

Fakultät für Medizin an der Technischen Universität München

Hals-Nasen-Ohrenklinik und Poliklinik
des Klinikums rechts der Isar

**Molekulare Mechanismen der strahleninduzierten Migration und
Invasion bei Plattenepithelkarzinomen
des Kopf-Hals-Bereichs (HNSCC)**

Dominik Christian Schüttler

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

Vorsitzender:

Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

- 1) Priv.-Doz. Dr. Anja C. Pickhard
- 2) Prof. Dr. Stephanie E. Combs

Die Dissertation wurde am 23.05.2016 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 15.02.2017
angenommen.

Meiner lieben Familie

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
3q, 7p, 7q, 8p, 9p, 10q, 11q 14p, 18q,	beschreibt Chromosomennummer mit kurzem (p) und langem (q) Chromosomenarm
4E-BP1	eukaryontischer Initiationsfaktor 4E - Bindeprotein 1
5-FU	5-Fluoruracil, ein Chemotherapeutikum
A.	Arteria
Abb.	Abbildung
AG	Aktiengesellschaft
AKT	eine Kinase, auch Proteinkinase B genannt
ALDH	Aldehyd-Dehydrogenase
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AML	Akute Myeloische Leukämie
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-activated protein kinase
AP-1	activator protein 1, ein Transkriptionsfaktor
APC	Adenomatous-polyposis-coli protein
APS	Ammoniumperoxidsulfat
Arf6	ADP-ribosylation factor 6
AS160	Akt substrate of 160 kDa, auch TBC1 domain family member 4 genannt
ASK1	Apoptosis signal-regulating kinase 1, eine MAP3K
ATP	Adenosintriphosphat
Axin	axis inhibition protein
BAD	Bcl-2-associated death promoter protein
bcl-2	B-cell lymphoma 2
BSA	Bovine Serum Albumin
C-Lobe	Carboxyl-Ende des Proteins
c-myc	ein Transkriptionsfaktor
CA	Kalifornien
CA	Karzinom

ca.	circa
Casp9	Caspase 9
CBP80	cap binding protein 80
CCND1	Gen das Zyklin D1 codiert
CCT β	chaperonin containing TCP1, subunit 2
CD	Cluster of Differentiation (Einteilung von Oberflächenproteinen der Zelle)
CDK	Cyklin dependent kinase
CDKN2A	Gen das p16 codiert
cDNA	complementary DNA
Chr.	Chromosom
CIN	chromosomale Instabilität
CK1 α	Casein Kinase 1 α
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CREB	cAMP response element-binding protein, ein Transkriptionsfaktor
CSC	Cancer Stem Cell
CSMD1	CUB and Sushi multiple domains 1
ctrl	Kontrolle
CTx	Chemotherapie
d	Tag
dest.	destilliert
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DTT	Dithiotreitol
E6,E7	virale Onkogene des HPV
ECM	Extrazellulärmatrix
eEF2	eukaryontischer Elongationsfaktor 2
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor

eIF4	eukaryontischer Initiationsfaktor 4
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase
ErbB	Familie von Rezeptor Tyrosin Kinasen, u.a. EGFR; wird auch Her genannt
ERK	extracellular-signal-regulated kinases; auch MAPK genannt
et al.	et alii
FACS	Fluorescence-activated cell sorting, Durchflusszytometrie
FAK	Focal Adhesion Kinase
FBS	Fetal Bovine Serum
FCS	Fetal Calf Serum
FDA	Food and Drug Administration, amerikanische Arzneimittelbehörde
FGF	Fibroblast Growth Factor
FITC	fluorescein isothiocyanate
FOXO	Forkhead box protein der Klasse O
G	Grading, Grad der Differenzierung des Tumors
g	Gramm
GAP	GTPase activating protein
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanine nucleotide exchange factors
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
GSK3 β	Glykogen Synthase Kinase 3 β
GTP	Guanosintriphosphat
Gy	Gray
h	Stunde
Hb	Hämoglobin
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma (engl. für Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches)
HPV	humanes Papillomvirus

HRP	Horseradish peroxidase
IB	Immunoblot
IgG	Immunglobulin G
IL-1 β	Interleukin 1 β
Inc.	Incorporation
inf.	inferior
int.	interna
IP	Immunpräzipitation
IRS1	Insulin Rezeptor Substrat 1
JNK	c-Jun NH ₂ -terminal Kinase
kDa	Kilo-Dalton
kV	Kilovolt
l	Liter
LEF/TCF	T-cell factor/lymphoid enhancer factor, Transkriptionsfaktor
LRP5/6	Low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6
M	Molar
M.	Musculus
MA	Massachusetts
mA	Milliampere
MAP2K	Mitogen Activated Protein Kinase Kinase (u.a MEK)
MAP3K	Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase (u.a Raf)
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase (u.a ERK)
MDM2	mouse double minute 2 homolog
MEK	auch MAPKK = Mitogen-activated protein kinase kinase
MEKK1	Proteinkinase, aktiviert MKK4 und 7 und ist eine MAP3K
MET	Proteinkinase auch HGFR (hepatocyte growth factor receptor) genannt
mg	Milligramm
min	Minute
MKK	eine MAP2K
ml	Milliliter
MLK3	Proteinkinase, aktiviert MKK7 und ist eine MAP3K

mLST8	mammalian lethal with SEC13 protein 8, auch GβL genannt
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MMP	Matrix Metallo Proteinasen
MO	Missouri
mRNA	massenger RNA
mt	mutiert
mTOR	mammalian target of rapamycin
mTORC	mamallian target of rapamycin complex
N-Lobe	Amino-Terminus des Proteins
N.	Nervus
Nanog	bestimmter Transkriptionsfaktor bei Stammzellen
NC	North Carolina
NCC	Nierenzellkarzinom
NFκB	Transkriptionsfaktor: <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NJ	New Jersey
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	non-obese diabetic
Oct4	Octamer-binding transcription factor 4
OR	Odds Ratio
p.a.	pro analysi
p+Protein	phosphoryliertes Protein
p14	Protein 14 auch ARF tumor suppressor genannt
p16	Protein 16 auch cyclin dependent kinase inhibitor 2A genannt
p27	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
p38	P38 mitogen-activated protein kinases
p63	tumor protein 63
p90RSK	p90 ribosomal s6 kinase
PDCD4	Programmed cell death protein
PDGF	Platelet derived Growth Factor

PDK1	Phosphoinositide-dependent kinase-1
PIK3, PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PIK3CA	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha
PIKK	Phosphatidylinositol kinase related kinases
PIP2	Phosphatidylinosito-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-trisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PNET	neuroendokriner Tumor pankreatischen Ursprungs
PRAS40	Protein, das mTOR inhibiert
Proc.	Processus
PTB	Phosphotyrosin-Bindedomäne
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative Polymerase Kettenreaktion
R	Residualzustand des Tumors nach Therapie
Rac	ein G-Protein
Raf	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma; eine Proteinkinase
Raptor	Regulatory-associated protein of mTOR
Ras	Rat Sarcoma, G-Protein
RB	Retinoblastom-Protein
RCTx	Radiochemotherapie
REDD1/2	regulated in development and DNA damage responses 1/2, inhibiert mTOR
Rheb	Ras homolog enriched in brain, ein GTP-Bindeprotein
Rho	ein G-Protein
Rictor	Rapamycin-insensitive companion of mammalian target of rapamycin
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute
RR	Relatives Risiko

RTK	Rezeptor Tyrosin Kinase
RTx	Bestrahlungstherapie
s	Sekunde
s.	siehe
s.o.	siehe oben
SAPK	Stress-activated Protein Kinase
SCC	Squamous Cell Carcinoma (engl. für Plattenepithelkarzinom)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Ser	Serin
SH2-Domäne	Src-homolog 2 Domäne
Sin1	Protein im mTORC2
SKAR	auch POLDIP3 Polymerase delta-interacting protein 3
SMAD4	Zellprotein
SNAI1	auch snail genannt, ein Zinkfingerprotein
SNAI2	auch slug genannt, ein Zinkfingerprotein
Sos	Son of Sevenless protein
SOX2	SRY (sex determining region Y)-box 2
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3, Transkriptionsfaktor
T-ALL	akute T-Zell Leukämie
Tab.	Tabelle
TCF8	siehe ZEB-1
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TERT	Telomerase Reverse Transkriptase
TF	Transkriptionsfaktor
TGFβ	Tumor Growth Factor β
Thr	Threonin
Tis	T-Stadium mit Carcinoma in situ
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
TNM	Tumor-Klassifikation nach Tumorgröße (T), Lymphknotenbefall (N) und Metastasen (M)
TP53	Tumorprotein 53

tp63	tumor protein 63
TSC	Tuberous Sclerosis Protein
TTBS	Tris-Tween Buffered Saline
TX	Texas
Tyr	Tyrosin
U	Units
u.a.	unter anderem
u./o.	und/oder
UICC	Union internationale contre le cancer
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vgl.	vergleiche
WA	Washington
WHO	World Health Organization
Wnt-Signalweg	bestimmter Zellsignalweg mit dem Signalprotein Wnt
wt	wild type
z. B.	zum Beispiel
ZEB-1	Zinc finger E-box binding homeobox 1, auch TCF8 genannt
ZO-1	zonula occludens protein 1
ZPF	Zentrum für präklinische Forschung
μl	Mikroliter
μg	Mikrogramm
μM	Mikromolar

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
Inhaltsverzeichnis	11
1. Einleitung	14
1.1. Problemstellung	14
1.2. Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich	16
1.2.1. Epidemiologie	16
1.2.2. TNM-Klassifikation und UICC-Stadien	17
1.2.3. Ätiologie und Risikofaktoren	22
1.2.4. Molekularpathologie	24
1.2.5. Therapie	26
1.2.6. Prognosefaktoren	27
1.3. Der Epidermal Growth Factor Rezeptor und nachgeschaltete Signalwege	28
1.3.1. Rezeptortyrosinkinasen und der EGF-Rezeptor	28
1.3.2. AKT-Signalweg	30
1.3.3. Mitogen-activated protein (MAP)-Kinasen Signalwege	33
1.4. Mammalian target of rapamycin (mTOR) als Steuereinheit der Proteinbiosynthese	34
1.5. Glykogen Synthase Kinase 3 β (GSK3 β)	39
1.6. Krebsstammzellen (CSCs) und ihre Marker	41
1.7. Epitheliale-mesenchymale Transition (EMT)	43
1.8. Zielsetzung	44
2. Material und Methoden	45
2.1. Material	45
2.1.1. Zelllinien	45
2.1.2. Inhibitoren	45
2.1.3. Primär- und Sekundärantikörper	46
2.1.4. Reagenzien	49
2.1.5. Verbrauchsmaterialien	54
2.1.6. Kits	54

2.1.7. Laborgeräte	55
2.1.8. Computerprogramme	56
2.2. Methoden	57
2.2.1. Zellkultur	57
2.2.2. Bestrahlung	58
2.2.3. Proliferationsanalysen: modifizierter <i>Crystal-Violett ELISA</i>	59
2.2.4. Klonogenes Überleben: <i>Colony Formation Assay</i>	60
2.2.5. Bestimmung des Zellmigrationsverhaltens: <i>Wound Healing Assay</i>	60
2.2.6. Züchtung von Sphäroiden aus der Cal27 Zelllinie: 3D-Zellkultur	61
2.2.7. Immunfluoreszenz der Sphäroide mit E-Cadherin	62
2.2.8. Proteinisolation	62
2.2.9. Bestimmung der Proteinmenge: Bradford Assay	63
2.2.10. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	64
2.2.11. Western Blot mittels Semidry-Blot System	65
2.2.12. Immundetektion	66
2.2.13. Immunpräzipitation	67
2.2.14. Invasionskammer	68
2.2.15. Statistische Auswertungen	68
3. Ergebnisse	70
3.1. Biologische Analysen: klonogenes Überleben, Proliferation und Migration	70
3.2. Western Blot Analysen und Wound Healing Assays zum Migrationsverhalten	76
3.3. Immunfluoreszenz von Tumorsphäroiden	82
3.4. Western Blot Analysen zur Proliferationsabnahme unter Bestrahlung	84
3.5. Der Einfluss fraktionierter Bestrahlung auf Proliferation, klonogenes Überleben, Migration und Invasion	86
3.6. Proteinexpression wichtiger Tumorzellsignalwege unter fraktionierter Bestrahlung	91
3.7. Auftreten von Tumorstammzellmarkern durch fraktionierte Bestrahlung	93
3.8. EMT: Immunfluoreszenz und Western Blot Analysen bei fraktionierter Bestrahlung	94
3.9. EMT- und CSC-Marker unter Signalwegsinhibition	95

4. Diskussion	97
4.1. Einfluss einmaliger Bestrahlung auf das Migrationsverhalten	98
4.2. Einfluss einmaliger Bestrahlung auf das Proliferationsverhalten	102
4.3. Wirkung fraktionierter Bestrahlung auf das Proliferationsverhalten	107
4.4. Wirkung fraktionierter Bestrahlung auf das Migrationsverhalten	107
4.5. Wirkung fraktionierter Bestrahlung auf Invasion und epitheliale-mesenchymale Transition	109
4.6. Auftreten von Zellen mit Tumorstammzell-ähnlichen Eigenschaften unter fraktionierter Bestrahlung	111
4.7. AKT- und ERK-Inhibition reduzieren EMT und CSC-Marker	112
5. Zusammenfassung	114
6. Anhang	116
6.1. Danksagung	116
6.2. Tabellenverzeichnis	117
6.3. Abbildungsverzeichnis	118
6.4. Literaturverzeichnis	120

1. Einleitung

1.1. Problemstellung

Kopf-Hals-Tumoren stellen mit weltweit geschätzt mehr als 650.000 Neuerkrankungen und 350.000 Todesfällen pro Jahr die sechst größte Tumorentität dar (Thornton, Pedraza-Alva et al. 2008, Ferlay, Shin et al. 2010). 90 % dieser heterogenen Gruppe sind histologisch betrachtet Plattenepithelkarzinome (HNSCC = head and neck squamous cell carcinoma) (Döbrossy 2005). Bezüglich ihrer Lokalisation unterscheidet man als Hauptuntergruppen HNSCC der Mundhöhle, des Oropharynx, des Hypopharynx, des Nasopharynx und des Larynx.

HNSCC sind nicht nur im Hinblick auf Prognose und Sterberate, sondern vor allem auch aufgrund der eingeschränkten Lebensqualität eine sehr schwere Tumorerkrankung. Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren leiden in ca. 70 % an starken Tumorschmerzen – die höchste Prävalenz unter den malignen Erkrankungen (van den Beuken-van Everdingen, de Rijke et al. 2007). Ebenso stellen vor allem eingeschränktes Sprechvermögen, Schlucken, Nahrungsaufnahme und eingeschränkte zwischenmenschliche Beziehungen schwere krankheits- und therapieassoziierte Probleme dar (Bjordal, Ahlner-Elmqvist et al. 2001).

Trotz der Fortschritte in Chirurgie und Bestrahlung sowie dem Einsatz systemischer Therapeutika und neuartiger Biologika, sind die Überlebensraten immer noch schlecht. So liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei Lymphknoten-positiven HNSCC nach Operation und adjuvanter Radiotherapie bei 43,2 % (Lavaf, Genden et al. 2008).

Lokale oder regionale Rezidive in einem vormals bestrahlten Tumorgebiet sind häufige Ereignisse bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs (Strojan, Corry et al. 2015). Bezogen auf eine Meta-Analyse hinsichtlich des Einsatzes von Radiochemotherapie bei Kopf-Hals-Tumoren (Blanchard, Baujat et al. 2011) lagen die Raten von lokalen oder regionalen Rezidiven bei ca. 50 % in einem Zeitraum von fünf Jahren nach einer Radiochemotherapie bzw. 60 % nach alleiniger Bestrahlung. Fernmetastasen traten dabei unter 20 % auf.

Bei Glioblastomen konnte gezeigt werden, dass eine subletale Bestrahlung Migration und Invasion von Gliomzellen hervorrufen kann (Wild-Bode, Weller et al. 2001). Diese Migration ist Epidermal growth factor receptor (EGFR)-abhängig und kann durch eine

spezifische Blockade inhibiert werden (Rappl, Piontek et al. 2008). Unsere Arbeitsgruppe konnte eine EGFR-vermittelte, strahleninduzierte Migration bei Zelllinien von Kopf-Hals-Tumoren nachweisen, die durch eine Blockade des EGF-Rezeptors und nachgeschalteter Signalwege unterdrückbar ist (Pickhard, Margraf et al. 2011). Generell spielt der EGF-Rezeptor eine tragende Rolle in der Pathogenese des HNSCC. Amplifizierte EGFR-Genprodukte und Überexpression des EGF-Rezeptors finden sich in über 90 % der HNSCC (Grandis and Twardy 1993). Ebenso können der EGF-Rezeptor und nachgeschaltete Signalwege wie der AKT/Proteinkinase B-Signalweg oder der mitogen activated protein kinase (MAPK)-Signalweg durch Stresssignale wie Bestrahlung hochreguliert werden (Dent, Yacoub et al. 2003). Cetuximab (Erbix[®]), ein monoklonaler Antikörper und Inhibitor des EGFR hat daher als erstes Biologikum Eingang in die Therapie des lokal fortgeschrittenen HNSCC und bei Tumorrezidiven gefunden. Viele weitere Tyrosinkinase-Inhibitoren stehen in klinischen Studien in Erprobung (Kundu and Nestor 2012). Die Identifikation von Signalwegen, die Tumorwachstum und Tumorüberleben sowie Invasionsverhalten und Migration fördern, ist dabei für die Entwicklung spezifischer Inhibitoren von zentraler Bedeutung.

In einigen Arbeiten wurde der Glykogen Synthase Kinase 3 β (GSK3 β) eine zentrale Funktion als Tumorsuppressor in oralen SCC zugeschrieben (Mishra 2010). Für inhibiertes GSK3 β und damit aktives Wnt- β -catenin *signaling* wird eine Rolle in der Invasions- und Migrationssteuerung von oralen Kopf-Hals-Tumoren propagiert (Iwai, Yonekawa et al. 2010).

In den vergangenen Jahren wurden für Tumorrezidive und mangelndes Ansprechen auf Radiochemotherapien eine kleine Subpopulation von Tumorzellen verantwortlich gemacht, die sogenannten Krebsstammzellen. Diese sind durch das Potential charakterisiert, die Tumorzellpopulation aufrecht zu erhalten, Metastasen zu generieren und Resistenzen gegenüber Radiochemotherapie-Regimen zu entwickeln (Allegra and Trapasso 2012). 2006 wurde schließlich auch bei HNSCC eine CD44 positive Subpopulation von Tumorzellen mit Stammzellcharakter entdeckt (Prince, Sivanandan et al. 2007).

1.2. Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich

1.2.1. Epidemiologie

Die weltweite Neuerkrankungsrate für Kopf-Hals-Tumoren wird auf über 650.000 Fälle pro Jahr beziffert (Ferlay, Shin et al. 2010). Mindestens 85 % der Tumore machen Plattenepithelkarzinome aus, der Rest setzt sich aus Sarkomen, Melanomen und Lymphomen zusammen (Kundu and Nestor 2012). Die Inzidenzen schwanken dabei von 24/100.000 Einwohnern in Melanesien bis 2/100.000 in Ostasien (Jemal, Bray et al. 2011). Die extrem hohe Inzidenz in Melanesien wird dabei auf das dort verbreitete Kauen von Kautabak aus Samen und Blättern der Betelpflanze zurückgeführt (Tovosia, Chen et al. 2007).

Nach den neuesten Daten des Robert Koch-Instituts liegen bezüglich der Inzidenz die malignen Erkrankungen des Kopf-Hals-Bereichs bei Männern in Deutschland an vierter Stelle (nach Prostata, Lunge und Darm) und bei Frauen an 15. Stelle. In Hinblick auf die Krebsmortalität stehen sie an sechster Stelle bei Männern und an 17. Stelle bei Frauen (Robert-Koch-Institut 2013). So betrug die altersstandardisierte Inzidenz im Jahr 2010 24,2 Fälle pro 100.000 Einwohner bei Männern und 6,7 Fälle pro 100.000 Einwohner bei Frauen. Die Inzidenzen haben sich in den westlichen Ländern in den letzten 30 Jahren, was die Karzinome des Oropharynx betrifft – im besonderen Zungenbasis und Tonsillen – fast verdreifacht, was auf eine erhöhte Infektion mit Humanen Papillomviren (HPV) der Hochrisikogruppe zurückgeführt wird (Hammarstedt, Lindquist et al. 2006).

Das Verhältnis von Männern zu Frauen beträgt ungefähr 7:1 bei Larynxkarzinomen, bei Tumoren der Mundhöhle und des Rachens weniger als 3:1. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Kehlkopfkrebs bei 66 Jahren bei Männern und bei 63 Jahren bei Frauen, für Karzinome des Rachens und der Mundhöhle beträgt es 61 Jahre beziehungsweise 65 Jahre. Frauen werden dabei häufiger in T1-Stadien diagnostiziert als Männer (40 % vs. 30 %). Die 5-Jahresüberlebensraten liegen bei Kehlkopfkrebs bei beiden Geschlechtern um 65 %, bei Karzinomen des Rachens und der Mundhöhle ist das 5-Jahresüberleben der Männer mit 48 % deutlich schlechter als das der Frauen mit 61 % (Robert Koch-Institut 2013).

1.2.2. TNM-Klassifikation und UICC-Stadien

Die Klassifikation von Tumoren beruht auf dem TNM-System bezüglich der anatomischen Ausbreitung der Neoplasie und wurde von der UICC (Union internationale contre le cancer) entworfen, der Internationalen Vereinigung gegen Krebs. Das TNM-System besteht aus drei Komponenten: *T* steht für die Ausbreitung und Größe des Primärtumors, *N* für den eventuellen Befall regionaler Lymphknoten mit Tumorzellen, *M* für das Fehlen oder Vorhandensein von Fernmetastasen. Die Klassifikation kann klinisch z. B. mittels bildgebender Verfahren oder chirurgischer Exploration erhoben werden (=cTNM, *c* für clinical) oder postoperativ histopathologisch erhoben werden (=pTNM, *p* für pathological). Der Zusatz *R* bezeichnet das Vorhandensein von residualem Tumorgewebe nach Therapie, der Zusatz *G* beschreibt das Grading des Tumors, also den Grad von Atypien und Entdifferenzierung des Tumorgewebes, und der Zusatz *C* (Certainty) spiegelt die aufgrund der verwendeten klinischen Diagnostik erlangte Zuverlässigkeit der cTNM Klassifikation wieder. Eine Lymphgefäßinvasion oder Veneninvasion kann mit *L* bzw. *V* angegeben werden, eine perineurale Invasion mit *Pn*. Zusätzlich kann ein Suffix *m* bei multiplen Primärtumoren angegeben werden, ein *y*, wenn die Klassifikation bereits unter Therapie erfolgte, ein *r*, wenn es sich um einen Rezidivtumor handelt und ein *a*, wenn die Klassifikation im Rahmen einer Autopsie erhoben wurde (Wittekind and Meyer 2010). Die TNM-Klassifikation ist für die meisten Karzinome des menschlichen Körpers unterschiedlich. Bei den Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich gelten unterschiedliche Klassifikationen in Abhängigkeit von der Lokalisation des ausgehenden Primärtumors. Tabelle 1 zeigt die UICC Kriterien für T,N,M,R und G im Allgemeinen auf:

T	Primärtumor
TX	Beurteilung nicht möglich
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1-T4	Zunehmende Größe und/oder Ausdehnung des Primärtumors
N	Regionäre Lymphknoten
NX	Beurteilung nicht möglich
N0	Kein regionärer Lymphknotenbefall

N1-N3	Zunehmender Befall regionärer Lymphknoten
M	Fernmetastasen
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
G	Grading
GX	Differenzierungsgrad nicht bestimmbar
G1	Gut differenziert
G2	Mäßig differenziert
G3	Schlecht differenziert
G4	Undifferenziert
R	Tumorresiduen
RX	Beurteilung von Tumorresiduen nicht möglich
R0	Kein Residualtumor
R1	Mikroskopischer Residualtumor
R2	Makroskopischer Residualtumor

Tab. 1: Kriterien der TNM-Klassifikation, des Gradings und der Tumorresiduen (Wittekind and Meyer 2010)

In Tabelle 2 finden sich die T-Stadien für die einzelnen anatomischen Lokalisationen des Primärtumors (Lippe und Mundhöhle, Nasopharynx, Oropharynx, Hypopharynx und Larynx).

Lippe und Mundhöhle	
T1	Tumor ≤ 2 cm
T2	Tumor > 2 cm aber ≤ 4 cm
T3	Tumor > 4 cm
T4a Lippe	Tumor infiltriert durch kortikalen Knochen, den N. alveolaris inf., in Mundhöhlenboden oder in Haut (Kinn oder Nase)
T4a Mundhöhle	Tumor infiltriert durch kortikalen Knochen in äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hyoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), Kieferhöhle oder Gesichtshaut
T4b Lippe und Mundhöhle	Tumor infiltriert Spatium masticatorium, Processus pterygoideus oder Schädelbasis oder umschließt die A. carotis int.

Nasopharynx	
T1	Tumor auf den Nasopharynx begrenzt oder mit Ausbreitung auf den Oropharynx und/oder Nasenhöhle
T2	Tumor mit parapharyngealer Ausbreitung
T3	Tumor infiltriert Knochenstrukturen der Schädelbasis und/oder der Nasennebenhöhlen
T4	Tumor mit intrakranieller Ausbreitung und/oder Befall von Hirnnerv(en), Fossa infratemporalis, Hypopharynx, Augenhöhle, Spatium masticatorium
Oropharynx	
T1	Tumor ≤ 2 cm
T2	Tumor > 2 cm aber ≤ 4 cm
T3	Tumor > 4 cm oder Ausbreitung zur lingualen Oberfläche der Epiglottis
T4a	Tumor infiltriert eine der folgenden Nachbarstrukturen: Larynx, äußere Zungenmuskulatur (s.o.), Lamina medialis des Proc. pterygoideus, harten Gaumen oder Unterkiefer
T4b	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen wie M. pterygoideus lateralis, Lamina lateralis des Proc. Pterygoideus, Schädelbasis oder umschließt die A. carotis interna
Hypopharynx	
T1	Tumor auf einen Unterbezirk des Hypopharynx begrenzt u./o. ≤ 2 cm
T2	Tumor infiltriert mehr als einen Unterbezirk des Hypopharynx oder einen benachbarten Bezirk oder misst > 2 cm und ≤ 4 cm ohne Fixation des Hemilarynx
T3	Tumor > 4 cm oder Tumor mit Fixation des Hemilarynx
T4a	Tumor infiltriert eine der folgenden Nachbarstrukturen: Schild-/Ringknorpel, Zungenbein, Schilddrüse, Ösophagus, zentrale Weichteile des Halses
T4b	Tumor infiltriert prävertebrale Faszien, umschließt die A. carotis interna oder infiltriert Strukturen des Mediastinums
Supraglottischer Larynx	
T1	Tumor auf einen Unterbezirk der Supraglottis begrenzt mit normaler Stimmlippenbeweglichkeit
T2	Tumor infiltriert Schleimhaut von mehr als einem benachbarten Unterbezirk der Supraglottis oder Glottis oder eines Areals außerhalb der Supraglottis (z. B. Schleimhaut von Zungengrund, Vallecula, mediale Wand des Sinus piriformis), ohne Fixation des Larynx

T3	Tumor auf den Larynx begrenzt, mit Stimmlippenfixation und/oder Tumor mit Infiltration des Postkrikoidbezirks, des präepiglottischen Gewebes und/oder geringgradiger Erosion des Schildknorpels (innerer Kortex)
T4a	Tumor infiltrierte durch den Schildknorpel und/oder breitet sich außerhalb des Kehlkopfes aus, z.B. Trachea, Weichteile des Halses eingeschlossen äußere Zungenmuskulatur, gerade Halsmuskulatur, Schilddrüse, Ösophagus
T4b	Tumor infiltrierte den Prävertebralraum, mediastinale Strukturen oder umschließt die A. carotis int.
Glottis des Larynx	
T1	Tumor auf Stimmlippe(n) begrenzt (und evtl. vordere/hintere Kommissur befallen) mit normaler Beweglichkeit der Stimmlippen. T1a Tumor auf eine Stimmlippe begrenzt, T1b beide Stimmlippen befallen
T2	Tumor breitet sich auf Supraglottis und/oder Subglottis aus und/oder Tumor mit eingeschränkter Stimmlippenbeweglichkeit
T3	Tumor auf Larynx begrenzt mit Stimmlippenfixation und/oder Invasion der Postkrikoidgegend und/oder des präepiglottischen Gewebes und/oder des paraglottischen Raumes mit geringgradiger Erosion des Schildknorpels
T4a	Tumor infiltrierte durch den Schildknorpel und/oder breitet sich außerhalb des Kehlkopfes aus: Trachea, Halsweichteile, äußere Zungenmuskulatur, gerade Halsmuskulatur, Schilddrüse, Ösophagus
T4b	Tumor infiltrierte den Prävertebralraum, Mediastinum oder umschließt die A. carotis int.
Subglottischer Larynx	
T1	Tumor auf die Subglottis begrenzt
T2	Tumor breitet sich auf eine oder beide Stimmlippen aus (mit normaler oder eingeschränkter Beweglichkeit)
T3	Tumor auf Larynx begrenzt mit Stimmlippenfixation
T4a	Tumor infiltrierte durch den Schildknorpel und/oder breitet sich außerhalb des Kehlkopfes aus: Trachea, Halsweichteile, äußere Zungenmuskulatur, gerade Halsmuskulatur, Schilddrüse, Ösophagus
T4b	Tumor infiltrierte den Prävertebralraum, Mediastinum oder umschließt die A. carotis int.

Tab. 2: Bedeutung der Tumorausbreitung bezogen auf die anatomische Lokalisation des Primärtumors (Wittekind and Meyer 2010)

Regionäre Lymphknoten Lippe und Mundhöhle, Oropharynx, Hypopharynx, Larynx	
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase(n) in solitärem ipsilateralem Lymphknoten ≤ 3 cm
N2a	Metastase(n) in solitärem ipsilateralem Lymphknoten > 3 cm ≤ 6 cm
N2b	Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten ≤ 6 cm
N2c	Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten ≤ 6 cm
N3	Metastase(n) in Lymphknoten > 6 cm
Regionäre Lymphknoten Nasopharynx	
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Unilaterale Metastase(n) in Halslymphknoten und/oder uni- oder bilaterale Metastase(n) in retropharyngealen Lymphknoten oder der Supraklavikulargrube ≤ 6 cm
N2	Metastase(n) in bilateralen Lymphknoten über der Supraklavikulargrube ≤ 6 cm
N3	Metastase(n) in Lymphknoten > 6 cm (N3a) oder Ausdehnung in die Supraklavikulargrube (N3b)

Tab. 3: Bedeutung des Lymphknotenstatus abhängig von der anatomischen Lokalisation des Primärtumors (Wittekind and Meyer 2010)

UICC-Stadium	T	N	M
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T1, T2	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
Stadium IVa	T1, T2, T3	N2	M0
	T4a	N0, N1, N2	M0
Stadium IVb	T4b	Jedes N	M0
	Jedes T	N3	M0
Stadium IVc	Jedes T	Jedes N	M1

Tab. 4: UICC-Stadieneinteilung (Wittekind and Meyer 2010)

Tabelle 3 gibt die Bedeutung des N-Stadiums bezogen auf die anatomischen Ursprungsorte des Primärtumors wieder.

Tabelle 4 ordnet die TNM-Klassifikation den einzelnen UICC-Stadien zu.

1.2.3. Ätiologie und Risikofaktoren

Im Laufe der Jahre wurden viele Risikofaktoren identifiziert, die in unterschiedlichem Ausmaß zur Entwicklung eines HNSCC beitragen können. Als die beiden Hauptrisikofaktoren gelten Rauchen und der Konsum von Alkohol. In einer schwedischen Fall-Kontroll-Studie (Lewin, Norell et al. 1998) unter Männern wurde ein alters- und alkoholadjustiertes Relatives Risiko (RR) von 4 für Personen, die jemals geraucht haben, ermittelt und für momentane Raucher ein RR von 6,5. Das Relative Risiko ist davon abhängig, wie lange man geraucht hat und wie groß der tägliche Tabakkonsum war. So lag das RR für Männer die bereits mehr als 20 Jahre nicht mehr Tabak konsumierten bei 0,9. Das Relative Risiko einen Kopf-Hals-Tumor bei regelmäßigem Konsum von Alkohol zu entwickeln, ist abhängig von der täglichen Aufnahmemenge an Alkohol: So lag das RR (adjustiert an Alter und Rauchverhalten) für Alkohol alleine, bei einer täglichen Einnahmemenge unter 10 g bei 1,0, über 20 g bei 2,7 und über 50 g bei 5,5. Die Kombination von dauerhaftem Tabakkonsum und hohem Alkoholkonsum (> 20 g/d) führte zu einer annähernden Multiplikation der Einzel-RRs und einem Gesamt-RR von 22,1.

Dennoch sind 15-20 % der Kopf-Hals-Tumoren unabhängig von einer zurückliegenden Tabak- und Alkoholeinnahme (Gillison and Shah 2001).

Während in den USA und westlichen Ländern aufgrund eines Rückgangs des Rauchverhaltens auch die Inzidenz von HNSCC im Larynxbereich deutlich zurückging, gab es in den letzten Jahren einen beachtlichen Anstieg an Tonsillenkarcinomen (4 % pro Jahr) und an Zungengrundkarcinomen (2 % pro Jahr) (Sturgis and Cinciripini 2007). Diese Patientengruppe ist jünger und zeigt ein verbessertes Ansprechen auf Therapie und bessere Überlebensraten (Upile, Jerjes et al. 2012). Die Verbindung zwischen diesen Beobachtungen und der vermehrten Detektion von onkogenen humanen Papillomviren in diesen Tumoren gibt starke Anhaltspunkte auf eine kausale virale Genese dieser Tumore durch HPV ähnlich den Beobachtungen beim Cervixkarzinom (Hammarstedt, Lindquist et al. 2006, D'Souza, Kreimer et al. 2007).

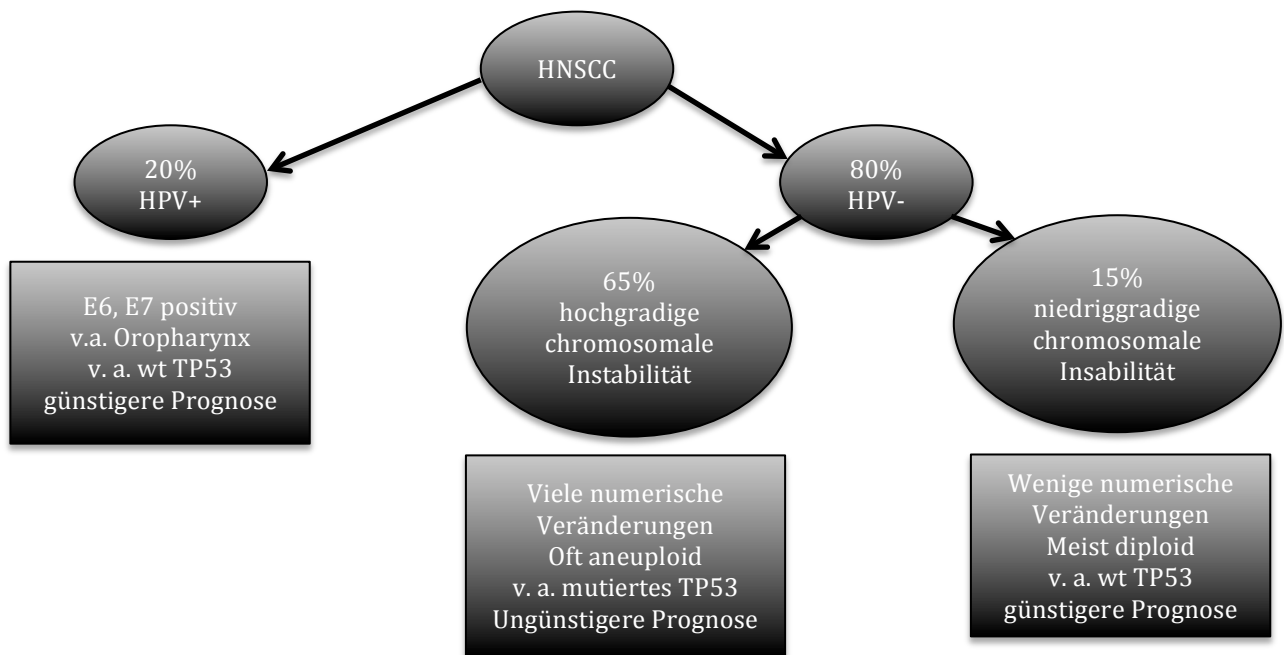


Abb. 1: Subgruppen des HNSCC, modifiziert nach Leemans, Braakhuis et al. 2011

So waren oropharyngeale Tumoren bei einem odds ratio (OR) von 14,6 mit einer HPV-16 Infektion assoziiert. In 72 % der Fälle konnte HPV-16 DNA detektiert werden und 64 % waren entweder für E6 oder E7 oder für beide onkogenen Proteine seropositiv. Ebenso war eine hohe Anzahl an Vaginalsex-Partnern (OR=3,1) und Oralsex-Partnern (OR=3,4) mit einem Oropharynxkarzinom assoziiert (D'Souza, Kreimer et al. 2007). Aus diesen Beobachtungen und durch Genom-Analysen konnte gezeigt werden, dass es mindestens drei Subgruppen von HNSCC gibt (vergleiche Abbildung 1): HPV+ HNSCC und HPV-HNSCC mit hochgradiger oder niedriggradiger chromosomaler Instabilität (high and low CIN) (Leemans, Braakhuis et al. 2011).

Des Weiteren sind schlechte Mundhygiene, schlechter Zahnstatus und Mangelernährungszustände weitere Faktoren, die eine Entstehung von Kopf-Hals-Tumoren begünstigen können. Ebenso kann eine gehäufte Sonnenexposition Lippenkarzinome triggern (Döbrossy 2005). Außerdem treten HNSCC bei familiären und genetischen Syndromen gehäuft auf: So gelten HNPCC (*Hereditäre Nichtpolypöse Colonicarzinome*), das Li-Fraumeni-Syndrom, die Fanconi Anämie und die Ataxia teleangiectasia als weitere Risikofaktoren (Argiris, Karamouzis et al. 2008).

1.2.4. Molekularpathologie

Makroskopische Vorläuferläsionen im Mund-Rachen-Raum wie Leukoplakie oder Erythroplakie können bereits Hinweise auf das Vorliegen einer Präkanzerose oder eines HNSCC liefern. Häufig befinden sich diese Vorläuferläsionen bei Kopf-Hals-Tumoren an nicht einsehbaren Lokalisationen, in den meisten Fällen jedoch sind derartige genetisch veränderte und dysplastische Tumorzellen makroskopisch gar nicht erst sichtbar. Nach dem Modell „The Hallmarks of Cancer“ nach Weinberg & Hanahan benötigt eine Zelle sechs veränderte Zellsignalwege um in eine Krebszelle zu transformieren: Unbegrenztes Regenerationspotential, Entzug von pro-apoptotischen Faktoren, eigenständige Aufrechterhaltung von Wachstumssignalen, Abschottung von wachstumshemmenden Signalen, Invasion und Migration sowie vermehrte Angiogenese (Hanahan and Weinberg 2000). Dies ist bei HNSCC Tumoren nicht anders. In den letzten Jahren wurden zahlreiche Tumorgene und dadurch veränderte Zellsignalwege bei Kopf-Hals-Tumoren identifiziert, die dazu beitragen, dass eine Epithelzelle maligne transformiert. Nach dem Modell der „*field cancerization*“ bildet eine Progenitorzelle oder adulte Stammzelle, sobald sie eine oder mehrere genetische Veränderungen (u.a. *tumor protein 53*) angehäuft hat, einen sogenannten „*patch*“, also einen Flecken im Epithel mit genetisch veränderten Tochterzellen. Indem dieser *patch* Wachstumsvorteile generiert oder sich der normalen Wachstumskontrolle entziehen kann, expandiert der *patch* in ein sogenanntes Feld (*field*). In diesem Feld kann sich nun ein Subklon der *field*-Zellen durch Anhäufung weiterer Mutationen zu einem invasiven Tumor entwickeln. Das mit Mutationen angehäufte Feld bleibt am Rande des Tumors liegen und dabei oft außerhalb der Resektionsgrenzen des Tumors nach einer Operation. Aus diesen genetisch veränderten Zellen kann sich durch neue Mutationen ein neues Karzinom entwickeln. Dies gilt als ein möglicher Grund für das häufige Auftreten lokaler Rezidive oder sekundär maligner Tumoren nach Therapie (Leemans, Braakhuis et al. 2011).

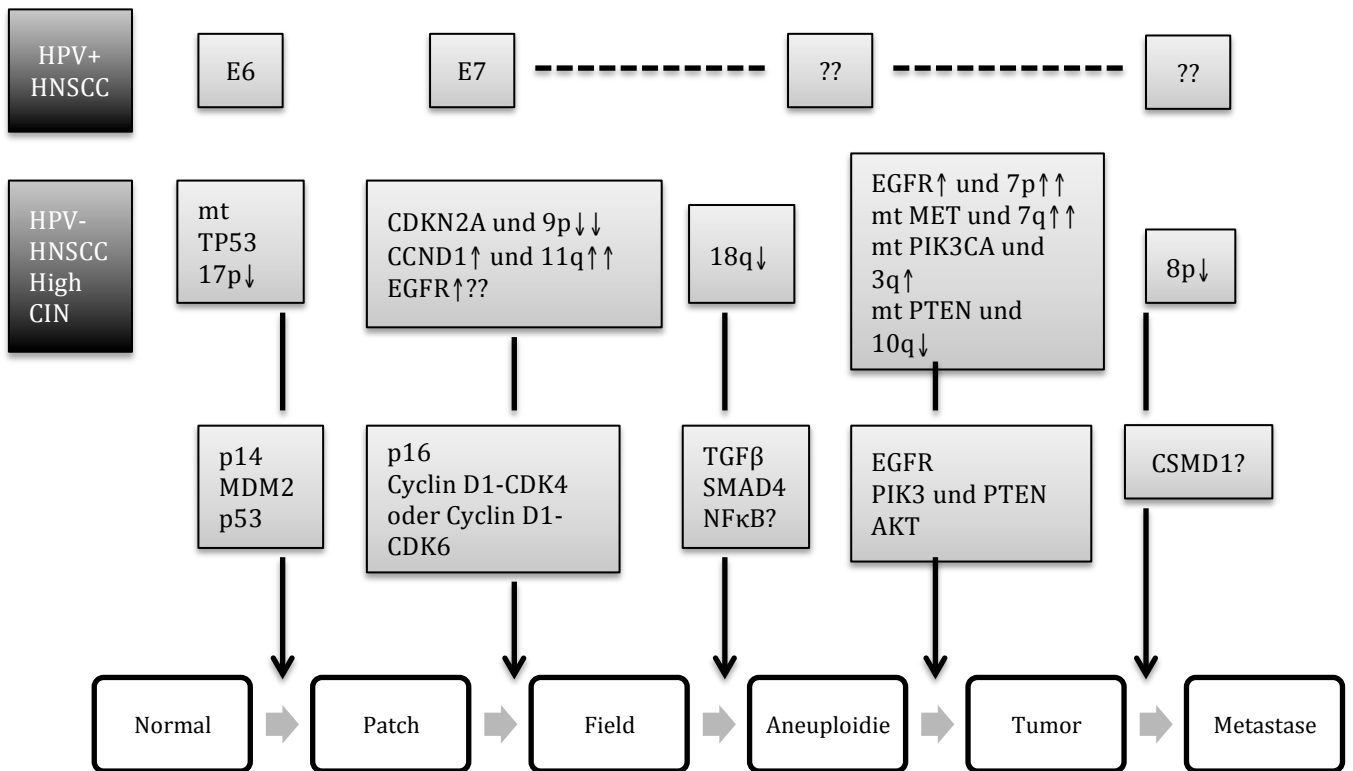


Abb. 2: Modell der Karzinogenese für das HNSCC *modifiziert nach Leemans, Braakhuis et al. 2011.* Dargestellt sind die onkogenen Proteine E6 (inaktiviert p53) und E7 (inaktiviert RB) für HPV+ HNSCC, und die Chromosomen/Genmutationen sowie Signalmolekülveränderungen bei HPV- HNSCC. Die drei entscheidenden Schritte beinhalten dabei die Konversion einer einzelnen mutierten Stammzelle in einem Patch in eine Gruppe von Stammzellen ohne Wachstumskontrolle (field), die Transformation eines Feldes in ein Karzinom mit invasivem Wachstum und die Entwicklung von Metastasen.

Abbildung 2 stellt die Entwicklung der *Field Cancerization* zum Tumor mit den häufigsten genetischen Mutationen und Signalwegsveränderungen dar.

Wichtige Gene sind dabei TP53 (in 60-80 % mutiert), ektopische Telomerase Reverse Transcriptase (TERT) - Expression (in >80 % der HNSCC erhöht), erhöhtes CCND1 (codiert Cyclin D1 und in >80 % amplifiziert), verloren gegangenes CDKN2A (codiert für p16^{INK4A} auf Chr.9p21) mit Folge von deregulierter zellulärer Proliferation. Ebenso wird häufig eine Überexpression des EGFR-Signalweges detektiert, was zu einer vermehrten Aktivierung des AKT-Signalweges, des MAPK-Signalweges oder einer erhöhten CCND1-Expression führen kann. Zudem wird häufig eine Überexpression von MET und eine Herunterregulierung des Transforming growth factor receptor β (TGF β) - Rezeptors gefunden. Mutationen des PIK3CA Gens, die zu einer erhöhten Phosphoinositid-3-kinase (PI3K) - Aktivität und damit zu einem erhöhten AKT-Signaling führen, bzw. eine

inaktivierende Mutation von phosphatase and tensin homolog (PTEN) sind häufige Beobachtungen (Leemans, Braakhuis et al. 2011). Des Weiteren kann eine Inaktivierung von Notch und eine Amplifikation oder Überexpression von tumor protein 63 (TP63) an der fehlenden terminalen Differenzierung von HNSCC-Tumorzellen beteiligt sein (Rothenberg and Ellisen 2012).

1.2.6. Therapie

Die Therapie des HNSCC fußt auf drei Säulen: Chirurgie, Bestrahlung und systemischer Therapie, also Therapie mit Chemotherapeutika bzw. neuen Inhibitoren wie Cetuximab. Das therapeutische Management ist kompliziert und benötigt einen multidisziplinären Ansatz aus Onkologen, Strahlentherapeuten, HNO-Chirurgen, Mund-Kiefer-Gesichtschirurgen und plastischen Chirurgen sowie die Einbeziehung von Psychologen, Sozialarbeitern und Sprachtherapeuten (Vermorken and Specenier 2010). In den frühen Stadien I und II sind Chirurgie oder Strahlentherapie alleine die Therapien der Wahl mit vergleichbaren Heilungsraten zwischen 60 und 90 %, abhängig von Tumorlokalisation und Erkrankungsausmaß (Vermorken and Specenier 2010). Eine elektive funktionelle „neck dissection“ der ipsilateralen, zervikalen Lymphknoten ist eine Standardprozedur bei Patienten mit hohem Risiko für okkulten Lymphknotenbefall (Argiris, Karamouzis et al. 2008). In den Stadien III und IV erhalten Patienten, die operabel sind, eine postoperative Bestrahlung oder – bei hohen Risikofaktoren (R1, extrakapsuläre Ausdehnung etc.) eine postoperative Radiochemotherapie mit einem platinhaltigen Medikament. Diese ist ebenfalls Therapiestandard bei nicht operablen Tumoren (Licitra, Felip et al. 2009). Eine Metaanalyse konnte zeigen, dass die Addition von Chemotherapie bei lokal fortgeschrittenen Tumoren einen absoluten 5-Jahres-Benefit von 4,5 % im Überleben bringt (Blanchard, Baujat et al. 2011). Eine Induktionschemotherapie mit einem Taxan/Platin-Schema gefolgt von Radiochemotherapie ist in Studien Platin/Fluoruracil-Schemata überlegen, aber noch nicht Standard (Gregoire, Lefebvre et al. 2010). Falls in lokal fortgeschrittenen Stadien nur bestrahlt wird, scheint die Kombination aus Bestrahlung und Cetuximab der alleinigen Bestrahlung hinsichtlich dem Überleben überlegen zu sein (49 Monate vs. 29,3 Monate) (Bonner, Harari et al. 2006). Bei Tumorrezidiven oder einem Zweittumor müssen die Patienten selektiert werden: Besteht die Möglichkeit zur Operation, beträgt das 5-Jahresüberleben ca. 39 %, bei Bestrahlung das 2-Jahresüberleben

zwischen 10 und 30 % (Strojan, Corry et al. 2015). Für die meisten Patienten mit Rezidiven sowie beim Auftreten von Fernmetastasen besteht jedoch eine palliative Situation und damit kommt nur noch der Einsatz von Chemotherapie in Frage. Für Patienten mit einem guten Allgemeinzustand wird hierbei als Mittel der Wahl eine Kombination von Cetuximab mit Cisplatin oder Carboplatin plus 5-Fluoruracil (5-FU) verwendet (Gregoire, Lefebvre et al. 2010), denn es konnte gezeigt werden, dass das mediane Überleben durch die zusätzliche Gabe von Cetuximab zur Platin/5-FU-Chemotherapie signifikant höher ist als die alleinige Chemotherapie (7,4 Monate vs. 10,1 Monate) (Vermorken, Mesia et al. 2008). Für Patienten, die eine Polychemotherapie nicht tolerieren, kann eine Monotherapie, z. B. mit wöchentlichem MTX angesetzt werden (Gregoire, Lefebvre et al. 2010).

Bei all den Therapieoptionen ist es wichtig, die akuten und späten Komplikationen der Therapie im Blick zu behalten: Mukositis, Dysphagie, Heiserkeit, Schilddrüsendysfunktion, Stenosen des Ösophagus oder der Carotiden und Xerostomie sind nur einige Beispiele, welche die Lebensqualität des Patienten beeinträchtigen und viele soziale und psychologische Probleme hervorrufen können (Argiris, Karamouzis et al. 2008).

1.2.7. Prognosefaktoren

Die Prognose von Patienten mit einem HNSCC ist vor allem von dem UICC-Stadium der Erkrankung abhängig, in welchem sie diagnostiziert wird. Dabei ist nicht nur das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen ein Prognosefaktor, sondern auch die Anzahl und die extranodale Ausbreitung (Leemans, Braakhuis et al. 2011). Ein niedriger Hb-Spiegel, knappe Tumorabsetzungsränder, R1-Status, Kapseldurchbruch der Metastasen, N3-Status und eine Lymphangiosis carcinomatosa führen zu einer schlechten Prognose (Lehnerdt, Hoffmann et al. 2010). Ebenso ist ein niedriger Differenzierungsgrad und eine unregelmäßige Tumorinvasionsfront mit schlechterer Prognose verbunden (Lehnerdt, Hoffmann et al. 2010).

Bei oropharyngealen Tumoren konnte gezeigt werden, dass der negative HPV-Status und der Tabakkonsum mit einer deutlichen Prognoseverschlechterung einhergeht, wobei die beiden Marker potenziell sogar mehr Aussagekraft haben als der reine TNM-Status (Ang, Harris et al. 2010). Ebenso ist in dieser Studie ein Alter >50 Jahre und die nicht-weiße Bevölkerung mit einer schlechteren Überlebensrate bei Oropharynxkarzinomen

vergesellschaftet (Ang, Harris et al. 2010). Auf molekularer Ebene gilt das Vorhandensein eines wild-typ TP53 als positiver Prognosefaktor; p16 Deletionen, EGFR-Überexpression und hohe VEGF-Spiegel sind negative Prädiktoren (Lehnerdt, Hoffmann et al. 2010). Ebenfalls führt eine erhöhte Expression von Aurora Kinase A-mRNA zu schlechterem Überleben (Reiter, Gais et al. 2006).

1.3. Der Epidermal Growth Factor Rezeptor und nachgeschaltete Signalwege

1.3.1. Rezeptortyrosinkinasen und der EGF-Rezeptor

Erhöhte Level des EGFR sind frühe Marker in der Karzinogenese von HNSCC und in über 90 % der Tumore zu finden (Grandis and Twardy 1993). Eine Aktivierung dieses Rezeptors führt zu zahlreichen nachgeschalteten Signalwegen in der Zelle, die das Zellwachstum und Zellüberleben fördern, Proteinbiosynthese und den Zellzyklus beeinflussen und Migration begünstigen (Dutta and Maity 2007). Auf Grund dieser tumorigenen Eigenschaften wurden Anstrengungen unternommen, pharmakologische Angriffspunkte gegen diesen Rezeptor zu finden. Im Jahr 2004 erhielt der gegen den EGFR gerichtete monoklonale Antikörper Cetuximab die Zulassung zur Behandlung von Kolorektalen Karzinomen und später von Kopf-Hals-Tumoren durch die FDA (Lemmon and Schlessinger 2010). Generell spielt die Inhibition dieser Rezeptorfamilie eine tragende Rolle in der Krebstherapie. Bisher erhielten folgende molekulare Inhibitoren und monoklonalen Antikörper gegen den EGFR bzw. die ErbB-Rezeptoren die Zulassung der FDA zur Krebstherapie: Gefitinib (Iressa®), Erlotinib (Tarceva®), Lapatinib (Tykerb®), Trastuzumab (Herceptin®), Cetuximab (Erbix®) und Panitumumab (Vectibix®) (Lemmon and Schlessinger 2010). Monoklonale Antikörper blocken von extrazellulär und führen zu einer Internalisierung des Rezeptors, Tyrosinkinaseinhibitoren blocken die ATP-Bindungstasche der zytoplasmatischen Domäne und verhindern Rezeptorphosphorylierungen (Dutta and Maity 2007). Durch Inhibition dieses Rezeptors zeigten sich antiproliferative Effekte (Huang, Li et al. 2002), G1-Phasen Arreste (Wu, Rubin et al. 1996), inhibitorische Effekte auf Migration (Chen, Xie et al. 1994) und Angiogenese (Petit, Rak et al. 1997) sowie eine augmentatorische Wirkung sowohl auf Radio- (Huang and Harari 2000, Bonner, Harari et al. 2006) als auch auf Chemotherapie (Vermorken, Mesia et al. 2008). Auf der anderen Seite führt interessanterweise auch eine ionisierende

Bestrahlung zu einer Phosphorylierung und damit Aktivierung des EGFR (Schmidt-Ullrich, Mikkelsen et al. 1997).

Der EGFR (ErbB1) ist Teil der ErbB- (auch Her1 genannten) Rezeptorfamilie, welche wiederum eine von 20 Subfamilien der Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) ausmacht (Lemmon and Schlessinger 2010). RTKs ähneln sich in ihrem molekularen Aufbau in einer extrazellulären Ligandenbindedomäne, einer einzelnen transmembranen Helix und der zytoplasmatischen Region mit der Tyrosinkinaseaktivität und regulatorischen Domänen (Lemmon and Schlessinger 2010). Trotz ähnlichem Aufbau sind die Mechanismen der Rezeptoraktivierung unterschiedlich: Meist gilt, dass die Bindung eines Wachstumsfaktors eine Rezeptordimerisierung induziert, allerdings formieren einige RTKs auch bereits im inaktiven Zustand wie der EGF-Rezeptor Oligomere (Clayton, Walker et al. 2005). Die Rezeptordimerisierung kann dabei zum einen komplett ligandenvermittelt sein, wo der bivalente Ligand beide Rezeptoren quervernetzt und beide Rezeptoren keinen direkten Kontakt miteinander haben, zum anderen komplett rezeptorvermittelt (u.a. EGFR), wo der Ligand keinen Beitrag zur Dimerisierungsschnittstelle leistet, oder es existieren Mischformen zwischen beiden Extremen (Lemmon and Schlessinger 2010). Der EGFR bildet dabei entweder Homodimere oder Heterodimere mit anderen ErbB-Rezeptortypen (bevorzugt mit ErbB2/Her2) aus (Dutta and Maity 2007).

Im inaktiven Zustand blockiert bei vielen RTKs (unter anderem Insulinrezeptor) eine *cis*-autoinhibierende Tyrosinphosphorylierung an der Tyrosinkinasedomäne den Zugang von ATP und Proteinsubstraten und inhibiert so dessen Funktion. Unter Ligandenbindung kommt es zur *trans*-Phosphorylierung des Dimerisierungspartners und zur Konformationsänderung in den aktiven Zustand. Der EGFR benötigt hingegen keine *trans*-Phosphorylierung für die Aktivierung. Studien identifizierten einen allosterischen Mechanismus zur Aktivierung: Der C-Lobe einer Tyrosinkinasedomäne agiert als Activator für den N-Lobe der Tyrosinkinasedomäne des Dimerisierungspartners (Receiver). Dadurch kommt es zu Konformationsänderungen im N-Lobe des Receivers, welche die *cis*-Autoinhibierung auflöst (Lemmon and Schlessinger 2010).

Autophosphorylierungen spezifischer Tyrosinreste im zytoplasmatischen Teil nach Aktivierung des Rezeptors dienen als Dockingstelle für Proteine mit SH2- und Phosphotyrosin-Bindedomänen (PTBs) (Normanno, De Luca et al. 2006). Die Rekrutierung dieser Proteine dient der Aktivierung zahlreicher intrazellulärer Signalwege.

Schlüsselsignalwege des EGFR und anderer RTKs sind der RTK-Grb2-Sos-Ras/MAP Kinase Signalweg, der RTK-PI3K-AKT Signalweg, der RTK-PLC-PKC Signalweg, der STAT3 Signalweg und der p38-Stress-Signalweg (Dutta and Maity 2007).

Viele Tumorentitäten schaffen es, dass eine vermehrte Aktivierung der RTKs/EGFR und abhängiger Signalwege losgelöst von der normalerweise erforderlichen Ligandenbindung durch Wachstumsfaktoren o. ä. erfolgen kann. Beispiele hierfür sind eine vermehrte Expression des Rezeptors an der Zelloberfläche, Punktmutationen oder Deletionen in der Aktivierungsdomäne der Tyrosinkinase, Deletionen in der Extrazellulärdomäne (z. B. die EGFRvIII Variante, welche die PI3-Kinase konstitutiv aktiviert) oder eine autokrine Ausschüttung von Transforming Growth Factor β (TGF- β), das den eigenen EGFR stimuliert (Dutta and Maity 2007).

Durch diese Mutationen oder tiefer gelegene *downstream* Mutationen ist es möglich, dass sich der Tumor der Therapie mit RTK-Inhibitoren entziehen kann, folglich ist die Entwicklung klinisch einsetzbarer Inhibitoren, die tiefer in der Zelle angreifen, ein wichtiges Ziel.

1.3.2. AKT-Signalweg

Die Serin/Threonin-Kinase AKT, oder auch Proteinkinase B genannt, liegt an einem zentralen Knotenpunkt von entscheidenden Zellsignalwegen und eine aberrante Funktion ist an Erkrankungen wie Typ 2-Diabetes und Krebs beteiligt (Manning and Cantley 2007). Es existieren drei Isoformen dieser Proteinkinase (AKT1-3), deren Substrate Zellvorgänge wie Metabolismus, Überleben, Proliferation, Wachstum, Angiogenese und Glukoseaufnahme steuern (Manning and Cantley 2007). AKT liegt eingebettet in der EGFR/PI3K/PTEN/AKT/mTOR-Kaskade, einem der am häufigsten veränderten Signalwege in HNSCC, wobei unterschiedliche genetische und epigenetische Mechanismen zu den Veränderungen beitragen (Freudlsperger, Burnett et al. 2011). Aktivierte RTKs aktivieren die PI3K entweder über direkte Bindung oder indirekt über Tyrosinphosphorylierung von sog. *scaffolding proteins* wie Insulin Rezeptor Substrat 1 (IRS1). PI3K generiert Phosphatidylinositol-trisphosphat (PIP3) aus Phosphatidylinositol-bisphosphat (PIP2) – eine Reaktion die durch PTEN wieder rückgängig gemacht werden kann. AKT und PDK1 binden daraufhin PIP3 an der Plasmamembran und PDK1 kann AKT an Thr308 phosphorylieren (Manning and Cantley 2007). Eine zweite

Phosphorylierungsstelle an Ser473 wird über den Rictor-mTOR Komplex (oder auch mTORC2 genannt) vermittelt und ist nötig für eine vollständige Aktivierung von AKT (Sarbasov, Guertin et al. 2005). Aktiviertes AKT beeinflusst zahlreiche Moleküle wie GSK3, endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS), AS160, BAD (Bcl-2 antagonist of cell death), und einige andere. Über eine Inhibition sowohl von TSC2 als auch von PRAS40 durch AKT kann der mTORC1 Komplex stabilisiert und aktiviert werden und die Translation gefördert werden (vergleiche auch 1.4.) (Manning and Cantley 2007). Abbildung 3 gibt einen Überblick über den PI3K-AKT-Signalweg, Abbildung 4 zeigt wichtige downstream Moleküle von AKT und die zelluläre Funktion auf.

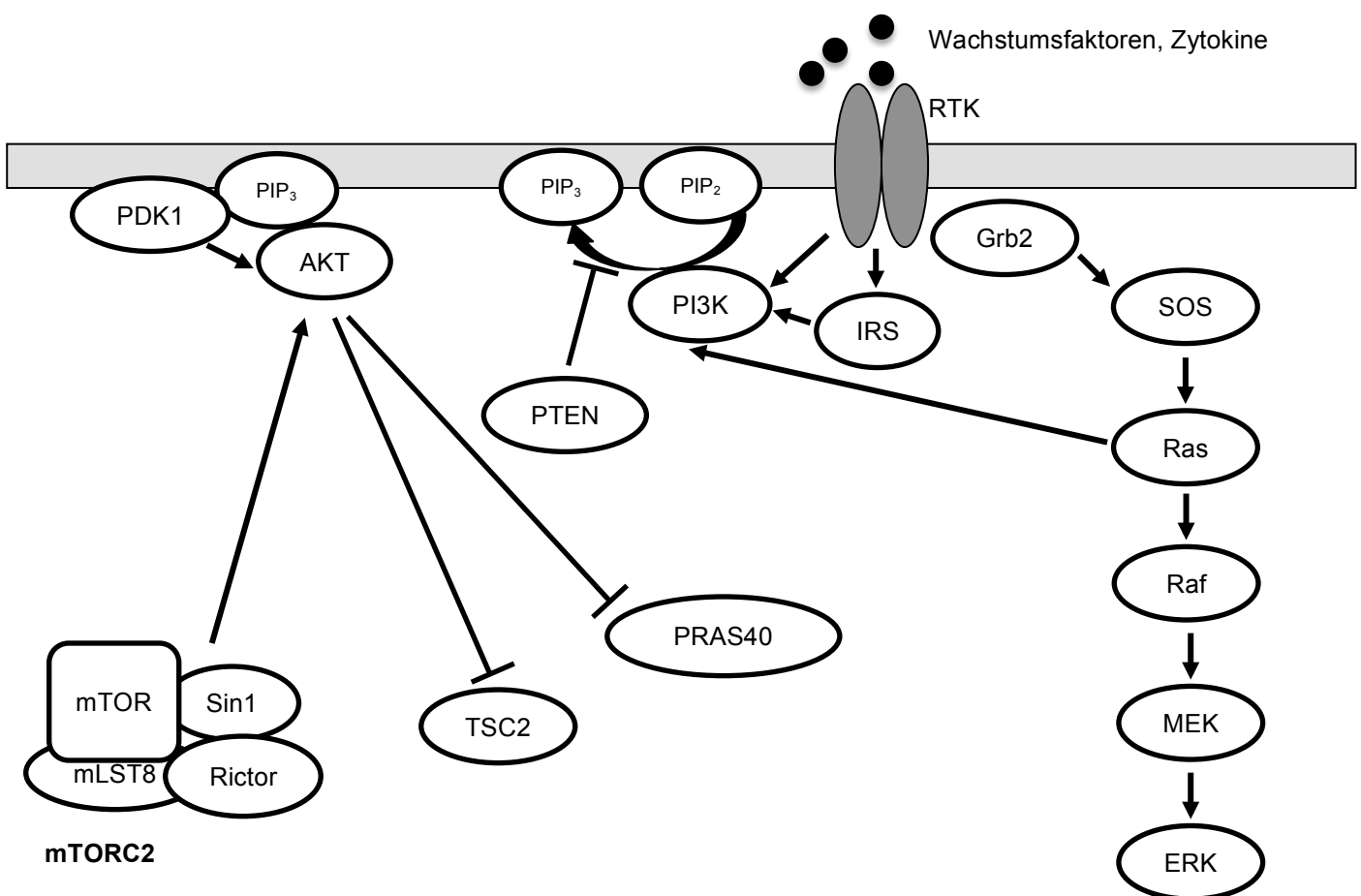


Abb. 3: Aktivierungsmechanismen des PI3K-AKT-Signalweges und des Raf/MEK/ERK-Signalweges: Zu beachten ist, dass es Verbindungen zwischen beiden Signalwegen gibt, etwa zwischen Ras und der PI3K (Aksamitiene, Kiyatkin et al. 2012). PTEN inhibiert die Aktivierung von AKT. Über eine Inhibition von TSC2 und PRAS40 durch AKT wird mTORC1 (vgl. Abbildung 6) aktiviert. Weitere *targets* von AKT sind Abbildung 4 zu entnehmen. Für eine vollständige Aktivierung benötigt AKT zwei Phosphorylierungen, einmal von PDK1 und andererseits von mTORC2. *Abbildung modifiziert nach Dutta and Maity 2007, Manning and Cantley 2007, Lemmon and Schlessinger 2010*

Die Bedeutung dieses Signalweges in Kopf-Hals-Tumoren ist groß: PI3K-Alterationen (bis 40 % der HNSCC), PTEN-Inaktivierungen (15 %) und AKT-Aktivierung sind häufige Ereignisse in HNSCC und korrelieren unter anderem mit einem invasiverem Phänotyp und höherer Wahrscheinlichkeit für Lymphknotenmetastasen (Freudlsperger, Burnett et al. 2011). Eine Aktivierung dieser Kaskade wurde bereits als ein prädiktiver Marker für das Therapieansprechen auf bestimmte Inhibitoren ausgemacht: So hängt das Ansprechen auf Gefitinib mit dem p-AKT Ser473-Level zusammen (Pernas, Allen et al. 2009).

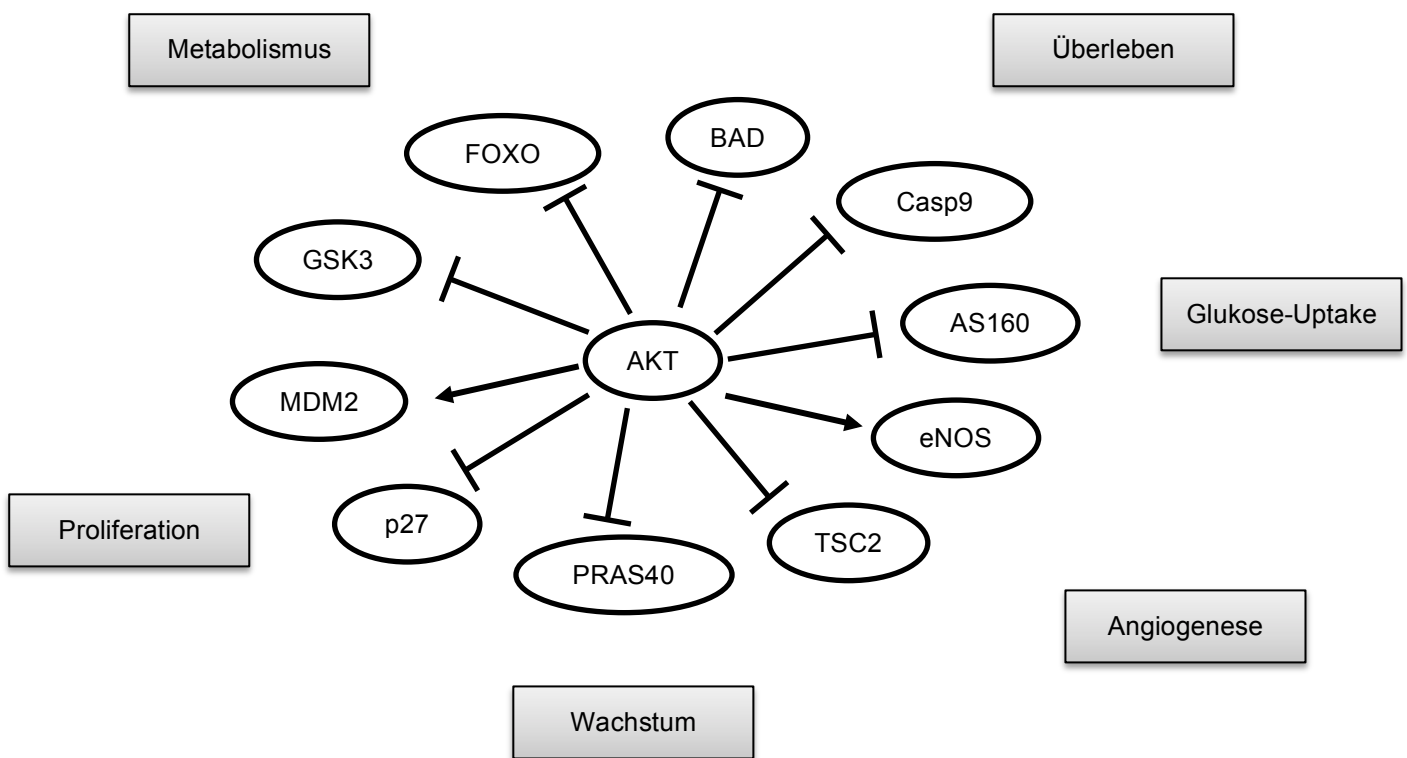


Abb. 4: Downstream targets von AKT und deren zelluläre Funktionen: Kontrolle von Metabolismus, Proliferation, Angiogenese, Wachstum, Überleben und Glukoseaufnahme. Überleben wird unter anderem vermittelt über BAD, FOXO, Caspase9, GSK3 und MDM2, Wachstum über PRAS40 und TSC-Hemmung, Proliferation über p27, MDM2, GSK3, PRAS40 und TSC2, Angiogenese vor allem über eNOS und mTORC1-Aktivierung, Glukoseaufnahme über AS160 und Metabolismus unter anderem über GSK3. *Abbildung modifiziert nach Manning und Cantley 2007*

1.3.3. Mitogen-activated protein (MAP)-Kinasen Signalwege

MAPKs sind Ser/Thr-Kinasen, die über ihre intrazellulären Signalwege Prozesse wie Zellproliferation, Differenzierung, Überleben, Zelltod und Transformation steuern (Kim and Choi 2010). Diese Kinasenfamilie besteht aus drei Untergruppen, der *Extracellular Signal-regulated Kinase* (ERK 1-8), p38 (α - δ) und der *c-Jun NH₂-terminal Kinase* (JNK 1-3 oder auch *Stress-activated Protein Kinase* SAPK) (Dhillon, Hagan et al. 2007). Jede MAPK Signalachse besteht aus mindestens drei Komponenten: einer MAPK Kinase Kinase (MAP3K), einer MAPK Kinase (MAP2K) und einer MAPK. JNK und p38 werden von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α oder IL-1 β oder als Reaktion auf zelluläre Stressfaktoren wie genotoxischen, osmotischen, hypoxischen oder oxidativen Stress aktiviert. Der ERK-Signalweg wird vor allem über Wachstumsfaktoren mittels RTK aktiviert (Kim and Choi 2010). Abbildung 5 gibt eine Übersicht über die drei MAPK Klassen.

Dysregulationen in den Signalwegen können zu Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson, ALS oder Krebs führen (Kim and Choi 2010). Besonders der ERK-Signalweg ist bezüglich Tumorgenese gut untersucht: Wachstumsfaktoren induzieren eine Aktivierung von RTK und die Rekrutierung von Grb2 und SOS, einem GEF für das kleine G-Protein Ras an die Plasmamembran. GDP-Ras wird zu GTP-Ras katalysiert und kann *downstream* Effektoren stimulieren: Zum einen den PI3K-Signalweg und zum anderen die Ser/Thr-Kinase Raf. Diese Kinase wiederum aktiviert über MEK schließlich die eigentliche MAPK ERK (Aksamitiene, Kiyatkin et al. 2012). Doppelt phosphoryliertes ERK kann in den Kern translozieren und andere Signalmoleküle sowie Transkriptionsfaktoren phosphorylieren (Kim, Rath et al. 2007). Dysregulationen im MAPK-Signalweg sind mit die häufigsten Aberrationen, die in Krebszellen gefunden werden: Mutationen in Ras finden sich in 30 % aller Krebsarten, auch Raf-Mutationen sind häufig, wohin gegen MEK- und ERK-Mutationen selten sind (Deschenes-Simard, Kottakis et al. 2014). Eine ERK-Aktivierung mit erhöhter VEGF-Freisetzung als eine Art Rettungssignalweg wurde bei HNSCC nach Bestrahlung gefunden (Affolter, Fruth et al. 2011).

Der p38 MAPK-Signalweg kontrolliert Differenzierung, blockt Proliferation und induziert Apoptose. Eine Aktivierung erfolgt durch DNA-Doppelstrangbrüche, welche durch ionisierende Strahlung oder Chemotherapeutika auftreten können (Thornton, Pedraza-Alva et al. 2008). Zahlreiche Einflüsse der drei MAPK Familien auf Zellmigration über

Adhäsionsmoleküle und Zytoskelett-Reorganisation sind beschrieben (Huang, Jacobson et al. 2004).

Dennoch sollte der ERK-Signalweg nicht als rein onkogen betrachtet werden, schließlich werden auch einige Signalwege mit Tumorsuppressorfunktion von ihm angesteuert. Genaue Evaluationen der molekularen Veränderungen der einzelnen Tumoren sind also nötig, um eine potenzielle therapeutische Inhibition ins Auge zu fassen (Deschenes-Simard, Kottakis et al. 2014).

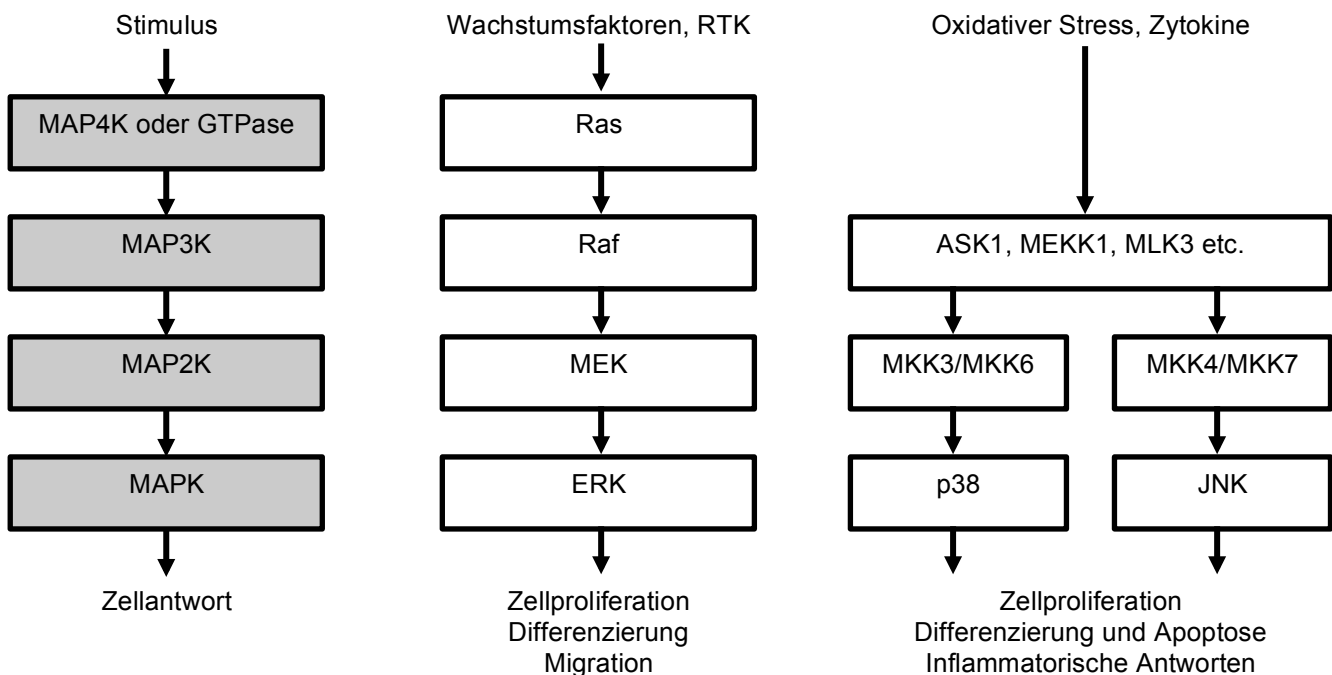


Abb. 5: Darstellung der drei MAPK Familien und deren Aktivierung. *Abbildung modifiziert nach Kim und Choi 2010*

1.4. mammalian target of rapamycin (mTOR) als Steuereinheit der Proteinbiosynthese

mTOR (mammalian target of rapamycin) ist eine evolutionär hoch konservierte Checkpoint Serin/Threonin-Kinase aus 2549 Aminosäuren und bedeutende Steuereinheit für Zellwachstum und Proliferation mittels Regulation der Proteinbiosynthese (Hay and Sonenberg 2004). Ihr Molekulargewicht beträgt 280 kDa und sie wird in die Familie der *phosphatidylinsoitol kinase related kinases* (PIKK) eingeteilt (Wullschleger, Loewith et al. 2006). 1994 wurde das Protein, an welches das Immunsuppressivum Rapamycin bindet, bei Säugern als homologes Protein zu den bereits bei Hefen gefundenen mTOR Proteinen

identifiziert (Sabatini, Erdjument-Bromage et al. 1994). In den letzten Jahren wurden zahlreiche Funktionen und Beteiligungen an Krankheitsbildern dieser Proteinkinase zugeschrieben. So kann eine Dysregulation zum einen zu Erkrankungen wie Krebs, Immundysfunktion, Fettleibigkeit und Diabetes führen (Magnuson, Ekim et al. 2012, Liu, Gan et al. 2013), zum anderen übt mTOR wichtige Funktionen bezüglich synaptischer Plastizität, Gedächtnis und Langzeitpotenzierung im Gehirn aus (Hay and Sonenberg 2004). Erhöhte Expression und Aktivierung von mTOR-Signalwegen sind auch für Kopf-Hals-Tumoren beschrieben worden und gelten als potentielle prognostische und diagnostische Biomarker (Gao, Li et al. 2012). mTOR-Inhibition wiederum übt potente antitumoröse Effekte auf HNSCC Zellen aus, die zu Tumorregression führen (Amornphimoltham, Patel et al. 2005). Rapamycin (Sirolimus) wurde ursprünglich als immunsuppressive Substanz verwendet; Abkömmlinge von Rapamycin, sog. Rapalogs werden zunehmend auch in Krebsstudien eingesetzt, da mTOR-Signalwege in vielen Tumoren hochreguliert sind, meist aufgrund einer Überexpression von Signalwegen, die mit dem mTOR Signaling in Verbindung stehen, wie dem PI3K-AKT-Signalweg (Zaytseva, Valentino et al. 2012). Einige Rapalogs sind bereits von der FDA bei bestimmten Krebsentitäten wie dem Nierenzellkarzinom, neuroendokrinen Tumoren oder Brustkrebs zugelassen.

Die mTOR-Funktion wird über mindestens zwei funktionell verschiedene Komplexe vermittelt, dem mTOR1-Komplex (mTORC1) und dem mTOR2-Komplex (mTORC2). mTORC2 fördert Zellproliferation und Überleben durch eine Phosphorylierung der AKT-Kinase und mTORC1 fördert direkt die Translation von mRNA und damit die Proteinbiosynthese durch eine Phosphorylierung der p70S6-Kinase-1 und des eukaryontischen Initiationsfaktor 4E - Bindeproteins 1 (4E-BP1) (Liu, Gan et al. 2013). mTORC1 ist im Gegensatz zu mTORC2 sensitiv gegenüber Rapamycin und besteht aus folgenden Proteinen: mTOR, Raptor und mammalian lethal with SEC13 protein 8 (mLST8) (auch GβL genannt). mTORC2 formiert sich aus mTOR, Sin1, Rictor und mLST8 (Wullschleger, Loewith et al. 2006).

Im Folgenden werden zunächst die *upstream* Signalwege aufgeführt, welche mTOR beeinflussen; im Anschluss daran die *downstream* Moleküle, welche von mTOR angesteuert werden. Abbildung 6 verschafft eine Übersicht über die beschriebenen Signalwege.

mTOR-Funktion wird über vier große Eingangssignale vermittelt: Wachstumsfaktoren, Nährstoffangebot, Energielevel und Stress (Wullschleger, Loewith et al. 2006).

Nährstoffe, insbesondere Aminosäuren können zu einer Konformationsänderung im mTORC1-Komplex führen und so eine effiziente Interaktion zwischen Raptor, mTOR und mTOR Substraten gewährleisten (Hay and Sonenberg 2004). Im Gegensatz dazu führt ein Mangel an Aminosäuren zu einer Dephosphorylierung der Effektorproteine p70S6K1 und 4EBP1.

mTOR reagiert mittels dem PI3K-Signalweg oder dem Ras/Raf-Signalweg auf Wachstumssignale von Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) z. B. über Insulin Growth Factor (IGF), Platelet derived Growth Factor (PDGF), Insulin oder Epidermal Growth Factor (EGF) (Hay and Sonenberg 2004, Shaw and Cantley 2006, Wullschleger, Loewith et al. 2006): PI3K bindet mittels SH2-Domänen an spezifische Phosphotyrosinreste von RTKs und wird damit an die Plasmamembran rekrutiert, wo es PIP₂ zu PIP₃ generiert. Dieses rekrutiert PDK1 und AKT zur Membran. AKT/Proteinkinase B wird über PDK1 an Thr308 phosphoryliert (Shaw and Cantley 2006) und über mTORC2 an Ser473 phosphoryliert und aktiviert (Liu, Gan et al. 2013). Beide Phosphorylierungen sind notwendig für eine vollständige Aktivierung von AKT (Hay and Sonenberg 2004). mTOR ist an diesen PI3K-AKT-Signalweg über die Tuberous Sklerosis Proteine TSC1 (Hamartin) und TSC2 (Tuberin) angeschlossen. TSC2 wird direkt von AKT phosphoryliert und damit inhibiert und ist als TSC1/TSC2 Heterodimer ein negativer *upstream* Regulator von mTOR (Hay and Sonenberg 2004). Inhibiertes TSC2 kann als GAP (GTPase activating protein) die kleine GTPase Rheb nicht mehr inhibieren und Rheb aktiviert direkt mTOR in GTP-abhängiger Weise (Wullschleger, Loewith et al. 2006). Zum anderen kann AKT PRAS40 phosphorylieren, wodurch dessen Hemmung auf den mTORC1 Komplex aufgehoben wird (Manning and Cantley 2007).

Wachstumsfaktoren können auch über den ERK-Signalweg mTORC1 aktivieren. Über Rezeptortyrosinkinasen wird mittels Signaltransduktion Ras, Raf, MEK und schließlich ERK aktiviert (siehe Abbildung 6). Tuberin ist direktes Substrat von ERK und wird dabei ebenfalls wie von AKT negativ reguliert, wodurch dessen inhibitorischer Einfluss auf Rheb aufgehoben wird (Shaw and Cantley 2006).

Der Energiestatus der Zelle wird über das Verhältnis von AMP zu ATP bestimmt. Die AMPK (AMP-activated protein kinase) wird bei niedrigem zellulären Energielevel bzw. hohem AMP/ATP Ratio aktiviert und aktiviert direkt TSC2, wodurch mTORC1 inhibiert wird (Wullschleger, Loewith et al. 2006).

Auf Stresssituationen wie DNA Schäden oder Hypoxie reagieren Zellen mittels Wachstumsarrest. mTOR spielt dabei eine zentrale Rolle: Unter Hypoxie wird REDD1/2

hochreguliert, welches TSC2 inhibiert (Wullschleger, Loewith et al. 2006); bei DNA Schäden führt die Aktivierung von p53 und p63 zu einer Suppression der mTOR Aktivität (Cam, Bid et al. 2014).

Die *downstream* Effektoren von mTOR stellen hauptsächlich Komponenten dar, die die Initiation des Translationsapparates regulieren, im Besonderen die Ribosomrekutierung zum 5' Ende der mRNA (Hay and Sonenberg 2004). In ruhenden Zellen bindet hypophosphoryliertes 4E-BP1 eng an eIF4E (eukaryontischer Initiationsfaktor 4E) und verhindert dessen Interaktion mit eIF4G (Ma and Blenis 2009). Bei mTORC1 Aktivierung wird 4E-BP1 hyperphosphoryliert (an Thr37 und Thr46 direkt durch mTORC1) (Hay and Sonenberg 2004), eIF4E kann sich lösen und eIF4G sowie eIF4A zum 5' Ende der mRNA rekrutieren und durch Anlagerung weiterer Faktoren kann sich der 48S Translations-Präinitiationskomplex bilden (Ma and Blenis 2009). Ebenso führt mTORC1 Aktivität zur Phosphorylierung der p70S6-Kinase 1 an Thr389, wodurch PDK1 an p70S6K1 binden und sie an Thr229 phosphorylieren und aktivieren kann (Ma and Blenis 2009). Auch die p70S6K liefert entscheidende Beiträge in der Regulierung der Translation: Aktivierte p70S6K nimmt Einfluss auf die mRNA Prozessierung über SKAR und CBP80, auf die Elongation über eEF2 und vermutlich auf Proteinfaltung über CCT β und Ribosomenfunktion über das 40S Ribosomale Protein S6 (Magnuson, Ekim et al. 2012). Zudem ist auch die p70S6K entscheidend an der Initiationsregulation der Translation beteiligt: p70S6K führt zu einer Aktivitätssteigerung des eIF4A, der mit seiner Helicase-Aktivität die mRNA linearisiert und damit der Translation zugänglich macht. Dies geschieht über 2 Wege: Zum einen aktiviert p70S6K einen wichtigen Cofaktor der mRNA Helicase, den eIF4B, zum anderen hemmt die p70S6K PDCD4, welches wiederum den eIF4A inhibiert (Ma and Blenis 2009).

Neuerdings wurde ein weiterer Feedbackloop der S6K beschrieben (Liu, Gan et al. 2013): aktivierte p70S6K phosphoryliert Sin1 an Thr86, einen wichtigen Bestandteil des mTORC2. Ist Sin1 phosphoryliert, kann dieser mTORC2 nicht mehr stabilisieren und der Komplex zerfällt. Ist dagegen die Phosphorylierung der S6K abgeschwächt, ist Sin1 weniger phosphoryliert, mTORC2 stabilisiert und Sin1 kann AKT an Ser473 phosphorylieren. Diese inverse Phosphorylierung zwischen pSin1 Thr86 und p-AKT Ser473 wurde bereits bei T-ALL und Ovarialkarzinom-Zellen nachgewiesen (Liu, Gan et al. 2013).

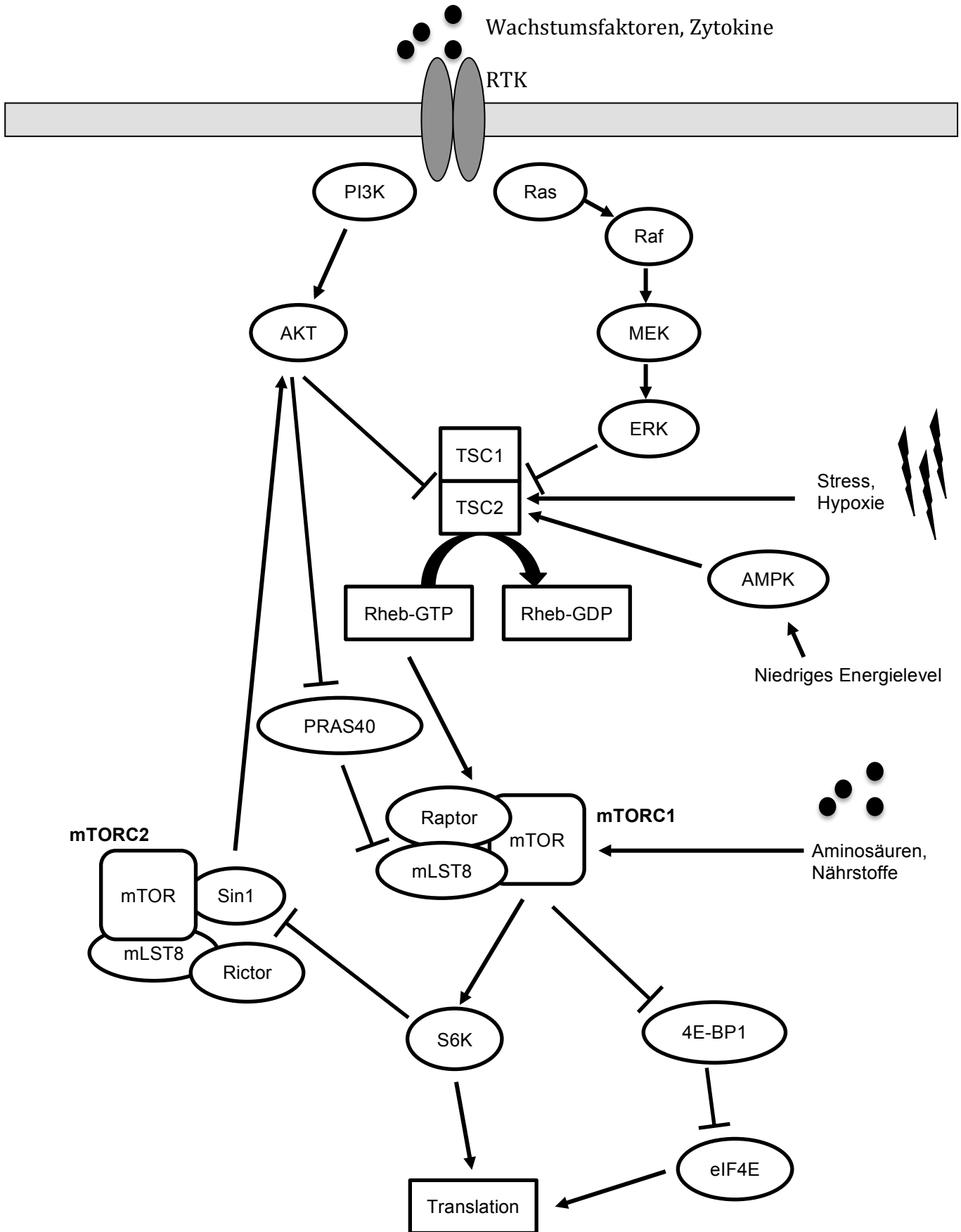


Abb. 6: Übersicht über die Regulation der mTOR Komplexe: Regulierung des mTORC1 über vier Zelleinflussfaktoren: Wachstumsfaktoren, Energielevel, Stress und Nährstoffangebot. *Abbildung modifiziert nach Wullschleger, Loewith et al. 2006, Manning und Cantley 2007, Klaus und Birchmeier 2008, Ma und Blenis 2009, Magnuson, Ekim et al. 2012*

1.5. Glykogen Synthase Kinase 3 β (GSK3 β)

GSK3 wurde 1980 im Skelettmuskel von Kaninchen als eine Kinase beschrieben, die hoch spezifisch die Glykogen Synthase Kinase phosphoryliert und inaktiviert (Embi, Rylatt et al. 1980). 1990 wurden zwei Isoformen als cDNA von Rattenhirnen gewonnen und als GSK3 α und GSK3 β bezeichnet (Woodgett 1990). Inzwischen sind für GSK3 β als Ser/Thr-Kinase zahlreiche Funktionen entdeckt worden, die weit über ihre Rollen im Glukose-Metabolismus hinausgehen und in vielen humanen Erkrankungen wie Diabetes, Inflammation, neurologischen Störungen oder Neoplasien eine Rolle spielen (Frame and Cohen 2001, Mishra 2010): GSK3 β übt in der Zelle wichtige Funktionen bezüglich Zelldifferenzierung, Zellwachstum, Transkriptionskontrolle, Zellzyklus-Regulation, Apoptosesteuerung und Zellmigration sowie der epithelialen-mesenchymalen Transition aus (Forde and Dale 2007, Takahashi-Yanaga and Sasaguri 2008, Sun, Rodriguez et al. 2009, Mishra 2010). Einfluss auf Zellzykluskontrolle übt GSK3 β über eine direkte Phosphorylierung von Cyclin D1 aus, wodurch dieses aus dem Kern exportiert und degradiert wird (Takahashi-Yanaga and Sasaguri 2008). Zum anderen zeigt GSK3 β apoptosefördernden Einfluss, indem es intrinsisch Caspase-8 aktiviert, p53 Aktivität reguliert und Expression von antiapoptotischem bcl-2 blockiert (Mishra 2010).

Neue Untersuchungen in verschiedenen Karzinomarten zeigten eine aktive Rolle von GSK3 β entweder als Tumorsuppressor oder als Tumorpromoter: Für orale SCC, Larynxkarzinome und nasopharyngeale SCC wurde bereits eine Rolle als Tumorsuppressor beschrieben (Mishra 2010), das heißt eine Inaktivierung des Enzyms führt zu einer Entthemmung potentiell onkogener Zellsignalwege. Interessanterweise wird dabei GSK3 β von zahlreichen Signalwegen inhibiert, die selber als onkogen beschrieben sind: Eine der wichtigsten inhibierenden Phosphorylierungsstellen an GSK3 β ist das Ser9, wo neben der p70S6K und der p90RSK vor allem AKT/PKB angreift (Cross, Alessi et al. 1995). Des Weiteren phosphoryliert und inhibiert p38 MAPK das GSK3 β am N-Terminus an Thr390 und führt dabei zu einer Akkumulation von β -Catenin (Thornton, Pedraza-Alva et al. 2008). Auch der ERK-Signalweg assoziiert mit GSK3 β und *primet* es an Thr43 für die Inaktivierung, was ebenfalls in einer Hochregulierung von β -Catenin resultiert (Ding, Xia et al. 2005).

GSK3 β ist damit ein Regulationsenzym zwischen diesen onkogenen Signalwegen und *downstream targets* wie Transkriptionsfaktoren, Zellzyklusregulatoren, und invasions-

fördernden Faktoren und spielt aus diesen Gründen eine große Rolle in der epithelialen Zellhomöostase (Mishra 2010). Transkriptionsfaktoren wie AP-1, NFκB, c-Myc, β-Catenin, Snail oder CREB werden mittels Phosphorylierung durch GSK3β destabilisiert (Mishra 2010). Besonders dem Wnt-β-Catenin Signalweg wird eine Beteiligung an Invasion und Migration in oralen Tumoren zugeschrieben (Iwai, Yonekawa et al. 2010). Der Wnt-Signalweg spielt eine entscheidende Rolle in der Embryonalentwicklung, Gewebeerneuerung und vielen anderen Prozessen, wobei Mutationen und Dysregulationen von Bestandteilen dieses Signalweges Krebs und andere Krankheiten verursachen können (Klaus and Birchmeier 2008). In der Abwesenheit von Wnt-Liganden liegt β-Catenin in einem Abbaukomplex bestehend aus APC, Axin, CK1α und GSK3β gebunden vor, wird von GSK3β und CK1α phosphoryliert, von einer E3 Ubiquitin Ligase folglich ubiquiniert und proteasomal degradiert. Unter der Präsenz von Wnt-Liganden werden Dishevelled Moleküle zur Plasmamembran rekrutiert, wo sie mit LRP5, LRP6 und Axin interagieren, was zu einer Inaktivierung und Destabilisierung des Abbaukomplexes führt (Klaus and Birchmeier 2008). β-Catenin ist dadurch stabilisiert und kann im Nucleus einen Transkriptionskomplex mit LEF/TCF und Coaktivatoren ausbilden und es kommt zur Transkription von Faktoren wie myc, Cyclin D1, VEGF, Matrix Metalloproteinasen 1 oder 7 (MMP-1/7) (Klaus and Birchmeier 2008, Iwai, Yonekawa et al. 2010). Für aberrantes Wnt/β-Catenin-Signaling wird eine Rolle in der Regulation der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) bei oralen SCC propagiert (Iwai, Yonekawa et al. 2010): β-Catenin wurde als ein Molekül entdeckt, das E-Cadherin an das Aktinzytoskelett anheftet (McCrea, Turck et al. 1991). Verlust von membranständigem E-Cadherin wiederum wird als eine grundlegende biochemische Veränderung angesehen, die auf eine EMT hindeutet (Peinado, Portillo et al. 2004). Daraus konnte bei oralen SCC geschlossen werden, dass eine Akkumulation von aberranten β-Catenin eine Umverteilung von E-Cadherin und des Aktinzytoskeletts bewirkt, die eine EMT und hohe Migrationsaktivität induziert (Iwai, Yonekawa et al. 2010).

Auch über andere Wege wirkt GSK3β auf die Zellmigration: Es beeinflusst die Dynamik von Aktin Filamenten durch Rac/Arf6 und Rho GTPasen ebenso wie die Dynamik von Mikrotubulifilamenten über APC, Kinesin und Dynein. Des Weiteren kann GSK3β Zell-Matrix-Adhäsionen über Phosphorylierungen von *focal adhesion kinase* (FAK) und Paxillin steuern (Sun, Rodriguez et al. 2009).

Eine Übersicht über die Funktionen der Glykogen Synthase Kinase 3β bietet Abbildung 7.

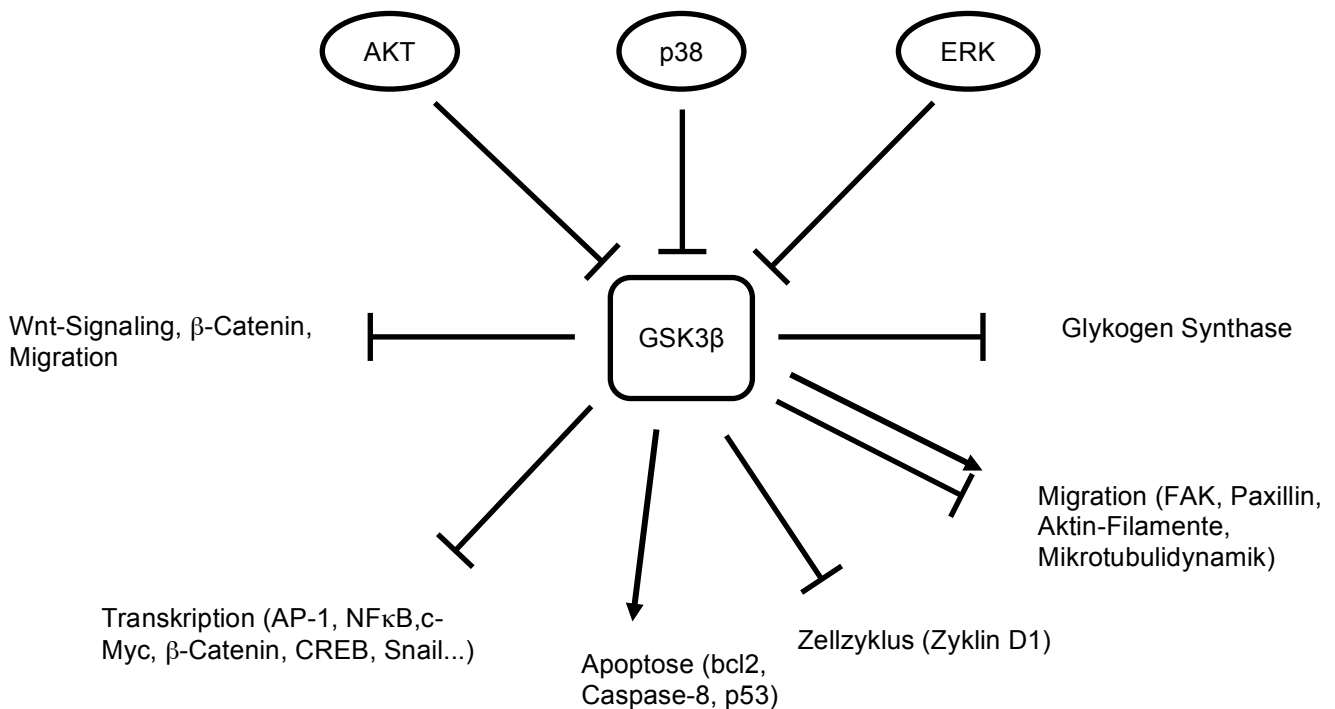


Abb. 7: Übersicht über ausgewählte inhibierende Eingänge an GSK3β und über dessen Funktionen in der Zelle.

1.6. Krebsstammzellen (CSCs) und ihre Marker

Die Hypothese, dass sich Krebs aus einer kleinen Zellpopulation mit Stammzeleigenschaften bildet, ist viele Jahre alt. Bonnet und Dick war 1997 die erste Arbeitsgruppe, der es gelang, Krebsstammzellen bei der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) zu isolieren. Nur diese CD34⁺/CD38⁻ Zellen waren in der Lage, in non-obese diabetic (NOD) - Mäusen mit einem schweren kombinierten Immundefekt (SCID) neue AML zu generieren, mit der Möglichkeit zur Differenzierung, Proliferation und Selbsterneuerung (Bonnet and Dick 1997). In der Zwischenzeit wurden derartige Zellen mit der Fähigkeit die Tumorphosphorie aufrecht zu erhalten, zu metastasieren und resistent gegenüber Radiochemotherapie zu sein, auch bei vielen soliden Tumoren inklusive HNSCC gefunden (Allegra and Trapasso 2012). Diese Zellen, die mit der Fähigkeit ausgestattet sind, neue Tumore zu bilden, machen dabei nur einen sehr kleinen Anteil an den Gesamttumorzellen aus im Rahmen von 1:10000 bis 1:100 (Reya, Morrison et al. 2001). Bei HNSCC waren Prince et al. die ersten, die eine CD44 positive Zellsubpopulation mit Stammzeleigenschaften identifizierten, die einen Tumor in

immundefizienten Mäusen reproduzieren konnten (Prince, Sivanandan et al. 2007). Aus diesen Experimenten ergeben sich folgende Charakteristika, die CSCs auszeichnen: (1) Tumorigenese bei Implantation in immundefiziente Mäuse; (2) spezifische Zelloberflächenmarker, die nicht von normalen Stammzellen exprimiert werden; (3) Tumoren, die von CSCs ausgehen, bestehen wiederum heterogen aus tumorigenen und nicht-tumorigenen Zellen; (4) Selbsterneuerungskapazität über mehrere Generationen (Allegra and Trapasso 2012).

Während der Tumorprogression entstehen zwei Unterformen von CSCs: zum einen stationäre CSCs, die eingelagert und geschützt im Epithel in sogenannten Nischen mit stromalen Komponenten liegen und eine Rolle bezüglich Radiochemotherapieresistenzen spielen; zum anderen bewegliche CSCs mit der Fähigkeit zur Migration und zur Bildung regionaler und ferner Metastasen (Allegra and Trapasso 2012).

Als etablierter CSC-Marker bei HNSCC gilt CD44, da nur die CD44⁺ im Gegensatz zu den CD44⁻ Zellen in der Lage sind, neue Tumore in immungeschwächten Mäusen zu bilden (Prince and Ailles 2008). CD44 ist ein Glykoprotein der Zellmembran, von dem aufgrund alternativem Splicings ca. 20 Varianten existieren (Faber, Barth et al. 2011). CD44 bindet Hyaluronsäure, ein ECM-Bestandteil das vor allem in Stammzellnischen vorkommt; Bindung an Hyaluronsäure wiederum führt zu einer Änderung der Membranlokalisierung von CD44 und triggert die Assoziation und Aktivierung von vielen Signaltransduktionsmolekülen wie *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *fibroblast growth factor* (FGF₂) oder *hepatocyte growth factor* (HGF), von RTK Signalwegen wie AKT oder *rat sarcoma* (Ras) und von Proteasen, was vermehrte Zellmigration induziert (Zoller 2011). Erhöhte CD44 Expression wurde mit schlechter T- und N-Kategorie, schlechtem Tumorgrad und schlechter Prognose bei Pharynx- und Larynxkarzinomen in Verbindung gebracht (Chen, Zhou et al. 2014).

Octamer-binding transcription factor 4 (Oct4) ist essentiell für die Selbsterneuerung embryonaler Stammzellen und wird in Verbindung gebracht mit CSCs, Strahlenresistenz und schlechter Prognose (Ventelä, Sittig et al. 2015, Wang, Lu et al. 2014). Nanog ist ebenfalls ein Transkriptionsfaktor, wobei Nanog und Oct4 gegenseitig ihre Expression induzieren. Sie spielen eine Schlüsselrolle bezüglich Selbsterneuerung und Pluripotenz von embryonalen Stammzellen und sind Biomarker für CSCs, wobei ihnen eine positive Regulation von epithelialer-mesenchymaler Transition (EMT) zugeschrieben wird (Wang, Lu et al. 2014). Eine Interaktion von Hyaluronsäure-CD44v3 mit Oct4-Sox2-Nanog wurde

bei HNSCC beschrieben, die zur Selbsterneuerung, klonaler Formierung und Cisplatinresistenz führt.

Ein weiterer Krebsstammzellmarker ist die Aldehyd Dehydrogenase (ALDH). Für Tumorzellen mit hohem ALDH-Gehalt konnte gezeigt werden, dass sie in immundefizienten Mäusen neue Kopf-Hals-Tumoren produzieren, wobei der größte Teil der ALDH⁺ Zellen auch CD44⁺ sind (Clay, Tabor et al. 2010).

1.7. Epitheliale-mesenchymale Transition (EMT)

Das Auftreten von Zellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften wurde mit dem Prozess der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) in Verbindung gebracht (Mani, Guo et al. 2008). EMT ist ein Prozess, bei dem epitheliale Zellen mesenchymale Eigenschaften erhalten und einen Verlust von Zellpolarität, eine Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts und Änderungen in Zellverbindungen erfahren (Thiery 2003). Dies ist unabdingbar für die Entwicklung des Organismus, Wundheilung und Fibrosierung, aber auch für das Fortschreiten von Karzinomkrankungen (Lamouille, Xu et al. 2014). Viele Studien konnten zeigen, dass EMT zu Rückfällen bei Krebserkrankungen, zu Resistenzen bei Chemotherapie, zu Resistenz gegenüber Apoptose und schlechterem klinischen Outcome führt (Thiery, Acloque et al. 2009).

Der Verlust von membranständigem E-Cadherin wird dabei als fundamentaler Schritt der EMT erachtet (Peinado, Portillo et al. 2004). Bedeutende Transkriptionsfaktoren, die mit diesem Prozess in Verbindung gebracht wurden, sind Snail, Slug, Twist und ZEB (Lamouille, Xu et al. 2014). Eine Aktivierung von Signalwegen wie dem AKT-, ERK-Signalweg, p38 Signalweg oder JNK Signalweg durch z. B. TGFβ, kann zu einer Zellantwort durch Expression der genannten Transkriptionsfaktoren führen, die den Prozess der EMT anstößt (Lamouille, Xu et al. 2014). ZEB und Snail sind in der Lage die Zellpolarität zu ändern (Thiery, Acloque et al. 2009) und Slug und ZEB1 vermitteln transkriptionelle Repression von E-Cadherin (Yilmaz and Christofori 2009). Slug Expression wird mit dem sogenannten Cadherin-Switch in Verbindung gebracht, einem Verlust von E-Cadherin und einem Anstieg von N-Cadherin an den Zellrändern bei oralen SCC (Katafiasz, Smith et al. 2011). Claudin, ein anderer Marker für EMT, fördert Invasion und Metastasierung bei oralen SCC. Epitheliale-mesenchymale Transition ist also eng verknüpft mit dem Invasionsverhalten von Tumorzellen und bildet dadurch die Basis, dass

Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen bei HNSCC entstehen können (Leemans, Braakhuis et al. 2011).

1.8. Zielsetzung

Wie in den vorigen Kapiteln aufgezeigt, spielen die Rezeptortyrosinkinase-abhängigen Zellsignalwege eine sehr wichtige Rolle in der Entstehung und Aufrechterhaltung von Kopf-Hals-Tumoren.

Zielsetzung dieser Arbeit war es nun, in *in vitro* Experimenten die biochemischen Mechanismen von Tumorzellmigration und Tumorzellüberleben bei HNSCC zu erforschen, im Besonderen hinsichtlich des Zusammenspiels der EGFR-abhängigen Signalwege wie des AKT/PKB- und des MAPK-Signalweges mit dem Tumorsuppressor GSK3 β und dem mammalian target of rapamycin (mTOR). Hierbei sollte vor allem der Einfluss von ionisierender Bestrahlung auf Tumoreigenschaften wie Migration, Invasion sowie dem Auftreten von Krebsstammzellen (CSCs) untersucht werden, da die Strahlentherapie eine klinische Standardtherapie bei der Behandlung von HNSCC darstellt.

Die Erforschung dieser Signalwege und deren Bedeutung für Zellmigration, -überleben und -invasion unter dem Einfluss von Bestrahlung könnten Ansätze für die Entwicklung und den klinischen Einsatz wirksamer Inhibitoren liefern, um die regionale Kontrolle der Kopf-Hals-Tumore zu verbessern und das Auftreten regionaler Tumorrezidive und Metastasen einzudämmen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Zelllinien

Für die Versuche wurden drei verschiedene HNSCC Zelllinien verwendet. Diese sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Zelllinie	Tumorlokalisierung	TNM; Grading	Alter	Geschlecht
Cal27	Zunge	G3	56	m
HN	Weicher Gaumen	G2	60	m
UD-SCC-5	Supraglottis	T1N1M0; G3	44	m

Tab. 5: verwendete Zelllinien (Lin, Grandis et al. 2007)

2.1.2. Inhibitoren

Tabelle 6 zeigt die im Rahmen der Arbeit verwendeten Inhibitoren und die bei den Experimenten eingesetzten Konzentrationen.

Name Inhibitor	Wirkmechanismus	Konzentration	Hersteller
MK2206 2HCl	AKT1/2/3-Inhibitor	5 μ M	Selleckchem, Houston, TX, USA;
PD98059	MEK1-Inhibitor	50 μ M	Selleckchem, Houston, TX, USA;
U0126-EtOH	MEK1/2-Inhibitor	25 μ M	Selleckchem, Houston, TX, USA;
SB203580	p38 MAPK-Inhibitor	10 μ M	Selleckchem, Houston, TX, USA;

Tab. 6: Inhibitoren

2.1.3. Primär- und Sekundärantikörper

In Tabelle 7 und Tabelle 8 sind die verwendeten Primär- bzw. Sekundärantikörper beschrieben.

Primärantikörper	Verdünnung	Hersteller	Molekulargewicht
EGFR (1005)	1:2500	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA	170 kDa
p-EGFR Tyr1068	1:2500	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	175 kDa
AKT	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	60 kDa
p-AKT Ser473 (D9E) XP	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	60 kDa
p44/42 MAPK (Erk1/2)	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	42, 44 kDa
p-p44/42 MAPK (Erk1/2) Thr202/Tyr204 (D13.14.4E) XP	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	42, 44 kDa
p38 MAPK (D13E1) XP	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	40 kDa
p-p38 MAPK Thr180/Tyr182 (D3F9) XP	1:500	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	40 kDa
Tubulin	1:10000	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	50 kDa
mTor	1:500	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	289 kDa
p-mTor Ser2448 (D9C2) XP	1:500	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	289 kDa

p70S6 Kinase (49D7)	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	70, 85 kDa
p-p70S6 Kinase Thr389	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	70, 85 kDa
4EBP1 (53H11)	1:5000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	15-20 kDa
p-4EBP1 Ser65	1:2500	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	15-20 kDa
p-4EBP1 Thr70	1:5000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	15-20 kDa
GSK-3β (27C10)	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	46 kDa
p-GSK-3β Ser9	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	46 kDa
p-GSK-3β Thr390	1:500	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	46 kDa
β-Catenin (6B3)	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	92 kDa
p-β-Catenin Ser33/37	1:500	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	92 kDa
CD29 Integrin-β1	1:10000	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA	130 kDa
CD104 Integrin-β4	1:500	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA Laboratories TM	200 kDa
FAK	1:5000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	125 kDa
p-FAK Tyr397	1:5000	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA	116-125 kDa

Paxillin	1:500	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	68 kDa
p-Paxillin Tyr118	1:500	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	68 kDa
Sin 1 (D7G1A)	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	78, 74 kDa
p-Sin 1 Ser385	1:1000	Millipore, Temecula, CA, USA	78, 74 kDa
Anti-Phospho-Threonin (20H6.1)	1:1000	Millipore, Temecula, CA, USA	
ALDH1A1 (D4R9V)	1:500	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	55 kDa
CD44 (8E2)	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	80 kDa
Oct4	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	45 kDa
Sox2 (D6D9)	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	35 kDa
Nanog	1:2000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	42 kDa
Slug (C19G7)	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	30 kDa
Snail (C15D3)	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	29 kDa
N-Cadherin (D4R1H)	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	140 kDa
Claudin-1 (D5H1D)	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	20 kDa

ZO-1 (D6L1E)	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	220 kDa
TCF8/ZEB1 (D80D3)	1:1000	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA	200 kDa
E-Cadherin (HECD-1)	1:100 (Immunfluoreszenz)	Invitrogen™ by life technologies™, Darmstadt, Deutschland	120 kDa

Tab. 7: Primärantikörper

Sekundärantikörper	Verdünnung	Hersteller
Anti-Mouse IgG HRP-linked	1:10000 (Towbin, Staehelin et al.)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
Anti-Rabbit IgG HRP-linked	1:5000 (Towbin, Staehelin et al.)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
Goat anti-mouse IgG, FITC-conjugated	1:100 für Immunfluoreszenz	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA

Tab. 8: Sekundärantikörper

2.1.4. Reagenzien

In Tabelle 9 sind die für die Zellkultur benötigten Reagenzien aufgeführt. Tabelle 10 beinhaltet alle weiteren im Rahmen der Experimente verwendeten Substanzen. Die Zusammensetzung von gemischten Reagenzien, Puffern und Western Blot Gels gibt Tabelle 11 wieder.

Reagenz	Hersteller
DMEM (1x) + GlutaMAX™-I	gibco® by life technologies™, Carlsbad, CA, USA
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
L-Glutamine 200 mM	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Penicillin 10000 U/ml	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Streptomycin 10000 µg/ml	

DPBS (1x) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (-)CaCl₂ (-)MgCl₂	gibco® by life technologies™, Carlsbad, CA, USA
TrypLE™ Express (1x) Stable Trypsin Replacement Encyme (+) Phenol Red	gibco® by life technologies™, Carlsbad, CA, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO) ≥99,5 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Tab. 9: Reagenzien für die Zellkultur

Reagenz	Hersteller
DPBS (1x) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (-)CaCl₂ (-) MgCl₂	gibco® by life technologies™, Carlsbad, CA, USA
Triton X-100	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Formaldehydlösung säurefrei ≥37 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Stock 20 % SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Aqua dest.	SAV Liquids Production GmbH, Flintsbach a. Inn, Deutschland
Ethanol ≥99,5 % p.a.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Crystal Violett	Sigma-Aldrich. St. Louis, MO, USA
Cell Lysis Buffer (10x)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Bradford Reagenz: Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Bovine Serum Albumin (BSA) 2 mg/ml	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1) Acrylamidstammlösung 30 % mit 0,8 % Bisacrylamide	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris Pufferan® ≥99,9 % p.a.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxidsulfat (APS) ≥98 % p.a.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
1,4 Dithiotreitol (DTT) ≥99,9 % p.a.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
1 % Bromphenol Blau	Sigma-Aldrich. St. Louis, MO, USA
Glycerol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycin ≥99 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tween-20	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid >99,8 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Magermilchpulver (non-fat skimmed milk powder)	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland
SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Methanol ≥99,5 % p.a.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
ε-amino-n-caproic acid	Sigma-Aldrich. St. Louis, MO, USA
Goat Serum (Normal)	Dako, Glostrup, Dänemark
NH₄Cl 500 mM	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Antibody Diluent	Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland
Vectashield® Mounting medium for Floureszenz H-1000	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
Hoechst 33342 Farbstoff für Kernfärbung	Sigma-Aldrich. St. Louis, MO, USA
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Protease Inhibitory Cocktail (10X)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich. St. Louis, MO, USA

Tab. 10: verwendete Reagenzien

Gemischte Reagenzien, Puffer und Gele	Zusammensetzung
0,1 % Triton X-100/PBS	500 µl Triton X-100 1x DPBS ad 500 ml
4 % Formaldehyd/PBS	27 ml Fomaldehyd 37 % 1x DPBS ad 250 ml
1 % SDS	25 ml SDS 20% Aqua dest. ad 500 ml
0,04 % Crystal Violett	40 mg Crystal Violett 100 ml 4% Ethanol
0,01 % Triton X-100/PBS	10 µl Triton X-100 1x DPBS ad 100 ml
0,25 % Triton X-100/PBS	250 µl Triton X-100 1x DPBS ad 100 ml
50 mM NH₄Cl/PBS	1 ml 500 mM NH ₄ Cl PBS ad 10 ml
5 % Normal Goat Serum/PBS	500 µl Normal Goat Serum 1x DPBS ad 10 ml
Bovine Serum Albumin 0,2 mg/ml	0,2 µl BSA 0,01 % Triton X-100 ad 1 ml
1 M Tris-Cl pH 8,8	12,1 g Tris Aqua dest. ad 100 ml Mit Essigsäure auf pH 8,8 einstellen
1 M Tris-Cl pH 6,8	12,1 g Tris Aqua dest. ad 100 ml Mit Essigsäure auf pH 6,8 einstellen
10 % APS	1 g APS Aqua dest. ad 10 ml
5x SDS Sample Buffer (10 ml)	3,125 ml Tris pH 6,8 1 M 386 mg DTT 1 g SDS 0,5 ml 1 % Bromphenol Blau 5 ml Glycerol 1,375 ml Aqua dest.

10x SDS Laufpuffer (für 1 l)	30,3 g Tris 140,42 g Glycin 50 ml 20 % SDS Aqua dest. ad 1000 ml Für Gelelektrophorese 1:10 mit Aqua dest. verdünnt
10x TBS (für 1 l)	24,2 g Tris 80 g NaCl Aqua dest. ad 1 l pH auf 7,6 mit Essigsäure einstellen
10 % Tween	10 ml Tween-20 1x DPBS ad 100 ml
Antikörperverdünnungs- und Blockingpuffer (für 1 l)	100 ml 10x TBS 10 ml 10 % Tween 50 g Magermilchpulver 890 ml Aqua dest
Wasch Puffer (1x TTBS) (für 1 l)	100 ml 10x TBS 10 ml 10 % Tween Aqua Dest 890 ml
Anodenpuffer I pH 10,5 (für 500 ml)	18,16 g Tris 100 ml Methanol $\geq 99,5$ % p.a. Aqua dest. ad 500 ml
Anodenpuffer II pH 10,4 (für 500 ml)	1,51 g Tris 100 ml Methanol $\geq 99,5$ % p.a. Aqua dest. ad 500 ml
Kathodenpuffer pH 7,5 (für 500 ml)	1,51 g Tris 100 ml Methanol $\geq 99,5$ % p.a. 2,62 g ϵ -amino-n-caproic acid Aqua dest. ad 500 ml
Stripping buffer (für 1 l)	100 ml Methanol $\geq 99,5$ % p.a. 100 ml Eisessigsäure 800 ml Aqua dest.
Cell lysis buffer (10X)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA

Tab. 11: Mischreagenzien, Puffer und Gels

2.1.5. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 12 listet die Verbrauchsmaterialien inklusive Hersteller auf.

Material	Hersteller
Tissue Culture Dish 100x20 mm	Sarstedt, Inc, Newton, NC, USA
Tissue Culture Plate 6-well-plate	Sarstedt, Inc, Newton, NC, USA
Tissue Culture Plate 96-well-plate	Sarstedt, Inc, Newton, NC, USA
Glas-Pasteurpipetten 150 mm, 230 mm	Brand GmbH+ Co, Wertheim, Deutschland
Reaktionsgefäß 15 ml „Cellstar Tubes“	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsgefäß 50 ml „Cellstar Tubes“	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
SafeSeal Micro Tubes 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipetten-Spitzen Safeguard 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Serologische Pipetten Cellstar 25 ml, 10 ml, 5 ml	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Kryoröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Blotting Paper	Sartorius stedim biotech, Göttingen, Deutschland
Immobilon PVDF Membran	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Toppits Frischhaltefolie	Cofresco Frischhalteprodukte, Minden, Deutschland

Tab. 12: Verbrauchsmaterialien

2.1.6. Kits

In Tabelle 13 finden sich die verwendeten Kits.

Kit	Hersteller
GravityPLUS™ Kit	InSphero AG, Schlieren, Schweiz
GravitTRAP™ Kit	InSphero AG, Schlieren, Schweiz
µ-Slide 8-well ibiTreat	ibidi GmbH, Planegg/Martinsried, Deutschland

Catch and Release® v2.0	Millipore, Temecula, CA, USA
Corning® BioCoat™ Matrigel® Invasion Chamber	BD Bioscience – Discovery Labware, Two Oak Park, Bedford, MA, USA

Tab. 13: Kits

2.1.7. Laborgeräte

Tabelle 14 enthält die benötigten Laborgeräte und deren Herstellerfirmen.

Gerät	Herstellerfirma
Eppendorf Research-Pipetten, Eppendorf Reference-Pipetten	Eppendorf, AG Hamburg, Deutschland
Accu-jet® pro	Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
Vortexer: MS2 Minishaker	IKA-Works, Inc., Wilmington, NC, USA
Rüttler IKA-VIBRAX-VXR	IKA-Works, Inc., Wilmington, NC, USA
Wasserbad Typ 1003	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Sterilbank HeraSafe KS	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Brutschrank HeraCell 150i CO₂ Incubator	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Liebherr Kühlschrank comfort	Liebherr, Biberach an der Riss, Deutschland
Gefrierschrank Liebherr Premium No Frost	Liebherr, Biberach an der Riss, Deutschland
Leica Mikroskop DMI6000 B	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Leica Mikroskopkamera DFC425 C	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge: Centrifuge 5430 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge PerfectSpin Mini	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
PowerPac™ HC	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Magnetrührer RCTbasic	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland

Blotting System Mini-PROTEAN® Tetra System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Trans-Blot® SD Semi Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Molecular Imager ChemiDoc™ XRS+	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Zellzähler Cellometer™ Auto T4	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Analysenwaage SBC 32	SCALTEC, Heiligenstadt, Deutschland
Absaugpumpe Vacuum Pump ME2	Vacuubrand GmbH, Wertheim, Deutschland
ELISA Reader Multiskan FC	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Bestrahlungsgerät Gulmay Medical LTD RS225 X-Ray Box	Gulmay Medical LTD, Camberley, Surrey, England
pH-Meter 766 Calimatic	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Taumel- Rollenmischer	A. Hartenstein Laborbedarf GmbH, Würzburg, Deutschland

Tab. 14: verwendete Laborgeräte

2.1.8. Computerprogramme

In Tabelle 15 sind die verwendeten Computerprogramme aufgeführt.

Computerprogramm	Firma
Leica Application Suite Software V3.8	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Image Lab 5.2.1	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Quantity One Software 4.6.9	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Adobe Photoshop CS5	Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA
Skant for Multiskan FC 2.5.1	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Software Cellometer Auto T4	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
GraphPad Prim 6	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA

Microsoft Office 2011	Microsoft, Redmond, WA, USA
Image Lab™ Software	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

Tab. 15: Computerprogramme

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

Die Zelllinien Cal27 und HN wurden über das Leibniz Institut DSMZ in Braunschweig, UD-SCC-5 über die Hals-Nasen-Ohrenklinik der Universität Düsseldorf bezogen. Als Kulturmedium wurde einfach konzentriertes *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (1x DMEM) unter dem Zusatz von 10 % Fetalem Bovinen Serum (FBS), 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin verwendet. Alle Zelllinien wurden unter Standard-Zellkultur-Bedingungen bei 5 % CO₂ und 37 °C im CO₂-Inkubator kultiviert.

a) Auftauen von Zellen

Die Kryoröhrchen mit den tiefgefrorenen Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C angetaut, die angetauten Zellen in ein 15 ml Reaktionsgefäß mit 5 ml 1x DMEM überführt und mit der Pipette vereinzelt. Diese Zellsuspension wurde auf 10 cm-Zellkulturschalen mit je 7 ml Medium aufgeteilt (ca. 1 ml Zellsuspension pro Zellkulturschale) und über Nacht im CO₂ Inkubator inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

b) Splitten von Zellkulturschalen

Sobald der Zellverband in den Zellkulturschalen eine circa 80 %-ige Konfluenz erreicht hatte (in der Regel nach 2 bis 3 Tagen), wurden die Zellen gesplittet: Hierfür wurde das alte Medium komplett abgesaugt, einmal mit 5 ml PBS gespült und die Zellschale für ungefähr 5 min mit 2 ml Trypsin im Brutschrank inkubiert bis sich die Zellen von der Zellkulturschale ablösten. Zu der abgelösten Zellsuspension wurden 5 ml frisches Medium hinzugefügt, die ganze Suspension in ein 15 ml Reaktionsgefäß übergeführt und gründlich

vereinzelt. Die vereinzelt Zellen wurden in gewünschter Menge auf neue 10 cm-Zellkulturschalen mit frischem Medium ausgesät und weiter kultiviert oder für Bestrahlungs- bzw. Inhibitionsversuche verwendet.

c) Mediumwechsel

Ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage, beziehungsweise am Tag nach jeder Bestrahlung um abgestorbene Zellen zu entfernen. Dabei wurde das alte Medium komplett abgesaugt und durch circa 7 ml frisches Medium ersetzt.

d) Einfrieren von Zelllinien

Die Zellkulturschalen wurden wie beim Splitten abgelöst, in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 1500 rpm für 2 min abzentrifugiert. Der Mediumüberstand wurde abpipettiert und die am Boden des Reaktionsgefäßes abgesetzten Zellen in einem *Freezing Medium* bestehend aus FBS und 5 % DMSO erneut in Suspension gebracht. 1 ml dieser Zellsuspension wurden in Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden über Nacht im Gefrierschrank bei -20 °C eingefroren. Die Langzeitaufbewahrung erfolgte im flüssigen Stickstoff.

2.2.2. Bestrahlung

Für die Bestrahlungsexperimente wurde das Bestrahlungsgerät „RS225 X-Ray Box“ der Firma Gulmay Medical LTD im ZPF (Zentrum für präklinische Forschung) der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie der Technischen Universität München (Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Stephanie E. Combs) verwendet. Die Bestrahlung wurde bei einer gewählten Spannung von 70 kV, einer Stromstärke von 10 mA und einer Tischhöhe von 466 mm mit Filter #3 durchgeführt. Aus diesen Einstellungen resultierte eine Dosis von 1 Gy pro Minute Bestrahlung. Als Bestrahlungsdosen für die Experimente wurden 2 Gy, 10 Gy und eine Bestrahlung von 10 Gy aus 5-maligen Einzeldosen zu je 2 Gy festgelegt. Bei dieser sogenannten fraktionierten Bestrahlung wurde an 5 konsekutiven Tagen mit je 2 Gy bestrahlt um die Dosis einer Woche einer Patientenbestrahlung in den Tumorzelllinien simulieren zu

können. Die Zellen wurden in den Zellkulturschalen oder 6-well-plates mit Medium und Deckel bestrahlt. Jeweilige Kontrollen wurden den gleichen Bedingungen ausgesetzt, jedoch nicht bestrahlt. Eine Proliferationskinetik und eine Kinetik zum klonogenen Überleben der drei Zelllinien wurde mit 0,5 Gy, 1 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy, 8 Gy, 10 Gy, 12 Gy, 14 Gy und 16 Gy durchgeführt. Bei den kombinierten Experimenten aus Inhibition und Bestrahlung wurde der jeweilige Inhibitor (vgl. Tab. 2) 1 h vor der Bestrahlung dem Medium zugeführt.

2.2.3. Proliferationsanalysen: modifizierter Crystal-Violett ELISA

Um das Proliferationsverhalten der HNSCC-Zelllinien zu bestimmen, wurde ein modifizierter Crystal-Violett ELISA durchgeführt. Hierfür wurden Zellsuspensionen von einer 80 % konfluenten Zellschale der Tumorzelllinien auf 5×10^4 Zellen/ml verdünnt und 100 μ l (also 5×10^3 Zellen) dieser Suspension in 6-well-plates mit 5 ml Medium pipettiert. Die 6-well-plates wurden über Nacht im CO₂-Inkubator inkubiert und am nächsten Tag der Behandlung zugeführt (Inhibition, Bestrahlung, Inhibition kombiniert mit Bestrahlung). Die Inhibition erfolgte dabei 1 h vor Bestrahlung. Die Konzentration der Inhibitoren wurde in Vorversuchen festgelegt. Für Experimente mit fraktionierter Bestrahlung wurden die ersten vier Bestrahlungen mit je 2 Gy in 10 cm Zellkulturschalen durchgeführt, die Zellen am vierten Bestrahlungstag 2 h nach der Bestrahlung abgelöst und auf die oben angegebene Zellsuspensionskonzentration verdünnt und 100 μ l in 6-well-plates gegeben (= 5×10^3 Zellen/6-well-plate).

Nach den Behandlungen wurden die 6-well-plates für 10 Tage im Brutschrank ohne Mediumwechsel inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 2 ml pro Well-Untereinheit einer 4 % Formaldehydlösung bei Raumtemperatur 10 min fixiert sowie mit 2 ml 1x DPBS/0,1 % Triton X-100 und 2 ml Aqua dest. gewaschen. Die Zellen wurden mit 2 ml einer 0,04 % Crystal-Violett-Lösung für 20 min gefärbt und im Anschluss mit Aqua dest. dreimal gespült. Anschließend wurden 2 ml einer 1 % SDS-Lösung hinzugegeben und die 6-well-plates für 1 h auf dem Rüttler IKA-VIBRAX-VXR geschwenkt bis die Zellen komplett lysiert waren. 100 μ l dieses SDS-Lysates wurden dreimal in 96-well-plates umpipettiert, die Extinktion bei 595 nm im ELISA-Reader bestimmt und der Mittelwert aus diesen drei Werten gebildet. Die Auswertung des Versuches erfolgte mit der Software Prism 6. Insgesamt wurde der Versuch zur statistischen Auswertung dreimal durchgeführt.

2.2.4. Klonogenes Überleben: Colony Formation Assay

Zur Bestimmung des klonogenen Überlebens wurde ein Colony Formation Assay durchgeführt. Hierfür wurden 10 μl der Zellsuspension mit 5×10^4 Zellen/ml (entspricht 500 Zellen) in einen well mit 5 ml Medium pipettiert. Der Versuchsaufbau entspricht dem des Crystal-Violett-ELISA. Die 6-well-plates wurden ebenfalls über Nacht inkubiert und am nächsten Tag den jeweiligen Behandlungen ausgesetzt. Nach 10 Tagen wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 2 ml 1x DPBS gespült, mit 2 ml 4 % Formaldehydlösung fixiert und erneut mit 2 ml 1x DPBS gespült. Anschließend wurden 2 ml 0,04% Crystal-Violett-Lösung hinzugegeben, die Zellklone für 20 min bei Raumtemperatur gefärbt und danach mit Leitungswasser ausgewaschen. Die gefärbten und fixierten Zellklone wurden, sobald sie getrocknet waren, mittels dem Molecular Imager ChemiDocTM XRS+ und der Software Image Lab 4.1 fotografiert und mit der Software Quantity One 4.6.9 ausgezählt. Die Auswertung der Versuche erfolgte ebenfalls mit Prism 6. Insgesamt wurden n=3 Versuche durchgeführt.

2.2.5. Bestimmung des Zellmigrationsverhaltens: Wound Healing Assay

Der sogenannte *Wound Healing Assay* ist ein wohletabliertes Verfahren um das Zellmigrationsverhalten im Monolayer zu bestimmen (Rodriguez, Wu et al. 2005). Hierfür wurden 1×10^6 Zellen der HNSCC-Zelllinien am Tag vor den jeweiligen Behandlungen pro well in 6-well-plates in 2 ml Medium ausgesät und über Nacht inkubiert. Fraktioniert (5×2 Gy) bestrahlte Zellen wurden am selben Tag nach der vierten Bestrahlung abgelöst und 1×10^6 Zellen pro well ausgesät und inkubiert. Am nächsten Tag wurde in den komplett konfluenten Zellrasen mit einer 200 μl Pipettenspitze und Lineal ein gerader Spalt gezogen – ein sogenannter „*Scratch*“. Die abgekratzten Zellen wurden abgesaugt, zweimal mit 1x DPBS gespült und anschließend 5 ml Medium hinzugefügt und, falls im Experiment vorgesehen, der Inhibitor dazugegeben. Die 6-well-plates wurden im Anschluss 1 h inkubiert und danach bestrahlt. Fotos des Spaltes wurden an der jeweiligen, exakt gleichen Stelle direkt nach der Bestrahlung (= 0 h), nach 5 h und nach 10 h mittels des Leica Mikroskops, der Leica Kamera und der Leica Application Suite Software V3.8 aufgenommen. Das Wiederauffinden der gleichen Stellen wurde durch genaue Markierung gewährleistet. Pro Spalt wurde an 6 verschiedenen Stellen mittels Fotoaufnahme das

Migrationsverhalten dokumentiert.

Die Auswertung der Fotoaufnahmen erfolgte mittels Adobe Photoshop CS5: Hierfür wurde mittels der Histogramm-Funktion die Pixelzahl des Gesamtbildes bestimmt (PG), die Pixelzahl des Spaltes nach 0 h (P1) und die Pixelzahl nach 5 h bzw. 10 h (P2). Daraus konnte mit folgender Formel die zumigrierte Fläche des Scratches bezogen auf die gesamte Fotofläche berechnet werden:

$$A(\%) = 100\% \times \frac{P2 - P1}{PG}$$

Der Versuchsansatz wurde zur statistischen Auswertung jeweils dreimal wiederholt.

2.2.6. Züchtung von Sphäroiden aus der Cal27 Zelllinie: 3D-Zellkultur

Um die Tumorbilogie der HNSCC Zelllinien realitätsnäher im dreidimensionalen Modell zu bestimmen, wurden Sphäroide gezüchtet. Sphäroide bieten hierfür eine gute Möglichkeit, Aspekte wie Zellorganisation, Migration und interzellulärer Adhäsion mittels Integrinen und Cadherinen darzustellen (Bates, Edwards et al. 2000). In umfangreichen Vorversuchen kristallisierte sich letztendlich die Cal27-Zelllinie als die dafür geeignete Zelllinie heraus, da sich mit ihr am besten Sphäroide in der gewünschten Größe, Stabilität und Menge züchten ließen.

Hierfür wurden die Kits GravityPLUS™ und GravitTRAP™ der Firma InSphero verwendet. Cal27 Zellen wurden abgelöst und eine Konzentration von $6,25 \times 10^4$ Zellen/ml ($= 2,5 \times 10^3$ Zellen/40 μ l) eingestellt. 40 μ l dieser Zellsuspension wurden als Tropfen in das Gravity-PLUS™ System je Sphäroid übertragen und inkubiert. Nach 3 Tagen wurden die Tropfen gemäß der Herstelleranleitung in das GravitTRAP™ System überführt, einen weiteren Tag inkubiert und anschließend mittels einer 1000 μ l Pipette aus dem System aufgesaugt und auf mit „ibiTreat“ beschichtete 8-well μ -Slides der Firma ibidi GmbH übertragen, die mit 200 μ l Medium befüllt wurden. Sobald die Sphäroide adhärent waren (in der Regel nach 24-48 h) wurde mit der Bestrahlung begonnen (Kontrolle (ctrl), 2 Gy, 10 Gy, 5x 2 Gy) und die Ausbreitung der Sphäroide mittels Leica Mikroskop und der Leica Application Suite Software fotografiert.

2.2.7. Immunfluoreszenz der Sphäroide mit E-Cadherin

Nach 6 Tagen wurden die Sphäroide auf den μ -Slides mit 200 μ l 4 % Formaldehyd/ 1x DPBS für 30 min bei Raumtemperatur fixiert und anschließend 2x 5 min mit 1x DPBS gespült. Anschließend wurden die Slides mit 200 μ l 0,25 % Triton-X-100/1x DPBS für 10 min inkubiert, 3x 2 min mit 1x DPBS gespült und für 30 min mit 200 μ l 5 % Normal Goat Serum/1x DPBS geblockt. Danach wurde der Primärantikörper gegen E-Cadherin, der 1:100 mit *Antibody Diluent* verdünnt wurde, hinzugefügt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde 3x 2min mit 1x DPBS gespült, der Sekundärantikörper *Goat anti-mouse IgG, FITC-conjugated* (1:100 mit Antibody Diluent) hinzugegeben und 1h bei Raumtemperatur inkubiert und erneut 3x 5min mit PBS gespült. Im Anschluss wurde eine Kernfärbung mit dem Hoechst 33342 Farbstoff (1 μ g/ml) für 5 min durchgeführt, kurz mit PBS gespült und die Slides mit *Vectashield Mountain Medium* überschichtet. Bilder der E-Cadherin-Färbung wurden mit dem Leica Mikroskop und der Leica Application Suite Software aufgenommen.

2.2.8. Proteinisolation

Um die Proteinexpression mittels Western Blot Analysen bestimmen zu können, wurden Proteinlysate gewonnen. Hierfür wurden Proteine von 80 % konfluenten 10 cm Zellschalen 24 h nach der jeweiligen Behandlung isoliert. Eine Kinetik mit Isolation nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h wurde ebenfalls angefertigt.

4,5 ml Aqua dest., 500 μ l 10x Zellysepuffer, 100 μ l PMSF und 100 μ l Protease Inhibitory Cocktail wurden miteinander vermengt und auf Eis zum Kühlen gestellt. Das Medium wurde abgesaugt und die Platten mit 4 °C kaltem 1x DPBS gespült und abgesaugt. 500 μ l des verdünnten Lysepuffers wurden auf die Zellen gegeben, die Zellen mittels Zellschaber abgelöst und in 1,5 ml Micro Tubes überführt. Die Gefäße wurden für 10 min auf Eis gekühlt und zwischendurch mittels Vortexer durchgemischt. Anschließend wurden die Zellsuspensionen bei 4 °C 15 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Der flüssige Überstand mit den gelösten Proteinen wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur Proteinmengenbestimmung bei -20 °C eingefroren.

2.2.9. Bestimmung der Proteinmenge: Bradford Assay

Der *Bradford Assay* (Bradford 1976) dient der Bestimmung der Proteinmenge in Proteinisolaten mittels photometrischer Bestimmung. Die Notwendigkeit der quantitativen Proteinbestimmung besteht darin, dass möglichst äquimolare Mengen der unterschiedlichen Proteinlysate für die Gelelektrophorese zur Vergleichbarkeit verwendet werden sollten. Ziel ist die Bestimmung derjenigen Menge Probelösung aus Proteinlysate und Ladepuffer, die 15 µg Protein enthält. Zunächst wurden die Proteinlysate (s. 2.2.8.) mit 1x DPBS 1:10 verdünnt und 20 µl des verdünnten Lysates mit 180 µl 1x DPBS und 200 µl 0,01 % Triton X-100/1x DPBS vermengt. Das Bradford Reagenz wurde 1:4 mit 1x DPBS verdünnt und 600 µl davon zu den Probelösungen hinzugegeben. Eine Kalibrationskurve wurde mit Hilfe einer 0,2 mg/ml BSA Lösung vermengt mit 0,01 % Triton X-100 hergestellt. Zu jeder dieser BSA-Konzentrationen wurde 600 µl des verdünnten Bradford Reagenz gegeben.

BSA (µg)	0,2 mg/ml BSA (µl)	0,01 % Triton X-100/PBS (µl)
0	0	400
2	10	390
4	20	380
6	30	370
8	40	360

Tab. 16: Kalibrationskurve für *Bradford Assay*

Gemessen wurde die Extinktion der Probelösungen und der Kalibrationslösungen in 96-well-plates bei 595 nm mittels ELISA Reader Multiskan FC. Mittels einer in Microsoft Excel erstellten Kalibrationsgeraden wurde die benötigte Menge Probelösung für die Gelelektrophorese bestimmt.

2.2.10. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um die Proteine nach Größe aufzutrennen wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt auf der Basis eines Tris-Glycin-Laufpuffers nach Laemmli (Laemmli 1970). Zunächst wurden die Laufgele hergestellt (vgl. Tab.17): Die Dichte des Laufgels wurde in Abhängigkeit der Proteingröße gewählt, die man detektieren wollte. Für kleine Proteingrößen wurden Laufgele höherer Dichte verwendet, für größere Proteine Gele mit geringerer Dichte. Die in Tabelle 17 und 18 angegebenen Mengen reichten für 4 Laufgele bzw. Sammelgele aus.

Laufgel-Dichte	7,5 %	10 %	12,5 %
Aqua dest.	5,72 ml	6,64 ml	4 ml
Acrylamidstammlösung 30 % mit 0,8 % Bisacrylamide	5,08 ml	5,32 ml	8,4 ml
1 M Tris pH 8,8	7,48 ml	4 ml	7,48 ml
20 % SDS Lösung	100 µl	100 µl	100 µl
10 % APS	100 µl	100 µl	100 µl
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin-diamin (TEMED)	25 µl	25 µl	25 µl

Tab. 17: Zusammensetzung des Laufgels

Sammelgel-Dichte	5 %
Aqua dest.	7 ml
Acrylamidstammlösung 30 % mit 0,8 % Bisacrylamide	1,672 ml
1 M Tris pH 8,8	1,252 ml
20 % SDS Lösung	50 µl
10 % APS	100 µl
N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin (TEMED)	25 µl

Tab. 18: Zusammensetzung des Sammelgels

Die Gelkammern wurden zu 2/3 mit den zusammengemischten Gelbestandteilen aufgefüllt und mit Aqua dest. übergossen und 45 min bei Raumtemperatur polymerisiert. Im Anschluss wurde das verbliebene Drittel der Gelkammer mit dem Sammelgel befüllt (vgl. Tab. 18) und die Kämmen eingefügt, welche die Ladekammern für die Proteinlösungen formen. Nach einer Polymerisationsdauer von 15 min konnten die Gele beladen werden. Die mittels Kalibrationskurve bestimmte Menge Proteinlysats, das 15 µg Protein enthält, wurde 5:1 mit 5x Sample Puffer vermischt (vgl. Tabelle 7) und für 5 min bei 98 °C im Thermomixer denaturiert. Nach kurzem Abzentrifugieren wurde der Probenansatz in die Gelkammern übertragen. Als Größenstandard wurden 4 µl *PageRulerTM Prestained Protein Ladder* in die jeweils letzte Tasche des Gels pipettiert. Die Laufzeit im Blotting System Mini-PROTEAN[®] Tetra System bei maximal 120 V betrug 3 bis 4 h, abhängig von der Proteingröße.

2.2.11. Western Blot mittels Semidry-Blot System

Western Blot Analysen dienen der Übertragung der in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine vom Gel auf eine Trägermembran. Als Trägermembranen können dabei Nitrocellulose (Towbin, Staehelin et al. 1979) oder modernere Membranen wie PVDF-Membranen dienen (Tovey and Baldo 1989). In den im Rahmen dieser Arbeit gezeigten Western Blots wurden PVDF-Membranen verwendet.

Kathode

- 9 Stück Blotting Papier in Kathodenpuffer
- Gel mit aufgetrennten Proteinen
- PVDF- Membran
- 3 Stück Blotting Papier in Anodenpuffer II
- 6 Stück Blotting Papier in Anodenpuffer I

Anode

**Abb. 8: Aufbau des Semidry Blots;
Wanderungsrichtung zur Anode**

Die PVDF-Membran (9 cm x 4,5 cm) wurde 5 min in Methanol p.a. inkubiert, mit Aqua dest. gespült und 5 min in Anodenpuffer II inkubiert (vgl. Tabelle 7). Zur Orientierung wurde die Membran markiert, 6 Stück Blotting Papier wurden in Anodenpuffer I eingeweicht, 3 Stück in Anodenpuffer II, 9 Stück in Kathodenpuffer (jeweils für ca. 5 min) und folgender Blotaufbau für die Wanderung der Proteine im elektrischen Feld Richtung Anode gewählt (vgl. Abbildung 8).

Der Transfer erfolgte im Trans-Blot[®] SD Semi Dry Transfer Cell bei 225 mA in 80 min.

Die Immundetektion dient der quantitativen Darstellung der Banden eines spezifischen Proteins mittels Primärantikörper für das Protein und Sekundärantikörper für *Mouse-* oder *Rabbit-IgG*. Die Visualisierung erfolgte mittels Chemilumineszenz.

Nach dem Blotten wurde die Membran kurz in Waschpuffer (1x TTBS) geschwenkt und mit 10 ml Antikörperverdünnungspuffer (vgl. Tabelle 7) und dem Primärantikörper in der jeweiligen eingesetzten Verdünnung in einem 50 ml Reaktionsgefäß bei 4 °C über Nacht auf einem Rollenmischer inkubiert.

2.2.12. Immundetektion

Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 7 min in Waschpuffer (1x TTBS) gewaschen und erneut mit 10 ml Antikörperverdünnungspuffer und dem eingesetzten Sekundärantikörper im 50 ml Reaktionsgefäß für 1 h auf dem Rollenmischer inkubiert. Die Membran wurde anschließend dreimal für 7 min im Waschpuffer geschwenkt. Die Membran wurde 1 min in 10 ml *SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate* inkubiert und im Anschluss in Frischhaltefolie eingeschlagen und im Molecular Imager ChemiDoc[™] XRS+ von Bio-Rad entwickelt. Die eingesetzten Sekundärantikörper waren „*HRP-linked*“ also mit einer Horseradisch-Peroxidase verbunden. Dieses Enzym löst eine Reaktion mit der ECL Lösung aus, die mittels des Imagers detektiert werden kann, so dass die Proteinbanden sichtbar werden (Chemilumineszenz Reaktion des Luminols in der ECL Lösung). Die aufgenommenen Bilder wurden anschließend mit der Software Image Lab 5.2.1 von Bio-Rad bearbeitet.

2.2.13. Immunpräzipitation

Proteinisolate für die Immunpräzipitation (IP) wurden auf dieselbe Weise gewonnen wie unter 2.2.8. beschrieben. Die Behandlung der Cal27 Zellen erfolgte dafür folgendermaßen: Kontrolle ohne Behandlung, 2 Gy und 2 Gy + MK2206-2HCl. Für die IP wurde das Kit *Catch and Release®* der Firma Millipore, in dem bereits ein 10x Waschpuffer, ein *Antibody Capture Affinity Ligand* (0,1 mg/ml), ein 1x *Denaturing Elution Buffer* und ein 4x *Non-Denaturing Elution Buffer* sowie *Spin Columns* und *Capture Tubes* enthalten sind, verwendet. Mittels Bradford Assay und Kalibrationskurve wurde die Menge an Proteinlysate bestimmt, die 500 µg Protein enthält. Der 10x Waschpuffer wurde mit Aqua dest. zu einem einfachen Waschpuffer verdünnt, der Bodenverschluss des *Spin Column* abgebrochen, der Deckel abgeschraubt und das Gefäß in ein *Capture Tube* überführt und bei 5000 rpm 30 s abzentrifugiert. Danach wurde der *Spin Column* nacheinander zweimal mit 400 µl des 1x Waschpuffers bei 5000 rpm für je 30 s gewaschen und der Bodenverschluss wieder aufgesteckt. Anschließend wurde die *Spin Column* mit dem angesetzten *Master Mix* für die IP für eine Nacht bei 4 °C auf einem Rollenmischer inkubiert (siehe Tab. 19).

Reagenz	Volumen	Konzentration bzw. Menge
Waschpuffer	x µl	1x
Zelllysat	x µl (bestimmt mit Bradford)	500 µg
Antikörper	10 µl	1:50
Affinity Ligand	10 µl	1x
Endvolumen	500 µl	

Tab. 19: Zusammensetzung Master Mix für Immunpräzipitation

Als Antikörper wurde ein Antikörper gegen Sin1 eingesetzt. Am nächsten Tag wurde der Bodenverschluss wieder entfernt, die *Spin Column* ohne Deckel in ein *Capture Tube* überführt und bei 5000 rpm 30 s zentrifugiert und danach 3x mit 400 µl 1x Waschpuffer bei 5000 rpm gewaschen. Die *Spin Column* wurde anschließend in ein neues *Capture Tube* gesetzt. 70 µl 1x *Denaturing Elution Buffer* wurden in die *Spin Column* pipettiert und wieder 30 s bei 5000 rpm abzentrifugiert. 20 µl des Proteineluats wurden für die Western Blot Analysen verwendet. Als Primärantikörper wurde im Rahmen der Blot Analysen Anti-Phosphothreonin 1:1000 verwendet.

2.2.14. Invasionskammer

Um das Invasionspotential der Tumorzellen zu untersuchen, wurden Versuche mit einer Invasionskammer durchgeführt (*Corning® BioCoat™ Matrigel® Invasion Chamber*). Hierfür wurden die Zellen auf 10 cm Kulturschalen kultiviert und bestrahlt (ctrl, 2 Gy, 5x 2 Gy). Die Invasionskammern wurden von -20 °C auf Raumtemperatur gebracht und die Membran mit 500 µl 37° C warmem 1x DMEM ohne Zusatz von FBS für 2 h rehydriert. Nach der Rehydrierung wurde das Medium verworfen und 500 µl einer Suspension mit 5×10^4 Zellen/ml (entspricht $2,5 \times 10^4$ Zellen) auf das Insert mit der Membran gegeben (das Medium der Zellsuspension enthält dabei kein FBS). Der Boden der Kammern wurde mit 750 µl Medium, das FBS als Chemoattraktans enthält, benetzt. Die Kammern wurden daraufhin bei 37 °C im Inkubator bei 5 % CO₂ für 22 h belassen. Anschließend wurden die nicht-invadierten Zellen mit Hilfe eines Wattestäbchens von der Membranoberfläche abgekratzt, die Membranen mit einem Skalpell herausgeschnitten und für je 2 min in je 700 µl Methanol p.a., Hoechst 33342 (1 µg/ml) und 1x DPBS inkubiert. Das Methanol diente dem Fixieren der Zellen in der Membran; mittels Hoechst wurde eine Kernfärbung der invadierten Zellen vorgenommen, um die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen. Die Membranen wurden auf Objektträger gegeben und mit Vectashield Eindeckmedium benetzt. Unter dem Mikroskop wurde die Anzahl der invadierten Zellen für die jeweilige Behandlung bestimmt.

2.2.15. Statistische Auswertungen

Auswertungen zur statistischen Überprüfung von signifikanten Unterschieden zwischen den einzelnen Behandlungen wurden mit der Software GraphPad Prism 6 von GraphPad durchgeführt. Unter der Annahme einer Normalverteilung der gemessenen Werte wurden dabei *unpaired t-tests* zur Ermittlung von statistischen Signifikanzen unter dem Signifikanzniveau $p < 0.05$ verwendet (vgl. Tabelle 20). Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte ebenfalls mittels Prism 6.

Alle Versuche wurden n=3 durchgeführt, Invasionsversuche n=4.

p-Wert	Signifikanzniveau
p<0,05	* signifikant
p<0,01	** sehr signifikant
p<0,001	*** höchst signifikant

Tab. 20 p-Werte und ihre Signifikanz

3. Ergebnisse

3.1. Biologische Analysen: klonogenes Überleben, Proliferation und Migration

Im Folgenden werden nun die in den Laborexperimenten erzielten Ergebnisse dargestellt. Zu Beginn wurde mittels modifiziertem *Crystal-Violett ELISA* für die Zelllinien Cal27, HN, und UD-SCC-5 eine Strahlenkinetik mit den Bestrahlungsdosen 0 Gy, 0,5 Gy, 1 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy, 8 Gy, 10 Gy, 12 Gy, 14 Gy und 16 Gy aufgestellt, um die biologische Wirkung der Bestrahlung auf die unterschiedlichen Zelllinien in Abhängigkeit von der Strahlendosis erfassen zu können.

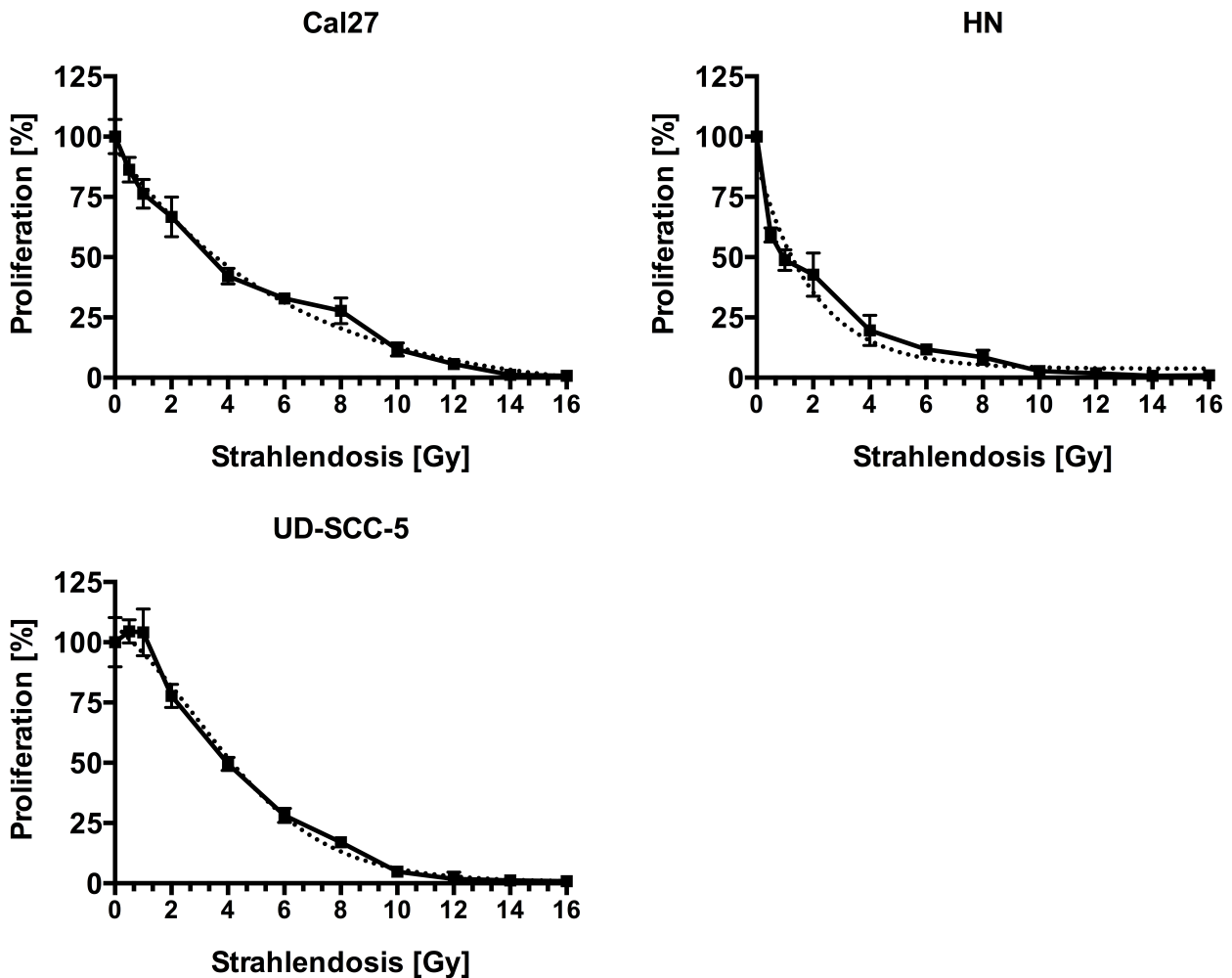
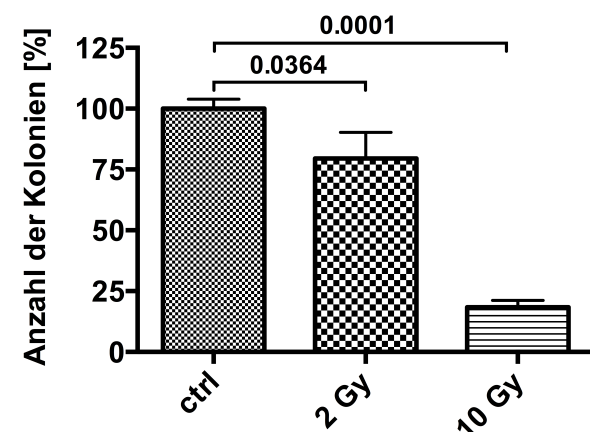


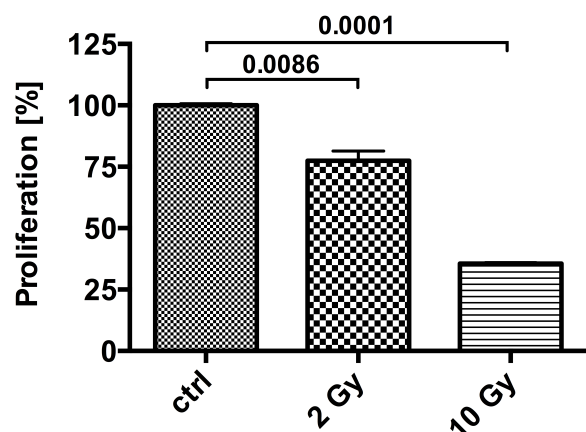
Abb. 9: Darstellung der Strahlenkinetiken von 0 Gy bis 16 Gy für die Zelllinien HN, Cal27 und UD-SCC-5

Anhand der Abbildung 9 lassen sich gewisse Unterschiede im Kurvenverlauf ausmachen: HN ist eine Zelllinie, welche sehr sensitiv bereits auf niedrige Bestrahlungsdosen mit einer Reduktion des Proliferationsverhaltens reagiert, wohingegen UD-SCC-5 eher erst in höheren Gray-Dosierungen mit einer stärkeren Proliferationsabnahme reagiert und somit als strahlenresistentere Zelllinie bezeichnet werden kann. Cal27 liegt diesbezüglich zwischen HN und UD-SCC-5.

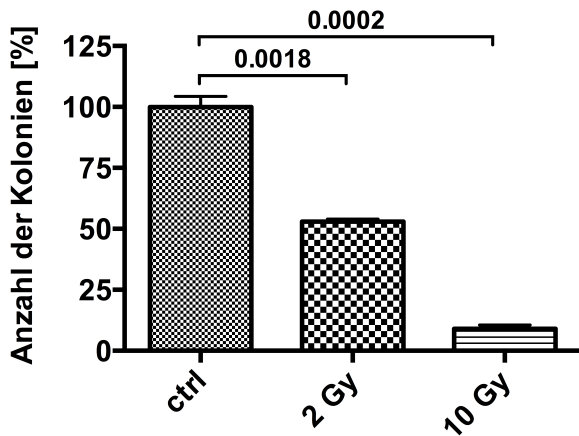
Abbildung 10 stellt für alle drei Zelllinien die biologische Wirkung von 2 und 10 Gy Bestrahlungsdosis auf klonogenes Überleben und Proliferation dar. Bei Cal27 findet sich eine signifikante Abnahme im klonogenen Überleben und der Proliferation unter 10 Gy gegenüber der Kontrolle (jeweils $p < 0.0001$) und eine signifikante Abnahme in der Proliferation ($p = 0.0086$) und des klonogenen Überlebens ($p = 0.0364$) bei 2 Gy. Bei HN als strahlensensible Zelllinie lässt sich eine signifikante Abnahme bezüglich klonogenem Überleben und Proliferation für 2 Gy ($p = 0.0018$ und $p = 0.0033$) und für 10 Gy ($p = 0.0002$ und $p < 0.0001$) nachweisen. Bei UD-SCC-5 findet sich lediglich bei 10 Gy eine signifikante Abnahme des klonogenen Überlebens sowie der Proliferation ($p = 0.0006$ bzw. $p < 0.0001$), bei 2 Gy hingegen lassen sich keine signifikanten Unterschiede gegenüber der Kontrolle nachweisen, was die Ergebnisse der Strahlenkinetik bestätigt und UD-SCC-5 als eine strahlenresistentere Zelllinie charakterisiert.



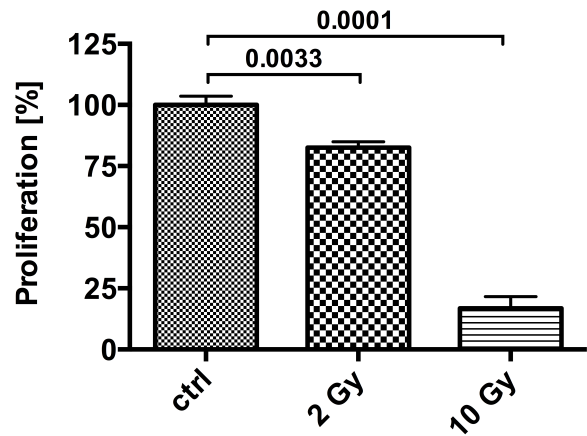
Cal27 klonogenes Überleben



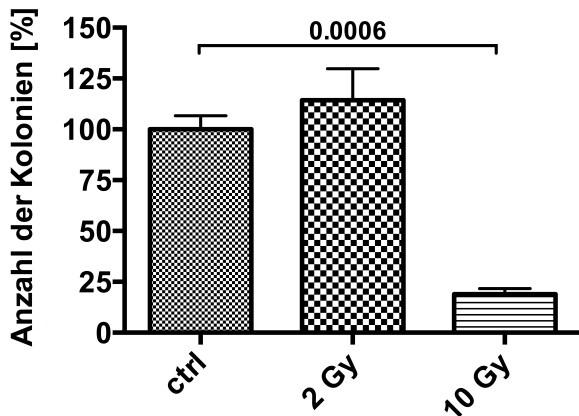
Cal27 Proliferation



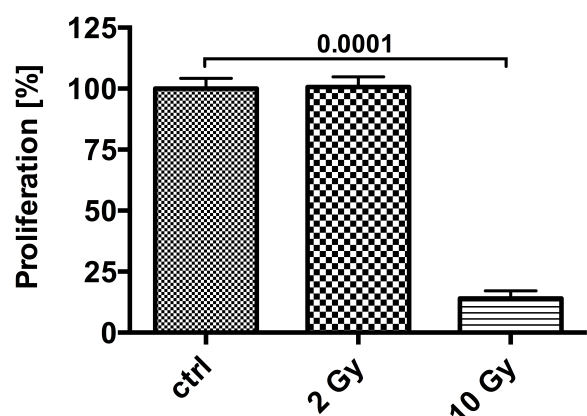
HN klonogenes Überleben



HN Proliferation



UD-SCC-5 klonogenes Überleben



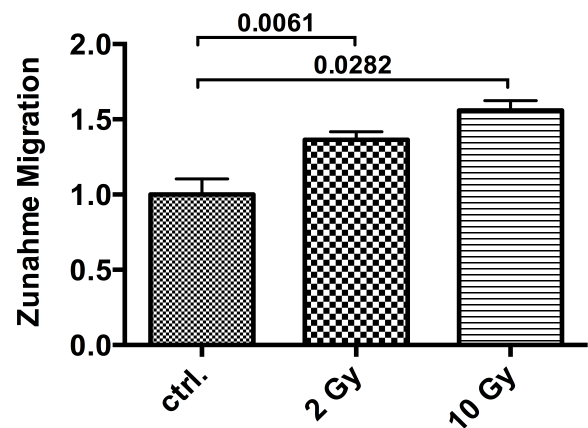
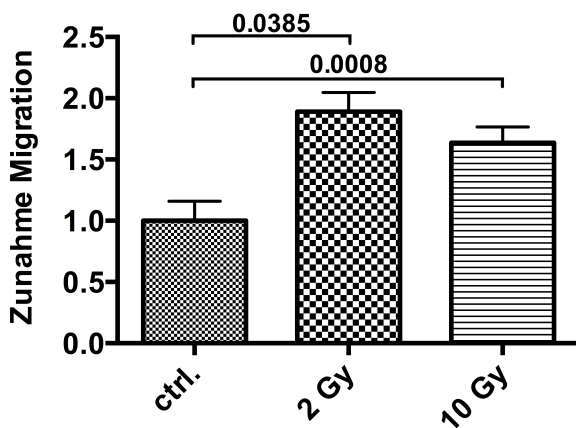
UD-SCC-5 Proliferation

Abb. 10: Klonogenes Überleben und Proliferation

Für einige Tumorentitäten wie dem Glioblastom und HNSCC wurde eine strahleninduzierte Migration beschrieben. Das bedeutet, dass durch Bestrahlung eine Zunahme des migratorischen Potentials entsteht (Wild-Bode, Weller et al. 2001, Pickhard, Margraf et al. 2011). Um das Migrationsverhalten der in dieser Arbeit verwendeten HNSCC Zelllinien zu überprüfen, wurden *Wound Healing Assays* durchgeführt. Abbildung 11 stellt für die Zelllinien HN, Cal27 und UD-SCC-5 die Zunahme der Zellmigration nach 10 h dar. Für alle drei Zelllinien war eine signifikante Zunahme der Zellmigration bei Bestrahlung mit 2 Gy und bei 10 Gy gegenüber den Kontrollen nachweisbar: Für Cal27 lagen die signifikanten Unterschiede der Behandlung mit 2 Gy gegenüber der Kontrolle bei $p=0.0385$ bzw. bei Vergleich einer Behandlung mit 10 Gy mit dem Kontrollversuchsansatz bei $p=0.0008$.

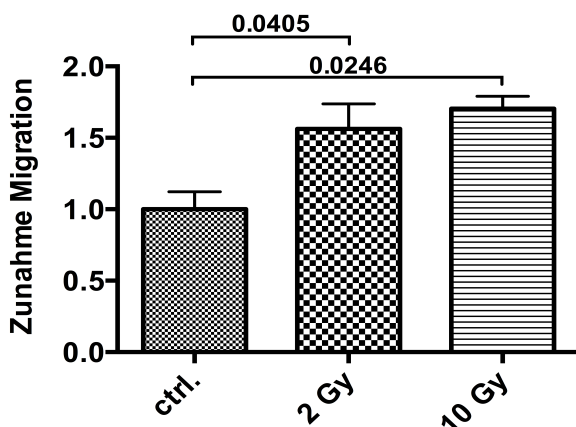
Verglichen mit dem Kontrollansatz lagen die p-Werte für HN bei $p=0.0061$ unter 2 Gy Bestrahlungsdosis bzw. bei $p=0.0282$ unter 10 Gy Bestrahlungsdosis, für UD-SCC-5 bei $p=0.0405$ unter 2 Gy bzw. bei $p=0.0246$ unter 10 Gy Bestrahlungsdosis. Zusammenfassend ist somit in allen verwendeten Zelllinien eine sogenannte strahleninduzierte Migration der HNSCC-Zellen nach 10 h nachweisbar, und dies sowohl bei Bestrahlung mit einer Einmaldosis von 2 Gy als auch mit 10 Gy Einzeldosis.

Abbildung 12 stellt für Cal27 exemplarisch mittels Phasenkontrast (10x) mikroskopisch aufgenommene Fotos des *Scratches* nach 10 h für den Kontrollversuch und die mit 2 Gy bzw. 10 Gy bestrahlte Versuchsanordnung dar, anhand derer man die strahleninduzierte Zunahme der Migration gut nachvollziehen kann.



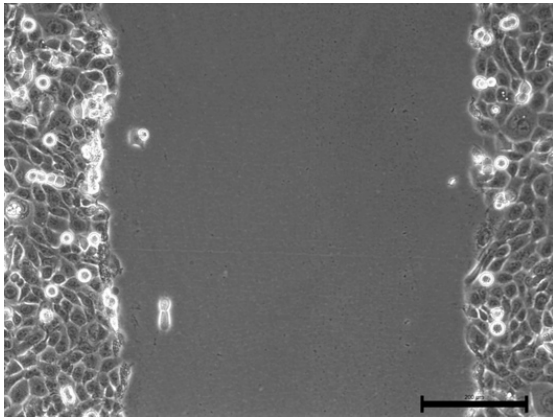
Zunahme der Zellmigration Cal27 unter 2 Gy und 10 Gy Bestrahlungsdosis

Zunahme der Zellmigration HN unter 2 Gy und 10 Gy Bestrahlungsdosis

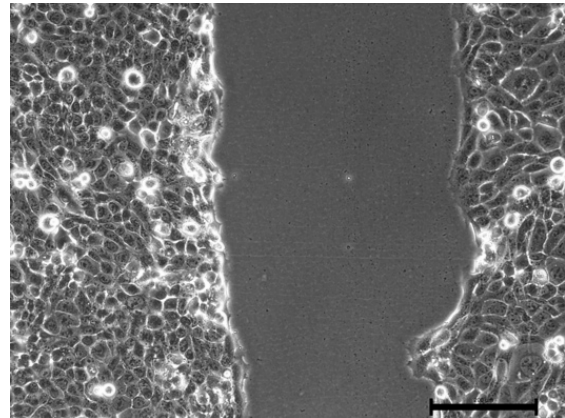


Zunahme der Zellmigration UD-SCC-5 unter 2 Gy und 10 Gy Bestrahlungsdosis

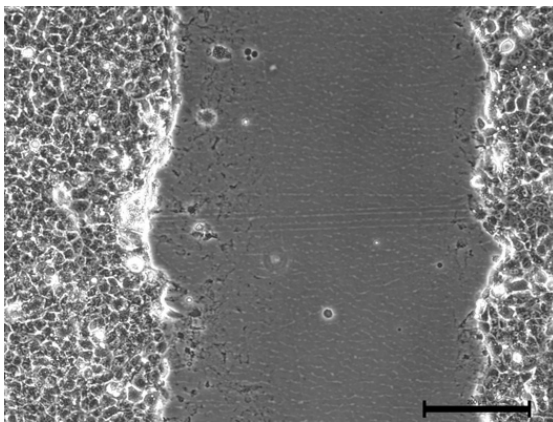
Abb. 11: Zunahme des migratorischen Potentials unter Bestrahlung mit 2 und 10 Gy



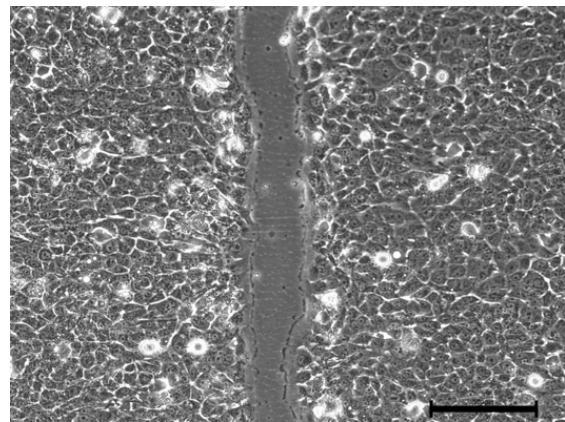
ctrl 0 h



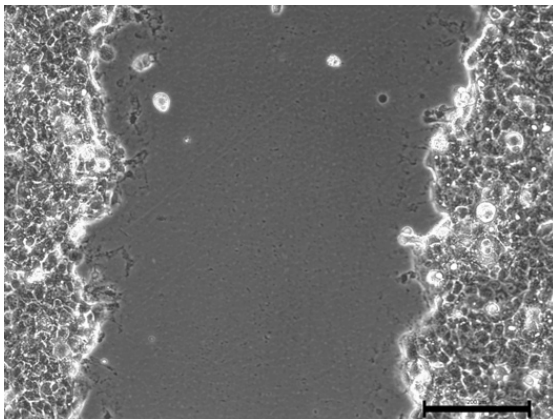
ctrl 10 h



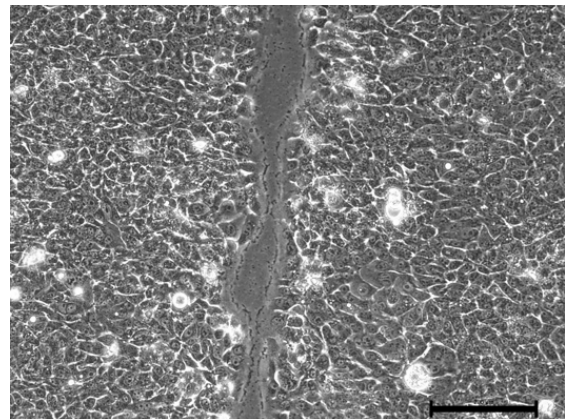
2 Gy 0 h



2 Gy 10 h



10 Gy 0 h



10 Gy 10 h

Abb. 12: mikroskopische Beispielaufnahmen des *Scratches* für ctrl, 2 Gy und 10 Gy nach 10 h (Ca27). Der Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 100 μm

Um die Ergebnisse des *Wound Healing Assays* in einer Versuchsanordnung zu überprüfen, welche die *in vivo* Realität eines Tumors besser abdeckt, wurden kleine

dreidimensionale Tumorgebilde – sogenannte Sphäroide – aus der Cal27 Zelllinie gezüchtet. Diese Sphäroide wurden auf mit „ibiTreat“ beschichtete Objektträger der Firma ibidi übertragen und, sobald adhärent, bestrahlt und die Größenzunahme mittels Phasenkontrastaufnahmen detektiert. Abbildung 13 stellt diese Größenzunahme der mit 2 Gy bzw. 10 Gy bestrahlten Sphäroide im Vergleich zu Kontrollsphäroiden dar. Es ist deutlich erkennbar, dass sich bestrahlte Sphäroide im Zeitverlauf weiter innerhalb der Objektträgerbeschichtung ausbreiten als Kontrollsphäroide und die erzielten Ergebnisse bestätigen jene aus dem *Wound Healing Assay*, wo gezeigt werden konnte, dass bestrahlte Tumorzellen gegenüber unbestrahlten Tumorzellen über ein erhöhtes migratorisches Potential verfügen.

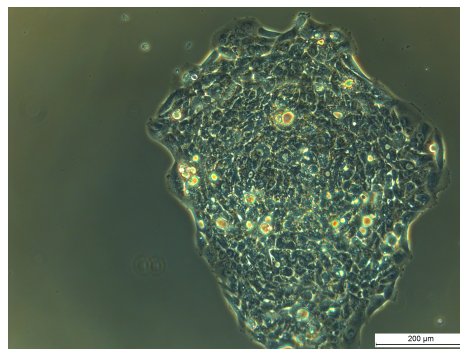
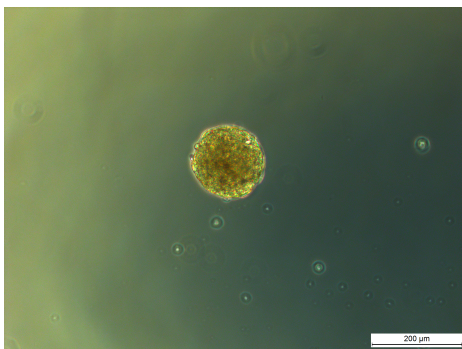
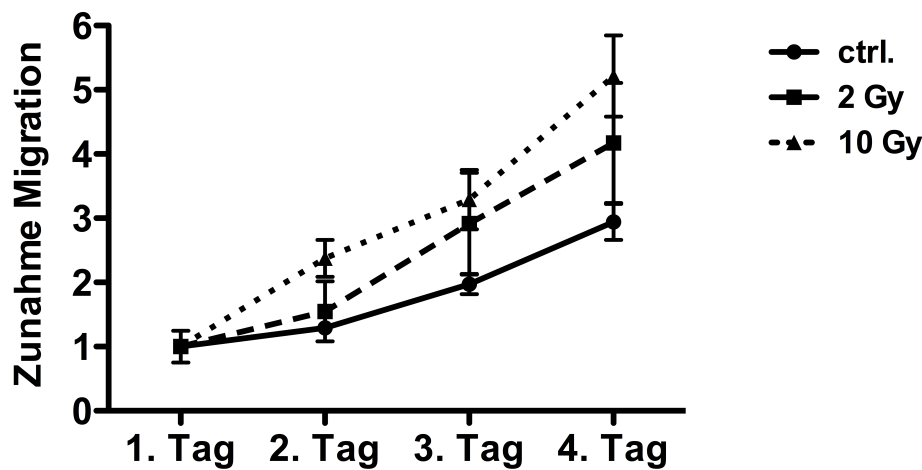


Abb. 13: Größenzunahme von Sphäroiden in der Objektträgerbeschichtung (oben), Beispielaufnahme eines Sphäroids bei Injektion auf Objektträger (unten links) und nach Ausbreitung in Beschichtung des Objektträgers (unten rechts)

3.2. Western Blot Analysen und Wound Healing Assays zum Migrationsverhalten

Um die biochemischen Veränderungen der HNSCC-Zellen unter Bestrahlung zu untersuchen und die bei Migration und Zellüberleben beteiligten Zellsignalwege zu entschlüsseln, wurden Proteinanalysen mittels Western Blot Technik durchgeführt. Da bekannt ist, dass der EGFR und nachgeschaltene Signalwege eine entscheidende Rolle bezüglich Migrationssteuerung und Zellüberleben einnehmen, wurden zuerst diese Zellmoleküle betrachtet. Der Literatur ist zudem zu entnehmen, dass eine durch Bestrahlung induzierte EGFR-Phosphorylierung mit erhöhter Zellmigration korreliert (Rappl, Piontek et al. 2008, Pickhard, Margraf et al. 2011). Ebenso ist beschrieben, dass eine Aktivierung des EGFR bereits wenige Minuten nach der Bestrahlung erfolgt (Schmidt-Ullrich, Valerie et al. 1996). Im Folgenden wurden nun die langzeitigen biochemischen Veränderungen in den Zellsignalwegen beleuchtet. Abbildung 14 stellt die Western Blot Analysen der EGFR-abhängigen Signalwege AKT, ERK und p38-MAPK dar, wobei Proteinisolate 24 h, 48 h, 72 h und 96 h nach der Bestrahlung entnommen wurden. Auffallend ist dabei eine kontinuierliche Aktivierung der EGFR-abhängigen Signalwege: Eine unter Bestrahlung induzierte Phosphorylierung des AKT bei Ser473 ist sowohl unter 2 Gy als auch unter 10 Gy von 24 h bis 96 h nachweisbar, ebenso gilt dies für die ERK-Phosphorylierungsstellen am Thr202 und Tyr204 bzw. die p38 MAPK-Phosphorylierungsstellen am Thr180 und Tyr182. Im Gegensatz dazu ist interessanterweise die Phosphorylierung des EGF-Rezeptors an Tyr1068 in der Zeitkinetik von 24 h bis 96 h abnehmend, was darauf schließen lässt, dass die Aktivierung des EGFR sich tatsächlich nur kurze Zeit nach der Bestrahlung abspielt, wohingegen die Aktivierung der dem EGFR nachfolgenden Zellsignalwege über mindestens 96 h aufrecht erhalten bleibt. AKT, ERK und p38 sind Zellmoleküle, die gemeinsam die Glykogen Synthase Kinase 3 β als *target* haben (Cross, Alessi et al. 1995, Ding, Xia et al. 2005, Thornton, Pedraza-Alva et al. 2008), eine Kinase, welche mit zahlreichen Zellfunktionen, unter anderem auch Zellmigration in Verbindung gebracht wird (Sun, Rodriguez et al. 2009).

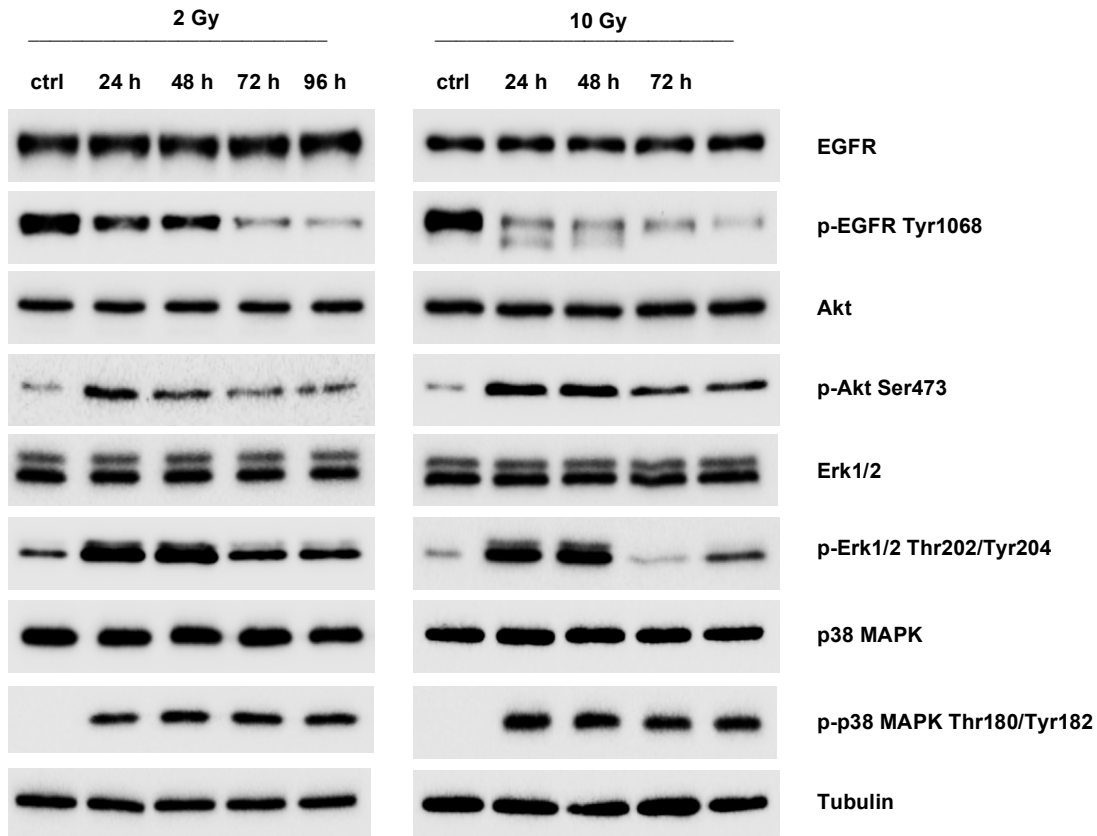


Abb. 14: Darstellung der Proteinanalysen zum Migrationsverhalten mittels Western Blot Technik. Zu sehen sind Analysen des EGFR und der nachgeschalteten Zellsignalwege in einer Zeitkinetik von 24 h bis 96 h

Aus diesen Überlegungen heraus wurden Proteinanalysen von GSK3 β und von GSK3 β -abhängigen Zellmolekülen erstellt, welche die Migration beeinflussen: FAK, Paxillin, β -Catenin und die Integrine β_1 und β_4 . Abbildung 15 zeigt diese Western Blot Analysen: Zu sehen ist eine Zunahme der inhibitorischen Phosphorylierung des GSK3 β am Ser9 unter Bestrahlung, wohingegen die Kontrolle kaum inhibitorische Phosphorylierung am Ser9 aufweist.

Ebenfalls ist in den Analysen über die gesamte Zeitkinetik hinweg unter Bestrahlung eine Abnahme der FAK-Phosphorylierung an Tyr397, der Paxillin-Phosphorylierung an Tyr118 und eine Abnahme der Gesamt-Integrine β_1 und β_4 sichtbar. Die Gesamtproteine von AKT, ERK, p38-MAPK, GSK3 β , FAK, β -Catenin und Paxillin zeigen keine Änderung des Expressionsverhaltens.

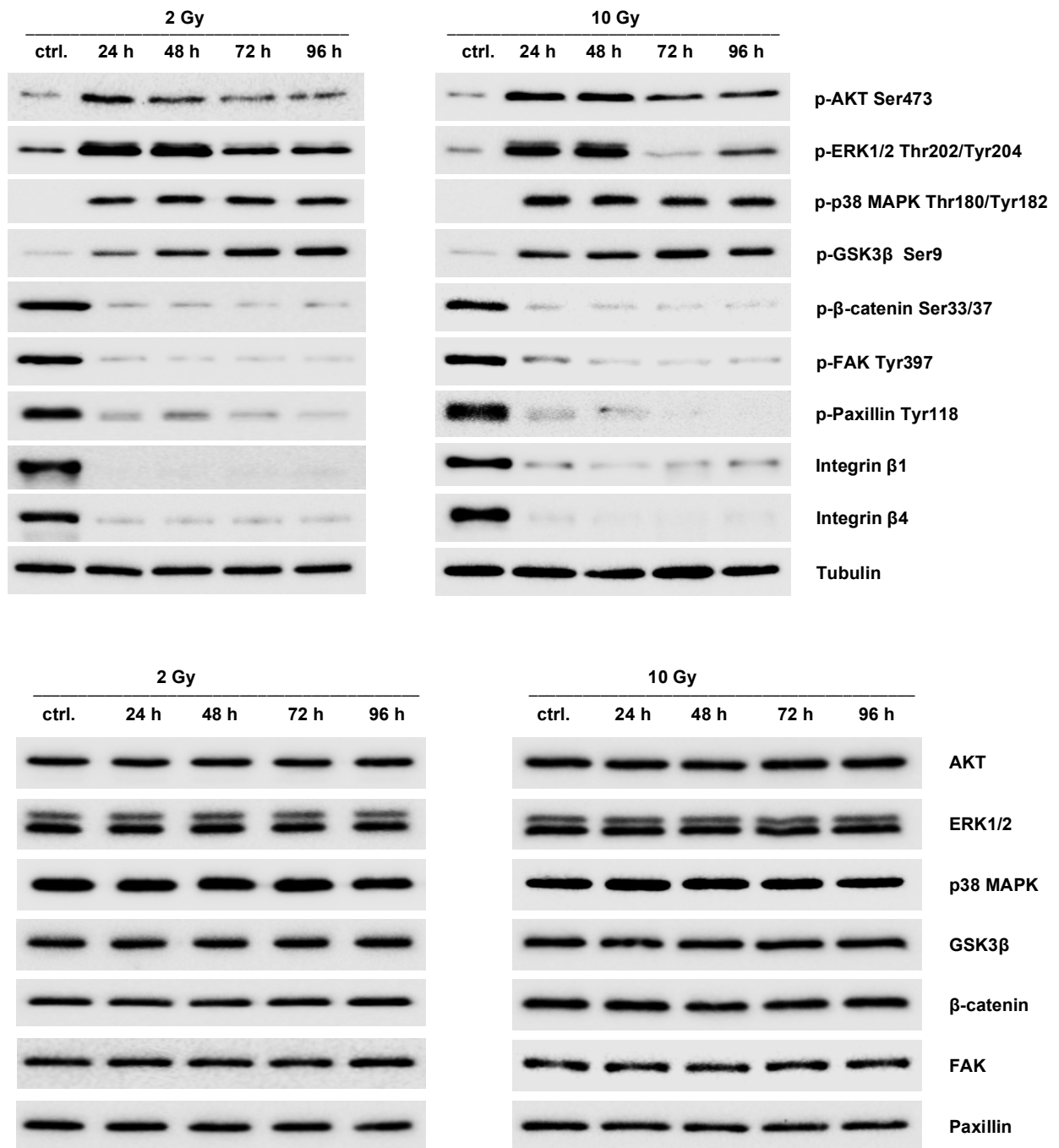


Abb. 15: Western Blot Analysen von GSK3 β und *downstream targets*: die obere Abbildung zeigt die jeweiligen regulierten Phosphorylierungsstellen, die untere Abbildung die jeweiligen Gesamtproteine

Unter der Hypothese, dass die GSK3 β -Inhibition durch die konstitutive Aktivierung der EGFR-abhängigen Signalwege AKT, ERK und p38-MAPK bedingt ist, wurden Western Blot Analysen mit Inhibitoren der jeweiligen Signalwege durchgeführt (vgl. Abbildung 16).

Da die Proteinanalysen zwischen 2 Gy und 10 Gy keine erkennbaren Unterschiede aufwiesen, wurden diese Analysen nur unter der Bestrahlungsdosis 2 Gy mit und ohne Einsatz von Inhibitoren vollzogen.

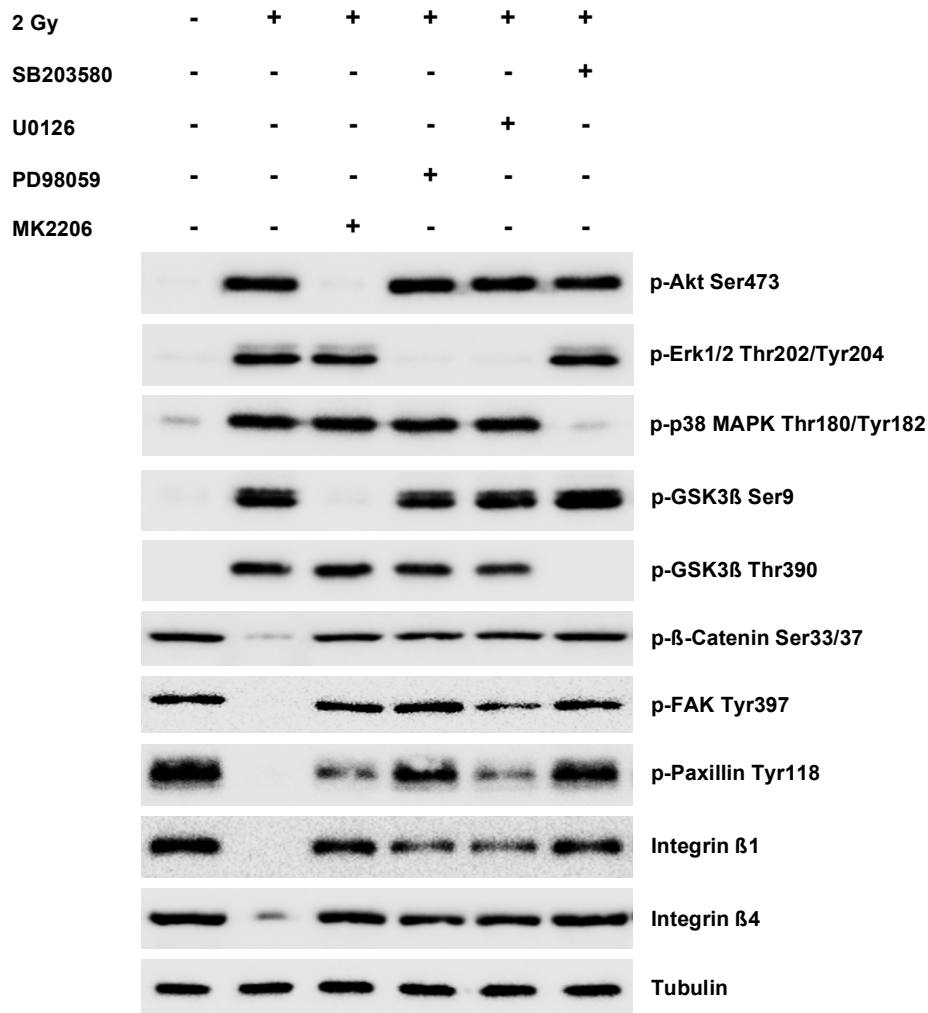


Abb. 16: Darstellung der EGFR-abhängigen Signalwege unter Bestrahlung +/- Inhibition mit spezifischen Inhibitoren für AKT (MK2206), MEK1/2 (U0126), MEK (PD98059) und p38-MAPK (SB203580)

Als Inhibitoren fungierten MK2206 gegen AKT, U0126 gegen MEK1/2 bzw. PD98059 gegen MEK als Inhibitoren des ERK-Signalwegs sowie SB203580 gegen p38-MAPK. Die Wirkung von MK2206 ist sichtbar anhand des Verlustes der Phosphorylierung am Ser473 des AKT und anhand des Verlustes der Phosphorylierung am Ser9 von GSK3 β , da dort AKT GSK3 β phosphoryliert. U0126 und PD98059 bewirken eine Abnahme der Phosphorylierung von ERK1/2 an Thr202/Tyr204. Die Wirkung auf GSK3 β kann allerdings nur indirekt über die Zunahme der β -Catenin-Phosphorylierung dargestellt werden, da kein

kommerzieller Antikörper für die Phosphorylierungsstelle von ERK an GSK3 β erhältlich war. SB203580 reversiert die Phosphorylierung von p38-MAPK an Thr180/Tyr182 und ebenso dessen Phosphorylierungsstelle am Thr390 von GSK3 β .

Was bei den Western Blot Analysen bei allen vier eingesetzten Inhibitoren augenscheinlich ist, ist, dass jeder dieser Inhibitoren alleine ausreicht, um den durch die Bestrahlung ausgelösten Phosphorylierungsverlust von β -Catenin, FAK und Paxillin aufzuheben und die Integrine wieder auf das Niveau der Kontrolle zu bringen.

Der fehlende Einfluss von Bestrahlung und Inhibitoren auf die Gesamtproteinexpression ist in Abbildung 17 dargestellt.

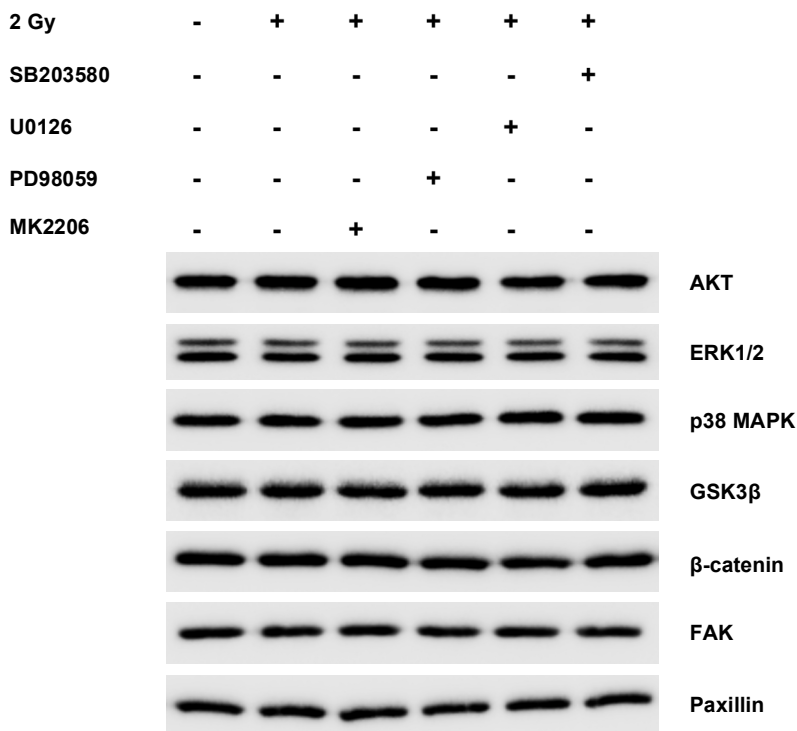
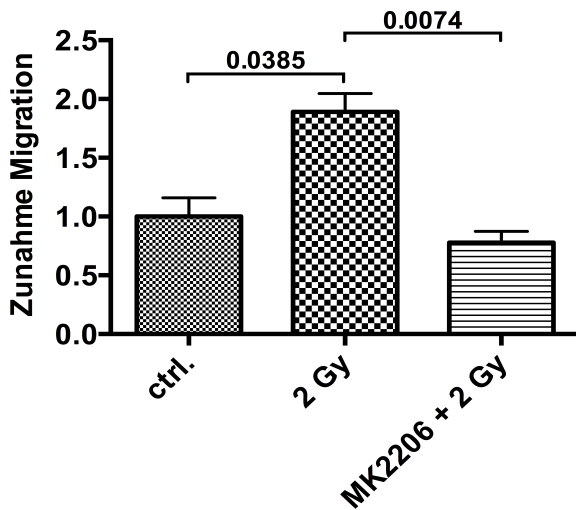


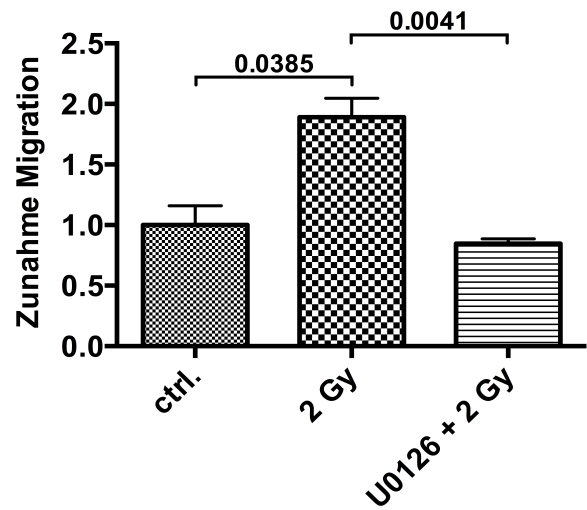
Abb. 17: Gesamtproteine unter Bestrahlung +/- Inhibition

Wenn nun die Aktivierung von AKT, ERK und p38-MAPK über GSK3 β Einfluss auf die Zellmigration mittels β -Catenin, FAK, Paxillin und Integrine nimmt, wie aufgrund der Western Blot Analysen zu vermuten ist, so müsste der Einsatz dieser Inhibitoren auch die strahleninduzierte Migration, welche in den *Wound Healing Assays* gezeigt werden konnte, hemmen. Daher wurden erneut *Wound Healing Assays* unter Einsatz jener Inhibitoren an der Cal27 Zelllinie durchgeführt (vgl. Abbildung 18). Unter 2 Gy Einmaldosis konnte erneut eine signifikante Zunahme der Zellmigration nachgewiesen werden

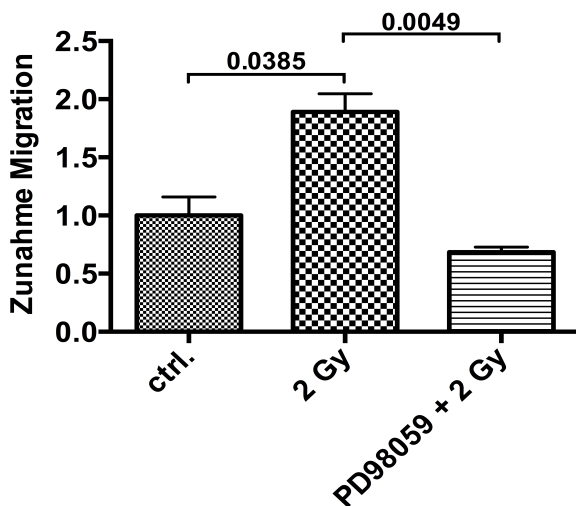
($p=0.0385$). Diese strahleninduzierte Migration konnte unter Einsatz jedes einzelnen Inhibitors auf Kontrolllevel signifikant reduziert werden ($p=0.0074$ bei Einsatz von MK2206, $p=0.0041$ bei Einsatz von U0126, $p=0.0049$ unter PD98059 und $p=0.0163$ unter SB203580). Zwischen der Migration der Kontrolle und der Migration unter 2 Gy mit Einsatz des jeweiligen Inhibitors bestand kein signifikanter Unterschied.



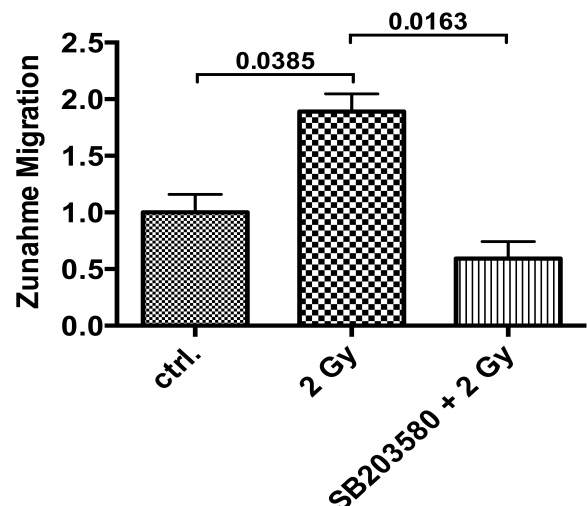
Reduktion der Zellmigration von Cal27 unter Einsatz des AKT-Inhibitors MK2206



Reduktion der Zellmigration von Cal27 unter Einsatz des MEK1/2-Inhibitors U0126



Reduktion der Zellmigration von Cal27 unter Einsatz des MEK-Inhibitors PD98059

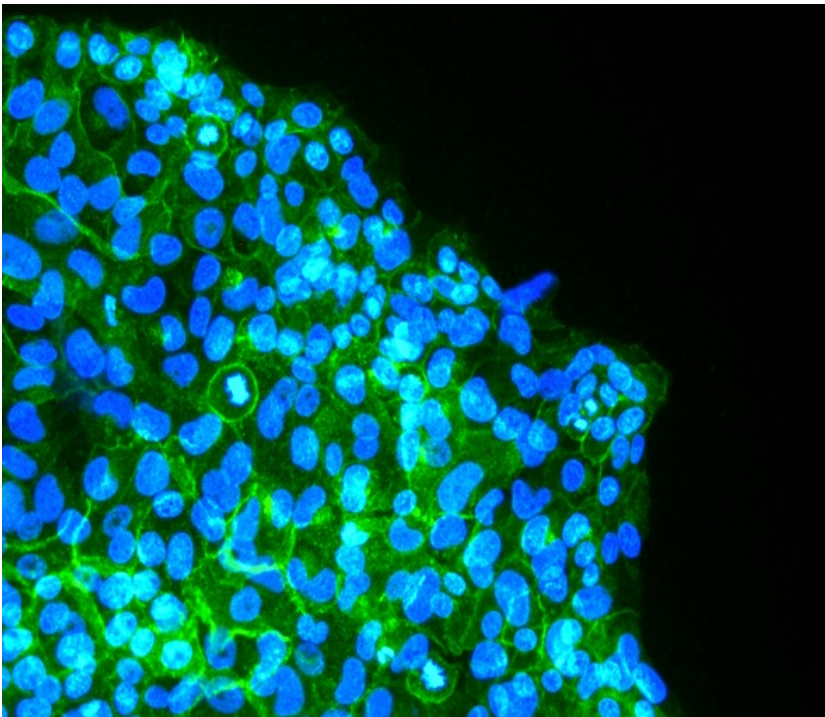


Reduktion der Zellmigration von Cal27 unter Einsatz des p38-Inhibitors SB203580

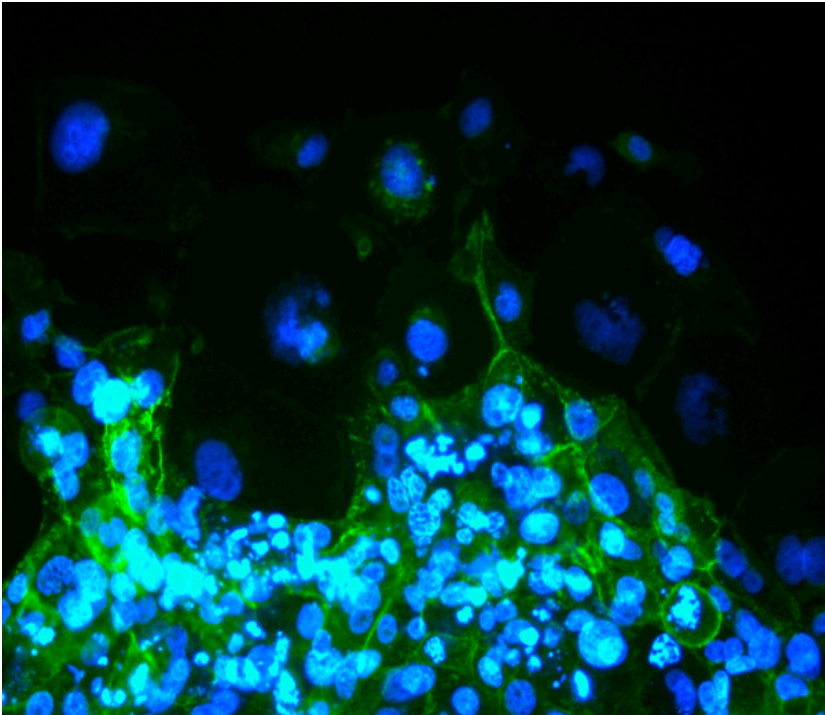
Abb. 18: Reversion der strahleninduzierten Migration unter Einsatz spezifischer Inhibitoren

3.3. Immunfluoreszenz von Tumorsphäroiden

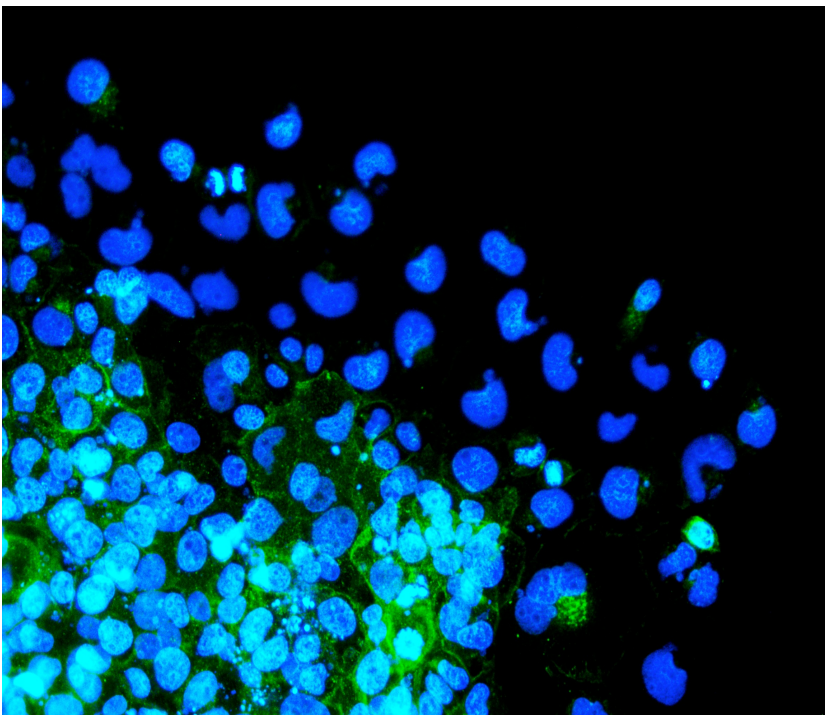
Als ein Marker für erhöhte Migration, Invasion und epitheliale-mesenchymale Transition gilt der Verlust von membranständigem E-Cadherin (Lee, Dedhar et al. 2006). Um zu überprüfen, ob die bestrahlten Sphäroide eine Veränderung in dieser Expression aufweisen, wurden die bestrahlten Tumorsphäroide fixiert und mittels Immunfluoreszenz auf E-Cadherin angefärbt. Abbildung 19 zeigt mit dem Fluoreszenzmikroskop (20x) aufgenommene Bilder aus dem Randbereich von Kontrollsphäroiden und mit 2 respektive 10 Gy bestrahlten Sphäroiden. Erkennbar ist hier eine Abnahme von membranständigem E-Cadherin bei den Tumorzellen am Rand der bestrahlten Sphäroide.



Kontrollsphäroid
ohne Bestrahlung



Verlust membranständigen
E-Cadherins unter 2 Gy
Bestrahlung



Verlust membranständigen
E-Cadherins unter 10 Gy
Bestrahlung

Abb. 19: Immunfluoreszenz mit E-Cadherin an Tumorsphäroiden

3.4. Western Blot Analysen zur Proliferationsabnahme unter Bestrahlung

Die Abbildungen 9 und 10 zeigen eine dosis-abhängige, deutliche Reduktion der Tumorzellproliferation unter Bestrahlung im *Crystal-Violett ELISA*. In der Literatur ist mTOR als eine zentrale Steuereinheit der Proteinbiosynthese beschrieben (Wang and Proud 2006). Aus diesem Grund wurden mit Cal27 Western Blots durchgeführt, welche die Proteinlevels von mTOR und weiteren für die Proteinbiosynthese entscheidenden Zellproteinen analysieren.

Abbildung 20 stellt die Proteinexpression von mTOR und dessen *downstream targets* S6Kinase1 und 4EBP1 dar. Aktives mTOR führt, gebunden im mTORC1, zu einer Phosphorylierung und Aktivierung von p70S6 Kinase 1 am Thr389 und zu einer Phosphorylierung von 4EBP1 am Ser65 und Thr70 und darüber zu einer Aktivierung der Proteinbiosynthese. Kennzeichnend für alle drei Zellmoleküle ist eine Abnahme der Proteinphosphorylierungen unter Bestrahlung, wohingegen die unbestrahlte Kontrolle eine starke Proteinphosphorylierung aufweist. Diese Abnahme in der Phosphorylierung bleibt über die Zeitkinetik hinweg von 24 h bis 96 h konstant und erklärt die Reduktion des Proliferations

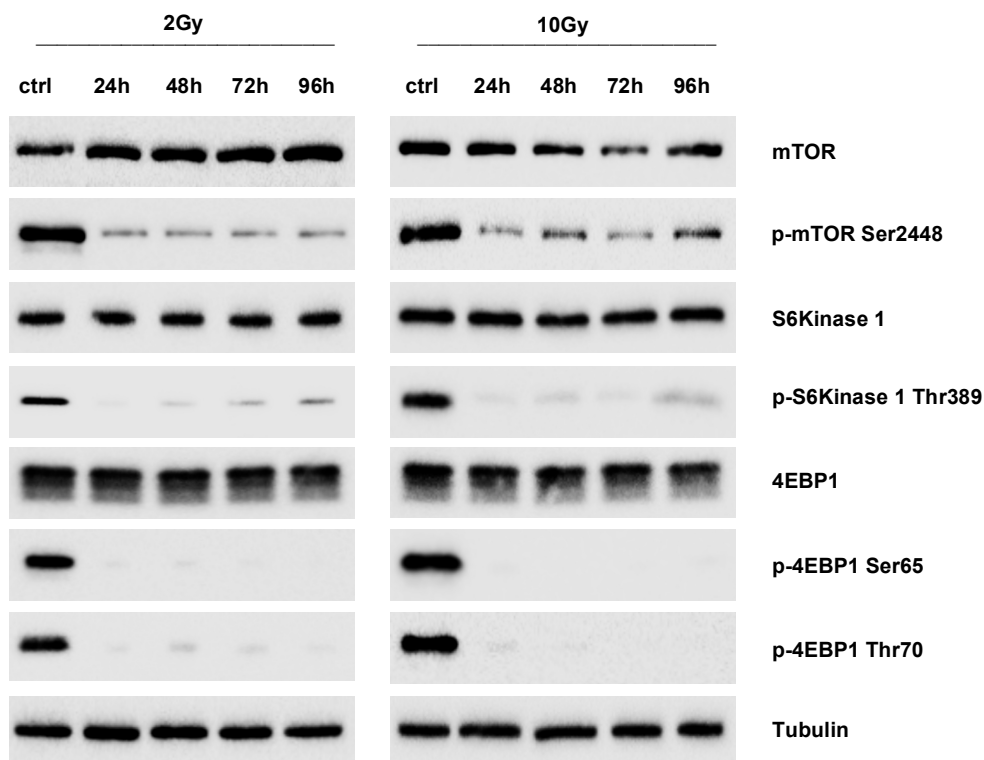


Abb. 20: Western Blot Analysen von mTOR und *downstream targets*

ferationsverhaltens in den biologische Analysen.

Um zu überprüfen, welche Rollen die beiden mTOR-Komplexe mTORC1 und mTORC2 einnehmen, wurden mittels Western Blots und Immunpräzipitation Proteinlevel von Sin1 und dessen Maß an Threonin-Phosphorylierung bestimmt. Sin 1 wird als der Partner im mTORC2 betrachtet, welcher durch seine Phosphorylierung an Threoninresten darüber entscheidet, ob der mTORC2 stabilisiert oder destabilisiert ist (Jacinto, Facchinetti et al. 2006, Liu, Gan et al. 2013). Im dephosphorylierten Sin1-Zustand ist mTORC2 stabil und kann AKT an Ser473 phosphorylieren, im destabilisierten Zustand zerfällt mTORC2. Abbildung 21 zeigt die Western Blots für mTOR, p70S6 Kinase 1, 4EBP1, Sin1 und AKT, wobei die obere Abbildung die wichtigsten und die Aktivität beeinflussenden Phosphorylie-

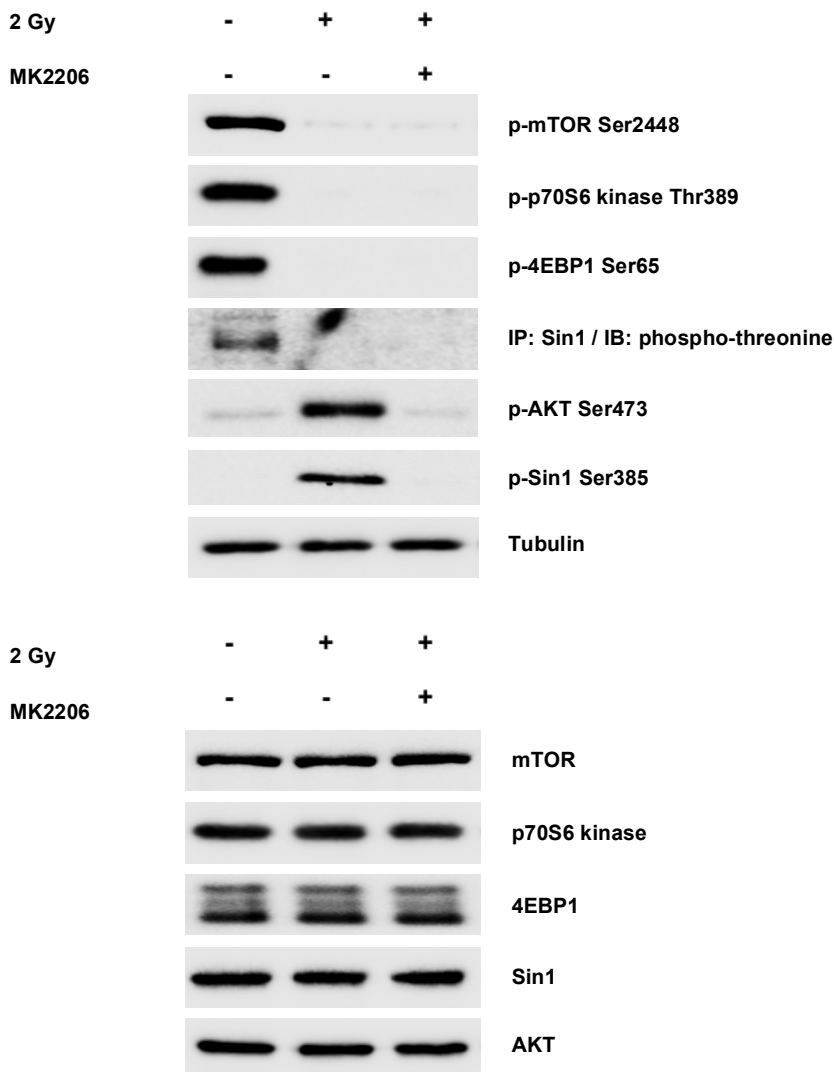


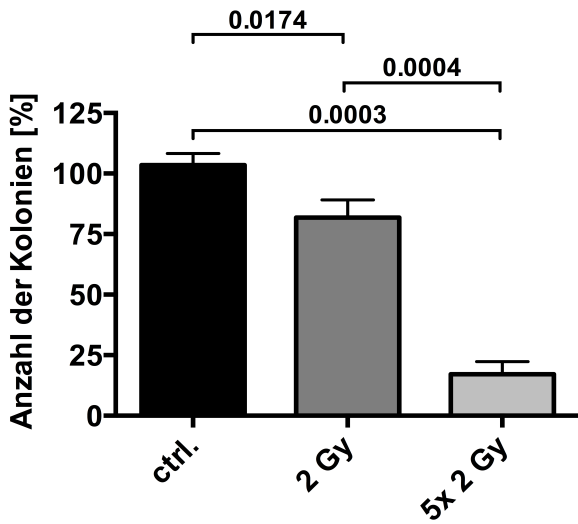
Abb. 21: Western Blot Analysen und Immunopräzipitation zur Überprüfung des Regelkreislaufs zwischen mTOR, Sin1 und AKT 24 h nach Bestrahlung/Inhibition

rungsstellen der genannten Proteine darstellt, die untere Abbildung zeigt die Western Blots für die Gesamtproteinmenge. Ersichtlich ist eine Abnahme der mTOR-Phosphorylierung am Ser2448, der p70S6Kinase am Thr389, von 4EBP1 am Ser65 unter Bestrahlung, wohin gegen AKT am Ser473 und Sin1 am Ser385 stark phosphoryliert sind. Die in der Kontrolle vorhandene Threonin-Phosphorylierung am Sin1 wird unter Bestrahlung aufgehoben. Der gleichzeitige Einsatz des AKT-Inhibitors MK2206 unter 2 Gy Bestrahlungsdosis bewirkt eine Reversion der unter Bestrahlung induzierten AKT-Phosphorylierung und ebenso eine Abnahme der Sin1-Phosphorylierung am Ser385.

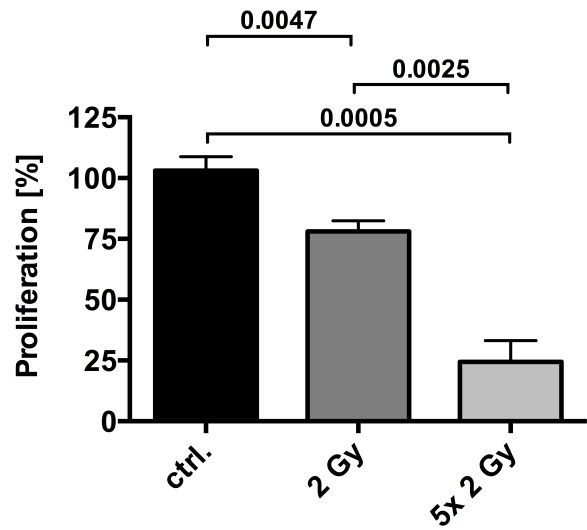
3.5. Der Einfluss fraktionierter Bestrahlung auf Proliferation, klonogenes Überleben, Migration und Invasion

Oben konnte gezeigt werden, welche Zellsignalwege eine erhöhte Tumorzellmigration unter Bestrahlung mit einer Einmaldosis von 2 respektive 10 Gy induzieren. Im klinischen Kontext werden oft Bestrahlungsschemen von 5x 2 Gy an 5 aufeinander folgenden Tagen in einer Woche verwendet. Daher sollen im Folgenden die Ergebnisse einer Versuchsreihe mit einer fraktionierten Bestrahlung mit 5x 2 Gy an Tumorzelllinien des HNSCC im Hinblick auf Überleben, Proliferation, Migration sowie Invasion dargestellt werden und Änderungen in der Expression von den wichtigen Zellsignalwegen gezeigt werden.

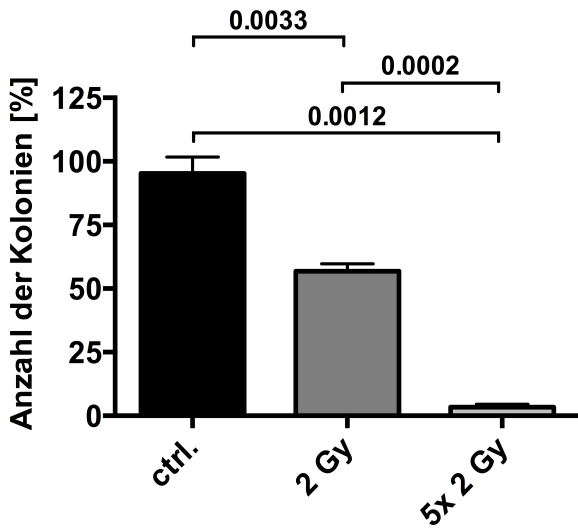
Abbildung 22 stellt den Einfluss von Bestrahlung mit 2 Gy und 5x 2 Gy auf das klonogene Überleben und die Zellproliferation dar. Sichtbar wird in allen drei verwendeten Zelllinien (UD-SCC-5, Cal27 und HN) eine deutliche und signifikante Reduktion der Tumorzellproliferation und des klonogenen Überlebens unter fraktionierter Bestrahlung. Dabei konnte in allen Zelllinien eine hoch signifikante Reduktion auf unter 25 % des Kontrollüberlebens bzw. der Kontrollproliferation erzielt werden. Ebenfalls ist erneut das signifikante Ansprechen bei HN und Cal27 auf eine Einmaldosis von 2 Gy sichtbar, wohingegen 2 Gy keine signifikante Änderung des Überlebens und der Proliferation bei UD-SCC-5 bewirkt.



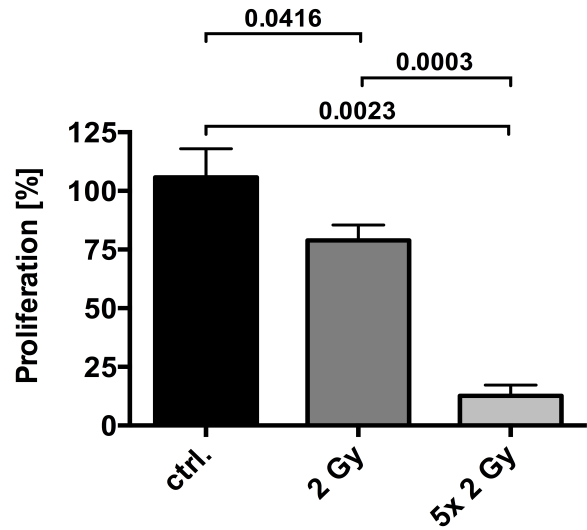
Cal27 klonogenes Überleben



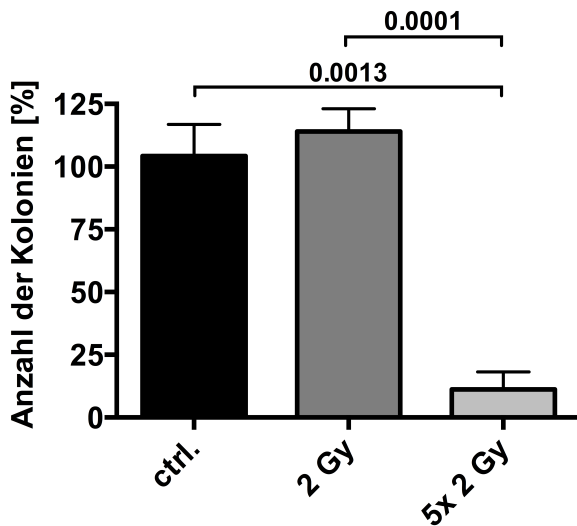
Cal27 Proliferation



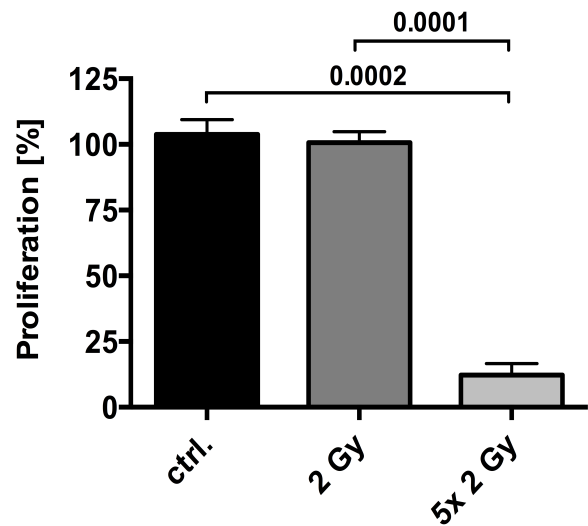
HN klonogenes Überleben



HN Proliferation



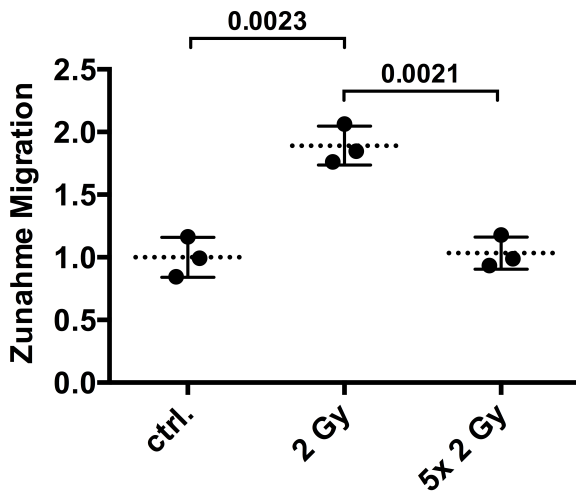
UD-SCC-5 klonogenes Überleben



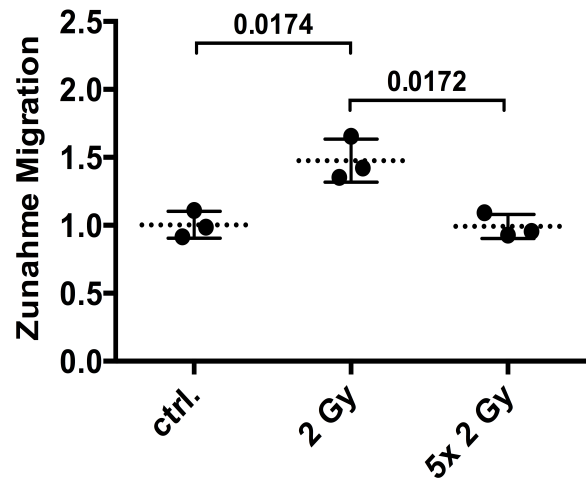
UD-SCC-5 Proliferation

Abb. 22: Darstellung von klonogenem Überleben und Proliferation unter fraktionierter Bestrahlung

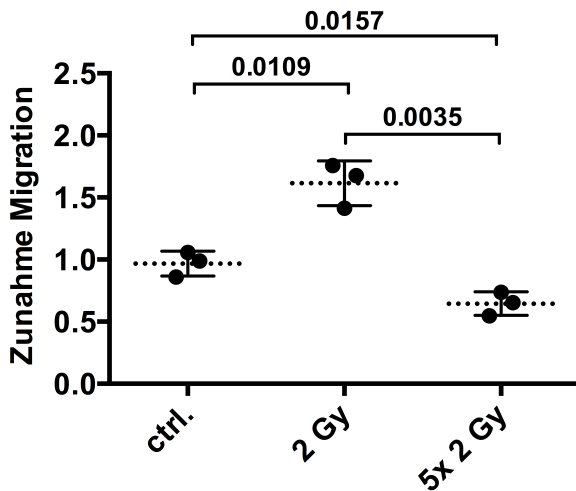
Zur Überprüfung des Migrationsverhaltens fraktioniert bestrahlter Zellen wurden *Wound Healing Assays* durchgeführt. Hierbei zeigte sich in allen drei Zelllinien eine signifikante Zunahme der Zellmigration gegenüber unbestrahlten Kontrollen unter 2 Gy Einmaldosis und eine signifikante Reduktion dieser induzierten Zellmigration durch den Einsatz fraktionierter Bestrahlung von 5x 2 Gy. Zwischen den Werten der Kontrolle und der fraktionierten Bestrahlung lagen keine signifikanten Unterschiede bei Cal27 und HN (Signifikanzniveau $p < 0.05$). Bei UD-SCC-5 konnte zwischen der Kontrolle und der fraktionierten Bestrahlung eine signifikante Reduktion nachgewiesen werden ($p = 0.0157$). Die Migrationsergebnisse sind in Abbildung 23 mit den jeweiligen p-Werten dargestellt.



Reduktion der Tumorzellmigration durch fraktionierte Bestrahlung bei Cal27



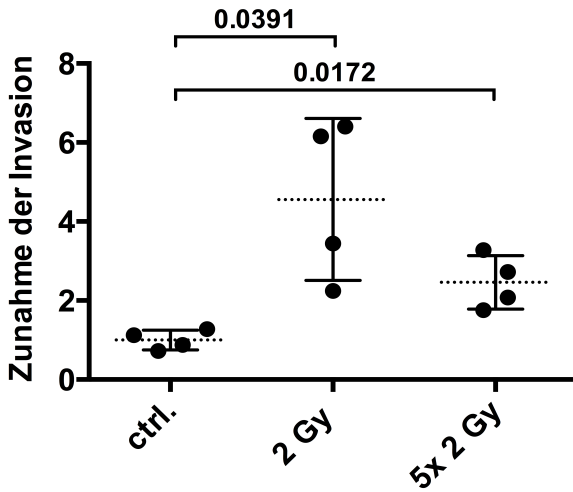
Reduktion der Tumorzellmigration durch fraktionierte Bestrahlung bei HN



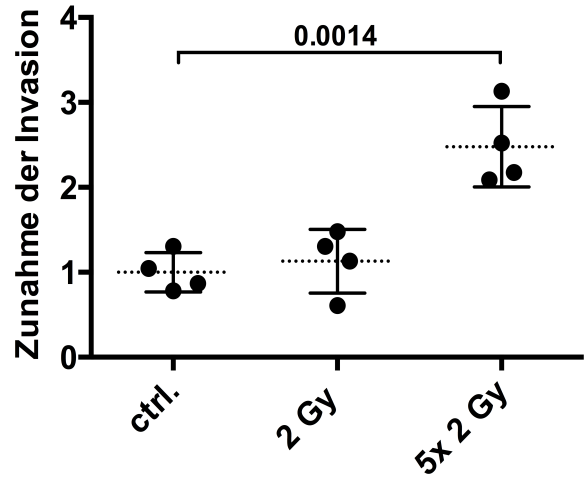
Reduktion der Tumorzellmigration durch fraktionierte Bestrahlung bei UD-SCC-5

Abb. 23: Migrationsverhalten unter fraktionierter Bestrahlung

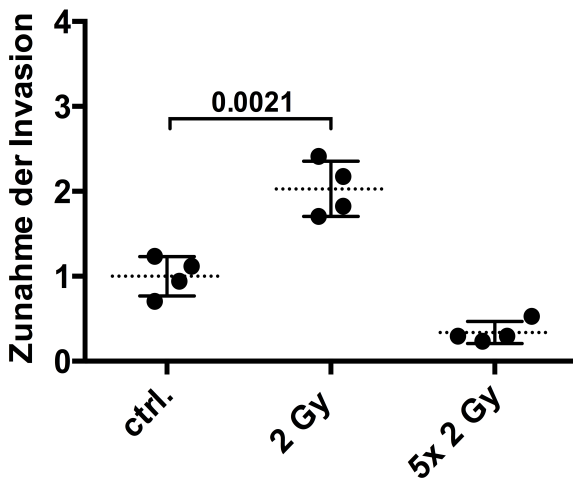
Um zu überprüfen, ob eine fraktionierte Bestrahlung neben der Reduktion der Zellmigration auch einen Einfluss auf Tumorzellinvasion hat, wurden mittels Invasionskammern Versuche zur Detektion der Zellinvasion unter Bestrahlung von 2 Gy und 5x 2 Gy unternommen. Abbildung 24 stellt diese Ergebnisse, durchgeführt mit den Cal27, HN und UD-SCC-5 Zelllinien dar.



Zunahme der Tumorzellinvasion bei Cal27 unter Bestrahlung mit 2 Gy und 5x 2 Gy



Zunahme der Tumorzellinvasion bei UD-SCC-5 unter Bestrahlung mit 5x 2 Gy



Zunahme der Tumorzellinvasion bei HN unter Bestrahlung mit 2 Gy

Abb. 24: Tumorzellinvasion unter fraktionierter Bestrahlung

Erkennbar ist eine statistisch signifikante Zunahme der Invasion bei Cal27 unter 2 Gy Strahlendosis sowie unter fraktionierter Bestrahlung gegenüber unbestrahlten Tumorzellen ($p=0.0391$ für 2 Gy, $p=0.0172$ unter fraktionierter Bestrahlung). Bei HN ist hingegen nur unter 2 Gy eine statistisch signifikante Zunahme der Invasion gegenüber der Kontrolle erkennbar ($p=0.0021$), bei UD-SCC-5 unter fraktionierter Bestrahlung ($p=0.0014$).

3.6. Proteinexpression wichtiger Tumorzellsignalwege unter fraktionierter Bestrahlung

Bestrahlung mit 2 Gy und 10 Gy bewirkte eine Aktivierung der AKT-, MAPK- und p38-Signalwege sowie eine Inaktivierung von GSK3 β mit konsekutivem Verlust der Proteinexpression von FAK, Paxillin und Integrinen. Um zu überprüfen, welche Auswirkung eine fraktionierte Bestrahlung auf diese Zellsignalwege hat, wurden erneut Western Blot Analysen durchgeführt. Abbildung 25 stellt diese dar.

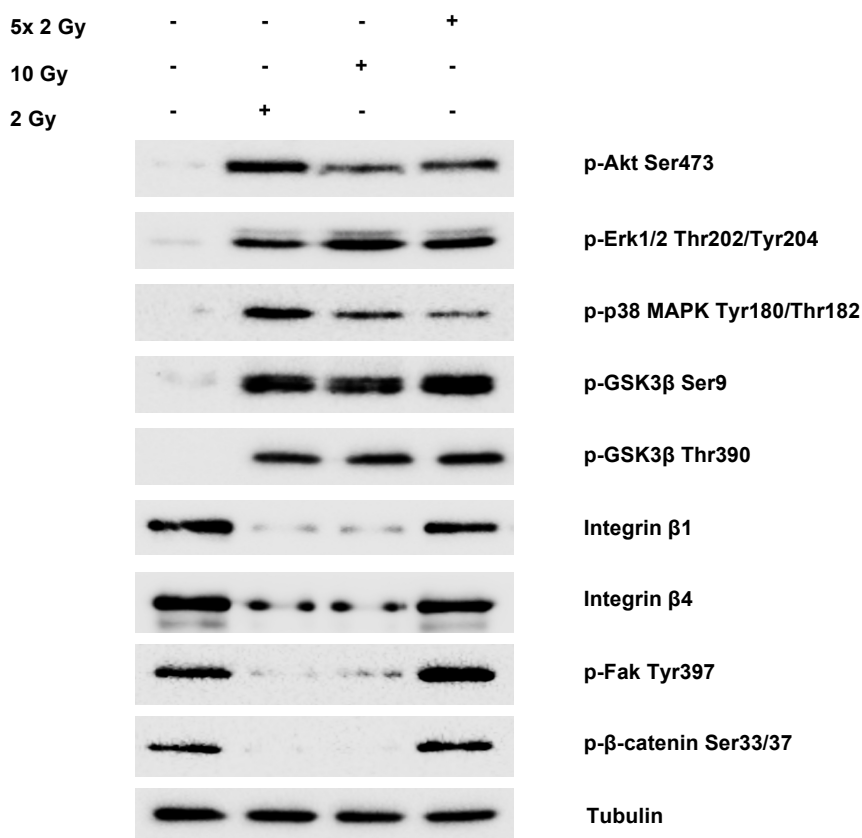


Abb. 25: Proteinexpression der AKT, ERK, p38 Signalwege unter fraktionierter Bestrahlung sowie GSK3 β und *downstream targets*

Unter fraktionierter Bestrahlung ist, verglichen mit unbestrahlten Proteinisolaten, eine erhöhte Proteinphosphorylierung von AKT, EKR, p38 und GSK3 β im Western Blot auf einem ähnlichen Level nachweisbar, wie unter Bestrahlung mit 2 Gy und 10 Gy. Auffällig ist jedoch, dass es unter fraktionierter Bestrahlung, trotz der GSK3 β -Phosphorylierung und damit konsekutiver Inaktivierung von GSK3 β nicht zu einer Abnahme der

Proteinphosphorylierung an dessen *downstream targets* β -Catenin, FAK, Integrin und Paxillin kommt, wie unter Bestrahlung mit 2 Gy und 10 Gy und wie es eigentlich bei einer GSK3 β -Inhibition zu erwarten wäre. Stattdessen befindet sich die Phosphorylierung dieser Marker unter fraktionierter Bestrahlung im Western Blot wieder auf dem Niveau der unbestrahlten Kontrollisolate.

Unter einmaliger Bestrahlung konnte gezeigt werden, dass mTOR als Steuereinheit der Proteinbiosynthese und die *downstream marker* p70S6K1 und 4EBP1 in der Proteinphosphorylierung herunterreguliert werden. Diese Marker wurden nun auch unter fraktionierter Bestrahlung untersucht. Abbildung 26 zeigt die Proteinphosphorylierungen im Western Blot für mTOR, p70S6K1 und 4EBP1 unter 2 Gy, 10 Gy und 5x 2 Gy Bestrahlung im Vergleich zur Kontrolle.

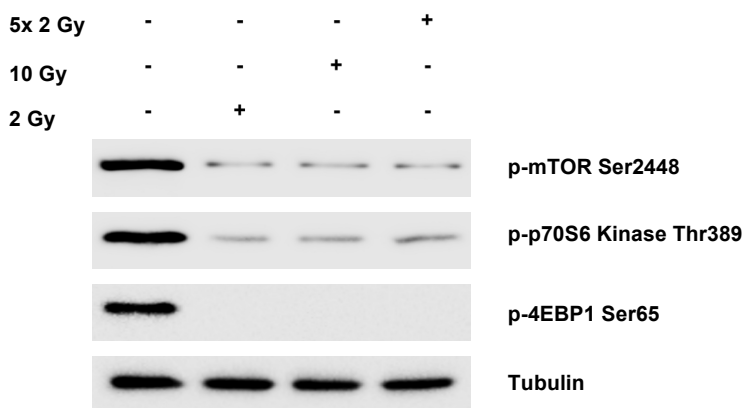


Abb. 26: Western Blots unter fraktionierter Bestrahlung von mTOR und *downstream targets*

Sichtbar ist eine Abnahme der Phosphorylierung von mTOR an Ser2448, von p70S6K1 an Thr389 und von 4EBP1 an Ser65 sowohl unter einmaliger Bestrahlung mit 2 Gy oder 10 Gy als auch bei fraktionierter Bestrahlung mit 5x 2 Gy.

3.7. Auftreten von Tumorstammzellmarkern durch fraktionierte Bestrahlung

Tumorstammzellen wird eine entscheidende Rolle in der Entstehung, der Aufrechterhaltung, der Resistenzentwicklung gegen Therapien und der Metastasenentwicklung bösartiger Neoplasien zugeschrieben (Allegra and Trapasso 2012). Um zu überprüfen, ob in HNSCC Marker von Tumorstammzellen nachweisbar sind und ob sich das Auftreten dieser unter Bestrahlung verändert, wurden Western Blot Analysen mit der Cal27 Zelllinie durchgeführt und auf diejenigen Marker hin überprüft, die bei Kopf-Hals-Tumoren sowie bei einigen anderen epithelialen Tumoren mit Krebsstammzellen in Verbindung gebracht werden: CD44, ALDH1, Sox, Oct4 und Nanog (Allegra and Trapasso 2012, Lee, Oh et al. 2014, Wang, Lu et al. 2014). Abbildung 27 zeigt diese Western Blot Analysen.

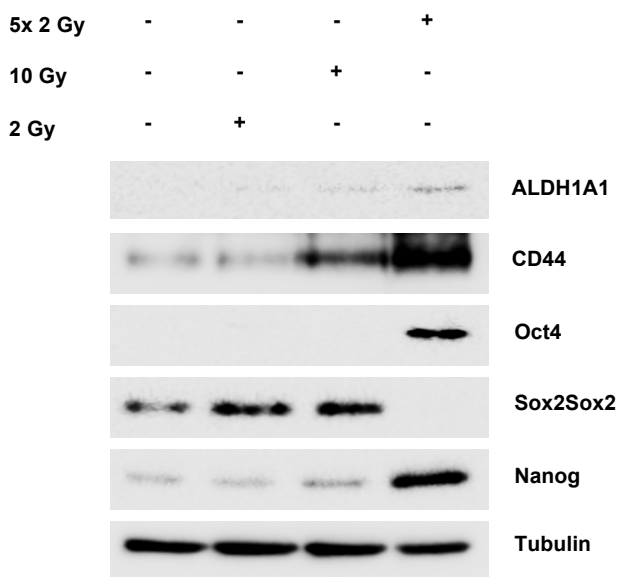


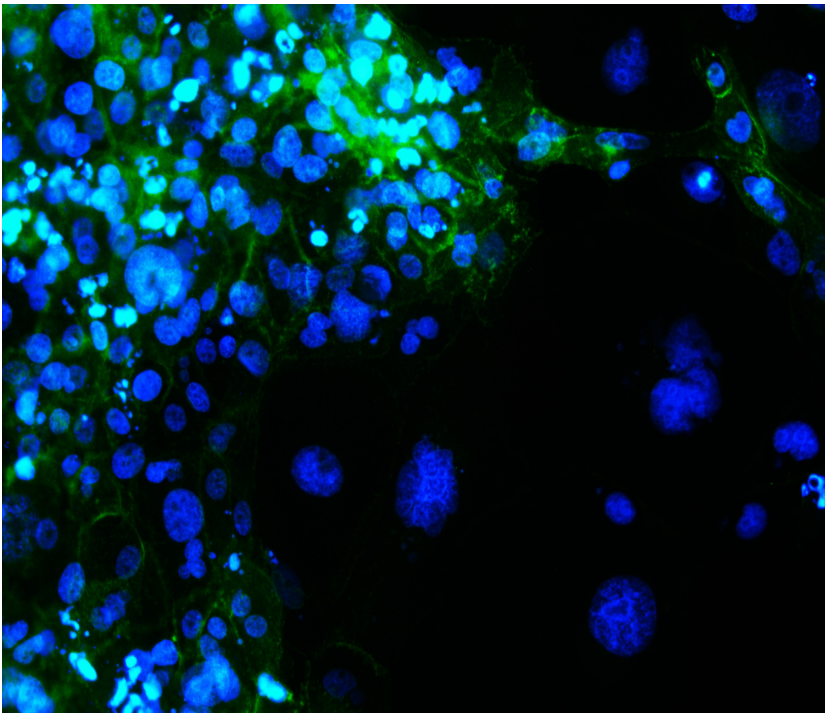
Abb. 27: Western Blot Analysen von Stammzellmarkern

Zu sehen ist unter fraktionierter Bestrahlung eine Zunahme der Proteinmenge der Stammzellmarker CD44, Oct4 und Nanog in der Cal27 Zelllinie und im Gegenzug eine Abnahme der Proteinmenge von Sox2. Unter 10 Gy Bestrahlung ist eine Zunahme von CD44 erkennbar. Der Marker Sox2 ist stark vorhanden bei Kontrollzellen und bei mit 2 Gy bzw. 10 Gy bestrahlten Zellen, jedoch nicht bei fraktioniert bestrahlten Zellen. Bei ALDH1

und Nanog sowie CD44 lässt sich nur eine leichte Zunahme der Marker unter einmaliger Bestrahlung gegenüber der Kontrolle erahnen.

3.8. EMT-Marker: Immunfluoreszenz und Western Blot Analysen bei fraktionierter Bestrahlung

In der Immunfluoreszenz der Sphäroide unter 2 bzw. 10 Gy Strahlendosis wurde in Randbereichen eine Verringerung des membranständigen E-Cadherins beobachtet. Daher wurden fraktioniert bestrahlte Sphäroide ebenfalls mittels IF auf E-Cadherin angefärbt. Abbildung 28 stellt einen solchen fraktioniert bestrahlten Sphäroid dar. Erkennbar ist auch hier eine Verringerung des membranständigen E-Cadherins im Randbereich, ein Indikator für EMT (Peinado, Portillo et al. 2004).



Verlust membranständigen E-Cadherins und morphologische Veränderung von Zellen im Randbereich fraktioniert bestrahlter Sphäroide

Abb. 28: Immunfluoreszenz mit E-Cadherin eines fraktioniert bestrahlten Sphäroids

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden Western Blot Analysen mit etablierten Markern für EMT durchgeführt. Abbildung 29 zeigt diese Analysen für Slug, Claudin-1, N-Cadherin, ZO-1 und TCF8/ZEB1:

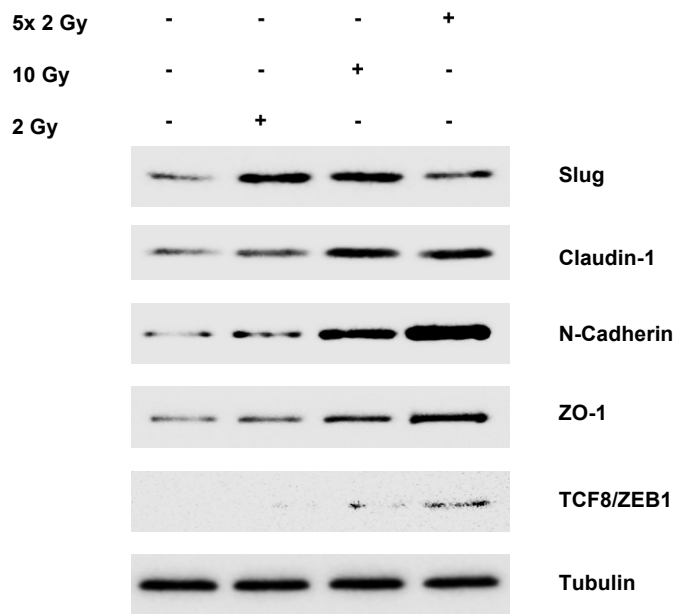


Abb. 29: Western Blot Analysen zu EMT-Markern

Zu sehen ist eine leichte Zunahme der EMT-Marker Claudin, N-Cadherin, ZO-1 und TCF8/ZEB1 von der Kontrolle über 2 Gy zu 10 Gy und zur fraktionierten Bestrahlung. Bei Slug findet man eine starke Erhöhung unter 2 Gy und 10 Gy gegenüber der Kontrolle, bei fraktionierter Bestrahlung ist diese Erhöhung weniger ausgeprägt, als unter Bestrahlung mit einer Einmaldosis.

3.9. EMT- und CSC-Marker unter Signalwegsinhibition

Um zu überprüfen, ob das Auftreten von Tumorstammzellmarkern und EMT-Markern durch Inhibition von Signalwegen reversibel ist, wurden Western Blot Analysen mit Inhibitoren von AKT (MK2206) und ERK (U0126) durchgeführt. Diese Inhibitoren wurden ausgewählt, da für diese hier gezeigt werden konnte, dass sie einen inhibierenden Einfluss auf das Migrationsverhalten bei HNSCC ausüben. Abbildung 30 stellt diese Analysen dar, die obere Abbildung zeigt die CSC-Marker, die untere Abbildung die EMT-Marker. Zu sehen ist eine Abnahme der bei alleiniger fraktionierter Bestrahlung stark exprimierten Marker CD44, ALDH1A1, Oct4 sowie Nanog bei Inhibition mit MK2206, U0126 oder bei Kombination dieser beiden Inhibitoren. Ebenso kommt es bei Einsatz von MK2206 und U0126 zu einer deutlichen Abnahme der EMT-Marker N-Cadherin, ZO-1, TCF8, Slug und Snail im Vergleich zur alleinigen fraktionierten Bestrahlung. Die

kombinierte Inhibition mittels AKT- und ERK-Inhibitor verstärkt diesen Effekt sogar noch deutlich.

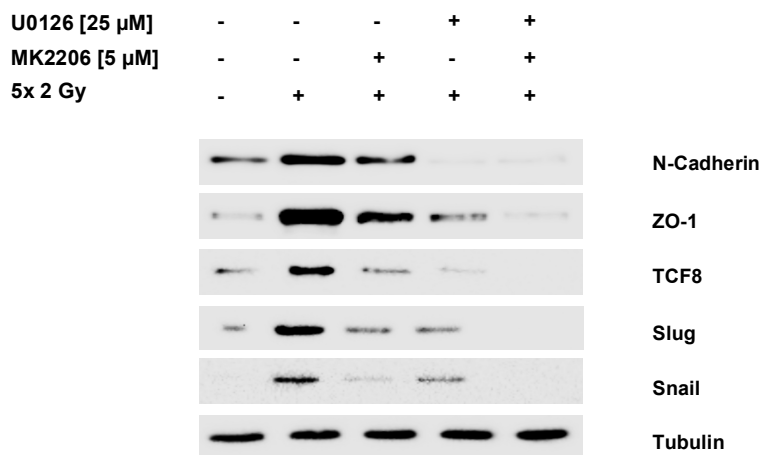
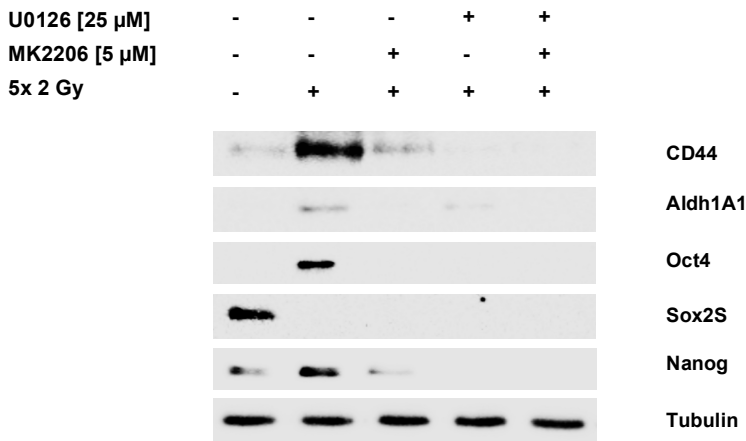


Abb. 30: Western Blot Analysen zu Krebsstammzellmarkern (obere Abbildung) und zu EMT-Markern (untere Abbildung) bei fraktionierter Bestrahlung und Einsatz von Inhibitoren gegen AKT und ERK

4. Diskussion

Kopf-Hals-Tumoren sind eine der häufigsten Tumorentitäten mit einer geschätzten Inzidenz von 686.328 Fällen weltweit im Jahre 2012 (Pezzuto, Buonaguro et al. 2015). Trotz Fortschritten bei operativen Verfahren, Bestrahlung und Chemotherapeutika sowie der Identifikation und Inhibition onkogener Zellsignalwege, liegt die Überlebensrate bei HNSCC im Rahmen von 50 % (Bose, Brockton et al. 2013). Vor allem Lokalrezidive und Metastasen stellen eine große Herausforderung in der Behandlung und Nachsorge von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches dar: So entwickelten in einer exemplarischen Studie 34,6 % der Patienten ein Rezidiv (davon 28,3 % ein lokoregionäres Rezidiv mit oder ohne Fernmetastasen sowie 6,3 % nur Fernmetastasen) bei einer medianen Nachbeobachtungszeit von 34,1 Monaten (Prabhu, Hanasoge et al. 2015).

Sowohl für Glioblastome (Wild-Bode, Weller et al. 2001), für Mamma-Karzinome (Bouchard, Bouvette et al. 2013) als auch für HNSCC (Pickhard, Margraf et al. 2011) konnte gezeigt werden, dass Bestrahlung eine vermehrte Tumorzellmigration fördern kann. Bei HNSCC-Zelllinien konnte bewiesen werden, dass eine Inhibition des EGFR-Signalweges durch Cetuximab (Pickhard, Margraf et al. 2011) sowie in Kombination mit Sphingosinkinase1-Inhibitoren (Schiefler, Piontek et al. 2014) diese strahleninduzierte Migration hemmen kann.

Zahlreiche weitere Zellsignalwege werden mit beschleunigter Tumorzellmigration in Verbindung gebracht. Eine zentrale Rolle scheint hierbei die Glykogen Synthase Kinase 3 β einzunehmen, die Prozesse wie Migration, Proliferation, Apoptose und epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) steuert und als eine Art Tumorsuppressor bei Mundbodenkarzinomen fungiert (Mishra 2010).

Auch ein gesteigertes Invasionsverhalten der Tumorzellen führt zu einer Abnahme lokaler Tumorkontrolle, da sich Zellen aus dem Verband lösen können und sich an einer vom Primarius abgelegenen Stelle ansiedeln können (Howell and Grandis 2005). Als ein Schlüsselmarker für epitheliale-mesenchymale Transition, einem Indikator für gesteigertes Invasionsverhalten gilt der Verlust des membranständigen E-Cadherins (Peinado, Portillo et al. 2004, Mandal, Myers et al. 2008). Zusätzlich wurde das Auftreten von Zellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften mit EMT in Verbindung gebracht (Mani, Guo et al. 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welche molekularen Mechanismen unter Strahlentherapie bei der Migration und Invasion von HNSCC-Zellen eine entscheidende Rolle spielen. Der Fokus lag hierbei auf der Rolle von GSK3 β sowie der Identifikation weiterer Marker, die gesteigerte Migration, EMT und Invasion bedingen. Zusätzlich sollte der Einfluss einer fraktionierten Bestrahlung überprüft werden sowie erforscht werden, ob durch die molekulare Inhibition bestimmter Zellsignalwege eine Hemmung dieser Prozesse erfolgen kann.

4.1. Einfluss einmaliger Bestrahlung auf das Migrationsverhalten

Mittels des sogenannten Wound Healing Assays wurden drei HNSCC-Zelllinien (UD-SCC-5, Cal-27 und HN) auf das Migrationsverhalten untersucht. In allen diesen Zelllinien war es möglich, unter Bestrahlung mit einer Dosis von 2 und 10 Gy eine im Vergleich zur Kontrolle vermehrte Tumorzellmigration zu detektieren (siehe Abb. 11 und 12). Diese Ergebnisse konnten mittels eines Tumorsphäroid-Modells reproduziert werden: Mit diesem konnte die Migration realitätsnäher abgebildet werden, da hierfür kleine dreidimensionale Tumorverbände produziert wurden, die sich innerhalb eines beschichteten Objektträgers ausbreiten konnten. Auch hier war die Ausbreitung der Sphäroide unter Bestrahlung von 2 und 10 Gy signifikant größer als die der unbestrahlten Sphäroide (siehe Abb. 13). Diese Ergebnisse sind konsistent mit den aus der Literatur bekannten Effekten, dass Bestrahlung eine vermehrte Tumorzellmigration induzieren kann (Wild-Bode, Weller et al. 2001, Pickhard, Margraf et al. 2011, Bouchard, Bouvette et al. 2013).

Die Sphäroide wurden nach Bestrahlung fixiert und mittels Immunfluoreszenz auf das Zelladhäsionsprotein E-Cadherin angefärbt (siehe Abb. 19). Bei den bestrahlten Sphäroiden war eine deutliche Abnahme des membranständigen E-Cadherins in den am Sphäroidrand lokalisierten Zellen zu beobachten, wohingegen unbestrahlte Sphäroide diese Abnahme nicht zeigten. Zudem imponierten diese bestrahlten Zellen in einer veränderten Zellmorphologie. Verlust des membranständigen E-Cadherins gilt als ein entscheidender Hinweis für EMT (Peinado, Portillo et al. 2004). Zudem ist es assoziiert mit einem aggressiveren Tumorphänotyp bei HNSCC (Mandal, Myers et al. 2008) und korreliert mit reduzierter Gewebedifferenzierung sowie erhöhter Rate von Lymphknotenmetastasen (Schipper, Frixen et al. 1991). EMT ist im Prinzip ein

physiologischer Prozess, der zu einem Zusammenbrechen von Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Kontakten führt und den Zellen eine Migration in andere Bereiche des Körpers ermöglicht (Radisky and LaBarge 2008). Dieser kann jedoch bei Karzinomen den initialen Schritt der Invasions-Metastasen-Kaskade bilden (Scheel, Onder et al. 2007). Zudem konnte bei Brustkrebszellen gezeigt werden, dass die Induktion einer EMT die Zellen Charakteristika von Tumorstammzellen annehmen lässt (Mani, Guo et al. 2008). Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass durch Bestrahlung Zellmigration bei HNSCC getriggert wird und durch die Transition eines epithelialen in einen mesenchymalen Phänotyp der erste Schritt der Metastasenbildung erleichtert wird.

Um herauszufinden, welche Signalwege bei der strahleninduzierten Zellmigration eine Rolle spielen, wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Dabei wurde ein besonderes Augenmerk auf die dem EGFR nachgeschalteten Zellsignalwege gelegt, da zum einen bereits gezeigt werden konnte, dass der EGFR an der strahleninduzierten Migration beteiligt ist (Pickhard, Margraf et al. 2011), zum anderen hat der EGFR-Inhibitor Cetuximab seit längerem Einzug in die Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren gefunden. Eine Aktivierung des EGFR bei SCC für nur wenige Minuten nach Bestrahlung ist schon lange bekannt (Schmidt-Ullrich, Valerie et al. 1996). Bei vorliegender Arbeit lag der Fokus auf die länger dauernden Signalwegsveränderungen, daher wurden die Proteinisolate zwischen 24 und 96 h nach Bestrahlung gewonnen.

In den Analysen war unter Bestrahlung mit 2 und 10 Gy eine deutliche Zunahme der Phosphorylierung und damit eine Aktivierung der EGFR-abhängigen AKT- und MAPK-Signalwege zu sehen sowie eine Zunahme der Phosphorylierung des Stress-induzierten p38-Signalwegs (siehe Abb. 14). Eine gesteigerte ERK-Aktivität unter Bestrahlung bei HNSCC (Affolter, Fruth et al. 2011) sowie eine Aktivierung von p38 durch Stressoren wie ionisierende Bestrahlung (Raingeaud, Gupta et al. 1995) sind bekannte Erscheinungen bei Tumoren. p38 wird mit vermehrter Zellmigration durch Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts in Verbindung gebracht (Rousseau, Houle et al. 1997) und Mutationen im PI3K-AKT-Signalweg korrelieren mit einem invasiveren Phänotyp bei HNSCC (Freudlspenger, Burnett et al. 2011). Eine Aktivierung des EGFR wie kurz nach Bestrahlung in der Literatur beschrieben wird (Schmidt-Ullrich, Valerie et al. 1996), ist ab 24 h in den Western Blot Analysen nicht mehr zu beobachten (Abb. 14). Es scheint also so zu sein, dass diese kurzfristige Aktivierung des EGFR dazu führt, dass die EGFR-abhängigen Signalwege langfristig hochreguliert bleiben.

Allen drei hochregulierten Zellsignalwegen ist gemein, dass sie als Zielmolekül die Glykogen Synthase Kinase 3 β haben: AKT phosphoryliert GSK3 β an Ser9 und inhibiert dessen Kinaseaktivität (Cross, Alessi et al. 1995). ERK phosphoryliert GSK3 β an Thr43 (Ding, Xia et al. 2005), was ebenso zu einer Inaktivierung von GSK3 β führt wie die Phosphorylierung von GSK3 β an Thr390 durch p38 (Thornton, Pedraza-Alva et al. 2008). GSK3 β wurde als ein wichtiger Tumorsuppressor in oralen SCC identifiziert und beeinflusst dabei Prozesse wie Migration, EMT, Proliferation und Apoptose (Mishra 2010). Diese Tumormigration beeinflusst GSK3 β durch eine Modulation von Zell-Matrix-Adhäsionsproteinen wie FAK und Paxillin (Sun, Rodriguez et al. 2009) sowie Integrinen. Als ein Marker für die GSK3 β -Aktivität wurden die Proteinlevel des am Ser33/37 phosphorylierten β -Catenins herangezogen: aktiviertes GSK3 β ist dort in der Lage, β -Catenin zu phosphorylieren und für den proteasomalen Abbau vorzubereiten. Stabilisiertes β -Catenin hingegen kann mit LEF/TCF als Transkriptionsfaktor wirken und beeinflusst migrationsfördernde Faktoren wie myc, VEGF und MMP (Klaus and Birchmeier 2008, Iwai, Yonekawa et al. 2010).

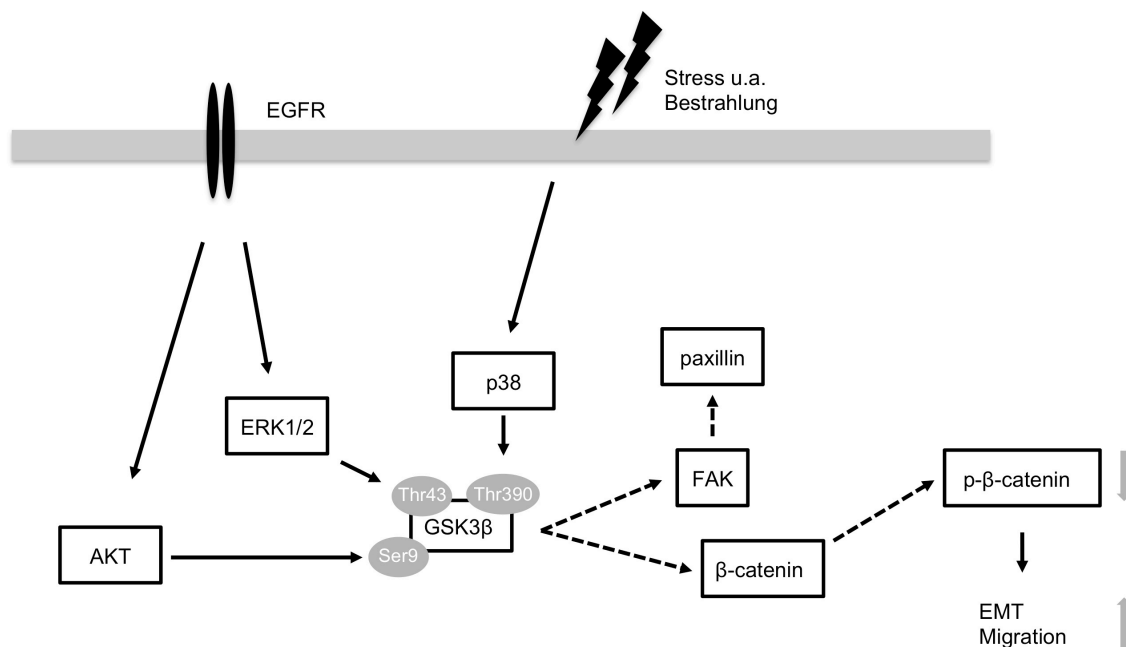


Abb. 31: Modell zur Inaktivierung von GSK3 β unter Bestrahlung durch Aktivierung der Moleküle AKT, ERK und p38. Durch Inaktivierung von GSK3 β kommt es zum Verlust von β -Catenin-, FAK- und Paxillin-Phosphorylierungen was eine gesteigerte Tumorzellmigration zur Folge hat.

In den Western Blot-Analysen (siehe Abb. 15) konnte unter Bestrahlung im Vergleich zu Isolaten der unbestrahlten Kontrolle eine Aktivierung der AKT, p38 und ERK Signalwege gezeigt werden, ebenso ein Verlust der Phosphorylierung von β -Catenin an Ser33/37, was eine Abnahme der GSK3 β -Aktivität unter Bestrahlung anzeigt. Zudem wurde eine reduzierte FAK- und Paxillin-Aktivität registriert sowie ein Verlust von den Integrinen β 1 und β 4. Die Gesamtproteinmengen von AKT, ERK, p38, GSK3 β , β -Catenin, FAK und Paxillin blieben unverändert.

Abbildung 31 zeigt das aus diesen Ergebnissen entwickelte Modell, wie die EGFR-abhängigen Signalwege sowie p38 über GSK3 β den Einfluss auf Migration mittels FAK und Paxillin ausüben.

Unter der Vorstellung, dass die Aktivierung von AKT, ERK und p38 eine Inaktivierung von GSK3 β bedingt und dies die Tumorzellmigration fördert, wurden zum einen *Wound Healing Assays* mit Inhibitoren dieser Signalwege (MK2206, U0126, PD98059, SB203580) in Kombination mit Bestrahlung durchgeführt und zum anderen erneut Western Blot Analysen. Die Idee dahinter war zu testen, ob durch Inhibition die Tumorzellmigration reversibel ist, sowie zu überprüfen, ob der Tumorsuppressor GSK3 β wieder reaktivierbar ist. Abbildung 16 zeigt die Western Blot Analysen: Der alleinige Einsatz eines dieser Inhibitoren ist in der Lage die unter Bestrahlung supprimierte GSK3 β -Aktivität wieder herzustellen. Dies ist daran erkennbar, dass die Phosphorylierung von Ser33/37 des β -Catenins bei Einsatz eines Inhibitors wieder detektierbar ist, was für eine suffiziente Funktion von GSK3 β spricht. Ebenso waren die Phosphorylierungen von FAK und Paxillin sowie die Integrine β 1 und β 4 unter kombinierter Inhibition und Bestrahlung auf einem der Kontrolle vergleichbaren Level. Die Theorie, dass die im Western Blot festgestellten Signalalterationen wirklich die Migration beeinflussen, konnte mittels *Wound Healing Assays* bestätigt werden (vergleiche Abbildung 18): Wenn nun, wie in den Blot-Analysen gezeigt, die GSK3 β -Inaktivierung, die Verluste an Integrinen sowie die Abnahme der Paxillin- und FAK-Phosphorylierungen für die strahleninduzierte Migration verantwortlich sind, so müsste diese durch den Einsatz der Inhibitoren aufgehoben werden. Durch Hinzufügen eines jeden dieser vier Inhibitoren vor Bestrahlung konnte gezeigt werden, dass die strahleninduzierte Migration signifikant verringert werden konnte und es beweist den Einfluss des AKT-, ERK- und p38-Signalwegs auf die Migration bei HNSCC. GSK3 β scheint also in der Lage zu sein, seine inhibitorische Wirkung auf Tumorzellmigration zu

entfalten, solange AKT, ERK und p38-MAPK nicht gemeinsam aktiviert sind, wie es unter einmaliger Bestrahlung mit 2 und 10 Gy der Fall ist.

Dieser Einfluss auf Tumorzellmigration scheint über FAK und Paxillin vermittelt zu sein, wobei eine Aktivierung dieser Proteine mit einem inhibierenden Einfluss auf Zellmotilität verbunden zu sein scheint, ähnlich wie bei HeLa Zellen, die eine gesteigerte Zellmigration unter Paxillin-Verlust zeigten (Yano, Mazaki et al. 2004). Ebenso ist bereits bekannt, dass eine reduzierte FAK-Aktivität mit erhöhter Zellmotilität und einem gesteigerten Invasionspotential bei HNSCC einhergeht und mit einer Überexpression von EGFR korreliert (Lu, Jiang et al. 2001). Dem übereinstimmend konnte mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass insbesondere die EGFR-abhängigen Signalwege AKT und ERK sowie der p38 MAPK-Signalweg den Einfluss auf FAK über GSK3 β ausüben, ein Hinweis darauf, dass der von Lu et al. unter EGF-Stimulation entdeckte Effekt darüber vermittelt wird. Zudem scheint GSK3 β indirekten Einfluss auf die β 1/ β 4-Integrin-Proteinexpression zu haben. Ein Verlust dieser Expression korreliert in den durchgeführten Versuchen mit einem erhöhten migratorischem Potential.

4.2. Einfluss einmaliger Bestrahlung auf das Proliferationsverhalten

Mittels modifiziertem *Crystal-Violett ELISA* wurde das Proliferationsverhalten der HNSCC-Zelllinien unter Bestrahlung überprüft. Dem gegenüber wurden *Colony Formation Assays* durchgeführt, um das klonogene Überleben, ein Maß für Zytotoxizität, zu überprüfen.

Ionisierende Strahlung wirkt über Signalwegsalterationen, Produktion reaktiver Sauerstoffradikale, DNA Einzelstrang- und Doppelstrangbrüche sowie Lipid- und Proteinveränderungen (Reisz, Bansal et al. 2014). Es ist lange bekannt, dass die durch Bestrahlung induzierten Doppelstrangbrüche mit Zelltod korrelieren (Radford 1985) und dass das Überleben der Tumorzellen durch eine strahleninduzierte Apoptose verringert wird (Dewey, Ling et al. 1995). Bestrahlung führt durch ROS-abhängige Aktivierung von Tyrosinkinase zu einer Aktivierung von Ras-Proteinen und einer multiplen Aktivierung von *downstream* Signalwegen wie AKT und ERK, die Transkriptionsfaktoren und Apoptose und damit Proliferation und Überleben beeinflussen (Valerie, Yacoub et al. 2007).

In den durchgeführten Proliferationsanalysen (siehe Abbildung 9) zeigte sich eine dosisabhängige Abnahme des Proliferationsverhaltens in den Zelllinien Cal27, HN und

UD-SCC-5 in einer Kinetik zwischen 0 und 16 Gy Strahlendosis, wobei bei UD-SCC-5 der Proliferationsabfall erst ab 2 Gy beginnt, was für eine gewisse Strahlenresistenz im niedrigdosiertem Strahlenbereich spricht. In Gesamtschau war sowohl das klonogene Überleben als auch das Proliferationsverhalten unter Bestrahlung mit 2 bzw. 10 Gy bei Cal27 und HN gegenüber der Kontrolle signifikant reduziert, bei UD-SCC-5 nur unter 10 Gy (siehe Abbildung 10).

Wie erwähnt, üben zahlreiche Zellsignalwege einen Einfluss auf das Proliferationsverhalten von Zellen aus. mTOR ist eine evolutionär hoch konservierte Checkpoint Ser/Thr-Kinase, welche die Proteinbiosynthese reguliert und damit Zellwachstum und Proliferation steuert (Hay and Sonenberg 2004). Die mTOR-Funktion wird dabei über zwei funktionell unterschiedliche Komplexe vermittelt (mTORC1 und mTORC2), wobei mTORC2 die Zellproliferation über eine Aktivierung von AKT fördert, und mTORC1 die Proteinbiosynthese über Aktivierung der p70S6-Kinase-1 und des 4E-BP1 initiiert (Liu, Gan et al. 2013). Eine Aktivierung von mTOR kann durch den PI3Kinase-Signalweg oder den Ras/Raf-Signalweg mittels Wachstumssignale auf Rezeptortyrosinkinasen erfolgen (Hay and Sonenberg 2004, Shaw and Cantley 2006, Wullschleger, Loewith et al. 2006).

In den durchgeführten Proteinanalysen (vergleiche Abbildung 20) zeigte sich unter Bestrahlung von 2 sowie 10 Gy eine deutliche, zeitkonstant (bis 96 h) andauernde Abnahme der Phosphorylierung von mTOR am Ser2448, was eine Inaktivierung des Proteins signalisiert. Dadurch sind folglich die *downstream targets* p70S6Kinase 1 und 4EBP1 an ihren Aktivierungsstellen unter Bestrahlung im Vergleich zu Kontrollisolaten kaum phosphoryliert und die Proteinbiosynthese damit inhibiert. Diese Abnahme der Phosphorylierungen unter Bestrahlung steht damit im Einklang mit den Proliferationsanalysen (modifizierter *Crystal-Violett ELISA*) und scheint eine wichtige Ursache für die Abnahme von Tumorzellproliferation unter Bestrahlung darzustellen.

Interessanterweise zeigte sich in den Proteinanalysen (vergleiche Abbildung 15) unter Bestrahlung eine dauerhafte, bis 96 h andauernde Aktivierung der Kinase AKT, die, wie oben berichtet, eine wichtige Rolle bei der strahleninduzierten Tumorzellmigration durch Inhibition von GSK3 β spielt. Zusätzlich wird dieser Kinase eine proliferationsfördernde Wirkung durch Aktivierung von mTOR zugeschrieben (Shaw and Cantley 2006). Eine konstante Aktivierung von AKT, wie bei meinen Analysen beobachtet, müsste folglich eine Aktivierung von mTOR und ein gesteigertes Proliferationsverhalten zur Folge haben. Um daher zu überprüfen wie die Wechselwirkungen zwischen AKT und den mTOR-Komplexen unter Bestrahlung bei HNSCC erfolgen, wurden weitere Proteinanalysen durchgeführt

(siehe Abbildung 21). Ein besonderes Augenmerk wurde hierbei auf das Protein Sin1 gelegt, da es neuerdings als ein wichtiger Mediator der Stabilität des mTOR-Komplex-2 beschrieben wurde (Liu, Gan et al. 2013): p70S6Kinase-Aktivität übt über p-Sin1-Thr86 einen destabilisierenden Einfluss auf den mTORC2 aus. Ist dagegen Sin1 an den Threoninresten dephosphoryliert, kann Sin1 mit den anderen Mitgliedern des mTORC2 interagieren und den Komplex stabilisieren. Durch diese Stabilisierung ist Sin1 in der Lage AKT an Ser473 zu phosphorylieren. Diese inverse Phosphorylierung zwischen p-Sin1-Thr86 und p-AKT-Ser473 konnte bereits bei T-ALL und Ovarialkarzinomen nachgewiesen werden (Liu, Gan et al. 2013) und wäre eine Erklärung für die dauerhafte Aktivierung von AKT, wie sie in meinen Proteinanalysen bei HNSCC-Zellen sichtbar wurde.

Aus diesem Grund wurde Sin1 mittels Immunpräzipitation extrahiert und dessen Threoninphosphorylierungsstatus betrachtet (siehe Abbildung 21): Unter Bestrahlung war keine Threonin-Phosphorylierung am Sin1 erkennbar, hingegen eine starke Phosphorylierung von AKT am Ser473 erkennbar. Bei den Kontrollisolaten war es genau umgekehrt, es war eine starke Threoninphosphorylierung am Sin1 zu finden, wohingegen AKT nicht am Ser473 phosphoryliert war. Diese inverse Phosphorylierung ist übereinstimmend mit den Ergebnissen, die Liu et al. erzielen konnten und weisen auf einen stabilisierten mTORC2 bei HNSCC unter Bestrahlung hin, was eine andauernde Aktivierung von AKT zur Folge hat, die unabhängig vom EGFR vermittelt zu sein scheint. Zusätzlich konnte unter Bestrahlung eine Phosphorylierung von Sin1 am Ser385 detektiert werden, die mit der AKT-Phosphorylierung am Ser473 korreliert. Diese Ser385-Stelle scheint ein direkter oder indirekter Angriffspunkt von AKT am Sin1 zu sein, denn unter Bestrahlung bei gleichzeitiger Inhibition von AKT mit MK2206 waren die Phosphorylierungen kaum nachweisbar (Abb. 21).

Basierend auf den gefundenen Ergebnissen kann folgendes Modell entwickelt werden: Unter Bestrahlung führen ein dephosphoryliertes mTOR und p70S6Kinase-1 zu einem an Threonin dephosphoryliertem Sin1. Dies stabilisiert den mTORC2, was eine dauerhafte AKT-Aktivierung bedingt. Diese AKT-Aktivierung sowie die strahleninduzierte Aktivierung von ERK und p38-MAPK führen zu einer Inaktivierung von GSK3 β , was über FAK, Paxillin und β -Catenin eine gesteigerte Zellmigration bewirkt. Dies wird in folgenden Schemen verdeutlicht: Abbildung 32 zeigt die aktivierten Zellsignalwege ohne Bestrahlung, Abbildung 33 mit Bestrahlung.

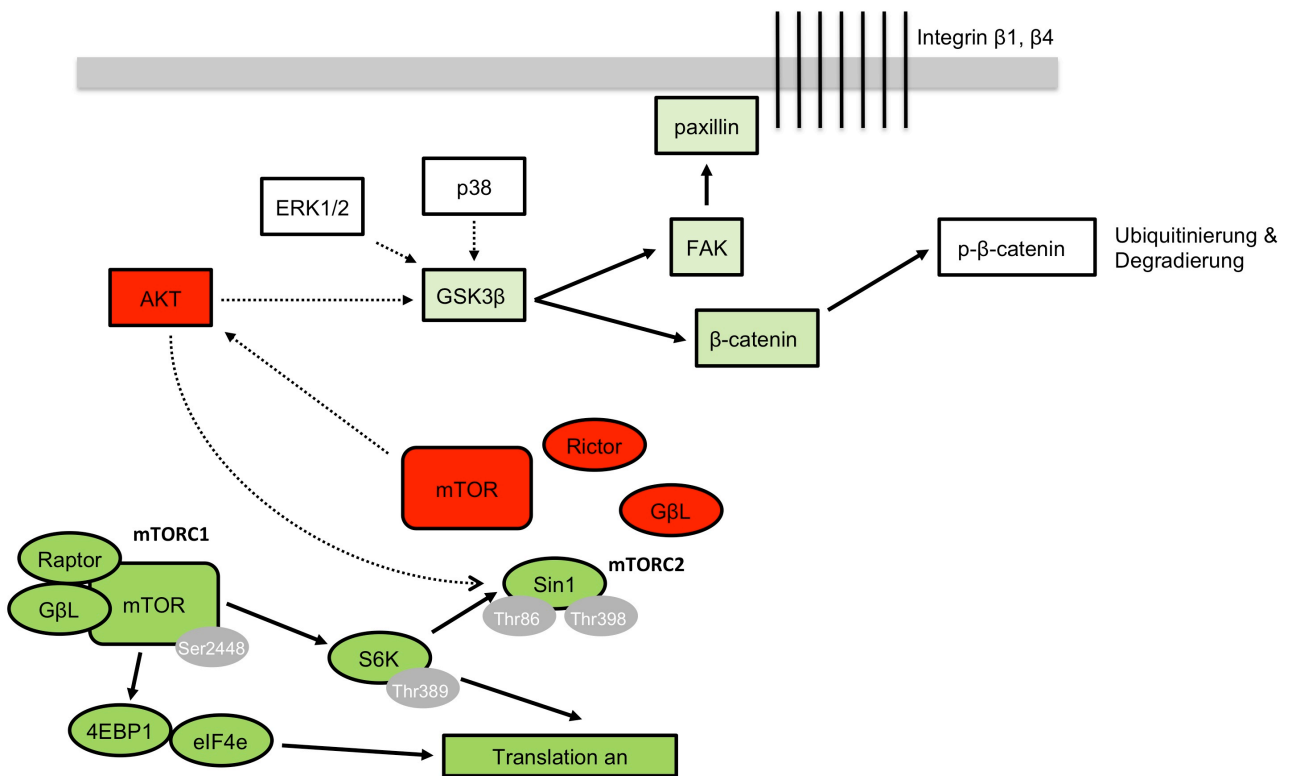


Abb. 32: Mechanistisches Modell bei HNSCC ohne Bestrahlung. In Grün sind aktivierte Zellmoleküle dargestellt, in Rot sind deaktivierte Zellmoleküle dargestellt: mTOR ist an Ser2448 phosphoryliert, wodurch es zu einer Stabilisierung von mTORC1 kommt. p70S6Kinase-1 sowie 4EBP-1 sind dadurch aktiv und bedingen eine gesteigerte Translation. Sin1 hingegen ist an den Threoninresten phosphoryliert und der mTORC2 destabilisiert, AKT dadurch ebenfalls inaktiv. Der ERK und p38 MAPK Signalweg sind ebenfalls nicht aktiviert. GSK3 β ist dadurch als aktiver Tumorsuppressor in der Lage die Kontrolle über FAK, Paxillin und β -Catenin zu wahren und es kommt zu keiner gesteigerten Tumorzellmigration.

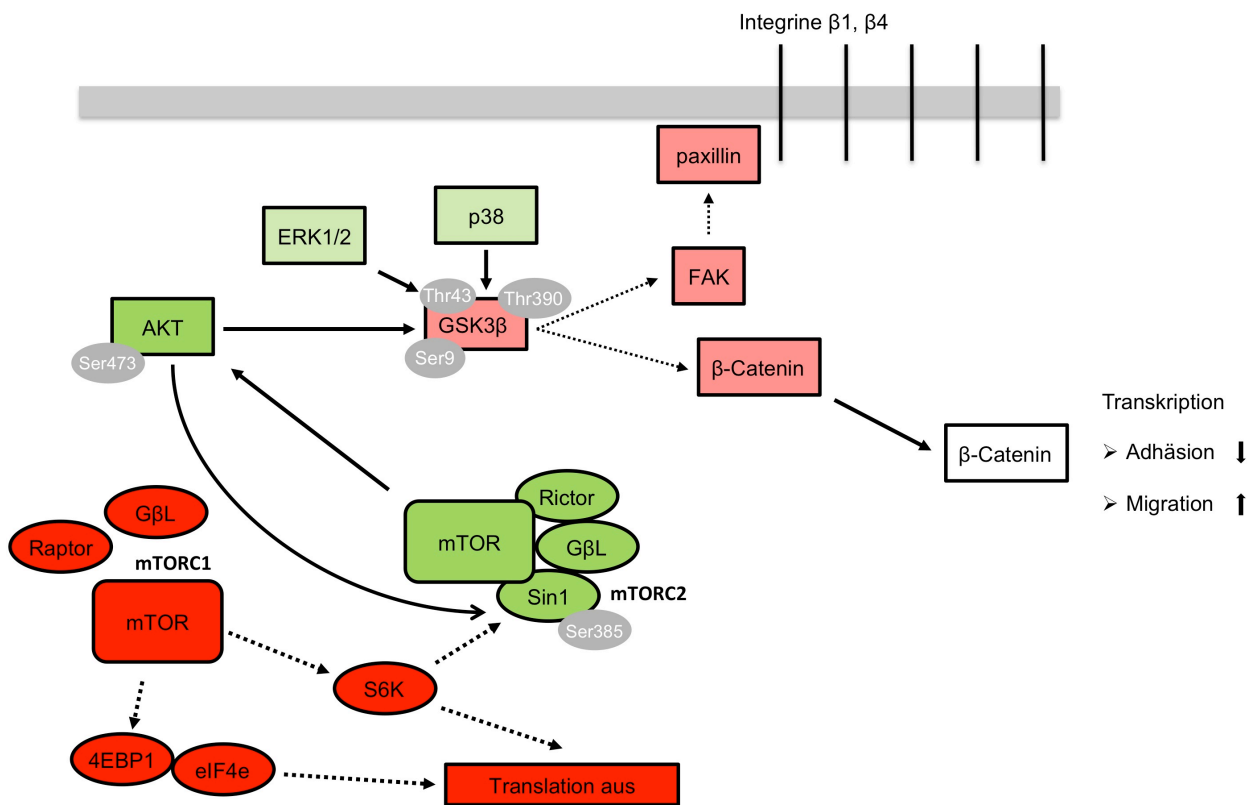


Abb. 33: Mechanistisches Modell bei HNSCC unter Bestrahlung. In Grün sind aktivierte Zellmoleküle dargestellt, in Rot sind deaktivierte Zellmoleküle dargestellt: Verlust der mTOR Phosphorylierung am Ser2448 führt zu einer Abnahme der Phosphorylierung von 4EBP1 und p70S6Kinase-1. Sin1 ist dadurch an den Threoninresten dephosphoryliert, stabilisiert mTORC2, was eine konstante Aktivierung von AKT am Ser473 bedingt sowie eine Phosphorylierung des Sin1 am Ser385. Diese Aktivierung und die strahleninduzierte Aktivierung von ERK und p38 MAPK inaktiviert den Tumorsuppressor GSK3β und bedingt die strahleninduzierte Migration mittels FAK, Paxillin und β-Catenin.

4.3. Wirkung fraktionierter Bestrahlung auf das Proliferationsverhalten

Die oben dargestellten Ergebnisse wurden unter einmaliger Bestrahlung mit 2 Gy oder 10 Gy erzielt, klinische Bestrahlungsregime verwenden jedoch meist fraktionierte Bestrahlungen, das heißt ein Aufsplitten der Gesamtdosis auf mehrere kleine Einzeldosen. Hierbei wird meist an fünf aufeinanderfolgenden Tagen pro Woche normofraktioniert mit 1,8 bis 2 Gy täglich bestrahlt, bis zu einer Gesamtdosis zwischen ca. 50 und 70 Gy.

Aus diesem Grund wurden Versuchsreihen zum klonogenen Überleben, zur Proliferation sowie Invasion und Migration bei einer fraktionierten Bestrahlung von 5x 2 Gy an fünf aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt. Ziel war zu überprüfen, ob eine fraktionierte Bestrahlung dieselbe aktivierende Wirkung auf Tumorzellmigration ausübt wie einmalige Bestrahlung sowie das Invasionsverhalten zu überprüfen – beides Prozesse, die mit Tumorzellmetastasierung einhergehen (Howell and Grandis 2005).

Das klonogene Überleben und die Proliferation konnte in den Zelllinien HN, Cal27 und UD-SCC-5 durch fraktionierte Bestrahlung gegenüber der einmaligen Bestrahlung mit 2 Gy höchst signifikant gesenkt werden (Abb. 22) und die Abnahme ist vergleichbar mit der Reduktion, die durch einmalige Bestrahlung mit 10 Gy erzielt werden konnte (Abb. 10). Unter einmaliger Bestrahlung konnte gezeigt werden, dass mTOR durch Bestrahlung inaktiviert wird (Abb. 20). Daher wurden Western Blot Analysen durchgeführt, welche die Rolle von mTOR unter fraktionierter Bestrahlung beleuchten sollten. Auch hier konnte eine Verminderung der Phosphorylierung unter fraktionierter Bestrahlung von mTOR am Ser2448 sowie der Effektormoleküle p70S6Kinase am Thr389 und 4EBP-1 am Ser65 nachgewiesen werden, die vergleichbar ist mit denen unter 2 Gy und 10 Gy Bestrahlung (Abb. 26). Wie erwähnt gilt mTOR als zentrale Steuereinheit der Proteinbiosynthese in der Zelle (Hay and Sonenberg 2004), weshalb eine Inhibition von mTOR durch Bestrahlung zu einer Proliferationsabnahme führt.

4.4. Wirkung fraktionierter Bestrahlung auf das Migrationsverhalten

Unter einmaliger Bestrahlung konnte eine strahleninduzierte Migration bei HNSCC in allen drei verwendeten Zelllinien bestätigt werden (Abb. 11 und 12). In den durchgeführten *Wound Healing Assays* (Abb. 23) konnte die signifikante Steigerung der Migration unter 2 Gy durch eine fraktionierte Bestrahlung signifikant in allen Zelllinien reduziert werden. Im Vergleich der fraktionierten Bestrahlung mit der Kontrolle gab es bei HN und Cal27 keine

statistischen Unterschiede bezüglich dem Migrationsverhalten, bei UD-SCC5 konnte die Tumorzellmigration sogar durch fraktionierte Bestrahlung signifikant gegenüber der Kontrolle gesenkt werden. Daraus ist zu folgern, dass die strahleninduzierte Migration, wie sie in meinen Ergebnissen (Abb. 11,12 und 23) sowie in der Literatur (Wild-Bode, Weller et al. 2001, Pickhard, Margraf et al. 2011, Bouchard, Bouvette et al. 2013) beschrieben wurde, ein Effekt einer einmaligen Bestrahlung ist. Fraktionierte Bestrahlung ist in der Lage die Tumorzellmigration mindestens auf das Kontrollniveau zu reduzieren.

In den Western Blot Analysen mit der Cal27 Zelllinie (Abb. 14) konnte gezeigt werden, dass die strahleninduzierte Migration ein Effekt ist, der mit der Inaktivierung des Tumorsuppressors GSK3 β und dem Verlust der Integrine β 1 und β 4 sowie der Dephosphorylierung von Paxillin am Tyr118 und von FAK am Tyr397 korreliert. Wenn die fraktionierte Bestrahlung die Tumorzellmigration nicht signifikant beeinflusst und wenn GSK3 β wirklich die entscheidende Kinase für die strahleninduzierte Migration ist, so müsste unter fraktionierter Bestrahlung in Proteinanalysen keine Veränderung zu Kontrollisolaten nachweisbar sein. Aus diesen Überlegungen heraus wurden Western Blot Analysen zu den AKT-, ERK-, p38-MAPK-Signalwegen sowie GSK3 β , FAK, Paxillin und Integrinen durchgeführt (Abb. 25): Interessanterweise zeigten sich unter fraktionierter Bestrahlung die selben Aktivierungen von AKT am Ser473, von ERK an Thr202/Tyr204 und von p38 an Tyr180/Thr182 wie unter einmaliger Bestrahlung mit 2 oder 10 Gy. Ebenso waren beide inhibierende Phosphorylierungen an GSK3 β (Ser9 durch AKT und Thr390 durch p38, für die Inhibition des GSK3 β durch ERK gab es keinen kommerziellen Antikörper) unter fraktionierter Bestrahlung detektierbar. Trotz dieser inhibierenden Phosphorylierungen scheint GSK3 β unter fraktionierter Bestrahlung seine Funktion als Tumorsuppressor weiter wahrnehmen zu können, da sowohl die Phosphorylierungen am β -Catenin Ser33/37 als auch die Phosphorylierung von FAK am Tyr397 wieder nachweisbar sind. Ebenso sind die Integrine β 1 und β 4 unter fraktionierter Bestrahlung wieder deutlich zu sehen. Der Verlust dieser Phosphorylierungen und der Integrine wurde für die strahleninduzierte Migration verantwortlich gemacht (siehe Kapitel 4.1). Die hier gezeigten Proteinveränderungen unter fraktionierter Bestrahlung untermauern diese These, da unter fraktionierter Bestrahlung biologisch im *Wound Healing Assay* keine vermehrte Tumorzellmigration detektierbar war und auch in den Proteinanalysen keine Änderung von β -Catenin, FAK und Integrinen verglichen mit der Kontrolle zu sein scheint. Interessant ist, dass trotz der Aktivierung von AKT, MAPK und p38 Signalwegen GSK3 β aktiv ist. Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür ist, dass neben AKT, MAPK und p38 ein

weiterer unbekannter Signalweg aktiv sein muss, um GSK3 β zu inaktivieren. Dieser Signalweg muss dann unter 2 und 10 Gy Bestrahlung aktiviert sein, um GSK3 β zu inaktivieren, und im Gegensatz dazu unter fraktionierter Bestrahlung inaktiv sein. Für die Verifikation dieses Modells müssten weitere Nachforschungen angestellt werden.

4.5. Wirkung fraktionierter Bestrahlung auf Invasion und epitheliale-mesenchymale Transition

Invasion ist ein fundamentaler Prozess für Lymphknoten- und Fernmetastasierung bei HNSCC (Leemans, Braakhuis et al. 2011). Aus diesem Grund wurden Analysen zum Invasionsverhalten bei HN, Cal27 und UD-SCC-5 durchgeführt (Abb. 24). Bei Cal27 konnte eine signifikante Zunahme des Invasionsverhaltens unter 2 Gy und fraktionierter (5x 2 Gy) Bestrahlung gegenüber der Kontrolle nachgewiesen werden, bei UD-SCC-5 bei fraktionierter Bestrahlung und bei HN bei 2 Gy Bestrahlung. Interessanterweise zeigen die Zelllinien UD-SCC-5 und Cal27 unter fraktionierter Bestrahlung eine Zunahme des Invasionsverhaltens bei gleichzeitiger Inhibition der Tumorzellmigration.

Das Invasionsverhalten bei HNSCC scheint eng mit dem Prozess der epithelialen-mesenchymalen Transition verknüpft zu sein (Leemans, Braakhuis et al. 2011). Zahlreiche Marker werden mit dem Prozess der EMT in Verbindung gebracht. Bei den einmalig bestrahlten Sphäroiden der Cal27 Zelllinie konnte bereits in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es zu einem Verlust des membranständigen E-Cadherins im Randbereich von Sphäroiden kommt (Abb.19). Dieser Verlust und eine morphologische Veränderung der im Randbereich lokalisierten Zellen zeigte sich auch bei Sphäroiden, die fraktioniert bestrahlten wurden (Abb.28). Die Sphäroide wurden aus der Cal27 Zelllinie gewonnen, da sich diese in Vorversuchen als die für die Sphäroidbildung am besten geeignete Zelllinie herauskristallisiert hatte. Eine Abnahme des membranständigen E-Cadherins gilt als ein Marker für EMT (Peinado, Portillo et al. 2004) und die normale Expression als Kontrolleur von Invasivität (Birchmeier and Behrens 1994). Die Beobachtungen, die anhand des Sphäroidmodells und der Invasionsversuche gewonnen wurden, deuten darauf hin, dass unter Bestrahlung ein EMT-Prozess bei HNSCC in Gang gesetzt wird, der zu einer vermehrten Invasivität der Tumorzellen führt. Dies könnte ein möglicher Trigger für die Entstehung von Metastasierung sein.

Neben E-Cadherin sind zahlreiche andere Marker von EMT identifiziert worden. Aus diesem Grund wurden Western Blot Analysen durchgeführt, die das Muster der

Proteinexpression von EMT-Markern unter Bestrahlung (2, 10, 5x 2 Gy) gegenüber unbestrahlten Zellen vergleichen sollten. Abbildung 29 zeigt diese Analysen. Zu sehen ist eine Zunahme der Marker Slug, Claudin, N-Cadherin, ZO-1 und TCF8/ZEB1 unter Bestrahlung gegenüber der Kontrolle. In Abbildung 30 ist eine Zunahme von Snail unter fraktionierter Bestrahlung erkennbar. Eine besonders deutliche Anreicherung von N-Cadherin, ZO-1 und ZEB1 ist unter fraktionierter Bestrahlung zu sehen (Abb. 29). Slug oder auch SNAI2 genannt, gehört neben SNAI1 (Snail) zur Gruppe der Zink-Finger Transkriptionsfaktoren und spielt eine wichtige Rolle bei invasiven Karzinomzellen (Peinado, Olmeda et al. 2007). Transkriptionelle Repression von E-Cadherin wird von Faktoren wie Slug und ZEB1 vermittelt (Yilmaz and Christofori 2009). Snail Expression ist in der Lage mRNA-Level von E-Cadherin zu reduzieren und von N-Cadherin hochzuregulieren (Mani, Guo et al. 2008). Für Plattenepithelkarzinome des Ösophagus konnte gezeigt werden, dass eine verstärkte Slug Expression mit einer verminderten E-Cadherin Expression, verstärktem Invasionsverhalten, vermehrten Lymphknotenmetastasen und schlechterem klinischen Outcome korreliert (Uchikado, Natsugoe et al. 2005). Slug Expression wurde mit dem sogenannten Cadherin Switch bei oralem SCC in Verbindung gebracht, einem Verlust von E-Cadherin und Überexpression von N-Cadherin an den Zellgrenzen, was EMT bedingt (Katafiasz, Smith et al. 2011). Claudin-1 ist ein Strukturprotein von apikalen Zelladhäsionen; Überexpression wurde mit EMT in Verbindung gebracht, sowie bei hepatozellulärem Karzinom, oralen SCC sowie Brustkrebs gefunden, wobei es Invasivität und Metastasierung fördert (Stebbing, Filipovic et al. 2013). ZO-1 (Zonula occludens protein 1) assoziiert mit N-Cadherin und wurde bei Melanomen mit vermehrter Invasivität in Verbindung gebracht (Smalley, Brafford et al. 2005). In den hier erzielten Ergebnissen korreliert die unter Bestrahlung vermehrte Proteinexpression der in der Literatur beschriebenen EMT Marker sowie die bei Sphäroiden gefundene Abnahme des E-Cadherins mit der in den Invasionstest gefundenen Steigerung der Invasivität. Dies sind starke Hinweise darauf, dass es unter Tumorzellbestrahlung bei HNSCC zu einer EMT kommt, die die Invasivität von Kopf-Hals-Tumoren fördert.

4.6. Auftreten von Zellen mit Tumorstammzell-ähnlichen Eigenschaften unter fraktionierter Bestrahlung

In den letzten Jahren wurde die epitheliale-mesenchymale Transition vermehrt mit dem Auftreten von Zellen mit Eigenschaften von Tumorstammzellen in Verbindung gebracht. 2008 berichteten Mani et al., dass die Induktion von EMT bei Mamma-Zellen neben dem Auftreten von mesenchymalen Eigenschaften auch zur Expression von Stammzellmarkern führte (Mani, Guo et al. 2008). Innerhalb von Tumorverbänden wurden sogenannte Krebsstammzellen beschrieben (CSCs), die fähig zur Selbsterneuerung und asymmetrischen Teilung sind und neue Tumorabkömmlinge bilden können (Reya, Morrison et al. 2001). Sie zeichnen sich durch Tumorigenese in immundefizienten Mäusen, durch spezifische Oberflächenmarker, durch asymmetrische Teilung und durch Selbsterneuerungskapazität über mehrere Zellgenerationen hinweg aus (Allegra and Trapasso 2012). Zuerst beschrieben wurden diese CSCs im hämatopoetischen System bei akuten myeloischen Leukämien 1997 (Bonnet and Dick 1997), in der Zwischenzeit wurden sie für zahlreiche weitere Tumorentitäten beschrieben. Auch bei HNSCC wurde 2007 eine CD44 positive Subpopulation mit Stammzeleigenschaften nachgewiesen (Prince, Sivanandan et al. 2007). Diese haben die Fähigkeit die Tumorzellpopulation aufrechtzuerhalten, Resistenz gegenüber Radiochemotherapie zu vermitteln und Metastasierung zu fördern (Allegra and Trapasso 2012). CD44 gilt als etablierter Marker für CSC bei HNSCC und wurde mit schlechter T- und N-Kategorie, schlechtem Grading und schlechter Prognose bei Pharynx- und Larynxkarzinomen in Verbindung gebracht (Chen, Zhou et al. 2014). Die Transkriptionsfaktoren Oct4 und Nanog werden ebenfalls als Marker für CSCs aufgeführt: Oct4 dient der Selbsterneuerung embryonaler Stammzellen und führt zu Strahlenresistenz und schlechterer Prognose (Ventelä, Sittig et al. 2015, Wang, Lu et al. 2014). Zusätzlich werden Oct4 und Nanog mit der Regulation von EMT in Verbindung gebracht (Wang, Lu et al. 2014). Ein weiterer Marker bei HNSCC ist ALDH1. Zellen mit hohem ALDH1-Gehalt sind in der Lage in immundefizienten Mäusen neue Kopf-Hals-Tumore zu bilden, wobei ALDH1-positive Zellen mit der CD44 Expression assoziiert sind (Clay, Tabor et al. 2010). Für Sox2 wurde beschrieben, dass eine Herunterregulierung zu einem Verlust von Tumorgenität bei Glioblastomen (Gangemi, Griffero et al. 2009) und zu einer Abnahme von Proliferation und Metastasierung bei Lungenkarzinomen führt (Gangemi, Griffero et al. 2009, Xiang, Liao et al. 2011).

Da die Sphäroidversuche, die Invasionsversuche und die Western Blot Analysen auf eine Induktion von EMT unter Bestrahlung hindeuten, wurde mittels Western Blot Analysen die Proteinexpression von Markern, die mit Tumorstammzellen assoziiert sind, überprüft (siehe Abbildung 27). Es zeigte sich vor allem unter fraktionierter Bestrahlung gegenüber der unbestrahlten Kontrolle eine starke Zunahme der Marker CD44, Oct4, Nanog und leicht von ALDH1, wohingegen Sox2, was bei vielen Tumorentitäten und auch HNSCC mit Stammzeleigenschaften (Lee, Oh et al. 2014) korreliert wurde, interessanterweise unter fraktionierter Bestrahlung kaum nachweisbar war. Unter einmaliger Bestrahlung konnte vor allem bei 10 Gy Bestrahlung eine Anreicherung von CD44 festgestellt werden.

Von diesen Ergebnissen ausgehend gibt es zwei Möglichkeiten, wie es zum Auftreten dieser Stammzellmarker unter fraktionierter Bestrahlung kommen kann: Zum einen könnte es zu einem Anreichern dieser Zellen mit Tumorstammzellmarkern kommen, zum anderen könnte die Bestrahlung das Auftreten dieser Zellen induzieren. Die zweite Möglichkeit scheint die wahrscheinlichere, da ohne Bestrahlung derartige Marker im Western Blot kaum detektierbar waren und eine derartige Anreicherung innerhalb 5 Tagen bei Bestrahlung wenig wahrscheinlich scheint.

Zu klären ist, ob die Induktion von EMT durch Bestrahlung ein Auftreten von Zellen mit Stammzellmarkern auslöst, oder ob Zellen mit Stammzellprofil die EMT induzieren. Mani et al. konnten zeigen, dass die Induktion eines EMT-Profiles zu Zellen mit Eigenschaften von Stammzellen führt (Mani, Guo et al. 2008). Dies gilt es in weiteren Experimenten zu überprüfen, die nicht mehr Teil dieser Arbeit sind. Hier konnte gezeigt werden, dass durch eine fraktionierte Bestrahlung ein Zelltyp induziert wird, der über ein erhöhtes Invasionspotential verfügt, der den Prozess der EMT durchmacht und Marker von CSC exprimiert.

4.7. AKT- und ERK-Inhibitoren reduzieren EMT- und CSC-Marker

Für die strahleninduzierte Tumorzellmigration konnte bereits eine inhibierende Wirkung durch den Einsatz von AKT- und ERK-Signalweginhibitoren gezeigt werden (Abbildung 18). In der Literatur wurde bei Glioblastomen gezeigt, dass AKT-Inhibition die Anzahl an CSCs reduzierte und die Zellmotilität und -invasivität hemmte (Eyler, Foo et al. 2008). Aus diesem Grund wurden Zellen, die fraktioniert bestrahlt wurden, vor jeder Bestrahlung entweder mit AKT-Inhibitor, ERK-Inhibitor oder beiden Inhibitoren behandelt und im

Anschluss mittels Western Blot Analysen die EMT-Marker und CSC-Marker betrachtet. Diese Analysen stellt Abbildung 30 dar. Zu sehen ist, dass bereits der Einsatz von AKT- oder ERK-Inhibitor ausreicht, um das Auftreten der Tumorstammzellmarker unter fraktionierter Bestrahlung zu verhindern. Auch das Auftreten der EMT-Marker N-Cadherin, ZO-1, TCF/ZEB1, Slug und Snail wird durch einfache Inhibition und deutlich unter dualer Inhibition komplett reduziert.

Dies zeigt einen deutlichen Einfluss der unter Bestrahlung hochregulierten AKT und ERK Signalwege auf die Induktion von EMT- und CSC-Markern. Unterstrichen wird durch diese Ergebnisse das Potential eines klinischen Einsatzes von Inhibitoren des AKT- oder ERK-Signalweges bei HNSCC, da *in vitro* neben Migration auch die EMT und das Auftreten von Zellen mit Markern von Tumorstammzellen verhindert werden konnte.

6. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es zu überprüfen, welche Tumorzellsignalwege zur strahleninduzierten Migration bei Kopf-Hals-Tumoren führen. Es sollte erforscht werden, welchen Einfluss einfache und fraktionierte Bestrahlung auf Proliferation, Überleben, Migration und Invasion von HNSCC-Zellen hat und welche Zellmoleküle diese biologischen Eigenschaften vermitteln.

Es konnte gezeigt werden, dass unter einfacher Bestrahlung eine kollektive Aktivierung des AKT-, des ERK- und des p38-MAPK-Signalweges erfolgt, was eine Inaktivierung des Tumorsuppressors GSK3 β zur Folge hat. Diese Inaktivierung führt zu einem Verlust der Phosphorylierungen von FAK und Paxillin, einem Integrinverlust von β 1 und β 4 sowie einem verminderten Abbau des β -Catenins, Proteinen, denen eine starke Rolle im Migrationsverhalten zugeschrieben wird. Diese Veränderungen korrelieren mit vermehrter Tumorzellmigration im *Wound Healing Assay*. Durch alleinige Inhibition eines dieser drei aktivierten Zellsignalwege konnte die strahleninduzierte Migration auf das Niveau der unbestrahlten Kontrolle zurückgeführt werden und die Inaktivierung von GSK3 β sowie von FAK, Paxillin und der Integrine aufgehoben werden.

Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass es unter einmaliger Bestrahlung zu einer Stabilisierung des mTORC2 bei HNSCC kommt, welcher eine dauerhafte Aktivierung von AKT bedingt. Diese Stabilisierung wird dadurch vermittelt, dass Sin1 unter Bestrahlung keine Phosphorylierung an Threoninresten aufweist. Zudem konnte gezeigt werden, dass AKT die Phosphorylierung von Sin1 am Ser385 beeinflusst.

Mittels dreidimensionalen Sphäroidmodellen konnte zum einen bewiesen werden, dass es auch bei Sphäroiden unter Bestrahlung zu einer gesteigerten Tumorzellausbreitung kommt, zum anderen wurde eine Abnahme von E-Cadherin in den Randbereichen von Sphäroiden detektiert, ein Hinweis auf EMT.

In Versuchen mit Invasionskammern wurde für die Cal27 Zelllinie und die UD-SCC-5 Zelllinie eine vermehrte Tumorzellinvasion vor allem unter fraktionierter Bestrahlung festgestellt. In Western Blot Analysen konnte gezeigt werden, dass eine fraktionierte Bestrahlung zu einer vermehrten Expression von EMT-Markern führt. Ebenso kommt es dabei zum Auftreten von Markern, die bei Zellen, die Tumorstammzell-Eigenschaften besitzen, gefunden wurden. Durch Inhibition des AKT- und ERK-Signalweges konnte das

Auftreten von EMT- und CSC-Markern unter fraktionierter Bestrahlung verhindert werden.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich die Rolle der EGFR-abhängigen Signalwege bei HNSCC unter ionisierender Bestrahlung auf. Ein klinischer Einsatz dieser Inhibitoren hat das Potential, Tumorzellmigration, Invasion, EMT und das Auftreten von Zellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften zu verhindern.

6. Anhang

6.1. Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz herzlich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Henning Bier bedanken, dass es mir ermöglicht wurde, die hier präsentierte Arbeit unter optimalen Bedingungen im onkologischen Labor der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde am Klinikum rechts der Isar durchzuführen.

Ich danke meiner Doktormutter Frau PD Dr. med. Anja Pickhard, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und mich in einer Weise bei meiner Arbeit begleitete, die keineswegs selbstverständlich ist. Ihre Begeisterung an wissenschaftlicher Forschung übertrug sich dadurch auf mich. Vielen Dank für die Möglichkeit meine Ergebnisse zu publizieren und für die schnelle Korrektur unserer Manuskripte.

Des Weiteren möchte ich Herrn Guido Piontek hervorheben, der Tag und Nacht ein offenes Ohr für jegliche Probleme hatte und mich in die Methoden der Laborarbeit bestens einführte und dabei begleitete. Auch bei ihm möchte ich mich für die Mühen bedanken, die er bei der Korrektur der Manuskripte auf sich nahm.

Ich danke Frau Univ.-Prof. Dr. med. Stephanie E. Combs aus der Klinik für Strahlentherapie am Klinikum rechts der Isar für die Möglichkeit die Strahlenversuche im Zentrum für präklinische Forschung durchzuführen.

Ich möchte mich zudem bei allen anderen Mitarbeitern und Doktoranden des onkologischen Labors, insbesondere bei Alexander Baumann und Lena Gebel für die interessante als auch humorvolle und schöne Zeit bedanken.

Zuletzt danke ich meiner Familie und meiner Freundin Maria Schlögl, die mich während der nicht immer leichten und stressigen Zeit des Studiums und der Experimente wundervoll unterstützt haben.

6.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Kriterien der TNM-Klassifikation, des Gradings und der Tumorresiduen	17
Tabelle 2	Bedeutung der Tumorausbreitung bezogen auf die anatomische Lokalisation des Primärtumors	18
Tabelle 3	Bedeutung des Lymphknotenstatus abhängig von der anatomischen Lokalisation des Primärtumors	21
Tabelle 4	UICC-Stadieneinteilung	21
Tabelle 5	verwendete Zelllinien	45
Tabelle 6	Inhibitoren	45
Tabelle 7	Primärantikörper	46
Tabelle 8	Sekundärantikörper	49
Tabelle 9	Reagenzien für die Zellkultur	49
Tabelle 10	verwendete Reagenzien	50
Tabelle 11	Mischreagenzien, Puffer und Gels	52
Tabelle 12	Verbrauchsmaterialien	54
Tabelle 13	Kits	54
Tabelle 14	verwendete Laborgeräte	55
Tabelle 15	Computerprogramme	56
Tabelle 16	Kalibrationskurve für <i>Bradford Assay</i>	63
Tabelle 17	Zusammensetzung des Laufgels	64
Tabelle 18	Zusammensetzung des Sammelgels	64
Tabelle 19	Zusammensetzung Master Mix für Immunpräzipitation	67
Tabelle 20	p-Werte und ihre Signifikanz	69

6.3. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Subgruppen des HNSCC	23
Abbildung 2	Modell der Karzinogenese für das HNSCC	25
Abbildung 3	Aktivierungsmechanismen des PI3K-AKT-Signalweges und des Raf/MEK/ERK-Signalweges	31
Abbildung 4	Downstream targets von AKT und deren zelluläre Funktionen	32
Abbildung 5	Darstellung der drei MAPK Familien und deren Aktivierung	34
Abbildung 6	Übersicht über die Regulation der mTOR Komplexe	38
Abbildung 7	Übersicht über ausgewählte inhibierende Eingänge an GSK3 β und über dessen Funktionen in der Zelle	41
Abbildung 8	Aufbau des Semidry Blots	65
Abbildung 9	Darstellung der Strahlenkinetiken von 0 Gy bis 16 Gy für die Zelllinien HN, Cal27 und UD-SCC-5	70
Abbildung 10	Klonogenes Überleben und Proliferation	71
Abbildung 11	Zunahme des migratorischen Potentials unter Bestrahlung mit 2 und 10 Gy	73
Abbildung 12	mikroskopische Beispielaufnahmen des <i>Scratches</i> für ctrl, 2 Gy und 10 Gy nach 10 h (Cal27)	74
Abbildung 13	Größenzunahme von Sphäroiden in der Objektträgerbeschichtung (oben), Beispielaufnahme eines Sphäroids bei Injektion auf Objektträger (unten links) und nach Ausbreitung in Beschichtung des Objektträgers (unten rechts)	75
Abbildung 14	Darstellung der Proteinanalysen zum Migrationsverhalten mittels Western Blot Technik	77
Abbildung 15	Western Blot Analysen von GSK3 β und <i>downstream targets</i>	78
Abbildung 16	Darstellung der EGFR-abhängigen Signalwege unter Bestrahlung +/- Inhibition mit spezifischen Inhibitoren für AKT (MK2206), MEK1/2 (U0126), MEK (PD98059) und p38-MAPK (SB203580)	79
Abbildung 17	Gesamtproteine unter Bestrahlung +/- Inhibition	80
Abbildung 18	Reversion der strahleninduzierten Migration unter Einsatz spezifischer Inhibitoren	81
Abbildung 19	Immunfluoreszenz mit E-Cadherin an Tumorsphäroiden	82
Abbildung 20	Western Blot Analysen von mTOR und <i>downstream targets</i>	84

Abbildung 21	Western Blot Analysen und Immunopräzipitation zur Überprüfung des Regelkreislaufts zwischen mTOR, Sin1 und AKT 24 h nach Bestrahlung/Inhibition	85
Abbildung 22	Darstellung von klonogenem Überleben und Proliferation unter fraktionierter Bestrahlung	87
Abbildung 23	Migrationsverhalten unter fraktionierter Bestrahlung	89
Abbildung 24	Tumorzellinvasion unter fraktionierter Bestrahlung	90
Abbildung 25	Proteinexpression der AKT, ERK, p38 Signalwege unter fraktionierter Bestrahlung sowie GSK3 und <i>downstream targets</i>	91
Abbildung 26	Western Blots unter fraktionierter Bestrahlung von mTOR und <i>downstream targets</i>	92
Abbildung 27	Western Blot Analysen von Stammzellmarkern	93
Abbildung 28	Immunfluoreszenz mit E-Cadherin eines fraktioniert bestrahlten Sphäroids	94
Abbildung 29	Western Blot Analysen zu EMT-Markern	95
Abbildung 30	Western Blot-Analysen zu Krebsstammzellmarkern (obere Abbildung) und zu EMT-Markern (untere Abbildung) bei fraktionierter Bestrahlung und Einsatz von Inhibitoren gegen AKT und ERK	96
Abbildung 31	Modell zur Inaktivierung von GSK3 β unter Bestrahlung durch Aktivierung der Moleküle AKT, ERK und p38	100
Abbildung 32	Mechanistisches Modell bei HNSCC ohne Bestrahlung	105
Abbildung 33	Mechanistisches Modell bei HNSCC unter Bestrahlung	106

6.4. Literaturverzeichnis

Affolter, A., K. Fruth, C. Brochhausen, I. Schmidtmann, W. J. Mann and J. Brieger (2011). "Activation of mitogen-activated protein kinase extracellular signal-related kinase in head and neck squamous cell carcinomas after irradiation as part of a rescue mechanism." Head Neck **33**(10): 1448-1457.

Aksamitiene, E., A. Kiyatkin and B. N. Kholodenko (2012). "Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance." Biochem Soc Trans **40**(1): 139-146.

Allegra, E. and S. Trapasso (2012). "Cancer stem cells in head and neck cancer." Onco Targets Ther **5**: 375-383.

Amornphimoltham, P., V. Patel, A. Sodhi, N. G. Nikitakis, J. J. Sauk, E. A. Sausville, A. A. Molinolo and J. S. Gutkind (2005). "Mammalian target of rapamycin, a molecular target in squamous cell carcinomas of the head and neck." Cancer Res **65**(21): 9953-9961.

Ang, K. K., J. Harris, R. Wheeler, R. Weber, D. I. Rosenthal, P. F. Nguyen-Tan, W. H. Westra, C. H. Chung, R. C. Jordan, C. Lu, H. Kim, R. Axelrod, C. C. Silverman, K. P. Redmond and M. L. Gillison (2010). "Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer." N Engl J Med **363**(1): 24-35.

Argiris, A., M. V. Karamouzis, D. Raben and R. L. Ferris (2008). "Head and neck cancer." The Lancet **371**(9625): 1695-1709.

Bates, R. C., N. S. Edwards and J. D. Yates (2000). "Spheroids and cell survival." Crit Rev Oncol Hematol **36**(2-3): 61-74.

Birchmeier, W. and J. Behrens (1994). "Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness." Biochim Biophys Acta **1198**(1): 11-26.

Bjordal, K., M. Ahlner-Elmqvist, E. Hammerlid, M. Boysen, J. F. Evensen, A. Björklund, M. Jannert, T. Westin and S. Kaasa (2001). "A Prospective Study of Quality of Life in Head and Neck Cancer Patients. Part II: Longitudinal Data." Laryngoscope **111**(8): 1440-1452.

Blanchard, P., B. Baujat, V. Holostenco, A. Bourredjem, C. Baey, J. Bourhis, J. P. Pignon and M.-C. C. group (2011). "Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): a comprehensive analysis by tumour site." Radiother Oncol **100**(1): 33-40.

Bonner, J. A., P. M. Harari, J. Giralt, N. Azarnia, D. M. Shin, R. B. Cohen, C. U. Jones, R. Sur, D. Raben, J. Jassem, R. Ove, M. S. Kies, J. Baselga, H. Youssoufian, N. Amellal, E. K. Rowinsky and K. K. Ang (2006). "Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck." N Engl J Med **354**(6): 567-578.

Bonnet, D. and J. E. Dick (1997). "Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell." Nat Med **3**(7): 730-737.

Bose, P., N. T. Brockton and J. C. Dort (2013). "Head and neck cancer: from anatomy to biology." Int J Cancer **133**(9): 2013-2023.

Bouchard, G., G. Bouvette, H. Therriault, R. Bujold, C. Saucier and B. Paquette (2013). "Pre-irradiation of mouse mammary gland stimulates cancer cell migration and development of lung metastases." Br J Cancer **109**(7): 1829-1838.

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.

Cam, M., H. K. Bid, L. Xiao, G. P. Zambetti, P. J. Houghton and H. Cam (2014). "p53/TAp63 and AKT Regulate Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 (mTORC1) Signaling through Two Independent Parallel Pathways in the Presence of DNA Damage." J Biol Chem **289**(7): 4083-4094.

Chen, J., J. Zhou, J. Lu, H. Xiong, X. Shi and L. Gong (2014). "Significance of CD44 expression in head and neck cancer: a systemic review and meta-analysis." BMC Cancer **14**(15).

Chen, P., H. Xie, M. C. Sekar, K. Gupta and A. Wells (1994). "Epidermal Growth Factor Receptor-mediated Cell Motility: Phospholipase C Activity Is Required, but Mitogen-activated Protein Kinase Activity Is Not Sufficient for Induced Cell Movement." J Cell Biol **127**(3): 847-857.

Clay, M. R., M. Tabor, J. H. Owen, T. E. Carey, C. R. Bradford, G. T. Wolf, M. S. Wicha and M. E. Prince (2010). "Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase." Head Neck **32**(9): 1195-1201.

Clayton, A. H., F. Walker, S. G. Orchard, C. Henderson, D. Fuchs, J. Rothacker, E. C. Nice and A. W. Burgess (2005). "Ligand-induced dimer-tetramer transition during the activation of the cell surface epidermal growth factor receptor-A multidimensional microscopy analysis." J Biol Chem **280**(34): 30392-30399.

Cross, D. A., D. R. Alessi, P. Cohen, M. Andjelkovich and B. A. Hemmings (1995). "Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B." Nature **378**(6559): 785-789.

Dent P., A. Yacoub, J. Contessa, R. Caron, G. Amorino, K. Valerie, M. P. Hagan, S. Grant and R. Schmidt-Ullrich (2003). "Stress and radiation-induced activation of multiple intracellular signaling pathways." Radiat Res **159**(3): 283-300.

Deschenes-Simard, X., F. Kottakis, S. Meloche and G. Ferbeyre (2014). "ERKs in cancer: friends or foes?" Cancer Res **74**(2): 412-419.

Dewey, W. C., C. C. Ling and R. E. Meyn (1995). "Radiation-induced apoptosis: relevance to radiotherapy." Int J Radiat Oncol Biol Phys **33**(4): 781-796.

Dhillon, A. S., S. Hagan, O. Rath and W. Kolch (2007). "MAP kinase signalling pathways in cancer." Oncogene **26**(22): 3279-3290.

Ding, Q., W. Xia, J. C. Liu, J. Y. Yang, D. F. Lee, J. Xia, G. Bartholomeusz, Y. Li, Y. Pan, Z. Li, R. C. Bargou, J. Qin, C. C. Lai, F. J. Tsai, C. H. Tsai and M. C. Hung (2005). "Erk associates with and primes GSK-3 β for its inactivation resulting in upregulation of beta-catenin." Mol Cell **19**(2): 159-170.

Döbrossy, L. (2005). "Epidemiology of head and neck cancer: Magnitude of the problem." Cancer Metastasis Rev **24**(1): 9-17.

D'Souza G., A. R. Kreimer, R. Viscidi, M. Pawlita, C. Fakhry, W. M. Koch, W. H. Westra, and M. L. Gillison (2007). "Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer." N Engl J Med **356**(19): 1944-1956.

Dutta, P. R. and A. Maity (2007). "Cellular responses to EGFR inhibitors and their relevance to cancer therapy." Cancer Lett. **2007**(254): 165-177.

Embi, N., D. B. Rylatt and P. Cohen (1980). "Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase." Eur J Biochem **107**(2): 519-527.

Eyler, C. E., W. C. Foo, K. M. LaFiura, R. E. McLendon, A. B. Hjelmeland and J. N. Rich (2008). "Brain cancer stem cells display preferential sensitivity to Akt inhibition." Stem Cells **26**(12): 3027-3036.

Faber, A., C. Barth, K. Hoermann, S. Kassner, J. D. Schultz, U. Sommer, J. Stern-Straeter, C. Thorn and U. R. Goessler (2011). "CD44 as a stem cell marker in head and neck squamous cell carcinoma." Oncol Rep **26**(2): 321-326.

Ferlay, J., H. R. Shin, F. Bray, D. Forman, C. Mathers and D. M. Parkin (2010). "Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008." Int J Cancer **127**(12): 2893-2917.

Forde, J. E. and T. C. Dale (2007). "Glycogen synthase kinase 3: a key regulator of cellular fate." Cell Mol Life Sci **64**(15): 1930-1944.

Frame, S. and P. Cohen (2001). "GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery." Biochem J **359**: 1-16.

Freudlsperger, C., J. R. Burnett, J. A. Friedman, V. R. Kannabiran, Z. Chen and C. Van Waes (2011). "EGFR-PI3K-AKT-mTOR signaling in head and neck squamous cell carcinomas: attractive targets for molecular-oriented therapy." Expert Opin Ther Targets **15**(1): 63-74.

Gangemi, R. M., F. Griffero, D. Marubbi, M. Perera, M. C. Capra, P. Malatesta, G. L. Ravetti, G. L. Zona, A. Daga and G. Corte (2009). "SOX2 Silencing in Glioblastoma Tumor-Initiating Cells Causes Stop of Proliferation and Loss of Tumorigenicity." Stem Cells **27**(1): 40-48.

Gao, W., J. Z. Li, J. Y. Chan, W. K. Ho and T. S. Wong (2012). "mTOR Pathway and mTOR Inhibitors in Head and Neck Cancer." ISRN Otolaryngol **2012**: 953089.

Gillison, M. L. and K. V. Shah (2001). "Human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma: mounting evidence for an etiologic role for human papillomavirus in a subset of head and neck cancers." Curr Opin Oncol **13**(3): 183-188.

Grandis, J. R. and D. J. Tweardy (1993). "Elevated Levels of Transforming Growth Factor α and Epidermal Growth Factor Receptor Messenger RNA Are Early Markers of Carcinogenesis in Head and Neck Cancer." Cancer Res **53**(15): 3579-3584.

Gregoire, V., J. L. Lefebvre, L. Licitra, E. Felip and E.-E.-E. G. W. Group (2010). "Squamous cell carcinoma of the head and neck: EHNS-ESMO-ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up." Ann Oncol **21 Suppl 5**: v184-186.

Hammarstedt, L., D. Lindquist, H. Dahlstrand, M. Romanitan, L. O. Dahlgren, J. Joneberg, N. Creson, J. Lindholm, W. Ye, T. Dalianis and E. Munck-Wikland (2006). "Human papillomavirus as a risk factor for the increase in incidence of tonsillar cancer." Int J Cancer **119**(11): 2620-2623.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer " Cell **100**(1): 57-70.

Hay, N. and N. Sonenberg (2004). "Upstream and downstream of mTOR." Genes Dev **18**(16): 1926-1945.

Howell, G. M. and J. R. Grandis (2005). "Molecular mediators of metastasis in head and neck squamous cell carcinoma." Head Neck **27**(8): 710-717.

Huang, C., K. Jacobson and M. D. Schaller (2004). "MAP kinases and cell migration." J Cell Sci **117**(Pt 20): 4619-4628.

Huang, S. M. and P. M. Harari (2000). "Modulation of radiation response after epidermal growth factor receptor blockade in squamous cell carcinomas: inhibition of damage repair, cell cycle kinetics, and tumor angiogenesis." Clin Cancer Res **6**(6): 2166-2174.

Huang, S. M., J. Li, E. A. Armstrong and P. M. Harari (2002). "Modulation of radiation response and tumor-induced angiogenesis after epidermal growth factor receptor inhibition by ZD1839 (Iressa)." Cancer Res **62**(15): 4300–4306.

Iwai, S., A. Yonekawa, C. Harada, M. Hamada, W. Katagiri, M. Nakazawa and Y. Yura (2010). "Involvement of the Wnt- β -catenin pathway in invasion and migration of oral squamous carcinoma cells." Int J Oncol **37**(5): 1095-1103.

Jacinto, E., V. Facchinetti, D. Liu, N. Soto, S. Wei, S. Y. Jung, Q. Huang, J. Qin and B. Su (2006). "SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity." Cell **127**(1): 125-137.

Jemal, A., F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward and D. Forman (2011). "Global cancer statistics." CA Cancer J Clin **61**(2): 69-90.

Katafiasz, D., L. M. Smith and J. K. Wahl 3rd (2011). "Slug (SNAI2) expression in oral SCC cells results in altered cell-cell adhesion and increased motility." Cell Adh Migr **5**(4): 315-322.

Kim, D., O. Rath, W. Kolch and K. H. Cho (2007). "A hidden oncogenic positive feedback loop caused by crosstalk between Wnt and ERK pathways." Oncogene **26**(31): 4571-4579.

Kim, E. K. and E. J. Choi (2010). "Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases." Biochim Biophys Acta **1802**(4): 396-405.

Klaus, A. and W. Birchmeier (2008). "Wnt signalling and its impact on development and cancer." Nat Rev Cancer **8**(5): 387-398.

Kundu, S. K. and M. Nestor (2012). "Targeted therapy in head and neck cancer." Tumour Biol **33**(3): 707-721.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.

Lamouille, S., J. Xu and R. Derynck (2014). "Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition." Nat Rev Mol Cell Biol **15**(3): 178-196.

Lavaf, A., E. M. Genden, J. A. Cesaretti, S. Packer and J. Kao (2008). "Adjuvant radiotherapy improves overall survival for patients with lymph node-positive head and neck squamous cell carcinoma." Cancer **112**(3): 535-543.

Lee, J. M., S. Dedhar, R. Kalluri and E. W. Thompson (2006). "The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease." J Cell Biol **172**(7): 973-981.

Lee, S. H., S. Y. Oh, S. I. Do, H. J. Lee, H. J. Kang, Y. S. Rho, W. J. Bae and Y. C. Lim (2014). "SOX2 regulates self-renewal and tumorigenicity of stem-like cells of head and neck squamous cell carcinoma." Br J Cancer **111**(11): 2122-2130.

Leemans, C. R., B. J. Braakhuis and R. H. Brakenhoff (2011). "The molecular biology of head and neck cancer." Nat Rev Cancer **11**(1): 9-22.

Lehnerdt, G., T. K. Hoffmann, S. Mattheis, S. Brandau, R. Zeidler and S. Lang (2010). "[Diagnostic and prognostic biomarkers in head and neck squamous cell carcinoma]." HNO **58**(7): 713-723; quiz 724-712.

Lemmon, M. A. and J. Schlessinger (2010). "Cell signaling by receptor tyrosine kinases." Cell **141**(7): 1117-1134.

Lewin, F., S. E. Norell, H. Johansson, P. Gustavsson, J. Wennerberg, A. Biörklund and L. E. Rutqvist (1998). "Smoking tobacco, oral snuff, and alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. a population-based case-referent study in sweden." Cancer **82**(7): 1367-1375.

Licitra, L., E. Felip and E. G. W. Group (2009). "Squamous cell carcinoma of the head and neck: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up." Ann Oncol **20 Suppl 4**: 121-122.

Lin, C. J., J. R. Grandis, T. E. Carey, S. M. Gollin, T. L. Whiteside, W. M. Koch, R. L. Ferris and S. Y. Lai (2007). "Head and neck squamous cell carcinoma cell lines: Established models and rationale for selection." Head Neck **29**(2): 163-188.

Liu, P., W. Gan, H. Inuzuka, A. S. Lazorchak, D. Gao, O. Arojo, D. Liu, L. Wan, B. Zhai, Y. Yu, M. Yuan, B. M. Kim, S. Shaik, S. Menon, S. P. Gygi, T. H. Lee, J. M. Asara, B. D. Manning, J. Blenis, B. Su and W. Wei (2013). "Sin1 phosphorylation impairs mTORC2 complex integrity and inhibits downstream Akt signalling to suppress tumorigenesis." Nat Cell Biol **15**(11): 1340-1350.

Lu, Z., G. Jiang, P. Blume-Jensen and T. Hunter (2001). "Epidermal growth factor-induced tumor cell invasion and metastasis initiated by dephosphorylation and downregulation of focal adhesion kinase." Mol Cell Biol **21**(12): 4016-4031.

Ma, X. M. and J. Blenis (2009). "Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(5): 307-318.

Magnuson, B., B. Ekim and D. C. Fingar (2012). "Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks." Biochem J **441**(1): 1-21.

Mandal, M., J. N. Myers, S. M. Lippman, F. M. Johnson, M. D. Williams, S. Rayala, K. Ohshiro, D. I. Rosenthal, R. S. Weber, G. E. Gallick and A. K. El-Naggar (2008). "Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous carcinoma: association of Src activation with E-cadherin down-regulation, vimentin expression, and aggressive tumor features." Cancer **112**(9): 2088-2100.

Mani, S. A., W. Guo, M. J. Liao, E. N. Eaton, A. Ayyanan, A. Y. Zhou, M. Brooks, F. Reinhard, C. C. Zhang, M. Shipitsin, L. L. Campbell, K. Polyak, C. Brisken, J. Yang and R. A. Weinberg (2008). "The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells." Cell **133**(4): 704-715.

Manning, B. D. and L. C. Cantley (2007). "AKT/PKB signaling: navigating downstream." Cell **129**(7): 1261-1274.

McCrea, P. D., C. W. Turck and B. Gumbiner (1991). "A homolog of the armadillo protein in *Drosophila* (plakoglobin) associated with E-cadherin." Science **254**(5036): 1359-1361.

Mishra, R. (2010). "Glycogen synthase kinase 3 beta: can it be a target for oral cancer." Mol Cancer **9**: 144.

Normanno, N., A. De Luca, C. Bianco, L. Strizzi, M. Mancino, M. R. Maiello, A. Carotenuto, G. De Feo, F. Caponigro and D. S. Salomon (2006). "Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer." Gene **366**(1): 2-16.

Peinado, H., D. Olmeda and A. Cano (2007). "Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?" Nat Rev Cancer **7**(6): 415-428.

Peinado, H., F. Portillo and A. Cano (2004). "Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis." Int J Dev Biol **48**(5-6): 365-375.

Pernas, F. G., C. T. Allen, M. E. Winters, B. Yan, J. Friedman, B. Dabir, K. Saigal, G. S. Munding, X. Xu, J. C. Morris, K. R. Calvo, C. Van Waes and Z. Chen (2009). "Proteomic signatures of epidermal growth factor receptor and survival signal pathways correspond to gefitinib sensitivity in head and neck cancer." Clin Cancer Res **15**(7): 2361-2372.

Petit, A. M., J. Rak, M. C. Hung, P. Rockwell, N. Goldstein, B. Fendly and R. S. Kerbel (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." AmJ Pathol **151**(6): 1523-1530.

Pezzuto, F., L. Buonaguro, F. Caponigro, F. Ionna, N. Starita, C. Annunziata, F. M. Buonaguro and M. L. Tornesello (2015). "Update on Head and Neck Cancer: Current Knowledge on Epidemiology, Risk Factors, Molecular Features and Novel Therapies." Oncology **89**(3): 125-136.

Pickhard, A. C., J. Margraf, A. Knopf, T. Stark, G. Piontek, C. Beck, A. L. Boulesteix, E. Q. Scherer, S. Pigorsch, J. Schlegel, W. Arnold and R. Reiter (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.

Prabhu, R. S., S. Hanasoge, K. R. Magliocca, W. A. Hall, S. A. Chen, K. A. Higgins, N. F. Saba, M. El-Deiry, W. Grist, J. T. Wadsworth, A. Y. Chen and J. J. Beitler (2015). "Lymph node ratio influence on risk of head and neck cancer locoregional recurrence after initial surgical resection: implications for adjuvant therapy." Head Neck **37**(6): 777-782.

Prince, M. E. and L. E. Ailles (2008). "Cancer stem cells in head and neck squamous cell cancer." J Clin Oncol **26**(17): 2871-2875.

Prince, M. E., R. Sivanandan, A. Kaczorowski, G. T. Wolf, M. J. Kaplan, P. Dalerba, I. L. Weissman, M. F. Clarke and L. E. Ailles (2007). "Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(3): 973-978.

Radford, I.R. (1985). "The level of induced DNA double-strand breakage correlates with cell killing after X-irradiation." Int J of Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med **48**(1): 45-54.

Radisky, D. C. and M. A. LaBarge (2008). "Epithelial-mesenchymal transition and the stem cell phenotype." Cell Stem Cell **2**(6): 511-512.

Raingeaud, J., S. Gupta, J. S. Rogers, M. Dickens, J. Han, R. J. Ulevitch and R. J. Davis (1995). "Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine." J Biol Chem **270**(13): 7420-7426.

Rappl, A., G. Piontek and J. Schlegel (2008). "EGFR-dependent migration of glial cells is mediated by reorganisation of N-cadherin." J Cell Sci **121**(Pt 24): 4089-4097.

Reisz, J. A., N. Bansal, J. Qian, W. Zhao and C. M. Furdai (2014). "Effects of ionizing radiation on biological molecules--mechanisms of damage and emerging methods of detection." Antioxid Redox Signal **21**(2): 260-292.

Reiter, R., P. Gais, U. Jutting, M. K. Steuer-Vogt, A. Pickhard, K. Bink, S. Rauser, S. Lassmann, H. Hofler, M. Werner and A. Walch (2006). "Aurora kinase A messenger RNA overexpression is correlated with tumor progression and shortened survival in head and neck squamous cell carcinoma." Clin Cancer Res **12**(17): 5136-5141.

Reya, T., S. J. Morrison, M. F. Clarke and I. L. Weissman (2001). "Stem cells, cancer, and cancer stem cells." Nature **414**(6859): 105-111.

Robert-Koch-Institut (2013). Krebs in Deutschland 2009/2010. Robert Koch Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.) **9. Ausgabe, 2013.**

Rodriguez, L. G., X. Wu and J. L. Guan (2005). "Wound-healing assay." Methods Mol Biol. **294**: 23-29.

Rothenberg, S. M. and L. W. Ellisen (2012). "The molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma." J Clin Invest **122**(6): 1951-1957.

Rousseau, S., F. Houle, J. Landry and J. Huot (1997). "p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells." Oncogene **15**(18): 2169-2177.

Sabatini, D. M., H. Erdjument-Bromage, M. Lui, P. Tempst and S. H. Snyder (1994). "RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs." Cell **78**(1): 35-43.

Sarbassov, D. D., D. A. Guertin, S. M. Ali and D. M. Sabatini (2005). "Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex." Science **307**(5712): 1098-1101.

Scheel, C., T. Onder, A. Karnoub and R. A. Weinberg (2007). "Adaptation versus selection: the origins of metastatic behavior." Cancer Res **67**(24): 11476-11479; discussion 11479-11480.

Schiefler, C., G. Piontek, J. Doescher, D. Schuettler, M. Mißlbeck, M. Rudelius, A. Haug, R. Reiter, G. Brockhoff and A. Pickhard (2014). "Inhibition of SphK1 reduces radiation-induced migration and enhances sensitivity to cetuximab treatment by affecting the EGFR/SphK1 crosstalk." Oncotarget **5**(20): 9877-9888.

Schipper, J. H., U. H. Frixen, J. Behrens, A. Unger, K. Jahnke and W. Birchmeier (1991). "E-Cadherin Expression in Squamous Cell Carcinomas of Head and Neck: Inverse Correlation with Tumor Dedifferentiation and Lymph Node Metastasis." Cancer Res **51**(23 Pt 1): 6328-6337.

Schmidt-Ullrich, R. K., R. B. Mikkelsen, P. Dent, D. G. Todd, K. Valerie, B. Kavanagh, J. N. Contessa, W. K. Rorrer and P. B. Chen (1997). "Radiation-induced proliferation of the human A431 squamous carcinoma cells is dependent on EGFR tyrosine phosphorylation." Oncogene **15**(10): 1191-1197.

Schmidt-Ullrich, R. K., K. Valerie, P. B. Fogleman and J. Walters (1996). "Radiation-Induced Autophosphorylation of Epidermal Growth Factor Receptor in Human Malignant Mammary and Squamous Epithelial Cells." Radiat Res **145**(1): 81.

Shaw, R. J. and L. C. Cantley (2006). "Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth." Nature **441**(7092): 424-430.

Smalley, K. S. M., P. Brafford, N. K. Haass, J. M. Brandner, E. Brown and M. Herlyn (2005). "Up-regulated expression of zonula occludens protein-1 in human melanoma associates with N-cadherin and contributes to invasion and adhesion." Am J Pathol **166**(5): 1541-1554.

Stebbing, J., A. Filipovic and G. Giamas (2013). "Claudin-1 as a promoter of EMT in hepatocellular carcinoma." Oncogene **32**(41): 4871-4872.

Strojan, P., J. Corry, A. Eisbruch, J. B. Vermorken, W. M. Mendenhall, A. W. Lee, M. Haigentz, Jr., J. J. Beitler, R. de Bree, R. P. Takes, V. Paleri, C. G. Kelly, E. M. Genden, C. R. Bradford, L. B. Harrison, A. Rinaldo and A. Ferlito (2015). "Recurrent and second primary squamous cell carcinoma of the head and neck: When and how to reirradiate." Head Neck **37**(1): 124-150

Sturgis, E. M. and P. M. Cinciripini (2007). "Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: an emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers?" Cancer **110**(7): 1429-1435.

Sun, T., M. Rodriguez and L. Kim (2009). "Glycogen synthase kinase 3 in the world of cell migration." Dev Growth Differ **51**(9): 735-742.

Takahashi-Yanaga, F. and T. Sasaguri (2008). "GSK-3beta regulates cyclin D1 expression: a new target for chemotherapy." Cell Signal **20**(4): 581-589.

Thiery, J. P. (2003). "Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies." Curr Opin Cell Biol **15**(6): 740-746.

Thiery, J. P., H. Acloque, R. Y. Huang and M. A. Nieto (2009). "Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease." Cell **139**(5): 871-890.

Thornton, T. M., G. Pedraza-Alva, B. Deng, C. D. Wood, A. Aronshtam, J. L. Clements, G. Sabio, R. J. Davis, D. E. Matthews, B. Doble and M. Rincon (2008). "Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3beta inactivation." Science **320**(5876): 667-670.

Tovey, E. R. and B. A. Baldo (1989). "Protein binding to nitrocellulose, nylon and PVDF membranes in immunoassays and electroblotting." J Biochem Biophys Methods **19**(2-3): 169-184.

Tovosia, S., P. H. Chen, A. M. Ko, H. P. Tu, P. C. Tsai and Y. C. Ko (2007). "Prevalence and associated factors of betel quid use in the Solomon Islands: a hyperendemic area for oral and pharyngeal cancer." Am J Trop Med Hyg **77**(3): 586-590.

Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci USA **76**(9): 4350-4354.

Uchikado, Y., S. Natsugoe, H. Okumura, T. Setoyama, M. Matsumoto, S. Ishigami and T. Aikou (2005). "Slug Expression in the E-cadherin preserved tumors is related to prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma." Clin Cancer Res **11**(3): 1174-1180.

Upile, T., W. Jerjes, M. Al-Khawalde, H. Radhi and H. Sudhoff (2012). "Oral sex, cancer and death: sexually transmitted cancers." Head Neck Oncol **4**: 31.

Valerie, K., A. Yacoub, M. P. Hagan, D. T. Curiel, P. B. Fisher, S. Grant and P. Dent (2007). "Radiation-induced cell signaling: inside-out and outside-in." Mol Cancer Ther **6**(3): 789-801.

van den Beuken-van Everdingen, M. H., J. M. de Rijke, A. G. Kessels, H. C. Schouten, M. van Kleef and J. Patijn (2007). "Prevalence of pain in patients with cancer: a systematic review of the past 40 years." Ann Oncol **18**(9): 1437-1449.

Ventelä, S., E. Sittig, L. Mannermaa, J.-A. Mäkelä, J. Kulmala, E. Löyttyniemi, L. Strauss, O. Carpen, J. Toppari, R. Grenman and J. Westermarck (2015). "CIP2A is an Oct4 target gene involved in head and neck squamous cell cancer oncogenicity and radioresistance." Oncotarget **6**(1): 144-158.

Vermorcken, J. B., R. Mesia, F. Rivera, E. Remenar, A. Kawecki, S. Rottey, J. Erfan, D. Zabolotnyy, H. R. Kienzer, D. Cupissol, F. Peyrade, M. Benasso, I. Vynnychenko, D. De Raucourt, C. Bokemeyer, A. Schueler, N. Amellal and R. Hitt (2008). "Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer." N Engl J Med **359**(11): 1116-1127.

Vermorcken, J. B. and P. Specenier (2010). "Optimal treatment for recurrent/metastatic head and neck cancer." Ann Oncol **21 Suppl 7**: vii252-261.

Wang, D., P. Lu, H. Zhang, M. Luo, X. Zhang, X. Wei, J. Gao, Z. Zhao and C. Liu (2014). "Oct-4 and Nanog promote the epithelial-mesenchymal transition of breast cancer stem cells and are associated with poor prognosis in breast cancer patients." Oncotarget **5**(21): 10803-10815.

Wang, X. and C. G. Proud (2006). "The mTOR pathway in the control of protein synthesis." Physiology (Bethesda) **21**: 362-369.

Wild-Bode, C., M. Weller, A. Rimner, J. Dichgans and W. Wick (2001). "Sublethal irradiation promotes migration and invasiveness of glioma cells: implications for radiotherapy of human glioblastoma." Cancer Res **61**(6): 2744-2750.

Wittekind, C. and H.-J. Meyer (2010). TNM Klassifikation maligner Tumoren. Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Woodgett, J. R. (1990). "Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A." EMBO J **9**(8): 2431-2438.

Wu, X., M. Rubin, Z. Fan, T. DeBlasio, T. Soos, A. Koff and J. Mendelsohn (1996). "Involvement of p27KIP1 in G1 arrest mediated by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody." Oncogene **12**(7): 1397-1403.

Wullschleger, S., R. Loewith and M. N. Hall (2006). "TOR signaling in growth and metabolism." Cell **124**(3): 471-484.

Xiang, R., D. Liao, T. Cheng, H. Zhou, Q. Shi, T. S. Chuang, D. Markowitz, R. A. Reisfeld and Y. Luo (2011). "Downregulation of transcription factor SOX2 in cancer stem cells suppresses growth and metastasis of lung cancer." Br J Cancer **104**(9): 1410-1417.

Yano, H., Y. Mazaki, K. Kurokawa, S. K. Hanks, M. Matsuda and H. Sabe (2004). "Roles played by a subset of integrin signaling molecules in cadherin-based cell-cell adhesion." J Cell Biol **166**(2): 283-295.

Yilmaz, M. and G. Christofori (2009). "EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion." Cancer Metastasis Rev **28**(1-2): 15-33.

Zaytseva, Y. Y., J. D. Valentino, P. Gulhati and B. M. Evers (2012). "mTOR inhibitors in cancer therapy." Cancer Lett **319**(1): 1-7.

Zoller, M. (2011). "CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule?" Nat Rev Cancer **11**(4): 254-267.