



Fakultät für Medizin der Technischen Universität München
Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde
des Klinikums rechts der Isar

**Die Rolle der Sphingosinkinase1 in Kopf-Hals-Tumoren
in Bezug auf Radiatio und den
EGFR-Signalweg**

Carlotta Dorothée Schiefler

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. A. Pickhard
2. Univ.-Prof. Dr. H. A. Bier

Die Dissertation wurde am 22.01.2014 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 09.07.2014 angenommen.

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	III
1. Verzeichnis der Abkürzungen.....	1
2. Einleitung	6
2.1. Problemstellung.....	6
2.2. Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches	6
2.2.1. <i>Epidemiologie</i>	7
2.2.2. <i>Klassifikation</i>	7
2.2.3. <i>Ätiopathologie und Risikofaktoren</i>	9
2.2.4. <i>Molekularpathologie</i>	10
2.2.5. <i>Prognosefaktoren</i>	11
2.2.6. <i>Therapiestandards</i>	12
2.3. Epidermal growth factor receptor (EGFR).....	15
2.3.1. <i>Signalvermittlung durch EGFR</i>	16
2.3.2. <i>EGFR-Inhibitoren</i>	17
2.4. Sphingosinkinase (SphK).....	18
2.4.1. <i>Sphingosinkinase1 und ihre Rolle in Tumoren</i>	19
2.4.2. <i>Die Sphingolipidrheostase</i>	20
2.4.3. <i>Signalvermittlung durch Sphingosin-1-Phosphat</i>	21
2.4.4. <i>Aktivierung der Sphingosinkinase1</i>	21
2.4.5. <i>Amplifizierungsschleifen</i>	22
2.4.6. <i>Sphingosinkinase1-Inhibitoren</i>	23
2.4.7. <i>Sphingosinkinase1 in Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches</i>	24
2.5. Zielsetzung	25
3. Material und Methoden	26
3.1 Material.....	26

3.1.1. Geräte	26
3.1.2. Verbrauchsmaterial	27
3.1.3. Reagenzien und Chemikalien	28
3.1.4. Zelllinien	30
3.1.5. Medien und Reagenzien für die Zellkultur	30
3.1.6. Puffer-Lösungen	31
3.1.7. Wachstumsfaktoren und Inhibitoren	32
3.1.8. Enzyme	33
3.1.9. Primer	33
3.1.10. Primär- und Sekundärantikörper	34
3.1.11. Größenstandards	35
3.1.12. Computerprogramme	35
3.2. Methoden	36
3.2.1 Zellkultur	36
3.2.2. Bestrahlung	37
3.2.3. Expressionsanalysen auf Gen-Ebene	37
3.2.4. Proliferations-/ Überlebens-Analysen	40
3.2.5. Migrationsanalysen	42
3.2.6. Expressionsanalysen auf Proteinebene	43
3.2.7. Statistische Auswertung	47
4. Ergebnisse	48
4.1. Expressionsverhalten der SphK1 und der S1P-Rezeptoren auf Gen-Ebene	48
4.2. Crystal-Violett-Assay	50
4.2.1. Einfluss von ionisierender Strahlung auf die Proliferation	50
4.2.2. Einfluss von EGF auf die Proliferation	51
4.2.3. Einfluss von PMA auf die Proliferation	51
4.2.4. Einfluss von SKI-II auf die Proliferation	52

4.2.5. Einfluss von Cetuximab auf die Proliferation	54
4.2.6. Vergleich von Cetuximab und SKI-II in Bezug auf die Proliferation	55
4.3. Colony-Formation-Assay	55
4.3.1. Einfluss von ionisierender Strahlung auf das klonogene Überleben	56
4.3.2. Einfluss von EGF auf das klonogene Überleben	58
4.3.3. Einfluss von PMA auf das klonogene Überleben	59
4.3.4. Einfluss von SKI-II auf das klonogene Überleben	59
4.3.5. Einfluss von SKI-II auf die Strahlenresistenz bei UD5	62
4.3.6. Einfluss von Cetuximab auf das klonogene Überleben	62
4.3.7. Effekt von SKI-II und Cetuximab im Vergleich	63
4.3.8. Auswirkung einer Kombinationstherapie von SKI-II und Cetuximab	64
4.4. Wound-Healing-Assay	67
4.4.1. Einfluss ionisierender Strahlung auf die Migration	67
4.4.2. Einfluss von EGF auf die Migration	68
4.4.3. Einfluss von PMA auf die Migration	68
4.4.4. Einfluss von SKI-II auf die Migration	69
4.4.5. Einfluss von Cetuximab auf die Migration	70
4.4.6. Effekt von SKI-II und Cetuximab im Vergleich	70
4.4.7. Einfluss einer Kombination aus Cetuximab und SKI-II auf die Migration	71
4.5. Expressionsanalysen auf Proteinebene	72
4.5.1. Western Blot-Analysen	72
4.5.2. Immunfluoreszenz-Färbungen	73
5. Diskussion	80
5.1. Expression auf Gen-Ebene	81
5.2. Proliferation und Überleben	81
5.3. Migration	86
5.4. Western Blot-Analysen	88

5.5 Immunfluoreszenz.....	89
5.5. Ausblick.....	93
6. Zusammenfassung.....	95
7. Literaturverzeichnis	96
8. Abbildungsverzeichnis	107
9. Tabellenverzeichnis	111
10. Danksagung.....	113

1. VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

°C	Grad Celsius
5-JÜR	5-Jahres-Überlebensrate
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AKT (PKB)	Proteinkinase B (AKT= Gencode)
APS	Ammoniumperoxidsulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BRD	Bundesrepublik Deutschland
bzw.	Beziehungsweise
Ca	Karzinom
cDNA	Copy Desoxyribonucleinsäure
Cet	Cetuximab
cm	Zentimeter
d’NTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DAG	Diacylglycerine
DHS	DL-threo-dihydrosphingosin
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMS	N,N-dimethylsphingosin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiotreitol
E2	Estradiol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor

EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ERK	Extracellular signal regulated kinase
ERND	Extendierte radikale Neck-Dissection
ESOND	Extendierte supraomohyoidale Neck-Dissection
et al.	Et altera
etc.	Et cetera
FBS	Fetal bovine serum
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluoreszeinisothiozyana
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GBM	Glioblastoma Multiforme
GSL	Glandula sublingualis
GSM	Glandula submandibularis
Gy	Gray
h	Stunde
HB-EGF	Pro-heparin-binding EGF like growth factor
HCl	Chlorwasserstoff
HNSCC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma
HPV	Humane Papillom Viren
IF	Immunfluoreszenz
IGF	Insulinlike growth factor
IP3	Inositoltriphosphat
JAK	Januskinase
kV	Kilo Volt
LAS	Leica Application Suite
LK	Lymphknoten
LND	Laterale Neck-Dissection
LPA	Lysophosphatidsäure

M-MLV	Moloney murine leukemia virus reverse transkriptase
mA	Milliamper
MAPK	Mitogen activated protein kinase
Min	Minute
ml	Milliliter
MMP	Matrixmetalloproteinase
MO	Musculus omohyoideus
MoAbs	Monoklonale Antikörper
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MRND	Modifizierte radikale Neck-Dissection
MSCM	Musculus sternocleidomastoideus
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MTT-Assay	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid-Assay
N. XI	Nervus accessorius
n.s.	Nicht signifikant
NaCl	Natriumchlorid
ND	Neck-Dissection
ng	Nanogramm
NGF	Nerve growth factor
NNH	Nasennebenhöhlen
OT	Objekträger
PBS	Phosphate buffered saline
PC	Plexus cervicalis
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF	Platelet-derived growth factor
PI3K	Phosphoinositid3Kinase
PIP2	Phosphatidylinositolbisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositoltriphosphat

PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PLND	Posterolaterale Neck-Dissection
PMA	Phorbol 12-myristat 13-acetat
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Raf	Rat fibrosarcoma protein
Ras	Rat sarcoma protein
RNA	Ribonukleinsäure
RND	Radikale Neck-Dissection
rpm	Revolutions per minute
RT-Mix	Reverse transkriptase-Mix
RT-PCR	Reverse transkriptase polymerase chain reaction
RTK	Rezeptortyrosinkinase
s.u.	Siehe unten
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
S1P 1-5	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 1-5
SDS	Natriumdodecylsulfat
PVDF	Polyvinylidenfluorid
siRNA	Small interfering Ribonukleinsäure
SK1-I	2-amino-3[2-(4-pentylphenyl)ethyl-1-ene]1,3-propanediol
SKI-II	2-(p-hydroxyanilino)-4-(p-chlorophenyl)thiazole
SOND	Supraomhyoidale Neck-Dissection
SphK1	Sphingosinkinase1
STATs	Signal transducers and activators of transcription
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, 1,2-Bis(dimethylamino)-ethan

TGFβ	Transforming growth factor β
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
TNFα	Tumornekrosefaktor α
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
U	Units
UICC	International Unit Against Cancer
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
VJI	Vena jugularis interna
Vol.	Volumen
WB	Western Blot
z.B.	Zum Beispiel
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

2. EINLEITUNG

2.1. PROBLEMSTELLUNG

Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches stellen die vierthäufigste Tumorentität in Deutschland dar {Reiter, 2009}. Aufgrund der Tatsache, dass die Tumoren in unterschiedlichen anatomischen Bereichen vorkommen und sich ihre Therapie auf verschiedene Fachdisziplinen aufteilt, wird die Inzidenz jedoch häufig unterschätzt. Obwohl die Therapieoptionen in den letzten Jahrzehnten optimiert wurden, konnten bislang keine wesentlichen Verbesserungen in der Prognose der Patienten erzielt werden. Nur 47% der Patienten bleiben langfristig tumorfrei {Bernier, 2004}. Geheilte Patienten büßen häufig langfristig einen großen Teil ihrer Lebensqualität ein, da im Rahmen der operativen oder Strahlentherapie erhebliche funktionelle Einbußen gemacht werden müssen.

Um diese Patienten langfristig effektiver und mit weniger starken Nebenwirkungen behandeln zu können, müssen die Pathomechanismen in Kopf-Hals-Malignomen besser verstanden werden. Erst wenn das Verständnis besser wird, können neue Therapiemodalitäten erprobt und mit Hilfe dieser das Leben der Patienten verbessert werden.

2.2. PLATTENEPITHELKRZINOME DES KOPF-HALS-BEREICHES

Zu den Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches zählen Tumoren der Lippen, der Zunge, der Speicheldrüsen, der Mundhöhle, des Larynx, des Oro-/Naso- und Hypopharynx, der Nase, der Nasennebenhöhlen (NNH) und des äußeren Ohres.

Unter den einzelnen Entitäten stellt das Plattenepithelkarzinom mit 90% die häufigste dar. Es wird von der World Health Organisation (WHO) definiert als maligner epithelialer Tumor mit plattenepithelialer Differenzierung, charakterisiert durch ein vom histologischen Malignitätsgrad abhängiges Ausmaß an Hornbildung und Vorhandensein von Interzellularbrücken {Ihrler, 2009}. Im Folgenden sind Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches im engeren Sinne gemeint, also Tumoren der Mundhöhle, des Oropharynx, des Hypopharynx und des Larynx.

2.2.1. EPIDEMIOLOGIE

In der Bundesrepublik Deutschland (BRD) stellen Malignome des oberen Aerodigestivtrakts mit einem relativen Anteil von 4,8% die vierthäufigste Tumorneuerkrankung dar (nach dem Prostata-, dem Lungen- und dem Kolorektalkarzinom) {Reiter, 2009}. Die relative Häufigkeit bei Männern unterscheidet sich mit 7,3% deutlich von der von Frauen mit 2,1%. Ebenso finden sich geographisch erheblich Unterschiede in der Prävalenz: in hochentwickelten Ländern wie den USA findet sich ein relativer Anteil von Kopf-Hals-Malignomen von nur 3% aller neoplastischen Neubildungen, wohingegen dieser Anteil im südlichen Zentralasien auf 17% ansteigt {Reiter, 2009}. Weltweit sind Kopf-Hals-Tumoren auf Rang sechs der häufigsten Tumorentitäten {Hunter, 2005}.

Für Deutschland zeigt sich eine altersstandardisierte Inzidenz von 25,1 /100.000 pro Einwohner und Jahr für Männer und von 5,2 /100.000 pro Einwohner und Jahr für Frauen. Im Jahr 2003 erkrankten 15.651 Männer an einem Tumor des oberen Aerodigestivtraktes, wobei 5250 an dieser Erkrankung verstarben. Unter den Frauen in der BRD sind in diesem Zeitraum 4058 erkrankt, wobei die Mortalität bei 1421 lag {Reiter, 2009}. Die Daten zur Mortalität von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches sollten allerdings mit Zurückhaltung interpretiert werden, da das Überleben der Patienten stark von Lokalisation und Stadium der Erkrankung (s.u.) abhängig ist.

Das mittlere Erkrankungsalter liegt zwischen dem 50. und dem 65. Lebensjahr {Gellrich, 2004}. Durch das vergleichsweise niedrige Erkrankungsalter ist das Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) bei Männern zwischen dem vierten und dem sechsten Lebensjahrzent sogar für 10% aller durch Tumoren bedingten Sterbefälle verantwortlich {Reiter, 2009}.

Die häufigste Lokalisation bei Männern ist mit 26% der Larynx, bei Frauen mit je 19% der Oropharynx und die Zunge {Reiter, 2009}.

2.2.2. KLASSIFIKATION

Kopf-Hals-Tumoren werden von der International Unit Against Cancer (UICC) nach der TNM-Klassifikation eingeteilt. Der Zusatz p steht für die histopathologische Untersuchung des Operationspräparates, auf der die Klassifikation beruht.

TABELLE 1: PT-KLASSIFIKATION DER UICC.

pT-Klassifikation	
pTX	Primärtumor kann histologisch nicht beurteilt werden
pT0	Kein histologischer Anhalt für Primärtumor
pTis	Carcinoma in situ
pT1-4	Zunehmende Größe und/oder Ausdehnung des Primärtumors

{Sobin, 2010}

TABELLE 2: PN-KLASSIFIKATION DER UICC.

pN-Klassifikation	
pNX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
pN0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
pN1	Metastase in solitärem ipsilateralen Lymphknoten, 3cm oder kleiner
pN2a	Metastase in solitärem ipsilateralen Lymphknoten, größer als 3cm, kleiner als 6cm
pN2b	Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, keiner größer als 6cm
pN2c	Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, keiner größer als 6cm
pN3	Metastase(n) in Lymphknoten größer als 6cm

{Sobin, 2010}

TABELLE 3: PM-KLASSIFIKATION DER UICC.

pM-Klassifikation	
pMX	Fernmetastasen können histologisch nicht beurteilt werden
pM0	Histologisch keine Fernmetastasen
pM1	Histologisch gesicherte Fernmetastase

{Sobin, 2010}

TABELLE 4: DEFINITION DES R-FAKTORS.

R-Faktor	
RX	Vorhandensein von Residualtumor kann nicht beurteilt werden
R0	Kein Residualtumor
R1	Mikroskopischer Residualtumor
R2	Makroskopischer Residualtumor

{Sobin, 2010}

Nach der TNM-Klassifikation lassen sich die Tumore in verschiedene Stadien einteilen. Dies erfolgt nach der UICC und ist in folgender Tabelle verdeutlicht:

TABELLE 5: STADIENEINTEILUNG VON KOPF-HALS-TUMOREN.

Stadium	T	N	M
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T1,T2	N1, N0	M0
	T3	N1	M0
Stadium IVA	T1,T2,T3	N2	M0
	T4a	N0,N1,N2	M0
Stadium IVB	alle T	N3	M0
	T4b	alle N	M0
Stadium IVC	alle T	alle N	M1

{Sobin, 2010}

Vom histopathologischen Grading lassen sich Aussagen über den Malignitätsgrad des Tumors machen. In folgender Tabelle wird die Einteilung verdeutlicht:

TABELLE 6: GRADING VON KOPF-HALS-TUMOREN.

Grading	
GX	Der Grad der Differenzierung kann nicht bestimmt werden
G1	Gut differenziert
G2	Mäßig differenziert
G3	Schlecht differenziert
G4	Undifferenziert

{Sobin, 2010}

2.2.3. ÄTIOPATHOLOGIE UND RISIKOFAKTOREN

Die Entstehung von Tumoren des oberen Aerodigestivtraktes wird durch eine Vielzahl von Faktoren bedingt. Zu ihnen gehören in erster Linie Alkohol- und Tabakkonsum. Im Vergleich zu Nichtrauchern haben Raucher ein 3-6 fach erhöhtes Risiko ein Mundhöhlenkarzinom zu

entwickeln. Bei gleichzeitigem Alkoholkonsum erhöht sich dieses Risiko noch einmal um den Faktor 2,5 {Gellrich, 2004}. Diese potenzierte Wirkung durch gleichzeitigen Alkohol- und Nikotinkonsum entsteht vermutlich durch eine Schwächung der plattenepithelialen Barrieren der Schleimhaut {Gellrich, 2004}.

Weitere Faktoren, die die Entstehung eines Karzinoms im Kopf-Hals-Bereich fördern, sind schlechte Mundhygiene, chronische Traumen, UV- und radioaktive Strahlung, kanzerogene Chemikalien sowie Virusinfektionen {Gellrich, 2004}. Für das Mundhöhlen- und das Larynxkarzinom spielen Viren, vor allem Humane Papillom Viren (HPV), eine wichtige Rolle. Neuere Studien haben insbesondere den Subtyp HPV16 mit diesen Neubildungen in Verbindung gebracht {Lundberg, 2011}.

2.2.4. MOLEKULARPATHOLOGIE

Ähnlich wie beim Kolonkarzinom geht das HNSCC aus prämaligen Vorläuferläsionen hervor, wie etwa einer Leukoplakie oder einer Erythroplakie {Ihrler, 2009}. Analog zum Vogelsteinmodell zur Tumorgenese des Kolonkarzinoms haben Califano et al. {Califano, 1996} folgendes Modell zur Tumorgenese des HNSCC publiziert:

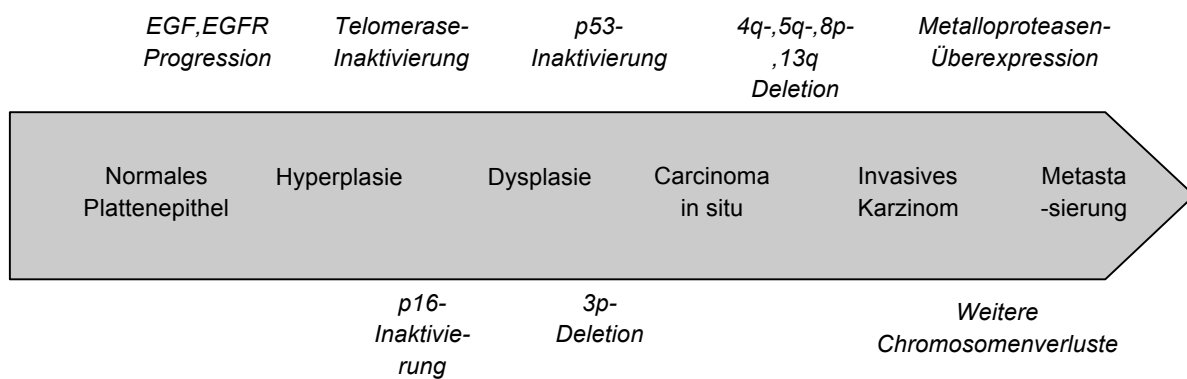


ABBILDUNG 1: PATHOGENESE VON KOPF-HALS-MALIGNOMEN AUF MOLEKULARER EBENE. DAS INVASIVE KARZINOM ENTWICKELT SICH AUS PRÄMALIGEN VORLÄUFERLÄSIONEN DURCH EINE KUMULATION VON MUTATIONEN.

modifiziert nach {Califano, 1996}

Für die Entstehung eines HNSCC sind folgende drei Genalterationen von besonderer Bedeutung: Inaktivierung des **p53** Tumorsuppressorproteins (in 40% der

Mundhöhlenkarzinome vorhanden {Taylor, 1999}), Inaktivierung des cyclin dependent kinase inhibitor **p16^{INK4a}** (in 70% der Mundhöhlenkarzinome vorhanden {Sartor, 1999}) und eine Überexpression vom epidermal growth factor receptor (**EGFR**) (in 90% der Mundhöhlenkarzinome vorhanden {Grandis, 1993}).

2.2.5. PROGNOSEFAKTOREN

Die wichtigsten Prognosefaktoren in Bezug auf das Überleben sind zum einen die TNM-Klassifikation und zum anderen die Lokalisation des Tumors. So zeigt sich eine 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) beim Lippenkarzinom von 90%. Im Gegensatz hierzu liegt die 5-JÜR beim Hypopharynxkarzinom bei nur 23% {Röper, 2009}. Auch für die Bedeutung des Lymphknoten- (LK-) Status spielt die Lokalisation des Primärtumors eine Rolle. Beim Oropharynxkarzinom kommt dem LK-Status in Bezug auf das Überleben kaum Bedeutung zu, beim Larynxkarzinom hingegen halbiert sich die Wahrscheinlichkeit des 5-Jahresüberlebens bei positivem LK-Status. Allen Lokalisationen gleich ist hingegen die schlechte Prognose bei einem T3/T4 Tumor im Vergleich zu einem T1 Tumor {Röper, 2009}.

In neueren Studien konnten Ang et al. zeigen, dass sowohl der HPV-Status als auch der Tabakkonsum das Outcome von Patienten mit Oropharynxkarzinom signifikant beeinflussen und womöglich sogar eine höhere prognostische Aussagefähigkeit haben als das TNM-Stadium {Ang, 2010}.

Wie bei anderen Tumorentitäten spielt die Invasion in Blut- und Lymphgefäße eine wichtige Rolle für die Prognose des Patienten {Woolgar, 2006}. Ebenso gilt die Kapselüberschreitung von Metastasen als prognostisch ungünstig, da bei einer Kapselüberschreitung sowohl die Rate an lokoregionären Rezidiven als auch an Fernmetastasen erhöht ist {Greenberg, 2003}.

Weitere Faktoren, die mit einem ungünstigen Verlauf assoziiert werden, sind Hypoxie {Nordsmark, 2005} und Anämie {Daly, 2003}. Bei ihnen ist jedoch nicht endgültig geklärt, ob sie tatsächlich Auslöser oder doch eher Symptom einer schwerer verlaufenden Tumorerkrankung sind.

Theoretisch mögliche, aber in der Praxis noch nicht angewandte Marker sind der epidermal growth factor receptor- (EGFR-) Status und in Zukunft vielleicht auch der Sphingokinase1- (SphK1-) Status von Tumoren. Chung et al. konnten in einer großen randomisierten Studie zeigen, dass die Expression von EGFR im HNSCC sehr variabel ist und dass eine erhöhte

Expression mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist. Im Einzelnen konnte gezeigt werden, dass eine hohe Expression einen negativen Einfluss auf das Gesamtüberleben, das krankheitsfreie Überleben und das Auftreten von Lokalrezidiven hat {Chung, 2011}. Auch in Bezug auf die SphK1 konnte gezeigt werden, dass in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches höhere Level an SphK1 exprimiert werden als im Normalgewebe und dass diese erhöhte Expression mit kürzeren Überlebenszeiten der Patienten einhergeht {Facchinetti, 2010}.

2.2.6. THERAPIESTANDARDS

Grundsätzlich stehen zur Therapie von Kopf-Hals-Malignomen drei Modalitäten zur Verfügung: chirurgische Resektion, Strahlentherapie und Chemotherapie, die einzeln oder in Kombination durchgeführt werden können. Welche Therapien durchgeführt werden, hängt im Einzelfall von Lokalisation, Metastasierung und histopathologischem Grading ab {Gellrich, 2004}. Bei Plattenepithelkarzinomen wird zunächst grundsätzlich eine Operation angestrebt, die in höheren Stadien mit einer adjuvanten Radiotherapie kombiniert wird. Bei zusätzlichen Risikofaktoren, wie extrakapsulärer Ausbreitung, Lymphangiosis carcinomatosa oder multiplem Lymphknotenbefall, konnte gezeigt werden, dass das progressionsfreie Überleben durch eine simultane Radiochemotherapie signifikant verbessert wird {Bootz, 2008}. Die zytostatische Chemotherapie allein wird überwiegend palliativ eingesetzt {Gellrich, 2004}.

Das Ziel chirurgischer Maßnahmen ist immer eine vollständige Resektion des Tumors und etwaiger Lymphknotenmetastasen (R0-Resektion), was durch eine Neck-Dissection (ND) erreicht werden soll. Art und Umfang des Eingriffs hängen von Lage und Lymphknotenstatus ab. Ob die ND beispielsweise ein- oder beidseitig durchgeführt wird, hängt von der Lokalisation und dem Risiko einer kontralateralen Metastasierung ab {Gellrich, 2004}. Folgende Tabelle (Tab. 7) veranschaulicht im Einzelnen, welche Formen der ND möglich sind und wann diese indiziert sind.

TABELLE 7: KLASSIFIKATION UND INDIKATIONEN VON NECK-DISSECTIONS.

Neck-Dissection Typ	LK-Level	Resektion nonlymphatischer Strukturen	Indikation/ Lokalisation Primärtumor
Komplette ND/ ‚Comprehensive‘ ND			
Radikale Neck-Dissection (RND)	I, II, III, IV, V	V. jugularis interna (VJI) M. omohyoideus (MO) M. sternocleidomastoideus (MSCM) N. accessorius (N. XI) Plexus cervicalis (PC) Gld. submandibularis (GSM) Gld. sublingualis (GSL)	Alle Primärtumor-Lokalisationen bei Nachweis extrakapsulärer LK-Metastasierung (N2-/N3-Stadien)
Modifizierte radikale Neck-Dissection (MRND), drei mögliche Typen	I, II, III, IV, V	Alle Typen: Resektion GSM (ggf. GSL) Typ1: Resektion VJI, MSCM; Erhalt N. XI Typ2: Resektion VJI; Erhalt N. XI, MSCM Typ3: Erhalt VJI, XI, MSCM	Alle Primärtumor-Lokalisationen mit nachgewiesenem LK-Befall (N1, N2), jedoch ohne extrakapsuläre Ausbreitung, Typ1 und Typ2 nur bei Involvement des MSCM und/oder VJI
Extendierte radikale Neck-Dissection (ERND)	I, II, III, IV, V, VI Zusätzlich LK-Regionen: retroaurikulär, subokzipital, parotideal, retro-, parapharyngeal, mediastinal, axillär	Siehe Standard-RND zusätzlich: Haut, Karotis, kaudale Hirnnerven, Halsmuskulatur, Parotis, evt. Paraspinale Muskulatur, Halswirbel etc.	Extrakapsuläre Metastasierung/ Infiltration/ Invasion in Umgebungsstrukturen in- und außerhalb des Kopf-Hals-Bereiches: Haut, Karotis, paraspinale Muskulatur, Halswirbel, Schädelbasis, Mediastinum, Axilla
Selektive ND (limitierter Umfang)			
Supraomohyoidale Neck-Dissection (SOND)	I, II, III	GSM/ GSL	Karzinome/ Malignome: Mundhöhle (Zunge), Unterkiefer, Wange, Weichgaumen, Intermaxillär-/ Retromolarregion, vorderer Tonsillenpol, anteriorer Oropharynx
Extendierte	I, II, III, IV	GSM/ GSL	Tumoren mit

supraomohyoidale Neck-Dissection (ESOND)			Metastasierungstendenz in Level IV: Zunge, Retromolarregion, vorderer Tonsillenpol, Weichgaumen
Laterale/ anterolaterale Neck-Dissection (LND)	II, III, IV	Keine	Oropharynx-Ca, Larynx-Ca
Posterolaterale Neck-Dissection (PLND)	II, III, IV, V Bei Hauptmalignomen im Hinterkopf-Nacken-Bereich zusätzlich subokzipitale/ retroaurikuläre LK	Keine	Oropharynx-Ca mit Involvierung dorsaler Abschnitte/ Pharynxhinterwand, Larynx-Ca mit Involvierung dorsaler Abschnitte Hinterkopf/ Halshaut

{Cornelius, 2009}

Auch wenn in Voruntersuchungen keine LK-Metastasen nachgewiesen werden konnten (N0), kann dennoch eine elektive ND angezeigt sein, wenn der Primärtumorbefund eine Metastasierung wahrscheinlich erscheinen lässt {Bootz, 2008}.

Die Strahlentherapie erfolgt in erster Linie als perkutane Therapie mit Linearbeschleunigern. Als radiosensibilisierende Verfahren können Chemotherapeutika oder immunmodulierende Substanzen eingesetzt werden. Die Radiotherapie wird entweder als Monotherapie oder in Kombination mit operativen Verfahren prä- oder postoperativ durchgeführt {Gellrich, 2004}. Der neoadjuvante Therapieansatz wird bei Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches nur selten und vor allem in kontrollierten Studien angewandt. Wichtig ist bei der anschließenden Operation, dass die Resektion entsprechend der prätherapeutischen Tumorgrenzen erfolgt. Der Vorteil der postoperativen Radiotherapie besteht darin, dass aufgrund der pathologisch-anatomischen Befunde eine strengere Indikationsstellung möglich ist {Bootz, 2008}. Trotz der theoretischen Vorteile einer neoadjuvanten Radiotherapie (bessere Resezierbarkeit und niedrigeres intraoperatives Metastasierungsverhalten) hat sich in einer Vergleichsstudie gezeigt, dass in Bezug auf Lokalrezidive und das Gesamtüberleben die adjuvante der neoadjuvanten Therapie deutlich überlegen ist {Kramer, 1987}.

Indikationen zur adjuvanten Radiotherapie sind {Gellrich, 2004}:

1. Resektion non in sano (R1 oder R2)
2. Lymphknotenmetastasen (pN2, pN3 oder Lymphangiosis carcinomatosa)
3. T4-Tumoren oder Durchbruch einer Metastase durch die LK-Kapsel

Die Strahlendosis ist abhängig von der Indikationsstellung. Eine alleinige Radiotherapie kann z.B. bei frühen Kehlkopf- und Nasopharynxkarzinomen kurativ eingesetzt werden. Hierbei wird mit Einzeldosen von 2Gy eine Gesamtdosis von 66Gy angestrebt {Pigorsch, 2009}. Wird die Radiotherapie bei lokal fortgeschrittenen Befunden eingesetzt, weil z.B. internistische Erkrankungen einen großen Eingriff nicht zulassen, kann durch eine Akzelerierung oder Hyperfraktionierung versucht werden, den Strahleneffekt zu steigern. Bei diesem Behandlungskonzept ist mit einer Zunahme der Akuttoxizität zu rechnen, nicht jedoch mit einer Veränderung der Spättoxizität, wenn zur Erholung des Normalgewebes ein Zeitintervall von mindestens sechs Stunden zwischen den einzelnen Fraktionen eingeplant wird {Pigorsch, 2009}.

Neoadjuvant werden Dosen von 50Gy eingesetzt. Bei einer postoperativen Strahlentherapie werden aufgrund des veränderten Gefäßstatus und der dadurch bedingten relativen Hypoxie mit Strahlenresistenz Dosen von 50-60Gy benötigt {Pigorsch, 2009}.

Die alleinige Chemotherapie wird bislang nur in palliativer Absicht durchgeführt. Dabei haben sich bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches folgende Substanzen als wirksam erwiesen: Cisplatin, Carboplatin, 5-Fluoruracil, Methotrexat, Cyclophosphamid, Ifosfamid, Vincaalkaloide und Paclitaxel. Die höchsten Remissionsraten haben sich bisher bei einer Kombinationschemotherapie mit Cis- bzw. Carboplatin und einer 5-Fluoruracil Dauerinfusion gezeigt {Bootz, 2008}.

Ein weiterer Therapieansatz besteht in der „Target Therapy“, in der ein spezifischer EGFR-Antikörper verwendet wird {Bonner, 2006}. Unter dem Namen Cetuximab befindet er sich bereits in der klinischen Erprobung (s.u.), ein alleiniger Einsatz gehört allerdings noch nicht zu den Standardtherapien.

2.3. EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR (EGFR)

Der EGFR ist eine Rezeptortyrosinkinase (RTK) und gehört zur Familie der erbB Rezeptoren. Nach Aktivierung des Rezeptors durch EGF kommt es in den nachgeschalteten

Signalwegen zur Phosphorylierung und somit Aktivierung verschiedener Enzyme, die mitogene und tumorfördernde Eigenschaften haben {Mendelsohn, 2003}. Für viele Tumore, einschließlich Tumore des Kopf-Hals-Bereiches, hat sich gezeigt, dass erhöhte Level an EGFR-Expression das Outcome der Patienten negativ beeinflussen {Pectasides, 2011}. Der EGFR hat aber nicht nur prognostischen, sondern auch therapeutischen Wert. Unter Therapie mit spezifischen EGFR-Antikörpern konnte in Tumoren ein Zellzyklusarrest {Wu, 1996}, eine Potenzierung der Apoptose {Wu, 1995}, eine Inhibition der Angiogenese {Petit, 1997} und verminderte Invasivitäts- und Metastasierungsraten {O-charoenrat, 2000} beobachtet werden. Des Weiteren wurde eine Augmentation der Antitumoreffekte von Strahlen- {Milas, 2000} und Chemotherapie {Baselga, 1993} beobachtet. Interessanterweise scheint auch die Bestrahlung einen Einfluss auf die Aktivierung des EGFR zu haben. Es konnte gezeigt werden, dass es durch Bestrahlung zu einer vermehrten Aktivierung des EGFR kommt {Dent, 2003}.

2.3.1. SIGNALVERMITTLUNG DURCH EGFR

Der EGFR wird aktiviert durch die Bindung eines Liganden: epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor β (TGF β) oder Amphiregulin {Dutta, 2007}. Nach Aktivierung kommt es zur Dimerisierung und anschließender Autophosphorylierung des intrazellulären Anteils des Rezeptors.

Der phosphorylierte EGFR aktiviert nun seinerseits verschiedene intrazelluläre Signalwege:

1. Über eine Aktivierung des rat sarcoma Protein (Ras) wird rat fibrosarcoma Protein (Raf) aktiviert. Raf aktiviert seinerseits die extracellular signal regulated kinase 1/2 / mitogen activated protein kinase (ERK1/2 / MAPK) und nimmt auf diese Weise Einfluss auf den Zellzyklus {Maruta, 1994}.
2. Über eine Aktivierung der Januskinase (JAK) werden signal transducers and activators of transcription Proteine (STATs) aktiviert, welche das Überleben der Zelle fördern {Dutta, 2007}.
3. Durch Aktivierung der Phospholipase C (PLC) wird Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP₂) zu Diacylglycerine (DAG) und Inositoltriphosphat (IP₃) gespalten. DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC) und führt damit zur Proliferation {Falasca, 1998}.
4. Durch Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) wird PIP₂ zu Phosphatidylinositoltriphosphat (PIP₃) phosphoryliert. PIP₃ aktiviert auf der einen

Seite über die Proteinkinase B (PKB=AKT) das mammalian target of rapamycin (mTOR) und beeinflusst auf diese Weise die Proteinsynthese und das Zellwachstum. Auf der anderen Seite aktiviert es Rac und nimmt somit Einfluss auf die Motilität der Zellen {Vivanco, 2002}, {Dutta, 2007}.

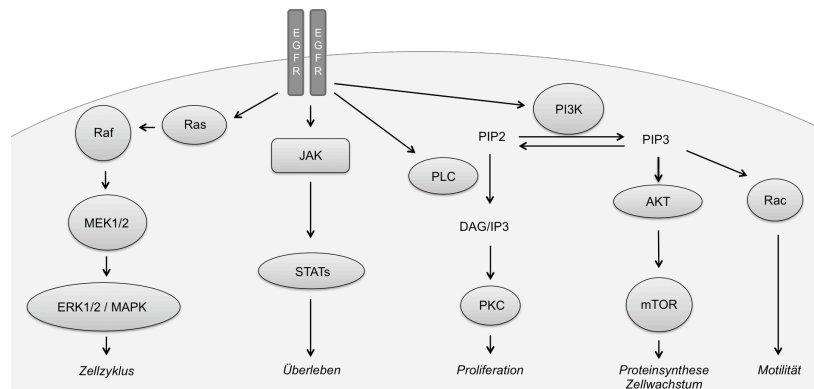


ABBILDUNG 2: SIGNALVERMITTLUNG DURCH EGFR. EINE AKTIVIERUNG DES EGFRS BEEINFLUSST ÜBER VERSCHIEDENE SIGNALWEGE DAS BIOLOGISCHE VERHALTEN VON ZELLEN. DETAILS SIEHE TEXT.

modifiziert nach {Dutta, 2007}

2.3.2. EGFR-INHIBITOREN

Es gibt vier verschiedene Klassen von EGFR-Inhibitoren: Monoklonale Antikörper (MoAbs), Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs), ligandengebundene Toxine und antisense Oligonukleotide, wobei bislang nur MoAbs und TKIs in der Klinik Anwendung finden.

TKIs verhindern intrazellulär die Adenosintriphosphat- (ATP-) Bindung an die ATP-Bindungsstelle. Auf diese Weise bleibt die Autophosphorylierung aus und es kommt nicht zur Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege {Dutta, 2007}.

MoAbs binden extrazellulär und verhindern das Andocken der Liganden an den Rezeptor, sodass eine Aktivierung des Rezeptors ausbleibt {Dutta, 2007}.

Von der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) sind bislang folgende Substanzen zugelassen: Cetuximab (MoAb), Pantimumab (MoAb), Erlotinib (TKI) und Gefitinid (TKI) {Dutta, 2007}.

Die wohl bekannteste Gruppe der EGFR-Inhibitoren sind die MoAbs. Unter ihnen ist Cetuximab am besten untersucht. Cetuximab ist ein chimärer, humanisierter, monoklonaler Mausantikörper, der nach Bindung an den EGFR zu einer Internalisierung und zu einem Abbau des Rezeptors führt {Dutta, 2007}. Von der FDA ist er mittlerweile zugelassen für lokoregionär fortgeschrittene HNSCCs in Kombination mit Bestrahlung oder mit platinbasierter Therapie und als Monotherapie nach fehlgeschlagener, platinbasierter Chemotherapie. Typische Nebenwirkungen einer Therapie mit Cetuximab sind akneiforme Hauteruptionen, die, in unterschiedlicher Ausprägung, bei der Mehrzahl der behandelten Patienten auftreten {Rodriguez-Murphy, 2011}. Pantimumab verspricht ein besseres Nebenwirkungsprofil aufgrund der Tatsache, dass er voll humanisiert ist. Er bindet ebenfalls extrazellulär an den EGFR und führt zur Internalisierung, ein Abbau bleibt allerdings aus {Yang, 2001}. Pantimumab ist von der FDA bislang nur zur Behandlung von metastasierten therapierefraktären Kolorektalkarzinomen zugelassen.

2.4. SPHINGOSINKINASE (SPHK)

Die Sphingosinkinase ist eine Lipidkinase, die die Reaktion von Sphingosin zu Sphingosin-1-Phosphat (S1P) mittels eines Moleküls ATP katalysiert. Es existieren zwei Unterformen des Enzyms: SphK1 und SphK2, benannt nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung. Obwohl diese Enzyme eng verwandt sind und sowohl dasselbe Substrat (Sphingosin) nutzen als auch dasselbe Produkt (S1P) generieren, scheinen sie unterschiedliche und zum Teil gegensätzliche Funktionen in der Zelle zu erfüllen {Shida, 2008}. Eine Überregulation der SphK1 ist eng assoziiert mit Tumorstadium, Überleben {Ogretmen, 2004}, Migration, Angiogenese {Spiegel, 2003} und Resistenz gegenüber Strahlen- und Chemotherapie {Chmura, 1997}, {Nava, 2000}, {Sauer, 2009}, {Guillermet-Guibert, 2009}. Eine Überregulation der SphK2 hingegen supprimiert, je nach Lokalisation, das Wachstum und induziert Apoptose via Cytochrom C und Caspase 3 {Liu, 2003}. Die Relevanz der SphK1 in Tumoren wird deutlich bei der Bedeutsamkeit ihrer Expression als prognostischer Marker. Follow-up-Studien von 48 Patienten mit Glioblastoma multiforme (GBM) zeigten eine signifikante Korrelation zwischen kurzer Überlebenszeit und erhöhter SphK1-Expression {Van Brocklyn, 2005}. Allerdings spielt nicht nur die Expression sondern auch die Aktivierung der SphK1 und die damit einhergehende Translokation an die Zellmembran eine Rolle {Pitson, 2005}. Phosphorylierung führt zu einer Konformationsänderung der SphK1, die die Bindung an saure Membranproteine begünstigt. Hier stehen der SphK1 die nötigen

Substrate zur Verfügung, die später im phosphorylierten Zustand über einen „inside out signaling“ Weg autokrin und parakrin an die entsprechenden Rezeptoren (Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren 1-5 (S1P-1-5), s.u.) binden {Hobson, 2001}. Diese Translokation an die Zellmembran ist assoziiert mit Zellproliferation und Überleben {Pitson, 2005}.

2.4.1. SPHINGOSINKINASE1 UND IHRE ROLLE IN TUMOREN

Erhöhte Level an SphK1-Expression wurden in verschiedenen Tumoren gefunden. Im Vergleich zwischen Tumor- und Normalgewebe desselben Patienten wurden doppelt so hohe Level an SphK1 mRNA in Mamma-, Kolon-, Lungen-, Ovarial-, Magen-, Uterus-, Nieren- und Rektumkarzinomen gefunden {French, 2003}.

Durch Blockierung der SphK1 mit siRNA konnte gezeigt werden, dass die SphK1 einen direkten Einfluss auf die Migration von Mammakarzinom-Zellen (MCF7) hat. Zellen, die zuvor mit spezifischer siRNA behandelt wurden, zeigten eine stark verminderte Migration nach EGF- {Sarkar, 2005}, Prolaktin- und Estradiol- (E2-) Stimulation {Doll, 2007}.

Neben dem Einfluss der SphK1 auf das Wachstum und die Migration von Tumorzellen hat ihr Substrat, S1P, auch Einfluss auf die Angiogenese. Es wurde nicht nur gezeigt, dass S1P einen stärkeren Einfluss auf Endothelzellmigration hat als vascular endothelial growth factor (VEGF) oder hepatocyte growth factor (HGF) {Liu, 2001} und somit die Angiogenese fördert, sondern es wurde auch in *in vivo* Experimenten nachgewiesen, dass S1P einen erheblichen Einfluss auf tumorassoziierte Gefäßneubildung hat {Visentin, 2006}.

Auch in Bezug auf die Resistenz gegenüber Chemo- und Strahlentherapie scheint die SphK1 eine wichtige Rolle zu spielen. Resistenzen gegenüber Antitumorthherapie gehen mit der Unfähigkeit Ceramid zu bilden einher {Ogretmen, 2001}. Im Prostatakarzinom wurde nachgewiesen, dass es unter Chemotherapie (Paclitaxel) und unter Strahlentherapie zu einer Erhöhung des Ceramidlevels kommt {Pchejetski, 2005}. In strahlensensitiven Prostatakarzinom-Zellen (TSU-Pr1) stiegen die Ceramidlevel nach Bestrahlung (8Gy) an, bei resistenten Zellen (LNCaP) blieb dieser Effekt aus. Zusätzlich wurde bei strahlensensitiven Zellen nach der Bestrahlung ein Rückgang der SphK1-Aktivität um 50% beobachtet {Nava, 2000}.

2.4.2. DIE SPHINGOLIPIDRHEOSTASE

Es hat sich gezeigt, dass Sphingolipide, neben ihrer bereits bekannten Funktion in Lipiddoppelschichten, auch eine Funktion als Signalmoleküle innerhalb der Zelle wahrnehmen. Ceramid und Sphingosin auf der einen Seite vermitteln einen Zellzyklusarrest und induzieren Apoptose, S1P auf der anderen Seite begünstigt Zellwachstum, Proliferation und Überleben. Interessanterweise sind diese Sphingolipide ineinander überführbar, was die beteiligten Enzyme und insbesondere die SphK1 zu einer wichtigen Schlüsselfigur macht {Ogretmen, 2004}.

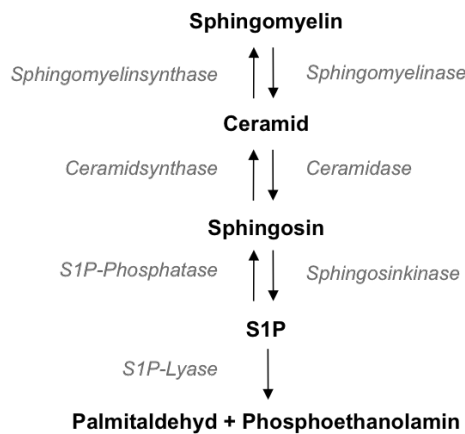


ABBILDUNG 3: DIE SPHINGOLIPIDRHEOSTASE. DIE ABBILDUNG ZEIGT DEN AUF- UND ABBAU VON SPHINGOLIPIDEN MIT DEN BETEILIGTEN ENZYMEN. DETAILS SIEHE TEXT.

Die SphK phosphoryliert Sphingosin zu S1P. S1P kann durch die S1P-Phosphatase wieder zu Sphingosin dephosphoryliert werden oder irreversibel durch die S1P-Lyase in Palmitaldehyd und Phosphoethanolamin gespalten werden. Sphingosin selbst entsteht durch Spaltung von Ceramid mittels Ceramidase, die Rückreaktion wird katalysiert von der Ceramidsynthase. Ceramid kann allerdings nicht nur zu Sphingosin gespalten sondern auch zu Sphingomyelin synthetisiert werden; die beteiligten Enzyme hier sind Sphingomyelinsynthetase und Sphingomyelinase.

Die SphK stellt das Gleichgewicht zwischen den Tumorsuppressorlipiden (Ceramid und Sphingosin) auf der einen Seite und dem Tumorpromoterlipid (S1P) auf der anderen Seite her und ist somit ein Schlüsselenzym für das Schicksal der Zelle.

2.4.3. SIGNALVERMITTLUNG DURCH SPHINGOSIN-1-PHOSPHAT

S1P wirkt zum einen intrazellulär als second messenger im Rahmen der Sphingolipidreostase, wobei die genauen Mechanismen nach wie vor ungeklärt sind {Huang, 2011}. Zum anderen wirkt es autokrin und parakrin als Ligand an fünf membranständigen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, Sphingosin-1-Phosphatrezeptor 1-5 (S1P 1-5). S1P-4 wird vornehmlich in lymphatischen Geweben exprimiert {Pyne, 2010} und bleibt deshalb in der folgenden Abbildung außer Acht.

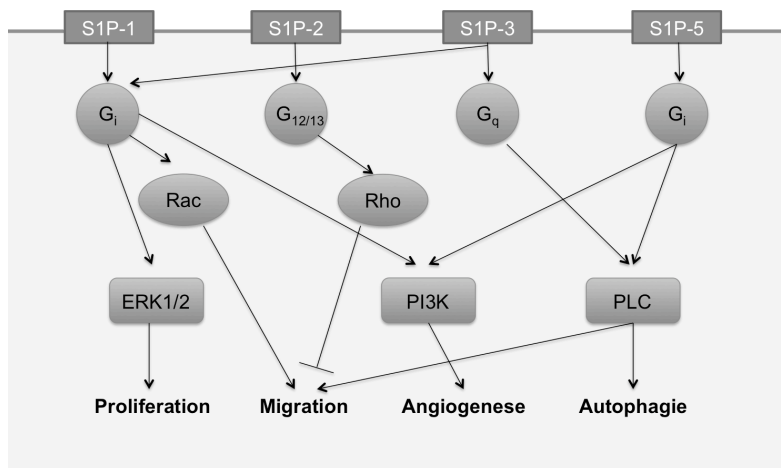


ABBILDUNG 4: SIGNALVERMITTLUNG DER S1P-REZEPTOREN. S1P WIRKT AUTOKRIN UND PARAKRIN ALS LIGAND AN FÜNF MEMBRANSTÄNDIGEN G-PROTEIN-GEKOPPELTEN REZEPTOREN, S1P 1-5. IN DEN NACHGESCHALTETEN SIGNALWEGEN WERDEN PROLIFERATION, MIGRATION, ANGIOGENESE UND AUTOPHAGIE BEEINFLUSST. DA S1P-4 NUR IN LYMPHATISCHEN GEWEBEN EXPRIMIERT WIRD, BLEIBT ER IN DIESER ABBILDUNG AUßER ACHT.

modifiziert nach {Huang, 2011}

2.4.4. AKTIVIERUNG DER SPHINGOSINKINASE1

Die SphK1 ist vornehmlich ein zytosolisches Enzym, das nach Aktivierung an die Plasmamembran transloziert {Pitson, 2003}. Dieser Prozess kann durch verschiedene Wachstumsfaktoren und andere chemische Stoffe angetrieben werden. Zu ihnen gehören: epidermal growth factor (EGF) {Doll, 2005}, platelet derived growth factor (PDGF), nerve growth factor (NGF), insulin growth factor (IGF), transforming growth factor beta (TGF β) {Shida, 2008}, phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA) {Nakade, 2003} und Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) {Pitson, 2005}. Diese Stoffe führen zu einer Phosphorylierung der SphK1 am Serin 225 via ERK1/2 oder PKC und haben somit eine Aktivierung und Translokation zur

Folge {Pitson, 2003}. Neben der kurzfristigen Aktivierung kommt es zur längerfristigen Hochregulation der SphK1-Expression durch EGF {Doll, 2005}, 17 β -Estradiol (E2) {Sukocheva, 2003}, Prolaktin {Doll, 2007}, Histamin {Huwiler, 2006}, PMA {Nakade, 2003} und Lysophosphatidsäure (LPA) {Ramachandran, 2010}. Die entscheidenden Enzyme bei diesem Mechanismus sind ERK1/2 und PKC in Abhängigkeit von dem jeweiligen Agens. Da viele dieser Stoffe sowohl eine kurzfristige als auch eine längerfristige Wirkung haben, kommt es zu einem biphasischen Verlauf der Aktivierung mit einer Spitze Minuten nach Stimulation und einer zweiten Spitze Stunden nach Stimulation {Shida, 2008}.

2.4.5. AMPLIFIZIERUNGSSCHLEIFEN

Die SphK1 ist Teil verschiedener Amplifizierungsschleifen, die in Tumoren aktiv sind. Das Produkt der SphK1 wirkt im „inside out signaling“ Weg autokrin und parakrin an entsprechenden Rezeptoren. In den nachgeschalteten Signalwegen kommt es zu einer Aktivierung der ERK1/2 {Huang, 2011}, die ihrerseits wiederum die SphK1 aktiviert {Pitson, 2003}. Auf diesem Wege kommt es, einmal angestoßen, zu einer fort dauernden Selbstaktivierung der SphK1.

Eine weitere Amplifizierungsschleife entsteht dadurch, dass S1P in der Lage ist, andere Rezeptortyrosinkinase (RTKs) zu transaktivieren. Erstmals beschrieben wurde dieser Mechanismus für den EGFR an Magenkarzinomzellen {Shida, 2004}. Derselbe Mechanismus wurde ein Jahr später auch für Her2/neu gefunden {Shida, 2005}. Die Transaktivierung beider Rezeptoren kommt durch eine Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) zustande. Diese spalten den transmembranösen pro-heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF). Die bei der Proteolyse entstehenden Spaltprodukte transaktivieren dann ihrerseits die entsprechenden RTKs. Bei einer Überexpression der SphK1 kommt es also nicht nur zu einer einfachen Verschiebung des Sphingolipidhaushaltes, sondern durch die Amplifizierungsschleifen und die damit einhergehenden Autoaktivierung der SphK1 zu einer weiteren Entkopplung der Sphingolipidhomeostase (Abb. 5).

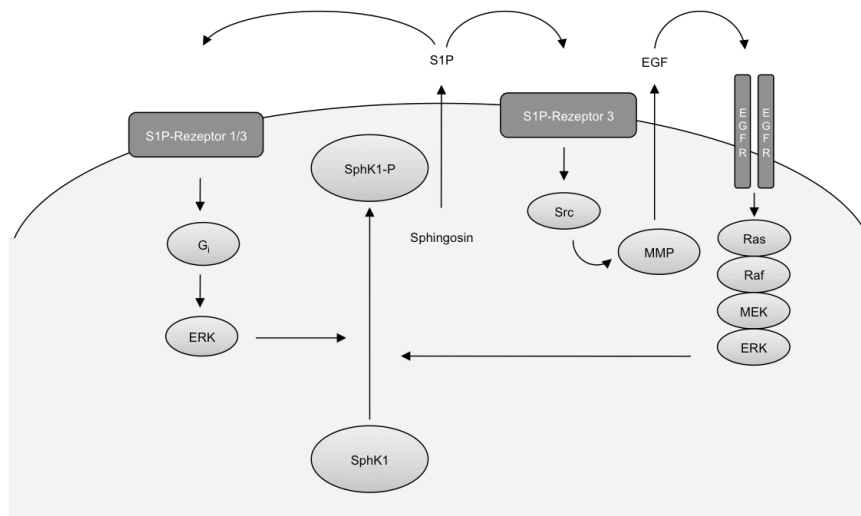


ABBILDUNG 5: SPHK1-AMPLIFIZIERUNGSSCHLEIFEN. DIE SPHK IST TEIL VERSCHIEDENER AMPLIFIZIERUNGSSCHLEIFEN. IHR PRODUKT, S1P FÜHRT ÜBER S1P-1 UND -3 REZEPTOREN ZU EINER AUTOSTIMULATION VIA ERK. S1P KANN AUßERDEM RTK TRANSAKTIVIEREN UND AUCH AUF DIESE WEISE IN DEN NACHGESCHALTETEN SIGNALWEGEN ZU EINER AUTOAKTIVIERUNG FÜHREN. DETAILS SIEHE TEXT.

2.4.6. SPHINGOSINKINASE1-INHIBITOREN

Die bereits beschriebenen Amplifizierungsschleifen verdeutlichen die Relevanz des SphK1-Signalweges zum einen als sich fortlaufend selbst aktivierenden Prozess, zum anderen aber auch in Bezug auf den Crosstalk mit dem EGFR-Signalweg. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Abregulierung der SphK1-Expression mittels spezifischer siRNA in verschiedenen Tumorzelllinien zur Apoptoseinduktion führt {Shida, 2008}. Diese Daten lassen darauf spekulieren, dass die SphK1 ein potentielles Target in der künftigen Antitumorthherapie darstellen könnte.

Die ersten Inhibitoren für SphKs waren N,N-dimethylsphingosin (DMS) und DL-threo-dihydrosphingosin (DHS). Es handelt sich dabei um Sphingosinanaloga, die beide SphKs und die PKC kompetitiv hemmen {Igarashi, 1989}. Mit diesen Substanzen konnten für verschiedene Tumoren in der Zellkultur verminderte Wachstumsraten und eine Apoptoseinduktion nachgewiesen werden {Sweeney, 1996}, {Endo, 1991}. Im Tiermodell zeigte sich allerdings eine starke Hämolyseinduktion, was diese Inhibitoren für therapeutische Zwecke ausschließt {Shida, 2008}.

Modernere spezifische SphK1 Inhibitoren sind nun in der Erprobung als mögliche neue Substanzen in der Antitumorthherapie:

1. SKI-I (2-amino-3[2-(4-pentylphenyl)ethyl-1-ene]1,3-propanediol), ein kompetitiver Inhibitor der SphK1 {Paugh, 2008}. Dieser Inhibitor wurde bereits erfolgreich im Mausmodell mit Xenotransplantaten am GBM getestet {Kapitonov, 2009}.
2. SKI-II (2-(p-hydroxyanilino)-4-(p-chlorophenyl)thiazole) ist ein nicht kompetitiver spezifischer Inhibitor der SphK1, der weder die PKC-, ERK2- noch PI3K- Aktivität beeinflusst {French, 2003}. Des Weiteren wirkt er über eine Abregulierung der SphK1 Proteinexpression {Ren, 2010}. Auch dieser Inhibitor führt zu einem verminderten Tumorstadium im Mausmodell, ist dabei oral bioverfügbar und im Blut für 8h nachweisbar {French, 2006}.

Im Folgenden wird die Rede vom SKI-II sein.

2.4.7. SPHINGOSINKINASE1 IN TUMOREN DES KOPF-HALS-BEREICHES

Auch in Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches scheint die SphK1-Expression von Bedeutung zu sein. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die SphK1-Expression in HNSCC-Tumorgewebe signifikant höher ist als in Normalgewebe {Facchinetti, 2010}, {Shirai, 2011}. Auch in Bezug auf das Überleben der Patienten konnte ein Zusammenhang zwischen hoher SphK1-Expression und kürzerem Überleben gefunden werden {Facchinetti, 2010}. Sinha et al. konnten in Korrelation dazu finden, dass ein höheres Tumorstadium mit einer höheren SphK1-Expression einhergeht. Aus diesen Ergebnissen könnte man der SphK1 in der Zukunft eine Rolle als Biomarker für die Prognose zuschreiben {Sinha, 2011}. In derselben Studie wurde zusätzlich eine Korrelation zwischen erhöhter SphK1-Expression und LK-Beteiligung gezeigt, was eine mögliche Involvement der SphK1 in das Metastasierungsverhalten von Kopf-Hals-Tumoren vermuten lässt. Auch im Tiermodell bestätigt sich die Theorie von der SphK1 als Onkogen. Shirai et. al. konnten zeigen, dass SphK1-/- knockout Mäuse signifikant viel weniger 4-nitroquinolin-1-oxid induzierte Zungentumoren entwickeln als Wildtyp Mäuse und ein Verlust der SphK1 somit einen tumorprotektiven Effekt hat {Shirai, 2011}.

Bezüglich möglicher zukünftiger Therapieoptionen verspricht eine Hemmung der SphK1 auch einiges: Mit spezifischen SphK1-Inhibitoren (SKI-II) konnte die Strahlenresistenz von Tumorzelllinien (SCC-15 und SCC-25) bereits *in vitro* überwunden werden. Im Tiermodell

wurden siRNA transfizierte Xenotransplantate mit nicht transfizierten verglichen. Die Mäuse mit transfizierten Tumoren hatten ein besseres Outcome als die mit den Wildtyp-Transplantaten. Das beste Outcome hatten jedoch die Mäuse mit transfizierten Tumoren, die zusätzlich strahlentherapiert wurden {Sinha, 2011}. Diese Ergebnisse lassen darauf hoffen, dass SphK1-Inhibitoren in Zukunft in der Therapie von Kopf-Hals-Malignomen Strahlenresistenzen überwinden können.

2.5. ZIELSETZUNG

Zweifelsohne bedarf es einer Optimierung der Therapie von Kopf-Hals-Tumoren. Vielversprechend ist die Target Therapy, die tumorfördernde Proteine spezifisch hemmt und in Form von Cetuximab bereits Einzug in die Klinik gefunden hat. Die Relevanz der SphK1 für die Entstehung und Behandlung von Malignomen konnte bereits in vielen Tumorentitäten gezeigt werden. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, ihre Rolle in Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches besser zu verstehen und mögliche therapeutische Ansätze zu untersuchen. Besonderes Augenmerk wird dabei auf den Einfluss von Bestrahlung und die mögliche Interaktion mit dem EGFR-Signalweg gelegt. Neu ist der Einsatz eines spezifischen Inhibitors der SphK1, der möglicherweise alleine oder in Kombination mit Bestrahlung und/oder Cetuximab einen Beitrag zur Therapie von Kopf-Hals-Malignomen liefern könnte.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 MATERIAL

3.1.1. GERÄTE

Geräte	Firma und Firmensitz
Absaugpumpe Vacuubrand LE2	Vacuubrand, Wertheim
Bestrahlungsgerät	Gulmay Medical, Chertsey, England
C1000 Thermo Cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Canon Scanner Multiscan	Canon, Krefeld
Cellometer Auto T4	PeqLab, Erlangen
Cleanbench: Hera Safe KS	Thermo Scientific, Langenselbold
CO ₂ -Inkubator Hera Cell 150i	Thermo Scientific, Langenselbold
DNA Engine	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Eagle-Eye	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Elektrophorese Kammer	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
ELISA Reader Multiscan FC	Thermo Scientific, Langenselbold
Eppendorf Research-Pipetten 1000µl, 200µl, 100µl, 20µl, 10µl	Eppendorf AG, Hamburg
Gefrierschrank no frost premium	Liebherr, Bulle, Schweiz
Gilson Pipetman	Gilson, Middletown, USA
Immundetektor BioRad Chemi Doc	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Kühlschrank comfort	Liebherr, Bulle, Schweiz
Laborabzug	Köttermann, Uetze
Leica DFC 425C	Leica, Wetzler
Magnetrührer RCT basic	IKA Werke GmbH& Co. KG, Staufen
Mikroskop Leica DMI 6000B	Leica Microsystems, Wetzler
Mini-PROTEAN 3 Cell (Gelkammern)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
MS2 Minishaker	IKA Werke GmbH& Co. KG, Staufen

NanoDrop 1000	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
PCR Elektrophorese Powersupply	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Peqpette	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
pH-Meter 766, Calimatic	Knick, Berlin
Pipettus-akku Accu-jet Pro	Brand, Wertheim
Power Pac 300 Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Ready Gel Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Sartorius Basic Elektrowaage Model BA 1105	Sartorius AG, Göttingen
Scaltec Rezeptureinwaage SBC21	Scaltec, Göttingen
Schüttler/ Mischer Vibrax VXR	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Thermomixer comfort 1,5ml	Eppendorf AG, Hamburg
Trans-Blot Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Wärmeschrank	Binder, Tuttlingen
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zentrifuge 5430R	Eppendorf AG, Hamburg

3.1.2. VERBRAUCHSMATERIAL

Verbrauchsmaterial

15ml Reaktionsgefäße
 50ml Reaktionsgefäße
 Biosphere Micro Tubes 1,5ml
 Blotting-Paper Sheets BF2 (Filterpapier)
 Deckgläser
 Distainingbags
 Objektträger
 Pasteurpipetten aus Glas
 Pipetten-Spitzen 1000µl, 100µl, 20µl, 10µl

Firma und Firmensitz

Sarstedt AG & Co., Nürnberg
 Sarstedt AG & Co., Nürnberg
 Sarstedt AG & Co., Nürnberg
 Sartorius AG, Göttingen
 Omnilab, München
 Amresco, Solon, USA
 Omnilab, München
 Brand GmbH + Co KG, Wertheim
 Sarstedt AG & Co., Nürnberg

Polyvinylidenfluorid-(PVDF-)Membran	Millipore GmbH, Schwalbach
Röntgenfilme Hyperfilm TM ECL	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Serologische Pipetten 25ml, 10ml, 5ml	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Tissue Culture Dish 100x20mm	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Tissue Culture Dish 150x20mm	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Tissue Culture Plate 24-well	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Tissue Culture Plate 6-well	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Tissue Culture Plate 96-well	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Toppits Frischhaltefolie	Melitta Unternehmensgruppe Bentz KG, Minden

3.1.3. REAGENZIEN UND CHEMIKALIEN

Reagenzien

0,1M Dithiothreitol (DTT)
 10x PCR Puffer S
 10x Tris-buffered saline
 2-Mercaptoethanol
 5x Enhancer-P
 5x First strand buffer
 Acrylamid
 amino-n-caprioic acid
 Ammoniumperoxidsulfat (APS)
 Amoniumchlorat
 Amoniumchlorid
 Antibody Diluent S2022
 Bovine Serum Albumin (BSA)
 Bradford-Reagenz
 Chlorwasserstoff (HCl)
 Crystal violett

Hersteller und Firmensitz

Invitrogen, Darmstadt
 PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
 Invitrogen, Darmstadt
 Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
 PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
 Invitrogen, Darmstadt
 Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
 Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
 Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
 Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
 Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
 DAKO Hamburg
 Bio-Rad Laboratories GmbH, München
 Bio-Rad Laboratories GmbH, München
 Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
 Aldrich Chemie, Steinheim

Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP's)	GE-Healthcare, München
d'NTP Polymerisation Mix	Roche, Mannheim
EGTA	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Amresco, Solon, USA
Gelatine	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Hexanukleotid Mix 10x conc.	Roche, Mannheim
Hoechst 33341	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
LE Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
Leupeptin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Magermilchpulver	Biomol GmbH, Hamburg
Methanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin, 1,2-Bis(dimethylamino)-ethan (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Na-Phosphat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Na ₂ EDTA	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Natriumvenedat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
PMSF	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
SDS	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Tris	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Triton	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Vectashield Eindeckmedium	Linaris, Wertheim
Ziegenserum	DAKO, Hamburg
β-Glycerolphosphat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
ε-Amino-n-caproic Acid	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim

3.1.4. ZELLINIEN

TABELLE 8: VERWENDETE ZELLINIEN. IM FOLGENEDEDEN WERDEN DIE ZELLINIEN ZUR ÜBERSICHT ABGEKÜRZT.

Zelllinie	Lokalisation	TNM	Grading	Alter	Geschl.
Cal (Cal27)	Zunge	TxNxMx	G3	56	M
HN	Weicher Gaumen	TxNxM1	G2	60	M
UD3 (UD-SCC-3)	LK-Metastase	T2N2cM0	G3	45	M
UD4 (UD-SCC-4)	Zungengrund/Oropharynx	T3N1M0	G2	45	M
UD5 (UD-SCC-5)	Supraglottisch	T1N1M0	G3	44	M
UD7 (UD-SCC-7)	Valleculae	T2N2bM0	Gx	71	M

{Leibniz-Institut, 2011}, {Ballo, 1999}, {Lin, 2007}

3.1.5. MEDIEN UND REAGENZIEN FÜR DIE ZELLKULTUR

Reagenzien für die Zellkultur

Firma und Firmensitz

Accutase	PAA Laboratories, Pasching, Austria
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium	GIBCO, Invitrogen, Darmstadt
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biochrom AG, Berlin
L-Glutamin 200mM	Biochrom AG, Berlin
Penicillin-Streptomycin-Lösung (10000 Units/ml Penicillin und 10000µg/ml Streptomycin)	Biochrom AG, Berlin
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	PAA Laboratories, Pasching, Austria

3.1.6. PUFFER-LÖSUNGEN

TABELLE 9: ZUSAMMENSETZUNG ZELL-LYSE-PUFFER 10X KONZENTRIERT.

Chemikalie	Konzentration
Tris-Cl ph 7,4	20mM
NaCl	150mM
Na ₂ EDTA	1mM
EGTA	1mM
Triton	1%
Na-Phyrophosphat	2,5 mM
β-Glycerolphosphat	1mM
Natriumvenedat	1mM
Leupeptin	1µg/ml
PMSF	1mM

TABELLE 10: ZUSAMMENSETZUNG ANODENPUFFER I.

Reagenz	Volumen	Konzentration
Tris	18,16g	300mM
Methanol p.a	100ml	20%
Aqua dest.	auffüllen	
Volumen	500ml	

TABELLE 11: ZUSAMMENSETZUNG ANODENPUFFER II.

Reagenz	Volumen	Konzentration
Tris	1,51	25mM
Methanol p.a	100ml	20%
Aqua dest.	auffüllen	
Volumen	500ml	

TABELLE 12: ZUSAMMENSETZUNG KATHODENPUFFER.

Reagenz	Volumen	Konzentration
Tris	1,51	25mM
Methanol p.a	100ml	20%
amino-n-caprioic acid	2,62g	40mM
Aqua dest.	auffüllen	
Volumen	500ml	

TABELLE 13: ZUSAMMENSETZUNG ANTIKÖRPER-VERDÜNNUNGS-UND-BLOCKING-PUFFERS.

Reagenz	Volumen	Konzentration
10x TBS	100ml	1x
10% Tween	10ml	0,1%
Magermilchpulver	50g	5%
Aqua dest.	890ml	
Volumen	1000ml	

3.1.7. WACHSTUMSFAKTOREN UND INHIBITOREN

TABELLE 14: VERWENDETE WACHSTUMSFAKTOREN UND INHIBITOREN

Wachstumsfaktor/ Inhibitor	Hersteller	Konzentration
2-(p-hydroxyanilino)-4-(p-chlorophenyl)thiazole (SKI-II)	Merck, Darmstadt	1µM, 2,5µM
Cetuximab	Merck, Darmstadt	0,07µM, 0,14µM
EGF	Biomol, Hamburg	10 ng/ml
Phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA)	Sigma Aldrich, München	300nM

3.1.8. ENZYME

Enzym	Hersteller
Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV)	Invitrogen, Darmstadt
Taq-Polymerase	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen

3.1.9. PRIMER

TABELLE 15: VERWENDETE PRIMER.

Primer	Sequenz (5'→ 3')	Annealing-Temperatur	Länge
SPHK1 for	CCGACGAGGACTTTGTGCTAGT	55°C	550 bp
SPHK1 rev	GCCTGTCCCCCAAAGCATAGC		
S1P-1 for	GCTGTCCACCCACCGGAAGC	58°C	152 bp
S1P-1 rev	ACACCCGACACCACCAGGCT		
S1P-2 for	GGAGTACCTGAACCCCAACA	58°C	407 bp
S1P-2 rev	TGCCATACAGCTTGACCTTG		
S1P-3 for	TGATGTCTGGCAAGAAGACG	58°C	516 bp
S1P-3 rev	AGGCCACATCAATGAGGAAG		
S1P-4 for	CGGCTCATTGTTCTGCACTA	58°C	555 bp
S1P-4 rev	GAAGAGGATGTAGCGCTTGG		
S1P-5 for	ACTCACTTCTGAACCCCATCAT	58°C	303 bp
S1P-5 rev	AGTCTGCAGCCGGTTCTGATAC		
GAPDH for	GCTCCTCCTCAGCGCAAG	58°C	198 bp
GAPDH rev	CATCTGCTGGAAGGTGGACA		

Die Primer für die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), die Sphingosinkinase1 (SphK1) und für den Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor 1 (S1P-1) wurden eigenständig mit der „GenScript Real-time PCR (TaqMan) Primer Design“ Software designt. Die Primer für S1P-2, S1P-3, S1P-4 und S1P-5 wurden aus dem Manuskript von J. Seo et al. übernommen {Seo, 2010}. Alle Primer wurden bei MWG-Eurofins, Ebersberg, bestellt.

3.1.10. PRIMÄR- UND SEKUNDÄRANTIKÖRPER

TABELLE 16: VERWENDETE PRIMÄRANTIKÖRPER.

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
AKT (Rabbit)	New England Biolabs, Frankfurt-Höchst	1:1000 (WB)
E-Cadherin	Enzo Life Sciences, Lörrach	1:200 (IF)
EGFR (Rabbit)	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz California	1:200 (IF) und 1:2500 (WB)
ERK1/2 (Rabbit)	New England Biolabs, Frankfurt-Höchst	1:1000 (WB)
p-AKT Ser473 (Rabbit)	New England Biolabs, Frankfurt-Höchst	1:500 (WB)
p-EGFR Tyr1068 (Rabbit)	New England Biolabs, Frankfurt-Höchst	1:2500 (WB)
p-ERK1/2 Thr202/Tyr204 (Rabbit)	New England Biolabs, Frankfurt-Höchst	1:1000 (WB)
SphK1 (Rabbit)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA	1:200 (IF)
SphK1 (Rabbit)	New England Biolabs, Frankfurt-Höchst	1:1000 (WB)
Tubulin (Mouse)	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim	1:10000 (WB)

TABELLE 17: VERWENDETE SEKUNDÄRANTIKÖRPER.

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Anti-Mouse HRP linked IgG Goat	New England Biolabs, Frankfurt-Höchst	1:2000 (WB)
Anti-Mouse-Cyp3	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers	1:100 (IF)
Anti-Rabbit HRP linked IgG Goat	New England Biolabs, Frankfurt-Höchst	1:2000 (WB)
Anti-Rabbit-FITC	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers	1:100 (IF)

3.1.11. GRÖßENSTANDARDS

Größenstandard	Firma
φX174 DANN/BsuRI (HAE III) Marker. 9	Fermentas, St. Leon-Rot
Page Ruler Prestained Protein Standard	Thermo Fisher Scientific, Schwerte

3.1.12. COMPUTERPROGRAMME

„GenScript Real-time PCR (TaqMan) Primer Design“ Software

Image Lab 4.1

Leica Application Suite LAS V3.7

Photoshop CS5, Adobe

Prism Graph Pad 5.0

Windows Office 2011, Microsoft

3.2. METHODEN

3.2.1 ZELLKULTUR

Alle Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Als Medium wurde Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM) verwendet, welches mit 10% fetalem Kälberserum (FBS), 2mM Glutamin, 100U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin versetzt wurde. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

3.2.1.1. Auftauen von Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurden die sich im Kryoröhrchen befindlichen Zellen im Wasserbad bei 37°C angewärmt. Die angetauten Zellen wurden in ein 15ml Zellkulturröhrchen überführt und mit dem darin vorgelegten angewärmten Medium (10% FBS, 2mM Glutamin, 100µg/ml Streptomycin, 100U/ml Penicillin) vermischt. Anschließend wurde je 1ml der Zellsuspension in eine 10cm Kulturschale mit 7ml Medium überführt und die Zellen über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium gewechselt.

3.2.1.2. Splitten von Zellen

Zellen wurden gesplittet, wenn die jeweiligen Schalen ca. 80% konfluent waren. Hierfür wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gespült und anschließend mit 2ml Accutase benetzt. Nach etwa 10min, wenn die Zellen vollständig abgelöst waren, wurde die Accutase mit 5ml Medium inhibiert. Von der Zellsuspension wurde nach gründlicher Vereinzelung je 1ml auf 10cm Kulturschalen in 7ml Medium ausgesät.

3.2.1.3. Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen mittels Accutase abgelöst und in einem Zellkulturröhrchen zusammengefasst. Die Röhrchen wurden bei 1500rpm 2min zentrifugiert und der Überstand

entfernt. Die Zellen im Pellet wurden mit Freezing Medium (20% FBS + 5% DMSO) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Anschließend wurden die Kryoröhrchen zunächst auf Eis gestellt, anschließend über Nacht auf -20°C abgekühlt und für die Langzeitaufbewahrung bei -80°C gelagert.

3.2.2. BESTRAHLUNG

Die Bestrahlung der Zellen wurde in Kooperation mit der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und radiologische Onkologie der Technischen Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. med. Michael Molls durchgeführt. Als Standardeinstellungen für das Strahlengerät der Firma Gulmay Medical wurde eine Spannung von 70kV, eine Stromstärke von 10mA, eine Tischhöhe von 490mm und der Filter #3 gewählt. Je nach gewünschter Strahlendosis wurde die Bestrahlungsdauer reguliert. Eine Dosis von 2Gy wurde mit 1min 42sec erreicht, eine Dosis von 5Gy mit 4min 17sec und eine Dosis von 8Gy mit 6min 51sec. Nach umfangreichen Vorversuchen wurden Bestrahlungsdosen von 8Gy für die Expressionsanalysen und 5Gy + 8Gy für die Überlebens-, Proliferations- und Migrationsanalysen festgelegt. Die Zellen wurden stets in der Kulturschale mit Medium und Deckel bestrahlt.

3.2.3. EXPRESSIONSANALYSEN AUF GEN-EBENE

3.2.3.1. Semiquantitative RT-PCR

Um den Expressionsstatus der Zelllinien zu eruieren, wurden semiquantitative RT-PCRs {Saiki, 1988} durchgeführt. Von besonderem Interesse waren die SphK1 und die S1P-Rezeptoren 1-5 in Bezug auf eine veränderte Expression nach Bestrahlung (1h und 24h).

3.2.3.1.1. RNA-Isolation

Die RNA-Isolation wurde mit Hilfe des RNeasy-Kits von Qiagen durchgeführt. Von 80% konfluenten Kulturschalen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gespült.

Anschließend wurden die Zellen für 10min mit 500µl Lyse Puffer inkubiert. Nach Überführung in ein 1,5ml Reaktionsgefäß wurden 500µl 70% Ethanol hinzugegeben. Das Lysat wurde durchmischt, auf ein Spin Column gegeben und bei 12000rpm für 15sec zentrifugiert. Im Anschluss wurde die Spin Column für 10min mit RW1 Puffer inkubiert und die Flüssigkeit erneut abzentrifugiert. Die Column wurde zwei Mal mit RPE Puffer versetzt und mit 150µl DPEC 1min inkubiert. Nach Zentrifugation bei 12000rpm wurde die Column verworfen und das Eluat bei -20°C im Gefrierschrank gelagert.

3.2.3.1.2. *cDNA Synthese*

TABELLE 18: RNA-MIX.

Reagenz	Stock-Konzentration	Volumen	Endkonzentration
total RNA	x ng/µl	x µl	500ng
Hexamers	10x	1µl	0,5x
Aqua dest.		x µl	-
Vol.		11µl	-

TABELLE 19: RT-MIX.

Reagenz	Stock-Konzentration	Volumen	Endkonzentration
DTT	100mM	2µl	10mM
Reaktionspuffer	5x	4µl	1x
dNTP's	40mM	0,5µl	1mM
DPEC	-	1,5µl	-
Vol	-	8µl	-

Zunächst wurde die RNA-Konzentration mit Hilfe des PeqLab Nano Drop Gerätes gemessen. Anschließend wurde ein 500ng RNA entsprechendes Volumen auf Eis mit 1µl Hexamers und DPEC auf 11µl aufgefüllt. Der RNA-Mix wurde 10min bei 70°C im Heizblock inkubiert, kurz abzentrifugiert und anschließend auf Eis gestellt. Es wurden 8µl RT-Mix hinzugefügt und die Reaktion 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 1µl M-

MLV (200U/μl) wurde die Reaktion 2h 30min bei 37°C im Heizblock inkubiert und anschließend die Enzyme bei 95°C für 5min abgekocht. Die entstandene cDNA wurde 1:2 mit Aqua dest. verdünnt und bei -20°C im Eisschrank gelagert.

3.2.3.1.3. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

TABELLE 20: PCR-MASTER MIX.

Reagenz	Stock-Konzentration	Reaktionsvolumen	Endkonzentrarion
Buffer	10x	5μl	1x
dNTP's	40mM	1μl	800μM
Enhancer P	5x	10μl	1x
Primer for	20pM	1μl	0,4pM
Primer rev	20pM	1μl	0,4pM
Taq-Polymerase	5U/μl	0,5μl	0,05U/μl
Aqua dest.	-	29,5μl	-

Zunächst wurde der Master Mix für die entsprechende Anzahl an Reaktionen hergestellt und anschließend je 48μl in ein 500μl Reaktionsgefäß gegeben. Von der angetauten, auf Eis stehenden cDNA wurden je 2μl (25ng) zu dem entsprechenden Master Mix hinzugefügt, so dass ein Reaktionsvolumen von 50μl entstand.

Nach umfangreichen Vorversuchen wurde folgendes PCR-Programm für den Bio-Rad Theromcycler festgelegt:

PCR-Programm:

Temperatur	Dauer
95°C	5min
95°C	30sec
Annealing-Temperatur	30sec
72°C	30sec
72°C	7min

Um Unterschiede in Bezug auf das Expressionsverhalten der Zellen möglichst genau ermitteln zu können, wurden in Vorversuchen Kinetiken angefertigt, anhand derer folgende Zykluszahlen für die PCR festgelegt wurden:

TABELLE 21: ANZAHL DER ZYKLEN FÜR DIE ENTSPRECHENDEN GENE IN DER SEMIQUANTITATIVEN RT-PCR.

Gen	Anzahl der Zyklen
SphK1	30
S1P1	28
S1P2-5	35
GAPDH	35

3.2.3.2.4. Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurde ein 2%iges Agarosegel aus 1x TBE-Puffer, Agarose und einem Tropfen Ethidiumbromid (entsprechend $1,25 \times 10^{-3}$ mg) hergestellt. Dieses Gel wurde in eine Laufkammer gelegt und mit Ethidiumbromid versetzten 1x TBE Puffer bedeckt. 10µl des PCR-Amplifikats wurden mit 1µl Ladepuffer versetzt und anschließend in die Taschen des Gels gegeben. Um die Amplifikatlänge überprüfen zu können, wurde in die letzte Tasche des Gels ein Größenstandard gegeben.

Die Laufzeit betrug 45min bei einer Spannung von 90V. Im Anschluss wurde das Gel unter dem Eagle-Eye fotografiert und die entstandenen Bilder eingescannt.

3.2.4. PROLIFERATIONS-/ ÜBERLEBENS-ANALYSEN

3.2.4.1. Crystal-Violett-Assay

Um das Proliferationsverhalten der Zellen zu beurteilen, wurden Crystal-Violett-Assays durchgeführt {Bonnekoh, 1989}. Grundlage für den Crystal-Violett-Assay ist die Unfähigkeit toter Zellen, am Zellkulturmaterial zu haften. Durch mehrfaches Spülen der Platten, wird gewährleistet, dass mit der Crystal-Violett-Lösung nur Zellen angefärbt werden, die zum

Zeitpunkt der Fixation noch vital waren. Demnach lassen sich anhand der optischen Dichte der entstandenen Lösung Rückschlüsse auf das Gesamzellvolumen und somit das Proliferationsverhalten der Zellen ziehen.

Es wurden stets bestrahlte und unbestrahlte Ansätze miteinander verglichen. Behandelt wurden die Zellen mit EGF, PMA, SKI-II und Cetuximab (siehe Tab. 14). EGF wurde als natürliches Stimulanz für den EGFR-Signalweg eingesetzt. Als Stimulanz für den SphK1-Signalweg wurde PMA gewählt. Es handelt sich um einen Phorboldiester, der über eine Aktivierung der PKC die SphK1 aktiviert {Nakade, 2003}. SKI-II wurde zur Hemmung des SphK1-Signalweges eingesetzt. Der EGFR-Signalweg wurde mit Cetuximab inhibiert. Je Behandlung und Bestrahlungsdosis (5Gy und 8Gy) wurden vier Platten angesetzt, um an vier verschiedenen Zeitpunkten (3, 6, 9 und 12 Tage nach Beginn der Behandlung) auswerten zu können.

Für den Crystal-Violett-Assay wurden Zellen von 80% konfluenten Kulturschalen abgelöst und gepoolt. 5×10^3 Zellen wurden pro well in 5ml Medium in einem 6-well ausgesät. Die über Nacht angewachsenen Zellen wurden am nächsten Tag mit den jeweiligen Zytokinen bzw. Inhibitoren behandelt, deren Konzentrationen in umfangreichen Vorversuchen ermittelt wurden. Die Bestrahlung der entsprechenden Ansätze (5Gy und 8Gy) wurde 1h nach Zugabe der Substanzen durchgeführt. Die Ansätze verblieben bei 37°C im Brutschrank und wurden zu den jeweiligen Zeitpunkten wie folgt ausgewertet:

Die Zellen wurden 20min mit 4% Formaldehyd/PBS fixiert und anschließend mit PBS/Triton und Aqua dest. gespült. Danach wurden die Zellen mit 0,04% Crystal-Violett Lösung 20min angefärbt und erneut gespült. Die angefärbten Zellen wurden anschließend mit 2ml 1%iger SDS Lösung 1h auf dem Rüttler lysiert.

Die optische Dichte der Lösung wurde mit Hilfe eines ELISA-Readers nach Übertragung von je 100µl pro well in eine 96-well-Platte ermittelt. Aus jeweils 3 Versuchen wurde der Mittelwert gebildet und mit der jeweiligen Kontrolle verglichen.

3.2.4.2. Colony-Formation-Assay

Zur Bestimmung der Auswirkung auf das klonogene Überleben in Abhängigkeit von verschiedenen Behandlungen wurden Colony-Formation-Assays {Puck, 1956} durchgeführt. Dabei wurden, wie beim Crystal-Violett-Assay, stets bestrahlte und unbestrahlte Ansätze

miteinander verglichen. Behandelt wurden die Zellen ebenfalls mit EGF, PMA, SKI-II und Cetuximab (siehe Tab. 14).

Für den Colony-Formation-Assay wurden Zellen von 80% konfluenten Kulturschalen mittels Accutase abgelöst. Von den gepoolten Zellen wurden je 5×10^2 pro well in 5ml Medium im 6-well ausgesät. Die über Nacht angewachsenen Zellen wurden stimuliert und ca. 1h nach Stimulation bestrahlt. Anschließend verblieben die Zellen 10 Tage im Brutschrank bei 37°C.

Am 10. Tag nach Zugabe der Zytokine bzw. Inhibitoren wurden die Zellen mit PBS gespült und anschließend 20min mit 4% Formaldehyd/PBS fixiert. Die fixierten Zellen wurden wiederum mit PBS gespült und mit 0,04% Crystal-Violett 20min angefärbt. Die angefärbten Kolonien wurden per Hand gezählt. Es wurden stets 3 Versuche angesetzt und aus den jeweiligen Ergebnissen der Mittelwert gebildet.

3.2.5. MIGRATIONSANALYSEN

3.2.5.1. Wound-Healing-Assay

Zur Beurteilung des Migrationsverhaltens der Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Behandlungen wurden Wound-Healing-Assays {Lampugnani, 1999} durchgeführt. Wie in den vorangegangenen Versuchen wurden die Zellen mit EGF, PMA, SKI-II und Cetuximab (siehe Tab. 14) stimuliert und anschließend mit 5Gy bzw. 8Gy bestrahlt.

Zur Vorbereitung wurden die Zellen mittels Accutase abgelöst und gepoolt. Anschließend wurden 5×10^5 Zellen in 2ml Medium pro well im 6-well ausgesät und zwei Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Zur Versuchsdurchführung wurde mit einer Pipettenspitze ein Spalt in den Zellrasen gekratzt und anschließend das entsprechende well mit PBS gespült. Nach Zugabe des mit Stimulanz versetzten Mediums wurden die Zellen bestrahlt und nach 0h und 12h im Phasenkontrast Mikroskop fotografiert. Es wurden je Messung drei Bereiche des Spaltes fotografiert, die Fläche in Pixeln mittels Photoshop ermittelt und die jeweiligen Mittelwerte gebildet.

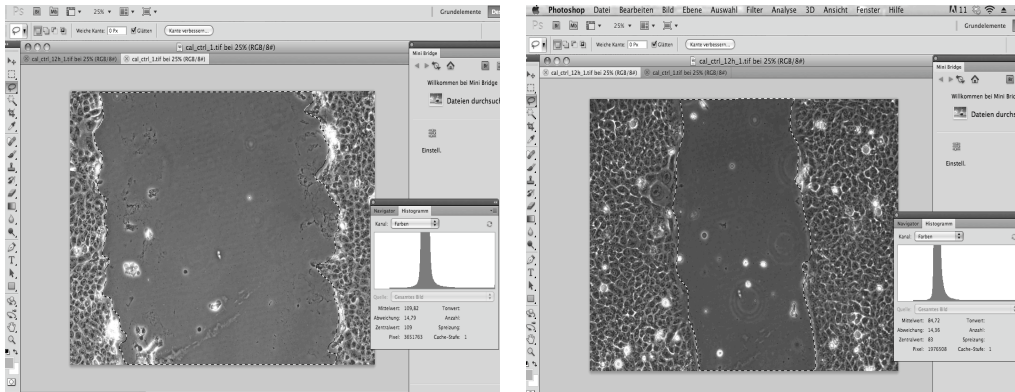


ABBILDUNG 6: VERANSCHAULICHUNG DER AUSWERTUNG DER WOUND-HEALING-ASSAYS AM BEISPIEL DER ZELLINIE CAL. DIE ZELLFREIE FLÄCHE WURDE NACH 12H MIT PHOTOSHOP ANHAND DER PIXELZAHL ERMITTELT UND MIT DEM JEWEILIGEN AUSGANGSWERT VERGlichen.

Zur Datenverarbeitung diente folgende Formel:

$$\frac{T2 - T1}{5038848} \times 100$$

5038848 = Gesamt – Pixelzahl

T1 = 5038848 – 0h Wert

T2 = 5038848 – 12h Wert

Das Ergebnis der Formel zeigt prozentual, inwieweit sich die von Zellen bewachsene Fläche vergrößert hat und gibt somit Auskunft über das Migrationsverhalten der Zellen.

3.2.6. EXPRESSIONSANALYSEN AUF PROTEINEBENE

3.2.6.1. Western Blot-Analysen

Zur näheren Untersuchung des Einflusses auf die Proteinexpression wurden Western Blot- (WB-) Analysen durchgeführt {Renart, 1979}. Augenmerk wurde hier auf EGFR, p-EGFR, AKT, p-AKT, ERK1/2, p-ERK1/2 und SphK1 gelegt. Zur Kontrolle wurde Tubulin markiert. Behandelt wurden die Zelllinien Cal und UD5 mit SKI-II und Cetuximab (siehe Tab. 16 /17).

3.2.6.1.1. Proteinisolierung

Proteine wurden eine Stunde nach Behandlung isoliert. Für die Experimente wurde der Lysepuffer (siehe Tab. 9) auf Eis 1:10 (500µl + 4,5ml) mit entmineralisiertem Wasser verdünnt und mit 50µl 200mM PMSF versetzt (ausreichend für zehn 10cm Kulturschalen). Die Zellen wurden mit PBS gespült, mit 500µl Puffer benetzt, mechanisch vom Zellkulturmaterial abgelöst und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Nach zehnmütiger Inkubation auf Eis wurden die Reaktionsgefäße 15min bei 4°C und 10000rpm zentrifugiert. Auf diese Weise wurden die Membranbestandteile vom Überstand getrennt, welcher im Anschluss in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde und bei -20°C gelagert wurde.

3.2.6.1.2. Bradford-Assay

Der Bradford-Assay dient der quantitativen Proteinbestimmung. Hierfür wird mit Hilfe von Standardlösungen eine Kalibrationskurve erstellt anhand derer die Konzentrationen der Probelösungen bestimmt wird {Bradford, 1976}.

Die Lysate wurden zunächst 1:10 mit PBS verdünnt. Von dieser Lösung wurden 20µl mit 180µl 1x PBS und 200µl 0,01% Triton X-100 gemischt. Die Standardlösungen wurden aus 0,2mg/ml Bovine Serum Albumin und 0,01% Triton X-100 hergestellt. Alle Lösungen wurden mit 600µl 1:4 verdünnter Bradford Reagenz versetzt und in ein 96-well umpipettiert. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die photometrische Messung bei einer Extinktion von 595nm. Anhand der mit den Standardlösungen hergestellten Kalibrationskurve wurden die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben errechnet.

3.2.6.1.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden verschieden Gele benötigt, deren Zusammensetzung in den nachstehenden Tabellen erläutert wird:

TABELLE 22: ZUSAMMENSETZUNGEN DER TRENNGELE.

Geldichte	7,5%	10%	12,5%
Aqua. dest.	5,72ml	6,64ml	4ml
Acrylamid	5,08ml	5,32ml	8,4ml
1M Tris ph8,8	7,48ml	4ml	7,48ml
20% SDS	100µl	100µl	100µl
10% APS	100µl	100µl	100µl
TEMED	25µl	25µl	25µl

TABELLE 23: ZUSAMMENSETZUNG DES SAMMELGELS.

Geldichte	5%
Aqua dest.	7ml
Acrylamid	1,672ml
1M Tris ph8,8	1,252ml
20% SDS	50µl
10% APS	100µl
TEMED	25µl

Zunächst wurde die Gelkammer zu 2/3 mit Trenngel (Tab. 22) (Dichte abhängig vom jeweiligen Protein) aufgefüllt und mit Aqua dest. überschichtet. Nach 45min war das Gel polymerisiert und das Aqua dest. wurde durch Sammelgel (Tab. 23) ersetzt. Nach einer Polymerisationsdauer von 15min wurden die Gele mit den jeweiligen Proben beladen. Hierfür wurden 10µg Protein pro Probe mit 5x Sample Puffer gemischt und 5min bei 98°C im Thermomixer denaturiert. Nach Abzentrifugation wurde der gesamte Probensatz auf das Gel übertragen. Zur Überprüfung der Proteingröße lief in der letzten Tasche ein Größenmarker mit. Die Laufzeit betrug je nach Proteingröße 2 bis 3 Stunden bei einer Spannung von 90 - 120 Volt.

3.2.6.1.4. Semi-dry Blot

Im Semi-dry Blot werden die in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Hierfür wurde die Nitrozellulosemembran mit Methanol und Anodenpuffer II (siehe Tab. 11) vorbehandelt. Whatman-Filterpapier wurde in Anodenpuffer I (siehe Tab. 10), Anodenpuffer II und Kathoden Puffer (siehe Tab. 12) inkubiert. Anschließend wurden die Bestandteile wie folgt geschichtet: 6x Whatman-Filterpapier in Anodenpuffer I, 3x Whatman-Filterpapier in Anodenpuffer II, Nitrozellulosemembran, Gel, 9x Whatman-Filterpapier in Kathodenpuffer. Der Transfer erfolgte 1 Stunde 20 Minuten bei 0,25A.

3.2.6.1.5. Immundetektion

In der Immundetektion werden die Proteinbanden mit spezifischen Antikörpern dargestellt. Hierfür wurden die Membranen über Nacht mit einem Antikörper-Verdünnungs-und-Blocking-Puffer auf einem Rollenmischer bei 4°C inkubiert. Die verwendeten Antikörper mit Verdünnung und Herkunft sind in Tabelle 17 dargestellt.

Am folgenden Tag wurden die Membranen in 1x TTBS gewaschen und für eine Stunde bei 4°C auf dem Rollenmischer mit dem Sekundärantikörper inkubiert (ebenfalls in Antikörper-Verdünnungs-und-Blocking-Puffer verdünnt). Die Membranen wurden erneut gründlich gespült und für eine Minute in ECL-Lösung inkubiert. Auf diese Weise wurden die Peroxidase-gekoppelten Proteine markiert und anschließend mit Hilfe des BioRad Chemi Doc. aufgenommen und mit der Image Lab Software 4.1 nachbearbeitet.

3.2.6.2. Immunfluoreszenz

Zur Darstellung der Proteine (Menge und Lokalisation), wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt {Coons, 1942}. Augenmerk wurde hier auf den EGFR, die SphK1 und auf E-Cadherin gelegt.

Für die Immunfluoreszenz (IF) wurden Objektträger zur Sterilisation zunächst UV-behandelt und anschließend mit 0,5% Gelatine beschichtet. Zellen wurden mittels Accutase abgelöst und gepoolt. Je Objektträger wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen in 6ml Medium ausgesät und 48h im

Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Tumorzellen wurden mit EGF, PMA, Cetuximab und SKI-II (siehe Tab. 14) behandelt und ggf. eine Stunde später mit 8Gy bestrahlt. Nach erneuter Inkubation für 24h im Brutschrank wurden die Zellen mit 4% Formaldehyd/PBS fixiert und mit PBS auf dem Rüttler gespült.

Für die Färbung wurden die Objektträger (OT) 10min in 0,25% Triton X-100/PBS inkubiert, um die Membranen zu permeabilisieren. Die OT wurden in PBS gespült und anschließend weitere 10min in 50mM NH₄Cl Lösung inkubiert, um etwaige bei der Fixierung entstandene Hydroxylgruppen zu spalten. Nach wiederholtem Spülen wurden die OT für 30min in einer feuchten Kammer mit 5%igem Ziegenserum blockiert. Nach der Blockierung wurden die OT über Nacht bei 4°C mit dem jeweiligen Primärantikörper (siehe Tab. 16) in einer feuchten Kammer inkubiert. Am Folgetag wurden die OT in PBS gespült und für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Lichtschutz mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (siehe Tab. 17) benetzt. Nach erneutem Spülen in PBS wurde für 5min eine Kernfärbung mit Hoechst 33341-Farbstoff durchgeführt und die OT mit Vectashield-Mountain-Medium eingedeckelt.

Die Auswertung erfolgte unter einem Fluoreszenzmikroskop der Firma Leica mittels der LAS-Software.

3.2.7. STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe der Prism Graph Pad 5.0 Software durchgeführt. Unter der Annahme einer Normalverteilung wurde ein gepaarter t-Test mit 95% Konfidenzintervall durchgeführt. Der entstehende p-Wert lässt Rückschlüsse auf das Signifikanzniveau zu.

TABELLE 24: DEFINITION DER SIGNIFIKANZNIVEAUS.

Signifikanzniveau	Darstellung
$p \leq 0,05$	* (signifikant)
$p \leq 0,01$	** (sehr signifikant)
$p \leq 0,001$	*** (höchst signifikant)

4. ERGEBNISSE

4.1. EXPRESSIONSVERHALTEN DER SPHK1 UND DER S1P-REZEPTOREN AUF GEN-EBENE

Bevor die Rolle der SphK1 näher erörtert wurde, wurde zunächst die mRNA-Expression der SphK1 und der S1P-Rezeptoren in den Zelllinien mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht. Von besonderem Interesse dabei war, welchen Einfluss eine Strahlentherapie auf das Expressionsverhalten der Gene hat. Dafür wurden die Zellen zunächst mit 8Gy bestrahlt. Nach 1h und nach 24h wurde aus den Zellen mRNA isoliert und die RT-PCR durchgeführt.

SphK1 wird in allen untersuchten Zelllinien in unterschiedlichem Ausmaß exprimiert. In unbestrahltem Zustand finden sich die höchsten Expressionslevel in den Zelllinien UD3, UD4 und UD7, die niedrigsten in Cal und UD5. Auch in Bezug auf das Verhalten nach Bestrahlung finden sich Unterschiede: Cal und HN regulieren SphK1 kurzfristig hoch, langfristig jedoch regulieren sie die Expression im Vergleich zum Ausgangswert leicht herunter. UD3 und UD4 regulieren invers dazu: kurzfristig herunter und langfristig etwas hoch bzw. auf den Ausgangswert zurück (UD3). UD5 und UD7 regulieren SphK1 sowohl kurzfristig, als auch langfristig herunter, wobei die Expression auf RNA-Ebene bei UD5 24h nach Bestrahlung nahezu völlig erliegt.

S1P-1 wird bei UD3, UD4 und UD5 überhaupt nicht exprimiert. Bei Cal und HN geht die Expression zunächst hoch, langfristig jedoch runter. Bei UD7 geht die Expression sowohl kurz- als auch langfristig runter.

S1P-2 wird bei UD3, UD4 und UD5 erst nach Bestrahlung exprimiert. Bei HN wird S1P-2 24h nach Bestrahlung stark hochreguliert. Bei Cal und UD7 geht die Expression kurzfristig runter und langfristig wieder hoch, wobei S1P-2 bei UD7 deutlich stärker exprimiert wird als bei Cal.

Bei UD3 und UD5 wird S1P-3 kurz und langfristig hochreguliert. Bei Cal geht die Expression langfristig etwas hoch. HN zeigt nur ein relativ geringes mRNA-Level, das auch unter Bestrahlung weitestgehend konstant bleibt. UD4 exprimiert diesen Rezeptor in unbestrahltem Zustand nicht, wohl aber eine Stunde nach Strahlenexposition. UD7 zeigt eine relativ konstante Expression, die jedoch eine Stunde nach Bestrahlung etwas ansteigt.

S1P-4 wird in keiner der Zelllinien exprimiert. S1P-5 wird nur in UD5 24h nach Bestrahlung massiv exprimiert.

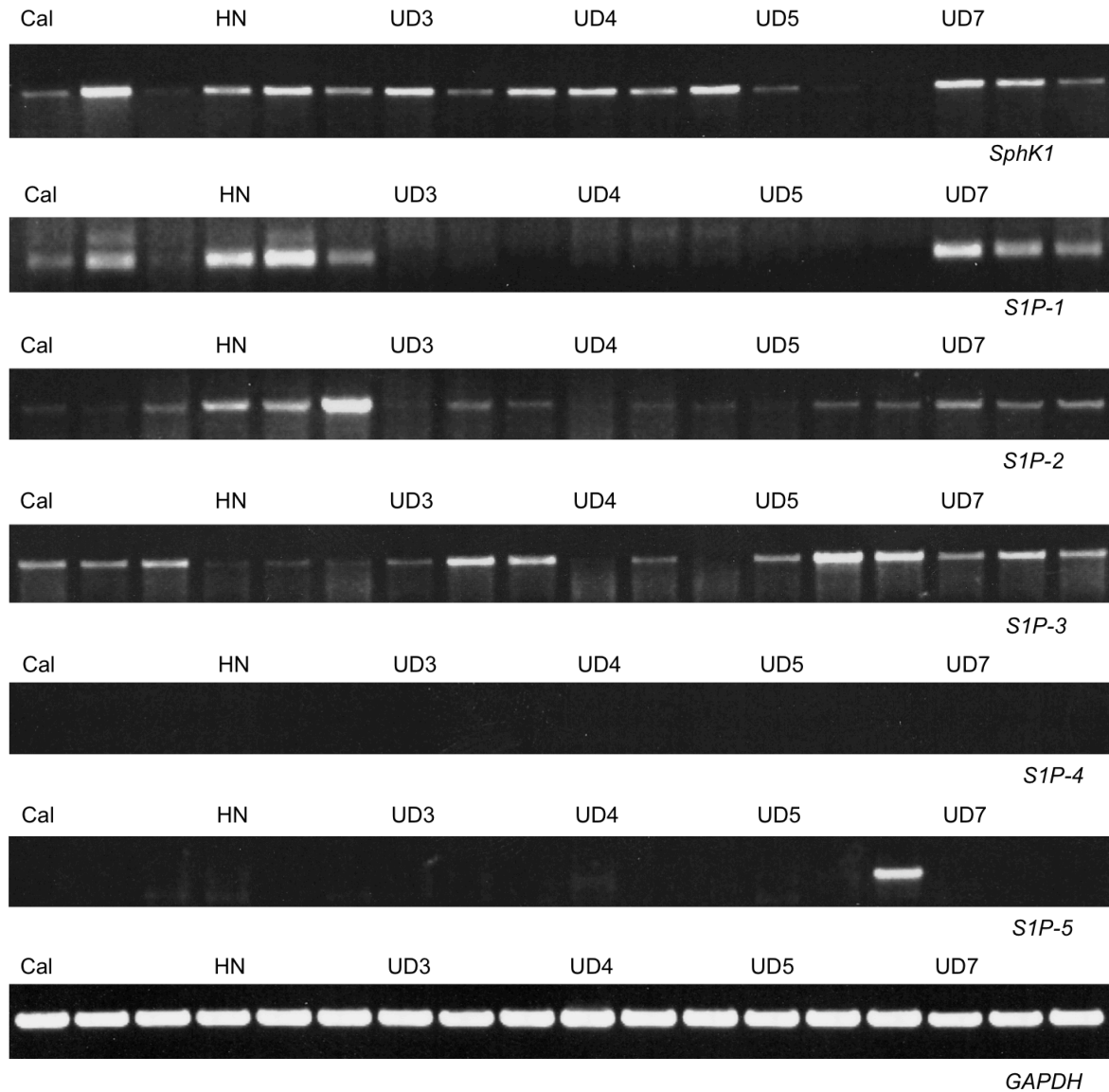


ABBILDUNG 7: ERGEBNISSE DER SEMIQUANTITATIVEN RT-PCR. JE ZELLINIE SIND DREI BANDEN ZU SEHEN: DIE ERSTE ZEIGT DIE mRNA-EXPRESSION DER UNBESTRAHLTEN KONTROLLE, DIE ZWEITE ZEIGT DIE mRNA-EXPRESSION 1H NACH 8GY BESTRAHLUNG, DIE DRITTE ZEIGT DIE mRNA-EXPRESSION 24H NACH 8GY BESTRAHLUNG. ALS HOUSEKEEPING-GEN WURDE DIE GAPDH AUFGETRAGEN. DETAILS SIEHE TEXT.

4.2. CRYSTAL-VIOLETT-ASSAY

Um Aussagen über das Wachstum von Tumoren treffen zu können, wurden Proliferationsanalysen in Form von Crystal-Violett-Assays durchgeführt.

4.2.1. EINFLUSS VON IONISIERENDER STRAHLUNG AUF DIE PROLIFERATION

Im Crystal-Violett-Assay reagierten alle Zelllinien mit einem Rückgang der Proliferation auf die Bestrahlung. Die deutlichsten Ergebnisse wurden bei HN, UD3 und UD4 erzielt mit Rückgängen der Proliferation um ca. 70% ($p < 0,0001$) bei 5Gy und ca. 85% ($p < 0,0001$) bei 8Gy. Cal und UD7 reagierten etwas schlechter. Bei Cal kam es zu einem Rückgang der Proliferation um 54,8% ($p = 0,0008$) bzw. 75,2% ($p = 0,0002$), bei UD7 zu einem Rückgang um 50,3% ($p = 0,0002$) bzw. 70,5% ($p < 0,0001$). UD5 bildete mit einem Rückgang der Proliferation um 29,8% ($p = 0,0028$) nach 5Gy und 51,8% ($p = 0,0012$) nach 8Gy Bestrahlung das Schlusslicht.

TABELLE 25: EINFLUSS VON IONISIERENDER STRAHLUNG AUF DAS PROLIFERATIONSVERHALTEN DER ZELLLINIEN. GEZEIGT IST JEWEILS DER PROZENTUALE WERT IM VERGLEICH ZUR KONTROLLE. DIE BESTRAHLUNG FÜHRTE IN ALLEN UNTERSUCHTEN ZELLLINIEN ZU EINEM DOSISABHÄNGIGEN RÜCKGANG DER PROLIFERATION.

Zelllinie	Ctrl	5Gy	8Gy
Cal	100	45,2 (***)	24,8 (***)
HN	100	29,9 (***)	16,9 (***)
UD3	100	30,3 (***)	16,9 (***)
UD4	100	29,1 (***)	16,3 (***)
UD5	100	70,2 (**)	48,2 (**)
UD7	100	49,7 (***)	29,5 (***)

4.2.2. EINFLUSS VON EGF AUF DIE PROLIFERATION

Auf die meisten Zelllinien hatte EGF einen antiproliferativen Effekt. Bei UD7 führte EGF zu einer Zunahme der Proliferation. Dieser Effekt schmälerte sich nach Bestrahlung.

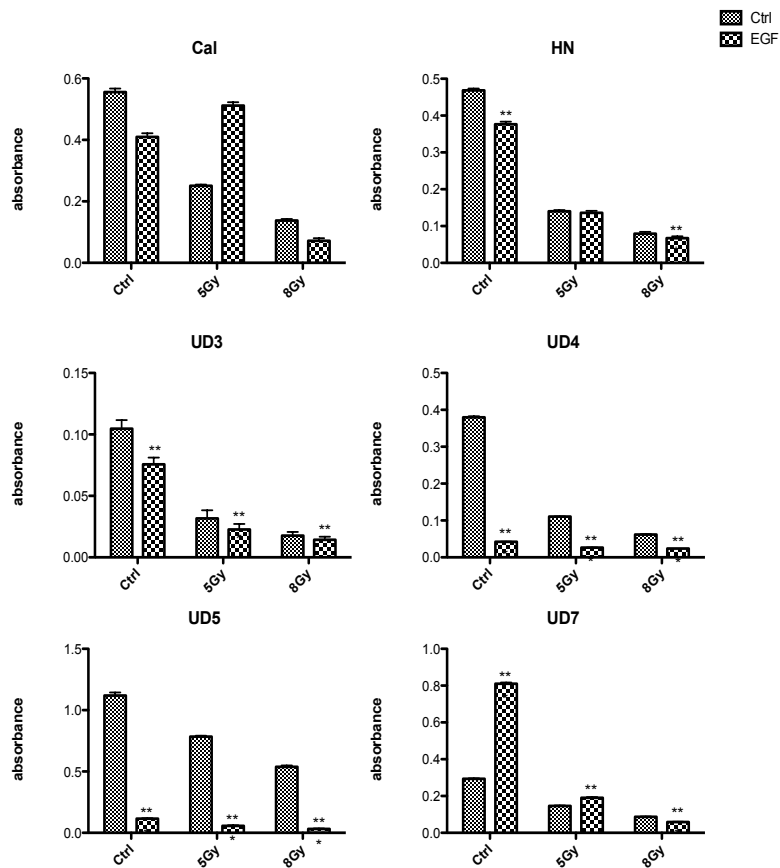


ABBILDUNG 8: EINFLUSS VON EGF AUF DAS ÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VON IONISIERENDER STRAHLUNG. MIT AUSNAHME VON UD7 REAGIERTEN ALLE ZELLINIEN MIT EINEM RÜCKGANG DER PROLIFERATION AUF DIE EGF-STIMULATION.

4.2.3. EINFLUSS VON PMA AUF DIE PROLIFERATION

Auf die Stimulation reagierten die Zelllinien Cal, HN, UD3 und UD7 mit einem Rückgang der Proliferation. Bei den Zelllinien UD4 und UD5 hingegen hatte PMA einen proliferativen Effekt. Bei der Zelllinie UD5 hatte sich dieser Effekt sowohl in der Kontrolle als auch in beiden Bestrahlungsdosen gezeigt, wobei nach 8Gy Bestrahlung keine Signifikanz nachgewiesen werden konnte ($p = 0,2005$). Bei der Zelllinie UD4 hatte sich nur nach Bestrahlung ein leicht proliferativer Effekt von PMA gezeigt (Abb. 9).

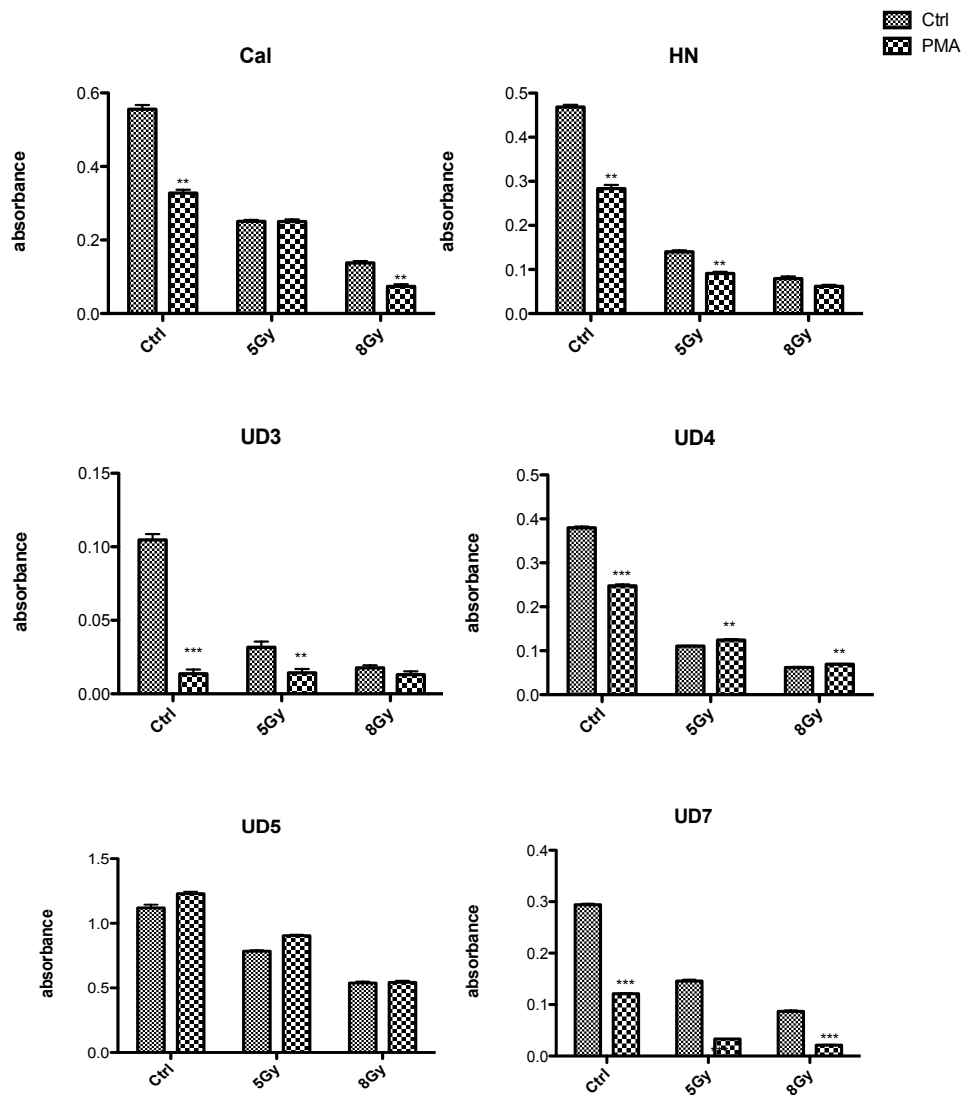


ABBILDUNG 9: EINFLUSS VON PMA AUF DIE PROLIFERATION. DIE ZELLINIEN CAL, HN, UD3 UND UD7 REAGIEREN BEI JEDER STRAHLENDOSIS MIT EINEM RÜCKGANG DER PROLIFERATION AUF DIE PMA-STIMULATION. BEI UD4 UND UD5 KAM ES DURCH DIE PMA-STIMULATION MIT AUSNAHME VOM UNBESTRAHLTEN ANSATZ DER ZELLINIE UD4 ZU EINEM PROLIFERATIONSSCHUB: UD4: CTRL: $P = 0,0001$, 5GY: $P = 0,0038$, 8GY: $P = 0,0071$ UD5: CTRL: $P = 0,0206$, 5GY: $P = 0,0010$, 8GY: $P = 0,2005$. DIE SIGNIFIKANZ BEZIEHT SICH JEWEILS AUF DEN UNBEHANDELTEN WERT DERSELBEN STRAHLENDOSIS.

4.2.4. EINFLUSS VON SKI-II AUF DIE PROLIFERATION

In Bezug auf den Einfluss des Inhibitors ließen sich drei Gruppen unterscheiden: UD3, UD4, und UD5 sprachen gut auf die niedrige Konzentration ($1\mu\text{M}$) des Inhibitors an, bei HN und

UD7 war die hohe Konzentration (2,5µM) des Inhibitors nötig, um die Proliferation signifikant zu hemmen (der Proliferationsrückgang bei UD7 war zwar in der niedrigen Konzentration signifikant ($p = 0,0309$) aber mit nicht einmal 6% eher unbedeutend) und bei Cal ließ sich gar keine Proliferationshemmung durch SKI-II erzielen. Bei der Zelllinie Cal war durch den Inhibitor sogar ein leichter Proliferationsschub zu verzeichnen. Bei der Zelllinie HN konnte die Proliferation durch die niedrige Dosis leicht gehemmt werden. Mit der hohen Dosis des Inhibitors konnten jedoch gute Ergebnisse in Bezug auf den Rückgang der Proliferation gezeigt werden ($p = 0,0003$). Durch eine zusätzliche Bestrahlung konnte der Effekt noch weiter ausgebaut werden.

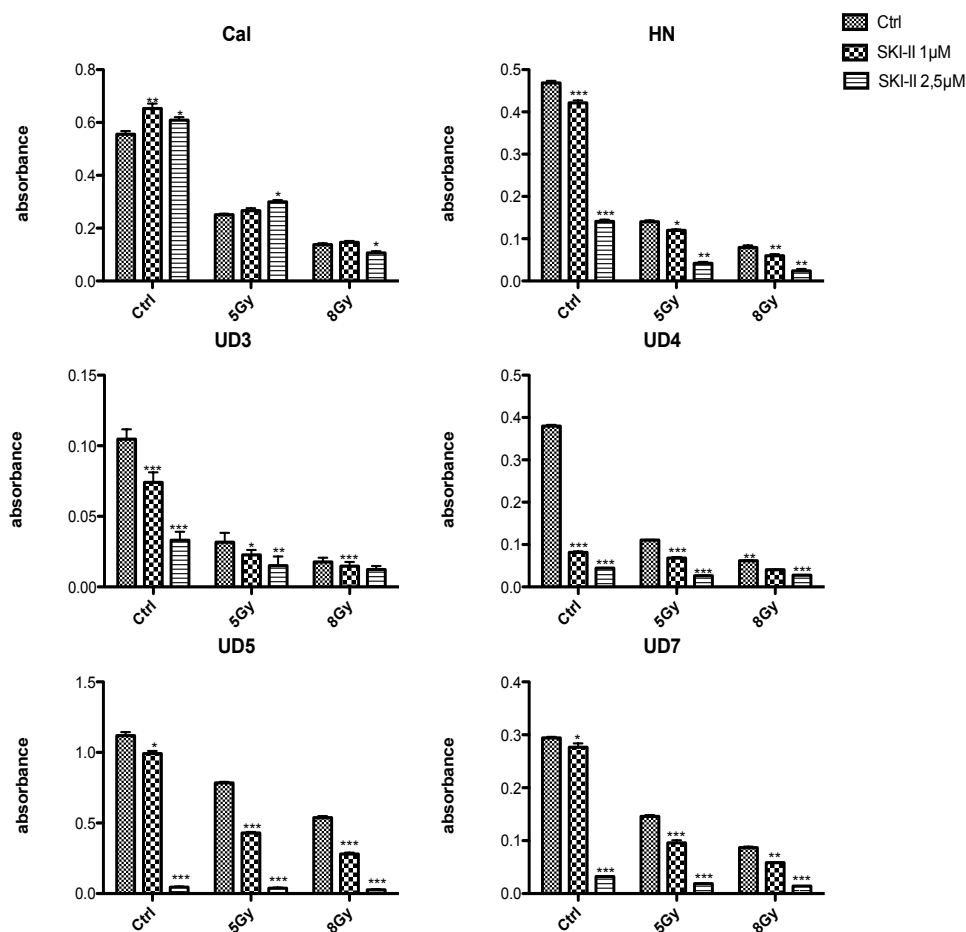


ABBILDUNG 10: EINFLUSS VON SKI-II IN ZWEI VERSCHIEDENEN KONZENTRATIONEN AUF DIE PROLIFERATION DER ZELLINIEN IN ABHÄNGIGKEIT VON 5GY UND 8GY BESTRAHLUNG. DIE ZELLINIEN SPRACHEN UNTERSCHIEDLICH GUT AUF SKI-II AN. UD3, UD4 UND UD5 REAGIEREN BEREITS AUF DIE NIEDRIGE DOSIERUNG, BEI HN UND UD7 WAR DIE HOHE DOSIS NÖTIG UND CAL WAR GÄNZLICH RESISTENT GEGENÜBER SKI-II. DETAILS SIEHE TEXT. DIE ANGABE DES SIGNIFIKANZNIVEAUS BEZIEHT SICH JEWEILS AUF DEN UNBEHANDELTEN WERT DERSELBEN STRAHLENDOSIS.

Bei der Zelllinie UD5 verbesserte eine Kombination aus Bestrahlung und SKI-II (in der niedrigen Dosierung) den Effekt des Inhibitors. Unbestrahlt wurde die Proliferation durch den Inhibitor um 11,3% ($p = 0,0001$) gehemmt. Durch eine SKI-II Behandlung vor einer Strahlendosis von 5Gy konnte die Proliferation um 45,3% ($p = 0,0144$) zusätzlich zu dem Bestrahlungseffekt gehemmt werden. Durch die hohe Dosis des Inhibitors, kam die Proliferation von UD5 nahezu vollständig zum Erliegen.

4.2.5. EINFLUSS VON CETUXIMAB AUF DIE PROLIFERATION

Cetuximab wirkte auf alle Zelllinien bei jeder Strahlendosis signifikant antiproliferativ.

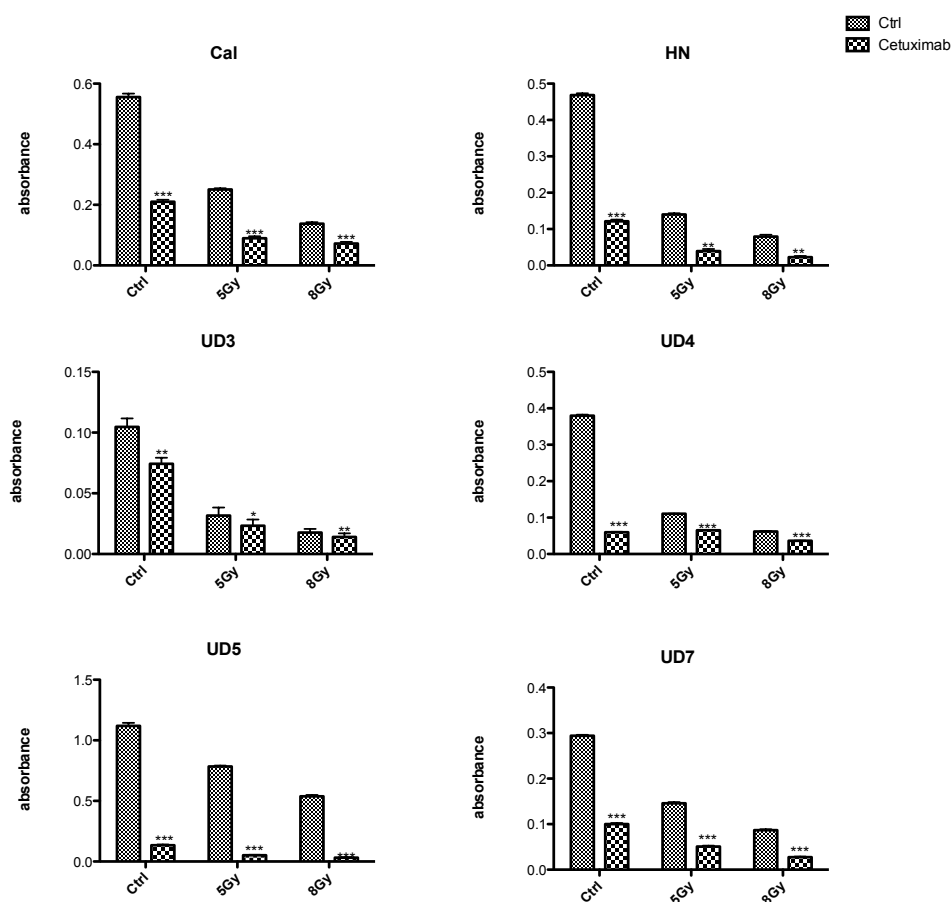


ABBILDUNG 11: EINFLUSS VON CETUXIMAB AUF DIE PROLIFERATION IN ABHÄNGIGKEIT VON IONISIERENDER STRAHLUNG. CETUXIMAB WIRKTE BEI ALLEN ZELLINIEN UNABHÄNGIG VON DER STRAHLENDOSIS ANTIPROLIFERATIV. DIE ANGABE DES SIGNIFIKANZNIVEAUS BEZIEHT SICH JEWEILS AUF DEN UNBEHANDELTEN WERT DERSELBEN STRAHLENDOSIS.

4.2.6. VERGLEICH VON CETUXIMAB UND SKI-II IN BEZUG AUF DIE PROLIFERATION

Cetuximab führte im Vergleich zur niedrigen Dosis des Inhibitors bei fast allen Zelllinien zu einer besseren Proliferationshemmung. Nur bei UD3 waren die Ergebnisse vergleichbar. Ein anderes Bild zeigte sich bei der hohen Dosis des SphK1-Inhibitors: Die Zelllinien UD3, UD4, UD5 und UD7 reagierten besser auf den Inhibitor als auf Cetuximab. Bei HN konnten ähnliche Ergebnisse mit dem Inhibitor wie mit Cetuximab erzielt werden und Cal reagierte überhaupt nicht auf den Inhibitor, wohl aber auf Cetuximab.

Eine zusätzliche Bestrahlung beeinflusste diese Verhältnisse nicht.

TABELLE 26: VERGLEICH DER WIRKSAMKEIT VON CETUXIMAB UND SKI-II IN BEZUG AUF DAS PROLIFERATIONSVERHALTEN. DIE NIEDRIGE DOSIERUNG VON SKI-II WAR DER CETUXIMAB-BEHANDLUNG UNTERLEGEN. IN DER HOHEN DOSIERUNG KONNTEN MIT AUSNAHME VON CAL UND HN MIT DEM INHIBITOR BESSERE ERGEBNISSE ERZIELT WERDEN ALS MIT CETUXIMAB.

Zelllinie	Cet vs. SKI-II (1 μ M)	Cet vs. SKI-II (2,5 μ M)
Cal	Cet > SKI-II (**)	Cet > SKI-II (***)
HN	Cet > SKI-II (***)	Cet = SKI-II (n.s.)
UD3	Cet = SKI-II (n.s.)	Cet < SKI-II (***)
UD4	Cet > SKI-II (**)	Cet < SKI-II (**)
UD5	Cet > SKI-II (***)	Cet < SKI-II (**)
UD7	Cet > SKI-II (***)	Cet < SKI-II (***)

4.3. COLONY-FORMATION-ASSAY

Anhand von Colony-Formation-Assays lässt sich das klonogene Überleben bestimmen und so die Effizienz verschiedener Therapiemodalitäten bestimmen.

4.3.1. EINFLUSS VON IONISIERENDER STRAHLUNG AUF DAS KLONOGENE ÜBERLEBEN

Um das Ansprechen der Zelllinien auf Bestrahlung zu beurteilen, wurden die Zellen mit 5Gy und 8Gy bestrahlt und mit der unbestrahlten Kontrolle verglichen. Die verschiedenen Zelllinien sprachen unterschiedlich gut auf die eingesetzten Strahlendosen an. Am besten reagierte die Zelllinie UD3. Die Kolonienanzahl nahm nach einer Bestrahlung mit 5Gy um 45,8% ab ($p = 0,0076$). Nach einer Dosis von 8Gy nahm die Kolonienzahl um 79,2% ab ($p < 0,0001$). Im Gegensatz hierzu zeigte sich bei UD5 eine Strahlenresistenz. Nach einer Strahlendosis von 5Gy gab es keinen signifikanten Rückgang der Kolonienzahlen ($p = 0,1685$), erst nach einer Strahlendosis von 8Gy gingen die Kolonienzahlen um 31,6% zurück ($p = 0,0014$). Ebenfalls schlecht sprach UD4 an, die Kolonienzahlen sanken hier nach 5Gy um 17,3% ($p = 0,0434$) und nach 8Gy um 21,4% ($p = 0,0094$).

Cal und HN zeigten sich bereits bei einer Strahlendosis von 5Gy sensibel. Bei Cal gingen die Kolonienzahlen nach 5Gy Bestrahlung um 26,5% ($p = 0,0050$) und nach 8Gy um 46,7% ($p = 0,0004$) zurück. Bei HN gingen die Zahlen bereits nach 5Gy um 37,8% ($p < 0,0001$) zurück. Nach 8Gy konnte dieser Effekt um 5,7% auf 43,5% ($p < 0,0001$) gesteigert werden.

UD7 verhielt sich ähnlich wie Cal. Auch hier konnte ein zur steigenden Strahlendosis linearer Rückgang der Kolonienzahlen beobachtet werden, das Gesamtüberleben der Klone war jedoch höher als bei Cal. Die Kolonien reduzierten sich um 22,7% ($p = 0,0084$) und um 35,5% ($p = 0,0106$) (Abb.12)

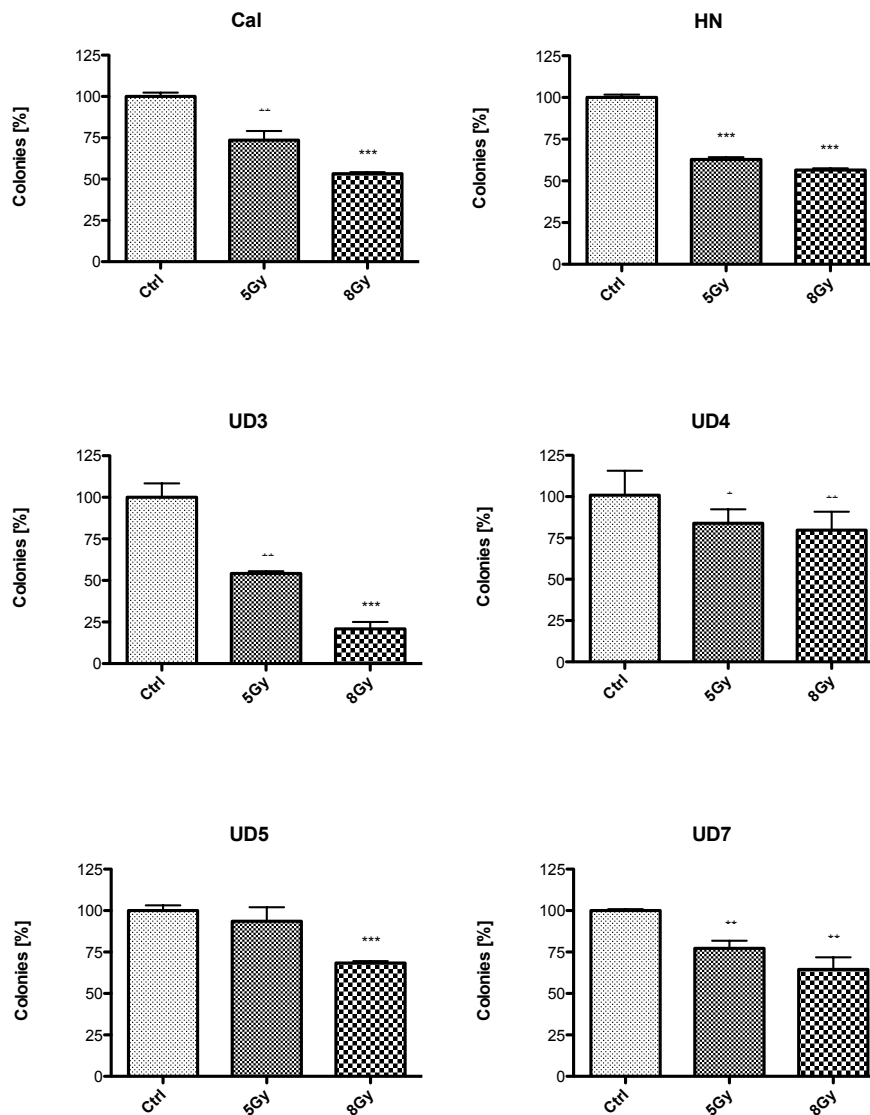


ABBILDUNG 12: EINFLUSS VON IONISIERENDER STRAHLUNG AUF DAS KLONOGENE ÜBERLEBEN. DIE BESTRAHLUNG FÜHRTE IN ALLEN ZELLLINIEN ZU EINEM RÜCKGANG DES KLONOGENEN ÜBERLEBENS. BEI UD5 WAR EINE DOSIS VON 8GY NÖTIG UM DAS ÜBERLEBEN SIGNIFIKANT ZU REDUZIEREN. BEI DER ZELLLINIE UD4 KONNTE SELBST MIT EINER DOSIS VON 8GY NUR EIN RÜCKGANG DES KLONOGENEN ÜBERLEBENS VON 21% ($P = 0,0094$) ERZIELT WERDEN. DETAILS SIEHE TEXT.

4.3.2. EINFLUSS VON EGF AUF DAS KLONOGENE ÜBERLEBEN

EGF führte bei allen Zelllinien zu einem Rückgang des klonogenen Überlebens. Signifikanzen konnten bei Cal, UD3, UD5 und UD7 nachgewiesen werden (Abb.13).

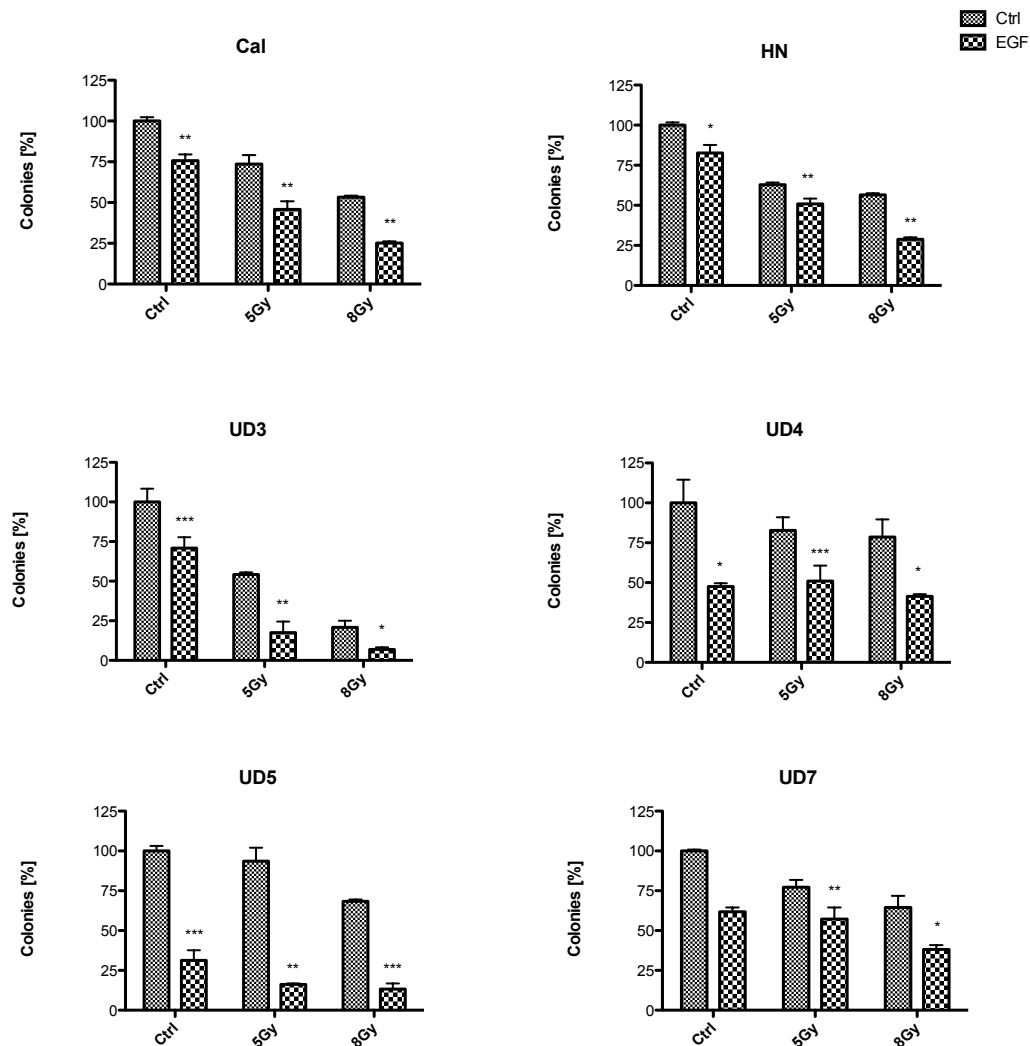


ABBILDUNG 13: EINFLUSS VON EGF AUF DAS KLONOGEN ÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VON IONISIERENDER STRAHLUNG. EGF-STIMULATION FÜHRTE BEI ALLEN ZELLINIEN ZU EINEM RÜCKGANG DES KLONOGENEN ÜBERLEBENS. SIGNIFIKANZEN KONNTEN BEI CAL, UD3, UD5 UND UD7 NACHGEWIESEN WERDEN. DIE ANGABE DES SIGNIFIKANZNIVEAUS BEZIEHT SICH JEWEILS AUF DEN UNBEHANDELTEN WERT DERSELBEN STRAHLENDOSIS.

4.3.3. EINFLUSS VON PMA AUF DAS KLONOGENE ÜBERLEBEN

PMA führte bei den Zelllinien Cal, HN, UD3 und UD7 zu einem Rückgang des klonogenen Überlebens, wobei der Effekt mit Ausnahme der Zelllinie UD3 eher schwach ausfiel. Bei UD4 und UD5 gab es kaum signifikante Ergebnisse.

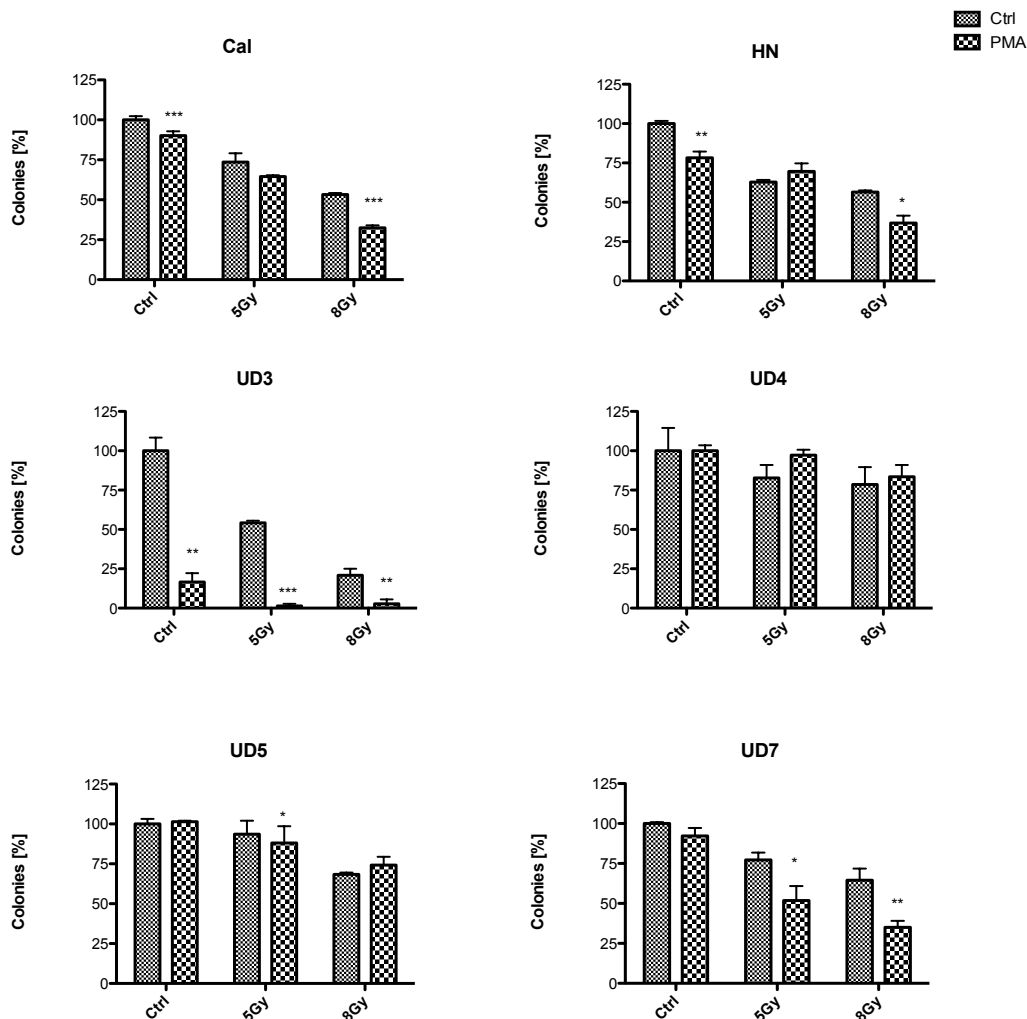


ABBILDUNG 14: EINFLUSS VON PMA AUF DAS KLONOGENE ÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VON IONISIERENDER STRAHLUNG. MIT AUSNAHME VON UD4 UND UD5 VERRINGERTE DIE PMA-STIMULATION DAS KLONOGENE ÜBERLEBEN DER ZELLINIEN. DAS SIGNIFIKANZNIVEAU BEZIEHT SICH JEWEILS AUF DEN UNBEHANDELTEN WERT DERSELBEN STRAHLENDOSIS.

4.3.4. EINFLUSS VON SKI-II AUF DAS KLONOGENE ÜBERLEBEN

Die Zelllinien sprachen unterschiedlich gut auf den Inhibitor an. In der niedrigen Dosierung sprach UD3 am besten an. Es kam zu einem Rückgang der Kolonienzahlen um 41,7% ($p =$

0,0029). Darauf folgten UD5 mit 36,5% ($p = 0,0059$) und UD4 mit 24,8% ($p = 0,0385$). Bei der hohen Dosis konnten diese Effekte weiter ausgebaut werden auf 74,6% bei UD3 ($p = 0,0005$), 64,6% bei UD5 ($p = 0,0003$) und 49% bei UD4 ($p = 0,0075$). UD7 sprach in der niedrigen Dosierung nicht auf den Inhibitor an, bei der hohen Dosis kam es zu einem Rückgang der Kolonienzahlen um 60,4% ($p = 0,0007$). Die Zelllinien Cal und HN reagierten kaum auf den Inhibitor.

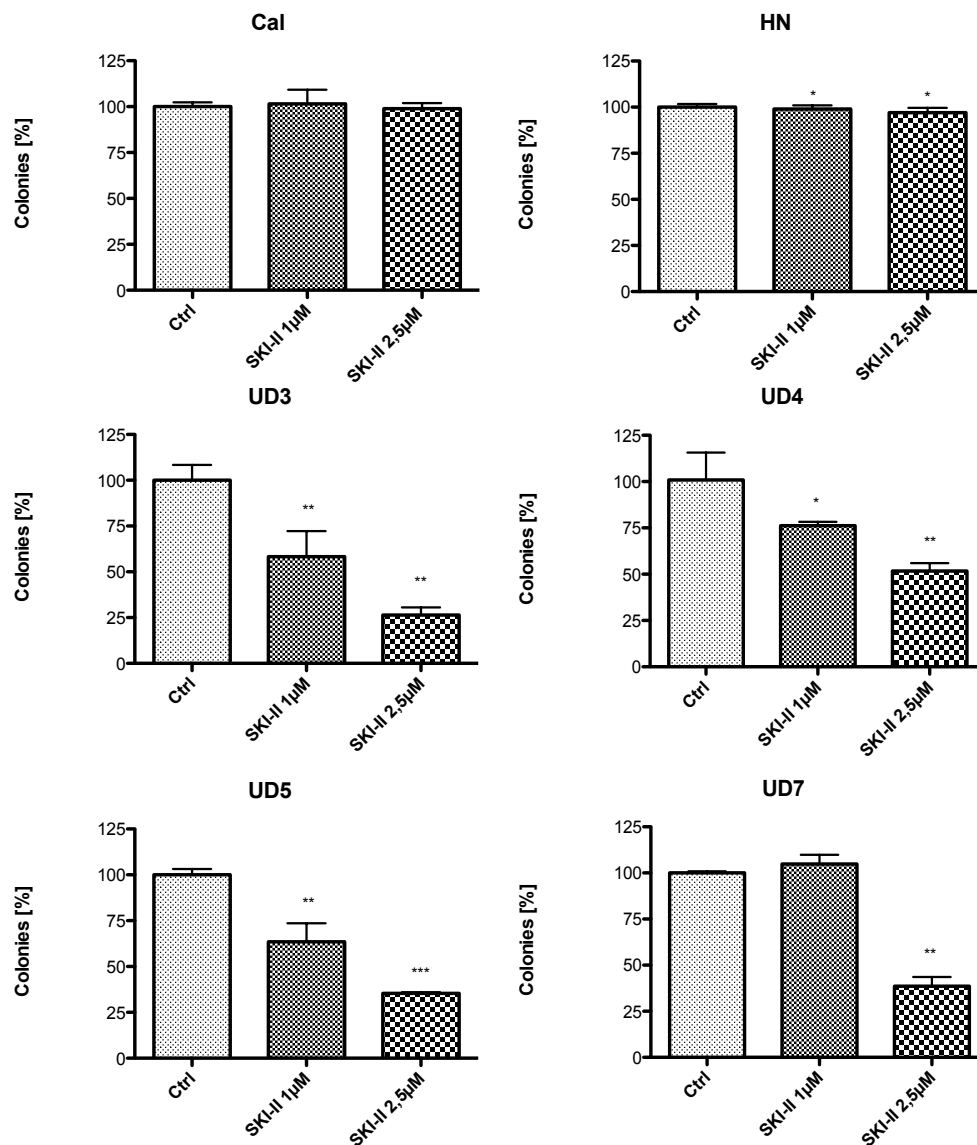


ABBILDUNG 15: EINFLUSS VON SKI-II AUF DAS KLONOGENE ÜBERLEBEN. CAL UND HN ZEIGTEN EINE RESISTENZ GEGENÜBER DEM INHIBITOR. BEI DER ZELLLINIE UD7 WAR EINE KONZENTRATION VON 2,5µM NÖTIG.

Eine zusätzliche Bestrahlung hatte darauf kaum Einfluss. Bei Cal kam es nach 8 Gy Bestrahlung durch die zusätzliche 2,5µM SKI-II-Behandlung zu einem signifikanten ($p = 0,0475$), aber dennoch geringen Rückgang der Kolonienzahlen. Bei HN zeigte sich ebenfalls erst nach 8Gy Bestrahlung ein signifikanter ($p = 0,0234$) Effekt des Inhibitors in der hohen Dosierung. Bei UD7 blieb es ebenfalls dabei, dass die niedrige Dosis des Inhibitors kaum wirkte, wohl aber die hohe. Bei UD3 und UD5 konnte ein additiver Strahleneffekt gezeigt werden.

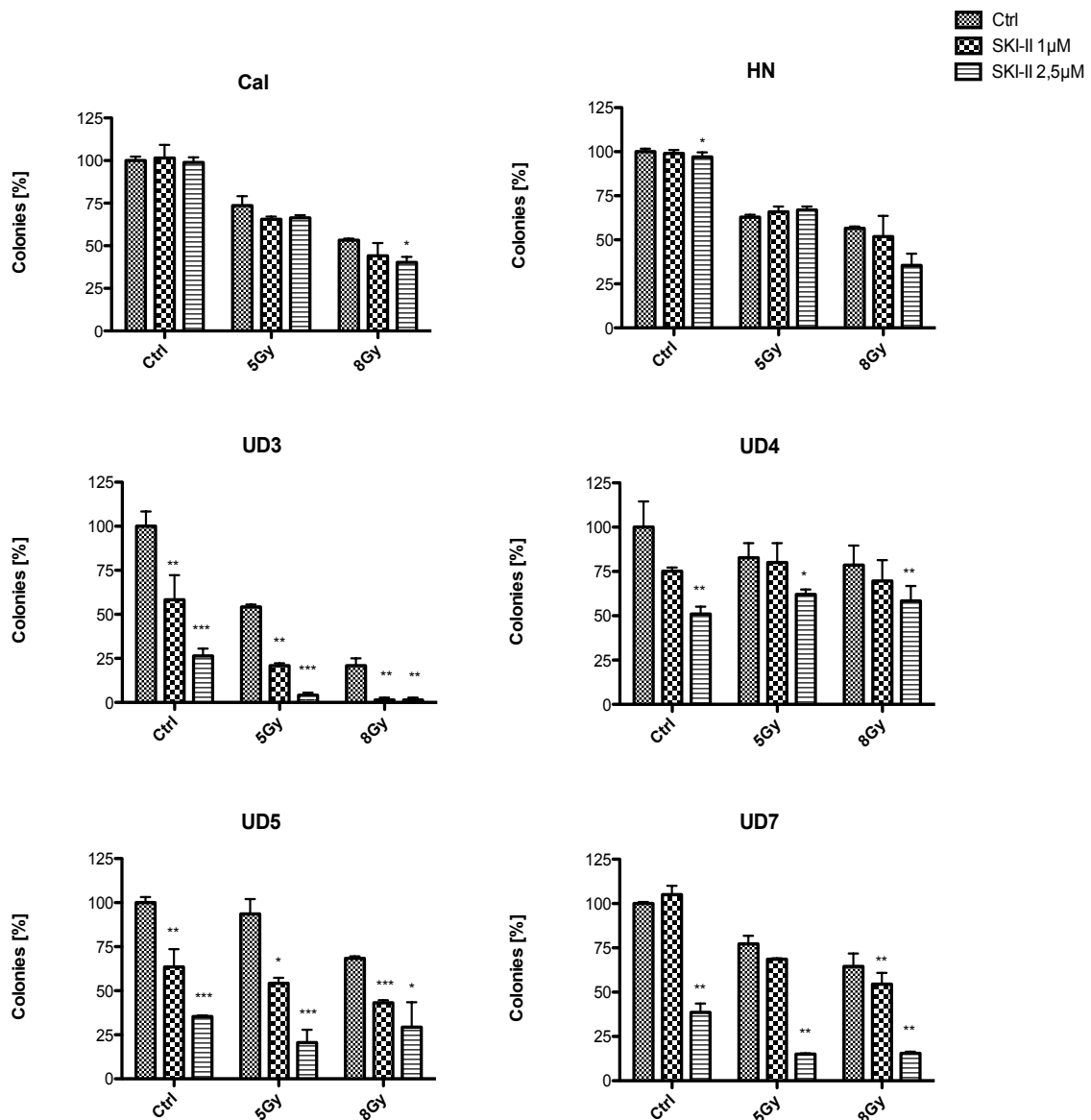


ABBILDUNG 16: EINFLUSS VON SKI-II AUF DAS KLONOGENE ÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VON IONISIERENDER STRAHLUNG. DETAILS SIEHE TEXT. DIE ANGABE DER SIGNIFIKANZNIVEAUS BEZIEHT SICH JEWEILS AUF DEN UNBEHANDELTEN WERT DERSELBEN STRAHLENDOSIS.

4.3.5. EINFLUSS VON SKI-II AUF DIE STRAHLENRESISTENZ BEI UD5

5Gy alleine führten bei UD5 zu einem nicht signifikanten Rückgang der Kolonienzahlen um 6,4% ($p = 0,0842$), in Kombination mit $1\mu\text{M}$ SKI-II reduzierten sich die Kolonien um 45% ($p = 0,0002$). Auch der Einfluss von 8Gy Bestrahlung konnten in Kombination mit dem Inhibitor ausgebaut werden: es gab 31,6% ($p = 0,0007$) weniger Kolonien nach alleiniger Bestrahlung und 66% ($p = 0,0002$) weniger bei zusätzlicher SKI-II Behandlung.

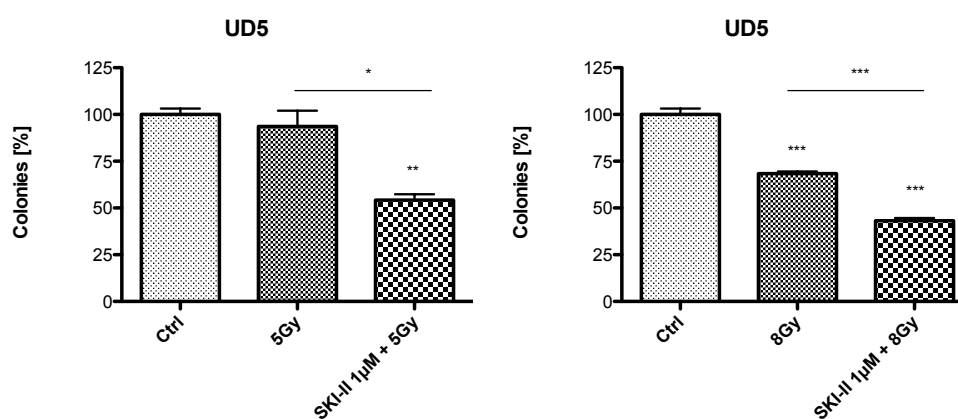


ABBILDUNG 17: VERHALTEN VON UD5 BEI BESTRAHLUNG UND ZUSÄTZLICHER SKI-II-BEHANDLUNG. DIE ABBILDUNG ZEIGT DAS KLONOGEN ÜBERLEBEN NACH 5GY UND 8GY BESTRAHLUNG JEWEILS ALLEIN UND IN KOMBINATION MIT SKI-II. IM STATISTISCHEN VERGLEICH ZWISCHEN ALLEINIGER BESTRAHLUNG UND DER KOMBINATION ERGEBEN SICH FOLGENDE P-WERTE : $p = 0,0138$ FÜR 5GY UND $p < 0,0001$ FÜR 8GY.

4.3.6. EINFLUSS VON CETUXIMAB AUF DAS KLONOGENE ÜBERLEBEN

Cetuximab führte in allen Zelllinien zu einem Rückgang des Überlebens. Bei HN war der Rückgang mit 5% gering, aber signifikant ($p = 0,0052$). Nach Bestrahlung kam es auch bei HN zu einer deutlichen Reduktion der überlebenden Klone durch Cetuximab. Nach 8Gy reduzierten sich die überlebenden Klone durch die Cetuximab-Behandlung um 61% ($p = 0,0038$).

Am besten sprach die Zelllinie UD5 mit einer Abnahme der Kolonienzahlen um 79,1% in der unbestrahlten Kontrolle ($p = 0,0002$) und mit 88,2% beim Ansatz mit 8Gy Bestrahlung ($p <$

0,0001) auf die Behandlung an. Auch UD3 und UD4 sprachen gut an. Etwas schlechter waren die Ergebnisse bei den Zelllinien Cal, HN und UD7.

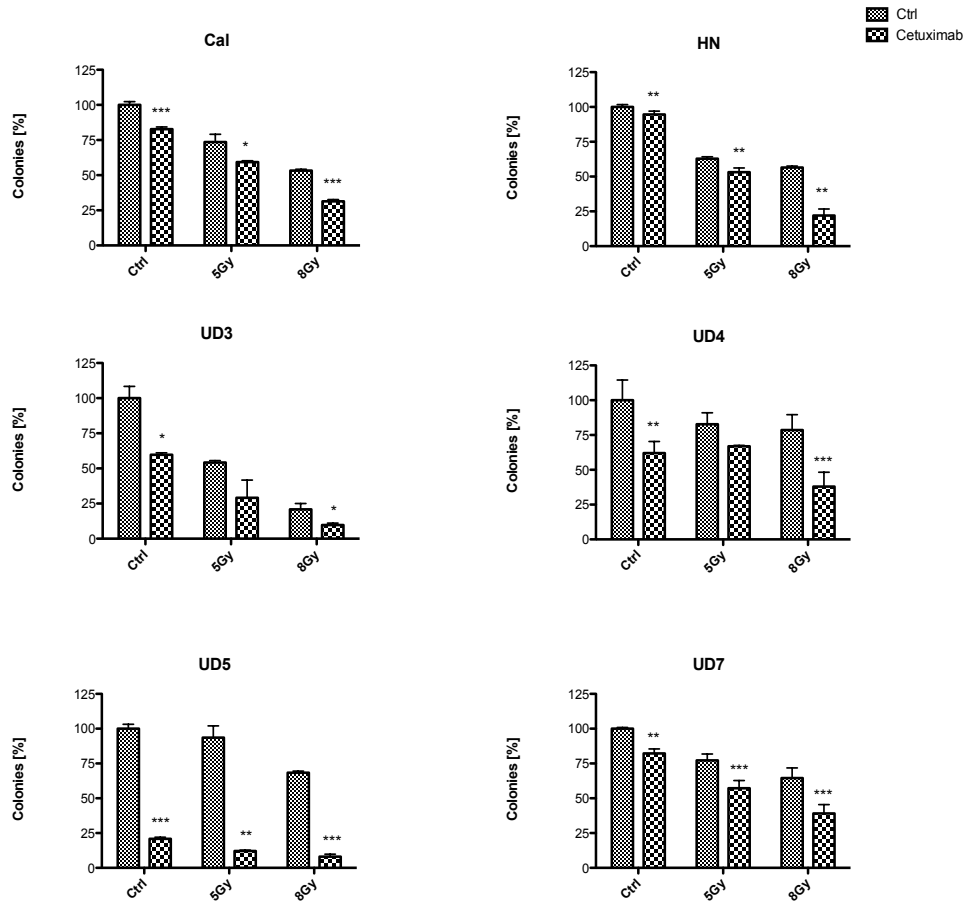


ABBILDUNG 18: EINFLUSS VON CETUXIMAB AUF DAS KLONOGENE ÜBERLEBEN IN ABHÄNGIGKEIT VON IONISIERENDER STRAHLUNG. CETUXIMAB REDUZIERTE IN ALLEN ZELLINIEN IN UNTERSCHIEDLICHEM AUSMAß DAS KLONOGENE ÜBERLEBEN. DETAILS SIEHE TEXT. DIE ANGABE DES SIGNIFIKANZNIVEAUS BEZIEHT SICH JEWEILS AUF DEN UNBEHANDELTEN WERT DERSELBEN STRAHLENDOSIS.

4.3.7. EFFEKT VON SKI-II UND CETUXIMAB IM VERGLEICH

Im Vergleich zu einer Cetuximab-Behandlung war die SKI-II-Behandlung weniger effektiv. Bei fast allen Zelllinien konnten mit Cetuximab bessere Ergebnisse erzielt werden als mit der niedrigen Konzentration des SphK1-Inhibitors. Dies galt sowohl für den bestrahlten wie auch für den unbestrahlten Ansatz. Die einzige Zelllinie, bei der mit der niedrigeren Konzentration des SphK1-Inhibitors ein ähnlicher Effekt erzielt werden konnte wie mit Cetuximab, war UD3.

Ein signifikanter Vorteil ($p = 0,0351$) zeigte sich allerdings nur bei einer Strahlendosis von 8Gy.

In der hohen Dosis war SKI-II bei UD3, UD4 und UD7 effektiver als Cetuximab. Nach 8Gy Bestrahlung war bei UD4 jedoch die Cetuximab-Behandlung effektiver.

TABELLE 27: VERGLEICH DER WIRKSAMKEIT VON CETUXIMAB UND SKI-II IN BEZUG AUF DAS KLONOGENE ÜBERLEBEN.

Zelllinie	Cet vs. SKI-II (1 μ M)	Cet vs. SKI-II (2,5 μ M)
Cal	Cet > SKI-II (*)	Cet > SKI-II (**)
HN	Cet > SKI-II (**)	Cet > SKI-II (**)
UD3	Cet = SKI-II (n.s.)	Cet < SKI-II (**)
UD4	Cet > SKI-II (n.s.)	Cet < SKI-II (*)
UD5	Cet > SKI-II (*)	Cet > SKI-II (***)
UD7	Cet > SKI-II (*)	Cet < SKI-II (***)

4.3.8. AUSWIRKUNG EINER KOMBINATIONSTHERAPIE VON SKI-II UND CETUXIMAB

Die bisherigen Ergebnisse und die beschriebenen Überschneidungen der Signalwege legten die Frage nahe, welche Auswirkungen eine Kombination von Cetuximab und SKI-II hat. Dafür wurde analog zu den bisherigen Colony-Formation-Assays ein neuer Versuch für die Zelllinien Cal und UD5 angesetzt. Um die Effizienz der Kombination besser beurteilen zu können, wurden nicht nur die etablierten Konzentrationen (SKI-II = 1 μ M und Cetuximab = 0,14 μ M) sondern auch niedrigere Dosen (SKI-II = 0,5 μ M und Cetuximab = 0,07 μ M) verwendet.

Für Cal konnte in den Kombinationsversuchen gezeigt werden, dass eine Kombination effektiver ist als eine alleinige Cetuximab-/ SKI-II-Therapie. In unbestrahltem Zustand konnte mit den niedrigen Dosen der Inhibitoren kein signifikanter Rückgang der Kolonienzahlen beobachtet werden. Eine Kombination aus Cetuximab und SKI-II führte jedoch zu einer Reduktion der Kolonienzahlen um 18,7% ($p = 0,032$). Bei den hohen Dosen blieb SKI-II erfolglos, Cetuximab führte zu einer Reduktion um 17,3% ($p = 0,0303$), die Kombination führte zu einem Rückgang der Kolonienzahlen um 27,2% ($p = 0,0027$). Zwischen der

alleinigen Cetuximab-Behandlung und der Kombination konnte jedoch keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden ($p = 0,3349$).

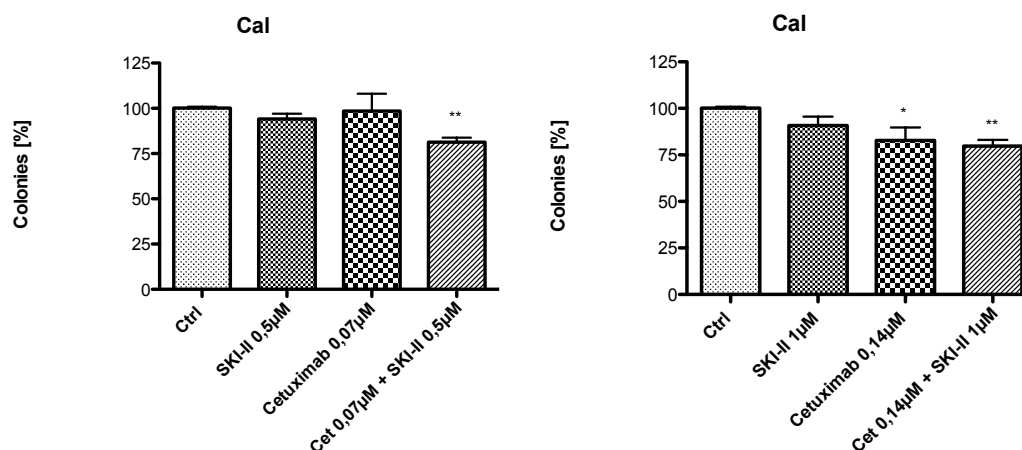


ABBILDUNG 19: KLONOGENES ÜBERLEBEN DER ZELLINIE CAL NACH BEHANDLUNG MIT SKI-II, CETUXIMAB UND DER KOMBINATION AUS BEIDEM. DAS LINKE DIAGRAMM ZEIGT DIE ERGEBNISSE IN DEN NIEDRIGEN KONZENTRATIONEN (CET. 0,07µM, SKI-II 0,5µM), DAS RECHTE DIAGRAMM DIE ERGEBNISSE IN DEN HOHEN KONZENTRATIONEN (CET. 0,14µM, SKI-II 1µM). EINE KOMBINATION AUS BEIDEN INHIBITOREN KONNTE DEN EFFEKT KAUM VERBESSERN.

Bei 2Gy, 5Gy und 8Gy Bestrahlung ergaben sich ähnliche Effekte. Der stärkste Effekt wurde bei 8Gy Bestrahlung und zusätzlicher hoher Kombinationstherapie erzielt. Es kam zu einem Rückgang der Kolonienzahlen um insgesamt 59,6% ($p = 0,0027$), wobei der größte Teil der Reduktion mit 40,8% ($p = 0,0030$) durch die Bestrahlung erzielt wurde und nur 18,8% ($p = 0,0216$) durch die zusätzliche Kombinationstherapie. Die alleinige Zugabe von Cetuximab oder SKI-II konnte die Bestrahlungseffekte nicht signifikant ausbauen.

Bei UD5 konnte durch Zugabe von SKI-II sowohl in der niedrigen als auch in der hohen Dosis die Anzahl der überlebenden Klone signifikant um 25% ($p = 0,0162$) bzw. um 44,4% ($p = 0,0102$) verringert werden. Eine Behandlung mit Cetuximab war, wie bereits gezeigt, noch effektiver, sie führte zu einer Reduktion um 46,5% ($p = 0,0101$) in der niedrigen und um 56,6% ($p = 0,0064$) in der hohen Dosierung. Eine Kombination der Inhibitoren war sehr wirksam und führte in der niedrigen Dosierung zu einem Rückgang der Kolonienzahlen um 85,8% ($p = 0,0059$). In der hohen Dosierung konnte der Effekt auf 97,3% ($p = 0,0079$) gesteigert werden.

Die Kombination war sowohl in der niedrigen als auch in der hohen Dosierung im Vergleich zur Einfachtherapie statistisch signifikant besser. (Niedrige Konzentration: Kombination im Vergleich zu SKI-II: $p = 0,0031$, Kombination im Vergleich zu Cetuximab: $p = 0,0140$. Hohe

Konzentration: Kombination im Vergleich zu SKI-II: $p = 0,0062$, Kombination im Vergleich zu Cetuximab: $p = 0,0103$). Auch im Vergleich der Einfachbehandlung in hoher Dosierung zur Kombinationsbehandlung in niedriger Dosierung konnten statistisch signifikante Vorteile auf Seiten der Kombinationsbehandlung beobachtet werden (Kombination in niedriger Dosierung im Vergleich zu Cetuximab in hoher Dosierung: $p = 0,0101$, Kombination in niedriger Dosierung im Vergleich zu SKI-II in hoher Dosierung: $p = 0,0051$). Eine zusätzliche Bestrahlung führte zwar zu einem weiteren Rückgang des klonogenen Überlebens, die Effekte waren jedoch kaum signifikant.

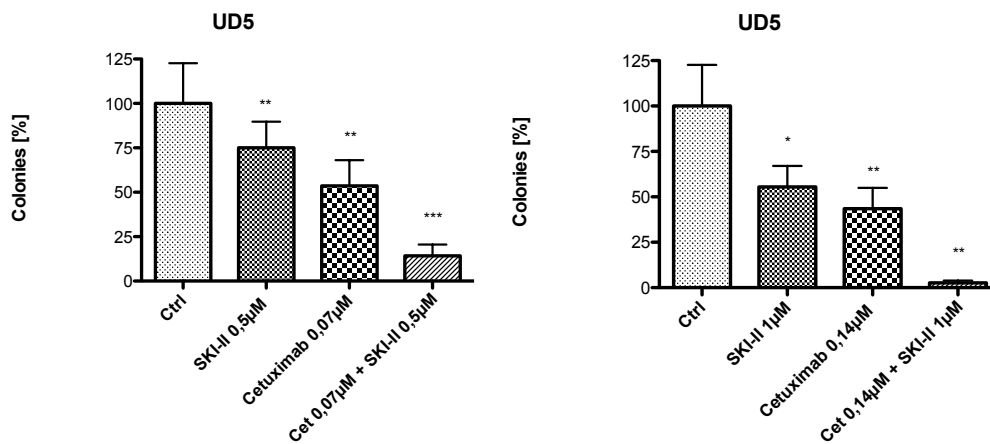


ABBILDUNG 20: KLONOGENES ÜBERLEBEN DER ZELLINIE UD5 NACH SKI-II-/CETUXIMAB-BEHANDLUNG UND EINER KOMBINATION AUS BEIDEM. DAS LINKE DIAGRAMM ZEIGT DIE ERGEBNISSE IN DEN NIEDRIGEN KONZENTRATIONEN (CET 0,07µM, SKI-II 0,5µM), DAS RECHTE DIE ERGEBNISSE IN DEN HOHEN KONZENTRATIONEN (CET 0,14µM, SKI-II 1µM). DURCH DIE KOMBINATION DER INHIBITOREN KONNTE DER EFFEKT AUF DAS KLONOGENE ÜBERLEBEN SIGNIFIKANT VERBESSERT WERDEN. DETAILS SIEHE TEXT.

4.4. WOUND-HEALING-ASSAY

Um Aussagen über das Migrationsverhalten der Zellen treffen zu können, wurden Wound-Healing-Assays durchgeführt. Von den sechs bis dato untersuchten Zelllinien wurden Cal, und UD5 für diese Versuche ausgewählt. Grund hierfür war das unterschiedliche Ansprechen auf die Bestrahlung und der unterschiedliche Einfluss der Inhibitoren auf das Überleben und die Proliferation der jeweiligen Zellen.

4.4.1. EINFLUSS IONISIERENDER STRAHLUNG AUF DIE MIGRATION

Für das Migrationsverhalten der Zellen konnte gezeigt werden, dass Cal nach Bestrahlung vermehrt migriert. Im Gegensatz wurde das Migrationsverhalten von UD5 durch die Bestrahlung nicht beeinflusst. Eine Signifikanz konnte nicht nachgewiesen werden.

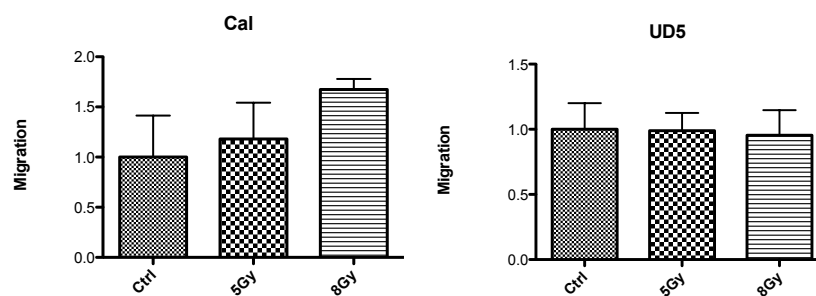


ABBILDUNG 21: DIE ABBILDUNG ZEIGT DAS MIGRATIONSVERHALTEN DER ZELLEN NACH 5GY UND 8GY BESTRAHLUNG. BEI CAL STEIGT DAS MIGRATIONSVERHALTEN LINEAR ZUR STRAHLENDOSIS AN. IM GEGENSATZ DAZU BLEIBT DAS MIGRATIONSVERHALTEN VON UD5 VON DER BESTRAHLUNG UNBEEINFLUSST.

4.4.2. EINFLUSS VON EGF AUF DIE MIGRATION

Das Migrationsverhalten von Cal wurde von EGF negativ beeinflusst. Bei der Zelllinie UD5 kam es sowohl unbestrahlt als auch nach 5Gy bzw. 8Gy Bestrahlung zu einer stark gesteigerten Migration nach EGF-Stimulation. Die Migrationszunahme durch EGF war bei UD5 unbestrahlt und nach 8Gy Bestrahlung signifikant (Ctrl.: $p = 0,0049$, 8Gy: $p = 0,0126$).

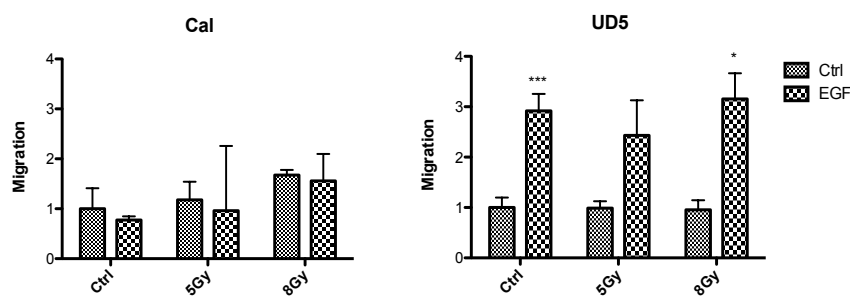


ABBILDUNG 22: EINFLUSS VON EGF AUF DAS PROLIFERATIONSVERHALTEN VON CAL UND UD5. BEI DER ZELLINIE UD5 KONNTE DAS MIGRATIONSVERHALTEN DURCH EGF STIMULATION GESTEIGERT WERDEN, BEI CAL BLIEB DIESER EFFEKT AUS. DETAILS SIEHE TEXT.

4.4.3. EINFLUSS VON PMA AUF DIE MIGRATION

Für beide Zelllinien zeigte sich im unbestrahlten Zustand ein vermehrtes Migrationsverhalten nach PMA-Stimulation. Bei Cal migrierten 1,19 mal so viele Zellen nach PMA-Stimulation wie in der unbehandelten Kontrolle ($p = n.s.$). Bei UD5 migrierten 1,72 mal so viele Zellen wie in der unbehandelten Kontrolle ($p = n.s.$). Nach Bestrahlung zeigte sich ein anderes Bild: Die strahleninduzierte Migration von Cal ließ sich durch PMA-Stimulation nicht weiter ausbauen. PMA hatte sogar eher einen migrationshemmenden Effekt auf die bestrahlten Zellen. Bei UD5 ließ sich die PMA-induzierte Migration durch zusätzliche Bestrahlung auf einen Faktor von 1,81 bei 5Gy und 2,26 bei 8Gy ausbauen (Abb. 23).

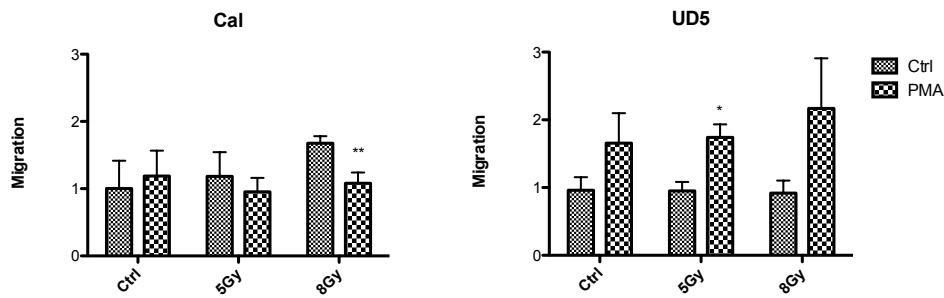


ABBILDUNG 23: EINFLUSS VON PMA AUF DAS MIGRATIONSVERHALTEN VON CAL UND UD5 IN ABHÄNGIGKEIT VON IONISIERENDER STRAHLUNG. PMA STEIGERTE DIE MIGRATIONSBEREITSCHAFT VON UD5, NICHT JEDOCH DIE VON CAL. DETAILS SIEHE TEXT.

4.4.4. EINFLUSS VON SKI-II AUF DIE MIGRATION

Die Zelllinie Cal reagierte unbestrahlt und bei 5Gy kaum auf den Inhibitor. Die durch 8Gy gesteigerte Migration konnte durch den SKI-II gemindert werden. Die Ergebnisse waren jedoch nicht signifikant.

Bei der Zelllinie UD5 migrierten unbestrahlt und nach 5Gy Bestrahlung weniger Zellen nach SKI-II-Behandlung. Dieser Effekt blieb nach einer Strahlendosis von 8Gy aus. Alle Werte waren statistisch nicht signifikant.

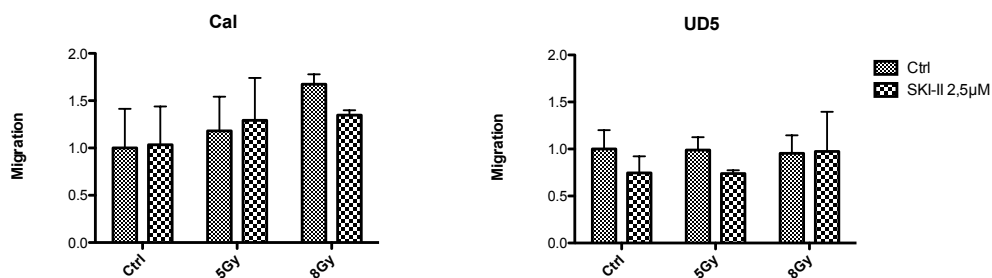


ABBILDUNG 24: MIGRATIONSVERHALTEN VON CAL UND UD5 NACH SKI-II-BEHANDLUNG IN ABHÄNGIGKEIT IONISIERENDER STRAHLEN.

4.4.5. EINFLUSS VON CETUXIMAB AUF DIE MIGRATION

Im unbestrahlten Zustand wirkte Cetuximab bei Cal migrationshemmend ($p = n.s.$), auf das Migrationsverhalten von UD5 hatte es keinen Einfluss. Nach 8Gy Bestrahlung hatte es einen hemmenden Effekt auf beide Zelllinien: bei Cal reduzierte sich das Migrationsverhalten um den Faktor 0,75 ($p = n.s.$), bei UD5 um den Faktor 0,47 ($p = 0,0211$).

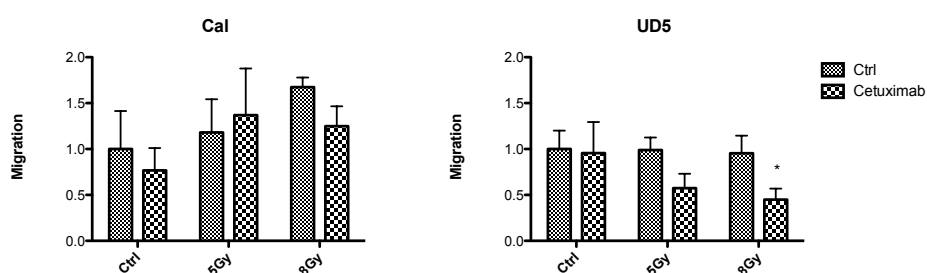


ABBILDUNG 25: MIGRATIONSVERHALTEN VON CAL UND UD5 NACH CETUXIMAB-BEHANDLUNG IN ABHÄNGIGKEIT IONISIERENDER STRAHLEN.

4.4.6. EFFEKT VON SKI-II UND CETUXIMAB IM VERGLEICH

Bei der Zelllinie Cal war in Bezug auf die Migrationshemmung Cetuximab dem SKI-II sowohl bestrahlt als auch unbestrahlt überlegen. Bei der Zelllinie UD5 war unbestrahlt SKI-II stärker migrationshemmend als Cetuximab. Nach einer Strahlendosis von 8Gy war der Effekt von Cetuximab stärker als der von SKI-II.

TABELLE 28: WIRKUNG VON CETUXIMAB UND SKI-II AUF DIE MIGRATION IM VERGLEICH.

Cell Line	Cet vs. SKI-II (1 μ M)	Cet vs. SKI-II (2,5 μ M)
Cal	Cet > SKI-II (n.s.)	Cet > SKI-II (n.s.)
UD5	Cet < SKI-II (n.s.)	Cet < SKI-II (n.s.)

TABELLE 29: WIRKUNG VON CETUXIMAB UND SKI-II AUF DIE MIGRATION IM VERGLEICH NACH 8GY BESTRAHLUNG.

Cell Line	Cet/SKI-II (1 μ M)	Cet/SKI-II (2,5 μ M)
Cal	Cet > SKI-II (n.s.)	Cet > SKI-II (n.s.)
UD5	Cet > SKI-II (*)	Cet > SKI-II (n.s.)

4.4.7. EINFLUSS EINER KOMBINATION AUS CETUXIMAB UND SKI-II AUF DIE MIGRATION

Bei Cal konnten unter der Kombinationsbehandlung keine besseren Ergebnisse erzielt werden als in den Einfachbehandlungen ($p = \text{n.s.}$). Nach 8Gy Bestrahlung schnitt sogar die Einfachbehandlung mit dem Inhibitor besser ab als die Kombination ($p = \text{n.s.}$).

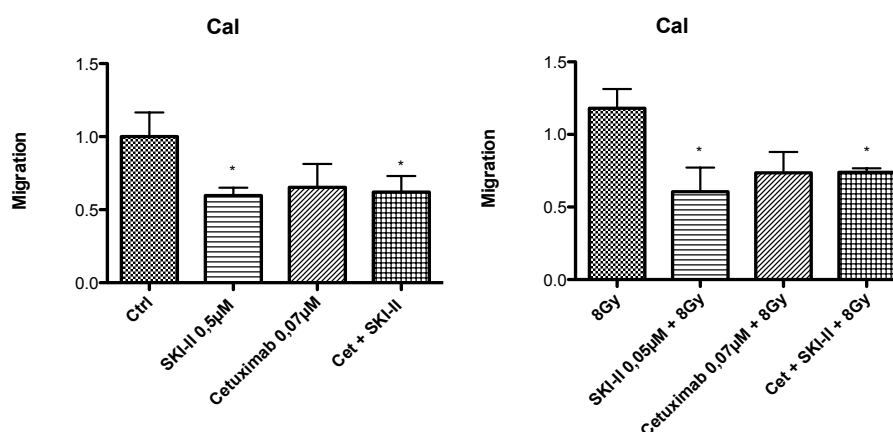


ABBILDUNG 26: EINFLUSS EINER KOMBINATION AUS CETUXIMAB UND SKI-II AUF DIE MIGRATION VON CAL. DAS LINKE DIAGRAMM ZEIGT DIE ERGEBNISSE AUS DER UNBESTRAHLTEN KONTROLLE, DAS RECHTE DIE NACH 8GY BESTRAHLUNG. DURCH EINE KOMBINATION DER INHIBITOREN KAM ES NICHT ZU EINER VERSTÄRKUNG DES MIGRATIONSHEMMENDEN EFFEKTS. DIE ANGABE DER SIGNIFIKANZ BEZIEHT SICH JEWEILS AUF DIESELBE STRAHLENDOSIS.

Bei der Zelllinie UD5 konnte ein additiver Effekt der Inhibitoren gezeigt werden. SKI-II allein zeigte v.a. im bestrahlten Zustand keine besonders guten Ergebnisse. Cetuximab wirkte etwas besser, die mit Abstand besten Ergebnisse wurden jedoch mit der Kombinationsbehandlung erzielt (unbestrahlt: SKI-II vs. Cet + SKI-II: $p = 0,0317$, Cet vs. Cet + SKI-II: $p = \text{n.s.}$, bestrahlt: SKI-II vs. Cet + SKI-II: $p = 0,0095$, Cet vs. Cet + SKI-II: $p = 0,0347$) (Abb.27).

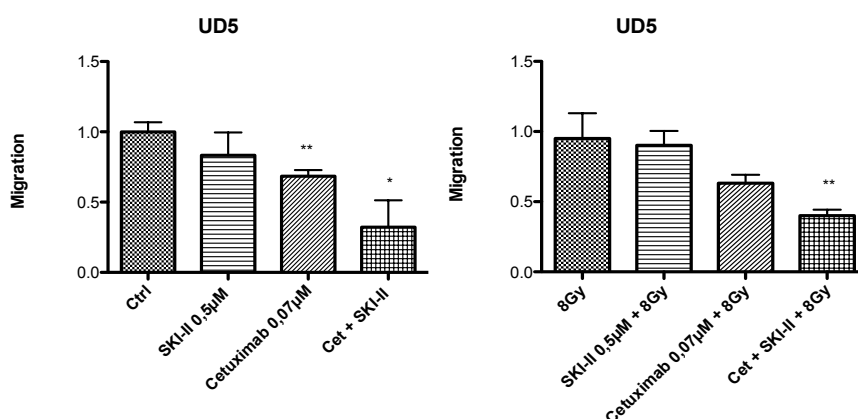


ABBILDUNG 27: EINFLUSS EINER KOMBINATION AUS CETUXIMAB UND SKI-II AUF DIE MIGRATION DER ZELLINIE UD5. DAS LINKE DIAGRAMM ZEIGT DIE ERGEBNISSE AUS DER UNBESTRAHLTEN KONTROLLE, DAS RECHTE DIE NACH 8GY BESTRAHLUNG. DURCH DIE KOMBINATION DER INHIBITOREN KONNTE EINE VERSTÄRKUNG DES MIGRATIONSHEMMENDEN EFFEKTS VON SKI-II UND CETUXIMAB ERZIELT WERDEN. DIE ANGABE DER SIGNIFIKANZ BEZIEHT SICH JEWEILS AUF DIESELBE STRAHLENDOSIS.

4.5. EXPRESSIONSANALYSEN AUF PROTEINEBENE

4.5.1. WESTERN BLOT-ANALYSEN

Zum Nachweis der biochemischen Auswirkungen von Cetuximab und SKI-II wurden verschiedene Proteine der nachgeschalteten Signalwege von EGFR und SphK1 untersucht.

In den WB-Analysen konnte gezeigt werden, dass es in beiden Zelllinien nach der Cetuximab-Behandlung zu einer Aufregulation von p-EGFR kam. Eine zusätzliche SKI-II-Behandlung milderte diesen Effekt in UD5, nicht jedoch in Cal ab. Die AKT-Expression wurde weder durch Cetuximab noch durch SKI-II oder die Kombination aus beidem beeinflusst. p-AKT wurde nach Cetuximab-Behandlung in beiden Zelllinien abreguliert. Nach SKI-II Behandlung blieb dieser Effekt aus. Die Expression von ERK1/2 wurde durch keine der Behandlungen beeinflusst. p-ERK wurde nach Cetuximab-Behandlung abreguliert, der Effekt von SKI-II war sehr viel schwächer ausgeprägt. SphK1 wurde nach Cetuximab-Behandlung in UD5 vermehrt exprimiert, durch eine zusätzliche SKI-II-Behandlung blieb dieser Effekt aus. In Cal konnte diese Regulation nicht nachgewiesen werden (Abb. 28).

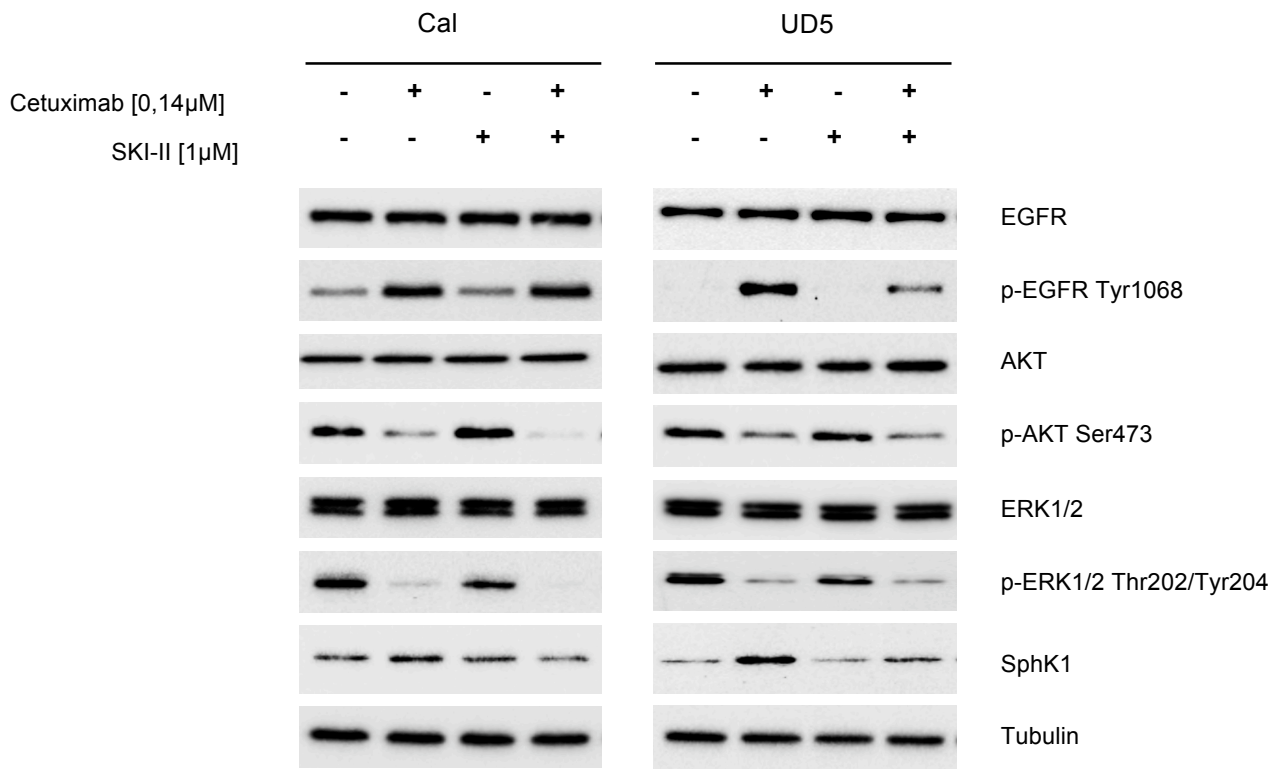


ABBILDUNG 28: WESTERN BLOT-ANALYSEN ZU DEN ZELLINIEN CAL UND UD5. (DETAILS SIEHE TEXT)

4.5.2. IMMUNFLUORESCENZ-FÄRBUNGEN

In der Immunfluoreszenz (IF) wurden drei Proteine angefärbt: SphK1, EGFR und E-Cadherin. Vor der Färbung wurden die Zellen jeweils mit EGF, PMA, SKI-II und Cetuximab (siehe Tab. 14) behandelt und anschließend mit 8Gy bestrahlt.

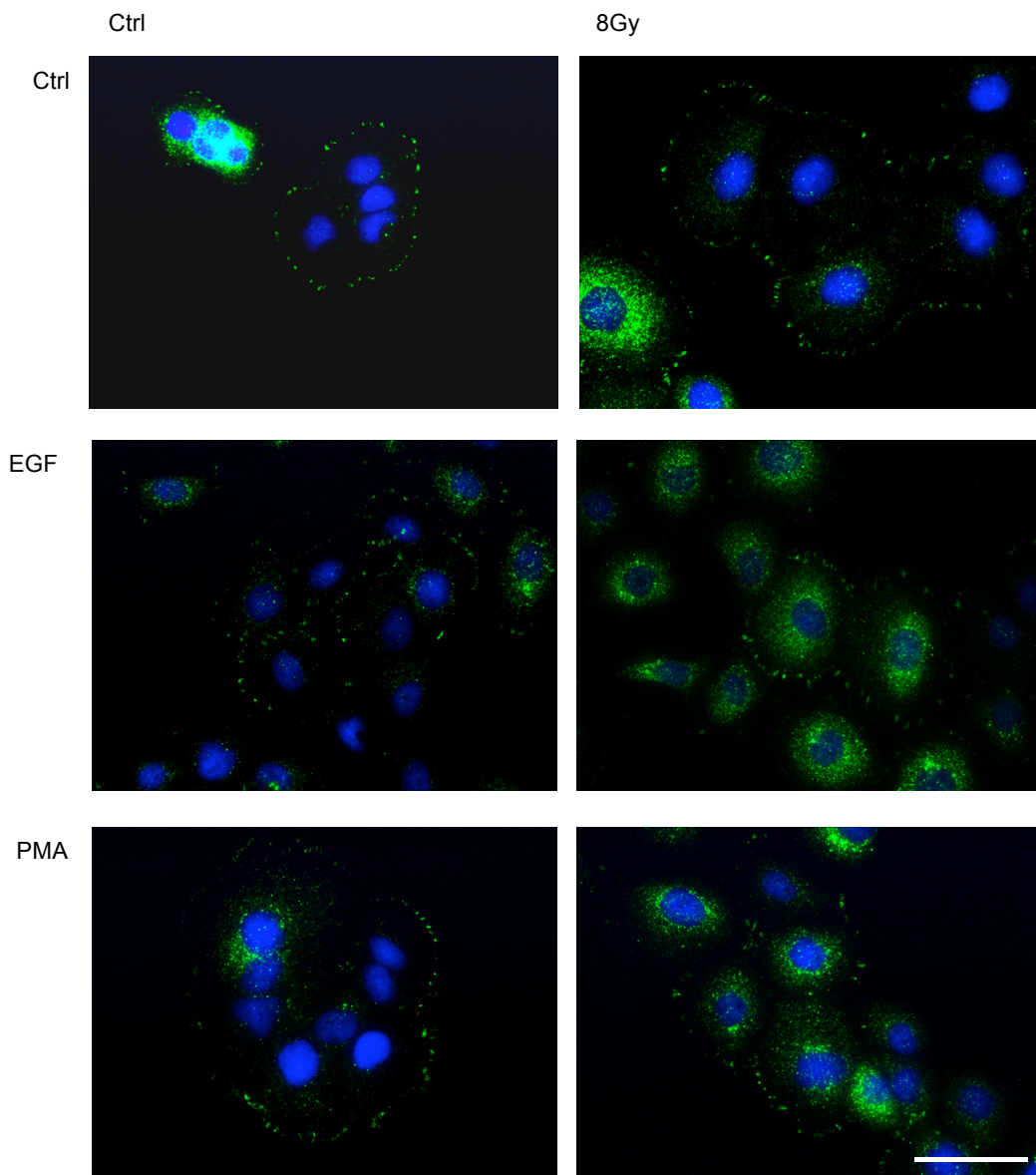


ABBILDUNG 29: IF-FÄRBUNG DER SPHK1 IN UD5 NACH EGF- UND PMA-STIMULATION IN ABHÄNGIGKEIT VON 8GY BESTRAHLUNG. VERGRÖßERUNG: 20X, MAßSTABSBALKEN: 100µM.

Die SphK1 wurde bei der Zelllinie UD5 nur schwach exprimiert und war vor allem membranständig zu finden. Nach Bestrahlung wurde die SphK1 hochreguliert und fand sich weiterhin membranständig. Nach Zugabe von EGF nahm die SphK1 membranständig zu, bei zusätzlicher Bestrahlung nahm die Konzentration auch intrazellulär zu. Nach PMA-Behandlung fanden sich ähnliche Effekte, wenn auch weniger ausgeprägt: nach Zugabe von PMA fand sich mehr membranständige SphK1, nach zusätzlicher Bestrahlung nahm die Konzentration auch intrazellulär zu.

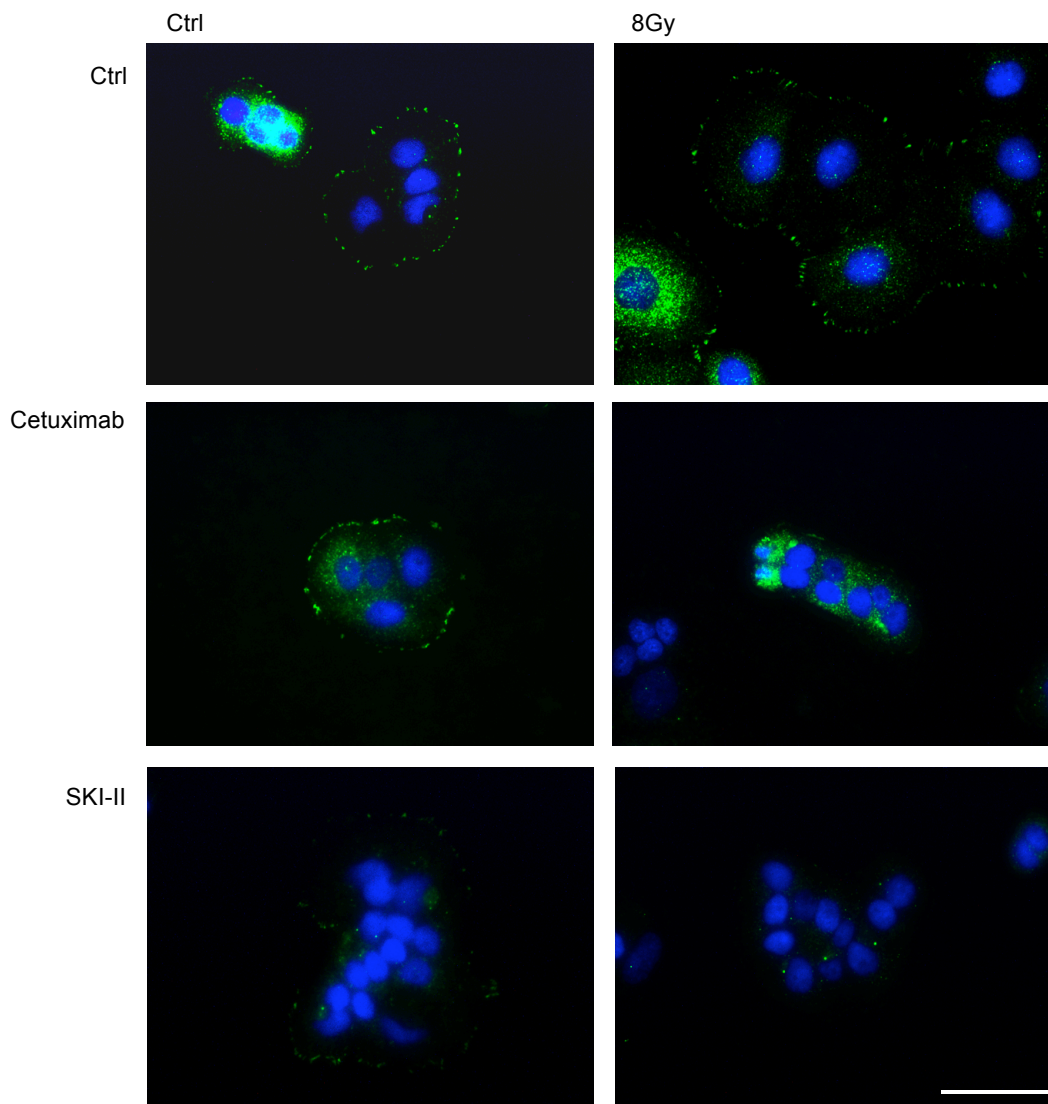


ABBILDUNG 30: IF-FÄRBUNG DER SPHK1 IN UD5 NACH CETUXIMAB- UND SKI-II-BEHANDLUNG IN ABHÄNGIGKEIT VON 8GY BESTRAHLUNG. VERGRÖßERUNG: 20X, MAßSTABSBALKEN: 100µM.

Nach Cetuximab-Behandlung wurde die SphK1 vermehrt exprimiert und war vor allem membranständig zu finden. Wurde dieser Ansatz zusätzlich bestrahlt, wurde die SphK1 intrazellulär weiterhin vermehrt exprimiert, verschwand jedoch nahezu vollständig von der Membran. Nach SKI-II-Behandlung war im Verhältnis zu den Zellkernen weniger Protein vorhanden als in der Kontrolle. Das Verhältnis zwischen intrazellulärer und membranständiger SphK1 verschob sich Richtung intrazellulär. Bei zusätzlicher Bestrahlung verschwand das Protein nahezu komplett.

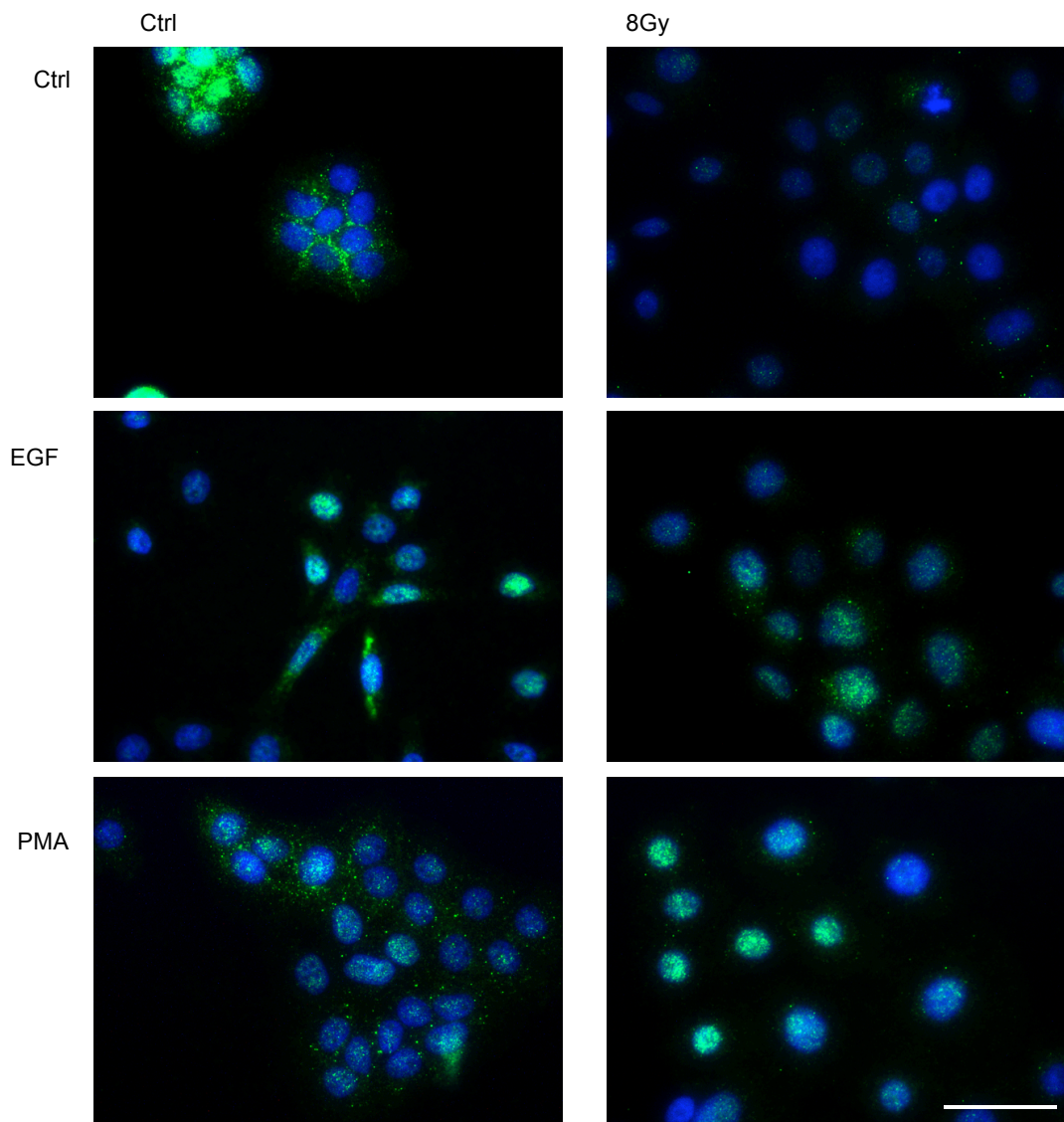


ABBILDUNG 31: IF-FÄRBUNG DES EGFRs BEI UD5 NACH EGF- UND PMA-STIMULATION IN ABHÄNGIGKEIT VON 8GY BESTRAHLUNG. VERGRÖßERUNG: 20X, MAßSTABSBALKEN: 100 μ M.

Bei der Zelllinie UD5 ließ sich der EGFR gut membranständig anfärben. Nach 8Gy Bestrahlung verschwand der Rezeptor nahezu völlig. Nach EGF-Stimulation verringerte sich die membranständige Konzentration des Rezeptors und das Protein fand sich vornehmlich zytoplasmatisch. Nach zusätzlicher Bestrahlung kam es zur Auflockerung der Zellen, Vergrößerung der Kerne und Abregulation des EGFR. Nach PMA-Stimulation ließ sich der EGFR hauptsächlich ungeordnet im Zytoplasma und im Nucleus nachweisen. Nach zusätzlicher Bestrahlung fand sich der EGFR fast ausschließlich im Nucleus.

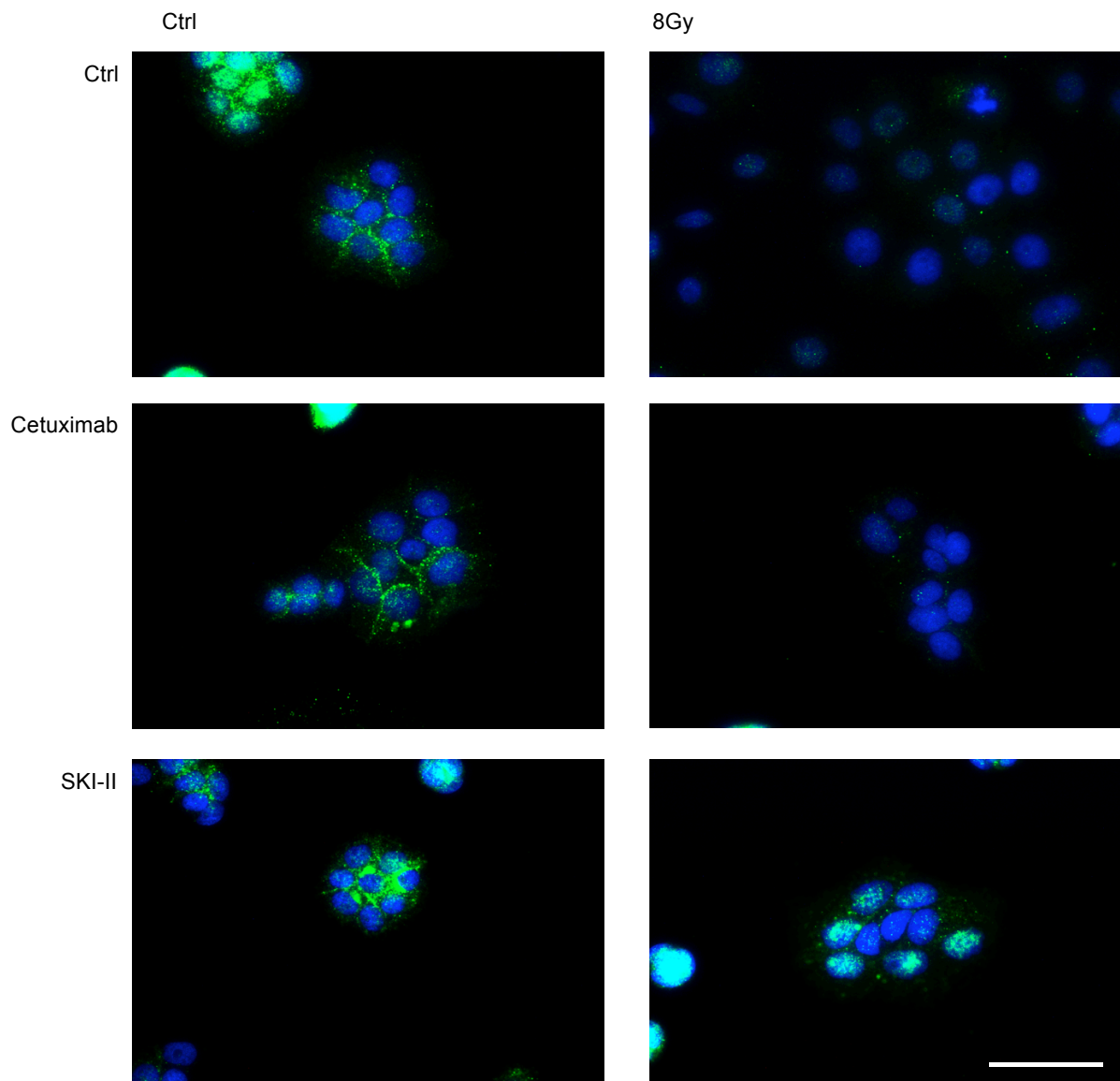


ABBILDUNG 32: IF-FÄRBUNG DES EGFRs BEI UD5 NACH CETUXIMAB- UND SKI-II-BEHANDLUNG IN ABHÄNGIGKEIT VON 8GY BESTRAHLUNG. VERGRÖßERUNG: 20X, MAßSTABSBALKEN: 100µM.

Nach Behandlung mit Cetuximab fand sich der Rezeptor weiterhin membranständig, nach zusätzlicher Bestrahlung verschwand das Protein komplett. Nach SKI-II-Behandlung wurde der EGFR hochreguliert und massiv an der Membran exprimiert. Nach einer zusätzlichen Strahlendosis von 8Gy war weiterhin relativ viel Protein zu sehen, jedoch eher im Zytoplasma und in der Nähe des Nucleus.

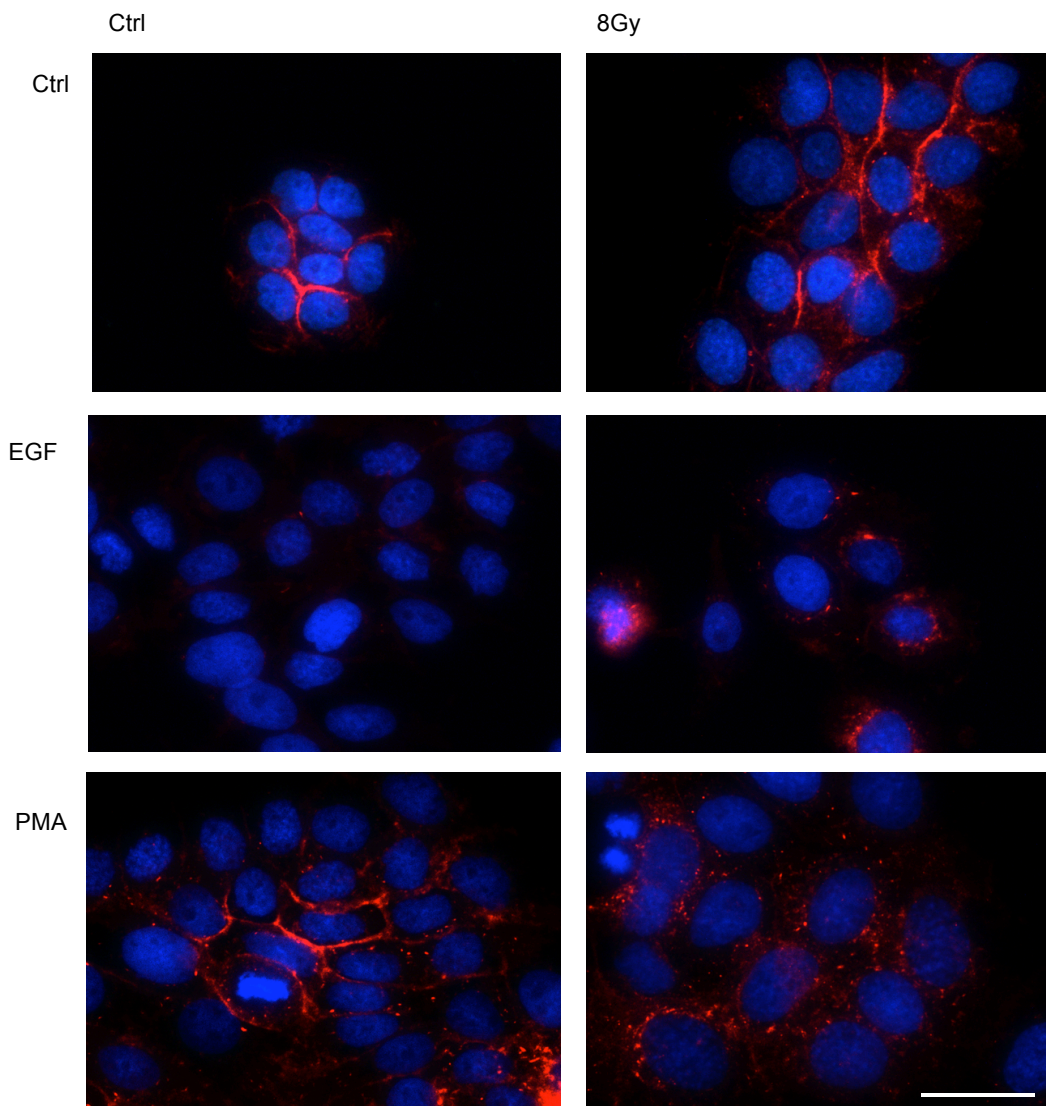


ABBILDUNG 33: IF-FÄRBUNG VON E-CADHERIN BEI UD5 NACH EGF- UND PMA-STIMULATION IN ABHÄNGIGKEIT VON 8GY BESTRAHLUNG. VERGRÖßERUNG: 40X, MAßSTABSALKEN: 50µM.

E-Cadherin war bei UD5 kompakt an den Zell-Zell-Kontakten zu sehen. Nach 8Gy Bestrahlung wurde E-Cadherin weiterhin stark exprimiert, wobei sich die Struktur etwas aulockerte. Nach Zugabe von EGF verschwand E-Cadherin nahezu komplett. Nach zusätzlicher Bestrahlung konnte lediglich ein bisschen ungeordnetes Protein angefärbt werden. PMA-Stimulation führte im Vergleich zur Kontrolle zu einer Auflockerung der Proteinstruktur. Nach zusätzlicher Bestrahlung konnte kaum kompaktes E-Cadherin nachgewiesen werden.

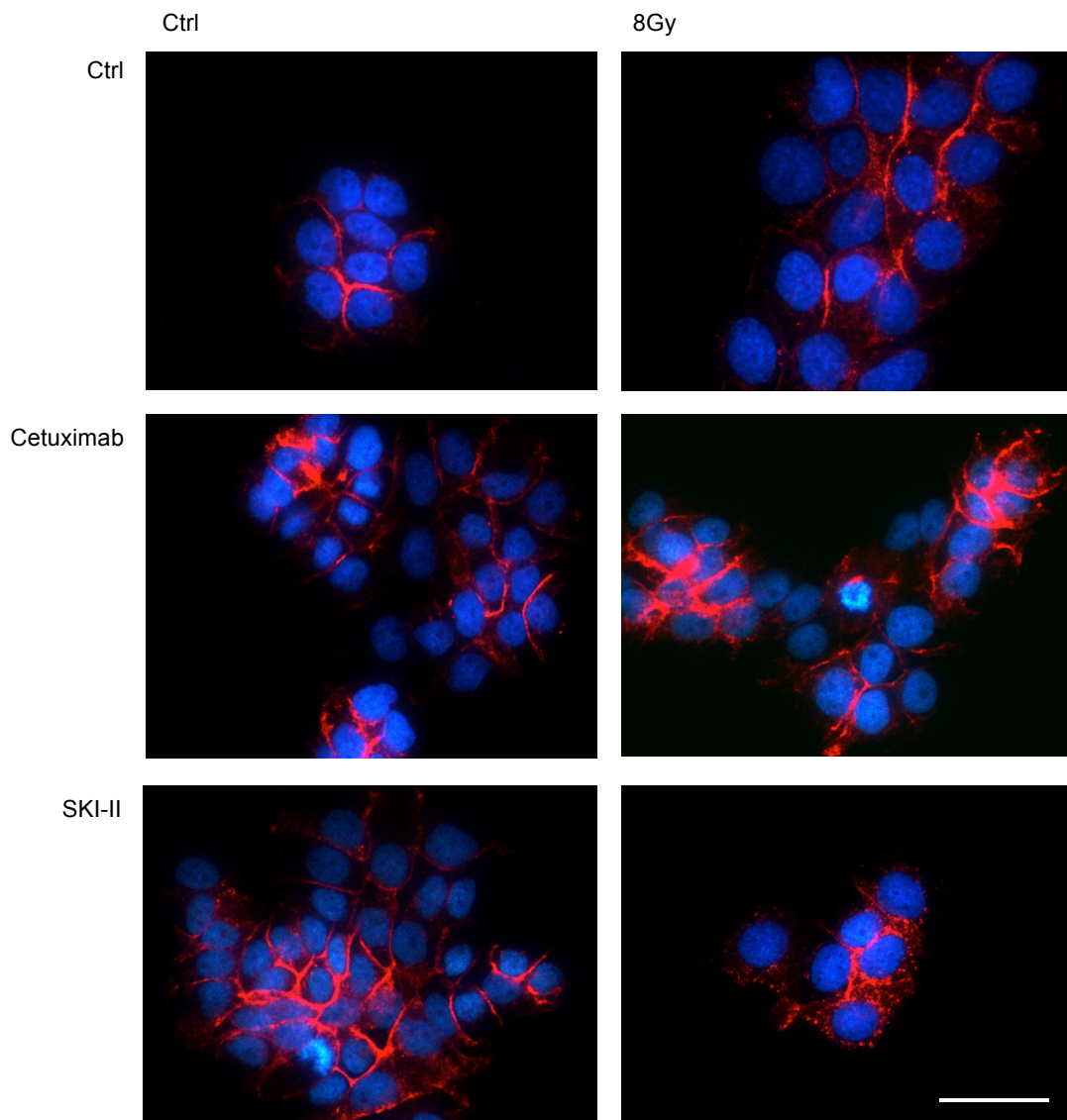


ABBILDUNG 34: IF-FÄRBUNG VON E-CADHERIN BEI UD5 NACH CETUXIMAB- UND SKI-II-BEHANDLUNG IN ABHÄNGIGKEIT VON 8GY BESTRAHLUNG. VERGRÖßERUNG: 40X, MAßSTABSBALKEN: 50µM.

Sowohl Cetuximab- als auch SKI-II-Behandlung führte zu einer vermehrten Expression von E-Cadherin. Bei zusätzlicher Bestrahlung wurde die Auflockerung der Proteinstruktur durch Cetuximab verhindert, nicht jedoch durch SKI-II.

5. DISKUSSION

Kopf-Hals-Tumoren sind die vierthäufigste Tumorentität in Deutschland {Reiter, 2009}. Aufgrund ihrer Lokalisation ist eine chirurgische Resektion häufig nur eingeschränkt möglich. In den letzten Jahrzehnten wurden die Therapieoptionen zwar optimiert, dennoch konnten bislang keine wesentlichen Verbesserungen in der Prognose der Patienten erzielt werden. Nur 47% der Patienten bleiben langfristig tumorfrei {Bernier, 2004}.

Die Rolle des EGFRs in Kopf-Hals-Tumoren ist in der Vergangenheit viel untersucht und diskutiert worden {Chung, 2013}. Unter Therapie mit spezifischen EGFR-Inhibitoren konnte in Tumorzellen ein Zellzyklusarrest {Wu, 1996}, eine Potenzierung der Apoptose {Wu, 1995}, eine Inhibition der Angiogenese {Petit, 1997} und verminderte Invasivitäts- und Metastasierungsraten {O-charoenrat, 2000} beobachtet werden. In Form von Cetuximab hat eine spezifische Hemmung des EGFRs bereits Einzug in die Klinik gehalten.

Für die SphK1 ist bekannt, dass eine Überexpression in vielen Tumoren mit Wachstum, Überleben {Ogretmen, 2004}, Angiogenese, Migration {Spiegel, 2003} und Resistenzen gegenüber Strahlen- und Chemotherapie {Chmura, 1997}, {Nava, 2000}, {Sauer, 2009}, {Guillermet-Guibert, 2009} assoziiert ist. Für Kopf-Hals-Tumore konnte gezeigt werden, dass die SphK1 im Vergleich zum Normalgewebe vermehrt exprimiert wird und dass eine erhöhte Expression mit geringen Überlebensraten einhergeht {Facchinetti, 2010}. In vielen Tumorentitäten, wie zum Beispiel im GBM, im Mammakarzinom, in Leukämien oder Blasen-tumorzellen, konnten bereits *in vitro* und zum Teil auch *in vivo* Erfolge mit spezifischen SphK1-Inhibitoren verbucht werden {Kapitonov, 2009}, {Antoon, 2011}, {Paugh, 2008}, {French, 2003}.

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand sechs humaner Kopf-Hals-Tumor-Zelllinien untersucht, welche Rolle der SphK1 bei dieser Tumorentität zukommt. Hierfür wurde die SphK1 pharmakologisch spezifisch inhibiert. SKI-II {French, 2003} wird als potentieller, neuer Kandidat in der Antitumorthherapie gehandelt. Von besonderem Interesse war, welche Rolle SKI-II in Bezug auf Strahlenresistenzen spielt und welche Bedeutung ihm in Bezug auf den EGFR-Signalweg zukommt. Der zweite Schwerpunkt lag auf dem Einfluss auf das Migrationsverhalten, insbesondere auf der strahleninduzierten Migration von Tumorzellen. Anschließend wurde aufgrund der überlappenden Signalwege von EGFR und SPHK1 die Frage einer Kombinationstherapie der entsprechenden Inhibitoren untersucht. Um auch die biochemischen Mechanismen hinter den biologischen Auswirkungen der unterschiedlichen

Behandlungen besser verstehen zu können, wurden IF-Färbungen und WB-Analysen angefertigt.

5.1. EXPRESSION AUF GEN-EBENE

Ziel der semiquantitativen RT-PCR war, zu überprüfen, ob die SphK1 und die entsprechenden Rezeptoren von den untersuchten Zelllinien exprimiert werden und ob die Expression von ionisierender Strahlung beeinflusst wird. Eine quantitative RT-PCR war nicht nötig, da es nicht um das Ausmaß, sondern um die alleinige Tatsache der Expression und der Regulation ging. Die semiquantitative RT-PCR ist ein geeignetes Verfahren, um zu ermitteln, ob gewisse Einflüsse zu einer genetischen Regulationsänderung führen. Direkte Rückschlüsse auf die Proteinebene sind jedoch schwierig, da posttranskriptionale Prozesse bis zu 60% der Proteinlevel der Zelle ausmachen {Vogel, 2012}.

Da die SphK1 ein evolutionär stark konserviertes Enzym ist {Shida, 2008}, war zu erwarten, dass sie von allen Zelllinien exprimiert wird. In der vorliegenden Arbeit konnte dies für alle untersuchten Zelllinien bestätigt werden. Die Tatsache, dass die Zelllinien dieses Protein in unterschiedlichem Ausmaß exprimieren, deckt sich mit Ergebnissen aus der Literatur {Facchinetti, 2010}. Auch veränderte Expressionslevel nach Bestrahlung wurden bereits in der Literatur beschrieben {Higo, 2006}.

Für die S1P-Rezeptoren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass bis auf S1P-4 alle Rezeptoren vor oder nach Bestrahlung in mindestens einer der Zelllinien exprimiert werden. Auch Hu et al. fanden unterschiedliche Expressionslevel der S1P-Rezeptoren in Ösophaguskarzinomzelllinien {Hu, 2010}. Es ist bekannt, dass S1P-4 nur in lymphatischem Gewebe exprimiert wird {Pyne, 2010}, daher war zu erwarten, dass er von keiner der Zelllinien exprimiert wird.

5.2. PROLIFERATION UND ÜBERLEBEN

Anhand des Crystal-Violett-Assays lassen sich Aussagen über die Proliferation und somit über die Wachstumsgeschwindigkeit von Tumoren machen. Im Gegensatz zu 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid-Assays (MTT-Assays), die die katalytische Aktivität vitaler Zellen messen und somit Rückschlüsse auf die Anzahl vitaler

Zellen zulassen, werden beim Crystal-Violett-Assay vitale Zellen angefärbt, lysiert und anschließend die optische Dichte der entstandenen Lösung ermittelt. Vorteil dieses Verfahrens ist, dass Schwankungen in der katalytischen Aktivität der Zellen die Ergebnisse nicht beeinflussen.

Im Gegensatz zu Crystal-Violett-Assays geben Colony-Formation-Assays Auskunft über das klonogene Überleben der Zellen. Anhand von Colony-Formation-Assays ist also auf einfache Art und Weise feststellbar, wie effizient zytotoxisch eine jeweilige Therapiemaßnahme ist. Nachteil dieser Methode ist, dass keine Aussage über die Größe der Klone getroffen werden kann. Somit kann nicht berücksichtigt werden, ob eine Therapiemodalität zusätzlich zu einer Verringerung des klonogenen Überlebens auch noch die Größe der Klone verringert oder gegebenenfalls sogar zu einem Proliferationsschub innerhalb der überlebenden Klone führt. Dementsprechend sollten die Ergebnisse aus Colony-Formation-Assays in Kombination mit Proliferationsanalysen bewertet werden.

Die Bestrahlung führte bei allen untersuchten Zelllinien zu einem Rückgang der Proliferation. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass es durch ionisierende Strahlung zu Doppelstrangbrüchen und Micronuclei-Formationen kommt. Es kommt zum Zellzyklusarrest, zu einer Hemmung der mitotischen Aktivität und somit zu einem Rückgang der Proliferation {Okada, 2012}. Am schlechtesten sprach die Zelllinie UD5 an. Ähnlich wie in den Proliferationsdaten war UD5 auch im Colony-Formation-Assay resistent gegenüber ionisierender Strahlung. UD4 reagierte ebenfalls nicht besonders gut auf die Bestrahlung. Für eine Resistenzentwicklung gegenüber der zytotoxischen Wirkung ionisierender Strahlung werden viele Gründe diskutiert. Gründe für unterschiedliches Ansprechen auf Bestrahlung können u.a. Hypoxie {Kim, 2012}, EGFR- {Hatanpaa, 2010} und SphK1-Überexpression {Shida, 2008} sein. Bei Kopf-Hals-Tumoren wird u.a. diskutiert, ob eine Strahlen- und Cetuximab-induzierte Translokation des EGFR in den Nucleus zu einer Resistenzentwicklung beitragen kann {Dittmann, 2008}, {Li, 2009}. Für in den Kern translozierten EGFR konnte bei Kopf-Hals-Tumoren bereits nachgewiesen werden, dass dies mit einem schlechten klinischen Outcome korreliert {Psyrrri, 2005}. Als weiterer Grund für Resistenzen gegenüber ionisierender Strahlung wird Autophagie diskutiert. Chaachouay et al. konnten an Mammakarzinom-Zelllinien zeigen, dass es in resistenten Zelllinien unter Bestrahlung zu Autophagie kommt und dass in strahlensensiblen Zelllinien dieser Effekt ausbleibt {Chaachouay, 2011}. Interessanterweise konnte in vorliegender Arbeit gezeigt werden, dass es durch Bestrahlung bei der strahlenresistenten Zelllinie UD5 zu einer Induktion des S1P-5-Rezeptors kommt, welche u.a. mit Autophagie assoziiert wird {Leong, 2010}. Diese Tatsache könnte eine Rolle bei der Entwicklung der Strahlenresistenz der

Zelllinie UD5 spielen. Zu bedenken ist jedoch, dass die alleinige Regulation auf genetischer Ebene noch keine Aussagen über die Proteinexpression zulässt.

Nach ihrem Ansprechen auf Bestrahlung konnten die Zelllinien in folgende Gruppen eingeteilt werden (Tab. 34).

TABELLE 30: EINTEILUNG DER ZELLLINIEN NACH IHREM ANSPRECHEN AUF BESTRAHLUNG.

	Cal, HN, UD3	UD7	UD4, UD5
Bestrahlung	Sensibel	Intermediär	Resistent

Die unter EGF-Stimulation erzielten Ergebnisse waren sowohl in den Proliferations- als auch in den Überlebensanalysen in sich nicht schlüssig und somit nicht aussagekräftig. Für EGF ist zwar bekannt, dass es zu einer Verbesserung der Strahlensensibilität führen kann {Kwok, 1989}, warum allerdings auch unbestrahlt der Einfluss auf Proliferation und Überleben negativ war, bleibt unklar. Bei den Colony-Formation-Assays könnte der Grund für die unschlüssigen Ergebnisse darin liegen, dass die Kolonien sehr groß wurden und sich teilweise überschneiden, was die Abgrenzung zueinander und somit das Auszählen erschwerte. Über die Gründe für die schwierig zu interpretierenden Ergebnisse im Crystal-Violett-Assay kann an dieser Stelle nur spekuliert werden. Aufgrund der Unklarheit der unter EGF-Stimulation erzielten Ergebnisse wird in den folgenden Betrachtungen nicht näher auf sie eingegangen.

Für PMA ist bekannt, dass es über einen PKC-abhängigen Weg einen proliferativen Effekt auf viele Zelllinien hat {Nakade, 2003}. Bei einigen Zelllinien (insbesondere an GBM-Zelllinien wurde dies beschrieben) nimmt jedoch die Proliferation nach PMA-Stimulation ab {Uht, 2007}. Für Kopf-Hals-Tumore propagieren Cao et al., dass normale Zellen mit einer Zunahme der Proliferation auf PMA reagieren und Tumorzellen mit einer Abnahme. Dies laufe über einen COX-2 abhängigen Weg {Cao, 2009}. Vier der untersuchten Zelllinien reagierten mit einer Abnahme der Proliferation, zwei (UD4 und UD5) mit einer Zunahme der Proliferation. Da es sich sowohl bei der Zelllinie UD5 als auch bei der Zelllinie UD4 um etablierte Tumorzelllinien handelt, konnten diese Ergebnisse in vorliegender Arbeit nicht bestätigt werden. Allerdings ist zu erwähnen, dass der hier gezeigte Proliferationsschub zwar signifikant, mit wenigen Prozentpunkten jedoch nicht besonders aussagekräftig war.

TABELLE 31: EINTEILUNG DER ZELLINIEN NACH IHREM ANSPRECHEN AUF BESTRAHLUNG UND IHRER REAKTION AUF PMA-STIMULATION.

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Zelllinien	Cal, HN, UD3	UD7	UD4, UD5
Bestrahlung	Sensibel	Intermediär	Resistent
PMA	Antiproliferativ	Antiproliferativ	Proliferativ

Die guten Ergebnisse mit SKI-II bei UD3, UD4 und UD5 im Crystal-Violett-Assay decken sich mit den Daten von Sinah et al., die ebenfalls eine dosisabhängige Proliferationshemmung durch SKI-II in Kopf-Hals-Tumorzellen zeigen konnten {Sinha, 2011}. Bislang gab es keine Literatur, die sich mit dem klonogenen Überleben nach SKI-II-Behandlung in Kopf-Hals-Tumoren befasst. Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass der Effekt von SKI-II auf das Überleben der Zelllinien vergleichbar mit dem Einfluss auf die Proliferation war. UD3, UD4 und UD5 sprachen gut auf die Behandlung mit dem Inhibitor an, bei UD7 war die hohe Konzentration nötig und Cal und HN reagierten schlecht bzw. gar nicht auf den Inhibitor. Resistenzen von Kopf-Hals-Malignomen gegenüber dem SKI-II wurden bislang in der Literatur noch nicht beschrieben. Mit Cal konnte in dieser Arbeit erstmals eine resistente Kopf-Hals-Tumor-Zelllinie gezeigt werden. Im malignen Melanom hingegen konnten Madhunapantula et al. bereits Resistenzen gegen SKI-II in Bezug auf das Tumorstadium finden {Madhunapantula, 2012}. SKI-I war bei diesen Zellen jedoch wirksam, was vermuten lässt, dass der Inhibitor (SKI-II) und nicht der zu blockierende Signalweg in Frage gestellt werden.

Anhand der vorliegenden Daten zum Ansprechen auf SKI-II konnte das Schema aus Tab. 35 erweitert werden. Die Zelllinie UD3 bildete eine Ausnahme und bleibt in Tab. 36 außen vor.

TABELLE 32: EINTEILUNG DER ZELLINIEN NACH IHREM ANSPRECHEN AUF BESTRAHLUNG, IHRER REAKTION AUF PMA-STIMULATION SOWIE IHREM ANSPRECHEN AUF SKI-II-BEHANDLUNG.

	Gruppe1	Gruppe 2	Gruppe 3
Zelllinien	Cal, HN	UD7	UD4, UD5
Bestrahlung	Sensibel	Intermediär	Resistent
PMA	Antiproliferativ	Antiproliferativ	Proliferativ
SKI-II	Resistent	Intermediär	Sensibel

Wie zu erwarten, reagierten alle verwendeten Zelllinien mit einem Rückgang der Proliferation auf die Behandlung mit Cetuximab, was u.a. auf eine Internalisierung des Rezeptors

zurückzuführen ist {Cassell, 2010}. Auffällig war, dass Zelllinien, die gut auf den Inhibitor ansprechen, auch sehr gut auf Cetuximab ansprechen. Zelllinien, die gar nicht auf den Inhibitor ansprechen, sprachen auch nicht gut auf Cetuximab an, wohl aber auf ionisierende Strahlung. Das Schema wurde dementsprechend erweitert:

TABELLE 33: EINTEILUNG DER ZELLLINIEN NACH IHREM ANSPRECHEN AUF BESTRAHLUNG, IHRER REAKTION AUF PMA-STIMULATION UND IHREM ANSPRECHEN AUF SKI-II- BZW. CETUXIMAB-BEHANDLUNG.

	Gruppe1	Gruppe 2	Gruppe 3
Zelllinien	Cal, HN	UD7	UD4, UD5
Bestrahlung	Sensibel	Intermediär	Resistent
PMA	Antiproliferativ	Antiproliferativ	Proliferativ
SKI-II/Cetuximab	Resistent	Intermediär	Sensibel

In Bezug auf die Überwindung der Strahlenresistenz durch SKI-II konnten die Ergebnisse dieser Arbeit Daten aus der Literatur bestätigen {Sinha, 2011}. Auch die Strahlenresistenz der Zelllinie UD5 konnte durch SKI-II überwunden werden. Die Daten aus der Literatur beziehen sich jedoch nur auf die Proliferation und nicht auf das klonogene Überleben, insofern sind dies die ersten Daten, die die Strahlenresistenzüberwindung durch SKI-II auch in Bezug auf das klonogene Überleben zeigen.

Bislang gibt es keine Daten, die die Effizienz einer Cetuximab-Behandlung mit der einer SphK1-Inhibitorbehandlung vergleichen. Die in der vorliegenden Arbeit generierten Daten lassen vermuten, dass eine Cetuximab-Behandlung effektiver ist als eine Behandlung mit SKI-II. In höheren Dosen des Inhibitors kann in einigen Zelllinien auch SKI-II überlegen sein. Da die Zelllinie Cal allerdings auf Cetuximab anspricht, nicht aber auf SKI-II in hoher Dosierung, kann an dieser Stelle vermutet werden, dass Cetuximab eine bessere Wirkung hat. Um ein abschließendes vergleichendes Urteil über die Effizienz der Behandlungen fällen zu können, müssten mögliche Nebenwirkungen bedacht werden um entsprechende Dosierungen miteinander vergleichen zu können. Hierfür wäre ein Tiermodell nötig.

In der Literatur wird beschrieben, dass der S1P Signalweg dem RTK Signalweg vorgeschaltet ist {Shida, 2004 und 2005}, was dafür sprechen würde, dass die Hemmung der SphK1 effektiver sein müsste als eine EGFR-Blockade. Die Annahmen basieren darauf, dass es durch SphK1-Aktivierung zu einer Transaktivierung von RTKs über S1P-3 und MMPs kommt {Sukocheva, 2006}, {Shida, 2004 und 2005}. Da es im nachgeschalteten Signalweg von RTKs zu einer Aktivierung der ERK1/2 kommt {Kandala, 2011} und diese wiederum die SphK1 aktiviert {Pitson, 2003} schließt sich der Kreis jedoch auch auf der

anderen Seite. Die Überschneidungen dieser Signalwege sind also komplexer, als bisher angenommen (siehe hierzu auch Abb. 5). Aus diesem Grund war die kombinierte Hemmung beider Signalwege von besonderem Interesse.

Die strahlensensible Zelllinie Cal, die nicht bzw. nicht gut auf die Behandlung mit den Inhibitoren ansprach, reagierte auch nicht auf die Kombinationsbehandlung. Bei der Zelllinie UD5 hingegen, die strahlenresistent, aber sensibel für die chemischen Inhibitoren war, kam es durch die Kombinationsbehandlung zu einer enormen Verbesserung der Ergebnisse im Vergleich zur Einfachtherapie. Bereits in der **reduzierten** Dosis kam es durch eine Kombination der Inhibitoren zu einem Rückgang der Kolonienzahlen um 85,8%. Im Vergleich brachte die **hohe** (doppelte) Dosis Cetuximab nur einen Rückgang von 57% und die **hohe** (doppelte) Dosis SKI-II nur einen von 44,5%. Der Grund für dieses außergewöhnlich gute Ansprechen könnten die beschriebenen Überlappungen der Signalwege sein. Die Tatsache, dass die Resistenz gegenüber den chemischen Inhibitoren in Cal nicht durch die Kombination überwunden werden konnte, könnte dafür sprechen, dass die Resistenzmechanismen nicht auf den Amplifizierungsschleifen beruhen.

5.3. MIGRATION

Um das Migrationsverhalten der Zellen zu untersuchen, wurden Wound-Healing-Assays durchgeführt. Hierfür wird in eine konfluente Schale ein „Scratch“ gezogen, dieser fotografiert und anschließend mit Photoshop ermittelt, inwieweit er sich in einer vorher festgelegten Zeitspanne verkleinert hat. Es handelt sich um eine relativ einfache Methode, um das Migrationsverhalten der Zellen zu beurteilen. Alternativen zu diesem Versuch wären Boyden-Chambers gewesen. Die damit generierten Daten brachten jedoch eine zu große Streuung mit sich. Wegen der schlechten Ergebnisse in Kombination mit hohen Kosten und kurzer Haltbarkeit der Chambers wurde entschieden, Wound-Healing-Assays durchzuführen, die nach der Etablierung besser reproduzierbare Ergebnisse lieferten.

Für die Zelllinie Cal konnte eine zur Strahlendosis lineare Steigerung des Migrationsverhaltens beobachtet werden. Die Ergebnisse decken sich mit Daten aus der Literatur, die bei derselben Zelllinie den gleichen Effekt zeigten {Pickhard, 2011}. Im Gegensatz hierzu migrierte UD5 nach Bestrahlung nicht verstärkt. Es wurde bereits ein Zusammenhang zwischen erhöhter SphK1-Expression und verstärktem Migrationsverhalten beschrieben {Bao, 2012}. Die Ergebnisse dieser Arbeit decken sich damit. Bei Cal wird die

SphK1-Genexpression eine Stunde nach 8Gy Bestrahlung massiv hochreguliert, was die strahleninduzierte Migration erklärt. Bei UD5 wird die SphK1-Expression auf genetischer Ebene abreguliert und die strahleninduzierte Migration bleibt aus.

TABELLE 34: MIGRATIONSVERHALTEN DER ZELLINIEN CAL UND UD5 IN ABHÄNGIGKEIT VON IONISIERENDER STRAHLUNG SOWIE DIE REAKTION DER SPHK1-MRNA-EXPRESSION EINE STUNDE NACH BESTRAHLUNG.

	Cal	UD5
Ionisierende Strahlung	Migration ↑	Migration ↔
mRNA-Expression 1h nach Bestrahlung	SphK1 ↑	SphK1 ↓

Beide Zelllinien reagierten mit einer Steigerung der Migration auf PMA-Stimulation. Dieser Effekt konnte durch eine zusätzliche Bestrahlung noch weiter ausgebaut werden. PMA hat also eine sensibilisierende Wirkung auf die strahleninduzierte Migration. Da PMA die SphK1 PKC-abhängig aktiviert {Nakade, 2003} und die PKC das Migrationsverhalten der Zellen auf verschiedene Weisen fördert {O'Neill, 2011}, {Larsson, 2006} ist nicht eindeutig festzustellen, ob der migrationsfördernde Effekt von PMA auf der Aktivierung der SphK1 basiert oder ob über den PKC-Signalweg auch andere Mechanismen eine Rolle spielen.

Die Inhibitorbehandlung hatte je nach Zelllinie und Bestrahlungsdosis einen unterschiedlich stark ausgeprägt migrationshemmenden Effekt. In verschiedenen Studien wurden bereits migrationshemmende Effekte von Sphingosinkinase-Inhibitoren auf GBM-Zellen und Leberkarzinomzellen beschrieben {Kapitonov, 2009}, {Bao, 2012}. In diesen Studien wurde jedoch ein anderer spezifischer SphK1-Inhibitor verwendet. Mit dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Inhibitor wurde bisher nur für Endothelzellen ein vermindertes Migrationsverhalten beobachtet {Berdyshev, 2011}.

Auch Cetuximab hatte in unterschiedlichem Ausmaß einen migrationshemmenden Effekt auf die untersuchten Zelllinien. Pickhard et al. zeigten bereits eine Hemmung der strahleninduzierten Migration nach EGFR-Inhibition mit AG1478 an der Zelllinie Cal {Pickhard, 2011}, insofern liegen die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse mit Cetuximab nahe.

Für UD5 konnte bereits im Colony-Formation-Assay gezeigt werden, dass eine Kombinationsbehandlung besser ist als eine Einfachbehandlung. Dies konnte in den Migrationsversuchen bestätigt werden. Die besten Ergebnisse in Bezug auf die Migrationshemmung zeigten sich bei einer Kombinationsbehandlung aus SKI-II und

Cetuximab. Diese Ergebnisse zeigen, dass es bei UD5 eine Verbindung zwischen dem EGFR- und dem SphK1-Signalweg gibt und dass dieser verschiedene biologische Verhaltensweisen (Überleben und Migration) betrifft. Bei Cal hingegen kam es weder in den Überlebens- noch in den Migrationsversuchen zu additiven Effekten der jeweiligen Inhibitoren, was dafür spricht, dass die Verbindung der Signalwege bei Cal keine Konsequenzen für das Tumorzellverhalten hat.

5.4. WESTERN BLOT-ANALYSEN

Um die Auswirkungen auf die nachgeschalteten Signalwege besser zu verstehen, wurden WB-Analysen durchgeführt. Für WB-Analysen werden Zellen lysiert und anschließend bestimmte Proteine detektiert. Durch dieses Verfahren kann quantitativ festgestellt werden, welchen Einfluss unterschiedliche Behandlungen auf die Proteinexpression haben. Nachteil ist, dass nicht feststellbar ist, wo sich das jeweilige Protein in der Zelle befindet.

Es konnte gezeigt werden, dass es in beiden Zelllinien nach Cetuximab-Behandlung zu einer Aktivierung des EGFRs kommt. Diese Reaktion wurde bereits beschrieben {Mandic, 2006} und korreliert nicht notwendiger Weise mit einer Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege. Sowohl p-AKT also auch p-ERK1/2 ließen sich nach Cetuximab-Behandlung reduziert darstellen. Die Kombination aus beiden Inhibitoren milderte die EGFR-Phosphorylierung in UD5 ab, nicht jedoch in Cal. Dies könnte Ausdruck der effektiven Kombination in UD5 im Vergleich zur ineffektiven Kombination in Cal sein. Auffällig war, dass in UD5 Cetuximab zu einer Aufregulierung der SphK1 führte. Der entsprechende Effekt blieb in Cal aus. Dieser Mechanismus erklärt, warum die Kombination in UD5 so effektiv ist: im Rahmen der positiven Amplifizierungsschleifen wird bei einer Blockade des EGFRs die SphK1 kompensatorisch aufreguliert. Erst wenn beide Signalwege blockiert werden, tritt die maximale Wirkung ein (Abb. 35).

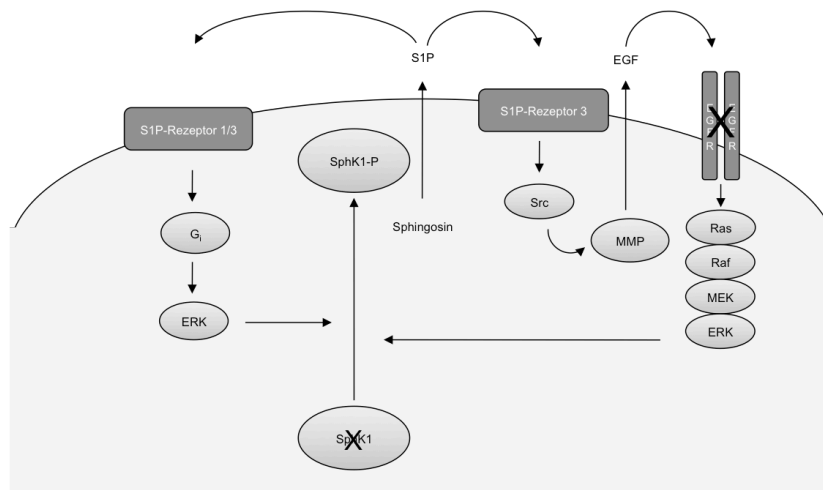


ABBILDUNG 35: UNTERBINDUNG DER AMPLIFIZIERUNGSSCHLEIFE ZWISCHEN DEN SIGNALWEGEN VON EGFRs UND SPHK1 DURCH EINE KOMBINATIONSBEHANDLUNG AUS CETUXIMAB UND SKI-II. ANHAND DIESES MODELS LÄSST SICH IN ANBETRACHT DER KOMPENSATORISCHEN AUFREGULIERUNG DER SPHK1 DURCH CETUXIMAB DIE GUTE WIRKSAMKEIT DER KOMBINATION ERKLÄREN.

Frühere Ergebnisse der Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass es unter Bestrahlung zu einer Aktivierung des EGFR-Signalweges kommt {Pickhard, 2011}. Um zu überprüfen wo sich die entsprechenden Proteine in der Zelle befinden wurden IF-Färbungen durchgeführt.

5.5 IMMUNFLUORESZENZ

In der Immunfluoreszenz werden Proteine in Zellen angefärbt, die zuvor auf Objektträgern angewachsen waren und unterschiedlich behandelt wurden. Vorteil dieses Verfahrens ist, dass nicht nur dargestellt werden kann, ob Protein vorhanden ist, sondern auch wo es in der Zelle lokalisiert ist. Dies ist insbesondere bei der SphK1 wichtig, da sich das Enzym im phosphorylierten (aktiven) Zustand an der Membran befindet. Wichtig ist es auch bei E-Cadherin, da bei diesem Protein nicht nur die Menge, sondern auch die Struktur von Bedeutung ist. Beim EGFR ist ebenfalls die Lokalisation von Bedeutung, da er an verschiedenen Orten der Zelle lokalisiert- unterschiedliche Funktionen erfüllen kann. Klarer Nachteil der Immunfluoreszenz ist, dass Aussagen über die Quantität von Proteinen nur eingeschränkt möglich sind, da innerhalb eines Schnittes unterschiedlich hohe Proteinlevel gefunden werden können und die Auswertung somit stark vom Untersucher abhängig ist.

24h nach einer Bestrahlung mit 8Gy wurde die SphK1 in UD5 vermehrt exprimiert. Die Tatsache, dass auf genetischer Eben die Expression der SphK1 unter Bestrahlung runter ging, könnte dadurch begründet werden, dass nicht nur Faktoren der Transkription, sondern auch der Translation eine Rolle spielen. An Zellen einer chronisch myeloischen Leukämie wurde gezeigt, dass eine Überexpression von SphK1 über den PI3K-, AKT2-, mTOR-Signalweg vermittelt wird {Marfe, 2011}. Durch Bestrahlung kommt es zu einer Aktivierung des EGFRs {Dent, 2003}, {Martinou, 2011}. Im nachgeschalteten Signalweg wird mTOR aktiviert und mTOR nimmt Einfluss auf die Translation von Proteinen {Hay, 2004}. Dieser Signalweg erklärt die Diskrepanz zwischen der Expression der SphK1 auf Gen- und Proteinebene nach Bestrahlung. Der vermehrten Membranständigkeit der SphK1 nach Bestrahlung könnte zugrunde liegen, dass es durch ionisierende Strahlen zu einer Aktivierung des EGFR kommt {Dent, 2003}, {Martinou, 2011} und im nachgeschalteten Signalweg zu einer Aktivierung der SphK1. Diese Aktivierung der SphK1 könnte für die Resistenzentwicklung von UD5 gegenüber Bestrahlung verantwortlich sein. Obwohl die SphK1 24h nach Bestrahlung vermehrt membranständig gefunden wird, kommt es dadurch nicht zu einer strahleninduzierten Migration. Grund hierfür könnte sein, dass die Migration früher induziert wird und die IF-Färbungen 24h nach Bestrahlung nicht den entscheidenden Moment aufnehmen.

Unter Bestrahlung kam es zwar zur Auflockerung, nicht jedoch zu einer Reduktion der E-Cadherin-Expression, was dem biologischen Bild des nicht strahleninduzierten Migrierens entspricht. Durch die physiologische EGF-Stimulation wurde die SphK1 vermehrt aktiv an der Membran gefunden. Die Zellen schienen mit der vermehrten, membranständigen SphK1 auseinander zu gehen, was die verstärkte Migration nach EGF-Stimulation erklärt. E-Cadherin verschwand nach EGF-Stimulation nahezu komplett. Diese Erkenntnis deckt sich mit Daten aus der Literatur zu Kopf-Hals-Tumoren {Lo, 2007} und weist darauf hin, dass der Mechanismus der gesteigerten Migration nach EGF-Stimulation durch dieses Protein vermittelt wird.

Durch EGF-Stimulation wanderten die Zellen auseinander und exprimierten zytoplasmatisch vermehrt EGFR. Wang et al. beschrieben bereits, dass eine Abregulierung von E-Cadherin in Kopf-Hals-Tumoren die Proliferation durch transkriptionelle Regulation des EGFR fördert {Wang, 2011}. Nach zusätzlicher Bestrahlung wanderte der Großteil des Proteins in den Kern. In den Kern translozierter EGFR hat Einfluss auf DNA-Reparaturmechanismen und reguliert die Transkription von Proteinen, die für Proliferation und für den Zellzyklus verantwortlich sind {Dittmann, 2010}. Eine Kombination aus EGF und Bestrahlung sollte also

zu einem verbesserten Überleben der Zellen führen. Leider konnte dies nicht im Colony-Formation-Assay gezeigt werden.

Auch durch PMA kam es zu einer verstärkten Membranständigkeit der SphK1 als Ausdruck der Aktivierung. Sowohl die proliferative Reaktion als auch die vermehrte Migrationsbereitschaft der Zellen decken sich mit dieser Beobachtung. Nach 8Gy waren die Zellen bereits weiter auseinander gerückt, SphK1 fand sich weiterhin an der Membran aber auch verstärkt zytoplasmatisch. Das Bild entspricht der Sensibilisierung für strahleninduzierte Migration durch erhöhte SphK1-Aktivität.

E-Cadherin wurde nach PMA-Stimulation zwar vermindert, aber dennoch deutlich exprimiert, wobei die Struktur stark aufgelockert war. Unter zusätzlicher Bestrahlung verstärkte sich dieses Bild. Die unterschiedlichen Einflüsse der Stimulantien auf E-Cadherin lassen vermuten, dass EGF und PMA auf unterschiedliche Weisen wirken. Während für die E-Cadherin-Reduktion durch EGF vor allem das embryonale Protein TWIST {Lo, 2007} und MMP-9 {Zuo, 2011} verantwortlich gemacht werden, propagieren He et al. für Prostatakarzinomzelllinien, dass PMA über einen PKC-abhängigen Weg zur Reduktion von E-Cadherin führt {He, 2010}. Da die SphK1 durch PMA-Stimulation ebenfalls PKC-abhängig hochreguliert wird und E-Cadherin vornehmlich aufgelockert und nicht abreguliert wurde, könnte der SphK1-Weg der Grund für die Auflockerung von E-Cadherin und die damit einhergehende verstärkte Migration sein.

Neben höheren zytoplasmatischen Konzentrationen des EGFRs führte die PMA-Behandlung zu einer vermehrten Anreicherung in der Kernregion. Dies lässt sich insofern erklären, als dass PKC, die von PMA aktiviert wird, den Transport des EGFRs von perinukleär nach nukleär reguliert {Dittmann, 2010}. Nach zusätzlicher Bestrahlung befand sich nahezu das gesamte Protein im Kern. Die Funktion des nukleären EGFRs erklärt den proliferativen Effekt von PMA.

Auch in der IF wurde SphK1 durch Cetuximab-Behandlung hochreguliert und fand sich vermehrt membranständig, was die Ergebnisse der WB-Untersuchung untermauert. Interessanter Weise konnte in der IF auch vermehrt EGFR nach SKI-II-Behandlung gefunden werden. Die Cetuximab-Behandlung wurde also durch eine Aufregulierung der SphK1 kompensiert und die SKI-II-Behandlung durch eine Aufregulierung des EGFRs. Dieser Zusammenhang kann erklären, warum die Kombinationsbehandlung aus beiden Inhibitoren so viel effektiver ist als eine Einfachbehandlung in höherer Dosierung (siehe hierzu auch Abb. 35). In den Western Blot-Analysen konnte dieser Mechanismus nur in Bezug auf

Cetuximab und SphK1 gefunden werden, nicht jedoch auf SKI-II und EGFR. Grund hierfür könnte der unterschiedliche Zeitpunkt der Messung sein (1h vs. 24h nach Behandlung).

Nach zusätzlicher Bestrahlung verschwand SphK1 nahezu völlig von der Membran, was vermuten lässt, dass die erhöhte Expression und Membranständigkeit der SphK1 durch Bestrahlung u.a. über den EGFR/ mTOR-Signalweg vermittelt wird. Die EGFR-Expression wurde durch die Cetuximab-Behandlung nicht beeinflusst, was in Widerspruch zu Daten aus der Literatur steht, die eine Degradierung des Rezeptors nach Cetuximab-Behandlung beschreiben {Dutta, 2007}, {Dai, 2013}. Nach zusätzlicher Bestrahlung verschwand der Rezeptor nahezu komplett, was wiederum kongruent ist mit den entsprechenden Daten.

Nach SKI-II Behandlung fand sich weniger membranständige SphK1 als Ausdruck der verminderten Aktivität. Auch die Proteinmenge, soweit in der IF beurteilbar, erschien reduziert, was kongruent ist mit den Daten von Ren et al. {Ren, 2010}. Die Daten decken sich mit den Analysen zum klonogenen Überleben und zeigen, dass der Effekt von SKI-II auf das Überleben der Zellen auch bei UD5 über eine verminderte Aktivität und Abregulierung der SphK1 wirkt. Nach Bestrahlung verschwand das Protein nahezu völlig. SKI-II verstärkt die lysosomale Degradierung von SphK1 und hat dabei keinen Einfluss auf die mRNA-Expression {Ren, 2010}. Ionisierende Strahlung führt zu verminderter mRNA-Expression, die Proteinexpression geht jedoch (vermutlich über eine Aktivierung des EGFR) hoch. Eine Kombination aus Bestrahlung und Inhibitor wirkt sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene, was die Überwindung der Strahlenresistenz erklärt.

E-Cadherin wurde nach SKI-II-Behandlung stark vermehrt exprimiert. Dies könnte das reduzierte Migrationsverhalten der Zellen nach Inhibitorbehandlung erklären. Durch zusätzliche Bestrahlung war zwar etwas mehr, aber ähnlich loses E-Cadherin wie bei der nur bestrahlten Färbung zu sehen, was erklärt, warum der Inhibitor im unbestrahlten Zustand eine bessere Wirkung zeigt.

Anhand der E-Cadherin-Färbung an der Zelllinie Cal konnte gezeigt werden, dass die strahleninduzierte Migration von Cal über eine Abregulation von E-Cadherin vermittelt wird. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der migrationshemmende Effekt von SKI-II ebenfalls über E-Cadherin vermittelt wird.

Abschließend kann die Aussage getroffen werden, dass es bei jedem Tumor sinnvoll ist, die Therapie um den SKI-II zu erweitern:

- I. Bei strahlenresistenten Tumoren kommt es durch SKI-II zu einer Abnahme von Proliferation, Überleben und Migration. Eine Kombination aus SKI-II und Cetuximab erweist sich aufgrund der überlappenden Signalwege als besonders effektiv.
- II. 2. Bei strahlensensiblen Tumoren wird durch die Bestrahlung in den überlebenden Klonen E-Cadherin abreguliert und dadurch Migration induziert. Diese strahleninduzierte Migration kann durch SKI-II eingedämmt werden indem E-Cadherin nach SKI-II-Behandlung aufreguliert wird.

5.5. AUSBLICK

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass der SphK1 in Kopf-Hals-Malignomen eine bedeutende Rolle zukommt. Es konnte gezeigt werden, dass sie sowohl mit Proliferation und Überleben als auch mit der Migration und der Strahlenresistenz der Zellen in Zusammenhang steht.

Die Tatsache, dass SKI-II oral bioverfügbar ist, im Blut 8h nachweisbar ist und bereits im Tiermodell zu einer signifikanten Reduzierung des Tumorwachstums geführt hat {French, 2006}, macht ihn zu einem möglichen neuen Akteur in der Antitumorthherapie. Da die SphK1 in Tumoren höher exprimiert wird als in Normalgewebe {French, 2003}, ist davon auszugehen, dass der Inhibitor Tumorzellen stärker angreift als gesundes Gewebe.

Eine Augmentation der Therapie durch SKI-II war bei allen Zelllinien sinnvoll. Bei strahlenresistenten Zelllinien hat SKI-II direkt in Bezug auf das klonogene Überleben und das Proliferationsverhalten der Zellen gute Ergebnisse gezeigt. Zusätzlich konnte er bei dieser Gruppe Resistenzen gegenüber ionisierender Strahlen überwinden. Bei strahlensensiblen Zelllinien konnte er indirekt die Therapie optimieren, da durch SKI-II Gabe eine Hemmung der strahleninduzierten Migration erzielt werden konnte. Jeder Tumor, der bestrahlt wird, könnte also auf die ein oder andere Weise in Kombination mit SKI-II besser therapiert werden.

Besonders profitieren würden Patienten, in deren Tumoren positive Amplifizierungsschleifen aktiv sind, wie etwa bei der Zelllinie UD5. Durch Cetuximab-Gabe konnten schon sehr gute Ergebnisse bei dieser Zelllinie erzielt werden. Bei zusätzlicher Gabe von SKI-II und einer damit einhergehenden Verhinderung der Kompensation durch die SphK1 waren die

Ergebnisse noch sehr viel besser als bei der Cetuximab-Monotherapie. Es ist also so, dass Zelllinien, deren Überleben und Migration durch Cetuximab gehemmt wird, von einer Kombination aus Cetuximab und SKI-II noch deutlich stärker profitieren als von der Einfachbehandlung. Die Kombination ist so wirksam, dass selbst nach einer Dosisreduktion um den Faktor 0,5 noch immer eine stärkere Wirkung als mit der Monotherapie erzielt werden kann. Durch eine Reduktion der Behandlungskonzentration könnte womöglich das Nebenwirkungsprofil von Cetuximab verbessert werden. Dies müsste allerdings im Tiermodell näher untersucht werden.

Um im Vorhinein erkennen zu können, welche Patienten auf welche Weise von einer Behandlung mit SKI-II profitieren können, wäre es sinnvoll mögliche Marker zu untersuchen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches stellen die vierthäufigste Tumorentität in Deutschland dar {Reiter, 2009}. Trotz verbesserter Therapiestandards bleiben noch immer nur 47% der Patienten langfristig tumorfrei {Bernier, 2004}. Um die Therapien zu optimieren und das Überleben der Patienten zu verbessern, ist es wichtig die Pathomechanismen der Tumorentstehung und Resistenzentwicklung besser zu verstehen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der Sphingosinkinase1 (SphK1) in Kopf-Hals-Tumoren mit Fokus auf einen möglichen Zusammenhang mit dem Ansprechen auf Bestrahlung und Überschneidungen mit dem EGFR-Signalweg untersucht. An sechs humanen Plattenepithelkarzinom-Zelllinien wurde das Expressionsverhalten der SphK1 und der S1P-Rezeptoren in Abhängigkeit von Bestrahlung mittels semiquantitativer RT-PCR analysiert. Anschließend wurden im Zellkulturmodell der EGFR- und SphK1-Signalweg stimuliert/blockiert und die Auswirkungen auf Proliferation, Überleben und das Migrationsverhalten in An- und Abwesenheit ionisierender Strahlen untersucht. Um den Einfluss auf die nachgeschalteten Signalwege zu erörtern, wurden Western Blot-Analysen und Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt.

Die untersuchten Zelllinien konnten in drei Gruppen eingeteilt werden: 1. strahlensensibel und resistent gegenüber der Inhibition mit Cetuximab und SKI-II 2. intermediär 3. strahlenresistent und sensibel gegenüber der Inhibition mit Cetuximab und SKI-II. In der 1. Gruppe kam es zur strahleninduzierten Migration der überlebenden Klone, vermittelt durch eine Abregulierung von E-Cadherin. Dieser Prozess konnte durch Gabe von Cetuximab und SKI-II verhindert werden. In der 3. Gruppe konnte die Migration durch die Inhibitoren ebenfalls reduziert werden. In dieser Gruppe zeigte eine Kombination der Inhibitoren eine enorme Steigerung der Wirksamkeit in Bezug auf das klonogene Überleben und das Migrationsverhalten, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass es nach Cetuximab-Behandlung zu einer kompensatorischen Aufregulierung der SphK1 kommt.

Abschließend kann die Aussage getroffen werden, dass die SphK1 eine wichtige Rolle bei Kopf-Hals-Tumoren spielt. Die spezifische Hemmung mit SKI-II ist nach den Ergebnissen aus der Zellkultur vielversprechend, das Potential kann jedoch erst nach weiterer Erprobung im Tiermodell beurteilt werden.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Ang, K. K., Harris, J., Wheeler, R., Weber, R., Rosenthal, D. I., Nguyen-Tan, P. F., Westra, W. H., Chung, C. H., Jordan, R. C., Lu, C., et al. (2010). Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 363, 24-35.
- Antoon, J. W., Meacham, W. D., Bratton, M. R., Slaughter, E. M., Rhodes, L. V., Ashe, H. B., Wiese, T. E., Burow, M. E., and Beckman, B. S. (2011). Pharmacological inhibition of sphingosine kinase isoforms alters estrogen receptor signaling in human breast cancer. *J Mol Endocrinol* 46, 205-216.
- Ballo, H., Koldovsky, P., Hoffmann, T., Balz, V., Hildebrandt, B., Gerharz, C. D., and Bier, H. (1999). Establishment and characterization of four cell lines derived from human head and neck squamous cell carcinomas for an autologous tumor-fibroblast in vitro model. *Anticancer Res* 19, 3827-3836.
- Bao, M., Chen, Z., Xu, Y., Zhao, Y., Zha, R., Huang, S., Liu, L., Chen, T., Li, J., Tu, H., and He, X. (2012). Sphingosine kinase 1 promotes tumour cell migration and invasion via the S1P/EDG1 axis in hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 32, 331-338.
- Baselga, J., Norton, L., Masui, H., Pandiella, A., Coplan, K., Miller, W. H., Jr., and Mendelsohn, J. (1993). Antitumor effects of doxorubicin in combination with anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *J Natl Cancer Inst* 85, 1327-1333.
- Berdyshev, E. V., Gorshkova, I., Usatyuk, P., Kalari, S., Zhao, Y., Pyne, N. J., Pyne, S., Sabbadini, R. A., Garcia, J. G., and Natarajan, V. (2011). Intracellular S1P generation is essential for S1P-induced motility of human lung endothelial cells: role of sphingosine kinase 1 and S1P lyase. *PLoS One* 6, e16571.
- Bernier, J., Domenge, C., Ozsahin, M., Matuszewska, K., Lefebvre, J. L., Greiner, R. H., Giralt, J., Maingon, P., Rolland, F., Bolla, M., et al. (2004). Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N Engl J Med* 350, 1945-1952.
- Bonnekoh, B., Wevers, A., Jugert, F., Merk, H., and Mahrle, G. (1989). Colorimetric growth assay for epidermal cell cultures by their crystal violet binding capacity. *Arch Dermatol Res* 281, 487-490.
- Bonner, J. A., Harari, P. M., Giralt, J., Azarnia, N., Shin, D. M., Cohen, R. B., Jones, C. U., Sur, R., Raben, D., Jassem, J., et al. (2006). Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 354, 567-578.
- Bootz, F., Howaldt, H.-P. Karzinome des oberen Aerodigestivtraktes. In: „Kurzgefasste Interdisziplinäre Leitlinien“, Deutsche Krebsgesellschaft, Garbe C., Adler G., Beckmann M., Bootz F., Creutzig U., Feyer P., Howaldt H.-P., Jakse G., Kloke M.,

- Kreienberg R., Schmiegel W. (Hrsg.) W. Zuckschwerdt Verlag , München, Wien, New York, 2008, 6. Auflage. 17-28.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Califano, J., van der Riet, P., Westra, W., Nawroz, H., Clayman, G., Piantadosi, S., Corio, R., Lee, D., Greenberg, B., Koch, W., and Sidransky, D. (1996). Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 56, 2488-2492.
- Cao, H. J. (2009). COX-2, Cell Proliferation and PMA in Head-and-Neck Cancer Cells. *Immun, Endoc & Metab Agents in Med Chem* 9, 203-218.
- Cassell, A., and Grandis, J. R. (2010). Investigational EGFR-targeted therapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Expert Opin Investig Drugs* 19, 709-722.
- Chaachouay, H., Ohneseit, P., Toulany, M., Kehlbach, R., Multhoff, G., and Rodemann, H. P. (2011). Autophagy contributes to resistance of tumor cells to ionizing radiation. *Radiother Oncol* 99, 287-292.
- Chmura, S. J., Nodzenski, E., Beckett, M. A., Kufe, D. W., Quintans, J., and Weichselbaum, R. R. (1997). Loss of ceramide production confers resistance to radiation-induced apoptosis. *Cancer Res* 57, 1270-1275.
- Chung, C. H., Zhang, Q., Hammond, E. M., Trotti, A. M., 3rd, Wang, H., Spencer, S., Zhang, H. Z., Cooper, J., Jordan, R., Rotman, M. H., and Ang, K. K. (2011). Integrating Epidermal Growth Factor Receptor Assay With Clinical Parameters Improves Risk Classification for Relapse and Survival in Head-and-Neck Squamous Cell Carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 81, 331-338.
- Coons, A. H. C., H. J. & Jones, R. N, Berliner, E (1942). The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody. *J Immunol*, 159-170.
- Cornelius C., Andratschke M., Leunig A., Hilscher C. Neck Dissection. In „Manuale Kopf-Hals-Malignome“, Mast G., Zimmermann F., Ihreler S., Matthias C., Kolk A. (Hrsg.) W. Zuckschwerdt Verlag , München, Wien, New York, 2009. 4. Auflage, 52-59.
- Dai, W., Li, Y., Zhou, Q., Xu, Z., Sun, C., Tan, X., and Lu, L. (2013). Cetuximab inhibits oral squamous cell carcinoma invasion and metastasis via degradation of epidermal growth factor receptor. *J Oral Pathol Med*.
- Daly, T., Poulsen, M. G., Denham, J. W., Peters, L. J., Lamb, D. S., Krawitz, H., Hamilton, C., Keller, J., Tripcony, L., and Walker, Q. (2003). The effect of anaemia on efficacy and normal tissue toxicity following radiotherapy for locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiother Oncol* 68, 113-122.

- Dent, P., Yacoub, A., Contessa, J., Caron, R., Amorino, G., Valerie, K., Hagan, M. P., Grant, S., and Schmidt-Ullrich, R. (2003). Stress and radiation-induced activation of multiple intracellular signaling pathways. *Radiat Res* 159, 283-300.
- Dittmann, K., Mayer, C., Kehlbach, R., and Rodemann, H. P. (2008). Radiation-induced caveolin-1 associated EGFR internalization is linked with nuclear EGFR transport and activation of DNA-PK. *Mol Cancer* 7, 69.
- Dittmann, K., Mayer, C., and Rodemann, H. P. (2010). Nuclear EGFR as novel therapeutic target: insights into nuclear translocation and function. *Strahlenther Onkol* 186, 1-6.
- Doll, F., Pfeilschifter, J., and Huwiler, A. (2005). The epidermal growth factor stimulates sphingosine kinase-1 expression and activity in the human mammary carcinoma cell line MCF7. *Biochim Biophys Acta* 1738, 72-81.
- Doll, F., Pfeilschifter, J., and Huwiler, A. (2007). Prolactin upregulates sphingosine kinase-1 expression and activity in the human breast cancer cell line MCF7 and triggers enhanced proliferation and migration. *Endocr Relat Cancer* 14, 325-335.
- Dutta, P. R., and Maity, A. (2007). Cellular responses to EGFR inhibitors and their relevance to cancer therapy. *Cancer Lett* 254, 165-177.
- Endo, K., Igarashi, Y., Nisar, M., Zhou, Q. H., and Hakomori, S. (1991). Cell membrane signaling as target in cancer therapy: inhibitory effect of N,N-dimethyl and N,N,N-trimethyl sphingosine derivatives on in vitro and in vivo growth of human tumor cells in nude mice. *Cancer Res* 51, 1613-1618.
- Facchinetti, M. M., Gandini, N. A., Fermento, M. E., Sterin-Speziale, N. B., Ji, Y., Patel, V., Gutkind, J. S., Rivadulla, M. G., and Curino, A. C. (2010). The expression of sphingosine kinase-1 in head and neck carcinoma. *Cells Tissues Organs* 192, 314-324.
- Falasca, M., Logan, S. K., Lehto, V. P., Baccante, G., Lemmon, M. A., and Schlessinger, J. (1998). Activation of phospholipase C gamma by PI 3-kinase-induced PH domain-mediated membrane targeting. *EMBO J* 17, 414-422.
- French, K. J., Schrecengost, R. S., Lee, B. D., Zhuang, Y., Smith, S. N., Eberly, J. L., Yun, J. K., and Smith, C. D. (2003). Discovery and evaluation of inhibitors of human sphingosine kinase. *Cancer Res* 63, 5962-5969.
- French, K. J., Upson, J. J., Keller, S. N., Zhuang, Y., Yun, J. K., and Smith, C. D. (2006). Antitumor activity of sphingosine kinase inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 318, 596-603.
- Gellrich N.-C., Gutwald R., Winterer J., Henne K., Digel W., Maier W., Schipper J., Henß H. (2004). Kopf-Hals-Tumoren, Empfehlung zur standardisierten Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Tumorzentrum Freiburg (Hrsg.), 2004, 1. Auflage. 1-31
- Gioanni, J., Fischel, J. L., Lambert, J. C., Demard, F., Mazeau, C., Zanghellini, E., Ettore, F., Formento, P., Chauvel, P., Lalanne, C. M., and et al. (1988). Two new human tumor cell lines derived from squamous cell carcinomas of the tongue: establishment,

- characterization and response to cytotoxic treatment. *Eur J Cancer Clin Oncol* 24, 1445-1455.
- Grandis, J. R., and Tweardy, D. J. (1993). Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res* 53, 3579-3584.
- Greenberg, J. S., Fowler, R., Gomez, J., Mo, V., Roberts, D., El Naggar, A. K., and Myers, J. N. (2003). Extent of extracapsular spread: a critical prognosticator in oral tongue cancer. *Cancer* 97, 1464-1470.
- Guillermet-Guibert, J., Davenne, L., Pchejetski, D., Saint-Laurent, N., Brizuela, L., Guilbeau-Frugier, C., Delisle, M. B., Cuvillier, O., Susini, C., and Bousquet, C. (2009). Targeting the sphingolipid metabolism to defeat pancreatic cancer cell resistance to the chemotherapeutic gemcitabine drug. *Mol Cancer Ther* 8, 809-820.
- Hatanpaa, K. J., Burma, S., Zhao, D., and Habib, A. A. (2010). Epidermal growth factor receptor in glioma: signal transduction, neuropathology, imaging, and radioresistance. *Neoplasia* 12, 675-684.
- Hay, N., and Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 18, 1926-1945.
- He, H., Davidson, A. J., Wu, D., Marshall, F. F., Chung, L. W., Zhau, H. E., He, D., and Wang, R. (2010). Phorbol ester phorbol-12-myristate-13-acetate induces epithelial to mesenchymal transition in human prostate cancer ARCaPE cells. *Prostate* 70, 1119-1126.
- Higo, M., Uzawa, K., Kawata, T., Kato, Y., Kouzu, Y., Yamamoto, N., Shibahara, T., Mizoe, J. E., Ito, H., Tsujii, H., and Tanzawa, H. (2006). Enhancement of SPHK1 in vitro by carbon ion irradiation in oral squamous cell carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 65, 867-875.
- Hobson, J. P., Rosenfeldt, H. M., Barak, L. S., Olivera, A., Poulton, S., Caron, M. G., Milstien, S., and Spiegel, S. (2001). Role of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 in PDGF-induced cell motility. *Science* 291, 1800-1803.
- Hu, W. M., Li, L., Jing, B. Q., Zhao, Y. S., Wang, C. L., Feng, L., and Xie, Y. E. (2010). Effect of S1P5 on proliferation and migration of human esophageal cancer cells. *World J Gastroenterol* 16, 1859-1866.
- Huang, Y. L., Huang, W. P., and Lee, H. (2011). Roles of sphingosine 1-phosphate on tumorigenesis. *World J Biol Chem* 2, 25-34.
- Hunter, K. D., Parkinson, E. K., and Harrison, P. R. (2005). Profiling early head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 5, 127-135.
- Huwiler, A., Doll, F., Ren, S., Klawitter, S., Greening, A., Romer, I., Bubnova, S., Reinsberg, L., and Pfeilschifter, J. (2006). Histamine increases sphingosine kinase-1 expression and activity in the human arterial endothelial cell line EA.hy 926 by a PKC-alpha-dependent mechanism. *Biochim Biophys Acta* 1761, 367-376.

- Igarashi, Y., Hakomori, S., Toyokuni, T., Dean, B., Fujita, S., Sugimoto, M., Ogawa, T., el-Ghendy, K., and Racker, E. (1989). Effect of chemically well-defined sphingosine and its N-methyl derivatives on protein kinase C and src kinase activities. *Biochemistry* 28, 6796-6800.
- Ihrler W., Weiler C. Tumorentitäten und pathologische Grundlagen. In „Manuale Kopf-Hals-Malignome“, Deutsche Krebsgesellschaft, Garbe C., Adler G., Beckmann M., Bootz F., Creutzig U., Feyer P., Howaldt H.-P., Jakse G., Kloke M., Kreienberg R., Schmiegel W. (Hrsg.) W. Zuckschwerdt Verlag, München, Wien, New York, 2008, 6. Auflage. 1-8.
- Kandala, P. K., Wright, S. E., and Srivastava, S. K. (2011). Blocking EGFR activation suppresses ovarian tumor growth in vitro and in vivo. *J Pharmacol Exp Ther.*
- Kapitonov, D., Allegood, J. C., Mitchell, C., Hait, N. C., Almenara, J. A., Adams, J. K., Zipkin, R. E., Dent, P., Kordula, T., Milstien, S., and Spiegel, S. (2009). Targeting sphingosine kinase 1 inhibits Akt signaling, induces apoptosis, and suppresses growth of human glioblastoma cells and xenografts. *Cancer Res* 69, 6915-6923.
- Kim, T. R., Cho, E. W., Paik, S. G., and Kim, I. G. (2012). Hypoxia-induced SM22alpha in A549 cells activates the IGF1R/PI3K/Akt pathway, conferring cellular resistance against chemo- and radiation therapy. *FEBS Lett.*
- Kramer, S., Gelber, R. D., Snow, J. B., Marcial, V. A., Lowry, L. D., Davis, L. W., and Chandler, R. (1987). Combined radiation therapy and surgery in the management of advanced head and neck cancer: final report of study 73-03 of the Radiation Therapy Oncology Group. *Head Neck Surg* 10, 19-30.
- Kwok, T. T., and Sutherland, R. M. (1989). Enhancement of sensitivity of human squamous carcinoma cells to radiation by epidermal growth factor. *J Natl Cancer Inst* 81, 1020-1024.
- Lampugnani, M. G. (1999). Cell migration into a wounded area in vitro. *Methods Mol Biol* 96, 177-182.
- Larsson, C. (2006). Protein kinase C and the regulation of the actin cytoskeleton. *Cell Signal* 18, 276-284.
- Leibniz-Institut (2011). Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. (www.dsmz.de/catalogues/catalogue-human-and-animal-cell-lines) Stand: 15.11.2011
- Leong, W. I., and Saba, J. D. (2010). S1P metabolism in cancer and other pathological conditions. *Biochimie* 92, 716-723.
- Li, C., Iida, M., Dunn, E. F., Ghia, A. J., and Wheeler, D. L. (2009). Nuclear EGFR contributes to acquired resistance to cetuximab. *Oncogene* 28, 3801-3813.
- Lin, C. J., Grandis, J. R., Carey, T. E., Gollin, S. M., Whiteside, T. L., Koch, W. M., Ferris, R. L., and Lai, S. Y. (2007). Head and neck squamous cell carcinoma cell lines: established models and rationale for selection. *Head Neck* 29, 163-188.

- Liu, F., Verin, A. D., Wang, P., Day, R., Wersto, R. P., Chrest, F. J., English, D. K., and Garcia, J. G. (2001). Differential regulation of sphingosine-1-phosphate- and VEGF-induced endothelial cell chemotaxis. Involvement of G(α 2)-linked Rho kinase activity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 24, 711-719.
- Liu, H., Toman, R. E., Goparaju, S. K., Maceyka, M., Nava, V. E., Sankala, H., Payne, S. G., Bektas, M., Ishii, I., Chun, J., et al. (2003). Sphingosine kinase type 2 is a putative BH3-only protein that induces apoptosis. *J Biol Chem* 278, 40330-40336.
- Lo, H. W., Hsu, S. C., Xia, W., Cao, X., Shih, J. Y., Wei, Y., Abbruzzese, J. L., Hortobagyi, G. N., and Hung, M. C. (2007). Epidermal growth factor receptor cooperates with signal transducer and activator of transcription 3 to induce epithelial-mesenchymal transition in cancer cells via up-regulation of TWIST gene expression. *Cancer Res* 67, 9066-9076.
- Lundberg, M., Leivo, I., Saarilahti, K., Makitie, A. A., and Mattila, P. S. (2011). Increased incidence of oropharyngeal cancer and p16 expression. *Acta Otolaryngol* 131, 1008-1011.
- Madhunapantula, S. V., Hengst, J., Gowda, R., Fox, T. E., Yun, J. K., and Robertson, G. P. (2012). Targeting Sphingosine Kinase-1 To Inhibit Melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*.
- Mandic, R., Rodgarkia-Dara, C. J., Zhu, L., Folz, B. J., Bette, M., Weihe, E., Neubauer, A., and Werner, J. A. (2006). Treatment of HNSCC cell lines with the EGFR-specific inhibitor cetuximab (Erbix) results in paradox phosphorylation of tyrosine 1173 in the receptor. *FEBS Lett* 580, 4793-4800.
- Marfe, G., Di Stefano, C., Gambacurta, A., Ottone, T., Martini, V., Abruzzese, E., Mologni, L., Sinibaldi-Salimei, P., de Fabritis, P., Gambacorti-Passerini, C., et al. (2011). Sphingosine kinase 1 overexpression is regulated by signaling through PI3K, AKT2, and mTOR in imatinib-resistant chronic myeloid leukemia cells. *Exp Hematol* 39, 653-665 e656.
- Martinou, M., Giannopoulou, E., Malatara, G., Argyriou, A. A., Kalofonos, H. P., and Kardamakis, D. (2011). Ionizing radiation affects epidermal growth factor receptor signalling and metalloproteinase secretion in glioma cells. *Cancer Genomics Proteomics* 8, 33-38.
- Maruta, H., and Burgess, A. W. (1994). Regulation of the Ras signalling network. *Bioessays* 16, 489-496.
- Mendelsohn, J., and Baselga, J. (2003). Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *J Clin Oncol* 21, 2787-2799.
- Milas, L., Mason, K., Hunter, N., Petersen, S., Yamakawa, M., Ang, K., Mendelsohn, J., and Fan, Z. (2000). In vivo enhancement of tumor radioresponse by C225 anti-epidermal growth factor receptor antibody. *Clin Cancer Res* 6, 701-708.

- Nakade, Y., Banno, Y., K, T. K., Hagiwara, K., Sobue, S., Koda, M., Suzuki, M., Kojima, T., Takagi, A., Asano, H., et al. (2003). Regulation of sphingosine kinase 1 gene expression by protein kinase C in a human leukemia cell line, MEG-O1. *Biochim Biophys Acta* 1635, 104-116.
- Nava, V. E., Cuvillier, O., Edsall, L. C., Kimura, K., Milstien, S., Gelmann, E. P., and Spiegel, S. (2000). Sphingosine enhances apoptosis of radiation-resistant prostate cancer cells. *Cancer Res* 60, 4468-4474.
- Nordsmark, M., Bentzen, S. M., Rudat, V., Brizel, D., Lartigau, E., Stadler, P., Becker, A., Adam, M., Molls, M., Dunst, J., et al. (2005). Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. An international multi-center study. *Radiother Oncol* 77, 18-24.
- O'Neill, A. K., Gallegos, L. L., Justilien, V., Garcia, E. L., Leitges, M., Fields, A. P., Hall, R. A., and Newton, A. C. (2011). Protein kinase Calpha promotes cell migration through a PDZ-dependent interaction with its novel substrate discs large homolog 1 (DLG1). *J Biol Chem* 286, 43559-43568.
- Ogretmen, B., and Hannun, Y. A. (2001). Updates on functions of ceramide in chemotherapy-induced cell death and in multidrug resistance. *Drug Resist Updat* 4, 368-377.
- Ogretmen, B., and Hannun, Y. A. (2004). Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat Rev Cancer* 4, 604-616.
- Okada, T., Kashino, G., Nishiura, H., Tano, K., and Watanabe, M. (2012). Micronuclei Formation Induced by X-ray Irradiation Does not Always Result from DNA Double-strand Breaks. *J Radiat Res (Tokyo)*.
- P, O. c., Modjtahedi, H., Rhys-Evans, P., Court, W. J., Box, G. M., and Eccles, S. A. (2000). Epidermal growth factor-like ligands differentially up-regulate matrix metalloproteinase 9 in head and neck squamous carcinoma cells. *Cancer Res* 60, 1121-1128.
- Paugh, S. W., Paugh, B. S., Rahmani, M., Kapitonov, D., Almenara, J. A., Kordula, T., Milstien, S., Adams, J. K., Zipkin, R. E., Grant, S., and Spiegel, S. (2008). A selective sphingosine kinase 1 inhibitor integrates multiple molecular therapeutic targets in human leukemia. *Blood* 112, 1382-1391.
- Pchejetski, D., Doumerc, N., Golzio, M., Naymark, M., Teissie, J., Kohama, T., Waxman, J., Malavaud, B., and Cuvillier, O. (2008). Chemosensitizing effects of sphingosine kinase-1 inhibition in prostate cancer cell and animal models. *Mol Cancer Ther* 7, 1836-1845.
- Pchejetski, D., Golzio, M., Bonhoure, E., Calvet, C., Doumerc, N., Garcia, V., Mazerolles, C., Rischmann, P., Teissie, J., Malavaud, B., and Cuvillier, O. (2005). Sphingosine kinase-1 as a chemotherapy sensor in prostate adenocarcinoma cell and mouse models. *Cancer Res* 65, 11667-11675.

- Pectasides, E., Rampias, T., Kountourakis, P., Sasaki, C., Kowalski, D., Fountzilas, G., Zaramboukas, T., Rimm, D., Burtness, B., and Psyrri, A. (2011). Comparative prognostic value of epidermal growth factor quantitative protein expression compared with FISH for head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 17, 2947-2954.
- Petit, A. M., Rak, J., Hung, M. C., Rockwell, P., Goldstein, N., Fendly, B., and Kerbel, R. S. (1997). Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. *Am J Pathol* 151, 1523-1530.
- Pickhard, A. C., Margraf, J., Knopf, A., Stark, T., Piontek, G., Beck, C., Boulesteix, A. L., Scherer, E. Q., Pigorsch, S., Schlegel, J., et al. (2011). Inhibition of radiation induced migration of human head and neck squamous cell carcinoma cells by blocking of EGF receptor pathways. *BMC Cancer* 11, 388.
- Pigorsch, R., Wypior, Zimmermann (2009). Allgemeine Grundsätze der Strahlentherapie. In *Manuale Kopf-Hals-Malignome*, D.D.G. Mast, ed. (München: Prof. Dr. Frank Zimmermann), pp. 70-77.
- Pitson, S. M., Moretti, P. A., Zebol, J. R., Lynn, H. E., Xia, P., Vadas, M. A., and Wattenberg, B. W. (2003). Activation of sphingosine kinase 1 by ERK1/2-mediated phosphorylation. *EMBO J* 22, 5491-5500.
- Pitson, S. M., Xia, P., Leclercq, T. M., Moretti, P. A., Zebol, J. R., Lynn, H. E., Wattenberg, B. W., and Vadas, M. A. (2005). Phosphorylation-dependent translocation of sphingosine kinase to the plasma membrane drives its oncogenic signalling. *J Exp Med* 201, 49-54.
- Psyrri, A., Yu, Z., Weinberger, P. M., Sasaki, C., Haffty, B., Camp, R., Rimm, D., and Burtness, B. A. (2005). Quantitative determination of nuclear and cytoplasmic epidermal growth factor receptor expression in oropharyngeal squamous cell cancer by using automated quantitative analysis. *Clin Cancer Res* 11, 5856-5862.
- Puck, T. T., Marcus, P. I., and Cieciura, S. J. (1956). Clonal growth of mammalian cells in vitro; growth characteristics of colonies from single HeLa cells with and without a feeder layer. *J Exp Med* 103, 273-283.
- Pyne, N. J., and Pyne, S. (2010). Sphingosine 1-phosphate and cancer. *Nat Rev Cancer* 10, 489-503.
- Ramachandran, S., Shida, D., Nagahashi, M., Fang, X., Milstien, S., Takabe, K., and Spiegel, S. (2010). Lysophosphatidic acid stimulates gastric cancer cell proliferation via ERK1-dependent upregulation of sphingosine kinase 1 transcription. *FEBS Lett* 584, 4077-4082.
- Reiter H., Harreus U., Matthias C., Hölzel D. Epidemiologie. In: „Manuale Kopf-Hals-Malignome“, Mast G., Zimmermann F., Ihreler S., Matthias C., Kolk A. (Hrsg.) W. Zuckschwerdt Verlag , München, Wien, New York, 2009. 4. Auflage, 9-13.

- Ren, S., Xin, C., Pfeilschifter, J., and Huwiler, A. (2010). A novel mode of action of the putative sphingosine kinase inhibitor 2-(p-hydroxyanilino)-4-(p-chlorophenyl) thiazole (SKI II): induction of lysosomal sphingosine kinase 1 degradation. *Cell Physiol Biochem* 26, 97-104.
- Renart, J., Reiser, J., and Stark, G. R. (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 3116-3120.
- Rodriguez-Murphy, E., Villanueva-Herraiz, S., Ortega-Garcia, M. P., Perez-Feliu, A., Lopez-Montenegro Soria, M. A., and Camps-Herrero, C. (2011). [Cutaneous toxicity associated with cetuximab treatment in metastatic colorectal cancer]. *Farm Hosp* 35, 114-120.
- Röper, B., Hölzel D. Prognostische Parameter. In: „Manuale Kopf-Hals-Malignome“, Mast G., Zimmermann F., Ihreler S., Matthias C., Kolk A. (Hrsg.) W. Zuckschwerdt Verlag, München, Wien, New York, 2009. 4. Auflage, 18-21.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Sarkar, S., Maceyka, M., Hait, N. C., Paugh, S. W., Sankala, H., Milstien, S., and Spiegel, S. (2005). Sphingosine kinase 1 is required for migration, proliferation and survival of MCF-7 human breast cancer cells. *FEBS Lett* 579, 5313-5317.
- Sartor, M., Steingrimsdottir, H., Elamin, F., Gaken, J., Warnakulasuriya, S., Partridge, M., Thakker, N., Johnson, N. W., and Tavassoli, M. (1999). Role of p16/MTS1, cyclin D1 and RB in primary oral cancer and oral cancer cell lines. *Br J Cancer* 80, 79-86.
- Sauer, L., Nunes, J., Salunkhe, V., Skalska, L., Kohama, T., Cuvillier, O., Waxman, J., and Pchejetski, D. (2009). Sphingosine kinase 1 inhibition sensitizes hormone-resistant prostate cancer to docetaxel. *Int J Cancer* 125, 2728-2736.
- Seo, J., Koo, N. Y., Choi, W. Y., Kang, J. A., Min, J. H., Jo, S. H., Lee, S. J., Oh, S. B., Kim, J. S., Lee, J. H., et al. (2010). Sphingosine-1-phosphate signaling in human submandibular cells. *J Dent Res* 89, 1148-1153.
- Shida, D., Kitayama, J., Yamaguchi, H., Yamashita, H., Mori, K., Watanabe, T., and Nagawa, H. (2005). Lysophospholipids transactivate HER2/neu (erbB-2) in human gastric cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 327, 907-914.
- Shida, D., Kitayama, J., Yamaguchi, H., Yamashita, H., Mori, K., Watanabe, T., Yatomi, Y., and Nagawa, H. (2004). Sphingosine 1-phosphate transactivates c-Met as well as epidermal growth factor receptor (EGFR) in human gastric cancer cells. *FEBS Lett* 577, 333-338.
- Shida, D., Takabe, K., Kapitonov, D., Milstien, S., and Spiegel, S. (2008). Targeting SphK1 as a new strategy against cancer. *Curr Drug Targets* 9, 662-673.

- Shirai, K., Kaneshiro, T., Wada, M., Furuya, H., Bielawski, J., Hannun, Y. A., Obeid, L. M., Ogretmen, B., and Kawamori, T. (2011). A role of sphingosine kinase 1 in head and neck carcinogenesis. *Cancer Prev Res (Phila)* 4, 454-462.
- Sinha, U. K., Schorn, V. J., Hochstim, C., Chinn, S. B., Zhu, S., and Masood, R. (2011). Increased radiation sensitivity of head and neck squamous cell carcinoma with sphingosine kinase 1 inhibition. *Head Neck* 33, 178-188.
- Sobin, L. H., and Compton, C. C. (2010). TNM seventh edition: what's new, what's changed: communication from the International Union Against Cancer and the American Joint Committee on Cancer. *Cancer* 116, 5336-5339.
- Spiegel, S., and Milstien, S. (2003). Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 397-407.
- Sukocheva, O., Wadham, C., Holmes, A., Albanese, N., Verrier, E., Feng, F., Bernal, A., Derian, C. K., Ullrich, A., Vadas, M. A., and Xia, P. (2006). Estrogen transactivates EGFR via the sphingosine 1-phosphate receptor Edg-3: the role of sphingosine kinase-1. *J Cell Biol* 173, 301-310.
- Sukocheva, O. A., Wang, L., Albanese, N., Pitson, S. M., Vadas, M. A., and Xia, P. (2003). Sphingosine kinase transmits estrogen signaling in human breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 17, 2002-2012.
- Sweeney, E. A., Sakakura, C., Shirahama, T., Masamune, A., Ohta, H., Hakomori, S., and Igarashi, Y. (1996). Sphingosine and its methylated derivative N,N-dimethylsphingosine (DMS) induce apoptosis in a variety of human cancer cell lines. *Int J Cancer* 66, 358-366.
- Taylor, D., Koch, W. M., Zahurak, M., Shah, K., Sidransky, D., and Westra, W. H. (1999). Immunohistochemical detection of p53 protein accumulation in head and neck cancer: correlation with p53 gene alterations. *Hum Pathol* 30, 1221-1225.
- Uht, R. M., Amos, S., Martin, P. M., Riggan, A. E., and Hussaini, I. M. (2007). The protein kinase C-eta isoform induces proliferation in glioblastoma cell lines through an ERK/Elk-1 pathway. *Oncogene* 26, 2885-2893.
- Van Brocklyn, J. R., Jackson, C. A., Pearl, D. K., Kotur, M. S., Snyder, P. J., and Prior, T. W. (2005). Sphingosine kinase-1 expression correlates with poor survival of patients with glioblastoma multiforme: roles of sphingosine kinase isoforms in growth of glioblastoma cell lines. *J Neuropathol Exp Neurol* 64, 695-705.
- Visentin, B., Vekich, J. A., Sibbald, B. J., Cavalli, A. L., Moreno, K. M., Matteo, R. G., Garland, W. A., Lu, Y., Yu, S., Hall, H. S., et al. (2006). Validation of an anti-sphingosine-1-phosphate antibody as a potential therapeutic in reducing growth, invasion, and angiogenesis in multiple tumor lineages. *Cancer Cell* 9, 225-238.
- Vivanco, I., and Sawyers, C. L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 489-501.

- Vogel, C., and Marcotte, E. M. (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet* 13, 227-232.
- Wang, D., Su, L., Huang, D., Zhang, H., Shin, D. M., and Chen, Z. G. (2011). Downregulation of E-Cadherin enhances proliferation of head and neck cancer through transcriptional regulation of EGFR. *Mol Cancer* 10, 116.
- Wang, M., Morsbach, F., Sander, D., Gheorghiu, L., Nanda, A., Benes, C., Kriegs, M., Krause, M., Dikomey, E., Baumann, M., et al. (2011). EGF receptor inhibition radiosensitizes NSCLC cells by inducing senescence in cells sustaining DNA double-strand breaks. *Cancer Res* 71, 6261-6269.
- Woolgar, J. A. (2006). Histopathological prognosticators in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 42, 229-239.
- Wu, X., Fan, Z., Masui, H., Rosen, N., and Mendelsohn, J. (1995). Apoptosis induced by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in a human colorectal carcinoma cell line and its delay by insulin. *J Clin Invest* 95, 1897-1905.
- Wu, X., Rubin, M., Fan, Z., DeBlasio, T., Soos, T., Koff, A., and Mendelsohn, J. (1996). Involvement of p27KIP1 in G1 arrest mediated by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody. *Oncogene* 12, 1397-1403.
- Yang, X. D., Jia, X. C., Corvalan, J. R., Wang, P., and Davis, C. G. (2001). Development of ABX-EGF, a fully human anti-EGF receptor monoclonal antibody, for cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 38, 17-23.
- Zhang, N., Erjala, K., Kulmala, J., Qiu, X., Sundvall, M., Elenius, K., and Grenman, R. (2009). Concurrent cetuximab, cisplatin, and radiation for squamous cell carcinoma of the head and neck in vitro. *Radiother Oncol* 92, 388-392.
- Zuo, J. H., Zhu, W., Li, M. Y., Li, X. H., Yi, H., Zeng, G. Q., Wan, X. X., He, Q. Y., Li, J. H., Qu, J. Q., et al. (2011). Activation of EGFR promotes squamous carcinoma SCC10A cell migration and invasion via inducing EMT-like phenotype change and MMP-9-mediated degradation of E-cadherin. *J Cell Biochem* 112, 2508-2517.

8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abbildung 1: Pathogenese von Kopf-Hals-Malignomen auf molekularer Ebene.** Das invasive Karzinom entwickelt sich aus prämaligen Vorläuferläsionen durch eine Kumulation von Mutationen..... 10
- Abbildung 2: Signalvermittlung durch EGFR.** Eine Aktivierung des EGFRs beeinflusst über verschiedene Signalwege das biologische Verhalten von Zellen. Details siehe Text. 17
- Abbildung 3: Die Sphingolipidreostase.** Die Abbildung zeigt den Auf- und Abbau von Sphingolipiden mit den beteiligten Enzymen. Details siehe Text.20
- Abbildung 4: Signalvermittlung der S1P-Rezeptoren.** S1P wirkt autokrin und parakrin als Ligand an fünf membranständigen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, S1P 1-5. In den nachgeschalteten Signalwegen werden Proliferation, Migration, Angiogenese und Autophagie beeinflusst. Da S1P-4 nur in lymphatischen Geweben exprimiert wird, bleibt er in dieser Abbildung außer Acht.21
- Abbildung 5: SphK1-Amplifizierungsschleifen.** Die SphK ist Teil verschiedener Amplifizierungsschleifen. Ihr Produkt, S1P führt über S1P-1 und -3 Rezeptoren zu einer autostimulation via ERK. S1P kann außerdem RTK transaktivieren und auch auf diese Weise in den nachgeschalteten Signalwegen zu einer Autoaktivierung führen. Details siehe Text.23
- Abbildung 6: Veranschaulichung der Auswertung der Wound-Healing-Assays am Beispiel der Zelllinie Cal.** Die zellfreie Fläche wurde nach 12h mit Photoshop Anhand der Pixelzahl ermittelt und mit dem jeweiligen Ausgangswert verglichen. 43
- Abbildung 7: Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR.** Je Zelllinie sind drei Banden zu sehen: die erste zeigt die mRNA-Expression der unbestrahlten Kontrolle, die zweite zeigt die mRNA-Expression 1h nach 8Gy Bestrahlung, die dritte zeigt die mRNA-Expression 24h nach 8Gy Bestrahlung. Als Housekeeping-Gen wurde die GAPDH aufgetragen. Details siehe Text..... 49
- Abbildung 8: Einfluss von EGF auf das Überleben in Abhängigkeit von ionisierender Strahlung.** Mit Ausnahme von UD7 reagierten alle Zelllinien mit einem Rückgang der Proliferation auf die EGF-Stimulation.51
- Abbildung 9: Einfluss von PMA auf die Proliferation.** Die Zelllinien Cal, HN, UD3 und UD7 reagierten bei jeder Strahlendosis mit einem Rückgang der Proliferation auf die PMA-Stimulation. Bei UD4 und UD5 kam es durch die PMA-Stimulation mit Ausnahme vom unbestrahlten Ansatz der Zelllinie UD4 zu einem Proliferationsschub: UD4: Ctrl: $p = 0,0001$, 5Gy: $p = 0,0038$, 8Gy: $p = 0,0071$ UD5: Ctrl: $p = 0,0206$, 5Gy: $p = 0,0010$, 8Gy:

- p = 0,2005. Die Signifikanz bezieht sich jeweils auf den unbehandelten Wert derselben Strahlendosis..... 52
- Abbildung 10: Einfluss von SKI-II in zwei verschiedenen Konzentrationen auf die Proliferation der Zelllinien in Abhängigkeit von 5Gy und 8Gy Bestrahlung.** Die Zelllinien sprachen unterschiedlich gut auf SKI-II an. UD3, UD4 und UD5 reagierten bereits auf die niedrige Dosierung, bei HN und UD7 war die Hohe Dosis nötig und Cal war gänzlich resistent gegenüber SKI-II. Details siehe Text. Die Angabe des Signifikanzniveaus bezieht sich jeweils auf den unbehandelten Wert derselben Strahlendosis..... 53
- Abbildung 11: Einfluss von Cetuximab auf die Proliferation in Abhängigkeit von ionisierender Strahlung.** Cetuximab wirkte bei allen Zelllinien unabhängig von der strahlendosis antiproliferativ. Die Angabe des Signifikanzniveaus bezieht sich jeweils auf den unbehandelten Wert derselben Strahlendosis. 54
- Abbildung 12: Einfluss von ionisierender Strahlung auf das klonogene Überleben.** Die Bestrahlung führte in allen Zelllinien zu einem Rückgang des klonogenen Überlebens. Bei UD5 war eine Dosis von 8Gy nötig um das Überleben signifikant zu reduzieren. Bei der Zelllinie UD4 konnte selbst mit einer Dosis von 8Gy nur ein Rückgang des klonogenen Überlebens von 21% (p = 0,0094) erzielt werden. Details siehe Text. 57
- Abbildung 13: Einfluss von EGF auf das klonogen Überleben in Abhängigkeit von ionisierender Strahlung.** EGF-Stimulation führte bei allen Zelllinien zu einem Rückgang des klonogenen Überlebens. Signifikanzen konnten bei Cal, UD3, UD5 und UD7 nachgewiesen werden. Die Angabe des Signifikanzniveaus bezieht sich jeweils auf den unbehandelten Wert derselben Strahlendosis. 58
- Abbildung 14: Einfluss von PMA auf das klonogene Überleben in Abhängigkeit von ionisierender Strahlung.** Mit Ausnahme von UD4 und UD5 verringerte die PMA-Stimulation das klonogene Überleben der Zelllinien. Das Signifikanzniveau bezieht sich jeweils auf den unbehandelten Wert derselben Strahlendosis..... 59
- Abbildung 15: Einfluss von SKI-II auf das klonogene Überleben.** Cal und HN zeigten eine Resistenz gegenüber dem Inhibitor. Bei der Zelllinie UD7 war eine Konzentration von 2,5µM nötig..... 60
- Abbildung 16: Einfluss von SKI-II auf das klonogene Überleben in Abhängigkeit von ionisierender Strahlung.** Details siehe Text. Die Angabe der Signifikanzniveaus bezieht sich jeweils auf den unbehandelten Wert derselben Strahlendosis..... 61
- Abbildung 17: Verhalten von UD5 bei Bestrahlung und zusätzlicher SKI-II-Behandlung.** Die Abbildung zeigt das klonogen Überleben nach 5Gy und 8Gy Bestrahlung jeweils allein und in Kombination mit SKI-II. Im statistischen Vergleich zwischen alleiniger Bestrahlung und der Kombination ergeben sich folgende p-Werte : p = 0,0138 für 5Gy und p < 0,0001 für 8Gy..... 62
- Abbildung 18: Einfluss von Cetuximab auf das klonogene Überleben in Abhängigkeit von ionisierender Strahlung.** Cetuximab reduzierte in allen Zelllinien in unterschiedlichem Ausmaß das klonogene Überleben. Details siehe text. Die Angabe

- des Signifikanzniveaus bezieht sich jeweils auf den unbehandelten Wert derselben Strahlendosis..... 63
- Abbildung 19: Klonogenes Überleben der Zelllinie Cal nach Behandlung mit SKI-II, Cetuximab und der Kombination aus beidem.** Das linke Diagramm zeigt die Ergebnisse in den niedrigen Konzentrationen (Cet. 0,07µM, SKI-II 0,5µM), das rechte Diagramm die Ergebnisse in den hohen Konzentrationen (Cet. 0,14µM, SKI-II 1µM). Eine Kombination aus beiden Inhibitoren konnte den Effekt kaum verbessern. 65
- Abbildung 20: Klonogenes Überleben der Zelllinie UD5 nach SKI-II/Cetuximab-Behandlung und einer Kombination aus beidem.** Das linke Diagramm zeigt die Ergebnisse in den niedrigen Konzentrationen (Cet 0,07µM, SKI-II 0,5µM), das rechte die Ergebnisse in den hohen Konzentrationen (Cet 0,14µM, SKI-II 1µM). Durch die Kombination der Inhibitoren konnte der Effekt auf das klonogene Überleben signifikant verbessert werden. Details siehe Text. 66
- Abbildung 21: die Abbildung zeigt das Migrationsverhalten der Zellen nach 5Gy und 8Gy Bestrahlung.** Bei Cal steigt das Migrationsverhalten linear zur Strahlendosis an. Im Gegensatz dazu bleibt das Migrationsverhalten von UD5 von der Bestrahlung unbeeinflusst. 67
- Abbildung 22: Einfluss von EGF auf das Proliferationsverhalten von Cal und UD5.** Bei der Zelllinie UD5 konnte das Migrationsverhalten durch EGF stimulation gesteigert werden, bei Cal blieb dieser Effekt aus. Details siehe Text. 68
- Abbildung 23: Einfluss von PMA auf das Migrationsverhalten von Cal und UD5 in Abhängigkeit von ionisierender Strahlung.** PMA steigerte die Migrationsbereitschaft von UD5, nicht jedoch die von Cal. Details siehe Text..... 69
- Abbildung 24: Migrationsverhalten von Cal und UD5 nach SKI-II-Behandlung in Abhängigkeit ionisierender Strahlen..... 69**
- Abbildung 25: Migrationsverhalten von Cal und UD5 nach Cetuximab-behandlung in Abhängigkeit ionisierender Strahlen..... 70**
- Abbildung 26: Einfluss einer Kombination aus Cetuximab und SKI-II auf die Migration von Cal.** Das linke Diagramm zeigt die Ergebnisse aus der unbestrahlten Kontrolle, das rechte die nach 8Gy Bestrahlung. Durch eine Kombination der Inhibitoren kam es nicht zu einer Verstärkung des migrationshemmenden Effekts. Die Angabe der Signifikanz bezieht sich jeweils auf dieselbe Strahlendosis. 71
- Abbildung 27: Einfluss einer Kombination aus Cetuximab und SKI-II auf die Migration der Zelllinie UD5.** Das linke Diagramm zeigt die Ergebnisse aus der unbestrahlten Kontrolle, das rechte die nach 8Gy Bestrahlung. Durch die Kombination der Inhibitoren konnte eine Verstärkung des migrationshemmenden Effekts von SKI-II und Cetuximab erzielt werden. Die Angabe der Signifikanz bezieht sich jeweils auf dieselbe Strahlendosis..... 72
- Abbildung 28: Western Blot-Analysen zu den Zelllinien Cal und UD5. (Details siehe Text) 73**

Abbildung 29: IF-Färbung der SphK1 in UD5 nach EGF- und PMA-Stimulation in Abhängigkeit von 8Gy Bestrahlung. Vergrößerung: 20x, Maßstabsbalken: 100µM..74

Abbildung 30: IF-Färbung der SphK1 in UD5 nach Cetuximab- und SKI-II-Behandlung in Abhängigkeit von 8Gy Bestrahlung. Vergrößerung: 20x, Maßstabsbalken: 100µM.
..... 75

Abbildung 31: IF-Färbung des EGFRs bei UD5 nach EGF- und PMA-Stimulation in Abhängigkeit von 8Gy Bestrahlung. Vergrößerung: 20x, Maßstabsbalken: 100µM..76

Abbildung 32: IF-Färbung des EGFRs bei UD5 nach Cetuximab- und SKI-II-Behandlung in Abhängigkeit von 8Gy Bestrahlung. Vergrößerung: 20x, Maßstabsbalken: 100µM.
..... 77

Abbildung 33: IF-Färbung von E-Cadherin bei UD5 nach EGF- und PMA-Stimulation in Abhängigkeit von 8Gy Bestrahlung. Vergrößerung: 40x, Maßstabsbalken: 50µM.... 78

Abbildung 34: IF-Färbung von E-Cadherin bei UD5 nach Cetuximab- und SKI-II-Behandlung in Abhängigkeit von 8Gy Bestrahlung. Vergrößerung: 40x, Maßstabsbalken: 50µM..... 79

Abbildung 35: Unterbindung der Amplifizierungsschleife zwischen den Signalwegen von EGFRs und SphK1 durch eine Kombinationsbehandlung aus Cetuximab und SKI-II. Anhand dieses Modells lässt sich in anbetracht der kompensatorischen Aufregulierung der SphK1 durch Cetuximab die gute Wirksamkeit der Kombination erklären. 89

9. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: pT-Klassifikation der UICC.	8
Tabelle 2: pN-Klassifikation der UICC.	8
Tabelle 3: pM-Klassifikation der UICC.	8
Tabelle 4: Definition des R-Faktors.	8
Tabelle 5: Stadieneinteilung von Kopf-Hals-Tumoren.	9
Tabelle 6: Grading von Kopf-Hals-Tumoren.	9
Tabelle 7: Klassifikation und Indikationen von Neck-Dissections.	13
Tabelle 8: Verwendete Zelllinien. Im Folgenden werden die Zelllinien zur Übersicht abgekürzt.....	30
Tabelle 9: Zusammensetzung Zell-Lyse-Puffer 10x konzentriert.	31
Tabelle 10: Zusammensetzung Anodenpuffer I.	31
Tabelle 11: Zusammensetzung Anodenpuffer II.	31
Tabelle 12: Zusammensetzung Kathodenpuffer.	32
Tabelle 13: Zusammensetzung Antikörper-Verdünnungs-und-Blocking-Puffers.	32
Tabelle 14: Verwendete Wachstumsfaktoren und Inhibitoren	32
Tabelle 15: Verwendete Primer.	33
Tabelle 16: Verwendete Primärantikörper.	34
Tabelle 17: Verwendete Sekundärantikörper.	34
Tabelle 18: RNA-Mix.	38
Tabelle 19: RT-Mix.	38
Tabelle 20: PCR-Master Mix.	39
Tabelle 21: Anzahl der Zyklen für die entsprechenden Gene in der semiquantitativen RT-PCR.	40
Tabelle 22: Zusammensetzungen der Trenngele.	45
Tabelle 23: Zusammensetzung des Sammelgels.	45
Tabelle 24: Definition der Signifikanzniveaus.	47

Tabelle 25: Einfluss von ionisierender Strahlung auf das Proliferationsverhalten der Zelllinien. Gezeigt ist jeweils der prozentuale Wert im Vergleich zur Kontrolle. Die Bestrahlung führte in allen untersuchten Zelllinien zu einem dosisabhängigen Rückgang der Proliferation.....	50
Tabelle 26: Vergleich der Wirksamkeit von Cetuximab und SKI-II in Bezug auf das Proliferationsverhalten. Die niedrige Dosierung von SKI-II war der Cetuximab-Behandlung unterlegen. In der hohen Dosierung konnten mit Ausnahme von Cal und HN mit dem Inhibitor bessere Ergebnisse erzielt werden als mit Cetuximab.....	55
Tabelle 27: Vergleich der Wirksamkeit von Cetuximab und SKI-II in Bezug auf das klonogene Überleben.....	64
Tabelle 28: Wirkung von Cetuximab und SKI-II auf die Migration im Vergleich.....	70
Tabelle 29: Wirkung von Cetuximab und SKI-II auf die Migration im Vergleich nach 8Gy Bestrahlung.	70
Tabelle 30: Einteilung der Zelllinien nach ihrem Ansprechen auf Bestrahlung.	83
Tabelle 31: Einteilung der Zelllinien nach ihrem Ansprechen auf Bestrahlung und ihrer Reaktion auf PMA-Stimulation.	84
Tabelle 32: Einteilung der Zelllinien nach ihrem Ansprechen auf Bestrahlung, ihrer Reaktion auf PMA-Stimulation sowie ihrem Ansprechen auf SKI-II-Behandlung..	84
Tabelle 33: Einteilung der Zelllinien nach ihrem Ansprechen auf Bestrahlung, ihrer Reaktion auf PMA-Stimulation und ihrem Ansprechen auf SKI-II- bzw. Cetuximab-Behandlung.....	85
Tabelle 34: Migrationsverhalten der Zelllinien Cal und UD5 in Abhängigkeit von ionisierender Strahlung sowie die Reaktion der SphK1-mRNA-Expression eine Stunde nach Bestrahlung.....	87

10. DANKSAGUNG

Herrn Univ.-Prof. Dr. Henning Bier danke ich für die Möglichkeit, an diesem spannenden Thema unter besten Bedingungen im onkologischen Labor der Hals-Nasen-Ohren-Klinik des Klinikums rechts der Isar zu arbeiten.

Frau Priv.-Doz. Dr. Anja Pickhard danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, Großzügigkeit und Geduld, die sie mir trotz ihrer Belastung in Klinik und Forschung entgegen brachte. Vielen Dank für die schnelle Durchsicht meines Manuskripts und die regelmäßige Möglichkeit, aktuelle Themen in der Laborbesprechung diskutieren zu können.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Elias Scherer danke ich für die Vermittlung und Einführung sowie für die herzliche Unterstützung während meiner Arbeit.

Großer Dank gilt Herrn Guido Piontek, der mich in die Methodik einführte und mir stets als kompetenter Gesprächspartner zur Seite stand. Ich danke ihm für seine große Hilfsbereitschaft und die schnelle Durchsicht und Korrektur meines Manuskripts.

Herrn Univ.-Prof. Dr. Michael Molls danke ich für die Möglichkeit die Strahlenversuche in der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und radiologische Onkologie der Technischen Universität München durchführen zu können.