

Technische Universität München
Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
Klinikum rechts der Isar

Mechanismen der Resistenzentwicklung auf zielgerichtete Therapie und Chemotherapie in
Kopf-Hals-Tumorzellen

Dominik Andreas Helmut Otto Schulz

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

Vorsitzender: Prof. Dr. Wolfgang Weber

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Anja Pickhard
2. Prof. Dr. Gabriele Multhoff

Die Dissertation wurde am 09.03.2021 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 08.06.2021 angenommen.

Meiner Familie.

Hinweis: Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden 2016 zur Veröffentlichung im American Journal of Cancer Research angenommen (Schulz et al., 2016). Eine weitere Publikation steht zur Veröffentlichung aus.

Inhaltsverzeichnis

1. Verzeichnis der Abkürzungen	1
2. Einleitung	3
2.1 Tumore des Kopf-Hals Bereichs	4
2.1.1 Therapie bei Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs	4
2.1.2 Pathogenese des Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinoms	5
2.1.3 Molekularbiologie des Kopf-Hals-Tumors	6
2.1.4 EGFR-Signalweg.....	7
2.1.5 PI3K-AKT-mTOR Signalweg	9
2.2 Mechanismen der Resistenz	9
2.2.1 Stress induzierte genetische Veränderung	12
2.2.2 APOBEC Familie	13
2.2.3 Interleukin-6 und Krebs.....	14
2.2.4 Zellkultur als Modell der Resistenzentwicklung.....	15
2.3 Auswahl der Zelllinien und Therapeutika.....	16
2.3.1 EGFR Inhibitor Afatinib	17
2.3.2 AKT Inhibitor MK-2206	18
2.3.3 PI3K-MTOR Inhibitor BEZ235.....	18
2.3.4 PARP-Inbihitor Olaparib	18
2.3.5 Cisplatin	19
2.4 Krebsstammzellkonzept	19
2.5 Therapie mit α -Strahlern	21
2.6 Zielsetzung der Arbeit	21
3. Material und Methoden.....	22
3.1 Material.....	22
3.1.1 Geräte	22
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	23
3.1.3 Reagenzien und Chemikalien.....	24
3.1.4 Medien und Supplemente.....	26
3.1.5 Inhibitoren.....	26

3.1.6 Kits	26
3.1.7 Gemische	27
3.1.8 Computerprogramme	28
3.1.9 PCR Primer	28
3.1.10 Primärantikörper	30
3.2 Methoden.....	31
3.2.1 Zellkultur.....	31
3.2.3 Kristallviolettassay	32
3.2.4 Klonogener Assay	32
3.2.5 Bestimmung der IC ₅₀ Konzentrationen.....	32
3.2.6 Züchtung der resistenten Zellen	33
3.2.7 Bestimmung der Proliferationsgeschwindigkeit.....	33
3.2.8 Behandlung mit γ -Strahlung	33
3.2.9 Behandlung mit α -Strahlung	33
3.2.10 Kombinationsversuche	34
3.2.11 Expression auf RNA-Ebene.....	34
3.2.12 Expression aus Proteinebene.....	36
3.2.13 Signaling Arrays	38
3.2.14 Random Mutation Capture Assay	39
3.2.15 Mechanismus der genetischen Veränderung.....	42
4. Ergebnisse	44
4.1 Bestimmung der IC ₅₀ Werte.....	44
4.2 Entwicklung der resistenten Zellen.....	46
4.3 Langsamere Proliferation resistenter Zellen	47
4.4 Morphologische Veränderungen nach Langzeitbehandlung.....	47
4.5 Sensibilität resistenter Zellen auf Röntgenstrahlung.....	48
4.6 Resistenz gegen α -Strahler von mit Cisplatin und Afatinib langzeitbehandelte Zellen.....	49
4.7 Kreuzresistenz bei gegen EGFR-Signalweginhibitoren resistenter Zellen, Multiresistenz bei gegen DNA-schädigende Substanzen resistenter Zellen.....	53
4.8 Heterogene Änderung in untersuchter Proteinexpression	56

4.9 Aktivierung des ERK 1/2 Signalwegs in resistenten Klonen	60
4.10 Heterogene Änderungen in Stammzellmarkerexpression.....	60
4.11 Hypermutation des Genoms resistenter Zellen.....	62
4.12 Mechanismen der genetischen Veränderung	64
4.12.1 Herunterregulation der mit DNA Replikation assoziierten Gene im RNA Microarray	64
4.12.2 Hochregulation von APOBEC3B und Polymerase α auf mRNA Ebene	65
4.12.3 Hochregulation von IL-6 und IL-20 RB auf mRNA Ebene	68
4.12.4 MEK 1/2 abhängige Hochregulation von Polymerase α und APOBEC3B auf Proteinebene.....	70
4.12.5 Signifikante Reduktion der Mutationsfrequenz bei Kostimulation mit MEK 1/2 Inhibitor	71
5. Diskussion.....	72
6. Zusammenfassung und Ausblick.....	81
7. Anhang.....	83
7.1 Danksagung.....	83
7.2 Tabellenverzeichnis	84
7.3 Abbildungsverzeichnis	85
7.4 Literaturverzeichnis.....	87
7.5 Veröffentlichung	102

1. Verzeichnis der Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
%	Prozent
°C	Grad Celsius
<, >	kleiner, größer
≤, ≥	kleiner gleich, größer gleich
Aqua dest	Destilliertes Wasser
AKT	Proteinkinase B
BSA	Bovine Serum Albumin
BCL-2	B-cell lymphoma 2
bcr-abl	breakpoint cluster region - Abelson murine leukemia viral oncogene homolog
cm	Zentimeter
CML	Chronisch myelotische Leukämie
DNA	Deoxyribonucleic acid
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FCS	fetal calf serum
FDA	Food and Drug Administration
Gy	Gray
HT	Hypoxanthin- Thymidin
HAT	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin
HIV	Human immunodeficiency virus
HPRT	Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase
HPV	Humanes Papillomavirus
kV	Kilovolt
mA	Milliampere
MET	Hepatocyte growth factor receptor
mg	Milligramm

ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
mTOR	mammalian target of Rapamycin
MÜ	Mittleres Überleben
MYBL2	Myb-verwandtes Protein B
Nanog	Homeobox protein Nanog
NSCLC	Non small cell lung cancer
Oct1	Organic cation transporter 1
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RB	Retinoblastom Protein
rpm	Revolutions per minute
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SMAD	SMA (small worm phenotype) und MAD (mothers against decapentaplegic)
Sox2	Sex determining region Y-box 2
TU	Technische Universität
6-TG	6-Thioguanin
TGF- β	Transforming growth factor beta
U	Units
UICC	International Union against Cancer
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter

2. Einleitung

Imatinib hat die Therapie der chronisch myelotischen Leukämie revolutioniert (Michael D. Lemonick, 2001). Der überragende Erfolg im *mittleren Überleben* (MÜ) im Vergleich mit der bis dato verwendeten Standardtherapie aus Interferon-Alpha/Cytarabin (O'Brien et al., 2003) hat zu zahlreichen Publikationen geführt, den Zweig der zielgerichteten Tumorthherapie mitbegründet und die Hoffnungen vieler Wissenschaftler beflügelt, dass nach Jahrzehnten intensiver Forschung der finale Durchbruch im Kampf gegen Krebs gemacht würde. Das Fusionsgen *breakpoint cluster region - Abelson murine leukemia viral oncogene homolog* (bcr-abl) wurde als krebsauslösender Mechanismus verstanden und dessen Proliferationsfunktion durch Imatinib unter minimalen Nebenwirkungen blockiert (Druker et al., 2001).

Während die genetischen Veränderungen und somit Treibermutationen vieler Krebsarten bekannt sind (Stratton, Campbell, & Futreal, 2009), bereits mehr als 180 new molecular entitis zur zielgerichteten Krebstherapie durch die *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen wurden und in dieser Dekade pro Jahr durchschnittlich 10 neue Medikamente die Neuzulassung erhielten (Kinch, 2014), konnte das MÜ bei der überwiegenden Zahl an Tumorarten bisher nur um wenige Monate gesteigert werden (Izar, Rotow, Gainor, Clark, & Chabner, 2013). So ergab eine Studie beim metastasierten Kopf-Hals-Karzinom bei Behandlung mit Cetuximab (Handelsname: Erbitux®) plus Chemotherapie gegenüber alleiniger Chemotherapie einen Vorteil im MÜ von 2,7 Monaten (Vermorken et al., 2008). Bei Behandlung des metastasierten Melanoms mit Vemurafenib gegenüber Dacarbazine betrug das Additiv im MÜ 4,3 Monate (Chapman et al., 2011). Eine Studie am nichtkleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) ergab einen MÜ-Vorteil von 2,9 Monaten bei Gabe von Gefitinib anstatt Cisplatin plus Docetaxel (Mitsudomi et al., 2010). In NSCLC blockiert Gefitinib spezifisch den Wachstumsrezeptor EGFR, welcher bei den Patienten durch verschiedene Mutationen konstitutiv aktiviert war.

Diese Studien belegen das hohe Potential der zielgerichteten Therapien, Gefitinib konnte das MÜ um annähernd 50% steigern, jedoch ist die Wirkung zeitlich begrenzt. Trotz der kontinuierlichen Gabe von Gefitinib bildeten sich Resistenzen aus und die Erkrankung schritt fort.

Die Resistenzmechanismen sind dabei oftmals weitestgehend bekannt. So findet sich bei 50% der mit Gefitinib behandelten Patienten die T790M Punktmutation und bei 25% eine *Hepatocyte growth factor receptor* (MET) Amplifikation (Suda, Onozato, Yatabe, &

Mitsudomi, 2009). Die T790M Mutation im *Epidermal growth factor receptor* (EGF-Rezeptor) verändert die Bindungstasche und führt dazu, dass Gefitinib nicht mehr binden kann.

Zeitlich begrenzte Wirkung und Resistenzentwicklung stellen ein Hauptproblem in der zielgerichteten Tumorthherapie dar. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Entwicklung und Therapie von Resistenzen am Beispiel der Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs besser zu verstehen.

2.1 Tumore des Kopf-Hals Bereichs

Die heterogene Gruppe der Kopf-Hals-Tumore besteht aus zahlreichen benignen und malignen Neoplasien und umschließt unter anderen Karzinom-, Sarkom- und Lymphomentitäten. Im allgemeinen klinisch-medizinischen Gebrauch, und so wird der Begriff auch in dieser Arbeit verwendet, ist mit Kopf-Hals-Tumor meist die mit über 90% häufigste Entität in diesem anatomischen Bereich (Sanderson & Ironside, 2002), namentlich das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle, Pharynx oder Larynx gemeint (Stenzinger, Kriegsmann, Kraywinkel, & Weichert, 2014). Diese Entität ist die sechsthäufigste solide Tumorart weltweit (Parkin, Bray, Ferlay, & Pisani, 2005). Rauchen und Alkoholkonsum sind mit 75% die wichtigsten ätiologischen Risikofaktoren (Curado & Boyle, 2013). Dabei ist Rauchen oft mit Larynxkarzinomen und Alkoholabusus mit Pharynxkarzinomen verbunden (Curado & Boyle, 2013). Die Inzidenz ist mit dem Alter steigend, der Altersgipfel liegt zwischen 55 und 65 Jahren (Stenzinger et al., 2014). In den letzten Jahren stark zunehmend ist die Inzidenz der Oropharynxkarzinome. Patienten mit dieser Entität sind in der Regel mit 40 bis 50 Jahren jünger und geben oft geringen bis fehlenden Rauch- und Alkoholkonsum an (Mehanna, Paleri, West, & Nutting, 2010). Hier ist das humane Papillomavirus (HPV), insbesondere HPV16, mit in den USA 60% positiven Fällen der führende Risikofaktor (Marur, D'Souza, Westra, & Forastiere, 2010). Eine Vielzahl von Hinweisen verdeutlichen, dass HPV positive Tumore höchstwahrscheinlich als eigene Entität unter den Kopf-Hals-Tumoren angesehen werden sollten (Gillison, 2004).

2.1.1 Therapie bei Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs

Die Therapie der Kopf-Hals-Tumore erfolgt Stadien gerecht mittels alleinig oder einer Kombination aus Operation, Chemo- und Strahlentherapie (Haddad & Shin, 2008). Patienten im Stadium I und II werden bevorzugt operiert (Bruce E Brockstein, 2016). An gut erreichbaren Stellen in Mundhöhle und Oropharynx können dabei auch Laser- oder robotergestützte Verfahren zum Einsatz kommen (Bruce E Brockstein, 2016). Bei fortgeschrittenen Tumoren kann postoperativ eine Radiotherapie ohne oder mit gleichzeitiger Chemotherapie empfohlen sein (Bruce E Brockstein, 2016). Die alleinige Radiotherapie ohne

Operation stellt eine gleichwertige Behandlungsoption für das frühe Stadium dar (Bruce E Brockstein, 2016). Insgesamt ist die Prognose im Stadium I und II mit einem 5-Jahres-Überleben von 70 bis 90% sehr gut (Bruce E Brockstein, 2016).

Rund zwei Drittel der Patienten präsentieren sich im Stadium III bis IV und haben ein hohes Lokalrezidiv- und Fernmetastasierungsrisiko (Bruce E Brockstein, 2016). Je nach Lokalisation, Fortschritt der Erkrankung, Risikofaktoren (Alter, Komorbiditäten) und Wunsch des Patienten setzt man hier Kombinationen aus Operation, Chemo- und Radiotherapie ein (Bruce E Brockstein, 2016). Die Entscheidung darüber wird in einem multidisziplinären Team getroffen (Bruce E Brockstein, 2016). Bei Verdacht auf eine Beteiligung der zervikalen Lymphknoten kann eine Neck Dissection, also die Ausräumung von Lymphknotenstation ein- oder beidseitig des Halses nötig sein (Bruce E Brockstein, 2016).

Eine definitive Radiochemotherapie ist im Stadium III und IV möglich (Bruce E Brockstein Everett E Vokes, 2016). Als Chemotherapeutikum werden beim Plattenepithelkarzinom des Kopf-Halses Platinverbindungen, Fluorouracil und Taxane eingesetzt (Bruce E Brockstein Everett E Vokes, 2016). Als zielgerichtete Therapie ist der EGFR-Antikörper Cetuximab zugelassen (Bruce E Brockstein Everett E Vokes, 2016).

2.1.2 Pathogenese des Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinoms

Im Allgemeinen handelt es sich bei Krebs um eine Akkumulation von genetischen, epigenetischen Veränderungen die dazu führen, dass Krebszellen eine anhaltend erhöhte Proliferation, vermindertes Ansprechen auf Wachstumsinhibitoren, nahezu unbegrenzte Zellteilung, verminderten Zelltod, vermehrte Angiogenese und erhöhte Invasivität/Metastasierung zeigen. Dies sind die von Hanahan und Weinberg im Jahr 2000 zusammengefassten und 2010 revidierten Kennzeichen von Krebs (Hanahan & Weinberg, 2011).

Califano et al. stellten 1996 analog zum Kolonkarzinom ein Sequenzmodell der Krebsentstehung in Kopf-Hals-Tumoren auf. Nach diesem Modell verliert eine Hyperplasie oder Leukoplakie durch Noxen Einwirkung Telomerase und p16^{INK4} Funktion und entwickelt sich zur Dysplasie (Califano et al., 1996). Durch Chromosomendeletion wie 3p und p53 Inaktivierung kommt es zum Cacinoma in situ, durch weitere Deletionen wie 4q, 5q oder 8p schließlich zum invasivem Karzinom und möglicher Metastasierung (Califano et al., 1996). Zwar konnten in Studien Leukoplakien durch Chemoprävention verkleinert werden, ein Rückgang der Krebsinzidenz wurde dadurch jedoch nicht erreicht (Wrangle & Khuri, 2007).

Das Modell von Califano bezog sich auf sichtbare Läsionen. Es gibt jedoch eine Vielzahl von klinischen und histopathologischen Hinweisen, dass Vorläuferläsionen nicht makroskopisch erkennbar sein müssen (Leemans, Braakhuis, & Brakenhoff, 2011; Maarten P Tabor et al., 2003; Maarten P Tabor et al., 2001). Retrospektive Studien belegen die Rolle nicht rezidierter Areale als Quelle für lokale Rezidive (Schaaij-Visser et al., 2009; M. P. Tabor et al., 2004). Schon 1953 prägten deshalb Slaughter et al. den Begriff der „Feldkanzerisierung“ (Slaughter, Southwick, & Smejkal, 1953). Durch Vergleich des genetischen Profils von Karzinom und Umgebung wurde ein molekularpathologisches Modell der invasiven Krebsentwicklung aus präneoplastischen Zellen aufgestellt (Abbildung 1) (Braakhuis, Tabor, Kummer, Leemans, & Brakenhoff, 2003).

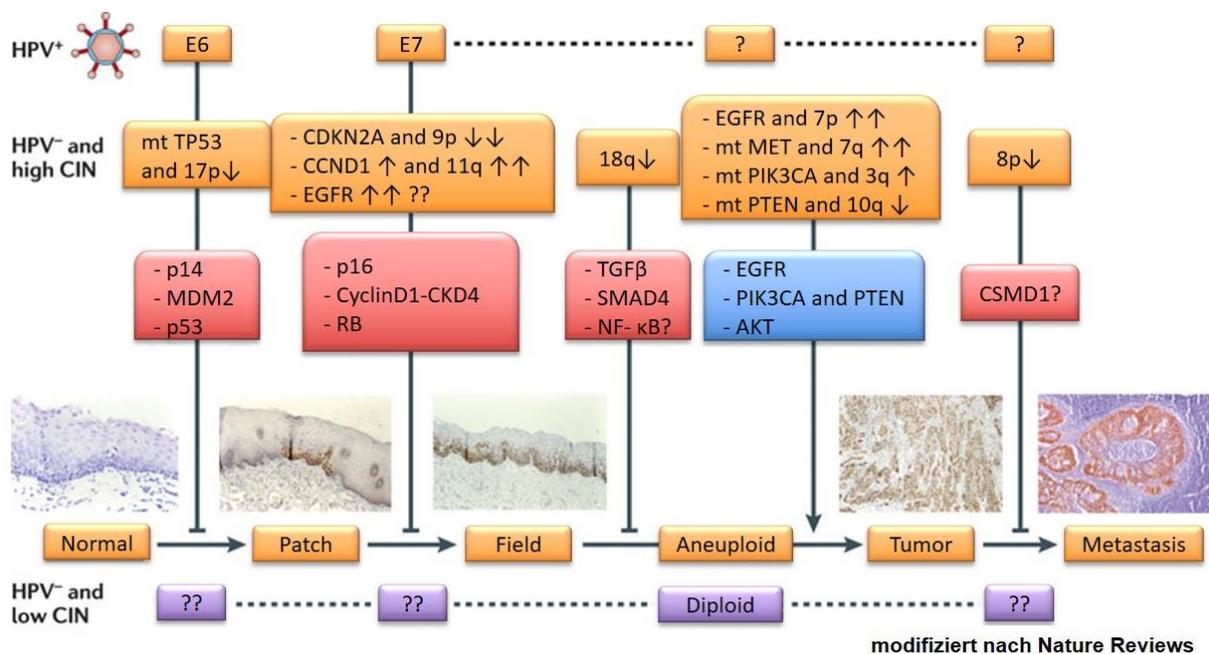


Abbildung 1: Modell der sequenziellen Entstehung von Kopf-Hals-Tumoren

2.1.3 Molekularbiologie des Kopf-Hals-Tumors

Vermutlich früh in der Entwicklung von Kopf-Hals-Tumoren entstehen Veränderungen im Zellzyklus. Durch Noxen assoziierte Mutation oder durch die HPV Onkogene E6 und E7 kommt es zur Inaktivierung von p53 und/oder *Retinoblastom Protein* (RB) (Abbildung 2). Funktionsloses p53 kann p21^{waf1} nicht mehr inaktivieren und es findet kein Zellzyklusarrest in G2 mehr statt (Bunz et al., 1998). Alternativ oder zusätzlich kann funktionsloses RB E2F nicht mehr binden und der G1 Restriktionspunkt im Zellzyklus wird übersprungen (Nevins, 2001). Diese beiden Mechanismen können zur Immortalisierung der Krebszelle beitragen (Smeets et al., 2011). Weiterhin kann die Funktion von p16^{INK4} durch Mutation gestört sein und über RB vermittelt kein G1 Arrest mehr stattfinden (Lukas et al., 1995).

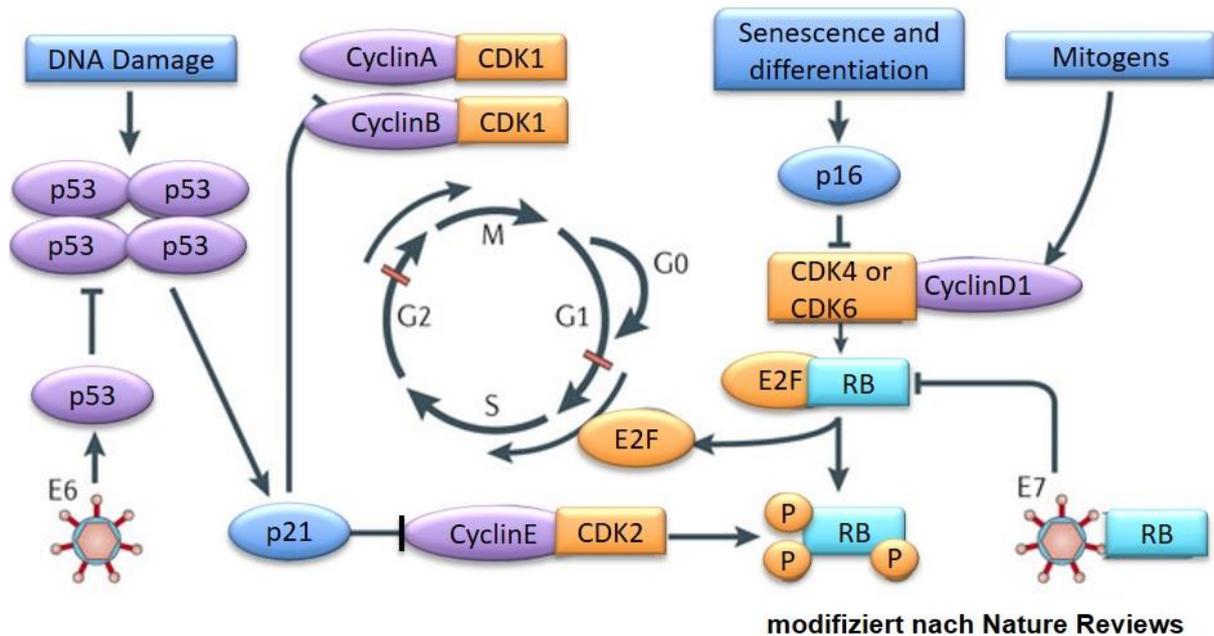


Abbildung 2 Frühe Veränderungen im Zellzyklus in Kopf-Hals-Tumoren

Außerdem finden sich bei Tumoren des Kopf-Halses häufig Veränderungen in transforming growth factor beta (TGF- β) Signalweg (Leemans et al., 2011). TGF- β wirkt über Phosphorylierung von SMAD4 inhibierend auf das Zellwachstum, entsprechend wurde in Tumoren eine Herunterregulation gefunden (D. Wang et al., 1997). In SMAD4 Knockout-Mäusen konnte das Auftreten von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Halses beobachtet werden (Bornstein et al., 2009).

Einige der klinisch bedeutsamsten Veränderungen bei Kopf-Hals-Tumoren finden sich im EGFR und nachgeschalteten PI3K-AKT-mTOR (*Phosphoinositid-3-Kinase - Proteinkinase B - mammalian target of Rapamycin*) Signalwegs und werden im Folgenden diskutiert.

2.1.4 EGFR-Signalweg

Bei dem Versuch mittels Carboxymethylcellulose Chromatographie den Nervenwachstumsfaktor zu isolieren entdeckten Cohen und Levi-Montalcini eine Fraktion, welche zwar zu keinen Nervenwachstum führte, jedoch bei Injektion in neugeborene Mäuse ein distinktes biologisches Verhalten zeigte (Cohen, 1962; Michael B. Sporn, 1991). So öffneten die so behandelten Mäuse früher die Augen, es entwickelten sich verfrüht Schneidezähne und es kam zu einer starken Wachstumsbeschleunigung. Das zunächst Tooth-Lid Faktor bezeichnete Isolat wurde später in Epidermal Growth Factor umbenannt (Cohen, 1964).

Der EGF-Rezeptor ist ein 170-kD transmembranes Glycoprotein und gehört zur Familie der ErbB Rezeptorthyrosinkinase. Die ErbB Familie umfasst vier Mitglieder: ErbB-1 (EGFR), ErbB-2 (HER2, neu), ErbB-3 (HER3) und ErbB-4 (HER4) (Normanno et al., 2006). Alle vier Proteine haben eine extrazelluläre Ligandenbindungsstelle, einen hydrophoben Transmembranteil und eine zytoplasmatische Domäne mit Thyrosinauto-phosphorylierungsstellen (Olayioye, Neve, Lane, & Hynes, 2000). An den Rezeptor können Liganden der EGF-Familie binden. Zu diesen gehört neben EGF selbst unter anderen Transforming growth factor alpha, Epiregulin, Neuregulin-1 bis -4 (Dreux, Lamb, Modjtahedi, & Ferns, 2006).

Zwei wichtige, bei Ligandenbindung aktivierte nachgeschaltete Wege sind der RAS-RAF-mitogen-activated protein Kinase-Weg (MAPK), welcher durch alle ErbB Rezeptoren aktiviert werden kann (Holbro & Hynes, 2004; Olayioye et al., 2000) und der PI-3K AKT mTOR Signalweg welcher durch die meisten der ErbBs aktiviert werden kann (Soltoff & Cantley, 1996). Weiterhin wurden zahlreiche durch ErbBs getriggerte Transkriptionsfaktoren beschrieben. Dazu gehören unter anderen NF-kappaB (Biswas, Cruz, Gansberger, & Pardee, 2000), Zinkfinger Proteine wie Sp1 (Alroy, Soussan, Seger, & Yarden, 1999), c-jun (Quantin & Breathnach, 1988), c-myc und c-fos (Cutry, Kinniburgh, Krabak, Hui, & Wenner, 1989), c-src (Ishizawa & Parsons, 2004) und signal transducer and activator of transcription (STAT) (Olayioye, Beuvink, Horsch, Daly, & Hynes, 1999).

Ein Zusammenhang zwischen Wachstumsfaktoren und Krebs gelang 1978 mit den Experimenten von De Larco und Todaro, welche bei Sarkomzellen eine Sekretion von polypeptiden Wachstumsfaktoren beobachteten (de Larco & Todaro, 1978). Sporn und Roberts entwickelten daraus die Theorie der autokrinen Sekretion. Krebszellen sichern durch Produktion von Wachstumsfaktoren ihr eigenes Überleben (Sporn & Roberts, 1985). Im Jahre 1980 wurde EGFR als Protein mit Thyrosinkinaseaktivität erkannt (Ushiro & Cohen, 1980). Im gleichen Jahr identifizierten Hunter und Sefton mit dem aus dem Rous Sarkomvirus stammenden v-SRC ebenfalls ein Protein mit Tyrosinkinaseaktivität (T. Hunter & Sefton, 1980). Diese und weitere Entdeckungen ebneten den Weg EGFR als Schlüsselspieler bei vielen Krebsarten zu verstehen.

Die EGFR Überexpression in Plattenepithelkarzinomen wurde erstmals 1986 beschrieben (Ozanne, Richards, Hender, Burns, & Gusterson, 1986). Seit dem konnte in einer überwiegenden Zahl von Studien im Kopf-Hals-Karzinom (in ca 60% (Leemans et al., 2011)) eine dadurch assoziierte schlechtere Prognose aufgezeigt werden (Keren, Shoude, Lu, & Beibei, 2014). Grandis und Kollegen belegen die Überexpression als frühes Ereignis in der

Karzinogenese (Grandis & Tweardy, 1993). Im Gegensatz zum NSCLC mit 10-30% sind aktivierende Mutationen des EGFR bei Kopf-Hals-Tumoren in der kaukasischen Bevölkerung mit 1% selten (Loeffler-Ragg et al., 2006). Trotzdem ist EGFR als therapeutisches Ziel bei Kopf-Hals-Tumoren interessant. Im Jahr 2006 wurde ein Überlebensvorteil bei mit dem EGFR Antikörper Cetuximab plus Radiotherapie behandelten Patienten gegenüber alleiniger Radiotherapie belegt (Bonner et al., 2006), welches zu einer Zulassung des Medikaments durch die FDA führte. In einer Phase II Studie zeigte der EGFR-small-Tyrosine-Kinase Inhibitor Afatinib mit Cetuximab vergleichbare Antitumoraktivität bei jedoch höherer Nebenwirkungsrate (T. Seiwert et al., 2014).

2.1.5 PI3K-AKT-mTOR Signalweg

Der PI3K-AKT-mTOR Signalweg ist ein wichtiger, dem EGFR nachgeschalteter Weg und gehört zu den am häufigsten dysregulierten Signalwegen bei einer großen Zahl unterschiedlicher Krebsarten (Vivanco & Sawyers, 2002). Physiologisch spielt der Signalweg eine wichtige Rolle in Zellwachstum, Differenzierung, Apoptose, Zellüberleben und Metabolismus. Durch die Aktivierung von PI3K beispielsweise durch Rezeptortyrosinkinasen wird das Substrat Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphat (PIP₃) umgesetzt. Die Dephosphorylierung von PIP₃ kann mittels PTEN geschehen. Als second messenger kann PIP₃ AKT an Thr308 oder Ser473 phosphorylieren, welches wiederum eine Reihe von nachgeschalteten Signalwegen wie mTOR aktivieren kann. Mutationen und/oder Amplifikationen für PI3K, AKT, PTEN wurden bei einer Vielzahl von Neoplasien beschrieben (Vivanco & Sawyers, 2002). Vor allem aufgrund der Involvierung im Zellwachstum wurden mindestens 29 Inhibitoren entwickelt und in klinischen Studien getestet (Dienstmann, Rodon, Serra, & Tabernero, 2014). Als Dual-Inhibitor blockiert BEZ235 PI3K und mTOR und zeigte damit präklinisch eine breitere Wirksamkeit bei unterschiedlichen Genotypen verglichen mit Einfachinhibitoren (Serra et al., 2008).

2.2 Mechanismen der Resistenz

Im Jahr 1961 begannen Frei und Kollegen (Frei et al., 1965) in einer Studie Kinder mit akuter lymphatischer Leukämie mittels einer neuartigen Kombination aus 4 Hochdosischemotherapeutika zu behandeln¹. Trotz nur geringer Erfahrung und somit Gefahr unabschätzbarer potentieller Nebenwirkungen bei gleichzeitiger Gabe begannen die Kinder auf die Kombination anzusprechen. „Die Knochenmarksbiopsien kamen nacheinander zurück – alle ohne leukämische Zellen. Rote und weiße Blutzellen sprossen in einem sonst versengten Knochenmarksfeld. Aber die Leukämie kam nicht zurück.“ (Mukherjee, 2010)

¹ Der folgende Abschnitt ist in freier Übersetzung übernommen worden aus: (Zahreddine & Borden, 2013)

Von den 16 eingeschlossenen Patienten zeigten 11 eine komplette Remission. Dieser herausragende Erfolg, jedoch, war nur von kurzer Dauer. Mit der Ausnahme von nur wenigen Kindern entwickelten alle Patienten ein aggressiveres Rezidiv, welches nun nicht mehr auf die Behandlung ansprach. Die Leukämischen Zellen übertraten die Blut-Hirn-Schranke und breiteten sich im Gehirn aus, „dem einzigen Raum den die Chemotherapie nicht erreichen konnte...die Kinder starben eines nach dem anderen - niedergestreckt durch die Anpassung die sie schützen sollte... der Grund war das Abwehrsystem des Körpers welches die Chemotherapie untergrub.“

Diese nun 55 Jahre alte Geschichte spiegelt immer noch viele der heutigen Erfahrungen in der Krebstherapie wieder, in der Resistenz und Rezidiv weiterhin ein Hauptproblem darstellen: Trotz moderner zielgerichteter Therapie erliegen nach wie vor etwa 90% der Patienten mit einer fortgeschrittenen, metastatischen Krebserkrankung ihrem Leiden (Wilson, Johnston, & Longley, 2009).

Es gibt grundsätzlich zwei Arten, warum Tumore gegen eine Chemotherapie resistent sein können: Umgebungsfaktoren und zelluläre Faktoren (Gottesman, 2002). Als Umgebungsassoziiert kann eine schlechte Medikamentenabsorption oder ein zu schneller Metabolismus wirken. Beides führt zu einem zu niedrigen Spiegel des Therapeutikums. Weiterhin kann die Toleranz des Patienten aufgrund von Komorbiditäten erniedrigt sein, weswegen nur eine geringere Dosis appliziert werden kann. Außerdem kann die Gewebegängigkeit des Medikaments durch zu hohes molekulares Gewicht beeinflusst sein (Pluen et al., 2001). Die Anflutung kann durch insuffiziente Blutgefäße, der lokale Spiegel durch zu hohen Metabolismus von Nichttumorzellen beeinflusst sein (Trédan, Galmarini, Patel, & Tannock, 2007).

Zelluläre Resistenzmechanismen können intrinsisch, also schon vor Therapie vorhanden oder erworben, also durch die Therapie entstanden sein. Es sind eine Vielzahl von zellulären Resistenzmechanismen beschrieben (Holohan, Van Schaeybroeck, Longley, & Johnston, 2013). So können die Membrantransportproteine der ATP-binding cassette (ABC) in die Zelle aufgenommene Therapeutika wieder hinausbefördern. Überexpression des ersten identifizierten ABC Transporters multi-drug-resistance 1 (MDR1) konnte mit Chemoresistenz in Prostata-(Zalberg et al., 2000), Lungen-(Triller, Korosec, Kern, Kosnik, & Debeljak, 2006) und Brustkrebs (Nooter et al., 1997) assoziiert werden. Weiterhin können Therapeutika inaktiviert werden. Beispielsweise wird Cisplatin durch zelluläres Gluthation gebunden und zeigt dadurch keine Wirkung mehr (Meijer et al., 1992). Integrität der DNA Reparatur hat großen Einfluss auf die Effizienz DNA-schädigender Substanzen (Bouwman & Jonkers,

2012). Das in 50% aller Krebsarten mutierte Wächtergen p53 kontrolliert den Zellzyklusarrest nach DNA Schäden (Levine, Momand, & Finlay, 1991). Fan und Kollegen konnte eine Verbindung zwischen Mutation von p53 und Resistenz aufzeigen (Fan et al., 1994).

Ebenso spielt das Tumormikroklima eine wichtige Rolle. So überlebten Lymphomzellen in einer Maus eine Doxorubicin Behandlung bevorzugt im Thymus. Gilbert et al. konnten Interleukin 6 (IL-6) und tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1) als von dem Gewebe sekretierten protektiven Faktoren identifizieren. Die Autoren konnten *in vitro* und *in vivo* zeigen, dass simultane IL-6 Gabe zu erhöhter Resistenz gegen Doxorubicin führt.

Ferner spielen Veränderungen der Zielstrukturen eine wichtige Rolle in der Resistenzentwicklung. Wie in der Einleitung beschrieben entsteht bei 50% der mit Gefitinib behandelten Patienten innerhalb eines Jahres die T790M Punktmutation, welche die Bindungstasche des EGF Rezeptors verändert und der Inhibitor somit nicht mehr binden kann (Suda et al., 2009). Mutation oder chromosomales Rearrangement der anaplastischen Lymphomkinase (ALK) wurden in kindlichen Neuroblastomen (Chen et al., 2008), anaplastischen Großzelllymphomen (Shin, Kim, Yoon, Kim, & Lee, 2012) und bei NSCLC (Soda et al., 2007) beschrieben. Der gegen ALK gerichtete TKI Crizotinib führt zu Ansprechraten bis zu 60%, jedoch entwickeln die meisten Patienten innerhalb eines Jahres ein Rezidiv (Camidge et al., 2012). Vier von elf Patienten waren resistent gegen Crizotinib aufgrund von Mutation der ALK (Doebele et al., 2012). Sogar die durch ein einzelnes Fusionsgen BCR-ABL1 (breakpoint cluster region - Abelson murine leukemia viral oncogene homolog) ausgelöste chronisch myelotische Leukämie (CML), zeigt bei Langzeitbehandlung mit Imatinib Resistenz durch Veränderung des Targets (N. P. Shah et al., 2007).

Resistenzen durch genetische Veränderung spielen also eine wichtige Rolle. Woher kommen diese Genveränderungen?

Ein Grund kann sein, dass sie bereits vorhanden sind. In der letzten Dekade ergaben sich, immer mehr Hinweise, dass scheinbar klonale Tumore aus vielen unterschiedlichen Populationen zusammengesetzt sind (Turner & Reis-Filho, 2012). Dieser Erkenntnisgewinn gründet vor allem im Fortschritt des parallelen Sequenzierens, welcher es erlaubte die Fraktion der Zellen mit einer ausgesuchten Mutation zu quantifizieren (S. P. Shah et al., 2009). Im Jahr 2012 publizierten Swanton et al. Sequenzierungsdaten aus unterschiedlichen Biopsien eines Patienten mit Nierenzellkarzinom (Marco Gerlinger et al., 2012). Sie konnten zeigen, dass 63% bis 69% der Mutationen nicht über den ganzen Tumor geteilt wurden. Heterogenität kann als gutes Modell für die Erklärung von erworbener Resistenz dienen (Turner & Reis-Filho, 2012). In einer heterogenen Zellpopulation können Klone mit einer

genetischen oder epigenetischen Veränderung wachsen, die bei Gabe einer Therapie einen Proliferationsvorteil darstellt. Durch Gabe der Therapie kann sich dieser Klon nach dem Darwin'schen Prinzip „Survival of the fittest“ durchsetzen (M Gerlinger & Swanton, 2010). Wie jedoch kommt es zur Heterogenität?

Die am Meisten verbreitete These zum Ursprung der Heterogenität von Tumorphpopulationen ist die des „mutator phenotype“ (Loeb, 2001) und der damit verbundenen genetischen Instabilität (Hanahan & Weinberg, 2011). Durch Schäden oder Verlust in DNA Reparaturgenen (Negrini, Gorgoulis, & Halazonetis, 2010), Umwelttoxinen wie Zigarettenrauch (Pleasant et al., 2010), epigenetische Mechanismen (Krajcovic et al., 2011) und Überproduktion von reactive oxygen species (Schumacker, 2006) kann es in der Tumorentwicklung und in der Resistenzbildung zu genetischer Instabilität kommen (Turner & Reis-Filho, 2012).

Andererseits jedoch kann ein zu hohes Maß an genetischer Instabilität für Wachstum und Überleben des Tumors unvorteilhaft sein (Birkbak et al., 2011). Es wäre für Krebszellen somit intelligent, dieses Maß an genetischer Instabilität steuern zu können (Cipponi & Thomas, 2014). Bei Bakterien ist die Existenz solcher Mechanismen bereits etabliert. Es lassen sich hier erstaunliche Parallelen zu Tumorzellen finden.

2.2.1 Stress induzierte genetische Veränderung

In der Evolution waren zelluläre Organismen oft feindlichen oder variablen Umweltbedingungen ausgesetzt und mussten Mechanismen entwickeln um sich an diese anzupassen (Jortner, 2006). Der einfachste Weg, um den Tod durch eine zytotoxische Substanz zu entgehen ist die Migration in ein Gebiet mit geringerer Konzentration der Substanz (Lambert et al., 2011). Bakterien können einer tödlichen Antibiotikakonzentration auf einer Agarplatte entgehen, indem sie sich in Zellverbänden durch *swarming mobility* fortbewegen (Butler, Wang, & Harshey, 2010). Ebenso können Tumorzellen durch eine Chemotherapie induziert migrieren und Metastasen bilden (Daenen et al., 2011). Weiterhin können sowohl Bakterien (Balaban, Merrin, Chait, Kowalik, & Leibler, 2004) als auch Tumorzellen (Sharma et al., 2010) bei Behandlung in ein seneszenzartiges Stadium übergehen in der sie weniger auf zytotoxische Substanzen reagieren. Es lassen sich Parallelen zwischen den die Antibiotikaresistenz beeinflussenden Biofilm bei Bakterien und dem Mikromilieu in Tumoren ziehen (Lambert et al., 2011). Bakterien unterschiedlicher Spezies bilden als Antwort auf erhöhten Stress wie zum Beispiel Änderungen im pH oder Osmolarität, Hunger oder Scherkräfte einen aus Polysacchariden bestehenden Biofilm (Monds & O'Toole, 2009). Diese chemisch inerte Schicht vermindert die Diffusion von

Antibiotika (Donlan & Costerton, 2002). Sie verhindert aber auch den Transport von Nährstoffen und Sauerstoff (Stewart, 2003). In *Pseudomonas aeruginosa* konnte gezeigt werden, dass diese an sich feindliche Umgebung dazu führt, dass durch die Herunterregulation von KatA sich die Mutationsrate in einem kleinen Teil (0,5-5%) (Lambert et al., 2011) der Bakterienpopulation um das 100-fache steigert (Driffield, Miller, Bostock, O'Neill, & Chopra, 2008). Diese Hypermutation erlaubt es den Pseudomonaden viel schneller gegen ein Antibiotikum resistent zu werden (Maciá et al., 2005).

Ein weiterer Mechanismus adaptiver Mutagenese ist das RNA Polymerase Sigma S- (RpoS) System in *Escherichia coli* (S. M. Rosenberg, Shee, Frisch, & Hastings, 2012). Durch Hunger-, pH-, osmotischen, Kälte- oder oxidativen Stress kommt es zur transkriptionellen Hoch- oder Herunterregulierung hunderter Gene (Battesti, Majdalani, & Gottesman, 2011). Unter anderem kommt es zu einem Switch von high-fidelity Polymerasen wie Pol III zu low-fidelity Polymerasen wie Pol IV. Bei der DNA Replikation kommt es durch diesen Switch zum vermehren Einbau von Fehlern in die DNA und somit erhöhter Mutationsfrequenz, was den Bakterien letztendlich erlaubt sich besser an die neuen Umweltbedingungen anzupassen (S. M. Rosenberg et al., 2012).

Auch in humanen Zellen gibt es Polymerasen unterschiedlicher Güte. So sind Pol α , δ , ϵ high-fidelity und Pol ζ , η , ι , κ low-fidelity Polymerasen (Loeb & Monnat, 2008). Unter anderen konnten Hara und Kollegen eine Verbindung zur Resistenzbildung herstellen (Hara, Kouno, Nakamura, Kusaka, & Yamaoka, 2005). Die meisten mit Antiandrogenen behandelten Prostatakarzinome werden im Verlauf der Behandlung resistent gegen die Therapie. Hara und Kollegen stellten dies in der Zellkultur nach und fanden bei Gabe des Androgenantagonisten Bicalutamid für sechs bis zwölf Wochen, dass Bicalutamid nun agonistisch am Androgenrezeptor wirkte (Hara et al., 2003). Als Ursache fanden sie die Emergenz der Punktmutation W741C oder W741L im Rezeptor. Bei weiterer Nachforschung fanden Hara und Kollegen, dass in der Zellkultur bei Gabe von Bicalutamid bereits nach 3 Tagen die high-fidelity Polymerase Pol δ um etwa 50% weniger und die low-fidelity Polymerase Pol ι um das 2-fache mehr exprimiert war (Hara et al., 2005).

2.2.2 APOBEC Familie

Die Sequenzierung von Tumorgenomen hat zu einer massiven Datenfülle geführt. Dies erlaubt es, im Mutationsspektrum mithilfe statistischer Verfahren nach Mustern zu suchen um Rückschlüsse auf die Genese von Mutationen zu ziehen (Roberts & Gordenin, 2014). Computergestützt wird dabei das Genom auf mutierte Base durchsucht und auf vor und nachfolgende Base geachtet. Durch Vergleich mit *in vitro* Daten kann auf den

Mutationsmechanismus geschlossen werden. So zeigte sich bei familiärem Kolorektal- und Endometriumkarzinom bei welchen ein Defekt in der Polymerase Pol ϵ besteht in 40-60% der Punktmutationen das für diesen Defekt typische Mutationsmuster (Palles et al., 2013). Bei Vergleich von 2680 Tumoren unterschiedlicher Genese fanden Roberts und Kollegen in 30-70% der Mutationen Übereinstimmung mit der APOBEC Signatur (Roberts et al., 2013). HPV positive Kopf-Hals Tumore zeigen mit 98% eine signifikant erhöhte Rate an Mutationen mit APOBEC Signatur als HPV negative (76%) (Cannataro et al., 2019). Es gibt noch weitere Hinweise die APOBEC in Verbindung mit Krebs setzen (Henderson & Fenton, 2015). So zeigten Yamanaka et al., dass eine Überexpression von APOBEC1 in transgenen Mäusen hepatozelluläre Karzinome erzeugt (Shinya Yamanaka et al., 1995). Caval und Kollegen demonstrierten, dass APOBEC3B Hypermutationen in der DNA erzeugen kann (Caval, Suspene, Shapira, Vartanian, & Wain-Hobson, 2014).

Die evolutionär relativ junge Familie der *apolipoprotein mRNA editing enzyme catalytic polypeptide* (APOBEC) Proteine umfasst 11 Mitglieder (Harris & Liddament, 2004). Physiologischerweise spielen die Proteine eine wichtige Rolle in der Hypermutation von Ig Antikörpern der adaptiven Mutation (Di Noia & Neuberger, 2007). Eine weitere wichtige Funktion übernehmen die APOBEC Proteine bei der Abwehr von Retroviren. In mit *human immunodeficiency virus* (HIV) infizierten Zellen kann APOBEC3G im Virusgenom eine 10-1000 fache Mutationslast induzieren und so das Virus inaktivieren (Harris & Liddament, 2004). HIV Viren besitzen mit dem *Viral Infectivity factor* (VIF) ein Protein, welches die Enzymaktivität von APOBEC3G unterdrückt.

2.2.3 Interleukin-6 und Krebs

Interleukin-6 (IL-6) ist ein aus 184 Aminosäuren zusammengesetztes Glykoprotein (Hirano et al., 1986) und gehört zusammen mit IL-11, dem leukämiehemmenden Faktor (LIF), Onkostatin M (OSM), dem ziliären neurotrophen Faktor (CNTF), Kardiotrophin-1 (CT-1) und dem kardiotrophinähnlichem Zytokin (CLC) in eine gemeinsame Zytokinfamilie (Guo, Xu, Lu, Duan, & Zhang, 2012; Heinrich et al., 2003). IL-6 bindet als Ligand an die α Kette des Oberflächenrezeptors IL-6R zusammen mit der Signaltransduktionskomponente gp130 (Heinrich et al., 2003). Hat der Ligand gebunden, aktiviert dies Thyrosinkinase der Janus (JAK) Familie (Heinrich et al., 2003). Dies führt zur Phosphorylierung von STAT3, welches wiederum ein Dimer mit einem zweiten phosphoryliertem STAT3 eingehen und in dieser Form in den Kern wandern kann (Levy & Lee, 2002). Das Dimer bindet direkt an die DNA und führt zur Beeinflussung von Zelldifferenzierung, Wachstum und Überleben durch Transkription verschiedener Gene wie organic cation transporter 1 (Oct1), sex determining region Y-box 2 (Sox2), homeobox protein Nanog (Nanog), B-cell lymphoma 2 (BCL-2),

Suvivin und AKT (Carpenter & Lo, 2014). Neben dem STAT3 Signalweg kann IL-6 auch weitere Wege wie RAS, MAPK, COX-2, WNT und PI3K/AKT aktivieren (Ara & DeClerck, 2010; Guo et al., 2012; Jee et al., 2004).

IL-6 stellt einen Schlüsselspieler in Infektionen, Entzündungen und Krebs dar und kann Krankheitsentstehung und -fortschritt beeinflussen (C. A. Hunter & Jones, 2015). IL-6 ist wichtig für Proliferation und Differenzierung von Lymphozyten. IL-6 Defizienz beeinflusst angeborene und adaptive Immunität und führt zu Abwehrschwäche gegen Viren (Dienz et al., 2012), Bakterien (Hoge et al., 2013) und Parasiten (W. Gao & Pereira, 2002). Der normale Serumspiegel von 1-5 pg/ml kann im Rahmen fulminanter Entzündungsreaktionen wie einer Meningokokkensepsis sehr schnell in den µg/ml hochgefahren werden (Waage, Brandtzaeg, Halstensen, Kierulf, & Espevik, 1989).

Andererseits jedoch ist der Serumspiegel von IL-6 unter anderen in Brust- (Knüpfer & Preiß, 2007), Prostata- (Nakashima et al., 2000), Nierenzell- (Blay et al., 1992) und Kolonkarzinomen (Xu et al., 2016) ein negativer prognostischer Marker. In Kopf-Hals-Tumoren ist IL-6 Expression ebenfalls mit schlechter Prognose assoziiert (J. Gao, Zhao, & Halstensen, 2016).

IL-6 ist auch in der Therapieresistenz relevant (Guo et al., 2012). So wurde in Prostatakarzinomzellen eine autokrine Sekretion von IL-6 und damit assoziierter Resistenz auf Cisplatin gefunden (Borsellino, Beldegrun, & Bonavida, 1995). Conze und Kollegen konnten nachweisen, dass Multitherapeutika resistente Brustkarzinomzelllinien IL-6 Produktion zeigten, während auf Therapeutika sensible Zellen kein IL-6 sekretierten (Conze et al., 2001). Eine Überexpression von phosphoryliertem STAT3 kann in den meisten auf Paclitaxel resistenten Ovarialkarzinomzelllinien gefunden werden (Duan et al., 2006). In Kopf-Hals-Tumoren ist IL-6 mit erworbener Cisplatin Resistenz assoziiert (J. Gao et al., 2016).

2.2.4 Zellkultur als Modell der Resistenzentwicklung

Tumorzellen unter Kulturbedingungen wurden in der Literatur vielfach verwendet um Ansprechen auf Chemotherapie und Resistenzentwicklung zu untersuchen. So generierten Shen et al. Cisplatin-resistente Zellen aus einer hepatozellulären Karzinomzelllinie (Shen, Akiyama, Schoenlein, Pastan, & Gottesman, 1995). Kitazono-Saitoh et al. züchteten Cisplatin-resistente Mesotheliomzellen (Kitazono-Saitoh et al., 2012). De Wilt et al. untersuchten Bortezomib Resistenz an ihrer generierten NSCLC Linie (de Wilt et al., 2012). Yamamoto et al. züchteten Gefitinib resistente NSCLC Zellen (Yamamoto et al., 2010). Berns et al. generierten Brustkarzinomzellen mit Resistenz auf Trastuzumab (Berns et al.,

2007). Die überwiegende Zahl an Autoren startet mit einer Konzentration um die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) des Therapeutikums und erhöht schrittweise bis zu einer Endkonzentration. Die Zeitspanne in der erhöht wird variiert dabei von 4 Wochen (Berns et al., 2007) bis zu 2 Jahren (Shen et al., 1995). Auch die erreichten Endkonzentrationen unterscheiden sich stark. So erreicht eine Cisplatin resistente Zelllinie bei Kitazono-Saitoh et al. das 1,7 fache der Ausgangs- IC_{50} -Konzentration während Yamamoto et al. mit Gefitinib langzeitbehandelte NSCLC Zelllinie noch bei der 305-fachen IC_{50} Konzentration proliferierte. Insgesamt muss kritisch angemerkt werden, dass der Begriff der Resistenz oder Kriterien ab wann man von resistenten Zellen spricht in der Literatur nicht eindeutig definiert sind. Trotzdem gibt es Ergebnisse, welche darauf hindeuten, dass in der Zellkultur gewonnene Erkenntnisse über Resistenzentwicklung auf die die Tumorentwicklung *in vivo* übertragen werden kann. So generierte eine koreanische Arbeitsgruppe um Kim et al. durch Langzeitbehandlung der NSCLC Zelllinie PC9 mit Afatinib über 6 Monate resistente Zellen welche die T790M Mutation aufwiesen (Y. Kim et al., 2012). Wie weiter oben beschrieben wird diese Mutation auch bei 50% der mit Gefitinib behandelten Patienten beobachtet (Suda et al., 2009). Eine weiterführende Untersuchung mittels Genomsequenzierung ergab, dass die resistenten Zellen die T790M Mutation aufwiesen, die Ausgangszellen jedoch nicht (P. Jia et al., 2013). Dies weist darauf hin, dass die Mutation während der Langzeitbehandlung entstanden ist.

2.3 Auswahl der Zelllinien und Therapeutika

Um die Resistenzentwicklung besser zu verstehen wurden in dieser Arbeit zwei Zelllinien mit fünf Inhibitoren langzeitbehandelt. Im Hinblick auf die Kombinationsversuche wurde die in vorhergehenden Studien der Arbeitsgruppe als relativ strahlensensibel charakterisierte Zelllinie Cal27 (Gioanni et al., 1988) und relativ strahlenresistente Zelllinie UD-SCC-5 (Ballo et al., 1999) verwendet. Cal27 wurde aus einer Probeexzision eines Zungenkarzinoms des mittleren Drittels vor Behandlung bei einem 56 jährigem, männlichen Patienten etabliert. Trotz neoadjuvanter Strahlentherapie, partieller Glossektomie, Neck dissection (21 Lymphknoten: 4+ Plattenepithelkarzinom, 1+ papilläres Schilddrüsenkarzinom) und Chemotherapieregiment verstarb der Patient 6 Monate nach Diagnose.

Zur Auswahl der Therapeutika wurde eine systematische Literaturrecherche durchgeführt. Als Ausgangspunkt wurde eine Zusammenstellung von oft veränderten Genregionen in dem oben zitierten Paper von Leemans et al. von 2011 verwendet (Leemans et al., 2011). Darin sind 8 Tumorsuppressorgene und 12 Onkogene beschrieben. Eine Literaturrecherche im Herbst 2012 zu jedem dieser Targets erbrachte, dass zum damaligen Zeitpunkt zu einem der

Suppressorgene und vier der Onkogene Inhibitoren kommerziell verfügbar und in präklinischer oder klinischer Testung waren. Hieraus wurden der EGFR Inhibitor Afatinib, der dual PI3K-mTOR Inhibitor BEZ235, der PARP1 Inhibitor Olaparib für die Generierung der resistenten Zellen ausgewählt. Zusätzlich wurde als EGFR Downstream-Target der AKT Inhibitor MK2206 und die Standard-Chemotherapie des Kopf-Halses Cisplatin für die Studie verwendet (Abbildung 3).

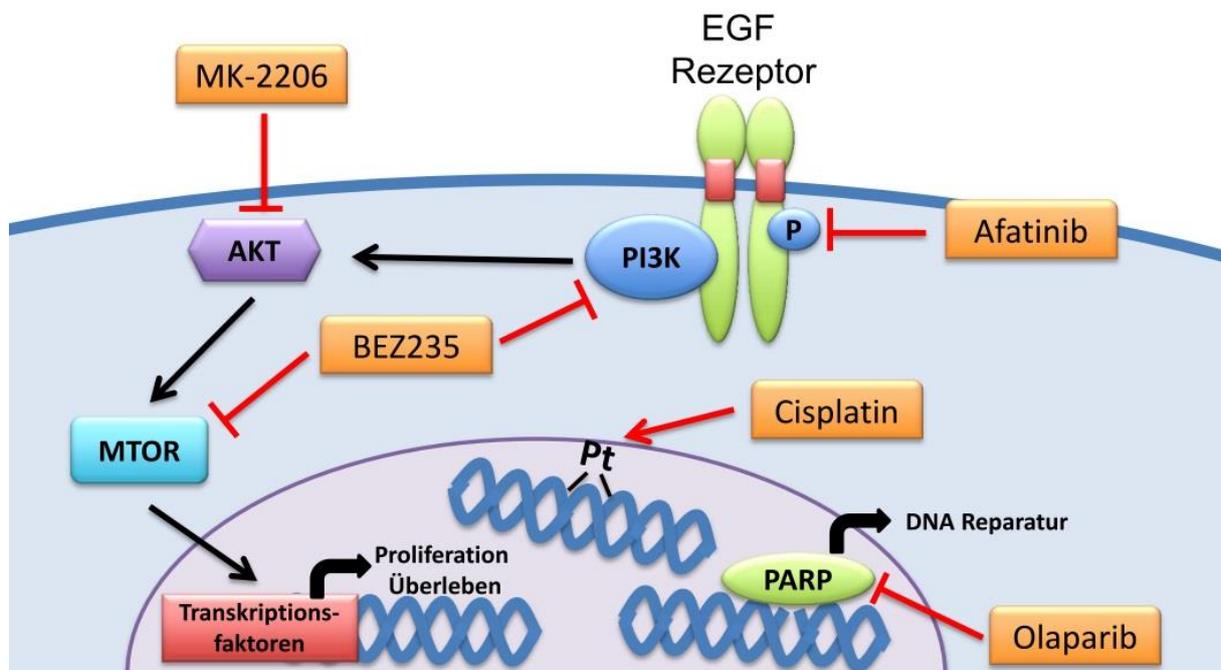


Abbildung 3: Überblick über die verwendeten Inhibitoren

2.3.1 EGFR Inhibitor Afatinib

Wie bereits beschrieben ist EGFR ein wichtiger Pfad in der Entwicklung und Aufrechterhaltung von Kopf-Hals Tumoren. Cetuximab als EGFR Antikörper ist seit 2006 durch die FDA zur Behandlung zugelassen ("Cetuximab approved by FDA for treatment of head and neck squamous cell cancer," 2006). Ebenso spielen aktivierende EGFR Mutationen eine wichtige Rolle im nicht kleinzelligen Lungenkarzinomen. So findet sich epidemiologisch in dieser Entität durchschnittlich in ungefähr 20% (kaukasische Herkunft) bis 50% (asiatische Herkunft) aktivierende EGFR Mutationen (Y. Shi et al., 2014). Bei Vorliegen einer dieser Mutationen ist Afatinib neben den weiteren EGFR-TKIs Erlotinib und Gefitinib als Erstlinientherapie bei NSCLC zugelassen (S. Wang, Gao, Liu, & Sun, 2018). Obwohl nicht zugelassen, zeigt Afatinib auch in Kopf-Hals Tumoren Ansprechen. In einer Phase III Studie an 483 Patienten in fortgeschrittenen Kopf-Hals Tumoren war die Gabe von Afatinib auch nach Behandlung mit Cisplatin als Zweitlinientherapie gegenüber Methotrexat mit einem signifikanten Überlebensvorteil korreliert (Machiels et al., 2015).

2.3.2 AKT Inhibitor MK-2206

Wie im Abschnitt 2.1.5 beschrieben und in Abbildung 3 gezeigt führt eine Aktivierung von EGFR über PI3K zu Aktivierung von AKT und mTOR und nachfolgend zu Transkription auf DNA Ebene. Präklinisch zeigten sich vielversprechende Ergebnisse mit MK2206 in Brustkarzinom- (Sangai et al., 2012), hepatozellulärem Karzinom- (Carolina Simioni et al., 2013) und T-Zell Leukämiezellen (C. Simioni et al., 2012). Klinisch als einzelne Substanz appliziert jedoch zeigte MK-2206 eher wenig antitumorale Aktivität in Phase II Studien an PI3K mutierten Brustkarzinomen (Xing et al., 2019), PI3K mutiertem Endometriumkarzinom (Myers et al.) und fortgeschrittenen Lymphomen (Oki et al., 2014).

2.3.3 PI3K-MTOR Inhibitor BEZ235

BEZ 235 ist ein dualer PI3K/MTOR Inhibitor. Wie bei MK2206 zeigte sich sehr gutes Ansprechen in präklinischen Tumorzellmodellen, unter anderen in Lungen- (Herrera, Zeindl-Eberhart, Jung, Huber, & Bergner, 2011), Brust- (Kuger et al., 2014), Pankreas- (Awasthi, Yen, Schwarz, & Schwarz, 2012) und Kopf-Hals-Karzinomen (Hsu et al., 2018). BEZ235 befindet sich in klinischer Testung in Phase I und II Studien. Unter den wenig Veröffentlichten findet sich eine Studie an 31 Patienten mit Everolimus resistentem neuroendokrinen Tumoren. Diese ging jedoch nicht in Phase II aufgrund von vor allem gastrointestinaler Toxizität (Fazio et al., 2016).

2.3.4 PARP-Inhibitor Olaparib

Durch Umwelteinflüsse, fehlerhafte DNA Replikation oder toxische Metaboliten sind Zellen der ständigen Gefahr von DNA Schäden ausgesetzt. DNA Reparatur ist somit ein wichtiger Bestandteil der Zellhomöostase. Die wichtigsten Reparaturmechanismen sind dabei die Nukleotidexzisionsreparatur, die Basenexzisionsreparatur, das Mismatch Repair und homologes und nichthomologes End-joining. Einzelstrangbrüche gehören mit durchschnittlich 10.000 pro Tag zu den häufigsten Schäden (Davar, Beumer, Hamieh, & Tawbi, 2012). Die Basenexzisionsreparatur unter Beteiligung der poly ADP ribose polymerase (PARP) Enzyme ist der wichtigste Reparaturmechanismus. Die PARP Enzyme, von denen heute 17 bekannt sind dessen wichtigster mit 90% der Aktivität PARP1 ist, fungieren dabei als Detektor für Einzelstrangbrüche (Schreiber, Dantzer, Ame, & de Murcia, 2006). Dabei bindet PARP an den Bruch und rekrutiert durch die negative Ladung weitere, für die Reparatur unabdingbare Proteine wie x-ray cross complementing gene 1 (XRCC1) (Davar et al., 2012). Durch eine Vielzahl von redundanten Reparaturmechanismen ist PARP1 nicht lebensnotwendig. So sind PARP-1 knockout Mäuse lebensfähig, zeigen sich jedoch stark anfällig für γ -Bestrahlung oder DNA alkylierende Substanzen (Sugo et al., 2007). Wenn andere Reparaturmechanismen, wie die homologe Reparatur bei Breast

Cancer 1/2 (BRCA1/2) defizienten Brusttumorzellen jedoch ebenfalls defekt sind, so zeigen diese Zellen ausgesprochene Sensibilität auf PARP Inhibitor (Bryant et al., 2005). Diese und weitere Ergebnisse haben die Suche nach und den Einsatz in klinischen Studien von PARP Inhibitoren vorangetrieben. AZD2281 (Olaparib) ist ein potenter PARP1/2 Inhibitor. In Phase I (Fong et al., 2010) und Phase II (Tutt et al., 2010) Studien konnten mit Olaparib Monotherapie gute Ansprechraten bei BRCA1/2 mutierten, Chemotherapie refraktären Brust- und Ovarialkarzinomen gezeigt werden. Im Jahr 2014 wurde Olaparib zu diesem Verwendungszweck durch die FDA zugelassen (G. Kim et al., 2015).

2.3.5 Cisplatin

Als Rosenberg und Kollegen Escherichia coli Bakterien einem elektrischen Feld aussetzten, entdeckten sie zufällig, dass die Verwendung einer platinhaltige Elektrode zur Wachstumsinhibition führt (B. Rosenberg, Van Camp, & Krigas, 1965). Bald darauf wurde auch ein antitumoröser Effekt von Platinverbindungen entdeckt (B. Rosenberg & Vancamp, 1969). Erstmals zugelassen durch die FDA im Jahr 1978 wird Cisplatin heute bei Hoden-, Ovarial-, Harnblasen-, Bronchial-, Zervix- und Plattenepithelkarzinome des Kopf-Halses eingesetzt. Ein Hauptmechanismus der Wirkung von Platinverbindungen wird dabei der Induktion der Apoptose als Folge eines Zellzyklusarrests in G1, S oder G2-M Phase zugeschrieben (Desoize & Madoulet, 2002). Es gilt als generell akzeptiert, dass Cisplatin Addukte mit der DNA bildet (P. Jordan & Carmo-Fonseca, 2000), das folgende Mismatchrepair wird aber abgebrochen und es findet ein Zellzyklusarrest statt (Florea & Büsselberg, 2011). Es werden jedoch auch andere Wege der Wirkung, wie Produktion von reactive oxigen species, p53 induzierte Apoptose, Wechselwirkung mit Ca²⁺-Signalweg oder Caspasen (Florea & Büsselberg, 2011) diskutiert.

2.4 Krebsstammzellkonzept

Um Eigenschaften wie unbegrenzte Teilung, Selbsterneuerung und Seneszenz von Tumoren zu erklären wurde das Krebsstammzellkonzept eingeführt. Eine kleine Zahl von oft durch wenige Oberflächenmarker charakterisierte Stammzellen ist für die Tumorerhaltung und Proliferation verantwortlich (Turner & Reis-Filho, 2012).

Allgemein werden mit Stammzellen Zellen bezeichnet, die sich in unterschiedliche Gewebe- oder Zelltypen ausdifferenzieren können. Durch Zellteilung können aus ihnen sowohl weitere Stammzellen, als auch höher differenzierte Zellen entstehen (Yu, Pestell, Lisanti, & Pestell, 2012). Eine weitere Eigenschaft ist ihr Selbsterneuerungspotential, also die Fähigkeit der nahezu unbegrenzten Teilung ohne weiter auszudifferenzieren. Im Jahr 2007 gelang Takahashi und Kollegen die Reprogrammierung von humanen adulten Fibroblasten in

pluripotente Stammzellen (Takahashi et al., 2007). Obwohl die unterliegenden Mechanismen immer noch wenig verstanden sind, gelten Oct4, Sox2 und Nanog als Hauptregulatoren, eine Überexpression dieser Faktoren kann den undifferenzierten Status aufrechterhalten (Leis et al., 2012; S Yamanaka, 2008). In hämatopoetischen Stammzellen scheint weiterhin BMI-1 eine Rolle zu spielen (Park et al., 2003). Vor allem das Selbsterneuerungspotential zeigt Parallelen zu Neoplasien (C. T. Jordan, Guzman, & Noble, 2006). Erste Hinweise fanden sich in einer Studie im Jahr 1994, in der Lapidot und Kollegen eine Subpopulation in Zellen von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) identifizierten, die bei Injektion in immundefiziente Mäuse ebenfalls AML auslöste. Diese Subpopulation war durch die Oberflächenmarker CD34⁺ CD38⁻ charakterisiert (Lapidot et al., 1994). Auch bei soliden Tumoren wie Brust- (Al-Hajj, Wicha, Benito-Hernandez, Morrison, & Clarke, 2003), Kolon- (Ricci-Vitiani et al., 2007), Pankreas- (C. Li et al., 2007), Lungen- (C. F. B. Kim et al., 2005), Hirn- (Singh et al., 2003) und Kopf-Hals-Tumoren (Prince et al., 2007) wurden krebssassoziierte Stammzellen nachgewiesen. Obwohl für Stammzeleigenschaften nicht beweisend, gelten Oberflächenmarker als Hinweis auf ihre Präsenz. In Kopf-Hals-Tumoren wurden CD44 und ALDH1 als wesentliche Marker identifiziert (Clay et al., 2010; Prince et al., 2007).

Das Krebsstammzellkonzept bietet Erklärungsansatz für eine Reihe von Tumoreigenschaften, ist aber selbst nicht unumstritten. Die klassische Formulierung des Konzepts geht davon aus, dass eine kleine Zahl von oft durch wenige Oberflächenmarker charakterisierte Stammzellen Tumorerhaltung und Proliferation steuern (Turner & Reis-Filho, 2012). Goldstandard zum Krebsstammzellnachweis ist die serielle Transplantation im Tiermodell (Clarke et al., 2006). Jedoch kann durch Wechsel des Mausstamms oder des Spiegels ihrer Immunsuppression die Zahl und der Typ der tumorbildenden Zellen beeinflusst werden (Quintana et al., 2008). Weiterhin wurde beobachtet, dass Nichtstammzell-Tumorzellen spontan stammzellartige Eigenschaften entwickeln können (Gupta et al., 2011).

Krebsstammzellen werden oft mit Therapieresistenz in Verbindung gebracht. Stammzeleigenschaften wie Expression von ABC Transportern und antiapoptischen Proteinen, erhöhte Toleranz gegen DNA Schäden und die Fähigkeit zur Quieszenz können zur Resistenz von Tumorzellen beitragen (Clevers, 2011). Es konnte gezeigt werden, dass Brustkarzinomzellen mit CD44^{high}CD24^{low} resistenter gegen konventionelle Chemotherapie (X. Li et al., 2008) und Radiotherapie (Phillips, McBride, & Pajonk, 2006) waren. Dennoch gibt es auch Hinweise, die gegen Therapieresistenz als generalisierte Eigenschaft von Stammzellen spricht. So reagieren undifferenzierte Keimzelltumore des Hodens sensibler auf

Bestrahlung und Cisplatingabe als ihre ausdifferenzierten Nachkommen (Masters & Koberle, 2003).

2.5 Therapie mit α -Strahlern

^{213}Bi an anti-CD33 gekoppelt wurde in der Klinik erstmals 2002 von Jurcic und Kollegen eingesetzt um spezifisch myeloisch leukämische Zellen abzutöten (Jurcic et al., 2002). Das Isotop ^{213}Bi gehört zu den α -Strahlern. Der Hauptvorteil dieser Strahlenart ist die mit 50-90 μm kurze Reichweite im Gewebe (Humm, 1986). Somit kann spezifisch lokal ein 100-1000-fach höherer Energietransfer als mit β -Strahlern eingesetzt werden, ohne umliegendes Gewebe stärker zu belasten (Sgouros, 2008). Der primäre Wirkmechanismus von α -Strahlern ist die Induktion von DNA Doppelstrangbrüchen (Sartor, Maalouf, Hauck, & Macklis, 2013). Ein zusätzlicher Vorteil besteht darin, dass die Doppelstrangbrüche komplexer, schwieriger zu reparieren und somit zytotoxischer sind als bei jeder anderen Strahlenart (Franken et al., 2012). Die bisher erfolgreichste klinische Anwendung von α -Strahlern gelang in einer Phase III Studie an 922 Patienten mit knochenmetastasierten Prostatakarzinom (Parker et al., 2013). Die Studie wurde nach einer Zwischenevaluation beendet, da durch sechsmalige Gabe des Isotops ^{223}Ra ein Gesamtüberleben 14,0 Monaten gegenüber 11,2 Monaten bei Placebo erzielt worden war.

2.6 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es resistente Kopf-Hals-Tumorzellen gegen 4 zielgerichtete und ein Chemotherapeutikum zu generieren und diese in Bezug auf Ansprechen auf weitere Chemo- oder Radiotherapie, Expression von Stammzellmarkern und Veränderung der Punktmutationsfrequenz zu untersuchen.

3. Material und Methoden

3.1 Material

Es folgt eine tabellarische Auflistung der verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien, Reagenzien und Chemikalien, Medien und Supplemente, Inhibitoren, Kits, Gemische und Computerprogramme.

3.1.1 Geräte

Geräte	Hersteller
Absaugpumpe Vacuubrand ME2	Vacuubrand GmbH, Wertheim, Deutschland
$^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ Generator	Institut für Transurane, Karlsruhe, Deutschland
Accu-Jet® pro	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Bestrahlungsgerät Gulmay Medical LTD RS 225 X-Ray Research System	Gulmay Medical LTD, Surrey, England
Blotting System Mini-PROTEAN® Tetra System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Brutschrank HeraCell 150i CO ₂ Inkubator	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
C1000 Thermo Cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Cellometer™ Auto T4	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
ELISA Reader Multiscan FC	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Eppendorf Research Pipetten 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Gefrierschrank Premium No frost	Liebherr, Biberach an der Riss, Deutschland
Kühlschrank comfort	Liebherr, Biberach an der Riss, Deutschland
Laborabzug	Köttermann GmbH & Co. KG, Uetze, Deutschland
Leica Mikroskop DMI6000 B	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Leica Mikroskopkamera DFC425 C	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Magnetrührer RCT basic	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Minishaker MS2	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Molecular Imager ChemiDoc™ XRS+	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

	Deutschland
NanoDrop 1000	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
pH-Meter 766 Calimatic	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Peqlab EV265	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Peqlab Gelkammer Model: 40-1515	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
PowerPac™ HC Powersupply	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Präzisionswaage SBC 32	Scaltec, Heiligenstadt, Deutschland
Ready Gel Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Rollenmischer	A. Hartenstein Laborbedarf GmbH, Würzburg, Deutschland
Rüttler Vibrax VXR	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Sterilbank HeraSafe KS	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Stickstofftank LS 4800	Taylor-Wharton Germany GmbH, Husum, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Trans-Blot® SD Semi Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Vilber E-Box	Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland
Wärmeschrank	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Wasserbad Typ 1003	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge 5430R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge PerfectSpin Mini	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland

Tabelle 1: Geräte

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
15 ml Falcon Reaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland
50 ml Falcon Reaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland
Biosphere Micro Tubes 1,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland
FrameStar® 96 PCR Platte	4titude®, Wotton, Großbritannien
Kryoröhrchen	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland
Pasteurpipetten aus Glas	Brand GmbH + Co KG, Wertheim,

	Deutschland
PCR Seal	4titude®, Wotton, Großbritannien
PD-10 Chromatographiesäulen	GE Healthcare, München, Deutschland
Pipetten-Spitzen 1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran	Merck Millipore GmbH, Darmstadt, Deutschland
Serologische Pipetten 25 ml, 10 ml, 5 ml	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
SD100 Cellometer Zählkammern	Nexcelom Bioscience LLC, Lawrence, MA, USA
Tissue Culture Dish 100x20 mm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Tissue Culture Plate 6-well	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Whatmann Gel Blotting Papier	Sartorius stedim biotech, Göttingen, Deutschland
Zellschaber	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

3.1.3 Reagenzien und Chemikalien

Reagenzien und Chemikalien	Hersteller
1,4 Dithiotreitol (DTT) ≥ 99,9% p.a.	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
1% Bromphenol Blau	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Aminocaprinsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ammoniumacetat, 0,4 M	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ammoniumperoxidsulfat (APS) ≥ 98%	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Bovine Serum Albumin 2 mg/ml	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Bradford 1x Dye Reagent	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Cell Lysis Buffer (10x)	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
CutSmart® Buffer	New England BioLabs®, Ipswich, Ma, USA
Crystal Violet	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Demineralisiertes Wasser	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn, Deutschland
DNTP's	GE-Healthcare, München, Deutschland

Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Ethanol ≥ 99,5% p.a.	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Ethylnitroseharnstoff	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Formaldehyd-Lösung ≥ 37% säurefrei	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Glycerol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Glycin ≥ 99%	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Hexanukleotid Mix 10x	Roche, Mannheim, Deutschland
HCl, 0,1 M	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Kapa SYBR® Fast qPCR Master Mix	Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA
Natriumchlorid ≥ 99,8%	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Natriumiodid, 0,1 M	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
NEBuffer 4	New England BioLabs®, Ipswich, Ma, USA
NH ₄ Cl 500 mM	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Magermilchpulver	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland
Maxima Reverse Transkriptase 200 U/μl, 10000 U	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Methanol ≥ 99,5% p.a.	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Protease Inhibitory Cocktail (10x)	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese® Gel - Acrylamidstammlösung 30% mit 0,8% Bisacrylamide	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
RT Buffer	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Taq ^{ql} 100000 U/ml	New England BioLabs®, Ipswich, Ma, USA
TBE Puffer 10x	Invitrogen, Waltham, MA, USA
Tris Pufferan® ≥ 99,9% p.a.	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Tris EDTA Buffer Solution, pH 8.0	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Tween-20	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 3: Reagenzien und Chemikalien

3.1.4 Medien und Supplemente

Medien und Supplemente	Hersteller
TrypLE™ Express (1x) Stable Trypsin	GIBCO®, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
DMEM - Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium	GIBCO®, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
DPBS - Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	GIBCO®, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
DMSO - Dimethylsulfoxid ≥ 99,5%	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
FBS - Fetal Bovine Serum	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
HAT Medium	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
HT Medium	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Glutamine 200 mM	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml Penicillin und 10000 µg/ml Streptomycin)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

Tabelle 4: Medien und Supplemente

3.1.5 Inhibitoren

Inhibitor	Ziel	Hersteller
Afatinib	EGFR	Selleckchem, Houston, TX, USA
BEZ-235	mTOR/PI3K	Adooq Bioscience, Irvine, CA, USA
Cisplatin Teva	DNA Schäden	Teva GmbH, Radebeul, Deutschland
Mk-2206	AKT	Adooq Bioscience, Irvine, CA, USA
Olaparib	PARP1	Selleckchem, Houston, TX, USA
Cetuximab Chelatkomplex	EGFR	Merck Serono, Darmstadt
U0126	MEK 1/2	Selleckchem, Houston, TX, USA
SB203580	p38 MAP Kinase	Selleckchem, Houston, TX, USA

Tabelle 5: Inhibitoren

3.1.6 Kits

Kits	Hersteller
------	------------

DNA Isolation Kit for Cells and Tissue	Roche, Mannheim, Deutschland
PathScan® EFGR Signaling Antibody Array Kit (Fluorescent Readout)	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
PathScan® RTK Signaling Antibody Array Kit (Fluorescent Readout)	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
RNeasy Mini Kit	Quiagen, Hilden, Deutschland

Tabelle 6: Kits

3.1.7 Gemische

Gemische	Hersteller
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 ad 100 ml destilliertem Wasser + Essigsäure zur pH Einstellung
1 M Tris-Cl pH 6,8	12,1 g Tris ad 100 ml destilliertem Wasser + Essigsäure zur pH Einstellung
10% APS	1 g APS ad 10 ml destilliertem Wasser
5x SDS Probenpuffer	3,125 ml Tris pH 6,8 + 386 mg DTT + 1g SDS + 0,5 ml 1% Bromphenol Blau + 5 ml Glycerol + 1,375 ml destilliertes Wasser
10x SDS Laufpuffer für 1 Liter	30,3 g Tris + 140,42 g Glycin + 50 ml 20% SDS ad 1000 ml destilliertem Wasser
10x TBS für 1 Liter	24,2 g Tris + 80 g NaCl ad 1000ml destilliertem Wasser + Essigsäure zu Einstellung des pH auf 7,6
10 % Tween	10 ml Tween-20 ad 100 ml DPBS
Blockingpuffer für 1 Liter	100 ml 10x TBS + 10 ml 10% Tween + 50 g Magermilchpulver + 890 ml destilliertes Wasser
Waschpuffer für 1 Liter	100 ml 10x TBS + 10 ml 10% Tween + 890 ml destilliertes Wasser
Anodenpuffer I pH 10,5	18,16 g Tris + 100 ml Methanol ad 500 ml destilliertes Wasser
Anodenpuffer II pH 10,4	1,51 g Tris + 100 ml Methanol ad 500 ml destilliertes Wasser
Kathodenpuffer pH 7,5	1,51 g Tris + 100 ml Methanol + 2,62 g e-amino-n-caproic acid ad 500 ml destilliertem Wasser
Strippingpuffer für 1 Liter	100 ml Methanol + 100 ml Essigsäure + 800 ml destilliertes Wasser
Proteinzellysepuffer	9 ml destilliertes Wasser + 1 ml 10x Cell Lysis Buffer, 1 mM PMSF, 1 mM Proteinase Inhibitor Cocktail

Tabelle 7: Gemische

3.1.8 Computerprogramme

Computerprogramme	Hersteller
CFX Manager Software	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Image Lab Software 5.1	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Microsoft Office Professional plus	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Prism GraphPad 6.0	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA
Quantity One Software 4.6.9	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Software Cellometer Auto T4	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland

Tabelle 8: Computerprogramme

3.1.9 PCR Primer

Die folgenden Primer wurden von MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Es sind jeweils die forward (5'→3'), reverse (5'→3') und die Annealing Temperatur angegeben

Primer	Sequenz	Annealing Temp. [°C]
APOBEC2 forward	CCA GGC TGC TCT GAA GAA GC	60
APOBEC2 reverse	AGG CCT TGG ATT CAC CCT CT	60
APOBEC3A forward	TGG CAT TGG AAG GCA TAA GAC	60
APOBEC3A reverse	TTA GCC TGG TTG TGT AGA AAG	60
	C	
APOBEC3B forward	GAC CCT TTG GTC CTT CGA C	60
APOBEC3B reverse	GCA CAG CCC CAG GAG AAG	60
APOBEC3C forward	GGA ACG AAA CTT GGC TGT GC	60
APOBEC3C reverse	CAG AAT CCA CCT GGT TTC GG	60
BRCA2 forward	AGA AGA AAC AAA GGC AAC GC	60
BRCA2 reverse	TGA GAA CAC GCA GAG GGA AC	60
GAPDH forward	GTG AAG GTC GGA GTC AAC GG	60
GAPDH reverse	TGA TGA CAA GCT TCC CGT TCT	60
	C	
MLH1 forward	GTG CTG GCA ATC AAG GGA	57
	CCC	
MLH1 reverse	CAC GGT TGA GGC ATT GGC	57
	TAG	
MSH2 forward	CAG TAT ATT GGA GAA TGC CA	60

MSH2 reverse	AGG GCA TTT GTT TCA CC	60
MSH6 forward	AAC AAG GGG CTG GGT TAG	60
MSH6 reverse	CGT TGC ATT GCT CTC AGT ATT TC	60
MYC1 forward	TAT GTG GAG CGG CTT CTC G	60
MYC1 reverse	TGG GCT GTG AGG AGG TTT G	60
PARP1 forward	CCT GAT CCC CCA CGA CTT T	60
PARP1 reverse	GCA GGT TGT CAA GCA TTT C	60
POL_D1 forward	ATC CAG AAC TTC GAC CTT CCG	60
POL_D1 reverse	ACG GCA TTG AGC GTG TAG G	60
POL_i forward	AGT GTT GCC CAC ACC AAA TG	60
POL_i reverse	GTT GAA CCC CTA AAG GTT TGT CT	60
POL_K forward	TGG CAG TAT TTC ATT TCT TGT CA	60
POL_K reverse	TTT GAA TTA CAC ATT TTC TCT TGA GG	60
RAD51 forward	GCT GGG AAC TGC AAC TCA TCT	60
RAD51 reverse	GCA GCG CTC CTC TCT CCA GC	60
RAD52 forward	AGA CCT CTG ACA CAT TAG CCT TGA A	60
RAD52 reverse	AAG ATC CAG ATT TTG CTT GTG GTT	60
RMC Kontrollprimer forward	CAC TGA CAA CCA CCC TTA ACC	60
RMC Kontrollprimer reverse	TCA GCA TCT TAT CCG AGT GGA	60
RMC mutationsspez. Primer forward	CAA GCA GGG GAG GCC TTT T	60
RMC mutationsspez. Primer reverse	TCC TGG CTA ACG GTG AAA CC	60
STAT1 forward	CAG CAG CTT GAC ACA CGG TA	60
STAT1 reverse	AAA CAC CAA AGT GGC ATG TGA	60
STAT3 forward	CGG CTG AAT TTC GGC ACC T	60

STAT3 reverse	CAGTAACGATGAGAGGACCCT	60
TET1 forward	ACC CCC TGT CAC CTG CTG AGG	57
TET1 reverse	GCG ATG GCC ACC CCA CCA AT	57
TET2 forward	TCA CAC CAG GTG CAC TTC TC	60
TET2 reverse	GGA TGG TTG TGT TTG TGC TG	60
TDG forward	GGC TAA TTG AGA GCG TGG AG	60
TDG reverse	GCA TGG CTT TCT TCT TCC TG	60
TOP1 forward	CGA AAA GAG GAA AAG GTT C	57
TOP1 reverse	GGG CTC AGC TTC ATG ACT TT	57
TOP2A forward	CTC CAC GAG AAA CAG AGC CA	57
TOP2A reverse	ACC GGT AGT GGA GGT GGA AG	57
XPC forward	ACA CCT ACT ACC TCT CAA ACC	60

Tabelle 9: PCR Primer

3.1.10 Primärantikörper

Primärantikörper	Verdünnung	Hersteller
ALDH1	1:1000	New England BioLabs®, Ipswich, Ma, USA
APOBEC3B	1:1000	Cell Signaling Technology (Danvers MA, USA)
p-AKT	1:500	New England BioLabs®, Ipswich, Ma, USA
Bmi1	1:1000	New England BioLabs®, Ipswich, Ma, USA
DNA Polymerase iota	1:1000	Cell Signaling Technology (Danvers MA, USA)
p-EGFR Tyr 1068	1:2500	New England BioLabs®, Ipswich, Ma, USA
p-Erk 1/2, Thr202/Thyr204	1:1000	New England BioLabs®, Ipswich, Ma, USA
Nanog	1:2000	New England BioLabs®, Ipswich, Ma, USA
Oct4	1:1000	New England BioLabs®, Ipswich, Ma, USA

p-p38 Tyr180/Tyr182	MAPK	1:500	Cell Signaling Technology (Danvers MA, USA)
Sox2		1:2000	New England BioLabs®, Ipswich, Ma, USA
p-Stat3 Tyr705		1:1000	Cell Signaling Technology (Danvers MA, USA)
Tubulin		1:1000	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Tabelle 10: Primärantikörper

3.2 Methoden

Sofern nicht anders verzeichnet wurden die folgenden Versuche drei Mal ausgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte in Prism 6.0. Als Hypothesentest wurde der t-Test und one-Way ANOVA mit einem Signifikanzniveau $p < 0,05$ verwendet.

3.2.1 Zellkultur

Alle Zellen wurden in einem Hera Cell Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die zur Zellkultur nötigen Arbeitsschritte wurden in einer Hera Safe Sterilbank durchgeführt. Sterilität wurde durch Reinigung mit 70% Ethanol erreicht. Alle Medien und Reagenzien wurden vor Gebrauch in einem Wasserbad Typ 1003 auf 37°C erwärmt. Als Medium wurde Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium eingesetzt (DMEM) welches mit 10% fetalem Kälberserum (FCS), 100 µg/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin und 2mM Glutamin versetzt wurde. Zur Spülung der Zellen wurde phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) verwendet. Die Zellzahl wurde in einem Cellometer Auto T4 bestimmt.

3.2.1.1 Auftauen von Zellen

Die bei -196°C in Stickstoff kryokonservierten Zellen wurden im Wasserbad erwärmt und in einen 15ml Falcon mit 6 ml angewärmten Medium überführt. 1 ml hiervon wurde mit 6 ml in eine 10cm Schale überführt. Am nächsten Tag wurde ein Medienwechsel durchgeführt.

3.2.1.2 Splitten von Zellen

Bei Standardkultiveringung wurde eine 10 cm Zellschale bei 60-80% Konfluenz gesplittet. Dazu wurde das Medium abgesaugt und einmal mit 5 ml PBS durchgespült. Nach Absaugen wurde 2 ml TrypLE dazugegeben. Nach 10 Minuten waren die Zellen abgelöst und konnten mit 5 ml frischem Medium mit einer Auslaufpipette in einen Falcon überführt werden. Durch auf- und abpipettieren konnten die Zellen vereinzelt werden. Abschließend wurde ca. 0,7 ml der Suspension in eine mit 7 ml befüllte 10 cm Kulturschale ausgesät.

3.2.1.3 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen von einer 10 cm Schale abgelöst und in ein 15 ml Falcon überführt. Dieser wurde bei 15000 rpm 5 Minuten zentrifugiert und das Medium abgesaugt. Das Zellpellet wurde mit Einfriermedium (20% FCS, 5% DMSO) resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Danach wurde das Röhrchen in einen Mr. Frosty bei -80°C 24h heruntergekühlt und zur Langzeitkonservierung in Stickstoff gelagert.

3.2.1.4 Bemerkung zur Kultivierung der resistenten Zellen

Wenn nicht anders beschrieben wurden die resistenten Zellen mit der finalen Dosis des jeweiligen Inhibitors bei jedem Splitten oder Medienwechsel beimpft. Beim Aussähen der langzeitbehandelten Klone für die Experimente wurde der Inhibitor nicht mehr gegeben.

3.2.3 Kristallviolettassay

5000 Zellen wurden in 6-well-Platten ausgesät und mit den Inhibitoren behandelt. Nach 10 Tagen wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 2 ml 4% Formaldehyd/PBS Lösung für 10 Minuten fixiert. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur ausgeführt. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml 0.1% Triton-X-100/ PBS Lösung und danach 2 ml destilliertem Wasser gespült. Dann wurden die Zellen mit 2 ml 0.04% Kristallviolett (in 4% Ethanol) für 10 Minuten angefärbt und wieder mit 2 ml destilliertem Wasser gespült. Mit 2 ml 1% SDS wurde das Kristallviolett auf einem Rüttler gelöst und mittels Bestimmung der Lichtabsorption bei 590 nm quantifiziert.

3.2.4 Klonogener Assay

500 Zellen wurden in 6-well-Platten ausgesät und mit Inhibitor behandelt. Nach 10 Tagen wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 2 ml 4% Formaldehyd/PBS Lösung für 10 Minuten fixiert. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur ausgeführt. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml 0.1% Triton-X-100/ PBS Lösung und danach 2 ml destilliertem Wasser gespült. Die angefärbten Kolonien wurden per Hand gezählt.

3.2.5 Bestimmung der IC₅₀ Konzentrationen

Die Bestimmung der IC₅₀ Konzentrationen erfolgte mittels Kristallviolettassay. Dazu wurden 5000 Zellen in einer 6-well-Platte ausgesät und nach 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen des jeweiligen Therapeutikums beimpft. Zur Quantifizierung des Zellüberlebens wurde wie oben beschrieben der Kristallviolettassay durchgeführt. Die IC₅₀ Konzentrationen wurden durch nichtlineare Regression und Mittelwertbildung drei Mal bestimmt.

3.2.6 Züchtung der resistenten Zellen

Um die resistenten Zellen zu züchten wurde in den Zelllinien Cal27 und UD-SCC-5 mit der IC_{50} Konzentration der fünf Chemo- und zielgerichteten Therapien begonnen (IC_{50} bei Cal27/UD-SCC-5: Afatinib 3.45/2.24 nM, MK2206: 0.21/0.18 μ M, BEZ235 9.21/5.45 nM, Cisplatin: 1.00/1.96 μ M, Olaparib 8.96/7.06 μ M). Die Dosis wurde schrittweise über 6 Monate erhöht, wann immer die Zellen einen Proliferationsschub zeigten. Gegen Ende wurde die Dosis wieder leicht gesenkt bis die Zellen proliferierten und bereit für die nachfolgenden Versuche waren.

3.2.7 Bestimmung der Proliferationsgeschwindigkeit

Zum Vergleich der Proliferationsgeschwindigkeiten wurden 5000 unbehandelte und resistente Zellen in einer 6-well-Platte ausgesät. Nach 10 Tagen wurde der Kristallviolettassay durchgeführt.

3.2.8 Behandlung mit γ -Strahlung

Für die Bestrahlungsexperimente wurden 5000 unbehandelte und resistente Zellen (alle bis auf resistente BEZ235) in einer 6-well-Platte ausgesät. Nach 24h wurden die Zellen im Bestrahlungsgerät RS 225 X-Ray (Spannung: 70 kV, Stromstärke: 10 mA, Tischhöhe 466 cm, Filter Nr. 3) mit einer Dosis zwischen 0,5 und 10 Gy bei Raumtemperatur bestrahlt. Die Kontrollpopulation wurde nicht bestrahlt. Anschließend wurde das Zellüberleben mittels Kristallviolett wie oben beschrieben bestimmt.

3.2.9 Behandlung mit α -Strahlung

3.2.9.1 Labeling von Cetuximab mit ^{213}Bi

Der α -Strahler ^{213}Bi wurde aus einem $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ Generator mit 0,1 M HCl und 0,1 M NaCl eluiert (Apostolidis, Molinet, Rasmussen, & Morgenstern, 2005; Morgenstern, Bruchertseifer, & Apostolidis, 2012). Zu dieser Lösung wurde das Chelat aus dem anti-EGFR monoklonalem Antikörper Cetuximab und CHX-A"-DTPA (N-[(R)-2-Amino-3-(p -Isothiocyanatophenyl)propyl]-trans-(S,S)-Cyclohexan-1,2-di-amin-N,N,N',N'',N''-Diethylentriaminpentaessigsäure) gegeben und 7 Minuten bei Raumtemperatur in 0,4M Ammoniumacetat bei pH 5,3 inkubiert. Nicht gebundene ^{213}Bi Ionen wurden durch Gel-Permeations-Chromatographie entfernt. Wie von Nikula und Kollegen beschrieben, wurde zur Sicherstellung einer Bindungseffizienz von 95% eine Dünnschichtchromatographie in einem Gamma-Zähler durchgeführt (Nikula et al., 1995).

3.2.9.2 Bindungseffizienz von ²¹³Bi – Cetuximab an Zellen

Zur Untersuchung der Bindungseffizienz an die Zellen wurden 3 x 10⁶ Zellen mit 100 ng ²¹³Bi – Cetuximab für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Als Zelllinien wurden unbehandelte und mit Afatinib und Cisplatin langzeitbehandelte Zellen verwendet. Zusätzlich wurden für 2 Wochen ohne Therapeutikum inkubierte auf Afatinib und Cisplatin resistente Zellen untersucht. Durch Zentrifugation bei 1200 rpm für 3 Minuten konnte ein Zellpellet gewonnen werden. Durch Vergleich der Aktivität im Überstand und dem Zellpellet in einem Gamma-Zähler wurde der Anteil an ungebundenem ²¹³Bi – Cetuximab bestimmt.

3.2.9.3 Ansprechen auf ²¹³Bi – Cetuximab in Vergleich zu Röntgenstrahlung

Für die Experimente wurden 5000 Zellen in einer 6-well-Platte ausgesät. Als Zellen wurden die im vorherigen Abschnitt genannten untersucht. Nach 24h wurden die Zellen mit 2 Gy γ -Strahlung bestrahlt, 1h vorher mit 2 Gy bestrahlt und dann mit 1 mCi ²¹³Bi – Cetuximab behandelt, oder nur mit ²¹³Bi – Cetuximab behandelt. Jeweils eine Kontrollpopulation wurde weder bestrahlt noch behandelt. Die Behandlung ²¹³Bi – Cetuximab erfolgte durch Zugabe von 1 mCi Aktivität und 24h Inkubation bei 37°C. Dann wurde das Medium abgesaugt, einmal mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versorgt. Anschließend wurde das Zellüberleben mittels Kristallviolett und klonogenem Assay wie oben beschrieben bestimmt.

3.2.10 Kombinationsversuche

Für die Kombinationsexperimente wurden 5000 resistente Zellen in einer 6-well-Platte ausgesät und nach 24h mit der IC₅₀ Konzentrationen der fünf Chemo- und zielgerichteten Therapien beimpft. Zur Quantifizierung der überlebenden Zellen wurde wie oben beschrieben der Kristallviolettassay durchgeführt.

3.2.11 Expression auf RNA-Ebene

Um die RNA-Expression zu bestimmen wurden in 10 cm Schalen je nach Versuch 0,9 bis 2,0 x 10⁶ Zellen ausgesät. Für die Versuche mit Afatinib, Cisplatin, Ruxolitinib und IL-6 wurden die Zellen nach 24h mit dem jeweiligen Inhibitor behandelt (*Tabelle 11*). Ruxolitinib wurde nach 24h dazugegeben und 1h später mit Afatinib oder Cisplatin behandelt. Nach 24h oder 168h wurden die RNA bzw. Proteine wie unten beschrieben isoliert.

	Cal-27	UD-SCC-5
Afatinib (2x IC ₅₀)	6,9 nM	4,5 nM
Cisplatin (2x IC ₅₀)	2,0 nM	3,9 nM
Ruxolitinib	25 nM	25 nM
Interleukin-6	10 pg/ml	10 pg/ml

Tabelle 11: Verwendete Konzentrationen für die Beimischung

3.2.11.1 RNA Isolation

Die RNA Isolation wurde mit dem RNeasy-Kit durchgeführt. Dazu wurde das Medium aus einer 10 cm Schale abgesaugt und die Zellen mit PBS gespült. Anschließend wurde 500 µl Lysepuffer (mit 1:100 Mercaptoethanol versetzt) dazugegeben und die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst. Das Lysat wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 1 Volumen 70% Ethanol aufgefüllt und gut durchmischt. Anschließend wurde das Lysat auf die Spinsäule gegeben und bei 12000 rpm für 15 Sekunden zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde verworfen, 700 µl RW1 Puffer auf die Spinsäule gegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wieder bei 12000 rpm für 15 Sekunden zentrifugiert und die Flüssigkeit verworfen. Jetzt wurde die Spinsäule mit 500 µl RPE Puffer versetzt und bei 12000 rpm für 15 Sekunden zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde verworfen und die Spinsäule erneut mit 500 µl RPE Puffer versetzt. Nun wurde bei 12000 rpm für 1 Minute zentrifugiert. Nach Verwerfen der Flüssigkeit wurde die Säule auf ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt, mit 150 µl RNase freiem Wasser versetzt und 1 Minute inkubiert. Das Eluat wurde nach einer Minute Zentrifugation mit 12000 rpm gewonnen und bei -80°C gelagert. Die Konzentration wurde mit dem Nanodrop 1000 bestimmt.

3.2.11.2 cDNA Synthese

Zur cDNA Synthese wurde ein RNA-Mix (Tabelle 12) auf Eis hergestellt, so dass das Gesamtvolumen 14,5 µl betrug.

Reagenz	Volumen [µl]	Konzentration
RNA	X	250 ng
10x Hexamere	1	1
10 mM dNTPs	1	0,2 mM
Aquadest	X	
Volumen insgesamt	14,5	

Tabelle 12: RNA-Mix

Der RNA-Mix wurde 5 Minuten bei 65°C inkubiert und auf Eis gestellt. Dann wurden 5,5 µl des Enzym Mixes (Tabelle 13) zum RNA-Mix pipettiert:

Reagenz	Volumen [µl]	Menge
Maxima rev. Transkriptase	1	200 Units
5x rev Transkriptase Puffer	4	
Aquadest	0.5	

Volumen	5.5
----------------	-----

Tabelle 13: Enzym Mix

Anschließend wird der Mix für 10 Minuten bei 25°C und dann 30 Minuten bei 50°C inkubiert. Die Synthese wird durch 5 minütiges Kochen bei 85°C beendet und die cDNA bei -20°C gelagert.

3.2.11.3 RNA Expression mit qPCR

Die mRNA Expression wurde mithilfe einer quantitativen PCR bestimmt. Dazu wurde 1 µl cDNA mit 12,5 µl SYBR Green Mastermix, 10,5 µl UV-irradiertem Aqua dest. und 1 µl 20 pM Primer versetzt und auf einer 96-well-Platte mit folgendem Protokoll gestartet:

Schritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95 °C	10 Minuten
44 Zyklen	95 °C	30 Sekunden
	60 °C	30 Sekunden
	72 °C	10 Sekunden
Schmelzkurve	65°C bis 95°C	5 Sekunden

Tabelle 14: PCR Protokoll zur mRNA Expressionsanalyse

Als Housekeeping Gen diente GAPDH. Die Expression wurde nach $\Delta\Delta C_T$ Methode quantifiziert.

3.2.12 Expression aus Proteinebene

3.2.12.1 Proteinisolation

Zur Proteinisolation wurde das Medium der 10 cm Kulturschale abgesaugt, mit PBS gespült und die Zellen mit 600 µl Proteinzelllysepuffer versetzt. Nach Ablösen mittels Zellschaber wurde das Lysat für 5 Minuten auf Eis gegeben und anschließend 10 Sekunden gevortext. Anschließend wurde das Lysat bei 10.000 Umdrehungen bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde bei -80°C konserviert.

3.2.12.2 Bradford-Assay

Zuerst wurden die Lysate mit PBS 1:10 verdünnt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 20 µl davon mit 180 µl PBS und 200 µl 0,01% Triton X-100 versetzt. Zur Ermittlung der Standardkurve wurden folgende Verdünnungen einer Lösung aus 0,2 mg/ml BSA und 0,01% Triton X-100 hergestellt:

BSA in Lösung [µg]	0,2 mg/ml BSA Lösung [µl]	0,01% Triton X-100 [µl]
0	0	400
2	10	390
4	20	380
6	30	370
8	40	360

Tabelle 15: Lösung von BSA als Standardkurve

Anschließend wurden 600 µl einer 1:4 Verdünnung des Bradford Reagenz zu den Proben und zu den Verdünnungen der Standardkurve hinzugegeben, gevortext und bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert. Die Quantifizierung erfolgte nach Messung der Extinktion im ELISA Multiscan FC bei 595 nm und Vergleich mit der Standardkurve.

3.2.12.3 SDS-Gelelektrophorese

Zur Größenauftrennung der Proteine verschiedener Größen wurden folgende Laufgele verschiedener Dichten verwendet:

	7,5%	10,0%	12,5%
Aquadest	7,15 ml	8,3 ml	5,0 ml
Acrylamid	6,35 ml	6,65 ml	10,5 ml
1 M Tris-HCL, pH 8,8	9,35 ml	5,0 ml	9,35 ml
20% SDS	125 µl	125 µl	125 µl
10% APS	125 µl	125 µl	125 µl
TEMED	50 µl	50 µl	50 µl

Tabelle 16: Zusammensetzung der Laufgele unterschiedlicher Dichte

Jeweils 4,4 ml wurden in eine Kammer gefüllt und mit Isopropanol aufgefüllt. Nach 10 Minuten Polymerisation wurde das Stacking Gel (*Tabelle 17*) mit Kamm eingefüllt.

	5,0%
Aquadest	7,0 ml
Acrylamid	1,672 ml
1 M Tris-HCL, pH 8,8	1,252 ml
20% SDS	50 µl
10% APS	100 µl
TEMED	25 µl

Tabelle 17: Zusammensetzung Stacking Gel

15 µg Protein wurden im Verhältnis 5:1 mit dem 5x SDS Probenpuffer versetzt und bei 98°C für 5 Minuten denaturiert. Anschließend wird das Gel im Mini-PROTEAN Tetra System bei 120 V zwischen 3 und 4 Stunden im SDS Laufpuffer laufen gelassen.

3.2.12.4 Western Blot

In Semidry-Methode wurden die im Gel befindlichen Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran übertragen. Dazu wurde die Membran für 5 Minuten in Methanol eingelegt und mit destilliertem Wasser gespült. Zum Blot wurde ein Stapel wie folgt hergestellt:

Anode
6 Stück Whatman Paper getränkt in Anodenpuffer I
3 Stück Whatman Paper getränkt in Anodenpuffer II
PVDF Membran
Gel mit aufgetrennten Proteinen
3 Stück Whatman Paper getränkt in Kathodenpuffer
Kathode

Abbildung 4: Schematische Darstellung des Blot Stapels

Als Reagenzien wurden verwendet Anodenpuffer I, Anodenpuffer II, Kathodenpuffer. In der Trans-Blot SD Semi Dry Transferzelle wurden die Proteine bei 225 mA in etwa 80 Minuten auf die Membran übertragen.

3.2.21.5 Immundetektion

Nach Blockierung der Membran mit Blockingpuffer wurde diese für 1h mit einem Antikörper inkubiert. Nach 12h auf einen Rollenmixer bei 4°C wurde die Membran drei Mal für jeweils 7 Minuten in Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde der sekundäre, mit Peroxidase markierter, Anti-IgG Antikörper im Blockingpuffer gelöst dazugegeben. Danach wurde die PVDF Membran für eine Minute in 10 ml SuperSignal WestPico Chemilumineszenz Substrat inkubiert und die Banden im Molecular Imager ChemiDoc XPS+ sichtbar gemacht. Als Bearbeitungssoftware wurde Image Lab Software 5.1 verwendet.

3.2.13 Signaling Arrays

Für die Versuche mit den Signaling Arrays wurden jeweils 1×10^7 Zellen ausgesät. Für beide Zelllinien Cal27 und UD-SCC-5 wurde jeweils Proteine einer Kontrolle, Afatinib und MK2206 langzeitbehandelter Klone unter der finalen Resistenzdosis, Afatinib und MK2206 Klone die für 2 Wochen ohne die finale Dosis und Afatinib und MK2206 Klone die für 2 Wochen zunächst ohne Inhibitor und wieder für 24h mit der finalen Dosis behandelt wurden, isoliert.

3.2.13.1 Auswertung der Signaling Arrays

Alle Reagenzien waren dem Kit beiliegend. Alle Schritte wurden bei Raumtemperaturen ausgeführt. Nach Proteinisolation und Bradford-Assay wurden die Proteinlysate mit dem Array Diluent Buffer auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt. Nach Zusammenbau wurden 150 µl Array Blocking Buffer in jedes Well gegeben. Das Array wurde mit Folie verschlossen und 15 Minuten auf einem Rüttler inkubiert. Der Überstand wurde entfernt und 150 µl Proteinlysate in jede Kammer gegeben. Das Array wurde abermals verschlossen und auf dem Rüttler für 2h inkubiert.

Der Überstand wurde verworfen und insgesamt 5x mit 200 µl Array Wash Buffer 5 Minuten inkubiert. Dann wurde 150 µl Detection Antibody Cocktail hinzugegeben und für 1h auf dem Rüttler inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und das Array abermals 5x mit 200 µl Array Wash Buffer für 5 Minuten inkubiert und gewaschen. Nun erfolgte die Zugabe von 150 µl HRP linked Straptavidin in jedes Well und die Inkubation für 30 Minuten auf dem Rüttler. Der Überstand wurde verworfen und wieder 5x mit 200 µl Array Wash Buffer für 5 Minuten inkubiert und gewaschen. Das Array wurde nun auseinandergebaut und die Glasplatte 2 Minuten in WestPico Chemilumineszenz Lösung inkubiert. Die Dots wurden im Molecular Imager ChemiDoc XPS+ sichtbar gemacht.

3.2.14 Random Mutation Capture Assay

3.2.14.1 Behandlung von Cal27 mit Ethylnitroseharnstoff

Eine 70% konfluente 10 cm Zellschale mit Cal27 Zellen in 10 ml DMEM Medium wurde mit 500 µg/ml Ethylnitroseharnstoff beimpft. Nach drei Stunden wurde die DNA wie oben beschrieben isoliert. Der Versuch wurde einmal durchgeführt.

3.2.14.2 DNA Isolation

Die DNA Isolation wurde wie im Roche Kit beschrieben durchgeführt. Das Medium einer 70% konfluenten Zellschale wurde entfernt und mit PBS gespült. Mit TrypLE wurden die Zellen abgelöst, 5 ml PBS hinzugefügt und in einen 50 ml Falcon transferiert. Bei 1,5 g wurden die Zellen für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde in 10 ml PBS resuspendiert und gewaschen. Wieder wurde ein Pellet durch zehn minütige Zentrifugation bei 1,5 g und 4°C gewonnen. Dann wurde 3 ml Zelllysepuffer pro $1 \cdot 10^7$ Zellen dazugegeben und gevortext. Anschließend wurde 2 µl Proteinase K Lösung pro $1 \cdot 10^7$ Zellen dazugegeben und gevortext. Nun wurde die Probe bei 65°C für 2h inkubiert und in Eis abgekühlt. Pro $1 \cdot 10^7$ Zellen wurden dann 100 µl RNase Lösung dazugegeben und gevortext. Die Zellen wurden dann bei 37°C für 15 Minuten inkubiert.

Jetzt wurde 1,2 ml Proteinpräzipitationslösung pro $1 \cdot 10^7$ Zellen hinzugefügt und gevortext. Die Probe wurde für 5 Minuten auf Eis gelegt. Dann wurde die Probe auf Eppendorfgefäße verteilt und bei 14900 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in einen neuen 50 ml Falcon überführt. Nun wurden 0.7 Volumen Isopropanol dazugegeben und die Phasen vermischt. Anschließend wurde die Probe über Nacht bei 4°C gelagert. Am nächsten Tag wurde die Probe bei 1,4 g für 10 Minuten und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml 70% Ethanol gewaschen. Dann wurde wieder mit 1,4 g für 5 Minuten zentrifugiert. Wieder wurde der Überstand verworfen und die Probe für 5 Minuten an der Luft getrocknet. Das Pellet wurde in 1 ml TE Puffer resuspendiert und für 2h bei 50°C inkubiert. Die isolierte DNA wurde bei 4°C gelagert.

3.2.14.3 Random mutation capture assay

Der Random mutation capture assay wurde mit kleineren Variationen wie von Wright und Kollegen beschrieben durchgeführt (Wright et al., 2011). Zuerst wurde eine Standardkurve mit DNA unbehandelte UD-SCC5 Zellen aufgestellt. Die Menge an DNA wurde mithilfe des Nanodrops bestimmt. Eine 4er Verdünnungsserie mit 50000 Kopien beginnend wurde hergestellt. Zur Verdünnung wurde TE-Puffer, pH 8,0 verwendet. Anschließend wurde eine qPCR mit Reaktionsvolumen von 25 µl mit 12,5 µl Kapa SYBR Green Master Mix, 7,25 µl UV-bestrahltes, doppelt deionisiertes Wasser, 0,25 µl 20 pM Primer und folgendem Protokoll durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95 °C	10 Minuten
57 Zyklen	95 °C	30 Sekunden
	65 °C	30 Sekunden
	74 °C	10 Sekunden
Schmelzkurve	65°C bis 95°C	5 Sekunden

Tabelle 18: PCR Protokoll für RMC Assay

Die Linearität der Standardkurve wurde durch Auftragen von C_T gegen eine willkürliche Kopienzahl überprüft. Die neunte 4er Verdünnung, in der statistisch nur noch eine Kopie pro Well zu erwarten war, wurde ausgewählt und eine qPCR mit 36 Ansätzen dieser Verdünnung gestartet. Ob ein Well eine Kopie erhielt wurde mittels Schmelzkurve bestimmt. Nach der Poissongleichung ergibt sich die mittlere Zahl der Kopien pro Well nach:

$$\frac{\text{Kopienzahl}}{\text{Well}} = -\ln \frac{\#\text{negativer Wells}}{\#\text{überprüfter Wells}} = -\ln \frac{\#\text{negativer Wells}}{36}$$

Abbildung 5: Berechnung der Kopienzahl pro Well

So wie von Wright und Kollegen beschrieben wurden anschließend der Taq^{qI} Verdau durchgeführt (Wright et al., 2011). Die DNA der resistenten Klone wurde isoliert und $24 \cdot 10^6$ Kopien in einem Eppendorfgefäß präpariert, so dass das Gesamtvolumen 800 µl betrug (Tabelle 19).

Substanz	Volumen [µl]
DNA	X
BSA	8
NEBuffer 4	80
Taq^{qI}	8
Doppelt deionisiertes Aquadest	X

Tabelle 19: Zusammensetzung des Verdauansatzes

Die DNA wurde für drei Stunden in einem Eppendorf Thermomixer bei 750 rpm verdaut. Danach wurde 8 µl Taq^{qI} hinzugegeben und der Verdau insgesamt neun Mal durchgeführt. Vor der dritten, fünften und siebten Zugabe von Taq^{qI} wurde eventuell präzipitiertes BSA mit einer Pipettenspitze entfernt, die Probe in ein neues Eppendorfgefäß überführt und 8 µl BSA hinzugefügt. Der von Wright beschriebene Pufferwechsel mit den YM-50 Microcon Zentrifugenfilter wurde nicht durchgeführt, da in vorausgehenden Versuchen eine große Menge an DNA verloren ging (Wright et al., 2011).

Anschließend wurde die Taq^{qI} Effizienz mit einer 4er Verdünnung (200 µl DNA und 600 µl TE-Puffer) und dem mutationsspezifischen Primer getestet. Es wurde die Verdünnung herausgesucht, bei der nach Schmelzkurvenanalyse im Mittel nur noch eine Kopie pro Well erhalten war. Dann wurde mit dem mutationsspezifischen Primer und dieser Verdünnung eine qPCR mit 93 Wells präpariert. Es wurden 2 Wells mit DNA aus der Standardkurve als Positiv- und 1 Well mit Aqua dest. als Negativkontrolle verwendet. Mastermix und Protokoll wurden wie oben beschrieben verwendet. Bei nach Schmelzkurve vermutetem positivem Well wurde ein post PCR Verdau durchgeführt. Dazu wurden 5 µl des Produkts des Wells, 0,25 µl Taq^{qI}, 0,2 µl CutSmart und 1,55 µl doppelt deionisiertes Aqua dest. eingesetzt. Der Verdau wurde in der PCR-Maschine mit folgendem Protokoll durchgeführt: 1. 10 Minuten bei 65°C; 2. 1 Minute bei 95°C; 3. 1 Minute bei 25°C. Die nachverdauten Proben wurden auf ein 2% Agarosegel (gelöst in TBE Puffer) aufgetragen und bei 180 V für 2h in TBE Puffer laufen gelassen. Mutationsspezifische Produkte wurden durch den Nachverdau nicht zerschnitten und es wurde nur eine Bande bei 154 Basenpaaren sichtbar. War keine Mutation vorhanden, so waren zwei Banden mit 64 und 90 Basenpaaren sichtbar.

Als nächstes wurde die Zahl der DNA Kopien pro Well der Verdünnung bestimmt. Dazu wurde die Standardkurve und die 4¹-4⁴ Verdünnung in einer PCR mit dem Kontrollprimer präpariert. Mithilfe der Standardkurve wurden die C_T Werte der 4¹-4⁴ Verdünnungen in Kopienzahlen umgerechnet.

Nun konnte die Mutationsfrequenz folgendermaßen errechnet werden:

$$\text{Mutationsfrequenz} = \frac{\# \text{detektierten Mutationen}}{\text{Kopienzahl pro Well} * \# \text{gescreenter Wells} * 4}$$

Abbildung 6: Berechnung der Mutationsfrequenz

Insgesamt wurden 777 Mutationen auf dem Agarosegel detektiert. Daraus wurde eine Zufallsstichprobe mit 100 Mutationen ausgewählt und zum Sequenzieren (MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland) geschickt.

3.2.15 Mechanismus der genetischen Veränderung

3.2.15.1 Gen Expressions Microarray

UD-SCC-5 Zellen wurden ohne Medienwechsel für 24 oder 168 Stunden mit Afatinib oder Cisplatin in IC₅₀ Dosis behandelt (Afatinib 2,24 nM, Cisplatin 1,96 µM). Die RNA wurde wie oben beschrieben extrahiert. Der RNA Gehalt und die Qualitätskontrolle wurde mittels des Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) mithilfe eines RNA 6000 Nano Chip Kits durchgeführt. Die RNA wurde amplifiziert und mithilfe des Low Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies) nach Herstellerprotokoll mit Cy3 gelabeled. Die Hybridisierung für Verwendung mit dem SurePrint G3 Human Gene Expression 8x60 Microarray (Agilent Technologies) wurde mit dem Gene Expression Hybridization Kit (Agilent Technologies) durchgeführt.

3.2.15.2 Auswertung der Microarray Daten

Die Daten wurden mithilfe der Genespring Software GX 12.5 (Agilent Technologies) ausgewertet. Der Median der dreifachen Wiederholung wurde verwendet und eine logarithmische Transformation zur Basis 2 durchgeführt ($\log_2(A/B) = \log_2(A) - \log_2(B)$). In der Hauptkomponentenanalyse zeigte sich eine homogene Verteilung. Gene mit mindestens einer 1,5-fachen, signifikanten Veränderung (Abhängiger t-Test, $p < 0.05$) wurden für die weitere Analyse ausgewählt. Die Heatmap wurde mittels des Morpheus Webtool erstellt (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>). Eine Gene ontology Analyse wurde mittels WebGestalt durchgeführt (Jing Wang, Vasaikar, Shi, Greer, & Zhang, 2017).

3.2.15.3 HPRT Assay

Der Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase (HPRT) Assay wurde wie von Johnson beschrieben durchgeführt (Johnson, 2012). Zur Vorbereitung wurden UD-SCC-5 Zellen 3 Tage in HAT Medium bebrütet. Anschließend wurden die Zellen 24 Stunden in HT Medium inkubiert. Dann erfolgte ein Wechsel auf DMEM und Stimulation mit Afatinib, Cisplatin und U0126 (IC_{50} Afatinib 2,24 nM, IC_{50} Cisplatin 1,96 μ M, U0126 25,0 μ M, SB203580 10 μ M). Danach wurde auf DMEM gewechselt und die Zellen für 14 Tage kultiviert. Die Zellen wurden in 96 Wells (0,75 Zellen/0,200 μ l) mit 0,6 μ g/ml 6-Thioguanin über 14 Tage inkubiert. Anschließend wurde das Medium gewechselt und die Zellen für weitere 14 Tage in DMEM Medium kultiviert. Kolonien ab einer Zellzahl von 20 wurden gezählt und gegenüber einer nicht stimulierten Kontrolle normalisiert.

4. Ergebnisse

4.1 Bestimmung der IC50 Werte

Um die Wirksamkeit der fünf Chemo- und zielgerichteten Therapien zu untersuchen wurden die Zellen der beiden Zelllinien ausgesät, mit unterschiedlichen Konzentrationen der Substanzen im mikro- beziehungsweise nanomolaren Bereich beimpft und die Proliferation nach 10 Tagen mithilfe des Kristallviolettassays bestimmt. *Abbildung 7* zeigt die bestimmten Graphen für Cal27.

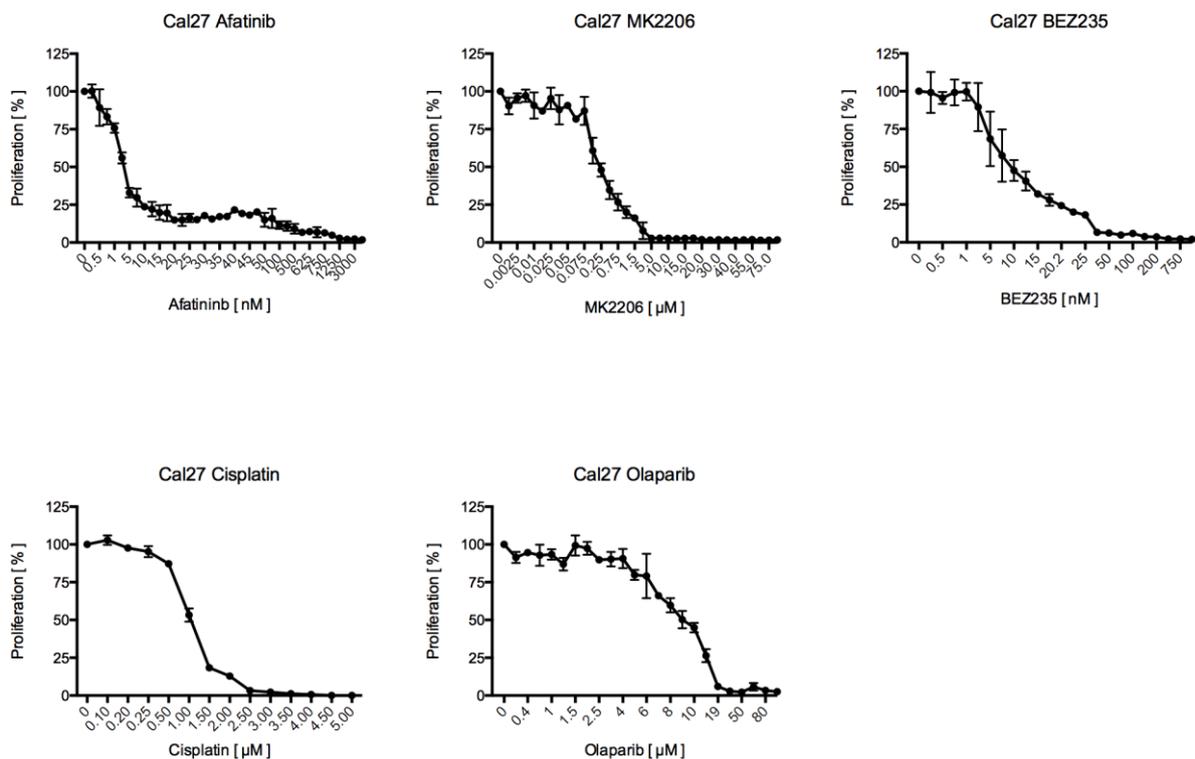


Abbildung 7: Proliferation von Cal27 bei einmaliger Gabe der fünf Chemo- und zielgerichteten Therapien

Während die meisten Kurven den klassischen sigmoiden Verlauf einer Dosis-Wirkungsbeziehung folgten und bei hohen Dosen asymptotisch gegen Null strebten, fällt man bei Afatinib Behandlung von Cal27 ein Plateau von etwa 20 bis 1000 nM auf. Dieses Plateau ergab sich, wenn auch weniger deutlich, ebenfalls bei Afatinib Beimpfung von UD-SCC-5 (*Abbildung 8*).

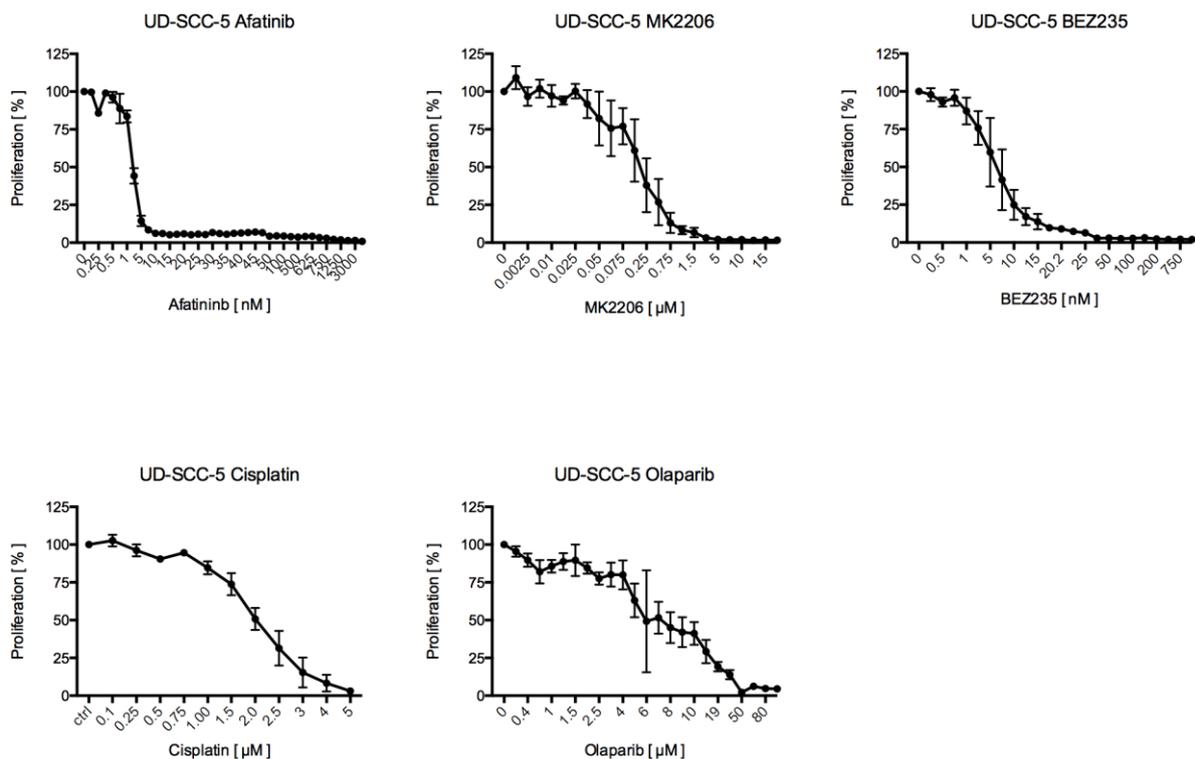


Abbildung 8: Proliferation von UD-SCC-5 bei einmaliger Gabe der fünf Chemo- und zielgerichteten Therapien

In *Tabelle 20* sind die mit nichtlinearem Fitting bestimmten IC_{50} Konzentrationen der fünf Chemo- und zielgerichteten Therapien für beide Zelllinien eingetragen.

IC_{50}	Cal27	UD-SCC-5
Afatinib [nM]	3,45	2,24
MK2206 [μ M]	0,21	0,18
BEZ235 [nM]	9,21	5,45
Cisplatin [μ M]	1,00	1,96
Olaparib [μ M]	8,96	7,06

Tabelle 20: IC_{50} Konzentration der fünf Substanzen

Alle Inhibitoren zeigen Wirkung und können die Proliferation in entsprechender Dosis effektiv hemmen. Während die EGFR-Signalweginhibitoren Afatinib, MK2206 und BEZ235 bereits im nanomolaren Bereich ihre Wirkung zeigten, ist für die primär DNA-schädigenden Substanzen Cisplatin und Olaparib eine 5 bis 4000-fach höhere Dosis nötig.

Von den Absolutwerten gesehen scheint UD-SCC-5 mit Ausnahme von MK2206 und Cisplatin mit 17-40% geringeren IC_{50} Konzentrationen chemosensibler zu reagieren. Wobei anzumerken ist, dass für UD-SCC-5 zwar eine fast doppelt so hohe IC_{50} Konzentration bestimmt wurde, die Zellen aber im Gegensatz zu Cal27 zweimal beim Start der

Resistenzentwicklung abstarben, so dass mit einer Konzentration $0,5x IC_{50}$ gestartet werden musste.

4.2 Entwicklung der resistenten Zellen

Zur Entwicklung der resistenten Zellen wurde die Dosis der fünf Chemo- und zielgerichteten Therapien schrittweise über 6 Monate erhöht. Meistens zeigten die Zellen nach einer Dosiserhöhung nur geringe Proliferation. Innerhalb von Tagen bis Wochen begannen die Zellen dann wieder zu wachsen, woraufhin die Dosis erneut erhöht wurde. Diese Entwicklung stellt *Abbildung 9* in einer logarithmischen Auftragung des erreichten vielfachen der IC_{50} Dosis gegen die Zeit der Behandlung dar. Jeder Punkt des Graphen repräsentiert ein Splitting der Zellen.

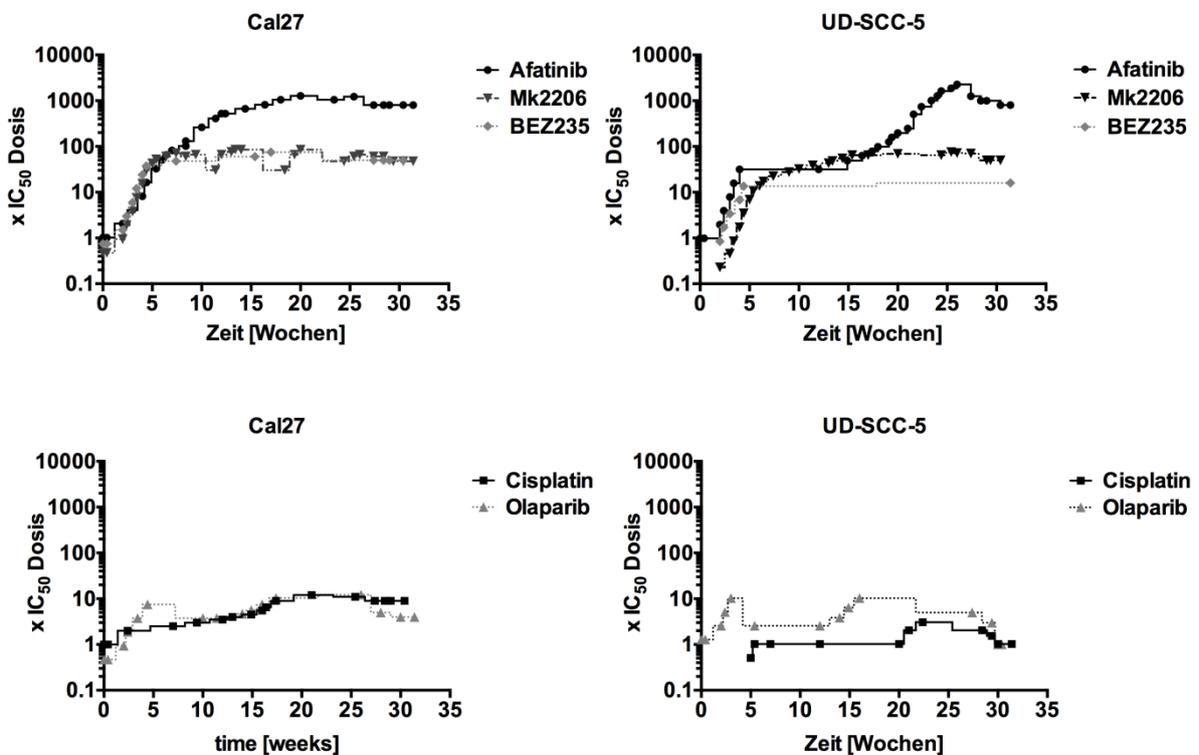


Abbildung 9: Zeitentwicklung der resistenten Zellen

Tabelle 21 zeigt die final erreichten IC_{50} Dosen.

x IC_{50} Dosis	Afatinib	Mk2206	BEZ235	Cisplatin	Olaparib
Cal27	800	47	50	9	4
UD-SCC-5	800	50	16	1	1

Tabelle 21: Final erreichte Dosen in Vielfachen der IC_{50} Konzentration

Die resistenten Zellen ließen sich in zwei Gruppen aufteilen: Klone die gegen die im EGFR Signalweg vorkommenden Ziele gerichtet waren, konnten weit höher gesteigert werden, als Klone die auf die DNA-schädigende Substanzen resistent waren. So wurde in Cal27 mit Afatinib eine finale Dosis von 800x der IC₅₀ Konzentration erreicht. Für MK2206 und BEZ235 betragen sie 47x IC₅₀ bzw. 50x IC₅₀. Dagegen wurde für Cisplatin und Olaparib nur eine Dosis von 9x IC₅₀ bzw. 4x IC₅₀ erreicht. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich für UD-SCC-5. Hier wurde für Afatinib, MK2206 und BEZ235 eine finale Konzentration von 800x, 50x und 16x der IC₅₀ Konzentration erreicht, während bei Cisplatin und Olaparib die Zellen nur bei 1x IC₅₀ proliferierten und keine Steigerung innerhalb des Zeitraums möglich war. Es ist anzumerken, dass bei Entwicklung der UD-SCC-5 resistenten Zellen mit BEZ235 nach 20 Wochen sich die Zellen zu vereinzeln begannen und eine farblose Schicht bildeten. Sie waren kaum mehr ohne Hilfe eines Zellschabers abzulösen. Eine Färbung auf Kollagen I und II war negativ (Daten nicht gezeigt). Da Proliferation eine Voraussetzung für die nachfolgenden Versuche war wurde eine Zellpopulation mit 4 Wochen Behandlung und einer Konzentration von 16x IC₅₀ aufgetaut.

4.3 Langsamere Proliferation resistenter Zellen

Zum Vergleich der Proliferationsgeschwindigkeit der resistenten Zellen wurde eine gleiche Zellzahl ausgesät und die Proliferation mittels Kristallviolettassay bestimmt (*Abbildung 10*).

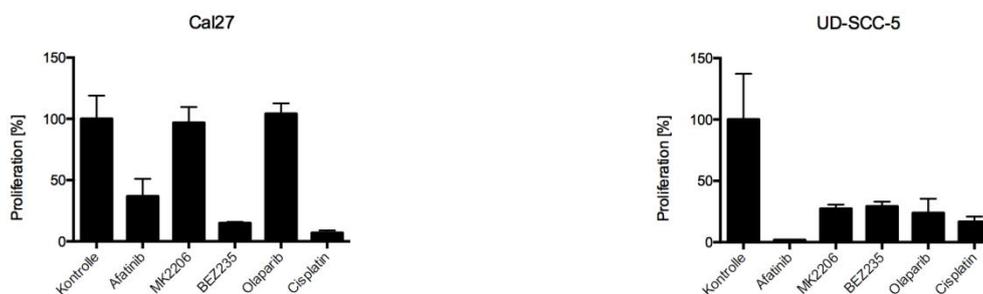


Abbildung 10: Proliferationsgeschwindigkeit von Cal27 und UD-SCC-5

Resistente UD-SCC-5 Klone zeigen alle eine deutlich langsamere Proliferation gegenüber unbehandelten Zellen. Mit Ausnahme von MK2206 und Olaparib resistenten Zellen sind auch Cal27 Zellen in ihrem Wachstum deutlich verlangsamt.

4.4 Morphologische Veränderungen nach Langzeitbehandlung

Es ließen sich in den resistenten Klonen auch morphologische Veränderungen beobachten. So waren bei unbehandelten UD-SCC-5 Klonen enge Zell-Zellkontakte und eine teilweise basal-apikale Ausrichtung festzustellen (*Abbildung 11, links*). Mit Afatinib langzeitbehandelte

Zellen zeigten dagegen abgerundete Zellkörper, podozytäre Ausläufer der Zytoplasmamembran und weitere Zell-Zellkontakte (Abbildung 11, rechts).

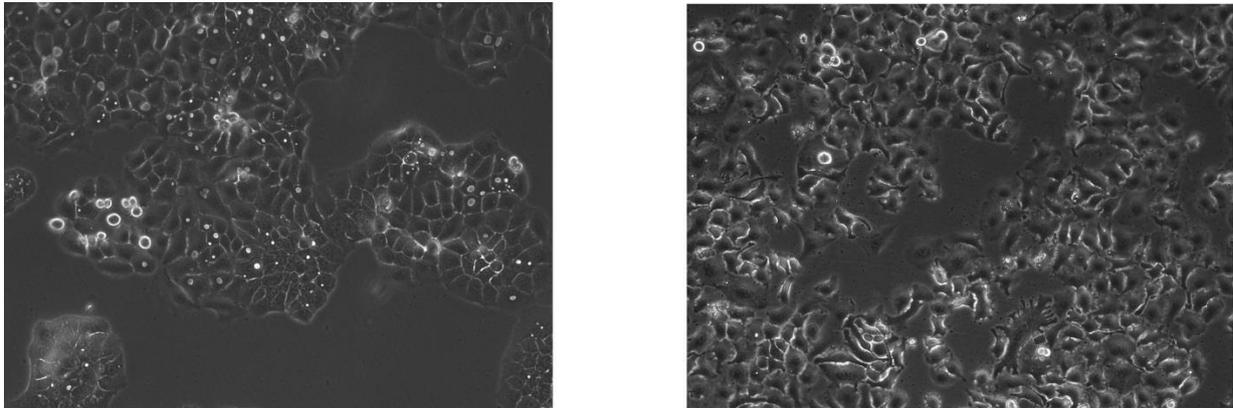


Abbildung 11: links: Morphologische Änderungen von Cal27. Links: unbehandelt, rechts: Cal27 Afatinib resistent

4.5 Sensibilität resistenter Zellen auf Röntgenstrahlung

Um Änderungen in der Strahlenkinetik der resistenten Klone zu erfassen wurden Zellen von 0,5 bis 10 Gy bestrahlt und mit einer unbehandelten Kontrolle verglichen (Abbildung 12).

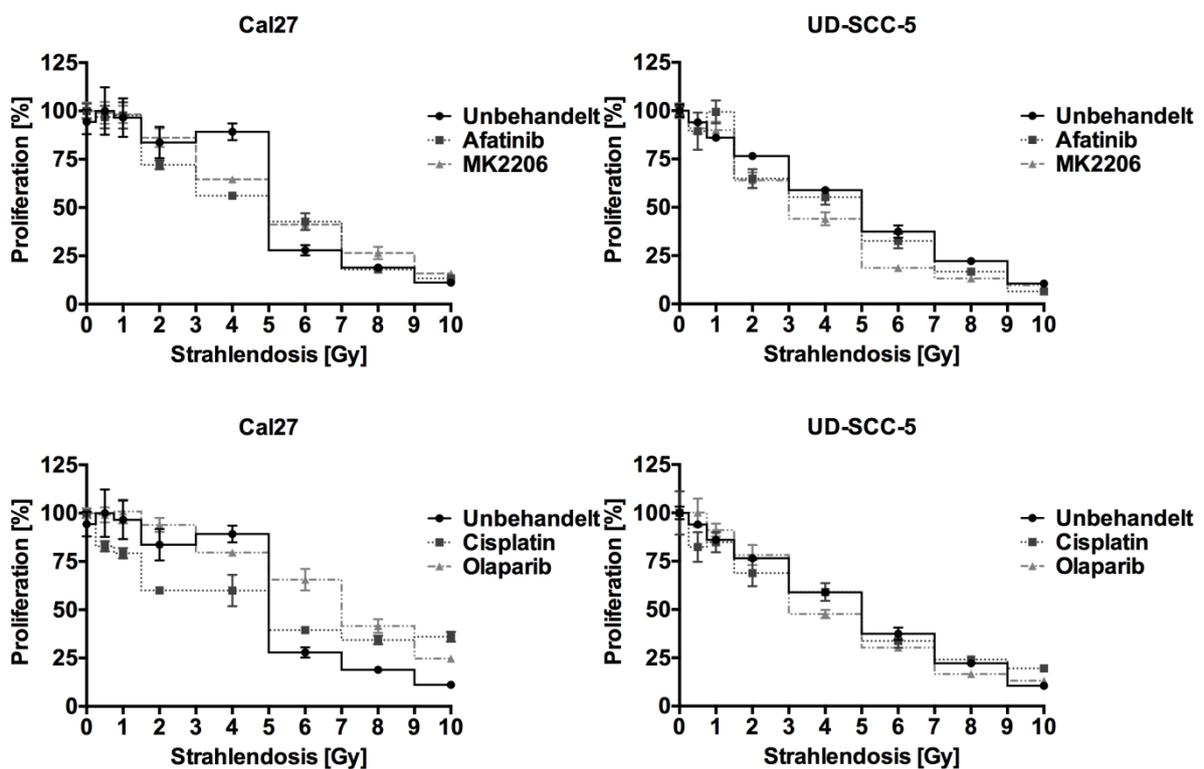


Abbildung 12: Wenig Veränderung in der Strahlenkinetik von 0 bis 10 Gy

Insgesamt waren dabei bei allen langzeitbehandelten Zelllinien nur geringe Änderungen festzustellen. So lagen die Änderungen im Strahlenansprechen auf die Proliferation bei auf

Cisplatin und Olaparib resistenten UD-SCC-5 Klonen bei unter 15%. Größere Änderungen von um 10-30% waren lediglich bei Cal27 Cisplatin und Olaparib resistenten Zellen und hohen Strahlendosen (>6Gy) bestimmbar.

Dieses Bild zeigte sich auch bei Bestimmung der Area under the curve (AUC) unter der Strahlenkinetik für alle resistenten Zelllinien im Vergleich zu den unbehandelten Klonen (Abbildung 13).

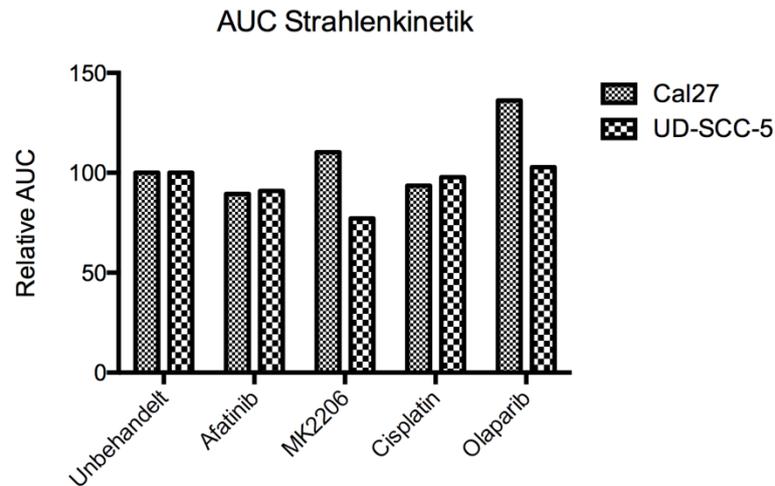


Abbildung 13: Marginale Änderungen in der AUC

Die größte Änderung in der AUC war hier bei Olaparib resistenten Cal27 Zellen mit einem Zuwachs von etwa 40% zu sehen. Die größte Änderung in Strahlensensibilität war bei MK2206 langzeitbehandelten UD-SCC-5 Zellen mit einem Verlust in der AUC von 20% zu sehen.

4.6 Resistenz gegen α -Strahler von mit Cisplatin und Afatinib langzeitbehandelte Zellen

In Tabelle 22 sind die Bindungseffizienzen eingetragen.

Bindungseffizienz [%]	Cal27	UD-SCC-5
unbehandelt	84	82
Afatinib resistent unstimuliert	84	79
Afatinib resistent stimuliert	86	
Cisplatin resistent unstimuliert	85	66
Cisplatin resistent stimuliert		77

Tabelle 22: Bindungseffizienz von ^{213}Bi – Cetuximab

Mit „resistent unstimuliert“ sind hier die resistenten Klone nach 2 wöchiger Kultivierung ohne Therapeutikum bezeichnet. Mit „resistent stimuliert“ sind langzeitbehandelte Klone die mit finaler Dosis der Substanz kultiviert wurden, bezeichnet. Bei den beiden fehlenden Einträgen waren zu wenige Zellen zur Messung vorhanden. Aufgrund des nur kurzen Zeitfensters der Verfügbarkeit des Generators konnten die Versuche nicht wiederholt werden.

Die Bindungseffizienz betrug im Durchschnitt 84,8% für Cal27 und 76,0% für UD-SCC-5. Es zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen unbehandelten und resistenten Zellen. Ebenso fanden sich keine Unterschiede zwischen stimulierten und unstimulierten Zellen. Ähnliche Ergebnisse ergaben sich bei UD-SCC-5 mit einer mittleren Bindungseffizienz von 76,0%. Hier jedoch war mit 66% Effizienz bei Cisplatin resistenten und 77% bei stimulieren Cisplatin resistenten eine kleinere Differenz festzustellen.

Abbildung 14 zeigt die Auswertung der Proliferation.

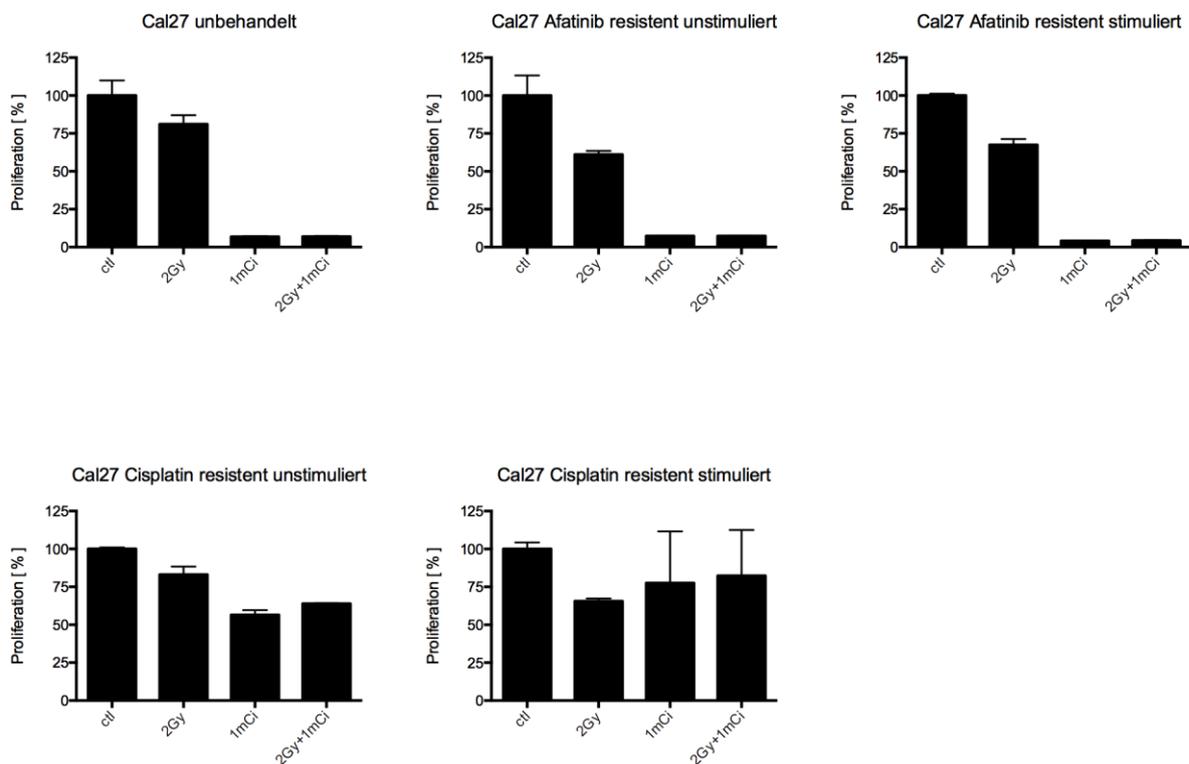


Abbildung 14: α -Strahlenresistenz in Proliferation von mit Cisplatin langzeitbehandelten Zellen

Während die Proliferation durch eine Bestrahlung mit γ -Strahlung in beiden unbehandelten Zelllinien nur etwa um 20% gesenkt werden kann, kann diese deutlich mit dem α -Strahler ^{213}Bi – Cetuximab und der Kombination aus α - und γ - Strahlung gesenkt werden. Diese

deutliche Senkung der Proliferation zeigte sich auch bei den mit Afatinib langzeitbehandelten Cal27 Zellen, wesentlich weniger jedoch bei Cisplatin resistenten Klonen beider Zelllinien und auch bei den Afatinib resistenten UD-SCC-5 Zellen (Abbildung 15).

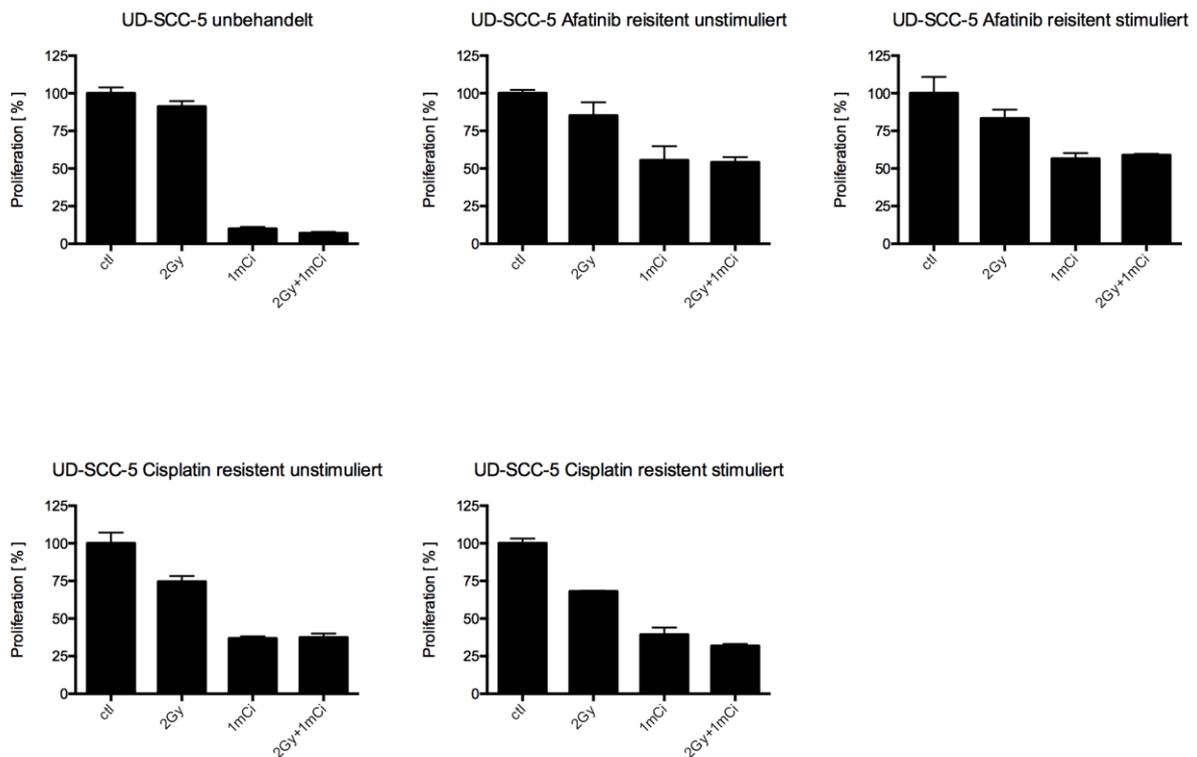


Abbildung 15: α -Strahlenresistenz in Proliferation von Cisplatin und Afatinib resistenten Zellen

So betrug die Proliferation bei unbehandelten UD-SCC-5 Klonen bei Gabe des α -Strahlers etwa 10% der Kontrolle. Bei Afatinib resistenten UD-SCC-5 Zellen und Applikation von ^{213}Bi – Cetuximab dagegen etwa 50% der Kontrolle. Wieder ergaben sich keine wesentlichen Differenzen zwischen stimulierten und unstimulierten Zellen. Es war kein bedeutsamer Vorteil einer Kombination aus α - und γ - Strahlung festzustellen.

In *Abbildung 16* sind die Ergebnisse des klonogenen Überlebens von Cal27 aufgetragen. Während durch Gabe von ^{213}Bi – Cetuximab auf unbehandelte Cal27 Zellen weniger als 5% der Kolonien überlebten, stieg diese Zahl bei den resistenten Klonen auf ca. 15 bis 40%. Auch in der Proliferation fanden sich wenige Unterschiede zwischen stimulierten und unstimulierten Klonen.

Im klonogenen Überleben waren bereits unbehandelte UD-SCC-5 resistenter gegen α -Bestrahlung (*Abbildung 17*)

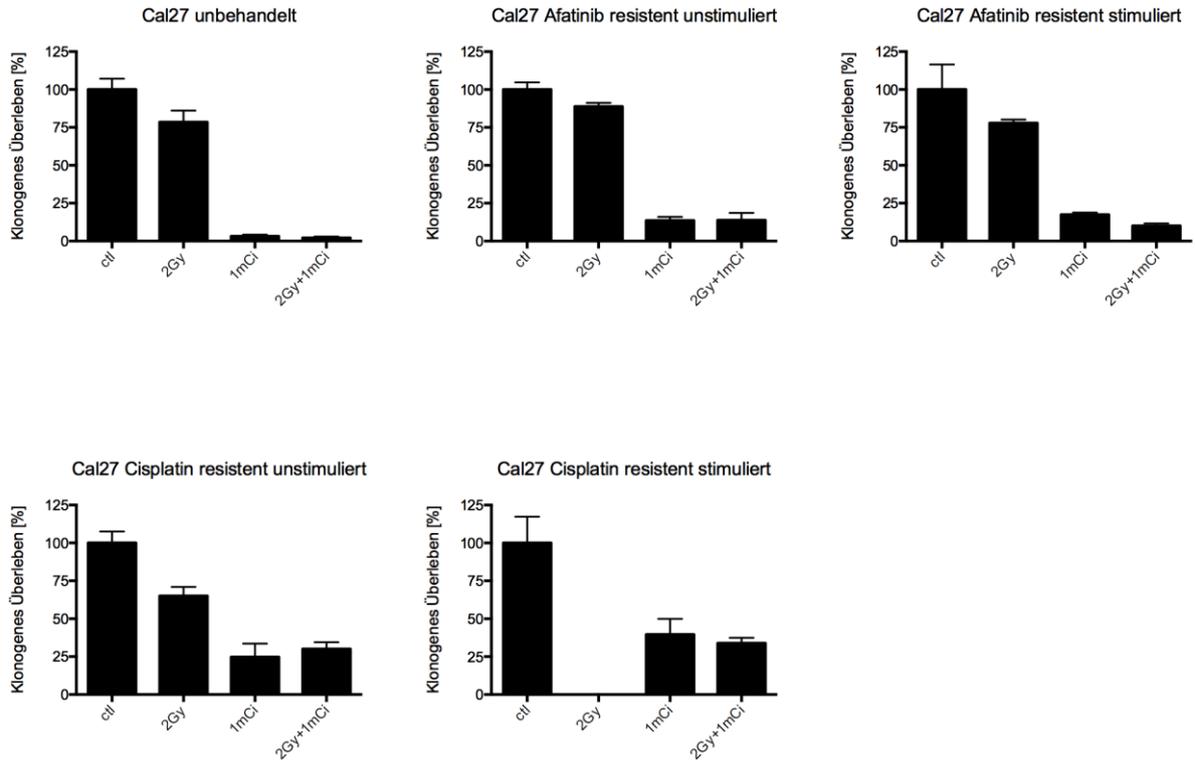


Abbildung 16: Klonogenes Überleben von unbehandelten und resistenten Cal27 Zellen

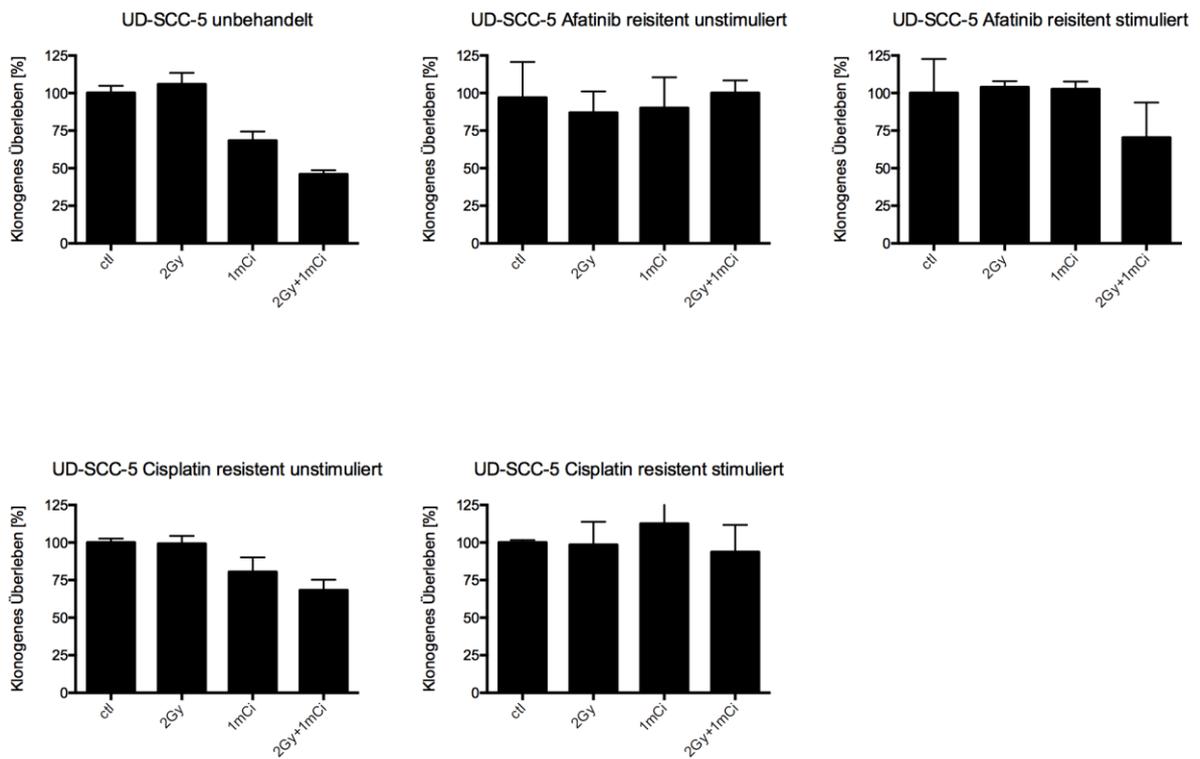


Abbildung 17: Klonogenes Überleben von unbehandelten und resistenten UD-SCC-5 Zellen

So konnte die Applikation von ^{213}Bi – Cetuximab bei unbehandelten UD-SCC-5 die Kolonienzahl nur um etwa 30% reduzieren. Zusätzlich war bei UD-SCC-5 im Gegensatz zur Proliferation auch ein Unterschied in der Kombination zu sehen. Obwohl eine Dosis von 2 Gy kaum Einfluss auf die Kolonienzahl hatte konnte die Kombination aus α - und γ -Bestrahlung die Zahl der Kolonien mit 40% gegenüber der Kontrolle stärker senken als nur die α -Bestrahlung mit etwa 60% der Kontrolle. Bei langzeitbehandelten Zellen zeigte sich ein ähnliches, wenn auch nicht so deutliches Bild wie in der Proliferation. Bei Langzeitbehandelten Zellen überlebten mehr Kolonien eine α - oder α - und γ -Bestrahlung als bei der unbehandelten Kontrolle. Wieder ergaben sich nur wenige Differenzen zwischen stimulierten und unstimulierten Zellen.

4.7 Kreuzresistenz bei gegen EGFR-Signalweginhibitoren resistenter Zellen, Multiresistenz bei gegen DNA-schädigende Substanzen resistenter Zellen

Um Veränderungen der Sensitivität bei Gabe von Chemo- und zielgerichteten Therapien zu erfassen wurden die langzeitbehandelten Zellen einmalig mit der IC_{50} Dosis aller Substanzen behandelt und die Proliferation bestimmt.

Bei Gruppeneinteilung in DNA-schädigende Substanzen und EGFR Signalweghemmer fand sich, dass letztere eine Art Kreuzresistenz gegen die jeweils anderen verwendeten EGFR Signalweghemmer zeigten (*Abbildung 18 und 19*).

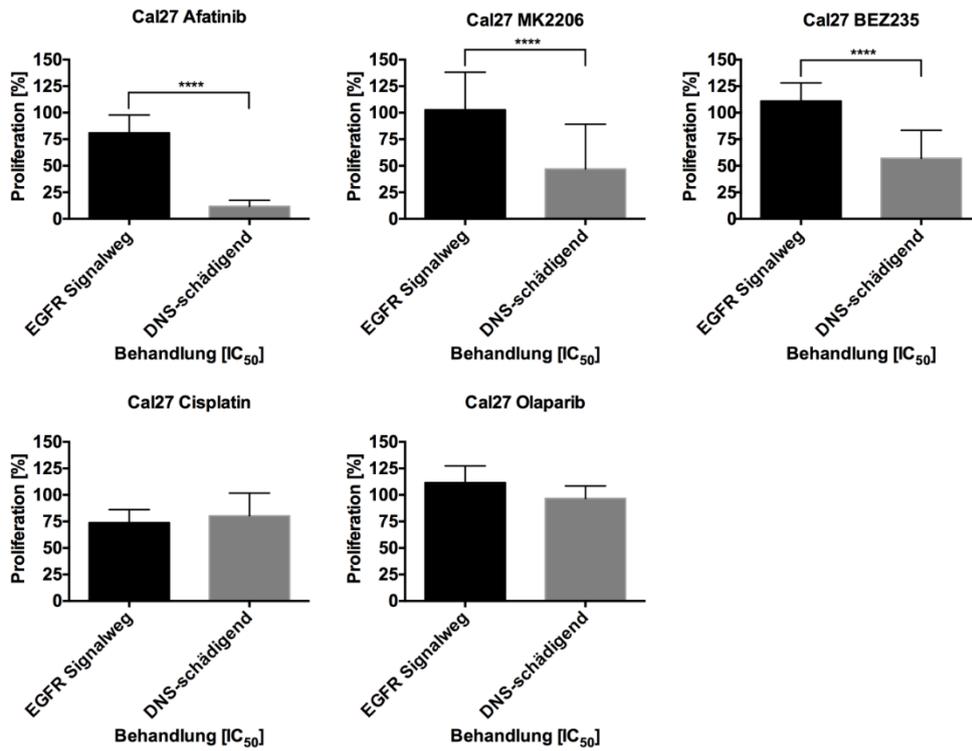


Abbildung 18: Langzeitbehandelte Cal27 Zellen mit EGFR Signalweg Inhibitoren „krezresistent“, mit DNA-schädigenden Substanzen "multiresistent"

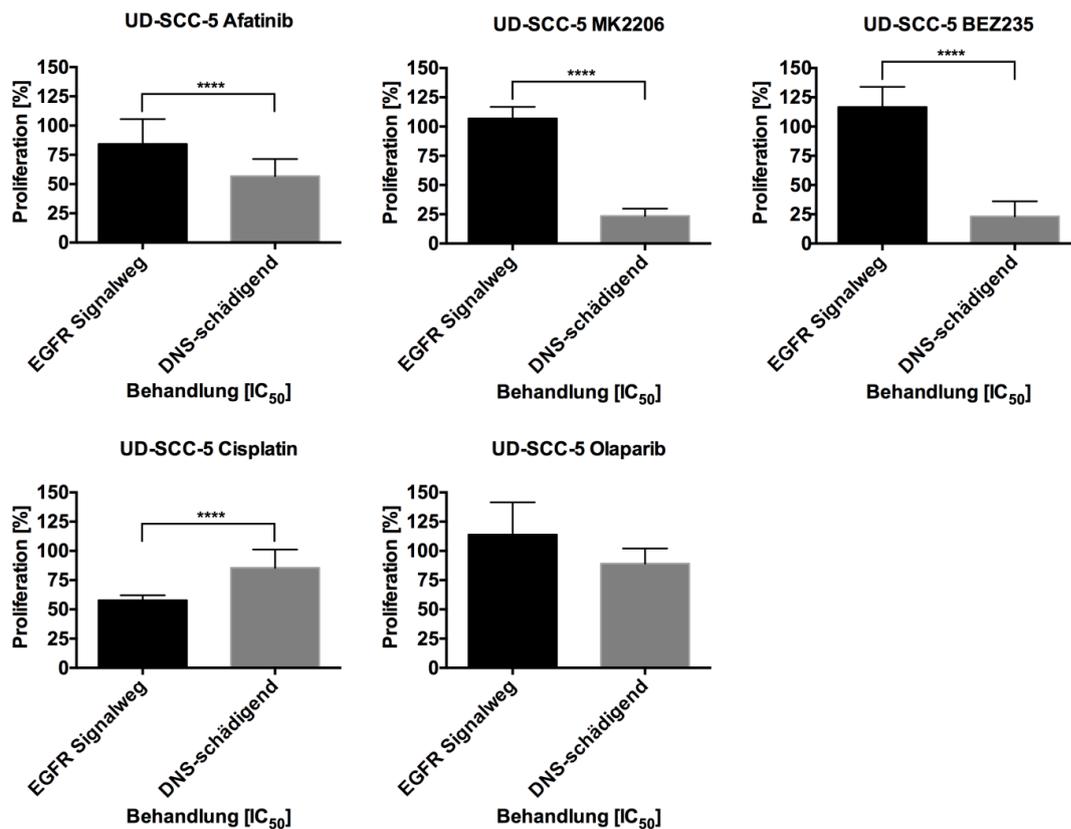


Abbildung 19: Ebenso wie bei Cal27 auch bei UD-SCC-5: Resistente Zellen gegen die EGFR Signalweg Inhibitoren „krezresistent“, gegen die DNA-schädigenden Substanzen "multiresistent"

So war bei den resistenten Klonen beider Zelllinien auf die EGFR-Inhibitoren höchstens eine Proliferationshemmung von 75% zu erreichen. Andererseits konnte bei diesen Klonen immer noch signifikant die Proliferation durch die DNA-schädigenden Substanzen Cisplatin und Olaparib gehemmt werden. Hier lag die Proliferationshemmung bei minimal ca. 50% der Kontrolle bei den auf Afatinib resistenten UD-SCC-5 bis maximal etwa 10% der Kontrolle bei mit Afatinib langzeitbehandelten Cal27 Klonen. Dagegen zeigten resistente Zellen gegen die DNA-schädigenden Substanzen überwiegend eine Art Multitherapeutikaresistenz. So waren gegen Olaparib resistente Klone beider Zelllinien weder durch die DNA-schädigenden, noch durch die EGFR-Signalweginhibitoren auf etwa unter 80% der Proliferation der Kontrolle zu bringen. Ein ähnliches, wenn auch etwas weniger deutlicheres Bild, war bei den mit Cisplatin langzeitbehandelten Klonen festzustellen.

Diese Trends zeigten sich auch in der Auftragung ohne Gruppeneinteilung (Abbildung 20 und 21).

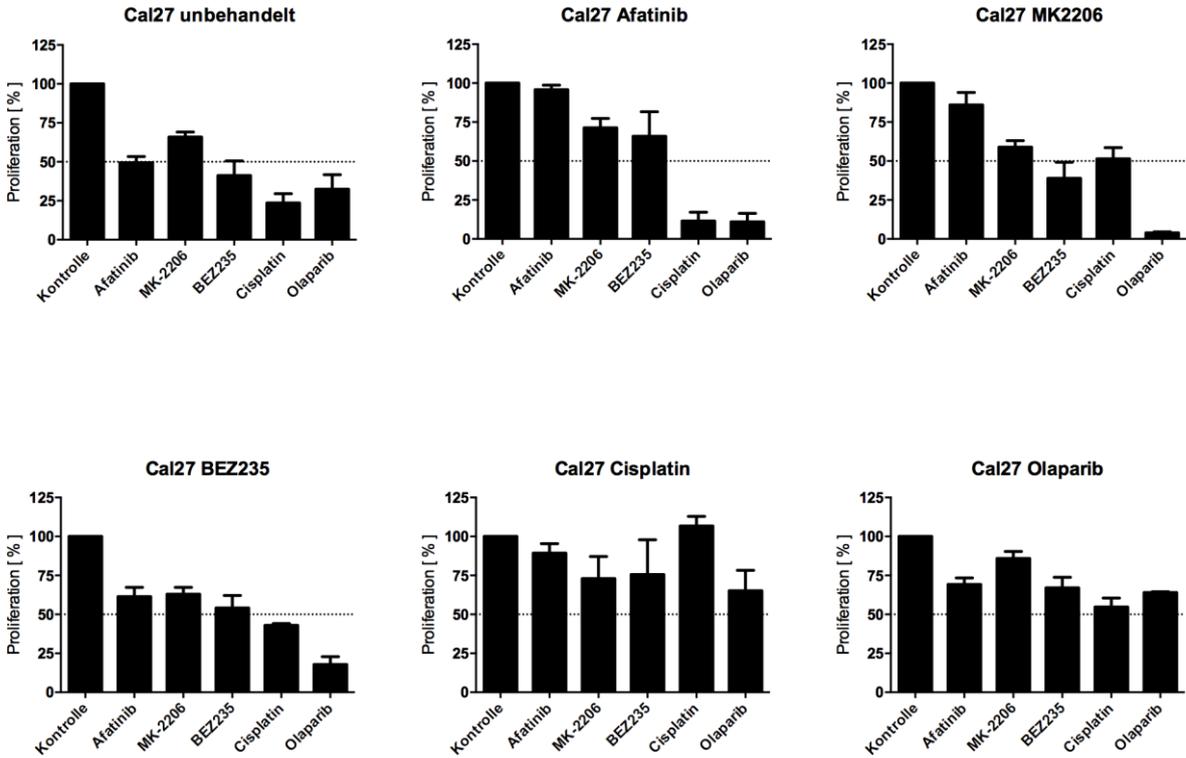


Abbildung 20: Einzelauftragung der Kombinationsversuche für Cal27

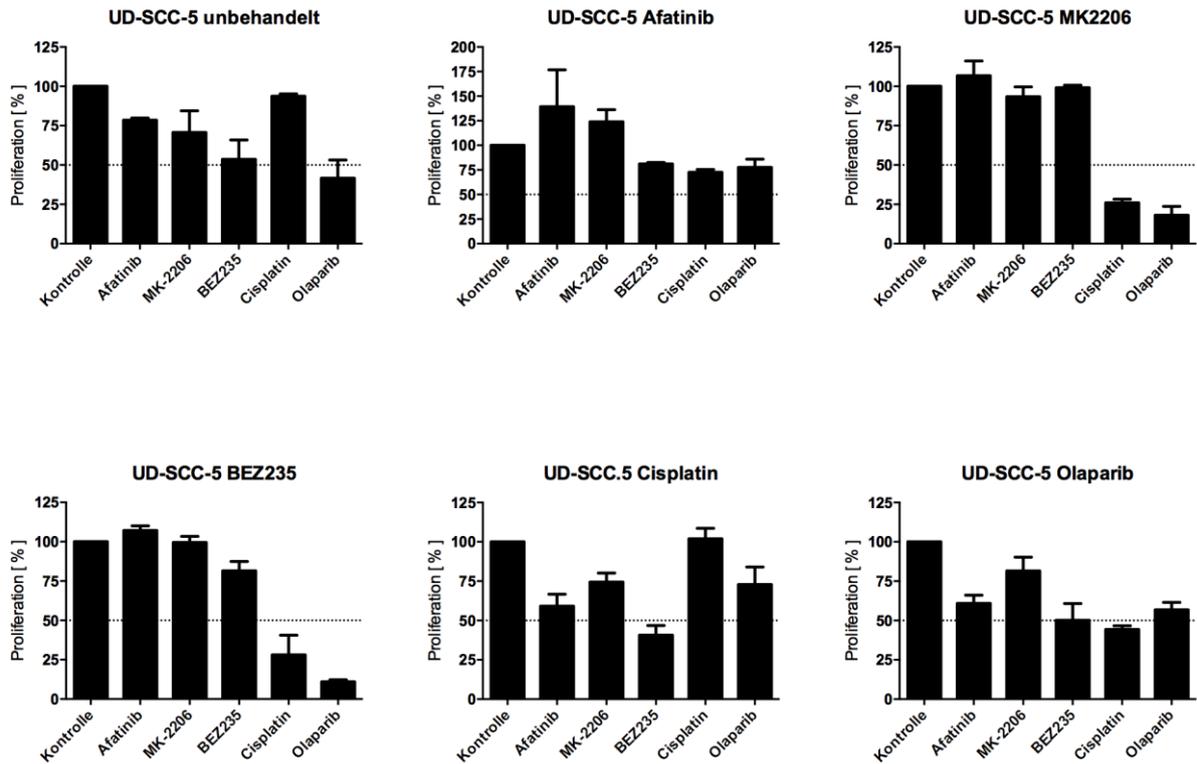


Abbildung 21: Einzelauftragung der Kombinationsversuche für UD-SCC-5

Hier fällt auf, dass überraschenderweise bei 4 von 10 langzeitbehandelten Klonen (Cal27: Olaparib, Mk2206, BEZ235 und UD-SCC-5: Olaparib) die Applikation einer IC_{50} Dosis immer noch Einfluss auf die Proliferation zeigte. So konnte die Proliferation bei Gabe einer IC_{50} Dosis BEZ235 auf mit BEZ235 langzeitbehandelten Cal27 Zellen immer noch um 50% gegenüber der Kontrolle der mit BEZ235 langzeitbehandelten Klone ohne Inhibitor gehemmt werden.

Weiterhin ist interessant, dass Gabe einer IC_{50} Dosis bei gegen Afatinib resistenten UD-SCC-5 Klonen die Proliferation zu unterstützen scheint. So ist bei diesen Klonen eine etwa 30% höhere Proliferation bei Applikation einer einmaligen IC_{50} Dosis Afatinib erreicht worden als gegenüber der Kontrolle der langzeitbehandelten Afatinib resistenten Klone ohne Inhibitor.

4.8 Heterogene Änderung in untersuchter Proteinexpression

Zum Screening auf Änderung in der Proteinexpression wurden zwei PathScan® Arrays von Cell Signaling Technologies verwendet (Abbildung 22 und 23). Es wurden bei den Versuchen Proteine von unbehandelten und resistenten Klonen, weiterhin von resistenten Klonen die 2 Wochen ohne Inhibitor proliferierten und von resistenten Klonen die zunächst 2 Wochen ohne und dann wieder 24h mit Inhibitor wuchsen, verwendet.

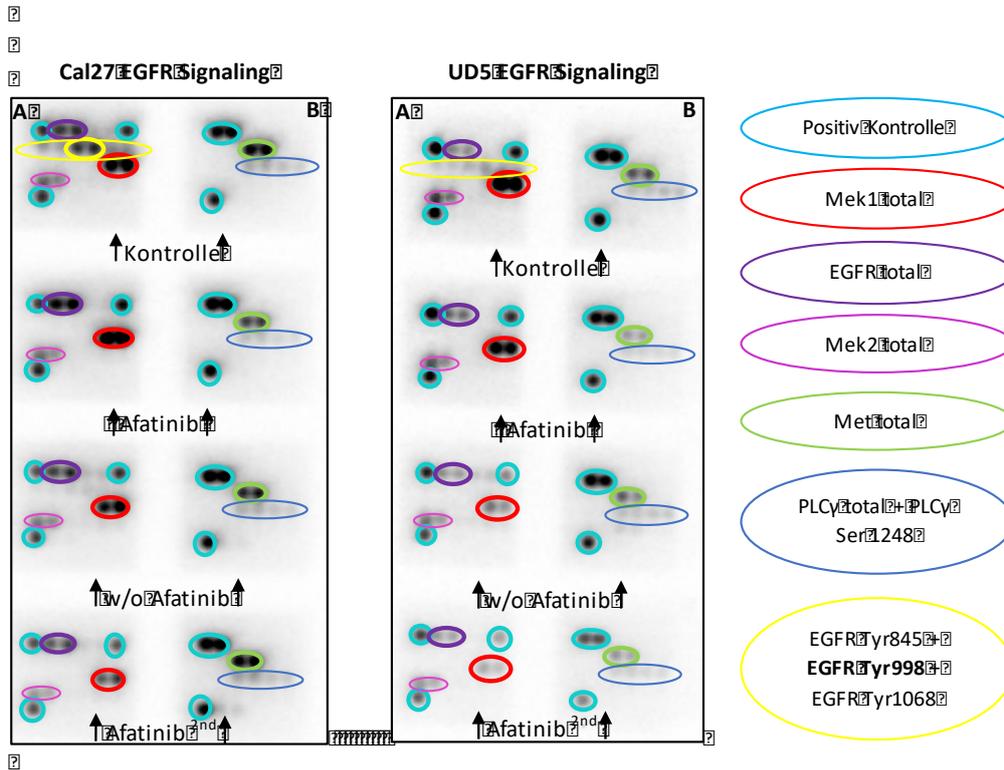


Abbildung 22: Auswertung der EGFR Signalwegarrays für Afatinib resistente Cal27 und UD-SCC-5 Zellen

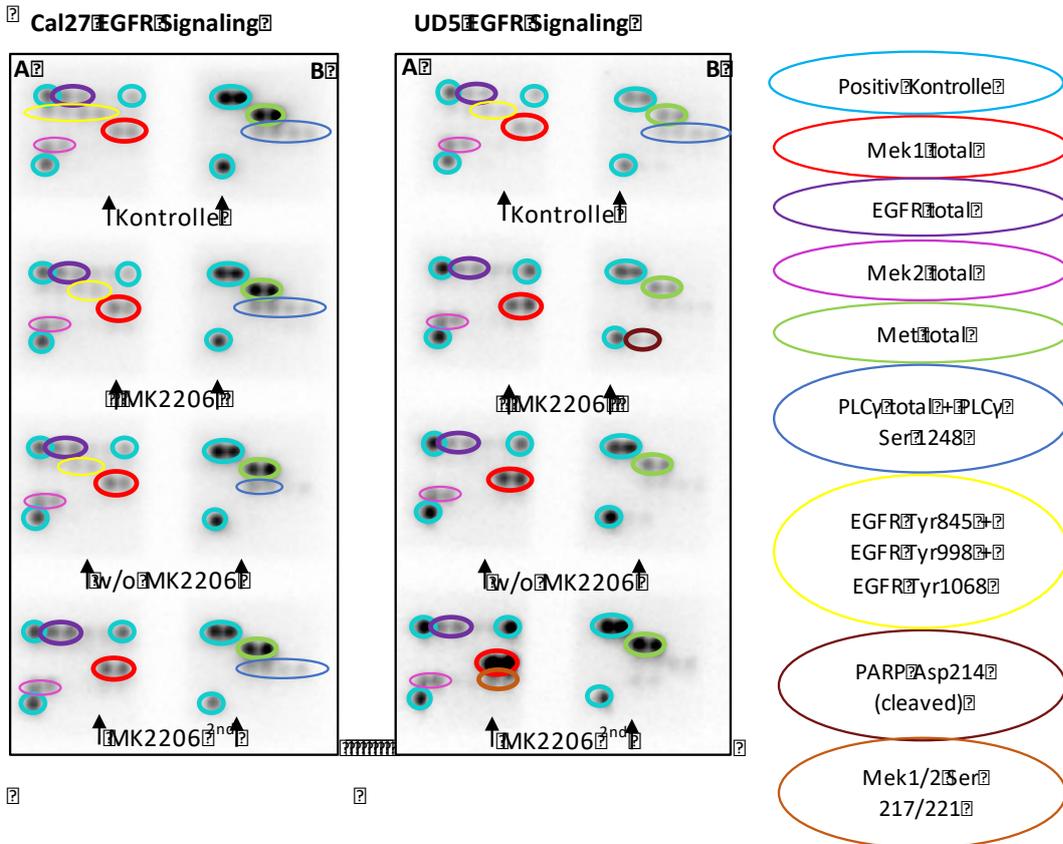


Abbildung 23: Auswertung der EGFR Signalwegarrays für MK2206 resistente Cal27 und UD-SCC-5 Zellen

Im EGFR Signalwegarray zeigte sich ein durch die Resistenzentwicklung kaum verändertes, starkes Signal von MET bei allen untersuchten Zellen. Weiterhin war das EGFR total und Mek 1/2 Total Signal bei allen nur wenig abweichend. Es ist hervorzuheben, dass die untersuchten Zellen keine Phosphorylierung von MEK 1/2 Ser221 oder Ser217 zeigten. Ebenso war keine ERK 1/2 Phosphorylierung an Tyr202 oder Tyr207, keine AKT Phosphorylierung an Tyr308 oder Tyr473 und keine Phosphorylierung von Stat3 an Tyr705 erkennbar.

Im Rezeptorthyrosinkinasearray zeigte sich ein starkes Signal von EGFR pan-Tyr bei unbehandelten UD-SCC-5 und Cal27 Zellen, sowie bei Cal27 auf MK2206 resistenten mit, ohne und mit für 2 Wochen erneut gegebenen Inhibitor (Abbildung 24 und 25).

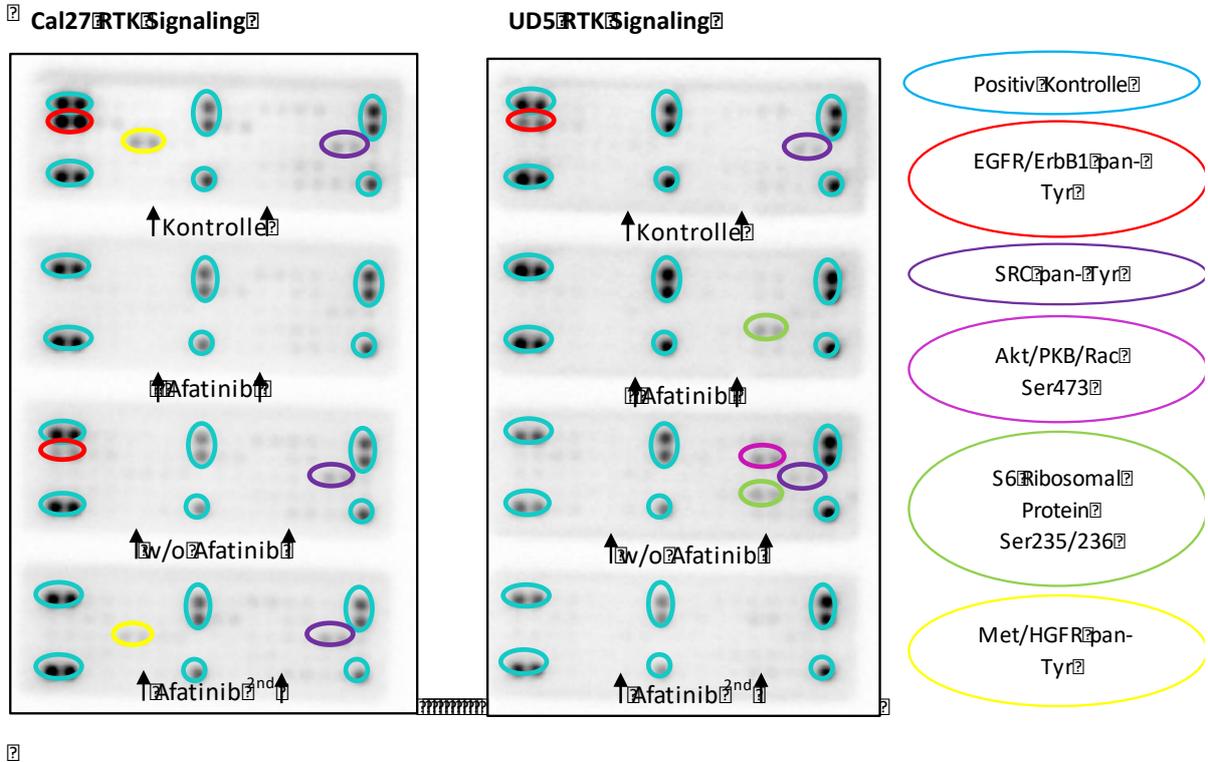


Abbildung 24: Auswertung der RTK Signalwegarrays für Afatinib resistente Cal27 und UD-SCC-5 Zellen

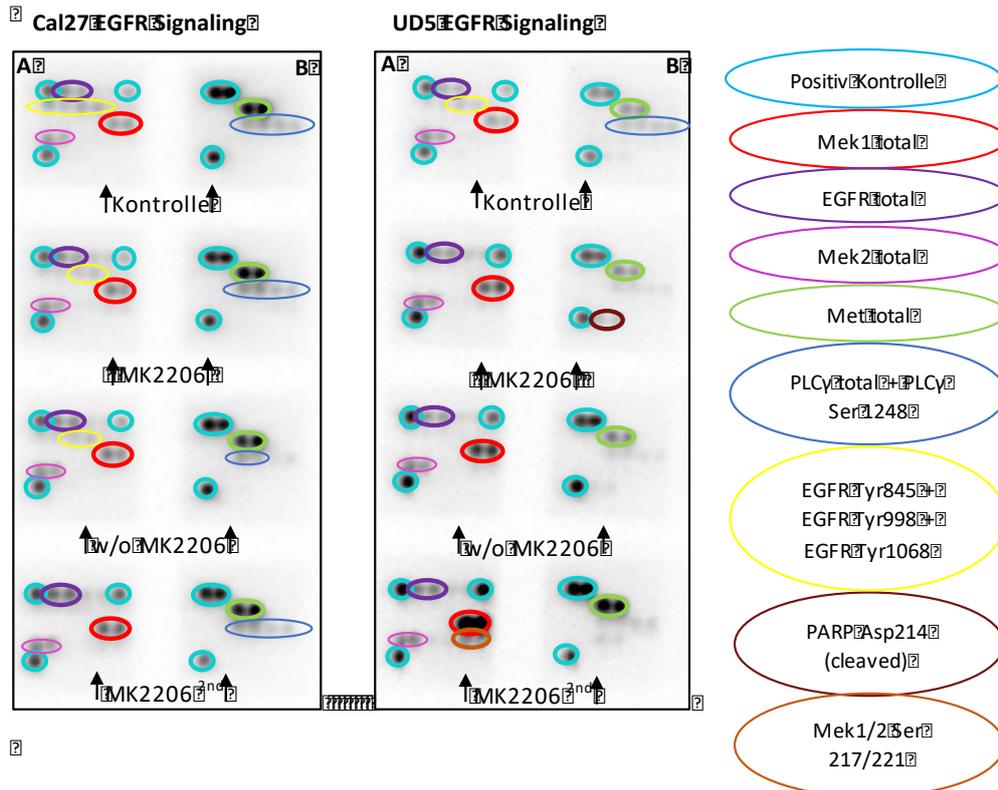


Abbildung 25: Auswertung der RTK Signalwegarrays für MK2206 resistente Cal27 und UD-SCC-5 Zellen

Bei auf MK2206 und Afatinib resistenten Cal27 Zellen war hier kein Signal detektierbar. Auf Afatinib resistente Cal27 Zellklone zeigten nur bei Weglassen des Inhibitors eine pan-Phosphorylierung von EGFR. Auf dem Array war weiterhin eine pan-Phosphorylierung von MET bei unbehandelten Cal27 zu erkennen. Bei Afatinib resistenten Cal27 Zellen verschwand diese Phosphorylierung bei den Klonen mit und ohne Inhibitorgabe. Bei erneuter Inhibitorgabe tauchte das Signal wieder auf. Bei MK2206 resistenten Cal27 Zellen zeigte sich ein gegensätzliches Bild. Hier war ein Signal bei mit und ohne Inhibitor behandelten Zellen detektierbar, während es bei erneuter Inhibitorgabe verschwand.

4.9 Aktivierung des ERK 1/2 Signalwegs in resistenten Klonen

Zur Untersuchung von Änderungen im EGFR-Signalweg wurde die Proteinexpression von p-EGFR Tyr1068, p-AKT Ser473, p-ERK 1/2 Tyr202/Tyr204 im Western-Blot bestimmt (Abbildung 26).

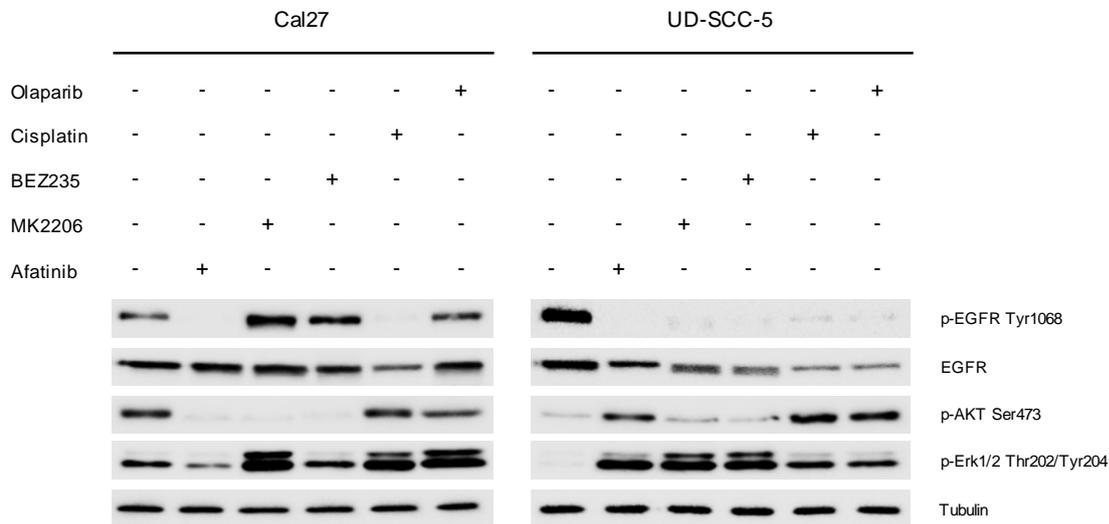


Abbildung 26: ERK 1/2 Aktivierung in resistenten Klonen

Unbehandelte UD-SCC-5 Zellen zeigten EGFR Phosphorylierung, während p-ERK 1/2 und p-AKT nicht phosphoryliert waren. In allen resistenten UD-SCC-5 Klonen dagegen war keine EGFR Phosphorylierung mehr detektierbar, dafür waren nun ERK 1/2 und AKT phosphoryliert. In unbehandelten Cal27 Klonen zeigte sich bereits eine basale Phosphorylierung von EGFR, ERK 1/2 und AKT. Das Level an ERK 1/2 Phosphorylierung nahm in allen resistenten Klonen zu. Bei EGFR und AKT Phosphorylierung dagegen war kein klares Bild einer Hoch- oder Herunterregulation in Cal27 resistenten Klonen zu sehen. Insgesamt deuten die Ergebnisse auf eine Aktivierung des ERK 1/2 Signalwegs hin unabhängig mit welchem Inhibitor die Zellen langzeitbehandelt wurden. Dabei ist dieses Bild bei UD-SCC-5 resistenten Zellen klarer als bei Cal27 resistenten Klonen zu sehen.

4.10 Heterogene Änderungen in Stammzellmarkerexpression

Ob Stammzellen während der Resistenzentwicklung angereichert wurden, wurde mithilfe der Expression der Stammzellmarker ALDH1, CD44, Oct4, Sox2, Nanog und Bmi1 im Western-Blot bestimmt (Abbildung 27,28 und 29).

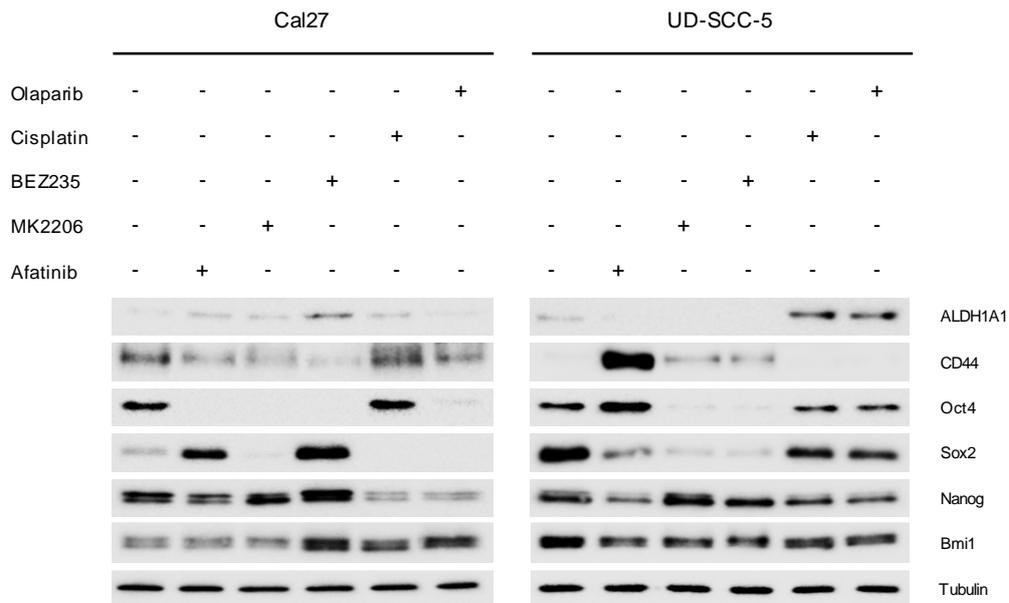


Abbildung 27: Heterogene Änderung in Stammzellmarkern der langzeitbehandelten Zellen

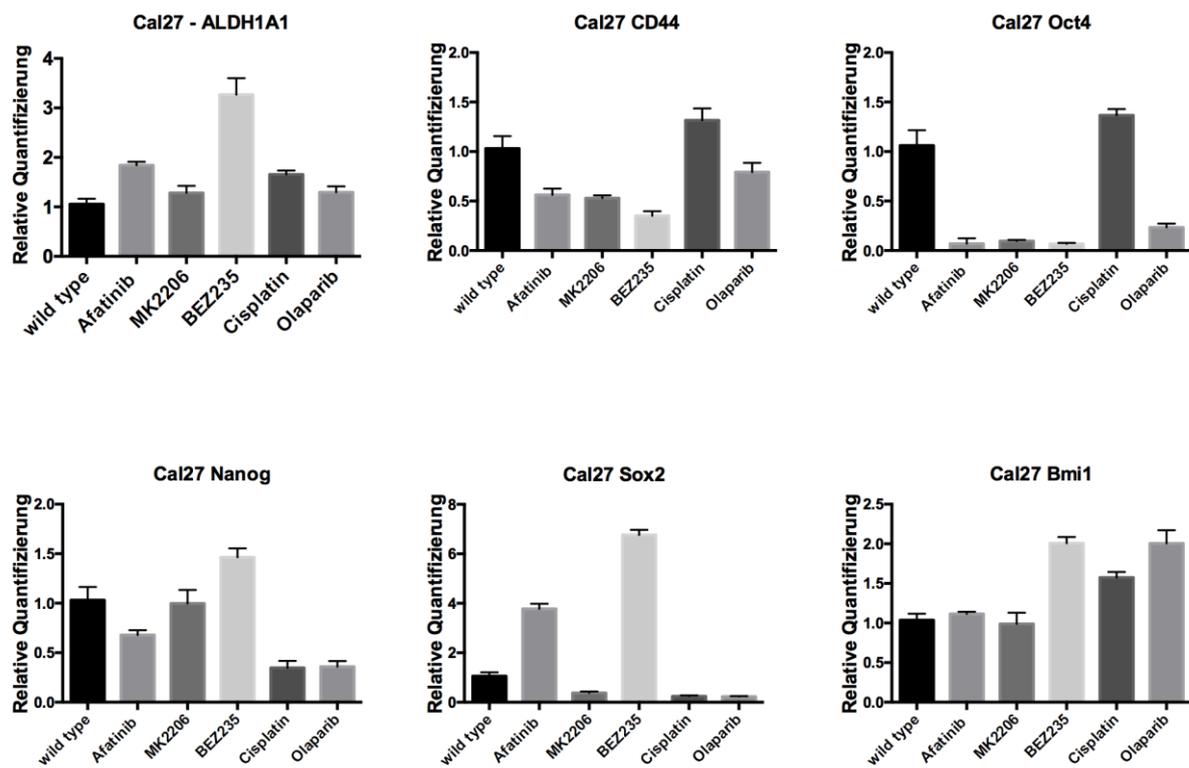


Abbildung 28: Semiquantitative Auswertung der Stammzellmarkerexpression bei langzeitbehandelten Cal27 Zellen

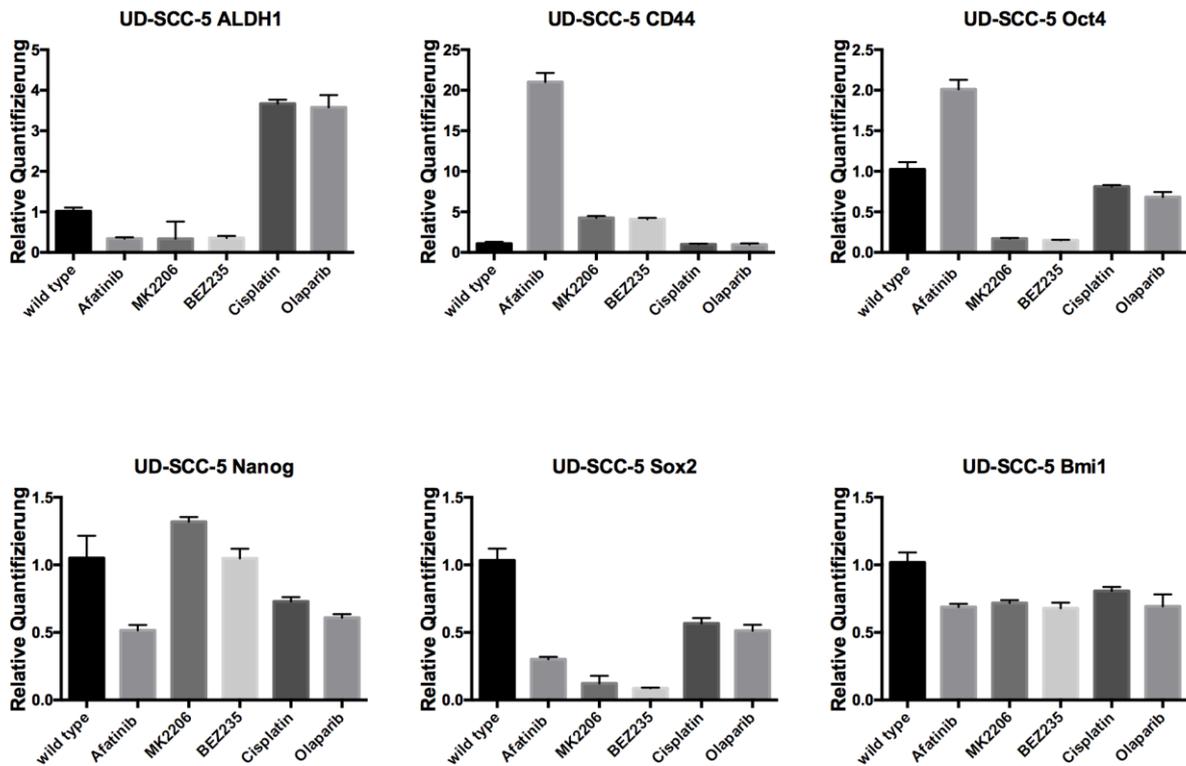


Abbildung 29: Semiquantitative Auswertung der Stammzellmarkerexpression bei langzeitbehandelten UD-SCC-5 Zellen

Mit Ausnahme von CD44 bei unbehandelten UD-SCC-5 und ALDH1 bei unbehandelten Cal27 Zellen zeigten bereits die unbehandelten Klone Expression der untersuchten Stammzellmarker.

Auf die EGFR-Signalweginhibitoren resistente UD-SCC-5 Zellen zeigten CD44 Expression und keine ALDH1 Expression. Umgekehrt zeigten auf die DNA-schädigenden Substanzen resistente UD-SCC-5 Zellen ALDH1, jedoch keine CD44 Expression. Weiterhin war Bmi1 in allen resistenten Klonen herunterreguliert. Diese Muster konnten bei Cal27 resistenten Klonen jedoch nicht beobachtet werden. Die Änderungen in den Markern Oct4, Nanog und Sox2 waren heterogen und folgten keinem klaren Muster. Auch mit dem gleichen Therapeutikum gezüchtete resistente Zellen zeigten meist unterschiedliche Expression der Stammzellmarker. Zusammenfassend konnte kein einzelner Marker identifiziert werden, der mit Resistenz auf alle Substanzen korrelierte.

4.11 Hypermutation des Genoms resistenter Zellen

Um Festzustellen, ob sich während der Resistenzentwicklung die Mutationsrate verändert, wurde der random mutation capture assay durchgeführt (Wright et al., 2011).

Zur Prüfung, ob die Impementation erfolgreich war, wurde analog zur Originalpublikation von Bielas und Loeb zunächst Cal27 Zellen mit Ethylnitroseharnstoff behandelt (Bielas & Loeb, 2005). Hier ergab sich eine Mutationsfrequenz von $3,40 \cdot 10^{-6}$. Dann wurden unbehandelte und resistente Klone untersucht. Die gemittelten Mutationsfrequenzen sind in *Tabelle 23* eingetragen.

	Cal27 Unbehan.	Cal27 resistent	UD-SCC-5 Unbehan.	UD-SCC-5 resistent
Mittlere Mutationsfreq.	$7,00 \cdot 10^{-8}$	$5,78 \cdot 10^{-7}$	$1,57 \cdot 10^{-7}$	$1,22 \cdot 10^{-6}$
x fache Erhöhung		8,3		7,8
# Mutationen in kodierenden Absch.	2,3	19,0	5,2	40,3
p-Wert (TTest)		<0,001		<0,007

Tabelle 23: Resistente Zellen zeigen eine etwa 8x höhere Mutaionsfrequenz als die unbehandelte Kontrolle

Bei unbehandelten und über die 6-monatige Spanne mitkultivierten Cal27 und UD-SCC-5 Zellen war eine Mutationsfrequenz pro Basenpaar von $7,00 \cdot 10^{-8}$ beziehungsweise $1,57 \cdot 10^{-7}$ messbar. Dagegen betrug die durchschnittliche Mutationsfrequenz aller resistenter Cal27 Klone $5,78 \cdot 10^{-7}$ ($p < 0,001$) und die der UD-SCC-5 Klone $1,22 \cdot 10^{-6}$ ($p = 0,007$). Damit war die Mutationsfrequenz der langzeitbehandelten Zellen durchschnittlich 8,3 beziehungsweise 7,8 Mal höher als die der unbehandelten Klone. Nimmt man eine Genomgröße von $3,3 \cdot 10^9$ Basenpaaren an, von denen etwa 1% in kodierenden Regionen liegen, kann man zur besseren Veranschaulichung die Mutationsfrequenz in eine Zahl an Mutationen pro Zelle umrechnen. So entwickeln sich über die Zeit von 6 Monaten in kodierenden Regionen durchschnittlich 2,3 Mutationen in Cal27 und 5,2 Mutationen in UD-SCC-5 Zellen. Während der Langzeitbehandlung dagegen treten im Mittel in kodierenden Regionen 19,0 Mutationen bei Cal27 und 40,3 Mutationen in UD-SCC-5 auf. Betrachtet man die Daten der einzelnen Behandlungen ergibt sich eine Breite der Erhöhung der Mutationsfrequenz von 4,4 - 14,8x (*Tabelle 24 und 25*).

Cal27	Unbehan.	Afatinib	Mk2206	BEZ235	Cisplatin	Olaparib
Mittlere Mutationsfreq.	$7,00 \cdot 10^{-8}$	$3,67 \cdot 10^{-7}$	$5,56 \cdot 10^{-7}$	$4,93 \cdot 10^{-7}$	$9,06 \cdot 10^{-7}$	$5,74 \cdot 10^{-7}$
x fache Erhöhung		5,2	7,9	7,0	13,0	8,2
p-Wert (TTest)		0,011	0,029	0,015	0,081	0,016

Tabelle 24: Mutationsfrequenzen der resistenten Cal27 Klone

UD-SCC-5	Unbehan.	Afatinib	Mk2206	BEZ235	Cisplatin	Olaparib
Mittlere Mutationsfreq.	1,57x10 ⁻⁷	9,27x10 ⁻⁷	6,96x10 ⁻⁷	7,16x10 ⁻⁷	2,32x10 ⁻⁶	1,35x10 ⁻⁶
x fache Erhöhung		5,9	4,4	4,6	14,8	8,6
p-Wert (TTest)		0,276	0,173	0,096	0,194	0,126

Tabelle 25: Mutationsfrequenzen der resistenten UD-SCC-5 Klone

Erwartungsgemäß zeigen die DNA-schädigenden Substanzen die größte Steigerung der Mutationsfrequenz. So ergab sich bei Cisplatin resistenten Cal27 Klonen eine Erhöhung des 14,8-fachen der unbehandelten Kontrolle. Bei Olaparib langzeitbehandelten Cal27 Zellen betrug die Erhöhung das 8,2-fache. Doch auch die Langzeitbehandlung mit zielgerichteten Therapeutika führte zu einer Vervielfachung der Mutationsfrequenz. So zeigte der Thyrosinkinaseinhibitor Afatinib eine Erhöhung des 5,2-fachen bei Cal27 und des 5,4-fachen bei UD-SCC-5. Zusammenfassend führte also eine Langzeitbehandlung mit Chemo- und zielgerichteten Therapeutika zu einer Hypermutation des Genoms.

4.12 Mechanismen der genetischen Veränderung

4.12.1 Herunterregulation der mit DNA Replikation assoziierten Gene im RNA Microarray

Um den Mechanismus der Hypermutation zu untersuchen wurde zunächst mit Cisplatin und Afatinib über 24 und 168 Stunden stimulierte UD-SCC-5 und Cal27 Zellen und die entsprechenden resistenten Klone in einem Microarray auf Ihre Genexpression untersucht. Abbildung 30 A zeigt die Heatmap. Insgesamt waren 19006 Gene hoch oder herunterreguliert.

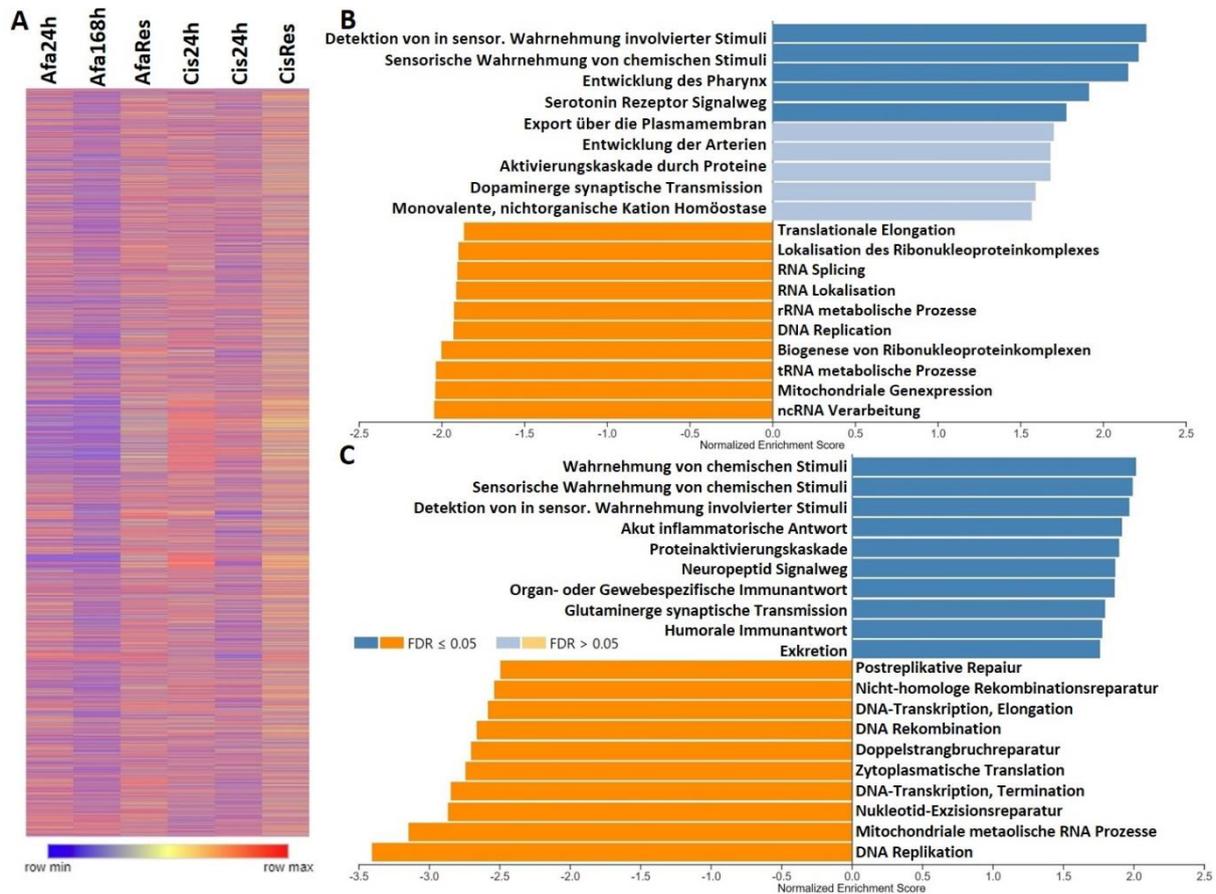


Abbildung 30: **A:** Heatmap der RNA Expression von Afatinib und Cisplatin behandelten Zellen nach 24 Stunden, 168 Stunden und resistente Klone. **B:** Gene ontology Analyse mit der Top 10 positiv und negativ angereicherter Gensets in Zellen nach 168 Stunden Stimulation mit Afatinib. **C:** Gene ontology Analyse mit der Top 10 positiv und negativ angereicherter Gensets in Zellen nach 168 Stunden Stimulation mit Cisplatin

Abbildung 30 B zeigt die Gene Ontology Analyse für 168 Stunden mit Afatinib behandelte Zellen. In Abbildung 30 C sieht man die Analyse für Cisplatin 168 Stunden. Es ist jeweils die Top 10 der Gensets mit dem höchsten positiven und negativen Enrichment Score aufgetragen. Unter den negativ regulierten findet sich als Gemeinsamkeit Veränderungen im DNA Replikation Genset. In Afatinib und Cisplatin behandelten Zellen findet sich Polymerase $\delta 1$ und Polymerase $\delta 3$ herunterreguliert. Herunterregulation der DNA Replikation und von Polymerase $\delta 1$ und $\delta 3$ findet sich auch nach 24-stündiger Stimulation (Daten nicht gezeigt). Mit Cisplatin behandelte Zellen zeigen zusätzlich Herunterregulation der Postreplikations-, nicht homologen Rekombinations- und Nukleotidexzisionsreparatur.

4.12.2 Hochregulation von APOBEC3B und Polymerase ι auf mRNA Ebene

Um Veränderungen in DNA Reparaturprozessen näher zu charakterisieren wurde zunächst eine Literaturrecherche durchgeführt. Es wurden 20 Gene identifiziert, die an verschiedenen DNA Reparatur Mechanismen beteiligt sind. In Abbildung 31 ist die relative RNA Expression

der 20 Gene in UD-SCC-5 Zellen nach 168 stündiger Stimulation mit Afatinib und Cisplatin aufgetragen.

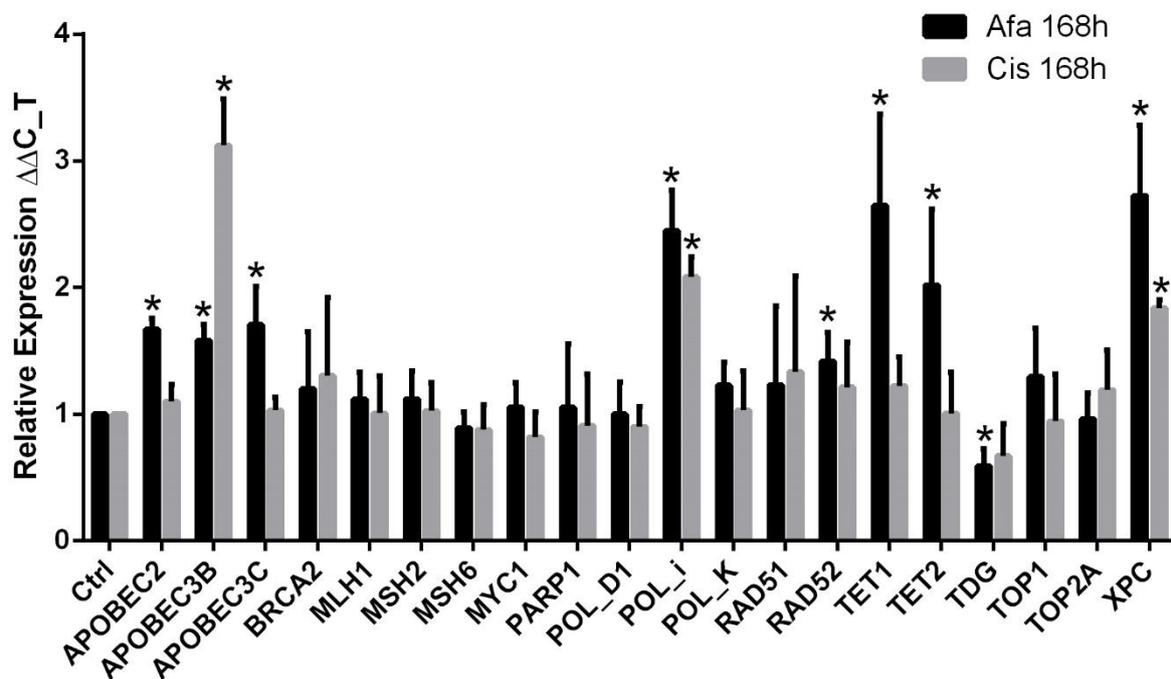


Abbildung 31: Relative Expression in quantitativer PCR von 20 an DNA Reparaturmechanismen beteiligten Genen. * zeigt statistische Signifikanz

Die quantitative PCR zeigte eine signifikante Hochregulation von APOBEC3B, Polymerase ι und XPC in mit Afatinib und Cisplatin behandelten Zellen. Die relative Änderung in der Expression betrug für Afatinib und Cisplatin 1,58 und 3,12 in APOBEC3B, 2,45 und 2,10 in Polymerase ι und 2,72 und 1,83 in XPC. Weiterhin waren APOBEC2, APOBEC3C und RAD52 in Afatinib stimulierten, nicht aber in mit Cisplatin behandelten Zellen erhöht. TDG war in mit Afatinib inkubierten Zellen signifikant herunterreguliert. In Polymerase $\delta 1$ waren keine signifikanten Veränderungen feststellbar.

Als nächstes wurde die zeitliche Dynamik von Polymerase δ , Polymerase ι , APOBEC 3A/3B in beiden Zelllinien bestimmt. Zusätzlich wurde als möglicher Regulationsmechanismus die Expression STAT1 und STAT3 untersucht. Die Zellen wurden 24, 72 und 168 Stunden stimuliert. Abbildung 32 zeigt die Ergebnisse in UD-SCC-5 (Abbildung 32).

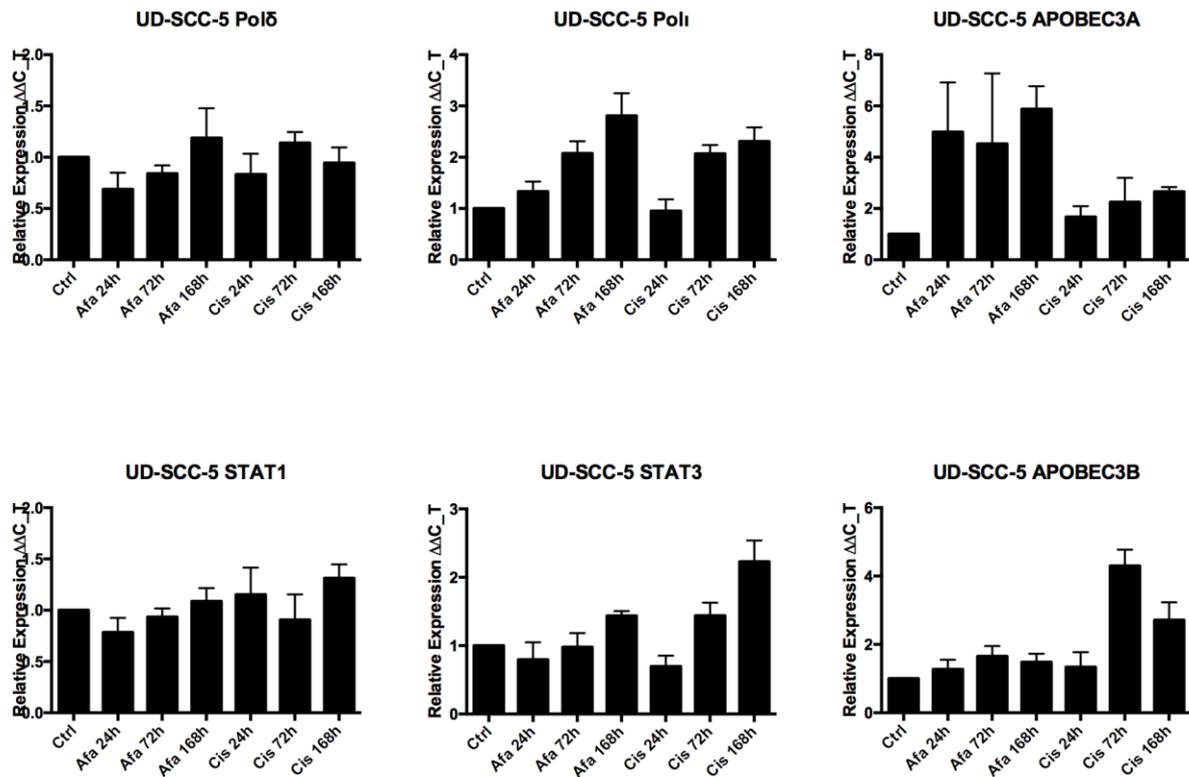


Abbildung 32: Hochregulation von Pol δ , STAT3, APOBEC3A und APOBEC3B in UD-SCC-5 bei einmaliger Stimulierung mit Afsatinib oder Cisplatin

Polymerase δ zeigte eine gleichbleibende Expression. Die Expression von Polymerase ϵ erhöhte sich auf etwa das 2,5 bis 3,0-fache. Bei STAT3 war eine etwa 1,5-fache bei Afsatinib und eine um 2,3-fache Erhöhung bei Cisplatin Behandlung detektierbar. Die STAT1 Expression war nahezu gleichbleibend. Es fand sich eine etwa 2,5-fache Hochregulation von APOBEC3A nach 7 Tagen Cisplatin Behandlung und eine 6,0-fache Erhöhung bei Afsatinib Behandlung. APOBEC3B war mit um 3,0-fach bei Cisplatin und etwa 1,8-fach bei Afsatinib Gabe nach 7 Tagen vermehrt exprimiert.

In Abbildung 33 sind die Ergebnisse der zeitlichen Dynamik für Cal27 aufgetragen.

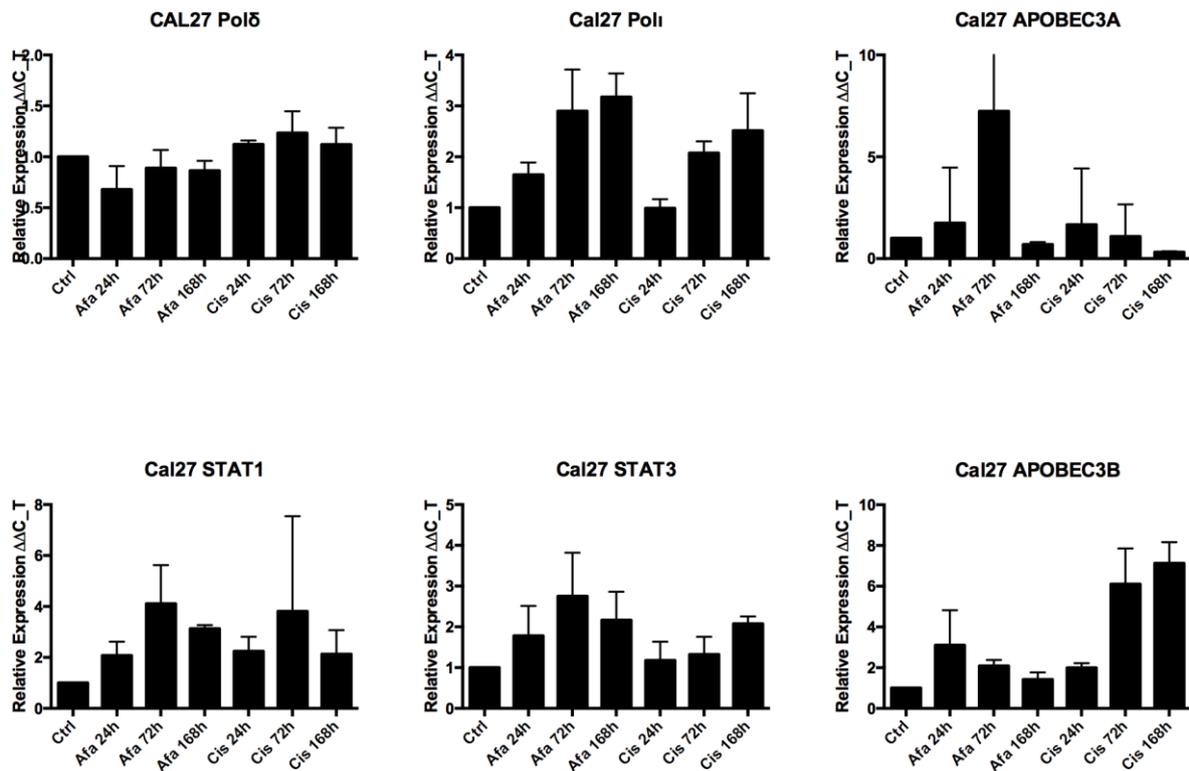


Abbildung 33: Hochregulation von Pol δ , STAT1, STAT3 und APOBEC3B in Cal27 bei einmaliger Stimulierung mit Afatinib oder Cisplatin

Während die Expression von Polymerase δ leicht zurückging oder sich kaum veränderte, stieg die Expression von Polymerase ι kontinuierlich und erreichte nach 7 Tagen etwa den 2,5 bis 3,0-fachen Wert. Dazu war eine Hochregulation von STAT1 auf etwa das 2 bis 4-fache zu detektieren und eine Hochregulation von STAT3 auf ca. das 2-fache. Ebenso war die Expression der APOBEC3B mRNA um das 3 bis 7-fache erhöht. Bei APOBEC3A war nur bei 72h eine wesentliche Hochregulation feststellbar.

4.12.3 Hochregulation von IL-6 und IL-20 RB auf mRNA Ebene

Es wurde die mRNA Expression nach 24h, 72h und 168h von IL-6, IL-24 und den Rezeptoruntereinheiten IL-20 RA, IL-20 RB und IL-22 RA1 untersucht. Bei Cal27 fand sich eine rund 5,5-fache Hochregulation der IL-6 mRNA bei Cisplatin Gabe und eine Hochregulation von ungefähr 2,5 bei Afatinib Gabe (Abbildung 34).

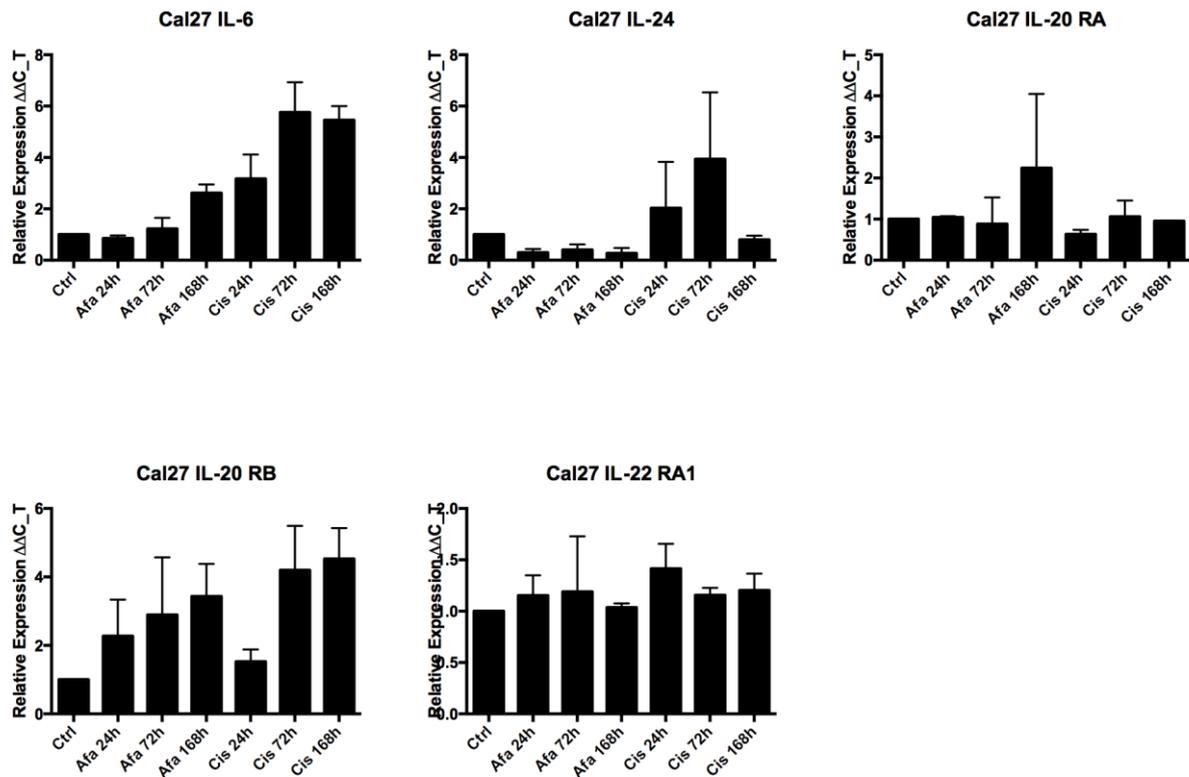


Abbildung 34: Hochregulation von IL-6 und IL-20 RB in Cal27 bei einmaliger Stimulierung mit Afatinib oder Cisplatin

Zusätzlich war bei Afatinib und Cisplatin Applikation eine etwa 3 bis 4-fache Expression des IL-6 RB Rezeptors detektierbar. Bei IL-24 war bei Afatinib Applikation eine Herunterregulation, bei Cisplatin eine zwischenzeitliche Hochregulation zu sehen. Die Expression von IL-20 RA und IL-22 RA1 blieb relativ konstant.

Die Daten für UD-SCC-5 sind in *Abbildung 35* zu sehen. Hier war ebenfalls eine Hochregulation von IL-6 bei Cisplatin Gabe um das 4,0-fache zu sehen. Bei Afatinib Gabe zeigte sich dagegen eher eine Herunterregulation. Bei IL-20 RB war eine 1,8-fache Expression bei Afatinib und ca. 5,5-fache Expression bei Cisplatin Gabe feststellbar. In der IL-24, IL-20 RA und IL-22 RA1 waren keine signifikanten Unterschiede in der Expression messbar.

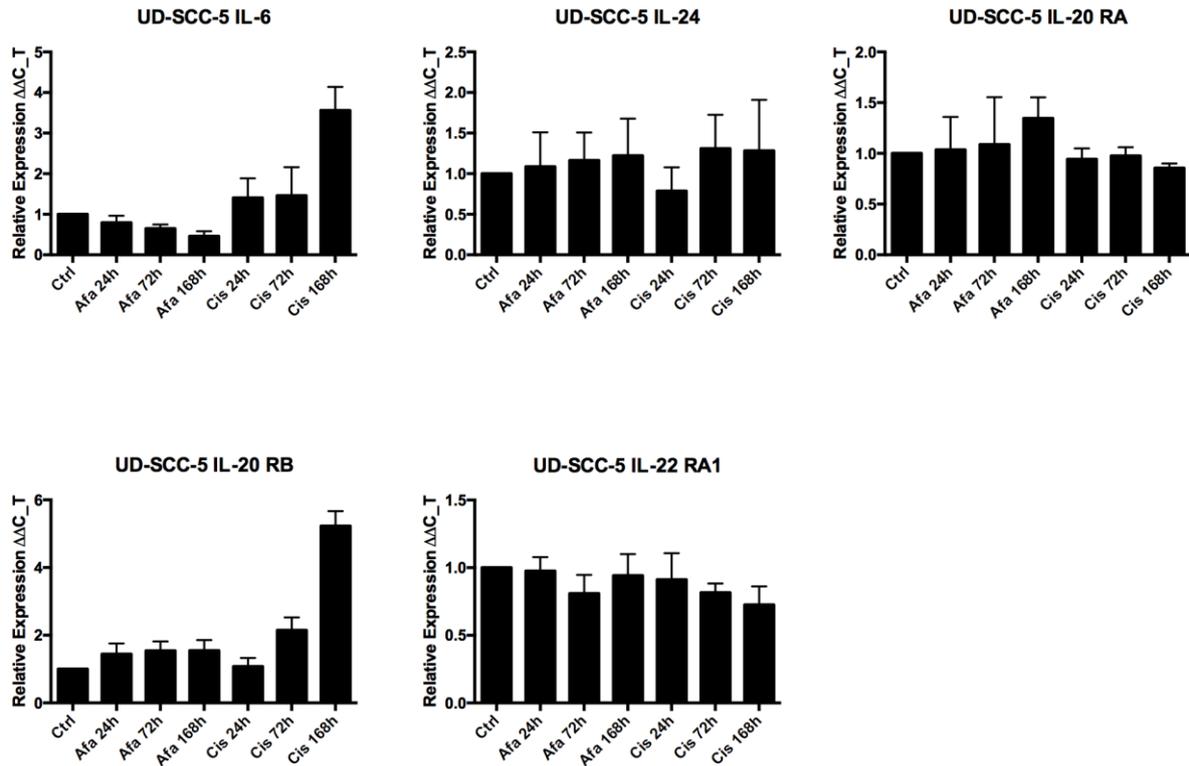


Abbildung 35: Hochregulation von IL-6 und IL-20 RB in UD-SCC-5 bei einmaliger Stimulierung mit Afatinib oder Cisplatin

4.12.4 MEK 1/2 abhängige Hochregulation von Polymerase ι und APOBEC3B auf Proteinebene

Die Hochregulation von Polymerase ι und APOBEC3B in mit 168 Stunden Afatinib und Cisplatin behandelten Zellen zeigte sich ebenso auf Proteinebene (Abbildung 36).

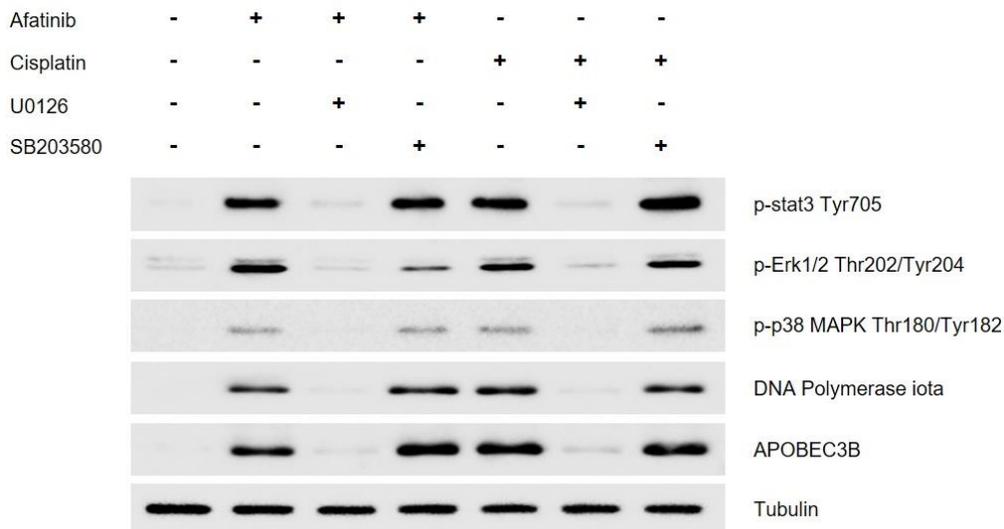


Abbildung 36: Hochregulation von Polymerase ι und APOBEC3B in Afatinib und Cisplatin stimulierten Zellen auf Proteinebene im Western Blot. Unter Kostimulation mit U0126 kann die Proteinexpression supprimiert werden. Kostimulation mit SB203580 hat keinen Effekt auf die Proteinexpression von Afatinib und Cisplatin.

Um die Regulation von APOBEC3B und Polymerase γ zu untersuchen wurden Zellen mit Afatinib/Cisplatin und dem ERK 1/2 Inhibitor U0126 beziehungsweise dem p38 MAPK Inhibitor SB203580 inkubiert. Der Western-Blot zeigte nur wenig Veränderungen bei Kostimulation mit SB203580. Jedoch konnte eine Suppression der Proteinexpression von APOBEC3B und Polymerase γ über Blockade von ERK 1/2 und sukzessiv Blockade von STAT3 beobachtet werden.

4.12.5 Signifikante Reduktion der Mutationsfrequenz bei Kostimulation mit MEK 1/2 Inhibitor

Um den Effekt von ERK 1/2 Blockade auf die Mutationsfrequenz zu untersuchen wurden Zellen über 168 Stunden mit Afatinib und Cisplatin kultiviert und ebenso mit U0126 kostimuliert. Abbildung 37 zeigt die relative Veränderung der Mutationsfrequenz im HPRT Assay.

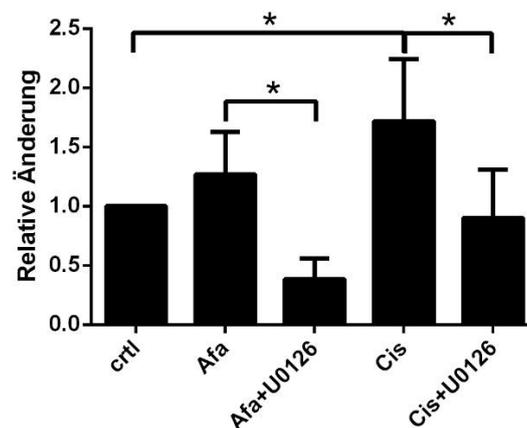


Abbildung 37: Verkleinerung der Mutationsfrequenz bei Kostimulation von Zellen mit Afatinib/Cisplatin und U0126 im Vergleich zu stimulierten Zellen. * zeigt statistische Signifikanz.

Cisplatin führt bereits nach 168 Stunden zu einem signifikanten Anstieg der Mutationsfrequenz um das 1,72-fache. Afatinib Gabe führte ebenso zu einem Anstieg um das 1,27-fache, dieses Ergebnis war jedoch nicht signifikant. Bei Simulation von Afatinib + U0126 ergab sich eine Änderung der Mutationsfrequenz um das 0,39-fache im Vergleich zur Kontrolle, bei Cisplatin + U0126 wurde die 0,90-fache gemessen. Beide Veränderungen gegenüber Einzelstimulation mit Afatinib und Cisplatin waren statistisch signifikant ($p < 0,05$).

5. Diskussion

Nach den Herz-Kreislaufkrankungen mit 39,7% stellte Krebs mit 25,0% nach einer aktuellen Statistik die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar (Schelhase, 2013). Trotz kontinuierlichem Fortschritt in operativer Technik, Strahlen- und Chemotherapie lag die relative 10-Jahres-Gesamtüberlebensrate für Krebserkrankungen in Deutschland immer noch bei 59,5% (Kraywinkel, 2015). Die Häufigkeit der Entität der Kopf-Hals-Tumore liegt an sechster Stelle weltweit (Duvvuri & Myers, 2009). Etwa zwei Drittel der Patienten mit dieser Entität präsentieren sich in einem fortgeschrittenen Stadium (Semrau, Fietkau, Werner, & Mueller, 2007).

Die zielgerichtete Therapie Imatinib hat die Behandlung der chronisch myelotischen Leukämie revolutioniert. Durch Verständnis des Fusionsgens bcr-abl als einzigen krankheitsauslösenden Mechanismus und Blockierung mit Imatinib konnte das mittlere Überleben von 4 auf 20 Jahre gesteigert werden (Westin & Kurzrock, 2012). Die Hoffnung war groß durch individualisierte, zielgerichtete Therapie auch solide Tumore von einer lebensbedrohlichen in eine chronische Erkrankung umzuwandeln (Brody, 2008). Cetuximab blockiert als zielgerichtete Therapie den bei Kopf-Hals-Tumoren häufig überexprimierten EGFR-Rezeptor (Burtneß, 2005). Eine Studie beim metastasierten Kopf-Hals-Karzinom und Behandlung mit Cetuximab plus Chemotherapie gegen alleinige Chemotherapie erbrachte einen Vorteil im MÜ von 2,7 Monaten (Vermorken et al., 2008). Vorteile im Überleben im Bereich von Monaten trotz Blockade der für Tumore wichtigen Ziele sind bei fortgeschrittenen Erkrankungen auch bei anderen Krebsentitäten die Regel (Izar et al., 2013). Die Gründe hierfür liegen einerseits darin, dass solide Tumore komplexer sind. So ist nicht nur ein Gen wie bei der CML verändert sondern es finden sich in Kolon-, Brust- oder Hirntumoren im Mittel 33 bis 66 Mutationen in kodierenden Regionen (Vogelstein et al., 2013). Andererseits entwickeln Tumorzellen in den meisten Fällen bei längerer Behandlung Resistenzen gegen eine zu Beginn wirksame Therapie (Foo & Michor, 2014).

Ziel dieser Arbeit war es, Resistenzmechanismen und Mechanismen der Resistenzbildung am Beispiel von Kopf-Hals-Tumorzellen besser zu verstehen. Es wurde untersucht, ob Tumorzellen bei Langzeitbehandlung mit aufsteigenden Dosen von fünf Chemo- und zielgerichteten Therapien Resistenzen gegen die Substanzen ausbilden. Weiterhin wurden Änderungen im EGFR-Signalweg und Stammzellmarkern der langzeitbehandelten Zellen analysiert. Es wurde die Sensitivität auf Röntgenstrahlung, α -Strahlung und Sensitivität auf nochmalige Gabe der fünf Substanzen erfasst. Abschließend wurden die Mutationsfrequenz und mögliche Mechanismen einer Erhöhung dieser untersucht.

Als Ausgangspunkt für die Therapeutikaauswahl wurde die Publikation von Leemans und Kollegen von 2011 verwendet, welche oft veränderte Genregionen bei Kopf-Hals-Tumoren auflistet (Leemans et al., 2011). Nach einer systematischen Literaturrecherche im Herbst 2012 zu kommerziell verfügbaren und schon klinisch getesteten Therapeutika wurde der EGFR Inhibitor Afatinib, der AKT Inhibitor MK2206, der dual PI3K-mTOR Inhibitor BEZ235, der PARP1 Inhibitor Olaparib und Cisplatin als Standardtherapie ausgewählt. Alle fünf Chemo- und zielgerichteten Therapeutika konnten die Proliferation signifikant reduzieren (Abbildung 7 und 8) und die IC₅₀ Konzentrationen lagen im nano- bzw. mikromolaren Bereich (Tabelle 20). Von den Absolutwerten scheint UD-SCC-5 mit Ausnahme von MK2206 und Cisplatin chemosensibler zu reagieren. Das Ansprechen auf ein Therapeutikum kann breiten Schwankungen unterliegen. So untersuchten Ioannu und Kollegen das Ansprechen von Afatinib in 7 verschiedenen Pankreaskarzinom Zelllinien und fanden eine Breite der IC₅₀ Konzentrationen von 11 bis 1200 nM (Ioannou et al., 2011). Vom Kurvenverlauf ins Auge springend ist die Dosis-Wirkungsbeziehung von Afatinib bei Cal27. Es zeigt sich ein breites Plateau von etwa 20 bis 1000 nM in der eine Erhöhung der Dosis kaum mehr Einfluss auf die Proliferation hat. Sharma und Kollegen beschreiben eine ähnliche Beobachtung bei mit dem EGFR TKI Gefitinib behandelten PC9 Zelllinie, in denen eine Subpopulation eine einmalig gegebene 100-fache IC₅₀ Dosis überlebe (Sharma et al., 2010). Die Autoren identifizierten einen Chromatin vermittelten Mechanismus als Ursache. Weitere Untersuchungen wären nötig, ob ein solcher Mechanismus auch das Plateau bei Ansprechen von Cal27 auf Afatinib erklären kann.

Die Erzeugung und Untersuchung resistenter Zellklone durch chronische Exposition von zielgerichteten oder Chemotherapeutika ist in der Literatur ein vielgewählter Ansatz. So gibt es Publikationen zu resistenten Melanom- (Villanueva et al., 2010) Lungen- (Y. Kim et al., 2012), Darm- (Misale et al., 2012) und Brustkarzinomzelllinien (Ward et al., 2013). Die meisten Autoren generieren dabei die Resistenzen mit einer Zelllinie und einer Behandlung. Um aus dem Vergleich der langzeitbehandelten Zellen Rückschlüsse auf die Resistenzentwicklung zu schließen wurde in dieser Arbeit aus zwei Zelllinien und fünf Chemo- und zielgerichteten Therapien insgesamt zehn resistente Zelllinien generiert und verglichen. Um die Zellen zu untersuchen, wäre auch eine Einzelzellklonierung möglich gewesen. Dieser Ansatz wurde in der vorliegenden Arbeit nicht gewählt, da die heterogene Schar der Krebszellen als realistischeres Modell eines Tumors im Patienten angesehen wurde.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass es für beide Zelllinien und alle fünf zielgerichteten und Chemotherapeutika möglich war, Zellen zu erzeugen, die in deren

Präsens proliferierten. Dabei waren die finalen Dosen unter denen die Klone proliferierten, trotz gleicher Kriterien der Erzeugung, sehr unterschiedlich (Tabelle 21). Bei Zellen die mit den Signalweginhibitoren Afatinib, MK2206 und BEZ235 langzeitbehandelt wurden, konnte die Dosis viel höher eskaliert werden als bei den DNA-schädigenden Substanzen Cisplatin und Olaparib. So betrug nach 6 Monaten die finale Dosis unter der UD-SCC-5 Zellen noch proliferierten für Afatinib dem 800-fachen des IC_{50} während bei Cisplatin nur das 1-fache des IC_{50} erreicht werden konnte. Auch innerhalb der Gruppe der Signalweginhibitoren zeigte sich eine Hierarchie. Der EGF Rezeptor steht höher in der Signalkaskade als AKT. Entsprechend konnte bei UD-SCC-5 und Afatinib eine 800-fache IC_{50} Dosis erreicht werden, während bei AKT eine 50-fache Dosis maximal war. Bei Cal27 zeigten sich dieselben Resultate. Es könnte vermutet werden, dass je höher ein Ziel in der Signalkaskade ist, desto mehr alternative Signalwege es gibt und diese bei der Resistenzentwicklung aktiviert werden. Die Aktivierung komplementärer Signalwege, oftmals durch physiologische Rückkopplungsschleifen, ist ein wichtiger, in der Literatur beschriebener Resistenzmechanismus (Turner & Reis-Filho, 2012). So kann die durch mTOR Inhibition induzierte Expression von Insulin-Like Growth Factor-I (IGF-I) die vorübergehende Wachstumsinhibition wieder aufheben (O'Reilly et al., 2006). Weiterhin führte mTOR Inhibition über eine Rückkopplung zur Aktivierung des alternativen MAPK Signalwegs (Carracedo et al., 2008).

Um Änderungen im EGFR Weg zu erfassen wurden im Western-Blot die Phosphorylierung von EGFR, AKT und ERK 1/2 untersucht. Gerade bei den langzeitbehandelten UD-SCC-5 Zellen zeigte sich ein Switch auf ERK 1/2 (Abbildung 26). Bei Cal27 war schon ein basales Level an ERK 1/2 Phosphorylierung vorhanden, trotzdem war auch hier eine Hochregulation sichtbar. In der Literatur finden sich konkordante Daten. Woessmann und Kollegen zeigen, dass Cisplatin Behandlung ERK 1/2 phosphoryliert und spekulieren über eine direkte Aktivierung oder eine indirekte durch DNA-Schäden (Woessmann, Chen, & Borkhardt, 2002). Rampias und Kollegen belegen, dass die Aktivierung des Onkogens HRAS zu erhöhter Phosphorylierung des ERK 1/2 Signalwegs und damit erhöhter Cetuximab Resistenz in Kopf-Hals-Tumorzellen führt (Rampias et al., 2014). Wang et al. demonstrieren, dass ERK2 Aktivierung zur Phosphorylierung der Mitogen-activated phosphatase Kinase 1 und dies zur erhöhter Cisplatin Resistenz in Ovarialtumorzellen führt (Juan Wang, Zhou, & Wu, 2007). Die Hochregulation des ERK vorgeschaltetem RAS wurde mit erworbener Resistenz von Melanomen auf B-RAF V600E in Verbindung gebracht (Nazarian et al., 2010).

Zum schnellen Screening auf Veränderung in den Pfadwegen der resistenten Zellklone wurden die Proteinexpression mithilfe von Signalwegarrays untersucht. Positiv bei den

Arrays muss die Handhabung hervorgehoben werden. So war es möglich innerhalb eines Tages durch Befolgung sehr einfacher Schritte mit einem Array im Prinzip bis zu 39 verschiedene Western-Blots zu ersetzen. Negativ auffällig war die fehlende Vergleichbarkeit zum Western-Blot. So zeigte sich bei MK2206 resistenten UD-SCC-5 Klonen im Western-Blot eine starke Bande bei p-EGFR Thyrosin 1068, im Array war jedoch kein Signal erkennbar. Weiterhin war im Array kein Signal einer AKT Serin 473 oder ERK 1/2 Thyrosin 202/207 Phosphorylierung bei Afatinib resistenten Cal27 Klonen erkennbar während beide im Western-Blot Banden zeigten. Auch war weder auf dem Rezeptorthyrosinkinasearray noch auf dem EGFR-Signalwegarray eine Stat3 Tyr705 Phosphorylierung erkennbar, während diese für Afatinib resistente UD-SCC-5 Klone im Western-Blot nachweisbar war. Aufgrund der fehlenden Vergleichbarkeit wurde auf eine weitergehende Interpretation und Einordnung der Ergebnisse der Arrays an dieser Stelle verzichtet.

Krebsstammzellen werden oft mit Therapieresistenz in Verbindung gebracht. Eine Assoziation mit Resistenz legt die beobachtete Anreicherung von Stammzellen bei Behandlung mit dem Zytostatikum Gemcitabin in Pankreastumoren (Hermann et al., 2007), bei Cyclophosphamid in Kolonkarzinomen (Dylla et al., 2008) und bei Bestrahlung in Gliomen (Bao et al., 2006) nahe. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit die These überprüft, ob Langzeitbehandlung mit Therapeutika zur Anreicherung von Krebsstammzellen führt. Bis auf CD44 bei UD-SCC-5 und ALDH1 bei Cal27 exprimierten bereits die unbehandelten Zellen die untersuchten Stammzellmarker Oct4, Sox2, Nanog, Bmi1, CD44 und ALDH1. Dies weist darauf hin, dass bereits die unbehandelten Zellen Krebsstammzellen sind. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit der Literatur, die eine serielle Transplantation ins Tiermodell als Goldstandard zum Nachweis von Stammzellen sieht. Sowohl für Cal27 (Gioanni et al., 1988), als auch für UD-SCC-5 (Ballo et al., 1999) konnte eine Tumorbildung in immundefizienten Mäusen nachgewiesen werden. Die resistenten Zellklone zeigten überwiegend Änderungen in den untersuchten Markern, jedoch konnte kein einheitliches Muster identifiziert werden. Es ergab sich kein Marker, der bei allen oder den meisten resistenten Zellen hoch- oder herunterreguliert war. Diese Ergebnisse stimmen mit einer Studie von Liu und Kollegen überein, die ebenfalls kein klares Muster der Anreicherung von CD44, CD24 und ALDH1 bei Behandlung von Brustkrebszellen mit Doxorubicin, Docetaxel oder Bestrahlung fanden (Liu et al., 2014).

Mehr als 60% der Patienten mit Kopf-Hals Tumoren stellen sich im Stadium III oder IV erstmalig klinisch vor (T. Y. Seiwert & Cohen, 2005). Ohne Behandlung liegt die mittlere Überlebensdauer bei 4 Monaten (Kowalski & Carvalho, 2000). Die kombinierte Radiochemotherapie stellt eine wichtige Säule in der Behandlung fortgeschrittener Kopf-

Hals-Tumore dar (Schlumpf, Fischer, Naehrig, Rochlitz, & Buess, 2013). Ob Induktion mit Chemotherapie vor Strahlentherapie oder gleichzeitige Gabe von Radio- und Chemotherapie zu besseren Ergebnissen führt ist immer noch Gegenstand der klinischen Forschung (Bruce E Brockstein Everett E Vokes, 2016; Paccagnella et al., 2010; Rapidis et al., 2006). Als Induktionstherapie werden häufig platinhaltige Therapeutika eingesetzt. Gerade bei diesen Patienten ist die Frage nach Kreuzresistenz zwischen Radio- und Chemotherapie interessant. Bei Bestrahlung der in dieser Arbeit erzeugten langzeitbehandelten Zellen zwischen 0,5 und 10 Gy zeigten sich insgesamt nur wenige Änderungen. Sowohl in der Area under the Curve als auch in der Strahlenkinetik wichen unbehandelte und resistente Zellen nur wenig in ihren Ergebnissen ab. Größere Änderungen ergaben sich nur für hohe Bestrahlungsdosen bei den DNA-schädigenden Substanzen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Mechanismus von Resistenz gegen zielgerichtete und Chemotherapie einerseits und Strahlentherapie andererseits unabhängig ist. In der Literatur findet sich hier kein eindeutiger Konsensus. So beschreiben Pauwels und Kollegen, dass zwei Blasenkarzinomzelllinien die Resistenz gegen Doxorubicin und Vinorelbin zeigten, auch gegen Bestrahlung resistent waren (Pauwels et al., 1996). Andererseits berichteten Gigante und Kollegen von einer auf Cisplatin und weitere Therapeutika resistenten Zelllinie welche jedoch immer noch auf γ -Strahlung sensibel war (Gigante et al., 2003). Shi et al. publizierten Daten einer radioresistenten Lungenkarzinomzelllinie welche Sensitivität auf sechs Chemotherapeutika zeigte (D. Shi, Shi, Huang, Zhang, & Lartigau, 2009).

Gerade fortgeschrittene Kopf-Hals-Tumore zeigen intrinsische Resistenz gegen Röntgenstrahlung (Perri et al., 2015). Die Radioimmuntherapie könnte sich hier als vielversprechend erweisen. Pickhard und Kollegen konnten darlegen, dass eine Kombination aus an einen EGFR Antikörper gekoppeltes ^{213}Bi mit Röntgenstrahlung einen synergistischen Effekt auf Behandlung von Kopf-Hals-Tumorzellen hatten (Pickhard et al., 2014). In den Experimenten dieser Arbeit zeigte sich, dass bei Cal27 in Mittel etwa 85% der Aktivität an den Zellen gebunden war und somit dort ihre Wirkung entfalten konnte. Es gab dabei keine wesentlichen Unterschiede zwischen unbehandelten und resistenten Zellen. Es kann somit spekuliert werden, dass während der Langzeitbehandlung keine Herunterregulation der Expression des EGF Rezeptors stattfand. Diese Ergebnisse stimmen mit den Western-Blots überein, welche keine wesentliche Änderung der Expression bei Afatinib resistenten Zellen und nur eine kleine Herunterregulation bei Cisplatin resistenten Zellen zeigte. Ähnliche Ergebnisse fanden sich bei UD-SCC-5. Bei Auswertung der Proliferation war eine deutliche Reduktion bei Gabe von ^{213}Bi – Cetuximab in beiden unbehandelten Zelllinien festzustellen. Diese Reduktion war auch noch bei Afatinib resistenten Klonen vorhanden, nicht mehr

jedoch bei mit Cisplatin langzeitbehandelten Zellen beider Zelllinien und auch nicht bei Afatinib resistenten UD-SCC-5 Klonen (Abbildung 14 und 15). Im klonogenen Überleben zeigte sich ein ähnliches, wenn auch nicht so deutliches Bild wie bei Untersuchung der Proliferation. Warum sich kaum Veränderungen in der Proliferation bei Behandlung mit γ -Strahlung, jedoch bei 3 von 4 untersuchten langzeitbehandelten Zellen eine Resistenz gegen α -Strahlung zeigte, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. In der Literatur gibt es hierzu auch nur wenige Daten. Friesen und Kollegen legen dar, dass durch Caspasenaktivierung bei Gabe eines CD33 - ^{213}Bi Konjugats Radio- und Chemoresistenz von AML Zelllinien durchbrochen werden konnte (Friesen et al., 2013). Roscher et al. beschreiben ^{213}Bi – Anti-CD20 als therapeutische Option bei radio- und chemoresistenten Non-Hodgkin Lymphomen (Roscher et al., 2013).

Um das Verhalten der resistenten Klone auf weitere Chemotherapie zu simulieren, wurde die IC_{50} Dosis aller fünf Substanzen nochmals auf die resistenten Zellen gegeben. Hier deutete sich an, dass mit den EGFR Inhibitoren langzeitbehandelte Klone weniger sensitiv auf die im gleichen Signalweg wirkenden Therapeutika waren, also eine gewisse Kreuzresistenz zeigten. Diese Klone reagierten andererseits immer noch sensitiv auf die DNA-schädigenden Substanzen. Dagegen zeigten die resistenten Zellen der DNA-schädigenden Substanzen eine gewisse Multiresistenz, sie reagierten auf die jeweils anderen vier Therapeutika weniger sensitiv. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Langzeitinhibition von Signalmolekülen zu spezifischen Resistenzmechanismen wie Mutation oder Aktivierung alternativer Signalwege führt. Demgegenüber scheint Langzeitbehandlung mit DNA-schädigenden Substanzen zu unspezifischen Abwehrmechanismen wie erhöhtem Efflux zu führen. Diese Thesen werden auch in der Literatur diskutiert. So zeigt sich nach Gabe konventioneller Chemotherapie unter anderem eine Hochregulation der multidrug resistance Proteine die zu einem erhöhten Ausflussrate von Medikamenten führt (Thomas & Coley, 2003). Dagegen demonstrieren Oerlemans und Kollegen bei mit dem Proteasominhibitor Bortezomib langzeitbehandelten Myelozyten eine Mutation der Bindungstasche als Resistenzmechanismus (Oerlemans et al., 2008). In einer Übersichtsarbeit von Wheeler und Kollegen präsentieren die Autoren die Aktivierung der komplementären HER2, HER3 und cMET Signalwege als erworbene Resistenzmechanismen gegen Cetuximab (Wheeler et al., 2008).

Der Random Mutation Capture Assay wurde zunächst als einfach zu implementierende Methode zur Bestimmung der Punktmutationsrate gewählt. Der Assay basiert darauf, dass die Sequenz TCGA durch das Restriktionsenzym Taq^{qI} nur dann geschnitten werden kann, wenn alle Basen TCGA an beiden Strängen erhalten sind. In den Versuchen dieser Arbeit wurde eine Sequenz TCGA im Intron 8 des p53 Gens gewählt. Zum Nachweis einer Mutation

wird DNA zunächst mit dem Restriktionsenzym verdaut. Nun wird die DNA verdünnt, so dass nur noch eine Kopie pro Ansatz erhalten ist. Eine PCR vervielfältigt den Abschnitt im p53 Intron8 Gen dieser Kopie nur dann mit nichtlinearer Effizienz, wenn die darin erhaltene Sequenz TCGA nicht geschnitten wurde. Hierfür kann es zwei Gründe geben. Erstens, die Sequenz TCGA erhält eine mutierte Base und zweitens, der Verdau war nicht vollständig. Eine Unterscheidung gelingt, indem das Amplifikat nochmals mit Taq^qI verdaut wird. Wieder kann das Restriktionsenzym nicht schneiden, wenn eine Mutation vorhanden ist. Im Agarosegel wird ein Amplifikat einer Mutation nur eine Bande, eine unveränderte Sequenz TCGA zwei Banden ergeben.

Eine alternative Methode zur Bestimmung der Mutationsfrequenz wäre die Sequenzierung des ganzen Genoms einer einzelnen Zelle. Obwohl kürzlich die Sequenzierung und Auswertung des Genoms für 1000 Dollar möglich geworden ist (Genetics, 2016) sind die Kosten für Einzelzellsequenzierung für das Onkologische Labor der HNO am rechts der Isar noch unerschwinglich. Ein weiteres Problem mit Genomsequenzierung ist die Fehlerrate. So muss für die Sequenzierung des Genoms einer einzelnen Zelle erst ihr ganzes Genom amplifiziert werden. Hier ist von Fehlerraten um $3,20 \cdot 10^{-6}$ pro Base auszugehen (De Bourcy et al., 2014). Dies würde in etwa dem 20-fachen der mit dem RMC Assay gemessenen Mutationsrate von unbehandelten UD-SCC-5 entsprechen und wäre somit einer Messung nicht zugänglich.

Wie sensitiv der RMC Assay Mutationsfrequenzen messen kann ist unbekannt. Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen war auffällig, dass die Mutationsfrequenzen in den Verdünnungen der verdauten DNA teilweise stark abwichen. So sollte theoretisch in einer 4-fach Verdünnung der DNA auch die Mutationsfrequenz 4x niedriger sein. Vor allem bei UD-SCC-5 wichen die Ergebnisse hier ab und die Mittelung aus zwei aufeinanderfolgenden Verdünnungen war nicht signifikant.

Zur Überprüfung der Implementation des Assays im Labor wurde wie von Bielas und Loeb in der Originalpublikation Cal27 Zellen mit dem stark mutagenen Ethylnitrosenharnstoff (ENU) behandelt. Hier ergab sich eine Mutationsfrequenz von $3,40 \cdot 10^{-6}$. Dies ist vergleichbar mit dem von Bielas und Loeb publizierten Wert von $0,85 \cdot 10^{-6}$ bei Behandlung von Fibroblasten mit ENU (Bielas & Loeb, 2005).

Für unbehandelte Zellen ergab sich im RMC Assay eine Mutationsfrequenz bei Cal27 von $7,00 \cdot 10^{-8}$ beziehungsweise $1,57 \cdot 10^{-7}$ pro Basenpaar bei UD-SCC-5. Bielas und Loeb bestimmen für unbehandelte Fibroblasten eine Mutationsfrequenz von $1,60 \cdot 10^{-8}$ pro Basenpaar, also etwa 4 beziehungsweise 10 Mal so groß wie von Cal27 und UD-SCC-5.

Resistente Cal27 Zellen zeigten eine Mutationsfrequenz von $5,78 \cdot 10^{-7}$ und bei UD-SCC-5 von $1,22 \cdot 10^{-6}$ pro Basenpaar. Jia und Kollegen verglichen parenterale PC-9 Zellen mit langzeitbehandelten, auf Erlotinib durch T790M Mutation resistenten PC-9 Zellen und fanden mithilfe der Genomsequenzierung 33 Einzelnukleotid-Varianten in kodierenden Bereichen (Peilin Jia et al., 2013). Dies entspricht einer Mutationsfrequenz von etwa $1,00 \cdot 10^{-6}$ pro Basenpaar, ist also mit den hier vorgestellten Ergebnissen vergleichbar.

Alle resistenten Zellen zeigten, verglichen zu über 6 Monate unbehandelten Zellen, eine durchschnittlich um 8,3 für Cal27 beziehungsweise um 7,8 für UD-SCC-5 erhöhte Mutationsfrequenz. Es ergab sich eine Breite der Steigerung von 4,4 bei UD-SCC-5 resistenten Cal27 Zellen bis 14,8 bei UD-SCC-5 Cisplatin resistenten Klonen. Wie zu erwarten war die Steigerung für die DNA-schädigenden Substanzen Olapaib und Cisplatin am größten. Interessanterweise zeigt jedoch auch die Langzeitbehandlung mit zielgerichteten Therapien, deren primärer Wirkungsmechanismus die hochspezifische Blockade von Signalwegmolekülen ist und im Prinzip nicht mutagen sind, eine Erhöhung der Mutationsfrequenz. Diese Ergebnisse bestätigen die These, dass genetische Änderung nicht nur in der Krebsentwicklung (Loeb, 2001), sondern auch in der Resistenzbildung gegen Therapeutika eine wichtige Rolle spielt (Turner & Reis-Filho, 2012).

Um den Mechanismus der Erhöhung der Mutationsfrequenz zu untersuchen wurde als im Rahmen dieser Arbeit die RNA Expression von UD-SCC-5 Zellen welche über 24 und 168 Stunden mit Afatinib und Cisplatin und die entsprechenden resistenten Klone mithilfe eines Microarrays untersucht. Die Interpretation der 19006 individuell hoch- oder herunterregulierten Gene gestaltete sich als herausfordernd. Einen guten Überblick konnte mit der Gene Ontology Analyse gewonnen werden. Hier zeigte sich nach 168 Stunden in Afatinib und Cisplatin behandelten Zellen ein negativer enrichment Score in der DNA Replikation (Abbildung 30). Polymerase $\delta 1$ und $\delta 3$ waren ebenso in beiden Behandlungen herunterreguliert. Wie in der Einleitung beschrieben kann zwischen high fidelity Polymerasen mit geringer Fehlerrate und low Fidelity Polymerasen unterschieden werden. Polymerase δ gehört zu den high fidelity Polymerasen (McCulloch & Kunkel, 2008). Herunterregulation dieser wie ebenso von Hara und Kollegen bei Gabe des Androgenantagonisten Bicalutamid im Prostatakarzinom beschrieben könnte zur Erhöhung der Mutationsfrequenz beitragen (Hara et al., 2005). Tumini et al. fanden eine erhöhte Zahl an DNA Strangbrüchen und chromosomalen Veränderungen als Zeichen erhöhter genetischer Instabilität in Zellen mit herunterregulierten D1 und D3 Einheiten der Polymerase δ (Tumini, Barroso, Calero, & Aguilera, 2016). Weiterhin beschreiben Czochoch und Kollegen eine Erhöhung der

genetischen Instabilität durch Herunterregulation von Polymerase δ bei Stimulation mit der miRNA miR-155 (Czochor, Sulkowski, & Glazer, 2016).

Um positiv regulierte Mechanismen zu finden, die die Mutationsfrequenz beeinflussen wurde als nächstes eine Literaturrecherche durchgeführt und 20 an verschiedenen DNA Reparaturmechanismen beteiligte Gene identifiziert. In qPCR in mit Afatinib oder Cisplatin 168 Stunden behandelten UD-SCC-5 Zellen zeigten Polymerase ι , APOBEC3B und XPC signifikant hochreguliert (Abbildung 31). In der zeitlichen Dynamik zeigte sich APOBEC3B und Polymerase ι bereits nach 24 Stunden ansteigend in der mRNA Expression (Abbildung 32). In den Western-Blots bestätigte sich eine Hochregulation von Polymerase ι und APOBEC3B (Abbildung 36). Ebenso konnte durch den ERK 1/2 Inhibitor U0126 die Proteinexpression von Polymerase ι und APOBEC3B blockiert werden. Nun wurde die Wirkung einer Herunterregulation von APOBEC auf die Mutationsfrequenz untersucht. Zur Messung dieser wurde der HPRT Assay als vermeintlich einfacher zu implementierende Methode anstatt des RMC Assays verwendet. Die Mutationsfrequenz konnte signifikant durch Kostimulation mit U0126 bei Afatinib und Cisplatin Gabe gesenkt werden (Abbildung 37). Zusammenfassend deutet dies auf eine ERK 1/2 abhängige Regulation der Mutationsfrequenz über APOBEC3B und Polymerase ι in Cisplatin und Afatinib stimulierten Kopf-Hals-Tumorzellen hin.

Als einer der Mechanismen der Mutationsfrequenzerhöhung wurde in dieser Arbeit somit Polymerase ι identifiziert. Wie in der Einleitung unter 2.2.1. beschrieben gehört Polymerase ι neben Polymerase ζ , η und κ in die Y-Familie zu den „low fidelity“ Polymerasen, also höher fehlertoleranten Polymerasen als die high fidelity Polymerasen α , δ , ϵ . Die Y-Familie spielt eine wichtige Rolle in der Translänionssynthese (McCulloch & Kunkel, 2008). Defekte in der Translänionssynthese können zur Karzinogenese beitragen. So fanden Lin und Kollegen eine erhöhte Rate an UV induzierbaren Hauttumoren bei Polymerase η defizienten Mäusen (Lin et al., 2006). Wojtaszek et al. berichten, dass durch Inhibition der Rekrutierung von Polymerase ζ die Effizienz von Cisplatin in humanen Tumorzelllinien gesteigert werden kann (Wojtaszek et al., 2019).

Als weiterer Mechanismus der Mutationsfrequenzerhöhung wurde in dieser Arbeit APOBEC3B identifiziert. Wie im Abschnitt 2.2.2 beschrieben spielt die Familie der APOBEC Enzyme eine bedeutende Rolle im Rahmen der Resistenzbildung bei HIV Infektion. So sind diese Enzyme an der Mutagenese von HIV Vironen beteiligt was einerseits der Abwehr dient, andererseits kann dies aber auch zum Auftreten therapieresistenter Varianten beitragen (Venkatesan et al., 2018). Die APOBEC Enzymfamilie gewinnt zunehmendes Interesse in

der Krebsforschung. Petljak und Kollegen fanden episodische Ausbrüche der mit APOBEC assoziierten Mutationssignatur in 1001 Krebszelllinien und 577 Patientenproben (Petljak et al., 2019). Roper et al. berichten über eine Korrelation von Tumorerheterogenität und APOBEC assoziierter Mutationslast in post mortem Proben thorakaler Tumoren (Roper et al., 2019). Überexpression von APOBEC3B in humanen Zellen kann zu einer erhöhten Mutationslast führen (Akre et al., 2016). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit fand Faltas und Kollegen eine erhöhte Zahl APOBEC assoziierter Mutationen bei Patienten mit Urothelkarzinom nach Chemotherapie (Faltas et al., 2016).

Während es viele Publikationen zur funktionellen Rolle von APOBEC in HIV- und Krebsforschung gibt, ist immer noch wenig über die Regulation dieser Enzymfamilie bekannt (Covino, Gauzzi, & Fantuzzi, 2018). Im Rahmen dieser Arbeit wurde MEK 1/2 als Regulationsmechanismus für APOBEC3B in Kopf-Hals Tumorzellen postuliert. In der Literatur finden sich mögliche Wege über NF- κ B und MYBL2. Maruyama und Kollegen beschreiben einen Aktivierungspfad von APOBEC3B über NF- κ B (Maruyama et al., 2016). Chou et al konnten zeigen, dass EGFR Blockade mit Afatinib die Expression von MYBL2 und APOBEC3B senkt (Chou et al., 2017). Die Autoren spekulieren über eine mögliche Suppression der Mutationsfrequenz durch EGFR Blockade. Die Daten im Rahmen dieser Arbeit zeigen, dass erst durch Kostimulation mit dem MEK Inhibitor U0126 mit Afatinib die Mutationsfrequenz im Kopf-Hals Tumorzellen signifikant sinkt.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten Kopf-Hals-Tumorzellen durch Langzeitbehandlung mit aufsteigenden Dosen von fünf Chemo- und zielgerichteten Therapien generiert werden. Die Dosen der Pfadweginhibitoren Afatinib, MK220-6 und BEZ-235 konnten dabei wesentlich höher gesteigert werden als die DNA schädigende Substanzen Cisplatin und Olaparib. Es zeigte sich Kreuzresistenz der Pfadweginhibitoren bei gleichzeitiger Sensibilität auf DNA schädigende Substanzen. Cisplatin und Olaparib resistente Zellen zeigten Multiresistenz. Ebenso waren Cisplatin langzeitbehandelte Klone resistent gegen α -Strahler. Afatinib resistente Klone waren gegenüber α -Strahler sensibel. Stammzellmarker waren in resistenten Klonen erhöht, jedoch konnte kein einzelner gemeinsam hochregulierter Marker identifiziert werden. Die Mutationsfrequenz war in allen untersuchten resistenten Klonen um durchschnittlich um etwa das 8x nach 6 Monaten erhöht. Die Mutationsfrequenz war bei Afatinib und Cisplatin Stimulation über sieben Tage ebenso bereits erhöht. Als möglicher Mechanismus konnte eine ERK 1/2 abhängige Hochregulation von Polymerase α und APOBEC3B identifiziert werden.

Ob eine Kostimulation des ERK 1/2 Inhibitors U0126 präklinisch und klinisch die Mutationsfrequenz und somit Resistenzentwicklung senken kann und damit letztendlich die Prognose von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren verbessern kann müssen zukünftige Forschungen zeigen.

7. Anhang

7.1 Danksagung

Ich möchte mich recht herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Henning Bier für die Unterstützung des onkologischen Labors bis zu seinem frühen Tod bedanken.

Weiterhin möchte ich mich sehr herzlich bei Frau Prof. Dr. med. Anja Pickhard für die Themenstellung, fruchtbaren Diskussionen und kontinuierliche Begleitung herzlich bedanken. Ohne ihre Offenheit für neue Ideen und Prüfen der Machbarkeit im Rahmen des onkologischen Labors wäre die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Sehr herzlich möchte ich Herrn Guido Piontek danken, für die Einführung in die Laborarbeit, kontinuierliche Betreuung und dafür als Diskussionspartner bei Problemen stets hilfreich zur Seite gestanden zu sein.

Außerdem möchte ich Herrn PD Dr.med. Markus Wirth danken, der vor allem in der Anfangszeit diese Arbeit mitgestaltete und begleitete.

Ich danke Herrn Michael Siegl für die Zusammenarbeit bei den Experimenten mit α -Strahlern.

Ich danke Frau Prof. Dr. rer. nat. Gabriele Multhoff für ihre Bereitschaft und die Begleitung von naturwissenschaftlicher Seite während dieser Promotion.

Zuletzt möchte ich meinen Mitdoktoranden für die gute und interessante Zeit bedanken.

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte.....	23
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	24
Tabelle 3: Reagenzien und Chemikalien	26
Tabelle 4: Medien und Supplemente	26
Tabelle 5: Inhibitoren	26
Tabelle 6: Kits	27
Tabelle 7: Gemische	27
Tabelle 8: Computerprogramme	28
Tabelle 9: PCR Primer.....	30
Tabelle 10: Primärantikörper	31
Tabelle 11: Verwendete Konzentrationen für die Beimpfung	35
Tabelle 12: RNA-Mix	35
Tabelle 13: Enzym Mix	36
Tabelle 14: PCR Protokoll zur mRNA Expressionsanalyse.....	36
Tabelle 15: Lösung von BSA als Standardkurve.....	37
Tabelle 16: Zusammensetzung der Laufgele unterschiedlicher Dichte	37
Tabelle 17: Zusammensetzung Stacking Gel	37
Tabelle 18: PCR Protokoll für RMC Assay.....	40
Tabelle 19: Zusammensetzung des Verdauansatzes	41
Tabelle 20: IC ₅₀ Konzentration der fünf Substanzen	45
Tabelle 21: Final erreichte Dosen in Vielfachen der IC ₅₀ Konzentration.....	46
Tabelle 22: Bindungseffizienz von ²¹³ Bi – Cetuximab	49
Tabelle 23: Resistente Zellen zeigen eine etwa 8x höhere Mutationsfrequenz als die unbehandelte Kontrolle.....	63
Tabelle 24: Mutationsfrequenzen der resistenten Cal27 Klone	63
Tabelle 25: Mutationsfrequenzen der resistenten UD-SCC-5 Klone	64

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Modell der sequenziellen Entstehung von Kopf-Hals-Tumoren	6
Abbildung 2 Frühe Veränderungen im Zellzyklus in Kopf-Hals-Tumoren	7
Abbildung 3: Überblick über die verwendeten Inhibitoren	17
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Blot Stapels	38
Abbildung 5: Berechnung der Kopienzahl pro Well	40
Abbildung 6: Berechnung der Mutationsfrequenz	42
Abbildung 7: Proliferation von Cal27 bei einmaliger Gabe der fünf Chemo- und zielgerichteten Therapien	44
Abbildung 8: Proliferation von UD-SCC-5 bei einmaliger Gabe der fünf Chemo- und zielgerichteten Therapien	45
Abbildung 9: Zeitentwicklung der resistenten Zellen	46
Abbildung 10: Proliferationsgeschwindigkeit von Cal27 und UD-SCC-5	47
Abbildung 11: links: Morphologische Änderungen von Cal27. Links: unbehandelt, rechts: Cal27 Afatinib resistent	48
Abbildung 12: Wenig Veränderung in der Strahlenkinetik von 0 bis 10 Gy	48
Abbildung 13: Marginale Änderungen in der AUC	49
Abbildung 14: α -Strahlenresistenz in Proliferation von mit Cisplatin langzeitbehandelten Zellen	50
Abbildung 15: α -Strahlenresistenz in Proliferation von Cisplatin und Afatinib resistenten Zellen	51
Abbildung 16: Klonogenes Überleben von unbehandelten und resistenten Cal27 Zellen	52
Abbildung 17: Klonogenes Überleben von unbehandelten und resistenten UD-SCC-5 Zellen	52
Abbildung 18: Langzeitbehandelte Cal27 Zellen mit EGFR Signalweg Inhibitoren „kruzresistent“, mit DNA-schädigenden Substanzen "multiresistent"	54
Abbildung 19: Ebenso wie bei Cal27 auch bei UD-SCC-5: Resistente Zellen gegen die EGFR Signalweg Inhibitoren „kruzresistent“, gegen die DNA-schädigenden Substanzen "multiresistent"	54
Abbildung 20: Einzelauftragung der Kombinationsversuche für Cal27	55
Abbildung 21: Einzelauftragung der Kombinationsversuche für UD-SCC-5	56
Abbildung 22: Auswertung der EGFR Signalwegarrays für Afatinib resistente Cal27 und UD-SCC-5 Zellen	57
Abbildung 23: Auswertung der EGFR Signalwegarrays für MK2206 resistente Cal27 und UD-SCC-5 Zellen	57

Abbildung 24: Auswertung der RTK Signalwegarrays für Afatinib resistente Cal27 und UD-SCC-5 Zellen.....	58
Abbildung 25: Auswertung der RTK Signalwegarrays für MK2206 resistente Cal27 und UD-SCC-5 Zellen.....	59
Abbildung 26: ERK 1/2 Aktivierung in resistenten Klonen.....	60
Abbildung 27: Heterogene Änderung in Stammzellmarkern der langzeitbehandelten Zellen	61
Abbildung 28: Semiquantitative Auswertung der Stammzellmarkerexpression bei langzeitbehandelten Cal27 Zellen	61
Abbildung 29: Semiquantitative Auswertung der Stammzellmarkerexpression bei langzeitbehandelten UD-SCC-5 Zellen.....	62
Abbildung 30: A: Heatmap der RNA Expression von Afatinib und Cisplatin behandelten Zellen nach 24 Stunden, 168 Stunden und resistente Klone. B: Gene ontology Analyse mit der Top 10 positiv und negativ angereicherter Gensets in Zellen nach 168 Stunden Stimulation mit Afatinib. C: Gene ontology Analyse mit der Top 10 positiv und negativ angereicherter Gensets in Zellen nach 168 Stunden Stimulation mit Cisplatin	65
Abbildung 31: Relative Expression in quantitativer PCR von 20 an DNA Reparaturmechanismen beteiligten Genen. * zeigt statistische Signifikanz	66
Abbildung 32: Hochregulation von Pol δ , STAT3, APOBEC3A und APOBEC3B in UD-SCC-5 bei einmaliger Stimulierung mit Afatinib oder Cisplatin	67
Abbildung 33: Hochregulation von Pol δ , STAT1, STAT3 und APOBEC3B in Cal27 bei einmaliger Stimulierung mit Afatinib oder Cisplatin	68
Abbildung 34: Hochregulation von IL-6 und IL-20 RB in Cal27 bei einmaliger Stimulierung mit Afatinib oder Cisplatin.....	69
Abbildung 35: Hochregulation von IL-6 und IL-20 RB in UD-SCC-5 bei einmaliger Stimulierung mit Afatinib oder Cisplatin	70
Abbildung 36: Hochregulation von Polymerase α und APOBEC3B in Afatinib und Cisplatin stimulierten Zellen auf Proteinebene im Western Blot. Unter Kostimulation mit U0126 kann die Proteinexpression supprimiert werden. Kostimulation mit SB203580 hat keinen Effekt auf die Proteinexpression von Afatinib und Cisplatin.	70
Abbildung 37: Verkleinerung der Mutationsfrequenz bei Kostimulation von Zellen mit Afatinib/Cisplatin und U0126 im Vergleich zu stimulierten Zellen. * zeigt statistische Signifikanz.....	71

7.4 Literaturverzeichnis

- Akre, M. K., Starrett, G. J., Quist, J. S., Temiz, N. A., Carpenter, M. A., Tutt, A. N., . . . Harris, R. S. (2016). Mutation processes in 293-based clones overexpressing the DNA cytosine deaminase APOBEC3B. *PLoS one*, *11*(5).
- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., & Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(7), 3983-3988. doi:10.1073/pnas.0530291100
- Alroy, I., Soussan, L., Seger, R., & Yarden, Y. (1999). Neu differentiation factor stimulates phosphorylation and activation of the Sp1 transcription factor. *Mol Cell Biol*, *19*(3), 1961-1972.
- Apostolidis, C., Molinet, R., Rasmussen, G., & Morgenstern, A. (2005). Production of Ac-225 from Th-229 for Targeted α Therapy. *Analytical Chemistry*, *77*(19), 6288-6291. doi:10.1021/ac0580114
- Ara, T., & DeClerck, Y. A. (2010). Interleukin-6 in bone metastasis and cancer progression. *European Journal of Cancer*, *46*(7), 1223-1231.
- Awasthi, N., Yen, P. L., Schwarz, M. A., & Schwarz, R. E. (2012). The efficacy of a novel, dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BE235 to enhance chemotherapy and antiangiogenic response in pancreatic cancer. *J Cell Biochem*, *113*(3), 784-791. doi:10.1002/jcb.23405
- Balaban, N. Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L., & Leibler, S. (2004). Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science*, *305*(5690), 1622-1625.
- Ballo, H., Koldovsky, P., Hoffmann, T., Balz, V., Hildebrandt, B., Gerharz, C. D., & Bier, H. (1999). Establishment and characterization of four cell lines derived from human head and neck squamous cell carcinomas for an autologous tumor-fibroblast in vitro model. *Anticancer Res*, *19*(5b), 3827-3836.
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R. E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A. B., . . . Rich, J. N. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, *444*(7120), 756-760.
- Battesti, A., Majdalani, N., & Gottesman, S. (2011). The RpoS-mediated general stress response in *Escherichia coli**. *Annual review of microbiology*, *65*, 189-213.
- Berns, K., Horlings, H. M., Hennessy, B. T., Madiredjo, M., Hijmans, E. M., Beelen, K., . . . Bernards, R. (2007). A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell*, *12*(4), 395-402. doi:10.1016/j.ccr.2007.08.030
- Bielas, J. H., & Loeb, L. A. (2005). Quantification of random genomic mutations. *Nature methods*, *2*(4), 285-290.
- Birkbak, N. J., Eklund, A. C., Li, Q., McClelland, S. E., Endesfelder, D., Tan, P., . . . Swanton, C. (2011). Paradoxical relationship between chromosomal instability and survival outcome in cancer. *Cancer Res*, *71*(10), 3447-3452. doi:10.1158/0008-5472.can-10-3667
- Biswas, D. K., Cruz, A. P., Gansberger, E., & Pardee, A. B. (2000). Epidermal growth factor-induced nuclear factor kappa B activation: A major pathway of cell-cycle progression in estrogen-receptor negative breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(15), 8542-8547.
- Blay, J.-Y., Negrier, S., Combaret, V., Attali, S., Goillot, E., Merrouche, Y., . . . Moskvitchenko, J.-F. (1992). Serum level of interleukin 6 as a prognosis factor in metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Res*, *52*(12), 3317-3322.
- Bonner, J. A., Harari, P. M., Giralt, J., Azarnia, N., Shin, D. M., Cohen, R. B., . . . Jassem, J. (2006). Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *New England Journal of Medicine*, *354*(6), 567-578.
- Bornstein, S., White, R., Malkoski, S., Oka, M., Han, G., Cleaver, T., . . . Wang, X. J. (2009). Smad4 loss in mice causes spontaneous head and neck cancer with increased genomic instability and inflammation. *J Clin Invest*, *119*(11), 3408-3419. doi:10.1172/jci38854

- Borsellino, N., Belldegrun, A., & Bonavida, B. (1995). Endogenous interleukin 6 is a resistance factor for cis-diamminedichloroplatinum and etoposide-mediated cytotoxicity of human prostate carcinoma cell lines. *Cancer Res*, 55(20), 4633-4639.
- Bouwman, P., & Jonkers, J. (2012). The effects of deregulated DNA damage signalling on cancer chemotherapy response and resistance. *Nature Reviews Cancer*, 12(9), 587-598.
- Braakhuis, B. J., Tabor, M. P., Kummer, J. A., Leemans, C. R., & Brakenhoff, R. H. (2003). A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res*, 63(8), 1727-1730.
- Brody, J. E. (2008, 17.06.2008). Once-fatal cancers now treated as a chronic disease. Retrieved from http://www.nytimes.com/2008/06/19/health/19iht-snbrody.1.13772712.html?_r=0
- Bruce E Brockstein Everett E Vokes, A. E. (2016). Locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: Approaches combining chemotherapy and radiation therapy. In *UpToDate*. UpToDate, Waltham, MA (Online eingesehen am 20.06.2016).
- Bruce E Brockstein, K. M. S., Shiyu Song. (2016). Overview of treatment for head and neck cancer. In *UpToDate*. UpToDate, Waltham, MA (Online eingesehen am 17.06.2016).
- Bryant, H. E., Schultz, N., Thomas, H. D., Parker, K. M., Flower, D., Lopez, E., . . . Helleday, T. (2005). Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase. *Nature*, 434(7035), 913-917.
- Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J., . . . Vogelstein, B. (1998). Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science*, 282(5393), 1497-1501.
- Burtness, B. (2005). The role of cetuximab in the treatment of squamous cell cancer of the head and neck. *Expert opinion on biological therapy*, 5(8), 1085-1093.
- Butler, M. T., Wang, Q., & Harshey, R. M. (2010). Cell density and mobility protect swarming bacteria against antibiotics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(8), 3776-3781.
- Califano, J., van der Riet, P., Westra, W., Nawroz, H., Clayman, G., Piantadosi, S., . . . Koch, W. (1996). Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res*, 56(11), 2488-2492.
- Camidge, D. R., Bang, Y.-J., Kwak, E. L., Iafrate, A. J., Varella-Garcia, M., Fox, S. B., . . . Kim, D.-W. (2012). Activity and safety of crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: updated results from a phase 1 study. *The lancet oncology*, 13(10), 1011-1019.
- Cannataro, V. L., Gaffney, S. G., Sasaki, T., Issaeva, N., Grewal, N. K., Grandis, J. R., . . . Townsend, J. P. (2019). APOBEC-induced mutations and their cancer effect size in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene*, 38(18), 3475-3487.
- Carpenter, R. L., & Lo, H.-W. (2014). STAT3 target genes relevant to human cancers. *Cancers*, 6(2), 897-925.
- Carracedo, A., Ma, L., Teruya-Feldstein, J., Rojo, F., Salmena, L., Alimonti, A., . . . Kozma, S. C. (2008). Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *The Journal of clinical investigation*, 118(9), 3065-3074.
- Caval, V., Suspene, R., Shapira, M., Vartanian, J. P., & Wain-Hobson, S. (2014). A prevalent cancer susceptibility APOBEC3A hybrid allele bearing APOBEC3B 3'UTR enhances chromosomal DNA damage. *Nat Commun*, 5, 5129. doi:10.1038/ncomms6129
- Cetuximab approved by FDA for treatment of head and neck squamous cell cancer. (2006). *Cancer Biol Ther*, 5(4), 340-342.
- Chapman, P. B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J. B., Ascierto, P., Larkin, J., . . . McArthur, G. A. (2011). Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *New England Journal of Medicine*, 364(26), 2507-2516. doi:doi:10.1056/NEJMoa1103782
- Chen, Y., Takita, J., Choi, Y. L., Kato, M., Ohira, M., Sanada, M., . . . Igarashi, T. (2008). Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature*, 455(7215), 971-974.

- Chou, W.-C., Chen, W.-T., Hsiung, C.-N., Hu, L.-Y., Yu, J.-C., Hsu, H.-M., & Shen, C.-Y. (2017). B-Myb induces APOBEC3B expression leading to somatic mutation in multiple cancers. *Scientific Reports*, *7*, 44089.
- Cipponi, A., & Thomas, D. M. (2014). Stress-induced cellular adaptive strategies: Ancient evolutionarily conserved programs as new anticancer therapeutic targets. *BioEssays*, *36*(6), 552-560.
- Clarke, M. F., Dick, J. E., Dirks, P. B., Eaves, C. J., Jamieson, C. H., Jones, D. L., . . . Wahl, G. M. (2006). Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res*, *66*(19), 9339-9344.
- Clay, M. R., Tabor, M., Owen, J. H., Carey, T. E., Bradford, C. R., Wolf, G. T., . . . Prince, M. E. (2010). Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase. *Head & neck*, *32*(9), 1195-1201.
- Clevers, H. (2011). The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nature medicine*, 313-319.
- Cohen, S. (1962). Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem*, *237*, 1555-1562.
- Cohen, S. (1964). ISOLATION AND BIOLOGICAL EFFECTS OF AN EPIDERMAL GROWTH-STIMULATING PROTEIN. *Natl Cancer Inst Monogr*, *13*, 13-37.
- Conze, D., Weiss, L., Regen, P. S., Bhushan, A., Weaver, D., Johnson, P., & Rincón, M. (2001). Autocrine production of interleukin 6 causes multidrug resistance in breast cancer cells. *Cancer Res*, *61*(24), 8851-8858.
- Covino, D. A., Gauzzi, M. C., & Fantuzzi, L. (2018). Understanding the regulation of APOBEC3 expression: Current evidence and much to learn. *Journal of leukocyte biology*, *103*(3), 433-444.
- Curado, M. P., & Boyle, P. (2013). Epidemiology of head and neck squamous cell carcinoma not related to tobacco or alcohol. *Curr Opin Oncol*, *25*(3), 229-234. doi:10.1097/CCO.0b013e32835ff48c
- Cutry, A. F., Kinniburgh, A. J., Krabak, M. J., Hui, S. W., & Wenner, C. E. (1989). Induction of c-fos and c-myc proto-oncogene expression by epidermal growth factor and transforming growth factor alpha is calcium-independent. *J Biol Chem*, *264*(33), 19700-19705.
- Czochor, J. R., Sulkowski, P., & Glazer, P. M. (2016). miR-155 Overexpression Promotes Genomic Instability by Reducing High-fidelity Polymerase Delta Expression and Activating Error-Prone DSB Repair. *Mol Cancer Res*, *14*(4), 363-373. doi:10.1158/1541-7786.mcr-15-0399
- Daenen, L. G., Roodhart, J. M., van Amersfoort, M., Dehnad, M., Roessingh, W., Ulfman, L. H., . . . Voest, E. E. (2011). Chemotherapy enhances metastasis formation via VEGFR-1-expressing endothelial cells. *Cancer Res*, *71*(22), 6976-6985.
- Davar, D., Beumer, J. H., Hamieh, L., & Tawbi, H. (2012). Role of PARP inhibitors in cancer biology and therapy. *Curr Med Chem*, *19*(23), 3907-3921.
- De Bourcy, C. F., De Vlaminc, I., Kanbar, J. N., Wang, J., Gawad, C., & Quake, S. R. (2014). A quantitative comparison of single-cell whole genome amplification methods. *PloS one*, *9*(8), e105585.
- de Larco, J. E., & Todaro, G. J. (1978). Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *75*(8), 4001-4005.
- de Wilt, L. H., Jansen, G., Assaraf, Y. G., van Meerloo, J., Cloos, J., Schimmer, A. D., . . . Kruij, F. A. (2012). Proteasome-based mechanisms of intrinsic and acquired bortezomib resistance in non-small cell lung cancer. *Biochem Pharmacol*, *83*(2), 207-217. doi:10.1016/j.bcp.2011.10.009
- Desoize, B., & Madoulet, C. (2002). Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment. *Critical reviews in oncology/hematology*, *42*(3), 317-325.

- Di Noia, J. M., & Neuberger, M. S. (2007). Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu. Rev. Biochem.*, 76, 1-22.
- Dienstmann, R., Rodon, J., Serra, V., & Tabernero, J. (2014). Picking the point of inhibition: a comparative review of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors. *Mol Cancer Ther*, 13(5), 1021-1031.
- Dienz, O., Rud, J. G., Eaton, S. M., Lanthier, P. A., Burg, E., Drew, A., . . . Rincon, M. (2012). Essential role of IL-6 in protection against H1N1 influenza virus by promoting neutrophil survival in the lung. *Mucosal Immunol*, 5(3), 258-266. doi:10.1038/mi.2012.2
- Doebele, R. C., Pilling, A. B., Aisner, D. L., Kutateladze, T. G., Le, A. T., Weickhardt, A. J., . . . Franklin, W. A. (2012). Mechanisms of resistance to crizotinib in patients with ALK gene rearranged non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 18(5), 1472-1482.
- Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, 15(2), 167-193.
- Dreux, A. C., Lamb, D. J., Modjtahedi, H., & Ferns, G. A. (2006). The epidermal growth factor receptors and their family of ligands: their putative role in atherogenesis. *Atherosclerosis*, 186(1), 38-53. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2005.06.038
- Driffield, K., Miller, K., Bostock, J., O'Neill, A., & Chopra, I. (2008). Increased mutability of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 61(5), 1053-1056.
- Druker, B. J., Talpaz, M., Resta, D. J., Peng, B., Buchdunger, E., Ford, J. M., . . . Sawyers, C. L. (2001). Efficacy and Safety of a Specific Inhibitor of the BCR-ABL Tyrosine Kinase in Chronic Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 344(14), 1031-1037. doi:doi:10.1056/NEJM200104053441401
- Duan, Z., Foster, R., Bell, D. A., Mahoney, J., Wolak, K., Vaidya, A., . . . Seiden, M. V. (2006). Signal transducers and activators of transcription 3 pathway activation in drug-resistant ovarian cancer. *Clinical Cancer Research*, 12(17), 5055-5063.
- Duvvuri, U., & Myers, J. N. (2009). Cancer of the head and neck is the sixth most common cancer worldwide. *Curr Probl Surg*, 46(2), 114-117. doi:10.1067/j.cpsurg.2008.10.002
- Dylla, S. J., Beviglia, L., Park, I.-K., Chartier, C., Raval, J., Ngan, L., . . . Smith-Berdan, S. (2008). Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy. *PLoS one*, 3(6), e2428.
- Faltas, B. M., Prandi, D., Tagawa, S. T., Molina, A. M., Nanus, D. M., Sternberg, C., . . . Elemento, O. (2016). Clonal evolution of chemotherapy-resistant urothelial carcinoma. *Nature genetics*, 48(12), 1490.
- Fan, S., El-Deiry, W. S., Bae, I., Freeman, J., Jondle, D., Bhatia, K., . . . O'Connor, P. M. (1994). p53 gene mutations are associated with decreased sensitivity of human lymphoma cells to DNA damaging agents. *Cancer Res*, 54(22), 5824-5830.
- Fazio, N., Buzzoni, R., Baudin, E., Antonuzzo, L., Hubner, R. A., Lahner, H., . . . Capdevila, J. (2016). A phase II study of BEZ235 in patients with everolimus-resistant, advanced pancreatic neuroendocrine tumours. *Anticancer Res*, 36(2), 713-719.
- Florea, A.-M., & Büsselberg, D. (2011). Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers*, 3(1), 1351-1371.
- Fong, P. C., Yap, T. A., Boss, D. S., Carden, C. P., Mergui-Roelvink, M., Gourley, C., . . . Messiou, C. (2010). Poly (ADP)-ribose polymerase inhibition: frequent durable responses in BRCA carrier ovarian cancer correlating with platinum-free interval. *Journal of Clinical Oncology*, 28(15), 2512-2519.
- Foo, J., & Michor, F. (2014). Evolution of acquired resistance to anti-cancer therapy. *Journal of theoretical biology*, 355, 10-20.
- Franken, N. A., Hovingh, S., Ten Cate, R., Krawczyk, P., Stap, J., Hoebe, R., . . . Barendsen, G. W. (2012). Relative biological effectiveness of high linear energy transfer alpha-particles for the

- induction of DNA-double-strand breaks, chromosome aberrations and reproductive cell death in SW-1573 lung tumour cells. *Oncol Rep*, 27(3), 769-774. doi:10.3892/or.2011.1604
- Frei, E., 3rd, Karon, M., Levin, R. H., Freireich, E. J., Taylor, R. J., Hananian, J., . . . Moon, J. H. (1965). The effectiveness of combinations of antileukemic agents in inducing and maintaining remission in children with acute leukemia. *Blood*, 26(5), 642-656.
- Friesen, C., Roscher, M., Hormann, I., Leib, O., Marx, S., Moreno, J., & Miltner, E. (2013). Anti-CD33-antibodies labelled with the alpha-emitter Bismuth-213 kill CD33-positive acute myeloid leukaemia cells specifically by activation of caspases and break radio- and chemoresistance by inhibition of the anti-apoptotic proteins X-linked inhibitor of apoptosis protein and B-cell lymphoma-extra large. *Eur J Cancer*, 49(11), 2542-2554. doi:10.1016/j.ejca.2013.04.008
- Gao, J., Zhao, S., & Halstensen, T. S. (2016). Increased interleukin-6 expression is associated with poor prognosis and acquired cisplatin resistance in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*, 35(6), 3265-3274. doi:10.3892/or.2016.4765
- Gao, W., & Pereira, M. A. (2002). Interleukin-6 is required for parasite specific response and host resistance to *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol*, 32(2), 167-170.
- Genetics, V. (2016). Retrieved from <https://www.veritasgenetics.com/mygenome#sec-4>
- Gerlinger, M., Rowan, A. J., Horswell, S., Larkin, J., Endesfelder, D., Gronroos, E., . . . Tarpey, P. (2012). Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *New England Journal of Medicine*, 366(10), 883-892.
- Gerlinger, M., & Swanton, C. (2010). How Darwinian models inform therapeutic failure initiated by clonal heterogeneity in cancer medicine. *British Journal of Cancer*, 103(8), 1139-1143.
- Gigante, M., Toffoli, G., Bertola, A., Biscontin, G., Dassie, A., Zanelli, G. D., . . . Muzzio, P. C. (2003). Radiosensitivity in multidrug-resistant and cisplatin-resistant human carcinoma cell lines. *American journal of clinical oncology*, 26(4), e73-e79.
- Gillison, M. L. (2004). Human papillomavirus-associated head and neck cancer is a distinct epidemiologic, clinical, and molecular entity. *Semin Oncol*, 31(6), 744-754.
- Gioanni, J., Fischel, J. L., Lambert, J. C., Demard, F., Mazeau, C., Zanghellini, E., . . . et al. (1988). Two new human tumor cell lines derived from squamous cell carcinomas of the tongue: establishment, characterization and response to cytotoxic treatment. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 24(9), 1445-1455.
- Gottesman, M. M. (2002). Mechanisms of cancer drug resistance. *Annual review of medicine*, 53(1), 615-627.
- Grandis, J. R., & Tweardy, D. J. (1993). Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res*, 53(15), 3579-3584.
- Guo, Y., Xu, F., Lu, T., Duan, Z., & Zhang, Z. (2012). Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer. *Cancer treatment reviews*, 38(7), 904-910.
- Gupta, P. B., Fillmore, C. M., Jiang, G., Shapira, S. D., Tao, K., Kuperwasser, C., & Lander, E. S. (2011). Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells. *cell*, 146(4), 633-644.
- Haddad, R. I., & Shin, D. M. (2008). Recent advances in head and neck cancer. *New England Journal of Medicine*, 359(11), 1143-1154.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.
- Hara, T., Kouno, J., Nakamura, K., Kusaka, M., & Yamaoka, M. (2005). Possible role of adaptive mutation in resistance to antiandrogen in prostate cancer cells. *The Prostate*, 65(3), 268-275.
- Hara, T., Miyazaki, J.-i., Araki, H., Yamaoka, M., Kanzaki, N., Kusaka, M., & Miyamoto, M. (2003). Novel mutations of androgen receptor A possible mechanism of bicalutamide withdrawal syndrome. *Cancer Res*, 63(1), 149-153.

- Harris, R. S., & Liddament, M. T. (2004). Retroviral restriction by APOBEC proteins. *Nature Reviews Immunology*, 4(11), 868-877.
- Heinrich, P. C., Behrmann, I., Serge, H., Hermanns, H. M., Müller-Newen, G., & Schaper, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochemical Journal*, 374(1), 1-20.
- Henderson, S., & Fenton, T. (2015). APOBEC3 genes: retroviral restriction factors to cancer drivers. *Trends Mol Med*, 21(5), 274-284. doi:10.1016/j.molmed.2015.02.007
- Hermann, P. C., Huber, S. L., Herrler, T., Aicher, A., Ellwart, J. W., Guba, M., . . . Heeschen, C. (2007). Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell stem cell*, 1(3), 313-323.
- Herrera, V. A., Zeindl-Eberhart, E., Jung, A., Huber, R. M., & Bergner, A. (2011). The dual PI3K/mTOR inhibitor BEZ235 is effective in lung cancer cell lines. *Anticancer Res*, 31(3), 849-854.
- Hirano, T., Yasukawa, K., Harada, H., Taga, T., Watanabe, Y., Matsuda, T., . . . Iwamatsu, A. (1986). Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin.
- Hoge, J., Yan, I., Janner, N., Schumacher, V., Chalaris, A., Steinmetz, O. M., . . . Mittrucker, H. W. (2013). IL-6 controls the innate immune response against *Listeria monocytogenes* via classical IL-6 signaling. *J Immunol*, 190(2), 703-711. doi:10.4049/jimmunol.1201044
- Holbro, T., & Hynes, N. E. (2004). ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 44, 195-217. doi:10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121440
- Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D. B., & Johnston, P. G. (2013). Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nature Reviews Cancer*, 13(10), 714-726.
- Hsu, C.-M., Lin, P.-M., Tsai, Y.-T., Tsai, M.-S., Tseng, C.-H., Lin, S.-F., & Yang, M.-Y. (2018). NVP-BEZ235, a dual PI3K-mTOR inhibitor, suppresses the growth of FaDu hypopharyngeal squamous cell carcinoma and has a synergistic effect with Cisplatin. *Cell Death Discovery*, 4(1), 57. doi:10.1038/s41420-018-0060-7
- Humm, J. L. (1986). Dosimetric aspects of radiolabeled antibodies for tumor therapy. *J Nucl Med*, 27(9), 1490-1497.
- Hunter, C. A., & Jones, S. A. (2015). IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nature immunology*, 16(5), 448-457.
- Hunter, T., & Sefton, B. M. (1980). Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77(3), 1311-1315.
- Ioannou, N., Dalglish, A. G., Seddon, A. M., Mackintosh, D., Guertler, U., Solca, F., & Modjtahedi, H. (2011). Anti-tumour activity of afatinib, an irreversible ErbB family blocker, in human pancreatic tumour cells. *Br J Cancer*, 105(10), 1554-1562. doi:10.1038/bjc.2011.396
- Ishizawa, R., & Parsons, S. J. (2004). c-Src and cooperating partners in human cancer. *Cancer Cell*, 6(3), 209-214. doi:10.1016/j.ccr.2004.09.001
- Izar, B., Rotow, J., Gainor, J., Clark, J., & Chabner, B. (2013). Pharmacokinetics, Clinical Indications, and Resistance Mechanisms in Molecular Targeted Therapies in Cancer. *Pharmacological Reviews*, 65(4), 1351-1395. doi:10.1124/pr.113.007807
- Jee, S.-H., Chu, C.-Y., Chiu, H.-C., Huang, Y.-L., Tsai, W.-L., Liao, Y.-H., & Kuo, M.-L. (2004). Interleukin-6 induced basic fibroblast growth factor-dependent angiogenesis in basal cell carcinoma cell line via JAK/STAT3 and PI3-kinase/Akt pathways. *Journal of investigative dermatology*, 123(6), 1169-1175.
- Jia, P., Jin, H., Meador, C. B., Xia, J., Ohashi, K., Liu, L., . . . Michor, F. (2013). Next-generation sequencing of paired tyrosine kinase inhibitor-sensitive and -resistant EGFR mutant lung cancer cell lines identifies spectrum of DNA changes associated with drug resistance. *Genome Res*, 23(9), 1434-1445.
- Jia, P., Jin, H., Meador, C. B., Xia, J., Ohashi, K., Liu, L., . . . Pao, W. (2013). Next-generation sequencing of paired tyrosine kinase inhibitor-sensitive and -resistant EGFR mutant lung cancer cell lines

- identifies spectrum of DNA changes associated with drug resistance. *Genome Res*, 23(9), 1434-1445. doi:10.1101/gr.152322.112
- Johnson, G. E. (2012). Mammalian cell HPRT gene mutation assay: test methods. In *Genetic Toxicology* (pp. 55-67): Springer.
- Jordan, C. T., Guzman, M. L., & Noble, M. (2006). Cancer stem cells. *New England Journal of Medicine*, 355(12), 1253-1261.
- Jordan, P., & Carmo-Fonseca, M. (2000). Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 57(8-9), 1229-1235.
- Jortner, J. (2006). Conditions for the emergence of life on the early Earth: summary and reflections. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 361(1474), 1877-1891.
- Jurcic, J. G., Larson, S. M., Sgouros, G., McDevitt, M. R., Finn, R. D., Divgi, C. R., . . . Scheinberg, D. A. (2002). Targeted alpha particle immunotherapy for myeloid leukemia. *Blood*, 100(4), 1233-1239.
- Keren, S., Shoude, Z., Lu, Z., & Beibei, Y. (2014). Role of EGFR as a prognostic factor for survival in head and neck cancer: a meta-analysis. *Tumour Biol*, 35(3), 2285-2295. doi:10.1007/s13277-013-1303-0
- Kim, C. F. B., Jackson, E. L., Woolfenden, A. E., Lawrence, S., Babar, I., Vogel, S., . . . Jacks, T. (2005). Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *cell*, 121(6), 823-835.
- Kim, G., Ison, G., McKee, A. E., Zhang, H., Tang, S., Gwise, T., . . . Philip, R. (2015). FDA approval summary: olaparib monotherapy in patients with deleterious germline BRCA-mutated advanced ovarian cancer treated with three or more lines of chemotherapy. *Clinical Cancer Research*, 21(19), 4257-4261.
- Kim, Y., Ko, J., Cui, Z., Abolhoda, A., Ahn, J. S., Ou, S. H., . . . Park, K. (2012). The EGFR T790M mutation in acquired resistance to an irreversible second-generation EGFR inhibitor. *Mol Cancer Ther*, 11(3), 784-791. doi:10.1158/1535-7163.mct-11-0750
- Kinch, M. S. (2014). An analysis of FDA-approved drugs for oncology. *Drug Discovery Today*, 19(12), 1831-1835. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2014.08.007>
- Kitazono-Saitoh, M., Takiguchi, Y., Kitazono, S., Ashinuma, H., Kitamura, A., Tada, Y., . . . Tatsumi, K. (2012). Interaction and cross-resistance of cisplatin and pemetrexed in malignant pleural mesothelioma cell lines. *Oncol Rep*, 28(1), 33-40. doi:10.3892/or.2012.1799
- Knüpfer, H., & Preiß, R. (2007). Significance of interleukin-6 (IL-6) in breast cancer (review). *Breast cancer research and treatment*, 102(2), 129-135.
- Kowalski, L. P., & Carvalho, A. L. (2000). Natural history of untreated head and neck cancer. *Eur J Cancer*, 36(8), 1032-1037.
- Krajcovic, M., Johnson, N. B., Sun, Q., Normand, G., Hoover, N., Yao, E., . . . Schnitt, S. J. (2011). A non-genetic route to aneuploidy in human cancers. *Nature cell biology*, 13(3), 324-330.
- Kraywinkel, D. K. (2015). Krebs in Deutschland 2015. Retrieved from http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2015/krebs_in_deutschland_2015.pdf?blob=publicationFile
- Kuger, S., Corek, E., Polat, B., Kammerer, U., Flentje, M., & Djuzenova, C. S. (2014). Novel PI3K and mTOR Inhibitor NVP-BE235 Radiosensitizes Breast Cancer Cell Lines under Normoxic and Hypoxic Conditions. *Breast Cancer (Auckl)*, 8, 39-49. doi:10.4137/bcbr.s13693
- Lambert, G., Estevez-Salmeron, L., Oh, S., Liao, D., Emerson, B. M., Tlsty, T. D., & Austin, R. H. (2011). An analogy between the evolution of drug resistance in bacterial communities and malignant tissues. *Nat Rev Cancer*, 11(5), 375-382. doi:10.1038/nrc3039
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., . . . Dick, J. E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, 367(6464), 645-648. doi:10.1038/367645a0

- Leemans, C. R., Braakhuis, B. J. M., & Brakenhoff, R. H. (2011). The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*, *11*(1), 9-22.
- Leis, O., Eguiara, A., Lopez-Arribillaga, E., Alberdi, M., Hernandez-Garcia, S., Elorriaga, K., . . . Martin, A. (2012). Sox2 expression in breast tumours and activation in breast cancer stem cells. *Oncogene*, *31*(11), 1354-1365.
- Levine, A. J., Momand, J., & Finlay, C. A. (1991). The p53 tumour suppressor gene. *Nature*, *351*(6326), 453-456. doi:10.1038/351453a0
- Levy, D. E., & Lee, C.-k. (2002). What does Stat3 do? *The Journal of clinical investigation*, *109*(9), 1143-1148.
- Li, C., Heidt, D. G., Dalerba, P., Burant, C. F., Zhang, L., Adsay, V., . . . Simeone, D. M. (2007). Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res*, *67*(3), 1030-1037.
- Li, X., Lewis, M. T., Huang, J., Gutierrez, C., Osborne, C. K., Wu, M. F., . . . Chang, J. C. (2008). Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst*, *100*(9), 672-679. doi:10.1093/jnci/djn123
- Lin, Q., Clark, A. B., McCulloch, S. D., Yuan, T., Bronson, R. T., Kunkel, T. A., & Kucherlapati, R. (2006). Increased Susceptibility to UV-Induced Skin Carcinogenesis in Polymerase η -deficient Mice. *Cancer Res*, *66*(1), 87-94.
- Liu, Y., Nenutil, R., Appleyard, M., Murray, K., Boylan, M., Thompson, A., & Coates, P. (2014). Lack of correlation of stem cell markers in breast cancer stem cells. *British Journal of Cancer*, *110*(8), 2063-2071.
- Loeb, L. A. (2001). A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res*, *61*(8), 3230-3239.
- Loeb, L. A., & Monnat, R. J. (2008). DNA polymerases and human disease. *Nature Reviews Genetics*, *9*(8), 594-604.
- Loeffler-Ragg, J., Witsch-Baumgartner, M., Tzankov, A., Hilbe, W., Schwentner, I., Sprinzl, G. M., . . . Zwierzina, H. (2006). Low incidence of mutations in EGFR kinase domain in Caucasian patients with head and neck squamous cell carcinoma. *European Journal of Cancer*, *42*(1), 109-111.
- Lukas, J., Parry, D., Aagaard, L., Mann, D. J., Bartkova, J., Strauss, M., . . . Bartek, J. (1995). Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16.
- Machiels, J.-P. H., Haddad, R. I., Fayette, J., Licitra, L. F., Tahara, M., Vermorken, J. B., . . . Cohen, E. E. W. (2015). Afatinib versus methotrexate as second-line treatment in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck progressing on or after platinum-based therapy (LUX-Head & Neck 1): an open-label, randomised phase 3 trial. *The lancet oncology*, *16*(5), 583-594. doi:[https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)70124-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)70124-5)
- Maciá, M. D., Blanquer, D., Togores, B., Sauleda, J., Pérez, J. L., & Oliver, A. (2005). Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *49*(8), 3382-3386.
- Marur, S., D'Souza, G., Westra, W. H., & Forastiere, A. A. (2010). HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol*, *11*(8), 781-789. doi:10.1016/s1470-2045(10)70017-6
- Maruyama, W., Shirakawa, K., Matsui, H., Matsumoto, T., Yamazaki, H., Sarca, A. D., . . . Takaori-Kondo, A. (2016). Classical NF- κ B pathway is responsible for APOBEC3B expression in cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*, *478*(3), 1466-1471.
- Masters, J. R., & Koberle, B. (2003). Curing metastatic cancer: lessons from testicular germ-cell tumours. *Nat Rev Cancer*, *3*(7), 517-525. doi:10.1038/nrc1120
- McCulloch, S. D., & Kunkel, T. A. (2008). The fidelity of DNA synthesis by eukaryotic replicative and translesion synthesis polymerases. *Cell research*, *18*(1), 148-161. doi:10.1038/cr.2008.4
- Mehanna, H., Paleri, V., West, C., & Nutting, C. (2010). Head and neck cancer—Part 1: Epidemiology, presentation, and prevention. *Bmj*, *341*(7774), 663-666.

- Meijer, C., Mulder, N. H., Timmer-Bosscha, H., Sluiter, W. J., Meersma, G. J., & de Vries, E. G. (1992). Relationship of cellular glutathione to the cytotoxicity and resistance of seven platinum compounds. *Cancer Res*, *52*(24), 6885-6889.
- Michael B. Sporn, A. B. R. (1991). Peptide Growth Factors and Their Receptors I. In (1 ed., pp. 69). New York: Springer-Verlag New York.
- Michael D. Lemonick, A. P. (2001). New hope for cancer. *Time*, *157*.
- Misale, S., Yaeger, R., Hobor, S., Scala, E., Janakiraman, M., Liska, D., . . . Siravegna, G. (2012). Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature*, *486*(7404), 532-536.
- Mitsudomi, T., Morita, S., Yatabe, Y., Negoro, S., Okamoto, I., Tsurutani, J., . . . Fukuoka, M. (2010). Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*, *11*(2), 121-128. doi:10.1016/s1470-2045(09)70364-x
- Monds, R. D., & O'Toole, G. A. (2009). The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends in microbiology*, *17*(2), 73-87.
- Morgenstern, A., Bruchertseifer, F., & Apostolidis, C. (2012). Bismuth-213 and actinium-225 -- generator performance and evolving therapeutic applications of two generator-derived alpha-emitting radioisotopes. *Curr Radiopharm*, *5*(3), 221-227.
- Mukherjee, S. (2010). *The Emperor of All Maladies: A Biography of Cancer*. New York: Scribner.
- Myers, A. P., Konstantinopoulos, P. A., Barry, W. T., Luo, W., Broaddus, R. R., Makker, V., . . . Westin, S. N. Phase II, 2-stage, 2-arm, PIK3CA mutation stratified trial of MK-2206 in recurrent endometrial cancer. *International journal of cancer*, *n/a*(*n/a*). doi:10.1002/ijc.32783
- Nakashima, J., Tachibana, M., Horiguchi, Y., Oya, M., Ohigashi, T., Asakura, H., & Murai, M. (2000). Serum interleukin 6 as a prognostic factor in patients with prostate cancer. *Clin Cancer Res*, *6*(7), 2702-2706.
- Nazarian, R., Shi, H., Wang, Q., Kong, X., Koya, R. C., Lee, H., . . . Sazegar, H. (2010). Melanomas acquire resistance to B-RAF (V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature*, *468*(7326), 973-977.
- Negrini, S., Gorgoulis, V. G., & Halazonetis, T. D. (2010). Genomic instability—an evolving hallmark of cancer. *Nature reviews Molecular cell biology*, *11*(3), 220-228.
- Nevins, J. R. (2001). The Rb/E2F pathway and cancer. *Human molecular genetics*, *10*(7), 699-703.
- Nikula, T. K., Curcio, M. J., Brechbiel, M. W., Gansow, O. A., Finn, R. D., & Scheinberg, D. A. (1995). A rapid, single vessel method for preparation of clinical grade ligand conjugated monoclonal antibodies. *Nucl Med Biol*, *22*(3), 387-390.
- Nooter, K., Brutel de la Riviere, G., Look, M. P., van Wingerden, K. E., Henzen-Logmans, S. C., Scheper, R. J., . . . Foekens, J. A. (1997). The prognostic significance of expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in primary breast cancer. *Br J Cancer*, *76*(4), 486-493.
- Normanno, N., De Luca, A., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Maiello, M. R., . . . Salomon, D. S. (2006). Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*, *366*(1), 2-16. doi:10.1016/j.gene.2005.10.018
- O'Brien, S. G., Guilhot, F., Larson, R. A., Gathmann, I., Baccarani, M., Cervantes, F., . . . Druker, B. J. (2003). Imatinib Compared with Interferon and Low-Dose Cytarabine for Newly Diagnosed Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, *348*(11), 994-1004. doi:doi:10.1056/NEJMoa022457
- O'Reilly, K. E., Rojo, F., She, Q.-B., Solit, D., Mills, G. B., Smith, D., . . . Ludwig, D. L. (2006). mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res*, *66*(3), 1500-1508.
- Oerlemans, R., Franke, N. E., Assaraf, Y. G., Cloos, J., van Zantwijk, I., Berkers, C. R., . . . Lemos, C. (2008). Molecular basis of bortezomib resistance: proteasome subunit $\beta 5$ (PSMB5) gene mutation and overexpression of PSMB5 protein. *Blood*, *112*(6), 2489-2499.

- Oki, Y., Fanale, M. A., Romaguera, J. E., Fayad, L., Fowler, N., Copeland, A. R. M., . . . Younes, A. (2014). Phase II Study of an AKT Inhibitor MK2206 in Patients with Relapsed or Refractory Lymphoma. *Blood*, *124*(21), 3093-3093. doi:10.1182/blood.V124.21.3093.3093
- Olayioye, M. A., Beuvink, I., Horsch, K., Daly, J. M., & Hynes, N. E. (1999). ErbB receptor-induced activation of stat transcription factors is mediated by Src tyrosine kinases. *J Biol Chem*, *274*(24), 17209-17218.
- Olayioye, M. A., Neve, R. M., Lane, H. A., & Hynes, N. E. (2000). The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *Embo j*, *19*(13), 3159-3167. doi:10.1093/emboj/19.13.3159
- Ozanne, B., Richards, C., Hendler, F., Burns, D., & Gusterson, B. (1986). Over-expression of the EGF receptor is a hallmark of squamous cell carcinomas. *The Journal of pathology*, *149*(1), 9-14.
- Paccagnella, A., Ghi, M. G., Loreggian, L., Buffoli, A., Koussis, H., Mione, C. A., . . . Gava, A. (2010). Concomitant chemoradiotherapy versus induction docetaxel, cisplatin and 5 fluorouracil (TPF) followed by concomitant chemoradiotherapy in locally advanced head and neck cancer: a phase II randomized study. *Ann Oncol*, *21*(7), 1515-1522. doi:10.1093/annonc/mdp573
- Palles, C., Cazier, J.-B., Howarth, K. M., Domingo, E., Jones, A. M., Broderick, P., . . . Salguero, I. (2013). Germline mutations affecting the proofreading domains of POLE and POLD1 predispose to colorectal adenomas and carcinomas. *Nature genetics*, *45*(2), 136-144.
- Park, I.-k., Qian, D., Kiel, M., Becker, M. W., Pihalja, M., Weissman, I. L., . . . Clarke, M. F. (2003). Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature*, *423*(6937), 302-305.
- Parker, C., Nilsson, S., Heinrich, D., Helle, S. I., O'sullivan, J., Fosså, S. D., . . . Seke, M. (2013). Alpha emitter radium-223 and survival in metastatic prostate cancer. *New England Journal of Medicine*, *369*(3), 213-223.
- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., & Pisani, P. (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, *55*(2), 74-108.
- Pauwels, O., Gozy, M., Van Houtte, P., Pasteels, J. L., Atassi, G., & Kiss, R. (1996). Cross resistance and collateral sensitivity between cytotoxic drugs and radiation in two human bladder cell lines. *Radiother Oncol*, *39*(1), 81-86.
- Perri, F., Pacelli, R., Della Vittoria Scarpati, G., Cella, L., Giuliano, M., Caponigro, F., & Pepe, S. (2015). Radioresistance in head and neck squamous cell carcinoma: Biological bases and therapeutic implications. *Head Neck*, *37*(5), 763-770. doi:10.1002/hed.23837
- Petljak, M., Alexandrov, L. B., Brammell, J. S., Price, S., Wedge, D. C., Grossmann, S., . . . Tubio, J. M. (2019). Characterizing mutational signatures in human cancer cell lines reveals episodic APOBEC mutagenesis. *cell*, *176*(6), 1282-1294. e1220.
- Phillips, T. M., McBride, W. H., & Pajonk, F. (2006). The response of CD24⁻/low/CD44⁺ breast cancer-initiating cells to radiation. *J Natl Cancer Inst*, *98*(24), 1777-1785.
- Pickhard, A., Piontek, G., Seidl, C., Kopping, S., Blechert, B., Misslbeck, M., . . . Essler, M. (2014). (2)(1)(3)Bi-anti-EGFR radioimmunoconjugates and X-ray irradiation trigger different cell death pathways in squamous cell carcinoma cells. *Nucl Med Biol*, *41*(1), 68-76. doi:10.1016/j.nucmedbio.2013.09.010
- Pleasance, E. D., Stephens, P. J., O'meara, S., McBride, D. J., Meynert, A., Jones, D., . . . Greenman, C. (2010). A small-cell lung cancer genome with complex signatures of tobacco exposure. *Nature*, *463*(7278), 184-190.
- Pluen, A., Boucher, Y., Ramanujan, S., McKee, T. D., Gohongi, T., di Tomaso, E., . . . Berk, D. A. (2001). Role of tumor-host interactions in interstitial diffusion of macromolecules: cranial vs. subcutaneous tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(8), 4628-4633.
- Prince, M., Sivanandan, R., Kaczorowski, A., Wolf, G., Kaplan, M., Dalerba, P., . . . Ailles, L. (2007). Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(3), 973-978.

- Quantin, B., & Breathnach, R. (1988). Epidermal growth factor stimulates transcription of the c-jun proto-oncogene in rat fibroblasts. *Nature*, 334(6182), 538-539.
- Quintana, E., Shackleton, M., Sabel, M. S., Fullen, D. R., Johnson, T. M., & Morrison, S. J. (2008). Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature*, 456(7222), 593-598.
- Rampias, T., Giagini, A., Siolos, S., Matsuzaki, H., Sasaki, C., Scorilas, A., & Psyrri, A. (2014). RAS/PI3K crosstalk and cetuximab resistance in head and neck squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 20(11), 2933-2946.
- Rapidis, A. D., Trichas, M., Stavriniadis, E., Roupakia, A., Ioannidou, G., Kritselis, G., . . . Katsilieris, I. (2006). Induction chemotherapy followed by concurrent chemoradiation in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: final results from a phase II study with docetaxel, cisplatin and 5-fluorouracil with a four-year follow-up. *Oral Oncol*, 42(7), 675-684. doi:10.1016/j.oraloncology.2005.12.006
- Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D. G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C., & De Maria, R. (2007). Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, 445(7123), 111-115. doi:http://www.nature.com/nature/journal/v445/n7123/supinfo/nature05384_S1.html
- Roberts, S. A., & Gordenin, D. A. (2014). Hypermutation in human cancer genomes: footprints and mechanisms. *Nature Reviews Cancer*, 14(12), 786-800.
- Roberts, S. A., Lawrence, M. S., Klimczak, L. J., Grimm, S. A., Fargo, D., Stojanov, P., . . . Saksena, G. (2013). An APOBEC cytidine deaminase mutagenesis pattern is widespread in human cancers. *Nature genetics*, 45(9), 970-976.
- Roper, N., Gao, S., Maity, T. K., Banday, A. R., Zhang, X., Venugopalan, A., . . . Brown, A.-L. (2019). APOBEC mutagenesis and copy-number alterations are drivers of proteogenomic tumor evolution and heterogeneity in metastatic thoracic tumors. *Cell reports*, 26(10), 2651-2666. e2656.
- Roscher, M., Hormann, I., Leib, O., Marx, S., Moreno, J., Miltner, E., & Friesen, C. (2013). Targeted alpha-therapy using [Bi-213]anti-CD20 as novel treatment option for radio- and chemoresistant non-Hodgkin lymphoma cells. *Oncotarget*, 4(2), 218-230.
- Rosenberg, B., Van Camp, L., & Krigas, T. (1965). Inhibition of cell division in Escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*, 205(4972), 698-699.
- Rosenberg, B., & Vancamp, L. (1969). Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature*, 222, 385-386.
- Rosenberg, S. M., Shee, C., Frisch, R. L., & Hastings, P. (2012). Stress-induced mutation via DNA breaks in Escherichia coli: A molecular mechanism with implications for evolution and medicine. *BioEssays*, 34(10), 885-892.
- Sanderson, R. J., & Ironside, J. A. D. (2002). Squamous cell carcinomas of the head and neck. *BMJ : British Medical Journal*, 325(7368), 822-827.
- Sangai, T., Akcakanat, A., Chen, H., Tarco, E., Wu, Y., Do, K.-A., . . . Meric-Bernstam, F. (2012). Biomarkers of Response to Akt Inhibitor MK-2206 in Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 18(20), 5816. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-1141
- Sartor, O., Maalouf, B. N., Hauck, C. R., & Macklis, R. M. (2013). Targeted use of alpha particles: current status in cancer therapeutics. *Journal of Nuclear Medicine & Radiation Therapy*, 2012.
- Schaaij-Visser, T. B., Graveland, A. P., Gauci, S., Braakhuis, B. J., Buijze, M., Heck, A. J., . . . Brakenhoff, R. H. (2009). Differential Proteomics Identifies Protein Biomarkers That Predict Local Relapse of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Clin Cancer Res*, 15(24), 7666-7675. doi:10.1158/1078-0432.ccr-09-2134
- Schelhase, T. (2013). Pressemitteilung Nr. 421 vom 27.11.2014: Zahl der Todesfälle im Jahr 2013 um 2,8 % gestiegen. Retrieved from

https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/2014/11/PD14_421_232.html

- Schlumpf, M., Fischer, C., Naehrig, D., Rochlitz, C., & Buess, M. (2013). Results of concurrent radio-chemotherapy for the treatment of head and neck squamous cell carcinoma in everyday clinical practice with special reference to early mortality. *BMC cancer*, *13*(1), 1.
- Schreiber, V., Dantzer, F., Ame, J.-C., & de Murcia, G. (2006). Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *7*(7), 517-528. doi:http://www.nature.com/nrm/journal/v7/n7/supinfo/nrm1963_S1.html
- Schulz, D., Wirth, M., Piontek, G., Buchberger, A. M. S., Schlegel, J., Reiter, R., . . . Pickhard, A. (2016). HNSCC cells resistant to EGFR pathway inhibitors are hypermutated and sensitive to DNA damaging substances. *American journal of cancer research*, *6*(9), 1963.
- Schumacker, P. T. (2006). Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword. *Cancer Cell*, *10*(3), 175-176.
- Seiwert, T., Fayette, J., Cupissol, D., Del Campo, J., Clement, P., Hitt, R., . . . Ehrnrooth, E. (2014). A randomized, phase II study of afatinib versus cetuximab in metastatic or recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck. *Annals of Oncology*, mdu216.
- Seiwert, T. Y., & Cohen, E. E. (2005). State-of-the-art management of locally advanced head and neck cancer. *Br J Cancer*, *92*(8), 1341-1348. doi:10.1038/sj.bjc.6602510
- Semrau, R., Fietkau, R., Werner, J., & Mueller, R.-P. (2007). Radiochemotherapie als Behandlungsstandard fortgeschrittener Kopf-Hals-Karzinome. *Der Onkologe*, *13*(2), 165-173.
- Serra, V., Markman, B., Scaltriti, M., Eichhorn, P. J., Valero, V., Guzman, M., . . . Di Cosimo, S. (2008). NVP-BE235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, prevents PI3K signaling and inhibits the growth of cancer cells with activating PI3K mutations. *Cancer Res*, *68*(19), 8022-8030.
- Sgouros, G. (2008). Alpha-particles for targeted therapy. *Adv Drug Deliv Rev*, *60*(12), 1402-1406. doi:10.1016/j.addr.2008.04.007
- Shah, N. P., Skaggs, B. J., Branford, S., Hughes, T. P., Nicoll, J. M., Paquette, R. L., & Sawyers, C. L. (2007). Sequential ABL kinase inhibitor therapy selects for compound drug-resistant BCR-ABL mutations with altered oncogenic potency. *J Clin Invest*, *117*(9), 2562-2569. doi:10.1172/jci30890
- Shah, S. P., Morin, R. D., Khattra, J., Prentice, L., Pugh, T., Burleigh, A., . . . Senz, J. (2009). Mutational evolution in a lobular breast tumour profiled at single nucleotide resolution. *Nature*, *461*(7265), 809-813.
- Sharma, S. V., Lee, D. Y., Li, B., Quinlan, M. P., Takahashi, F., Maheswaran, S., . . . Fischbach, M. A. (2010). A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *cell*, *141*(1), 69-80.
- Shen, D. W., Akiyama, S., Schoenlein, P., Pastan, I., & Gottesman, M. M. (1995). Characterisation of high-level cisplatin-resistant cell lines established from a human hepatoma cell line and human KB adenocarcinoma cells: cross-resistance and protein changes. *British Journal of Cancer*, *71*(4), 676-683.
- Shi, D., Shi, G., Huang, G., Zhang, J., & Lartigau, E. (2009). Chemosensitivity of radioresistant cells in the multicellular spheroids of A549 lung adenocarcinoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, *28*(1), 1.
- Shi, Y., Au, J. S.-K., Thongprasert, S., Srinivasan, S., Tsai, C.-M., Khoa, M. T., . . . Yang, P.-C. (2014). A prospective, molecular epidemiology study of EGFR mutations in Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology (PIONEER). *J Thorac Oncol*, *9*(2), 154-162. doi:10.1097/JTO.0000000000000033
- Shin, S., Kim, J., Yoon, S. O., Kim, Y. R., & Lee, K.-A. (2012). ALK-positive anaplastic large cell lymphoma with TPM3-ALK translocation. *Leukemia research*, *36*(7), e143-e145.
- Simioni, C., Martelli, A. M., Cani, A., Cetin-Atalay, R., McCubrey, J. A., Capitani, S., & Neri, L. M. (2013). The AKT inhibitor MK-2206 is cytotoxic in hepatocarcinoma cells displaying

- hyperphosphorylated AKT-1 and synergizes with conventional chemotherapy. *Oncotarget*, 4(9), 1496-1506. doi:10.18632/oncotarget.1236
- Simioni, C., Neri, L. M., Tabellini, G., Ricci, F., Bressanin, D., Chiarini, F., . . . Martelli, A. M. (2012). Cytotoxic activity of the novel Akt inhibitor, MK-2206, in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 26(11), 2336-2342. doi:10.1038/leu.2012.136
- Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J., & Dirks, P. B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*, 63(18), 5821-5828.
- Slaughter, D. P., Southwick, H. W., & Smejkal, W. (1953). "Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium. Clinical implications of multicentric origin. *Cancer*, 6(5), 963-968.
- Smeets, S. J., van der Plas, M., Schaaij-Visser, T., van Veen, E. A., van Meerloo, J., Braakhuis, B. J., . . . Brakenhoff, R. H. (2011). Immortalization of oral keratinocytes by functional inactivation of the p53 and pRb pathways. *International journal of cancer*, 128(7), 1596-1605.
- Soda, M., Choi, Y. L., Enomoto, M., Takada, S., Yamashita, Y., Ishikawa, S., . . . Hatanaka, H. (2007). Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*, 448(7153), 561-566.
- Soltoff, S. P., & Cantley, L. C. (1996). p120cbl is a cytosolic adapter protein that associates with phosphoinositide 3-kinase in response to epidermal growth factor in PC12 and other cells. *J Biol Chem*, 271(1), 563-567.
- Sporn, M. B., & Roberts, A. B. (1985). Autocrine growth factors and cancer. *Nature*, 313(6005), 745-747.
- Stenzinger, A., Kriegsmann, M., Kraywinkel, K., & Weichert, W. (2014). Pathologie der malignen Kopf-Hals-Tumoren. *Der Onkologe*, 20(2), 116-129.
- Stewart, P. S. (2003). Diffusion in biofilms. *Journal of bacteriology*, 185(5), 1485-1491.
- Stratton, M. R., Campbell, P. J., & Futreal, P. A. (2009). The cancer genome. *Nature*, 458(7239), 719-724.
- Suda, K., Onozato, R., Yatabe, Y., & Mitsudomi, T. (2009). EGFR T790M mutation: a double role in lung cancer cell survival? *J Thorac Oncol*, 4(1), 1-4. doi:10.1097/JTO.0b013e3181913c9f
- Sugo, N., Niimi, N., Aratani, Y., Masutani, M., Suzuki, H., & Koyama, H. (2007). Decreased PARP-1 levels accelerate embryonic lethality but attenuate neuronal apoptosis in DNA polymerase β -deficient mice. *Biochemical and biophysical research communications*, 354(3), 656-661.
- Tabor, M. P., Braakhuis, B. J., van der Wal, J. E., van Diest, P. J., Leemans, C. R., Brakenhoff, R. H., & Kummer, J. A. (2003). Comparative molecular and histological grading of epithelial dysplasia of the oral cavity and the oropharynx. *The Journal of pathology*, 199(3), 354-360.
- Tabor, M. P., Brakenhoff, R. H., Ruijter-Schippers, H. J., Kummer, J. A., Leemans, C. R., & Braakhuis, B. J. (2004). Genetically altered fields as origin of locally recurrent head and neck cancer: a retrospective study. *Clin Cancer Res*, 10(11), 3607-3613. doi:10.1158/1078-0432.ccr-03-0632
- Tabor, M. P., Brakenhoff, R. H., van Houten, V. M., Kummer, J. A., Snel, M. H., Snijders, P. J., . . . Braakhuis, B. J. (2001). Persistence of Genetically Altered Fields in Head and Neck Cancer Patients Biological and Clinical Implications. *Clinical Cancer Research*, 7(6), 1523-1532.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *cell*, 131(5), 861-872.
- Thomas, H., & Coley, H. M. (2003). Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer Control*, 10(2), 159-165.
- Trédan, O., Galmarini, C. M., Patel, K., & Tannock, I. F. (2007). Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *J Natl Cancer Inst*, 99(19), 1441-1454.
- Triller, N., Korosec, P., Kern, I., Kosnik, M., & Debeljak, A. (2006). Multidrug resistance in small cell lung cancer: expression of P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1 and lung resistance protein in chemo-naive patients and in relapsed disease. *Lung Cancer*, 54(2), 235-240. doi:10.1016/j.lungcan.2006.06.019

- Tumini, E., Barroso, S., Calero, C. P., & Aguilera, A. (2016). Roles of human POLD1 and POLD3 in genome stability. *Scientific Reports*, *6*(1), 38873. doi:10.1038/srep38873
- Turner, N. C., & Reis-Filho, J. S. (2012). Genetic heterogeneity and cancer drug resistance. *The lancet oncology*, *13*(4), e178-e185.
- Tutt, A., Robson, M., Garber, J. E., Domchek, S. M., Audeh, M. W., Weitzel, J. N., . . . Schmutzler, R. K. (2010). Oral poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial. *The Lancet*, *376*(9737), 235-244.
- Ushiro, H., & Cohen, S. (1980). Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A-431 cell membranes. *Journal of Biological Chemistry*, *255*(18), 8363-8365.
- Venkatesan, S., Rosenthal, R., Kanu, N., McGranahan, N., Bartek, J., Quezada, S., . . . Swanton, C. (2018). Perspective: APOBEC mutagenesis in drug resistance and immune escape in HIV and cancer evolution. *Annals of Oncology*, *29*(3), 563-572.
- Vermorken, J. B., Mesia, R., Rivera, F., Remenar, E., Kawecki, A., Rottey, S., . . . Hitt, R. (2008). Platinum-Based Chemotherapy plus Cetuximab in Head and Neck Cancer. *New England Journal of Medicine*, *359*(11), 1116-1127. doi:doi:10.1056/NEJMoa0802656
- Villanueva, J., Vultur, A., Lee, J. T., Somasundaram, R., Fukunaga-Kalabis, M., Cipolla, A. K., . . . Kee, D. (2010). Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K. *Cancer Cell*, *18*(6), 683-695.
- Vivanco, L., & Sawyers, C. L. (2002). The phosphatidylinositol 3-kinase–AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews Cancer*, *2*(7), 489-501.
- Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Diaz, L. A., & Kinzler, K. W. (2013). Cancer Genome Landscapes. *Science*, *339*(6127), 1546-1558. doi:10.1126/science.1235122
- Waage, A., Brandtzaeg, P., Halstensen, A., Kierulf, P., & Espevik, T. (1989). The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome. *J Exp Med*, *169*(1), 333-338.
- Wang, D., Song, H., Evans, J. A., Lang, J. C., Schuller, D. E., & Weghorst, C. M. (1997). Mutation and downregulation of the transforming growth factor beta type II receptor gene in primary squamous cell carcinomas of the head and neck. *Carcinogenesis*, *18*(11), 2285-2290.
- Wang, J., Vasaikar, S., Shi, Z., Greer, M., & Zhang, B. (2017). WebGestalt 2017: a more comprehensive, powerful, flexible and interactive gene set enrichment analysis toolkit. *Nucleic Acids Res*, *45*(W1), W130-W137.
- Wang, J., Zhou, J.-Y., & Wu, G. S. (2007). ERK-dependent MKP-1-mediated cisplatin resistance in human ovarian cancer cells. *Cancer Res*, *67*(24), 11933-11941.
- Wang, S., Gao, A., Liu, J., & Sun, Y. (2018). First-line therapy for advanced non-small cell lung cancer with activating EGFR mutation: is combined EGFR-TKIs and chemotherapy a better choice? *Cancer chemotherapy and pharmacology*, *81*(3), 443-453. doi:10.1007/s00280-017-3516-1
- Ward, A., Balwierz, A., Zhang, J., Küblbeck, M., Pawitan, Y., Hielscher, T., . . . Sahin, Ö. (2013). Re-expression of microRNA-375 reverses both tamoxifen resistance and accompanying EMT-like properties in breast cancer. *Oncogene*, *32*(9), 1173-1182.
- Westin, J. R., & Kurzrock, R. (2012). It's About Time: Lessons For Solid Tumors From Chronic Myelogenous Leukemia Therapy. *Mol Cancer Ther*, *11*(12), 2549-2555. doi:10.1158/1535-7163.MCT-12-0473
- Wheeler, D. L., Huang, S., Kruser, T. J., Nechrebecki, M. M., Armstrong, E. A., Benavente, S., . . . Harari, P. M. (2008). Mechanisms of acquired resistance to cetuximab: role of HER (ErbB) family members. *Oncogene*, *27*(28), 3944-3956. doi:10.1038/onc.2008.19
- Wilson, T., Johnston, P., & Longley, D. (2009). Anti-apoptotic mechanisms of drug resistance in cancer. *Current cancer drug targets*, *9*(3), 307-319.

- Woessmann, W., Chen, X., & Borkhardt, A. (2002). Ras-mediated activation of ERK by cisplatin induces cell death independently of p53 in osteosarcoma and neuroblastoma cell lines. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 50(5), 397-404.
- Wojtaszek, J. L., Chatterjee, N., Najeeb, J., Ramos, A., Lee, M., Bian, K., . . . Li, D. (2019). A small molecule targeting mutagenic translesion synthesis improves chemotherapy. *cell*, 178(1), 152-159. e111.
- Wrangle, J. M., & Khuri, F. R. (2007). Chemoprevention of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Curr Opin Oncol*, 19(3), 180-187.
- Wright, J. H., Modjeski, K. L., Bielas, J. H., Preston, B. D., Fausto, N., Loeb, L. A., & Campbell, J. S. (2011). A random mutation capture assay to detect genomic point mutations in mouse tissue. *Nucleic Acids Res*, 39(11), e73. doi:10.1093/nar/gkr142
- Xing, Y., Lin, N. U., Maurer, M. A., Chen, H., Mahvash, A., Sahin, A., . . . Meric-Bernstam, F. (2019). Phase II trial of AKT inhibitor MK-2206 in patients with advanced breast cancer who have tumors with PIK3CA or AKT mutations, and/or PTEN loss/PTEN mutation. *Breast Cancer Research*, 21(1), 78. doi:10.1186/s13058-019-1154-8
- Xu, J., Ye, Y., Zhang, H., Szmitkowski, M., Makinen, M. J., Li, P., . . . Wu, H. (2016). Diagnostic and Prognostic Value of Serum Interleukin-6 in Colorectal Cancer. *Medicine (Baltimore)*, 95(2), e2502. doi:10.1097/md.0000000000002502
- Yamamoto, C., Basaki, Y., Kawahara, A., Nakashima, K., Kage, M., Izumi, H., . . . Ono, M. (2010). Loss of PTEN expression by blocking nuclear translocation of EGR1 in gefitinib-resistant lung cancer cells harboring epidermal growth factor receptor-activating mutations. *Cancer Res*, 70(21), 8715-8725. doi:10.1158/0008-5472.can-10-0043
- Yamanaka, S. (2008). Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblasts by four transcription factors. *Cell proliferation*, 41(s1), 51-56.
- Yamanaka, S., Balestra, M. E., Ferrell, L. D., Fan, J., Arnold, K. S., Taylor, S., . . . Innerarity, T. L. (1995). Apolipoprotein B mRNA-editing protein induces hepatocellular carcinoma and dysplasia in transgenic animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(18), 8483-8487.
- Yu, Z., Pestell, T. G., Lisanti, M. P., & Pestell, R. G. (2012). Cancer stem cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 44(12), 2144-2151.
- Zahreddine, H., & Borden, K. (2013). Mechanisms and insights into drug resistance in cancer. *Front Pharmacol*, 4(28.10), 3389.
- Zalcborg, J., Hu, X. F., Slater, A., Parisot, J., El-Osta, S., Kantharidis, P., . . . Parkin, J. D. (2000). MRP1 not MDR1 gene expression is the predominant mechanism of acquired multidrug resistance in two prostate carcinoma cell lines. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 3(2), 66-75. doi:10.1038/sj.pcan.4500394

7.5 Veröffentlichung

Am J Cancer Res 2016;6(9):1963-1975
www.ajcr.us /ISSN:2156-6976/ajcr0025730

Original Article

HNSCC cells resistant to EGFR pathway inhibitors are hypermutated and sensitive to DNA damaging substances

Dominik Schulz^{1*}, Markus Wirth^{1*}, Guido Piontek¹, Anna Maria Stefanie Buchberger¹, Jürgen Schlegel², Rudolf Reiter³, Gabriele Multhoff⁴, Anja Pickhard¹

¹Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Technical University of Munich, Ismaninger Straße 22, Munich, Germany; ²Division of Neuropathology, Institute of Pathology, Technical University of Munich, Ismaninger Straße 22, Munich, Germany; ³Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Section of Phoniatrics and Pedaudiology, University of Ulm, Prittwitzstraße 43, Ulm, Germany; ⁴Department of Radiotherapy, Technical University of Munich, Ismaninger Straße 22, Munich, Germany. *Equal contributors.

Received February 8, 2016; Accepted February 29, 2016; Epub September 1, 2016; Published September 15, 2016

Abstract: Despite remarkable successes with targeted therapies in the treatment of cancer, resistance can occur which limits the clinical outcome. In this study, we generated and characterized resistant cell clones derived from two different head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cell lines (Cal27, UD-SCC-5) by long-term exposure to five targeted- and chemotherapeutics (afatinib, MK2206, BEZ235, olaparib and cisplatin). The resistant tumor cell clones showed an increased ERK1/2 expression and an altered expression of the stem-cell markers CD44, ALDH1, Oct4, Sox2, Nanog and Bmi1. None of the single markers alone was predictive for resistance to all five targeted- and chemotherapeutics. Furthermore, long-term exposure of tumor cells to these five drugs resulted in an eightfold increase in the mutational rate compared to untreated cells. Interestingly, targeted- and chemotherapy resistant cell clones remained sensitive to irradiation. Lastly, clones that were resistant to afatinib, MK2206 or BEZ235 showed cross-resistance to further treatment with therapeutics that affect the same signaling pathway, but remained sensitive to those affecting different pathways such as cisplatin and olaparib. In contrast, cell clones which were once resistant to cisplatin or olaparib were found to be multidrug-resistant. These data might indicate that patients with HNSCC benefit more by a first line targeted therapy followed by cisplatin as a second line therapy.

Keywords: HNSCC, resistant cells, hypermutation

Introduction

Squamous cell carcinomas constitute to 90% of all head and neck cancers (HNSCC). HNSCC is the sixth most common neoplasia worldwide, showing rising incidence rates [1]. Mortality due to this cancer remains largely unimproved despite ongoing advancements in tumor surgery, radiotherapy, and chemotherapy. The 5-year survival rate of advanced HNSCC is below 50% [2]. The prognosis of HNSCC is worsened by a poor loco-regional disease control and significant morbidity [3]. In cases of advanced unresectable and metastatic cancer multi-agent chemotherapy or biological therapies are presently investigated [4, 5]. These include drugs targeting growth factors and their

receptors. The Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) is overexpressed in 90% of HNSCC and thus represents an important target.

Cetuximab received its FDA approval for the therapy of HNSCC in 2006. The human-murine chimeric immunoglobulin cetuximab competitively targeting the EGFR prevents receptor activation by endogenous ligands and results in EGFR downregulation by internalization of the receptor/antibody complex [6]. Tyrosine-kinase inhibitors like erlotinib or gefitinib influence downstream signaling processes. They were used in locally advanced or metastatic NSCLC pancreatic carcinomas and were studied in HNSCC.

Pathway inhibitor resistant cells are hypermutated and crossresistant

NSCLC patients harboring the activating mutation in the EGFR kinase domain respond well to small tyrosine-kinase inhibitors like erlotinib or gefitinib. However, after an initial clinical response, 50% of all tumors develop the EGFR T790M mutation [7] which alters the binding pocket of the receptor and thus prevents binding of the inhibitor [8]. The knowledge of the molecular mechanisms of drug resistance is important for the selection of the patients for further therapy. It was shown, that tyrosine-kinase inhibitors of the third generation like AZD9291 or rociletinib are targets for tumors with the EGFR mutation T790M [9, 10].

Different resistance mechanisms such as cell-cycle alterations, mutations, activation of alternate signaling pathways have been elucidated [11]. Cancer stem cells which have been identified in many tumor entities have also been associated with drug resistance [12, 13]. Various cell surface markers such as CD44 and ALDH1 have been associated with a stem cell phenotype in HNSCC [14, 15]. Sox2, Oct4, Nanog and Bmi1 are transcription factors that play pivotal roles in maintaining the pluripotency of embryonic stem cells [16, 17] and are also found in tumors [18-20].

In the presented study, we generated resistant tumor cell clones derived from two different HNSCC cell lines by a long-term incubation to five targeted- and chemotherapeutics (afatinib, MK2206, BEZ235, olaparib and cisplatin). The tumor cell clones were screened for alterations in the EGFR signaling pathway, for the expression of stem-cell markers and for upcoming mutation rates. In addition, therapeutic strategies to overcome resistancy were investigated.

Methods

Selection of inhibitors

We conducted a systematic literature research to identify the most promising targets and inhibitors for HNSCC which had been clinically successful in other solid tumors. Most of our targets were in the EGFR pathway which plays a pivotal role in HNSCC development and progression [21]. In order to generate resistant cells, we selected the EGFR tyrosine-kinase inhibitor afatinib (Selleckchem, Houston, United States of America), the AKT inhibitor MK2206 (Adooq, Irvine, United States of America), the dual mTOR/PI3K inhibitor BEZ235 (Adooq), the PARP inhibitor olaparib (Selleckchem) and cis-

platin (Teva, Ulm, Germany), the standard chemotherapy in HNSCC. By PARP inhibition, olaparib is able to enhance pre-existing DNA repair defects leading to the accumulation of unrepaired DNA double strand breaks [22]. Therapeutics can thus be divided into two classes: EGFR pathway inhibitors such as afatinib, MK2206 and BEZ235, and DNA-damaging therapeutics such as olaparib and cisplatin.

Cell culture and reagents

The Cal27 cell line was obtained from DSMZ (Braunschweig, Germany), UD-SCC-5 cells were obtained from the University of Düsseldorf (Clinic for Otolaryngology, Düsseldorf, Germany). The cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Invitrogen, Darmstadt, Germany) containing 10% fetal calf serum (FBS) (Biochrom, Berlin, Germany), 2 mM glutamine (Biochrom), 100 µg/ml streptomycin (Biochrom), and 100 U/ml penicillin (Biochrom), maintained at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂ and grown to 70-90% confluence.

IC₅₀ determination

For IC₅₀ determination cells were treated with increasing concentrations of the five targeted- and chemotherapeutics. Cell survival was assessed by applying the crystal-violet assay. The cells were seeded in a 6-well plate (5 × 10³ cells/well). After 1 d, the cells were treated with the drug and then cultured for 10 days. Ten days after treatment, the culture medium was aspirated and 500 µl of 4% formaldehyde/1 × PBS were added to each well for 30 minutes. After washing with 0.1% Triton-X-100/1 × PBS and H₂O, crystal violet (0.04%) was added to the fixed cells and allowed to act for 30 minutes. Finally, SDS (1%) was added and the optical density was measured at 590 nm using an ELISA reader 1 h later. The IC₅₀ was calculated by nonlinear regression of three independent experiments by using GraphPad Prism 6.0 software (Graph Pad Software Inc., La Jolla, United States of America).

Development of resistant cells

To establish resistant HNSCC cells we started treating the two cell lines with the IC₅₀ concentration of each targeted- and chemotherapeutic (IC₅₀ for Cal27/UD-SCC-5: afatinib 3.45/2.24 nM, MK2206: 0.21/0.18 µM, BEZ235 9.21/5.45 nM, cisplatin: 1.00/1.96 µM, olaparib

Pathway inhibitor resistant cells are hypermutated and crossresistant

8.96/7.06 μM). We increased the dose stepwise for 6 months, and finished by decreasing the concentration slightly to regain normally proliferating cells for the following experiments. We did not perform single-cell cloning, as we think the generated potentially heterogeneous cells are a more realistic clinical model. Tumors in patients have been demonstrated to be heterogeneous as well.

Western blot

The expression of key proteins of the EGFR receptor pathways and stem-cell markers was assessed by western blotting. For that purpose cells were seeded in 6-well-plates (2.5×10^6 per culture dish). After treatment cells were lysed in an appropriate buffer (20 mM Tris/HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM Na_2EDTA , 1 mM EGTA, 1 % Triton-X-100, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β -glycerophosphate, 1 mM Na_2VO_4 , 1 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin, 1 mM PMSF). Lysates were centrifuged at 10.000 rpm for 15 minutes at 4°C to precipitate insoluble membrane particles. Protein concentrations of the lysates were quantified by using the Bradford assay to ensure equal amounts of protein loaded per lane in SDS-PAGE. The proteins were then transferred to a PVDF membrane (Immobilon-P, Millipore, Germany). Before incubation with primary antibodies, membranes were blocked with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20 (TTBS) for 1 h at room temperature. After 12 hours of incubation on a shaker at 4°C, the secondary anti-IgG antibodies labelled with peroxidase were added in 5% non-fat dry milk in TTBS. Bands were detected by means of chemiluminescence using the ECL Detection System with the Imager SRX-101* (Konica Minolta, Langenhagen, Germany). Primary antibodies against the following antigens were used (dilution): p-EGFR Tyr1068 (1:2500), p-Akt Ser473 (1:1000), p-ERK 1/2 Thr202/Tyr204 (1:1000), ALDH1 (1:1000), Oct4 (1:1000), Nanog (1:2000), Sox2 (1:2000), Bmi1 (1:1000), Tubulin (1:5000). Antibodies were obtained from Cell Signaling Technology (Danvers MA, USA), US Biological (Marblehead MA, USA).

X-ray irradiation kinetics

For determining the kinetics of cell death after X-ray exposure, cells were seeded in 6-well plates at a density of 5×10^3 cells/well. The irradiation of cells was performed by using an

X-ray generator (Gulmay CP-2225; maximum dose rate 3 Gy/min) at the Department of Radiotherapy (Technische Universität München, Germany). The cells were irradiated at room temperature (70 kV, 10 mA) with X-ray doses ranging between 0.5 and 10 Gy 24 h after seeding. Control cells were treated accordingly, however, without irradiation. Cell survival was assessed by crystal-violet assay as described above.

Random mutation capture assay

We followed the random mutation capture assay protocol of Wright et al. [23] with slight variations described below. In order to calculate the DNA copy number per well qPCR was performed using a 10-fold dilution series and the control primer (forward 5'-CACTGACAACCA-CCCTTAACC-3', reverse 5'-TCAGCATCTTATCCG-AGTGGA-3'). A reaction volume of 25 μl was used: 12.5 μl SYBR Green Master mix (Peqlab Erlangen, Germany), 7.25 μl double deionized, UV-irradiated water (Cayman Chemical, Ann Arbor, United States of America), 0.25 μl 20 pM Primer (MWG Biotech, Ebersberg, Germany), 5 μl DNA. PCR was performed in 96-well format (4titude Frame Star, Wotton, Surrey, United Kingdom) with a C1000 thermal cycler (Biorad, Munich, Germany) machine. The following qPCR protocol was used: 1. 95.0°C for 10:00; 2. 95.0°C for 0:30; 3. 65.0°C for 0:30; 4. 74.0°C for 0:10 + plate read; 5. GOTO 2 for 57 more times; 6. melt Curve 65.0°C to 95.0°C, increment 0.5°C for 0:05 + plate read.

Then Taq^I digestion was performed as described by Wright et al. [23]. The reaction was incubated in an Eppendorf thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Germany) for 3 hours, while shaking the reaction mixture at 750 rpm for a total of nine times. Before the third, fifth and seventh addition of Taq^I, precipitated BSA was removed by transferring the sample to a new tube and 8 μl fresh BSA were added. We did not perform the Microcon YM-50 buffer exchange described by Wright, as we experienced a heavy DNA loss when using these concentrator tubes [23].

After that, we tested for Taq^I (New England Biolabs, Ipswich, United Kingdom) digestion efficiency using the mutation-specific primer (forward 5'-CAAGCAGGGGAGGCCCTTT-3', reve-

Pathway inhibitor resistant cells are hypermutated and crossresistant

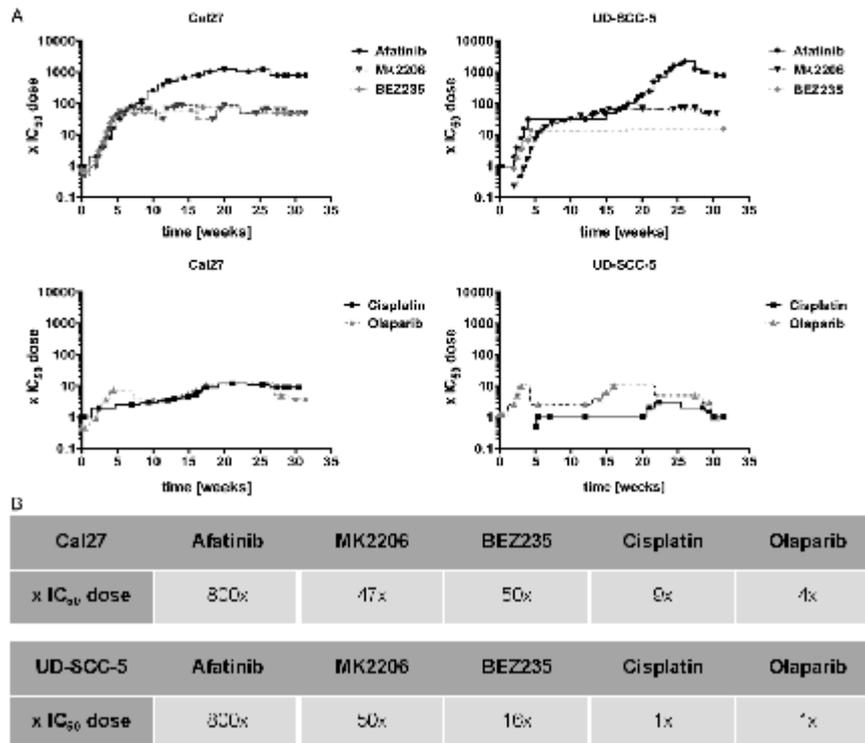


Figure 1. Development on the time axis of the resistant tumor cell clones. Starting with the two cell lines Cal27 and UD-SCC-5 and the IC_{50} dose of the three EGFR signaling inhibitors afatinib, MK2206 and BEZ235 and the two DNA-damaging substances cisplatin and olaparib, a total of 10 resistant cell lines were generated by increasing the dose of a single drug stepwise over 24 weeks. Each dot represents a cell passages. Cells resistant to EGFR-pathway inhibitors could be dose-escalated far higher (e.g. Cal27 afatinib: 800 x IC_{50} vs. Cal27 cisplatin: 9x).

rese 5'-TCCTGGCTAACGGTGAACC-3') and chose a dilution for screening of mutants [23]. The master mix and the qPCR protocol described above were applied.

Then qPCR plate was performed to screen for mutants. Primer-specific products which had been positive as confirmed by melt curves were then analyzed by means of post-PCR restriction and gel electrophoresis to differentiate between the wild-type and the mutant PCR product. 5 μ l of PCR product were digested with 0.25 μ l Taq^I, 0.2 μ l CutSmart (New England Biolabs) and 1.55 μ l double-deionized water [23].

Next, the number of DNA copies per well was determined by standard curve and mutation frequency was calculated [23].

All experiments were performed three times independently.

A total of 777 mutations were detected by gel electrophoresis. A random sample was chosen and 100 mutations were sent to sequencing with the mutation-specific primer.

Proliferation assay

Cell proliferation was assessed by a crystal violet assay. The binding of crystal violet to cellular DNA was used to assess cell proliferation by means of ELISA as described previously [24]. Briefly, 5×10^3 cells/well were seeded in six-well plates 24 h before treatment. On the next day, cells were incubated with the IC_{50} dose of each drug. Ten days after treatment, culture medium was aspirated and 500 μ l of 4% form-

Pathway inhibitor resistant cells are hypermutated and crossresistant

aldehyde were added to each well for 30 minutes. After washing with 0.1% Triton-X-100/PBS and H₂O, crystal violet (0.04%) was added to the fixed cells and allowed to act for 30 minutes. Finally, SDS (1%) was added and the optical density was measured at 590 nm, using an ELISA reader 1 h later.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed by using GraphPad Prism 6.0 software (Graph Pad Software Inc.). Assuming a symmetry correlation structure for all experiments, all hypotheses were tested with the One-way ANOVA test. The means of treated cells and untreated controls were compared by applying Student's t-test. The level of statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

Establishment of drug-resistant HNSCC cell lines

According to a protocol described by Kim et al., a resistant tumor cell clone which displays the typical T790M mutation could be established after exposure of the NSCLC cell line PC9 with escalating doses of afatinib [25]. In the present study we chose a similar approach and generated HNSCC cell lines which are resistant to five targeted- and chemotherapeutics.

After increasing the drug doses stepwise for 6 months we observed that resistant cell clones could be divided in two groups: Clones resistant to EGFR pathway inhibitors could be dose escalated much more than clones resistant to DNA-damaging therapeutics. The final concentration of Cal27 clones resistant to the pathway inhibitors was at $800 \times IC_{20}$, $47 \times IC_{20}$ and $50 \times IC_{20}$ for afatinib, MK2206, and BEZ235, respectively, whereas the final concentration to DNA-damaging cisplatin was $9 \times IC_{20}$ and to olaparib $4 \times IC_{20}$. Similar results were obtained with the cell line UD-SCC-5: afatinib $800 \times IC_{20}$, MK2206 $50 \times IC_{20}$, BEZ235 $16 \times IC_{20}$, cisplatin and olaparib only $1 \times IC_{20}$. The development of the resistant clones of both cell lines is shown in Figure 1A, 1B.

Switch to ERK1/2 pathway in resistant cells

Next we assessed changes in the EGFR signaling pathway by applying a western-blot analysis

to the expression of p-EGFR Tyr1068, p-AKT Ser473 and p-ERK1/2 Thr202/Tyr204 (Figure 2A, 2B). In untreated UD-SCC-5 cells p-EGFR was phosphorylated at tyrosine 1068, whereas we did not detect any phosphorylation of p-ERK1/2 or p-AKT. In all five drug-resistant UD-SCC-5 cell lines p-EGFR phosphorylation at tyrosine 1068 was lost, whereas ERK1/2 and AKT phosphorylation newly occurred. In untreated Cal27 cells we detected a basal phosphorylation of p-EGFR Tyr1068, p-ERK1/2 Thr202/Tyr204 and p-AKT Ser473. In treated Cal27 cells, ERK1/2 phosphorylation increased generally, whereas there was an inhomogeneous pattern in AKT and EGFR phosphorylation (Figure 2A, 2B). These results indicate an activation of the ERK1/2 in UD-SCC-5-resistant cells and, less pronounced, in resistant Cal27 cell lines.

Heterogeneous alterations in stem cell marker expression

To explore common patterns of stem-cell populations after pathway inhibition or targeted- or chemotherapy, we determined the expression of the stem-cell markers CD44, ALDH1, Oct4, Sox2, Nanog and Bmi1 in untreated and resistant clones. Untreated Cal27 and UD-SCC-5 cells expressed all of the abovementioned stem-cell markers, with the exception of CD44 in wild-type UD-SCC-5 and ALDH1 in wild-type Cal27. UD-SCC-5 clones resistant to the pathway inhibitors expressed CD44 except for ALDH1, whereas UD-SCC-5 clones resistant to DNA-damaging substances expressed ALDH1, with the exception of CD44 (Figure 3A, 3B). Bmi1 was downregulated in all resistant UD-SCC-5 cells. These patterns were not observed in resistant Cal27 cells. We detected heterogeneous alterations in the expression of Oct4, Nanog and Sox2. No clear pattern of change in the expression of these markers was observed in the two cell lines when they were treated with the same inhibitor (Figure 3A, 3B). In conclusion, stem-cell makers had already been expressed differently in the untreated cell lines, and no single marker could be attributed to the resistance to a specific drug.

Hypermutation of the cancer-cell genome in drug-resistant cells

Genetic change can be a powerful mechanism of acquiring resistance. To test this hypothesis,

Pathway inhibitor resistant cells are hypermutated and crossresistant

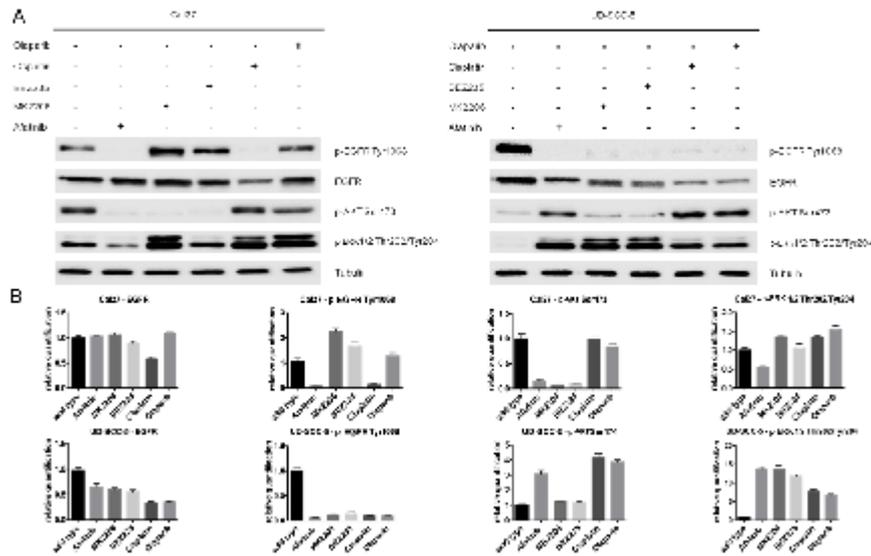


Figure 2. Western blot and concordant relative quantification displaying the changes in signaling of the resistant cells compared to untreated cells. No clear pattern of signaling alterations in EGFR, p-EGFR Tyr1068 and p-AKT Ser473 could be identified. Untreated UD-SCC-5 cells however showed a much weaker phosphorylation of Thr202/Tyr204 at ERK1/2 while all resistant cell lines show a sharp rise in phosphorylation. Cal27 resistant cell lines show an overall increase in ERK1/2 phosphorylation, although this effect is less pronounced than in UD-SCC-5 due to basal level of phosphorylation in Untreated cells. Together these findings indicate a switch to ERK1/2 during the development of the resistances.

we determined the point-mutation frequency by applying the random mutation capture assay [23].

Untreated cancer cells were co-cultivated over the period of 6 months. Untreated Cal27 and UD-SCC-5 cells had a mutation frequency of 7.00×10^{-8} and 1.57×10^{-7} , respectively (Figure 4). The average mutation frequency of all resistant Cal27 clones was at 5.78×10^{-7} and thus 8.3 times higher than in the untreated control ($p < 0.001$). The median mutation frequency of resistant UD-SCC-5 cells was at 1.22×10^{-6} and thus 7.8 times higher compared to the control ($p=0.007$). The mutation frequency can be transformed into the number of gained mutations in coding regions by assuming 3.3×10^9 bases per genome of which only 1% are coding. Untreated Cal27 cells gained 2.3 mutations in coding regions, while untreated UD-SCC-5 cells gained 5.2. Resistant Cal27 clones accumulated on average 19.0 mutations, whereas resistant UD-SCC-5 clones accumulated 40.3 muta-

tions. Mutation frequency increases of the various drugs ranged from 4.4-14.8 \times in resistant clones (Figure 4). As expected, the mutation frequency incremented most in cells treated with DNA-damaging substances (cisplatin and olaparib). Interestingly, after treatment with the pathway inhibitors (afatinib, MK2206 and BEZ235), the mutation frequency increased as well (Figure 4). In conclusion, long-term targeted- and chemotherapeutic treatment leads to a hypermutation of the cancer-cell genome.

Drug-resistant cells are sensitive to irradiation

To assess the response to radiation therapy we conducted X-ray kinetics with wild-type and resistant cells. As shown in Figure 5, with the exception of Cal27 cells which had been treated with cisplatin and olaparib, changes were rather minimal. The resistant cells are thus as sensitive to irradiation as their untreated wild-type counterparts, indicating that different mechanisms are mediating chemo- and radio-resistance.

Pathway inhibitor resistant cells are hypermutated and crossresistant

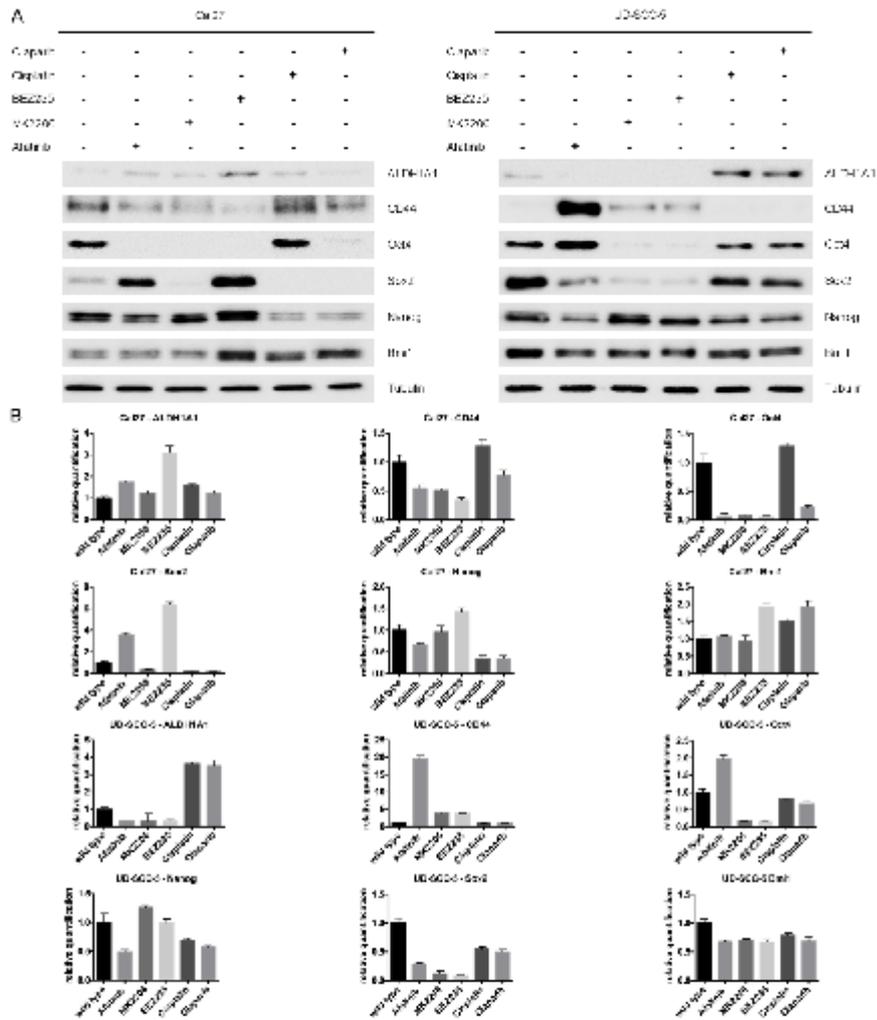


Figure 3. The western blot and the concordant relative quantification showing changes in the stem-cell marker expression of CD44, ALDH1, Oct4, Sox2, Nanog and Bmi1 in untreated and resistant clones. With the exception of CD44 in UD-SCC-5 and ALDH1 in Cal27, all stem-cell markers had already been expressed in the untreated cells. While there are similarities, for example, a downregulation of BMI1 in all resistant UD-SCC-5 cells, overall alternation in stem-cell marker expression was heterogeneous and no single marker could be attributed to the resistance to all therapeutics.

Cells resistant to pathway inhibitors show "cross-resistance", whereas DNA-damaging substances show "multidrug resistance"

To characterize the change in sensitivity of cell lines resistant to various other forms of target-

ed- and chemotherapy, we treated each resistant cell line with a single IC_{50} dose of one of the five drugs. All cell lines resistant to EGFR pathway inhibitors showed a cross-resistance with respect to the other EGFR pathway inhibitors afatinib, MK2206 or BEZ235 and a strong

Pathway inhibitor resistant cells are hypermutated and crossresistant

Cal27	wild type	Afatinib	MK2206	BEZ235	Cisplatin	Olaparib
mean mutation frequency	7.00×10^{-8}	3.67×10^{-7}	5.56×10^{-7}	4.93×10^{-7}	9.06×10^{-7}	5.74×10^{-7}
fold increase of mutation frequency		5.2	7.9	7.0	13	9.2
p-value [t-test]		0.011	0.029	0.015	0.081	0.016

UD-SCC-5	wild type	Afatinib	MK2206	BEZ235	Cisplatin	Olaparib
mean mutation frequency	1.57×10^{-7}	9.27×10^{-7}	3.69×10^{-7}	7.16×10^{-7}	2.32×10^{-5}	1.35×10^{-6}
fold increase of mutation frequency		5.9	4.4	4.6	14.8	9.6
p-value [t-test]		0.276	0.173	0.066	0.184	0.126

	Cal27 wild type	Cal27 resistant	UD-SCC-5 wild type	UD-SCC-5 resistant
mean mutation frequency	7.00×10^{-8}	6.75×10^{-7}	6.95×10^{-7}	7.16×10^{-7}
number of point mutations	231	1907	518	4026
fold increase of mutation frequency		9.6	10.2	10.2

Figure 4. Table showing the point-mutation frequency determined by application of the random mutation capture assay. The overall increase in mutation frequency compared to untreated, co-cultivated cells is 8.3 in cell lines resistant to Cal27, and 7.8 in those resistant to UD-SCC-5, indicating the importance of point mutations in acquiring resistance to all therapeutics. The fold increase in mutation frequency ranged from 4.4 in Cal27 cells resistant to MK2206 to 14.8 in cisplatin-resistant UD-SCC-5 clones, displaying comparability of increases of the mechanistically per se nonmutational tyrosine-kinase inhibitors and DNA-crosslinking cytotoxic cisplatin.

reduction in their proliferative capacity when treated with cisplatin or olaparib.

In contrast, cells resistant to DNA-damaging therapeutics like cisplatin or olaparib showed *multidrug* resistance in UD-SCC-5 and Cal27 cell lines (Figure 6A, 6B).

Discussion

Survival in chemotherapeutic treatment in advanced cancer disease is limited. While properly selected patients for targeted therapy respond initially, resistances develop and patients' tumors relapse. Generation of resistant cell lines by chronic exposure and dose escalation has been widely used as a model to study resistance mechanisms at the molecular level, for example, in lung cancer [25], colon

cancer [26], breast cancer [27] and melanoma [28]. While most authors chose one cell line and only one treatment, in this study, we generated cells with an acquired resistance in two HNSCC cell lines and five different drugs to explore whether there is a common pattern of adaption to targeted- or chemotherapy. Our results show that clones resistant to inhibitors of the EGFR signaling pathway, such as afatinib, MK2206 and BEZ235, could be dose-escalated much more than clones resistant to the DNA-damaging substances olaparib and cisplatin. The highest dose escalation was seen in receptor-targeting afatinib, whereas far lower dose increases were possible in downstream targeting MK2206 and BEZ235. We think that this is due to more alternative and downstream pathways available for acquiring resistance to therapy.

Pathway inhibitor resistant cells are hypermutated and crossresistant

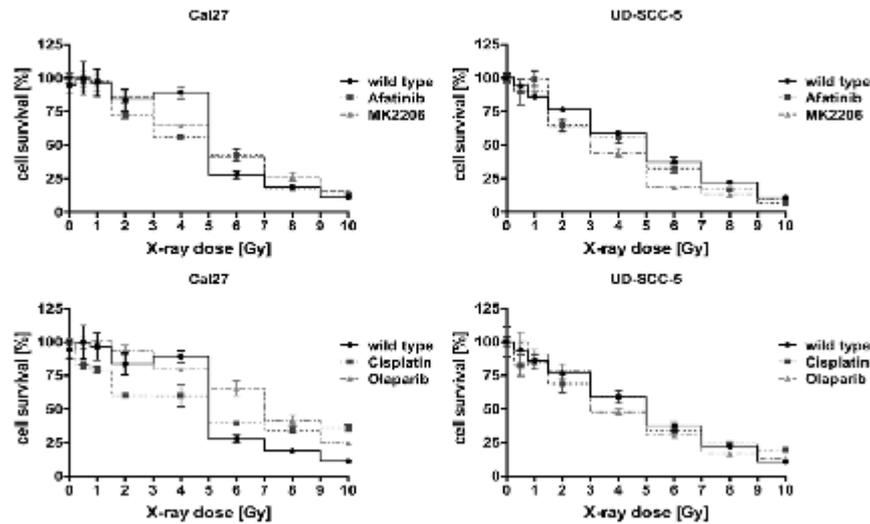


Figure 5. X-ray kinetics of untreated wild-type Cal27 and UD-SCC-5 compared to the resistant clones. With the exception of olaparib-resistant Cal27 cells, which seem slightly more resistant to X-ray exposure, overall alteration in response to irradiation is largely minimal, leaving radiation therapy as an option for a further treatment of chemoresistant clones.

Our western-blot analyses show that resistant cancer cells switch towards the ERK1/2 pathway. This is in accordance with previous findings described in the literature. Rampias et al. reported that oncogenic HRAS promoted the activation of the ERK1/2 pathway when mediating cetuximab resistance in HNSCC [29]. In ovarian cancer, Wang et al. showed that ERK2 promotes phosphorylation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1, leading to increased cisplatin resistance [30]. Upregulation of RAS has been described as a mechanism of acquired resistance to B-RAF (V600E) inhibition in melanoma [31]. Whether cisplatin activates ERK signaling directly or through induction of DNA damage remains unclear [32]. Also further research is needed to clarify whether a switch to the RAS/RAF/ERK pathway alone is sufficient for acquiring resistance to targeted- or chemotherapy.

The cancer stem-cell hypothesis has been used to explain various properties of cancer cells including drug resistance [33-35]. Cancer stem-cell enrichment was reported after treatment with gemcitabine in pancreatic cancer [36], with cyclophosphamide in colon cancer

[37], and with irradiation in glioma [38]. We explored the changes in expression of the well described stem-cell markers CD44, ALDH1, Oct4, Sox2, Nanog and Bmi1 [14-17]. All untreated cancer cells expressed Oct4, Sox2, Nanog and Bmi1, only Cal27 expressed CD44 and UD-SCC-5 ALDH1. While we found alterations in expression of stem-cell markers in resistant clones, they were heterogeneous and no clear pattern of enrichment or depletion could be identified. This is in concordance with findings of Liu et al., who reported a distinctive rather than a common pattern of CD44, CD24 and ALDH1 expression in two breast cancer cell lines treated with doxorubicin, docetaxel and radiation [39].

Genetic change is an important mechanism in acquiring resistance [40]. Our data supports this hypothesis. Untreated Cal27 cells accumulated about 2.3 point mutations in coding regions, and untreated UD-SCC-5 accumulated 5 mutations over the six month period. All resistant clones acquired additional point mutations compared with untreated cancer cells. On average, a single resistant Cal27 cell acquired around 19 mutations in coding regions, where-

Pathway inhibitor resistant cells are hypermutated and crossresistant

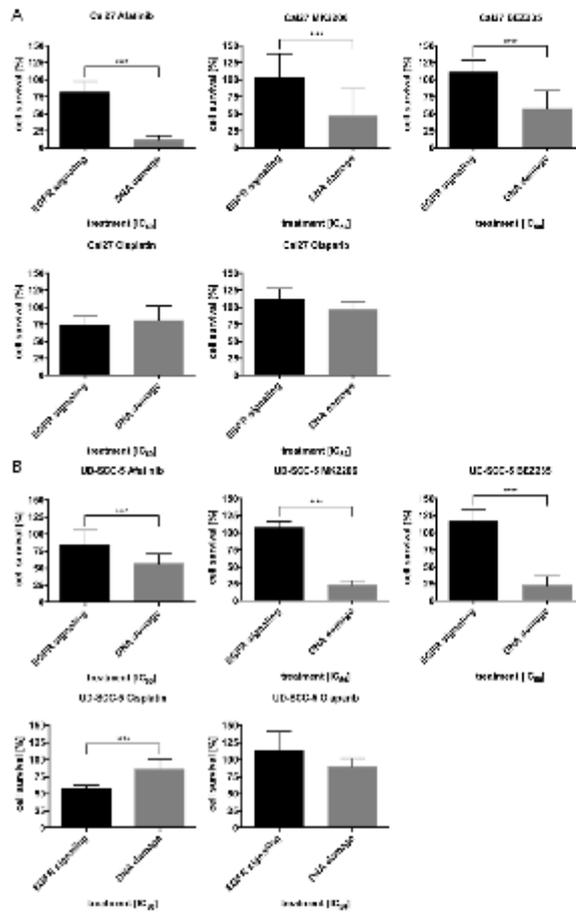


Figure 6. Reduction of proliferation in resistant cells treated with a single IC₅₀ dose of the three EGFR signaling inhibitors: afatinib, MK2208 and BEZ235 and the two DNA-damaging substances cisplatin and olaparib. While clones resistant to EGFR signaling inhibitors were cross-resistant relative to the other EGFR pathway inhibitors, they were still sensitive to the DNA-damaging substances. In contrast, cells resistant to the DNA-damaging substances only showed a minimal response after treatment with all substances, thus indicating multidrug-resistance.

as a resistant UD-SCC-5 cell acquired about 40 mutations. The number of mutations acquired was about eight times higher in resistant cells than in untreated cells. In accordance with our findings, Jia et al. found newly acquired single nucleotide variants by next generation sequencing of an erlotinib-resistant NSCLC cell line in

comparison with the parental line 18-91 [41].

In addition, we showed that the response of the targeted- and chemoresistant cell lines to irradiation remains mostly unchanged. These data might imply that mechanisms of targeted- and chemo- and radio-resistance are independent from each other and thus irradiation might provide an option to treat targeted- and chemoresistant tumors in the clinical setting. There is no final consent in the literature on chemo- and radio-cross-sensitivity or -resistance. Pauwels et al. described a cisplatin-treated bladder-cell line which showed cross-resistance to chemo- and radiotherapy [42]. On the other hand, Gigante et al. described a cisplatin-resistant and multidrug-resistant colon-cancer cell line, which is radiosensitive [43], and Shi et al. reported that the radioresistant lung-adenocarcinoma cell line A549 is still sensitive to five chemotherapeutic drugs [44].

Furthermore, we showed that clones resistant to one targeted therapy are less sensitive to the further application of a differently targeted therapy involving the same pathway. Interestingly, the “cross-resistant” cancer cells were still sensitive to treatment with cisplatin or olaparib, whereas cell clones resistant to DNA-damaging substances tend to be “multidrug-resistant”.

This indicates that there are specific mechanisms of resistance to the pathway inhibitors like mutations or use of alternative pathways, whereas unspecific mechanism exist in DNA-targeting pathways. This is in agreement with previous findings of mutations affecting the binding site of targets [45] or an activa-

Pathway inhibitor resistant cells are hypermutated and crossresistant

tion of alternative pathways after treatment with targeted therapies [46]. In contrast, drug efflux [47] or reduced cellular uptake have been suggested as resistance mechanisms effective in conventional chemotherapy [48].

To prevent multidrug resistance in cancers in first-line treatment we hypothesize that it would be more useful to treat patients with a combination of targeted therapies first and then start a second-line treatment with DNA-damaging substances.

Disclosure of conflict of interest

None.

Address correspondence to: Anja Pickhard, Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Technical University of Munich, Ismaninger Straße 22, Munich, Germany. Tel: 0049-89-41405319; Fax: 0049-89-41404952; E-mail: a.pickhard@lrz.tum.de

References

[1] Siegel R, Naishadham D and Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 2013; 63: 11-30.

[2] Bernier J, Domenge C, Ozsahin M, Matuszewska K, Lefebvre JL, Greiner RH, Giralt J, Maingon P, Rolland F, Bolla M, Cognetti F, Bourhis J, Kirkpatrick A and van Glabbeke M; European Organization for Research and Treatment of Cancer Trial 22931. Postoperative Irradiation with or without Concomitant Chemotherapy for Locally Advanced Head and Neck Cancer. *N Engl J Med* 2004; 350: 1945-1952.

[3] Shirai K, Kaneshiro T, Wada M, Furuya H, Bielawski J, Hannun YA, Obeid LM, Ogretmen B and Kawamori T. A Role of Sphingosine Kinase 1 in Head and Neck Carcinogenesis. *Cancer Prev Res (Phila)* 2011; 4: 454-462.

[4] Vermorken JB and Speeoenier P. Optimal treatment for recurrent/metastatic head and neck cancer. *Ann Oncol* 2010; 21: vii252-vii261.

[5] Kundu SK and Nestor M. Targeted therapy in head and neck cancer. *Tumour Biol* 2012; 33: 707-721.

[6] Dequanter D, Shahla M, Paulus P and Lothaire PH. The role of EGFR-targeting strategies in the treatment of head and neck cancer. *Onco Targets Ther* 2012; 5: 127-131.

[7] Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, Yoshida K, Hida T, Tsuboi M, Tada H, Kuwano H and Mitsudomi T. Analysis of Epidermal Growth Factor Receptor Gene Mutation in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer and Acquired Resistance to

Gefitinib. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 5784-5789.

[8] Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, Janne PA, Kocher O, Meyerson M, Johnson BE, Eck MJ, Tenen DG and Halmos B. EGFR Mutation and Resistance of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *N Engl J Med* 2005; 352: 786-792.

[9] Janne PA, Yang JC, Kim DW, Planchard D, Ohe Y, Ramalingam SS, Ahn MJ, Kim SW, Su WC, Horn L, Haggstrom D, Felip E, Kim JH, Frewer P, Cantarini M, Brown KH, Dickinson PA, Giorghiu S and Ranson M. AZD9291 in EGFR Inhibitor-Resistant Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2015; 372: 1689-1699.

[10] Sequist LV, Soria JC, Goldman JW, Wakelee HA, Gadgeel SM, Varga A, Papadimitrakopoulou V, Solomon BJ, Oxnard GR, Dziadziuszko R, Aisner DL, Doebele RC, Galasso C, Garon EB, Heist RS, Logan J, Neal JW, Mendenhall MA, Nichols S, Piotrowska Z, Wozniak AJ, Raponi M, Karlovich CA, Jaw-Tsai S, Isaacson J, Despain D, Matheny SL, Rolfe L, Allen AR and Camidge DR. Rociletinib in EGFR-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2015; 372: 1700-1709.

[11] Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB and Johnston PG. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer* 2013; 13: 714-726.

[12] Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med* 2011; 313-319.

[13] Baccelli I and Trumpp A. The evolving concept of cancer and metastasis stem cells. *J Cell Biol* 2012; 198: 281-293.

[14] Clay MR, Tabor M, Owen JH, Carey TE, Bradford CR, Wolf GT, Wicha MS and Prince ME. Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase. *Head Neck* 2010; 32: 1195-1201.

[15] Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, Weissman IL, Clarke MF and Ailles LE. 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* 2007; 104: 973-978.

[16] Loh YH, Wu Q, Chew JL, Vega VB, Zhang W, Chen X, Bourque G, George J, Leong B, Liu J, Wong KY, Sung KW, Lee CWH, Zhao XD, Chiu KP, Lipovich L, Kuznetsov VA, Robson P, Stanton LW, Wei CL, Ruan Y, Lim B and Ng HH. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet* 2006; 38: 431-440.

[17] Park IK, Qian D, Kiel M, Becker MW, Pihalja M, Weissman IL, Morrison SJ and Clarke MF. Bmi-1 is required for maintenance of adult self-re-

Pathway inhibitor resistant cells are hypermutated and crossresistant

- newing haematopoietic stem cells. *Nature* 2003; 423: 302-305.
- [18] Luo W, Li S, Peng B, Ye Y, Deng X and Yao K. Embryonic Stem Cells Markers SOX2, OCT4 and Nanog Expression and Their Correlations with Epithelial-Mesenchymal Transition in Nasopharyngeal Carcinoma. *PLoS One* 2013; 8: e56324.
- [19] Guo Y, Liu S, Wang P, Zhao S, Wang F, Bing L, Zhang Y, Ling EA, Gao J and Hao A. Expression profile of embryonic stem cell-associated genes Oct4, Sox2 and Nanog in human gliomas. *Histopathology* 2011; 59: 763-775.
- [20] Shimono Y, Zabala M, Cho RW, Lobo N, Dalerba P, Qian D, Diehn M, Liu H, Panula SP, Chiao E, Dirbas FM, Somlo G, Pera RAR, Lao K and Clarke MF. Downregulation of miRNA-200c Links Breast Cancer Stem Cells with Normal Stem Cells. *Cell* 2009; 138: 592-603.
- [21] Leemans CR, Braakhuis BJ and Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 2011; 11: 9-22.
- [22] Weston VJ, Oldreive CE, Skowronska A, Oscier DG, Pratt G, Dyer MJ, Smith G, Powell JE, Rudzki Z, Kearns P, Moss PA, Taylor AM and Stankovic T. The PARP inhibitor olaparib induces significant killing of ATM-deficient lymphoid tumor cells in vitro and in vivo. *Blood* 2010; 116: 4578-4587.
- [23] Wright JH, Modjeski KL, Bielas JH, Preston BD, Fausto N, Loeb LA and Campbell JS. A random mutation capture assay to detect genomic point mutations in mouse tissue. *Nucleic Acids Research* 2011; 39: e73-e73.
- [24] Noeske K. [The binding of crystal violet on deoxyribonucleic acid. Cytophotometric studies on normal and tumor cell nuclei]. *Histochemie* 1966; 7: 273-287.
- [25] Kim Y, Ko J, Cui Z, Abolhoda A, Ahn JS, Ou SH, Ahn MJ and Park K. The EGFR T790M Mutation in Acquired Resistance to an Irreversible Second-Generation EGFR Inhibitor. *Mol Cancer Ther* 2012; 11: 784-791.
- [26] Misale S, Yaeger R, Hobor S, Scala E, Janakiraman M, Liska D, Valtorta E, Schiavo R, Buscarino M, Siravegna G, Bencardino K, Ceroak A, Chen CT, Veronese S, Zanoni C, Sartore-Bianchi A, Gambacorta M, Gallicchio M, Vakiani E, Boscaro V, Medico E, Weiser M, Siena S, Di Nicolantonio F, Solit D and Bardelli A. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature* 2012; 486: 532-536.
- [27] Ward A, Balwierz A, Zhang JD, Kublbeck M, Pawitan Y, Hielscher T, Wiemann S and Sahin O. Re-expression of microRNA-375 reverses both tamoxifen resistance and accompanying EMT-like properties in breast cancer. *Oncogene* 2013; 32: 1173-1182.
- [28] Villanueva J, Vultur A, Lee JT, Somasundaram R, Fukunaga-Kalabis M, Cipolla AK, Wubbenhorst B, Xu X, Gimotty PA, Kee D, Santiago-Walker AE, Letrero R, D'Andrea K, Pushparajan A, Hayden JE, Brown KD, Laquerre S, McArthur GA, Sosman JA, Nathanson KL and Herlyn M. Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by co-targeting MEK and IGF-1R/PI3K. *Cancer cell* 2010; 18: 683-695.
- [29] Rampias T, Giaghi A, Siolos S, Matsuzaki H, Sasaki C, Scorilas A and Psyrri A. RAS/PI3K Crosstalk and Cetuximab Resistance in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res* 2014; 20: 2933-2946.
- [30] Wang J, Zhou JY and Wu GS. ERK-Dependent MKP-1-Mediated Cisplatin Resistance in Human Ovarian Cancer Cells. *Cancer Res* 2007; 67: 11933-11941.
- [31] Nazarian R, Shi H, Wang Q, Kong X, Koya RC, Lee H, Chen Z, Lee MK, Attar N, Sazegar H, Chodon T, Nelson SF, McArthur G, Sosman JA, Ribas A and Lo RS. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* 2010; 468: 973-977.
- [32] Woessmann W, Chen X and Borkhardt A. Ras-mediated activation of ERK by cisplatin induces cell death independently of p53 in osteosarcoma and neuroblastoma cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 2002; 50: 397-404.
- [33] Dean M, Fojo T and Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 275-284.
- [34] Donnenberg VS and Donnenberg AD. Multiple Drug Resistance in Cancer Revisited: The Cancer Stem Cell Hypothesis. *J Clin Pharmacol* 2005; 45: 872-877.
- [35] Alison MR, Lin WR, Lim SM and Nicholson LJ. Cancer stem cells: In the line of fire. *Cancer Treat Rev* 2012; 38: 589-598.
- [36] Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, Bruns CJ and Heeschen C. Distinct Populations of Cancer Stem Cells Determine Tumor Growth and Metastatic Activity in Human Pancreatic Cancer. *Cell Stem Cell* 2007; 1: 313-323.
- [37] Dylla SJ, Beviglia L, Park IK, Chartier C, Raval J, Ngan L, Pickell K, Aguilar J, Lazetic S, Smith-Berdan S, Clarke MF, Hoey T, Lewicki J and Gurney AL. Colorectal Cancer Stem Cells Are Enriched in Xenogeneic Tumors Following Chemotherapy. *PLoS One* 2008; 3: e2428.
- [38] Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD and Rich JN. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA

Pathway inhibitor resistant cells are hypermutated and crossresistant

- damage response. *Nature* 2006; 444: 758-760.
- [39] Liu Y, Nenutil R, Appleyard MV, Murray K, Boylan M, Thompson AM and Coates PJ. Lack of correlation of stem cell markers in breast cancer stem cells. *Br J Cancer* 2014; 110: 2063-2071.
- [40] Turner NC and Reis-Filho JS. Genetic heterogeneity and cancer drug resistance. *Lancet Oncol* 2012; 13: e178-185.
- [41] Jia P, Jin H, Meador CB, Xia J, Ohashi K, Liu L, Pirazzoli V, Dahlman KB, Politi K, Michor F, Zhao Z and Pao W. Next-generation sequencing of paired tyrosine kinase inhibitor-sensitive and -resistant EGFR mutant lung cancer cell lines identifies spectrum of DNA changes associated with drug resistance. *Genome Res* 2013; 23: 1434-1445.
- [42] Pauwels O, Gozy M, Van Houtte P, Pasteels JL, Atassi G and Kiss R. Cross resistance and collateral sensitivity between cytotoxic drugs and radiation in two human bladder cell lines. *Radiother Oncol* 1996; 39: 81-86.
- [43] Gigante M, Toffoli G, Bertola A, Biscontin G, Dassie A, Zanelli GD, Zanin E, Trovo MG and Muzzio PC. Radiosensitivity in multidrug-resistant and cisplatin-resistant human carcinoma cell lines. *Am J Clin Oncol* 2003; 26: e73-79.
- [44] Shi D, Shi G, Huang G, Zhang J and Lartigau E. Chemosensitivity of radioresistant cells in the multicellular spheroids of A549 lung adenocarcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2009; 28: 72.
- [45] Oerlemans R, Franke NE, Assaraf YG, Cloos J, van Zantwijk I, Berkers CR, Scheffer GL, Debipersad K, Vojtekova K, Lemos C, van der Heijden JW, Ylstra B, Peters GJ, Kaspers GL, Dijkmans BA, Scheper RJ and Jansen G. Molecular basis of bortezomib resistance: proteasome subunit $\beta 5$ (PSMB5) gene mutation and overexpression of PSMB5 protein. *Blood* 2008; 112: 2489-2499.
- [46] Wheeler DL, Huang S, Kruser TJ, Nechrebecki MM, Armstrong EA, Benavente S, Gondi V, Hsu KT and Harari PM. Mechanisms of acquired resistance to cetuximab: role of HER (ErbB) family members. *Oncogene* 2008; 27: 3944-3956.
- [47] Thomas H and Coley HM. Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer Control* 2003; 10: 159-165.
- [48] Arnold CN, Goel A and Boland CR. Role of hMLH1 promoter hypermethylation in drug resistance to 5-fluorouracil in colorectal cancer cell lines. *Int J Cancer* 2003; 108: 66-73.