# TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

# Hals-Nasen-Ohren-Klinik und Poliklinik Klinikum rechts der Isar

# Die Rolle des EGF-Rezeptors und EGF-vermittelter Signalwege auf die strahleninduzierte Migration bei Plattenepithelkarzinomzelllinien des Kopf-Hals-Bereichs (HNSCC)

Johanna Maria Theresia Margraf

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. H. A. Bier

2. apl. Prof. Dr. R. Staudenmaier

Die Dissertation wurde am 08.02.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.05.2011 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

1.	Ein	leitung	. 1
1	.1	Problemstellung	. 1
1	.2	Grundlagen	. 2
	1.2.	1 Das Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs	. 2
	1.2.	2 Tyrosinkinasen und Signaltransduktion	. 9
		Zielsetzung	
2.	Ma	terial und Methoden1	14
2	.1.	Material	14
	2.1.		
	2.1.	2 Wachstumsfaktoren und Inhibitoren	14
	2.1.	3 Antikörper	15
	2.1.	4 Kits	15
	2.1.	5 Reagenzien	16
	2.1.	6 Gemischte Reagenzien und Puffer	17
	2.1.	7 Zellkulturmedien, Medienzusätze und sonstige für die Zellkultur	
		benötigte Reagenzien	19
	2.1.	8 Computer-Programme	19
	2.1.	9 Geräte	20
	2.1.	10 Verbrauchsmaterialien	21
2	.2	Methoden	22
	2.2.	1 Zellkultur	22
	2.2.	2 Bestrahlung	22
	2.2.	3 MTT-Test	23
	2.2.	4 Wound-Healing Assay	24
	2.2.	5 Statistik	26
	2.2.	6 Proteinisolierung	27
	2.2.	7 Bradford Assay	27
	2.2.	8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	28
	2.2.	9 Western Blot Analyse	29
	2.2.	10 Immundetektion	30
3.	Erg	gebnisse	31
	_	Biologische Effekte	
	3.1.	1 MTT-Test	31
	3.1.	2 Wound-Healing Assay	40
3	.2	Biochemische Effekte	53
	3.2.	1 Western Blot Analyse und Immundetektion	53
4	Dis	kussion	59

5. Zı	Zusammenfassung74		
6. A	nhang	75	
6.1	Abbildungsverzeichnis	75	
6.2	Tabellenverzeichnis	78	
6.3	Literaturverzeichnis	81	

# Abkürzungsverzeichnis

Abb. = Abbildung

APS = Ammoniumperoxidsulfat

bidest. = bidestillatus (doppelt desitilliert)

BSA = Bovine Serum Albumin

bzw. = beziehungsweise

° C = Grad Celsius

ca. = circa

cm = Zentimeter

DMSO = Dimethylsulfoxid

DTT = Dithiotreitol

etc. = et cetera

EGF = Epidermal growth factor

EGFR = Epidermal growth factor receptor

ERK1/2 = Extracellular signal-regulated kinase 1/2

FKBP12 = 12-kDa-immunophilin FK506-binding protein

GDP = Guanosindiphosphat

GTP = Guanosintriphosphat

Gy = Gray

h = Stunde

HCI = Chlorwasserstoff

HNSCC = Head and neck squamous cell carcinoma

= Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs

```
mA = Milliampere
```

MAPK = Mitogen activited proteinkinase

MEK1/2 = Mitogen signal-regulated kinase 1/2

 $\mu g = Microgramm$ 

min. = Minuten

 $\mu$ I = Microliter

ml = Milliliter

mTOR = Mammalian target of rapamycin

MTT = 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromid

NaCl = Natriumchlorid

ND = Neck dissection

NSCLC = Non-small cell lung cancer

pAkt = phosphorylierte Proteinkinase B

PBS = Phosphate-buffered Saline

PDK1 = 3-phosphoinositide-dependent proteinkinase 1

pEGFR = phosphorylierter Epidermal growth factor receptor

PI3K = Phosphatidylinositol-3'-Kinase

PIP2 = Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat

PIP3 = Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate

PKB/Akt = Proteinkinase B

pMAPK = phosphorylierte Mitogen activited proteinkinase

pMEK1/2 = phosphorylierte Mitogen signal-regulated kinase

PTEN = Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten

PVDF = Polyvinylidenfluorid rH = relative Luftfeuchte S. = Seite s. = siehes.a. = siehe auch SDS = Sodiumdodecylsulfat Sos = son of sevenless s.u. = siehe unten Tab. = Tabelle  $\label{eq:TEMED} TEMED = N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin, 1, 2-Bis (dimethylamino)-ethan$ u.a. = unter anderem V = Volt v.a. = vor allem vs = versus z.B. = zum Beispiel zw. = zwischen

# 1. Einleitung

# 1.1 Problemstellung

Die durch eine primäre Radio-Chemotherapie erreichbaren Überlebensraten bei Patienten mit einem fortgeschrittenen Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs (HNSCC) sind nicht überzeugend (Hunter et al. 2005). In der aktuellen Forschung konzentriert man sich deshalb auf gezielte molekulare Therapiemöglichkeiten zusätzlich zur primären Radio-Chemotherapie. Der EGFR spielt in dieser Forschung eine große Rolle, da er mit der Entstehung und Progression des HNSCC zusammenhängt (Grandis and Tweardy 1993). Eine Überexpression ist mit einer schlechteren Prognose behaftet (Ang et al. 2002). Wichtige dem EGFR nachfolgende Signalwege sind der Pl3K-abhängige Signalweg und der MAPK-Signalweg (Testa and Bellacosa 2001). Der MAPK-Signalweg vermittelt mitogene Signale wie Proliferation und Differentation, der Pl3K-abhängige Signalweg ist hingegen in die zelluläre Migration und Anti-Apoptose involviert (Tamura et al. 1998). Eine Aktivierung des Pl3K/PKB/Akt-abhängigen Signalwegs konnte in HNSCC beobachtet werden. In klinischen Studien wurde eine Assoziation zwischen der Expression des aktivierten Akt und dem Behandlungserfolg festgestellt (Bussink et al. 2008).

Es konnte gezeigt werden, dass der EGFR und somit auch seine nachfolgenden Signalwege auf molekularer Ebene durch Bestrahlung aktiviert werden (Valerie et al. 2007). Auch auf biologischer Ebene wurden Bestrahlungseffekte nachgewiesen. Die Bestrahlung von humanen Plattenepithelkarzinomzellen induzierte beispielsweise eine vermehrte Proliferation, welche von der Aktivierung des EGFR durch Autophosphorylierung abhängig war (Schmidt-Ullrich et al. 1997). In anderen Studien konnte ein Anstieg der Migration und des invasiven Potentials von Gliomzellen, Lungenkarzinomzellen und Pankreaskarzinomzellen durch Bestrahlung beobachtet werden (Camphausen et al. 2001; Qian et al. 2002; Wild-Bode et al. 2001).

In dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, ob Bestrahlung auch in Plattenepithelkarzinomlinien eine vermehrte Migration induziert und ob eine Aktivierung des EGFR und der ihm nachfolgenden Signalwege für die erhöhte Migrationsrate verantwortlich ist.

# 1.2 Grundlagen

## 1.2.1 Das Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs

## **Epidemiologie**

Das Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs ist weltweit der am sechst häufigsten auftretende Tumor und steht bei den durch eine Tumorerkrankung verursachten Todesursachen an achter Stelle (Hunter et al. 2005; Ragin et al. 2007). Ca. 50 % aller HNSCC entfallen auf die Mundhöhle, ca. 25 % auf den Larynx und ca. 25 % auf den Pharynx Männer sind dreimal häufiger als Frauen von HNSCC der

25 % auf den Pharynx. Männer sind dreimal häufiger als Frauen von HNSCC der Mundhöhle und des Pharynx betroffen. Bei HNSCC des Larynx besteht sogar ein Männer-Frauen-Verhältnis von 5:1.

Das mittlere Erkrankungsalter beträgt sowohl bei Männern als auch bei Frauen ca. 60 Jahre (Mast et al. 2009).

## TNM-Klassifikation und Stadieneinteilung

Die aktuelle TNM-Klassifikation der HNSCC ist in der folgenden Tab. 1 aufgeführt. Sie entspricht der neuesten Version der International Union against Cancer. T steht für die Ausbreitung des Primärtumors, N für die Ausbreitung des Tumors in die regionären Lymphknoten, M für das Vorhandensein von Fernmetastasen, R für das Vorhandensein eines Resttumors nach Behandlung und G für die histologische Differenzierung und somit für die Malignität. Durch den Zusatz p wird beschrieben, dass das jeweilige Stadium anhand histopathologischer Befunde gesichert wurde. Das T-Stadium ist für die verschiedenen Tumorlokalisationen im Kopf-Hals-Bereich unterschiedlich. Dahingegen gilt das N-Stadium mit Ausnahme der Nasopharynx-Tumoren für HNSCC aller Lokalisationen. M-Stadium, R-Faktor und G-Faktor werden für HNSCC aller Lokalisationen angewendet (Sobin and Wittekind 2002).

pT-Klassifikation	pT-Klassifikation			
рТх	Keine histologische Beurteilung des Primärtumors möglich			
pT0 Kein histologischer Anhalt für einen Primärtumor				
pTis Carcinoma in situ				
pT1-4 Zunehmende Größe und/oder lokale Ausdehnung des Primärtumors				
pN-Klassifikation				
pNx	Keine histologische Beurteilung der regionären Lymphknoten möglich			
pN0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen			
pN1	Metastase in solitärem ipsilateralen Lymphknoten ≤ 3 cm			
pN2a	Metastase in solitärem ipsilateralen Lymphknoten > 3cm < 6 cm			
pN2b	Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, alle ≤ 6 cm			
pN2c	Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, alle ≤ 6 cm			
pN3 Alle Lymphknotenmetastasen > 6 cm				
pM-Klassifikation				
рМх	Keine histologische Beurteilung der Fernmetastasen möglich			
pM0	Histologisch keine Fernmetastasen			
pM1	Histologisch gesicherte Fernmetastase(n)			
R-Faktor				
Rx	Keine Beurteilung des Vorhandenseins eines Residualtumors möglich			
R0	Kein Residualtumor			
R1	Mikroskopisch nachweisbarer Residualtumor			
R2	Makroskopisch sichtbarer Residualtumor			
G-Faktor				
G1	Hoch differenziert			
G2	Mäßig differenziert			
G3	Niedrig differenziert			

Tab. 1: TNM-Klassifikation der HNSCC (Sobin and Wittekind 2002)

Tab. 2 zeigt die Stadieneinteilung der Karzinome im Kopf-Hals-Bereich. Diese gilt für Karzinome im Kopf-Hals-Bereich aller Lokalisationen außer der Schilddrüse und des Nasopharynx.

Stadium	Т	N	M
Stadium 0	Tis	N0	MO
Stadium I	T1	N0	MO
Stadium II	T2	N0	MO
Stadium III	T1, T2	N1, N0	MO
	Т3	N1	MO
Stadium IVa	T1, T2, T3	N2	MO
	T4a	N0, N1, N2	MO
Stadium IVb	Alle T	N3	MO
	T4b	Alle N	MO
Stadium IVc	Alle T	Alle N	M1

Tab. 2: Stadieneinteilung der Karzinome im Kopf-Hals-Bereich (Sobin and Wittekind 2002)

## **Pathologie**

Das Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs ist ein maligner epithelialer Tumor plattenepithelialer Differenzierung. Man unterscheidet hauptsächlich das Plattenepithelkarzinom vom verhornenden Typ und das vom nicht verhornenden Typ. Makroskopisch wächst der Tumor meist endophytisch, knotig und oberflächlich ulzerierend. Seltener trifft man auf die exophytisch-papilläre Wuchsform eines hochdifferenzierten Plattenepithelkarzinoms.

Mikroskopisch sieht man große, polygonale oder spindelzellige Tumorzellen mit Kernatypien und atypischen Mitosefiguren. Je höher differenziert der Tumor ist, desto ausgeprägter ist das Auftreten einer Verhornung beim verhornenden Typ und das Vorhandensein von Interzellularbrücken. Die Verhornung kann in Form konzentrischer Hornperlen oder auch als Einzelzellverhornung in Erscheinung treten (Böcker et al. 2008; Mast et al. 2009).

## Molekularpathologie

Die Entwicklung des HNSCC geht von einer prämalignen Vorläuferzelle aus. In der Folge führt die Anhäufung genetischer Alterationen mit einem Zugewinn tumorgener Eigenschaften zu einem Anwachsen klonaler Zellpopulationen.

Genetische Alterationen wie Deletionen, Punktmutationen, Promotor-Methylierungen und Gen-Amplifikation führen zu einer Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und Aktivierung von Protoonkogenen. Der Verlust der chromosomalen Region 9p21 ist die häufigste genetische Alteration und wird in 70 – 80 % der Fälle gefunden. Häufige Tumorsuppressorgene und Protoonkogene in HNSCC sind p16<sup>ink4A</sup>, p53, Cyclin D1, p14<sup>ARF</sup>, FHIT, RASSF1A, Rb und der EGF-Rezeptor (Perez-Ordonez et al. 2006).

Abbildung 1 zeigt ein hypothetisches Modell für die Karzinogenese in HNSCC.

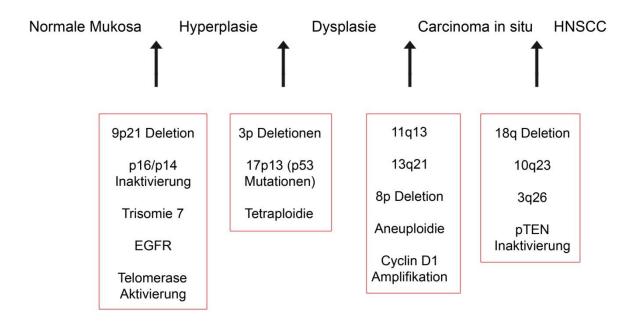


Abb. 1: Hypothetisches Modell für die Karzinogenese in HNSCC (Perez-Ordonez et al. 2006)

Eine Überexpression des EGFR tritt in der Karzinogenese der HNSCC früh auf (Grandis and Tweardy 1993). Eine starke Aufregulation des EGFR wird während des Wechsels von einer Dysplasie zu einem HNSCC beobachtet (Shin et al. 1994).

In einer Studie wurde eine Erhöhung der EGFR mRNA in 92 % der HNSCC festgestellt (Grandis and Tweardy 1993). Eine Überexpression des EGFR Proteins fand man in 38 – 47 % der Fälle (Bei et al. 2004; Ongkeko et al. 2005).

Es wurde beobachtet, dass die Überexpression des EGFR in HNSCC des Larynx geringer ist als in Plattenepithelkarzinomen des Pharynx und der Mundhöhle (Takes et al. 1998), was darauf hinweist, dass die EGFR-Expression zwischen den verschiedenen anatomischen Lokalisation der HNSCC differiert (Kalyankrishna and Grandis 2006).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression des EGFR bei Patienten mit einem HNSCC mit einem niedrigeren Überleben korreliert (Ang et al. 2002; Grandis et al. 1998). Bei Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus hing eine Überexpression des EGFR sogar mit einer erhöhten Tumorinvasion zusammen (Hanawa et al. 2006).

## Ätiologie und Risikofaktoren

Die zwei wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung von HNSCC sind Zigarettenund Alkoholkonsum. Auch eine schlechte Mundhygiene kann zur Entwicklung beitragen. Kontrovers diskutiert wird eine Rolle des Humanen Papillomavirus (HPV) bei der Entstehung von Mundhöhlen- und Oropharynxkarzinomen. Eine weitere Rolle bei der Entstehung von HNSCC spielen auch berufliche Karzinogene wie z.B. Asbest, Benzol oder Nickel.

Das höchste Risiko für die Entstehung eines Plattenepithelkarzinoms im Kopf-Hals-Bereich besteht allerdings, wenn man den verschiedenen Risikofaktoren, v.a. dem Zigarettenrauch und dem Alkohol, gleichzeitig ausgesetzt ist (Hunter et al. 2005; Mast et al. 2009; Meurman and Uittamo 2008).

## **Therapie**

Bei der Therapie der Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs herrschen zwei wesentliche Behandlungskonzepte vor.

Zum einen gibt es das primär chirurgische Behandlungskonzept, dessen Ziele die vollständige Resektion des Tumors und die Wiederherstellung der ästhetischen und funktionellen Integrität des Patienten sind. Zusätzlich zur Entfernung des Primärtumors wird häufig eine Neck Dissection (ND) durchgeführt. Dabei werden die lokoregionären Lymphdrainagewege ausgeräumt. Sind klinisch bereits vergrößerte Lymphknoten nachweisbar (N+), erfolgt die ND in kurativer bzw. therapeutischer Indikation. Bei klinisch inapparentem Lymphknotenstatus (N0) kann eine ND im Sinne eines operativen Stagings vorgenommen werden (Mast et al. 2009). Bei fortgeschrittenen HNSCC wird an die Operation eine adjuvante Strahlentherapie angeschlossen, um lokoregionäre Rezidive zu vermeiden. Die Indikationen für eine adjuvante Strahlentherapie sind: Lokal fortgeschrittener Tumor (T3, T4), positiver fortgeschrittener Lymphknotenbefall (N2, N3), extrakapsuläre Ausbreitung der Lymphknotenmetastasen, nahe oder positive Resektionsränder, ossäre, perineurale oder lymphovaskuläre Invasion und hohe Wahrscheinlichkeit einer okkulten Ausbreitung in die Halslymphknoten bei nicht durchgeführter Neck Dissection (Kao et al. 2008). Die adjuvante Strahlentherapie wird meist durch eine simultane Chemotherapie ergänzt, was zwar einen Überlebensvorteil mit sich bringt, jedoch auch die Nebenwirkungsrate erhöht (Bernier et al. 2004; Vivek et al. 2006).

Das zweite große Behandlungskonzept ist die primäre Radiotherapie. Sie wird angewendet, wenn der Tumor entweder schon so weit fortgeschritten ist oder an einer anatomisch ungünstigen Stelle gelegen ist, dass eine vollständige Resektion ohne erhebliche funktionelle und ästhetische Einbußen nicht möglich wäre. Bei einem N+-Status werden auch die lokoregionären Lymphdrainagewege mitbestrahlt. Die Kombination der primären Radiotherapie mit einer Chemotherapie birgt Vorteile für die lokoregionäre Kontrolle und die Überlebenszeit. Limitiert wird dieses Verfahren jedoch durch die Kombination dieser zwei sehr Behandlungskomponenten, die starke akute und auch chronische Nebenwirkungen mit sich bringt. Bei sehr alten Patienten oder hoher Komorbidität wird deshalb häufig nur eine primäre Radiotherapie durchgeführt.

Die primäre Radio-Chemotherapie kann als einzige Therapie, aber auch als neoadjuvante Therapie angewendet werden, deren Ziel eine Verkleinerung des Primärtumors für eine anschließende chirurgische Entfernung ist (Mast et al. 2009; Pignon et al. 2000).

Aktuell werden für die Behandlung fortgeschrittener HNSCC auch molekular gezielte Therapien erforscht und getestet. Dabei spielen v.a. der EGFR und der PI3Kabhängige Signalweg eine Rolle. Monoklonale Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne des EGFR wie Cetuximab hemmen die Aktivierung des EGFR und induzieren seinen Abbau (Choong and Cohen 2006). In einer Phase III – Studie wurde die Anwendung von Cetuximab in Kombination mit einer primären Strahlentherapie getestet und mit der alleinigen Strahlentherapie verglichen. Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Besserung der lokoregionären Kontrolle und der Überlebensrate ohne die Nebenwirkungen der Strahlentherapie zu verstärken. Jedoch profitierten nur ca. 10 – 15 % der Patienten von der Behandlung (Bonner et al. 2006). In einer Phase II – Studie wurde bereits auch die Kombination der primären Strahlentherapie mit Cetuximab und einer Chemotherapie mit Cisplatin getestet. Die Studie musste aufgrund ungünstiger Zwischenfälle frühzeitig beendet werden. Die bis dahin erreichte lokoregionäre Kontrolle, das progressionsfreie Überleben und die mittlere Überlebensrate waren jedoch ermutigend (Pfister et al. 2006).

Weiterhin sind erste Versuche mit EGFR Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Erlotinib und mTOR-Inhibitoren wie Rapamycin erfolgsversprechend (Aissat et al. 2008; Nathan et al. 2007; Soulieres et al. 2004).

## Prognosefaktoren

Wichtigster Prognosefaktor bei HNSCC ist das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen. Patienten mit Lymphknotenmetastasen weisen eine signifikant verringerte Überlebensrate auf (O'Brien et al. 1986). Weitere Prognosefaktoren sind Lokalisation, Ausbreitung, Resektionsstatus, histologische Differenzierung, Angioinvasion in Blut- und Lymphgefäße und eine perineurale Invasion des Tumors. Zudem spielt bei der Prognose die extrakapsuläre Infiltration von Lymphknotenmetastasen eine Rolle.

Bezüglich der Lokalisation haben HNSCC der Lippe und des Larynx die beste Prognose und HNSCC des Hypopharynx die schlechteste Prognose (Fortin et al. 2001; Mast et al. 2009).

# 1.2.2 Tyrosinkinasen und Signaltransduktion

#### **EGFR**

Der EGF-Rezeptor ist ein Mitglied der zu den Rezeptor-Tyrosinkinasen zählenden ErbB/HER-Familie. Er besteht aus einer extrazellulären N-terminalen Ligandenbindenden Domäne, einer transmembranösen Region und einer intrazellulären Cterminalen Domäne. welche sich aus der Tyrosinkinase und Phosphorylierungsstellen zusammensetzt. Aktuell sind 12 Liganden der ErbB-Familie bekannt (z.B. EGF). Die Ligandenbindung an den zuvor monomeren EGFR führt zu einer Homodimerisierung des EGFR oder einer Heterodimerisierung des EGFR mit anderen ErbBs, woraus eine Autophosphorylierung des Rezeptors resultiert. Der aktivierte Rezeptor rekrutiert Signal-Komplexe und aktiviert verschiedene Signalkaskaden, die u.a. für Zellwachstum und Antiapoptose verantwortlich sind (Kalyankrishna and Grandis 2006). Interessant für diese Arbeit sind v.a. der PI3Kabhängige und der MAPK-Signalweg, auf die unten näher eingegangen wird.

Für die Stimulation des EGFR wird in vorliegender Arbeit EGF verwendet, welches als Ligand an die extrazelluläre Domäne des EGFR bindet. Die Inhibition des EGFR erfolgt mit Tyrphostin AG1478, einem spezifischen Inhibitor der Tyrosinkinase-Aktivität des EGFR (Osherov and Levitzki 1994).

#### PI3K/PKB/Akt

Nach Aktivierung des EGFR wird die Phosphatidylinositol-3'-Kinase (PI3K) über die Bindung der regulatorischen Untereinheit p85 an Phosphotyrosin-Reste des Rezeptors aktiviert. Die katalytische Untereinheit der PI3K phosphoryliert Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP2), wodurch Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphat (PIP3) entsteht.

Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten (PTEN) fungiert als Antagonist der PI3K. Es wandelt PIP3 wieder in PIP2 um.

Ein Anstieg von PIP3 führt zu einer Rekrutierung der Proteinkinase B (PKB/Akt) an die Plasmamembran, wo sie durch die 3-phosphoinositide-dependent proteinkinase 1 (PDK1) über eine PIP3-abhängige Phosphorylierung von Thr-308 und Ser-473 aktiviert wird (Kandel and Hay 1999; Vivanco and Sawyers 2002).

Der Pl3K-abhängige Signalweg ist in die zelluläre Migration und Anti-Apoptose involviert (Tamura et al. 1998).

In vorliegender Arbeit wird die PI3K spezifisch durch LY294002 inhibiert, welches an der ATP-bindenden Seite der katalytischen Untereinheit des Enzyms wirkt (Vlahos et al. 1994).

#### MAPK

Nach der Autophosphorylierung des EGFR binden Adaptermoleküle an den Rezeptor. Diese Moleküle verbinden den Rezeptor mit dem Protein son of sevenless (Sos). Sos fördert die Guanosindiphosphat (GDP) – Freisetzung und die Bindung von Guanosintriphosphat (GTP) an Ras. Die GTP-gebundene Form von Ras bindet an Raf und aktiviert es durch einen komplexen Prozess, der u.a. Plasmamembran-Rekrutierung und Phosphorylierung beinhaltet. Das aktivierte Raf phosphoryliert und aktiviert dadurch die mitogen signal-regulated kinase 1 und 2 (MEK1 und MEK2), welche wiederum die MAP-Kinasen extracellular signal-regulated kinase 1 und 2 (ERK1 und ERK2) durch Phosphorylierung aktivieren (Cobb 1999; Moelling et al. 2002).

Der MAPK-Signalweg vermittelt eher mitogene Signale wie Proliferation und Differentation (Tamura et al. 1998).

In der vorliegenden Arbeit wird PD98059 eingesetzt, welches spezifisch die dephosphorylierte Form von MEK1 hemmt (Alessi et al. 1995).

#### **mTOR**

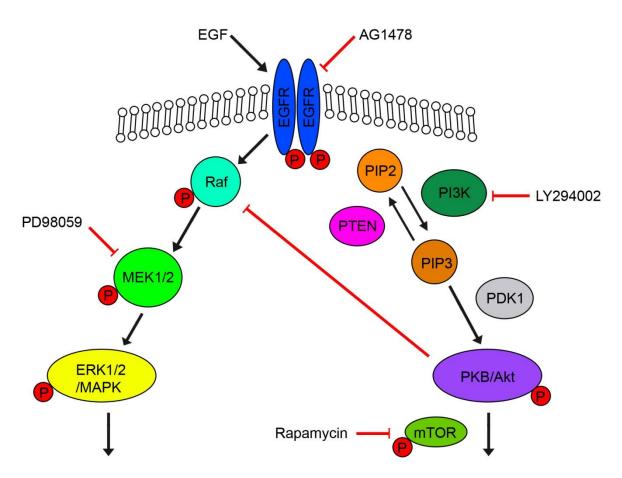
Mammalian target of rapamycin (mTOR) ist eine Serin/Threoninkinase, die an den PI3K-abhängigen Signalweg angeschlossen ist und direkt durch PKB/Akt phosphoryliert wird. Es häufen sich jedoch die Hinweise, dass mTOR auch PI3K-unabhängig aktiviert werden kann (Kandel and Hay 1999; Vivanco and Sawyers 2002).

mTOR spielt eine zentrale Rolle in der Regulation von Zell-Wachstum, Proliferation, Apopotose und Invasion (Vivanco and Sawyers 2002).

Rapamycin ist ein lipophiles Makrolid-Antibiotikum und wird in vorliegender Arbeit verwendet, um mTOR zu inhibieren. Es bindet an das 12-kDa-immunophilin FK506-binding protein (FKBP12) und bildet damit einen Komplex, der mTOR hemmt (Aissat et al. 2008).

Abbildung 2 zeigt den Aufbau der in vorliegender Arbeit interessanten EGFRabhängigen Signalwege. Die Wachstumsfaktoren und Inhibitoren, die zur Beeinflussung der Signaltransduktion verwendet wurden, sind in der Abbildung eingezeichnet.

Zwischen dem PI3K-abhängigen und dem MAPK-Signalweg ist in der Literatur ein Cross-Talk zwischen PKB/Akt und Raf beschrieben, wobei eine Aktivierung der PKB/Akt die Aktivität von Raf durch eine Phosphorylierung von Ser-259 hemmt (Zimmermann and Moelling 1999). Dieser Cross-Talk ist ebenfalls in der Abbildung enthalten.



Proliferation / Differentation Anti-Apoptosis / Migration
Abb. 2: Schematische Darstellung der verschiedenen Signalwege und der in der Arbeit verwendeten Inhibitoren

# 1.3 Zielsetzung

Die Überlebensraten von Patienten mit einem fortgeschrittenen HNSCC sind mit den eingesetzten Therapiemodalitäten nicht überzeugend. Deshalb konzentriert man sich in der aktuellen Forschung auf zusätzlich einsetzbare gezielte molekulare Therapiemöglichkeiten. Der EGFR spielt in dieser Forschung eine große Rolle, da er mit der Entstehung und Progression von HNSCC zusammenhängt. Dem EGFR nachfolgende Signalwege vermitteln verschiedene zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differentation, Migration und Anti-Apoptose.

Studien zeigen, dass der EGFR und somit auch seine nachfolgenden Signalwege auf molekularer Ebene durch Bestrahlung aktiviert werden. Auch auf biologischer Ebene konnten Bestrahlungseffekte im Sinne einer erhöhten Proliferation, Migration oder Invasivität nachgewiesen werden.

Die Zielsetzung bei vorliegender Arbeit beinhaltete:

Bei drei etablierten HNSCC – Zelllinien sollte untersucht werden, ob durch Bestrahlung eine Migration induziert wird.

Weiterhin sollte die Hypothese, dass die EGFR-abhängigen Signalwege für die strahlen-induzierte Migration verantwortlich sind, verifiziert werden.

Um dies zu erreichen, wurde einerseits versucht die strahlen-induzierte Migration durch Blockade des EGFR und der EGFR-abhängigen Signalwege zu inhibieren und durch EGF zu stimulieren. Andererseits wurden die EGFR-abhängigen Signalwege auf molekularer Ebene untersucht, um ein biochemisches Korrelat für die erhöhte Migration zu finden.

Zusammenfassend sollten also folgende Punkte gezeigt werden:

- 1. Durch Bestrahlung induzierte Migration der Plattenepithelkarzinomzellen
- Bedeutung des EGFR und der EGFR-abhängigen Signalwege für die strahleninduzierte Migration

# 2. Material und Methoden

# 2.1. Material

## 2.1.1 Zelllinien

In Tab. 3 sind die in der Arbeit verwendeten Zelllinien aufgeführt.

Zelllinie	Tumor	Alter und Geschlecht	Tumorlokalisation	Differenzierung
вну	Humanes orales Plattenepithelkarzinom	52 a, männlich	Unterer Alveolarkamm mit Infiltration der Mandibula und der Mundbodenmuskulatur	G1
CAL-27	Humanes Plattenepithelkarzinom der Zunge	56 a, männlich	Zunge	G3
HN	Humanes orales Plattenepithelkarzinom	60 a, männlich	Weicher Gaumen mit Infiltration der Muskulatur	G2

Tab. 3: Verwendete Zelllinien, Quellen: BHY und HN (Kawamata et al. 1997), CAL-27 (Gioanni et al. 1988)

## 2.1.2 Wachstumsfaktoren und Inhibitoren

Tab. 4 zeigt die in der Arbeit verwendeten Wachstumsfaktoren und Inhibitoren.

Wachstumsfaktor/Inhibitor	Hersteller	Verwendete Konzentration
Epidermal Growth Faktor (EGF)	Upstate biotechnology, New York	100 ng / ml
LY294002 (C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>3</sub> )	Calbiochem, EMD Biosciences Inc., Darmstadt	50 μM / ml
PD98059 (C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub> )	Calbiochem, EMD Biosciences Inc., Darmstadt	50 μM / ml
Rapamycin (C <sub>51</sub> H <sub>79</sub> NO <sub>13</sub> )	Biomol Research Laboratories Inc., Plymouth Meeting	100 nM / ml
Tyrphostin AG 1478 (C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> CIN <sub>3</sub> O <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim	10 μM / ml
U0126 (C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> N <sub>6</sub> S <sub>2</sub> )	Biomol Research Laboratories Inc., Plymouth Meeting	25μM / ml

Tab. 4: Verwendete Wachstumsfaktoren und Inhibitoren

# 2.1.3 Antikörper

In der unten stehenden Tabelle sind die in der Arbeit verwendeten Antikörper aufgeführt.

Antikörper	Hersteller	Verdünnung		
Primärantikörper				
Phospho-Akt (Ser473)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers	1:5000		
Akt	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers	1:10.000		
Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers	1:5000		
Phospho-44/42 MAPK	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers	1:10.000		
Phospho-EGFR (Tyr1086)	Zymed® Laboratories, South San Francisco	1:5000		
EGFR	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers	1:10.000		
Phospho-MEK1/2 (Ser217/221)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers	1:5000		
MEK1/2	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers	1:10.000		
pRaf (Ser259)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers	1:10.000		
α-Tubulin	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim	1:20.000		
Sekundärantikörper				
Anti-Rabbit-HRP-linked	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers	1:10.000		
Anti-Mouse-HRP-linked	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers	1:10.000		

Tab. 5: Verwendete Antikörper

## 2.1.4 Kits

Tab. 6 zeigt die in der Arbeit verwendeten Kits.

Kit	Firma und Firmensitz
Chemilucent ECL Detection System	Millipore GmbH, Schwalbach
Cell proliferation Kit I (MTT)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Tab. 6: Verwendete Kits

# 2.1.5 Reagenzien

Tab. 7 enthält alle in der Arbeit verwendeten Reagenzien.

Reagenzien	Firma und Firmensitz
<ul> <li>Glycin</li> <li>Tween 20</li> <li>Natriumchlorid (NaCl)</li> <li>Sodiumdodecylsulfat (SDS)</li> <li>Ethanol</li> <li>Methanol</li> <li>Tris</li> <li>Chlorwasserstoff (HCl)</li> <li>Ammoniumperoxidsulfat (APS)</li> <li>N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin, 1,2-Bis(dimethylamino)- ethan (TEMED)</li> <li>Dithiotreitol (DTT)</li> <li>Essigsäure</li> </ul>	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
<ul> <li>ε-Amino-n-caproic Acid</li> <li>Bromphenolblau</li> </ul>	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Non-fat skimmed milk powder	Biomol GmbH, Hamburg
Cell Lysis Buffer (10x)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers
Triton X-100	ICN Biomedicals, Ohio
Dulbecco's Phosphate-buffered Saline (PBS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching
<ul> <li>Bovine Serum Albumin (BSA)</li> <li>Protein Assay, Farbstoffkonzentrat</li> </ul>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Glycerin	E. Merck, Darmstadt
Proteinmarker: PageRuler <sup>™</sup> Prestained Protein Ladder Plus	Fermentas Inc., Glen Burnie

Tab. 7: Verwendete Reagenzien

# 2.1.6 Gemischte Reagenzien und Puffer

Im Folgenden sind die Zusammensetzungen der gemischten Reagenzien, Puffer und Gele aufgelistet:

**0,01% Triton X-100:** 10µl Triton X-100 ad 100ml Dulbecco's PBS

**1M Tris-OH/HCI, pH 8,8:** 18,5 g Tris (Base) ad 100 ml H<sub>2</sub>O bidest., mit

1M HCl pH auf 8,8

**1M Tris-OH/HCI, pH 6,8:** 18,5 g Tris (Base) ad 100 ml H<sub>2</sub>O bidest., mit

1M HCl pH auf 6,8

**10 % SDS:** 10g Sodiumdodecylsulfat ad 100ml H<sub>2</sub>O

bidest.

10 % APS: 1g Ammoniumperoxidsulfat ad 10ml H<sub>2</sub>O

bidest.

**20** % **Methanol**: 200 ml Methanol ad 800 ml H<sub>2</sub>O bidest.

**10** % Tween: 100 ml Tween 20 ad 900 ml H<sub>2</sub>O bidest.

**10 x TBS:** 24,2 g Tris (Base) und 80 g Natriumchlorid,

pH mit Essigsäure auf 7,6 einstellen und mit

H<sub>2</sub>O bidest. auf 1 I auffüllen

1 x TTBS (= Waschpuffer/

Primär Antikörper-Solution): 5 ml 10 % Tween 20 und 50 ml 10 x TBS, mit

H<sub>2</sub>O bidest. auf 500 ml auffüllen

**Blocking Puffer/** 

**Sekundär-Antikörper-Solution:** 100 ml 1 x TTBS und 5 g Non-fat skimmed

milk powder

**0,2mg/ml Bovine Serum Albumin:** 0,2µl BSA ad 1ml 0,01% Triton X-100

**Laemmli-Probenpuffer:** 3,125 ml Tris-OH/HCl pH 6,8, 1 g SDS, 5 ml

Glycerin, 386 mg Dithiotreitol und 0,5 ml 1 % Bromphenolblau mit H<sub>2</sub>O bidest. auf 10 ml

auffüllen

SDS-Laufpuffer: 15,15 g Tris (Base), 70,21 g Glycin und 100

ml 10 % Sodiumdodecylsulfat mit H<sub>2</sub>O bidest.

auf 500 ml auffüllen

**Anodenpuffer I, pH 10,5:** 18,16 g Tris (Base) und 100 ml 20 %

Methanol mit H<sub>2</sub>O bidest. auf 500 ml auffüllen

Anodenpuffer II, pH 10,4: 1,51 g Tris (Base) und 100 ml 20 %

Methanol mit H<sub>2</sub>O bidest. auf 500 ml auffüllen

**Kathodenpuffer, pH 7,5:** 1,51 g Tris (Base), 100 ml 20 % Methanol

und 2,62 g ε-Amino-n-caproic Acid mit H<sub>2</sub>O

bidest. auf 500 ml auffüllen

**Stripping Puffer:** 50 ml Methanol und 50 ml 100% Essigsäure

mit H<sub>2</sub>O bidest. auf 500 ml auffüllen

# 2.1.7 Zellkulturmedien, Medienzusätze und sonstige für die Zellkultur benötigte Reagenzien

Tab. 8 enthält alle in der Arbeit verwendeten Zellkulturmedien, Medienzusätze und sonstige für die Zellkultur benötigte Reagenzien.

Zellkulturmedien, Medienzusätze und sonstige für die Zellkultur benötigte Reagenzien	Firma und Firmensitz
<ul> <li>Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium</li> <li>RPMI-1640 Medium</li> <li>L-Glutamin 200mM</li> <li>Penicillin-Streptomycin- Lösung 10000 Einheiten/ml Penicillin und 10000 μg/ml Streptomycin</li> <li>0,05% Trypsin / 0,53mM EDTA•4Na</li> </ul>	GIBCO, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
HyClone® Fetal Bovine Serum (FBS)	Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Isotone Salzlösung: CASYton	Schärfe System GmbH, Reutlingen

Tab. 8: Verwendete Zellkulturmedien, Medienzusätze und sonstige für die Zellkultur benötigte Reagenzien

# 2.1.8 Computer-Programme

In Tab. 9 sind die in der Arbeit verwendeten Computer-Programme aufgezählt.

Computer-Programme	Firma und Firmensitz
Axiovision Rel. 4.4	Carl Zeiss AG, Göttingen
Adobe Photoshop CS	Adobe Systems GmbH, München
Microsoft Office 2007	Microsoft Corporation, Redmond
R, Version 2.6.1, statistische Software (www.r-project.org)	The R Foundation for Statistical Computing, Wien
Reference Manager 11	The Thomson Corporation, Toronto

Tab. 9: Verwendete Computer-Programme

# 2.1.9 Geräte

In folgender Tabelle sind die in der Arbeit verwendeten Geräte aufgelistet.

Geräte	Firma und Firmensitz	
Zellzähler: CASY1, Modell TT	Schärfe System GmbH, Reutlingen	
Thermomixer comfort 1,5 ml		
<ul> <li>Eppendorf Research-Pipetten 1000μl, 100μl, 20μl, 10μl</li> </ul>	Eppendorf AG, Hamburg	
<ul> <li>Zentrifuge 5417R</li> </ul>		
<ul> <li>Zentrifuge 5415D</li> </ul>		
<ul> <li>MS1 Minishaker</li> </ul>	IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen	
<ul> <li>Magnetrührer RCT basic</li> </ul>	INAW WEIKE GIIDIT & CO. NG, Statien	
Pipettus-akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG, Eberstadt	
Schüttler/Mischer Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach	
<ul> <li>Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell</li> <li>Mini-PROTEAN 3 Cell (Gelkammern)</li> <li>Ready Gel Cell</li> <li>PowerPac 300 Power Supply</li> </ul>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München	
Sartorius Basic Elektrowaage Model BA 1105	Sartorius AG, Göttingen	
Entwicklungsmaschine für die Röntgenfilme: SRX-101A	Konica Minolta GmbH, Unterföhring	
Wasserbad Typ 1002	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel	
<ul><li>Mikroskop: Axiovert 25</li><li>Photomikroskop: Axiovert 135</li></ul>	Carl Zeiss AG, Göttingen	
<ul><li>Cleanbanc: Hera safe, Typ HS 12</li><li>Inkubator: Cytoperm 2</li></ul>	Heraeus Instruments GmbH, Hanau	
Absaugpumpe, Typ N035.3AN.18	KNF Neuberger GmbH, Freiburg	
Siemens elektronic, Gefrierschrank	Siemens AG, München	
SANYO Ultra low, Gefrierschrank	SANYO Fisher Sales GmbH, München	
Beckman DU530, Life Science UV/Vis Spectrophotometer	Beckman Coulter Inc., Fullerton	
Assistent Rollenmischer RM 5, Nr. 348	Karl Hecht KG, Sondheim/Röhn	
ASYS Hitech DigiScan, ELISA Reader	ASYS Hitech GmbH, Eugendorf	
Röntgentherapiegerät RT 100	Siemens AG, München	

Tab. 10: Verwendete Geräte

# 2.1.10 Verbrauchsmaterialien

In Tab. 11 sind die in der Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien aufgeführt.

Verbrauchsmaterialien	Firma und Firmensitz
<ul> <li>Pipetten-Spitzen 1000µl, 100µl, 20µl, 10µl</li> <li>15 ml Tubes</li> <li>50 ml Tubes</li> <li>Biosphere® MicroTubes 1,5 ml</li> <li>Serologische Pipetten 25 ml, 10 ml, 5 ml</li> <li>Tissue Culture Dish 100X20 mm</li> <li>Tissue Culture Dish 60x15 mm</li> <li>Tissue Culture Plate 6-well</li> <li>Tissue Culture Plate 96-well</li> <li>Halb-Mikro-Küvette 10 x 4 x 45 mm</li> </ul>	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pasteurpipetten aus Glas	Brand GmbH + Co KG, Wertheim
Röntgenfilme Hyperfilm <sup>™</sup> ECL	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Blotting-Paper Sheets BF2 (Filterpapier)	Sartorius AG, Göttingen
ImmobilonP Transfer Membranes = Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran	Millipore GmbH, Schwalbach
Toppits Frischhaltefolie	Melitta Unternehmensgruppe Bentz KG, Minden

Tab 11: Verwendete Verbrauchsmaterialien

# 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Zellkultur

Die in Tab. 3 aufgeführten Zelllinien BHY, CAL-27 und HN wurden auf Tissue Culture Dishs in RPMI-1640 Medium (BHY) und in D-MEM-Medium (CAL-27 und HN) kultiviert. Dem Medium wurden jeweils 10 % FBS, 2mM Glutamine, 100U/ml Penicillin und 100μg/ml Streptomycin zugesetzt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37°C, 5% CO2 und 92% rH.

Zum Einfrieren der Zellen wurde dem Medium 5 % DMSO beigefügt. Um das Absterben der Zellen durch zu schnelles Abkühlen zu verhindern, wurden die Zellen schrittweise heruntergekühlt: Zunächst wurden sie 20 Min. auf Eis, dann über Nacht bei -20 °C und schließlich bei -80°C im Gefrierschrank gelagert.

Im Rahmen der Experimente erfolgte eine Behandlung der Zellen mit den in Tab. 6 aufgeführten Wachstumsfaktoren und Inhibitoren. Um eine optimale Wirkungsentfaltung zu erreichen, wurden bei der Prüfung des biologischen Effekts im Rahmen des Wound-Healing Assays und des MTT-Tests (s.u.) Wachstumsfaktoren und Inhibitoren jeweils 12 h vor dem Experiment zugegeben. Bei der Prüfung des biochemischen Effekts im Rahmen der Proteinisolierung erfolgte die Zusetzung nach folgendem Schema:

1 h vorher: Rapamycin

30 min. vorher: LY294002 / PD98059 / Tyrphostin AG 1478 / U0126

15 min. vorher: EGF

Außerdem wurden 24 h vor der Proteinisolierung serumfreie Bedingungen geschaffen, um die wachstumsstimulierende Wirkung des Serums auszuschalten.

## 2.2.2 Bestrahlung

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte in der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie der Technischen Universität München (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. M. Molls) mit dem Röntgentherapiegerät RT 100. Die Zellen wurden dort mit jeweils 0, 2, 5 und 8 Gy bei 70 kV bestrahlt.

## **2.2.3** MTT-Test

Der MTT-Test dient der Messung metabolischer Aktivität von Zellen. Es können Aussagen über die zelluläre Proliferation, die Vitalität und über anti-proliferative Effekte getroffen werden (Alley et al. 1988).

Mit Hilfe dieses Tests sollte durch Messungen der Proliferationsrate der optimale Untersuchungszeitraum für das Wound Healing Assay bestimmt werden. Ein Effekt der Proliferationsrate auf die Ergebnisse des Wound Healing Assays sollte damit ausgeschlossen werden. Als Untersuchungszeitpunkte wurden 24, 48 und 72 h nach Bestrahlung gewählt.

#### Versuchsaufbau

Für das Experiment wurden Tissue Culture Plate 96-wells verwendet. Die Zellen wurden 24 h vor der Bestrahlung ausgesät und 12 h vor der Bestrahlung mit Wachstumsfaktoren und Inhibitoren (s. Tab. 6) behandelt. Die Bestrahlung erfolgte mit jeweils 0 und 8 Gy. Für jede Strahlendosis wurde eine Kontrolle mitgeführt. 24, 48 und 72 h nach der Bestrahlung wurden jeweils 10 μl 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromid (MTT) – labeling reagent hinzugefügt und die Zellen wurden für 4 h bei 37°C inkubiert. Dabei kam es zu einer Ringspaltung des wasserlöslichen Tetrazoliumsalzes MTT durch die mitochondriale Dehydrogenase der lebenden Zellen in das wasserunlösliche dunkelblaue Formazan. Nach der anschließenden Zugabe von 100 μl Solubilization solution erfolgte eine Inkubation der Zellen wiederum bei 37°C über Nacht. Durch die Solubilization solution konnte das Formazan in Lösung gebracht werden. Die optische Dichte dieser Lösung wurde am nächsten Tag mit Hilfe eines ELISA-Readers bei einer Wellenlänge von 590 nm gemessen.

#### **Auswertung**

Für die Auswertung wurden die Absorbtionswerte in Excel exportiert und nach zeitlichem Zusammenhang sortiert. Anschließend war eine Darstellung der Ergebnisse als Diagramm möglich. Die Absorbtionswerte entsprechen der Proliferationsaktivität der untersuchten Proben.

# 2.2.4 Wound-Healing Assay

Das Wound-Healing Assay ist ein Experiment, mit dem man das Migrationsverhalten von Zellen beurteilen kann (Rodriguez et al. 2005). In dieser Arbeit sollte das Migrationsverhalten der Zelllinien BHY, HN und CAL 27 nach 0, 2, 5 und 8 Gy Bestrahlung verglichen werden. Gleichzeitig erfolgte eine Behandlung der Zellen mit Wachstumsfaktoren und Inhibitoren (s. Tab. 6). Für jede Strahlendosis wurde zudem eine Kontrolle mitgeführt.

#### Versuchsaufbau

24 h vor der Bestrahlung wurden die Zellen in Tissue Culture Plate 6-wells ausgesät. 12 h vor der Bestrahlung erfolgte die Zugabe der Wachstumsfaktoren und Inhibitoren. Kurz vor Beginn der Bestrahlung wurde mit einer 100 µl Pipetten-Spitze ein Spalt (= "Scratch") in die Mitte des Zellrasens gekratzt. Darauf folgte die Bestrahlung mit jeweils 0, 2, 5 und 8 Gy. Nach der Bestrahlung wurde der Spalt mit Hilfe des Photomikroskops Axiovert 135 und der Computer-Software Axiovision Rel. 4.4 fotodokumentiert. Auf jeder Tissue Culture Dish wurden jeweils drei Stellen ausgewählt, an denen der Spalt dokumentiert werden sollte. Um diese Stellen wieder zu finden. wurden die Koordinaten handschriftlich festgehalten. Die Fotodokumentation erfolgte jeweils 0, 12 und 24 h nach der Bestrahlung.

Dieser Versuch wurde dreimal durchgeführt, so dass für die Auswertung insgesamt neun Tests zur Verfügung standen.

#### Auswertung

Die Fotos wurden mit der Computer-Software Adobe Photoshop CS ausgewertet. Ziel der Auswertung war es, die Anzahl der nach 12 h und nach 24 h in den Spalt migrierten Zellen zu bestimmen. Dafür erfolgte die Bildung von Dreiergruppen aus den zeitlich zusammenhängenden Fotos. Im 0 h – Foto wurde der Spalt nachgefahren, um eine Vorlage für die ursprüngliche Breite des Spalts zu erhalten. Diese Vorlage wurde zuerst über das 12 h – Foto, dann über das 24 h – Foto gelegt. Die in den Spalt hinein ragenden Zellen konnten nun ausgezählt werden.

Da die Plattenepithelkarzinomzellen größtenteils in Platten wachsen und deshalb nicht gegeneinander abgrenzbar sind, war es nicht möglich, die Zellen einzeln zu zählen. Deshalb wurde ein Gitternetz erstellt, das für die Auswertung über jedes Foto gelegt wurde. Vorbild für die Größe eines Kästchens dieses Gitternetzes war die Größe einer einzeln wachsenden Plattenepithelkarzinomzelle. Anstelle einzelner Zellen wurden also Kästchen gezählt (s. Abb.3).

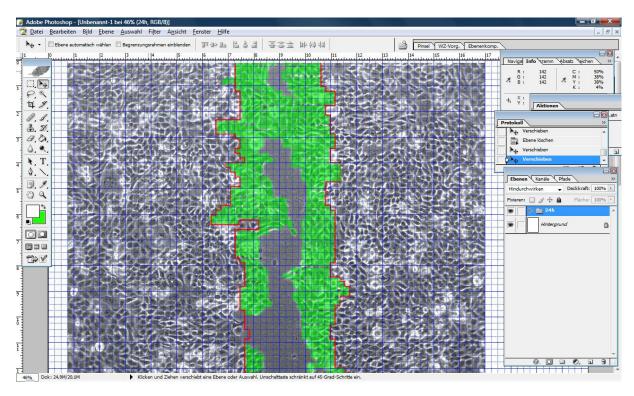


Abb. 3: Photoshop-Screenshot als Beispiel für die Auszählung des Wound Healing Assays

Die erhaltenen Werte wurden in Excel exportiert und nach zeitlichem Zusammenhang und verwendetem Inhibitor und Wachstumsfaktor sortiert. Daraus konnten nun Mittelwerte und Standardfehler errechnet und Diagramme erstellt werden.

## 2.2.5 Statistik

Die Ergebnisse des Wound-Healing Assays und des MTT-Tests mussten auf ihre statistische Signifikanz geprüft werden.

Der Effekt der Strahlendosis auf die Migration der Zellen wurde in einem linearen Regressionsmodell berechnet. In diesem Modell stellte die Migration die abhängige Variable dar und die Strahlendosis den metrischen Einflusswert.

Das Potential dosisabhängiger Inhibiton oder Erhöhung der Migration durch Stimulation wurde basierend auf der generalisierten Methode der kleinsten Quadrate geprüft, wobei eine Anpassung an die R-Funktion "gls" mit der Migration als abhängige Variable erfolgte. Die Einflusswerte waren: die Strahlendosis (metrischer Einflusswert, \( \mathreal\_{rad} \), der Stimulus (kategorischer Einflusswert mit den Koeffizienten ßEGF, ßAG, etc. und den Kontrollen als Referenzgruppe) und ihre Interaktionen etc.). Bei jedem Experiment wurde (Koeffizienten  $R_{rad,EGF}$  $\beta_{\text{rad},AG}$ , zusammenhängende symmetrische Korrelation angenommen. Die zusätzliche Durchführung von linearen Hypothesen-Tests im oben angeführten GLS-Modell geschah zur Überprüfung des Effekts der Strahlendosis in Anwesenheit eines Stimulus (gestestete Hypothese:  $\beta_{rad} + \beta_{rad,EGF} = 0$ ,  $\beta_{rad} + \beta_{rad,AG} = 0$ , etc.). Alle Hypothesen wurden basierend auf dem Wald-Test geprüft. Die einzelnen Analysen erfolgten für alle 3 Zelllinien (BHY, CAL-27 und HN) und für beide Zeitpunkte (12 h und 24 h).

Mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests wurde die Proliferation unter zwei verschiedenen Bedingungen verglichen.

## 2.2.6 Proteinisolierung

Um den Einfluss der Bestrahlung auf den EGF-Rezeptor-Signalweg untersuchen zu können, mussten zunächst Proteinlysate hergestellt werden. Proteine wurden 0 und 24 h nach Bestrahlung und Vorbehandlung der Zellen isoliert.

Nach der Bestrahlung der Zellen mit 0 und 8 Gy wurden diese mit eiskaltem PBS gespült und anschließend mit 150 µl Lyse-Puffer für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nun konnten die Zellen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt werden. In einer Zentrifuge wurden bei 4°C für 15 Minuten die Membranbestandteile der Zellen abzentrifugiert. Der Überstand konnte in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäße abpipettiert werden. Das so gewonnene Proteinlysat wurde anschließend bei – 20° C eingefroren.

## 2.2.7 Bradford Assay

Mit Hilfe der Methode von Bradford (Bradford 1976) konnte der quantitative Proteingehalt der Proteinlösung bestimmt werden.

#### Versuchsaufbau

Zunächst mussten Standardlösungen mit Bovine Serum Albumin für eine Kalibrationskurve hergestellt werden. Für die Probelösungen wurden die Proteinlysate 1:500 und 1:250 verdünnt, um die Genauigkeit der Messung zu steigern. Anschließend wurde zu den Probelösungen und Standardlösungen 600 µl Protein Assay hinzugefügt, kurz durchgemischt und dann 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert.

#### Auswertung

Die optische Dichte der nun blau gefärbten Standard- und Probelösungen konnte in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen werden. Die Werte wurden anschließend in Excel exportiert. Anhand der Kalibrationskurve, die sich aus den Werten der Standardlösungen ergab, konnte die Proteinkonzentration jeder Probe errechnet werden. Da für jede Probe aufgrund der zwei verschiedenen Verdünnungen zwei Ergebnisse existierten, wurde aus den jeweiligen Ergebnissen ein Mittelwert gebildet.

# 2.2.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli 1970) wurden die Proteinlysate der Größe nach aufgetrennt.

Für den Versuch mussten zunächst die Gele hergestellt werden. Ein Gel besteht aus zwei Komponenten: dem Trenngel und dem Sammelgel.

In Tab. 12 ist die Zusammensetzung dieser Gele dargestellt.

Trenngel 10 % Dichte (Menge für 2 Mini-Gele):	
Acrylamid/Bis	2,66 ml
1M Tris-Cl ph 8,8	2 ml
H <sub>2</sub> O bidest.	3,32 ml
10 % SDS	60 µl
10 % APS	30 µl
TEMED	20 μl
Sammelgel 5 % Dichte (Menge für 2 Mini-Gele):	
Acrylamid/Bis	836 µl
1M Tris-Cl ph 6,8	626 µl
H <sub>2</sub> O bidest.	3,5 ml
10 % SDS	50 μl
10 % APS	25 μl
TEMED	10 μΙ

Tab. 12: Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele

Das Trenngel wurde bis zu 2/3 in die Gelkammern gefüllt und mit H<sub>2</sub>O bidest. überschichtet. Nach 45 Min. Polymerisationsdauer konnte das H<sub>2</sub>O bidest. abgegossen und stattdessen das Sammelgel aufgegossen werden. Zur Bildung von Taschen für die Proteinproben wurde außerdem eine Kammschablone eingesetzt. weiteren 15 Min. Gel Nach war das vollständig polymerisiert. Die zuvor eingefrorenen Proteinlysate wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Anhand der mit der Bradford-Methode errechneten Proteinkonzentrationen konnte das Volumen jeder Probe errechnet werden, welches genau 10 µg Protein enthält. Diese 10 µg Protein wurden mit Laemmli-Probenpuffer 1:4 verdünnt und im Thermomixer 5 Min. bei 98° C denaturiert.

Die vorbereiteten Proben wurden auf die Gele aufgetragen. Auf jedem Gel wurde als Längenstandard auch ein Proteinmarker (je 3 - 4  $\mu$ g) mitgeführt. In 1x SDS Laufpuffer konnte jetzt bei einer Stromstärke von 500 mA und einer konstanten Spannung von 120 V die Elektrophorese stattfinden. Die Laufzeit betrug etwa 60-120 Minuten.

## 2.2.9 Western Blot Analyse

Die durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden wurden mittels des Semi-Dry Blot-Verfahrens nach Kyhse-Anderson auf eine PVDF-Membran transferiert (Khyse-Anderson 1984).

Für den Versuch musste ein diskontinuierliches Puffersystem mit folgendem luftblasenfreien Schichtenaufbau von der Anode zur Kathode vorbereitet werden:

- 6 Stück Filterpapier, getränkt mit Anodenpuffer I
- 3 Stück Filterpapier, getränkt mit Anodenpuffer II
- Nitrocellulosemembran, befeuchtet mit Anodenpuffer II
- Polyacrylamidgel
- 9 Stück Filterpapier, getränkt mit Kathodenpuffer

Zur späteren Orientierung wurde die Nitrocellulosemembran auf einer Seite markiert. Danach fand der Transfer über 1 h bei einer Stromstärke von 230mA statt. Um unspezifische Bindungen abzusättigen, wurde die Nitrocellulosemembran nach dem Western Blot mit Blocking Puffer für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach kurzem Spülen mit TTBS konnte die Membran nun für den spezifischen Immunnachweis verwendet werden.

#### 2.2.10 Immundetektion

Der Immunnachweis erlaubt die Darstellung spezifischer Proteinbanden mit der Hilfe von Antikörpern (s,a, Tab. 5). Er erfolgte in modifizierter Form nach Vogel (Vogel and Müller-Esterl 1986).

Es wurden Antikörper gegen die phosphorylierte (aktivierte) Form folgender Proteine der EGFR-abhängigen Signalwege verwendet: phospho-EGFR, phospho-Akt, phospho-Raf, phospho-MEK1/2 und phospho-MAPK (s.a. Abb. 1 und Tab. 3).

Die PVDF-Membran wurde zunächst mit der proteinbehafteten Seite nach innen in ein 50 ml Tube eingerollt, in welchem sich der in 10 ml Primär Ab-Solution verdünnte Primärantikörper befand (Verdünnung s. Tab.5). Anschließend wurde das Tube über Nacht bei 4° C auf dem Rollenmischer inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 10 Min. in TTBS gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, der in 10 ml Sekundär Ab-Solution verdünnt war. Die Inkubation erfolgte für 1 h auf dem Rollenmischer bei Raumtemperatur. Nach abermals drei Waschgängen wurden die immunreaktiven Proteine durch die Peroxidase-Reaktion mit einer fluoreszierenden Lösung (ECL Detection System) markiert und durch Auflage eines Röntgenfilms sichtbar gemacht.

Um zu kontrollieren, ob bei der Gelelektrophorese pro Spur die gleiche Proteinmenge aufgetragen wurde, erfolgte eine erneute Inkubation der entwickelten Membran mit einem Antikörper gegen α-Tubulin. Die Konzentration von α-Tubulin ist in jeder Zelle gleich hoch. Um die Membran erneut inkubieren zu können, musste sie zunächst gestrippt werden. Zum Strippen wurde die Membran zweimal 10 min. mit Stripping-Puffer inkubiert. Nach drei anschließenden Waschgängen in TTBS wurde die Membran 1 h mit Blocking Puffer geblockt. Danach konnte die Membran mit dem neuen Antikörper inkubiert werden.

# 3. Ergebnisse

# 3.1 Biologische Effekte

### 3.1.1 MTT-Test

Der MTT-Test wurde ausgeführt, um einen optimalen Untersuchungszeitraum für das Wound Healing Assay herauszufinden. Es galt eine Verfälschung der Ergebnisse durch die Proliferation der Zellen auszuschließen.

Zudem sollte die Auswirkung zum einen der Bestrahlung zum anderen der Wachstumsfaktoren und Inhibitoren des EGFR und der ihm nachgeschalteten Signalwege auf die Proliferation überprüft werden.

Für die Bestrahlung wurde eine Strahlendosis von 8 Gy ausgewählt. Um einen ausreichend langen und aussagekräftigen Zeitraum zu erhalten, wurden die Zeitpunkte für die Untersuchung 24, 48 und 72 h nach Bestrahlung gesetzt.

Im Folgenden sind die Ergebnisse des MTT-Tests aufgeführt.

### Einfluss der Bestrahlung auf die Proliferation

Im Gegensatz zur unbestrahlten Kontrolle wurde 72 h nach Bestrahlung der Kontrolle mit 8 Gy eine signifikante Abnahme der Proliferation beobachtet (s. Tab. 13).

Zelllinie	Kontrollen 0Gy vs 8Gy
ВНҮ	<0.001
CAL-27	<0.001
HN	0.014

Tab. 13: Errechnete p-Werte für den Vergleich der bestrahlten und unbestrahlten Kontrollen beim MTT-Test

Auf Abb. 4 sieht man, dass zwischen 24 und 48 h sowohl bei den bestrahlten als auch bei den unbestrahlten Zellen eine geringe Proliferation stattfindet.

Bei den unbestrahlten Zellen steigt die Proliferation zwischen 48 und 72 h stark an. Die bestrahlten Zellen zeigen in diesem Zeitraum allerdings ebenfalls eine erhöhte Proliferation. Im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen ist der Anstieg jedoch geringer.

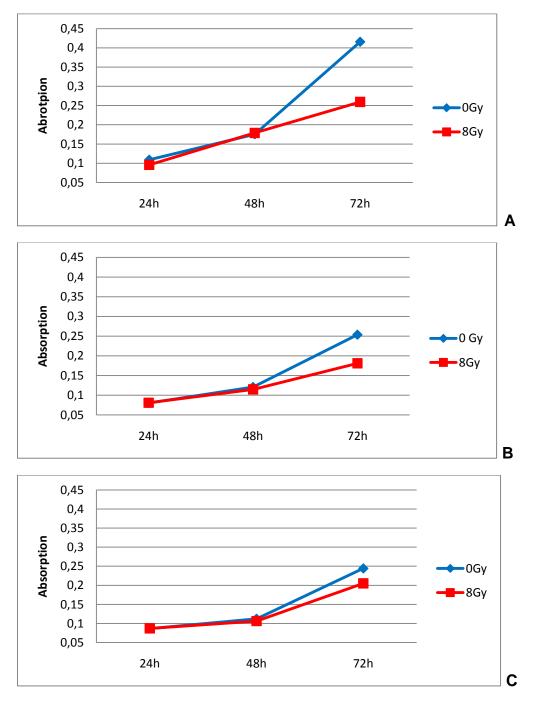


Abb. 4: Demonstration der Proilferation der unbestrahlten und bestrahlten Kontrollen im MTT-Test. A = BHY, B = CAL, C = HN

### Effekt der Beeinflussung des EGFR auf die Proliferation

Nach der Blockade des EGFR durch AG1478 sah man im Vergleich zur Kontrollgruppe einen signfikanten Abfall der Proliferation.

Die Stimulation des EGFR mit EGF zeigte bei den nicht bestrahlten Zellen einen leicht signifikanten Effekt auf die Proliferation.

Die p-Werte, welche die voranstehenden Aussagen bekräftigen, sind in Tab. 14 aufgeführt.

Zelllinie	Kontrollen vs AG1478 (bei 0Gy)	Kontrollen vs EGF (bei 0 Gy)
ВНҮ	<0.001	0.22
CAL-27	<0.001	0.042
HN	<0.001	0.016

Tab. 14: Errechnete p-Werte für den Einfluss derStimulation und Inhibition des EGFR beim MTT-Test

Abb. 5 zeigt die Ergebnisse der Stimulation und Inhibition des EGFR anhand der Ergebnisse der Zelllinie CAL-27.

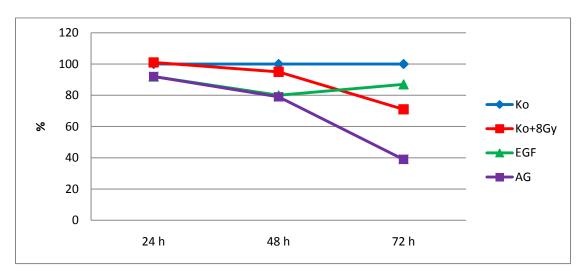


Abb. 5: Ergebnisse der Beeinflussung des EGFR beim MTT-Test anhand der Zelllinie CAL-27. Die bei jedem Versuch mit laufenden Kontrollen wurden gleich 100% und die anderen Werte in Abhängigkeit dazu gesetzt. Ko = Kontrolle, AG = AG1478

Bei gleichzeitiger Bestrahlung und Behandlung der Zellen mit EGF und AG1478 ließ sich kein Unterschied zu den Ergebnissen ohne Bestrahlung feststellen. In Abb. 6 wird diese Aussage verdeutlicht.

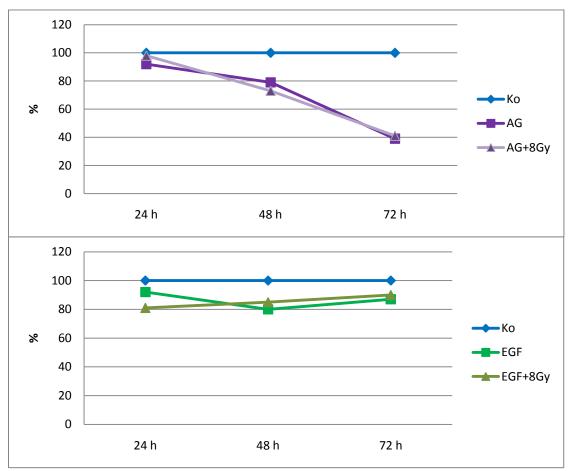


Abb. 6: Vergleich der mit EGF und AG1478 behandelten Zellen mit und ohne Bestrahlung anhand der Zelllinie CAL-27. Die bei jedem Versuch mit laufenden Kontrollen wurden gleich 100% und die anderen Werte in Abhängigkeit dazu gesetzt. Ko = Kontrolle, AG = AG1478

### Effekt der Blockade der PI3K auf die Proliferation

Die Blockade der PI3K durch LY294002 führte zu einer signifikanten Abnahme der Proliferation (s. Tab. 15 und Abb. 7).

Zelllinie	Kontrollen vs LY294002 bei 0Gy	
ВНҮ	<0.001	
CAL-27	<0.001	
HN	<0.001	

Tab. 15: Errechnete p-Werte für den Einfluss der Blockade der PI3K beim MTT-Test

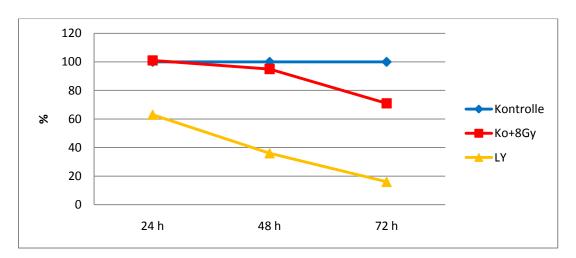


Abb. 7: Ergebnisse der Blockade der PI3K durch LY294002 beim MTT-Test anhand der Zelllinie CAL-27. Die bei jedem Versuch mit laufenden Kontrollen wurden gleich 100% und die anderen Werte in Abhängigkeit dazu gesetzt. Ko = Kontrolle, LY = LY294002

Bei gleichzeitiger Bestrahlung und Behandlung der Zellen mit LY294002 konnte kein Unterschied zu den Ergebnissen ohne Bestrahlung beobachtet werden (s. Abb. 8).

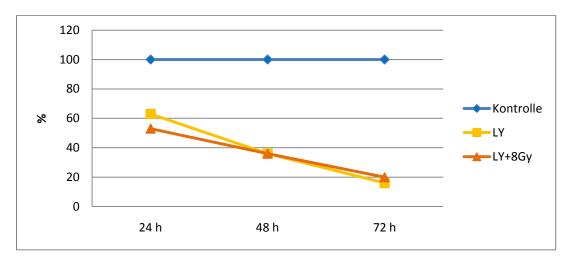


Abb. 8: Vergleich der mit LY294002 behandelten Zellen mit und ohne Bestrahlung anhand der Zelllinie CAL-27. Die bei jedem Versuch mit laufenden Kontrollen wurden gleich 100% und die anderen Werte in Abhängigkeit dazu gesetzt. Ko = Kontrolle, LY = LY294002

### Effekt der Blockade von MEK1 auf die Proliferation

Durch die Blockade von MEK1 durch PD98059 wurde die Proliferation signifikant reduziert (s. Tab. 16 und Abb. 9).

Zelllinie	Kontrollen vs PD98059 bei 0Gy	
вну	<0.001	
CAL-27	<0.001	
HN	<0.001	

Tab. 16: Errechnete p-Werte für den Einfluss der Blockade von MEK1 beim MTT-Test

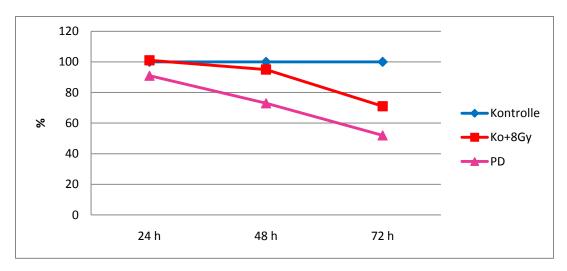


Abb. 9: Ergebnisse der Blockade von MEK1 durch PD98059 beim MTT-Test anhand der Zelllinie CAL-27. Die bei jedem Versuch mit laufenden Kontrollen wurden gleich 100% und die anderen Werte in Abhängigkeit dazu gesetzt. Ko = Kontrolle, PD = PD98059

Bei gleichzeitiger Bestrahlung und Behandlung der Zellen mit PD98059 und war kein Unterschied zu den Ergebnissen ohne Bestrahlung zu sehen (s. Abb. 10).

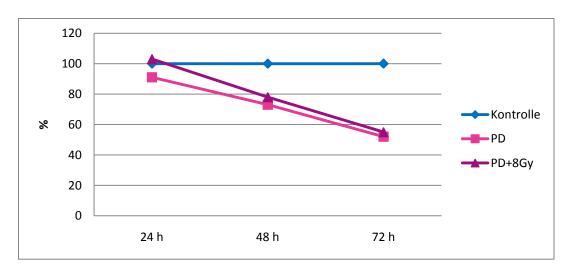


Abb. 10: Vergleich der mit PD98059 behandelten Zellen mit und ohne Bestrahlung anhand der Zelllinie CAL-27. Die bei jedem Versuch mit laufenden Kontrollen wurden gleich 100% und die anderen Werte in Abhängigkeit dazu gesetzt. Ko = Kontrolle, PD = PD98059

### Effekt der Blockade von mTOR auf die Proliferation

Die Blockade von mTOR durch Rapamycin hatte eine signifikante Reduktion der Proliferation zur Folge (s. Tab. 17 und Abb. 14).

Zelllinie	Kontrollen vs Rapamycin bei 0Gy	
ВНҮ	<0.001	
CAL-27	<0.001	
HN	<0.001	

Tab. 17: Errechnete p-Werte für den Einfluss der Blockade von mTOR beim MTT-Test

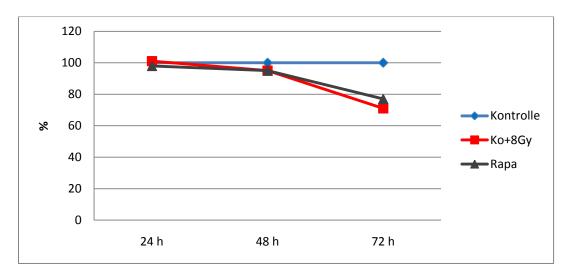


Abb. 11: Ergebnisse der Blockade von mTOR durch Rapamycin beim MTT-Test anhand der Zelllinie CAL-27. Die bei jedem Versuch mit laufenden Kontrollen wurden gleich 100% und die anderen Werte in Abhängigkeit dazu gesetzt. Ko = Kontrolle, Rapa = Rapamycin

Bei gleichzeitiger Bestrahlung und Behandlung der Zellen mit Rapamycin war kein Unterschied zu den Ergebnissen ohne Bestrahlung festzustellen (s. Abb. 12).

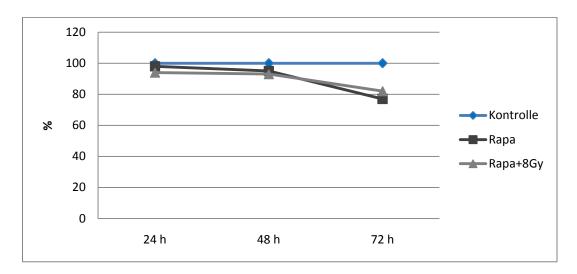


Abb. 12: Vergleich der mit Rapamycin behandelten Zellen mit und ohne Bestrahlung anhand der Zelllinie CAL-27. Die bei jedem Versuch mit laufenden Kontrollen wurden gleich 100% und die anderen Werte in Abhängigkeit dazu gesetzt. Ko = Kontrolle, Rapa = Rapamycin

.

### 3.1.2 Wound-Healing Assay

Ziel des Wound-Healing Assays war herauszufinden, ob bei den drei verwendeten Zelllinien durch Bestrahlung eine Migration induziert wird. Um die Bedeutung der EGFR-abhängigen Signalwege für die strahlen-induzierte Migration aufzuzeigen, wurden die Tumorzellen außerdem zusätzlich zur Bestrahlung mit EGF, dem EGFR-Inhibitor AG1478 und Inhibitoren der EGFR-abhängigen Signalwege (LY294002, PD98059 und Rapamycin, s.a. Abb. 1) behandelt. Interessant war, ob durch den Einsatz dieser Wachstumsfaktoren und Inhibitoren die strahlen-induzierte Migration gehemmt werden kann.

Die Auswertung des Wound-Healing Assays erfolgte 0, 12 und 24 h nach der Bestrahlung und ergab folgende Ergebnisse:

### Effekt der Bestrahlung auf die Migration

Zu Beginn wurde der Effekt der Bestrahlung in aufsteigender Dosis mit 0, 2, 5 und 8 Gy auf unbehandelte Zellen (Kontrollen) der 3 Zelllinien geprüft.

Verglichen mit den nicht bestrahlten Zellen war bei den bestrahlten Zellen eine statistisch signifikante Steigerung der Migration in allen 3 Zelllinien zu sehen (p < 0.009, s. a. Tab.18).

Zeit [h]	ВНҮ	CAL-27	HN
12 h	0.005	< 0.001	< 0.001
24 h	0.009	0.007	< 0.001

Tab. 18: Errechnete p-Werte für den Effekt der Bestrahlung auf die Kontrollen

Das größte Migrationsvermögen konnte bei der Zelllinie HN beobachtet werden.

Die strahlen-induzierten Migration zeigte sich sowohl von der applizierten Dosis als auch von der verstrichenen Zeit (12 und 24 h) abhängig. Je höher also die Dosis war und je mehr Zeit nach der Bestrahlung verging, desto mehr Zellen migrierten in den gesetzten Spalt. Diese Zusammenhänge werden in Abb. 13 verdeutlicht, welche die ansteigende Migration bei allen drei Zelllinien zeigt.

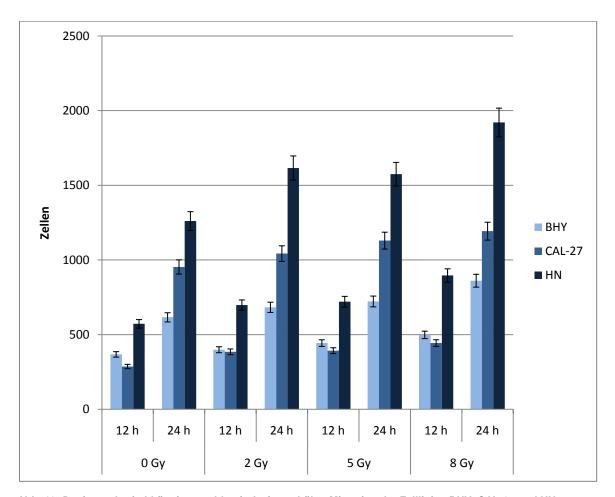


Abb. 13: Dosis- und zeitabhängige strahlen-induziert erhöhte Migration der Zelllinien BHY, CAL-27 und HN

Abb. 14 dient zur Veranschaulichung der erhöhten Migration mit Hilfe von Beispielaufnahmen der Zelllinie BHY, welche die Migration 12 und 24h nach Bestrahlung mit 0 und 8 Gy vergleichen.

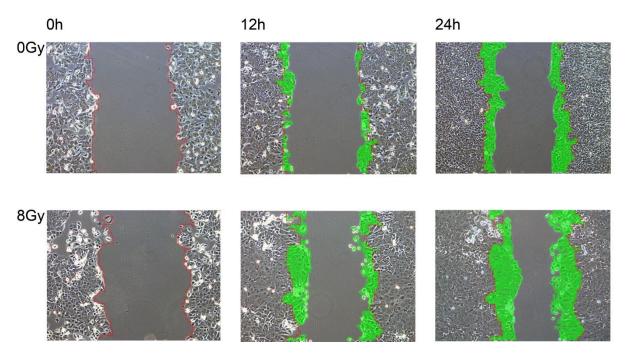


Abb. 14: Strahlen-induziert erhöhte Migration bei 0 und 8 Gy anhand von Beispielaufnahmen der Zelllinie BHY

### Effekt der Beeinflussung des EGFR auf die Migration

Weiterhin wurde untersucht, wie die Zellen auf Beeinflussung des EGFR mit und ohne gleichzeitige Bestrahlung (0, 2, 5 und 8 Gy) reagieren. Hierzu wurden EGF als Stimulans und AG1478 als Inhibitor des EGFR verwendet.

Die Stimulation der nicht bestrahlten Zellen mit EGF führte zu einem signifikanten Anstieg der Migration in allen drei Zelllinien. Bei einer Inhibition der nicht bestrahlten Zellen mit AG1478 ließ sich eine signifikante Abnahme der Migration erkennen (s. Tab. 19 und Abb. 15).

Getestete Hypothesen: $\beta_{EGF} = 0$ und $\beta_{AG} = 0$				
Zeit [h]	12 24			
Stimulus	EGF	AG1478	EGF	AG1478
ВНҮ	< 0.001	0.161	0.005	0.003
CAL-27	0,048	0,006	< 0.001	< 0.001
HN	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

Tab. 19: Errechnete p-Werte für den Effekt von EGF und AG1478 auf die nicht bestrahlten Zellen

Wurden nun die bestrahlten Zellen gleichzeitig mit EGF stimuliert bzw. mit AG1478 inhibiert, konnte man eine signifikante Verringerung des strahlen-induziert erhöhten Migrations-Effekts beobachten (s. Tab. 20 und Abb. 15).

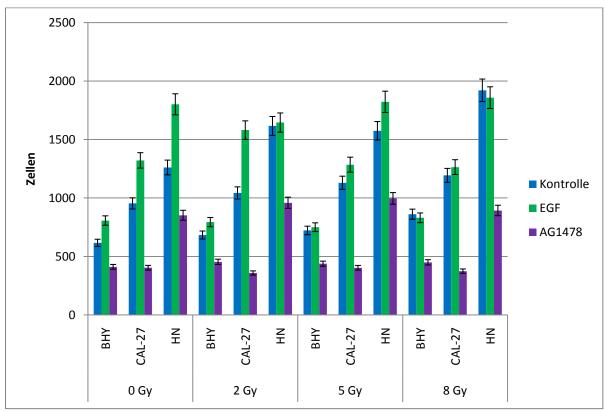


Abb. 15: Abnahme des strahlen-induziert erhöhten Migrationsvermögens nach Behandlung mit EGF und AG1478 (24 h nach Bestrahlung)

Getestete Hypothesen: $\beta_{rad.EGF} = 0$ und $\beta_{rad.AG} = 0$					
Zeit [h]	12 24				
Stimulus	EGF	AG1478	EGF	AG1478	
ВНҮ	< 0.001	0.028	0.034	0.048	
CAL-27	0.002	0.021	0.004	0.070	
HN	0.042	0.003	0.008	0.002	

Tab. 20: Errechnete p-Werte für den Effekt von EGF und AG1478 auf die bestrahlten Zellen

Diese Ergebnisse bedeuten, dass die Migration bei den bestrahlten Zellen, welche mit EGF und AG1478 behandelt wurden, durch die Bestrahlung nicht weiter ansteigt, also nicht von der Strahlendosis abhängt (s. Tab. 21).

Getestete Hypothesen: $\beta_{rad}+\beta_{rad.EGF}=0$ und $\beta_{rad}+\beta_{rad.AG}=0$				
Zeit [h]	12	12 24		
Stimulus	EGF	AG	EGF	AG
ВНҮ	0.077	0.902	0.877	0.713
CAL-27	0.306	0.847	0.090	0.917
HN	0.035	0.486	0.317	0.756

Tab. 21: Errechnete p-Werte für den Zusammenhang zwischen der Dosis und der Migration bei den bestrahlten mit EGF und AG1478 behandelten Zellen

### Effekt der Blockade der PI3K auf die Migration

Die PI3K wurde durch den Einsatz von LY294002 gehemmt. Dadurch nahm die Migration der Zellen signifikant ab (s.Tab. 22 und Abb. 16).

Getestete Hypothese: β <sub>LY</sub> =0			
Zeit [h]	12	24	
Stimulus	LY294002	LY294002	
ВНҮ	0.000	0.000	
CAL-27	0.001	0.000	
HN	0.000	0.000	

Tab. 22: Errechnete p-Werte für den Effekt von LY294002 auf die Kontrollen

Bei allen drei Zelllinien, v.a. aber bei der Zelllinie HN, konnte nach 12 und 24 h eine signifikant negative Interaktion zwischen der gleichzeitigen Bestrahlung und dem Einsatz von LY294002 beobachtet werden. Dies spricht dafür, dass die strahleninduzierte Migration durch die Inhibition der PI3K signifikant abnimmt (s. Tab. 23 und Abb. 16).

Getestete Hypothese: β <sub>rad.LY</sub> =0			
Zeit [h] 12 24			
Stimulus	LY294002	LY294002	
ВНҮ	0.089	0.131	
CAL-27	0.072	0.154	
HN	0.002	0.001	

Tab. 23: Errechnete p-Werte für den Effekt von LY294002 auf die bestrahlten Zellen

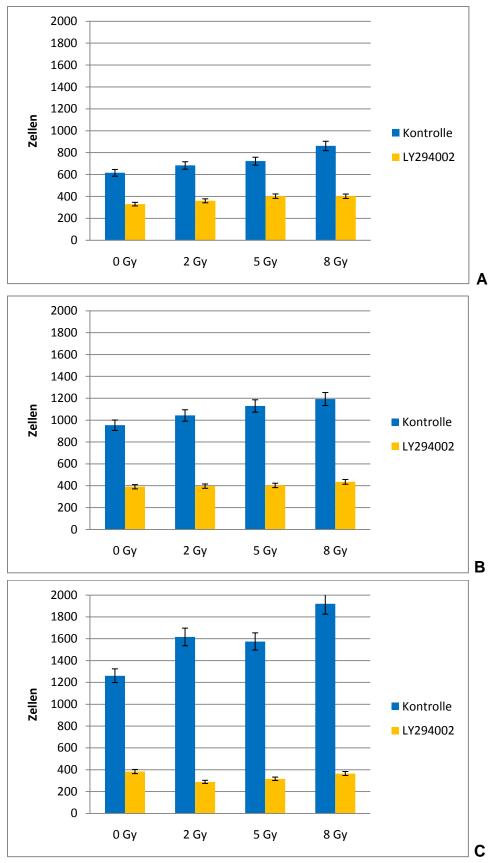


Abb. 16: Abnahme des Migrationsvermögens aller 3 Zelllinien durch Blockade der Pl3K nach 24 h. A = Zelllinie BHY, B = Zelllinie CAL-27, C = Zelllinie HN

Die Blockade der strahlen-induziert erhöhten Migration durch LY294002 war in allen drei Zelllinien unabhängig von der Strahlendosis (s. Tab. 24).

Getestete Hypothese: $\beta_{rad}+\beta_{rad,LY}=0$			
Zeit [h] 12 24			
Stimulus	LY294002	LY294002	
ВНҮ	0.089	0.131	
CAL-27	0.072	0.154	
HN	0.002	0.001	

Tab. 24: Errechnete p-Werte für den Zusammenhang zwischen der Strahlendosis und der Migration bei den mit LY294002 behandelten Zellen

### Effekt der Blockade von MEK1 auf die Migration

MEK1 wurde durch den Einsatz von PD98059 gehemmt. Daraus resultierte bei den Zelllinien CAL-27 und HN eine signifikante Migrations-Abnahme. Bei der Zelllinie BHY ergab sich keine Veränderung (s. Tab. 25).

Getestete Hypothese: β <sub>PD</sub> =0					
Zeit [h] 12 24					
Stimulus	PD98059	PD98059			
ВНҮ	0.781	0.007			
CAL-27	0.000	0.000			
HN	0.000	0.000			

Tab. 25: Errechnete p-Werte für den Effekt von PD98059 auf die Kontrollen

Die strahlen-induzierte Migration konnte durch den Einsatz von PD98059 bei den Zelllinien CAL-27 und HN ebenfalls signifikant gehemmt werden. Bei der Zelllinie BHY zeigte sich wiederum keine Veränderung (s. Abb.17 und Tab. 26).

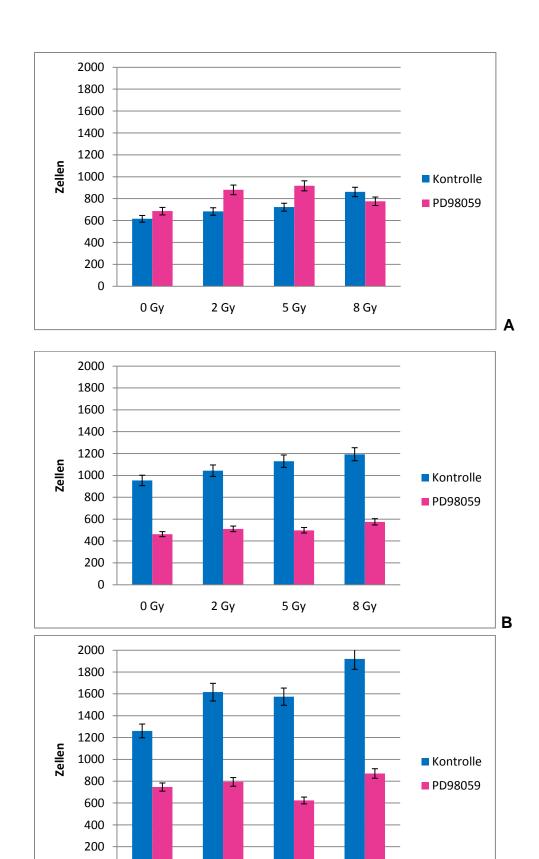


Abb. 17: Abnahme des Migrationsvermögens bei den Zelllinien CAL-27 und HN durch Blockade von MEK1 nach 24 h. Keine Abnahme bei der Zelllinie BHY. A = Zelllinie BHY, B = Zelllinie CAL-27, C = Zelllinie HN

8 Gy

5 Gy

2 Gy

0

0 Gy

C

Getestete Hypothese: β <sub>rad.PD</sub> =0					
Zeit [h] 12 24					
Stimulus	PD98059	PD98059			
ВНҮ	0.023	0.125			
CAL-27	0.107	0.301			
HN	0.041	0.003			

Tab. 26: Errechnete p-Werte für den Effekt von PD98059 auf die bestrahlten Zellen

Die Blockade der strahlen-induziert erhöhten Migration bei CAL-27 und HN durch PD98059 sowie der fehlende Effekt bei BHY waren unabhängig von der Strahlendosis (s. Tab. 27).

Getestete Hypothese: β <sub>rad</sub> +β <sub>rad.PD</sub> =0					
Zeit [h] 12 24					
Stimulus	PD98059	PD98059			
вну	0.828	0.320			
CAL-27	0.238	0.316			
HN	0.036	0.589			

Tab. 27: Errechnete p-Werte für den Zusammenhang zwischen der Strahlendosis und der Migration bei den mit PD98059 behandelten Zellen

## Effekt der Blockade von mTOR auf die Migration

mTOR wurde durch Rapamycin inhibiert. Daraus ergab sich bei allen drei Zelllinien eine signifikante Abnahme der Migration (s. Tab. 28).

Getestete Hypothese: β <sub>Rapamycin</sub> =0					
Zeit [h] 12 24					
Stimulus	Rapamycin	Rapamycin			
ВНҮ	0.050	0.011			
CAL-27	0.003	0.000			
HN	0.000	0.000			

Tab. 28: Errechnete p-Werte für den Effekt von Rapamycin auf die Kontrollen

Auch die durch Bestrahlung induzierte Migration konnte durch den Einsatz von Rapamycin bei allen drei Zelllinien inhibiert werden (s. Tab. 29 und Abb. 18).

Getestete Hypothese: β <sub>rad.Rapamycin</sub> =0				
Zeit [h] 12 24				
Stimulus	Rapamycin	Rapamycin		
ВНҮ	0.021	0.005		
CAL-27	0.088	0.024		
HN	0.014	0.000		

Tab. 29: Errechnete p-Werte für den Effekt von Rapamycin auf die bestrahlten Zellen

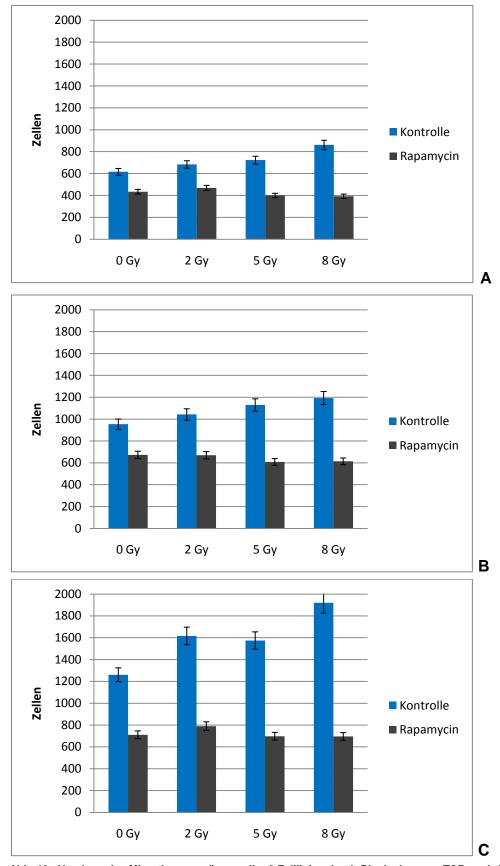


Abb. 18: Abnahme des Migrationsvermögens aller 3 Zelllinien durch Blockade von mTOR nach 24 h. A = Zelllinie BHY, B = Zelllinie CAL-27, C = Zelllinie HN

Die Blockade der strahlen-induziert erhöhten Migration durch Rapamycin war bei allen drei Zelllinien unabhängig von der Strahlendosis.

Getestete Hypothese: β <sub>rad</sub> +β <sub>rad.Rapamycin</sub> =0					
Zeit [h] 12 24					
Stimulus	Rapamycin	Rapamycin			
ВНҮ	0.782	0.406			
<b>CAL-27</b> 0.296 0.457					
HN	0.137	0.686			

Tab. 27: Errechnete p-Werte für den Zusammenhang zwischen der Strahlendosis und der Migration bei den mit Rapamycin behandelten Zellen

## 3.2 Biochemische Effekte

### 3.2.1 Western Blot Analyse und Immundetektion

Um die Effekte der Bestrahlung, der Stimulation und der Inhibition auf biochemischer Ebene nachzuvollziehen, wurden zusätzlich Western Blot Analysen durchgeführt. Dazu erfolgte wie für die vorausgegangen Experimente eine Bestrahlung (mit 0 und 8 Gy) und eine Behandlung mit den gleichen Wachstumsfaktoren und Inhibitoren.

Nachfolgend wird auf die einzelnen Ergebnisse genauer eingegangen.

# Charakterisierung der Proteinexpression unter Standard- und Strahlenbedingungen

In allen drei Zelllinien wurde eine konstitutive Aktivierung des EGFR, der PKB/Akt, der ERK/MAPK und von MEK1/2 gefunden. Bei CAL-27 sah man ebenfalls eine konstitutive Aktivierung von Raf, bei den anderen 2 Zelllinien waren die Ergebnisse mit dem Antikörper gegen phospho-Raf nicht auswertbar.

Zwischen den unbestrahlten und den bestrahlten Proben konnte kein Unterschied in der Aktivierung beobachtet werden, weder 0 h noch 24 h nach Bestrahlung.

In Tab. 28 wird die konstitutive Aktivierung näher charakterisiert.

	ВНҮ		CAL-27		HN	
Mit (☆) / ohne (Ø)	Ø	4	Ø	4	Ø	4
Bestrahlung						
Phospho-EGFR	+	+	++	++	++	++
Phospho-Akt	+	+	++	++	++	++
Phospho-MEK1/2	++	++	+	+	+	+
Phospho-MAPK	+	+	++	++	++	++
Phospho-Raf	-	-	+	+	-	-

Tab. 28: Proteinexpression bei den Zelllinien BHY, CAL-27 und HN unter Standard (∅) - und Strahlenbedingungen (★).

<sup>+ =</sup> leichte konstitutive Aktivierung, ++ = starke konstitutive Aktivierung, - = nicht auswertbar

### Beeinflussung des EGFR

Die Stimulation mit EGF führte zu einer Aufregulation des phospho-EGFR und auch der PI3K/Akt- und der Raf/MEK/ERK-Signalwege.

Im Gegensatz dazu resultierte aus der Blockade des EGFR durch AG1478 eine Abregulation des phospho-EGFR und seiner nachgeschalteten Signalwege. War die Abregulation von phospho-MEK1/2, phospho-MAPK und phospho-Akt schon nach 0 h eindeutig, konnte bei phospho-EGFR und phopsho-Raf nach 0 h nur eine leichte Abregulation beobachtet werden. Eine deutlichere Abregulation war erst nach 24 h erkennbar.

Beide Effekte hielten fast immer für 24 h an.

In Tab. 29 werden diese Ergebnisse schematisch zusammengefasst.

	EGF	AG1478
Phospho-EGFR	1	<b>\</b>
Phospho-Akt	1	<b>↓</b>
Phospho-Raf	1	<b>↓</b>
Phospho-MEK1/2	1	<b>↓</b>
Phospho-MAPK	1	<b>↓</b>

Tab. 29: Zusammenfassung der Ergebnisse der Western Blots bei Beeinflussung des EGFR. ↑ = im Vergleich zur Kontrolle aufreguliert, ↔ = mit Kontrolle vergleichbar, ↓ = im Vergleich zur Kontrolle abreguliert

Bei den gleichzeitig bestrahlten und mit EGF und AG1478 behandelten Zellen konnte kein Unterschied zu den nicht bestrahlten Zellen festgestellt werden.

Abb.19 zeigt die Wirkungen von EGF und AG1478 auf den phospho-EGFR beispielhaft anhand der Zellinie CAL-27. Da die Bestrahlung keinen Unterschied ergab, werden nur die Ergebnisse 0 und 24 h nach Bestrahlung mit 0 Gy (= keine Bestrahlung) gezeigt.

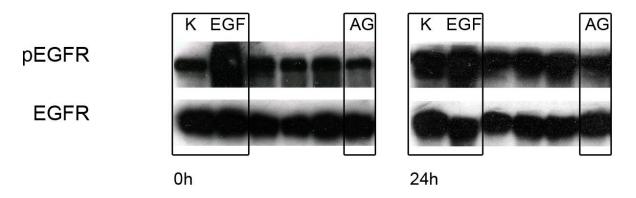


Abb. 19: Western Blot-Ergebnisse der Zelllinie CAL-27 bei phospho-EGFR 0 und 24 h nach Bestrahlung mit 0 Gy und Behandlung mit EGF und AG1478. K = Kontrolle, AG = AG1478

### Beeinflussung der PI3K

Die Blockade der PI3K durch LY294002 hatte wie erwartet einen Abfall von phospho-Akt bis zu 24 h nach der Behandlung zur Folge.

Phospho-Raf blieb zunächst unverändert zur Kontrolle. Nach 24 h war phospho-Raf dann abreguliert.

Tab. 30 fasst diese Ergebnisse zusammen.

	LY294002
Phospho-Akt	<b>↓</b>
Phospho-Raf	Nach 0h ↔
	Nach 24 h ↓

Tab. 30: Zusammenfassung der Ergebnisse der Western Blots bei phospho-Akt und phospho-Raf und der Behandlung mit LY294002. ↑ = im Vergleich zur Kontrolle aufreguliert, ↔ = mit Kontrolle vergleichbar, ↓ = im Vergleich zur Kontrolle abreguliert

Zwischen den bestrahlten und den nicht bestrahlten und mit LY294002 behandelten Proben wurde kein Unterschied beobachtet.

Abb. 20 zeigt die Ergebnisse anhand der Zelllinie CAL-27. Aufgrund des fehlenden Unterschieds bei Bestrahlung sind auch hier nur die Ergebnisse ohne Bestrahlung dargestellt.

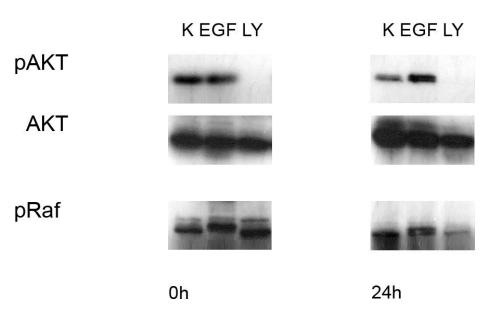


Abb. 20: Western Blot-Ergebnisse der Zelllinie CAL-27 bei phospho-Akt und phospho-Raf 0 und 24 h nach Bestrahlung mit 0 Gy und Behandlung mit EGF und LY294002. K = Kontrolle, LY = LY294002

### Beeinflussung der MAPK

Die Blockade von MEK1 durch PD98059 ging wie erwartet mit einem Abfall der phospho-MAPK nach 0 und 24 h einher.

Durch den Einsatz von PD98059 wurde auch phospho-MEK1/2 abreguliert, jedoch nur 0 h nach der Blockade. 24 h danach war phospho-MEK1/2 im Vergleich zu den Kontrollen interessanterweise hochreguliert.

Auffallend war, dass phospho-MEK1/2 und phospho-MAPK 0 h nach Blockade der PI3K mit LY294002 ebenfalls abreguliert waren. Nach 24 h waren diese Reaktionen bei phospho-MEK1/2 und phospho-MAPK verschwunden und die Ergebnisse waren wieder mit der Kontrolle vergleichbar.

In der Tab. 31 werden diese Ergebnisse zusammenfassend dargestellt.

	PD98059	LY294002
Phospho-MAPK		Nach 0h ↓
	<b>+</b>	Nach 24 h ↔
Phospho-MEK1/2	Nach 0h ↓	Nach 0h ↓
	Nach 24 h ↑	Nach 24 h ↔

Tab. 31: Zusammenfassung der Ergebnisse der Western Blots bei phospho-MAPK und phospho-MEK1/2 und Behandlung mit PD98059 und LY294002. ↑ = im Vergleich zur Kontrolle aufreguliert, ↔ = mit Kontrolle vergleichbar, ↓ = im Vergleich zur Kontrolle abreguliert

Abb. 21 zeigt diese Ergebnisse anhand der Zelllinie HN.

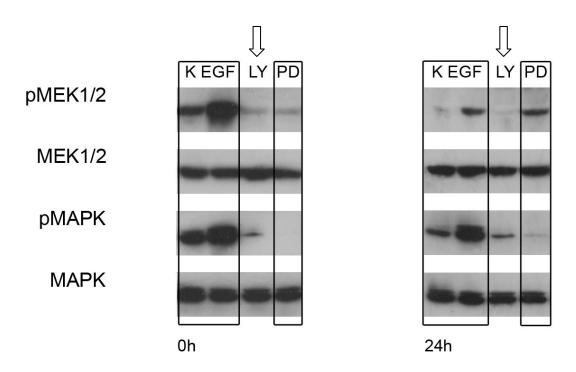


Abb. 21: Western Blot-Ergebnisse der Zelllinie HN bei phospho-MEK1/2 und phospho-MAPK 0 und 24 h nach Bestrahlung mit 0 Gy und Behandlung mit EGF, PD98059 und LY294002 ( ♣). K = Kontrolle, LY = LY294002, PD = PD98059

## Beeinflussung von mTOR

Die Blockade von mTOR durch Rapamycin hatte keine Veränderung bei den geprüften Antikörpern zur Folge (s. a. Tab. 32).

Eine zusammenfassende Übersicht über alle Ergebnisse der Western Blot Analysen wird in Tab. 32 gegeben.

	EGF	LY294002	PD98059	Rapamycin	AG1478
Phospho- EGFR	1	$\leftrightarrow$	$\leftrightarrow$	$\leftrightarrow$	<b>\</b>
Phospho- Akt	1	<b>\</b>	$\leftrightarrow$	$\leftrightarrow$	<b>\</b>
Phospho- Raf	1	Nach 0h ↔ Nach 24 h ↓	$\leftrightarrow$	$\leftrightarrow$	<b>\</b>
Phospho- MEK1/2	1	Nach 0h ↓ Nach 24 h ↔	Nach 0h ↓ Nach 24 h ↑	$\leftrightarrow$	<b>\</b>
Phospho- MAPK	1	Nach 0h ↓ Nach 24 h ↔	1	$\leftrightarrow$	<b>\</b>

Tab. 32: Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse der Western Blots. ↑ = im Vergleich zur Kontrolle aufreguliert,

⇔ = mit Kontrolle vergleichbar, ↓ = im Vergleich zur Kontrolle abreguliert

# 4. Diskussion

### **Therapie**

Wie schon eingangs erwähnt steht das Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs (HNSCC) weltweit an sechster Stelle der häufigsten Tumorerkrankungen und ist am acht häufigsten für einen Todesfall aufgrund einer Tumorerkrankung verantwortlich (Hunter et al. 2005; Ragin et al. 2007).

Die Strahlentherapie ist eine etablierte Methode bei der Behandlung von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich. Man unterscheidet die adjuvante Strahlentherapie im Anschluss an eine Operation und die primäre Strahlentherapie.

Die adjuvante Strahlentherapie wird bei fortgeschrittenen HNSCC an eine primäre Operation angeschlossen, um lokoregionäre Rezidive zu vermeiden. Dadurch verbessern sich die Überlebensraten im Vergleich zur rein operativen Behandlung (Kao et al. 2008).

Beim ersten Auftreten sind HNSCC gekennzeichnet durch infiltratives Wachstum in das umgebende Gewebe, so dass über 40 % aller Patienten eine lokal fortgeschrittene Krankheit haben (Silva et al. 2007). Oft erlaubt die Tumorlokation deshalb keine Resektion im Gesunden, da die notwendige radikale Operation tief greifende funktionelle Einbußen in Bezug auf Schlucken, Sprechen oder Atmen nach sich ziehen würde. In diesen Fällen wird eine primäre Bestrahlung durchgeführt (Mast et al. 2009).

Sowohl bei der adjuvanten als auch bei der primären Strahlentherapie lassen sich die Überlebensraten durch eine geänderte Strahlenfraktionierung oder eine Kombination mit einer Chemotherapie verbessern. Es werden Vorteile in Bezug auf das Überleben und den Organ- und Funktionserhalt beschrieben (Bernier et al. 2004; Pignon et al. 2000). Zusammenfassend sind die Überlebensraten jedoch trotz dieser Fortschritte in der Behandlung nicht überzeugend (Jeremic et al. 2000; Vivek et al. 2006). Die nicht zufriedenstellenden Überlebensraten und die Verbesserung der Überlebensraten bei Strahlentherapie durch den Einsatz von Chemotherapeutika lassen eine Strahlenresistenz von HNSCC vermuten. Deshalb ist es notwendig, neue Strategien in der Behandlung von Patienten mit einem fortgeschrittenen HNSCC zu entwickeln.

### Molekularpathologie

In den letzten zehn Jahren wurde im Verständnis der molekularen Mechanismen, welche für die Tumorentstehung und Progression verantwortlich sind, ein signifikanter Fortschritt erzielt. Man fand heraus, dass der EGFR mit der Entstehung und Progression vieler Tumoren wie auch dem HNSCC in Verbindung steht (Dassonville et al. 1993). Eine Überexpression des EGFR tritt in der Pathogenese von HNSCC früh auf (Grandis and Tweardy 1993) und ist mit einem verminderten rückfallfreien Überleben und einem schlechten Gesamtüberleben assoziiert (Ang et al. 2002).

Wichtige dem EGFR nachfolgende Signalwege sind der Pl3K-abhängige Signalweg und der MAPK-Signalweg (Testa and Bellacosa 2001). Der MAPK-Signalweg vermittelt mitogene Signale wie Proliferation und Differentation, der Pl3K-abhängige Signalweg ist hingegen in die zelluläre Migration und Anti-Apoptose involviert (Tamura et al. 1998).

In HNSCC konnte die Aktivierung des PI3K/PKB/Akt-abhängigen Signalwegs beobachtet werden. Klinische Studien zeigten eine Assoziation zwischen der Expression des aktivierten Akt und dem Behandlungserfolg (Bussink et al. 2008). Die Überexpression des EGFR und die Aktivierung des PI3K-abhängigen Signalwegs stellen mögliche Ursachen für die Strahlenresistenz der HNSCC dar.

Auf molekularer Ebene konnte außerdem gezeigt werden, dass der in HNSCC ohnehin schon überexprimierte EGFR durch Bestrahlung zusätzlich aktiviert wird (Dent et al. 2003; Valerie et al. 2007). Daraus resultiert auch eine Aktivierung der dem EGFR nachgeschalteten Signalwege. Man konnte ebenfalls beobachten, dass durch Bestrahlung von humanen Plattenepithelkarzinomzellen eine Proliferation induziert wird, die von einer Aktivierung des EGFR abhängt (Schmidt-Ullrich et al. 1997). Interessanterweise wurde in einem Modell mit Gliom-Zellen gezeigt, dass sublethale Bestrahlung die Migration und die Invasion unterstützt (Wild-Bode et al. 2001). Eine andere Studie kam zu dem Ergebnis, dass die Bestrahlung eines Lewis Lungentumors zum Wachstum früher Lungenmetastasen bei Mäusen führt (Camphausen et al. 2001). Bei Pankreaskarzinomzellen konnte durch Bestrahlung ein erhöhtes invasives Potential beobachtet werden (Qian et al. 2002).

Es kann vermutet werden, dass diese Bestrahlungseffekte ebenfalls durch eine Aktivierung des EGFR und seiner nachfolgenden Signalwege vermittelt werden. Wahrscheinlich spielt v.a. die Aktivierung des PI3K-abhängigen Signalwegs eine Rolle, da dieser die Signale für zelluläre Migration und Anti-Apoptose vermittelt (Tamura et al. 1998). Eine derartige strahlen-induzierte Steigerung der Migrationsund Invasions-Fähigkeit von Tumorzellen könnte ein weiterer Grund für die Strahlenresistenz bei HNSCC sein.

In dieser Arbeit interessierte nun vor allem, ob wie bei den Gliomen (Wild-Bode et al. 2001) eine strahlen-induzierte Migration von Plattenepithelkarzinomzellen des Kopf-Hals-Bereichs beobachtet werden kann (1.). Weiterhin sollte untersucht werden, ob der EGFR und die dem EGFR nachstehenden Signalwege für die strahleninduzierte Migration verantwortlich gemacht werden können (2.).

#### **Eingesetzte experimentelle Methoden**

Zu Beginn der Arbeit wurde zunächst die Proliferationsrate der in der Arbeit verwendeten Zelllinien mit und ohne Bestrahlung (0 und 8 Gy) gemessen. Die Messung der Proliferation erfolgte mit dem MTT-Test. Dieser wurde ausgewählt, weil er nicht nur die Proliferation, sondern auch die Vitalität der Zellen anzeigt (Alley et al. 1988). Dadurch konnte ein zu hoher Zellausfall durch die Bestrahlung ausgeschlossen werden. Zudem ist der MTT-Test sehr genau, schnell durchführbar und gut reproduzierbar.

Mit Hilfe des MTT-Tests sollte der optimale Untersuchungszeitraum für das im Anschluss geplante Wound Healing Assay bestimmt werden. Ziel war der Ausschluss eines Einflusses der Proliferationsrate auf die Ergebnisse des Wound Healing Assays. Da bereits zwischen 24 und 48 h nach Bestrahlung mit 0 und 8 Gy bei allen Zelllinien eine geringe Proliferation nachgewiesen werden konnte, wurden die Dokumentationszeitpunkte für das Wound Healing Assay zeitlich davor gesetzt. Die Entscheidung fiel auf 0 h, 12 h und 24 h nach Bestrahlung mit 0 und 8 Gy.

Die experimentelle Bestrahlung der Plattenepithelkarzinomzellen erfolgte mittels eines Röntgengeräts mit 70 kV. Da beim MTT-Test lediglich der Effekt einer Bestrahlung getestet werden sollte, wurde nur mit einer Strahlendosis (8Gy) bestrahlt.

Das Wound Healing Assay wurde zur Messung der Migration eingesetzt. Migration, Motilität und Invasivität von Zellen sind eng miteinander verbunden. *In vivo* können Migration, Motilität und Invasion nicht unabhängig voneinander auftreten. Die getrennte Betrachtung von Migration und Invasion *in vitro* ist deshalb nur ein Versuch, weil der jeweils andere Parameter nicht komplett unterdrückt werden kann. Zur Untersuchung dieser Verhaltensweisen *in vitro* werden in der Literatur bereits unterschiedliche Assays beschrieben. Die mit am häufigsten verwendeten Assays sind das Boyden-Kammer Assay und das Wound Healing Assay.

Beim Boyden-Kammer Assay müssen in einer Zellsuspension kultivierte Zellen eine Filtermembran passieren (Shaw 2005). Dadurch wird eher das invasive Verhalten der Zellen getestet. Im Gegensatz dazu migrieren die Zellen beim Wound Healing Assay in einen vorgefertigten Spalt, der in einen Zell-Monolayer eingebracht wurde. Diese Vorgehensweise imitiert gewissermaßen die Zellmigration in vivo (Liang et al. 2007). Zum Beispiel führt das Abtragen von Endothel bei Blutgefäßen zu einer Migration von Endothelzellen, um einen Wundverschluss zu erreichen (Haudenschild and Schwartz 1979).

Aus diesen Gründen wurde das Wound Healing Assay dem Boyden-Kammer Assay vorgezogen. Weitere Vorteile des Wound Healing Assays sind die einfache und kostengünstige Durchführung und die gute Reproduzierbarkeit.

Beim Wound Healing Assay wurde mit ansteigenden Strahlendosen (2, 5 und 8 Gy) bestrahlt, um eine Dosisabhängigkeit der strahlen-induzierten Migration nachzuweisen.

Die strahlen-induzierte Migration sowie auch Invasion und Proliferation scheint durch die Aktivierung von Signalwegen vermittelt zu werden. Dabei spielt augenscheinlich v.a. der dem EGFR nachgeschaltete PI3K-abhängige Signalweg eine entscheidende Rolle (Meng et al. 2006; Zheng and Liu 2007). Aus diesem Grund wurde der PI3K-abhängige Signalweg im Hinblick auf die strahlen-induzierte Migration in vorliegender Arbeit näher untersucht. Schon in mehreren Arbeiten konnte nämlich eine strahlen-induzierte Autophosphorylierung und dadurch Aktivierung des EGFR und seiner nachfolgenden Signalwege nachgewiesen werden (Dent et al. 2003; Valerie et al. 2007).

Der ebenfalls dem EGFR nachfolgende MAPK-Signalweg steht über den Cross-Talk zwischen PKB/Akt und Raf mit dem PI3K-abhängigen Signalweg in Verbindung (Zimmermann and Moelling 1999). In einer Studie wurde gezeigt, dass die Wachstumsfaktor-induzierte Erhöhung der Migration und Invasion von menschlichen Plattenepithelkarzinomzellen eine Aktivierung der MAPK erforderte (Crowe and Ohannessian 2004). Deshalb wurde dieser Signalweg ebenfalls genauer betrachtet.

Weiterhin erfolgte eine genauere Untersuchung von mTOR, da es an den PI3Kabhängigen Signalweg direkt angeschlossen ist.

Die Durchführung von Western Blot Analysen mit und ohne Bestrahlung (0 und 8 Gy) sollte einen Bestrahlungseffekt auf die genannten Signalwege nachweisen. Der EGFR und wichtige Signalproteine des PI3K-abhängigen Signalwegs und des MAPK-Signalwegs wurden hinsichtlich ihrer Aktivierung untersucht (s.a. Tab.5). Da die Bestrahlung mit 8 Gy beim Wound Healing Assay den größten Effekt erzielte, fand die Bestrahlung bei den Western Blot Analysen nur mit 8 Gy statt.

Die Überprüfung einer Verbindung zwischen der Migration, dem EGFR und den untersuchten Signalwegen erfolgte durch den Einsatz von EGF als Stimulans des EGFR, AG1478 als Inhibitor des EGFR und verschiedenen Inhibitoren der nachgeschalteten Signalwege (LY294002 als Inhibitor der PI3K, PD98059 als Inhibitor von MEK1 und Rapamycin als Inhibitor von mTOR).

Dadurch sollte die beim Wound Healing Assay auftretende Migration beeinflusst werden, um so einen Zusammenhang zwischen der Migration, dem EGFR und seinen nachgeschalteten Signalwegen herzustellen. Außerdem sollte geprüft werden, ob die strahlen-induziert gesteigerte Migration durch die Inhibitoren effektiv gehemmt werden kann.

Mit Hilfe des MTT-Tests wurde der Einfluss der eingesetzten Wachstumsfaktoren und Inhibitoren auf die Proliferation getestet.

Um die Wirkung der Wachstumsfaktoren und Inhibitoren auch auf molekularer Ebene nachvollziehen zu können, wurden diese auch bei den Western Blot Analysen eingesetzt.

Durch die Western Blot Analysen wurden bei allen drei Zelllinien gute Ergebnisse in Form spezifischer Banden erzielt. Einzige Ausnahme war der Antikörper gegen phospho-Raf, der nur bei der Zelllinie CAL-27 spezifische Banden lieferte. Bei den Zelllinien BHY und HN erschienen auf dem Röntgenfilm zu viele unspezifische Banden. Die Ergebnisse für diese beiden Zelllinien konnten deshalb nicht ausgewertet werden.

#### **Strahlen-induzierte Migration**

In vorliegender Arbeit konnte zum ersten Mal eine strahlen-induzierte Migration humaner Plattenepithelkarzinomzelllinien des Kopf-Hals-Bereichs gezeigt werden. Zudem wurde eine Abhängigkeit der Migrationsstärke von der Strahlendosis nachgewiesen. Je höher die eingesetzte Strahlendosis war, desto stärker migrierten die Zellen. Wie bereits auf S. 60 beschrieben, wurde eine strahlen-induzierte Migration bisher auch schon bei anderen Tumorzelllinien gezeigt.

In der Literatur existieren im Bezug auf die strahlen-induzierte Migration jedoch widersprüchliche Ergebnisse, denn in einer anderen Studie wurde die Migration und die Proliferation von Gliomzellen *in vitro* durch Bestrahlung sogar gehemmt. Die Invasivität wurde hingegen nicht beeinflusst (Gliemroth et al. 2003). Bei einer Studie mit Pankreaskarzinomzellen nahm die Proliferation und die Migration durch Bestrahlung ebenfalls ab, wohingegen das invasive Potential nicht nur unbeeinflusst blieb, sondern sogar zunahm (Qian et al. 2002). Migration und Invasion wurden in diesen Studien jeweils getrennt beobachtet. Diese Trennung ist problematisch, da *in vivo* Migration und Invasion zusammenhängen. Experimentell kann eine Trennung zwar versucht werden, ein gegenseitiger Einfluss dieser Parameter kann aber nie ausgeschlossen werden. Die Bewertung genannter Ergebnisse im Hinblick auf die Migration und Invasion ist deshalb schwierig.

Jedoch wurde in diesen beiden Studien eine strahlen-induzierte Abnahme der Proliferation beobachtet, was in vorliegender Arbeit ebenfalls gezeigt werden konnte.

# Bedeutung des EGFR und der EGFR-abhängigen Signalwege für die strahleninduzierte Migration

Die Aktivierung des PI3K-abhängigen Signalwegs und des MAPK-abhängigen Signalwegs spielen bei der Migration eine Rolle (Crowe and Ohannessian 2004; Meng et al. 2006; Shen et al. 2009; Zheng and Liu 2007). Eine Studie beschreibt Mutationen der PI3K in HNSCC, welche eine erhöhte PI3K-Aktivität zur Folge haben. Diese erhöhte Aktivität führte zu einer Steigerung der Migrations- und Invasions-Fähigkeit der untersuchten Plattenepithelkarzinomzellen (Murugan et al. 2008).

Sowohl der PI3K-abhängige Signalweg als auch der MAPK-Signalweg folgen dem EGFR nach. In Studien wurde eine strahlen-induzierte Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors mit einer Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege beobachtet (Arteaga 2002; Dent et al. 2003). Eine andere Studie beweist den Zusammenhang dieser strahlen-induzierten Autophosphorylierung des EGFR mit einem Anstieg der Proliferation (Schmidt-Ullrich et al. 1997). Es wurde nun vermutet, dass auch die strahlen-induzierte Migration von einer Aktivierung des EGFR mit Aktivierung der ihm nachfolgenden Signalwege abhängt.

In dieser Arbeit konnte ein Anstieg der Migration durch Stimulation der Zellen mit EGF in allen drei Zelllinien aufgezeigt werden. Die Blockade des EGFR durch AG1478 führte zu einer signifikanten Abnahme der strahlen-induzierten Migration. Diese Ergebnisse legen eine Beteiligung des EGFR an der strahlen-induzierten Migration nahe. Zudem wurde eine Beziehung zwischen dem PI3K/Akt Signalweg und der strahlen-induzierten Migration angenommen, da die Inhibition der PI3K durch LY294002 und die Blockade von mTOR durch Rapamycin mit einem signifikanten Abfall der migrierenden Zellen einherging. Derselbe Effekt wurde bei zwei der drei Zellllinien nach der Inhibition von MEK1 durch PD98059 beobachtet, weshalb auch ein Zusammenhang zwischen dem MAPK-Signalweg und der strahlen-induzierten Migration vermutet wurde. LY294002 hatte den größten Einfluss auf die strahlen-induzierte Migration.

Der Effekt von EGF und der eingesetzten Inhibitoren auf die Proliferation der Zellen war analog zu den Effekten auf die Migration. In einer Studie konnte die Hemmung der Proliferation durch LY294002 bei der auch in vorliegender Arbeit verwendeten Zelllinie CAL-27 bereits nachgewiesen werden (Stahl et al. 2004). Auch der antiproliferative Effekt von Rapamycin wurde bei Plattenepithelkarzinomzelllinien des Kopf-Hals-Bereichs bereits beobachtet (Aissat et al. 2008).

In mehreren Arbeiten wurde gezeigt, dass die Inhibition der PI3K durch LY294002 oder Wortmannin die Radiosensitivität von Tumoren verbessert (Gupta et al. 2003; Rosenzweig et al. 1997; Shi et al. 2001). Weiterhin inhibiert eine hohe Expression des PI3K-Gegenspielers und Tumorsuppressorgens PTEN die migratorische Aktivität von Zellen (Leslie et al. 2005). In einer Studie konnte eine Radiosensibilisierung von Gliomzellen mit mutiertem PTEN-Gen durch eine Transfektion des Wildtyp PTEN-Gens erreicht werden (Wick et al. 1999).

Diese Ergebnisse stützen die Annahme, dass die strahlen-induzierte Migration über die Aktivierung des EGFR und seiner nachgeschalteten Signalwege vermittelt wird und dass insbesondere der PI3K-abhängige Signalweg dabei eine wichtige Rolle spielt.

In den durchgeführten Western Blot Analysen fand sich jedoch keine Auswirkung der Bestrahlung auf die untersuchten Signalproteine. Nach der Bestrahlung konnte keine Aufregulation von phospho-EGFR beobachtet werden, wie es in früheren Studien beschrieben wurde (Dent et al. 2003; Valerie et al. 2007). Allerdings ist zu beachten, dass der EGFR bei HNSCC überexprimiert ist. Zudem sind der EGFR und die Proteine der ihm nachfolgenden Signalwege (Akt, Raf, MEK1/2, MAPK) bei den untersuchten Zelllinien bereits ohne Bestrahlung konstitutiv aktiviert. Eine zusätzliche Aktivierung durch Bestrahlung wird deshalb vielleicht nicht sichtbar. Die Methode der Western Blot Analyse ist für diese Fragestellung vermutlich zu ungenau.

Die konstitutive Aktivierung von Akt in HNSCC konnte bereits in einer anderen Studie bestätigt werden. In dieser Studie wurde außerdem eine starke und unabhängige Beziehung zwischen der Expression des aktivierten Akt und dem Behandlungserfolg festgestellt (Bussink et al. 2008).

Eine Stimulation des EGFR mit EGF führte erwartungsgemäß zu einer Aufregulation des phospho-EGFR und der nachgeschalteten untersuchten Signalproteine. Hingegen resultierte eine Inhibition des EGFR mit AG1478 in einer Abregulation des phospho-EGFR und der nachgeschalteten Signalproteine.

Die Blockade der PI3K durch LY294002 hatte wie zu erwarten eine 24 h andauernde Abregulation von phospho-Akt zur Folge. 0 h nach der Blockade war kein Effekt auf phospho-Raf zu sehen, 24 h danach war phospho-Raf jedoch abreguliert.

Auf die Inhibition von MEK1 durch PD98059 folgte erwartungsgemäß eine Abregulation von phospho-MAPK und phospho-MEK1/2 nach 0h. Nach 24 h konnte interessanterweise wieder eine Aufregulation von phospho-MEK1/2 beobachtet werden.

Ebenfalls fiel auf, dass phospho-MAPK und phospho-MEK1/2 auch 0 h nach Blockade mit LY294002 abreguliert wurden. Es wurde in einer Studie bereits gezeigt, dass PDK1 MEK1/2 aktiviert (Sato et al. 2004), was in einer Aktivierung von ERK1/2 resultiert. So lässt sich der Abfall von phospho-MEK1/2 und phospho-MAPK durch die Inhibition des vorgeschalteten Regulators PI3K erklären. Nach 24 h waren phospho-MAPK und phospho-MEK1/2 wieder aufreguliert und mit dem Kontrollwert vergleichbar.

Der bisher bekannte Cross-Talk zwischen Akt und Raf (Zimmermann and Moelling 1999) kann durch diese Ergebnisse bestätigt werden. 24 h nach der Behandlung mit LY294002 wurde phospho-Raf abreguliert, was für einen Wegfall der Phosphorylierung von Raf durch Akt spricht. Die Wieder-Aufregulation von phospho-MAPK und phospho-MEK1/2 24 h nach Blockade mit LY294002 passt demnach ebenfalls ins Bild, da Raf nicht mehr durch die Phosphorylierung durch Akt inhibiert wird.

Es wurden nun weitere Western Blot Analysen angefertigt, um diese zum Teil sehr ungewöhnlichen Ergebnisse näher zu untersuchen. Die Experimente wurden versuchsweise nur mit der Zelllinie CAL-27 durchgeführt. Zusätzlich zu dem bisher verwendeten MEK1-Inhibitor PD98059 wurde nun auch der MEK1/2-Inhibitor U0126 eingesetzt.

Die Blockade von MEK1/2 durch U0126 führte zunächst wie die Blockade von MEK1 durch PD zu einer Abregulation der phospho-MEK1/2. Nach 24 h ließ sich unter Anwesenheit sowohl bei PD98059 als auch bei U0126 eine Aufregulation der phospho-MEK1/2 feststellen.

0 h nach Blockade von MEK1 durch PD98059 und von MEK1/2 durch U0126 war phospho-MAPK erwartungsgemäß komplett abreguliert. 24 h später jedoch konnte bei PD98059 eine teilweise Aufregulation beobachtet werden. Bei U0126 war das Signal der phospho-MAPK hingegen immer noch komplett unterdrückt.

Phospho-Akt veränderte sich unter dem Einfluss von U0126 und PD98059 erwartungsgemäß zunächst nicht. Überraschend konnte man 24 h nach der Behandlung eine Aufregulation von phospho-Akt beobachten. Diese weiteren Ergebnisse sind in Tab. 33 zusammenfassend dargestellt.

	PD98059	U0126
Pospho-Akt	Nach 0h ↔	Nach 0h ↔
	Nach 24h ↑	Nach 24h ↑
Phospho-MAPK	Nach 0h ↓↓	<b>\</b>
	Nach 24h ↓	
Phospho-MEK1/2	Nach 0h ↓	Nach 0h ↓
	Nach 24h ↑	Nach 24h ↑

Tab. 33: Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse der zusätzlich mit U0126 durchgeführten Western Blots. ↑ = im Vergleich zur Kontrolle aufreguliert, ↔ = mit Kontrolle vergleichbar, ↓ = im Vergleich zur Kontrolle abreguliert, ↓↓ = im Vergleich zu Kontrolle stark abreguliert

Abb. 22 zeigt die Ergebnisse der Western Blot Analysen bei phospho-MAPK.

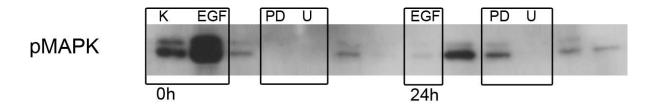


Abb. 22: Western Blot-Ergebnisse der Zelllinie CAL bei pMAPK 0 und 24 h nach Behandlung mit PD98059 und U0126. K = Kontrolle, PD = PD98059, U = U0126

Zusammenfassend werfen die Ergebnisse der Western Blot Analysen die Frage nach einem bisher unbekannten positiven Feedback-Mechanismus zwischen dem PI3K-abhängigen Signalweg und dem MAPK-Signalweg auf. Auf der Seite des PI3K-abhängigen Signalwegs kann PDK1 als Modulator genannt werden, da bekannt ist, dass PDK1 MEK1/2 aktiviert (Sato et al. 2004). Dieser Zusammenhang wird durch die oben bereits beschriebene Abregulation von phospho-MEK1/2 und phospho-MAPK bei Blockade der PI3K mit LY294002 bestärkt. Außerdem werden phospho-MAPK und phospho-MEK1/2 24 h nach Blockade mit PD98059 aufreguliert, was ebenfalls für eine Aktivierung von MEK1/2 durch PDK1 spricht. Diese Aktivierung greift wahrscheinlich unterhalb von MEK1 ein, da bei unseren Ergebnissen das Signal von phospho-MAPK 24 h nach Blockade mit PD98059 aufreguliert wird, 24 h nach Blockade mit U0126 jedoch unterdrückt bleibt.

Es muss ebenfalls ein positives Feedback in die andere Richtung existieren, da phospho-Akt 24 h nach Blockade mit PD98059 und U0126 aufreguliert wird.

In Abb. 23 sind die Schlussfolgerungen aus diesen Ergebnissen in die untersuchten Signalwege eingezeichnet.

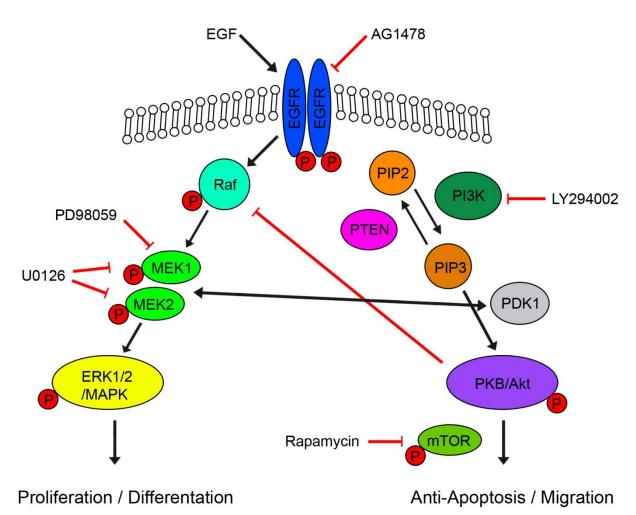


Abb. 23: Schematische Darstellung des postulierten positiven Feedback-Mechanismus zwischen dem PI3Kabhängigen Signalweg und dem MAPK-Signalweg

Dieser postulierte positive Feedback-Mechanismus soll in weiteren Studien bestätigt werden.

#### Zukünftige therapeutische Ansätze

Momentan beinhaltet die Therapie der Patienten mit HNSCC im fortgeschrittenen Stadium III und IV die primäre Radiotherapie, evtl. in Kombination mit einer Chemotherapie (Pignon et al. 2000). Aktuell hat die geänderte Fraktionierung der Radiotherapie und die Kombination mit einer Chemotherapie Vorteile für die Patienten in Bezug auf Überlebensraten, Organ- und Funktionserhalt (Bernier and Bentzen 2003).

In dieser Arbeit wurde bewiesen, dass Bestrahlung bei Plattenepithelkarzinomzellen des Kopf-Hals-Bereichs eine Migration induziert. Weiterhin konnte durch die Inhibitionsversuche beim Wound-Healing Assay gezeigt werden, dass der EGFR und die ihm nachfolgenden Signalwege (PI3K/Akt/mTOR und Raf/MEK1/2/ERK1/2) in die strahlen-induzierte Migration involviert sind. Diese Daten implizieren, dass eine Änderung Patienten mit der Therapie von einem fortgeschrittenen Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs nützlich wäre. Der EGFR und seine nachgeschalteten Signalwege könnten ein zukünftiges Therapieziel bei der Behandlung von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs in Kombination mit Strahlentherapie darstellen.

Die Inhibition des EGFR zur Behandlung von HNSCC ist bereits ein beliebtes Thema der momentanen Forschung (Choong and Cohen 2006). Bei metastasierten oder rezidivierten HNSCC konnten durch den kombinierten Einsatz des monoklonalen Antikörpers Cetuximab mit einer Chemotherapie im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie höhere Überlebensraten erreicht werden (Vermorken et al. 2008).

Mehrere Phase I- und Phase II-Studien mit EGFR-Antagonisten in Kombination mit einer Strahlentherapie erbrachten gute Ergebnisse (Thariat et al. 2007). Es wurde auch bereits eine Phase III-Studie durchgeführt, bei der die Patienten eine Kombination von Strahlentherapie mit einem gegen den EGFR gerichteten Antikörper erhielten. Dabei zeigte sich ein Benefit bei 10 – 15 % der Patienten (Bonner et al. 2006).

Auch bei der Behandlung anderer Tumorentitäten spielt die Inhibition des EGFR eine große Rolle. Die Tyrosinkinaseinhibitoren gegen den EGFR Erlotinib und Gefitinib und der gegen den EGFR gerichtete monoklonale Antikörper Cetuximab sind die derzeit wichtigsten EGFR-Inhibitoren (Harandi et al. 2009). Es liegen eine große Anzahl von klinischen Studienergebnissen für EGFR-Antagonisten in Monotherapie oder in Kombination mit Chemotherapie vor:

Erlotinib verlängerte in einer Phase III-Studie nach Versagen einer First- oder Second-line Chemotherapie bei fortgeschrittenem Non-small cell lung cancer (NSCLC) das Überleben (Herbst et al. 2005; Shepherd et al. 2005). Eine andere Phase III-Studie hingegen verglich die Kombination einer Chemotherapie und Chemotherapie bei vorher **Erlotinib** mit der alleinigen unbehandelten fortgeschrittenen NSCLC. Hier zeigte sich kein Vorteil bei den zusätzlich mit Erlotinib behandelten Patienten (Herbst et al. 2005). Der Einsatz von Gefitinib erzielte bei Patienten mit einem fortgeschrittenem NSCLC in mehreren Phase III-Studien keine Erhöhung der Überlebensraten. Die Ansprechrate und das progressionsfreie Überleben waren jedoch zumindest verbessert (Giaccone et al. 2004; Herbst et al. 2004; Thatcher et al. 2005). In einer Phase III-Studie konnte außerdem durch die Kombination von Cetuximab mit einer Chemotherapie die Überlebensdauer von Patienten mit einem fortgeschrittenen NSCLC im Gegensatz zu einer alleinigen Chemotherapie verlängert werden (Pirker et al. 2009).

Auch bei der Behandlung von metastasierten Kolonkarzinomen wurden bereits Phase III-Studien mit Cetuximab durchgeführt. Eine Studie wies bei austherapierten metastasierten Kolonkarzinomen einen Überlebensvorteil durch den Einsatz von Cetuximab nach (Jonker et al. 2007). Eine andere Studie verglich den Einsatz von Chemotherapie alleine und die Kombination mit Cetuximab. Hier war nur ein Vorteil in Bezug auf das progressionsfreie Überleben, die Ansprechrate und die Lebensqualität eruierbar (Sobrero et al. 2008).

Experimentelle Studien zeigen bei anderen Tumorentitäten auch gute Ergebnisse für eine Kombination von EGFR-Antagonisten mit Strahlentherapie:

Gefitinib konnte in einem experimentellen Modell bei verschiedenen Tumorzelllinien die Effektivität einer Bestrahlung steigern (Bianco et al. 2002). Weiterhin erhöhte der gegen den EGFR gerichtete monoklonale Antikörper Nimotuzumab bei NSCLC-Zelllinien die Radiosensitivität (Akashi et al. 2008). Bei Nacktmaus-Modellen mit Gliomen und Ependymomen konnte außerdem durch den Einsatz des Tyrosinkinaseinhibitors Gefitinib gegen den EGFR eine Radiosensitivierung und Apoptose-Induktion erreicht werden (Geoerger et al. 2008).

Es wurde auch bereits eine Phase I/II-Studie durchgeführt, die den zusätzlichen Einsatz von Cetuximab bei der neoadjuvanten Radiochemotherapie von fortgeschrittenen Rektumkarzinomen testete (Machiels et al. 2007).

Eine Beeinflussung des dem EGFR nachgeschalteten PI3K-abhängigen Signalwegs scheint in Kombination mit der konventionellen Radiotherapie ebenfalls ein aussichtsreicher therapeutischer Ansatz zu sein (Matta and Ralhan 2009).

In einem Nacktmaus-Modell mit einer Blasenkarzinomzelllinie wurde gezeigt, dass die Blockade der PI3K durch LY294002 in Kombination mit Bestrahlung ein signifikant besseres "Outcome" mit sich bringt (Gupta et al. 2003). Auch in einem weiteren Nacktmaus-Modell mit Schilddrüsenkarzinomzellen konnte eine Hemmung der Tumorprogression und der Metastasierung durch LY294002 beobachtet werden (Furuya et al. 2007).

Eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigt anhand eines Maus-Modells mit Plattenepithelkarzinomzelllinien, dass auch der Einsatz des mTOR-Inhibitors Rapamycin einen radiosensitivierenden Effekt hat (Ekshyvan et al. 2009).

### 5. Zusammenfassung

Ziel vorliegender Arbeit war der Nachweis, dass durch Bestrahlung die Migration von Plattenepithelkarzinomzellen des Kopf-Hals-Bereichs (HNSCC) induziert wird. Weiterhin sollte geklärt werden, ob der EGFR, welcher in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs oft überexprimiert ist, und die EGFR-abhängigen Signalwege (Raf/MEK/ERK, PKB/Akt/mTOR) für die strahlen-induzierte Migration verantwortlich gemacht werden können.

Für die Versuche wurden drei Plattenepithelkarzinomzelllinien benutzt: BHY, CAL-27 und HN. Die Proliferation der Tumorzellen wurde durch einen MTT-Test geprüft, die Untersuchung der Migration erfolgte mit einem Wound-Healing Assay. Zur Überprüfung der biochemischen Aktivierung des EGFR und seiner nachfolgenden Signalwege fanden Western Blot Analysen statt. Die Zellen wurden mit ansteigenden Dosen (2, 5 und 8 Gy) bestrahlt. Zusätzlich wurden EGF, der EGFR-Antagonist AG1478 und Inhibitoren der nachfolgenden Signalwege LY294002 (PI3K), PD98059 (MEK1) und Rapamycin (mTOR) hinzugefügt.

Aufsteigende Strahlendosen induzierten einen dosisabhängigen Anstieg der migrierenden Zellen und einen Abfall der Zellproliferation. Die Inhibition des EGFR oder der nachfolgenden Signalwege reduzierte die Migration signifikant, wohingegen die Stimulation der Tumorzellen mit EGF einen signifikanten Anstieg der Migration verursachte. Bei den Western Blot Analysen wurde kein Bestrahlungseffekt auf den EGFR oder die ihm nachfolgenden Signalwege beobachtet.

Die Zusammenschau der biologischen Ergebnisse legt nahe, dass der EGFR und seine nachfolgenden Signalwege in die strahlen-induzierte Migration von Plattenepithelkarzinomzellen des Kopf-Hals-Bereichs involviert sind. Zwar sind die biologischen mit den biochemischen Ergebnissen in vorliegender Arbeit nicht in Einklang zu bringen, es sollte jedoch angemerkt werden, dass der EGFR bei HNSCC stark überexprimiert ist und eine weitere Aktivierung mit der verwendeten Methode eventuell nicht nachgewiesen werden kann.

Der EGFR und die Proteine der ihm nachfolgenden Signalwege könnten auf Basis dieser Ergebnisse in Kombination mit einer Strahlentherapie zukünftig Ziel für die Therapie der Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs sein.

# 6. Anhang

## 6.1 Abbildungsverzeichnis

al. 2006)	
Abb. 2: Schematische Darstellung der verschiedenen Signalwege und der in der Arbeit verwendeten Inhibitoren	
Abb. 3: Photoshop-Screenshot als Beispiel für die Auszählung des Wound Heali	
Abb. 4: Demonstration der Proilferation der unbestrahlten und bestrahlten Kontro	
Abb. 5: Ergebnisse der Beeinflussung des EGFR beim MTT-Test anhand der Ze CAL-27. Die bei jedem Versuch mit laufenden Kontrollen wurden gleich 100% und die anderen Werte in Abhängigkeit dazu gesetzt. Ko = Kontrolle, AG = AG1478.	nd
Abb. 6: Vergleich der mit EGF und AG1478 behandelten Zellen mit und ohne Bestrahlung anhand der Zelllinie CAL-27. Die bei jedem Versuch mit laufenden Kontrollen wurden gleich 100% und die anderen Werte in Abhängigkeit dazu gesto = Kontrolle, AG = AG1478	
Abb. 7: Ergebnisse der Blockade der PI3K durch LY294002 beim MTT-Test anh der Zelllinie CAL-27. Die bei jedem Versuch mit laufenden Kontrollen wurden gle 100% und die anderen Werte in Abhängigkeit dazu gesetzt. Ko = Kontrolle, LY = LY294002	eich =
Abb. 8: Vergleich der mit LY294002 behandelten Zellen mit und ohne Bestrahlur anhand der Zelllinie CAL-27. Die bei jedem Versuch mit laufenden Kontrollen wurdelich 100% und die anderen Werte in Abhängigkeit dazu gesetzt. Ko = Kontrolle LY294002	urden e, LY

Abb. 9: Ergebnisse der Blockade von MEK1 durch PD98059 beim MTT-Test anhand der Zelllinie CAL-27. Die bei jedem Versuch mit laufenden Kontrollen wurden gleich 100% und die anderen Werte in Abhängigkeit dazu gesetzt. Ko = Kontrolle, PD =
PD98059
Abb. 10: Vergleich der mit PD98059 behandelten Zellen mit und ohne Bestrahlung anhand der Zelllinie CAL-27. Die bei jedem Versuch mit laufenden Kontrollen wurden gleich 100% und die anderen Werte in Abhängigkeit dazu gesetzt. Ko = Kontrolle, PD = PD98059
Abb. 11: Ergebnisse der Blockade von mTOR durch Rapamycin beim MTT-Test anhand der Zelllinie CAL-27. Die bei jedem Versuch mit laufenden Kontrollen wurden gleich 100% und die anderen Werte in Abhängigkeit dazu gesetzt. Ko = Kontrolle, Rapa = Rapamycin
Abb. 12: Vergleich der mit Rapamycin behandelten Zellen mit und ohne Bestrahlung anhand der Zelllinie CAL-27. Die bei jedem Versuch mit laufenden Kontrollen wurden gleich 100% und die anderen Werte in Abhängigkeit dazu gesetzt. Ko = Kontrolle, Rapa = Rapamycin
Abb. 13: Dosis- und zeitabhängige strahlen-induziert erhöhte Migration der Zelllinien BHY, CAL-27 und HN41
Abb. 14: Strahlen-induziert erhöhte Migration bei 0 und 8 Gy anhand von Beispielaufnahmen der Zelllinie BHY42
Abb. 15: Abnahme des strahlen-induziert erhöhten Migrationsvermögens nach Behandlung mit EGF und AG1478 (24 h nach Bestrahlung)
Abb. 16: Abnahme des Migrationsvermögens aller 3 Zelllinien durch Blockade der PI3K nach 24 h. A = Zelllinie BHY, B = Zelllinie CAL-27, C = Zelllinie HN
Abb. 17: Abnahme des Migrationsvermögens bei den Zelllinien CAL-27 und HN durch Blockade von MEK1 nach 24 h. Keine Abnahme bei der Zelllinie BHY. A = Zelllinie BHY, B = Zelllinie CAL-27, C = Zelllinie HN

Abb. 18: Abnahme des Migrationsvermögens aller 3 Zelllinien durch Blockade von
mTOR nach 24 h. A = Zelllinie BHY, B = Zelllinie CAL-27, C = Zelllinie HN 51
Abb. 19: Western Blot-Ergebnisse der Zelllinie CAL-27 bei phospho-EGFR 0 und 24
h nach Bestrahlung mit 0 Gy und Behandlung mit EGF und AG1478. K = Kontrolle,
AG = AG147855
Abb. 20: Western Blot-Ergebnisse der Zelllinie CAL-27 bei phospho-Akt und
phospho-Raf 0 und 24 h nach Bestrahlung mit 0 Gy und Behandlung mit EGF und
LY294002. K = Kontrolle, LY = LY294002
Abb. 21: Western Blot-Ergebnisse der Zelllinie HN bei phospho-MEK1/2 und
phospho-MAPK 0 und 24 h nach Bestrahlung mit 0 Gy und Behandlung mit EGF,
PD98059 und LY294002 (. ) K = Kontrolle, LY = LY294002, PD = PD98059 57
Abb. 22: Western Blot-Ergebnisse der Zelllinie CAL bei pMAPK 0 und 24 h nach
Behandlung mit PD98059 und U0126. K = Kontrolle, PD = PD98059, U = U0126 69
Abb. 23: Schematische Darstellung des postulierten positiven Feedback-
Mechanismus zwischen dem PI3K-abhängigen Signalweg und dem MAPK-
Signalweg70

## 6.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: TNM-Klassifikation der HNSCC (Sobin and Wittekind 2002)
Tab. 2: Stadieneinteilung der Karzinome im Kopf-Hals-Bereich (Sobin and Wittekind 2002)
Tab. 3: Verwendete Zelllinien, Quellen: BHY und HN (Kawamata et al. 1997), CAL-27 (Gioanni et al. 1988)
Tab. 4: Verwendete Wachstumsfaktoren und Inhibitoren14
Tab. 5: Verwendete Antikörper15
Tab. 6: Verwendete Kits
Tab. 7: Verwendete Reagenzien
Tab. 8: Verwendete Zellkulturmedien, Medienzusätze und sonstige für die Zellkultur benötigte Reagenzien
Tab. 9: Verwendete Computer-Programme
Tab. 10: Verwendete Geräte
Tab 11: Verwendete Verbrauchsmaterialien21
Tab. 12: Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele
Tab. 13: Errechnete p-Werte für den Vergleich der bestrahlten und unbestrahlten Kontrollen beim MTT-Test
1. C. T. C.
Tab. 14: Errechnete p-Werte für den Einfluss derStimulation und Inhibition des EGFR
beim MTT-Test

Tab. 15: Errechnete p-Werte für den Einfluss der Blockade der PI3K beim MTT-Test
Tab. 16: Errechnete p-Werte für den Einfluss der Blockade von MEK1 beim MTT- Test
Tab. 17: Errechnete p-Werte für den Einfluss der Blockade von mTOR beim MTT- Test
Tab. 18: Errechnete p-Werte für den Effekt der Bestrahlung auf die Kontrollen 40
Tab. 19: Errechnete p-Werte für den Effekt von EGF und AG1478 auf die nicht bestrahlten Zellen43
Tab. 20: Errechnete p-Werte für den Effekt von EGF und AG1478 auf die bestrahlten Zellen44
Tab. 21: Errechnete p-Werte für den Zusammenhang zwischen der Dosis und der Migration bei den bestrahlten mit EGF und AG1478 behandelten Zellen
Tab. 22: Errechnete p-Werte für den Effekt von LY294002 auf die Kontrollen 45
Tab. 23: Errechnete p-Werte für den Effekt von LY294002 auf die bestrahlten Zellen 45
Tab. 24: Errechnete p-Werte für den Zusammenhang zwischen der Strahlendosis und der Migration bei den mit LY294002 behandelten Zellen
Tab. 25: Errechnete p-Werte für den Effekt von PD98059 auf die Kontrollen 47
Tab. 26: Errechnete p-Werte für den Effekt von PD98059 auf die bestrahlten Zellen
Tab. 27: Errechnete p-Werte für den Zusammenhang zwischen der Strahlendosis und der Migration bei den mit PD98059 behandelten Zellen

Tab. 28: Errechnete p-Werte für den Effekt von Rapamycin auf die Kontrollen 50
Tab. 29: Errechnete p-Werte für den Effekt von Rapamycin auf die bestrahlten Zellen
50
Tab. 27: Errechnete p-Werte für den Zusammenhang zwischen der Strahlendosis
und der Migration bei den mit Rapamycin behandelten Zellen52
Tab. 28: Proteinexpression bei den Zelllinien BHY, CAL-27 und HN unter Standard
<ul> <li>(ø) - und Strahlenbedingungen (★). + = leichte konstitutive Aktivierung, ++ = starke</li> <li>konstitutive Aktivierung, - = nicht auswertbar</li></ul>
Tab. 29: Zusammenfassung der Ergebnisse der Western Blots bei Beeinflussung des
EGFR. ↑ = im Vergleich zur Kontrolle aufreguliert, ↔ = mit Kontrolle vergleichbar, ↓ = im Vergleich zur Kontrolle abreguliert
Tab. 30: Zusammenfassung der Ergebnisse der Western Blots bei phospho-Akt und phospho-Raf und der Behandlung mit LY294002. ↑ = im Vergleich zur Kontrolle
aufreguliert, ↔ = mit Kontrolle vergleichbar, ↓ = im Vergleich zur Kontrolle abreguliert55
Tab. 31: Zusammenfassung der Ergebnisse der Western Blots bei phospho-MAPK
und phospho-MEK1/2 und Behandlung mit PD98059 und LY294002. ↑ = im Vergleich zur Kontrolle aufreguliert, ↔ = mit Kontrolle vergleichbar, ↓ = im Vergleich zur
Kontrolle abreguliert57
Tab. 32: Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse der Western Blots. ↑ = im
Vergleich zur Kontrolle aufreguliert, ↔ = mit Kontrolle vergleichbar, ↓ = im Vergleich
zur Kontrolle abreguliert58
Tab. 33: Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse der zusätzlich mit U0126
durchgeführten Western Blots. ↑ = im Vergleich zur Kontrolle aufreguliert, ↔ = mit
Kontrolle vergleichbar, ↓ = im Vergleich zur Kontrolle abreguliert, ↓↓ = im Vergleich zu
Kontrolle stark abreguliert68

#### 6.3 Literaturverzeichnis

- Aissat,N., C.Le Tourneau, A.Ghoul, M.Serova, I.Bieche, F.Lokiec, E.Raymond, and S.Faivre. 2008. "Antiproliferative effects of rapamycin as a single agent and in combination with carboplatin and paclitaxel in head and neck cancer cell lines." *Cancer Chemother Pharmacol.* 62:305-313.
- Akashi,Y., I.Okamoto, T.Iwasa, T.Yoshida, M.Suzuki, E.Hatashita, Y.Yamada, T.Satoh, M.Fukuoka, K.Ono, and K.Nakagawa. 2008. "Enhancement of the antitumor activity of ionising radiation by nimotuzumab, a humanised monoclonal antibody to the epidermal growth factor receptor, in non-small cell lung cancer cell lines of differing epidermal growth factor receptor status." *Br J Cancer.* 98:749-755.
- Alessi, D.R., A.Cuenda, P.Cohen, D.T.Dudley, and A.R.Saltiel. 1995. "PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo." *J Biol Chem.* 270:27489-27494.
- Alley,M.C., D.A.Scudiero, A.Monks, M.L.Hursey, M.J.Czerwinski, D.L.Fine, B.J.Abbott, J.G.Mayo, R.H.Shoemaker, and M.R.Boyd. 1988. "Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay." *Cancer Res.* 48:589-601.
- Ang,K.K., B.A.Berkey, X.Tu, H.Z.Zhang, R.Katz, E.H.Hammond, K.K.Fu, and L.Milas. 2002. "Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma." *Cancer Res.* 62:7350-7356.
- Arteaga, C.L. 2002. "Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: More than just expression?" *Oncologist*. 7:31-39.
- Bei,R., A.Budillon, L.Masuelli, V.Cereda, D.Vitolo, E.Di Gennaro, V.Ripavecchia, C.Palumbo, F.Ionna, S.Losito, A.Modesti, M.H.Kraus, and R.Muraro. 2004. "Frequent overexpression of multiple ErbB receptors by head and neck squamous cell carcinoma contrasts with rare antibody immunity in patients." *J Pathol.* 204:317-325.
- Bernier, J. and S.M.Bentzen. 2003. "Altered fractionation and combined radio-chemotherapy approaches: pioneering new opportunities in head and neck oncology." *Eur J Cancer*. 39:560-571.
- Bernier, J., C.Domenge, M.Ozsahin, K.Matuszewska, J.L.Lefèbvre, R.H.Greiner, J.Giralt, P.Maignon, F.Rolland, M.Bolla, F.Cognetti, J.Bourhis, A.Kirkpatrick, and M.van Glabbeke. 2004. "Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer." *N Eng J Med.* 350:1945-1952.

- Bianco, C., G.Tortora, R.Bianco, R.Caputo, B.M.Veneziani, R.Caputo, V.Damiano, T.Troiani, G.Fontanini, D.Raben, S.Pepe, A.R.Bianco, and F.Ciardiello. 2002. "Enhancement of antitumor activity of ionizing radiation by combined treatment with the selective epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa)." *Clin Cancer Res.* 8:3250-3258.
- Böcker, W., H.Denk, and P.U.Heitz. 2008. "Pathologie." *Urban & Fischer Verlag, München.* 4. Auflage: 203-204.
- Bonner, J.A., P.M.Harari, J.Giralt, N.Azarnia, D.M.Shin, R.B.Cohen, C.U.Jones, R.Sur, D.Raben, J.Jassem, R.Ove, M.S.Kies, J.Baselga, H.Youssoufian, N.Amellal, E.K.Rowinsky, and K.K.Ang. 2006. "Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck." *N Eng J Med.* 354:567-578.
- Bradford,M. 1976. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem.* 72:248-254.
- Bussink, J., A.J. van der Kogel, and J.H.A.M. Kaanders. 2008. "Activation of the PI3-K/AKT pathway and implications for radioresistance mechanisms in head and neck cancer." *Lancet Oncol.* 3:288-296.
- Camphausen, K., M.A.Moses, W.D.Beecken, M.K.Khan, J.Folkman, and M.S.O´Reilly. 2001. "Radiation therapy to a primary tumor accelerates metastatic growth in mice." *Cancer Res.* 61:2207-2211.
- Choong, N.W. and E.E.W.Cohen. 2006. "Epidermal growth factor receptor directed therapy in head and neck cancer." *Crit Rev Oncol Hematol.* 57:25-43.
- Cobb, M.H. 1999. "MAP kinase pathways." Prog Biophys Mol Biol. 71:479-500.
- Crowe, D.L. and A.Ohannessian. 2004. "Recruitment of focal adhesion kinase and paxillin to beta1 integrin promotes cancer cell migration via mitogen activated protein kinase activation." *BMC Cancer*. 4:18.
- Dassonville, O., J.L. Formento, M. Francoual, A. Ramaioli, J. Santini, M. Schneider, F. Demard, and G. Milano. 1993. "Expression of epidermal growth factor receptor and survival in upper aerodigestive tract cancer." *J Clin Oncol.* 11:1873-1878.
- Dent,P., A.Yacoub, J.Contessa, G.Amorino, K.Valerie, M.P.Hagan, S.Grant, and R.Schmidt-Ullrich. 2003. "Stress and radiation-induced activation of multiple intracellular signaling pathways." *Radiat Res.* 159:283-300.
- Ekshyvan,O., Y.Rong, X.Rong, K.M.Pattani, F.Abreo, G.Caldito, J.K.Chang, F.Ampil, J.Glass, and C.A.Nathan. 2009. "Comparison of radiosensitizing effects of the mammalian target of rapamycin inhibitor CCI-779 to cisplatin in experimental models of head and neck squamous cell carcinoma." *Mol Cancer Ther.* 8:2255-2265.

- Fortin, A., C.Couture, R.Doucet, M.Albert, J.Allard, and B.Tetu. 2001. "Does histologic grade have a role in the management of head and neck cancers?" *J Clin Oncol.* 19:4107-4116.
- Furuya,F., C.Lu, M.C.Willingham, and S.Y.Cheng. 2007. "Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase delays tumor progression and blocks metastatic spread in a mouse model of thyroid cancer." *Carcinogenesis*. 28:2451-2458.
- Geoerger, B., N. Gaspar, P. Opolon, J. Morizet, P. Devanz, Y. Lecluse, A. Valent, L. Lacroix, J. Grill, and G. Vassal. 2008. "EGFR tyrosine kinase inhibition radiosensitizes and induces apoptosis in malignant glioma and childhood ependymoma xenografts." *Int J Cancer*. 123:209-216.
- Giaccone, G., R.S.Herbst, C.Manegold, G.Scagliotti, R.Rosell, V.Miller, R.B.Natale, J.H.Schiller, J.von Pawel, A.Pluzanska, U.Gatzemeier, J.Grous, J.S.Ochs, S.D.Averbuch, M.K.Wolf, P.Rennie, A.Fandi, and D.H.Johnson. 2004. "Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 1." *J Clin Oncol.* 22:777-784.
- Gioanni, J., J.L.Fischel, J.C.Lambert, F.Demard, C.Mazeau, E.Zanghellini, F.Ettore, P.Formento, P.Chauvel, C.M.Lalanne, and A.Courdi. 1988. "Two new human tumor cell lines derived from squamous cell carcinomas of the tongue: establishment, characterization and response to cytotoxic treatment." *Eur J Cancer Clin Oncol.* 24:1445-1455.
- Gliemroth, J., T.Feyerabend, C.Gerlach, H.Arnold, and A.J.Terzis. 2003.

  "Proliferation, migration, and invasion of human glioma cells exposed to fractionated radiotherapy in vitro." *Neurosurg Rev.* 26:198-205.
- Grandis, J.R. and D.J.Tweardy. 1993. "Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer." *Cancer Res.* 53:3579-3584.
- Grandis, J.R., D.J. Tweardy, and M.F. Melhem. 1998. "Asynchronous modulation of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor protein expression in progression of premalignant lesions to head and neck squamous cell carcinoma." *Clin Cancer Res.* 4:13-20.
- Gupta, A.K., G.J. Cerniglia, R.Mick, M.S. Ahmed, V.J. Bakanauskas, R.J. Muschel, and W.G. McKenna. 2003. "Radiation sensitization of human cancer cells in vivo by inhibiting the activity of PI3k using LY294002." *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 56:846-853.
- Hanawa, M., S.Suzuki, T.Dobashi, T.Yamane, K.Kono, N.Enomoto, and A.Ooi. 2006. "EGFR protein overexpression and gene amplification in squamous cell carcinomas of the esophagus." *Int J Cancer*. 118:1173-1180.
- Harandi, A., A.S.Zaidi, A.M.Stocker, and D.A.Laber. 2009. "Clinical efficacy and toxicity of anti-EGFR therapy in common cancers." *J Oncol.* 2009:567486.
- Haudenschild, C.C. and S.M. Schwartz. 1979. "Endothelial regeneration. II. Restitution of endothelial continuity." *Lab Invest.* 41:407-418.

- Herbst,R.S., G.Giaccone, J.H.Schiller, R.B.Natale, V.Miller, C.Manegold, G.Scagliotti, R.Rosell, I.Oliff, J.A.Reeves, M.K.Wolf, A.D.Krebs, S.D.Averbuch, J.S.Ochs, J.Grous, A.Fandi, and D.H.Johnson. 2004. "Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 2." *J Clin Oncol.* 22:785-794.
- Herbst,R.S., D.Prager, R.Hermann, L.Fehrenbacher, B.E.Johnson, A.Sandler, M.G.Kris, H.T.Tran, P.Klein, X.Li, D.Ramies, D.H.Johnson, V.A.Miller, and TRIBUTE Investigator Group. 2005. "TRIBUTE: a phase III trial of erlotinib hydrochloride (OSI-774) combined with carboplatin and paclitaxel chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer." *J Clin Oncol.* 23:5892-5899.
- Hunter, K.D., E.K. Parkinson, and P.R. Harrison. 2005. "Profiling early head and neck cancer." *Nat Rev Cancer*. 5:127-135.
- Jeremic,B., Y.Shibamoto, B.Milicic, N.Nikolic, A.Dagovic, J.Aleksandrovic, Z.Vaskovic, and L.Tadic. 2000. "Hyperfractionated radiation therapy with or without concurrent low-dose daily cisplatin in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: a prospective randomized trial." *J Clin Oncol.* 18:1458-1464.
- Jonker, D.J., C.J.O´Callaghan, C.S.Karapetis, J.R.Zalcberg, D.Tu, H.J.Au, S.R.Berry, M.Krahn, T.Price, R.J.Simes, N.C.Tebbutt, G.van Hazel, R.Wierzbicki, C.Langer, and M.J.Moore. 2007. "Cetuximab for the treatment of colorectal cancer." *N Eng J Med.* 357:2040-2048.
- Kalyankrishna, S. and J.R. Grandis. 2006. "Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer." *J Clin Oncol.* 24.
- Kandel, E.S. and N.Hay. 1999. "The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB." *Exp Cell Res.* 253:210-229.
- Kao, J., A. Lavaf, M.S. Teng, D. Huang, and Genden E.M. 2008. "Adjuvant radiotherapy and survival for patients with node-positive head and neck cancer: an analysis by primary site and nodal stage." *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 71:362-370.
- Kawamata,H., K.Nakashiro, D.Uchida, K.Harada, H.Yoshida, and M.Sato. 1997.

  "Possible contribution of active MMP2 to lymph-node metastasis and secreted cathepsin L to bone invasion of newly established human oral-squamous-cancer cell lines." *Int J Cancer.* 70:120-127.
- Khyse-Andersen,J. 1984. "Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamid to nitrocellulose." *J Biochem Biophys Meth.* 10:203-209.
- Laemmli, U. 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature*. 227:680-685.
- Leslie, N.R., X.Yang, C.P.Downes, and C.J.Weijer. 2005. "The regulation of cell migration by PTEN." *Biochem Soc Trans.* 33:1507-1508.

- Liang, C.C., A.Y. Park, and J.L. Guan. 2007. "In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro." *Nat Protoc.* 2:329-333.
- Machiels, J.P., C.Sempoux, P.Scalliet, J.C.Coche, Y.Humblet, E.Van Cutsem, J.Kerger, J.L.Canon, M.Peeters, S.Aydin, S.Laurent, A.Kartheuser, B.Coster, S.Roels, J.F.Daisne, B.Honhon, L.Duck, C.Kirkove, M.A.Bonny, and K.Haustermans. 2007. "Phase I/II study of preoperative cetuximab, capecitabine, and external beam radiotherapy in patients with rectal cancer." *Ann Oncol.* 18:738-744.
- Mast,G., F.Zimmermann, S.Ihrler, C.Matthias, and A.Kolk. 2009. "MANUAL Kopf-Hals-Malignome." *Zuckschwerdt Verlag München Wien New York*. 4. Auflage.
- Matta,A. and R.Ralhan. 2009. "Overview of current and future biologically based targeted therapies in head and neck squamous cell carcinoma." *Head Neck Oncol.* 1.
- Meng,Q., C.Xia, J.Fang, Y.Rojanasakul, and B.H.Jiang. 2006. "Role of PI3K and AKT specific isoforms in ovarian cancer cell migration, invasion and proliferation through the p70S6K1 pathway." *Cell Signal*. 18:2262-2271.
- Meurman, J.H. and J.Uittamo. 2008. "Oral micro-organisms in the etiology of cancer." *Acta Odontol Scand.* 66:321-326.
- Moelling, K., K.Schad, M.Bosse, S.Zimmermann, and M.Schweneker. 2002. "Regulation of Raf-Akt cross-talk." *J Biol Chem.* 277:31099-31106.
- Murugan, A.K., N.T.Hong, Y.Fukui, A.K.Munirajan, and N.Tsuchida. 2008. "Oncogenic mutations of the PIK3CA gene in head and neck squamous cell carcinomas." *Int J Oncol.* 32:101-111.
- Nathan, C.O., N.Amirghahari, X.Rong, T.Giordano, D.Sibley, M.Nordberg, J.Glass, A.Agarwal, and G.Caldito. 2007. "Mammalian target of rapamycin inhibitors as possible adjuvant therapy for microscopic residual disease in head and neck squamous cell cancer." *Cancer Res.* 67:2160-2168.
- Ongkeko,W.M., X.Altuna, R.A.Weisman, and J.Wang-Rodriguez. 2005. "Expression of protein tyrosine kinases in head and neck squamous cell carcinomas." *Am J Clin Pathol.* 124:71-76.
- Osherov, N. and A.Levitzki. 1994. "Epidermal-growth-factor-dependent activation of the Src-family kinases." *Eur J Biochem.* 225:1047-1053.
- O'Brien, C., J.W.Smith, S.J.Soong, M.M.Urist, and W.A.Maddox. 1986. "Neck dissection with and without radiotherapy: prognostic factors, patterns of recurrence, and survival." *Am J Surg.* 152:456-463.
- Perez-Ordonez,B., M.Beauchemin, and R.C.K.Jordan. 2006. "Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck." *J Clin Pathol.*. 59:445-453.

- Pfister, D.G., Y.B.Su, D.H.Kraus, S.L.Wolden, E.Lis, T.B.Aliff, A.J.Zahalsky, S.Lake, M.N.Needle, A.R.Shaha, J.P.Shah, and M.J.Zelefsky. 2006. "Concurrent cetuximab, cisplatin, and concomitant boost radiotherapy for locoregionally advanced, squamous cell head and neck cancer: a pilot phase II study of a new combined-modality paradigm." *J Clin Oncol.* 24:1072-1078.
- Pignon, J.P., J.Bourhis, C.Domenge, and L.Designé. 2000. "Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data." *Lancet*. 355:949-955.
- Pirker,R., J.R.Pereira, A.Szczesna, J.von Pawel, M.Krzakowski, R.Ramlau, I.Vynnychenko, K.Park, C.T.Yu, V.Ganul, J.K.Roh, E.Bajetta, J.O´Byrne, F.de Marinis, W.Eberhardt, T.Goddemeier, M.Emig, and U.Gatzemeier. 2009. "Cetuximab plus chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer (FLEX): an open-label randomised phase III trial." *Lancet*. 373:1497-1498.
- Qian,L.W., K.Mizumotu, T.Urashima, E.Nagai, N.Maehara, N.Sato, M.Nakajima, and M.Tanaka. 2002. "Radiation-induced increase in invasive potential of human pancreatic cancer cells an its blockade by a matrix metalloproteinase inhibitor, CGS27023." *Clin Cancer Res.* 8:1223-1227.
- Ragin, C.C.R., F. Modugno, and S.M. Gollin. 2007. "The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus." *J Dent Res.* 86:104-114.
- Rodriguez, L., X.Wu, and J.Guan. 2005. "Wound-healing assay." *Methods Mol Biol.* 294:23-29.
- Rosenzweig, K.E., M.B. Youmell, S.T. Palayoor, and B.D. Price. 1997.

  "Radiosensitization of human tumor cells by the phosphatidylinositol3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 correlates with inhibition of DNA-dependent protein kinase and prolonged G2-M delay." *Clin Cancer Res.* 3:1149-1156.
- Sato,S., N.Fujita, and T.Tsuruo. 2004. "Involvement of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in the MEK/MAPK signal transduction pathway." *J Biol Chem.* 279:33759-33767.
- Schmidt-Ullrich, R.K., R.B.Mikkelsen, P.Dent, D.G.Todd, K.Valerie, B.D.Kavanagh, J.N.Contessa, W.K.Rorrer, and P.B.Chen. 1997. "Radiation-induced proliferation of the human A431 squamous carcinoma cells is dependent on EGFR tyrosine phosphorylation." *Oncogene*. 15:1191-1197.
- Shaw, L.M. 2005. "Tumor cell invasion assays." Methods Mol Biol. 294:97-105.
- Shen,K.H., S.H.Hung, L.T.Yin, C.S.Huang, C.H.Chao, C.L.Liu, and Y.W.Shi. 2009.

  "Acacetin, a flavonoid, inhibits the invasion and migration of human prostate cancer DU145 cells via inactivation of the p38 MAPK signaling pathway." *Mol Cell Biochem.* DOI 10.1007/s11010-009-0229-8.

- Shepherd, F.A., J.Rodrigues Pereira, T.Ciuleanu, E.H.Tan, V.Hirsh, S.Thongprasert, D.Campos, S.Maoleekoonpiroj, M.Smylie, R.Martins, M.van Kooten, M.Dediu, B.Findlay, D.J.D.Tu, A.Bezjak, G.Clark, P.Santabárbara, L.Seymour, and National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. 2005. "Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer." *N Eng J Med.* 353:123-132.
- Shi,Y.Q., H.Blattmann, and N.E.Crompton. 2001. "Wortmannin selectively enhances radiation-induced apoptosis in proliferative but not quiescent cells." *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 49:421-425.
- Shin, D.M., J.Y.Ro, W.K.Hong, and W.N.Hittelman. 1994. "Dysregulation of epidermal growth factor receptor expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis." *Cancer Res.* 54:3153-3159.
- Silva, P., J.J. Homer, N.J. Slevin, B.T. Musgrove, P. Sloan, P. Price, and C.M.L. West. 2007. "Clinical and biological factors affecting response to radiotherapy in patients with head and neck cancer: a review." *Clin Otolaryngol.* 32:337-345.
- Sobin,L.H. and C.Wittekind. 2002. "TNM-Classification of malignant tumours." *John Wiley & Sons Inc.* 6th edition.
- Sobrero, A.F., J.Maurel, L.Fehrenbacher, W.Scheithauer, Y.A.Akubakr, M.P.Lutz, M.E.Vega-Villegas, C.Eng, E.U.Steinhauer, J.Prausova, H.J.Lenz, C.Borg, G.Middleton, H.Kröning, G.Luppi, O.Kisker, A.Zubel, C.Langer, J.Kopit, and H.A.3.Burris. 2008. "EPIC: phase III trial of cetuximab plus irinotecan after fluoropyrimidine and oxaliplatin failure in patients with metastatic colorectal cancer." *J Clin Oncol.* 26:2311-2319.
- Soulieres, D., N.N.Senzer, E.E.Vokes, M.Hidalgo, S.S.Agarwala, and L.L.Siu. 2004. "Multicenter phase II study of erlotinib, an oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with recurrent or metastatic squamous cell cancer of the head and neck." *J Clin Oncol.* 22:77-85.
- Stahl, U., J.Wenk, F.Wagener, J.Woenckhaus, U.Gamerdinger, A.Battmann, and T.Dreyer. 2004. "Phosphoinositide 3-kinase (PI3-K) expression. Tumorigenesis of epithelial carcinoma of the mouth." *Pathologe*. 25:31-37.
- Takes,R.P., R.J.Baatenburg de Jong, E.Schuuring, S.V.Litvinov, J.Hermans, and J.H.Van Krieken. 1998. "Differences in expression of oncogenes and tumor suppressor genes in different sites of head and neck squamous cell." *Anticancer Res.* 18:4793-4800.
- Tamura, M., J.Gu, K.Matsumoto, S.Aota, R.Parsons, and K.M.Yamada. 1998. "Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN." *Science*. 280:1614-1617.
- Testa, J.R. and A.Bellacosa. 2001. "AKT plays a central role in tumorigenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:10983-10985.
- Thariat, J., G. Yildirim, K.A.Mason, A.S.Garden, L.Milas, and K.K.Ang. 2007. "Combination of radiotherapy with EGFR antagonists for head and neck carcinoma." *Int J Clin Oncol.* 12:99-110.

- Thatcher, N., A.Chang, P.Parikh, J.Rodrigues Pereira, T.Ciuleanu, J.von Pawel, S.Thongprasert, E.H.Tan, K.Pemberton, V.Archer, and K.Carroll. 2005. "Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer: results from a randomised, placebo-controlled, multicentre study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer)." *Lancet*. 366:1527-1537.
- Valerie, K., A. Yacoub, M.P. Hagan, D.T. Curial, P.B. Fisher, S. Grant, and P. Dent. 2007. "Radiation-induced cell signaling: inside-out and outside-in." *Mol Cancer Ther.* 6:789-801.
- Vermorken, J.B., R.Mesia, F.Rivera, E.Remenar, A.Kawecki, S.Rottey, J.Erfan, D.K.H.R.Zabolotnyy, D.Cupissol, F.Peyrade, M.Benasso, I.Vynnychenko, D.De Raucourt, C.Bokemeyer, A.Schueler, N.Amellal, and R.Hitt. 2008. "Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer." *N Eng J Med.* 359:1116-1127.
- Vivanco,I. and C.L.Sawyers. 2002. "The phosphatidylinositol 3-Kinase–AKT pathway in human cancer." *Nat Rev Cancer*. 2:489-501.
- Vivek,R.S., M.Baludavid, and R.Mohanram. 2006. "Concurrent chemo-irradiation using accelerated concomitant boost radiation therapy in loco-regionally advanced head and neck squamous cell carcinomas." *J Cancer Res Ther.* 2:90-96.
- Vlahos, C.J., W.F.Matter, K.Y.Hui, and R.F.Brown. 1994. "A Specific Inhibitor of Phosphatidylinositol 3=Kinase, 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4H-l-benzopyran-4-one (LY294002)." *J Biol Chem.* 269:5241-5248.
- Vogel,R. and W.Müller-Esterl. 1986. "Optimierungsstrategien beim Westernblotting und Immunoprinting." *Radola (ed.) Elektrophorese Forum 86.Bode*.81-88.
- Wick, W., F.B. Furnari, U. Naumann, W.K. Cavenee, and M. Weller. 1999. "PTEN gene transfer in human malignant glioma: sensitization to irradiation and CD95L-induced apoptosis." *Oncogene*. 18:3936-3943.
- Wild-Bode, C., M.Weller, A.Rimner, J.Dichgans, and W.Wick. 2001. "Sublethal irradiation promotes migration and invasiveness of glioma cells: implications for radiotherapy of human glioblastoma." *Cancer Res.* 61:2744-2750.
- Zheng, Z.Z. and Z.X.Liu. 2007. "Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt pathway mediates CD151-induced endothelial cell proliferation and cell migration." *Int J Biochem Cell Biol.* 39:340-348.
- Zimmermann, S. and K. Moelling. 1999. "Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B)." *Science*. 286:1741-1744.

### **Dankvermerk**

Ich danke hiermit meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Henning Bier. Besonders dankbar bin ich dafür, dass er die Rolle als mein Doktorvater so kurzfristig von der kürzlich verstorbenen Frau Prof. Dr. med. Miriam Steuer-Vogt übernommen hat, welcher ich hiermit in memoriam ebenfalls für ihre vormalige Betreuung danke.

Mein Dank gilt außerdem meiner Betreuerin Frau Dr. med. Anja Pickhard für die engagierte Unterstützung bei der Konzeption und Durchführung der Arbeit. Sie nahm sich stets die Zeit, um mir mit Rat und Tat zur Seite zu stehen und mir mit Tipps und Anregungen weiterzuhelfen.

Weiterhin danke ich Herrn Guido Piontek, auf dessen Hilfe und Ratschläge ich v.a. bei der Arbeit im Labor, aber auch bei der Erstellung des Manuskripts immer zählen konnte.

Ich möchte ebenfalls dem Leiter des Instituts für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie Herrn Prof. Dr. med. Heinz Höfler und insbesondere auch dem Leiter der Neuropathologie Herrn Prof. Dr. med. Jürgen Schlegel danken, die mir den Arbeitsplatz zur Durchführung meiner Experimente zur Verfügung gestellt haben.

Darüber hinaus danke ich Herrn Prof. Dr. med. M. Molls, dem Leiter der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie, und Herrn Prof. Dr. med. habil. Dr. rer. nat. Dipl.-Phys. Peter Kneschaurek für die Möglichkeit der Benutzung des Röntgengeräts. In diesem Zusammenhang danke ich auch allen beteiligten MTAs, die mir bei der experimentellen Bestrahlung geholfen haben und sich stets kooperativ zeigten.