

Tab. 8Schema der Färbungen der Durchflusszytometrie-Proben

Es wurden folgende Antikörper verwendet: mit PE-Cyanine 7 gekoppelte CD39-Antikörper (CD39-AK), mit PE-Cyanine 7 gekoppelte ISO-Kontrollantikörper, mit eFluor 450 gekoppelte CD73-Antikörper (CD73-AK) und mit eFluor 450 gekoppelte ISO-Kontrollantikörper. CD: cluster of differentiation

Danksagungen

Die Danksagung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.