

Aus der
Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Dr. Martin Canis

Funktion von EpCAM in der Epithelialen-Mesenchymalen Transition in HNO-Karzinomen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von

Julius Hagen Shakhtour

aus Düsseldorf

Jahr
2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. Olivier Gires

Mitberichterstatter:

PD Dr. Matthias Illmer

Prof. Dr. Heiko Hermeking

Dekan:

Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung:

13.06.2024

Eidesstattliche Versicherung

Shakhtour, Julius Hagen

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Funktion von EpCAM in der Epithelialen-Mesenchymalen Transition in HNO-Karzinomen

Selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe. Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 13.06.2024

Ort, Datum

Julius Hagen Shakhtour

Unterschrift Julius Shakhtour

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
1. Einleitung	5
1.1 Krebs	5
1.1.1 HNO-Karzinome	5
1.1.2 Karzinogenese.....	7
1.2 Epitheliale-Mesenchymale Transition.....	9
1.2.1 EMT-Signalwege	10
1.2.2 EMT in Krebs, Klinik und Therapie	13
1.3 EpCAM	16
1.3.1 EpCAM Gen.....	17
1.3.2 EpCAM Protein, Spaltung und Funktion als Zelladhäsionsmolekül.....	17
1.3.3 EpCAM in Krebs, Klinik und Therapie	19
1.3.4 EpCAM in der EMT	21
2. Zielsetzung	23
3. Material	24
3.1 Chemikalien, Kits und Verbrauchsmaterialien.....	24
3.1.1 Chemikalien	24
3.1.2 Kits.....	26
3.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	26
3.2 Geräte, Computerprogramme und Dienstleistungen.....	28
3.2.1 Geräte	28
3.2.2 Computerprogramme.....	30
3.2.3 Dienstleistungen	31
3.3 Antikörper	31
3.4 qRT-PCR Primer	32
3.5 Zelllinien	33
3.6 Puffer und Stammlösungen.....	34
3.6.1 Zellkultur	34

3.6.2 MTT-Assay	35
3.6.3 SDS-Page und Western Blot	35
3.6.4 Durchflusszytometrie	36
4. Methoden	37
4.1 Zellkultur	37
4.1.1 Kultivierung, Konservierung und Reaktivierung von Krebszellen	37
4.2 Funktionsassays	37
4.2.1 Proliferationsassay	37
4.2.2 Migrationsassay	38
4.3 Chemoresistenz und MTT-Assay	39
4.4 Molekularbiologische Versuche	40
4.4.1 BCA-Assay	40
4.4.2 SDS-Page und Western Blot	41
4.4.3 Immunpräzipitation	41
4.4.4 mRNA Extraktion und Herstellung von cDNA	42
4.4.5 Real-time quantitative PCR	42
4.4.6 Durchflusszytometrie	44
5. Ergebnisse	45
5.1 Funktion der EMT in wildtypischen Karzinomzelllinien	45
5.1.1 Phänotypische Marker und Zellmorphologie in wildtypischen Karzinomzelllinien	46
5.1.2 EMT-Transkriptionsfaktoren in wildtypischen Karzinomzelllinien	49
5.1.3 Proliferation und Migration in wildtypischen Karzinomzelllinien	50
5.1.4 Chemoresistenz in wildtypischen Karzinomzelllinien	53
5.2 Funktion der EMT in Kyse30 EpCAM Knockdown Zelllinien	55
5.2.1 EpCAM Knockdown führt partiell zu mesenchymalen und phänotypischen Veränderungen in Kyse30 Zellen	56
5.2.2 EpCAM Knockdown führt zum Anstieg der Twist mRNA-Expression in Kyse30 Zellen	59
5.2.3 EpCAM Knockdown führt zu einer verminderten Migrationsrate und hat keinen Einfluss auf die Proliferation in Kyse30 Zellen	60

5.2.4 EpCAM Knockdown führt zur partiell erhöhten Resistenz gegen 5-FU in Kyse30 Zellen	63
6. Diskussion	65
6.1 EpCAM Knockdown führte zur Erhöhung von mesenchymalen Markern	66
6.2 EpCAM Knockdown führte zur Erhöhung von EMT-Tfs	67
6.3 EpCAM Knockdown führte zur Resistenz gegen 5-FU	69
7. Zusammenfassung/Abstract.....	71
8. Literaturverzeichnis	73
9. Abbildungsverzeichnis.....	89
10. Tabellenverzeichnis	90
11. Abkürzungsverzeichnis.....	91
12. Danksagung	94
13. Publikationsliste	95

1. Einleitung

1.1 Krebs

Laut der World Health Organization (WHO) ist Krebs weltweit die häufigste Ursache für eine Krankheitslast (Global Burden of Disease), gemessen an verlorenen Jahren aufgrund vorzeitigen Todes (cause-specific Disability-Adjusted Life Years). Krebs ist zudem führende Ursache für einen krankheitsbedingten Tod, an erster Stelle in Nord- und Südamerika, an zweiter Stelle in Südostasien, Europa und in den östlichen Mittelmeerländern und an vierter Stelle in Afrika (World Health Organization, 2018). Die Todesursache ist in vielen Fällen nicht der Primärtumor, sondern die Metastasierung und die damit einhergehende Therapierefraktärheit und Exazerbation der Erkrankung (Mehlen & Puisieux, 2006; Weigelt, Peterse, & Van't Veer, 2005). Besseres Verständnis der Prävention und Entstehung von Metastasierung und molekularen Geschehnissen ist demnach wichtig für eine effiziente Therapie und ein Thema von globaler Dringlichkeit.

1.1.1 HNO-Karzinome

Unter dem Begriff HNO-Karzinome werden meist Plattenepithelkarzinome aus dem Larynx, Pharynx, der Mundhöhle und der Nasenhöhlen zusammengefasst. HNO-Karzinome waren 2018, mit ca. 890.000 Neuerkrankungen, weltweit die sechsthäufigste Krebsentität (Bray et al., 2018; Ferlay et al., 2019). Männer sind zwei- bis vierfach häufiger betroffen als Frauen. Bei Diagnosestellung beträgt das mittlere Alter bei Karzinomen, die keine virale Genese haben, ca. 66 Jahren. Humane Papillomviren (HPV) bzw. Epstein-Barr-Viren (EBV) assoziierte Karzinome werden im Mittel mit ca. 53 bzw. ca. 50 Jahren diagnostiziert (Fung, Lam, & Chan, 2016; Windon et al., 2018). Starker Tabak- und Alkoholkonsum, als synergistisch wirkende ätiologische Risikofaktoren, und eine Infektion mit HPV und EBV sind größtenteils ursächlich für die Entstehung eines HNO-Karzinoms (Hennessey, Westra, & Califano, 2009; Talamini et al., 2002; Tsang, Lui, Bruce, Pugh, & Lo, 2020). Eine Infektion mit HPV ist mit über 70 % der Oropharynxkarzinome assoziiert (Stein et al., 2015). HPV-16 wurde, neben HPV-18, HPV-31, HPV-33 und HPV-52, mit Abstand am häufigsten als Hochrisiko-Subtyp diagnostiziert (Michaud et al., 2014). Während, teilweise aufgrund geringerem Tabakkonsum, die Inzidenz in Teilen der Welt sinkt, steigen die

Fälle von HPV-induzierten Oropharynxkarzinomen vornehmlich in der jüngeren Bevölkerung in Europa und Nordamerika (Gillison, Chaturvedi, Anderson, & Fakhry, 2015; Global Burden of Disease Cancer et al., 2017; Mourad et al., 2017). Symptomatisch machen sich HNO-Karzinome unterschiedlich bemerkbar. Betroffene Patienten leiden beispielsweise an Dysphagie, Dysphonie und Ulzerationen (Mehanna, Paleri, West, & Nutting, 2010). Obwohl die meisten Patienten sich mit einem Karzinom de novo präsentieren, gibt es makroskopische, präkanzeröse Läsionen der Schleimhaut, die sich als weiße Leukoplakien, bzw. rote Erythroplakien zeigen (Brouns et al., 2014). Daneben gibt es, nur mikroskopisch als dysplastisches Epithel sichtbar, weitreichende Läsionen der Schleimhaut, die bereits 1953 zur Formulierung des Konzepts der Feldkanzerisierung führten. Dieses beschreibt, dass das Epithel sich, aufgrund des breitflächigen Kontakts mit Kanzerogenen wie Tabak und Alkohol, an mehreren Stellen dysplastisch verändert und damit auch das hohe Risiko eines Rezidivs und Zweittumors birgt (Slaughter, Southwick, & Smejkal, 1953). HNO-Karzinome werden anhand der anatomischen Lage, nach der TNM-Klassifikation maligner Tumore (TNM), dem Union for International Cancer Control (UICC) System und im Fall des Oropharynxkarzinoms nach dem HPV-Status eingeteilt. Eine Einteilung anhand von Genexpressionsmustern ist bisher nicht etabliert (Amin et al., 2017; Chow, 2020; Leemans, Snijders, & Brakenhoff, 2018). Ca. 30 bis 40 % der Patienten präsentieren sich mit Tumoren im Stadium I oder II, während mehr als 60 % der Patienten sich bei Diagnosestellung bereits im Stadium III oder IV befinden. In frühen Stadien erfolgt eine Therapie mittels Operation oder Radiotherapie; je nach anatomischer Lage und im Hinblick auf den Funktionserhalt betroffener Organe. Beide Modalitäten führen zu gleichwertigen Therapieerfolgen mit einer Langzeit Überlebensrate von ca. 70 bis 90 % (Chow, 2020; Pfister et al., 2014). Tumoren in fortgeschrittenen Stadien werden nach anatomischer Möglichkeit und unter größtmöglichem Erhalt des gesunden Gewebes operiert, gefolgt von einer adjuvanten Chemo- oder Radiochemotherapie. Bei Inoperabilität erfolgt eine definitive Radiochemotherapie (Chow, 2020; Pignon, le Maitre, Maillard, Bourhis, & Group, 2009). Die Chemotherapie enthält ein platinhaltiges Medikament wie Cisplatin. Stattdessen oder in Kombination mit Cisplatin kann Cetuximab als monoklonaler Antikörper, der gegen den epidermal growth factor receptor (EGFR) gerichtet ist, gegeben werden. Bei einem Rezidiv oder in einer palliativen Situation erfolgt eine Therapie mit einer Mono- oder Kombinationstherapie bestehend aus Cisplatin, 5-

Fluoruracil (5-FU), Cetuximab und programmed death-ligand 1 (PD-L1) Inhibitoren Pembrolizumab und Nivolumab (Chow, 2020; Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2021; Moskovitz, Moy, & Ferris, 2018). Lokal fortgeschrittene Tumoren bergen ein hohes Risiko für das Auftreten von Rezidiven und Zweitumoren, sowohl im Kopf-Hals Bereich als auch in den Lungen und anderen Arealen, und haben ein 5-Jahres Gesamtüberleben von weniger als 50 % (Braakhuis, Brakenhoff, & Leemans, 2012; Gan et al., 2013). HPV-positive Patienten jedoch haben eine günstigere Prognose, da sie besser auf die Radio- und Chemotherapie ansprechen, im Mittel jünger sind und im Allgemeinen weniger Komorbiditäten haben durch geringeren Alkohol- und Tabakkonsum als HPV-negative Patienten (Coordes et al., 2016; Zhang, Edwards, Fang, Flemington, & Zhang, 2016).

1.1.2 Karzinogenese

Als Karzinogenese, oder auch Onkogenese, bezeichnet man den Prozess, in dem eine somatische Zelle zu einer Krebszelle wird. DNA-Mutationen sind hierbei von besonderer kausaler Bedeutung (Miller & Miller, 1981). Jede Zelle des menschlichen Körpers erleidet täglich zehntausende genomische Schäden (Lindahl & Barnes, 2000). Beispielhaft dafür sind endogene Ursachen (fehlerhafte DNA-Replikation und oxidativer Stress durch das Immunsystem (Basu, 2011; Fialkow, Wang, & Downey, 2007)), Infektionen (radikale Sauerstoffspezies durch *Helicobacter pylori* (Handa, Naito, & Yoshikawa, 2011)), sowie exogene Noxen (Tabakrauchen, Ultraviolettstrahlung, ionisierende Strahlung, mit Aflatoxinen kontaminierte Lebensmittel und Chemotherapeutika (Doll & Peto, 1981; Kielbassa, Roza, & Epe, 1997; Roos & Kaina, 2013; Ward, 1988; Wogan, Hecht, Felton, Conney, & Loeb, 2004)). In den meisten Fällen werden diese Mutationen durch zelleigene Reparaturmechanismen beseitigt (Hoeijmakers, 2001). Sind die Schäden zu gravierend, kann es zur Aktivierung des kontrollierten Zelltodes (Apoptose) oder zur Nekrose kommen (Roos & Kaina, 2006). Sollte die Funktion der DNA-Reparatur oder die der Apoptose durch weitreichende Schäden gestört sein, akkumulieren die Mutationen teilweise über Jahre bis Jahrzehnte und begünstigen weitere Mutationen, welche u. a. die Zellproliferation beeinflussen. In diesem Zusammenhang unterscheidet man auf die Proliferation förderlich wirkende Protoonkogene von Tumorsuppressorgenen, welche das Wachstum von Zellen regulieren. Mutationen in Protoonkogenen können die Genexpression deregulieren und damit Funktion und

Anzahl der gebildeten Proteine erhöhen; fortan spricht man von Onkogenen. Diese mutierten Onkogene fördern das Zellwachstum und Zellüberleben. Häufige Mutationen und Beispiele sind chromosomale Translokationen (Bcr-Abl bei chronischer myeloischer Leukämie (CML)), Punktmutationen (RAS beim Pankreaskarzinom) und Genamplifikationen (HER2/neu beim Mammakarzinom) (Bishop, 1991; Croce, 2008).

Tabelle 1: Beispiele wichtiger Gruppen von Onkogenen

Onkogengruppe	Vertreter	Beispielhafte Erkrankung
Apoptoseinhibitoren	BCL2	B-Zell Lymphom
Transkriptionsfaktoren	MYC	Neuroblastom, chronische lymphatische Leukämie, Burkitt-Lymphom, HNO-Karzinom
Wachstumsfaktoren	v-SIS	Gliom, Fibrosarkom
Tyrosinkinaserzeptoren	EGFR; HER2/neu	HNO-Karzinom, kolorektales Karzinom; Mammakarzinom
Signaltransduktionsproteine	RAS; BRAF	Kolorektales Karzinom, akute myeloische Leukämie; Melanom

(Bagci & Kurtgoz, 2015; Beroukhim et al., 2010; Croce, 2008)

Bekanntes Tumorsuppressorgene sind das Retinoblastom Gen (Rb-Gen) und das p53 Gen. Im Jahr 1971 postulierte Knudson, dass zwei Mutationen in Tumorsuppressorgenen zum Funktionsverlust nötig sind und entdeckte 1976 Deletionen des Rb-Gens an Retinoblastomen. Diese machten es zum ersten bekannten Tumorsuppressorgen und führte zur Etablierung der allgemein anerkannten Two-Hit-Hypothese (Knudson, 1971; Knudson, Meadows, Nichols, & Hill, 1976). Rb reguliert den Zellzyklus, die Zelldifferenzierung und die Apoptose (Nevins, 2001). p53 ist an der Entstehung von mehr als 50 % aller Tumoren beteiligt und das häufigste inaktivierte Gen bei Krebs (Olivier et al., 2002; Sherr, 2004). p53 wirkt als Transkriptionsfaktor und wird aktiviert durch vielfältige Formen zellulären Stresses, wie

Bestrahlung, Hypoxie und Onkogenaktivierung, blockiert die Proliferation und kann die Apoptose einleiten (Prives, 1998). Uneingeschränkte Proliferation und das Umgehen der Apoptose durch Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen sind charakteristisch für Krebs. Diese und weitere Mechanismen der Krebsentstehung fasste Hanahan im Jahr 2022 zu 14 grundsätzlichen Merkmalen von Krebs zusammen, welche er als „Hallmarks of Cancer“ bezeichnete (Abbildung 1) (Hanahan, 2022).

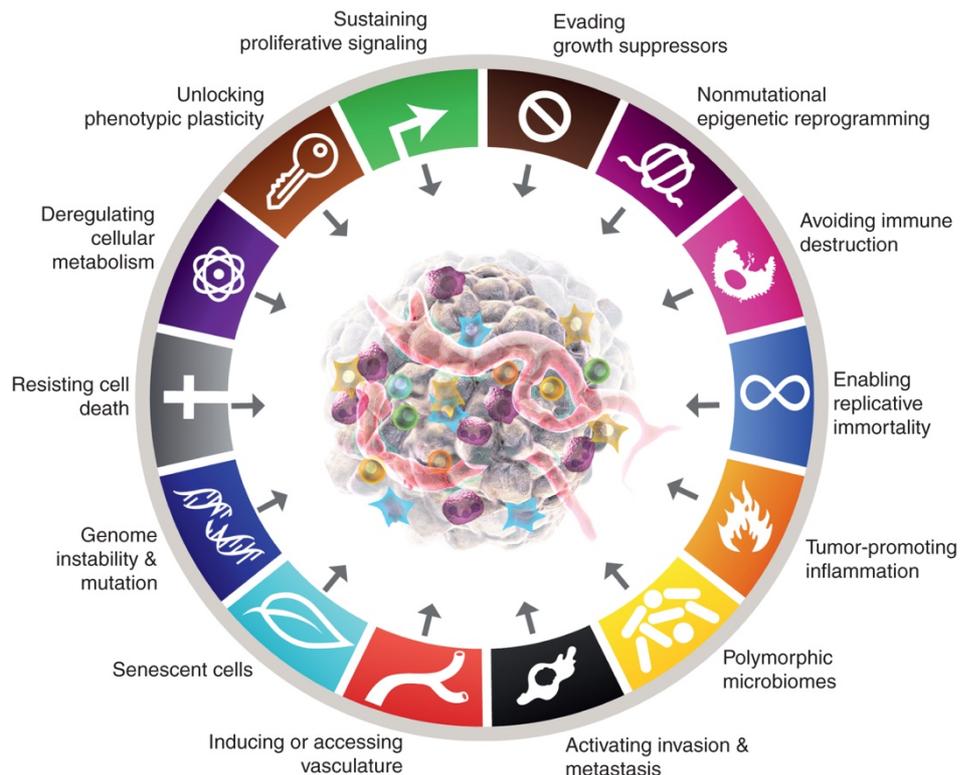


Abbildung 1: “Hallmarks of Cancer”

Die im Jahr 2022 von Hanahan veröffentlichten grundsätzlichen Merkmale von Krebs (Hanahan, 2022).

1.2 Epitheliale-Mesenchymale Transition

Während der Embryogenese kommt es zu einer Differenzierung von pluripotenten Stammzellen zu spezialisierten, somatischen Zellen, die sich in Morphologie, Funktion, Interaktion mit anderen Zellen, Genexpression und zellulärem Metabolismus unterscheiden. Gemeinsam ermöglichen sie die Bildung und Funktion der einzelnen Gewebe und Organe. So sind Epithelzellen stark miteinander durch Zell-Zell-Verbindungen verbunden, haben eine apikale-basolaterale Ausrichtung und bilden eine Barriere zwischen Umwelt und Körper. Mesenchymzellen dagegen, wie z. B.

Fibroblasten, interagieren lose miteinander, besitzen keine Ausrichtung und haben eine spindelförmige Morphologie (Thiery & Sleeman, 2006). Eine Umwandlung zwischen Epithel- zu Mesenchymzellen wurde bereits 1908 beschrieben (Lillie, 1908), jedoch dauerte es bis zum Jahr 1982, dass diese Beobachtung als eindeutiger Prozess als Epitheliale-Mesenchymale Transformation erkannt wurde (Greenburg & Hay, 1982). Im Verlauf der Forschung prägte sich der Begriff Epitheliale-Mesenchymale Transition (EMT) und es wurde klar, dass bestimmte Epithelzellen während der Embryogenese und Organbildung hin und her wechseln zwischen epithelialen und mesenchymalen Eigenschaften und damit mehrere Zyklen EMT und eine gegenläufige Mesenchymale-Epitheliale Transition (MET) durchlaufen (Lee, Dedhar, Kalluri, & Thompson, 2006).

Heutzutage wird EMT als wichtiger Bestandteil in Embryogenese, Wundheilung, Fibrose und Krebsprogression angesehen (Kalluri & Weinberg, 2009; Thiery, Acloque, Huang, & Nieto, 2009). Zur besseren Übersicht des Themas wurde die EMT in drei verschiedenen Arten unterteilt; je nach Kontext. Dies wurde u. a. 2007 auf einem Kongress zur EMT in Polen diskutiert. Typ 1 und Typ 2 EMT sind assoziiert mit Embryogenese bzw. mit Wundheilung und Organfibrosierung, während Typ 3 EMT mit der Progression von Krebserkrankungen verbunden ist (Kalluri & Weinberg, 2009; Lim & Thiery, 2012; Zeisberg & Kalluri, 2013).

1.2.1 EMT-Signalwege

Die Orchestrierung der EMT besteht aus einem komplexen Zusammenspiel aus verschiedenen Signalwegen, Transkriptionsfaktoren und epigenetischen Veränderungen. Oft untersuchte Signalwege beinhalten unter anderem transforming growth factor β (TGF- β), epidermal growth factor (EGF), hepatocyte growth factor (HGF), Wnt/ β -catenin, Hedgehog und Notch, welche EMT induzierende Transkriptionsfaktoren (EMT-Tfs) wie zinc finger protein SNAI1 und SNAI2 (Snail und Snail2, auch bekannt als Slug), twist-related protein 1 (Twist), zinc finger E-box-binding homeobox 1 und 2 (ZEB1 und ZEB2) und einige andere Tfs aktivieren (De Craene & Berx, 2013; Hugo, Wafai, Blick, Thompson, & Newgreen, 2009; Kokudo et al., 2008; Niessen et al., 2008; Ochoa-Hernandez, Juarez-Vazquez, Rosales-Reynoso, & Barros-Nunez, 2012; Shi & Massague, 2003; Suarez-Causado et al., 2015; Thiery, 2002; Yoo et al., 2011). Diese EMT-Tfs haben eine wechselseitige und oft

synergistische Beziehung zueinander. Snail reguliert Slug und Twist (Smit, Geiger, Song, Gitelman, & Peeper, 2009; Thuault et al., 2008) und Twist aktiviert zusammen mit Snail die ZEB1 Expression (Dave et al., 2011). Die Expression von Genen, die Zell-Zell Kontakte, Migrations- und Invasionsfähigkeiten beeinflussen, werden durch die EMT reguliert. Dadurch verlieren die Zellen ihre epithelialen Eigenschaften und Marker, wie das epithelial cadherin (E-Cadherin) und das epithelial cell adhesion molecule (EpCAM), und erlangen mehr und mehr ein mesenchymales Expressionsmuster, hervorgehoben durch z. B. neural cadherin (N-Cadherin) und Vimentin.

Eine zentrale Rolle in der EMT nimmt der Verlust von Zell-Zell Kontakten, insbesondere von E-Cadherin, ein (J. Yang & Weinberg, 2008). Snail, Slug und ZEB1 binden mit ihrer Zinkfingerdomäne an die E-Box Sequenz im Promoter und inhibieren die Transkription von E-Cadherin direkt (Bai, 2017; Battle et al., 2000; Eger et al., 2005). Die Expression der Tight Junctions Proteine Claudin und Occludin wird zusätzlich von Snail und Slug inhibiert (Martinez-Estrada et al., 2006; Z. Wang et al., 2007). Ob Twist die Transkription von E-Cadherin ebenfalls direkt, oder indirekt beeinflusst, ist aufgrund widersprüchlicher Daten unklar (Vesuna, van Diest, Chen, & Raman, 2008; J. Yang & Weinberg, 2008). Zudem erhöht Twist auch die N-Cadherin Expression, was man als Cadherin-Switch bezeichnet. Dieser Cadherin-Switch führt zu einer verstärkten Affinität der Zellen zu anderen mesenchymalen Zellen und N-Cadherin Verbindungen, die weniger stark als E-Cadherin Verbindungen sind und Zellmigration und -invasion ermöglichen (Theveneau & Mayor, 2012; Wheelock, Shintani, Maeda, Fukumoto, & Johnson, 2008; Yilmaz & Christofori, 2009).

Neben dem Verlust von Zell-Zell Kontakten ist die Veränderung des Zytoskeletts ein entscheidender Schritt zur Mobilitätssteigerung und zum Erlangen von invasiven Eigenschaften. Die Intermediärfilamente von Epithelzellen bestehen normalerweise aus Zytokeratinen. Während der EMT kommt es zur verstärkten Expression von Vimentin Intermediärfilamenten, was zur Induktion des mesenchymalen Phänotyps und gesteigerter Mobilität führt (Mendez, Kojima, & Goldman, 2010). Das Aktinzytoskelett ist in Epithelien mit E-Cadherin verbunden und trägt zur Stabilisierung der Zelle bei. In mesenchymalen Zellen und durch die EMT kommt es zur Reorganisation von Aktin zur Zellperipherie. Hier beteiligt es sich an der Bildung von Zellausstülpungen (Filopodien und Lamellipodien) und invasiven Invadopodien und

wird umgebaut in kontraktile Aktin Stress-Fibrillen (Haynes, Srivastava, Madson, Wittmann, & Barber, 2011; Morris & Machesky, 2015).

Obwohl die EMT Treiber der Snail, ZEB und Twist Familien im Besonderen häufig in der Literatur beschrieben wurden, und deswegen auch Master-Transkriptionsfaktoren genannt werden (De Craene & Berx, 2013), sind die der phänotypischen Ausrichtung von Zellen zugrunde liegenden Wirkmechanismen weitreichender. Der epitheliale Status wird durch andere epithelspezifische Transkriptionsfaktoren (Tfs) wie grainhead-like Protein 2 (GRHL2), E74-like ETS transcription factor 3 und 5 (ELF3 und ELF5) und einige microRNAs definiert. GRHL2, ELF3 und ELF5 werden während der EMT inhibiert und induzieren die MET, wenn sie exprimiert werden (Chakrabarti et al., 2012; Cieply et al., 2012; De Craene & Berx, 2013). Nichtkodierende microRNAs wie miR200 und miR34, welche unter anderem durch p53 aktiviert und epigenetisch durch DNA-Methylierung inhibiert werden, vermindern die Snail und ZEB Expression und damit die EMT (Chang et al., 2011; Korpala, Lee, Hu, & Kang, 2008; Vrba et al., 2010). Vermehrt wurden auch sex determinig region Y (SRY) box TFs mit der EMT assoziiert. Bekannter Vertreter dieser Familie sind Sox2 und Sox9, welche Stammzelleigenschaften in der Embryogenese und in Krebszellen regulieren (Adachi et al., 2013; Herreros-Villanueva et al., 2013). Verschieden Studien zeigten, dass Slug durch Sox2 und Sox9, und der WNT/ β -catenin Weg durch Sox2 direkt transkriptional aktiviert werden und damit EMT, Invasion und Metastasierung beeinflussen können (H. Gao, Teng, Huang, Peng, & Wang, 2015; X. Li et al., 2013; S. C. Lin et al., 2016; C. Sun et al., 2013). Ein Sox2 Knockdown (KD) in Kolonkarzinomzellen führte zudem zu phänotypischen Veränderungen, die mit einer MET vereinbar sind (Han et al., 2012).

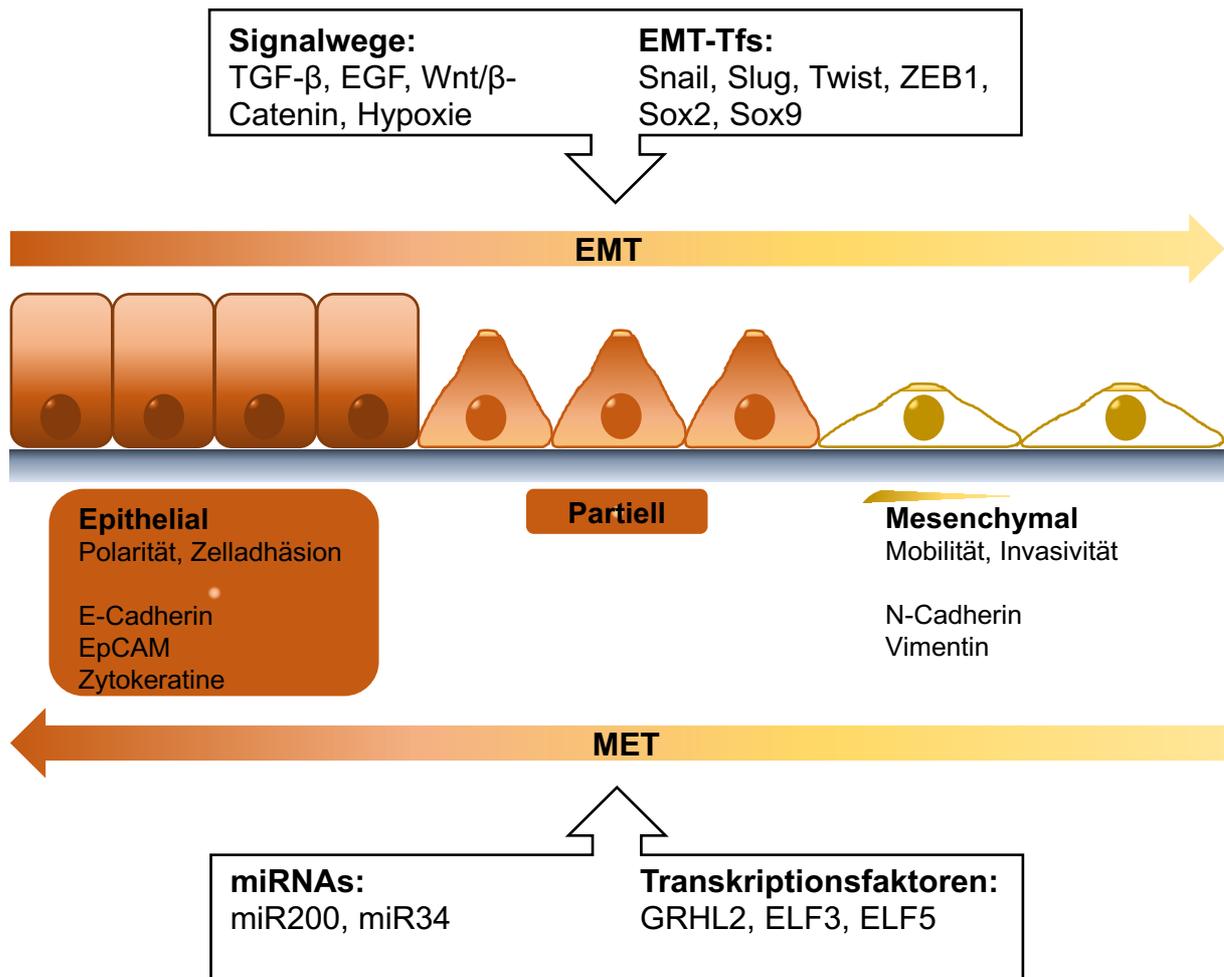


Abbildung 2: Schematische Darstellung der EMT/MET

Molekularbiologisch beeinflussen verschieden Signalwege, Transkriptionsfaktoren und miRNAs die EMT und die dazu gegenläufige MET. Die dadurch bewirkte Transition von Zellen zwischen epithelialen und mesenchymalen Phänotypen, Eigenschaften und molekularen Markern kann vollständig oder partiell verlaufen.

1.2.2 EMT in Krebs, Klinik und Therapie

Um eine Metastasierung zu ermöglichen, müssen Karzinomzellen aus dem Epithelverbund ausdringen, in das Gefäßsystem gelangen und werden fortan zirkulierende Tumorzellen (circulating tumor cells, CTCs) genannt. Dies kann durch die EMT ermöglicht werden (Brabletz, Kalluri, Nieto, & Weinberg, 2018; Thiery, 2002). Durch genetische und metabolische Veränderungen erlangen die Zellen motilitätsfördernde, invasive und zum Teil Stammzeleigenschaften wie einen CD44^{high}/CD24^{low} Phänotyp (Mani et al., 2008; Morel et al., 2008). Die dadurch entstehenden Krebsstammzellen (cancer stem cells, CSCs) sind mit der Fähigkeit der Selbsterneuerung, Differenzierung in Krebszellen mit unterschiedlichen Eigenschaften und Therapieresistenz assoziiert (Ayob & Ramasamy, 2018; Singh & Settleman,

2010). Die EMT-induzierenden Signale kommen dabei häufig aus dem den Tumor umgebenden Gewebe. 2016 veröffentlichte Marcucci et al. fünf, aus der Tumorumgebung kommende, hauptverantwortliche Stimuli zur Induktion einer EMT in Tumoren. Diese beinhalten Hypoxie und niedrige pH-Werte, Interaktionen mit dem Immunsystem, mechanischer Stress, veränderte extrazelluläre Matrix und die Reaktion auf eine Chemotherapie (Marcucci, Bellone, Caserta, & Corti, 2014; Marcucci, Stassi, & De Maria, 2016). Die zellulären Veränderungen entstehen in unterschiedlicher Ausprägung und zeigen sich vor allem in Zellen am äußeren Rand des Tumors (Brabletz, Jung, Spaderna, Hlubek, & Kirchner, 2005; Thiery, 2002). Zudem gibt es Evidenz, dass die EMT kein binäres System, sondern vielmehr ein Spektrum ist, in dem Krebszellen sequenziell mesenchymaler werden, jedoch einige Eigenschaften ihres epithelialen Ursprungs behalten und sowohl epitheliale, mesenchymale als auch Hybridphänotypen annehmen können (Aiello & Kang, 2019; Kroger et al., 2019; Tam & Weinberg, 2013). Dieses Spektrum wird Epitheliale-Mesenchymale Plastizität (EMP) genannt und soll die Wandelhaftigkeit verdeutlichen, wodurch metastasierende Zellen eine ähnliche Histomorphologie wie im Primarius erreichen können (Gunasinghe, Wells, Thompson, & Hugo, 2012). Hybridphänotypen wurden bereits in verschiedenen Karzinomen und CTCs gefunden und zeichnen sich wahrscheinlich durch ein höheres Potential zur Bildung von Metastasen aus als Zellen, die eine vollständige EMT durchlaufen (Beerling et al., 2016; Lee et al., 2006; Navas et al., 2020; Pastushenko et al., 2018). Nachdem die CTCs aus dem Blutgefäß gelangen und sich in Organen ansiedeln durchlaufen sie eine MET und erlangen vermehrt epitheliale Funktionen. Analog zur Induktion der EMT durch die Tumorumgebung, können extrazelluläre Faktoren zur MET führen, welche sich wahrscheinlich von denen in der Umgebung des Primärtumors unterscheiden (Chaffer, Thompson, & Williams, 2007; Jechlinger, Grunert, & Beug, 2002).

Es gibt viele Studien zur EMT-vermittelten Resistenz von Krebszellen gegen Chemotherapeutika. Beispiele sind die EMT-assoziierte Cisplatin Resistenz von nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen und Magenkarzinomen und die Docetaxel Resistenz von Prostatakarzinomen (Huang et al., 2016; Kurokawa, Ise, Omi, Goishi, & Higashiyama, 2013; Marin-Aguilera et al., 2014). Der Verlust von epithelialen Markern und die Expression von EMT-Tfs fand sich auch in Kolonkarzinomen und ovariellen Karzinomen welche Resistenzen gegen Oxaliplatin und Paclitaxel erwarben

(Kajiyama et al., 2007; A. D. Yang et al., 2006). Zudem trägt eine hohe Snail Expression, durch eine Inhibition der p53-vermittelten Apoptose, zur Resistenz gegen einzelne Chemotherapeutika und Bestrahlung bei (Kajita, McClinic, & Wade, 2004; Kurrey et al., 2009). Neben der Chemoresistenz zeigen Studien auch eine Korrelation zwischen einer EMT-Genexpression und schlechtem klinischem Outcome (George, Jolly, Xu, Somarelli, & Levine, 2017; Tan et al., 2014; Taube et al., 2010). In klinischen Studien konnte eine signifikante Korrelation zwischen EMT-Tfs, wie Snail und Slug, und dem Aufkommen eines Tumorrezidivs in Brust-, Kolon- und Ovarkarzinomen gezeigt werden (Thiery et al., 2009). Einzelne, für die EMT typische zelluläre Veränderungen, wie der Verlust von E-Cadherin und die Expression von ZEB1, konnten als prognostisch ungünstige Faktoren charakterisiert werden (Hirohashi, 1998; Jang, Kim, Kim, Chung, & Park, 2015).

Ein weitreichendes Verständnis über die molekularen Mechanismen der EMT ist daher wegweisend zur Erforschung von möglichen neuen Therapieansätzen in der Onkologie. Ein Therapiekonzept verfolgt den Ansatz Krebszellen zu töten, die bereits eine EMT durchliefen und dadurch zu CSCs wurden, welche häufig nach konventionellen Chemotherapien im Körper verbleiben. Der zweite Ansatz sieht vor, die EMT in metastasierenden Zellen zu hemmen. Dazu gibt es bereits einige präklinische und klinische Studien. Viele der getesteten Substanzen greifen jedoch vielmehr in allgemein tumorfördernde Signalwege wie TGF- β , NF- κ B und EGF ein, und damit indirekt in die EMT Induktion (Voon, Huang, Jackson, & Thiery, 2017). Ähnliche Ansätze gibt es mit Medikamenten, die in den Zellstoffwechsel eingreifen und teilweise bereits in anderen Bereichen der Medizin eingesetzt werden. So gibt es Untersuchungen, inwiefern die Inhibition des TGF- β Signalwegs, durch Medikamente wie Simvastatin oder Rolipram, einen Einfluss auf die EMT-vermittelte Tumorprogression hat (Ramesh, Brabletz, & Ceppi, 2020). Eine pharmakologische, zielgerichtete Therapie zur Inhibition von EMT-Tfs bleibt schwierig. Ein Grund dafür ist die unzulänglich erreichbare Lokalisation der EMT-Tfs im Zellkern (Dang, Reddy, Shokat, & Soucek, 2017). Letztendlich gibt es Überlegungen, dass EMT Inhibitoren den größten Nutzen für EMT-assoziierte klinische Endpunkte, und weniger Einfluss auf das Tumorwachstum haben werden, und daher mit konventionellen Therapien kombiniert werden müssten (Elaskalani, Razak, Falasca, & Metharom, 2017).

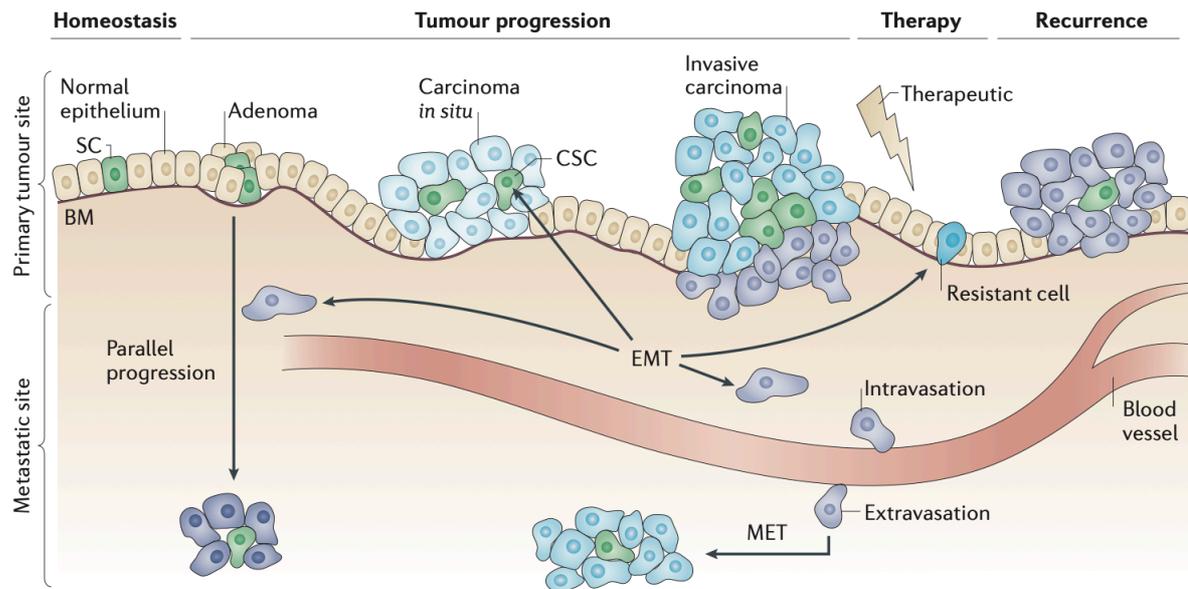


Abbildung 3: EMT als Metastasierungsmodell

EMT-bedingte Generierung von CSCs und von mesenchymalen Karzinomzellen führt zur Bildung von therapieresistenten Krebszellen und zur Ausbildung eines Rezidivs. Mobile und invasive Karzinomzellen am Tumorrand metastasieren durch Intravasation und Extravasation in Blutgefäße und anschließender MET (De Craene & Berx, 2013).

1.3 EpCAM

Das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM (epithelial cell adhesion molecule) wurde erstmalig 1979 als Tumorantigen bei menschlichen Kolonkarzinomzellen beschrieben (Herlyn, Steplewski, Herlyn, & Koprowski, 1979). Im Verlauf weiterer Jahre und Forschung wurde es weiterhin als ein kalziumunabhängiges Zelladhäsionsmolekül charakterisiert (Litvinov et al., 1997; Litvinov, Velders, Bakker, Fleuren, & Warnaar, 1994), welches mit der Proliferation von Tumoren (Litvinov et al., 1996; Schon et al., 1994), Stammzeleigenschaften (Lu et al., 2010) und seit wenigen Jahren auch mit der EMT assoziiert ist (Sankpal, Fleming, Sharma, Wiedner, & Gillanders, 2017; M. H. Wang et al., 2018). Da EpCAM auf fast allen Epithelien exprimiert wird, jedoch nicht in mesenchymalen, hämatopoetischen, neuroendokrinen Zellen und Muskelzellen (Moldenhauer, Momburg, Moller, Schwartz, & Hammerling, 1987; Trzpis, McLaughlin, de Leij, & Harmsen, 2007), wurde das Protein mehrere Male entdeckt und benannt. Weitere Namen sind tumor-associated calcium signal transducer 1 (TACSTD1) und trophoblast cell-surface antigen 1 (Trop-1) (Baeuerle & Gires, 2007).

1.3.1 EpCAM Gen

Das für humanes EpCAM kodierende Gen TACSTD1 liegt auf Chromosom 2p21, besteht aus 41,88 Kilobasen und besitzt neun Exons (Balzar, Winter, de Boer, & Litvinov, 1999). Es ist Mitglied der Genfamilie GA-733, welche neben EpCAM noch trophoblast cell-surface antigen 2 (Trop-2) als Typ-I Transmembranprotein beinhaltet (Baeuerle & Gires, 2007; Calabrese et al., 2001; Szala et al., 1990). Das Exon 1 kodiert das Signalpeptid, welches den Transport des Proteins an die Zellmembran koordiniert. Exon 2-6 kodieren den extrazellulären Teil EpEX. Die Transmembrandomäne (TMD) wird von Exon 7 kodiert. Schließlich kodieren Exon 8 und 9 den intrazellulären Teil EplCD. Insgesamt umfasst der kodierende Anteil der mRNA 945 bp (Balzar et al., 1999).

Die Transkription von EpCAM wird durch mehrere Mechanismen beeinflusst. Zum einen durch Methylierung von CpG-Dinukleotiden. Methylierte CpG-Inseln im Promoter vermindern, unmethylierte CpG-Inseln erhöhen die Expression des Gens (Alberti, Nutini, & Herzenberg, 1994; G. Yu et al., 2008). Zum anderen durch Trimethylierungen von Histonen, wobei hier die Stelle der Methylierung entscheidend ist. So führt eine Trimethylierung des Lysin4 im Histon 3 (H₃K₄) zu einer Aktivierung, eine Trimethylierung des Lysin27 im Histon 3 (H₃K₂₇) zu einer Verminderung der Transkription (Sarrach et al., 2018). Ebenso wirken TNF- α , NF- κ B und INF- γ vermindern und TCF4 verstärkend auf die Transkription (Gires, Eskofier, Lang, Zeidler, & Munz, 2003; Gires et al., 2001; Yamashita, Budhu, Forgues, & Wang, 2007).

1.3.2 EpCAM Protein, Spaltung und Funktion als Zelladhäsionsmolekül

EpCAM als ein Typ-I transmembranes Glykoprotein befindet sich mit dem N-Terminus außerhalb und mit dem C-Terminus innerhalb der Zelle. Es besteht aus insgesamt 314 Aminosäuren und hat dadurch ein errechnetes Molekulargewicht von 34,9 kDa (Wilkins et al., 1999). Das Protein hat eine 265 Aminosäuren lange extrazelluläre Domäne (EpEX) (Balzar et al., 1999). Diese beinhaltet eine EGF-ähnliche Domäne und eine Thyroglobulin Domäne, sowie drei N-Glykosylierungsstellen (N⁷⁴, N¹¹¹, N¹⁹⁸) (Baeuerle & Gires, 2007; Munz, Baeuerle, & Gires, 2009; Munz, Fellingner, Hofmann, Schmitt, & Gires, 2008). Diese zeigen sich in HNO-Karzinomen meist hyperglykosyliert (Pauli et al., 2003) und erklären die Diskrepanz zwischen dem errechneten und dem

im Western Blot gemessenen Molekulargewicht zwischen 38 und 42 kDa. Es konnte gezeigt werden, dass eine Glykosylierung an Asparagin¹⁹⁸ den stabilisierendsten Effekt auf das Protein hat (Munz et al., 2008). Auf EpEX folgt eine 23 Aminosäuren lange Transmembrandomäne aus hydrophoben Aminosäuren und die 26 Aminosäuren lange intrazelluläre Domäne (EpICD) (Strnad et al., 1989), welche zwei Alfa-Actinin-bindende Domänen besitzt, die auf das Aktinzytoskelett wirken (Balzar et al., 1998). Das N-Terminale Signalpeptid wird durch ein spezifisches Signalerkennungspartikel an den dazugehörigen Rezeptor in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) gebunden, sodass die Translation von EpCAM durch einen Kanal in das Lumen des ERs vervollständigt wird. Das Signalpeptid wird anschließend durch die Signalpeptidase abgespalten und durch die Signalpeptiddegradase degradiert (Akopian, Shen, Zhang, & Shan, 2013; Chong & Speicher, 2001). Zusätzlich wurde eine EpCAM Variante mit einer fehlenden intrazellulären Domäne in Pankreas- und Kolonkarzinomen beschrieben, welche mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert ist (Fong et al., 2014; Seeber et al., 2016).

EpCAM unterliegt einer regulierten Intramembranproteolyse (RIP) (Maetzel et al., 2009). Diese lässt sich als hochkonservierte Reaktion bei vielen Proteindegradationen und zur Einleitung von Signalkaskaden beobachten (Urban & Freeman, 2002). Das bekannteste Beispiel ist die Spaltung des amyloid precursor proteins (APP), welche zur Bildung von A β -Fragmenten führt. Diese lagern sich zu unlöslichen Plaques zusammen und sind eine Hauptursache für Morbus Alzheimer (Lichtenthaler, Haass, & Steiner, 2011). Die RIP besteht aus zwei Phasen. Zuerst kommt es zu einer Spaltung des Proteins außerhalb der Zelle durch eine von mehreren bekannten Proteasen in eine lösliche Ektodomäne und in ein in der Zellmembran verbleibendes C-terminales Fragment (CTF) (McCarthy, Coleman-Vaughan, & McCarthy, 2017). Das Abspalten der Ektodomäne, auch Shedding genannt, ist der regulierende Schritt der Reaktion (Tousseyn et al., 2009). Die zweite Stufe der RIP läuft innerhalb der Membran ab. Die Spaltung erfolgt durch einen Presenilin-2 beinhaltenden γ -Sekretasekomplex durch Gamma- und Epsilon-Spaltungen. Es entstehen ein lösliches, extrazelluläres A β -like Fragment und ein ICD (Brown, Ye, Rawson, & Goldstein, 2000). EpCAM wird analog dazu im ersten Schritt durch Metalloproteasen der ADAM-Familie (ADAM-10 und ADAM-17) gespalten. Dabei wird lösliches sEpEX frei und das EpCAM CTF verbleibt. Im zweiten Schritt entsteht durch Spaltung des EpCAM CTF durch die Gamma-

Sekretase ein extrazelluläres, lösliches A β -like Fragment und ein EpICD (Hachmeister et al., 2013; Maetzel et al., 2009; Tsaktanis et al., 2015). Das EpICD wiederum kann zusammen mit β -Catenin und Lef-1 an die LIM-Domänen von FHL 2 binden (Maetzel et al., 2009; Martin et al., 2002). Dieser Proteinkomplex wirkt als Transkriptionsfaktor und steigert die Expression von u. a. c-Myc, Cyclin D1, Klf4, Nanog, Oct4 und Sox2. Dadurch werden Stammzeleigenschaften wie Pluripotenz und Reparaturfähigkeiten induziert und der Zellzyklus angeregt (Imrich, Hachmeister, & Gires, 2012; C. W. Lin et al., 2012; Lu et al., 2010; T. Yu, Ma, & Wang, 2017). Ein alternativer Spaltungsweg mittels BACE-1 in sauren Endozytosevesikeln wurde ebenfalls beschrieben (Hachmeister et al., 2013; Tsaktanis et al., 2015).

Die Funktion von EpCAM als kalziumunabhängiges und homotypisches Zelladhäsionsmolekül ist seit längerem Gegenstand der Forschung. 1994 konnte gezeigt werden, dass durch eine Transfektion von E-Cadherin-negativen murinen Fibroblasten mit EpCAM, eine auf EpCAM basierende Zelladhäsion erzeugt wurde. Zudem kommt es in Zellkulturen mit gemischten EpCAM-positiven und EpCAM-negativen Fibroblasten zu einer Segregation EpCAM-positiver und EpCAM-negativer Zellen (Litvinov, Velders, et al., 1994). EpCAM ist nicht Teil von Tight junctions, Desmosomen oder Hemidesmosomen, sondern wird basolateral exprimiert und ist mit E-Cadherin kolokalisiert (Balzar et al., 1999). Die Rolle von EpCAM zum Erhalt einer stabilen Zelladhäsion ist umstritten. Denn EpCAM Verbindungen sind schwächer als die durch E-Cadherin und EpCAM inhibiert die Bindung zwischen E-Cadherin und dem Zytoskelett und vermindert dadurch die E-Cadherin-vermittelte Zelladhäsion (Litvinov, Bakker, Gourevitch, Velders, & Warnaar, 1994; Litvinov et al., 1997). Und auch ein Knockout von EpCAM führte in Krebszellen nicht zu geschwächten Zell-Zell-Kontakten (Tsaktanis et al., 2015). Jedoch kommt es bei Fehlbildungen und Funktionsverlust von EpCAM, wie durch eine Deletion von Exon 4, zu einer angeborenen entzündlichen Darmerkrankung congenital tufting enteropathy (CTE) mit Durchfällen durch eine gestörte Barrierefunktion des Epithels (Mueller, McGeough, Pena, & Sivagnanam, 2014; Sivagnanam et al., 2008).

1.3.3 EpCAM in Krebs, Klinik und Therapie

Die RIP von EpCAM wurde vermehrt in Karzinomzellen und seltener in gesunden Zellen beobachtet. Dafür spricht, dass EpICD sich in Kopf-Hals-, Ösophagus-, Brust-,

Kolon- und Prostatakarzinomen vermehrt im Nukleus lokalisiert, als in gesunden Zellen desselben Gewebes (Maetzel et al., 2009; Ralhan et al., 2010). EpICD wirkt hierbei in Krebszellen als Transkriptionsfaktor, erhöht die Expression des Onkogens c-Myc und von Cyclin A, D1 und E und verstärkt dadurch die Proliferation der Zelle (Chaves-Perez et al., 2013; Munz et al., 2004). Außerdem ist eine Mutation von EpCAM mit dem Lynch Syndrom assoziiert. Das Lynch Syndrom, oder hereditäres nicht polypöses Kolonkarzinom (HNPCC) ist eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung, die die Lebenswahrscheinlichkeit an verschiedenen abdominal gelegen Tumoren zu erkranken auf 60 bis 90 % erhöht. Molekulargenetisch zeigen 20 % der Patienten mit Lynch Syndrom einen Verlust an DNA-Mismatch-Reparatur Proteinen. Zugrunde liegt eine Mutation am 3'-Ende von EpCAM, welche zu epigenetischer Deaktivierung von DNA-Reparatur Genen wie MLH1 und MSH2 führt (Kempers et al., 2011; Kuiper et al., 2011; Lynch, Lynch, Snyder, & Riegert-Johnson, 2011; Rumilla et al., 2011).

EpCAM wird als prognostischer Marker und als diagnostisches und therapeutisches Antigen in der Onkologie benutzt, weil es von vielen verschiedenen Karzinomen und deren Metastasen in höherem Ausmaß exprimiert wird im Vergleich zum gesunden Gewebe (Went et al., 2006). Prognostisch korreliert EpCAM in Harnblasen-, Brust-, Gallenblasen-, Kolorektal-, Ovarial-, Pankreas- und Prostatakarzinomen mit einer schlechten Prognose und mit einer guten Prognose in Endometrium-, HNO-, Kolon-, Magen-, Nieren-, Ösophagus- und Schilddrüsenkarzinomen (Akita et al., 2011; Baumeister et al., 2018; Ralhan et al., 2010; Seligson et al., 2004; Spizzo et al., 2011; Spizzo et al., 2006; Spizzo et al., 2004; Stoecklein et al., 2006). CTCs aus Karzinomen exprimieren häufig EpCAM und somit kann EpCAM zur Detektion von CTCs im Blut von Krebspatienten benutzt werden. In Studien konnte gezeigt werden, dass ≥ 5 EpCAM positive CTCs pro 7,5 ml Blut in metastasierten und ≥ 1 EpCAM positive CTC pro 7,5 ml Blut in nicht metastasierten Mammakarzinompatienten mit einer schlechteren Prognose einhergeht (Cristofanilli et al., 2004; Janni et al., 2016).

Therapeutisch wurde EpCAM aufgrund der starken und weitverbreiteten Expression auf Karzinomzellen zur Therapie von Tumorpatienten benutzt. Im Jahr 1995, 16 Jahre nach der Erstbeschreibung von EpCAM, wurde mit Edrecolomab (Antikörper 17-1A) der erste murine monoklonale Antikörper zur Behandlung von Kolonkarzinompatienten in Deutschland zugelassen (J. Li & Zhu, 2010). In Deutschland wurde Edrecolomab im Jahr 2000 wieder vom Markt genommen, aufgrund fehlender Überlegenheit

gegenüber der damaligen Standardtherapie (Punt et al., 2002). Ein anderer Antikörper, Catumaxomab, wurde zur Behandlung von malignem Aszites bei EpCAM positiven Karzinomen zugelassen (Wimberger, Heubner, & Kimmig, 2010). Damit bewies sich EpCAM als klinisch relevanter Angriffspunkt und bleibt weiterhin Forschungsobjekt für neue potentielle Therapien zur zielgerichtete Tumorthherapie in 87 klinischen Studien im Jahr 2022, die von der U.S. National Library of Medicine unter dem Stichwort EpCAM aufgelistet wurden (U.S. National Library of Medicine, 2022).

1.3.4 EpCAM in der EMT

Zur Rolle von EpCAM in der EMT gibt es mehrere, sich zum Teil widersprechende, Studien. Generell gehen epitheliale Marker, so auch EpCAM, während der EMT verloren und der Verlust von EpCAM ist mit dem Anstieg von mesenchymalen Markern wie Vimentin in Tumoren assoziiert (Dongre & Weinberg, 2019; Pastushenko & Blanpain, 2019). Jedoch wurden unterschiedliche Einflüsse von EpCAM auf die EMT berichtet. Eine Studie fand einen repressiven Effekt von EpCAM auf die EMT durch Inhibition der Erk2 Aktivität. Gleichzeitig führte die Erk2 Aktivität im Sinne einer negativen Feedbackschleife zur Verminderung von EpCAM durch direkte transkriptionale Regulierung und durch die Aktivierung von EMT-Tfs (Sankpal et al., 2017). In anderen Studien hatte EpCAM einen verstärkenden Effekt auf die EMT. So führte eine hohe EpCAM Expression in Nasopharynxkarzinomen zur Einleitung von EMT durch die Aktivierung von AKT und mTOR und in Kolonkarzinomzellen erhöhte EpICD die Transkription von Snail und Slug (C. W. Lin et al., 2012; M. H. Wang et al., 2018). In den letzten Jahren zeigte die Erforschung von EpCAM in Zusammenhang mit EGFR neue Erkenntnisse auf. Hsu et al. postulierte 2016, dass die Aktivierung von EGFR durch EGF in Endometriumzellen zur RIP von EpCAM führte und anschließend zur Induktion von EMT durch EpICD (Hsu et al., 2016). Dies konnte weder in verschiedenen Karzinomzelllinien noch in der von Hsu et al. benutzen Endometriumzelllinie repliziert werden. Vielmehr wurde lösliches sEpEX als neuer Ligand von EGFR in HNO-Karzinomen beschrieben und sEpEX induzierte dadurch die typischen Signalwege von EGFR. Erk1/2 jedoch, wurde durch sEpEX schwächer aktiviert als durch EGF und führte damit zwar zur Proliferation, aber nicht zur Einleitung der EMT. Diese Beobachtung wurde dadurch unterstrichen, dass die gleichzeitige Behandlung von Zellen mit einer Konzentration an EGF, welche normalerweise die EMT induziert, und mit gleicher Konzentration an sEpEX die EMT-Einleitung durch

Verminderung der Erk1/2 Aktivität in HNO-Karzinomen verhinderte. Damit kann EGFR, in Abhängigkeit der Erk1/2 Aktivität, Proliferation oder EMT induzieren. Klinisch zeigte sich dementsprechend, dass HNO-Karzinom Patienten mit EGFR^{high}/EpCAM^{low} Tumoren ein signifikant schlechteres Überleben hatten als Patienten mit EGFR^{low}/EpCAM^{high} Tumoren (Pan et al., 2018).

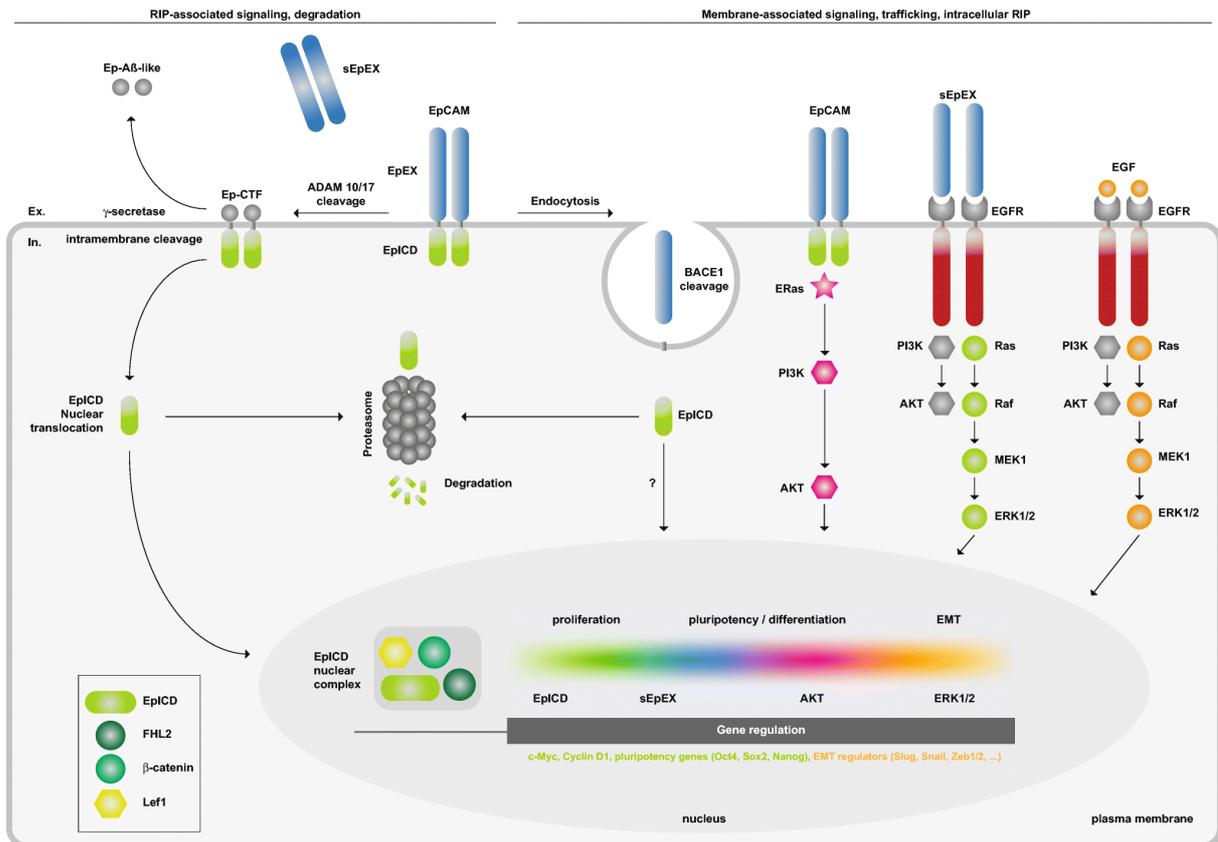


Abbildung 4: Schematische Darstellung der molekularen Funktion von EpCAM

Darstellung der RIP von EpCAM in lösliches EpEX und EpICD, von EpICDs Funktion als Transkriptionsfaktor in der Zelle und von EpEX als Ligand analog zu EGF für EGFR (Gires, Pan, Schinke, Canis, & Baeuerle, 2020).

2. Zielsetzung

EMT beschreibt den Übergang einer Epithelzelle in eine mesenchymale Zelle durch weitreichende zelluläre Veränderungen und ist Bestandteil der Embryogenese, Wundheilung und Metastasierung von Karzinomen. Dieser Prozess wird durch viele extrazelluläre Signale und Faktoren wie TGF- β und Hypoxie induziert und entsteht zellbiologisch aufgrund zahlreicher EMT-Tfs wie Snail, Slug und Twist. Dadurch verlieren Karzinomzellen epitheliale Marker und Eigenschaften und erlangen durch Migration und Invasion die Fähigkeit aus dem Epithelverbund in das umgebende Stroma zu infiltrieren. Durch den Transport im Blut- und Lymphsystem kommt es zur Disseminierung von Tumorzellen und zur Bildung von Metastasen, welche in vielen Tumorerkrankungen den letztendlich letalen Schritt der Erkrankung darstellen.

EpCAM ist in gesunden Epithelien exprimiert und ist an verschiedenen zellulären Mechanismen beteiligt. Als homotypisches Zelladhäsionsmolekül reguliert es die Zell-Zell-Adhäsion und moduliert die Funktion von E-Cadherin. Zudem kann das membranständige Protein durch RIP in ein lösliches extrazelluläres sEpEX und ein intrazelluläres EpICD gespalten werden. EpICD kann zusammen mit anderen Molekülen einen Komplex bilden und als Transkriptionsfaktor fungieren und dadurch Stammzeleigenschaften und die Proliferation der Zelle fördern. EpCAM wird überproportional stark in Karzinomen exprimiert im Vergleich zum Normalgewebe und wird daher zur Detektion von Karzinomen und CTCs benutzt und war Angriffspunkt einiger antitumoraler Medikamente.

EpCAM geht als epithelialer Marker während der EMT verloren. Außerdem wurde EpCAM eine modulierende Funktion in der EMT durch Bindung von sEpEX an EGFR oder durch direkte transkriptionelle Aktivierung von EMT-Tfs durch EpICD zugesprochen. Daher ist ein Ziel dieser Arbeit EpCAM als Marker zur Einordnung von verschiedenen Karzinomzelllinien mit Fokus auf den HNO-Bereich in einem epithelialen bis mesenchymalen Spektrum zu etablieren. Darüber hinaus soll der direkte Einfluss von EpCAM auf die EMT durch molekularbiologische Untersuchungen von EMT-Tfs, Zellfunktionstests und Chemoresistenztests der Zellen mittels eines in vitro Knockdown Modells weiter bestimmt werden.

3. Material

3.1 Chemikalien, Kits und Verbrauchsmaterialien

3.1.1 Chemikalien

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien

Artikel	Firma
2-Propanol	Merck Millipore, Burlington (USA)
5-Fluoruracil	Santa Cruz Biotechnology, Dallas (USA)
Aqua dest.	Braun, Melsungen
BacilloI® Flächen-Desinfektionsmittel	Hartmann GmbH, Wiener Neudorf (AU)
Bovines Serum Albumin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Cisplatin	Santa Cruz Biotechnology, Dallas (USA)
Dimethylsulfoxid (DSMO)	Merck Millipore, Burlington (USA)
Dodecylsulfat Natriumsalz (SDS)	Serva, Heidelberg
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Merck Millipore, Burlington (USA)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg
Ethanol	Merck Millipore, Burlington (USA)
Fötales Bovines Serum Superior (FBS)	Merck Millipore, Burlington (USA)
Glycin	Serva, Heidelberg

Salzsäure, rauchend 37 %	Merck Millipore, Burlington (USA)
Magermilchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
Mercaptoethanol	Merck Millipore, Burlington (USA)
Methanol	Merck Millipore, Burlington (USA)
Methylthiazolyldiphenyl- tetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Mucocit [®] T	Schülke & Mayr, Norderstedt
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) Tabletten	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
PBS-Medium Pufferlösung	Apotheke Klinikum Großhadern, München
Penicillin/Streptomycin	Merck Millipore, Burlington (USA)
Propidiumiodid (PI)	Merck Millipore, Burlington (USA)
Puromycin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Rotiphorese [®] Gel 30 (30 % Acrylamidstammlösung; 0,8 % Bisacrylamid; 37,5:1)	Carl Roth, Karlsruhe
RPMI 1640 Medium (RPMI)	Merck Millipore, Burlington (USA)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Merck Millipore, Burlington (USA)
Trypan Blau (0,4 %)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
10x Trypsin 0,5 % /EDTA 0,2 %	Merck Millipore, Burlington (USA)
Tween [®] 20 Polysorbat	Merck Millipore, Burlington (USA)

3.1.2 Kits

Tabelle 3: Verwendete Kits

Kit	Firma
Cozy™ Prestained Protein Ladder	highQu GmbH, Kraichtal
Immobilon® Western Chemiluminescent HRP Substrat	Millipore, Bredford (USA)
Invitrogen PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
LightCycler 480 SYBR Green I Master	Roche, Basel (CH)
NuceloSpin® Tissue	Macherey-Nagel, Düren
Pierce™ BCA Protein Assay	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
QIAshredder	Qiagen, Venlo (NL)
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	Qiagen, Venlo (NL)
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Venlo (NL)

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Artikel	Firma
3MM Whatman™-Papier	GE Healthcare, Chalfont St Giles (UK)
Costar® Stripetten, 1 ml/5 ml/10 ml/ 25 ml	Corning, Corning (USA)

Druckerpapier K95HG	Mitsubishi Electric, Chiyoda (JP)
Einmal Zählkammern C-Chip-NO1	NanoEnTek, Seoul (KR)
Einweg Desotex®- Vliestuchspendersysteme	Dr. Schumacher GmbH, Malsfeld
Falcon® 6-Well Zellkulturplatten/96-Well Zellkulturplatten, flacher Boden, durchsichtig	Corning, Corning (USA)
Falcon® Einweg Zell-Schaber	Corning, Corning (USA)
Falcon® Rundbodenröhrchen, 5 ml	Becton, Dickinson, Franklin Lakes (USA)
Falcon® Zentrifugengefäße, 15 ml/50 ml	Corning, Corning (USA)
Immobilon®-P Transfer Membranes	Merck Millipore, Burlington (USA)
Kryogefäße, 1,8 ml	Starlab GmbH, Hamburg
Küchenrolle	Tapira, Friedewald
Labortücher	Kimberly-Clark, Dallas (USA)
LightCycler® 480 Multiwell Platten 96, weiß	Roche, Basel (CH)
Nunc™ EasYFlask™ Zellkulturflaschen, 25cm ² , 75cm ²	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Pipettenspitzen SafeSeal-tips® professional/SurPhob®	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Reaktionsgefäß, 1,5 ml, undurchsichtig	Greiner Bio-One, Kremsmünster (AU)
Vasco® Nitril Handschuhe	Braun, Kronberg im Taunus

Zentrifugengefäß, 1,5 ml, nukleasefrei	Starlab GmbH, Hamburg
Zentrifugengefäß, 1,5 ml/2 ml	Eppendorf, Hamburg

3.2 Geräte, Computerprogramme und Dienstleistungen

3.2.1 Geräte

Tabelle 5: Verwendete Geräte

Gerät	Firma
Accu-jet® pro	Brand GmbH, Wertheim
Autoclav Systec 95	Systec GmbH, Wettenberg
ChemiDoc™ XRS+ imaging system	BioRad, Hercules (USA)
Digitale Spiegelreflex Kamera EOS 1300D	Canon, ōta (JP)
Durchflusszytometer Cytoflex	Beckman Coulter, Brea (USA)
Easypet	Eppendorf, Hamburg
Eis Maschine	Ziegra, Isernhagen
Gefrierschrank Herafreeze™ (-80 °C)	Thermo Electron, Waltham (USA)
Kühl- und Gefrierschränke (4 °C, -20 °C)	Liebherr, Bulle FR (CH)
Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen
Magnetrührer	Bellco Glass, New Jersey (USA)
Magnetrührer Ikamag® Reo	IKA-Werke, Staufen im Breisgau
Microplate Reader MRX	Dynatech Laboratories, El Paso (USA)

Mikroliter-Pipetten	Gilson, Middleton (USA)
Mikroliter-Pipetten Reference/Research plus	Eppendorf, Hamburg
Mikroliter-Pipetten Transferpette® S	Brand GmbH, Wertheim
Mikrowelle	Sharp, Osaka (JP)
Mini Pro 500V Netzteil	Major Science, Saratoga (USA)
Multikanalpipette Transferpette® S-8/-8	Brand GmbH, Wertheim
NanoPhotometer®	Implen, München
Netzteil EV2310	Consort, Hemel Hempstead (UK)
Präzisionswaagen	Sartorius AG, Göttingen
Rollgerät	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Rollgerät	CAT, Ballrechten-Dottingen
Schüttel- & Mixgerät Polymax 2040	Heidolph, Schwabach
Sicherheitswerkbank Laminair®/Herasafe™	Heraeus, Hanau
Spülmaschine	Miele, Gütersloh
Thermaldrucker P93D	Mitsubishi Electric, Chiyoda (JP)
Thermostat plus	Eppendorf, Hamburg
VersaMax™ Tunable Microplate Reader	Molecular Devices, San José (USA)
Vortex Mixer IKAR MS1	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Vortex Mixer REAX 2000/REAX top	Heidolph, Schwabach

Wasserbad 1083	GFL, Burgwedel
Elektrophoresekammern miniVE SE300	Hoefer, Holliston (USA)
Elektrophoresekammern BlueVertical™ PRIME™	Serva, Heidelberg
Zellkulturinkubator CB	Binder, Tuttlingen
Zellkulturinkubator Heracell®	Heraeus, Hanau
Zentrifuge 46 R/Mikro 20	Hettich, Kirchlingern
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg
LightCycler® 480 Instrument II	Roche, Basel (CH)

3.2.2 Computerprogramme

Tabelle 6: Verwendete Computerprogramme

Computerprogramm	Firma
CytExpert	Beckman Coulter, Brea (USA)
Endnote	Thomson Reuters Corporation, New York (USA)
Fiji	Wayne Rasband, NIH, Bethesda (USA)
Image Lab	BioRad, Hercules (USA)
iWork	Apple, Cupertino (USA)
LightCycler® 480 SW 1.5	Roche, Basel (CH)
Primer Blast	NCBI, Bethesda (USA)

SPSS	IBM, Armonk (USA)
------	-------------------

3.2.3 Dienstleistungen

Tabelle 7: Verwendete Dienstleistungen

Dienstleistung	Firma
Oligonukleotidsynthese	Metabion, Martinsried

3.3 Antikörper

Tabelle 8: Verwendete Antikörper

Antikörper	Firma	Anwendung
Primärantikörper		
Anti-E-Cadherin (24E10), Kaninchen	Cell Signaling Technology, Danvers (USA)	WB (1:1000 in BSA)
Anti-EpCAM (Ber-EP4), Maus	DakoCytomation, Glostrup (DK)	FACS (1:50 in FACS-Puffer)
Anti-EpCAM (C-10): sc-25308, Maus	Santa Cruz Biotechnology, Dallas (USA)	WB (1:5000 in Milch)
Anti-Slug (C19G7), Kaninchen	Cell Signaling Technology, Danvers (USA)	WB (1:5000 in BSA)
Anti-Sox2 (D6D9) XP, Kaninchen	Cell Signaling Technology, Danvers (USA)	WB (1:5000 in BSA)
Anti-Vimentin (EPR3776), Kaninchen	Abcam, Cambridge (UK)	WB (1:5000 in Milch)

Anti- β -Actin (C4), Maus	Santa Cruz Biotechnology, Dallas (USA)	WB (1:1000 in Milch)
Sekundärantikörper		
FITC Ziege-anti-Maus IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch, West Grove (USA)	FACS (1:50 in FACS-Puffer)
HRP Ziege-anti-Maus IgG (PO44)	DakoCytomation, Glostrup (DK)	WB (1:5000 in Milch)
PO Ziege-anti-Kaninchen IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch, West Grove (USA)	WB (1:5000 in Milch)

3.4 qRT-PCR Primer

Die Sequenzen der verwendeten Primer wurden mit Primer Blast vom NCBI erstellt. Es wurden Primersequenzen ausgewählt, die ausschließlich an den zu untersuchenden Gensequenzen binden, um eine möglichst hohe Spezifität zu ermöglichen.

Tabelle 9: Verwendete qRT-PCR Primer

Primername	Sequenz in 5'-3' Orientierung
FW_E-Cadherin	CGAGAGCTACACGTTACGG
BW_E-Cadherin	GTGTCGAGGGAAAAATAGGCT
FW_EpCAM	CCATGTGCTGGTGTGTGAAC
BW_EpCAM	CCTTCTGAAGTGCAGTCCGC
FW_GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC
BW_GAPDH	GAAGATGGTGATGGGATTTC

FW_N-Cadherin	GAGGCTTCTGGTGAAATCGC
BW_N-Cadherin	AATCTGCAGGCTCACTGCTC
FW_Slug	CGAACTGGACACACATACAGTGAT
BW_Slug	GAGAGGCCATTGGGTAGCTG
FW_Snail	CTTCCAGCAGCCCTACGAC
BW_Snail	CGGTGGGGTTGAGGATCT
FW_Sox2	CCAGCGCATGGACAGTTACG
BW_Sox2	CCGTTTCATGTAGGTCTGCGAG
FW_Sox9	CTCTGGAGACTTCTGAACGAGAGC
BW_Sox9	GTTCTTCACCGACTTCCTCCG
FW_Twist1	TCTCGGTCTGGAGGATGGAG
BW_Twist1	AATGACATCTAGGTCTCCGGC
FW_Vimentin	CCGGGAGAAATTGCAGGAGG
BW_Vimentin	CGTTCAAGGTCAAGACGTGC
FW_ZEB1	AGCAGTGAAAGAGAAGGGAATGC
BW_ZEB1	GGTCCTCTTCAGGTGCCTCAG

3.5 Zelllinien

Tabelle 10: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Bemerkung
Cal27	Zungenkarzinom (Homo sapiens)	DSMZ ACC 446

Cal33	Zungenkarzinom (Homo sapiens)	DSMZ ACC 447
FaDu	Hypopharynxkarzinom (Homo sapiens)	DSMZ ACC 784
Kyse30	Ösophaguskarzinom (Homo sapiens)	DSMZ ACC 351
Kyse30 KD ct	Ösophaguskarzinom (Homo sapiens) transfiziert mit Kontroll-shRNA	Bereits im Labor etabliert
Kyse30 KD I	Ösophaguskarzinom (Homo sapiens) transfiziert mit EpCAM-Knockdown- shRNA	Bereits im Labor etabliert
Kyse30 KD II	Ösophaguskarzinom (Homo sapiens) transfiziert mit EpCAM-Knockdown- shRNA	Bereits im Labor etabliert
Kyse30 KD III	Ösophaguskarzinom (Homo sapiens) transfiziert mit EpCAM-Knockdown- shRNA	Bereits im Labor etabliert
MDA-MB-231	Mammakarzinom (Homo sapiens)	DSMZ ACC 732

3.6 Puffer und Stammlösungen

3.6.1 Zellkultur

Kulturmedium

(Cal27, Cal33, FaDu, MDA-MB-231): DMEM; 10 % FBS; 1 % P/S

Kulturmedium (Kyse30): RPMI; 10 % FBS; 1 % P/S

Kulturmedium (Kyse30 KD): RPMI; 10 % FBS; 1 % P/S;
Puromycin 1 µg/ml

Einfriermedium: 50 % DMEM/RPMI; 40 % FBS;
10 % DMSO

PBS: 4,0 g NaCl; 0,1 g KCl; 0,575 g Na₂HPO₄;
0,1 g KH₂PO₄; Wasser für
Injektionszwecke zu 500 ml

3.6.2 MTT-Assay

MTT-Stock: 5 mg/ml MTT in PBS

MTT-Medium: 10 % MTT-Stock in Medium ohne Zusätze

Lösungspuffer: 0,1 M HCL in Isopropanol

3.6.3 SDS-Page und Western Blot

Lyse-Puffer: 1% DDM; Roche Proteinase Inhibitor
Cocktail in PBS

Lade-Puffer (Laemmli-Puffer): 140 mM Tris-HCL pH 7,0; 30 % Glycin;
16 % β-Mercaptoethanol; 4 % SDS;
0,1 % Bromphenolblau

Trenngel (12%): 30 % Acrylamid; 2 M Tris pH 8,9;
0,5 M EDTA in Aqua dest.

Sammelgel (4%): 30 % Acrylamid; 2 M Tris pH 6,8;
0,5 M EDTA in Aqua dest.

Lauf-Puffer: 250 mM Tris; 2 M Glycin;
1 % SDS in VE-Wasser

10x Blotting-Puffer: 250 mM Tris; 1,26 M Glycin in VE-Wasser

Block-Puffer: 5 % Magermilchpulver in Wasch-Puffer

Wasch-Puffer: PBS; 0,2 % Tween in VE-Wasser

Antikörperlösung Milch: 5 % Magermilchpulver in Wasch-Puffer

Antikörperlösung BSA: 5 % BSA in Wasch-Puffer

3.6.4 Durchflusszytometrie

FACS-Puffer: 3 % FBS in PBS

Propidiumiodid Färbelösung: 1 µg/ml Propidiumiodid in FACS-Puffer

4. Methoden

4.1 Zellkultur

4.1.1 Kultivierung, Konservierung und Rekultivierung von Krebszellen

Alle Arbeitsschritte erfolgten unter einer Sicherheitswerkbank und wurden mit sterilen Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Lösungen durchgeführt. Zur Kultivierung wurden die Zellen bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ Partialdruck kultiviert. Je nach Proliferation wurden die Zellen alle zwei bis drei Tage ausgedünnt. Dazu wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellkulturflaschen zwei Mal mit PBS gewaschen und die Zellen mit Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 %) inkubiert. Die Reaktion wurde mit Kulturmedium gestoppt und die Zellen wurden im Verhältnis 1:10 verdünnt. Zu den in den Zellkulturflaschen verbliebenen Zellen wurde frisches Kulturmedium hinzugefügt.

Zur Konservierung wurden die geernteten Zellen bei 280 g für fünf Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Einfriermedium ersetzt und die resuspendierten Zellen wurden auf Kryogefäße verteilt und bei -80 °C eingefroren.

Zur Rekultivierung wurden die Kryogefäße in einem 37 °C warmen Wasserbad zügig aufgetaut und die Zellen abzentrifugiert. Der Überstand wurde durch Kulturmedium ersetzt und die Zellsuspension wurde in Zellkulturflaschen überführt. Nach 24 h wurde das Kulturmedium gewechselt.

4.2 Funktionsassays

4.2.1 Proliferationsassay

Der Proliferationsassay misst, wie stark sich Zelllinien in einem definierten Zeitraum vermehren. Dafür wurden die Zellen wie in 4.1.1 beschrieben geerntet. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt. Hierfür wurde 10 µl Zellsuspension mit Trypan Blau 1:1 gemischt. Zum Auszählen wurden Zählkammern vom Typ Neubauer improved benutzt. Die Zellkonzentration wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellen/ml} = (\text{gezählte Zellen/Anzahl der gezählten Quadrate}) \times 2 \times 10^4.$$

Nach der Berechnung wurden pro Zelllinie jeweils 2×10^5 Zellen pro Vertiefung in 6-Well Platten mit je 5 ml Kulturmedium ausplattiert. Dies erfolgte für jeweils drei Zeitpunkte in Duplikaten. Im Verlauf wurden die Zellen an den Zeitpunkten 24 h, 72 h und 120 h geerntet und wie oben beschrieben ausgezählt. Die Zellzahlen konnten danach verglichen werden.

4.2.2 Migrationsassay

Mit dem Migrationsassay ermittelt man die Fähigkeit der Zelllinien zur Wanderung in einem Zellmonolayer. Die Zellen wurden geerntet und wie in 4.2.1 ausgezählt. Daraufhin wurden pro Zelllinie jeweils 9×10^5 Zellen pro Vertiefung in 6-Well Platten mit je 5 ml Kulturmedium in Triplikaten ausplattiert. Hierbei dienten zwei der je drei Vertiefungen zur Messung der Migrationsfähigkeit, die dritte Vertiefung diente der Proliferationskontrolle. Nach 24 h wurde das Kulturmedium durch ein Medium ohne Zusatz von FBS ersetzt, um so den Einfluss von Proliferation auf die Migration zu vermeiden. Nach weiteren 24 h erreichten alle Zellen eine Konfluenz von 95 – 100 % und unterlagen nicht mehr der Wachstumsförderung durch FBS. Wenn nicht anders beschrieben, erfolgten die folgenden Arbeitsschritte an den Vertiefungen zur Messung der Migrationsfähigkeit. Mit einer sterilen 20 µl Pipettenspitze wurde ein Spalt in die Zellmonolayer gezogen. Hierdurch lösten sich die Zellen ab. Sofort im Anschluss wurde jede Vertiefung zwei Mal mit PBS gewaschen, um die gelösten Zellen zu entfernen. Nach Hinzufügen von Medium ohne FBS wurden zwei zu jedem Spalt senkrecht verlaufende Markierungen an der Unterseite der 6-Well Platte angebracht. Diese konnten nun im Mikroskop referenziert werden. Jeweils links und rechts der Markierungen wurde in einer 100-fachen Vergrößerung ein Foto des Spalts mit einer digitalen Spiegelreflex Kamera gemacht, sodass vier Fotos pro Vertiefung entstanden. Diese Fotos erfassen die Spaltgröße am Ausgangszeitpunkt 0 h. Nach 24 h, 48 h und 72 h wurden die Vertiefungen, wie zuvor beschrieben, mit PBS gewaschen und Fotos gemacht. Im Verlauf migrierten die Zellen an der Spaltgrenze zur Mitte hin und verschmälerten ihn. Zuletzt wurden die Zellen zur Proliferationskontrolle geerntet und gezählt. Die entstandenen Fotos wurden mit dem Bildbearbeitungsprogram Fiji und der MRI-Wound-Healing-Tool-Software (http://dev.mri.cnrs.fr/projects/imagej-macros/wiki/Wound_Healing_Tool) analysiert. Die Spaltgrößen wurden auf jedem Foto gemessen und als Anzahl von Pixeln angegeben. Pro Vertiefung und pro

Zeitpunkt wurde ein Mittelwert für die Größe des Spalts errechnet (\bar{x} Spaltgröße). Anschließend wurden die Mittelwerte der Zeitpunkte 24 h, 48 h und 72 h vom Mittelwert des Ausgangspunkt 0 h abgezogen. Dies ergab die Fläche, die die migrierten Zellen zum jeweiligen Zeitpunkt ausfüllten in Pixeln (*migrierte Zellfläche*). Um Fehler durch eine mögliche Proliferation zu korrigieren, wurde mit der Proliferationskontrolle für jede Zelllinie ein Quotient gebildet, indem die gegebene Zellzahl 9×10^5 am Anfang des Experiments durch die gemessene Zellzahl nach 72 h dividiert wurde. Dieser Quotient wurde dann mit der *migrierten Zellfläche* des jeweiligen Zeitpunkts multipliziert und ergab die *Migrationsrate* des jeweiligen Zeitpunkts. Es ergaben sich folgende Formeln (exemplarisch für 72 h):

$$\text{Migrierte Zellfläche}_{72h} = \bar{x}\text{Spaltgröße}_{0h} - \bar{x}\text{Spaltgröße}_{72h} \text{ (Pixelanzahl)}$$

$$\text{Proliferation} = \text{Zellanzahl}_{0h} / \text{Zellanzahl}_{72h} \text{ (Einheitslos)}$$

$$\text{Migrationsrate}_{72h} = \text{Migrierte Zellfläche}_{72h} \times \text{Proliferation} \text{ (Pixelanzahl)}$$

4.3 Chemoresistenz und MTT-Assay

Der MTT-Assay testet die metabolische Aktivität von Zellen und damit die Zellvitalität. Somit lässt sich der Assay zur Bestimmung der Effektivität von Chemotherapeutika auf Krebszellen benutzen (Mosmann, 1983). Biochemisch wird das gelbe Methylthiazolyldiphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) durch Reaktionen des mitochondrialen Zellstoffwechsels zu dem unlöslichen, violetten Farbstoff Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC oder Formazan) reduziert. Dieser lagert sich kristallförmig in den Zellen ein. Die Intensität des Farbumschlags korreliert mit der Zellvitalität. Die Zellen wurden wie in 4.1.1 und 4.2.1 beschrieben geerntet und gezählt. Anschließend wurden pro Zelllinie 5×10^3 Zellen pro Vertiefung in 96-Well Platten mit flachem Boden ausplattiert. Dies erfolgte für je sieben Messpunkte in Triplikaten. Die Messpunkte stehen für die nach 24 h hinzugefügten Konzentrationen an Cisplatin oder 5-Fluoruracil (5-FU): 0; 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40 (μM). Hierfür wurde das alte Kulturmedium durch frisches Kulturmedium mit den entsprechenden Konzentrationen an Chemotherapeutika (100 μl /Vertiefung) ersetzt. Nach weiteren 48 h wurde das Medium mit Chemotherapeutika entfernt. Die folgenden Schritte erfolgten im Dunkeln, da MTT lichtsensitiv ist. Die Zellen wurden mit 100 μl MTT-Medium pro Vertiefung bei 37 °C inkubiert. Außerdem wurde pro Medium (DMEM und RPMI) eine

Mediumkontrolle in Triplikaten eingeführt. Diese bestanden lediglich aus dem MTT-Medium ohne Zellen. Nach drei Stunden wurde die Reaktion gestoppt und das Formazan gelöst. Dazu wurde 100 µl Lösungspuffer pro Vertiefung hinzugefügt und sehr gründlich mit den Zellen und dem MTT-Medium vermischt. Anschließend konnte die Farbintensität mit dem VersaMax™ Tunable Microplate Reader erfasst werden. Hierzu wurde die Lichtabsorption (*optische Dichte; OD*) in jeder Vertiefung gemessen; die OD des Formazans mit einer Wellenlänge von 570 nm und die OD von Unregelmäßigkeiten an der 96-Well Platte mit 690 nm. Lichtabsorption bei 570 nm durch andere Farbstoffe im MTT-Medium oder Lösungspuffer konnten durch die Mediumkontrolle erfasst werden. Es ergaben sich folgende Formeln (exemplarisch für 0 µM und 5 µM Chemotherapeutikum):

$$OD_{0\mu M} = ((OD_{570nm} - OD_{690nm})_{0\mu M} - (OD_{570nm} - OD_{690nm})_{Mediumkontrolle})$$

$$OD_{5\mu M} = ((OD_{570nm} - OD_{690nm})_{5\mu M} - (OD_{570nm} - OD_{690nm})_{Mediumkontrolle})$$

Anschließend wird die OD bei 5 µM durch die OD bei 0 µM Chemotherapeutikum geteilt und als Prozentwert davon angegeben. Es ergab sich folgende Formel:

$$Zellviabilität_{5\mu M} = (OD_{5\mu M} / OD_{0\mu M}) \times 100$$

Aus den Triplikaten wurde der jeweilige Mittelwert berechnet. Zusätzlich wurden zum besseren Vergleich für jede Zelllinie die Konzentrationen an Chemotherapeutika berechnet, die zu einer Reduktion der Zellviabilität auf 50 % (IC50) führten. Diese Werte wurden mit dem IC50 Calculator (AAT Bioquest Inc., 2023), einem logistischen Regressionsmodell, annäherungsweise berechnet.

4.4 Molekularbiologische Versuche

4.4.1 BCA-Assay

Der BCA-Assay dient der quantitativen Proteinkonzentrationsmessung mittels Bicinchoninsäure. Nachdem die Zellen, wie in 4.1.1. beschrieben, geerntet wurden und mit dem Lyse-Puffer ein Proteinlysate hergestellt wurde, erfolgte die Anwendung des Pierce™ BCA Protein Assay Kit nach Protokoll des Herstellers. Zur Konzentrationsbestimmung anhand der Farbintensität wurde ein Microplate Reader MRX verwendet.

4.4.2 SDS-Page und Western Blot

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) ist eine Methode zur Trennung von Molekülen nach ihrer Masse in einem elektrischen Feld. Die so aufgetrennten Proteine können anschließend im Western Blot auf eine Trägermembran übertragen werden. Zur Vorbereitung wurden Proteinlysate der Proben entnommen, mit Lyse-Puffer in gleicher Konzentration verdünnt und danach in einem Verhältnis von 1:1 mit Lade-Puffer gemischt. Das Lysat wurde zuletzt für fünf bis zehn Minuten bei 95 °C erhitzt. Zuerst wurden die gegossenen Polyacrylamid Gele in den Elektrophorese Kammern in Laufpuffer getaucht und mit den Proteinlysaten beladen. Ein elektrisches Feld mit 180 V und 15 mA wurde für 15 Minuten zur Sammlung der Lysate im Sammelgel angeschlossen. Anschließend erfolgte das Auftrennen der Lysate bei 180 V und 30 mA für bis zu zwei Stunden im Trenngel.

Das mit den vollständig aufgetrennten Proteinen bestückte Gel konnte im nächsten Schritt aus den Kammern entnommen werden und wurde kurze Zeit in Blotting-Puffer gelegt. Als Trägermembran fungierende Polyvinylidenfluorid-Membranen wurden je kurze Zeit in Methanol, VE-Wasser und Blotting-Puffer gewaschen und anschließend mit dem entnommenen Gel zwischen Whatman-Papieren zusammengepresst. Diese wurden in Elektrophoresekammern in 4 °C kaltem Blotting-Puffer aufgehängt und für 50 Minuten bei 100 V und 500 mA angeschlossen, sodass die aufgetrennten Proteine auf die Trägermembran übertragen wurden. Als letzten Schritt musste die Trägermembran für 30 Minuten in Raumtemperatur oder über Nacht in 4 °C mit Block-Puffer gewaschen werden.

4.4.3 Immunpräzipitation

Zur indirekten Darstellung der Proteine auf der Trägermembran werden Primärantikörper und daran bindende enzymmarkierte Sekundärantikörper verwendet. Die Peroxidasen, bzw. Meerrettichperoxidasen bilden aus Wasserstoffperoxid Protonen, die oxidieren und farblich dargestellt werden können. Die Antikörper wurden nach Angaben der Hersteller und wie in Tabelle 8 angegeben verdünnt. Die Trägermembran wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur, oder über Nacht in 4 °C mit der Primärantikörperlösung, und für 30 Minuten in Raumtemperatur mit der Sekundärantikörperlösung benetzt. Nach jeder Inkubation mit den Antikörperlösungen

wurde die Trägermembran je drei Mal für zehn Minuten mit Wasch-Puffer gewaschen. Zur Detektion der Proteine wurde das Immobilon® Western Chemiluminescent HRP Substrat nach Angaben des Herstellers benutzt. Die Enzymreaktion wurde mit dem ChemiDoc™ XRS+ imaging system bildlich festgehalten.

4.4.4 mRNA Extraktion und Herstellung von cDNA

Die Zellen wurden, wie in 4.1.1. beschrieben, geerntet. Für die folgenden Arbeitsschritte wurden ausschließlich RNase/DNase freie Verbrauchsmaterialien verwendet. Anschließend wurde das QIAshredder und RNeasy® Mini-Kit nach Protokoll des Herstellers benutzt. Die Konzentration der gewonnenen RNA wurde mit einem NanoPhotometer® bestimmt. Zur Herstellung von cDNA aus jeweils 1 µg RNA pro Zelllinie wurde das QuantiTect® Reverse Transcription Kit nach Protokoll des Herstellers verwendet.

4.4.5 Real-time quantitative PCR

Die real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) ist eine Methode zur quantitativen Messung von cDNA mittels einer PCR und anschließender Fluoreszenz-Messung der PCR-Produkte. Deren Anzahl korreliert mit der Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus und sie sind ein Maß für den in der cDNA enthaltenen mRNA Gehalt zuvor selektierter Gene. Die Primer wurden in einer Konzentration von 100 µM bestellt und zur Verwendung ebenso wie die generierte cDNA 1:10 mit RNase/DNase freiem Wasser verdünnt. Für die Versuche wurde das LightCycler 480 SYBR Green I Master Kit nach Protokoll des Herstellers verwendet. Nach der Ausführung aller Arbeitsschritte befand sich folgender Reaktionsansatz in den Vertiefungen der LightCycler® 480 Multiwell Platte 96:

Tabelle 11: Verwendeter qPCR-Reaktionsansatz pro Vertiefung

Reagenz	Volumen
PCR-grade Wasser	4,5 µl
SYBR Green	2,5 µl
cDNA	1 µl

Forward Primer	1 μ l
Backward Primer	1 μ l
Summe	10 μ l

Für jedes untersuchte Gen wurden Triplikate pro Zelllinie gemessen. Um eine Bindung der Primer aneinander zu kontrollieren, wurde pro verwendetem Primerpaar eine Kontrollmessung eingeführt, in dem die cDNA im Reaktionsansatz durch 1 μ l Wasser ersetzt wurde. Wenn in den Kontrollmessungen eine Zyklusanzahl > 35 gemessen wurde, galten die Primerpaare als ausreichend spezifisch. Die Durchführung der Versuche geschah mit dem LightCycler® 480 Instrument II und dem folgenden Protokoll:

Tabelle 12: qPCR Protokoll

Programm	Zyklen	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Ramp-Rate (°C/s)	Detektionsmodus
Vorinkubation	1	95	300	4,8	-
Amplifikation	45	95	10	4,8	-
		65	10	2,5	-
		72	15	4,8	„Single“
Schmelzkurve	1	95	5	-	-
		65	60	-	-
		97	-	-	„Kontinuierlich“
Kühlung	1	40	10	2,0	-

Zur Analyse wurde die LightCycler® 480 SW 1.5 Software verwendet. Zunächst wurde für die Anzahl der Zyklen zum Erreichen der Fluoreszenz in den einzelnen Vertiefungen ein Mittelwert für jedes Triplikat errechnet (ct-Wert). Danach wurde der ct-Wert des „Haushaltsgens“ von den ct-Werten der untersuchten Gene abgezogen (Δ ct-Wert). Das Haushaltsgen ist ein Gen, welches von allen Zellen zu allen Zeitpunkten in annähernd gleichmäßiger Menge exprimiert werden soll. In diesem Fall wurde GAPDH benutzt. Zuletzt wurden zur besseren Vergleichbarkeit die Δ ct-Werte in Expressionsdaten umgerechnet und in Verhältnis zu einer Kontrollprobe gesetzt. Es ergab sich folgende Formel am Beispiel von EpCAM (Zelllinie 1 ist die Kontrollprobe):

$$\text{Relative EpCAM mRNA Expression Zelllinie2} = 2^{- (\text{EpCAM } \Delta\text{ct-Wert Zelllinie2} - \text{EpCAM } \Delta\text{ct-Wert Zelllinie1})}$$

4.4.6 Durchflusszytometrie

Als Durchflusszytometrie bezeichnet man u. a. das Detektieren von Oberflächenmolekülen an Zellmembranen. Die Zellen wurden wie in 4.1.1 beschrieben geerntet. Anschließend wurden ca. 1×10^6 Zellen pro Zelllinie in 50 μ l FACS-Puffer mit einem Primärantikörper im Verhältnis 1:50 resuspendiert. Nach einer Inkubation von einer Stunde bei 4 °C wurden die Zellen bei 280 g für fünf Minuten bei RT abzentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstands wurden die Zellen zweimal mit je 3 ml FACS-Puffer gewaschen und wieder abzentrifugiert. Darauffolgend wurde der Überstand entfernt und die Zellen wurden in 50 μ l FACS-Puffer mit einem Sekundärantikörper im Verhältnis 1:50 resuspendiert. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 4 °C erfolgten die gleichen Waschschriffe wie oben beschrieben. Zuletzt wurden die Zellen in 500 μ l mit 1 μ g/ml Propidiumiodid resuspendiert, um tote Zellen anzufärben. Außerdem wurde eine Kontrolle für jede Zelllinie erstellt, indem die Kontrollzellen direkt mit einem Sekundärantikörper inkubiert wurden. Dadurch ließ sich ausschließen, dass die Sekundärantikörper ebenfalls an die Zellmembran banden. Nun konnten die fluoreszierenden Antikörper am Durchflusszytometer gemessen werden. In der Analyse wurden lebende Zellen von den toten mittels Software getrennt und die angefärbten Zellen durch die Kontrollen dividiert.

5. Ergebnisse

5.1 Funktion der EMT in wildtypischen Karzinomzelllinien

Eine Korrelation zwischen EpCAM und EMT-Markern, EMT-Tfs und Zellfunktionen, die mit einer EMT assoziiert sind, wurde in verschiedenen wildtypischen Tumorzelllinien u. a. aus dem Kopf-Hals Bereich im erweiterten Sinn untersucht. Dazu dienten die menschlichen Karzinomzelllinien FaDu (Hypopharynx), Kyse30 (Ösophagus), Cal27 (Zunge), Cal33 (Zunge) und MDA-MB-231 (Brust). Letztere wurde wegen der besonders mesenchymalen Eigenschaften in die Analyse eingeschlossen. Wie in 4.4.6 beschrieben, wurde die EpCAM Expression an der Zelloberfläche mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Zudem wurde, wie in 4.4.2 und 4.4.3, bzw. 4.4.4 und 4.4.5 beschrieben, die EpCAM Expression in der Gelelektrophorese, bzw. die EpCAM mRNA Expression in der qPCR untersucht. In der Durchflusszytometrie zeigten sich signifikante Unterschiede in der EpCAM Expression zwischen allen Zelllinien bis auf Cal27 im Vergleich mit Cal33. Kyse30 hatte eine um ca. 19 %, Cal 27 um ca. 40 %, Cal33 um ca. 43 % und MDA-MB-231 um ca. 98 % geringere EpCAM Expression als FaDu. Die EpCAM Expression war im Western Blot besonders unterschiedlich zwischen FaDu bzw. Kyse30 und Cal27 bzw. Cal33. FaDu und Kyse30, bzw. Cal27 und Cal33 unterschieden sich kaum. MDA-MB-231 zeigte keine messbare EpCAM Expression. Die mRNA Expression von EpCAM zeigte sich in der qPCR signifikant unterschiedlich zwischen FaDu bzw. MDA-MB-231 und den restlichen Zellen und war in Kyse30 um ca. 67 %, in Cal27 um ca. 71 %, in Cal33 um ca. 55 % und in MDA-MB-231 um ca. 99 % geringer als in FaDu. Zur besseren Übersicht wurden die Zellen in den folgenden Abbildungen in absteigender Reihenfolge bezüglich der EpCAM Expression dargestellt (in der Reihenfolge FaDu, Kyse30, Cal27, Cal33, MDA-MB-231) (Abbildung 5).

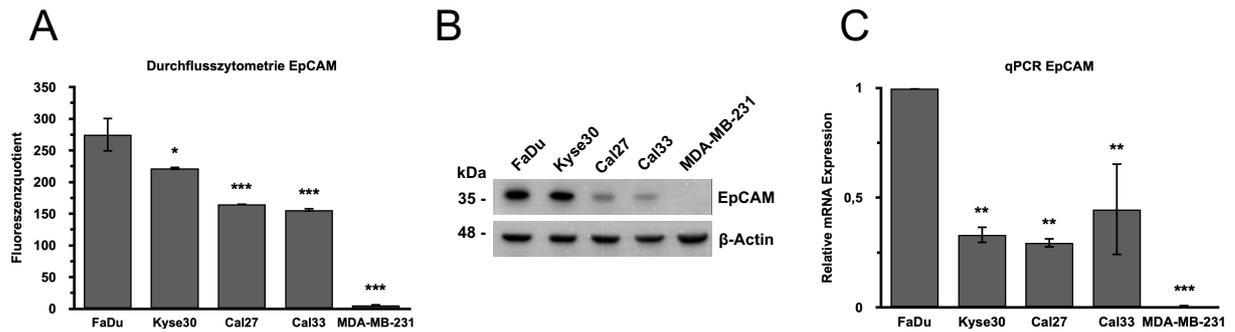


Abbildung 5: EpCAM mRNA und Proteinexpression in wildtypischen Karzinomzelllinien
(A) EpCAM Proteinexpression bestimmt in der Durchflusszytometrie als Fluoreszenzquotient. **(B)** EpCAM und β -Actin Proteinexpression bestimmt im Western Blot. **(C)** Relative mRNA Expression von EpCAM bestimmt in der qPCR und in Verhältnis zu FaDu gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (A und C) und repräsentative Ergebnisse (B) aus drei unabhängigen Experimenten. Statistische Berechnung mittels einfaktorieller Varianzanalyse, Games-Howell und Tukey-HSD Test. Signifikanz in Bezug auf FaDu. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$.

5.1.1 Phänotypische Marker und Zellmorphologie in wildtypischen Karzinomzelllinien

Zur Charakterisierung der wildtypischen Karzinomzelllinien wurden E-Cadherin als epithelialer Marker und Vimentin und N-Cadherin als mesenchymale Marker mittels qPCR und Western Blot untersucht und die Morphologie der Zellen wurde verglichen. Dazu wurden die Zellen in gleicher Anzahl ausplattiert und nach 72 h und dem Erreichen einer ca. 60-prozentigen Konfluenz fotografiert. In Western Blot und qPCR erkennt man eine eindeutige Abstufung der E-Cadherin Expression. Kyse30 exprimiert am meisten E-Cadherin mit einer ca. 7-fach signifikant erhöhten mRNA-Expression als FaDu. Danach folgte Cal27, mit einer ca. 3,3-fach erhöhten mRNA-Expression. E-Cadherin war in MDA-MB-231 im Western Blot nicht messbar, und betrug in der qPCR ca. 0,04 % der Expression von FaDu. Vimentin wiederum war im Western Blot nur für MDA-MB-231 vorhanden. In der qPCR zeigte Kyse30 eine ca. 6,6-fach, Cal27 eine ca. 9-fach und MDA-MB-231 eine ca. 2526-fach signifikant erhöhte Vimentin Expression im Vergleich zu FaDu. Die N-Cadherin mRNA Expressionen betragen in Kyse30 ca. 18 % und in MDA-MB-231 ca. 0,2 % der Expression in FaDu und waren damit signifikant geringer (Abbildung 6).

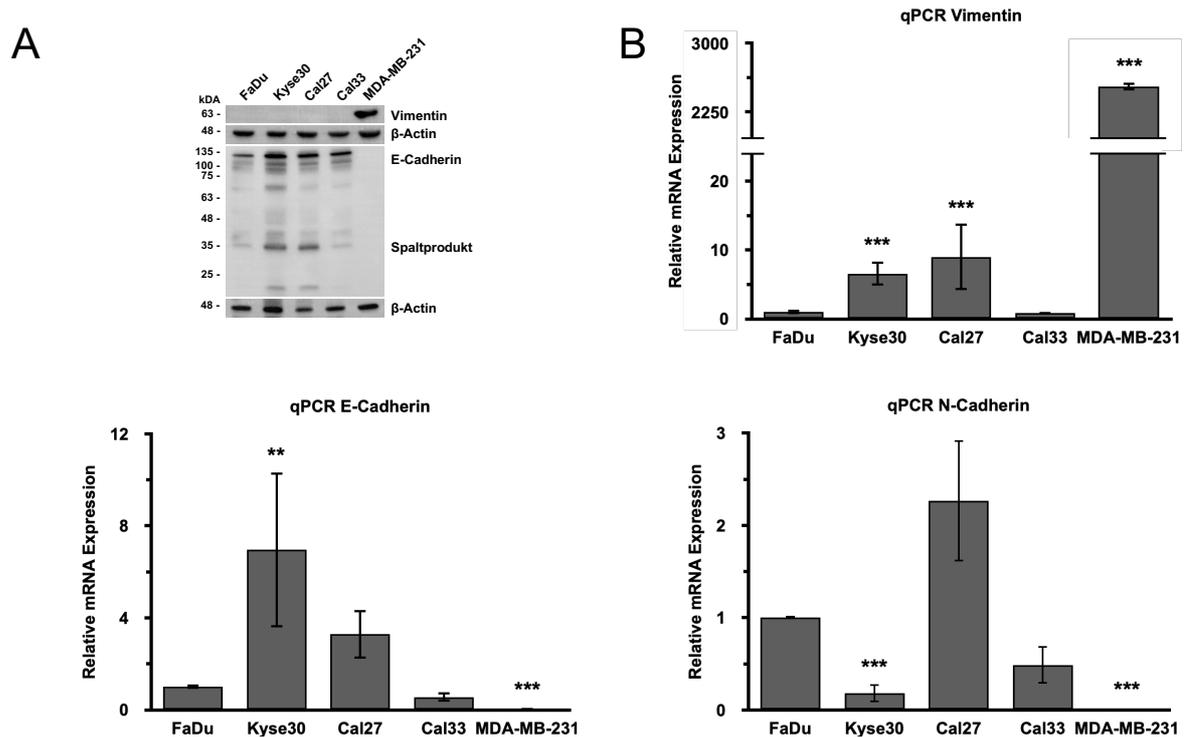


Abbildung 6: Epitheliale und mesenchymale Marker in wildtypischen Karzinomzelllinien
(A) Vimentin, E-Cadherin und β -Actin Proteinexpression bestimmt im Western Blot. **(B)** Relative Vimentin, E-Cadherin und N-Cadherin mRNA Expression bestimmt in der qPCR und in Verhältnis zu FaDu gesetzt. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse (A) Mittelwerte und Standardabweichungen (B) aus drei unabhängigen Experimenten. Statistische Berechnung mittels einfaktorieller Varianzanalyse und Tukey-HSD-Test. Signifikanz in Bezug auf FaDu. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$.

Zwischen allen Zelllinien ließen sich Unterschiede in der Morphologie erkennen, welche aber nicht eindeutig mit der Expression von EpCAM oder anderen zuvor bestimmten Markern übereinstimmten. FaDu, bei höchster EpCAM Expression, wuchs in kompakten Zellverbänden aus fast ausschließlich quaderförmigen Zellen. Vereinzelt ließen sich Zellfortsätze an den Rändern der Verbände erkennen. Kyse30 Zellen, bei zweithöchsten EpCAM und höchsten E-Cadherin Werten, präsentierten sich spindelförmig am Rand der Zellverbände mit sich berührenden Zellfortsätzen, während die Zellen im Inneren quaderförmig und mit langstreckigen Zell-Zell Kontakten Verbunden erschienen. Die Zellen von Cal27 zeigten sich teilweise kugel-, quader- oder spindelförmig. Nach außen hin greifende Zellfortsätze ließen sich kaum und nur andeutungsweise erkennen. Ebenfalls in eng verbundenen Zellverbänden mit mehrheitlich quaderförmigen Zellen erschienen Cal33 Zellen, welche am zweitwenigsten EpCAM und am zweitmeisten Vimentin exprimierten. Hier zeigte fast jede Zelle am Rand der Verbände deutliche Zellfortsätze. MDA-MB-231 Zellen, als

einzigste Zelllinie mit einer messbaren Vimentin Expression im WB und bei niedrigster EpCAM und E-Cadherin Expression, erschienen am deutlichsten spindelförmig mit prominenten Zellfortsätzen. Die Zellen waren teilweise punktförmig, teilweise langstreckig miteinander Verbunden und bildeten einen netzartigen Zellverbund (Abbildung 7).

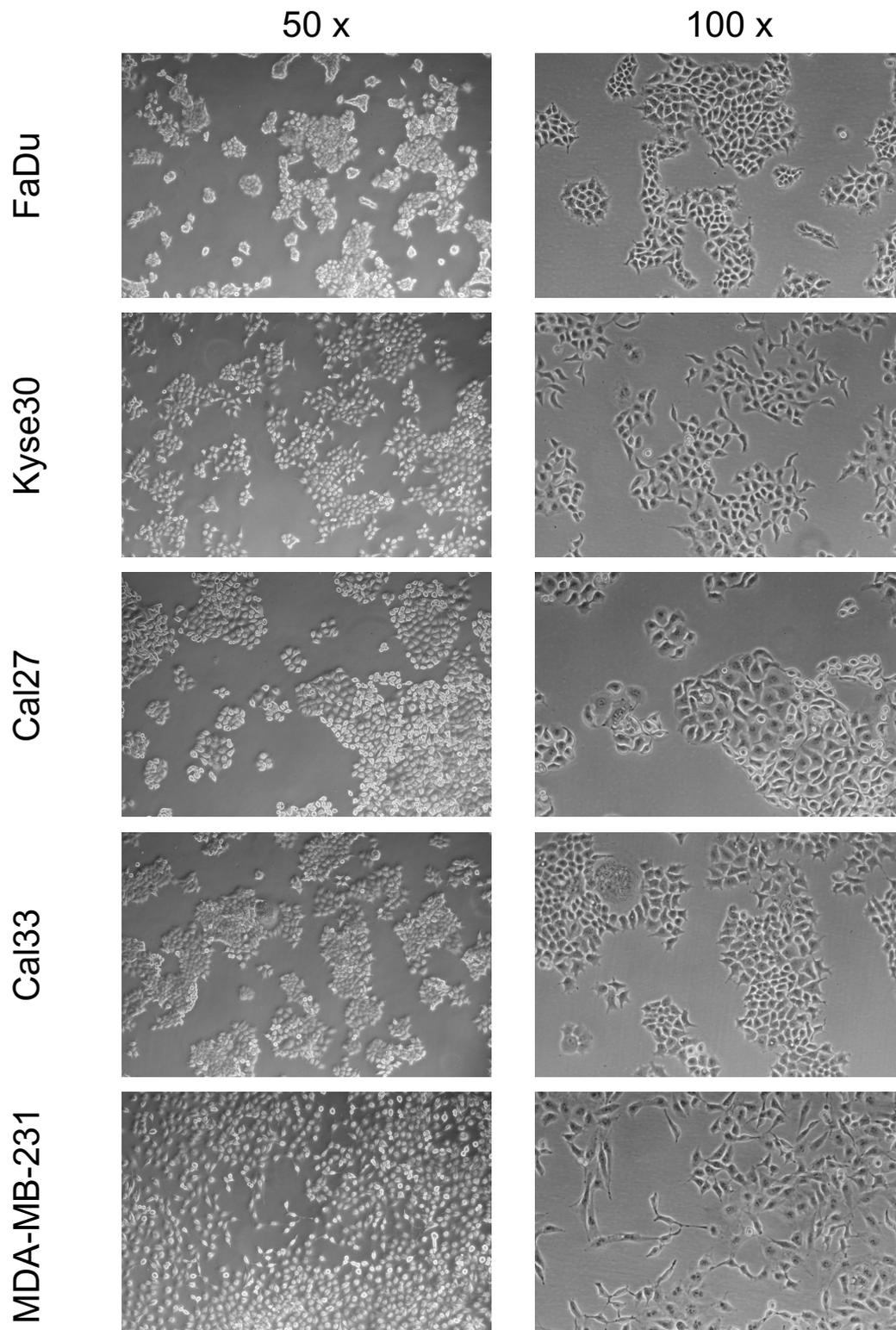


Abbildung 7: Zellmorphologie von wildtypischen Karzinomzelllinien

Repräsentative Fotos für zwei unabhängige Experimente von FaDu, Kyse30, Cal27, Cal33 und MDA-MB-231 in 50-facher und 100-facher Vergrößerung. Die Zellen wurde in gleicher Anzahl ausplattiert und nach 72 h fotografiert. Die Bildfarbe wurde im Nachhinein entsättigt und aufgehellt.

5.1.2 EMT-Transkriptionsfaktoren in wildtypischen Karzinomzelllinien

Zur weiteren Differenzierung wildtypischer Karzinomzelllinien bezüglich ihrer Expression von EMT-Tfs in Anbetracht der EpCAM Expression wurden die Expression der EMT-Tfs Snail, Slug, Twist, ZEB1, Sox2 und Sox9 in qPCR und Slug und Sox2 im Western Blot bestimmt. Es ergaben sich signifikante Unterschiede bei allen EMT-Tfs. Die Snail Expression von Cal33 war am geringsten und ca. 64 % signifikant geringer als die von FaDu, während es zwischen FaDu und den restlichen Zellen keine signifikanten Unterschiede gab. In der qPCR wurde Slug am stärksten in Cal27, und damit um das ca. 3,4-fache signifikant höher exprimiert, und am schwächsten in MDA-MB-231, und damit um ca. 91 % signifikant geringer exprimiert als in FaDu. Im Western Blot weist Cal33 die höchste, Cal27 die zweithöchste, FaDu die zweitgeringste und MDA-MB-231 die geringste Slug Expression auf. Twist wurde in allen Zellen bis auf MDA-MB-231 gleichermaßen exprimiert. MDA-MB-231 zeigte eine um ca. 82 % signifikant geringere Twist Expression als FaDu. ZEB1 war in Cal33 am geringsten und in MDA-MB-231 am stärksten exprimiert. Cal33 hatte eine um ca. 93 % signifikant geringere, MDA-MB-231 eine um das ca. 6,6-fache signifikant erhöhte ZEB1 Expression als FaDu. In der qPCR wurde Sox2 am stärksten in Kyse30 exprimiert und war ca. 3,3-fach signifikant höher als in FaDu. MDA-MB-231 exprimierte mit 0,5 % signifikant am wenigsten. Cal27 hatte ebenfalls mit ca. 13 % eine signifikant geringe Expression. Im Western Blot zeigte sich ebenfalls in Kyse30 die höchste und in Cal33 die zweithöchste Sox2 Expression, während für FaDu, Cal27 und MDA-MB-231 kein Protein messbar war. Die Expression von Sox9 war in Kyse30 am stärksten und um das ca. 4-fache signifikant höher als in FaDu. Die restlichen Zellen unterschieden sich nicht signifikant (Abbildung 8).

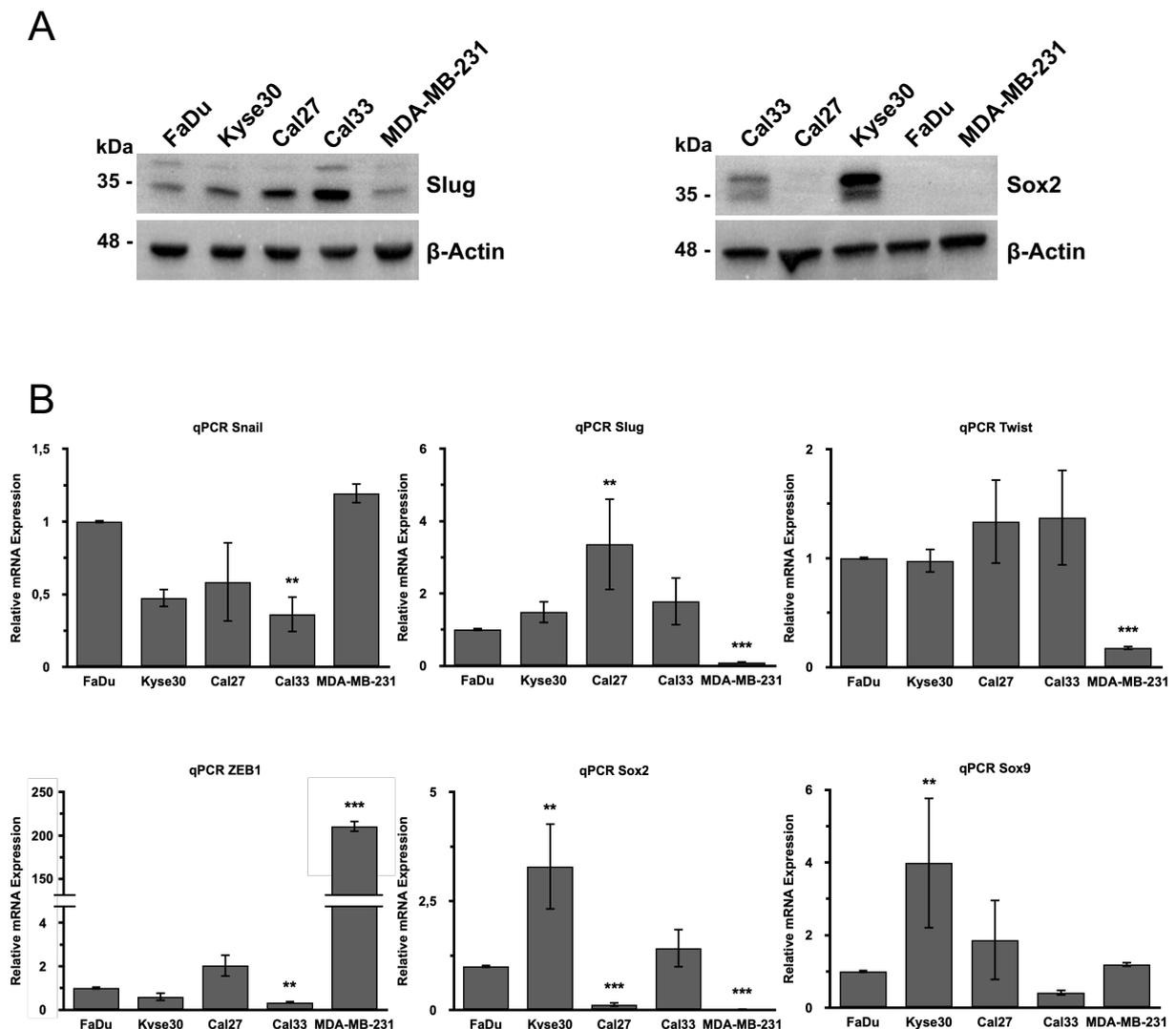


Abbildung 8: EMT-Tfs mRNA und Proteinexpression in wildtypischen Karzinomzelllinien

(A) Slug, Sox2 und β -Actin Proteinexpression bestimmt im Western Blot. (B) Relative Snail, Slug, Twist, ZEB1, Sox2 und Sox9 mRNA Expression bestimmt in der qPCR und in Verhältnis zu FaDu gesetzt. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse (A) und Mittelwerte und Standardabweichungen (B) aus drei unabhängigen Experimenten. Statistische Berechnung mittels einfaktorierlicher Varianzanalyse und Tukey-HSD-Test. Signifikanz in Bezug auf FaDu. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$.

5.1.3 Proliferation und Migration in wildtypischen Karzinomzelllinien

Zur Charakterisierung der Proliferation von wildtypischen Karzinomzelllinien in Korrelation zur EpCAM Expression wurden je 2×10^5 Zellen in Duplikaten in 6-Well Platten ausplattiert und die Zellzahl wurde, wie in 4.2.1 beschrieben, nach 24 h, 72 h und 120 h mit einer Zählkammer ausgewertet. Nach 24 h und 72 h gab es keine

signifikanten Unterschiede in der Zellzahl. Diese betrug nach 24 h im Mittel ca. $3,1 \times 10^5$ Zellen und nach 48 h im Mittel ca. $1,3 \times 10^6$ Zellen. Jedoch ergaben sich signifikante Unterschiede in der Zellzahl nach 120 h. FaDu zeigte mit einer Zellzahl von ca. $4,9 \times 10^6$ Zellen die höchste Proliferation. Diese unterscheidet sich signifikant von der Zellzahl von Kyse30 mit ca. $2,6 \times 10^6$ Zellen, Cal27 mit ca. $2,5 \times 10^6$ Zellen und MDA-MB-231 mit ca. $2,8 \times 10^6$ Zellen. Cal33 zeigte die zweithöchste Proliferation mit ca. $3,7 \times 10^6$ Zellen und unterschied sich damit nicht signifikant zu FaDu (Abbildung 9 A).

Zur Charakterisierung der Migration wurden je 9×10^5 Zellen in Duplikaten in 6-Well Platten ausplattiert. Wie in 4.2.2 beschrieben, wurde nach Erreichen eines konfluenten Zellmonolayers ein Spalt mit einer Pipettenspitze gezogen und die Spaltgröße für jeden Zeitpunkt abfotografiert. Die resultierenden Migrationsflächen und an die Proliferationsquotienten angepassten Migrationsraten wurden errechnet. Es ergaben sich signifikante Unterschiede in der Migrationsrate zu allen Messzeitpunkten. FaDu zeigte durchgehend die niedrigste und Kyse30 die höchste Migration. Nach 24 h unterschied sich die Migrationsrate von FaDu mit ca. $1,3 \times 10^5$ Pixel von der von Kyse30 mit ca. $1,2 \times 10^6$ Pixel und MDA-MB-231 mit ca. $1,0 \times 10^6$ Pixel signifikant. Nach 48 h zeigten sich signifikante Unterschiede in der Migrationsrate zwischen FaDu mit ca. $1,7 \times 10^5$ Pixel, Kyse30 mit ca. $2,1 \times 10^6$ Pixel, Cal33 mit ca. $5,7 \times 10^5$ Pixel und MDA-MB-231 mit ca. $1,4 \times 10^6$ Pixel. Nach 72 h ergab sich zwischen FaDu mit einer Migrationsrate von ca. $1,9 \times 10^5$ Pixel und Kyse30 mit ca. $2,6 \times 10^6$ Pixel ein signifikanter Unterschied (Abbildung 9 B).

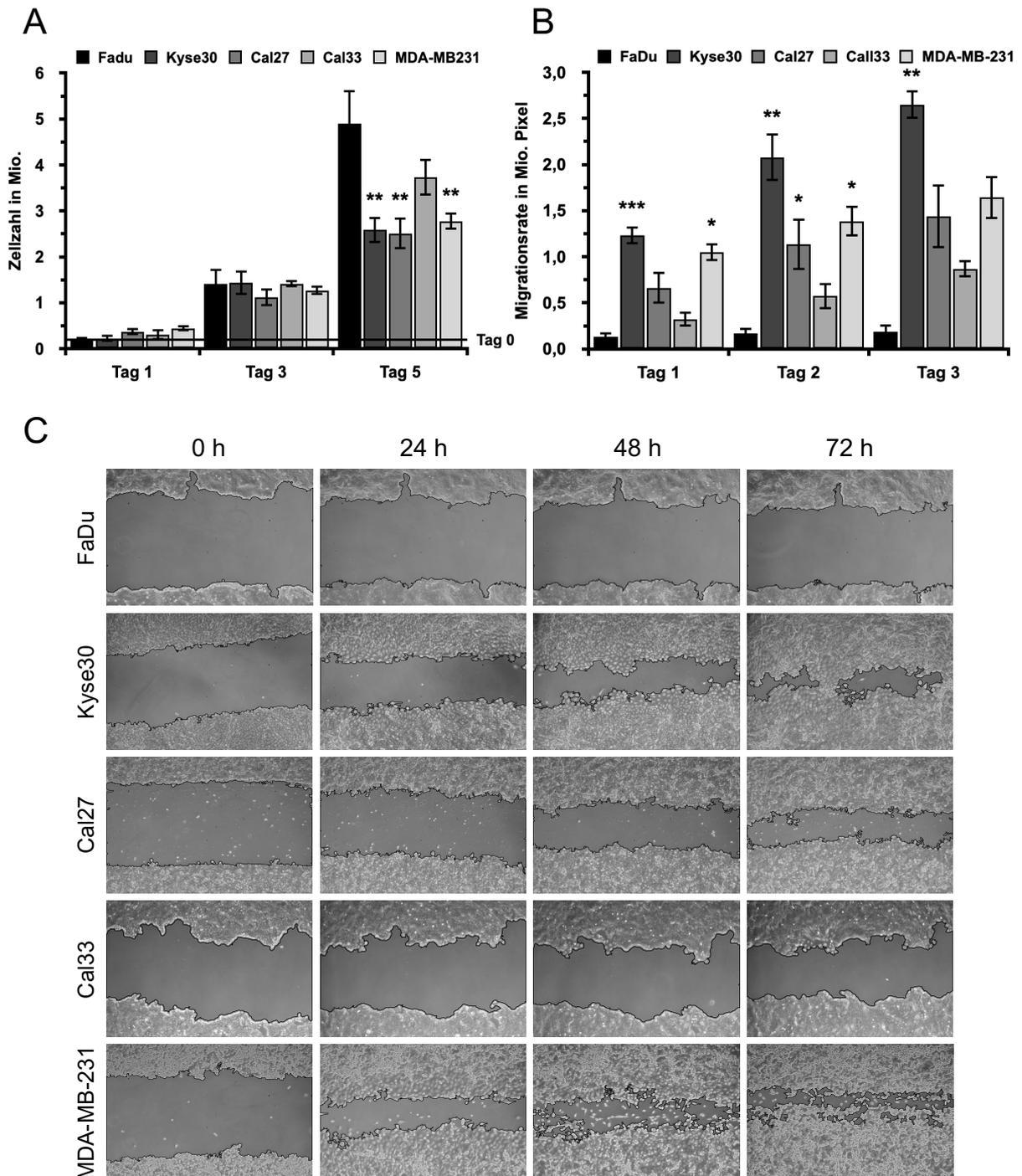


Abbildung 9: Proliferation und Migration in wildtypischen Karzinomzelllinie

(A) Proliferation: Ausplattierung gleicher Anzahl an Zellen und Messung der Zellzahl nach je 24 h, 72 h und 120 h. Dargestellt sind Mittelwerte der Zellzahlen und der Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten, jeweils erzeugt aus Duplikaten mit je zwei Messungen. (B) Migration: Messung der Migrationsrate nach je 24 h, 48 h und 72 h. Dargestellt sind Mittelwerte der migrierten Fläche, dividiert durch die jeweilige Proliferationsrate, und der Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten, jeweils erzeugt aus Duplikaten mit je vier Messungen. (C) Repräsentative Fotos des Spaltes in dem Zellrasen jeweils zum Startzeitpunkt 0 h und nach je 24 h, 48 h und 72 h. Statistische Berechnung mittels einfaktorierlicher Varianzanalyse, Games-Howell und Tukey-HSD Test. Signifikanz in Bezug auf FaDu. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$.

5.1.4 Chemoresistenz in wildtypischen Karzinomzelllinien

Zur Charakterisierung des Einflusses von Chemotherapeutika auf wildtypische Karzinomzelllinien in Korrelation zu der EpCAM Expression wurden je 5×10^3 Zellen in Triplikaten in 96-Well Platten ausplattiert und, wie in 4.3 beschrieben, für 48 h mit Cisplatin oder 5-FU in einer Konzentration von je 0; 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40 μM inkubiert. Anschließend erfolgte ein MTT-Test zur Bestimmung der Zellviabilität. Zusätzlich wurde zum besseren Vergleich, mittels eines logistischen Regressionsmodells wie in 4.3 beschrieben, die Konzentration an Chemotherapeutika berechnet, die zu einer Reduktion der Zellviabilität um 50% (IC₅₀) führte. Unter der Behandlung mit Cisplatin zeigte FaDu die geringste Zellviabilität. Kyse30 hatte bis zur Konzentration von 5 μM und MDA-MB-231 ab einer Konzentration von 10 μM die höchste Zellviabilität. Dabei ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen FaDu und Cal33 bis 2,5 μM , zwischen FaDu und Kyse30 bis 10 μM und zwischen FaDu und MDA-MB-231 bei allen Konzentrationen von Cisplatin. Die IC₅₀ lag für Kyse30 bei ca. 9 μM und für MDA-MB-231 bei ca. 24 μM und war damit signifikant höher als bei FaDu mit ca. 6 μM . Zwischen FaDu und Cal27 gab es keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 10 A). Unter Behandlung mit 5-FU zeigte Cal27 bei allen Konzentrationen die geringste Zellviabilität. Ebenfalls zeigten Kyse30 bis zur Konzentration von 10 μM und MDA-MB-231 ab einer Konzentration von 10 μM die höchste Zellviabilität. Signifikante Unterschiede zwischen FaDu und Cal27, bzw. Cal33, ergaben sich bis 5 μM , zwischen FaDu und Kyse30 bis 10 μM und zwischen FaDu und MDA-MB-231 bei allen Konzentrationen. Kyse30 und MDA-MB-231 zeigten zudem die höchste IC₅₀ für 5-FU, welche für Kyse30 ca. 10 μM höher und für MDA-MB-231 ca. 27 μM signifikant höher lag als bei FaDu mit ca. 10 μM (Abbildung 10 B).

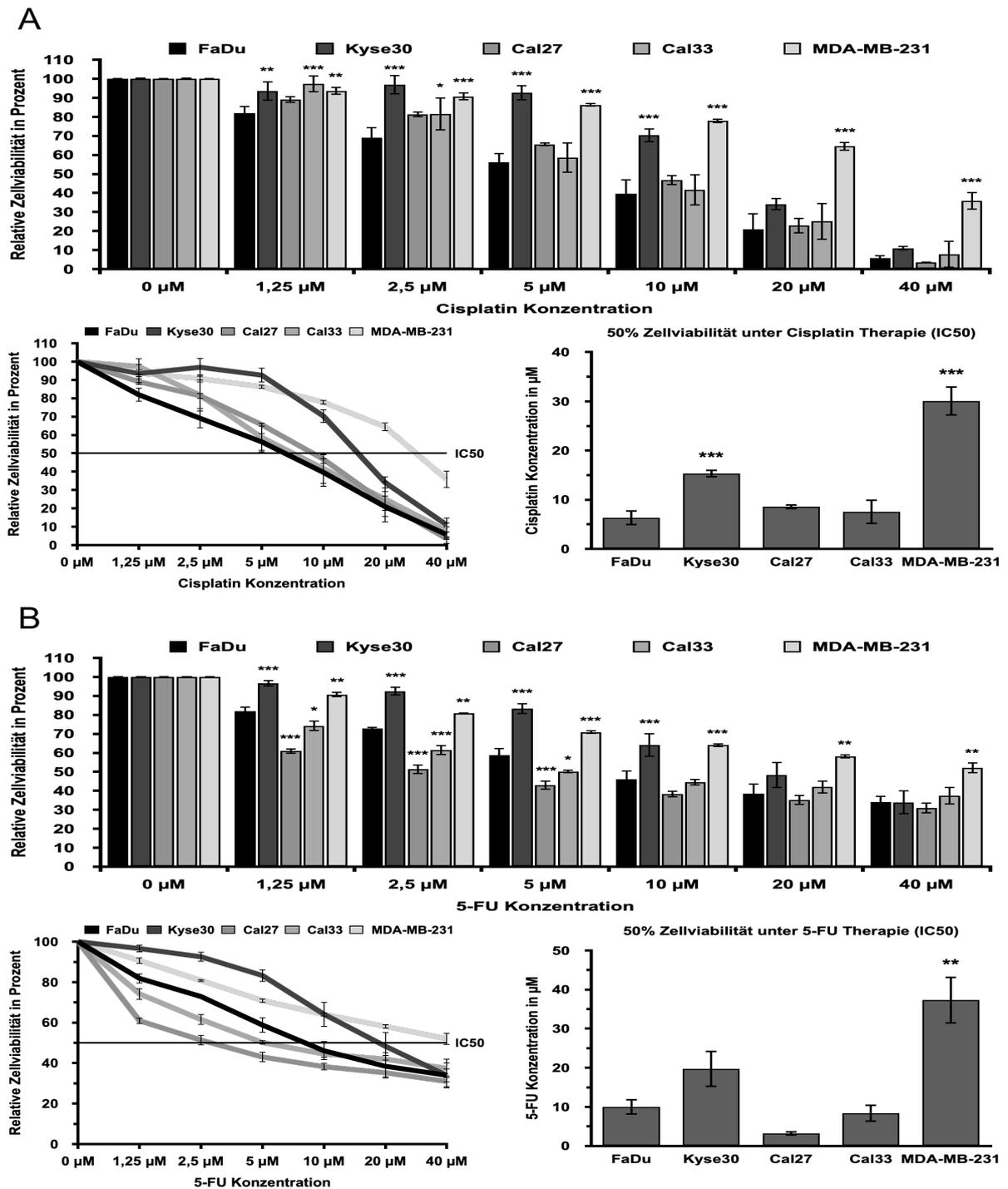


Abbildung 10: Zellviabilität unter Einfluss von Cisplatin und 5-Fu in wildtypischen Karzinomzelllinien

Messung der optischen Dichte nach Behandlung mit je 0; 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40 µM (A) Cisplatin und (B) 5-FU und Durchführung eines MTT-Tests. Dargestellt sind Mittelwerte der Zellviabilität unter Chemotherapie in Prozent in Bezug auf die Zellviabilität ohne Chemotherapie, und der Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, jeweils erzeugt aus Triplikaten. Berechnung des IC50 durch Cisplatin und 5-FU Therapie. Dargestellt sind Mittelwerte des IC50 und der Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, jeweils erzeugt aus Triplikaten. Statistische Berechnung mittels einfaktorierter Varianzanalyse, Games-Howell und Tukey-HSD Test. Signifikanz in Bezug auf FaDu. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$.

5.2 Funktion der EMT in Kyse30 EpCAM Knockdown Zelllinien

Der Einfluss von EpCAM auf die EMT wurde in einem EpCAM Knockdown Zellmodell untersucht. Dazu dienten drei, im Labor etablierte, Kyse30 EpCAM Knockdown Zelllinien, die mit einer EpCAM-Knockdown-shRNA transfektiert wurden (Kyse30 KD I, Kyse30 KD II, Kyse30 KD III), und eine, mit einer Kontroll-shRNA generierte, Kontrollzelllinie (Kyse30 KD ct). Zum stabilen Erhalt des Knockdowns wurden die Zellen in Puromycin-haltigem Nährmedium kultiviert, um die mit dem Resistenzgen transfektierten Zellen zu selektieren. Wie in 4.4.6 beschrieben, wurde die EpCAM Expression an der Zelloberfläche mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Zudem wurde, wie in 4.4.2 und 4.4.3, bzw. 4.4.4 und 4.4.5 beschrieben, die EpCAM Expression in der Gelelektrophorese, bzw. die EpCAM mRNA Expression in der qPCR untersucht. In der Durchflusszytometrie hatte Kyse30 KD I eine um ca. 14 %, Kyse30 KD III eine um ca. 16 % und Kyse30 KD II eine um ca. 37 % signifikant geringere EpCAM Expression als Kyse30 KD ct. Im Western Blot zeigte sich eine deutliche Verminderung der EpCAM Expression in den Knockout Zellen. Der Unterschied zur Kontrolle war in Kyse30 KD I am geringsten und in Kyse30 KD II am stärksten ausgeprägt. Die mRNA-Expressionen von EpCAM betrug in Kyse30 KD I ca. 63 %, in Kyse30 KD III ca. 45 % und in Kyse30 KD II ca. 26 % der EpCAM Expression in der Kontrolle und unterschieden sich damit signifikant voneinander (Abbildung 11). Es folgten Experimente zur Charakterisierung von EMT-Markern und EMT-Tfs, sowie zu Zelleigenschaften, deren Veränderungen mit einer EMT assoziiert sind. Zur besseren Übersicht zeigen die folgenden Abbildungen die Knockdown Zelllinien, wenn möglich, in absteigender Reihenfolge bezüglich der EpCAM Expression (in der Reihenfolge Kyse30 KD ct, Kyse30 KD I, Kyse30 KD III und Kyse30 KD II) und nicht anhand der Nummerierung.

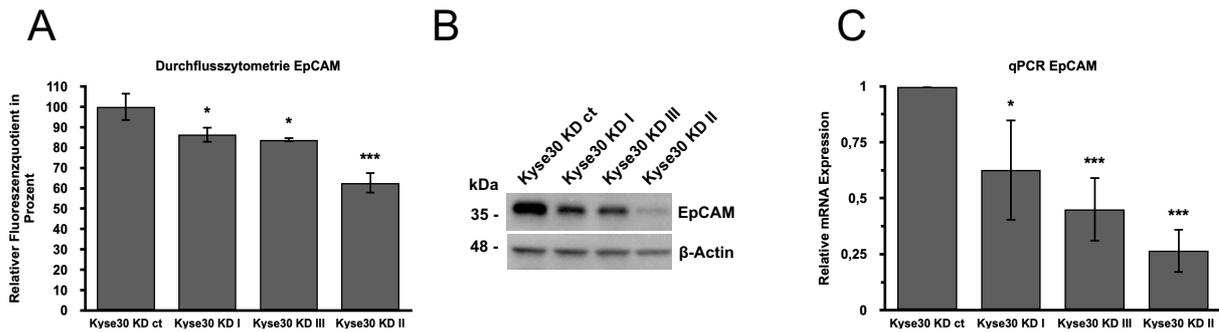


Abbildung 11: EpCAM Protein und mRNA-Expression in Kyse30 KD Zellen

(A) EpCAM Proteinexpression bestimmt in der Durchflusszytometrie. Als Fluoreszenzquotient und in Verhältnis zu Kyse30 KD ct angegeben. (B) EpCAM und β -Actin Proteinexpression bestimmt im Western Blot. (C) Relative mRNA Expression von EpCAM und β -Actin bestimmt in der qPCR und in Verhältnis zu Kyse30 KD ct gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (A und C) und repräsentative Ergebnisse (B) aus drei unabhängigen Experimenten. Statistische Berechnung mittels einfaktorierter Varianzanalyse und Dunnett-T-Test. Signifikanz in Bezug auf Kyse30 KD ct. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$.

5.2.1 EpCAM Knockdown führt partiell zu mesenchymalen und phänotypischen Veränderungen in Kyse30 Zellen

Inwiefern EpCAM einen Einfluss auf die EMT hat wurde in drei EpCAM-Knockdown und einer Kontroll-Zelllinie von Kyse30 untersucht. E-Cadherin als epithelialer Marker und Vimentin und N-Cadherin als mesenchymale Marker wurden mittels qPCR in allen vier Zelllinien untersucht. Zusätzlich wurde die E-Cadherin und Vimentin Expression im Western Blot bestimmt. Im Western Blot sind keine Vimentin Expression und keine Unterschiede zwischen den Knockdown Zellen und der Kontrolle in Bezug auf die E-Cadherin Expression zu sehen. MDA-MB-231 dient als positive Kontrolle für Vimentin in diesem Experiment. Ebenfalls zeigt sich kein Unterschied in der E-Cadherin mRNA Expression. Jedoch findet sich eine erhöhte Vimentin und N-Cadherin mRNA Expression in den Knockdown Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Kyse30 KD III zeigt eine ca. 3,1-fach signifikant erhöhte Vimentin und ca. 5-fach signifikant erhöhte N-Cadherin Expression als Kyse30 KD ct. Auch Kyse30 KD I zeigt eine, zwar nicht signifikante, ca. 2-fach erhöhte Vimentin und 4-fach erhöhte N-Cadherin Expression (Abbildung 12).

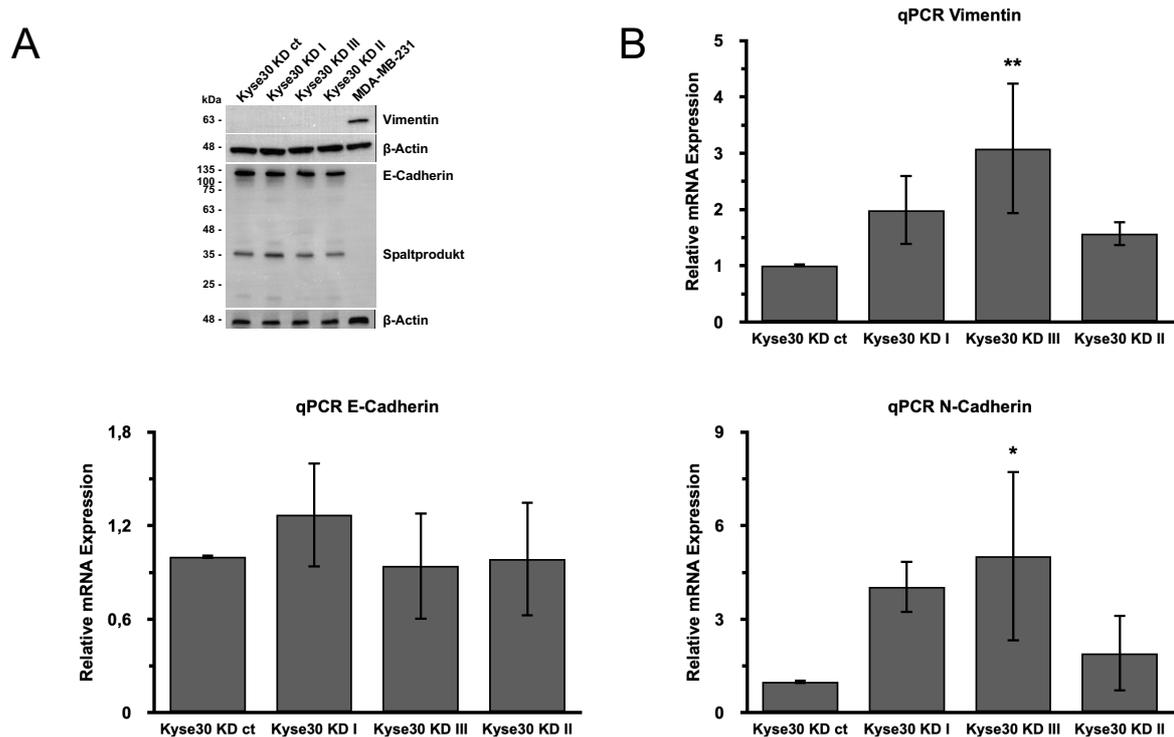


Abbildung 12: Epitheliale und mesenchymale Marker in Kyse30 KD Zellen

(A) Vimentin, E-Cadherin und β -Actin Proteinexpression bestimmt im Western Blot. (B) Relative E-Cadherin, Vimentin und N-Cadherin mRNA-Expression bestimmt in der qPCR und in Verhältnis zu Kyse30 KD ct gesetzt. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse (A) und Mittelwerte und Standardabweichungen (B) aus drei unabhängigen Experimenten. Statistische Berechnung mittels einfaktorierlicher Varianzanalyse und Dunnett-T-Test. Signifikanz in Bezug auf Kyse30 KD ct. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$.

Weiterhin wurden durch den Knockdown verursachte phänotypische Veränderungen der Zellen untersucht. Alle Kyse30 KD Zellen wachsen in Zellverbänden, die teilweise eng und Kopfsteinpflasterartig oder teilweise lose durch Zellausläufer miteinander verbunden sind. Kyse30 KD ct Zellen zeigen eine gemischte Morphologie aus kugelförmigen, spindelförmigen oder quaderförmigen Zellen mit teilweisen Zellfortsätzen und insgesamt wenigen epithelartigen Zell-Zell-Verbindungen. Der Knockdown von EpCAM führte zu verschiedenen morphologischen Veränderungen. Kyse30 KD I Zellen bilden vermehrt quaderförmige Zellverbände, die durch die gesamte Zellwand und durch Zellfortsätze miteinander verbunden sind. Kyse30 KD III Zellen wiederum haben größtenteils spindelförmige Zellkörper mit ausgeprägten Zellfortsätzen und bilden netzartige Zellverbände. Quaderförmige Zellen und langstreckige Zell-Zell-Verbindungen lassen sich nur vereinzelt finden. Kyse30 KD II Zellen sind meist quaderförmig oder spindelförmig mit erkennbaren Zellfortsätzen (Abbildung 13).

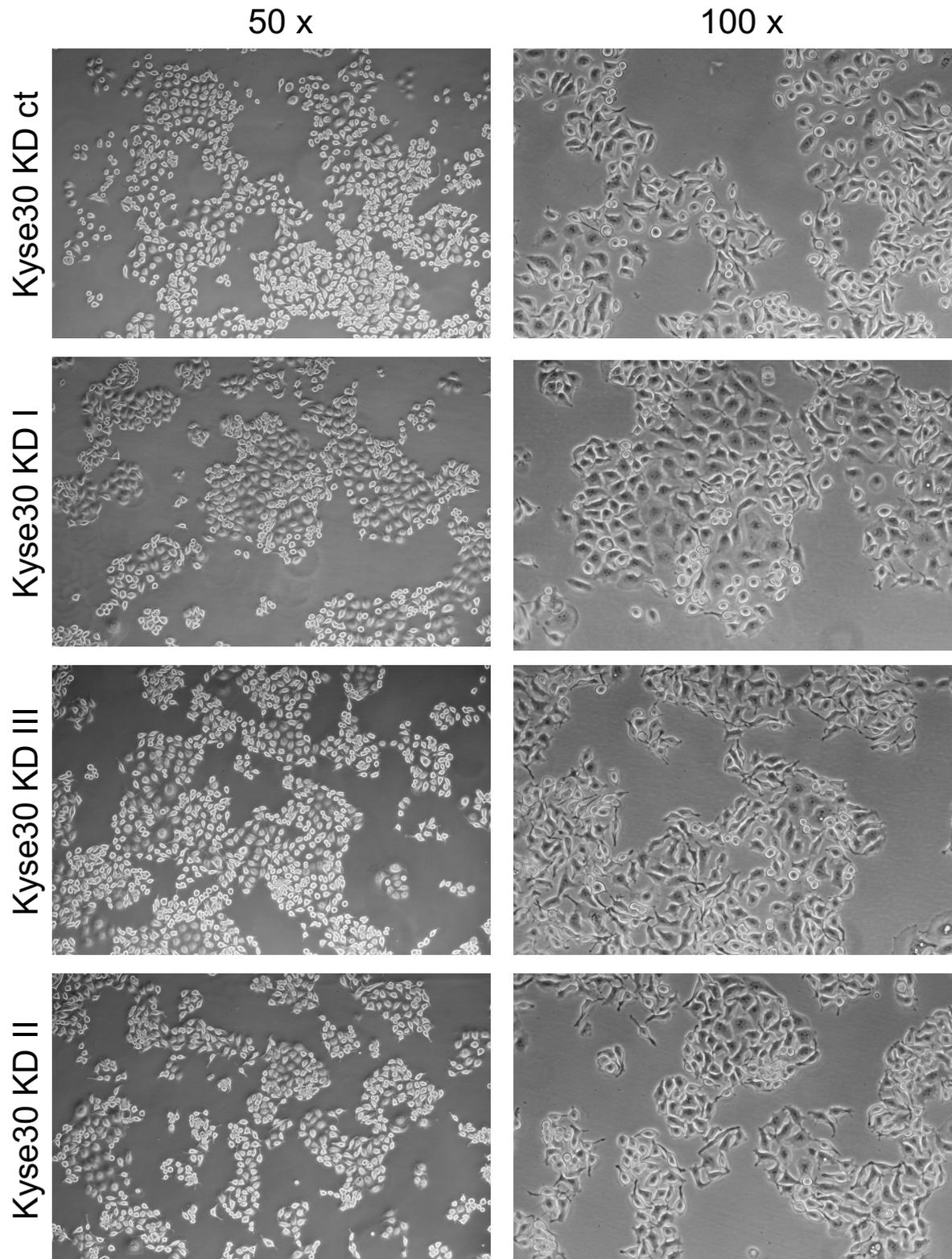


Abbildung 13: Zellmorphologie von Kyse30 KD Zellen

Repräsentative Fotos für zwei unabhängige Experimente von Kyse30 KD Zellen in 50-facher und 100-facher Vergrößerung. Die Zellen wurde in gleicher Anzahl ausplattiert und nach 72 h fotografiert. Die Bildfarbe wurde im Nachhinein entsättigt und das Bild wurde aufgehellt.

5.2.2 EpCAM Knockdown führt zum Anstieg der Twist mRNA-Expression in Kyse30 Zellen

Zur Charakterisierung des Einflusses von EpCAM auf die EMT wurden etablierte EMT-Tfs in drei EpCAM-Knockdown und einer Kontroll-Zelllinie von Kyse30 untersucht. Die Slug und Sox2 Expression wurde mittels Western Blot bestimmt. Zusätzlich wurde die mRNA-Expression von Snail, Slug, Twist, ZEB1, Sox2 und Sox9 mittels qPCR in Knockdown- und Kontrollzelllinien untersucht. Die Kyse30 Knockdown Zellen zeigten keine signifikanten Veränderungen der Snail und Slug mRNA-Expressionen und Slug Proteinexpression im Western Blot im Vergleich zur Kyse30 Kontrolle. Jedoch zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Twist Expression um das ca. 1,6-fache in Kyse30 KD I, um das ca. 1,5-fache in Kyse30 KD III und um das ca. 1,9-fache in Kyse30 KD II im Vergleich zur Kontrolle. Für ZEB1, Sox2 und Sox9 zeigten sich, obwohl teilweise leicht erhöhte, keine signifikant unterschiedlichen mRNA-Expressionen in den Knockdown Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Die Sox2 Proteinexpression der Knockdown Zellen war im Western Blot jedoch im Allgemeinen etwas erniedrigt im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 14).

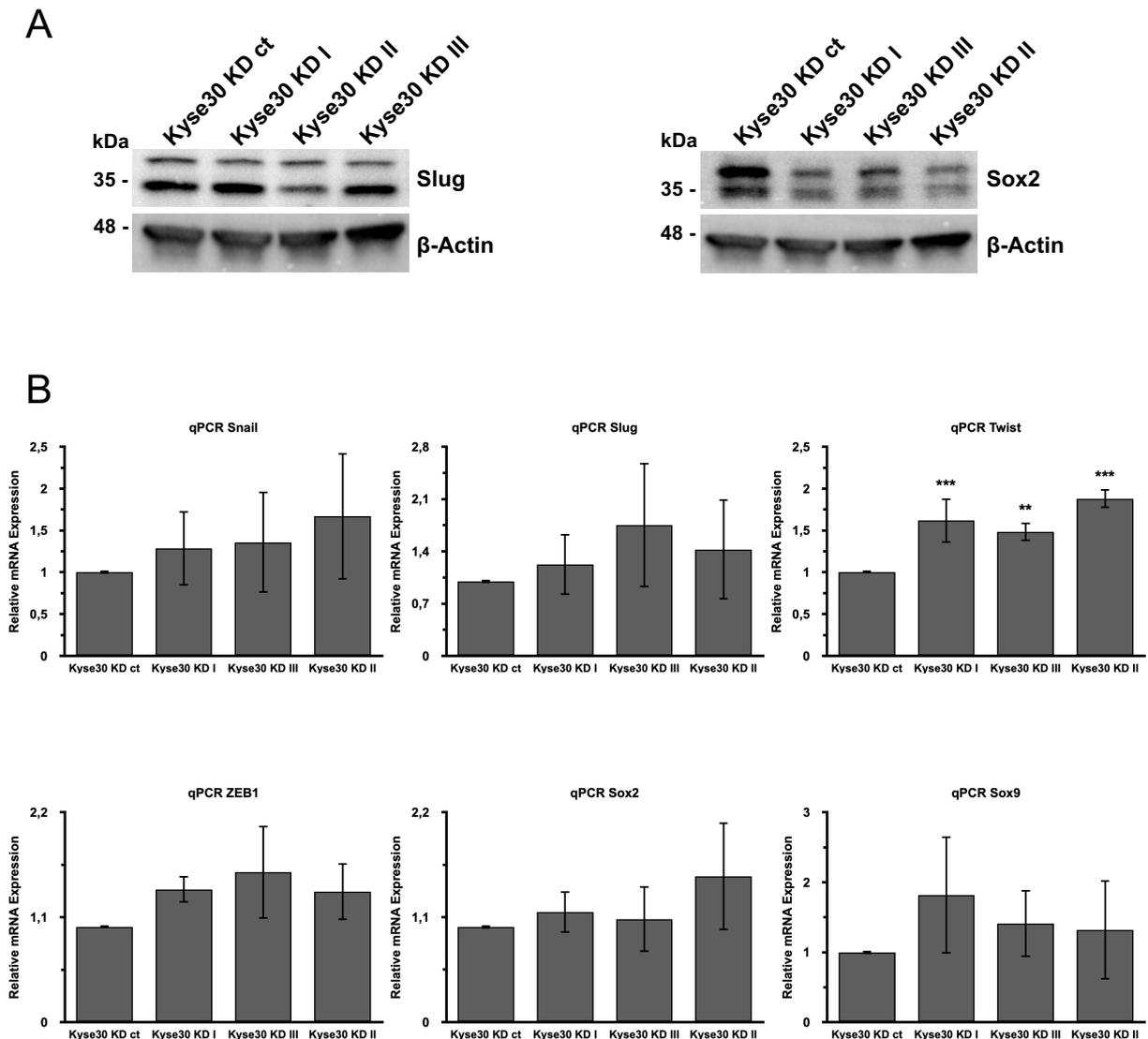


Abbildung 14: EMT-Tfs mRNA und Proteinexpression in Kyse30 KD Zellen

(A) Slug, Sox2 und β -Actin Proteinexpression bestimmt im Western Blot. (B) Relative Snail, Slug, Twist, ZEB1, Sox2 und Sox9 mRNA-Expression bestimmt in der qPCR und in Verhältnis zu Kyse30 KD ct gesetzt. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse (A) Mittelwerte und Standardabweichungen (B) aus drei unabhängigen Experimenten. Statistische Berechnung mittels einfaktorieller Varianzanalyse und Dunnett-T-Test. Signifikanz in Bezug auf Kyse30 KD ct. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$.

5.2.3 EpCAM Knockdown führt zu einer verminderten Migrationsrate und hat keinen Einfluss auf die Proliferation in Kyse30 Zellen

Zur Charakterisierung des Einflusses von EpCAM auf die Proliferation von Tumorzellen wurde die Zellzahl von drei EpCAM-Knockdown- und eine Kontroll-Zelllinie von Kyse30, wie in 4.2.1 beschrieben, nach 24 h, 72 h und 120 h mit einer Zählkammer ausgewertet. Zu keinem Zeitpunkt ergaben sich signifikanten Unterschiede in der Zellzahl. Nach 24 h betrug die Zellzahl der Kontrolle und die der

Knockdown Zellen im Mittel ca. $2,9 \times 10^5$ Zellen. Nach 72 h erreichte Kyse30 KD ct eine Zellzahl von ca. $1,4 \times 10^6$ Zellen, ebenso wie die Knockdown Zellen im Mittel. Nach 120 h wurden jeweils ca. $2,4 \times 10^6$ Zellen der Kontroll-Zellen und der Knockdown Zellen im Mittel gezählt (Abbildung 15 A).

Zur Charakterisierung des Einflusses von EpCAM auf die Migrationsfähigkeit von Tumorzellen wurden die Migrationsraten der Kyse30 KD Zellen, wie in 4.2.2 beschrieben, bestimmt. Es ergab sich eine um ca. 31 % signifikant verminderte Migrationsrate von Kyse30 KD II im Vergleich zur Kontrolle nach 24 h. Kyse30 KD I und Kyse30 KD III wiesen eine um ca. 27 % und ca. 24 % verminderte Migrationsrate auf. Nach 48 h migrierten die KD-Zellen im Mittel ca. 26 % weniger als die Kontrolle. Nach 72 h zeigten alle KD-Zellen eine im Mittel um ca. 29 % signifikant verminderte Migrationsrate im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 15 B).

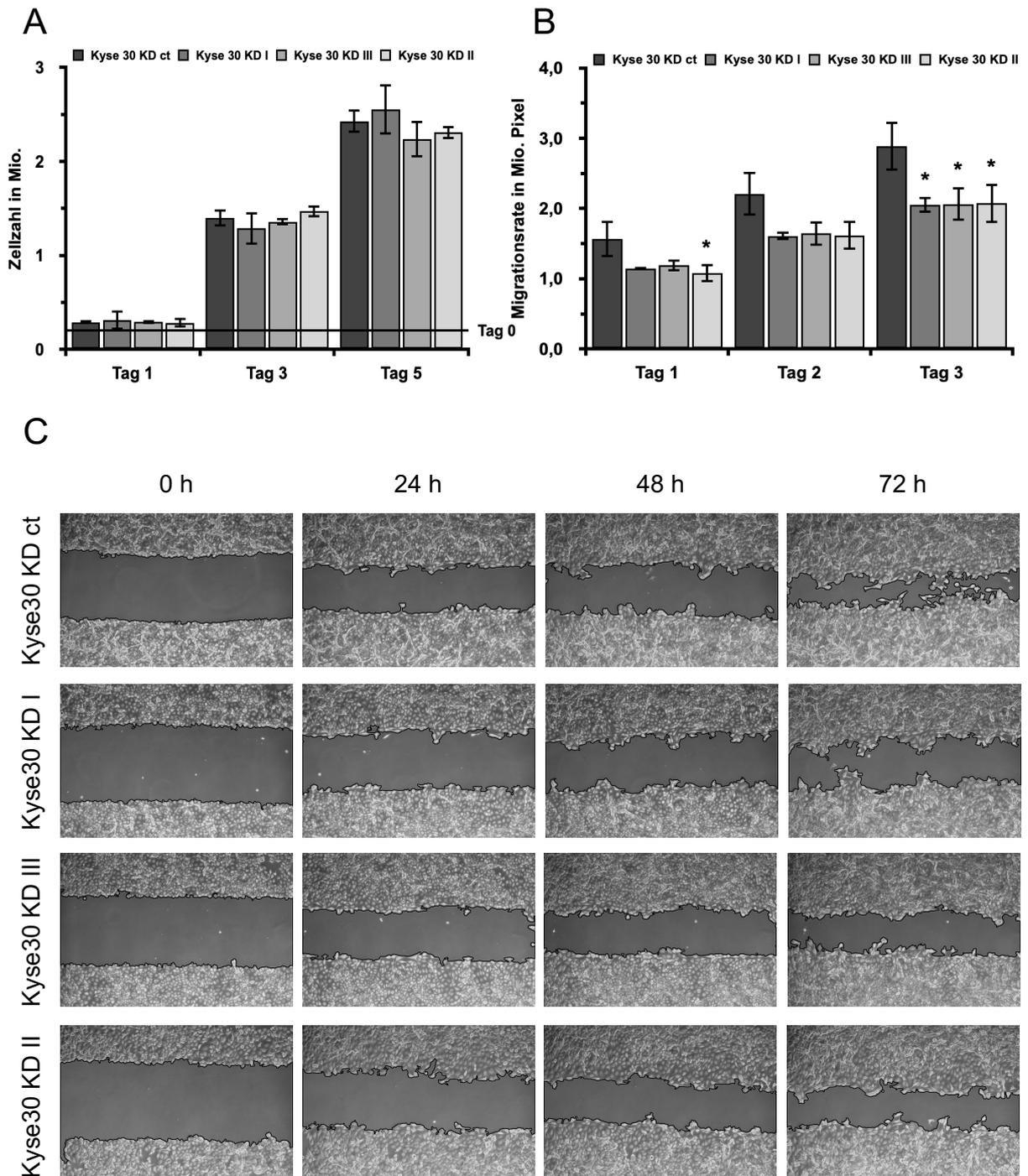


Abbildung 15: Proliferation und Migration in Kyse30 KD Zellen

(A) Ausplattierung gleicher Anzahl an Zellen und Messung der Zellzahl nach je 24 h, 72 h und 120 h. Dargestellt sind Mittelwerte der Zellzahlen und der Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten, jeweils erzeugt aus Duplikaten mit je zwei Messungen. (B) Messung der Migrationsrate nach je 24 h, 48 h und 72 h. Dargestellt sind Mittelwerte der migrierten Fläche in Pixel, dividiert durch die jeweilige Proliferationsrate und der Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten, jeweils erzeugt aus Duplikaten mit je vier Messungen. (C) Repräsentative Fotos des Spaltes in dem Zellrasen jeweils zum Startzeitpunkt 0 h und nach je 24 h, 48 h und 72 h. Statistische Berechnung mittels einfaktorieller Varianzanalyse und Dunnett-T-Test. Signifikanz in Bezug auf Kyse30 KD ct. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$.

5.2.4 EpCAM Knockdown führt zur partiell erhöhten Resistenz gegen 5-FU in Kyse30 Zellen

Zur Charakterisierung des Einflusses von EpCAM auf die Zellviabilität von Tumorzellen unter Behandlung mit Chemotherapeutika wurden drei EpCAM-Knockdown und eine Kontroll-Zelllinie von Kyse30, wie in 4.3. beschrieben, für 48 h mit Cisplatin oder 5-FU in einer Konzentration von je 0; 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40 μM inkubiert. Anschließend erfolgte ein MTT-Test zur Bestimmung der Zellviabilität. Zusätzlich wurde zum besseren Vergleich, mittels eines logistischen Regressionsmodells wie in 4.3 beschrieben, die Konzentration an Chemotherapeutika berechnet, die zu einer Reduktion der Zellviabilität um 50% (IC50) führte. Unter Cisplatintherapie zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Zelllinien in der Zellviabilität und der IC50. Die IC50 lag bei allen Zelllinien bei ca. 4 μM Cisplatin (Abbildung 16 A). Unter 5-FU Therapie zeigte sich, dass Kyse30 KD III und Kyse30 KD II eine höhere Zellviabilität als die Kontrolle aufweisen, insbesondere unter 5, 10 und 20 μM 5-FU. Dabei zeigten Kyse30 KD III und Kyse30 KD II ein signifikantes Ergebnis unter 10 μM 5-FU mit einer um je ca. 13 % erhöhten Zellviabilität als die Kontrolle. Kyse30 KD III zeigte auch unter 20 μM 5-FU eine um ca. 11 % signifikant erhöhte Zellviabilität. Die IC50 unter 5-FU Therapie lag bei Kyse30 KD III mit ca. 22 μM um ca. 54 % und bei Kyse30 KD II mit ca. 21 μM um ca. 46 % signifikant höher als bei der Kontrolle mit ca. 14 μM . Kyse30 KD I zeigte mit ca. 12 μM keine signifikante Veränderung der IC50 (Abbildung 16 B).

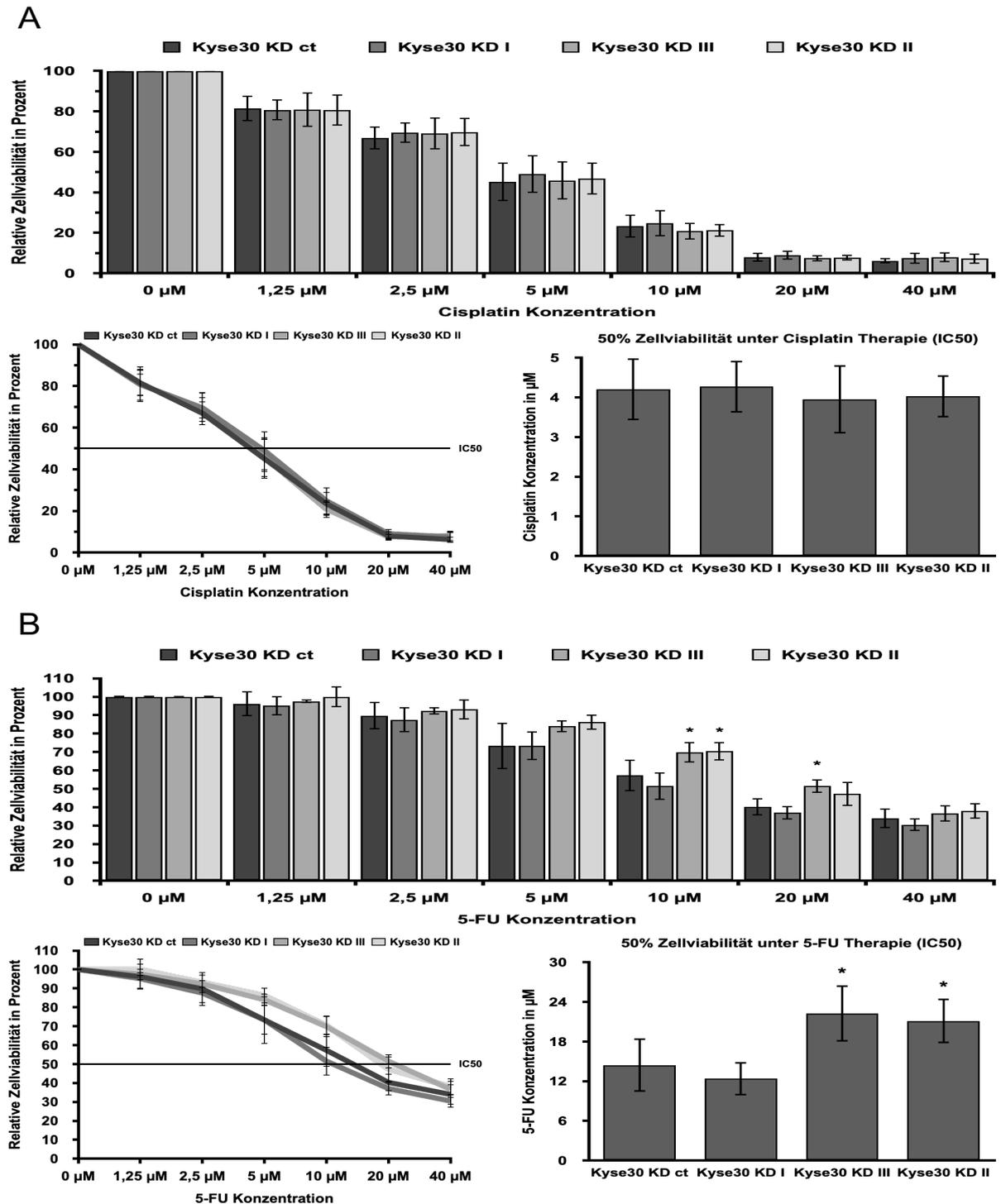


Abbildung 16: Zellviabilität unter Einfluss von Cisplatin und 5-Fu in Kyse30 KD Zellen
 Messung der optischen Dichte nach Behandlung mit je 0; 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40 μM (A) Cisplatin und (B) 5-FU und Durchführung eines MTT-Tests. Dargestellt sind Mittelwerte der Zellviabilität unter Chemotherapie in Prozent in Bezug auf die Zellviabilität ohne Chemotherapie, und der Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, jeweils erzeugt aus Triplikaten. Berechnung des IC50 durch Cisplatin und 5-FU Therapie. Dargestellt sind Mittelwerte des IC50 und der Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, jeweils erzeugt aus Triplikaten. Statistische Berechnung mittels einfaktorieller Varianzanalyse und Dunnett-T-Test. Signifikanz in Bezug auf Kyse30 KD ct. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$.

6. Diskussion

In den über 40 Jahren nach der Erstbeschreibung wurde EpCAM als wichtiges Molekül in verschiedenen Zellfunktionen charakterisiert und hat seitdem in der klinischen Diagnostik und Therapie von Tumorpatienten Einzug gefunden. Als Zelladhäsionsmolekül ist es an der Zell-Zell Interaktion beteiligt (Litvinov, Velders, et al., 1994), und durch die RIP nimmt es als Transkriptionsfaktor Einfluss auf die Proliferation und Stammzeleigenschaften von Zellen (Chaves-Perez et al., 2013; Munz et al., 2009). Der Proliferative Effekt ist in Karzinomen besonders auffallend und demzufolge korreliert EpCAM in unterschiedlichen Tumorentitäten mit einer schlechteren Prognose (Spizzo et al., 2011; Spizzo et al., 2006). Die hohe Expression von EpCAM in Tumoren im Vergleich zum normalen Gewebe wurde in der Detektion von EpCAM-exprimierenden CTCs und als therapeutischer Angriffspunkt genutzt (Cristofanilli et al., 2004; J. Li & Zhu, 2010; Went et al., 2006).

Die Epitheliale-Mesenchymale Transition wurde in ihren Ansätzen bereits vor über 100 Jahren beschrieben und bezeichnet heutzutage die, nicht immer komplett ausgeführte, Umwandlung von Epithelzellen in mesenchymale Zellen als Teil der Embryogenese, Wundheilung, Fibrosebildung und Metastasierung (Dongre & Weinberg, 2019; Thiery et al., 2009). Dieser Vorgang wird durch eine Vielzahl an Signalwegen und Transkriptionsfaktoren beeinflusst. Besonders die EMT-Tfs Snail, Slug, Twist und ZEB1 wurden dabei als sich teilweise synergistisch ergänzende Treiber der EMT beschrieben (De Craene & Berx, 2013). Diese EMT-Tfs und andere Faktoren führen zu vielfältigen strukturellen und metabolischen Veränderungen der Zelle, von denen der Verlust von Zell-Zell Kontakten durch einen Cadherin-Switch von E-Cadherin zu N-Cadherin und eine erhöhte Vimentin Expression mit Veränderung des Zytoskeletts als besonders zentrale Elemente der mesenchymalen Transition angesehen werden (Lamouille, Xu, & Derynck, 2014; J. Yang & Weinberg, 2008). Dabei beschreibt die Epitheliale-Mesenchymale Plastizität Zellen mit einem hybriden Phänotyp aus epithelialen und mesenchymalen Eigenschaften, die in ihrer Dominanz variieren können (Bhatia, Wang, Toh, & Thompson, 2020). In Krebserkrankungen ermöglicht diese Plastizität es Karzinomzellen aus dem Epithelverbund in das umliegende Bindegewebe einzudringen, um eventuell über die Blutbahn an einer anderen

Körperstelle wieder zu proliferieren und zu metastasieren, was mit einer Umkehr der Eigenschaften in einer MET verbunden ist (Thiery, 2002).

6.1 EpCAM Knockdown führte zur Erhöhung von mesenchymalen Markern

EpCAM wird von fast allen Epithelien exprimiert und kaum von anderen Gewebearten (Moldenhauer et al., 1987). Zudem zeigt sich die Expression häufig gesteigert in Karzinomen im Vergleich zum Normalgewebe. Dementsprechend wird EpCAM als Marker zur Feststellung des epithelialen Ursprungs von Tumorzellen in der pathologischen Diagnostik oder zur Detektion von CTCs benutzt. Weitere routinemäßig genutzte Marker sind E-Cadherin und Vimentin zur Bestimmung eines epithelialen oder mesenchymalen Ursprungs der Zelle. Zur Einordnung inwieweit die Expression von EpCAM sich zu der Expression von E-Cadherin, N-Cadherin und Vimentin verhält, wurden insgesamt fünf Karzinomzelllinien in Durchflusszytometrie, Western Blot und qPCR untersucht (Abbildung 5 und 6) und ihre entsprechenden Phänotypen verglichen (Abbildung 7). Im Vergleich zu FaDu zeigten alle vier anderen Zelllinien eine signifikant verminderte EpCAM Expression unterschiedlichen Ausmaßes. Es ließ sich jedoch davon kein Rückschluss auf die Expression von E-Cadherin ziehen, da Kyse30 und Cal27 höhere Werte als FaDu aufwiesen. Auch die Expression von N-Cadherin oder Vimentin, zeigte sich nicht konsistent entgegengesetzt der epithelialen Marker gerichtet. Morphologisch zeigten sich zwar teils deutliche Unterschiede zwischen den Zelllinien, jedoch ließ sich die kubische Form von FaDu und Cal33 und der spindelzellartige Charakter und die Ausbildung von Zellfortsätzen in MDA-MB-231 und Kyse30 ebenfalls nicht mit der Expression von EpCAM und den anderen Markern in eindeutiger Verbindung bringen.

Zur weiteren Einordnung einer möglichen EpCAM induzierten EMT wurden die in Tabelle 10 beschriebenen Kyse30 Knockdown-Zelllinien auf ihre Expression von typischen EMT-Tfs und phänotypischen Markern untersucht. Die drei benutzten Knockdown Zelllinien wiesen eine unterschiedlich stark verminderte EpCAM Expression im Vergleich zur Kontrolle auf (Abbildung 11). Die Unterschiede in der Expression auf dem Protein- und mRNA-Level könnten posttranslational begründet sein. Dennoch zeigen sich die Unterschiede in allen drei benutzten Methoden (Durchflusszytometrie, Western Blot und qPCR) gleichgerichtet, sodass Kyse30 KD I

den schwächsten und Kyse30 KD II den stärksten Knockdown präsentiert. Es konnte gezeigt werden, dass lediglich der Verlust von EpCAM zu einer signifikant erhöhten Vimentin und N-Cadherin Expression in einer von drei Zelllinien führte (Abbildung 12). E-Cadherin wiederum zeigte keine Veränderung in den untersuchten KD-Zelllinien. Eine eindeutig morphologische Veränderung der Zellen durch einen alleinigen EpCAM KD zu einem mesenchymalen Phänotyp, wie Driemel et al. durch den TGF β induzierten EpCAM Verlust zeigte (Driemel et al., 2014), konnte hier nicht beobachtet werden (Abbildung 13). Somit führt zwar der Verlust von EpCAM innerhalb einer Zelllinie zu einer Erhöhung von Vimentin und N-Cadherin im Sinne mesenchymaler Veränderungen, was kongruent mit anderen Beobachtungen ist, in denen Vimentin vermehrt exprimiert wurde, nachdem es zu einer Verminderung von EpCAM kam (Pastushenko & Blanpain, 2019). Die alleinige Bestimmung der Expression von EpCAM eignete sich jedoch nicht als quantitativer Marker zur Einordnung von verschiedenen Tumorzelllinien in ein epithelial-mesenchymales Spektrum.

6.2 EpCAM Knockdown führte zur Erhöhung von EMT-Tfs

Weiterhin wurde untersucht, inwiefern die Messung der EpCAM Expression Rückschlüsse auf die Ausbildung von EMT-Mechanismen in Karzinomzelllinien erlaubt. Dazu wurden die wildtypischen Zelllinien in WB und qPCR auf ihre Expression von typischen EMT-Tfs untersucht (Abbildung 8) und die Proliferations- und Migrationsfähigkeit wurde ermittelt (Abbildung 9). Es fand sich keine Korrelation zwischen der Höhe der EpCAM Expression und der Expression von EMT-Tfs. Weder zeigten FaDu und Kyse30, bei höchster EpCAM Expression, vergleichsweise niedrige EMT-Tfs Werte, noch zeigte MDA-MB-231, bei niedrigster EpCAM Expression, vergleichsweise hohe EMT-Tfs Werte. Außerdem ließ sich keine Korrelation zwischen dem Phänotyp und EMT-Tfs finden. MDA-MB-231 exprimierte zwar, als Zelllinie mit einer sehr spindelförmigen Morphologie, am stärksten ZEB1, aber am geringsten Slug und Twist. Jedoch wies Kyse30, ebenfalls mit leicht mesenchymaler Morphologie als FaDu, keine erhöhte Expression von Snail, Slug, Twist und ZEB1 auf. FaDu, Cal27 und Cal33 zeigten, bei größtenteils epithelialen Phänotypen, keine gleichgerichteten EMT-Tfs Expressionen. Zwar zeigten sich signifikante Unterschiede in der Zellzahl nach einer Proliferationsphase von fünf Tagen und FaDu zeigte dabei die stärkste Proliferation, jedoch ließ sich eine eindeutige Korrelation zwischen der Proliferation

und der EpCAM Expression, phänotypischen Markern oder EMT-Tfs nicht bestätigen. Ebenfalls zeigte sich auch keine Korrelation zwischen der Migrationsrate der Zellen und der EpCAM Expression oder EMT-Tfs. Jedoch zeigten, bei gleichzeitiger Betrachtung der Zellmorphologie und der Migrationsfähigkeit, Kyse30 und MDA-MB-231 besonders hohe Migrationsraten und größtenteils spindelförmige Zellen, während FaDu und Cal33 am wenigsten migrierten und gleichzeitig einen sehr epithelialen Phänotyp besaßen.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der Knockdown von EpCAM zu mesenchymalen Veränderungen führt, wurden die in Tabelle 10 beschriebenen Kyse30 Knockdown-Zelllinien auf ihre Expression von typischen EMT-Tfs mittels WB und qPCR sowie auf ihre Proliferations- und Migrationsfähigkeit untersucht. Hier konnte eine signifikante Erhöhung von Twist mRNA durch einen EpCAM Knockdown beobachtet werden (Abbildung 14). Zudem zeigten sich ebenfalls nicht signifikante Tendenzen zu einer Erhöhung von Snail, Slug, ZEB1, Sox2 und Sox9. Eine zu erwartende Veränderung in der Proliferation zeigte sich nicht und, gegensätzlich zu Driemel et al., konnte eine signifikant verminderte Migration dargestellt werden (Abbildung 15) (Driemel et al., 2014). Diese Ergebnisse in Bezug auf die Migration reihen sich ein in eine widersprüchliche Literatur, in der sowohl positive als auch negative Effekte von EpCAM auf Proliferation und Migration beschrieben werden (Martowicz, Seeber, & Untergasser, 2016; Osta et al., 2004). Ursächlich für die verminderte Migration könnte eine verstärkte E-Cadherin Wirkung zwischen den Zellen sein, da es durch den KD nicht zu einem Verlust von E-Cadherin kam, jedoch die inhibierende Wirkung von EpCAM auf E-Cadherin (Litvinov, Bakker, et al., 1994) abgeschwächt wurde. Weiterhin inkonsistent ist die Datenlage zur EpCAM-vermittelten EMT. Der in dieser Arbeit gezeigte Anstieg von EMT-Tfs durch den EpCAM Knockdown unterstützt die Ansicht von EpCAM als ein Protein, welches einen epithelialen Phänotyp etabliert und bei Verlust die Zelle zur EMT treibt. Jedoch ist diese Beobachtung gegenläufig zu anderen Untersuchungen, in denen die Expression von EpCAM in Nasopharynxkarzinomzellen zu einer EMT-Induktion mit Erhöhung von Snail und Slug führte (M. H. Wang et al., 2018). Diese Widersprüche in Bezug auf eine EpCAM vermittelte EMT könnten sich in den unterschiedlichen Korrelationen zwischen der EpCAM Expression und der Prognose der Patienten in verschiedenen Tumorentitäten widerspiegeln (Baumeister et al., 2018; Stoecklein et al., 2006).

6.3 EpCAM Knockdown führte zur Resistenz gegen 5-FU

Zur Charakterisierung der Wirkung von in der HNO häufig benutzten Chemotherapeutika wie Cisplatin und 5-FU in Anbetracht der EpCAM und EMT-Tfs Expression wurden die Zellviabilität der Karzinomzelllinien nach Inkubation mit Chemotherapeutika mittels MTT-Tests bestimmt (Abbildung 10). FaDu, bei höchster EpCAM Expression, reagierte am sensibelsten auf Cisplatin und Cal27, bei mittlerer EpCAM Expression, auf 5-FU. Kyse30, bei zweithöchster EpCAM Expression, zeigte von niedrigen bis zu mittleren Konzentrationen an Chemotherapeutika die größte Resistenz, während MDA-MB-231, bei geringster EpCAM Expression, in den höheren Konzentrationen die größte Resistenz aufwies. Außerdem reagierten alle Zellen bis auf MDA-MB-231, insbesondere bei Konzentrationen von 20 μM und 40 μM stärker auf die Behandlung mit Cisplatin als auf die Behandlung mit 5-FU. Damit zeigte sich keine Korrelation zwischen der EpCAM Expression und einer Resistenz gegen Cisplatin oder 5-FU der getesteten Zelllinien. Auffällig ist jedoch die besonders hohe Resistenz von Kyse30 und MDA-MB-231, welche ebenfalls eine ausgeprägte Migrationsrate und größtenteils spindelförmige Zellen aufwiesen.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der EpCAM Knockdown zu EMT-Veränderungen führte und ein typisches Merkmal von EMT induzierten Metastasen die Resistenz gegen Chemotherapeutika ist (Fischer et al., 2015), wurden die Kyse30 KD Zellen, wie oben beschrieben, auf ihre Chemoresistenz untersucht. Hier bewies sich eine signifikant erhöhte Resistenz gegen 5-FU in zwei von drei Zelllinien (Abbildung 16). Eine Veränderung in der Wirksamkeit von Cisplatin konnte nicht beobachtet werden. Ähnlich wie in den vorherigen Abschnitten ist die Datenlage zur EpCAM-vermittelten Chemoresistenz nicht eindeutig. Literatur mit konträren Ergebnissen zu denen in dem hier durchgeführten Experiment zeigten, dass ein EpCAM Knockdown in Brustkrebszellen zu einer verstärkten Wirkung von 5-FU führte (J. Gao, Yan, Liu, & Yang, 2014) und erhöhtes EpCAM mit einem schlechteren Ansprechen von Ösophaguskarzinomzellen auf eine Chemotherapie mit Cisplatin und 5-FU verbunden war (X. Sun et al., 2018). Mit den Ergebnissen dieser Arbeit kongruente Literatur berichtete von einem Besseren Ansprechen auf Cisplatin in Ovarkarzinomzellen mit einer Überexpression von EpCAM (Woopen et al., 2014).

In Zusammenschau aller Ergebnisse konnte somit, durch einen alleinigen Verlust von EpCAM, eine partielle EMT in Kyse30 Zellen initiiert werden mit Erhöhung der mesenchymalen Marker Vimentin und N-Cadherin, Erhöhung von Twist und anderen EMT-Tfs und einer erhöhten Resistenz gegen 5-FU. Jedoch wurden vornehmlich prätranslationale Veränderung in einer kleinen Stichprobe an Zelllinien untersucht. Anschließende Funktionstest wie die Ausbildung von Kolonien und Invasionfähigkeit, sowie erweiterte proteomische und in vivo Experimente werden nötig sein, um eine EpCAM-vermittelte EMT besser zu validieren.

7. Zusammenfassung/Abstract

EpCAM als in Karzinomen überexprimiertes und in Epithelien ubiquitär vorhandenes transmembranäres Zelladhäsionsmolekül moduliert die Zell-Zell-Verbindung, fördert durch RIP und Bildung eines EpICDs als Transkriptionsfaktor Stammzeleigenschaften und die Proliferation von Zellen und interagiert in der EMT als Ligand für EGFR durch sEpEX und durch direkt transkriptionelle Aktivierung von EMT-Tfs durch EpICD. Die EMT ist durch den Verlust von epithelialen Markern wie EpCAM und E-Cadherin und durch gesteigerte mesenchymale Eigenschaften wie Migration und Invasion sowie eine einhergehende Chemoresistenz gekennzeichnet. Um die Interaktion zwischen EpCAM und EMT weiter zu charakterisieren wurde EpCAM und der epitheliale, bzw. mesenchymale Status von fünf verschiedenen Karzinomzelllinien untersucht und in Verbindung mit der Expression von EMT-Tfs mittels molekularbiologischer Methoden, dem Proliferations- und Migrationsverhalten und der Chemoresistenz gegen Cisplatin und 5-FU gestellt. Hierbei konnte keine Eindeutige Korrelation zwischen der Höhe der EpCAM Expression und der Expression von E-Cadherin, N-Cadherin und Vimentin gefunden werden. Ebenfalls zeigten die Zellen keine, mit der Expression der beschriebenen Marker gleichgerichtet in Verbindung stehende Zellmorphologie. Auch einzelne signifikante Unterschiede in Proliferation, Migration, Expression von EMT-Tfs und Chemoresistenz konnten nicht vollends mit der EpCAM Expression korreliert werden. Daher bewies sich EpCAM in dieser Arbeit nicht als geeigneter alleiniger Marker um Rückschlüsse auf epitheliale oder mesenchymale Eigenschaften in verschiedenen Zelllinien zu ziehen. Darüber hinaus wurde der direkte Einfluss von EpCAM auf die EMT in einem Knockdown Modell von Kyse30, einer Ösophaguskarzinomzelllinie, bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass der KD von EpCAM zu EMT typischen Veränderungen mit einer signifikanten Erhöhung der mesenchymalen Markern Vimentin und N-Cadherin, vom EMT-Tf Twist in der qPCR und zu einer signifikanten erhöhten Chemoresistenz gegen 5-FU führte. Normalerweise mit der EMT verbundene morphologische Veränderungen, der Verlust von E-Cadherin, eine verminderte Proliferation, gesteigerte Migration und ein signifikanter Anstieg anderer EMT-Tfs konnte jedoch nicht gefunden werden. Somit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Verlust von EpCAM zu partiellen EMT-Veränderungen innerhalb einer Zelllinie führt.

EpCAM is a transmembrane cell adhesion molecule, overexpressed in carcinomas and ubiquitously present in epithelia. It modulates the cell-cell junction and through RIP and formation of an EpICD it promotes stem cell properties and cell proliferation. Furthermore it interacts in EMT as a ligand for EGFR through sEpEX and through direct transcriptional activation of EMT-Tfs by EpICD. EMT is characterized by loss of epithelial markers such as EpCAM and E-cadherin and by increased mesenchymal properties such as migration and invasion and concomitant chemoresistance. To further characterize the interaction between EpCAM and EMT, EpCAM and the epithelial, or mesenchymal status of five different carcinoma cell lines were investigated. Therefore, related expression of EMT-Tfs by molecular biology methods were investigated and proliferation behavior, migration behavior, and chemoresistance to cisplatin and 5-FU were tested. No clear correlation was found between the level of EpCAM expression and the expression of E-cadherin, N-cadherin, and Vimentin. Likewise, the cells did not show any cell morphology correlated with the expression of the described markers. Also, individual significant differences in proliferation, migration, expression of EMT-Tfs and chemoresistance could not be fully correlated with EpCAM expression. Therefore, EpCAM alone did not prove to be a suitable marker to draw conclusions about epithelial or mesenchymal properties in different cell lines in this work. Furthermore, the direct effect of EpCAM on EMT was determined in a knockdown model of Kyse30, an esophageal carcinoma cell line. It was shown that the KD of EpCAM lead to EMT typical changes with a significant increase of the mesenchymal markers Vimentin and N-cadherin, of EMT-Tf Twist in qPCR and to a significant increased chemoresistance to 5-FU. Morphological changes normally associated with EMT, loss of E-cadherin, decreased proliferation, increased migration, and a significant increase in other EMT-Tfs, however, could not be found. Thus, this work demonstrated that loss of EpCAM leads to partial EMT changes within a cell line.

8. Literaturverzeichnis

- Adachi, K., Nikaido, I., Ohta, H., Ohtsuka, S., Ura, H., Kadota, M., . . . Niwa, H. (2013). Context-dependent wiring of Sox2 regulatory networks for self-renewal of embryonic and trophoblast stem cells. *Molecular Cell*, 52(3), 380-392. doi:10.1016/j.molcel.2013.09.002
- Aiello, N. M., & Kang, Y. (2019). Context-dependent EMT programs in cancer metastasis. *Journal of Experimental Medicine*, 216(5), 1016-1026. doi:10.1084/jem.20181827
- Akita, H., Nagano, H., Takeda, Y., Eguchi, H., Wada, H., Kobayashi, S., . . . Doki, Y. (2011). Ep-CAM is a significant prognostic factor in pancreatic cancer patients by suppressing cell activity. *Oncogene*, 30(31), 3468-3476. doi:10.1038/onc.2011.59
- Akopian, D., Shen, K., Zhang, X., & Shan, S. O. (2013). Signal recognition particle: an essential protein-targeting machine. *Annual Review of Biochemistry*, 82, 693-721. doi:10.1146/annurev-biochem-072711-164732
- Alberti, S., Nutini, M., & Herzenberg, L. A. (1994). DNA methylation prevents the amplification of TROP1, a tumor-associated cell surface antigen gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(13), 5833-5837. doi:10.1073/pnas.91.13.5833
- Amin, M. B., Greene, F. L., Edge, S. B., Compton, C. C., Gershenwald, J. E., Brookland, R. K., . . . Winchester, D. P. (2017). The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 67(2), 93-99. doi:10.3322/caac.21388
- Ayob, A. Z., & Ramasamy, T. S. (2018). Cancer stem cells as key drivers of tumour progression. *Journal of Biomedical Science*, 25(1), 20. doi:10.1186/s12929-018-0426-4
- Baeuerle, P. A., & Gires, O. (2007). EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *British Journal of Cancer*, 96(3), 417-423. doi:10.1038/sj.bjc.6603494
- Bagci, O., & Kurtgoz, S. (2015). Amplification of Cellular Oncogenes in Solid Tumors. *North American Journal of Medical Sciences*, 7(8), 341-346. doi:10.4103/1947-2714.163641
- Bai, J., Chen, MN., Wei, XL. et al. (2017). The zinc-finger transcriptional factor Slug transcriptionally downregulates ER α by recruiting lysine-specific demethylase 1 in human breast cancer. In (Vol. 6). *Oncogenesis*.
- Balzar, M., Bakker, H. A., Briaire-de-Bruijn, I. H., Fleuren, G. J., Warnaar, S. O., & Litvinov, S. V. (1998). Cytoplasmic tail regulates the intercellular adhesion function of the epithelial cell adhesion molecule. *Molecular and Cellular Biology*, 18(8), 4833-4843. doi:10.1128/MCB.18.8.4833
- Balzar, M., Winter, M. J., de Boer, C. J., & Litvinov, S. V. (1999). The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 77(10), 699-712. doi:10.1007/s001099900038
- Basu, A. K. (2011). Mutagenesis: The Outcome of Faulty Replication of DNA. *Chemical Carcinogenesis*, pp. 375-399.
- Batlle, E., Sancho, E., Franci, C., Dominguez, D., Monfar, M., Baulida, J., & Garcia De Herreros, A. (2000). The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nature Cell Biology*, 2(2), 84-89. doi:10.1038/35000034

- Baumeister, P., Hollmann, A., Kitz, J., Afthonidou, A., Simon, F., Shakhtour, J., . . . Gires, O. (2018). High Expression of EpCAM and Sox2 is a Positive Prognosticator of Clinical Outcome for Head and Neck Carcinoma. *Scientific Reports*, *8*(1), 14582. doi:10.1038/s41598-018-32178-8
- Beerling, E., Seinstra, D., de Wit, E., Kester, L., van der Velden, D., Maynard, C., . . . van Rheenen, J. (2016). Plasticity between Epithelial and Mesenchymal States Unlinks EMT from Metastasis-Enhancing Stem Cell Capacity. *Cell Reports*, *14*(10), 2281-2288. doi:10.1016/j.celrep.2016.02.034
- Beroukhim, R., Mermel, C. H., Porter, D., Wei, G., Raychaudhuri, S., Donovan, J., . . . Meyerson, M. (2010). The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature*, *463*(7283), 899-905. doi:10.1038/nature08822
- Bhatia, S., Wang, P., Toh, A., & Thompson, E. W. (2020). New Insights Into the Role of Phenotypic Plasticity and EMT in Driving Cancer Progression. *Front Mol Biosci*, *7*, 71. doi:10.3389/fmolb.2020.00071
- Bishop, J. M. (1991). Molecular themes in oncogenesis. *Cell*, *64*(2), 235-248. doi:10.1016/0092-8674(91)90636-d
- Braakhuis, B. J., Brakenhoff, R. H., & Leemans, C. R. (2012). Treatment choice for locally advanced head and neck cancers on the basis of risk factors: biological risk factors. *Annals of Oncology*, *23 Suppl 10*, x173-177. doi:10.1093/annonc/mds299
- Brabletz, T., Jung, A., Spaderna, S., Hlubek, F., & Kirchner, T. (2005). Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nature Reviews: Cancer*, *5*(9), 744-749. doi:10.1038/nrc1694
- Brabletz, T., Kalluri, R., Nieto, M. A., & Weinberg, R. A. (2018). EMT in cancer. *Nature Reviews: Cancer*, *18*(2), 128-134. doi:10.1038/nrc.2017.118
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *68*(6), 394-424. doi:10.3322/caac.21492
- Brouns, E., Baart, J., Karagozoglu, K., Aartman, I., Bloemena, E., & van der Waal, I. (2014). Malignant transformation of oral leukoplakia in a well-defined cohort of 144 patients. *Oral Diseases*, *20*(3), e19-24. doi:10.1111/odi.12095
- Brown, M. S., Ye, J., Rawson, R. B., & Goldstein, J. L. (2000). Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell*, *100*(4), 391-398. doi:10.1016/s0092-8674(00)80675-3
- Calabrese, G., Crescenzi, C., Morizio, E., Palka, G., Guerra, E., & Alberti, S. (2001). Assignment of TACSTD1 (alias TROP1, M4S1) to human chromosome 2p21 and refinement of mapping of TACSTD2 (alias TROP2, M1S1) to human chromosome 1p32 by in situ hybridization. *Cytogenetics and Cell Genetics*, *92*(1-2), 164-165. doi:10.1159/000056891
- Chaffer, C. L., Thompson, E. W., & Williams, E. D. (2007). Mesenchymal to epithelial transition in development and disease. *Cells Tissues Organs*, *185*(1-3), 7-19. doi:10.1159/000101298
- Chakrabarti, R., Hwang, J., Andres Blanco, M., Wei, Y., Lukacisin, M., Romano, R. A., . . . Kang, Y. (2012). Elf5 inhibits the epithelial-mesenchymal transition in mammary gland development and breast cancer metastasis by transcriptionally repressing Snail2. *Nature Cell Biology*, *14*(11), 1212-1222. doi:10.1038/ncb2607
- Chang, C. J., Chao, C. H., Xia, W., Yang, J. Y., Xiong, Y., Li, C. W., . . . Hung, M. C. (2011). p53 regulates epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties through modulating miRNAs. *Nature Cell Biology*, *13*(3), 317-323. doi:10.1038/ncb2173

- Chaves-Perez, A., Mack, B., Maetzel, D., Kremling, H., Eggert, C., Harreus, U., & Gires, O. (2013). EpCAM regulates cell cycle progression via control of cyclin D1 expression. *Oncogene*, 32(5), 641-650. doi:10.1038/onc.2012.75
- Chong, J. M., & Speicher, D. W. (2001). Determination of disulfide bond assignments and N-glycosylation sites of the human gastrointestinal carcinoma antigen GA733-2 (CO17-1A, EGP, KS1-4, KSA, and Ep-CAM). *Journal of Biological Chemistry*, 276(8), 5804-5813. doi:10.1074/jbc.M008839200
- Chow, L. Q. M. (2020). Head and Neck Cancer. *New England Journal of Medicine*, 382(1), 60-72. doi:10.1056/NEJMra1715715
- Cieply, B., Riley, P. t., Pifer, P. M., Widmeyer, J., Addison, J. B., Ivanov, A. V., . . . Frisch, S. M. (2012). Suppression of the epithelial-mesenchymal transition by Grainyhead-like-2. *Cancer Research*, 72(9), 2440-2453. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-4038
- Coordes, A., Lenz, K., Qian, X., Lenarz, M., Kaufmann, A. M., & Albers, A. E. (2016). Meta-analysis of survival in patients with HNSCC discriminates risk depending on combined HPV and p16 status. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 273(8), 2157-2169. doi:10.1007/s00405-015-3728-0
- Cristofanilli, M., Budd, G. T., Ellis, M. J., Stopeck, A., Matera, J., Miller, M. C., . . . Hayes, D. F. (2004). Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 351(8), 781-791. doi:10.1056/NEJMoa040766
- Croce, C. M. (2008). Oncogenes and cancer. *New England Journal of Medicine*, 358(5), 502-511. doi:10.1056/NEJMra072367
- Dang, C. V., Reddy, E. P., Shokat, K. M., & Soucek, L. (2017). Drugging the 'undruggable' cancer targets. *Nature Reviews: Cancer*, 17(8), 502-508. doi:10.1038/nrc.2017.36
- Dave, N., Guaita-Esteruelas, S., Gutarra, S., Frias, A., Beltran, M., Peiro, S., & de Herreros, A. G. (2011). Functional cooperation between Snail1 and twist in the regulation of ZEB1 expression during epithelial to mesenchymal transition. *Journal of Biological Chemistry*, 286(14), 12024-12032. doi:10.1074/jbc.M110.168625
- De Craene, B., & Berx, G. (2013). Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nature Reviews: Cancer*, 13(2), 97-110. doi:10.1038/nrc3447
- Doll, R., & Peto, R. (1981). The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *Journal of the National Cancer Institute*, 66(6), 1191-1308. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7017215>
- Dongre, A., & Weinberg, R. A. (2019). New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*, 20(2), 69-84. doi:10.1038/s41580-018-0080-4
- Driemel, C., Kremling, H., Schumacher, S., Will, D., Wolters, J., Lindenlauf, N., . . . Gires, O. (2014). Context-dependent adaption of EpCAM expression in early systemic esophageal cancer. *Oncogene*, 33(41), 4904-4915. doi:10.1038/onc.2013.441
- Eger, A., Aigner, K., Sonderegger, S., Dampier, B., Oehler, S., Schreiber, M., . . . Foisner, R. (2005). DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. *Oncogene*, 24(14), 2375-2385. doi:10.1038/sj.onc.1208429
- Elaskalani, O., Razak, N. B., Falasca, M., & Metharom, P. (2017). Epithelial-mesenchymal transition as a therapeutic target for overcoming chemoresistance in

- pancreatic cancer. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 9(1), 37-41. doi:10.4251/wjgo.v9.i1.37
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D. M., Pineros, M., . . . Bray, F. (2019). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer*, 144(8), 1941-1953. doi:10.1002/ijc.31937
- Fialkow, L., Wang, Y., & Downey, G. P. (2007). Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radical Biology and Medicine*, 42(2), 153-164. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2006.09.030
- Fischer, K. R., Durrans, A., Lee, S., Sheng, J., Li, F., Wong, S. T., . . . Gao, D. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature*, 527(7579), 472-476. doi:10.1038/nature15748
- Fong, D., Moser, P., Kasal, A., Seeber, A., Gastl, G., Martowicz, A., . . . Spizzo, G. (2014). Loss of membranous expression of the intracellular domain of EpCAM is a frequent event and predicts poor survival in patients with pancreatic cancer. *Histopathology*, 64(5), 683-692. doi:10.1111/his.12307
- Fung, S. Y., Lam, J. W., & Chan, K. C. (2016). Clinical utility of circulating Epstein-Barr virus DNA analysis for the management of nasopharyngeal carcinoma. *Chin Clin Oncol*, 5(2), 18. doi:10.21037/cco.2016.03.07
- Gan, S. J., Dahlstrom, K. R., Peck, B. W., Caywood, W., Li, G., Wei, Q., . . . Sturgis, E. M. (2013). Incidence and pattern of second primary malignancies in patients with index oropharyngeal cancers versus index nonoropharyngeal head and neck cancers. *Cancer*, 119(14), 2593-2601. doi:10.1002/cncr.28107
- Gao, H., Teng, C., Huang, W., Peng, J., & Wang, C. (2015). SOX2 Promotes the Epithelial to Mesenchymal Transition of Esophageal Squamous Cells by Modulating Slug Expression through the Activation of STAT3/HIF-alpha Signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9), 21643-21657. doi:10.3390/ijms160921643
- Gao, J., Yan, Q., Liu, S., & Yang, X. (2014). Knockdown of EpCAM enhances the chemosensitivity of breast cancer cells to 5-fluorouracil by downregulating the antiapoptotic factor Bcl-2. *PloS One*, 9(7), e102590. doi:10.1371/journal.pone.0102590
- George, J. T., Jolly, M. K., Xu, S., Somarelli, J. A., & Levine, H. (2017). Survival Outcomes in Cancer Patients Predicted by a Partial EMT Gene Expression Scoring Metric. *Cancer Research*, 77(22), 6415-6428. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-3521
- Gillison, M. L., Chaturvedi, A. K., Anderson, W. F., & Fakhry, C. (2015). Epidemiology of Human Papillomavirus-Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 33(29), 3235-3242. doi:10.1200/JCO.2015.61.6995
- Gires, O., Eskofier, S., Lang, S., Zeidler, R., & Munz, M. (2003). Cloning and characterisation of a 1.1 kb fragment of the carcinoma-associated epithelial cell adhesion molecule promoter. *Anticancer Research*, 23(4), 3255-3261. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12926061>
- Gires, O., Kieu, C., Fix, P., Schmitt, B., Munz, M., Wollenberg, B., & Zeidler, R. (2001). Tumor necrosis factor alpha negatively regulates the expression of the carcinoma-associated antigen epithelial cell adhesion molecule. *Cancer*, 92(3), 620-628. doi:10.1002/1097-0142(20010801)92:3<620::aid-cncr1362>3.0.co;2-f
- Gires, O., Pan, M., Schinke, H., Canis, M., & Baeuerle, P. A. (2020). Expression and function of epithelial cell adhesion molecule EpCAM: where are we after 40 years? *Cancer and Metastasis Reviews*, 39(3), 969-987. doi:10.1007/s10555-020-09898-3

- Global Burden of Disease Cancer, C., Fitzmaurice, C., Allen, C., Barber, R. M., Barregard, L., Bhutta, Z. A., . . . Naghavi, M. (2017). 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: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol*, 3(4), 524-548. doi:10.1001/jamaoncol.2016.5688
- Greenburg, G., & Hay, E. D. (1982). Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *Journal of Cell Biology*, 95(1), 333-339. doi:10.1083/jcb.95.1.333
- Gunasinghe, N. P., Wells, A., Thompson, E. W., & Hugo, H. J. (2012). Mesenchymal-epithelial transition (MET) as a mechanism for metastatic colonisation in breast cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 31(3-4), 469-478. doi:10.1007/s10555-012-9377-5
- Hachmeister, M., Bobowski, K. D., Hognl, S., Dislich, B., Fukumori, A., Eggert, C., . . . Gires, O. (2013). Regulated intramembrane proteolysis and degradation of murine epithelial cell adhesion molecule mEpCAM. *PloS One*, 8(8), e71836. doi:10.1371/journal.pone.0071836
- Han, X., Fang, X., Lou, X., Hua, D., Ding, W., Foltz, G., . . . Lin, B. (2012). Silencing SOX2 induced mesenchymal-epithelial transition and its expression predicts liver and lymph node metastasis of CRC patients. *PloS One*, 7(8), e41335. doi:10.1371/journal.pone.0041335
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31-46. doi:10.1158/2159-8290.CD-21-1059
- Handa, O., Naito, Y., & Yoshikawa, T. (2011). Redox biology and gastric carcinogenesis: the role of *Helicobacter pylori*. *Redox Rep*, 16(1), 1-7. doi:10.1179/174329211X12968219310756
- Haynes, J., Srivastava, J., Madson, N., Wittmann, T., & Barber, D. L. (2011). Dynamic actin remodeling during epithelial-mesenchymal transition depends on increased moesin expression. *Molecular Biology of the Cell*, 22(24), 4750-4764. doi:10.1091/mbc.E11-02-0119
- Hennessey, P. T., Westra, W. H., & Califano, J. A. (2009). Human papillomavirus and head and neck squamous cell carcinoma: recent evidence and clinical implications. *Journal of Dental Research*, 88(4), 300-306. doi:10.1177/0022034509333371
- Herlyn, M., Steplewski, Z., Herlyn, D., & Koprowski, H. (1979). Colorectal carcinoma-specific antigen: detection by means of monoclonal antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(3), 1438-1442. doi:10.1073/pnas.76.3.1438
- Herreros-Villanueva, M., Zhang, J. S., Koenig, A., Abel, E. V., Smyrk, T. C., Bamlet, W. R., . . . Billadeau, D. D. (2013). SOX2 promotes dedifferentiation and imparts stem cell-like features to pancreatic cancer cells. *Oncogenesis*, 2, e61. doi:10.1038/oncsis.2013.23
- Hirohashi, S. (1998). Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *American Journal of Pathology*, 153(2), 333-339. doi:10.1016/S0002-9440(10)65575-7
- Hoeijmakers, J. H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411(6835), 366-374. doi:10.1038/35077232
- Hsu, Y. T., Osmulski, P., Wang, Y., Huang, Y. W., Liu, L., Ruan, J., . . . Huang, T. H. (2016). EpCAM-Regulated Transcription Exerts Influences on Nanomechanical Properties of Endometrial Cancer Cells That Promote Epithelial-to-Mesenchymal

- Transition. *Cancer Research*, 76(21), 6171-6182. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-0752
- Huang, D., Duan, H., Huang, H., Tong, X., Han, Y., Ru, G., . . . Zhao, Z. (2016). Cisplatin resistance in gastric cancer cells is associated with HER2 upregulation-induced epithelial-mesenchymal transition. *Scientific Reports*, 6, 20502. doi:10.1038/srep20502
- Hugo, H. J., Wafai, R., Blick, T., Thompson, E. W., & Newgreen, D. F. (2009). Staurosporine augments EGF-mediated EMT in PMC42-LA cells through actin depolymerisation, focal contact size reduction and Snail1 induction - a model for cross-modulation. *BMC Cancer*, 9, 235. doi:10.1186/1471-2407-9-235
- Imrich, S., Hachmeister, M., & Gires, O. (2012). EpCAM and its potential role in tumor-initiating cells. *Cell Adh Migr*, 6(1), 30-38. doi:10.4161/cam.18953
- Inc., A. B. (2023, 2023-10-23). IC50 Calculator. Retrieved from <https://www.aatbio.com/tools/ic50-calculator>
- Jang, M. H., Kim, H. J., Kim, E. J., Chung, Y. R., & Park, S. Y. (2015). Expression of epithelial-mesenchymal transition-related markers in triple-negative breast cancer: ZEB1 as a potential biomarker for poor clinical outcome. *Human Pathology*, 46(9), 1267-1274. doi:10.1016/j.humpath.2015.05.010
- Janni, W. J., Rack, B., Terstappen, L. W., Pierga, J. Y., Taran, F. A., Fehm, T., . . . Lucci, A. (2016). Pooled Analysis of the Prognostic Relevance of Circulating Tumor Cells in Primary Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 22(10), 2583-2593. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-1603
- Jechlinger, M., Grunert, S., & Beug, H. (2002). Mechanisms in epithelial plasticity and metastasis: insights from 3D cultures and expression profiling. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 7(4), 415-432. doi:10.1023/a:1024090116451
- Kajita, M., McClinic, K. N., & Wade, P. A. (2004). Aberrant expression of the transcription factors snail and slug alters the response to genotoxic stress. *Molecular and Cellular Biology*, 24(17), 7559-7566. doi:10.1128/MCB.24.17.7559-7566.2004
- Kajiyama, H., Shibata, K., Terauchi, M., Yamashita, M., Ino, K., Nawa, A., & Kikkawa, F. (2007). Chemoresistance to paclitaxel induces epithelial-mesenchymal transition and enhances metastatic potential for epithelial ovarian carcinoma cells. *International Journal of Oncology*, 31(2), 277-283. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17611683>
- Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Clinical Investigation*, 119(6), 1420-1428. doi:10.1172/JCI39104
- Kempers, M. J., Kuiper, R. P., Ockeloen, C. W., Chappuis, P. O., Hutter, P., Rahner, N., . . . Ligtenberg, M. J. (2011). Risk of colorectal and endometrial cancers in EPCAM deletion-positive Lynch syndrome: a cohort study. *Lancet Oncology*, 12(1), 49-55. doi:10.1016/S1470-2045(10)70265-5
- Kielbassa, C., Roza, L., & Epe, B. (1997). Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light. *Carcinogenesis*, 18(4), 811-816. doi:10.1093/carcin/18.4.811
- Knudson, A. G., Jr. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68(4), 820-823. doi:10.1073/pnas.68.4.820
- Knudson, A. G., Jr., Meadows, A. T., Nichols, W. W., & Hill, R. (1976). Chromosomal deletion and retinoblastoma. *New England Journal of Medicine*, 295(20), 1120-1123. doi:10.1056/NEJM197611112952007

- Kokudo, T., Suzuki, Y., Yoshimatsu, Y., Yamazaki, T., Watabe, T., & Miyazono, K. (2008). Snail is required for TGFbeta-induced endothelial-mesenchymal transition of embryonic stem cell-derived endothelial cells. *Journal of Cell Science*, *121*(Pt 20), 3317-3324. doi:10.1242/jcs.028282
- Korpál, M., Lee, E. S., Hu, G., & Kang, Y. (2008). The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(22), 14910-14914. doi:10.1074/jbc.C800074200
- Kroger, C., Afeyan, A., Mraz, J., Eaton, E. N., Reinhardt, F., Khodor, Y. L., . . . Weinberg, R. A. (2019). Acquisition of a hybrid E/M state is essential for tumorigenicity of basal breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(15), 7353-7362. doi:10.1073/pnas.1812876116
- Kuiper, R. P., Vissers, L. E., Venkatachalam, R., Bodmer, D., Hoenselaar, E., Goossens, M., . . . Ligtenberg, M. J. (2011). Recurrence and variability of germline EPCAM deletions in Lynch syndrome. *Human Mutation*, *32*(4), 407-414. doi:10.1002/humu.21446
- Kurokawa, M., Ise, N., Omi, K., Goishi, K., & Higashiyama, S. (2013). Cisplatin influences acquisition of resistance to molecular-targeted agents through epithelial-mesenchymal transition-like changes. *Cancer Science*, *104*(7), 904-911. doi:10.1111/cas.12171
- Kurrey, N. K., Jalgaonkar, S. P., Joglekar, A. V., Ghanate, A. D., Chaskar, P. D., Doiphode, R. Y., & Bapat, S. A. (2009). Snail and slug mediate radioresistance and chemoresistance by antagonizing p53-mediated apoptosis and acquiring a stem-like phenotype in ovarian cancer cells. *Stem Cells*, *27*(9), 2059-2068. doi:10.1002/stem.154
- Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*, *15*(3), 178-196. doi:10.1038/nrm3758
- Lee, J. M., Dedhar, S., Kalluri, R., & Thompson, E. W. (2006). The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *Journal of Cell Biology*, *172*(7), 973-981. doi:10.1083/jcb.200601018
- Leemans, C. R., Snijders, P. J. F., & Brakenhoff, R. H. (2018). The molecular landscape of head and neck cancer. *Nature Reviews: Cancer*, *18*(5), 269-282. doi:10.1038/nrc.2018.11
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, D. K., AWMF). (2021). S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms, Langversion 3.0. AWMF Registernummer: 007/100OL. Retrieved from <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mundhoehlenkarzinom/>
- Li, J., & Zhu, Z. (2010). Research and development of next generation of antibody-based therapeutics. *Acta Pharmacologica Sinica*, *31*(9), 1198-1207. doi:10.1038/aps.2010.120
- Li, X., Xu, Y., Chen, Y., Chen, S., Jia, X., Sun, T., . . . Li, N. (2013). SOX2 promotes tumor metastasis by stimulating epithelial-to-mesenchymal transition via regulation of WNT/beta-catenin signal network. *Cancer Letters*, *336*(2), 379-389. doi:10.1016/j.canlet.2013.03.027
- Lichtenthaler, S. F., Haass, C., & Steiner, H. (2011). Regulated intramembrane proteolysis--lessons from amyloid precursor protein processing. *Journal of Neurochemistry*, *117*(5), 779-796. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07248.x
- Lillie, F. R. (1908). *The Development of the Chick*. In Henry Holt and Co, New York.

- Lim, J., & Thiery, J. P. (2012). Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development. *Development*, *139*(19), 3471-3486. doi:10.1242/dev.071209
- Lin, C. W., Liao, M. Y., Lin, W. W., Wang, Y. P., Lu, T. Y., & Wu, H. C. (2012). Epithelial cell adhesion molecule regulates tumor initiation and tumorigenesis via activating reprogramming factors and epithelial-mesenchymal transition gene expression in colon cancer. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(47), 39449-39459. doi:10.1074/jbc.M112.386235
- Lin, S. C., Chou, Y. T., Jiang, S. S., Chang, J. L., Chung, C. H., Kao, Y. R., . . . Wu, C. W. (2016). Epigenetic Switch between SOX2 and SOX9 Regulates Cancer Cell Plasticity. *Cancer Research*, *76*(23), 7036-7048. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-3178
- Lindahl, T., & Barnes, D. E. (2000). Repair of endogenous DNA damage. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *65*, 127-133. doi:10.1101/sqb.2000.65.127
- Litvinov, S. V., Bakker, H. A., Gourevitch, M. M., Velders, M. P., & Warnaar, S. O. (1994). Evidence for a role of the epithelial glycoprotein 40 (Ep-CAM) in epithelial cell-cell adhesion. *Cell Adhesion and Communication*, *2*(5), 417-428. doi:10.3109/15419069409004452
- Litvinov, S. V., Balzar, M., Winter, M. J., Bakker, H. A., Briaire-de Bruijn, I. H., Prins, F., . . . Warnaar, S. O. (1997). Epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) modulates cell-cell interactions mediated by classic cadherins. *Journal of Cell Biology*, *139*(5), 1337-1348. doi:10.1083/jcb.139.5.1337
- Litvinov, S. V., van Driel, W., van Rhijn, C. M., Bakker, H. A., van Krieken, H., Fleuren, G. J., & Warnaar, S. O. (1996). Expression of Ep-CAM in cervical squamous epithelia correlates with an increased proliferation and the disappearance of markers for terminal differentiation. *American Journal of Pathology*, *148*(3), 865-875. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8774141> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1861708/pdf/amjpathol00039-0185.pdf>
- Litvinov, S. V., Velders, M. P., Bakker, H. A., Fleuren, G. J., & Warnaar, S. O. (1994). Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *Journal of Cell Biology*, *125*(2), 437-446. doi:10.1083/jcb.125.2.437
- Lu, T. Y., Lu, R. M., Liao, M. Y., Yu, J., Chung, C. H., Kao, C. F., & Wu, H. C. (2010). Epithelial cell adhesion molecule regulation is associated with the maintenance of the undifferentiated phenotype of human embryonic stem cells. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(12), 8719-8732. doi:10.1074/jbc.M109.077081
- Lynch, H. T., Lynch, J. F., Snyder, C. L., & Riegert-Johnson, D. (2011). EPCAM deletions, Lynch syndrome, and cancer risk. *Lancet Oncology*, *12*(1), 5-6. doi:10.1016/S1470-2045(10)70291-6
- Maetzel, D., Denzel, S., Mack, B., Canis, M., Went, P., Benk, M., . . . Gires, O. (2009). Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nature Cell Biology*, *11*(2), 162-171. doi:10.1038/ncb1824
- Mani, S. A., Guo, W., Liao, M. J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., . . . Weinberg, R. A. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, *133*(4), 704-715. doi:10.1016/j.cell.2008.03.027
- Marcucci, F., Bellone, M., Caserta, C. A., & Corti, A. (2014). Pushing tumor cells towards a malignant phenotype: stimuli from the microenvironment, intercellular communications and alternative roads. *International Journal of Cancer*, *135*(6), 1265-1276. doi:10.1002/ijc.28572

- Marcucci, F., Stassi, G., & De Maria, R. (2016). Epithelial-mesenchymal transition: a new target in anticancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, *15*(5), 311-325. doi:10.1038/nrd.2015.13
- Marin-Aguilera, M., Codony-Servat, J., Reig, O., Lozano, J. J., Fernandez, P. L., Pereira, M. V., . . . Mellado, B. (2014). Epithelial-to-mesenchymal transition mediates docetaxel resistance and high risk of relapse in prostate cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, *13*(5), 1270-1284. doi:10.1158/1535-7163.MCT-13-0775
- Martin, B., Schneider, R., Janetzky, S., Waibler, Z., Pandur, P., Kuhl, M., . . . Wixler, V. (2002). The LIM-only protein FHL2 interacts with beta-catenin and promotes differentiation of mouse myoblasts. *Journal of Cell Biology*, *159*(1), 113-122. doi:10.1083/jcb.200202075
- Martinez-Estrada, O. M., Culleres, A., Soriano, F. X., Peinado, H., Bolos, V., Martinez, F. O., . . . Vilaro, S. (2006). The transcription factors Slug and Snail act as repressors of Claudin-1 expression in epithelial cells. *Biochemical Journal*, *394*(Pt 2), 449-457. doi:10.1042/BJ20050591
- Martowicz, A., Seeber, A., & Untergasser, G. (2016). The role of EpCAM in physiology and pathology of the epithelium. *Histology and Histopathology*, *31*(4), 349-355. doi:10.14670/HH-11-678
- McCarthy, A. J., Coleman-Vaughan, C., & McCarthy, J. V. (2017). Regulated intramembrane proteolysis: emergent role in cell signalling pathways. *Biochemical Society Transactions*, *45*(6), 1185-1202. doi:10.1042/BST20170002
- Mehanna, H., Paleri, V., West, C. M., & Nutting, C. (2010). Head and neck cancer-- Part 1: Epidemiology, presentation, and prevention. *BMJ*, *341*, c4684. doi:10.1136/bmj.c4684
- Mehlen, P., & Puisieux, A. (2006). Metastasis: a question of life or death. *Nature reviews cancer*, *6*(6), 449-458. doi:10.1038/nrc1886
- Mendez, M. G., Kojima, S., & Goldman, R. D. (2010). Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB Journal*, *24*(6), 1838-1851. doi:10.1096/fj.09-151639
- Michaud, D. S., Langevin, S. M., Eliot, M., Nelson, H. H., Pawlita, M., McClean, M. D., & Kelsey, K. T. (2014). High-risk HPV types and head and neck cancer. *International Journal of Cancer*, *135*(7), 1653-1661. doi:10.1002/ijc.28811
- Miller, E. C., & Miller, J. A. (1981). Mechanisms of chemical carcinogenesis. *Cancer*, *47*(5 Suppl), 1055-1064. doi:10.1002/1097-0142(19810301)47:5+<1055::aid-cnrcr2820471302>3.0.co;2-3
- Moldenhauer, G., Momburg, F., Moller, P., Schwartz, R., & Hammerling, G. J. (1987). Epithelium-specific surface glycoprotein of Mr 34,000 is a widely distributed human carcinoma marker. *British Journal of Cancer*, *56*(6), 714-721. doi:10.1038/bjc.1987.276
- Morel, A. P., Lievre, M., Thomas, C., Hinkal, G., Ansieau, S., & Puisieux, A. (2008). Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PloS One*, *3*(8), e2888. doi:10.1371/journal.pone.0002888
- Morris, H. T., & Machesky, L. M. (2015). Actin cytoskeletal control during epithelial to mesenchymal transition: focus on the pancreas and intestinal tract. *British Journal of Cancer*, *112*(4), 613-620. doi:10.1038/bjc.2014.658
- Moskovitz, J., Moy, J., & Ferris, R. L. (2018). Immunotherapy for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Current Oncology Reports*, *20*(2), 22. doi:10.1007/s11912-018-0654-5
- Mourad, M., Jetmore, T., Jategaonkar, A. A., Moubayed, S., Moshier, E., & Urken, M. L. (2017). Epidemiological Trends of Head and Neck Cancer in the United States:

- A SEER Population Study. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 75(12), 2562-2572. doi:10.1016/j.joms.2017.05.008
- Mueller, J. L., McGeough, M. D., Pena, C. A., & Sivagnanam, M. (2014). Functional consequences of EpCam mutation in mice and men. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 306(4), G278-288. doi:10.1152/ajpgi.00286.2013
- Munz, M., Baeuerle, P. A., & Gires, O. (2009). The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling. *Cancer Research*, 69(14), 5627-5629. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-0654
- Munz, M., Fellingner, K., Hofmann, T., Schmitt, B., & Gires, O. (2008). Glycosylation is crucial for stability of tumour and cancer stem cell antigen EpCAM. *Frontiers in Bioscience*, 13, 5195-5201. doi:10.2741/3075
- Munz, M., Kieu, C., Mack, B., Schmitt, B., Zeidler, R., & Gires, O. (2004). The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation. *Oncogene*, 23(34), 5748-5758. doi:10.1038/sj.onc.1207610
- Navas, T., Kinders, R. J., Lawrence, S. M., Ferry-Galow, K. V., Borgel, S., Hollingshead, M. G., . . . Parchment, R. E. (2020). Clinical Evolution of Epithelial-Mesenchymal Transition in Human Carcinomas. *Cancer Research*, 80(2), 304-318. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-3539
- Nevins, J. R. (2001). The Rb/E2F pathway and cancer. *Human Molecular Genetics*, 10(7), 699-703. doi:10.1093/hmg/10.7.699
- Niessen, K., Fu, Y., Chang, L., Hoodless, P. A., McFadden, D., & Karsan, A. (2008). Slug is a direct Notch target required for initiation of cardiac cushion cellularization. *Journal of Cell Biology*, 182(2), 315-325. doi:10.1083/jcb.200710067
- Ochoa-Hernandez, A. B., Juarez-Vazquez, C. I., Rosales-Reynoso, M. A., & Barros-Nunez, P. (2012). [WNT-beta-catenin signaling pathway and its relationship with cancer]. *Cirugía y Cirujanos*, 80(4), 389-398. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23374390>
- Olivier, M., Eeles, R., Hollstein, M., Khan, M. A., Harris, C. C., & Hainaut, P. (2002). The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Human Mutation*, 19(6), 607-614. doi:10.1002/humu.10081
- Organization, W. H. (2018). Global health estimates 2016: deaths by cause, age, sex, by country and by region, 2000–2016. *Geneva: World Health Organization*. Retrieved from https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/index1.html
- Osta, W. A., Chen, Y., Mikhitarian, K., Mitas, M., Salem, M., Hannun, Y. A., . . . Gillanders, W. E. (2004). EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy. *Cancer Research*, 64(16), 5818-5824. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0754
- Pan, M., Schinke, H., Luxenburger, E., Kranz, G., Shakhtour, J., Libl, D., . . . Gires, O. (2018). EpCAM ectodomain EpEX is a ligand of EGFR that counteracts EGF-mediated epithelial-mesenchymal transition through modulation of phospho-ERK1/2 in head and neck cancers. *PLoS Biology*, 16(9), e2006624. doi:10.1371/journal.pbio.2006624
- Pastushenko, I., & Blanpain, C. (2019). EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends in Cell Biology*, 29(3), 212-226. doi:10.1016/j.tcb.2018.12.001
- Pastushenko, I., Brisebarre, A., Sifrim, A., Fioramonti, M., Revenco, T., Boumahdi, S., . . . Blanpain, C. (2018). Identification of the tumour transition states occurring during EMT. *Nature*, 556(7702), 463-468. doi:10.1038/s41586-018-0040-3

- Pauli, C., Munz, M., Kieu, C., Mack, B., Breinl, P., Wollenberg, B., . . . Gires, O. (2003). Tumor-specific glycosylation of the carcinoma-associated epithelial cell adhesion molecule EpCAM in head and neck carcinomas. *Cancer Letters*, *193*(1), 25-32. doi:10.1016/s0304-3835(03)00003-x
- Pfister, D. G., Spencer, S., Brizel, D. M., Burtness, B., Busse, P. M., Caudell, J. J., . . . National Comprehensive Cancer, N. (2014). Head and neck cancers, Version 2.2014. Clinical practice guidelines in oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, *12*(10), 1454-1487. doi:10.6004/jnccn.2014.0142
- Pignon, J. P., le Maitre, A., Maillard, E., Bourhis, J., & Group, M.-N. C. (2009). Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiotherapy and Oncology*, *92*(1), 4-14. doi:10.1016/j.radonc.2009.04.014
- Prives, C. (1998). Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit. *Cell*, *95*(1), 5-8. doi:10.1016/s0092-8674(00)81774-2
- Punt, C. J., Nagy, A., Douillard, J. Y., Figer, A., Skovsgaard, T., Monson, J., . . . MacGregor, S. (2002). Edrecolomab alone or in combination with fluorouracil and folinic acid in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: a randomised study. *Lancet*, *360*(9334), 671-677. doi:10.1016/S0140-6736(02)09836-7
- Ralhan, R., Cao, J., Lim, T., Macmillan, C., Freeman, J. L., & Walfish, P. G. (2010). EpCAM nuclear localization identifies aggressive thyroid cancer and is a marker for poor prognosis. *BMC Cancer*, *10*, 331. doi:10.1186/1471-2407-10-331
- Ramesh, V., Brabletz, T., & Ceppi, P. (2020). Targeting EMT in Cancer with Repurposed Metabolic Inhibitors. *Trends Cancer*, *6*(11), 942-950. doi:10.1016/j.trecan.2020.06.005
- Roos, W. P., & Kaina, B. (2006). DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends in Molecular Medicine*, *12*(9), 440-450. doi:10.1016/j.molmed.2006.07.007
- Roos, W. P., & Kaina, B. (2013). DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Letters*, *332*(2), 237-248. doi:10.1016/j.canlet.2012.01.007
- Rumilla, K., Schowalter, K. V., Lindor, N. M., Thomas, B. C., Mensink, K. A., Gallinger, S., . . . Thibodeau, S. N. (2011). Frequency of deletions of EPCAM (TACSTD1) in MSH2-associated Lynch syndrome cases. *Journal of Molecular Diagnostics*, *13*(1), 93-99. doi:10.1016/j.jmoldx.2010.11.011
- Sankpal, N. V., Fleming, T. P., Sharma, P. K., Wiedner, H. J., & Gillanders, W. E. (2017). A double-negative feedback loop between EpCAM and ERK contributes to the regulation of epithelial-mesenchymal transition in cancer. *Oncogene*, *36*(26), 3706-3717. doi:10.1038/onc.2016.504
- Sarrach, S., Huang, Y., Niedermeyer, S., Hachmeister, M., Fischer, L., Gille, S., . . . Gires, O. (2018). Spatiotemporal patterning of EpCAM is important for murine embryonic endo- and mesodermal differentiation. *Scientific Reports*, *8*(1), 1801. doi:10.1038/s41598-018-20131-8
- Schon, M. P., Schon, M., Klein, C. E., Blume, U., Bisson, S., & Orfanos, C. E. (1994). Carcinoma-associated 38-kD membrane glycoprotein MH 99/KS 1/4 is related to proliferation and age of transformed epithelial cell lines. *Journal of Investigative Dermatology*, *102*(6), 987-991. doi:10.1111/1523-1747.ep12384258
- Seeber, A., Untergasser, G., Spizzo, G., Terracciano, L., Lugli, A., Kasal, A., . . . Fong, D. (2016). Predominant expression of truncated EpCAM is associated with a more aggressive phenotype and predicts poor overall survival in colorectal cancer. *International Journal of Cancer*, *139*(3), 657-663. doi:10.1002/ijc.30099

- Seligson, D. B., Pantuck, A. J., Liu, X., Huang, Y., Horvath, S., Bui, M. H., . . . Figlin, R. A. (2004). Epithelial cell adhesion molecule (KSA) expression: pathobiology and its role as an independent predictor of survival in renal cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 10(8), 2659-2669. doi:10.1158/1078-0432.ccr-1132-03
- Sherr, C. J. (2004). Principles of tumor suppression. *Cell*, 116(2), 235-246. doi:10.1016/s0092-8674(03)01075-4
- Shi, Y., & Massague, J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 113(6), 685-700. doi:10.1016/s0092-8674(03)00432-x
- Singh, A., & Settleman, J. (2010). EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene*, 29(34), 4741-4751. doi:10.1038/onc.2010.215
- Sivagnanam, M., Mueller, J. L., Lee, H., Chen, Z., Nelson, S. F., Turner, D., . . . Hoffman, H. M. (2008). Identification of EpCAM as the gene for congenital tufting enteropathy. *Gastroenterology*, 135(2), 429-437. doi:10.1053/j.gastro.2008.05.036
- Slaughter, D. P., Southwick, H. W., & Smejkal, W. (1953). Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer*, 6(5), 963-968. doi:10.1002/1097-0142(195309)6:5<963::aid-cnrcr2820060515>3.0.co;2-q
- Smit, M. A., Geiger, T. R., Song, J. Y., Gitelman, I., & Peeper, D. S. (2009). A Twist-Snail axis critical for TrkB-induced epithelial-mesenchymal transition-like transformation, anoikis resistance, and metastasis. *Molecular and Cellular Biology*, 29(13), 3722-3737. doi:10.1128/MCB.01164-08
- Spizzo, G., Fong, D., Wurm, M., Ensinger, C., Obrist, P., Hofer, C., . . . Went, P. (2011). EpCAM expression in primary tumour tissues and metastases: an immunohistochemical analysis. *Journal of Clinical Pathology*, 64(5), 415-420. doi:10.1136/jcp.2011.090274
- Spizzo, G., Went, P., Dirnhofer, S., Obrist, P., Moch, H., Baeuerle, P. A., . . . Zeimet, A. G. (2006). Overexpression of epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) is an independent prognostic marker for reduced survival of patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 103(2), 483-488. doi:10.1016/j.ygyno.2006.03.035
- Spizzo, G., Went, P., Dirnhofer, S., Obrist, P., Simon, R., Spichtin, H., . . . Gastl, G. (2004). High Ep-CAM expression is associated with poor prognosis in node-positive breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 86(3), 207-213. doi:10.1023/B:BREA.0000036787.59816.01
- Stein, A. P., Saha, S., Kraninger, J. L., Swick, A. D., Yu, M., Lambert, P. F., & Kimple, R. J. (2015). Prevalence of Human Papillomavirus in Oropharyngeal Cancer: A Systematic Review. *Cancer Journal*, 21(3), 138-146. doi:10.1097/PPO.0000000000000115
- Stoecklein, N. H., Siegmund, A., Scheunemann, P., Luebke, A. M., Erbersdobler, A., Verde, P. E., . . . Hosch, S. B. (2006). Ep-CAM expression in squamous cell carcinoma of the esophagus: a potential therapeutic target and prognostic marker. *BMC Cancer*, 6, 165. doi:10.1186/1471-2407-6-165
- Strnad, J., Hamilton, A. E., Beavers, L. S., Gamboa, G. C., Apeltgren, L. D., Taber, L. D., . . . Gadski, R. A. (1989). Molecular cloning and characterization of a human adenocarcinoma/epithelial cell surface antigen complementary DNA. *Cancer Research*, 49(2), 314-317. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2463074>

- Suarez-Causado, A., Caballero-Diaz, D., Bertran, E., Roncero, C., Addante, A., Garcia-Alvaro, M., . . . Sanchez, A. (2015). HGF/c-Met signaling promotes liver progenitor cell migration and invasion by an epithelial-mesenchymal transition-independent, phosphatidyl inositol-3 kinase-dependent pathway in an in vitro model. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1853(10 Pt A), 2453-2463. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.05.017
- Sun, C., Sun, L., Li, Y., Kang, X., Zhang, S., & Liu, Y. (2013). Sox2 expression predicts poor survival of hepatocellular carcinoma patients and it promotes liver cancer cell invasion by activating Slug. *Medical Oncology*, 30(2), 503. doi:10.1007/s12032-013-0503-1
- Sun, X., Martin, R. C. G., Zheng, Q., Farmer, R., Pandit, H., Li, X., . . . Li, Y. (2018). Drug-induced expression of EpCAM contributes to therapy resistance in esophageal adenocarcinoma. *Cellular Oncology (Dordrecht)*, 41(6), 651-662. doi:10.1007/s13402-018-0399-z
- Szala, S., Froehlich, M., Scollon, M., Kasai, Y., Steplewski, Z., Koprowski, H., & Linnenbach, A. J. (1990). Molecular cloning of cDNA for the carcinoma-associated antigen GA733-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(9), 3542-3546. doi:10.1073/pnas.87.9.3542
- Talamini, R., Bosetti, C., La Vecchia, C., Dal Maso, L., Levi, F., Bidoli, E., . . . Franceschi, S. (2002). Combined effect of tobacco and alcohol on laryngeal cancer risk: a case-control study. *Cancer Causes and Control*, 13(10), 957-964. doi:10.1023/a:1021944123914
- Tam, W. L., & Weinberg, R. A. (2013). The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nature Medicine*, 19(11), 1438-1449. doi:10.1038/nm.3336
- Tan, T. Z., Miow, Q. H., Miki, Y., Noda, T., Mori, S., Huang, R. Y., & Thiery, J. P. (2014). Epithelial-mesenchymal transition spectrum quantification and its efficacy in deciphering survival and drug responses of cancer patients. *EMBO Molecular Medicine*, 6(10), 1279-1293. doi:10.15252/emmm.201404208
- Taube, J. H., Herschkowitz, J. I., Komurov, K., Zhou, A. Y., Gupta, S., Yang, J., . . . Mani, S. A. (2010). Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(35), 15449-15454. doi:10.1073/pnas.1004900107
- Theveneau, E., & Mayor, R. (2012). Cadherins in collective cell migration of mesenchymal cells. *Current Opinion in Cell Biology*, 24(5), 677-684. doi:10.1016/j.ceb.2012.08.002
- Thiery, J. P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews: Cancer*, 2(6), 442-454. doi:10.1038/nrc822
- Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139(5), 871-890. doi:10.1016/j.cell.2009.11.007
- Thiery, J. P., & Sleeman, J. P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*, 7(2), 131-142. doi:10.1038/nrm1835
- Thuault, S., Tan, E. J., Peinado, H., Cano, A., Heldin, C. H., & Moustakas, A. (2008). HMGA2 and Smads co-regulate SNAIL1 expression during induction of epithelial-to-mesenchymal transition. *Journal of Biological Chemistry*, 283(48), 33437-33446. doi:10.1074/jbc.M802016200
- Tousseyn, T., Thathiah, A., Jorissen, E., Raemaekers, T., Konietzko, U., Reiss, K., . . . De Strooper, B. (2009). ADAM10, the rate-limiting protease of regulated

- intramembrane proteolysis of Notch and other proteins, is processed by ADAMS-9, ADAMS-15, and the gamma-secretase. *Journal of Biological Chemistry*, 284(17), 11738-11747. doi:10.1074/jbc.M805894200
- Trzpis, M., McLaughlin, P. M., de Leij, L. M., & Harmsen, M. C. (2007). Epithelial cell adhesion molecule: more than a carcinoma marker and adhesion molecule. *American Journal of Pathology*, 171(2), 386-395. doi:10.2353/ajpath.2007.070152
- Tsaktanis, T., Kremling, H., Pavsic, M., von Stackelberg, R., Mack, B., Fukumori, A., . . . Gires, O. (2015). Cleavage and cell adhesion properties of human epithelial cell adhesion molecule (HEPCAM). *Journal of Biological Chemistry*, 290(40), 24574-24591. doi:10.1074/jbc.M115.662700
- Tsang, C. M., Lui, V. W. Y., Bruce, J. P., Pugh, T. J., & Lo, K. W. (2020). Translational genomics of nasopharyngeal cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 61, 84-100. doi:10.1016/j.semcancer.2019.09.006
- U.S. National Library of Medicine. (2022). Klinische Studien mit Stichwort EpCAM. Retrieved from <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=%20EpCAM&cntry=&state=&city=&dist=>
- Urban, S., & Freeman, M. (2002). Intramembrane proteolysis controls diverse signalling pathways throughout evolution. *Current Opinion in Genetics and Development*, 12(5), 512-518. doi:10.1016/s0959-437x(02)00334-9
- Vesuna, F., van Diest, P., Chen, J. H., & Raman, V. (2008). Twist is a transcriptional repressor of E-cadherin gene expression in breast cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 367(2), 235-241. doi:10.1016/j.bbrc.2007.11.151
- Voon, D. C., Huang, R. Y., Jackson, R. A., & Thiery, J. P. (2017). The EMT spectrum and therapeutic opportunities. *Molecular Oncology*, 11(7), 878-891. doi:10.1002/1878-0261.12082
- Vrba, L., Jensen, T. J., Garbe, J. C., Heimark, R. L., Cress, A. E., Dickinson, S., . . . Futscher, B. W. (2010). Role for DNA methylation in the regulation of miR-200c and miR-141 expression in normal and cancer cells. *PloS One*, 5(1), e8697. doi:10.1371/journal.pone.0008697
- Wang, M. H., Sun, R., Zhou, X. M., Zhang, M. Y., Lu, J. B., Yang, Y., . . . Mai, S. J. (2018). Epithelial cell adhesion molecule overexpression regulates epithelial-mesenchymal transition, stemness and metastasis of nasopharyngeal carcinoma cells via the PTEN/AKT/mTOR pathway. *Cell Death & Disease*, 9(1), 2. doi:10.1038/s41419-017-0013-8
- Wang, Z., Wade, P., Mandell, K. J., Akyildiz, A., Parkos, C. A., Mrsny, R. J., & Nusrat, A. (2007). Raf 1 represses expression of the tight junction protein occludin via activation of the zinc-finger transcription factor slug. *Oncogene*, 26(8), 1222-1230. doi:10.1038/sj.onc.1209902
- Ward, J. F. (1988). DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 35, 95-125. doi:10.1016/s0079-6603(08)60611-x
- Weigelt, B., Peterse, J. L., & Van't Veer, L. J. (2005). Breast cancer metastasis: markers and models. *Nature reviews cancer*, 5(8), 591-602.
- Went, P., Vasei, M., Bubendorf, L., Terracciano, L., Tornillo, L., Riede, U., . . . Baeuerle, P. A. (2006). Frequent high-level expression of the immunotherapeutic target EpCAM in colon, stomach, prostate and lung cancers. *British Journal of Cancer*, 94(1), 128-135. doi:10.1038/sj.bjc.6602924

- Wheelock, M. J., Shintani, Y., Maeda, M., Fukumoto, Y., & Johnson, K. R. (2008). Cadherin switching. *Journal of Cell Science*, 121(Pt 6), 727-735. doi:10.1242/jcs.000455
- Wilkins, M. R., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J. C., Williams, K. L., Appel, R. D., & Hochstrasser, D. F. (1999). Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods in Molecular Biology*, 112, 531-552. doi:10.1385/1-59259-584-7:531
- Wimberger, P., Heubner, M., & Kimmig, R. (2010). Catumaxomab in the Treatment of Malignant Ascites: The Evidence of its Therapeutic Value. *Clinical Medicine Insights: Therapeutics*, 2, CMT.S4954. doi:10.4137/cmt.S4954
- Winton, M. J., D'Souza, G., Rettig, E. M., Westra, W. H., van Zante, A., Wang, S. J., . . . Fakhry, C. (2018). Increasing prevalence of human papillomavirus-positive oropharyngeal cancers among older adults. *Cancer*, 124(14), 2993-2999. doi:10.1002/cncr.31385
- Wogan, G. N., Hecht, S. S., Felton, J. S., Conney, A. H., & Loeb, L. A. (2004). Environmental and chemical carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 14(6), 473-486. doi:10.1016/j.semcancer.2004.06.010
- Wooen, H., Pietzner, K., Richter, R., Fotopoulou, C., Joens, T., Braicu, E. I., . . . Sehouli, J. (2014). Overexpression of the epithelial cell adhesion molecule is associated with a more favorable prognosis and response to platinum-based chemotherapy in ovarian cancer. *Journal of Gynecologic Oncology*, 25(3), 221-228. doi:10.3802/jgo.2014.25.3.221
- Yamashita, T., Budhu, A., Forgues, M., & Wang, X. W. (2007). Activation of hepatic stem cell marker EpCAM by Wnt-beta-catenin signaling in hepatocellular carcinoma. *Cancer Research*, 67(22), 10831-10839. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0908
- Yang, A. D., Fan, F., Camp, E. R., van Buren, G., Liu, W., Somcio, R., . . . Ellis, L. M. (2006). Chronic oxaliplatin resistance induces epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer cell lines. *Clinical Cancer Research*, 12(14 Pt 1), 4147-4153. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0038
- Yang, J., & Weinberg, R. A. (2008). Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Developmental Cell*, 14(6), 818-829. doi:10.1016/j.devcel.2008.05.009
- Yilmaz, M., & Christofori, G. (2009). EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer and Metastasis Reviews*, 28(1-2), 15-33. doi:10.1007/s10555-008-9169-0
- Yoo, Y. A., Kang, M. H., Lee, H. J., Kim, B. H., Park, J. K., Kim, H. K., . . . Oh, S. C. (2011). Sonic hedgehog pathway promotes metastasis and lymphangiogenesis via activation of Akt, EMT, and MMP-9 pathway in gastric cancer. *Cancer Research*, 71(22), 7061-7070. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1338
- Yu, G., Zhang, X., Wang, H., Rui, D., Yin, A., Qiu, G., & He, Y. (2008). CpG island methylation status in the EpCAM promoter region and gene expression. *Oncology Reports*, 20(5), 1061-1067. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18949402>
- Yu, T., Ma, Y., & Wang, H. (2017). EpCAM Intracellular Domain Promotes Porcine Cell Reprogramming by Upregulation of Pluripotent Gene Expression via Beta-catenin Signaling. *Scientific Reports*, 7, 46315. doi:10.1038/srep46315
- Zeisberg, M., & Kalluri, R. (2013). Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 1. Common and organ-specific mechanisms associated with tissue fibrosis. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, 304(3), C216-225. doi:10.1152/ajpcell.00328.2012

Zhang, W., Edwards, A., Fang, Z., Flemington, E. K., & Zhang, K. (2016). Integrative Genomics and Transcriptomics Analysis Reveals Potential Mechanisms for Favorable Prognosis of Patients with HPV-Positive Head and Neck Carcinomas. *Scientific Reports*, 6, 24927. doi:10.1038/srep24927

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: "Hallmarks of Cancer"	9
Abbildung 2: Schematische Darstellung der EMT/MET	13
Abbildung 3: EMT als Metastasierungsmodell.....	16
Abbildung 4: Schematische Darstellung der molekularbiologischen Funktion von EpCAM.....	22
Abbildung 5: EpCAM mRNA und Proteinexpression in wildtypischen Karzinomzelllinien	46
Abbildung 6: Epitheliale und mesenchymale Marker in wildtypischen Karzinomzelllinien	47
Abbildung 7: Zellmorphologie von wildtypischen Karzinomzelllinien	49
Abbildung 8: EMT-Tfs mRNA und Proteinexpression in wildtypischen Karzinomzelllinien	50
Abbildung 9: Proliferation und Migration in wildtypischen Karzinomzelllinie.....	52
Abbildung 10: Zellviabilität unter Einfluss von Cisplatin und 5-Fu in wildtypischen Karzinomzelllinien	54
Abbildung 11: EpCAM Protein und mRNA-Expression in Kyse30 KD Zellen	56
Abbildung 12: Epitheliale und mesenchymale Marker in Kyse30 KD Zellen	57
Abbildung 13: Zellmorphologie von Kyse30 KD Zellen.....	58
Abbildung 14: EMT-Tfs mRNA und Proteinexpression in Kyse30 KD Zellen	60
Abbildung 15: Proliferation und Migration in Kyse30 KD Zellen	62
Abbildung 16: Zellviabilität unter Einfluss von Cisplatin und 5-Fu in Kyse30 KD Zellen	64

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Beispiele wichtiger Gruppen von Onkogenen	8
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien	24
Tabelle 3: Verwendete Kits	26
Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien	26
Tabelle 5: Verwendete Geräte	28
Tabelle 6: Verwendete Computerprogramme	30
Tabelle 7: Verwendete Dienstleistungen	31
Tabelle 8: Verwendete Antikörper.....	31
Tabelle 9: Verwendete qRT-PCR Primer.....	32
Tabelle 10: Verwendete Zelllinien.....	33
Tabelle 11: Verwendeter qPCR-Reaktionsansatz pro Vertiefung.....	42
Tabelle 12: qPCR Protokoll.....	43

11. Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluoruracil
Abl	Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog
ADAM	A disintegrin and metalloproteinase
AKT	Protein kinase B
APP	Amyloid precursor proteins
BACE-1	Beta-Sekretase 1
BCL2	B-cell lymphoma 2
Bcr	Breakpoint cluster region
BRAF	<i>B</i> -rapidly accelerated fibrosarcoma
cDNA	Complementary DNA
CML	Chronische myeloische Leukämie
CSCs	Cancer stem cells
CTCs	Circulating tumor cells
CTE	Congenital tufting enteropathy
CTF	C-terminales Fragment
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMO	Dimethylsulfoxid
EBV	Epstein-Barr-Virus
E-Cadherin	Epithelial cadherin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ELF3	E74-like ETS transcription factor 3
ELF5	E74-like ETS transcription factor 5
EMP	Epitheliale-Mesenchymale Plastizität
EMT	Epitheliale-Mesenchymale Transition
EMT-Tfs	EMT induzierende Transkriptionsfaktoren
EpCAM	Epithelial cell adhesion molecule
EpEX	EpCAM extrazelluläre Domäne
EpICD	EpCAM intrazelluläre Domäne

ER	Endoplasmatisches Retikulum
Erk2	Mitogen-activated protein kinase 1
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FBS	Fötales Bovines Serum Superior
FHL 2	Four and a half LIM domains
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GRHL2	Grainhead-like Protein 2
HER2/neu	Human epidermal growth factor receptor 2
HGF	Hepatocyte growth factor
HNO	Hals-Nasen-Ohren
HNPCC	Hereditäres nicht polypöses Kolonkarzinom
HPV	Humane Papillomviren
IC50	Zellviabilität von 50 %
INF- γ	Interferon-gamma
KD	Knockdown
Klf4	Kruppel-like factor 4
Lef-1	Lymphoid enhancer-binding factor 1
MET	Mesenchymale-Epitheliale Transition
MLH1	MutL Proteinhomolog 1
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MSH2	MutS Proteinhomolog 2
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MTT	Methylthiazolyldiphenyl-tetrazoliumbromid
MYC	Myelocytomatose
N-Cadherin	Neural cadherin
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
Oct4	Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor 4
OD	Optische Dichte
p53	Tumorprotein p53
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PD-L1	Programmed death-ligand 1
pH	Potential of hydrogen
qPCR	Real-time quantitative polymerase chain reaction
RAS	Rat sarcoma

Rb-Gen	Retinoblastomgen
RIP	Regulierte Intramembranproteolyse
SDS.....	Dodecylsulfat Natriumsalz
SDS-Page.....	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sEpEX	Lösliche EpCAM extrazelluläre Domäne
Snail	Zinc finger protein SNAI1
Snail2	Zinc finger protein SNAI2
SRY	Sex determinig region Y
TACSTD1.....	Tumor-associated calcium signal transducer 1
TCF4	Transcription factor 4
Tfs	Transkriptionsfaktoren
TGF-β.....	Transforming growth factor β
TMD	Transmembrandomäne
TNF-α.....	Tumornekrosefaktor-alpha
TNM	TNM Klassifikation maligner Tumore
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trop-1	Trophoblast cell-surface antigen 1
Trop-2	Trophoblast cell-surface antigen 2
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
Twist.....	Twist-related protein 1
UICC	Union for International Cancer Control
WHO	World Health Organization
ZEB1	Zinc finger E-box-binding homeobox 1
ZEB2	Zinc finger E-box-binding homeobox 2

12. Danksagung

Hiermit möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Olivier Gires bedanken für seine Betreuung, konstruktive Hilfestellung, kollegiale Arbeitsweise und für die Vergabe dieser Doktorarbeit an mich. Außerdem möchte ich mich bei allen anderen Mitarbeitern des HNO-Labors des Klinikum Großhaderns für ihre großartige Unterstützung bedanken. Ich blicke gerne auf unsere gemeinsame Arbeitszeit zurück. Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie, meinen Freunden und Arbeitskollegen bedanken, die mir bei dem Anfertigen dieser Dissertation mit Geduld und als Quelle der Motivation beistanden.

13. Publikationsliste

Etzel, L., Navarro, F., Tomov, T., Münch, S., Schüttrumpf, L., Shakhtour, J., ... & Peeken, J. C. (2023). PO-1634 Validation of a U-Net-based algorithm for MRI-guided extremity soft tissue sarcoma GTV segmentation. *Radiotherapy and Oncology*, 182, S1330-S1331.

Baumeister, P., Hollmann, A., Kitz, J., Afthonidou, A., Simon, F., Shakhtour, J., Mack, B., Kranz, G., Libl, D., Leu, M., Schirmer, M. A., Canis, M., Belka, C., Zitzelsberger, H., Ganswindt, U., Hess, J., Jakob, M., Unger, K., & Gires, O. (2018). High Expression of EpCAM and Sox2 is a Positive Prognosticator of Clinical Outcome for Head and Neck Carcinoma. *Scientific reports*, 8(1), 14582. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32178-8>

Pan, M., Schinke, H., Luxenburger, E., Kranz, G., Shakhtour, J., Libl, D., Huang, Y., Gaber, A., Pavšič, M., Lenarčič, B., Kitz, J., Jakob, M., Schwenk-Zieger, S., Canis, M., Hess, J., Unger, K., Baumeister, P., & Gires, O. (2018). EpCAM ectodomain EpEX is a ligand of EGFR that counteracts EGF-mediated epithelial-mesenchymal transition through modulation of phospho-ERK1/2 in head and neck cancers. *PLoS biology*, 16(9), e2006624. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006624>