

Technische Universität München
Hals-Nasen-Ohrenklinik und Poliklinik
Klinikum rechts der Isar

Der Zusammenhang des Bradykinin B2-Rezeptors und des EGFR bei der Strahlenbiologie von Kopf- Hals-Tumoren

Carolin Anna Christina Beck

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

Vorsitzender:		Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny
Prüfer der Dissertation:	1.	Priv.-Doz. Dr. A. C. Pickhard
	2.	Univ.-Prof. Dr. H. A. Bier

Die Dissertation wurde am 26.09.2013 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 26.02.2014 angenommen.

Meinen lieben Eltern Gerti und Franz Beck

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1. Problemstellung	6
1.2. Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches	7
1.2.1. Epidemiologie	7
1.2.2. Klassifikation	8
1.2.3. Pathologie	13
1.2.4. Molekularpathologie	14
1.2.5. Ätiologie und Risikofaktoren	15
1.2.6. Therapiestandards	16
1.2.7. Prognose	18
1.3. Kallikrein-Kinin-System	18
1.3.1. Bradykinin und seine Rezeptoren BKB1R und BKB2R	18
1.3.2. Mitogen-activated Protein Kinase-Signalweg (MAPK)	20
1.3.3. Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und Proteinkinase B (PKB/AKT)	21
1.4. Ziel der Arbeit	23
2. Material und Methoden	25
2.1. Material	25
2.1.1. Zelllinien	25
2.1.2. Zellkulturmedien und Zusätze	25
2.1.3. Wachstumsfaktoren und Inhibitoren	26
2.1.4. Antikörper	27
2.1.5. Kits	27
2.1.6. Reagenzien	28
2.1.7. Puffer und gemischte Reagenzien	29
2.1.8. Geräte und Laborausstattung	30
2.1.9. Verbrauchsmaterial	32
2.1.10. Computerprogramme	33
2.2. Methoden	33
2.2.1. Zellkultur	33
2.2.1.1. Auftauen	33

2.2.1.2.	Mediumwechsel	33
2.2.1.3.	Splitten	34
2.2.1.4.	Einfrieren.....	34
2.2.2.	Bestrahlung.....	34
2.2.3.	Proteinisolierung	36
2.2.4.	Bradford-Assay	37
2.2.5.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	37
2.2.6.	Western Blot	39
2.2.7.	Immundetektion	40
2.2.8.	Proliferations-Assay.....	40
2.2.9.	Colony-Formation-Assay	43
2.2.10.	Invasion	44
2.2.11.	Migration	45
2.2.12.	Statistik	46
3.	Ergebnisse	48
3.1.	Biologische Effekte.....	48
3.1.1.	Colony Formation Assay.....	48
3.1.1.1.	Einfluss der Bestrahlung auf das Überleben der Zellen.....	48
3.1.1.2.	Effekt der Stimulation mit Bradykinin auf das Überleben	50
3.1.1.3.	Einfluss der Blockade des Bradykinin B2-Rezeptors auf das Überleben der Zellen.....	53
3.1.2.	Proliferation.....	57
3.1.2.1.	Einfluss der Bestrahlung auf die Proliferation der Zellen	57
3.1.2.2.	Effekt der Stimulation mit Bradykinin bei gleichzeitiger Bestrahlung auf die Proliferation der Zellen.....	59
3.1.2.3.	Einfluss der Blockade des Bradykinin B2-Rezeptors auf die Proliferation der Zellen	61
3.1.3.	Invasion	63
3.1.3.1.	Einfluss der Bestrahlung auf die Invasion der Zellen	63
3.1.3.2.	Effekt der Stimulation mit Bradykinin bei gleichzeitiger Bestrahlung auf die Invasion der Zellen	65
3.1.3.3.	Effekt der Blockade des Bradykinin B2-Rezeptors auf die Invasion der Zellen	69
3.1.4.	Migration	72

3.1.4.1.	Effekt der Bestrahlung auf das Migrationsverhalten der Zellen	72
3.1.4.2.	Einfluß der Bradykinin-Stimulation auf die Migration unserer Plattenepithelkarzinomzellen.....	73
3.1.4.3.	Effekt der Blockade des Bradykinin B2-Rezeptors mit HOE140 auf das Migrationsverhalten der Plattenepithelkarzinomzellen	76
3.2.	Biochemische Effekte: Western Blot Analysen	78
3.2.1.	Proteinexpression der Zelllinien – Vergleich unbestrahlt vs. bestrahlt	79
3.2.2.	Effekt der Bradykinin-Stimulation auf die Proteinexpression vor und nach Bestrahlung.....	82
3.2.3.	Effekt der Inhibition des Bradykinin B2-Rezeptors auf die Proteinexpression; Vergleich unbestrahlt vs. bestrahlt	85
4.	Diskussion	92
5.	Zusammenfassung.....	105
6.	Anhang	106
6.1.	Abbildungsverzeichnis:.....	106
6.2.	Tabellenverzeichnis.....	109
6.3.	Literaturverzeichnis	111
6.4.	Abkürzungsverzeichnis	119

1. Einleitung

1.1. Problemstellung

Tumorerkrankungen des Kopf-Hals-Bereichs sind zweifelsohne mit einer Verminderung der Lebensqualität verbunden (Silveira, Goncalves et al., 2010). Dies zeigt sich vor allem dadurch, dass die Behandlung einer solchen Tumorerkrankung meist mit Einschränkungen der Basisfunktionen Atmen, Kauen, Schlucken und Sprechen assoziiert ist. Auch eine Verschlechterung der Sinneswahrnehmungen, wie Gehör, Geruch und Geschmack, ebenso wie mögliche ästhetische Veränderungen zeigen negative Auswirkungen auf die Lebensqualität der Patienten (Silveira, Goncalves et al., 2010).

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs (HNSCC) stehen deutschlandweit an vierter Stelle aller Tumorerkrankungen (Tumorzentrum München, 2003). Trotz neuesten Fortschritten in der Kopf- und Halschirurgie und in der Radiotherapie kann eine vollständige Heilung nur bei weniger als 50% der Patienten erreicht werden (Goerner, Seiwert et al., 2010). Vor allem Patienten mit Fernmetastasen oder Rezidiverkrankungen und nach bereits durchgeführter Strahlentherapie haben eine schlechte Prognose, mit einer mittleren Überlebensrate von 6-10 Monaten (Goerner, Seiwert et al., 2010) (Affolter, Fruth et al., 2011). Diese klinischen Ergebnisse, ebenso wie die toxischen Nebenwirkungen systemischer Chemotherapie verdeutlichen die Notwendigkeit, neue effektive Behandlungsstrategien zu entwickeln (Nijkamp, Hoogsteen et al., 2011). Bei der sogenannten Target-Therapie werden spezielle Wirkstoffe verwendet, die spezifisch auf zelluläre Signalwege der Tumorentstehung von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs einwirken (Goerner, Seiwert et al., 2010). So führte die wissenschaftliche Erkenntnis, dass der Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor (EGFR) bei Kopf-Hals-Tumoren überexprimiert und so mit einem verringerten Überleben der Tumorpatienten assoziiert ist, bereits zur Einführung einer EGFR-Target-Therapie (Sharafinski, Ferris et al., 2010). Es konnte auch gezeigt werden, dass das Kallikrein-Kinin-System und seine nachgeschalteten Signalwege Tumorwachstum und Angiogenese stimulieren (Ikeda, Hayashi et al., 2004). Aus diesem Grund stellt auch das Kallikrein-Kinin-System und

sein Endprodukt Bradykinin eine Option für einen molekularen Therapieansatz bei Tumoren dar.

Das Nonapeptid Bradykinin, welches im Rahmen des Kallikrein-Kinin-Systems im Körper gebildet wird, führt zu einer Aktivierung des G-Protein gekoppelten Rezeptors B2. Die nachgeschalteten Signalwege führen einerseits über eine Aktivierung der Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK), andererseits über den Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/ Proteinkinase B (PKB/AKT)- Signalweg zu Tumorwachstum und tumorassoziierter Angiogenese (Ikeda, Hayashi et al., 2004).

Kürzlich konnte bei unterschiedlichen Tumorzelllinien eine strahleninduzierte Migration nachgewiesen werden, was nachweislich zum Beispiel bei Gliomen zu einer erhöhten Rezidivrate des Primarius führt (Wild-Bode, Weller et al. 2001). Ebenso zeigte unsere Arbeitsgruppe auf (Pickhard, Margraf et al., 2011), dass sich auch bei Plattenepithelkarzinomzelllinien eine vermehrte Migration nach Radiatio darstellen lässt. Dieser Effekt kann durch EGF-Stimulation verstärkt und durch EGF-Rezeptor-Blockade verringert werden. Daraus wird deutlich, dass sowohl die Bestrahlung als auch die Stimulation mit EGF eine wesentliche Rolle bei der Migration von Plattenepithelkarzinomzelllinien spielen (Zuo, Zhu et al., 2011).

In meiner Arbeit soll nun die mögliche Rolle des Kallikrein-Kinin-Systems, im Speziellen des Bradykinin B2-Rezeptors bei der Strahlenbiologie von Plattenepithelkarzinomzellen des Kopf-Hals-Bereichs genauer dargestellt werden. Dabei soll der Effekt der Bestrahlung auf Proliferation, Überleben, Invasions- und Migrationsverhalten der Tumorzellen gezeigt werden, bei simultaner Stimulation und Inhibition des Bradykinin B2-Rezeptors.

1.2. Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches

1.2.1. Epidemiologie

Plattenepithelkarzinome sind die häufigsten Tumore des Kopf-Hals-Bereichs. Hierbei handelt es sich um Tumore des Pharynx, des Larynx und der Mundhöhle, die aus der sich dort befindenden Schleimhaut, dem Plattenepithel, hervorgehen. Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs (HNSCC) stehen deutschlandweit in

der Häufigkeit an vierter Stelle hinter Prostata-, Lungen- und Colorectalem Carcinom und machen 6% der bösartigen Neubildungen aus (Tumorzentrum München, 2003). In Deutschland treten Kopf-Hals-Malignome bei Männern bei einer geschätzten altersstandardisierten Inzidenz von 24.5 /100000 Männer auf; dies entspricht einem Anteil von 6.3% aller jährlichen Krebsneuerkrankungen. Bei Frauen beträgt die Neuerkrankungsrate 2,1%. Vergleicht man den prozentualen Anteil der einzelnen Tumorentitäten, so fällt auf, dass bei den Männern 26,1% den Larynx betreffen, 17,7% den Hypopharynx und 16,4% den Oropharynx. Bei Frauen sind die häufigsten Lokalisationen die Zunge mit 19,3% und der Oropharynx mit 19,2%. Bezüglich der Letalität beträgt das Verhältnis Männer zu Frauen 3,8 zu 1. Der Altersmittelwert der Erkrankten bei Diagnosestellung eines Kopf-Hals-Malignoms beträgt bei Männern 58 Jahre, bei Frauen 62 Jahre. Der Anteil der Patienten mit primärer Fernmetastasierung ist im Vergleich zu anderen soliden Tumoren relativ niedrig und liegt bei durchschnittlich 2,2 % (Tumorzentrum München, 2003).

1.2.2. Klassifikation

Die Einteilung der Tumoren erfolgt nach der neuesten Version der TNM-Klassifikation der International Union against Cancer, welche in folgender Tabelle dargestellt ist.

pT-Klassifikation	
pTx	Keine histologische Beurteilung des Primärtumors möglich
pT0	Kein histologischer Anhalt für 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 > 3 cm < 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	
pMx	Keine histologische Beurteilung der Fernmetastasen möglich
pM0	Histologisch keine Fernmetastasen
pM1	Histologisch gesicherte Fernmetastase(n)
R-Status	
Rx	Keine Beurteilung des Vorhandenseins eines Residualtumors möglich
R0	Kein Residualtumor
R1	Mikroskopisch nachweisbarer Residualtumor
R2	Makroskopisch sichtbarer Residualtumor
Graduierung	
G1	gut differenziert
G2	Mäßig differenziert
G3	Niedrig differenziert
G4	Undifferenziert
GX	Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden

Tabelle 1: TNM-Klassifikation der HNSCC (Wittekind, 2010)

T steht dabei für Ausdehnung und Verhalten des Primärtumors, N für das Fehlen oder Vorhandensein von regionären Lymphknotenmetastasen und M für das Fehlen oder Vorhandensein von Fernmetastasen. R bezeichnet das Vorhandensein von Resttumorgewebe nach Behandlung. Die histologische Differenzierung des Tumors wird anhand des Gratings G 1-3 beschrieben. Der Zusatz „p“ bedeutet, dass die Klassifikation auf einer histopathologischen Sicherung des Operationspräparats beruht, wobei das Suffix „c“ für eine klinische Beurteilung der Klassifikation steht.

Das Suffix „m“ in Klammern gesetzt, wird benutzt, um multiple Primärtumoren in einem anatomischen Bezirk anzuzeigen. Wenn die Klassifikation während oder nach einer initialen multimodalen Therapie erfolgt, werden die TNM- oder pTNM-Kategorien durch das Präfix „y“ gekennzeichnet. Rezidivtumore nach krankheitsfreiem Intervall werden durch das Präfix „r“ gekennzeichnet. Das Symbol „a“ kennzeichnet Fälle, bei denen die Klassifikation erst anlässlich einer Autopsie erfolgte (Wittekind, 2010).

Die T-Klassifikation ist je nach Lokalisation der Tumore unterschiedlich. Die

Einteilung der T-Klassifikation für die einzelnen Plattenepithelkarzinome ist in den folgenden Tabellen aufgelistet (Wittekind, 2010).

Lippe/ Mundhöhle	
T1	Tumor 2cm oder weniger in größter Ausdehnung
T2	Tumor mehr als 2cm, aber nicht mehr als 4cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor mehr als 4cm in größter Ausdehnung
T4a	Lippe: Tumor infiltriert durch kortikalen Knochen, den N. alveolaris inferior, in Mundhöhlenboden oder in Haut (Kinn oder Nase)
T4a	Mundhöhle: Tumor infiltriert durch kortikalen Knochen in äußere Muskulatur der Zunge, Kieferhöhle oder Gesichtshaut
T4b	Lippe und Mundhöhle: Tumor infiltriert Spatium masticatorium, Processus pterygoideus oder Schädelbasis oder umschließt A. carotis interna

Tabelle 2: T-Klassifikation der Mundhöhle/ Lippe (Wittekind, 2010)

Pharynx	
T1	Tumor 2cm oder weniger in größter Ausdehnung
T2	Tumor mehr als 2cm, aber nicht mehr als 4cm in größter Ausdehnung
T3	Tumor mehr als 4cm in größter Ausdehnung oder Ausbreitung zur lingualen Oberfläche der Epiglottis
T4a	Tumor infiltriert eine der folgenden Nachbarstrukturen: Larynx, äußere Muskulatur der Zunge, Lamina medialis des Processus pterygoideus, harten Gaumen oder Unterkiefer
T4b	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen wie M. pterygoideus lateralis, Lamina lateralis des Processus pterygoideus, Schädelbasis oder umschließt die A. carotis interna

Tabelle 3: T-Klassifikation des Pharynx (Wittekind, 2010)

Nasopharynx	
T1	Tumor auf den Nasopharynx begrenzt oder mit Ausbreitung auf den Oropharynx und/ oder Nasenhöhle
T2	Tumor mit parapharyngealer Ausbreitung
T3	Tumor infiltriert Knochenstrukturen der Schädelbasis und/ oder Nasennebenhöhlen
T4	Tumor mit intrakranieller Ausbreitung und/ oder Befall von Hirnnerven, Fossa infratemporalis, Hypopharynx, Augenhöhle, Spatium masticatorium

Tabelle 4: T-Klassifikation des Nasopharynx (Wittekind, 2010)

Hypopharynx	
T1	Tumor auf einen Unterbezirk des Hypopharynx begrenzt und/ oder 2cm oder weniger in größter Ausdehnung
T2	Tumor infiltriert mehr als einen Unterbezirk des Hypopharynx oder einen benachbarten Bezirk oder misst mehr als 2cm, aber nicht mehr als 4cm in größter Ausdehnung, ohne Fixation des Hemilarynx
T3	Tumor misst mehr als 4cm in größter Ausdehnung, oder Tumor mit Fixation des Hemilarynx
T4a	Tumor infiltriert eine der folgenden Nachbarstrukturen: Schild-/ Ringknorpel, Zungenbein, Schilddrüse, Ösophagus, zentrale Weichteile des Halses
T4b	Tumor infiltriert prävertebrale Faszien, umschließt die A. carotis interna oder infiltriert Strukturen des Mediastinums

Tabelle 5: T-Klassifikation des Hypopharynx (Wittekind, 2010)

Supraglottis	
T1	Tumor auf einen Unterbezirk der Supraglottis begrenzt, mit normaler Stimmlippenbeweglichkeit
T2	Tumor infiltriert Schleimhaut von mehr als einem benachbarten Unterbezirk der Supraglottis oder Glottis oder eines Areals außerhalb der Supraglottis, ohne Fixation des Larynx
T3	Tumor auf den Larynx begrenzt, mit Stimmlippenfixation, und/ oder Tumor mit Infiltration des Postkrikoidbezirks, des präepiglottischen Gewebes und/ oder geringgradiger Erosion des Schildknorpels
T4a	Tumor infiltriert den Schildknorpel und/ oder breitet sich außerhalb des Kehlkopfes aus, z.B. Trachea, Weichteile des Halses eingeschlossen äußere Muskulatur der Zunge, gerade Halsmuskulatur, Schilddrüse, Ösophagus
T4b	Tumor infiltriert den Prävertebralraum, mediastinale Strukturen oder umschließt die A. carotis interna

Tabelle 6: Klassifikation der Supraglottis (Wittekind, 2010)

Glottis	
T1	Tumor auf Stimmlippe begrenzt, mit normaler Beweglichkeit T1a Tumor auf eine Stimmlippe begrenzt T1b Tumorbefall beider Stimmlippen
T2	Tumor breitet sich auf Supraglottis und/ oder Subglottis aus und/ oder Tumor mit eingeschränkter Stimmlippenbeweglichkeit
T3	Tumor auf den Larynx begrenzt, mit Stimmlippenfixation und/ oder Invasion der Postkrikoidgegend und/ oder des präepiglottischen Gewebes und/ oder des paraglottischen Raumes mit geringgradiger Erosion des Schildknorpels
T4a	Tumor infiltriert den Schildknorpel und/ oder breitet sich außerhalb des Kehlkopfes aus, z.B. Trachea, Weichteile des Halses eingeschlossen äußere Muskulatur der Zunge, gerade Halsmuskulatur, Schilddrüse, Ösophagus
T4b	Tumor infiltriert den Prävertebralraum, mediastinale Strukturen oder umschließt die A. carotis interna

Tabelle 7: T-Klassifikation der Glottis (Wittekind, 2010)

Subglottis	
T1	Tumor auf die Subglottis begrenzt
T2	Tumor breitet sich auf eine oder beide Stimmlippen aus, diese mit normaler oder eingeschränkter Beweglichkeit
T3	Tumor auf den Larynx begrenzt, mit Stimmlippenfixation
T4a	Tumor infiltriert den Schildknorpel und/ oder breitet sich außerhalb des Kehlkopfes aus, z.B. Trachea, Weichteile des Halses eingeschlossen äußere Muskulatur der Zunge, gerade Halsmuskulatur, Schilddrüse, Ösophagus
T4b	Tumor infiltriert den Prävertebralraum, mediastinale Strukturen oder umschließt die A. carotis interna

Tabelle 8: T-Klassifikation der Subglottis (Wittekind, 2010)

In Tabelle 9 ist die Stadien-Einteilung für alle Karzinome im Kopf-Hals-Bereich aufgeführt (ausgenommen der Karzinome von Speicheldrüse und Schilddrüse):

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

Tabelle 9: Darstellung der TNM-Klassifikation (Wittekind, 2010)

1.2.3. Pathologie

Das Plattenepithelkarzinom des Aerodigestivtrakts ist laut WHO ein maligner epithelialer Tumor mit plattenepithelialer Differenzierung (Tumorzentrum München, 2003). Es lässt sich zu 90% den typischen verhornenden und nicht verhornenden Plattenepithelkarzinomen zuordnen. Das Ausmaß an Hornbildung, ebenso wie das Vorhandensein von Interzellularbrücken lassen auf den histologischen Malignitätsgrad schließen (Tumorzentrum München, 2003). Des Weiteren gibt es weniger häufig vorkommende Unterformen, die vor allem durch den histopathologischen Aufbau, allerdings auch durch die prognostische und therapeutische Relevanz von den Plattenepithelkarzinomen unterschieden werden müssen. Dazu zählen unter anderem das verruköse Karzinom, welches als hoch differenziert gilt, ebenso wie das sarkomatoide, das basaloide und das lymphoepitheliale Karzinom, die als gering differenziert angesehen werden (Tumorzentrum München, 2003).

Plattenepithelkarzinome wachsen meist endophytisch, verrukös und ulzerierend. Mikroskopisch zeigen die Plattenepithelkarzinome spindelförmige Tumorzellen mit großen, atypischen Kernformationen und reichlichen Mitosefiguren. Hochdifferenzierte Tumore bilden Hornschuppen im Inneren des Tumors. Da diese

nicht abgeschilfert werden können, entstehen mikroskopisch zwiebelschalenartige Hornperlen, deren Ausmaß mit dem Grad der Differenzierung des Tumors korreliert. (Böcker, 2008)

1.2.4. Molekularpathologie

Die Entstehung der Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs beruht unter anderem auf komplexen molekularen Veränderungen. Das Konzept der schrittweisen Tumorprogression wurde erstmals von Nowell gezeigt (Nowell, 1986). Fearon und Vogelstein konnten 1987 / 1988 dieses Konzept für das Kolonkarzinom auf molekularer Ebene nachweisen (Vogelstein, Fearon et al., 1988). 1999 konnte Kleihues zeigen, dass diese Tumorprogression auch bei Astrozytomen vorkommt (Kleihues and Ohgaki, 1999): Ausgehend von einer prämaligen Vorläuferzelle entsteht durch genetische Alterationen und phänotypischen Veränderungen eine maligne, invasive Tumorzelle. Entscheidend für die Tumorentstehung ist die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (wie zum Beispiel p16^{INK4A}, Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1 (RASSF1a) und Tumorprotein 53 (TP53) bzw. die Aktivierung von Proto-Onkogenen (wie rat sarcoma viral oncogene homolog (ras), myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian) (myc) und Cyclin D1). Beides geht auf Veränderungen der DNA durch Deletion, Punktmutation, Promotor-Methylierungen oder Genamplifikationen zurück (Hardisson, 2003)

Folgende Graphik zeigt ein hypothetisches Modell von Tumorentstehung bei Kopf-Hals-Tumoren:

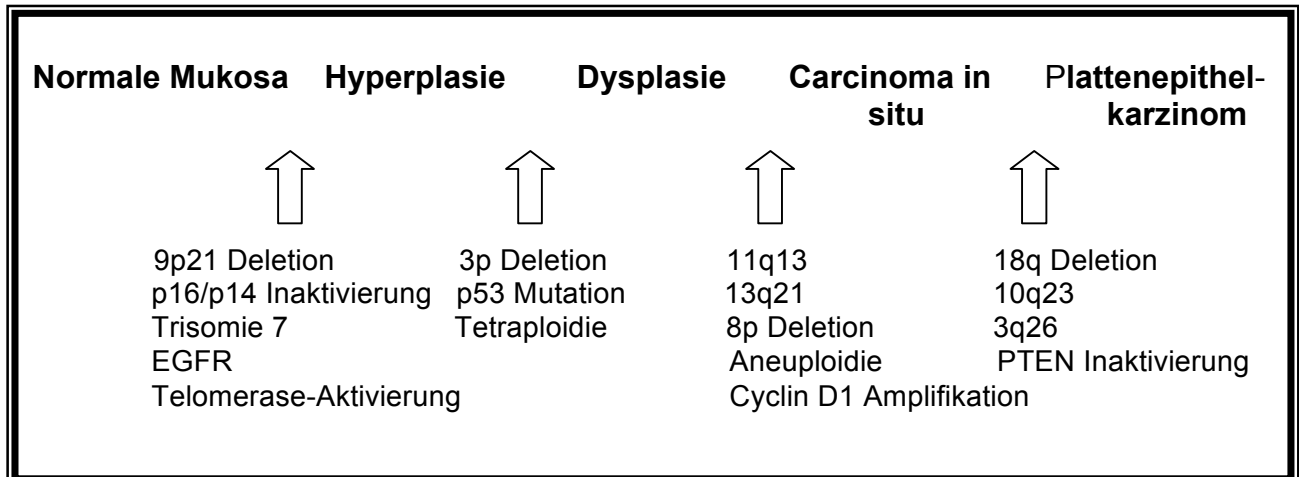


Abbildung 1: Hypothetisches Modell der Tumorentstehung von Kopf-Hals-Tumoren (Perez-Ordenez, Beauchemin et al., 2006)

1.2.5. Ätiologie und Risikofaktoren

Abhängig von der Lokalisation des Tumors gibt es Hauptrisikofaktoren unterschiedlicher Gewichtung, die für die Entstehung der meisten Kopf- und Halstumoren verantwortlich sind. Während langjähriger Nikotin- und Alkoholkonsum zusammen die beiden bedeutendsten Risikofaktoren darstellen (das relative Risiko für Tumorentstehung bei langjährigen Rauchern liegt bei 6,3, bei hohem Alkoholkonsum zeigt sich ein RR von 4,2) (Lewin, Norell et al., 1998), gibt es dennoch eine kleine Gruppe erkrankter Patienten (3 - 4%), die keinerlei Alkohol- oder Nikotinkonsum aufweisen. Beim Vergleich von Alkohol- und Nikotinkonsumenten zu den Erkrankten ohne Alkohol- und Nikotinexposition zeigen sich deutliche Unterschiede bezüglich Tumorlokalisierung, Erkrankungsalter und Überleben (Farshadpour, Kranenborg et al., 2010).

Bei den Patienten ohne Alkohol- und Nikotinkonsum manifestiert sich die Tumorerkrankung wesentlich später (Durchschnittsalter 72,7 Jahre). Zudem zeigt sich eine deutlich höhere Frauenerkrankungsrate (Frauen : Männer = 3 : 1). Die Mehrheit dieser Tumoren befindet sich in der Mundhöhle.

Im Gegensatz dazu beträgt bei den Patienten mit Alkohol- und Nikotinkonsum das Durchschnittserkrankungsalter der meist männlichen Patienten 63,5 Jahre (Männer : Frauen = 3 : 1). Hauptmanifestationsort von Alkohol- und Nikotin-induzierten Karzinomen ist der Larynx (Farshadpour, Kranenborg et al., 2010).

Laut Studien sind Alkohol- und Nikotinkonsum prognostische Faktoren für Inzidenz und Überleben von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs, wobei vor allem aber die Exposition beider Faktoren als höchstes Risiko einzustufen ist (Farshadpour, Kranenborg et al., 2010). Ein relatives Risiko von 22,1 verdeutlicht die synergistische Wirkung von Alkohol- und Nikotinkonsum auf die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs (HNSCC) (Lewin, Norell et al., 1998).

Zu den Risikofaktoren zählt aber auch das Rauchen von Pfeife oder Zigarren und im Bereich der Mundhöhle stellt das Kauen von Tabak ein Risiko dar (Lewin, Norell et al., 1998). Neben Zigaretten- und Alkoholkonsum kommt bei Lippenkarzinomen auch die chronische solare Exposition zum Tragen. Zudem konnte gezeigt werden, dass im Bereich des Nasopharynx die transformierende Wirkung des Epstein-Barr-Virus zur Tumorentstehung beiträgt (Tumorzentrum München, 2003). Bei einem kleinen Teil der Larynxkarzinome gilt der Einfluss von humanen Papillomaviren (HPV) auf die Kanzerogenese als gesichert (Ragin, Modugno et al., 2007). Zuletzt kann man schließlich auch die schlechte Mundhygiene zu den Risikofaktoren für die Entstehung von HNSCC zählen, wobei die Tumorentstehung dann auf eine Infektion mit HPV zurückgeführt werden kann (Gillison, D'Souza et al., 2008). Vor allem bei nichtrauchenden und nichttrinkenden Patienten jüngere n Alters scheint HPV bei der Tumorentstehung eine entscheidende Rolle zu spielen (Sudhoff, Schwarze et al., 2011). Bei HPV-assoziierten Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs handelt es sich meist um Tumore an Zunge, Gaumenmandel oder Oropharynx (Fakhry and Gillison, 2006), bei denen auf immunhistochemischer Ebene ein vermehrtes Vorhandensein von p16^{INK4A} und ein Fehlen der p53 Überexpression nachgewiesen werden konnte (van Monsjou, van Velthuysen et al., 2011).

1.2.6. Therapiestandards

Die Therapie von Kopf-Hals-Tumoren stellt meist ein interdisziplinäres Vorgehen der Fachbereiche HNO, MKG, Radiotherapie und Onkologie dar. Insgesamt gibt es derzeit vier Therapieansätze für lokal fortgeschrittene Kopf-Hals-Tumoren (Seiwert and Cohen, 2005):

Die chirurgische Intervention mit dem Ziel der R0-Resektion steht dabei nach wie vor an erster Stelle. Bei knappem R0 Status und bei Lymphknotenmetastasen wird zudem eine adjuvante Strahlentherapie erwogen, bei extrakapsulärem Wachstum oder R1 Status eine adjuvante Radiochemotherapie. Im Rahmen von Studien bietet die neoadjuvante Radiochemotherapie, die mit anschließender chirurgischer Intervention eine kurative Therapieoption liefert, ein weiteres Vorgehen. Falls eine operative Sanierung nicht möglich ist, kann eine primäre Radiochemotherapie in kurativer Absicht durchgeführt werden (Seiwert and Cohen, 2005). Seit der EXTREME Studie wird als palliative Therapieoption die Kombination aus Cetuximab, einem Epidermal-growth-factor-receptor-Inhibitor, mit einem platinhaltigen Chemotherapeutikum verwendet (Frampton, 2010).

Einen Schlüsselpunkt beim Therapieentschluss stellt neben der Verbesserung der Überlebenszeit auch die Lebensqualität der Patienten dar. Da durch die oben genannten Therapiemodalitäten meist eine permanente Morbidität resultiert, sollten das Ausmaß der unerwünschten Wirkungen ebenso wie die psychosoziale Verfassung der Patienten in die Therapieplanung mit einbezogen werden. In der Vergangenheit standen postoperativ orofaziale Mutilationen im Vordergrund, die allerdings durch neue operative Zugänge und Verfahren reduziert werden konnten, so dass derzeit eher die Nebenwirkungen der Radiochemotherapie die Lebensqualität der Patienten einschränken (S. Sehlen, 2003). Die Bestrahlung der Patienten im Kopf-Hals-Bereich resultiert in einer Zerstörung der Knochenstruktur, einer Funktionsbeeinträchtigung der Muskulatur und in Vernarbung und Fibrose (Mast, 2003). Zu den Folgen der Radiochemotherapie zählen so Mundtrockenheit, Schluckstörung, Geschmacksverlust, Trismus, dentale Schäden, Luftnot bei postradiogenem Ödem und Sprachprobleme (S. Sehlen, 2003; Tumorzentrum München, 2003).

Da Kopf-Hals-Tumoren zuerst lokal in zervikale Lymphknoten metastasieren, wird schon bei primärer Operation eine Ausräumung von verschiedenen Halslymphknotengruppen angeschlossen. Die Klassifizierung der Halslymphknotengruppen, sowie die heute gängigen Neck-dissection-Verfahren beruhen auf der Einteilung der American Academy of Otolaryngology – Head and neck surgery (E. Oestreicher, 2003).

1.2.7. Prognose

Für Kopf-Hals-Karzinome gibt es eine Reihe von typischen Prognosefaktoren, die eine Abschätzung des klinischen Verlaufs ermöglichen. Allerdings ist eine Therapieplanung und Prognoseabschätzung für betroffene Patienten nur sehr schwer möglich, da oft die individuelle molekulare Struktur der Tumoren unbekannt ist (Lehnerdt, Hoffmann et al., 2010). Zu den typischen Prognosefaktoren, anhand derer auch die Therapiemodalitäten abgewogen werden, zählen vor allem die Tumorlokalisation und -kategorie nach TNM oder UICC-Klassifikation und der Differenzierungsgrad, welcher durch Keratinisierung, intrazelluläre Brückenbildung und den Zell- und Mitoseindex definiert ist (Lehnerdt, Hoffmann et al., 2010). Des Weiteren korrelieren der N-Status, knappe tumorfreie Absetzungsränder und ein Kapseldurchbruch der Lymphknotenmetastase mit einer schlechteren Prognose (Lehnerdt, Hoffmann et al., 2010). Zu den patientenbezogenen Faktoren für eine schlechtere Prognose zählen das hohe Alter und das männliche Geschlecht. Entscheidend für Tumorentstehung und das Therapieansprechen ist auch der Nikotinabusus der Patienten, welcher bei gleichzeitigem Alkoholkonsum sogar eine Potenzierung des Risikos darstellt (Lehnerdt, Hoffmann et al., 2010). Auch ein niedriger Hämoglobin-Wert korreliert mit vermindertem Überleben und kann so als Prognosefaktor erwogen werden (Lehnerdt, Hoffmann et al., 2010). Zu den histomorphologischen Prognosefaktoren zählen auch das Tumolvolumen und die Tumorzellinfiltration in Blutgefäße, Lymphabflusswege und Nerven (Lehnerdt, Hoffmann et al., 2010).

1.3. Kallikrein-Kinin-System

1.3.1. Bradykinin und seine Rezeptoren BKBR1 und BKBR2

Bradykinin ist ein Peptid- und Gewebshormon der Kiningruppe, bestehend aus 9 Aminosäuren: $\text{H}_2\text{N-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-COOH}$. Neben Blutdruckregulierung, Schmerzvermittlung und Tonusänderung der glatten

Muskulatur (Roberts and Gullick, 1989), spielt Bradykinin auch eine entscheidende Rolle bei der Proliferation und Migration von HNSCC (Zhang, Bholá et al., 2008). Bradykinin entsteht im Rahmen des Kallikrein-Kinin-Systems. Durch enzymatische Aktivierung durch Kallikrein werden vasoaktive Kinine aus den inaktiven Vorläuferproteinen, den Kininogenen, freigesetzt. (Clements and Mukhtar, 1997). Zu den vasoaktiven Kininen zählen Bradykinin und Kallidin, wobei Bradykinin aus high-molecular-weight kininogen (HK) gebildet wird und Kallidin aus low-molecular-weight kininogen (Guo and Colman, 2005).

Der Abbau von Bradykinin erfolgt zum einen durch Carboxypeptidase N und Aminopeptidase P, vor allem aber durch das Angiotensin-converting-Enzyme, welches auch im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) eine entscheidende Rolle spielt. Die Entstehung und der Abbau von Bradykinin sind in folgender Grafik dargestellt, wobei auch der Zusammenhang von Kallikrein-Kinin-System und RAAS gezeigt wird.

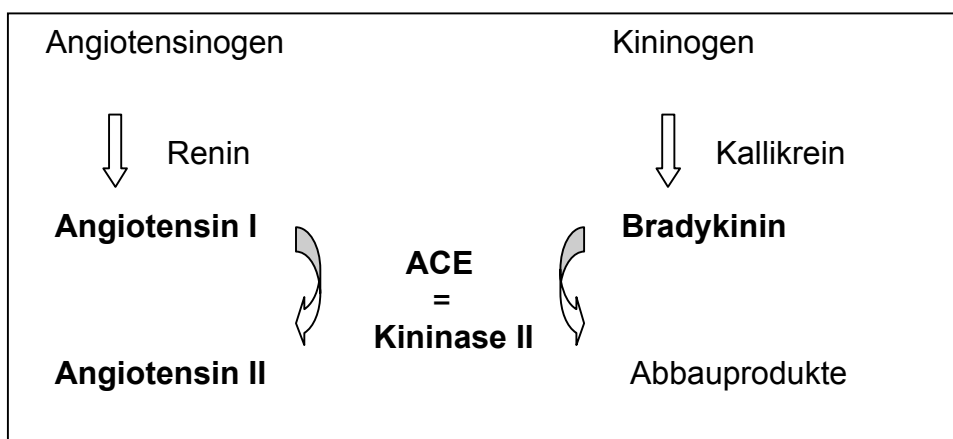


Abbildung 2: Entstehung und Abbau von Bradykinin und der Zusammenhang mit dem Renin–Angiotensin-Aldosteron-System

Es sind zwei Arten von Bradykininrezeptoren bekannt: BKB1R und BKB2R. Bradykinin selbst ist Agonist am B2-Rezeptor und hat keine Affinität zum B1-Rezeptor, kann aber zu des-Arg9-Bradykinin metabolisiert werden, welches diesen Rezeptor dennoch aktiviert. B1 wird nur bei Gewebeverletzung exprimiert und scheint laut aktueller Literatur bei der Tumorentstehung keine Rolle zu spielen. Im Gegensatz zum B2-Rezeptor soll der B1-Rezeptor weder bei HNSCC überexprimiert

sein, noch konnte gezeigt werden, dass er die für die Tumorentstehung entscheidenden Signalwege aktiviert (Zhang, Bhola et al., 2008).

Der Bradykinin B2-Rezeptor dagegen ist konstitutiv aktiviert. Zudem lässt seine Hochregulierung in Kopf-Hals-Tumorzellen auf den Einfluss bei der Tumorregulierung schließen.

Beide Bradykininrezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR). Sie sind heptahelikale Transmembranproteine und dienen zur Aktivierung von GTP-bindenden Proteinen und deren Signalwege, die die Tumorentstehung implizieren (Zhang, Bhola et al., 2008).

Der Bradykinin-Rezeptor B2 und seine Überexprimierung bei HNSCC sind somit der Bezugspunkt für die Signalwege der Mitogen-activated Protein Kinase und der Proteinkinase B/ AKT, die Überleben, Wachstum und womöglich Migration und Invasion von Tumorzellen beeinflussen.

Entscheidend für diese Arbeit sind deshalb der MAPK-Signalweg und die PI3K-abhängige Aktivierung der Proteinkinase B/ AKT, auf die nun genauer eingegangen wird:

1.3.2. Mitogen-activated Protein Kinase-Signalweg (MAPK)

Der MAPK-Signalweg gilt als Schlüsselkaskade der Signaltransduktion von Tumorzellen. Bradykinin führt über die Aktivierung des G-Protein-gekoppelten Rezeptors Gq11 zu einem intrazellulären Anstieg von Ca^{2+} und zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC). Aus der B2-Aktivierung resultiert eine Zytosol-Membran-Translokation der herkömmlichen PKC α zu neuen Isoformen PKC δ und ϵ . Sowohl der intrazelluläre Ca^{2+} -Anstieg als auch die Proteinkinase C-Isoformen δ und ϵ dienen ebenso wie die Oncogen-Produkte ras und v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1 (raf-1) als Regulatoren der Mitogen-activated Protein Kinase/ Mitogen-activated Protein Kinase Kinase (MAPK/ MEK), die auf Zellkernebene Transkription fördern und so zellproliferative Effekte zeigen (Greco, Elia et al., 2005). Dass nur die neuen Isoformen der PKC δ und ϵ eine direkte Verbindung zum MAPK-Signalweg zeigen, wird deutlich dadurch, dass ihre Inhibition, aber nicht die der PKC α durch Gö 6976 zur Blockierung der MAPK führt (Greco, Storelli et al., 2006). Des

Weiteren wurde auch gezeigt, dass Bradykinin die Aktivierung des Epidermal Growth Factor-Rezeptors (EGF-Rezeptor) bedingt. Über die Rezeptor-Tyrosinkinase v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian) (src) und die Oncogene ras und raf-1 resultiert daraus schließlich wiederum die Phosphorylierung und somit Aktivierung der Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK).

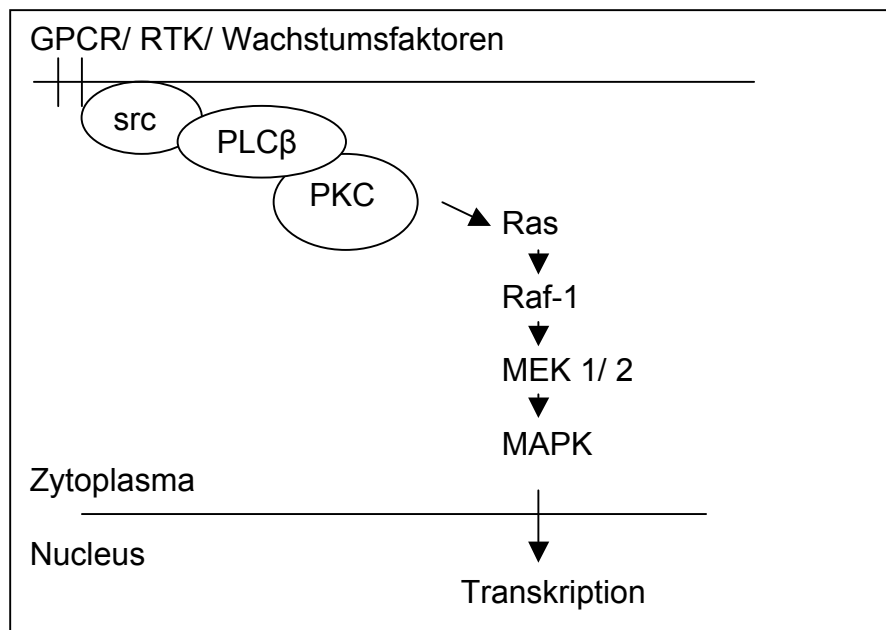


Abbildung 3: Darstellung des MAPK-Signalwegs

1.3.3. Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und Proteinkinase B (PKB/AKT)

Der PI3K/ AKT- Signalweg, welcher in dieser Arbeit ebenso eine entscheidende Rolle spielt, bedingt Zellwachstum, Proliferation und Überleben, ebenso wie Migration und Angiogenese (Greco, Storelli et al., 2006). So führt Bradykinin über seinen G-Proteingekoppelten B2-Rezeptor zur Aktivierung der PI3K, deren katalytische Untereinheit Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) phosphoryliert. Der Anstieg von PIP₃ führt zu einer Rekrutierung von AKT an die Plasmamembran und zu einer Aktivierung der Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase 1 (PDK1). Diese führt über die Phosphorylierung von Threonin308 und Serin473 schließlich zur Aktivierung von AKT, welche auch als Proteinkinase B bezeichnet

wird. Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten (PTEN) gilt als Antagonist der PI3K, indem es die Phosphorylierung von PIP2 zu PIP3 rückgängig macht. Folgende Grafik verdeutlicht die Signalkaskade von PI3K/ AKT:

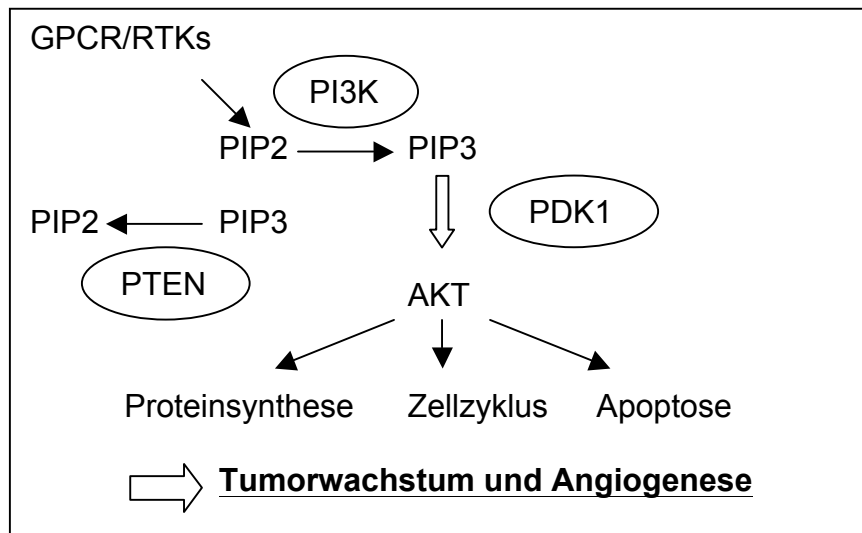


Abbildung 4: Darstellung der PI3K/ AKT-Signalkaskade und deren Wirkungsweise

Die Rekrutierung von AKT erfolgt unabhängig vom MAPK-Signalweg. Dies wird dadurch deutlich, dass die Phosphorylierung von AKT nicht durch PD98059, einem spezifischen Inhibitor von MEK1, blockiert werden kann. Wenn aber der PI3K-Signalweg durch seinen spezifischen Inhibitor LY294002 blockiert ist, dann ist offenbar sowohl die BK-abhängige Phosphorylierung von AKT, als auch die Aktivierung von MAPK gedämpft. Daraus lässt sich schließen, dass die Aktivierung der PI3K der der MAPK vorgeschaltet ist (Greco, Storelli et al., 2006). In Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe zeigte sich eine Dephosphorylierung von PKB/AKT nach Zugabe des PI3K-Inhibitors LY294002, während nach Inhibition von MEK1 eine Herabregulation der phospho-MAP-Kinase zu verzeichnen war. Zudem sah man bei Blockade der PI3-Kinase eine verminderte Phosphorylierung von c-Raf. Diese Western Blot-Daten konnten die Ergebnisse von Zimmermann (Zimmermann and Moelling, 1999) und Moelling (Moelling, Schad et al., 2002) bestätigen, dass es eine Querverbindung zwischen dem PI3-Kinase- und dem MAP-Kinase-Signalweg gibt (Pickhard, Margraf et al., 2011).

Ebenso konnte durch Greco, Storelli et al. gezeigt werden, dass eine Inhibierung von PI3K/AKT die BK-abhängige Translokation von PKC δ und ϵ unterdrückt, womit deutlich wird, dass es eine PI3K/ AKT-abhängige Regulation der PKC gibt. Diese Ergebnisse deuten auf eine BK-induzierte Kreuzregulation zwischen PI3K/AKT und der PKC in Bezug auf die Regulierung der MAPK hin, wobei es diese Hypothese noch genauer zu untersuchen gilt.

Des Weiteren fördert Bradykinin über die Aktivierung des B2-Rezeptors auch die Entstehung von Cyclooxygenase-2 (COX-2), welche die Umformung von Arachidonsäure zu Prostaglandinen, vor allem Prostaglandin E2 (PG E2), katalysiert. PG E2 ist ein biologisch aktives Produkt, das Zellproliferation und Zellmotilität erhöht (Zhang, Bhola et al., 2008).

1.4. Ziel der Arbeit

Trotz neuer operativer Verfahren und Fortschritte in der Radiotherapie, können nur weniger als die Hälfte der Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren geheilt werden (Goerner, Seiwert et al., 2010). Deshalb wird den molekularen Therapiemöglichkeiten in der aktuellen Forschung immer mehr Bedeutung zugeschrieben. Die Blockade des EGFR mit Cetuximab wird bereits in der Klinik als Therapie eingesetzt (Sharafinski, Ferris et al., 2010). In der Literatur konnte gezeigt werden, dass auch das Kallikrein-Kinin-System einen weitreichenden Einfluss auf die Tumorbilogie hat (Ikeda, Hayashi et al., 2004). Studien verdeutlichen, dass Bradykinin, ein Nonapeptid, das im Rahmen des Kallikrein-Kinin-Systems aus Kininogen freigesetzt wird, zu vermehrtem Tumorzellwachstum und zu einer gesteigerten Proliferation (Greco, Elia et al., 2005), ebenso wie zu verstärkter Invasivität führt (Montana and Sontheimer, 2011).

Zudem resultiert auch die Bestrahlung in einem veränderten biologischen Verhalten der Tumorzellen, so dass bei Gliomen (Wild-Bode, Weller et al., 2001) und Plattenepithelkarzinomzellen (Pickhard, Margraf et al., 2011) eine strahleninduzierte Migration vermutet werden kann.

Die Zielsetzung dieser Arbeit soll folgende Aspekte beinhalten:

- 1) An 9 Plattenepithelkarzinomzelllinien soll der Effekt des Kallikrein-Kinin-Systems auf das biologische Verhalten der Tumorzellen gezeigt werden, wobei vor allem auf Proliferation, Überleben, Invasion und Migration genauer eingegangen werden soll. Dazu werden die Zellen vor den Versuchen mit Bradykinin stimuliert. Zudem soll der Bradykinin B2-Rezeptor durch die Zugabe von HOE140, einem spezifischen Antagonisten, blockiert werden.
- 2) Es soll bewiesen werden, ob die Bestrahlung einen Effekt auf die Tumorbiologie zeigt, und ob dieser Effekt durch die Stimulation oder die Inhibition des Bradykinin B2-Rezeptors beeinflusst werden kann.
- 3) Zuletzt sollen die intrazellulären Signalwege genauer untersucht werden, um ein biochemisches Korrelat zum biologischen Tumorzellverhalten aufzeigen zu können.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Zelllinien

Die Versuche wurden mit insgesamt 9 verschiedenen Plattenepithelzelllinien des Kopf-Hals-Bereichs (HNSCC) durchgeführt. In Tabelle 10 sind die verwendeten Zelllinien mit Tumorlokalisierung, TNM-Klassifikation/ Grading und weiteren Informationen zum Patienten aufgeführt (Lin, Grandis et al., 2007).

Name der Zelllinie	Tumorlokalisierung	TNM/ Grading	Geschlecht/ Alter/ Status des Pat.
CAL27	Zunge	G3	m/ 56
HN	Weicher Gaumen	G2	m/ 60
UD-SCC-3	Lymphknotenmetastase (Larynx)	T2N2cM0/ G3	m/ 45
UD-SCC-4	Oropharynx/ Zungengrund	pT3N1M0/ G2	m/ 47
UD-SCC-5	Supraglottischer Bereich	T1N1M0/III	m/ 44
UD-SCC-6	Zunge	T2N0M0	m/ 64
UD-SCC-7	Oropharynx	T2N2bM0	?
DDP	?	?	?
HLAC	Larynx	?	m/?

Tabelle 10: verwendete Zelllinien

2.1.2. Zellkulturmedien und Zusätze

Alle Zelllinien wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium bei 37° Celsius im CO₂-Inkubator mit 5% CO₂ und 2% rH kultiviert. Dem DMEM-Medium sind 10% fetales

Kälberserum und 2mM Glutamin sowie 100U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin zugesetzt.

Die Medien und weitere für die Zellkultur benötigte Zusätze sind in Tabelle 11 zusammengefasst, ebenso wie Firmenname und deren Sitz.

Reagenzien für die Zellkultur	Firma und Firmensitz
Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium	GIBCO, Invitrogen, Darmstadt
L-Glutamin 200mM	Biochrom AG, Berlin
Penicillin-Streptomycin-Lösung (10000 Einheiten/ml Penicillin und 10000µg/ml Streptomycin)	Biochrom AG, Berlin
Accutase	PAA Laboratories, Pasching, Austria
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biochrom AG, Berlin
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Phosphat-buffered Saline (PBS)	PAA Laboratories, Pasching, Austria

Tabelle 11: Auflistung der in der Zellkultur verwendeten Medien und Supplemente

2.1.3. Wachstumsfaktoren und Inhibitoren

Tabelle 12 zeigt die in der Arbeit verwendeten Wachstumsfaktoren und Inhibitoren.

Wachstumsfaktor/ Inhibitor	Hersteller	verwendete Konzentration
Epidermal Growth Factor (EGF)	Biomol, Hamburg	10ng/ml
Bradykinin	Alexis Biochemicals, Enzo Life Sciences, Lörrach	1µM/ml
HOE140	Biomol, Hamburg	1µM/ml
Tyrphostin AG1478	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim	10µM/ml

Tabelle 12: Wachstumsfaktoren und Inhibitoren

2.1.4. Antikörper

Die in meiner Arbeit verwendeten Antikörper sind in folgender Tabelle aufgeführt:

Primär-Antikörper

Antikörper	Hersteller	Verdünnung	Gewicht
Bradykinin B1- Rezeptor	US Biological, Biomol, Hamburg	1:1000	35 kDa
Bradykinin B2- Rezeptor	US Biological, Biomol Hamburg	1:1000	75-80 kDa
phospho-AKT Ser473	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA	1:2000	60 kDa
phospho-MAPK Thr202/Tyr204	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA	1:2000	42/44 kDa
pEGFR Tyr1086	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA	1:2500	170 kDa

Tabelle 13: Primär-Antikörper

Sekundär-Antikörper

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Anti-Rabbit-HRP-linked	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers	1:5000
Anti-Mouse-HRP-linked	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers	1:10000
Anti-Goat HRP-linked	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz California	1:5000

Tabelle 14: Sekundär-Antikörper

2.1.5. Kits

In Tabelle 15 sind die verwendeten Kits aufgelistet:

Kit	Firma und Firmensitz
Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific, Rockford, USA
BD BioCoat Matrigel Invasion Chamber	BD Biosciences, Erembodegem, Belgium

Tabelle 15: Kits

2.1.6. Reagenzien

Tabelle 16 enthält alle in meiner Arbeit verwendeten Reagenzien:

Reagenzien	Firma und Firmensitz
Glycin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Tween 20	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Methanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Tris	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Chlorwasserstoff (HCl)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, 1,2-Bis(dimethylamino)-ethan (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
ϵ -Amino-n-caproic Acid	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Non-fat skimmed milk powder	Biomol GmbH, Hamburg
Cell Lysis Buffer (10x)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Bovine Serum Albumin (BSA)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Protein Assay, Farbstoffkonzentrat	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Proteinmarker: PageRuler Prestained	Fermentas Inc., Glen Burnie

Protein Ladder Plus	
Crystal violet	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

Tabelle 16: verwendete Reagenzien

2.1.7. Puffer und gemischte Reagenzien

Puffer	Zusammensetzung der gemischten Reagenzien
0,01% Triton X-100	10µl Triton X-100 → ad 100ml Dulbecco's PBS
1M Tris-Cl, pH 8,8	12,1g Tris (Base) → ad 100ml Aqua dest → mit Essigsäure auf pH 8,8
1M Tris-Cl, pH 6,8	12,1g Tris (Base) → ad 100ml Aqua dest → mit Essigsäure auf pH 6,8
10% SDS	10g Sodiumdodecylsulfat → ad 100ml Aqua dest
10% APS	1g Ammoniumperoxidsulfat → ad 10ml Aqua dest
20% Methanol	200ml Methanol → ad 800ml Aqua dest
10% Tween	100ml Tween 20 → ad 900ml Aqua dest
10 x TBS	24,2g Tris (Base) 80g NaCl → pH mit Essigsäure auf 7,6 einstellen → mit Aqua dest auf 1l auffüllen
1xTTBS (Waschpuffer)	10ml 10% Tween 20 100ml 10 x TBS

	→ mit Aqua dest auf 1l auffüllen
Blocking Puffer	200ml 1 x TTBS 10g Non-fat skimmed milk powder
0,2mg/ml Bovine Serum Albumin	0,2µl BSA → ad 1ml 0,01% Triton X-100
Laemmli-Probenpuffer	3,125ml Tris-OH/HCl pH 6,8 1g SDS 5ml Glycerin 386mg Dithiothreitol 0,5ml 1% Bromphenolblau → mit Aqua dest auf 10ml auffüllen
SDS-Laufpuffer	15,15g Tris (Base) 70,21g Glycin 100ml 10% Sodiumdodecylsulfat → mit Aqua dest auf 500ml auffüllen
Anodenpuffer I, pH 10,5	18,16g Tris (Base) 100ml 20% Methanol → mit Aqua dest auf 500ml auffüllen
Anodenpuffer II, pH 10,4	1,51g Tris (Base) 100ml 20% Methanol → mit Aqua dest auf 500ml auffüllen
Kathodenpuffer, pH 7,5	1,51g Tris (Base) 100ml 20% Methanol 2,62g ε-Amino-n-caproic Acid → mit Aqua dest auf 500ml auffüllen

Tabelle 17: Puffer und Zusammensetzung der gemischten Reagenzien

2.1.8. Geräte und Laborausstattung

In folgender Tabelle sind die bei meiner Arbeit verwendeten Geräte aufgelistet, ebenso wie die notwendige Laborausstattung.

Geräte	Firma und Firmensitz
Cellometer Auto T4	PeqLab, Erlangen
Thermomixer comfort 1,5ml	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Research-Pipetten 1000µl, 200µl, 100µl, 20µl, 10µl	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge 5430R	Eppendorf AG, Hamburg
MS2 Minishaker	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Magnetrührer RCT basic	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Pipettus-akku Accu-jet Pro	Brand, Wertheim
Schüttler/ Mischer Vibrax VXR	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Trans-Blot Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Mini-PROTEAN 3 Cell (Gelkammern)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Power Pac 300 Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Scaltec Rezeptureinwaage SBC21	Scaltec, Göttingen
Entwicklermaschine für die Röntgenfilme: SRX-101A	Konica Minolta GmbH, Unterföhring
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Mikroskop Leica DMI 6000B	Leica Microsystems
Cleanbench: Hera Safe KS	Thermo Scientific, Langenselbold
CO ₂ -Inkubator Hera Cell 150i	Thermo Scientific, Langenselbold
Absaugpumpe Vacuubrand LE2	Vacuubrand, Wertheim
Liebherr Gefrierschrank no frost premium	Liebherr, Bulle, Schweiz
Liebherr Kühlschranks comfort	Liebherr, Bulle, Schweiz
ELISA Reader Multiscan FC	Thermo Scientific, Langenselbold
Gulmay medical Bestrahlungsgerät	Byfleet Surrey, United Kingdom
Pipetman	Gilson, Middletown USA
Peqette	PeqLab, Erlangen
Leica DFC 425C	Leica Microsystems, Wetzlar
pH-Meter 766, Calimatic	Knick, Berlin
Taumel-Rollenmischer	A. Hartenstein, Würzburg
Canon Scanner Multiscan	Canon, Krefeld

Tabelle 18: Geräte und Laborausstattung

2.1.9. Verbrauchsmaterial

Im Anschluss sind die Verbrauchsmaterialien meiner Arbeit in tabellarischer Form aufgeführt.

Verbrauchsmaterial	Firma und Firmensitz
Pipetten-Spitzen 1000µl, 100µl, 20µl, 10µl	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
15ml Reaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
50ml Reaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Biosphere Micro Tubes 1,5ml	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Serologische Pipetten 25ml, 10ml, 5ml	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Tissue Culture Dish 100x20mm	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Tissue Culture Dish 150x20mm	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Tissue Culture Plate 6-well	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Tissue Culture Plate 24-well	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Tissue Culture Plate 96-well	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Pasteurpipetten aus Glas	Brand GmbH + Co KG, Wertheim
Röntgenfilme Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare München
Whatmann Gel Blotting Papier	Carl Roth AG, Karlsruhe
ImmobilonP Transfer Membranes = Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran	Millipore GmbH, Schwalbach
Toppits Frischhaltefolie	Melitta Unternehmensgruppe Bentz KG, Minden

Tabelle 19: Verbrauchsmaterial

2.1.10. Computerprogramme

Computerprogramme	Firma und Firmensitz
Leica Application Suite LAS V3.7	Leica Microsystems, Wetzlar
Windows Office 2007	Microsoft Corporation, Redmond
Photoshop CS5, Adobe	Adobe Systems GmbH, München
Prism 5.0	GraphPad Software, La Jolla, USA

Tabelle 20: Computerprogramme

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

2.2.1.1. Auftauen

Nach dem Auftauen im Wasserbad bei 37° Celsius wurde die Zellsuspension in einem Falcon mit 5ml DMEM-Medium gemischt, um das DMSO zu verdünnen und dessen toxische Wirkung zu beseitigen. Anschließend wurden die Zellen auf 10cm-Kulturschalen mit je 7ml DMEM-Medium ausgesät und bei 37° Celsius im CO₂-Inkubator mit 5% CO₂ und 2% rH inkubiert.

2.2.1.2. Mediumwechsel

Nach dem Aussähen der Zellen erfolgte in der Regel nach zwei Tagen ein Mediumwechsel. Dazu wurde das in den Kulturschalen vorhandene Medium abgesaugt und durch frisches ersetzt.

Wurde beim Mediumwechsel auf serumfreies Medium gewechselt, so wurden die Zellen nach Absaugen des alten Mediums mit 1x PBS gespült und anschließend mit serumfreiem Medium versehen.

2.2.1.3. Splitten

Der Zeitpunkt des Splittens war abhängig vom Proliferationsverhalten der Zellen. Nach etwa 2 bis 3 Tagen Inkubation war eine Konfluenz von 80% erreicht, so dass die Zellen gesplittet werden konnten. Nach Absaugen des Mediums und Spülen mit 1x PBS, gab man 2ml Accutase in die Kulturschale und inkubierte diese 3-5 min im Brutschrank. Zu den abgelösten Zellen gab man 4ml frisches Medium und überführte die Zellsuspension in ein Zellkulturröhrchen. Nach mehrmaligem Durchmischen der resuspendierten Zellen verteilte man diese auf neue Kulturschalen mit 7ml frischem Medium, schwenkte diese und inkubierte sie bei 37° Celsius im CO₂-Inkubator.

Durch Splitten und regelmäßigen Mediumwechsel wurden die Zellen auf eine Konfluenz von ca. 80% kultiviert, um schließlich im Rahmen der Experimente mit Wachstumsfaktoren und Inhibitoren behandelt zu werden.

2.2.1.4. Einfrieren

Zum Einfrieren der Zellen wurde ein Einfriermedium bestehend aus 47,5ml FCS und 2,5ml DMSO (5%) verwendet. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit 4ml 1x PBS gespült und schließlich trypsiniert. Nach drei- bis fünfminütiger Inkubation im Brutschrank wurde zu den abgelösten Zellen 4ml frisches Medium zugegeben. Die Zellsuspension wurde in Zellkulturröhrchen überführt. Nach 2 Minuten Zentrifugieren bei 21° Celsius und 1800 rpm wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet konnte in Einfriermedium resuspendiert und anschließend in Kryoröhrchen pipettiert werden. Nach kurzzeitigem Lagern auf Eis erfolgte ein Herunterkühlen auf -20° Celsius für eine Nacht. Gelagert wurden die Zellen in Stickstoff.

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). Das Tier- und Zellbestrahlungsgerät der Firma Gulmay

Medicals wurde für die Experimente mit Filter 3 auf 70kV und 10mA eingestellt. Die Tischhöhe betrug 490 (Die Einstellung erfolgt am Gerät; eine Einheit hierzu ist nicht bekannt). Die verschiedenen Bestrahlungsintensitäten wurden analog zur Dauer der Bestrahlung erreicht.

8 Gray → 6min 51sec

In der Zellkultur wurden die Zellen auf die Bestrahlung vorbereitet, so dass diese eine Konfluenz von ca. 80% erreichten. In Vorversuchen wurden zunächst alle Experimente mit FCS-haltigem Medium bzw. serumfrei durchgeführt, um die eventuelle wachstumsstimulierende Wirkung des Kälberserums auszuschließen. Serumfreie Bedingungen wurden 24h vor Bestrahlung geschaffen. Da sich hierbei kein Unterschied beim Wachstumsverhalten der Zellen zeigte, wurden daraufhin die folgenden Versuche ausschließlich mit FCS-haltigem Medium durchgeführt.

In verschiedenen Ansätzen wurden die Zellen jeweils mit den Substanzen EGF, Bradykinin, HOE140 und der Kombination aus Bradykinin und HOE140 behandelt.

Ein Bestrahlungsexperiment setzte sich aus vier Ansätzen zusammen. Jeder Ansatz wurde bei allen Zelllinien gleich durchgeführt. Im Anschluss wird der Ablauf des Experiments erläutert:

Nach Durchführung einer Kinetik wurden die nachfolgenden Inhibitoren und Wachstumsfaktoren zu unterschiedlichen Zeitpunkten zugegeben. 30 Minuten vor Bestrahlung wurde 1µM/ml HOE140 in das Medium gegeben, 15 Minuten vor Bestrahlung 1µM/ml Bradykinin und fünf Minuten vor Bestrahlung wurden 10ng/ml EGF dem Medium zugemischt. Es wurden jeweils zwei Schalen verwendet, so dass parallel zur bestrahlten Schale eine unbestrahlte Schale als Kontrolle mitbeurteilt werden konnte. Als letzter Ansatz wurden weitere 2 Schalen sowohl mit Bradykinin als auch mit dessen Inhibitor HOE140 versetzt. Zur Verdeutlichung ist der Versuchsaufbau in Abbildung 5 dargestellt.



Abbildung 5: Darstellung der 10cm-Kulturschalen mit den jeweiligen Konzentrationen

Die in der Zellkultur vorbereiteten Ansätze aller Zelllinien mit EGF, Bradykinin, HOE140 und die Kombination aus Bradykinin und HOE140 wurden mit je 2, 5 und 8 Gray bestrahlt. Für jede Strahlendosis wurde zudem eine Kontrolle mitgeführt.

2.2.3. Proteinisolierung

Um den Einfluss der Bestrahlung im Western Blot darstellen zu können, mussten zunächst die Proteine der zu vergleichenden Zellen isoliert werden. Proteinlysate wurden jeweils 1 und 24 Stunden nach Bestrahlung, beziehungsweise zur Kontrolle auch ohne Bestrahlung hergestellt. Zunächst wurde der benötigte Lysepuffer vorbereitet. Dazu pipettierte man 4,5ml entmineralisiertes Wasser, 50µl PMSF in einer Konzentration von 1mM und 500µl des vorher 1:10 verdünnten Lysepuffers in ein Reaktionsgefäß, welches auf Eis gestellt wurde. Der 10x Lysepuffer wurde somit 1:10 verdünnt und reichte für die Isolierung von zehn 10cm-Schalen.

Zur Isolierung wurden die Zellen aus dem Inkubator entnommen und mit kaltem PBS gespült. Anschließend gab man 500µl Lysepuffer auf den Zellrasen. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen vom Boden der Zellkulturschale herunter gekratzt und in ein 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte die Zentrifugation 15 min lang bei 4° Celsius und 10000 rpm. So wurden die Membranbestandteile vom Überstand getrennt, welcher nun abpipettiert und in 1,5ml Reaktionsgefäße bei -20° Celsius eingefroren wurde. Nach Abschluss der Proteinisolierung hatte man eingefrorene Lysate von jeder Zelllinie in folgender Ausführung:

ctrl	EGF	BK	HOE140	comb.
ctrl 8Gy 1h	EGF 8Gy 1h	BK 8Gy 1h	HOE 8Gy 1h	comb. 8Gy 1h
ctrl 8Gy 24h	EGF 8Gy 24h	BK 8Gy 24h	HOE 8Gy 24h	comb. 8Gy 24h

Tabelle 21: Versuchsaufbau Proteinisolierung

2.2.4. Bradford-Assay

Die Methode des Bradford-Assays (Bradford 1976) diente zur Bestimmung der quantitativen Proteinmenge in den vorher isolierten Lysaten. Im Anschluss konnten so die exakten Proteinmengen mit Ladepuffer versehen und im Western Blot verarbeitet werden. Ziel des Bradford-Assays war es, dass 10µg Gesamtprotein geladen werden können.

Zunächst wurden die Lysate mit PBS 1:10 verdünnt. Zur Messung der Probelösungen wurden im Anschluss je 180µl 1x PBS, 200µl 0,01% Triton X-100 und 20µl aus den 1:10 verdünnten Lysaten zusammen gemischt. Das Bradford Reagenz wurde 1:4 mit 1x PBS verdünnt, wobei die Menge von der Probenzahl abhängig war. Um eine Kalibrierungskurve für die spätere Messung zu erhalten, wurden nun die Standardlösungen aus 0,2mg/ml Bovine Serum Albumin und 0,01% Triton X-100 hergestellt.

Nach Zugabe von 600µl 1:4 verdünntem Bradford Reagenz zu den Probe- und Standardlösungen, wurden die Proben zur Messung im Photometer in eine 96-well-Platte umpipettiert. Nach kurzem Durchmischen und 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Messung der Extinktion bei 595nm. Die Werte der optischen Dichte der nun blau gefärbten Lösungen wurden in Excel exportiert. So konnte die anhand der Standardlösungen erstellte Kalibrierungskurve zur Berechnung der Proteinkonzentration jeder einzelnen Probe dienen.

2.2.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde in der Analyse von Proteinen verwendet. Es handelte sich hierbei um ein Verfahren, bei dem die Proteine der Größe nach aufgetrennt werden (Laemmli, 1970).

Zunächst mussten die Gele hergestellt werden, die aus zwei Komponenten bestanden: dem Trenngel und dem Sammelgel. Die Zusammensetzung des Trenngels, welches als erstes benötigt wurde, ist in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Trenngel 10% Dichte	
Acrylamid/ Bis	2,66ml
1M Tris-Cl pH 8,8	2ml
aqua dest	3,32ml
10% SDS	60µl
10% APS	30µl
TEMED	20µl

Tabelle 22: Zusammensetzung des Trenngels 10%

Die Reagenzien wurden zusammen pipettiert und in die Gelkammern gegossen, bis diese zu etwa 2/3 aufgefüllt waren. Im Anschluss wurde das Gel mit Aqua dest überschichtet und 45 Minuten bei Raumtemperatur zur Polymerisation belassen.

Nun wurde das aqua dest durch das Sammelgel, dessen Zusammensetzung in Tabelle 22 dargestellt ist, ersetzt und die Kammschablonen hinzugefügt. Diese bildeten später die Taschen zum Auftragen der Proteinlysate.

Sammelgel 5% Dichte	
Acrylamid/ Bis	836µl
1M Tris-Cl pH 6,8	626µl
Aqua dest	3,5ml
10% SDS	50µl
10% APS	25µl
TEMED	10µl

Tabelle 23: Zusammensetzung des Sammelgels 5%

Nach 15 Minuten Polymerisationsdauer konnten die Gele entweder sofort beladen werden oder zur Verwendung am folgenden Tag über Nacht im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt werden.

Nach dem Auftauen der Proteinlysate wurden die mit der Bradford-Methode berechneten Lysatmengen für 10µg Protein pro Probe mit 5x Sample Puffer gemischt und 5 Minuten bei 98°C im Thermomixer denaturiert. Nach dem Abzentrifugieren konnte nun der gesamte Probensatz auf das Gel aufgetragen werden. Als Größenstandard wurde auf jedes Gel 3µl Proteinmarker in die jeweils letzte Kammer hinzugefügt. Bei 90 bis maximal 120 Volt lief das Gel über einen Zeitraum von 2 bis 3 Stunden, wobei die Laufzeit von der Proteingröße abhing.

2.2.6. Western Blot

Der Semi-dry Blot diente dazu, die in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine mit einem Antikörper nachzuweisen. Dazu wurden die Proteine von dem Gel auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen (Kyhse-Andersen, 1984).

Nach Abschluss der SDS-Gelelektrophorese wurden nun die Bestandteile für den anschließenden Western Blot vorbereitet. Benötigt wurden neben Whatmann-Filterpapier, Nitrozellulosemembranen (in der Größe 9 x 4,5cm) und Methanol auch die Reagenzien Anodenpuffer I, Anodenpuffer II und Kathodenpuffer.

Um den elektrophoretischen Transfer der Proteine auf die Membran zu gewährleisten, war folgender Blot-Aufbau notwendig:

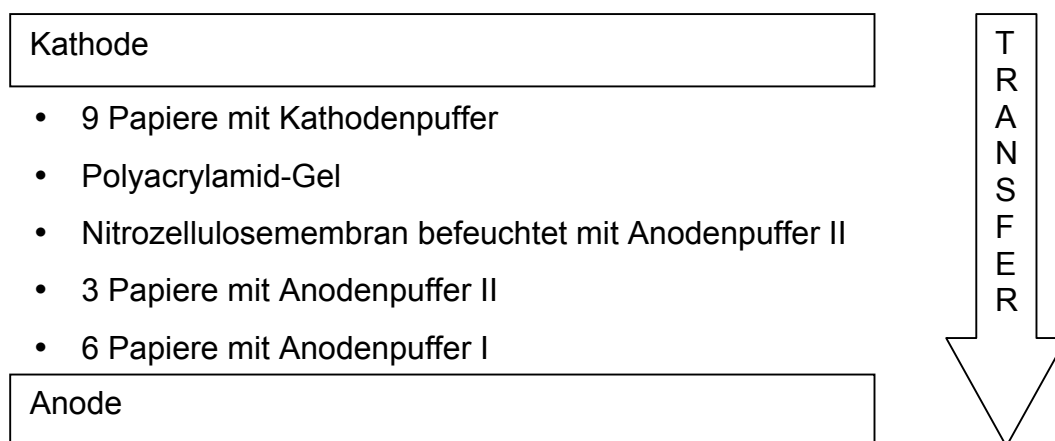


Abbildung 6: Schematische Darstellung des elektrophoretischen Transfers der Proteine

Der Transfer erfolgte 1 Stunde 20 Minuten bei 0,25A. Zur Orientierung wurden die Membranen markiert und kurz in 1x TTBS inkubiert. Anschließend standen sie zur Immundetektion zur Verfügung.

2.2.7. Immundetektion

Der Immunnachweis diente zur Darstellung der Proteinbanden mittels spezifischer Antikörper. Dazu wurden die Membranen in 50ml Falcons gerollt und mit 10ml Magermilchpulver in 1x TTBS geblockt. In den Blocking Puffer pipettierte man nun den Antikörper, wobei die Verdünnung antikörperspezifisch war. Die verwendeten Antikörper mit ihrer Herkunft und Verdünnung sind in Tabelle 13 dargestellt.

Über Nacht wurden die Membranen auf einem Rollenmischer bei 4° C inkubiert.

Am folgenden Tag erfolgten zunächst 3 Waschschritte in 1x TTBS à 7 Minuten. Erneut wurden die Membranen in 50ml Falcons gerollt und mit 10ml Sekundärantikörperlösung eine Stunde bei 4° C auf dem Rollenmischer inkubiert. Der Sekundär-Antikörper ist HRP konjugiert und wurde mit einer Verdünnung von 1:10000 dem Blocking Puffer zugegeben. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Membranen wieder dreimal für jeweils 7 Minuten gewaschen. Zeitgleich wurde die immunfluoreszierende Lösung (ECL Detection System) im Verhältnis von 1:1 gemischt. Nach dem letzten Waschgang wurden die Membranen jeweils 1 Minute in der ECL Lösung inkubiert, so dass die Peroxidase-gekoppelten Proteine markiert und anschließend durch Auflegen eines Röntgenfilmes in der Dunkelkammer sichtbar gemacht werden konnten.

2.2.8. Proliferations-Assay

Der Crystal Violet ELISA ist ein Proliferations- und Zytotoxizitätstest und diente der Darstellung der Proliferation von Zellen. Mittels Formalin und des Farbstoffes Crystal Violet wurden die Zellen fixiert und angefärbt, so dass zu vier Zeitpunkten (nach 0h, 24h, 48h und 96h) der Anteil lebender Zellen gegenüber des gesamten Zellrasens

gemessen werden konnte. Das Anfärben kann nämlich nur erfolgen, wenn das Membranpotential der Zellen vor der Fixierung erhalten ist, das heißt, dass die Zellen vital und unbeschädigt sind. Crystal Violet bindet an den nicht mit Histonen verbundenen DNS-Anteilen, wobei die Kristallviolett färbung der Zellkerne direkt proportional zu deren DNS-Gehalt ist (Noeske, 1966).

Die Zellen wurden für die Versuche wieder mit EGF und Bradykinin, sowie dem Bradykinin B2-Rezeptor-Inhibitor HOE140 und der Kombination aus Bradykinin und HOE140 behandelt. Zunächst wurde eine Konzentrationskinetik mit Bradykinin und HOE140 durchgeführt, um konzentrationsabhängige Effekte zu erkennen und diese bei den Versuchen zu berücksichtigen.

Die Kinetik wurde nach folgendem Versuchsaufbau durchgeführt.

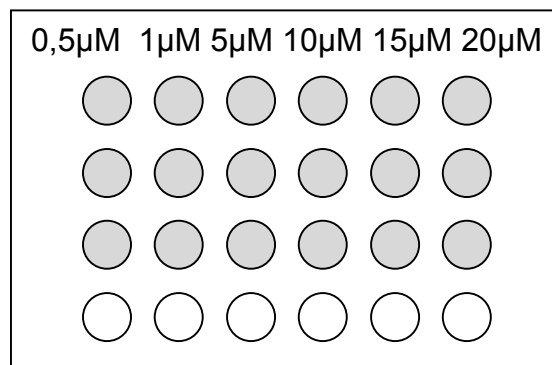


Abbildung 7: Kinetik der Inhibitoren, durchgeführt an den Zelllinien Cal27 und HN

Nach Auswertung der Kinetik wurde die Konzentration der Wachstumsfaktoren und Inhibitoren auf 1µM/ml für die weiteren Experimente festgelegt, da sich so eine adäquate Proliferationskurve darstellen lässt.

Für die Hauptversuche wurden pro Zelllinie vier 24-well-Platten vorbereitet, die 0h, 24h, 48h und 72h nach Bestrahlung ausgewertet werden sollten. Zudem wurde pro Zeitpunkt eine unbestrahlte Platte als Kontrolle mitgeführt. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 8 dargestellt.

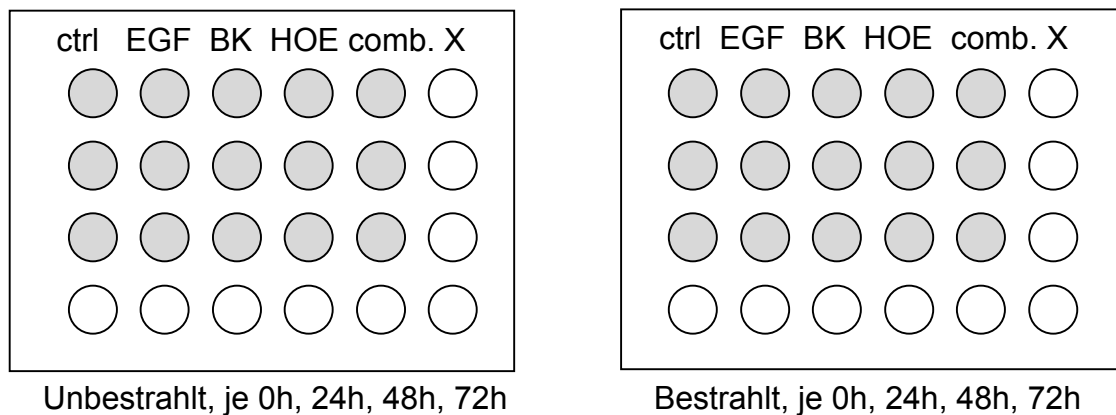


Abbildung 8: Versuchsaufbau Crystal Violet Elisa; unbestrahlt und bestrahlt

Nach Ablösen der Zellen mit Accutase von der Kulturschale wurden pro 24-well 2.5×10^4 Zellen ausgesät. Die Zelllinien wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden die Substanzen anhand der vorher berechneten Konzentrationen für die verschiedenen Zeitpunkte 24h, 48h und 72h zugegeben. Zeitgleich wurde der 0h-Wert gemessen, also 0h unbestrahlt und bestrahlt. Dazu wurden die Zellen in den 24-wells mit $500\mu\text{l}$ 4%igem Formaldehyd fixiert. Nach 30 Minuten wurden die wells je zweimal mit $500\mu\text{l}$ 0,5% Triton-X100/PBS und aqua dest. gespült, bevor sie mit Crystal Violet angefärbt wurden. Nach erneuten 30 Minuten Einwirkzeit wurden die wells zweimal mit Aqua dest. gespült. Zuletzt wurde nun 1x SDS dazugegeben, welches die Zellen lysiert, so dass der vorher aufgenommene Farbstoff aus dem Zellinneren freigesetzt wurde. Nach 1 Stunde Inkubationszeit auf dem Rüttler wurden die Versuchsansätze auf eine 96-well-plate umpipettiert. So war eine dreimalige Messung jedes einzelnen 24-wells gewährleistet. Mittels ELISA-Reader konnte nun die optische Dichte der Lösung ermittelt werden. Die Absorptionwerte entsprachen der Proliferationsaktivität der Zellen.

Die Mittelwerte aus den 3 Messungen eines jeden Ansatzes wurden nun in GraphPad Prism 5.0 exportiert und mit Hilfe einer Grafik konnte so die Proliferationsaktivität der Zellen dargestellt werden.

2.2.9. Colony-Formation-Assay

Der Colony-Formation-Assay ist der Goldstandard um den Effekt zytotoxischer Substanzen auf Tumorzellen *in vitro* zu messen (Katz, Ito et al., 2008).

Dargestellt wurden Zellkolonien, die sich innerhalb von 10 Tagen nach Inkubation im Brutschrank entwickelt hatten, wobei zu Beginn des Experiments 5×10^3 Zellen auf eine 15cm Kulturschale ausgesät wurden. Tumorzellen, die in die Proliferation übergehen, sollten Kolonien bilden, die sich in Anzahl und Größe unterscheiden. Die fehlende Entstehung von Zellkolonien, basierend auf dem Prinzip, dass einige Zellen absterben bzw. in den Zellzyklusarrest übergehen, hing unter anderem von der Vorbehandlung der Zelllinien ab.

Zur Vorbereitung des Colony-Formation-Assays wurden je $2,5 \times 10^5$ Zellen auf 6-wells mit je 2ml Medium pro well ausgesät. Die Darstellung der 6-wells ist in Abbildung 9 gezeigt.

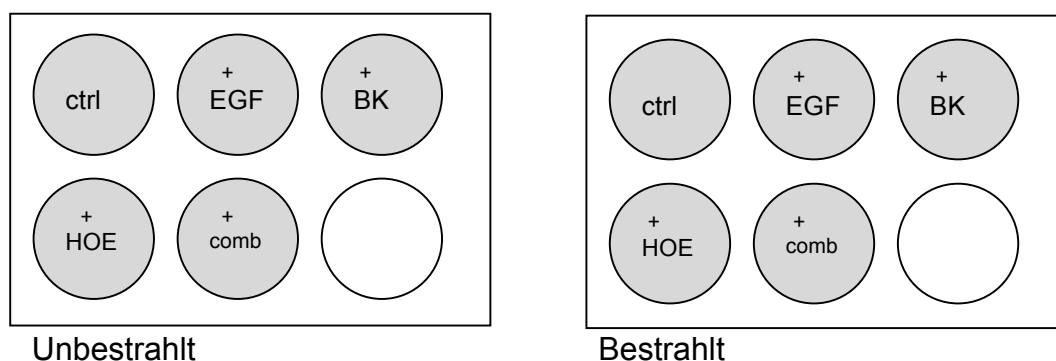


Abbildung 9: Versuchsaufbau Colony-Formation-Assay; unbestrahlt und bestrahlt

Nach Inkubation bei 37° Celsius über Nacht erfolgte am darauf folgenden Tag die Bestrahlung nach dem üblichen Verfahren mit 8Gy und einer Dauer von 6 Minuten 51 Sekunden. 1 Stunde nach der Behandlung wurden alle Zellen (sowohl unbestrahlt als auch bestrahlt) abgelöst und gezählt. Parallel dazu wurden 50ml Falcons mit je 20ml Medium vorbereitet, in welche die Substanzen hinzu pipettiert werden (im Detail: 10ng/ml EGF, 1µM/ml BK und 1µM/ml HOE140).

In die großen Falcons pipettierte man anschließend 5000 Zellen aus jeder 6-well-Platte, durchmischte kräftig und verteilte nun die gesamte Zellsuspension auf eine 15cm Kulturschale.

Nach 10-tägiger Inkubation im Brutschrank wurden die Kolonien mit 4% Formalin fixiert. Nach zweimaligem Spülen mit aqua dest konnten die Zellkolonien mit Crystal Violet angefärbt und anschließend ausgezählt werden.

2.2.10. Invasion

Anhand der Matrigel Invasionskammer mit 8µm großen Poren, sollte das Invasionsverhalten der Zellen dargestellt werden. Dazu wurden am Vortag zunächst 2×10^5 Zellen auf 6-wells ausgesät. Nach 24-stündiger Inkubation erfolgte die Zugabe der Substanzen nach bekanntem Protokoll. Pro Zelllinie gab es zwei 6-wells: eines wurde für die Bestrahlung vorbereitet, das zweite wurde als unbestrahlte Kontrolle mitgeführt. Vor der Bestrahlung wurden die bei -20° Celsius gelagerten Invasionskammern vorbereitet. Diese werden zunächst zwei Stunden vor dem Aussähen rehydriert, wobei dazu je 500µl Medium in die Bottom-wells und in die Inserts gegeben wurde. Anhand folgender Abbildung kann der Aufbau der Invasionskammern nachvollzogen werden.

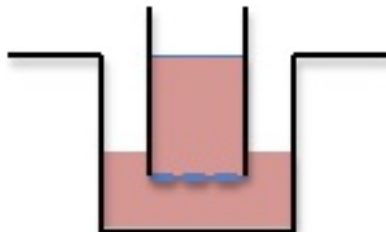


Abbildung 10: Seitenansicht der Invasionskammer. Außen das Bottom-well mit 750µl Medium mit den hinzugefügten Stimulatoren und Inhibitoren; innen das Insert mit der Poren-Membran, gefüllt mit 500µl Zellsuspension (in die Inserts werden lediglich die Inhibitoren zugegeben)

Nach der Bestrahlung mit 8Gy wurden sowohl die bestrahlten Platten, als auch die unbestrahlte Kontrolle für den Zeitraum von einer Stunde im Brutschrank inkubiert. Während dessen wurde das Medium für die Bottom-wells mit den Stimulatoren bzw. Inhibitoren versehen. Die Verdünnung der Substanzen erfolgte analog zu den bisher durchgeführten Versuchen. Pro Insert wurden je 2.5×10^4 Zellen ausgesät. Beim Verteilen der Zellen auf die Inserts galt es zu beachten, dass die Inhibitoren, nicht aber die Stimulatoren, sowohl in das Medium der Bottom-wells als auch in die Zell-

Verdünnung der Inserts gegeben werden mussten. Die Stimulatoren wurden im Gegensatz dazu nur in das Medium der Bottom-wells pipettiert. Das Volumen der Bottom-wells betrug 750µl pro well, das der Zellverdünnung für die Inserts 500µl.

	ctrl	EGF	BK	HOE140	comb.
Insert (500µl)	-	-	-	+ HOE140	+ HOE140
Bottom-well (750µl)	-	+ EGF	+ BK	+ HOE140	+ BK + HOE140

Tabelle 24: Tabellarische Darstellung des Versuchsaufbaus für die Matrigel Invasionskammer

Über Nacht wurden die Invasionskammern im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Zur Auswertung mussten die Membranen zunächst an der Innenseite mit Wattestäbchen von den dort haftenden Zellen befreit werden, so dass lediglich die für die Auszählung relevanten Zellen an der Unterseite der Membran übrig blieben. Die Inserts wurden anschließend zwei Minuten in Methanol fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen zwei Minuten mit Hoechst33342, einem vitalen DNA-Farbstoff, gefärbt. Nach weiteren zwei Minuten Inkubation der Inserts in PBS wurden die Membranen mit Hilfe eines Skalpell aus den Inserts herausgeschnitten und auf Objektträger gelegt. Mit Eindeckmedium für Fluoreszenz und Deckglas versehen, konnten die Objektträger für das Auszählen der invadierten Zellen mit dem Fluoreszenzmikroskop verwendet werden.

2.2.11. Migration

Mit Hilfe des Wound-Healing-Assays kann das Migrationsverhalten der Zellen dargestellt werden (Rodriguez, Wu et al., 2005). Dafür wurden die Zellen analog zu den vorhergehenden Versuchen mit Wachstumsfaktoren und Inhibitoren versehen. Die Bestrahlung erfolgte mit 8Gy; es wurde jeweils eine unbestrahlte Kontrolle mitgeführt.

48h vor Bestrahlung wurden je 5×10^5 Zellen pro 6-well ausgesät. Kurz vor der Bestrahlung wurde mit einer Pipettenspitze ein Spalt in den Zellrasen gekratzt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gespült und mit neuem Medium versehen,

in das schließlich die Wachstumsfaktoren und Inhibitoren nach bekanntem Protokoll gegeben wurden.

Zur Auswertung wurde der Spalt mit Hilfe der Leica Application Suite nach 4h und 12h fotografiert. Der erste Zeitpunkt wurde auf 4h festgelegt, da in Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, dass Migration erst nach 8h einsetzt und wir ein Ablösen der Zellen nach Bestrahlung befürchteten. Der zweite Zeitpunkt wurde in Anlehnung an das Protokoll unserer Arbeitsgruppe auf 12h gelegt (Pickhard, Margraf et al., 2011). Das Migrationsverhalten der Zellen wurde pro 6-well an drei verschiedenen Positionen des Spalts dokumentiert.

2.2.12. Statistik

Bei den Ergebnissen des Colony-Formation-Assays, des Invasions-Assays und des Wound-Healing-Tests galt es die statistische Signifikanz zu überprüfen. Die Auswertung der Ergebnisse, inklusive der Darstellung der Graphen und der p-Wert Berechnung wurde mit dem Statistik-Programm Graph Pad Prism 5 durchgeführt. Für die statistische Auswertung kann bei allen Versuchen von paarigen Ansätzen ausgegangen werden, das heißt, dass die unterschiedlichen Behandlungen pro Versuchsreihe zum gleichen Zeitpunkt und unter gleichen Bedingungen durchgeführt wurden.

Um die Signifikanz der Ergebnisse des Colony-Formation-Assays und des Invasions-Assays zu überprüfen, wurde zunächst der One-way ANOVA Test angewendet, der einen Überblick über die Signifikanz des gesamten Versuchs bietet, ohne dabei einzelne Werte zu vergleichen. Mit dem anschließenden t-Test wurde die Signifikanz der einzelnen Behandlungen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ausgewertet. Zur statistischen Auswertung des Wound-Healing-Assays wurde folgende Formel entwickelt:

$$\frac{(T2 - T1) \times 100}{\text{Pixel gesamt}}$$

T1 steht dabei für die Differenz der gesamten Pixelzahl minus der Pixelzahl des Spalts nach 4h. T2 verdeutlicht die Differenz Gesamtpixelzahl minus Pixelzahl des Spalts nach 12h. Aus jeweils drei Ansätzen wurde der Mittelwert gebildet und

anschließend in die Formel eingegeben. Das Ergebnis dieser Formel stellt die Zellen dar, die innerhalb des Zeitraumes in den Spalt migriert sind und repräsentiert somit den Prozentsatz der Migration. Eine Berechnung der Standardabweichung ist für diesen Versuch nicht möglich, da in der oben genannten Formel bereits die drei Mittelwerte verrechnet und somit etwaige Abweichungen berücksichtigt werden.

3. Ergebnisse

3.1. Biologische Effekte

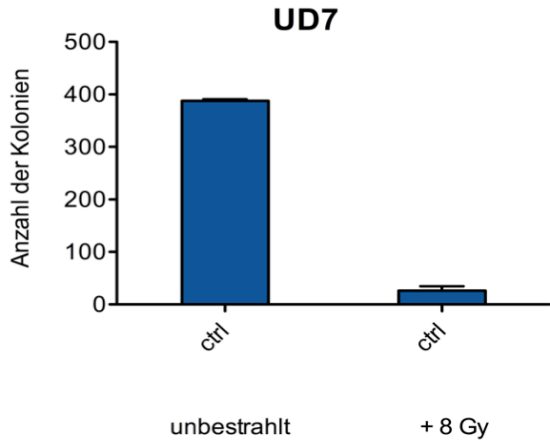
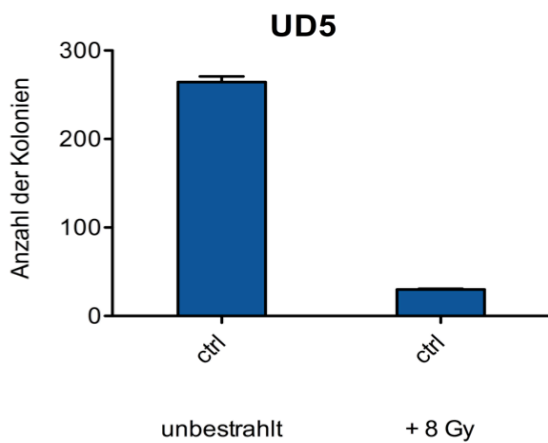
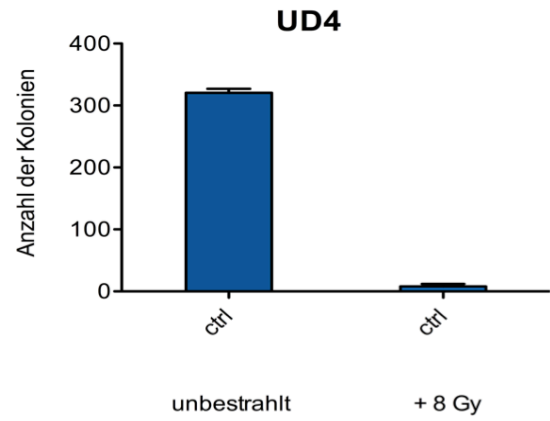
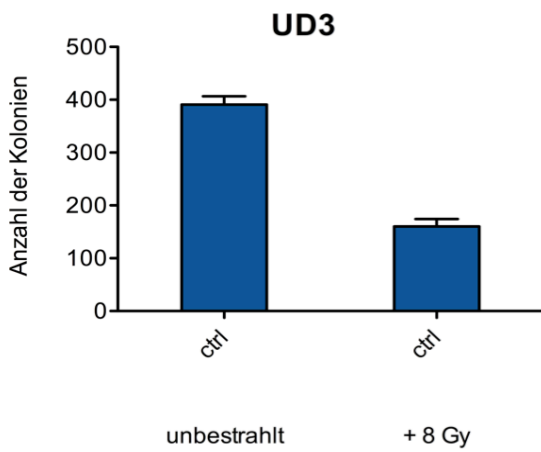
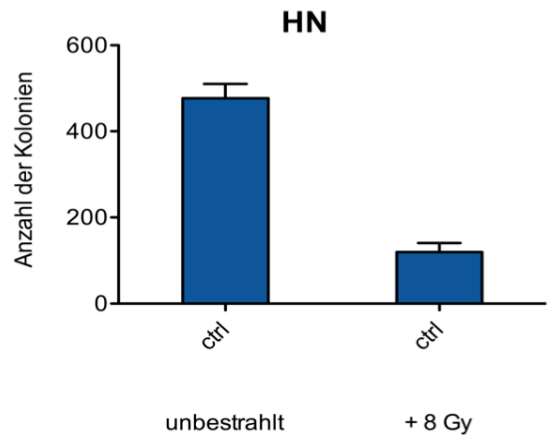
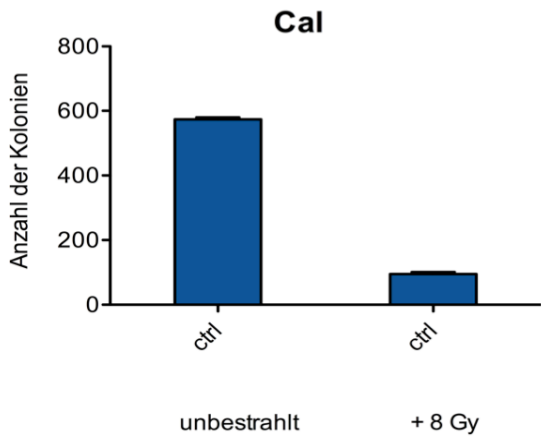
3.1.1. Colony-Formation-Assay

Der Colony-Formation-Assay wurde durchgeführt, um das Überleben der Zelllinien über längere Zeit zu beobachten. Vor allem der Effekt der Zellen auf Bestrahlung und die Zugabe der Stimulatoren bzw. Inhibitoren sollte deutlich gemacht werden.

Die Bestrahlung erfolgt mit 8Gy. Anschließend wurden je 5×10^3 Zellen in einer 15cm Kulturschale ausgesät und mit den Stimulatoren bzw. Inhibitoren versehen. Die Auswertung erfolgt nach zehntägiger Inkubation im Brutschrank. Dabei wurde bei jedem Diagramm der Mittelwert aus drei Versuchsansätzen dargestellt.

3.1.1.1. Einfluss der Bestrahlung auf das Überleben der Zellen

In den folgenden Abbildungen soll der Effekt der Bestrahlung auf das Überleben der Zellen gezeigt werden. Es fand sich bei fast allen Zelllinien ein deutlich verringertes klonogenes Überleben nach Bestrahlung. Lediglich die Zelllinie UD6 reagiert mit einer strahleninduzierten Verbesserung des Überlebens. Gezählt wurden in beiden Versuchsansätzen diejenigen Zellkolonien, die nach zehntägiger Inkubationszeit nachweisbar sind.



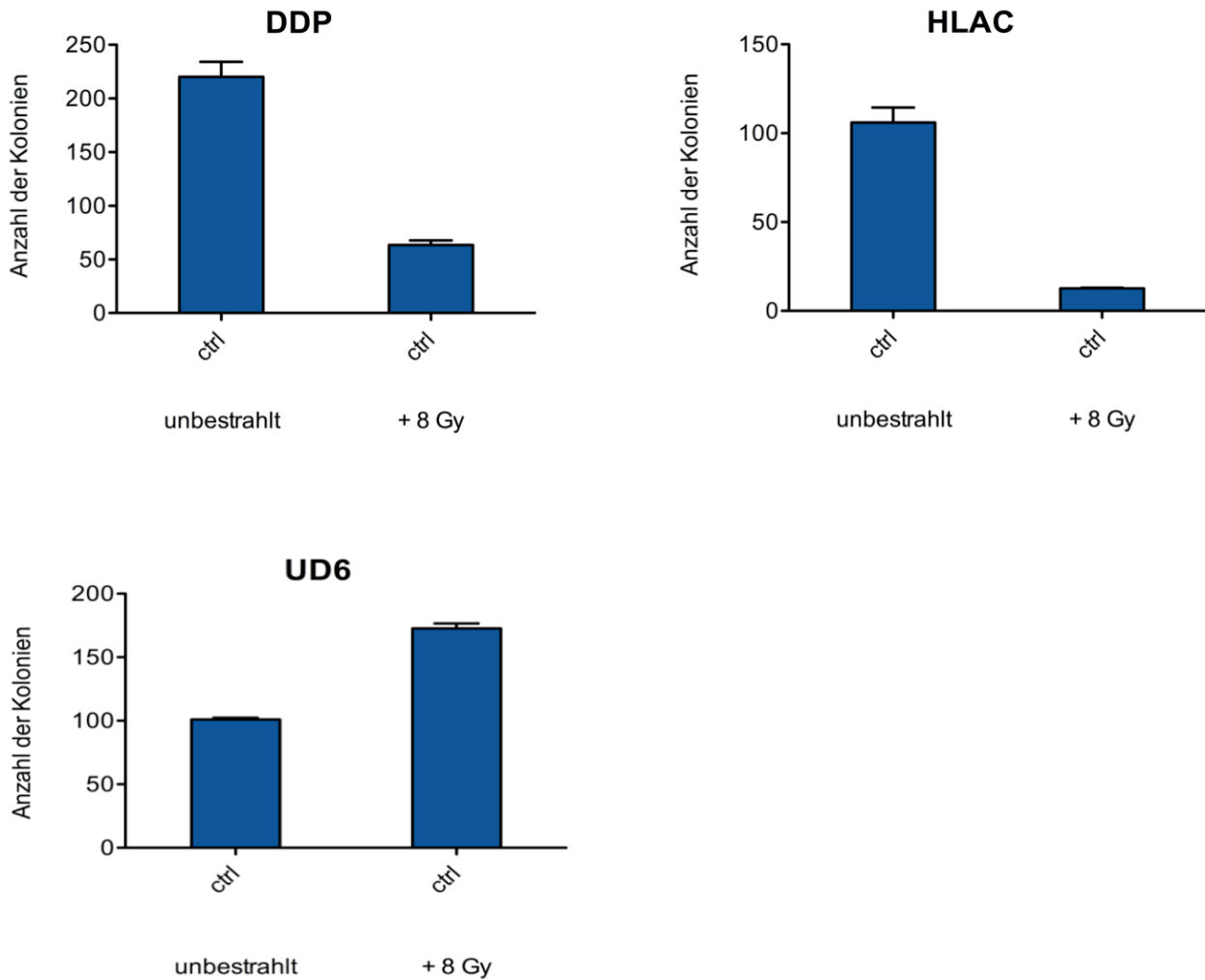


Abbildung 11: Einfluss der Bestrahlung auf das Überleben der Zellen

3.1.1.2. Effekt der Stimulation mit Bradykinin auf das Überleben

Im Folgenden ist der Einfluss der Stimulation mit Bradykinin auf das Überleben dargestellt. Zudem wird der Effekt der Stimulation bei gleichzeitiger Bestrahlung verdeutlicht.

Bei den Zelllinien UD3, UD6, DDP und HLAC zeigt sich unbestrahlt ein Überlebensvorteil nach Zugabe von Bradykinin (UD3: $p = 0,0004$, UD6: $p = 0,0013$, DDP: $p < 0,001$, HLAC: $p = 0,0069$). Nach Bestrahlung und Stimulation mit Bradykinin wird in beiden Versuchsansätzen eine fast identische Anzahl an Zellkolonien erreicht. Lediglich bei den Zelllinien HN und UD6 zeigt sich eine signifikante Reduktion des

Überlebens nach Bestrahlung und Bradykinin-Stimulation (HN: $p=0,0345$, UD6: $p=0,0012$).

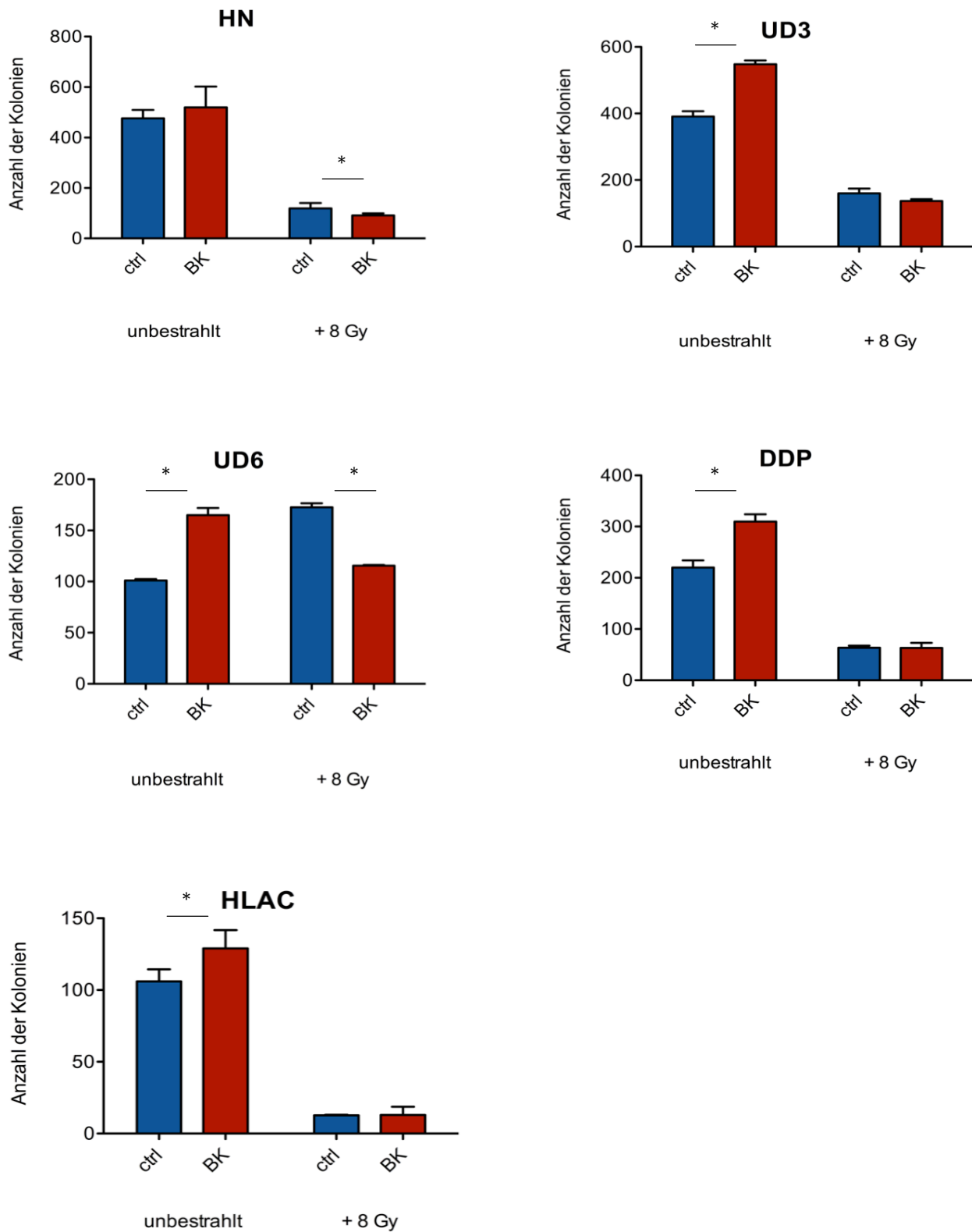


Abbildung 12: Effekt der Bradykinin-Stimulation auf das Überleben, dargestellt an den Zelllinien HN, UD3, UD6, DDP und HLAC; Vergleich unbestrahlt vs. bestrahlt

In den folgenden Abbildungen ist das Überleben der Zelllinien Cal27, UD4, UD5 und UD7 nach Stimulation mit Bradykinin dargestellt, ebenso wie der Einfluss der Bestrahlung auf das Überleben.

Verglichen mit der Kontrolle führt die Stimulation mit Bradykinin unbestrahlt zu einer leicht verringerten Überlebensrate (Cal27: $p=0,0176$, UD4: $p=0,0019$, UD7: $p=0,0023$), wobei sich unter Bestrahlung ein Überlebensvorteil der Zelllinie UD5 bei gleichzeitiger Bradykinin-Stimulation aufzeigen lässt (UD5: $p=0,0083$) bzw. ein verringertes Überleben bei der Zelllinie Cal27 beobachtet werden kann (Cal27: $p=0,0012$).

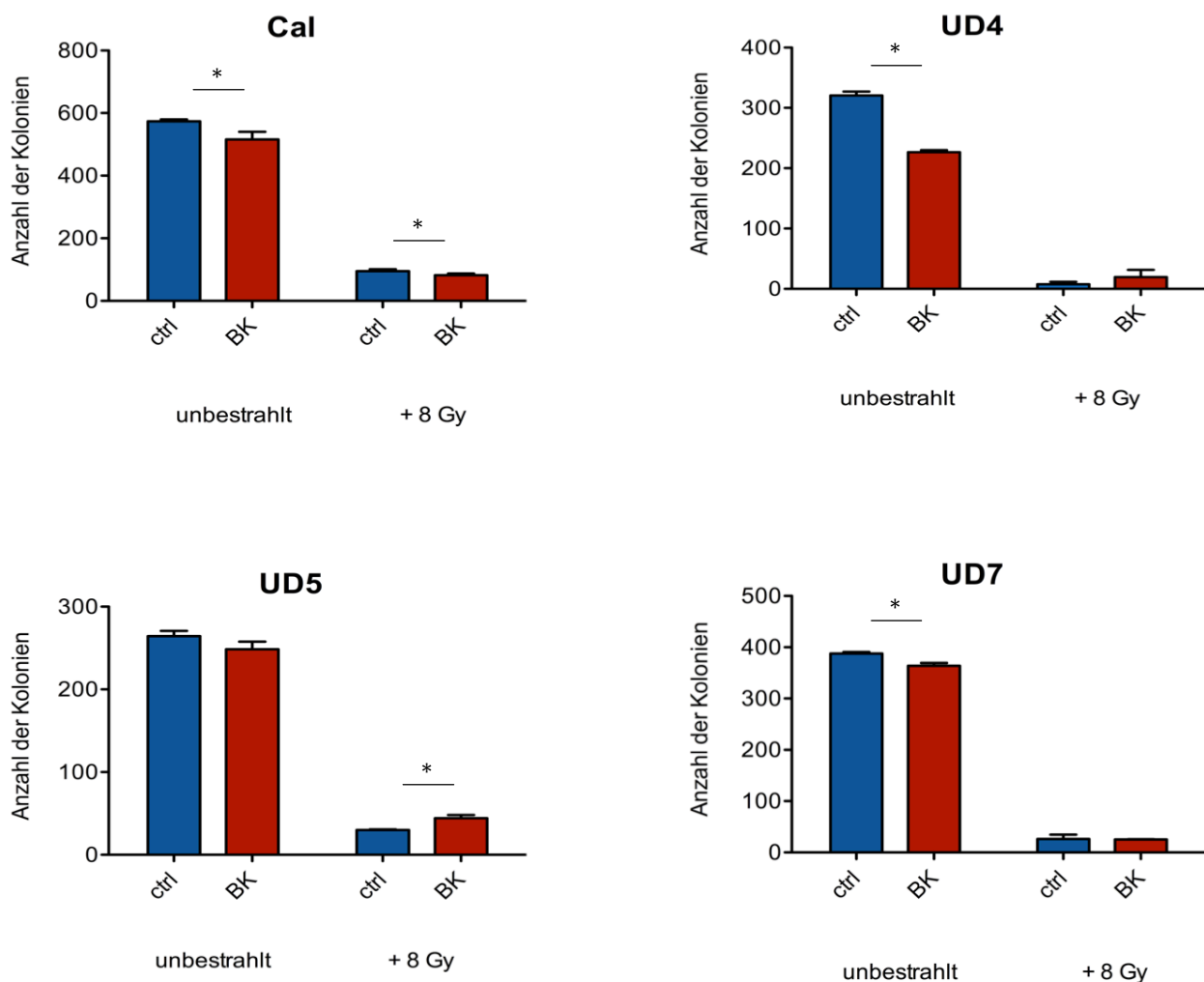


Abbildung 13: Effekt der Bradykinin-Stimulation auf das Überleben der Zellen, dargestellt an den Zelllinien Cal27, UD4, UD5 und UD7; Vergleich unbestrahlt vs. bestrahlt

Zusammenfassend kann man feststellen, dass sich bei der Auswertung der Colony-Formation-Assays nach Bradykinin-Stimulation die Zelllinien in zwei Gruppen einteilen lassen:

Die erste Gruppe, bestehend aus HN, UD3, UD6, DDP und HLAC zeigen unbestrahlt ein besseres Überleben nach Bradykinin-Stimulation. Die Stimulation mit Bradykinin bei gleichzeitiger Bestrahlung der Zellen führt zu einem unveränderten bis tendenziell schlechteren klonogenen Überleben.

Bei der zweiten Gruppe der Zelllinien (Cal27, UD4, UD5 und UD7) manifestiert sich die Bradykinin-Stimulation unbestrahlt in einer verringerten Überlebensrate der Zellen. Bei gleichzeitiger Bestrahlung allerdings zeigen die Zellen unter Bradykinin-Stimulation kein verändertes klonogenes Überleben. Lediglich bei Cal27 kann man nach Bestrahlung und Bradykinin-Stimulation eine signifikante Reduktion des Überlebens erkennen, bei UD5 eine signifikante Zunahme. Insgesamt zeigt sich jedoch kein Vorteil der Bradykinin-Stimulation auf das Überleben der Zellen nach Bestrahlung.

In folgender Tabelle sind die Ergebnisse nach Bradykinin-Stimulation zusammenfassend dargestellt:

Überleben der Zellen	unbestrahlt + BK	+ 8Gy + BK
HN, UD3, UD6, DDP, HLAC	↑	⇔ (↓)
Cal27, UD4, UD5, UD7	↓	⇔

Tabelle 25: Zusammenfassung der Ergebnisse des Colony-Formation-Assays nach Bradykinin-Stimulation

3.1.1.3. Einfluss der Blockade des Bradykinin B2-Rezeptors auf das Überleben der Zellen

Wie in nachfolgender Abbildung dargestellt, führt die Blockade des Bradykinin B2-Rezeptors mit HOE140, einem spezifischen Bradykinin B2-Rezeptor-Blocker, zu einer Zunahme der Kolonienzahl nach Bestrahlung. Dies verdeutlicht, dass Bestrahlung und gleichzeitige Inhibition des Bradykinin-Rezeptors zu verbessertem

Überleben der Zellen führen. Die Zelllinien Cal27, UD4, UD6 und UD7 zeigen unter Bestrahlung und Zugabe von HOE140 diesen Effekt (Cal27: $p=0,0011$, UD4 $p<0,0001$, UD6: $p=0,0019$, UD7: $p=0,057$). Die Zelllinien UD4 und UD7 zeigen unbestrahlt unter Zugabe von HOE140 eine signifikante Verringerung des klonogenen Überlebens (UD4: $p=0,0011$ / UD7: $p=0,0035$).

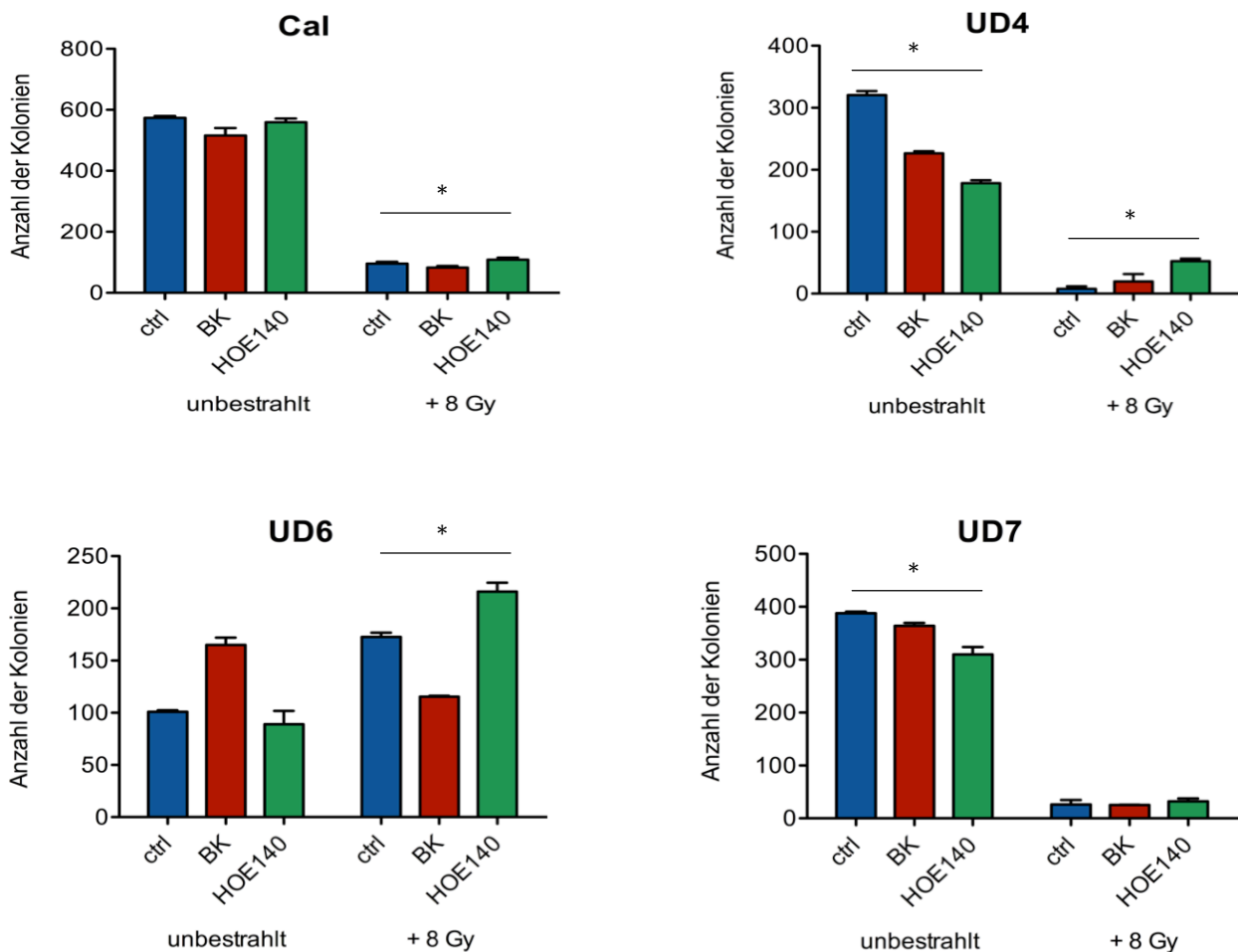


Abbildung 14: Einfluss der Blockade des Bradykinin B2-Rezeptors auf das Überleben der Zellen; Vergleich unbestrahlt vs. bestrahlt

Im Gegensatz dazu zeigen die Zelllinien HN, UD5, DDP und HLAC bereits unbestrahlt einen Überlebensvorteil unter Blockade des Bradykinin B2-Rezeptors im Vergleich zur Kontrolle (HN: $p=0,005$, UD5: $p=0,1625$, DDP: $p=0,0072$, HLAC: $p=0,044569$). Die Behandlung der Zellen mit HOE140 führt auch nach Bestrahlung zu verbessertem Überleben, allerdings ist der Effekt weniger deutlich (HN: $p=0,0644$, UD5: $p=0,0299$, DDP: $p=0,0457$, HLAC: $p=0,162$).

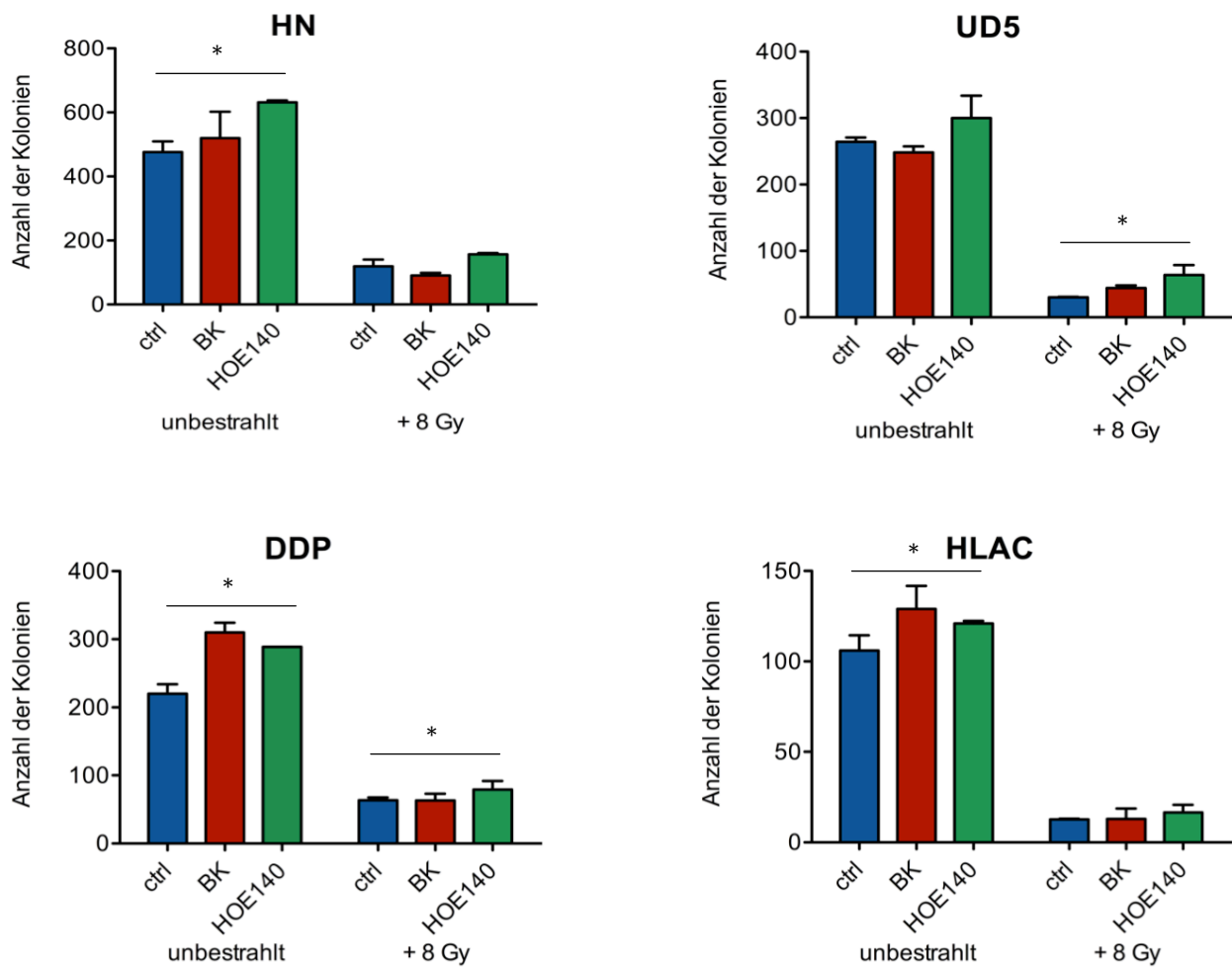


Abbildung 15: Effekt der Blockade des Bradykinin B2-Rezeptors auf das Überleben der Zellen; dargestellt ist ein Vergleich zwischen unbestrahlten und bestrahlten Zellen

Die Blockade des Bradykinin B2-Rezeptors resultiert bei der Zelllinie UD3 unbestrahlt in einer Zunahme des klonogenen Überlebens (UD3: $p = 0,0136$). Nach Bestrahlung resultiert die Blockade mit HOE140 in einer verringerten Überlebensrate der Zelllinie UD3 (UD3: $p = 0,0006$).

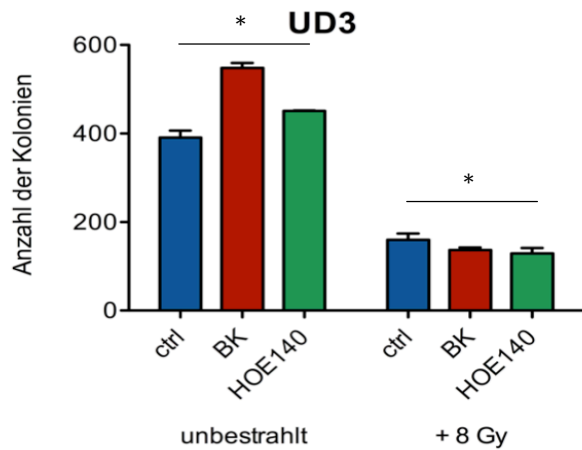


Abbildung 16: Effekt der Blockade des Bradykinin B2-Rezeptors auf das Überleben der Zelllinie UD3; Vergleich unbestrahlt und bestrahlt

Auch bei der Auswertung des Colony-Formation-Assays nach Bradykinin B2-Rezeptor-Blockade lassen sich die Zelllinien wieder in zwei Gruppen einteilen. Die Zelllinien HN, UD5, DDP und HLAC zeigen nach Behandlung mit HOE140 sowohl unbestrahlt als auch nach Bestrahlung einen Überlebensvorteil.

Bei den Zelllinien Cal27, UD4, UD6 und UD7 dagegen manifestiert sich eine Zunahme der überlebenden Zellen vor allem nach Bestrahlung und gleichzeitiger HOE140-Substitution.

In folgender Tabelle sind die Ergebnisse des Colony-Formation-Assays nach Zugabe von HOE140 noch einmal zusammengefasst:

Überleben der Zellen	unbestrahlt + HOE140	+ 8Gy + HOE140
Cal27, UD4, UD6, UD7	↓	↑
HN, UD5, DDP, HLAC	↑	↑

Tabelle 26: Zusammenfassung der Ergebnisse des Colony-Formation-Assays nach Zugabe von HOE140

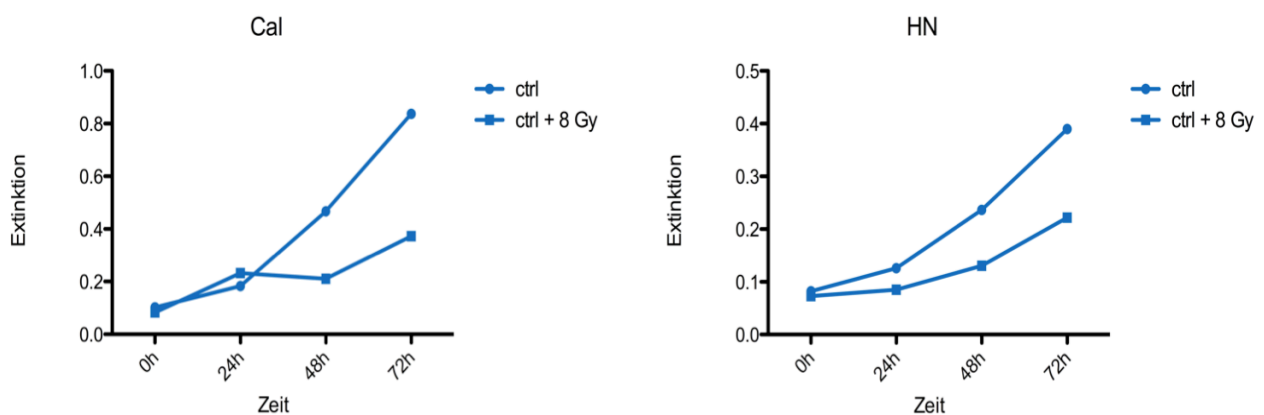
3.1.2. Proliferation

Der Crystal Violet ELISA-Test wurde durchgeführt, um das Proliferationsverhalten der Zellen zu veranschaulichen. Ebenso soll der Effekt der Bestrahlung, sowie die Zugabe von Bradykinin bzw. HOE140 auf die Proliferation aufgezeigt werden.

Die Zellen wurden dazu in 24-wells ausgesät und nach Zugabe der Stimulatoren bzw. Inhibitoren mit 8Gy bestrahlt. Unter gleichen Versuchsbedingungen wurde auch eine unbestrahlte Kontrolle mitgeführt. Die Auswertung erfolgt 0h, 24h, 48h und 72h nach Bestrahlung. In den Graphiken sind die Mittelwerte aus drei Versuchsansätzen dargestellt.

3.1.2.1. Einfluss der Bestrahlung auf die Proliferation der Zellen

Abbildung 17 zeigt den Effekt der Bestrahlung mit 8Gy auf die Proliferation der Zellen. Nach 48h und 72h stellt sich für die unbestrahlte Kontrolle ein deutlicher Proliferationsvorteil dar, so dass wir bei fast allen Zelllinien, außer UD6 und UD7, einen Strahleneinfluss auf die Proliferation zeigen können.



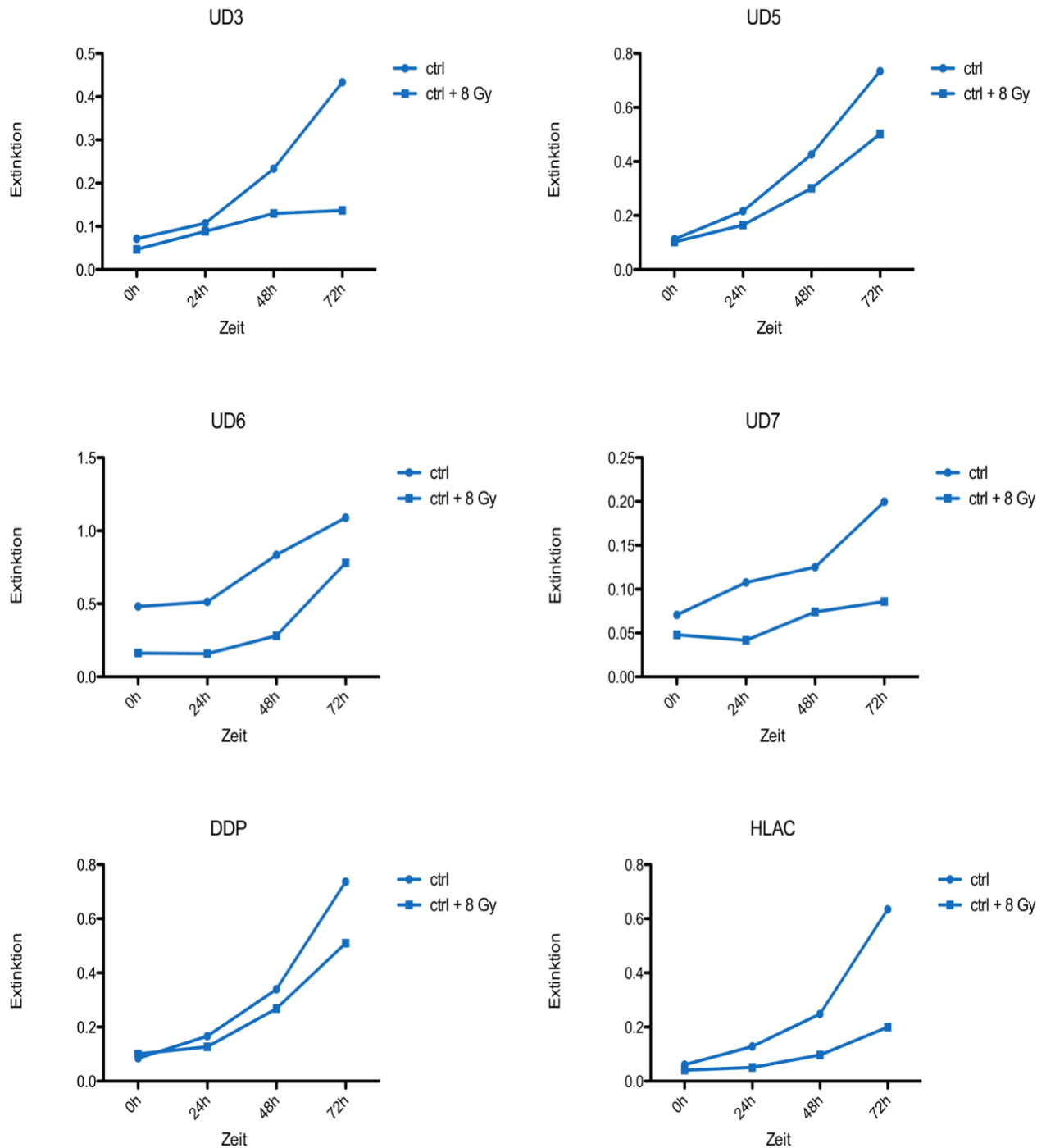


Abbildung 17: Einfluss der Bestrahlung auf die Proliferation der Zelllinien; Auswertung nach 0h, 24h, 48h und 72h

Lediglich bei der Zelllinie UD4 zeigt die bestrahlte Kontrolle bei allen vier Auswertungszeitpunkten eine leicht erhöhte Proliferation.

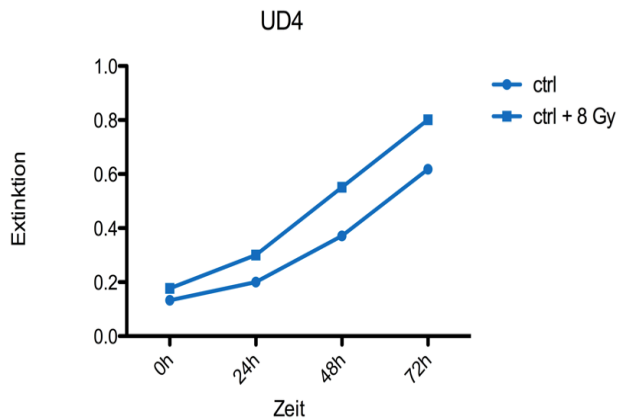
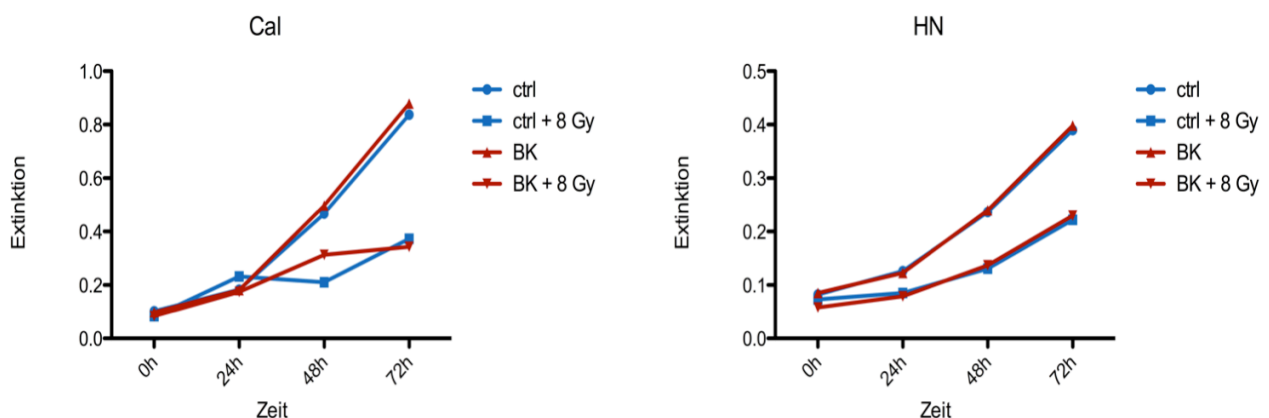


Abbildung 18: Einfluss der Bestrahlung auf die Proliferation der Zelllinie UD4; Auswertung nach 0h, 24h, 48h und 72h

3.1.2.2. Effekt der Stimulation mit Bradykinin bei gleichzeitiger Bestrahlung auf die Proliferation der Zellen

Wie in den vorangehenden Graphiken verdeutlicht, lässt sich eine Abnahme der Proliferation der bestrahlten Zellen nachweisen. Bei simultaner Bradykinin-Stimulation und Bestrahlung nimmt die Proliferation ab und erreicht nach 72h die Werte der bestrahlten Kontrolle. Insgesamt zeigt die Bradykinin-Stimulation sowohl unbestrahlt als auch nach Bestrahlung im Zeitverlauf von 72h keinen Einfluss auf die Proliferation. In Abbildung 19 sind die Ergebnisse des Crystal Violet ELISA der Zelllinien Cal27, HN, UD1, UD3, UD5, UD6, UD7, DDP und HLAC dargestellt.



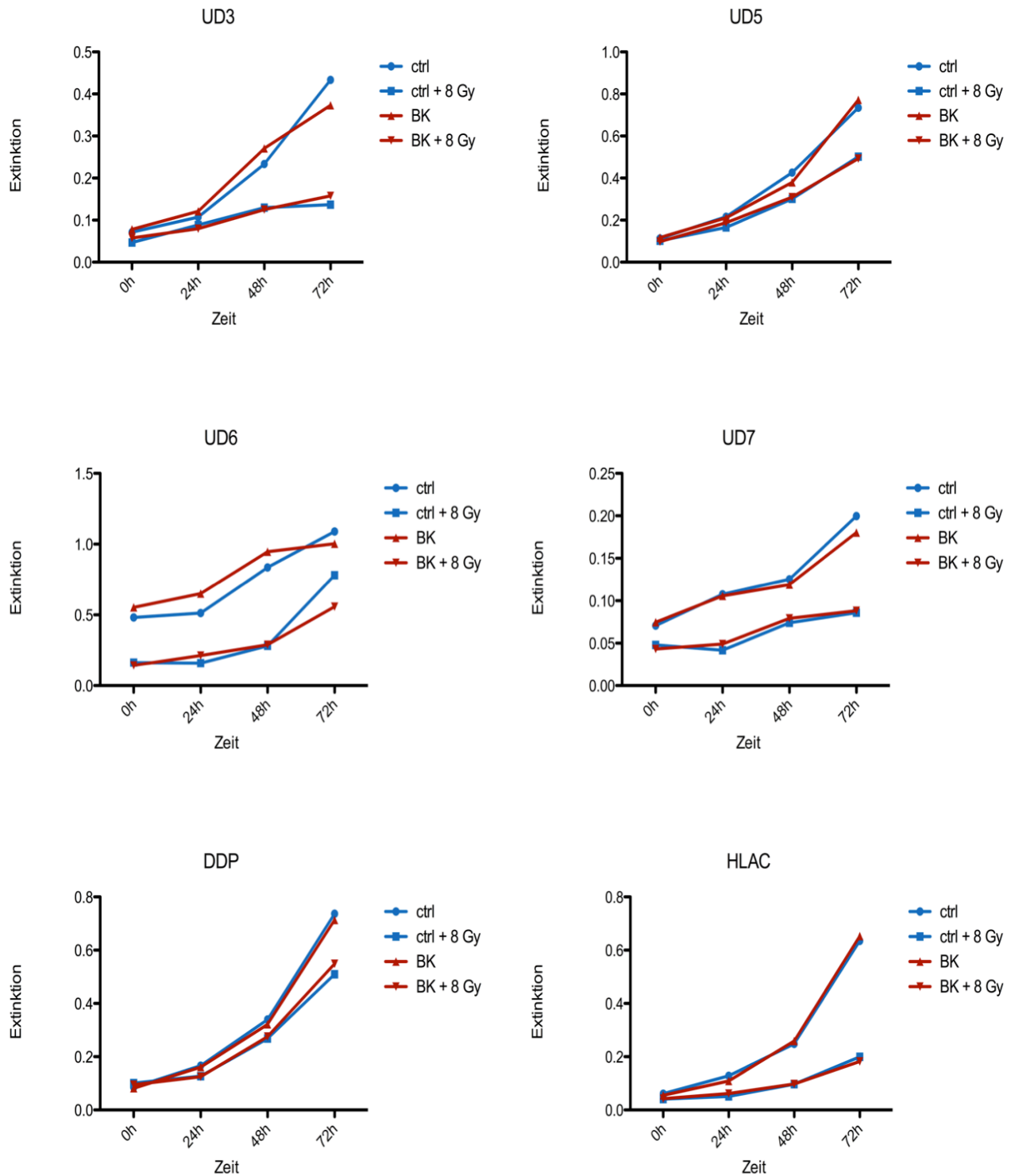


Abbildung 19: Effekt der Stimulation mit Bradykinin und gleichzeitiger Bestrahlung auf die Proliferation der Zelllinien; Auswertung nach 0h, 24h, 48h und 72h

Lediglich die Zelllinie UD4 zeigt unter Bestrahlung eine Zunahme der Proliferation, die sowohl bei der Kontrolle als auch nach Stimulation mit Bradykinin nachweisbar ist. Vor allem nach Bradykinin-Substitution und simultaner Bestrahlung erkennt man ein Maximum der proliferierenden Zellen nach 72h.

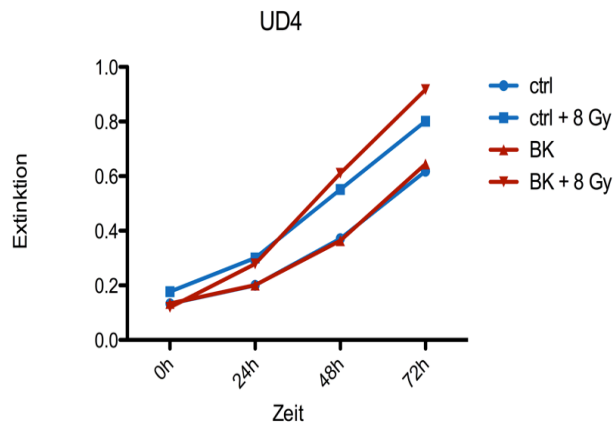
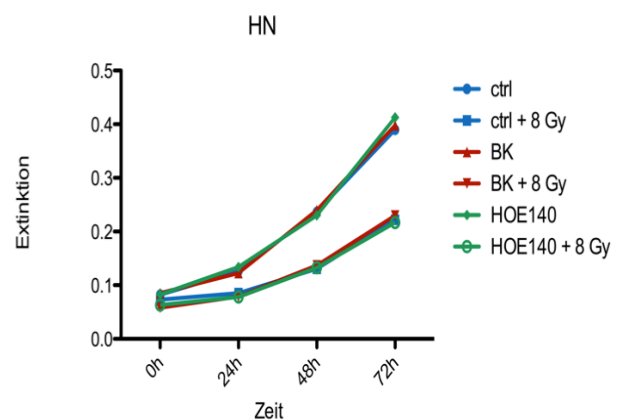
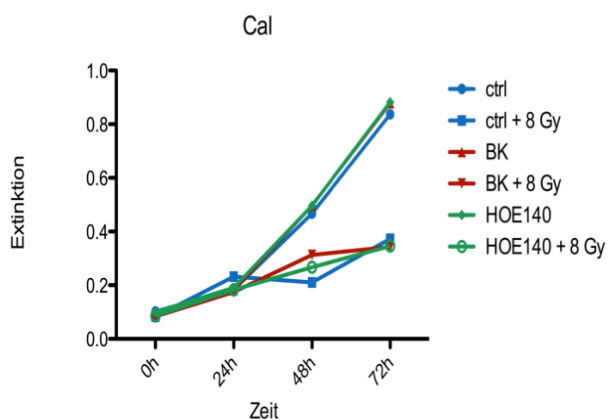


Abbildung 20: Effekt der Stimulation mit Bradykinin auf das proliferative Verhalten der Zelllinie UD4; Vergleich unbestrahlt vs. bestrahlt; Auswertung nach 0h, 24h, 48h und 72h

3.1.2.3. Einfluss der Blockade des Bradykinin B2-Rezeptors auf die Proliferation der Zellen

Wie auch in den vorangehenden Versuchen wurde der Bradykinin B2-Rezeptor mit seinem spezifischen Antikörper HOE140 irreversibel blockiert. Folgende Abbildungen verdeutlichen die Zunahme der Proliferation bei der unbestrahlten Kontrolle, ebenso wie bei alleiniger Zugabe von Bradykinin oder HOE140. Die Zellen, die bestrahlt wurden (ctrl+ 8Gy, BK + 8Gy und HOE140 + 8Gy) zeigen einen deutlich geringeren proliferativen Effekt. Auch nach Zugabe von HOE140 zeigt sich im Zeitverlauf von 72h kein Einfluss auf die Proliferation. Die Kurven der behandelten Zellen fallen mit denen der unbehandelten Kontrolle zusammen.



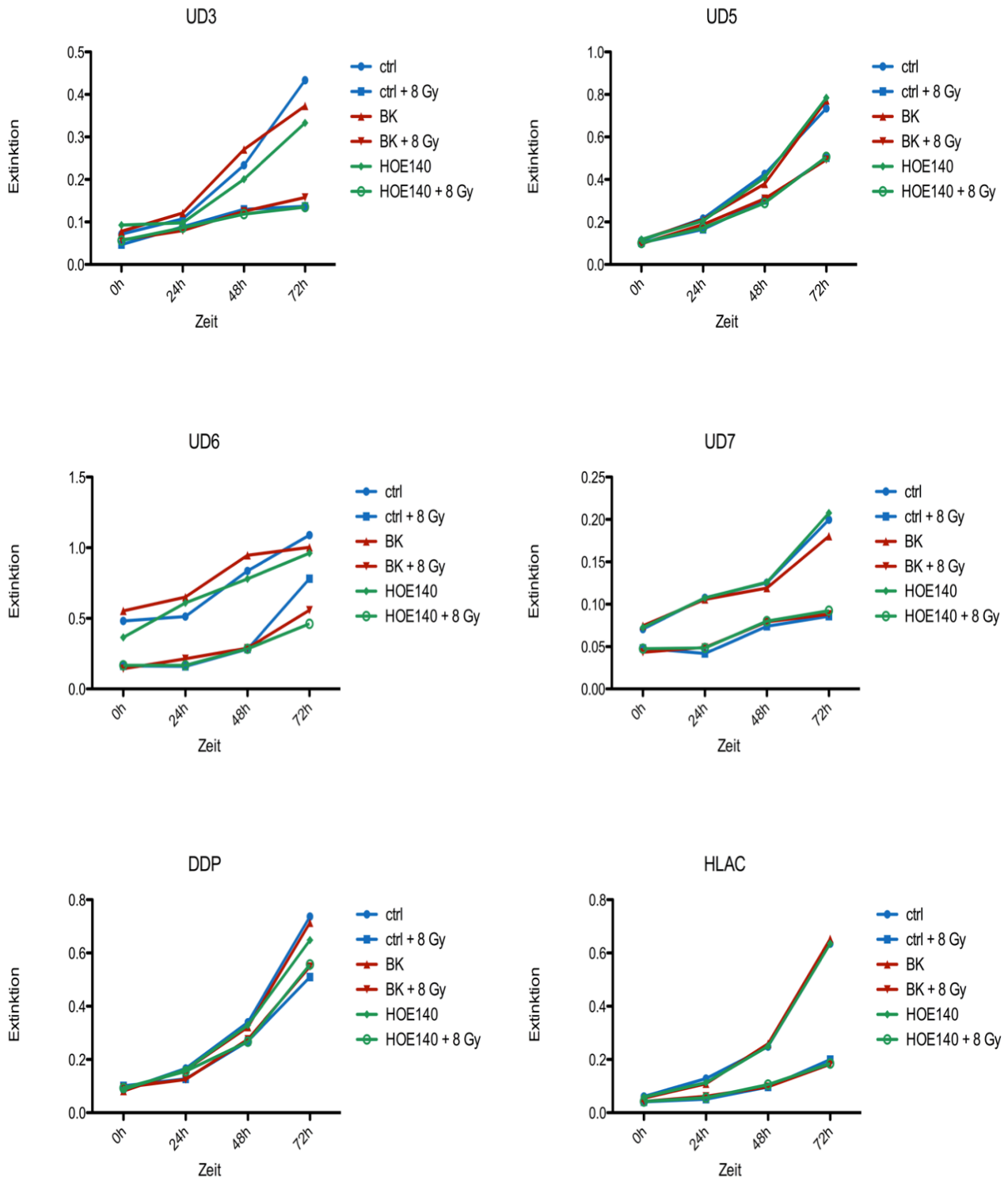


Abbildung 21: Einfluss der Blockade des Bradykinin-Rezeptors auf das Proliferationsverhalten der Zelllinien; die Auswertung erfolgt nach 0h, 24h, 48h und 72h

Auch nach Blockade des Bradykinin B2-Rezeptors mit HOE140 zeichnet sich die Zelllinie UD4 mit einer Zunahme der Proliferation nach Bestrahlung aus. Wie in Abbildung 22 dargestellt, haben diese Zellen, die bestrahlt wurden und gleichzeitig

mit Bradykinin oder HOE140 behandelt wurden, nach 72h den höchsten proliferativen Effekt.

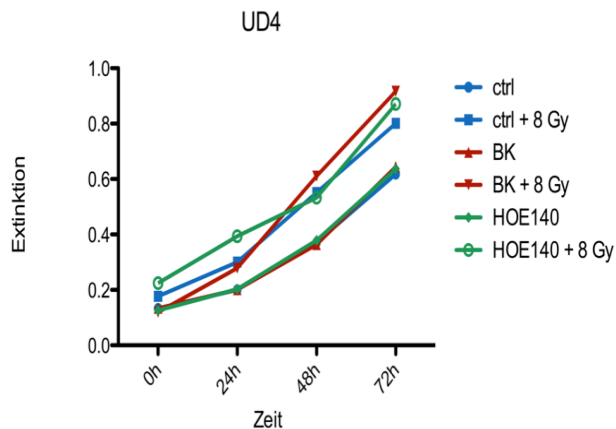


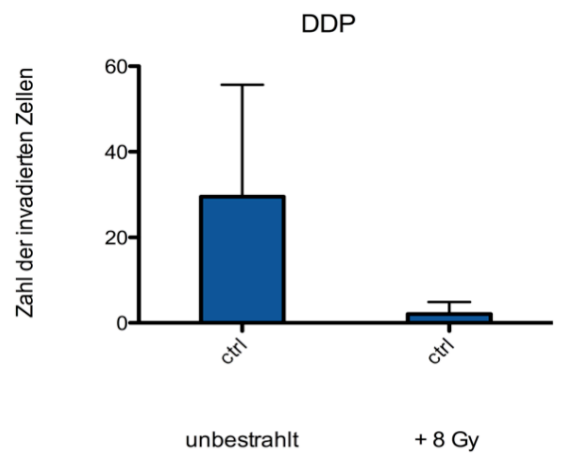
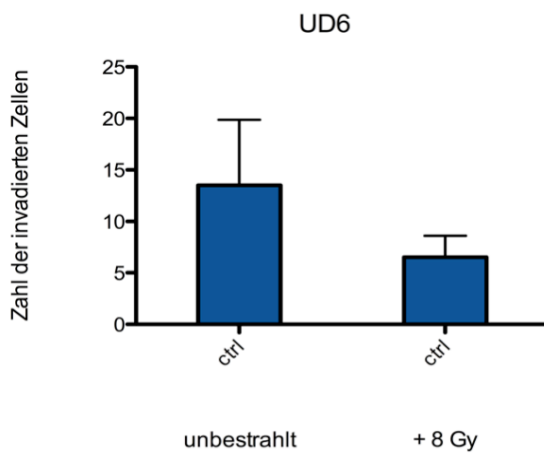
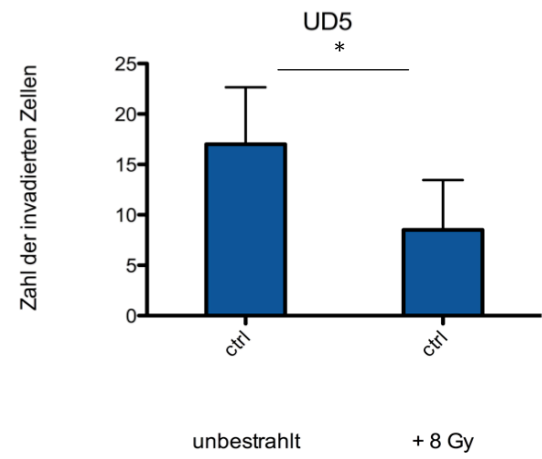
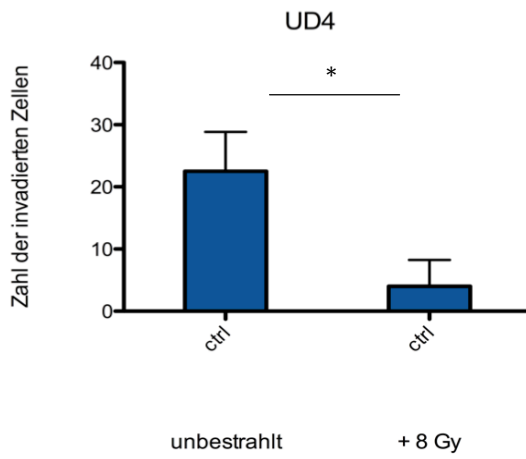
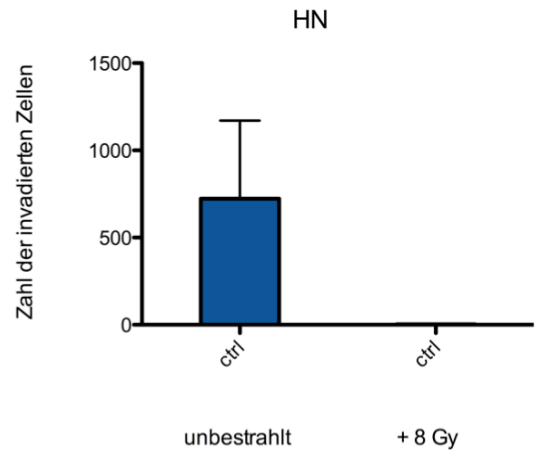
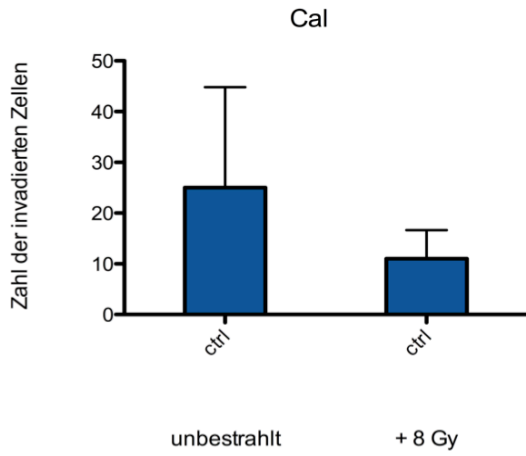
Abbildung 22: Einfluss der Blockade des Bradykinin-Rezeptors auf das Proliferationsverhalten der Zelllinie UD4; die Auswertung erfolgt nach 0h, 24h, 48h und 72h

3.1.3. Invasion

Dieser Versuch wurde durchgeführt, um das invasive Verhalten der Plattenepithelzelllinien zu verdeutlichen. Vor allem galt es, den Einfluss der Bestrahlung sowie der Zugabe von Stimulatoren oder Inhibitoren auf das Invasionsverhalten darzustellen.

3.1.3.1. Einfluss der Bestrahlung auf die Invasion der Zellen

Wie in Abbildung 23 dargestellt, zeigt sich bei den Zelllinien Cal27, HN, UD4, UD5, UD6, DDP und HLAC nach Bestrahlung eine deutlich verringerte Invasivität (Cal27: $p=0,302$, HN: $p=0,0556$, UD4: $p=0,0028$, UD5: $p=0,0015$, UD6: $p=0,0533$, DDP: $p=0,1419$, HLAC: $p=0,0016$).



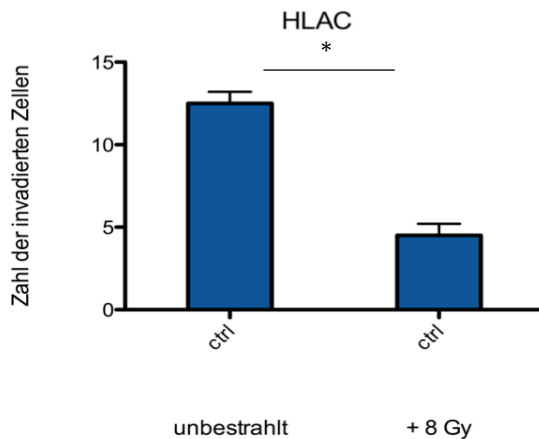


Abbildung 23: Einfluss der Bestrahlung auf das Invasionsverhalten der Zellen

Die Zelllinien UD3 und UD7 dagegen reagieren mit einer strahleninduzierten Zunahme des Invasionsverhaltens, wobei die Werte aufgrund der hohen Standardabweichung nicht signifikant sind (UD3: $p=0,6667$, UD7: $p=0,4647$).

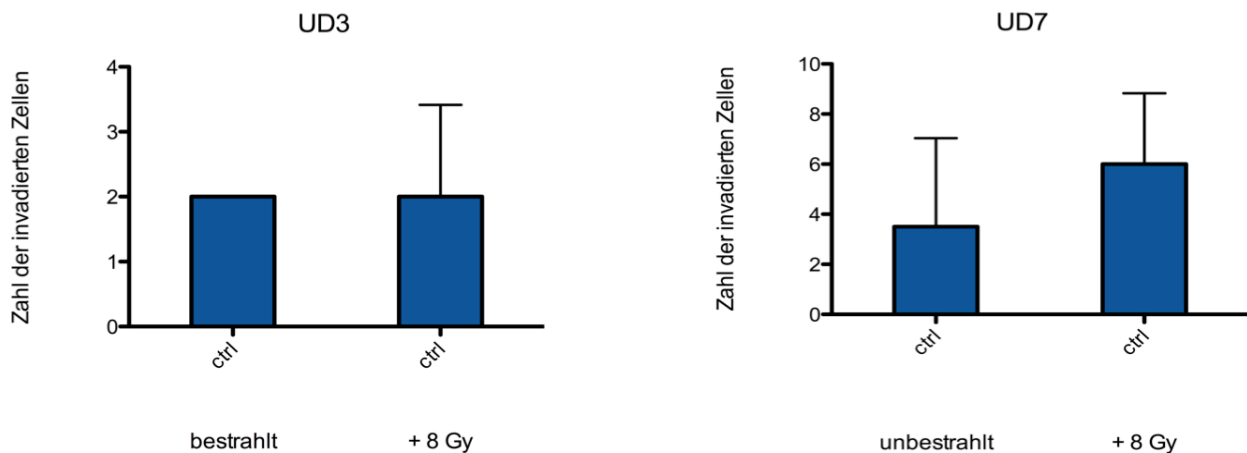
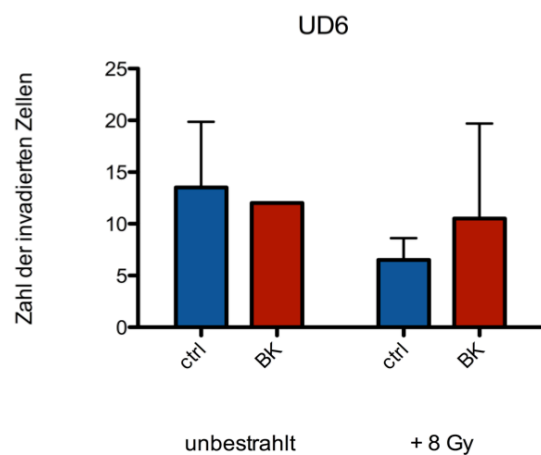
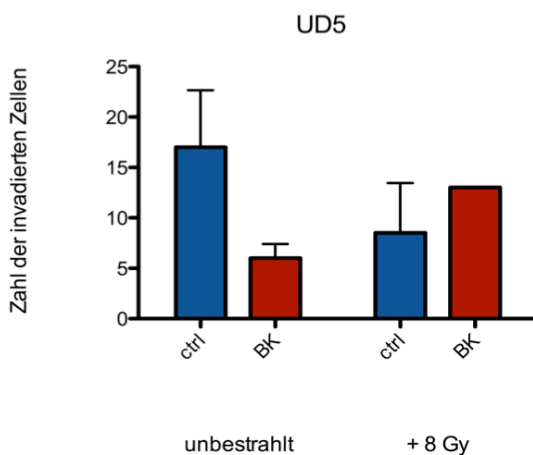
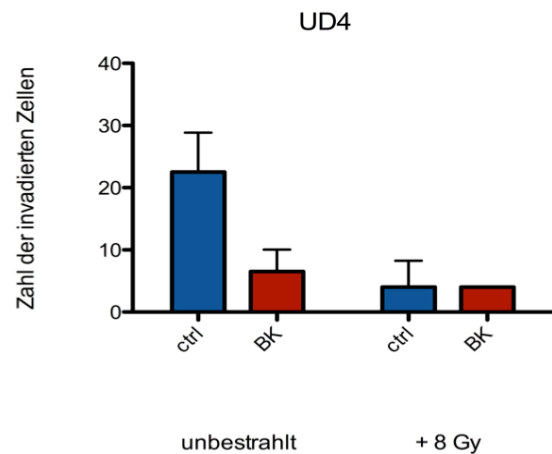
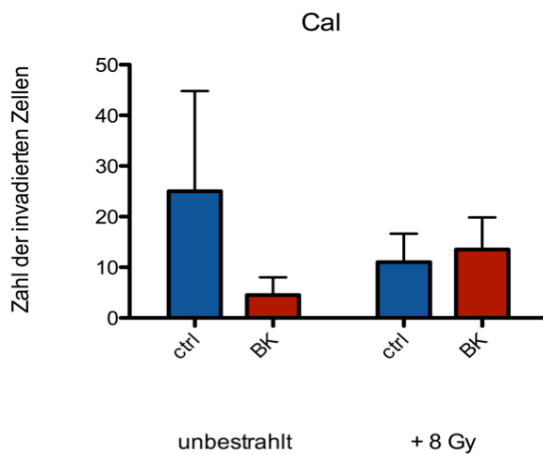


Abbildung 24: Invasionsverhalten der Zelllinien UD3 und UD7; Vergleich unbestrahlt vs. bestrahlt

3.1.3.2. Effekt der Stimulation mit Bradykinin bei gleichzeitiger Bestrahlung auf die Invasion der Zellen

Wie in Abbildung 25 dargestellt, resultiert die Stimulation von Bradykinin unbestrahlt in einer verringerten Invasivität der Zellen (Cal27: $p=0,0875$, UD4: $p=0,0554$, UD5:

$p = 0,0625$, UD6: $p = 0,6595$, DDP: $p = 0,3458$, HLAC: $p = 0,0185$). Nach Bestrahlung allerdings zeigen die Zellen nach Bradykinin-Stimulation eine Zunahme des Invasionsverhaltens, wobei nur bei der Zelllinie HLAC eine signifikante Invasivität gezeigt werden konnte (Cal: $p = 0,6415$, UD4: $p = 0,8675$, UD5: $p = 0,1383$, UD6: $p = 0,2434$, DDP: $p = 0,0623$, HLAC: $p = 0,0161$).



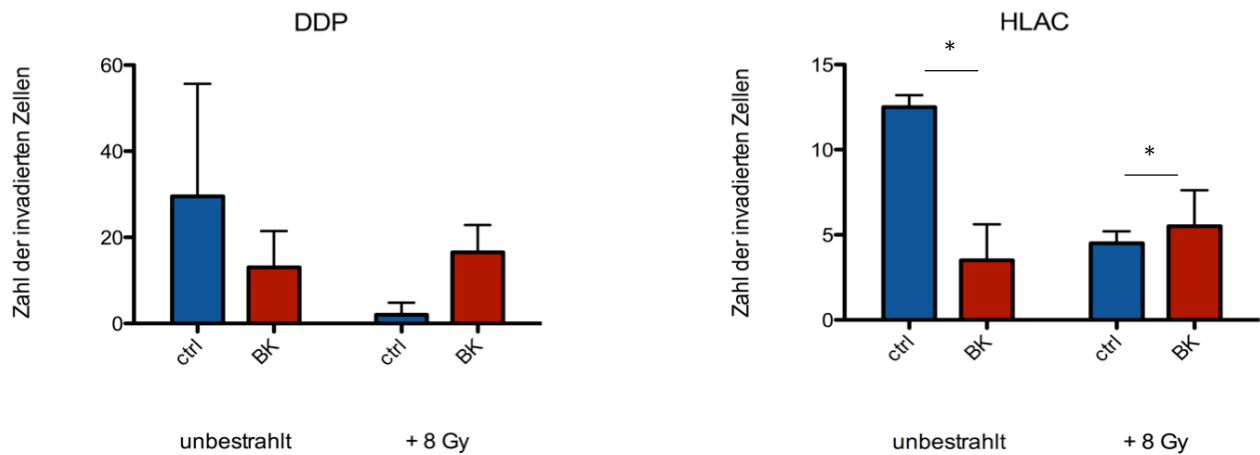


Abbildung 25: Invasionsverhalten der Zelllinien nach BK-Stimulation ohne und mit Bestrahlung

Bei den Zelllinien HN und UD3 sieht man nach Bradykinin-Stimulation keine signifikante Änderung des Invasionsverhaltens (HN: $p = 0,8802$, UD3: $p = 1,0$). Nach Bestrahlung resultiert die Bradykinin-Stimulation bei der Zelllinie UD3 in einer erhöhten Invasivität, was sich allerdings als statistisch nicht signifikant herausstellt (HN: $p = 0,1390$, UD3: $p = 0,1885$).

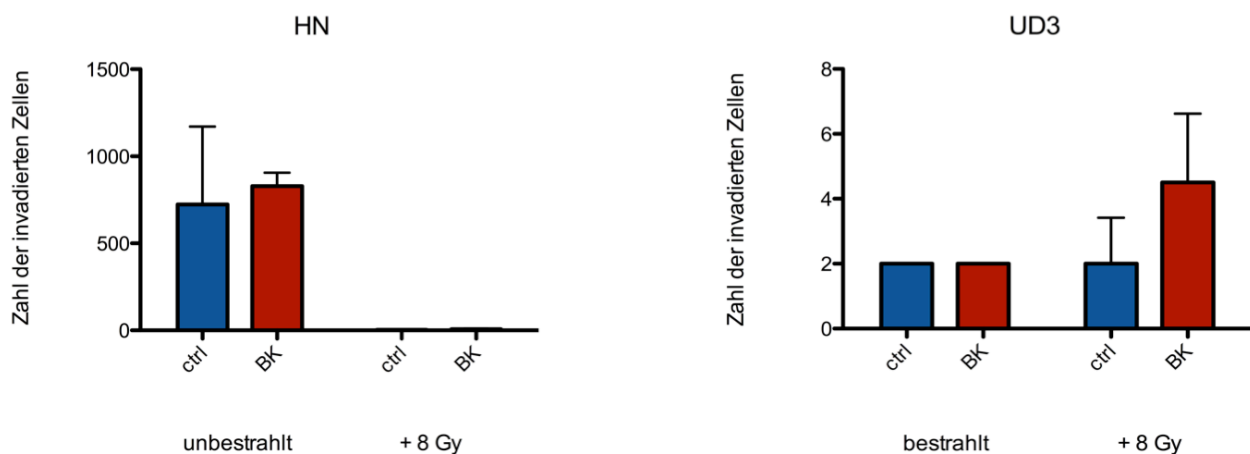


Abbildung 26: Darstellung der Zahl der invadierten Zellen nach BK-Stimulation; Vergleich unbestrahlt vs. bestrahlt

Bei der Zelllinie UD7 zeigt sich unbestrahlt keine signifikante Zunahme der Invasivität (UD7: $p= 0,1608$). Die Bradykinin-Stimulation bei simultaner Bestrahlung führt zu einem, verglichen mit der bestrahlten Kontrolle, unveränderten Invasionsverhalten (UD7: $p= 1,0$).

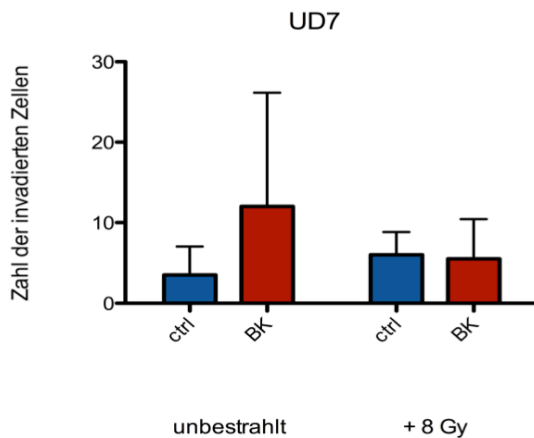


Abbildung 27: Invasionsverhalten von UD7; dargestellt ist die Zahl der invadierten Zellen nach BK-Stimulation unbestrahlt und bestrahlt

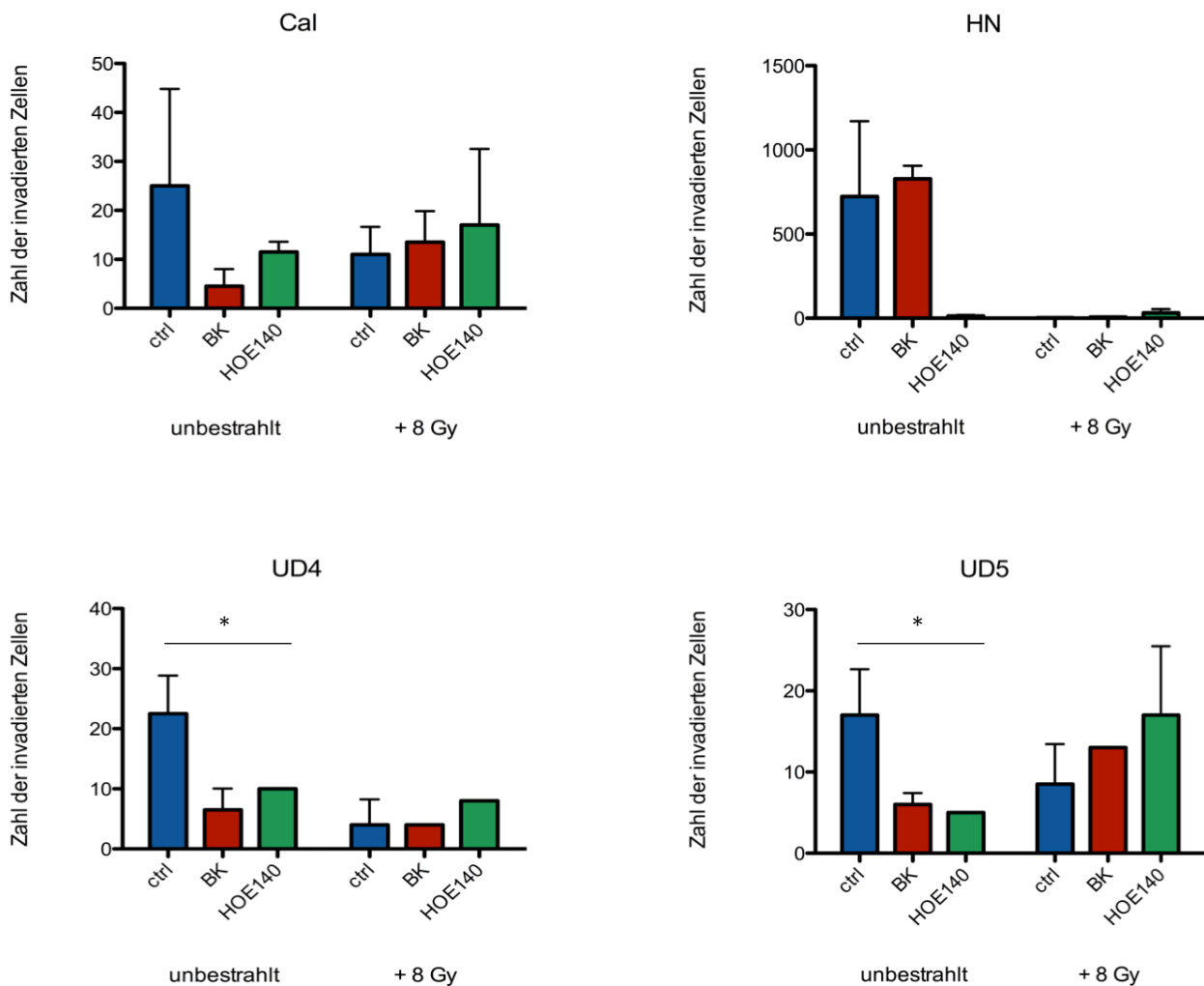
In folgender Tabelle sind die Ergebnisse der Matrigel Invasionskammern zusammenfassend dargestellt:

Invasivität der Zellen	unbestrahlt + Bradykinin	+ 8Gy + Bradykinin
Cal27, UD4, UD5, UD6, DDP, HLAC	↓	↔
HN, UD3	↔	↔

Tabelle 27: tabellarische Darstellung der Ergebnisse des Invasionsstests nach Stimulation mit Bradykinin

3.1.3.3. Effekt der Blockade des Bradykinin B2-Rezeptors auf die Invasion der Zellen

Blockiert man den Bradykinin B2-Rezeptor mit HOE140 so zeigt sich unbestrahlt im Vergleich zur Kontrolle ein verringertes Invasionsverhalten der Zellen (Cal27: $p=0,1926$, HN: $p=0,0558$, UD4: $p=0,0390$, UD5: $p=0,0351$, UD6: $p=1,0$, HLAC: $p=0,0082$). Nach Bestrahlung haben die Zellen, die mit HOE140 behandelt wurden, eine höhere Tendenz zur Invasion (Cal27: $p=0,3361$, HN: $p=0,0847$, UD4: $p=0,1333$, UD5: $p=0,2550$, UD6: $p=0,0005$, HLAC: $p=0,3190$).



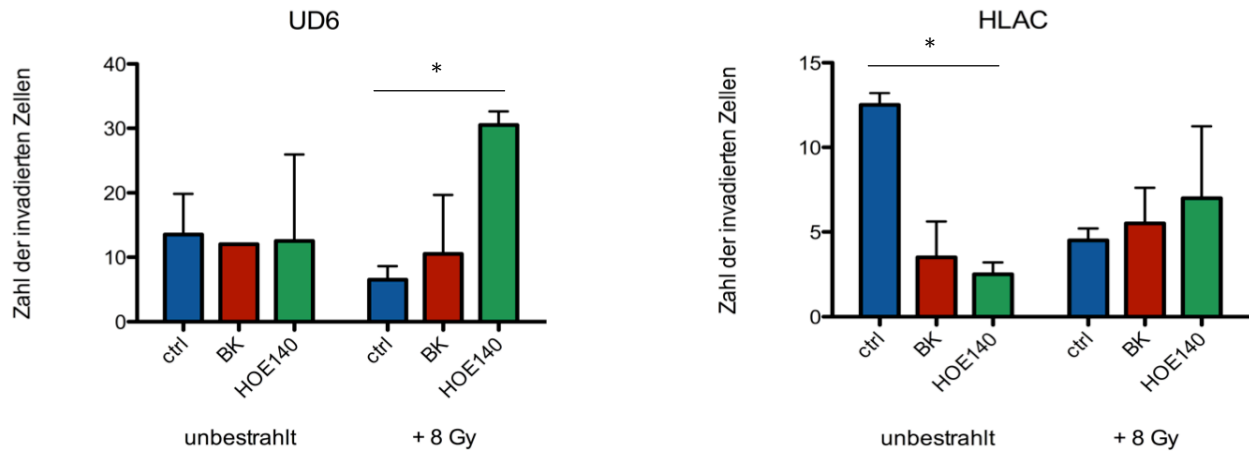
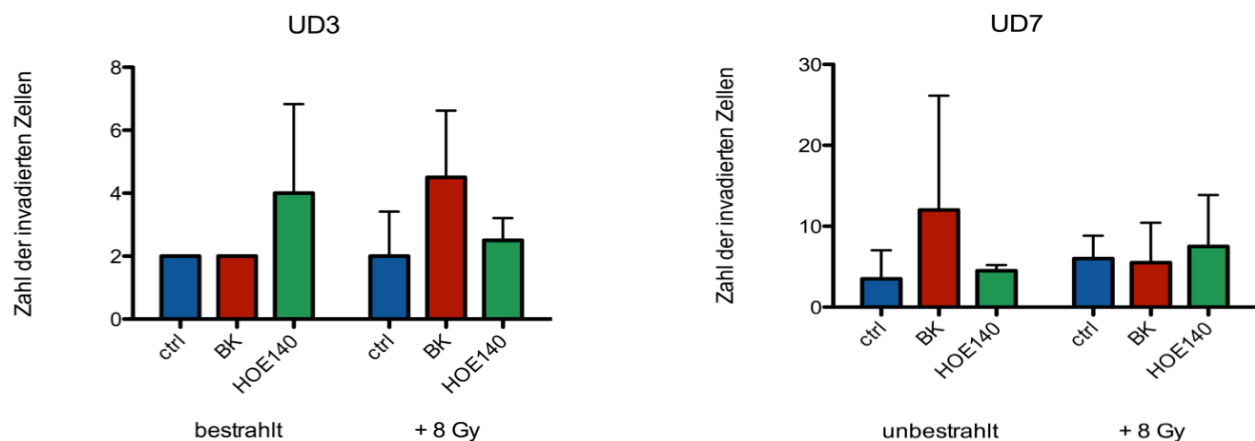


Abbildung 28 zeigt den Effekt der Bradykinin B2-Rezeptor-Inhibition auf die Invasion der Zelllinien; es kann zwischen unbestrahlt und bestrahlt sowie den vorherigen Behandlungen unterschieden werden

Bei den Zelllinien UD3, UD7 und DDP führt die Behandlung mit HOE140 sowohl unbestrahlt (UD3: $p= 0,2995$, UD7: $p= 0,5492$, DDP: $p= 0,2076$) als auch nach Bestrahlung zu einem erhöhten Invasionsverhalten der Zellen, wobei sich die Zunahme der Invasivität nur bei der Zelllinie DDP als statistisch signifikant darstellt (UD3: $p= 0,4226$, UD7: $p= 0,7315$, DDP: $p= 0,0059$).



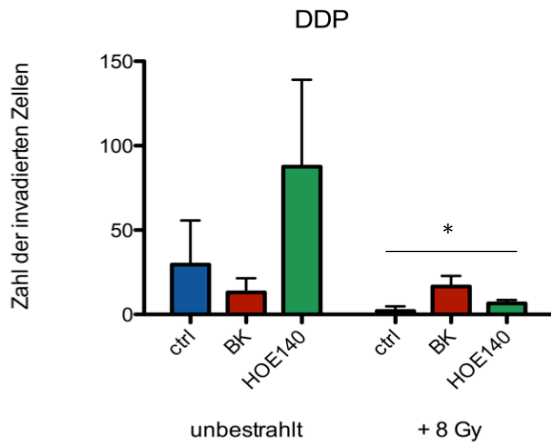


Abbildung 29: Zahl der invadierten Zellen nach HOE140-Zugabe; die Graphik zeigt den Vergleich zwischen Bestrahlung und Kontrolle (unbestrahlt)

Zusammenfassend kann man feststellen, dass auch nach Behandlung mit HOE140 die Zelllinien auf verschiedene Weise reagieren, wobei sich wie bei den vorherigen Versuchen zwei Verhaltenstendenzen herausarbeiten lassen.

Bei der ersten Gruppe der Zelllinien Cal27, HN, UD4, UD5, UD6 und HLAC manifestiert sich die Bradykinin B2-Rezeptor-Blockade unbestrahlt meist in einem verringerten Invasionsverhalten. Bei den Zelllinien UD1, UD3 und UD7 zeigt die Behandlung mit HOE140 keine statistisch signifikanten Ergebnisse. Lediglich die Zelllinie DDP zeigt bei Zugabe von HOE140 und gleichzeitiger Bestrahlung eine signifikant erhöhte Invasivität.

Die zusammenfassende Darstellung erfolgt tabellarisch:

Invasivität der Zellen	unbestrahlt + HOE140	+ 8Gy + HOE140
Cal27, HN, UD4, UD5, UD6, HLAC	↓	⇔ (↑)
UD1, UD3, UD7, DDP	⇔	⇔ (↑)

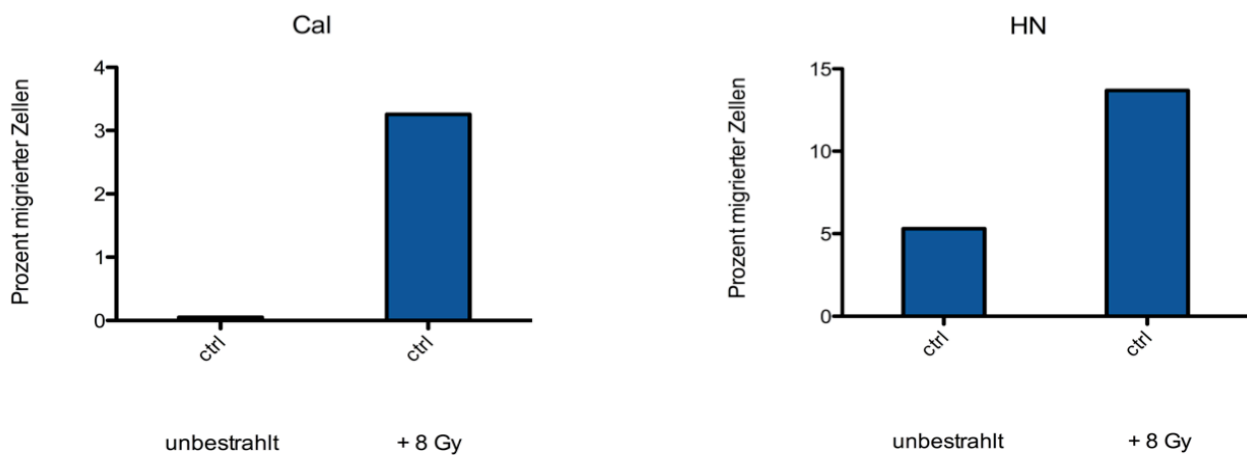
Tabelle 28: tabellarische Darstellung der Ergebnisse des Invasions-tests nach Zugabe von HOE140

3.1.4. Migration

Mit Hilfe des Wound-Healing-Tests wurde das Migrationsverhalten der Zellen dargestellt. Dabei soll vor allem der Effekt der Bestrahlung untersucht werden. Des Weiteren wurde auf die Effekte von Stimulation und Inhibition des Kallikrein-Kinin-Systems bezüglich des Migrationsverhaltens der Zellen genauer eingegangen.

3.1.4.1. Effekt der Bestrahlung auf das Migrationsverhalten der Zellen

Wie in Abbildung 30 dargestellt, manifestiert sich bei den Zelllinien Cal27, HN, UD5, UD7 und DDP eine strahleninduzierte Migration. Lediglich die Zelllinie UD4 reagiert nach Bestrahlung mit einem verringerten Migrationsverhalten. Die Zelllinien UD3, UD6 und HLAC waren aufgrund ihres langsamen Wachstumsverhaltens schlecht geeignet für den Wound-Healing-Test. Um von möglichst ähnlichen Versuchsbedingungen auszugehen, wurden deshalb die Zelllinien Cal27, HN, UD4, UD5, UD7 und DDP verwendet.



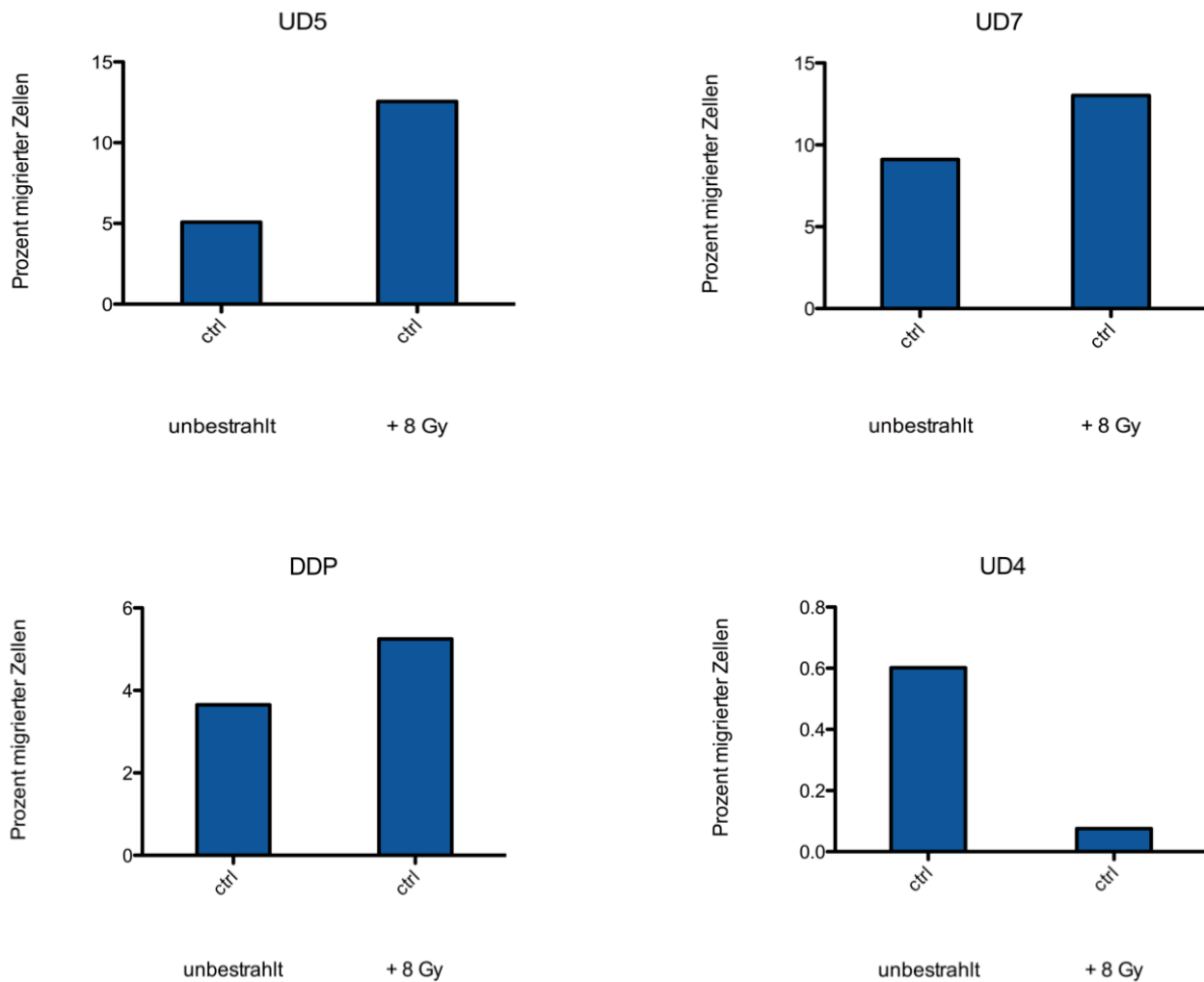


Abbildung 30: Effekt der Bestrahlung auf das Migrationsverhalten der Zellen

3.1.4.2. Einfluß der Bradykinin-Stimulation auf die Migration unserer Plattenepithelkarzinomzellen

Die Stimulation mit Bradykinin resultiert bei den Zelllinien HN, UD5 und DDP unbestrahlt in einer Zunahme des Migrationsverhaltens. Nach Bestrahlung und gleichzeitiger Bradykinin-Stimulation zeigt sich ein, verglichen mit der Kontrolle, verringertes Migrationsverhalten der Zellen.

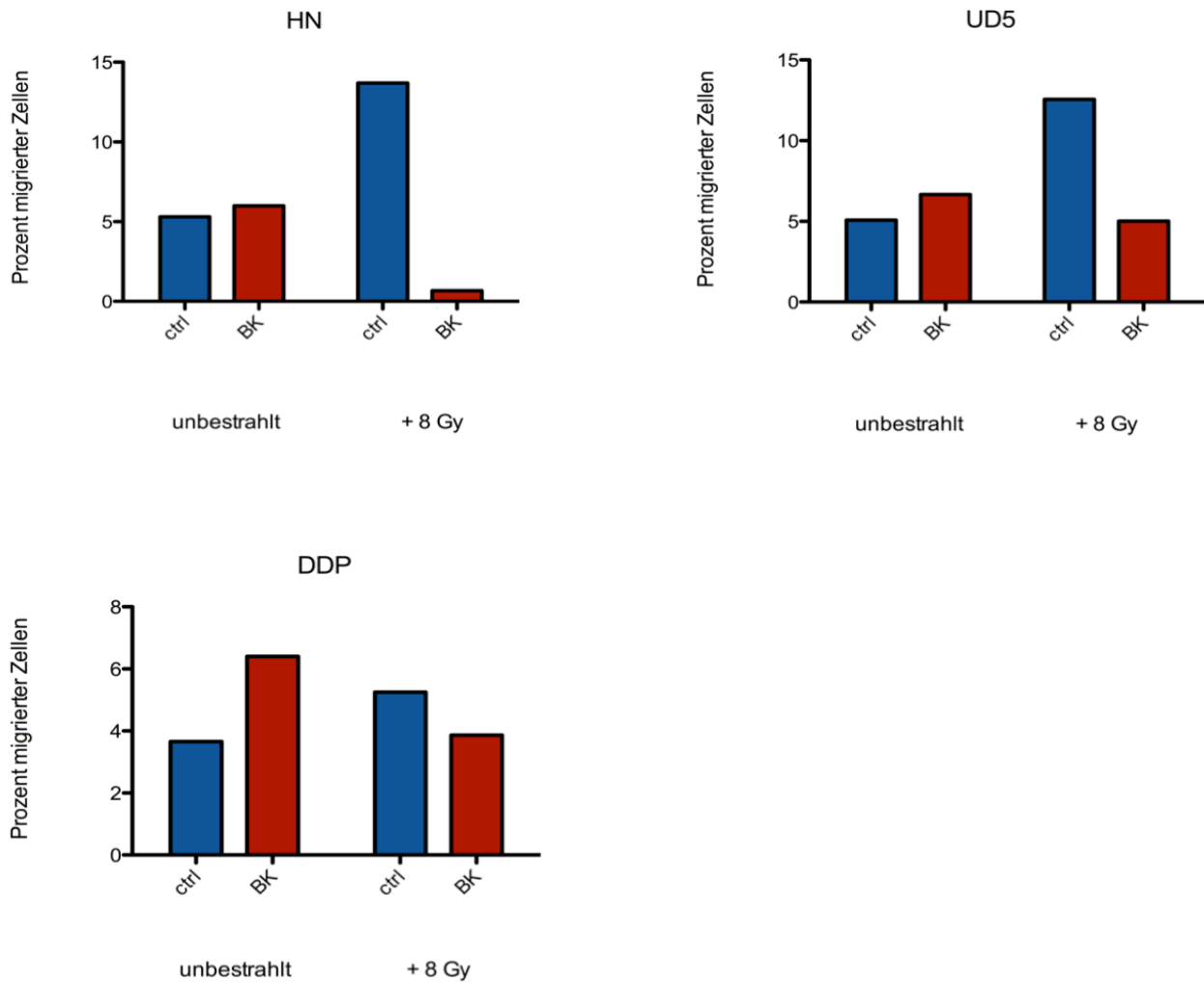


Abbildung 31: Effekt der Bradykinin-Stimulation auf das Migrationsverhalten der Zellen HN, UD5 und DDP

Nach Stimulation mit Bradykinin zeigen die Zelllinien Cal27 und UD4 unbestrahlt ein stärkeres Migrationsverhalten. Auch nach Bestrahlung resultiert die Stimulation von Bradykinin in einer verstärkten Migration der Plattenepithelzelllinien Cal27 und UD4.

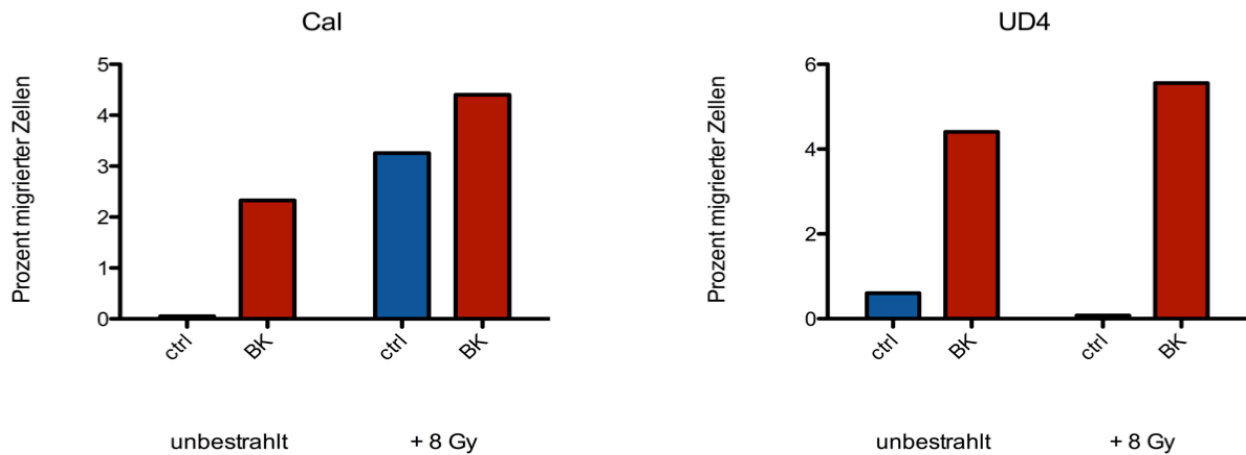


Abbildung 32: Effekt der Bradykinin-Stimulation auf die Migration der Zelllinien Cal27 und UD4

Lediglich bei der Zelllinie UD7 resultiert die Bradykinin-Stimulation sowohl unbestrahlt als auch nach Bestrahlung in einem verringerten Migrationsverhalten. Die unbehandelte Kontrolle zeigt also in beiden Fällen höheres Migrationspotential als die behandelten Zellen.

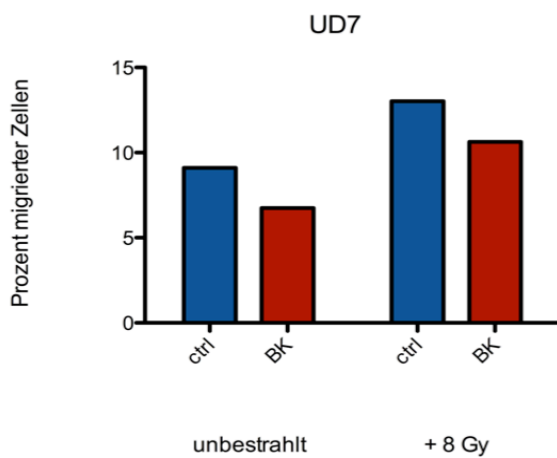


Abbildung 33: Einfluss der Zugabe von Bradykinin auf das Migrationsverhalten der Zelllinie UD7

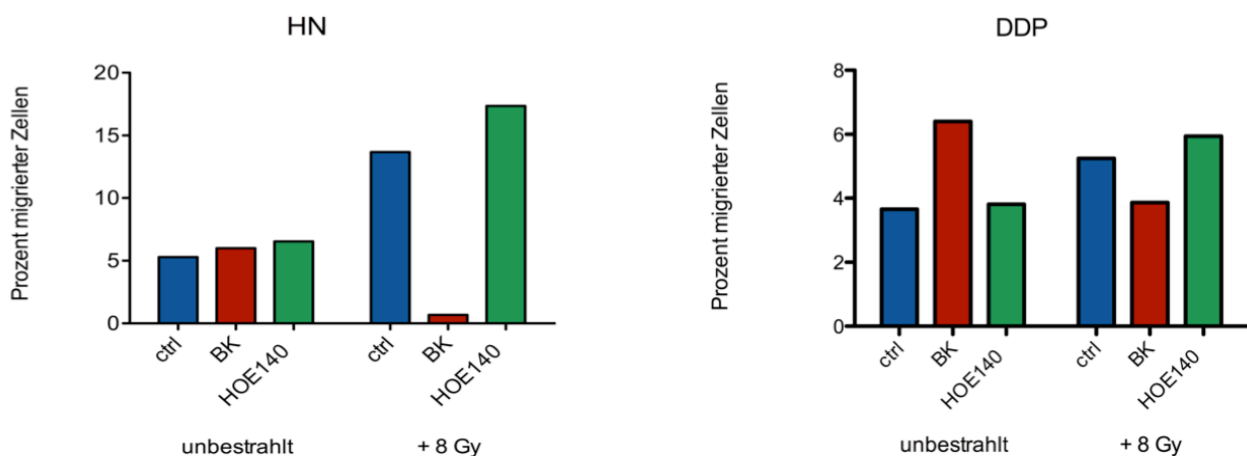
In folgender Tabelle sind die Ergebnisse des Migrationsverhaltens der Zellen nach Bradykinin-Stimulation zusammengefasst:

Migration der Zellen	unbestrahlt + BK	+ 8Gy + BK
HN, UD5, DDP	↑	↓
Cal27, UD4	↑	↑
UD7	↓	↓

Tabelle 29: Zusammenfassung der Ergebnisse des Wound-Healing-Tests nach Bradykinin-Stimulation

3.1.4.3. Effekt der Blockade des Bradykinin B2-Rezeptors mit HOE140 auf das Migrationsverhalten der Plattenepithelkarzinomzellen

Nach Zugabe von HOE140 zeigt sich bei den Zelllinien HN und DDP unbestrahlt kein deutliches Migrationsverhalten. Nach Bestrahlung und gleichzeitiger Inhibition des Bradykinin B2-Rezeptors verfügen die Zellen über ein größeres Migrationspotential als die unbehandelte Kontrolle.



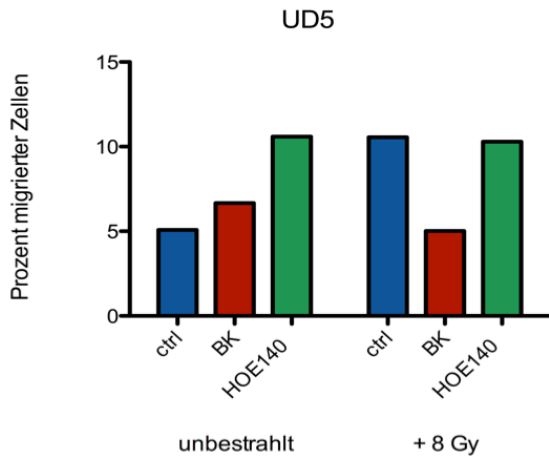
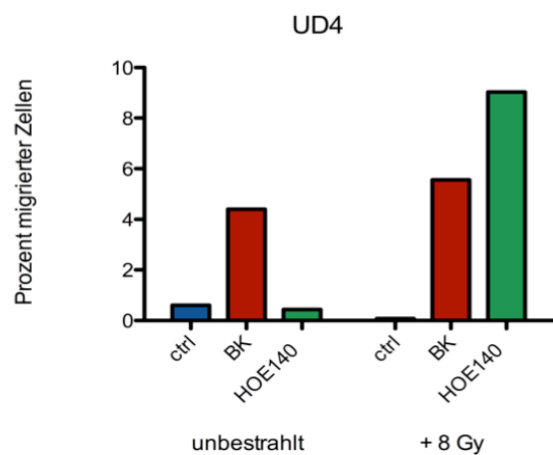
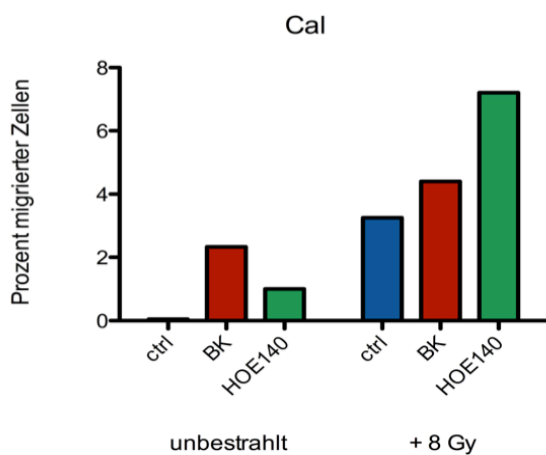


Abbildung 34: Migrationsverhalten der Zelllinien HN, DDP und UD5 nach Zugabe von HOE140

Unbestrahlt zeigt sich bei den Zelllinien Cal27, UD4 und UD7 nach Zugabe von HOE140 nur ein sehr geringes Migrationsverhalten. Bei UD4 zeigt die Blockade des Bradykinin B2-Rezeptors keinerlei Einfluss auf die Migration. Nach Bestrahlung und Zugabe von HOE140 jedoch verdeutlicht sich eine starke Migrationstendenz der Zellen Cal27, UD4 und UD7.



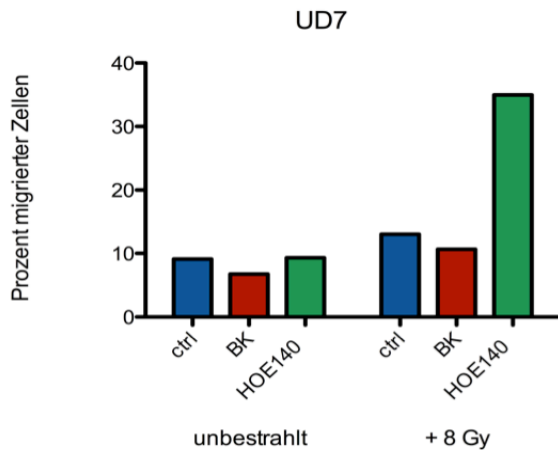


Abbildung 35: Effekt der Bradykinin B2-Rezeptor-Inhibition auf das Migrationsverhalten der Zelllinien Cal27, UD4 und UD7

Die Ergebnisse des Wound-Healing-Tests nach Bradykinin B2-Rezeptor-Blockade sind in folgender Tabelle zusammengefasst:

Migration der Zellen	unbestrahlt + HOE140	+ 8Gy + HOE140
HN, DDP	↓	↑
Cal27, UD4, UD7	↔	↑
UD5	↑	↔

Tabelle 30: Zusammenfassung der Ergebnisse des Wound-Healing-Tests nach Blockade des Bradykinin B2-Rezeptors mit HOE140

3.2. Biochemische Effekte: Western Blot Analysen

Um den Einfluss der Bestrahlung bzw. der Zugabe der Stimulatoren und Inhibitoren biochemisch darzustellen wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Die Bestrahlung erfolgte analog zu den bisher aufgeführten Versuchen mit 8Gy, die Stimulation des Bradykinin B2-Rezeptors mit Bradykinin und dessen Inhibition mit HOE140. Für die Western Blot Analysen wurden exemplarisch drei Zelllinien herausgesucht, die die Ergebnisse der biologischen Analysen am besten verdeutlichen. Auf diese Weise können die biologischen Ergebnisse mit den biochemischen genauer verglichen werden.

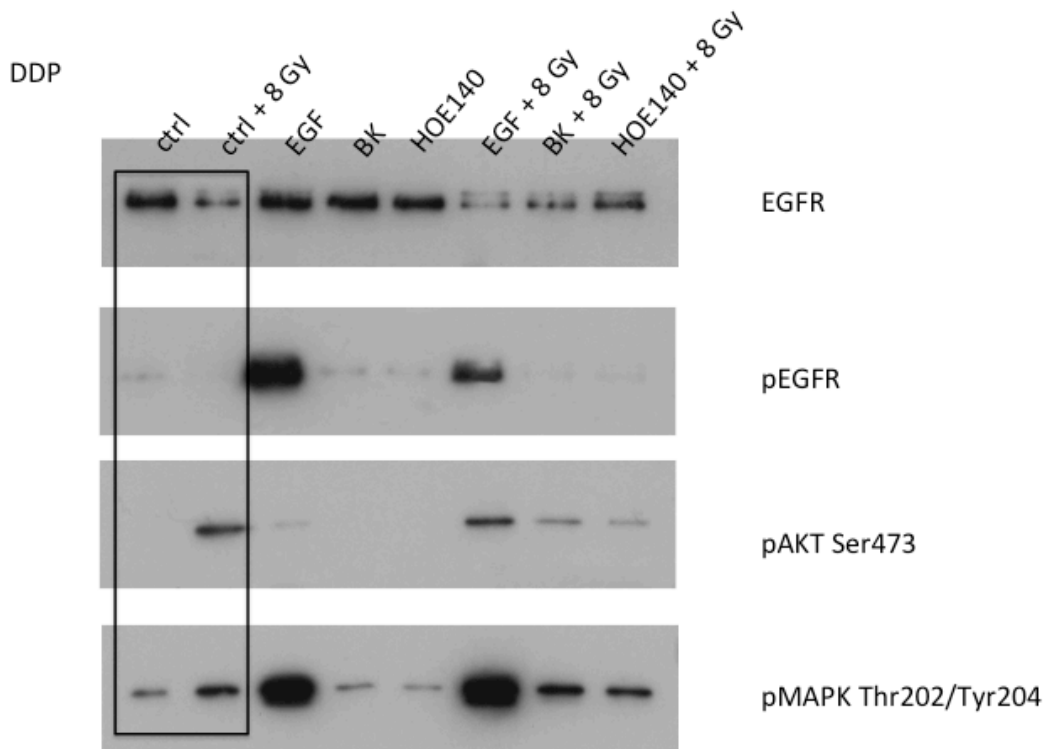
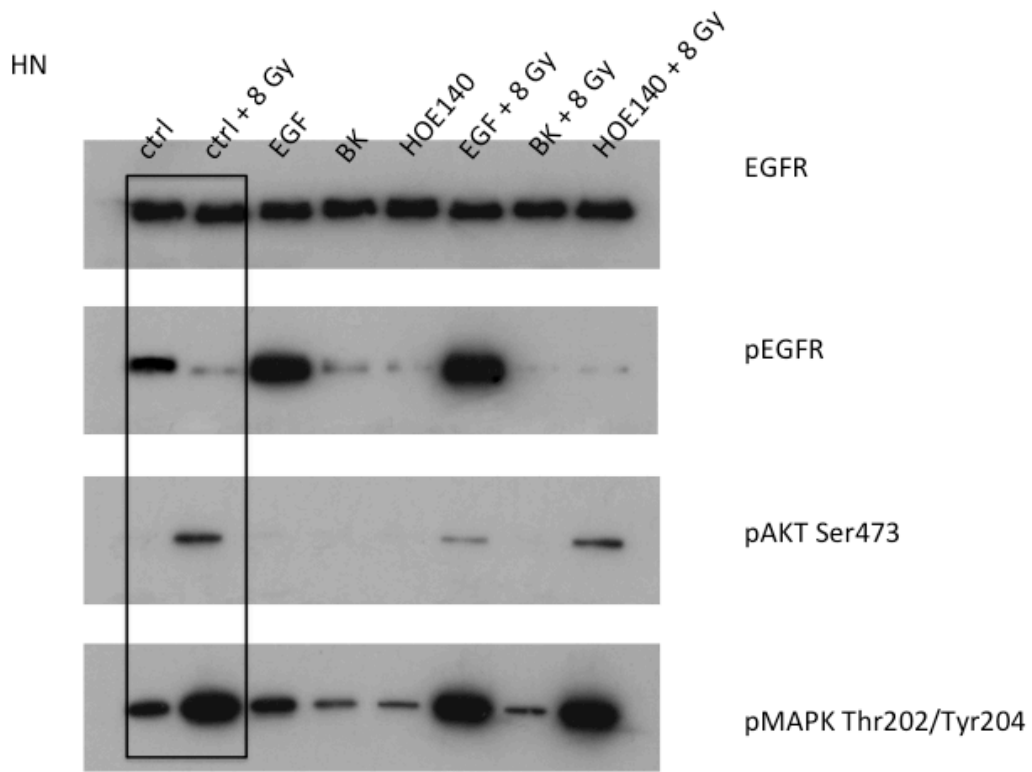
Im Folgenden wird nun genauer auf die Ergebnisse der Western Blot Analysen eingegangen.

3.2.1. Proteinexpression der Zelllinien – Vergleich unbestrahlt vs. bestrahlt

Unbestrahlt erkennt man bei allen Zelllinien eine konstitutive Expression des Bradykinin B2-Rezeptors. Auch nach Bestrahlung bleibt die Expression von BKB2R erhalten. Der EGF-Rezeptor ist bei der Zelllinie HN sowohl unbestrahlt als auch nach Bestrahlung exprimiert. Bei DDP und UD4 zeigt sich eine vermehrte Expression des EGFR nur bei den unbestrahlten Zellen. Bei allen drei Zelllinien resultiert die Bestrahlung in einer Verringerung der Proteinexpression von phospho-EGFR zum Zeitpunkt der Proteinisolation. Bezüglich der Expression von phospho-AKT Ser473 zeigt die Bestrahlung einen positiven Effekt, so dass bei allen drei Zelllinien von einer strahleninduzierten erhöhten Expression gesprochen werden kann. Bei HN und DDP kommt es nach Bestrahlung ebenso zu einer erhöhten Proteinexpression von p-MAPK Thr202/Tyr204. Lediglich die Zelllinie UD4 zeigt eine verringerte p-MAPK Thr202/Tyr204-Expression nach Bestrahlung.

	HN Ø	HN + 8Gy	DDP Ø	DDP + 8Gy	UD4 Ø	UD4 + 8Gy
BKB2R	+	+	+	+	+	+
EGFR	+	+	++	+	++	+
pEGFR	++	+	+	-	++	+
pAKT Ser473	-	+	-	+	-	+
pMAPK Thr202/ Tyr204	+	++	+	++	++	+

Tabelle 31: Effekt der Bestrahlung auf die Proteinexpression der Zelllinien; Ø= unbestrahlt, „++“ = sehr stark exprimiert, „+“ = mäßig exprimiert, „-“ = schwach exprimiert



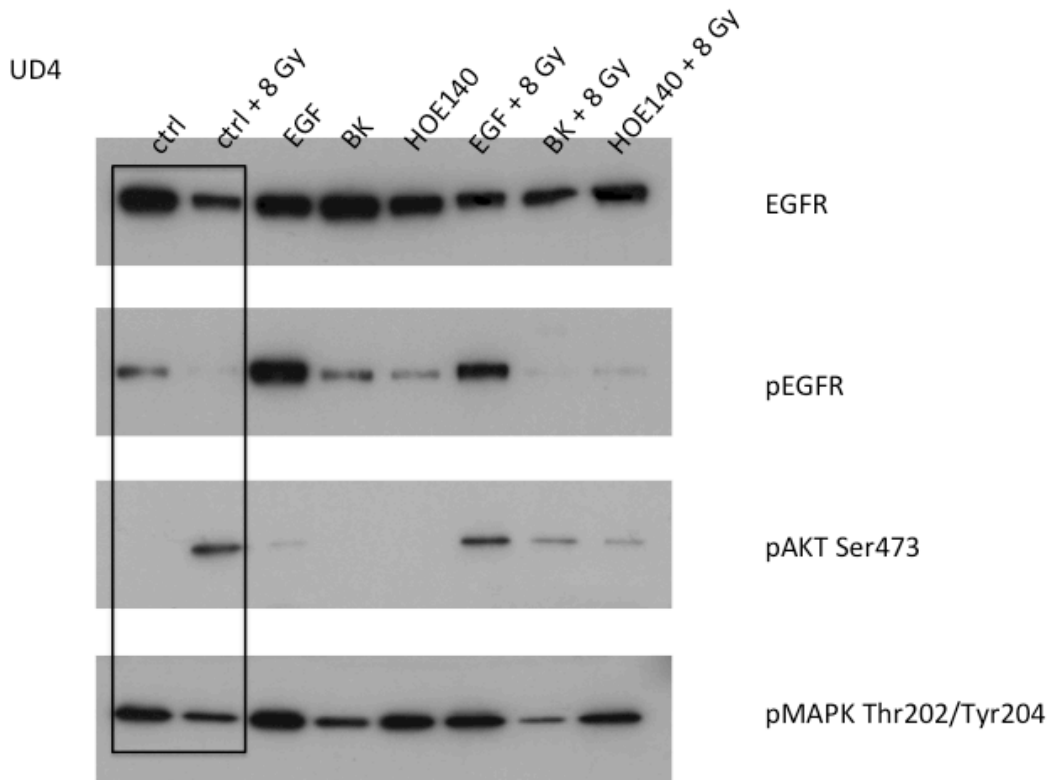


Abbildung 36: Darstellung der Western Blot Analysen; die zu vergleichenden Ergebnisse sind eingerahmt; Größe der Proteine: EGFR 180 kDa, pEGFR 170 kDa, pAKT 60 kDa, pMAPK 42/44 kDa

Als Ladekontrolle für die Western Blot Analysen wurde Tubulin verwendet.

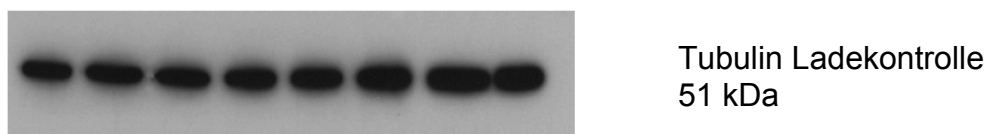


Abbildung 37: Ladekontrolle der Western Blot Analysen

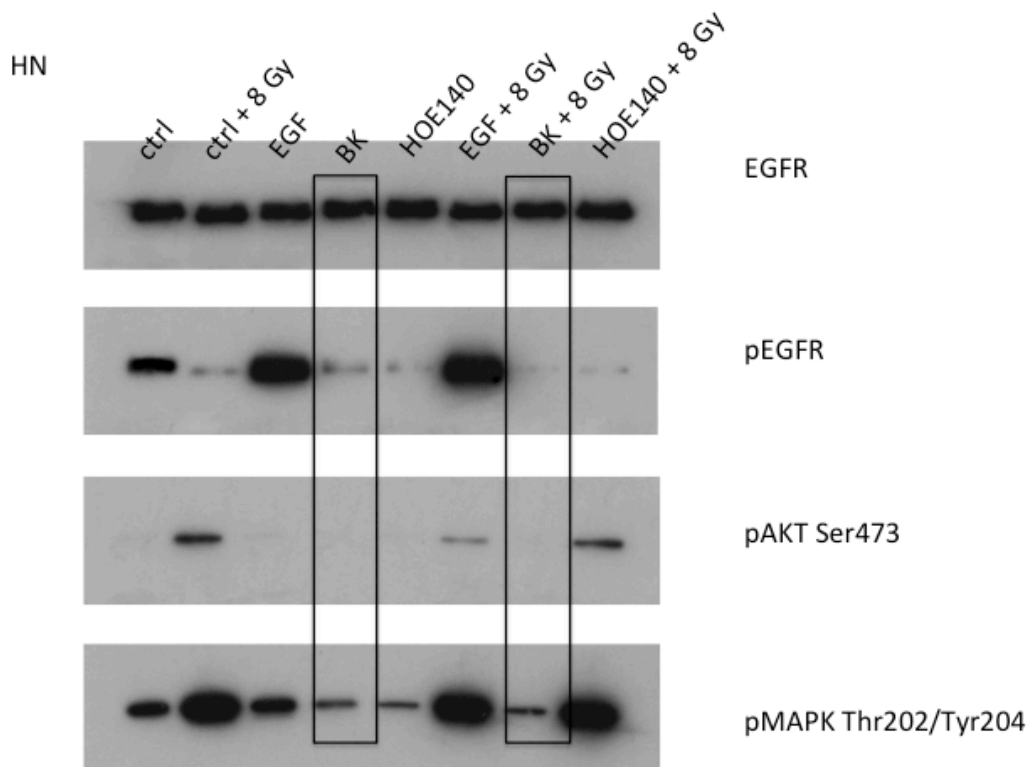
3.2.2. Effekt der Bradykinin-Stimulation auf die Proteinexpression vor und nach Bestrahlung

Im Folgenden wird nun die Proteinexpression nach Stimulation mit Bradykinin genauer charakterisiert. Ausgegangen wird von dem oben aufgeführten Expressionsniveau der Proteine vor und nach Bestrahlung, welches als Kontrollwert gesehen werden soll.

Es zeigt sich, dass die Stimulation mit Bradykinin unbestrahlt keine Auswirkung auf die Proteinexpression des BKB2-Rezeptors der Zelllinien HN und DDP hat. Nach Bestrahlung jedoch lässt sich eine Hochregulierung des Bradykinin B2-Rezeptors nachweisen. Lediglich die Zelllinie UD4 zeigt mit und ohne Bestrahlung eine Hochregulierung des BKBR2 nach Bradykinin-Stimulation. Die Proteinexpression des EGFR kann bei allen Zelllinien durch die alleinige Bradykinin-Stimulation nicht verändert werden. Erst nach Bestrahlung zeigt sich bei den Zelllinien DDP und UD4 eine verringerte Aktivierung des EGFR. Die Aktivierung des pEGFR nach Zugabe von Bradykinin kann bei den Zelllinien HN und DDP durch Bestrahlung nicht verändert werden, lediglich bei der Zelllinie UD4 resultiert die kombinierte Behandlung mit Bradykinin und Bestrahlung in einem Abfall des pEGFR. Die Expression des pAKT Ser473 bleibt bei der Zelllinie HN unabhängig von der Behandlung konstant. Bei DDP zeigt sich eine vermehrte Expression nach Bestrahlung, bei UD4 eine verringerte Expression von pAKT Ser473, die in beiden Versuchsansätzen zu sehen ist. Die Bradykinin-Stimulation führt bei HN sowohl mit als auch ohne Bestrahlung zu einer verringerten Aktivierung von pMAPK Thr202/Tyr204. Bei DDP zeigt sich unter der kombinierten Behandlung von BK + 8Gy eine vermehrte Aktivierung, bei UD4 eine verringerte Expression von pMAPK Thr202/Tyr204.

	HN + BK	HN BK + 8Gy	DDP + BK	DDP BK + 8Gy	UD4 + BK	UD4 BK + 8Gy
BKB2R	↔	↑	↔	↑	↑	↑
EGFR	↔	↔	↔	↓	↔	↓
pEGFR	↓	↓	↔	↔	↔	↓
pAKT Ser473	↔	↔	↔	↑	↓	↓
pMAPK Thr202/ Tyr204	↓	↓	↔	↑	↔	↓

Tabelle 32: Änderung der Proteinexpression nach Bradykinin-Stimulation; Vergleich unbestrahlt vs. bestrahlt; „↑“ = vermehrte Proteinexpression im Vergleich zur Kontrolle, „↓“ = verminderte Proteinexpression im Vergleich zur Kontrolle, „↔“ = gleiches Expressionsniveau wie die Kontrolle



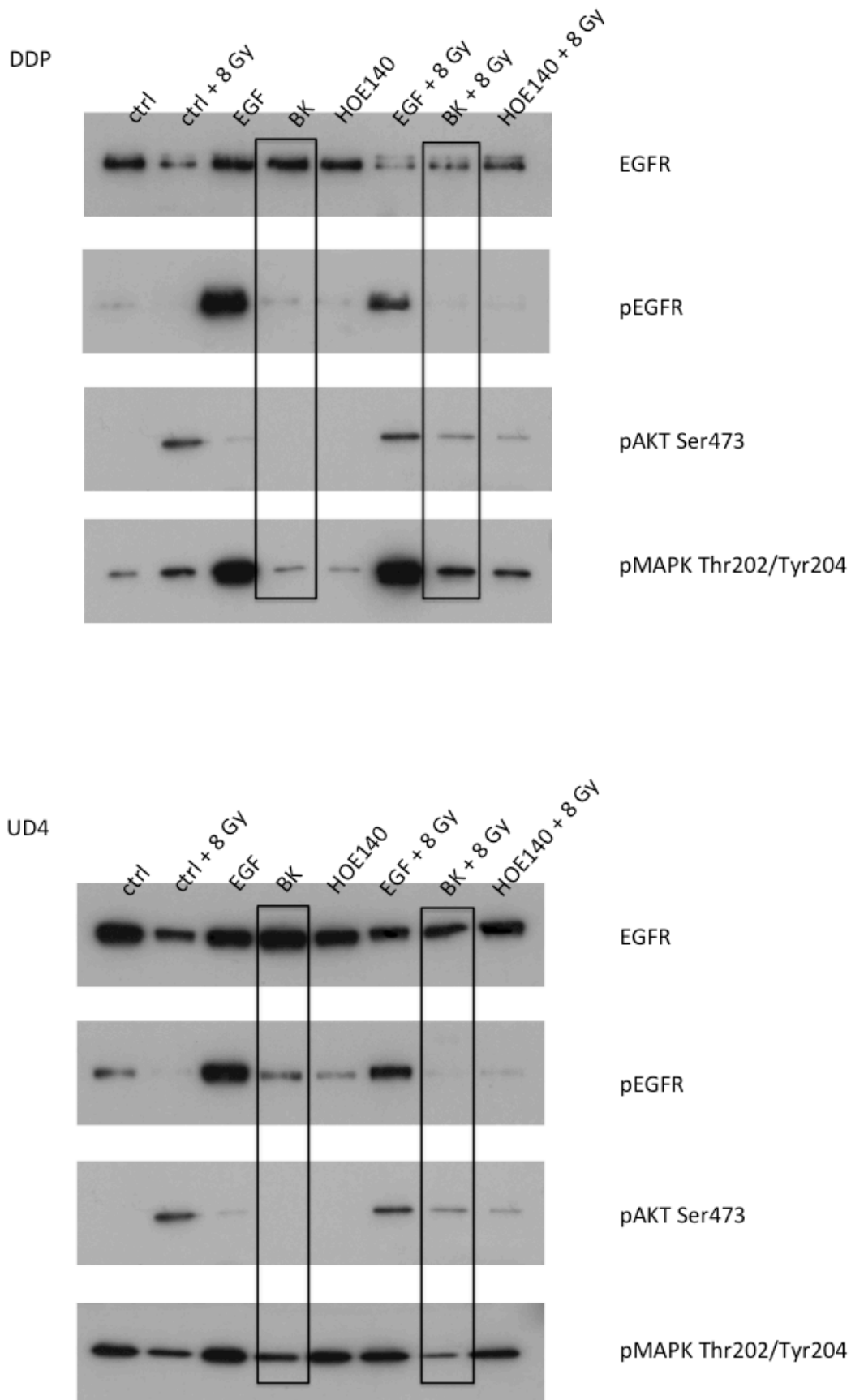


Abbildung 38: Darstellung der Western Blot Analysen. Die zu vergleichenden Ergebnisse sind eingerahmt; Größe der Proteine: EGFR 180 kDa, pEGFR 170 kDa, pAKT 60 kDa, pMAPK 42/44 kDa

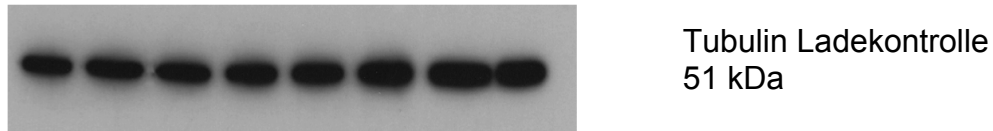


Abbildung 39: Tubulin Ladekontrolle

3.2.3. Effekt der Inhibition des Bradykinin B2-Rezeptors auf die Proteinexpression; Vergleich unbestrahlt vs. bestrahlt

Die Inhibition des Bradykinin B2-Rezeptors erfolgte wie bei den anderen Versuchen mit HOE140, einem spezifischen Bradykinin B2-Rezeptor-Blocker. Ohne Bestrahlung zeigt sich bei den Zelllinien HN, UD4 und DDP keine Regulation der Proteinexpression des BKB2-Rezeptors nach seiner Blockade mit HOE140. Gleichzeitige Bestrahlung und Inhibition des BKB2R resultieren in einer vermehrten Proteinexpression des Bradykinin B2-Rezeptors bei den Zelllinien UD4 und DDP. HN zeigt keine veränderte Proteinexpression nach Bestrahlung. In folgender Abbildung ist die Proteinexpression des BKB2R am Beispiel der Zelllinie UD4 dargestellt.

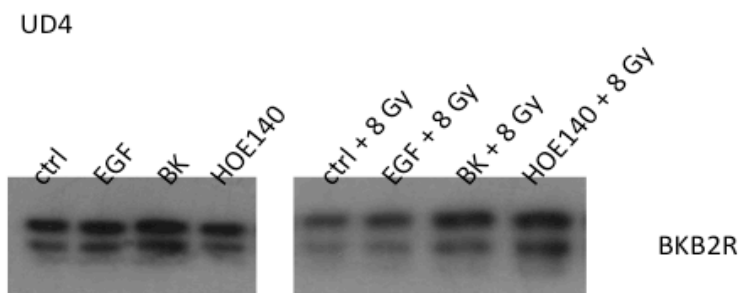
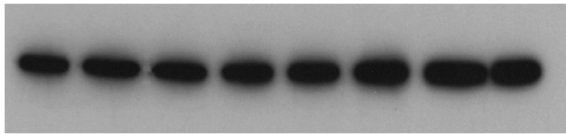


Abbildung 40: Darstellung der Proteinexpression des BKB2R am Beispiel der Zelllinie UD4; Größe von BKB2R: 75 – 80 kDa



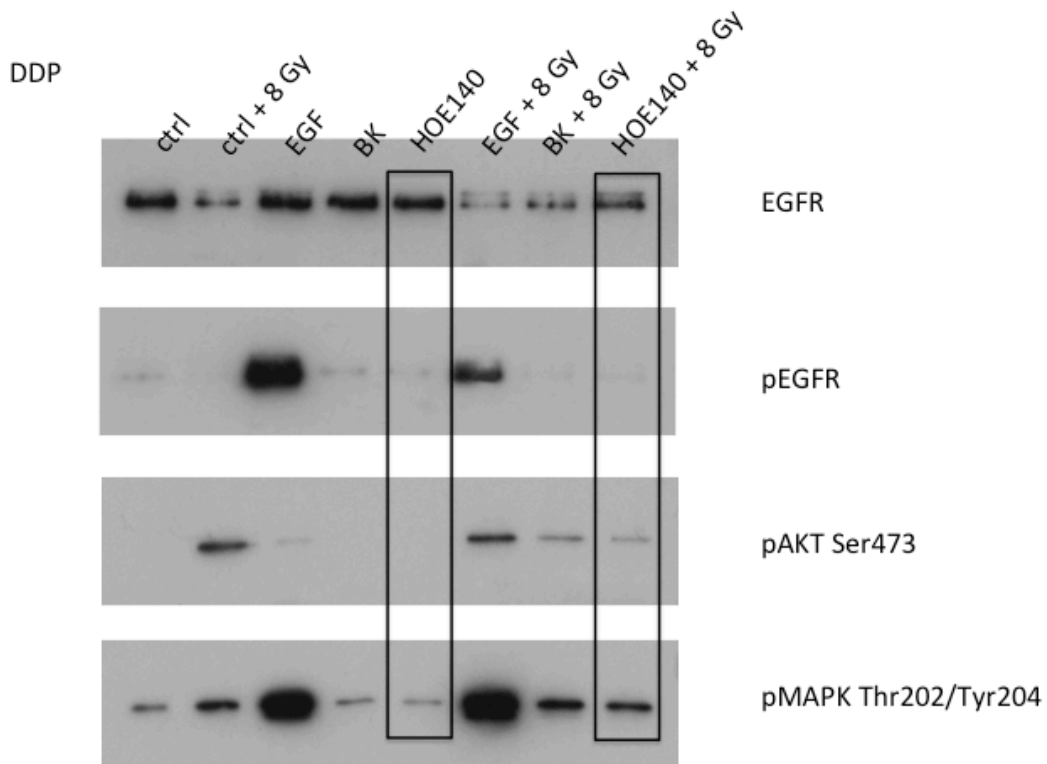
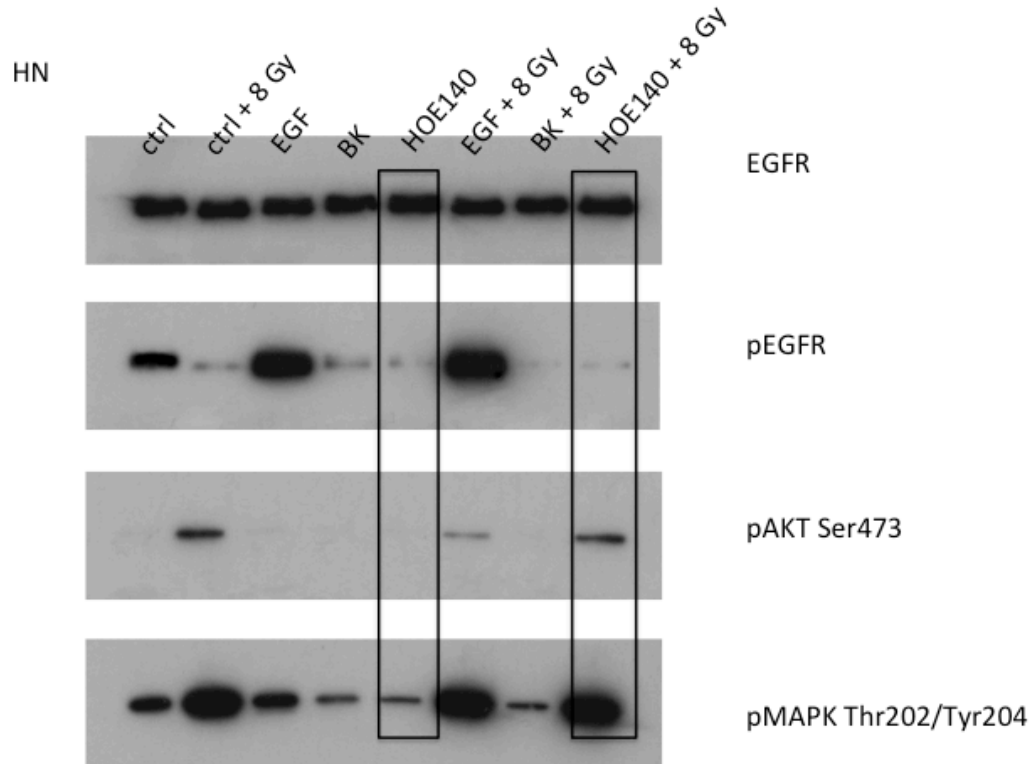
Tubulin Ladekontrolle
51 kDa

Abbildung 41: Tubulin Ladekontrolle

Nach kombinierter Behandlung von HOE140 + 8Gy zeigt sich bei den Zelllinien HN und UD4 keine veränderte Expression des EGFR. Nur bei DDP kommt es nach Bestrahlung zu einer vermehrten Aktivierung. Der pEGFR wird bei HN durch die Blockade des Bradykinin B2-Rezeptors herunter reguliert, bei DDP bleibt das Expressionsniveau von pEGFR unverändert. Bei UD4 resultiert die Bestrahlung in einer verringerten Aktivierung von pEGFR nach Zugabe von HOE140. Bei allen drei Zelllinien führen die Blockade mit HOE140 und simultane Bestrahlung zu einer vermehrten Aktivierung von pAKT Ser473. Unter gleichen Bedingungen zeigen auch die Zelllinien HN und DDP eine starke Aktivierung von pMAPK Thr202/Tyr204. Bei der Zelllinie UD4 hat die Zugabe von HOE140 keinen Einfluss auf die Proteinexpression von pMAPK Thr202/Tyr204.

	HN + HOE140	HN + HOE140 + 8Gy	DDP + HOE140	DDP + HOE140 + 8Gy	UD4 + HOE140	UD4 + HOE140 + 8Gy
BKB2R	↔	↔	↔	↑	↔	↑
EGFR	↔	↔	↔	↓	↔	↔
pEGFR	↓	↓	↔	↔	↔	↓
pAKT Ser473	↔	↑	↔	↑	↓	↑
pMAPK Thr202/ Tyr204	↓	↑↑	↓	↑	↔	↔

Tabelle 33: Verhalten der Proteinexpression nach Blockade des Bradykinin B2-Rezeptors durch HOE140 verglichen mit der Kontrolle; Vergleich unbestrahlt vs. bestrahlt; „↑↑“ = sehr stark erhöhte Proteinexpression verglichen mit der Kontrolle, „↑“ = vermehrte Proteinexpression im Vergleich zur Kontrolle, „↓“ = verminderte Proteinexpression im Vergleich zur Kontrolle, „↔“ = gleiches Expressionsniveau wie die Kontrolle



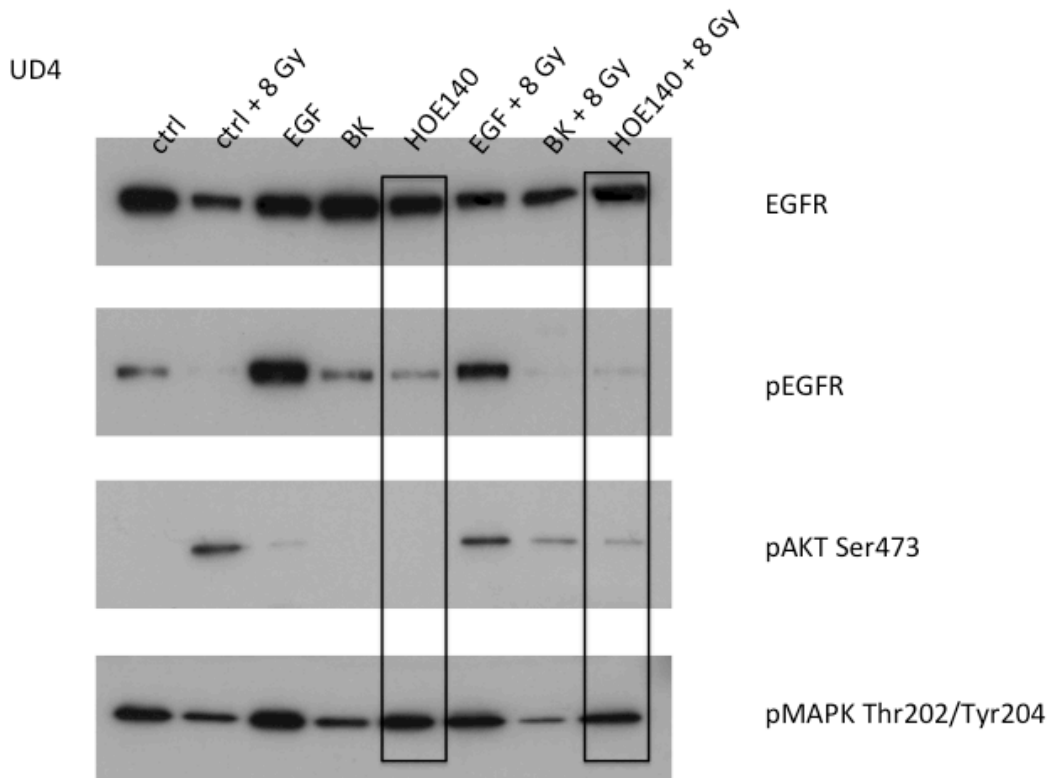


Abbildung 42: Darstellung der Western Blot Analysen; die zu vergleichenden Ergebnisse sind eingerahmt; Größe der Proteine: EGFR 180 kDa, pEGFR 170 kDa, pAKT 60 kDa, pMAPK 42/44 kDa

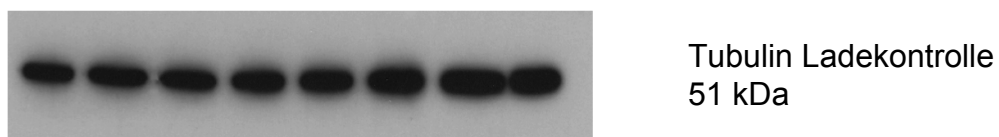


Abbildung 43: Tubulin Ladekontrolle

Folgende Tabellen liefern einen Überblick über die oben genannten Ergebnisse der Western Blot Analysen.

Bei den Zelllinien HN und DDP (Gruppe 1) zeigen sich nach Bestrahlung sowie nach Zugabe von HOE140 und Bestrahlung folgende Ergebnisse: Die vermehrte Expression der dem EGFR nachgeschalteten Signalwege pAKT Ser473 und pMAPK Thr202/Tyr204 lassen auf eine Aktivierung des EGF-Rezeptors schließen. Bei Bradykinin-Stimulation sowie bei BKB2R-Blockade ohne Bestrahlung bleiben die Signalwege pAKT Ser473 und pMAPK Thr202/Tyr204 unbeeinflusst.

HN	+ 8Gy	BK	BK + 8Gy	HOE140	HOE140 + 8Gy
EGFR	-	-	-	-	-
pEGFR	↓	↓	↓	↓	↓
pAKT Ser473	↑	-	-	-	↑
pMAPK Thr202/Tyr204	↑	↓	↓	↓	↑↑

Tabelle 34: Zusammenfassung der Western Blot Analysen der Zelllinie HN

DDP	+ 8Gy	BK	BK + 8Gy	HOE140	HOE140 + 8Gy
EGFR	↓	-	↓	-	↓
pEGFR	↓	-	-	-	-
pAKT	↑	-	↑	-	↑
pMAPK	↑	-	↑	↓	↑

Tabelle 35: Zusammenfassung der Western Blot Analysen der Zelllinie DDP

Bei der Zelllinie UD4, die die 2. Gruppe repräsentiert, zeigt sich auch nach Bestrahlung und nach Inhibition des BKB2R mit simultaner Bestrahlung eine Aktivierung von pAKT, allerdings nicht von pMAPK Thr202/Tyr204. Die mit Bradykinin stimulierten Zellen zeigen keine Aktivierung oben genannter Signalwege.

UD4	+ 8Gy	BK	BK + 8Gy	HOE140	HOE140 + 8Gy
EGFR	↓	-	↓	-	-
pEGFR	↓	-	↓	-	↓
pAKT	↑	↓	↓	↓	↑
pMAPK	↓	-	↓	-	-

Tabelle 36: Zusammenfassung der Western Blot Analysen der Zelllinie UD4

Folgende Darstellung verdeutlicht den Zusammenhang der biologischen Ergebnisse mit den relevanten Signalkaskaden. Es soll nun überprüft werden, ob die Zugaben von HOE140 und 8Gy EGFR-abhängige Signalwege aktivieren, wie es auch nach alleiniger Radiatio zu sehen ist. Dazu sollen sowohl der EGFR mit Tyrphostin AG1478, einem spezifischen EGFR-Tyrosin-Kinase-Inhibitor, ebenso wie der Bradykinin B2-Rezeptor mit HOE140 zeitgleich blockiert werden. Dieser Versuch wurde sowohl unbestrahlt als auch nach Bestrahlung mit 8Gy durchgeführt.

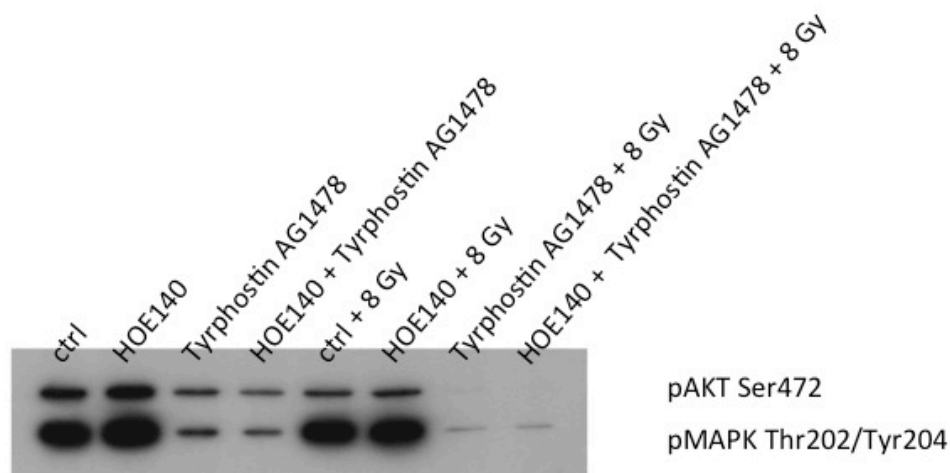


Abbildung 44: Darstellung der Western Blot Analyse nach Blockade des EGFR mit Tyrphostin AG1478; Größe der Proteine: pAKT 60 kDa, pMAPK 42/44 kDa

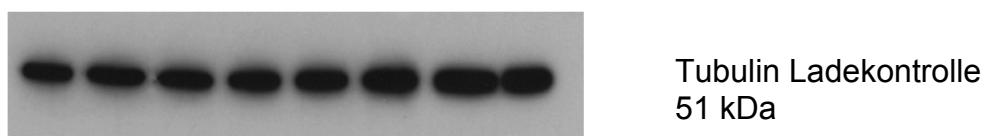


Abbildung 45: Tubulin Ladekontrolle

Die Ergebnisse dieses Western Blots bestätigen die Hochregulierung von pMAPK Thr202/Tyr204 nach Bestrahlung und nach Zugabe von HOE140 und Bestrahlung. Nach Blockade des EGFR mit Tyrphostin AG1478 kann der Effekt auf die Signalwege reduziert werden. Auch die kombinierte Behandlung mit HOE140 und

Tyrphostin AG1478 zeigt sowohl unbestrahlt als auch nach Radiatio eine deutlich geringere Aktivierung von pAKT Ser473 und pMAPK Thr202/Tyr204.

4. Diskussion

Einfluss des Kallikrein-Kinin-Systems auf die Tumorbilogie von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs stehen weltweit an sechster Stelle aller Tumorerkrankungen (Hunter, Parkinson et al., 2005), in Deutschland sogar an vierter Stelle (Tumorzentrum München, 2003). Zu den Therapiemöglichkeiten zählt neben der operativen Entfernung des Tumorgewebes auch der Einsatz von adjuvanter oder neoadjuvanter Radiochemotherapie. Insgesamt jedoch kann trotz neuester Fortschritte bei der Tumorthherapie eine vollständige Heilung nur bei weniger als 50% der Patienten erreicht werden (Goerner, Seiwert et al., 2010). Unter anderem ist dieser Effekt auf folgende Aspekte zurück zu führen:

Die Strahlenresistenz bei Plattenepithelkarzinomzellen des Kopf-Hals-Bereichs, auf die das häufige Auftreten von lokalen Rezidiven zurück zu führen ist, stellt ein wesentliches Problem dar (Yang, McEachern et al., 2011). Des Weiteren konnte bei unterschiedlichen Tumorzelllinien eine strahleninduzierte Migration nachgewiesen werden, was zum Beispiel bei Gliomen zu einer erhöhten Rezidivrate des Primarius führt (Wild-Bode, Weller et al. 2001). Ebenso konnte auch bei Plattenepithelkarzinomzelllinien eine vermehrte Migration nach Radiatio dargestellt werden (Pickhard, Margraf et al., 2011).

Aus diesen Gründen spielen neue Therapiemöglichkeiten bei der Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren eine entscheidende Rolle. Die wissenschaftlich nachgewiesene Überexpression des EGF-Rezeptors bei Kopf-Hals-Tumoren (Thomas, Bhola et al., 2006) führte zur Entwicklung der Phase III-Studie bei HNSCC, der sogenannten Bonner Studie. Dort konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Erbitux bei gleichzeitiger Radiotherapie zu einem besseren Überleben (29 Monate bei RT; 49 Monate bei RT + Erbitux) und zu einem längeren 3-Jahres-Überleben (3JÜ 45% bei RT; 3JÜ 55% bei RT + Erbitux) führt (Bonner, Harari et al., 2006). Als palliative Therapieoption steht die EGFR-Target Therapie mit Cetuximab in Kombination mit 5FU bereits in der Klinik zur Verfügung (Sharafinski, Ferris et al., 2010).

Zudem konnte auch gezeigt werden, dass das Kallikrein-Kinin-System und seine nachgeschalteten Signalwege Tumorwachstum und Angiogenese stimulieren (Ikeda,

Hayashi et al., 2004). Des Weiteren beschreibt die Literatur eine Hochregulierung von Tissue Kallikrein und Kinin B1 und B2-Rezeptoren in Plattenepithelkarzinom des Oesophagus (Dlamini and Bhoola, 2005). Deshalb stellt das Kallikrein-Kinin-System und sein Endprodukt Bradykinin eine Option für einen molekularen Therapieansatz bei Tumoren dar.

Das Nonapeptid Bradykinin entsteht durch enzymatische Freisetzung aus Kininogen und hat physiologisch weitreichende Effekte auf den Körper. Dazu zählen neben Blutdruckregulierung und Organperfusion auch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren und die Schmerzvermittlung (Roberts and Gullick, 1989). Das Kallikrein-Kinin-System hat außerdem Einfluss auf das biologische Verhalten von Tumorzellen (Zhang, Bhola et al., 2008). Der Bradykinin-induzierte Effekt auf das Tumorzellverhalten wird über eine Aktivierung des Bradykinin B2-Rezeptors vermittelt (Ishihara, Hayash et al., 2001). Der BKB2-Rezeptor-Aktivierung folgen eine Phosphorylierung der MAPK und der PI3K/ Proteinkinase B (PKB/ AKT), welche zentrale Bezugspunkte der nachgeschalteten Signalwege darstellen (Greco, Elia et al., 2005)/ (Greco, Storelli et al., 2006).

Im Folgenden wird nun die Bedeutung des Kallikrein-Kinin-Systems und seiner Blockade auf Proliferation, Überleben, Invasivität und Migration von Plattenepithelkarzinomzellen des Kopf-Hals-Bereichs genauer dargestellt. Dabei sollen die Ergebnisse dieser Arbeit mit den in der Literatur beschriebenen Erkenntnissen abgeglichen werden; zudem soll auch der Effekt der Strahlentherapie auf das biologische Verhalten verdeutlicht werden.

Eingesetzte experimentelle Methoden

Die Proliferationsrate der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurde mittels Crystal Violet ELISA gemessen. Mit dieser Methode konnte nicht nur das Proliferationsverhalten der Zellen bestimmt, sondern auch ein unter Umständen zu hoher Zellausfall nach Bestrahlung mit 8Gy ausgeschlossen werden. Mit dem Crystal Violet ELISA konnte zudem der optimale Untersuchungszeitraum für den geplanten Wound-Healing-Test bestimmt werden, so dass der Einfluss der Proliferationsrate auf

die Ergebnisse des Migrationsversuchs möglichst gering gehalten wird. Da bei den Ergebnissen des Crystal Violet ELISA bereits nach 24h bis 48h bei allen Zellen eine einsetzende Proliferation nachgewiesen werden konnte, wurden die Auswertungszeitpunkte des Wound-Healing-Assays auf 4h und 12h festgelegt.

Der Wound-Healing-Assay diente zur optischen Darstellung der Migration der Zellen. Dazu werden diejenigen Zellen gezählt, welche im oben genannten Zeitraum in den vorgefertigten Spalt migriert sind. Dieser Test ist gut objektivierbar und überzeugt durch kostengünstige Durchführung und gute Reproduzierbarkeit.

Das klonogene Überleben wurde mit Hilfe des Colony-Formation-Assays nachgewiesen. Dargestellt werden Zellkolonien, die sich innerhalb von 10 Tagen nach Inkubation entwickelt hatten, wobei zu Beginn des Versuchs sehr wenige Zellen in eine vorgegebene, relativ große Menge an Medium ausgesät wurden. Abhängig von der Behandlung der Zellen bildeten sich mehr oder weniger Kolonien, welche sich ferner in Form und Größe unterschieden.

Neben dem Migrationsverhalten sollte auch die Invasivität der Tumorzellen abhängig von ihrer Behandlung aufgezeigt werden. Dazu wurden die kultivierten Zellen in eine Matrigel Invasionskammer mit einer Membran bestehend aus 8µm großen Poren gegeben, welche dem Prinzip der Boyden-Kammer entspricht. Das Passieren der Membran imitiert gewissermaßen das invasive Verhalten der Zellen in vivo (Shaw, 2005).

Die Western Blot Analysen wurden durchgeführt, um die biochemischen Effekte der Behandlungen und Bestrahlung aufzuzeigen. Es wurde dabei vor allem der Einfluss auf den BKB2R und seiner nachgeschalteten Signalwege untersucht. Auch der EGFR wurde hinsichtlich seiner Aktivierung und seines Einflusses auf das Kallikrein-Kinin-System überprüft. Die Ergebnisse der Western Blot Analysen wurden mittels spezifischer Banden auf dem Röntgenfilm ausgewertet.

Proliferation

Die Effekte des Kallikrein-Kinin-Systems auf die Proliferation der Plattenepithelkarzinomzelllinien wurden mit Hilfe des Crystal Violet ELISA dargestellt. Dabei kann durch die Stimulation der Zellen mit Bradykinin allerdings kein Proliferationsvorteil innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 72h nachgewiesen

werden. Zudem zeigt auch die Blockade des Bradykinin B2-Rezeptors mit HOE140 kein verändertes Proliferationsverhalten. Einzig die Bestrahlung mit 8Gy resultiert in einer deutlichen Verminderung der Proliferation, was sich aber sowohl bei der Kontrolle, wie auch bei den behandelten Zellen aufzeigen lässt. Das Proliferationsverhalten der behandelten Zellen entspricht also dem der Kontrolle. Daraus lässt sich schließen, dass lediglich die Bestrahlung in dieser Versuchsreihe einen Einfluss auf das Proliferationsverhalten hat. Die Zugabe von Stimulatoren oder Inhibitoren zeigt jedoch keinen Effekt auf die Tumorzellproliferation.

In der Literatur wird aber für Mammakarzinomzellen beschrieben, dass Bradykinin die Zellproliferation dosisabhängig steigert, wobei der Effekt bei Tumorzellen größer ist als im peritumoralen Gewebe (Greco, Elia et al., 2005). Es konnte auch gezeigt werden, dass sowohl die Blockade des Bradykinin B2-Rezeptors mit HOE140 (Ishihara, Hayash et al., 2001), als auch die Zugabe eines Bradykinin-Rezeptor-Antagonisten nachweislich das Tumorwachstum deutlich reduziert bzw. verhindert (Thomas, Bholal et al., 2006).

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten jedoch darauf hin, dass das Kallikrein-Kinin-System keinen Einfluss auf das kurzzeitige Proliferationsverhalten (72h) von Plattenepithelkarzinomzellen des Kopf-Hals-Bereichs hat.

Klonogenes Überleben

Auf dem Boden dieser Erkenntnisse soll nun das klonogene Überleben der Kopf-Hals-Tumorzelllinien genauer untersucht werden. Mit Hilfe des Colony-Formation-Assays soll so das längerfristige Überleben dargestellt werden. Es stellte sich heraus, dass sich die Zelllinien bezüglich ihres Überlebens in Abhängigkeit der zugeführten Behandlung in zwei Gruppen einteilen lassen.

Bei den Zelllinien HN, DDP, HLAC, UD3 und UD6 resultiert die Stimulation mit Bradykinin in einem deutlichen Überlebensvorteil im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die zusätzliche Bestrahlung konnte das Überleben dieser Zelllinien wieder reduzieren. Blockiert man den Bradykinin B2-Rezeptor mit HOE140, so erwartet man ein verringertes Überleben. Erstaunlicherweise zeigt sich auch hier ein, verglichen mit der Kontrolle, deutlich besseres Überleben. Nach Bestrahlung der mit HOE140 behandelten Zellen manifestiert sich ebenso ein deutlicher Überlebensvorteil.

Die Zelllinien Cal27, UD4, UD5 und UD7 zeigen nach Zugabe von Bradykinin eine schlechtere, bzw. der Kontrolle ähnliches Überleben. Erst die zusätzliche Bestrahlung zur Bradykinin-Stimulation führt bei dieser Zellgruppe zu einem besseren Überleben. Wider Erwarten verbleibt die Anzahl der Zellkolonien nach Zugabe von HOE140 unter der der Kontrolle und der mit Bradykinin behandelten Zellen. Wiederum zeigt sich auch hier erst nach Bestrahlung und simultaner Blockade des Bradykinin B2-Rezeptors ein besseres Überleben.

Zusammenfassend kann man sagen, dass das beste Überleben der Zellen HN, DDP, HLAC, UD3 und UD6 nach Zugabe von HOE140, das heißt nach Blockade des Bradykinin B2-Rezeptors, erreicht werden kann. Dieser Effekt ist unabhängig von der Tatsache, ob die Zellen bestrahlt oder unbestrahlt sind. Bei den Zelllinien Cal27, UD4, UD5 und UD7 resultiert die Zugabe von HOE140 ebenso in dem deutlichsten Überlebensvorteil, allerdings erst bei vorhergehender Bestrahlung der Zellen mit 8Gy. Wie in Tabelle 26 dargestellt, können wir in beiden Fällen nach Zugabe von HOE140 und simultaner Bestrahlung einen protektiven Effekt auf das Überleben von Plattenepithelkarzinomzelllinien des Kopf-Hals-Bereichs aufweisen, obwohl in der Literatur von einer Bradykinin-Antagonisten-induzierten Apoptose auf Tumorzellen die Rede ist (Stewart, 2003).

Wir können in dieser Arbeit zeigen, dass dem Kallikrein-Kinin-System durchaus eine wesentliche Bedeutung bezüglich des längerfristigen Überlebens von Plattenepithelkarzinomzellen nach Bestrahlung zuzuordnen ist. Aufgrund dieser Ergebnisse gilt es nun auch den Einfluss von Bradykinin auf die Invasivität von Kopf-Hals-Tumoren genauer zu untersuchen.

Invasion

Lokale Tumorzellinvasion und Lymphknotenmetastasen korrelieren mit einem verringerten Überleben bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren (Wu, Palad et al., 1997). Da auch Bradykinin bei Tumorzellinvasion eine wesentliche Rolle spielt - in einer Studie konnte gezeigt werden, dass Bradykinin über die Aktivierung des Bradykinin B2-Rezeptors die Invasivität bei Gliomzelllinien deutlich erhöht (Montana and Sontheimer, 2011) - , wurde mit Hilfe der Matrigel Invasion Chamber die

Invasivität der Plattenepithelkarzinomzellen in Abhängigkeit ihrer Behandlung genauer untersucht.

Bei den Zelllinien Cal27, UD4, UD5, UD6, DDP und HLAC resultiert die Stimulation mit Bradykinin in einer verringerten Invasivität der Zellen, ein mäßig gutes, bzw. der Kontrolle ähnliches Invasivitätsniveau lässt sich bei den Zellen HN, UD1, UD3 und UD7 darstellen. Studien zeigten, dass Bradykinin bei Blasenkrebs zu erhöhtem Invasionsverhalten führt, welches nach Blockade des BKB2-Rezeptors komplett aufgehoben werden kann (Baba and Yamaguchi, 2001). Erst bei vorhergehender Bestrahlung mit 8Gy kann bei allen unseren untersuchten Plattenepithelkarzinomzellen eine vermehrte Invasionstendenz nach Bradykinin-Stimulation nachgewiesen werden. In der Literatur wird beschrieben, dass Bradykinin als Lockstoff (chemoattractant) dient, der die Tumorzellen in Richtung der Blutgefäße wachsen lässt (Montana and Sontheimer, 2011). In vitro konnte zudem nach Bradykinin-Stimulation eine Zunahme der Invasivität um den Faktor 2 nachgewiesen werden (Erices, Corthorn et al., 2011), was bei den Plattenepithelkarzinomzellen des Kopf-Hals-Bereichs erst nach Bestrahlung in etwa erreicht werden kann.

Die Zugabe von HOE140 konnte laut Erices, Corthorn et al. diesen Effekt vollständig aufheben. So kommt es auch bei unseren Plattenepithelkarzinomzelllinien Cal27, HN, UD4, UD5, UD6 und HLAC nach Blockade des Bradykinin B2-Rezeptors mit HOE140 zu einem verringerten Invasionsverhalten. Lediglich bei den Zellen UD1, UD3, UD7 und DDP lässt sich nach Zugabe von HOE140 ein mäßig gutes Invasionsverhalten darstellen. Nach Bestrahlung und gleichzeitiger Blockade des Bradykinin B2-Rezeptors zeigt sich bei fast allen untersuchten Plattenepithelkarzinomzellen das deutlichste Invasionsverhalten. Daraus lässt sich schließen, dass die Blockade des Bradykinin B2-Rezeptors bei vorhergehender Bestrahlung das invasive Wachstum von Kopf-Hals-Tumoren fördert.

Die Zugabe von HOE140 resultiert, wie in Tabelle 28 verdeutlicht, in einem verbesserten Überleben und einem vermehrt invasiven Wachstum der Plattenepithelkarzinomzellen nach Bestrahlung. Aufgrund dieser Erkenntnisse liegt es nahe, auch den Einfluss des Kallikrein-Kinin-Systems auf das Migrationsverhalten dieser Tumorzellen vor und nach Bestrahlung genauer zu untersuchen.

Migration

Bradykinin stimuliert Zellmigration, ein wesentlicher Prozess bei Plazentation, Embryologie, Wundheilung, Immunantwort und Tumorerkrankungen (Erices, Corthorn et al., 2011).

Wie in unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden konnte, ergab sich auch beim Wound-Healing-Test in dieser Arbeit eine strahleninduzierte Migration bei den Zelllinien Cal27, HN, UD4, UD5, UD7 und DDP (Pickhard, Margraf et al., 2011). Der Effekt der verstärkten Migrationstendenz der Zellen nach Radiotherapie konnte auch bei Gliomen nachgewiesen werden (Wild-Bode, Weller et al., 2001). Nach Bradykinin-Stimulation zeigt sich unbestrahlt bei den Zelllinien Cal27, HN, UD4, UD5 und DDP eine deutlich stärkere Migration. Der in der Literatur angegebene Faktor 3 (Erices, Corthorn et al., 2011) oder sogar Faktor 6 bis 10 (Bertram, Baltic et al., 2007) der Migrationszunahme konnte aber nur bei den Zellen Cal27 und UD4 nachgewiesen werden. Laut Literatur ist die Bradykinin-induzierte Zunahme der Tumorzellmigration auf eine Aktivierung der PLC und der Proteinkinase C- δ zurück zu führen, die dann in einer MAPK-Aktivierung resultiert (Hsieh, Wu et al., 2008), sowie auf eine vermehrte Integrin-Expression (Yang, Chang et al., 2010). Ebenso zeigten Studien, dass Bradykinin über die Aktivierung des EGFR zu einer Phosphorylierung der MAPK-Kaskade führt, die in einer erhöhten Tumorzellmigration resultiert (Zhang, Bhola et al., 2008). Bradykinin induziert die Migration von Endothelzellen, Endothelprogenitorzellen, Neutrophilen, Lymphozyten, Fibroblasten, dendritischen Zellen, Mikroglia und Tumorzellen (Erices, Corthorn et al., 2011).

Erices et al. konnte auch die Relevanz von Bradykinin bei Migrations- und Invasionsvorgängen verdeutlichen, dadurch, dass es die Bildung von Aktin-Mikrospikes, Filopodien, Lamellipodien in Fibroblasten und Endothelprogenitorzellen fördert.

Betrachtet man den Effekt der Bradykinin-Stimulation auf das Migrationsverhalten der Zellen nach Bestrahlung, so können diese nach ihrem dementsprechenden Verhalten in zwei Gruppen eingeteilt werden. Bei den bestrahlten Zelllinien HN, UD5 und DDP resultiert die Bradykinin-Stimulation in einer verringerten Migration, so dass man darauf schließen kann, dass die Bradykinin-induzierte Migration durch Strahlentherapie aufgehoben werden kann. Bei den bestrahlten Zelllinien Cal27 und UD4 zeigt sich nach Bradykinin-Stimulation eine deutliche Zunahme der Migration.

So kann die bereits bei der Kontrolle nachweisbare strahleninduzierte Migration durch die Stimulation mit Bradykinin noch verstärkt werden. Nach Blockade des Bradykinin B2-Rezeptors mit HOE140 sieht man unbestrahlt keinen Effekt auf das Migrationsverhalten. Bei den Zelllinien Cal, UD4 und DDP kann die Migration, wie in der Literatur beschrieben, durch die Zugabe von HOE140 sogar komplett blockiert werden (Bertram, Baltic et al., 2007) (Erices, Corthorn et al., 2011). Erst nach Bestrahlung und Substitution von HOE140 zeigt sich eine deutliche Zunahme der Migration, die das Maß der strahleninduzierten Migrationszunahme der Kontrolle überschreitet. Daraus lässt sich schließen, dass die Blockade des Bradykinin B2-Rezeptors durch die Strahlentherapie wieder aufgehoben werden kann. Es zeigt sich somit der gleiche Effekt wie nach alleiniger Radiatio der Zellen.

Strahlenresistenz

Neben dem bisher untersuchten biologischen Tumorzellverhalten stellt auch die Strahlenresistenz bei Plattenepithelkarzinomzellen des Kopf-Hals-Bereichs, auf die das häufige Auftreten von lokalen Rezidiven zurück zu führen ist, ein wesentliches Problem dar (Yang, McEachern et al., 2011). In einer Studie mit Gliomzellen wurde gezeigt, dass subletale Bestrahlung die Migration und Invasion der Tumorzellen fördert (Wild-Bode, Weller et al., 2001). Zudem wird in der Literatur von einer durch Bestrahlung induzierten frühen Metastasierung eines Lewis Lungentumors gesprochen (Camphausen, Moses et al., 2001). Nach den bisherigen Erkenntnissen wird bei Kopf-Hals-Tumoren vermutet, dass die Strahlenresistenz auf eine Überexpression des EGFR und eine Aktivierung der PI3K-abhängigen Signalwege zurück zu führen ist (Pickhard, Margraf et al., 2011). Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei der Zelllinie UD6 bezüglich des Überlebens und bei den Zelllinien UD3 und UD7 bezüglich der Invasivität eine Strahlenresistenz nachgewiesen werden kann. Eine strahleninduzierte Migration konnte bei fast allen unserer Zelllinien festgestellt werden. Der signifikanteste Effekt der Strahlenresistenz lässt sich bei den oben genannten Versuchen allerdings nach Zugabe von HOE140 darstellen, was vermuten lässt, dass es nach Ausschalten der Bradykinin B2-Rezeptor-abhängigen Signalwege zu einer Aktivierung der in der Literatur vermuteten PI3K-Signalkaskaden gibt, die für die Strahlenresistenz verantwortlich

sind. Ob eine Aktivierung des EGFR als Zwischenschritt dient konnte mit Western Blot Analysen überprüft werden.

Biochemische Ergebnisse + Signalkaskaden

In dieser Arbeit kann gezeigt werden, dass das Kallikrein-Kinin-System einen wesentlichen Effekt auf längerfristiges Tumorzellüberleben, Invasion und Migration der Plattenepithelkarzinomzellen aufweist. Diese Ergebnisse galt es nun auf biochemischer Ebene genauer zu untersuchen. Mit Hilfe der Ergebnisse der Western Blot Analysen sollen die für die biologischen Ergebnisse relevanten intrazellulären Signalkaskaden geklärt werden.

In der Literatur wird beschrieben, dass Bradykinin über seinen Bradykinin B2-Rezeptor und die intrazelluläre Signalkaskaden der Mitogen-activated-protein Kinase (MAPK) in der Lage ist, Tumorzellproliferation zu fördern (Greco, Elia et al., 2005). In dieser Arbeit konnte jedoch festgestellt werden, dass das Kallikrein-Kinin-System keinen Einfluss auf die Proliferation von Plattenepithelzellen hat. Dennoch konnten wir zeigen, dass das längerfristige Überleben, die Invasion und die Migration der Tumorzellen durch die Zugabe von Bradykinin verändert werden können. Das biochemische Korrelat zu diesen Ergebnissen soll nun genauer diskutiert werden.

In der Literatur wird gezeigt, dass die Signalkaskaden von PI3K/AKT und von MAPK eine wesentliche Rolle in der Tumorbilogie der Kopf-Hals-Tumoren spielen. Dabei wird vermutet, dass die Aktivierung der MAPK durch Bradykinin sowohl über den Signalweg der PKC, als auch über eine EGFR-Transaktivierung als Voraussetzung läuft (Greco, Muscella et al. 2004). Dieser Effekt wird in den Studien dadurch verdeutlicht, dass nach Zugabe von AG1478, einem spezifischen EGFR-Tyrosin-Kinase-Inhibitor, der Effekt von Bradykinin auf die Phosphorylierung der MAPK reduziert werden kann. So können einige Liganden an GPCRs – dazu zählt auch Bradykinin – intrazellulär EGFR-abhängige Signalwege aktivieren, welche in der Tumorbilogie von Kopf-Hals-Tumoren eine wesentliche Rolle spielen (Thomas, Bholra et al., 2006). Die Ligandenbindung am GPCR resultiert in einer Aktivierung des EGF-Rezeptors, der daraufhin zu einer Aktivierung von MAPK führt. Laut Literatur gibt es für Bradykinin allerdings auch einen EGFR-unabhängigen Mechanismus der

MAPK-Aktivierung, der über die Phosphorylierung der PI3K und der PKC führt. Die kombinierte Aktivierung von EGFR- und GPCR-Signalwege allerdings scheint für maximale Invasivität bei HNSCC zu sprechen, was auf einen intrazellulären „GPCR-EGFR cross-talk“ schließen lässt (Thomas, Bhola et al., 2006). Auch Radiotherapie von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs führt laut Studien zu einer Hochregulierung des MAPK-Signalwegs (Affolter, Fruth et al., 2011).

So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sowohl die Bestrahlung, als auch die Zugabe von EGF und HOE140 deutliche Auswirkungen auf die Expression des MAPK-Signalwegs aufweisen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass nach alleiniger Radiatio, sowie nach Zugabe von HOE140 und 8Gy eine Aktivierung von pAKT Ser473 und pMAPK Thr202/Tyr204 zu verzeichnen ist. Diese biochemischen Ergebnisse korrelieren mit einem guten Tumorzellüberleben, starker Invasivität und ausgeprägtem Migrationsverhalten. Dieses biologische Verhalten leitet sich von einer Aktivierung des EGFR und seiner nachgeschalteten Signalwege her.

Nach alleiniger Bradykinin-Stimulation und nach kombinierter Bestrahlung kann keine Aktivierung oben genannter Signalwege nachgewiesen werden. Biologisch zeigt sich nach Bradykinin-Stimulation aber ein gutes Tumorzellüberleben, gute Invasivität und verstärkte Migration, was somit auf einen EGFR-unabhängigen Signalweg zurück zu führen ist. Nach Bestrahlung erweist sich das Überleben und das Migrationsverhalten der Zellen als deutlich eingeschränkt, was darauf hindeutet, dass die Bradykinin-induzierte Signalkaskade unterbrochen wurde. Nach Blockade des Bradykinin B2-Rezeptors mit HOE140 können biologisch zwar gute Werte bezüglich Überleben und Migration erreicht werden, dennoch zeigt sich keine EGFR-abhängige Signalkaskade. Die Assoziation zum EGF-Rezeptor und seiner Signalwege manifestiert sich erst nach Blockade des Bradykinin B2-Rezeptors und simultaner Bestrahlung. In den Western Blot Analysen kann eine deutliche Hochregulierung der pAKT- und pMAPK-Signalwege erreicht werden. Die somit nachgewiesene EGFR-Aktivierung resultiert, verglichen mit allen Versuchen, in dem besten Tumorüberleben und dem stärksten Migrationsverhalten.

Eine EGFR-Aktivierung konnte bei den Versuchsansätzen nicht direkt nachgewiesen werden, was vermutlich auf eine sehr kurzfristige und somit biochemisch schwer nachweisbare Aktivierung des Rezeptors nach Bestrahlung zurück zu führen ist. In der Literatur konnte gezeigt werden, dass die erste Aktivierung des EGFR innerhalb

von 0 bis 10 Minuten nach Bestrahlung erfolgt. Eine ebenso beschriebene Reaktivierung nach 60 bis 180 Minuten nach Bestrahlung konnten wir nicht nachweisen. (Valerie, Yacoub et al., 2007). Zudem ist zu beachten, dass der EGFR bei HNSCC überexprimiert ist (Pickhard, Margraf et al., 2011). Um die EGFR-abhängige Induzierung der Signalwege pAKT Ser473 und pMAPK Thr202/Tyr204 nach Bestrahlung und nach Blockade des Bradykinin B2-Rezeptors mit simultaner Bestrahlung dennoch nachzuweisen, wurden Western Blot Analysen mit Tyrphostin AG1478, einem EGFR-Tyrosin-Kinase-Inhibitor durchgeführt. Dabei konnte nach Blockade des EGFR der Effekt auf die Signalwege reduziert werden. Nach kombinierter Behandlung mit HOE140 und Tyrphostin AG1478 zeigt sich sowohl unbestrahlt als auch nach Radiatio eine deutlich geringere Aktivierung von pAKT Ser473 und pMAPK Thr202/Tyr204.

Auf dem Boden dieser Erkenntnisse können wir sowohl nach Bestrahlung als auch nach Zugabe von HOE140 mit simultaner Bestrahlung von einem EGFR-abhängigen Signalweg ausgehen, der für das biologische Verhalten der Tumorzellen verantwortlich ist. Wird der Bradykinin Rezeptor stimuliert und somit sein Signalweg aktiviert, zeigt sich ein EGFR-unabhängiges Geschehen. Die genaue, von Bradykinin aktivierte Signalkaskade ist derzeit noch nicht geklärt.

Daher gilt es nun, mögliche Mechanismen zu erörtern, die das von Bradykinin ausgelöste biologische Tumorzellverhalten der Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs verdeutlichen. Studien beschreiben eine Bradykinin-abhängige Aktivierung des Vascular endothelial growth factors (VEGFR), die der Aktivierung der MAPK nachgeschaltet ist und zu Tumorproliferation und -wachstum führt (Ikeda, Hayashi et al., 2004). Bradykinin soll laut Ikeda, Hayashi et al. 2004 auch die Fibroblasten zur VEGF-Bildung aktivieren, was schließlich in der Bildung neuer Gefäße im Rahmen der Angiogenese resultiert. Auch in diesem Fall ist der Bradykinin-induzierten VEGF-Bildung eine Aktivierung des Bradykinin B2-Rezeptors mit nachfolgender Aktivierung der MAPK- oder der PKC-Signalwege vorgeschaltet (Ikeda, Hayashi et al., 2004). Um diese These auf das biologische Verhalten von Plattenepithelkarzinomzelllinien zu übertragen, wurde die Expression des phospho-VEGFR untersucht (Daten nicht gezeigt). Dabei stellte sich heraus, dass bei unseren Plattenepithelkarzinomzelllinien weder unbestrahlt noch bestrahlt eine Aktivierung des VEGFR gezeigt werden kann. Daraus lässt sich vermuten, dass unsere

gezeigten Effekte auf Überleben, Invasion und Migration deshalb nicht über eine Aktivierung des VEGFR laufen können.

Kritische Beurteilung

Zusammenfassend kann in dieser Arbeit verdeutlicht werden, dass das Kallikrein-Kinin-System weitreichende Effekte auf das biologische Verhalten von Plattenepithelkarzinomzellen des Kopf-Hals-Bereichs aufweist.

Wir können zeigen, dass die Zugabe von HOE140 mit simultaner Bestrahlung Überleben, Invasion und Migration bei Plattenepithelkarzinomzelllinien fördert.

Ebenso zeigt sich auf biochemischer Ebene eine vermehrte Expression von p-AKT und p-MAPK nach Zugabe von HOE140 und gleichzeitiger Bestrahlung, wobei dies auf eine Aktivierung des EGFR zurück zu führen ist. Im Fall einer Aktivierung des Bradykinin B2-Rezeptor zeigen sich allerdings intrazelluläre Signalwege, die EGFR-unabhängig erfolgen. Eine vermehrte Proteinexpression des VEGFR konnte ausgeschlossen werden.

In nachfolgenden Projekten gilt es nun, den Zusammenhang zwischen den biochemischen Effekten und die in dieser Arbeit gewonnenen biologischen Ergebnisse genauer zu untersuchen. Dabei sollten auch eventuelle Mutationen des Bradykinin B2-Rezeptors bzw. anderer relevanter Proteine berücksichtigt werden. Ein weiterer Aspekt, den es genauer zu untersuchen gilt, ist der Effekt des Kallikrein-Kinin-Systems auf die Angiogenese der Plattenepithelkarzinomzellen. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass das Nonapeptid Bradykinin ein wichtiger Wachstumsfaktor für zahlreiche Tumorzellen darstellt, was bereits *in vitro* und *in vivo* an Lungen- und Prostatakreberkrankungen gezeigt werden konnte (Stewart, 2003). In der Literatur wird beschrieben, dass Bradykinin die Angiogenese durch zwei Mechanismen induziert. Zum einen kommt es in der ersten Phase des Tumorwachstums zu einer Bradykinin-induzierten Erhöhung der Gefäßpermeabilität (Ishihara, Kamata et al., 2002). In der späten Phase des Tumorwachstums resultiert die Bradykinin B2-Rezeptor-Aktivierung laut Ishihara, Kamata et al. 2002 in einer Hochregulierung von VEGF in Stromafibroblasten.

Um allerdings die Effekte des Kallikrein-Kinin-Systems auf Angiogenese und Tumervaskularisierung zu verdeutlichen, wäre eine Fortführung der weiteren Untersuchungen unter anderen Bedingungen sinnvoll: Neben der exakten Bestimmung von Angiogenesemarkern wie uPa, Pai-1 oder NO wäre es ein wichtiges Ziel, den Bradykininrezeptorstatus in den Endothelzellen von Tumorgefäßen in vitro zu bestimmen oder die Angiogenese-Forschung im Maus-Modell fortzuführen.

Obwohl laut Literatur sämtliche Effekte des Kallikrein-Kinin-Systems auf die Blockade des Bradykinin B2-Rezeptors zurückzuführen sind, - es konnte gezeigt werden, dass die Blockade des Bradykinin B1-Rezeptors mit des-Arg10-HOE140 keinerlei Effekt auf Tumorangioese und Tumorstwachstum (Ishihara, Hayash et al., 2001) hat - , könnte auch eine genauere Untersuchung des Bradykinin B1-Rezeptors eine relevante Bedeutung in der Tumorstbiologie von Kopf-Hals-Tumoren aufzeigen.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit galt es herauszufinden, welche Rolle das Kallikrein-Kinin-System bei dem biologischen Tumorverhalten von Plattenepithelkarzinomzellen des Kopf-Hals-Bereichs spielt. Weiterhin war es das Ziel, die Effekte der Bestrahlung auf das Überleben, die Invasion und die Migration der Tumorzelllinien aufzuzeigen, wobei diese sowohl nach Stimulation mit Bradykinin, als auch nach Blockade des Bradykinin B2-Rezeptors nachgewiesen werden sollen. Zuletzt wurden die intrazellulären Signalkaskaden entsprechend der biologischen Ergebnisse untersucht.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Blockade des Bradykinin B2-Rezeptors mit HOE140 bei den bestrahlten Tumorzellen das Überleben deutlich fördert. Bezüglich des Invasionsverhaltens können wir bei unseren bestrahlten Kopf-Hals-Tumorzellen sowohl nach Bradykinin-Stimulation, vor allem aber nach Blockade des Bradykinin B2-Rezeptors mit HOE140 einen deutlichen Effekt sehen.

Zudem fand sich eine strahleninduzierte Migration. Diese konnte durch Blockade des Bradykinin B2-Rezeptors und simultaner Bestrahlung noch verstärkt werden.

Neben den biologischen Ergebnissen können wir sowohl nach Bestrahlung, als auch nach Zugabe von HOE140 und 8Gy auf biochemischer Ebene eine Hochregulierung von pMAPK Thr202/Tyr204 und pAKT Ser473 nachweisen, wobei wir eine gleichzeitige Aktivierung EGFR-abhängiger Signalwege aufzeigen konnten. Unter Bradykinin-Stimulation zeigt sich eine EGFR-unabhängige Wirkungskaskade. Eine Aktivierung des VEGFR konnte ausgeschlossen werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass das Kallikrein-Kinin-System eine wesentliche Rolle in der Tumorbiologie von Kopf-Hals-Tumoren spielt.

6. Anhang

6.1. Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Hypothetisches Modell der Tumorentstehung von Kopf-Hals-Tumoren (Perez-Ordenez, Beauchemin et al., 2006)	15
Abbildung 2: Entstehung und Abbau von Bradykinin und der Zusammenhang mit dem.....	19
Abbildung 3: Darstellung des MAPK-Signalwegs	21
Abbildung 4: Darstellung der PI3K/ AKT-Signalkaskade und deren Wirkungsweise.	22
Abbildung 5: Darstellung der 10cm-Kulturschalen mit den jeweiligen Konzentrationen	36
Abbildung 6: Schematische Darstellung des elektrophoretischen Transfers der Proteine	39
Abbildung 7: Kinetik der Inhibitoren, durchgeführt an den Zelllinien Cal27 und HN ..	41
Abbildung 8: Versuchsaufbau Crystal Violet Elisa; unbestrahlt und bestrahlt	42
Abbildung 9: Versuchsaufbau Colony-Formation-Assay; unbestrahlt und bestrahlt..	43
Abbildung 10: Seitenansicht der Invasionskammer. Außen das Bottom-well mit 750µl Medium mit den hinzugefügten Stimulatoren und Inhibitoren; innen das Insert mit der Poren-Membran, gefüllt mit 500µl Zellsuspension (in die Inserts werden lediglich die Inhibitoren zugegeben)	44
Abbildung 11: Einfluss der Bestrahlung auf das Überleben der Zellen.....	50
Abbildung 12: Effekt der Bradykinin-Stimulation auf das Überleben, dargestellt an den Zelllinien HN, UD3, UD6, DDP und HLAC; Vergleich unbestrahlt vs. bestrahlt	51
Abbildung 13: Effekt der Bradykinin-Stimulation auf das Überleben der Zellen, dargestellt an den Zelllinien Cal27, UD4, UD5 und UD7; Vergleich unbestrahlt vs. bestrahlt	52
Abbildung 14: Einfluss der Blockade des Bradykinin B2-Rezeptors auf das Überleben der Zellen; Vergleich unbestrahlt vs. bestrahlt.....	54
Abbildung 15: Effekt der Blockade des Bradykinin B2-Rezeptors auf das Überleben der Zellen; dargestellt ist ein Vergleich zwischen unbestrahlten und bestrahlten Zellen	55

Abbildung 16: Effekt der Blockade des Bradykinin B2-Rezeptors auf das Überleben der Zelllinie UD3; Vergleich unbestrahlt und bestrahlt.....	56
Abbildung 17: Einfluss der Bestrahlung auf die Proliferation der Zelllinien; Auswertung nach 0h, 24h, 48h und 72h	58
Abbildung 18: Einfluss der Bestrahlung auf die Proliferation der Zelllinie UD4; Auswertung nach 0h, 24h, 48h und 72h	59
Abbildung 19: Effekt der Stimulation mit Bradykinin und gleichzeitiger Bestrahlung auf die Proliferation der Zelllinien; Auswertung nach 0h, 24h, 48h und 72h.....	60
Abbildung 20: Effekt der Stimulation mit Bradykinin auf das proliferative Verhalten der Zelllinie UD4; Vergleich unbestrahlt vs. bestrahlt; Auswertung nach 0h, 24h, 48h und 72h.....	61
Abbildung 21: Einfluss der Blockade des Bradykinin-Rezeptors auf das Proliferationsverhalten der Zelllinien; die Auswertung erfolgt nach 0h, 24h, 48h und 72h.....	62
Abbildung 22: Einfluss der Blockade des Bradykinin-Rezeptors auf das Proliferationsverhalten der Zelllinie UD4; die Auswertung erfolgt nach 0h, 24h, 48h und 72h.....	63
Abbildung 23: Einfluss der Bestrahlung auf das Invasionsverhalten der Zellen	65
Abbildung 24: Invasionsverhalten der Zelllinien UD3 und UD7; Vergleich unbestrahlt vs. bestrahlt	65
Abbildung 25: Invasionsverhalten der Zelllinien nach BK-Stimulation ohne und mit Bestrahlung.....	67
Abbildung 26: Darstellung der Zahl der invadierten Zellen nach BK-Stimulation; Vergleich unbestrahlt vs. bestrahlt.....	67
Abbildung 27: Invasionsverhalten von UD7; dargestellt ist die Zahl der invadierten Zellen nach BK-Stimulation unbestrahlt und bestrahlt.....	68
Abbildung 28 zeigt den Effekt der Bradykinin B2-Rezeptor-Inhibition auf die Invasion der Zelllinien; es kann zwischen unbestrahlt und bestrahlt, sowie den vorherigen Behandlungen unterschieden werden	70
Abbildung 29: Zahl der invadierten Zellen nach HOE140-Zugabe; die Graphik zeigt den Vergleich zwischen Bestrahlung und Kontrolle (unbestrahlt)	71
Abbildung 30: Effekt der Bestrahlung auf das Migrationsverhalten der Zellen	73
Abbildung 31: Effekt der Bradykinin-Stimulation auf das Migrationsverhalten der Zellen HN, UD5 und DDP	74

Abbildung 32: Effekt der Bradykinin-Stimulation auf die Migration der Zelllinien Cal27 und UD4.....	75
Abbildung 33: Einfluss der Zugabe von Bradykinin auf das Migrationsverhalten der Zelllinie UD7	75
Abbildung 34: Migrationsverhalten der Zelllinien HN, DDP und UD5 nach Zugabe von HOE140	77
Abbildung 35: Effekt der Bradykinin B2-Rezeptor-Inhibition auf das Migrationsverhalten der Zelllinien Cal27, UD4 und UD7	78
Abbildung 36: Darstellung der Western Blot Analysen; die zu vergleichenden Ergebnisse sind eingerahmt; Größe der Proteine: EGFR 180 kDa, pEGFR 170 kDa, pAKT 60 kDa, pMAPK 42/44 kDa	81
Abbildung 37: Ladekontrolle der Western Blot Analysen.....	81
Abbildung 38: Darstellung der Western Blot Analysen. Die zu vergleichenden Ergebnisse sind eingerahmt; Größe der Proteine: EGFR 180 kDa, pEGFR 170 kDa, pAKT 60 kDa, pMAPK 42/44 kDa	84
Abbildung 39: Tubulin Ladekontrolle.....	85
Abbildung 40: Darstellung der Proteinexpression des BKB2R am Beispiel der Zelllinie UD4; Größe von BKB2R: 75 – 80 kDa	85
Abbildung 41: Tubulin Ladekontrolle.....	86
Abbildung 42: Darstellung der Western Blot Analysen; die zu vergleichenden Ergebnisse sind eingerahmt; Größe der Proteine: EGFR 180 kDa, pEGFR 170 kDa, pAKT 60 kDa, pMAPK 42/44 kDa	88
Abbildung 43: Tubulin Ladekontrolle.....	88
Abbildung 45: Tubulin Ladekontrolle.....	90
Abbildung 44: Darstellung der Western Blot Analyse nach Blockade des EGFR mit Tyrphostin AG1478; Größe der Proteine: pAKT 60 kDa, pMAPK 42/44 kDa	90

6.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Klassifikation der HNSCC (Wittekind, 2010).....	9
Tabelle 2: T-Klassifikation der Mundhöhle/ Lippe (Wittekind, 2010).....	10
Tabelle 3: T-Klassifikation des Pharynx (Wittekind, 2010).....	10
Tabelle 4: T-Klassifikation des Nasopharynx (Wittekind, 2010).....	11
Tabelle 5: T-Klassifikation des Hypopharynx (Wittekind, 2010).....	11
Tabelle 6: Klassifikation der Supraglottis (Wittekind, 2010).....	11
Tabelle 7: T-Klassifikation der Glottis (Wittekind, 2010)	12
Tabelle 8: T-Klassifikation der Subglottis (Wittekind, 2010).....	12
Tabelle 9: Darstellung der TNM-Klassifikation (Wittekind, 2010).....	13
Tabelle 10: verwendete Zelllinien	25
Tabelle 11: Auflistung der in der Zellkultur verwendeten Medien und Supplemente	26
Tabelle 12: Wachstumsfaktoren und Inhibitoren.....	26
Tabelle 13: Primär-Antikörper	27
Tabelle 14: Sekundär-Antikörper	27
Tabelle 15: Kits	28
Tabelle 16: verwendete Reagenzien	29
Tabelle 17: Puffer und Zusammensetzung der gemischten Reagenzien	30
Tabelle 18: Geräte und Laborausstattung	31
Tabelle 19: Verbrauchsmaterial	32
Tabelle 20: Computerprogramme	33
Tabelle 21: Versuchsaufbau Proteinisolierung	37
Tabelle 22: Zusammensetzung des Trenngels 10%.....	38
Tabelle 23: Zusammensetzung des Sammelgels 5%.....	38
Tabelle 24: Tabellarische Darstellung des Versuchsaufbaus für die Matrigel Invasionskammer.....	45
Tabelle 25: Zusammenfassung der Ergebnisse des Colony-Formation-Assays nach Bradykinin-Stimulation	53
Tabelle 26: Zusammenfassung der Ergebnisse des Colony-Formation-Assays nach Zugabe von HOE140	56
Tabelle 27: tabellarische Darstellung der Ergebnisse des Invasionstests nach Stimulation mit Bradykinin	68

Tabelle 28: tabellarische Darstellung der Ergebnisse des Invasionstests nach Zugabe von HOE140	71
Tabelle 29: Zusammenfassung der Ergebnisse des Wound-Healing-Tests nach Bradykinin-Stimulation	76
Tabelle 30: Zusammenfassung der Ergebnisse des Wound-Healing-Tests nach Blockade des Bradykinin B2-Rezeptors mit HOE140	78
Tabelle 31: Effekt der Bestrahlung auf die Proteinexpression der Zelllinien; Ø= unbestrahlt, „++“ = sehr stark exprimiert, „+“ = mäßig exprimiert, „-“ = schwach exprimiert	79
Tabelle 32: Änderung der Proteinexpression nach Bradykinin-Stimulation; Vergleich unbestrahlt vs. bestrahlt; „↑“ = vermehrte Proteinexpression im Vergleich zur Kontrolle, „↓“ = verminderte Proteinexpression im Vergleich zur Kontrolle, „↔“ = gleiches Expressionsniveau wie die Kontrolle	83
Tabelle 33: Verhalten der Proteinexpression nach Blockade des Bradykinin B2-Rezeptors durch HOE140 verglichen mit der Kontrolle; Vergleich unbestrahlt vs. bestrahlt; „↑↑“ = sehr stark erhöhte Proteinexpression verglichen mit der Kontrolle, „↑“ = vermehrte Proteinexpression im Vergleich zur Kontrolle, „↓“ = verminderte Proteinexpression im Vergleich zur Kontrolle, „↔“ = gleiches Expressionsniveau wie die Kontrolle	86
Tabelle 34: Zusammenfassung der Western Blot Analysen der Zelllinie HN	89
Tabelle 35: Zusammenfassung der Western Blot Analysen der Zelllinie DDP	89
Tabelle 36: Zusammenfassung der Western Blot Analysen der Zelllinie UD4	89

6.3. Literaturverzeichnis

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

Baba, K. and O. Yamaguchi. Effects of bradykinin on cytoplasmic calcium and motility in murine bladder tumor cells. *The Journal of urology* 165(1):259-262; 2001.

Bertram, C. M., S. Baltic, N. L. Misso, K. D. Bhoola, P. S. Foster, P. J. Thompson and M. Fogel-Petrovic. Expression of kinin B1 and B2 receptors in immature, monocyte-derived dendritic cells and bradykinin-mediated increase in intracellular Ca²⁺ and cell migration. *Journal of leukocyte biology* 81(6):1445-1454; 2007.

Böcker, H. D. P. U. H. H. M. W., Ed. (2008). Pathologie.

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. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *The New England journal of medicine* 354(6):567-578; 2006.

Camphausen, K., M. A. Moses, W. D. Beecken, M. K. Khan, J. Folkman and M. S. O'Reilly. Radiation therapy to a primary tumor accelerates metastatic growth in mice. *Cancer research* 61(5):2207-2211; 2001.

Clements, J. and A. Mukhtar. Tissue kallikrein and the bradykinin B2 receptor are expressed in endometrial and prostate cancers. *Immunopharmacology* 36(2-3):217-220; 1997.

Dlamini, Z. and K. D. Bhoola. Upregulation of tissue kallikrein, kinin B1 receptor, and kinin B2 receptor in mast and giant cells infiltrating oesophageal squamous cell carcinoma. *Journal of clinical pathology* 58(9):915-922; 2005.

E. Oestreicher, V. B. Neck dissection. *Manuale Kopf-Hals-Malignome* 3:34-40; 2003.

Erices, R., J. Corthorn, F. Lisboa and G. Valdes. Bradykinin promotes migration and invasion of human immortalized trophoblasts. *Reproductive biology and endocrinology* : RB&E 9:97; 2011.

Fakhry, C. and M. L. Gillison. Clinical implications of human papillomavirus in head and neck cancers. *Journal of clinical oncology* : official journal of the American Society of Clinical Oncology 24(17):2606-2611; 2006.

Farshadpour, F., H. Kranenborg, E. V. Calkoen, G. J. Hordijk, R. Koole, P. J. Slootweg and C. H. Terhaard. Survival analysis of head and neck squamous cell carcinoma: Influence of smoking and drinking. *Head Neck*; 2010.

Frampton, J. E. Cetuximab: a review of its use in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Drugs* 70(15):1987-2010; 2010.

Gillison, M. L., G. D'Souza, W. Westra, E. Sugar, W. Xiao, S. Begum and R. Viscidi. Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *Journal of the National Cancer Institute* 100(6):407-420; 2008.

Goerner, M., T. Y. Seiwert and H. Sudhoff. Molecular targeted therapies in head and neck cancer--an update of recent developments. *Head Neck Oncol* 2:8; 2010.

Greco, S., M. G. Elia, A. Muscella, S. Romano, C. Storelli and S. Marsigliante. Bradykinin stimulates cell proliferation through an extracellular-regulated kinase 1 and 2-dependent mechanism in breast cancer cells in primary culture. *J Endocrinol* 186(2):291-301; 2005.

Greco, S., C. Storelli and S. Marsigliante. Protein kinase C (PKC)-delta/-epsilon mediate the PKC/Akt-dependent phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 in MCF-7 cells stimulated by bradykinin. *J Endocrinol* 188(1):79-89; 2006.

Guo, Y. L. and R. W. Colman. Two faces of high-molecular-weight kininogen (HK) in angiogenesis: bradykinin turns it on and cleaved HK (HKa) turns it off. *J Thromb Haemost* 3(4):670-676; 2005.

Hardisson, D. Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 260(9):502-508; 2003.

Hsieh, H. L., C. Y. Wu and C. M. Yang. Bradykinin induces matrix metalloproteinase-9 expression and cell migration through a PKC-delta-dependent ERK/Elk-1 pathway in astrocytes. *Glia* 56(6):619-632; 2008.

Hunter, K. D., E. K. Parkinson and P. R. Harrison. Profiling early head and neck cancer. *Nature reviews. Cancer* 5(2):127-135; 2005.

Ikeda, Y., I. Hayashi, E. Kamoshita, A. Yamazaki, H. Endo, K. Ishihara, S. Yamashina, Y. Tsutsumi, H. Matsubara and M. Majima. Host stromal bradykinin B2 receptor signaling facilitates tumor-associated angiogenesis and tumor growth. *Cancer Res* 64(15):5178-5185; 2004.

Ikeda, Y., I. Hayashi, E. Kamoshita, A. Yamazaki, H. Endo, K. Ishihara, S. Yamashina, Y. Tsutsumi, H. Matsubara and M. Majima. Host stromal bradykinin B2 receptor signaling facilitates tumor-associated angiogenesis and tumor growth. *Cancer research* 64(15):5178-5185; 2004.

Ishihara, K., I. Hayash, S. Yamashina and M. Majima. A potential role of bradykinin in angiogenesis and growth of S-180 mouse tumors. *Japanese journal of pharmacology* 87(4):318-326; 2001.

Ishihara, K., M. Kamata, I. Hayashi, S. Yamashina and M. Majima. Roles of bradykinin in vascular permeability and angiogenesis in solid tumor. *Int Immunopharmacol* 2(4):499-509; 2002.

Katz, D., E. Ito, K. S. Lau, J. D. Mocanu, C. Bastianutto, A. D. Schimmer and F. F. Liu. Increased efficiency for performing colony formation assays in 96-well plates:

novel applications to combination therapies and high-throughput screening. *Biotechniques* 44(2):ix-xiv; 2008.

Kleihues, P. and H. Ohgaki. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro-oncology* 1(1):44-51; 1999.

Kyhse-Andersen, J. Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Journal of biochemical and biophysical methods* 10(3-4):203-209; 1984.

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

Lehnerdt, G., T. K. Hoffmann, S. Mattheis, S. Brandau, R. Zeidler and S. Lang. [Diagnostic and prognostic biomarkers in head and neck squamous cell carcinoma]. *HNO* 58(7):713-723; quiz 724-715; 2010.

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

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

Mast, G. Kaufunktionelle Rehabilitation von Patienten mit Tumorerkrankungen im Kopf-Hals-Bereich. *Manuale Kopf-Hals-Tumoren* 3:117-122; 2003.

Moelling, K., K. Schad, M. Bosse, S. Zimmermann and M. Schweneker. Regulation of Raf-Akt Cross-talk. *The Journal of biological chemistry* 277(34):31099-31106; 2002.

Montana, V. and H. Sontheimer. Bradykinin promotes the chemotactic invasion of primary brain tumors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31(13):4858-4867; 2011.

Nijkamp, M. M., I. J. Hoogsteen, P. N. Span, R. P. Takes, J. Lok, P. F. Rijken, A. J. van der Kogel, J. Bussink and J. H. Kaanders. Spatial relationship of phosphorylated epidermal growth factor receptor and activated AKT in head and neck squamous cell carcinoma. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*; 2011.

Noeske, K. Die Bindung von Kristalviolett an Desoxyribonukleinsäure. *Histochemistry and Cell Biology* 7(3):273-287; 1966.

Perez-Ordóñez, B., M. Beauchemin and R. C. Jordan. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Pathol* 59(5):445-453; 2006.

Pickhard, A. C., J. Margraf, A. Knopf, T. Stark, G. Piontek, C. Beck, A. L. Boulesteix, E. Q. Scherer, S. Pigorsch, J. Schlegel, W. Arnold and R. Reiter. Inhibition of Radiation Induced Migration of Human Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells by Blocking of EGF Receptor Pathways. *BMC cancer* 11(1):388; 2011.

Ragin, C. C., F. Modugno and S. M. Gollin. The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus. *J Dent Res* 86(2):104-114; 2007.

Roberts, R. A. and W. J. Gullick. Bradykinin receptor number and sensitivity to ligand stimulation of mitogenesis is increased by expression of a mutant ras oncogene. *J Cell Sci* 94 (Pt 3):527-535; 1989.

Rodríguez, L. G., X. Wu and J. L. Guan. Wound-healing assay. *Methods in molecular biology* 294:23-29; 2005.

S. Sehlen, M. L., P. Herschbach. Lebensqualität (LQ) von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren. *Manual Kopf-Hals-Malignome* 3:110-112; 2003.

Seiwert, T. Y. and E. E. Cohen. State-of-the-art management of locally advanced head and neck cancer. *British journal of cancer* 92(8):1341-1348; 2005.

Sharafinski, M. E., R. L. Ferris, S. Ferrone and J. R. Grandis. Epidermal growth factor receptor targeted therapy of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* 32(10):1412-1421; 2010.

Shaw, L. M. Tumor cell invasion assays. *Methods in molecular biology* 294:97-105; 2005.

Silveira, A. P., J. Goncalves, T. Sequeira, C. Ribeiro, C. Lopes, E. Monteiro and F. L. Pimentel. Patient reported outcomes in head and neck cancer: selecting instruments for quality of life integration in clinical protocols. *Head Neck Oncol* 2:32; 2010.

Stewart, J. M. Bradykinin antagonists as anti-cancer agents. *Current pharmaceutical design* 9(25):2036-2042; 2003.

Sudhoff, H. H., H. P. Schwarze, D. Winder, L. Steinstraesser, M. Gorner, M. Stanley and P. K. Goon. Evidence for a causal association for HPV in head and neck cancers. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies*; 2011.

Thomas, S. M., N. E. Bhola, Q. Zhang, S. C. Contrucci, A. L. Wentzel, M. L. Freilino, W. E. Gooding, J. M. Siegfried, D. C. Chan and J. R. Grandis. Cross-talk between G protein-coupled receptor and epidermal growth factor receptor signaling pathways contributes to growth and invasion of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer research* 66(24):11831-11839; 2006.

Thomas, S. M., N. E. Bhola, Q. Zhang, S. C. Contrucci, A. L. Wentzel, M. L. Freilino, W. E. Gooding, J. M. Siegfried, D. C. Chan and J. R. Grandis. Cross-talk between G protein-coupled receptor and epidermal growth factor receptor signaling pathways contributes to growth and invasion of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 66(24):11831-11839; 2006.

Tumorzentrum München, W., Zimmermann. Manuale Kopf-Hals-Malignome. 3; 2003.
Valerie, K., A. Yacoub, M. P. Hagan, D. T. Curiel, P. B. Fisher, S. Grant and P. Dent. Radiation-induced cell signaling: inside-out and outside-in. *Molecular cancer therapeutics* 6(3):789-801; 2007.

van Monsjou, H. S., M. L. van Velthuisen, M. W. van den Brekel, E. S. Jordanova, C. J. Melief and A. J. Balm. Human papillomavirus status in young patients with head and neck squamous cell carcinoma. *International journal of cancer. Journal international du cancer*; 2011.

Vogelstein, B., E. R. Fearon, S. R. Hamilton, S. E. Kern, A. C. Preisinger, M. Leppert, Y. Nakamura, R. White, A. M. Smits and J. L. Bos. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *The New England journal of medicine* 319(9):525-532; 1988.

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

Wittekind, M. TNM-Klassifikation. UICC 7. Auflage; 2010.

Wu, Y., A. J. Palad, W. J. Wasilenko, P. F. Blackmore, W. A. Pincus, G. L. Schechter, J. R. Spoonster, E. C. Kohn and K. D. Somers. Inhibition of head and neck squamous cell carcinoma growth and invasion by the calcium influx inhibitor carboxyamido-triazole. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 3(11):1915-1921; 1997.

Yang, J., D. McEachern, W. Li, M. A. Davis, H. Li, M. A. Morgan, L. Bai, J. T. Sebolt, H. Sun, T. S. Lawrence, S. Wang and Y. Sun. Radiosensitization of head and neck squamous cell carcinoma by a SMAC-mimetic compound, SM-164, requires activation of caspases. *Molecular cancer therapeutics* 10(4):658-669; 2011.

Yang, W. H., J. T. Chang, S. F. Hsu, T. M. Li, D. Y. Cho, C. Y. Huang, Y. C. Fong and C. H. Tang. Bradykinin enhances cell migration in human chondrosarcoma cells

through BK receptor signaling pathways. *Journal of cellular biochemistry* 109(1):82-92; 2010.

Zhang, W., N. Bhola, S. Kalyankrishna, W. Gooding, J. Hunt, R. Seethala, J. R. Grandis and J. M. Siegfried. Kinin b2 receptor mediates induction of cyclooxygenase-2 and is overexpressed in head and neck squamous cell carcinomas. *Mol Cancer Res* 6(12):1946-1956; 2008.

Zimmermann, S. and K. Moelling. Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science* 286(5445):1741-1744; 1999.

Zuo, J. H., W. Zhu, M. Y. Li, X. H. Li, H. Yi, G. Q. Zeng, X. X. Wan, Q. Y. He, J. H. Li, J. Q. Qu, Y. Chen and Z. Q. Xiao. Activation of EGFR promotes squamous carcinoma SCC10A cell migration and invasion via inducing EMT-like phenotype change and MMP-9-mediated degradation of E-cadherin. *Journal of cellular biochemistry*; 2011.

6.4. Abkürzungsverzeichnis

Abb. = Abbildung

ACE = Angiotensin converting Enzyme

APS = Ammoniumperoxidsulfat

bidest. = bidestillatus (doppelt desitilliert)

BK = Bradykinin

BKB1R = Bradykinin B1-Rezeptor

BKB2R = Bradykinin B2-Rezeptor

BSA = Bovine Serum Albumin

bzw. = beziehungsweise

° C = Grad Celsius

ca. = circa

Ca²⁺ = Calcium

cm = Zentimeter

CO₂ = Kohlendioxyd

COX-2 = Cyclooxygenase 2

DMEM = Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO = Dimethylsulfoxid

DNS = Desoxyribonukleinsäure

DTT = Dithiotreitol

ECL = Elektrochemilumineszenz

etc. = et cetera

EGF = Epidermal growth factor

EGFR = Epidermal growth factor receptor

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

EXTREME-Studie: **E**rbitu**X** in first line **T**reatment of **R**Ecurrent or **M**Etastatic head & neck cancer

FBS = Fetal bovine serum

GDP = Guanosindiphosphat

GPCR = G-Protein coupled receptor

GTP = Guanosintriphosphat

Gy = Gray

h = Stunde

HCl = Chlorwasserstoff

HK = High molecular weight kininogen

HNO = Hals-Nasen-Ohrenheilkunde

HPV = Humane Papillomviren

HNSCC = Head and neck squamous cell carcinoma = Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs

kV = kilo Volt

mA = Milliampere

MAPK = Mitogen-activated Protein Kinase

MEK1/2 = Mitogen-activated Protein Kinase Kinase 1/2

µg = Microgramm

min. = Minuten

MKG = Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie

µl = Microliter

µM = Micromolar

ml = Milliliter

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

myc = myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)

NaCl = Natriumchlorid

ND = Neck dissection

NO = Stickstoffmonoxid

NSCLC = Non-small cell lung cancer

Pai-1 = Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1

pAkt = phosphorylierte Proteinkinase B

PBS = Phosphate-buffered Saline

PDK1 = 3-phosphoinositide-dependent proteinkinase 1

PECA = Plattenepithelkarzinom

pEGFR = phosphorylierter Epidermal growth factor receptor

PG E2 = Prostaglandin E2

PI3K = Phosphatidylinositol-3'-Kinase

PIP2 = Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat

PIP3 = Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate

PKB/Akt = Proteinkinase B

pMAPK = phosphorylierte Mitogen-activated proteinkinase

pMEK1/2 = phosphorylierte Mitogen-activated Protein Kinase Kinase 1/2

PMSF = Phenylmethylsulfonylfluorid

PTEN = Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten

PVDF = Polyvinylidenfluorid

RAAS = Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Raf = v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1

Ras = rat sarcoma viral oncogene homolog

RASSF1a = Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1

rH = relative Luftfeuchte

rpm = revolutions per minute

RCT = Radiochemotherapie

RT = Radiotherapie

RTK = Rezeptor Thyrosin Kinase

s. = siehe

s.a. = siehe auch

SDS = Sodiumdodecylsulfat

Sos = son of sevenless

Src = v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)

s.u. = siehe unten

Tab. = Tabelle

TBS = Tris-Buffered Saline

TEMED = N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin, 1,2-Bis(dimethylamino)-ethan

TP53 = Tumorprotein 53

TTBS = Tris-Tween Buffered Saline

u.a. = unter anderem

UICC = Union for International Cancer Control

uPa = Urokinase

V = Volt

v.a. = vor allem

VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR = Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

vs = versus

WHO = World Health Organization

z.B. = zum Beispiel

Dankvermerk

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau PD Dr. med. Anja Pickhard für die hervorragende Unterstützung bei der Konzeption und Durchführung der Doktorarbeit. Mit großem Engagement und stets wertvollen Ratschlägen und Anregungen trug sie wesentlich zum Gelingen meiner Arbeit bei. Frau PD Dr. med. Anja Pickhard ermöglichte mir zudem die Teilnahme an Kongressen der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie und begeisterte mich für wissenschaftliches Arbeiten.

Weiterhin danke ich Herrn Guido Piontek, der mir sowohl bei den Experimenten im Labor als auch bei der Erstellung des Manuskripts mit Rat und Tat zur Seite stand. Er unterstützte mich bei Versuchsplanung und -durchführung sowie der Auswertung der Ergebnisse. Sehr schätzte ich auch die stets zeitnahe Korrektur meines Manuskriptes.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. M. Molls, dem Leiter der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie, und Herrn Dr. Martin Mißlbeck, dem stellvertretenden leitenden Physiker, für die Einführung in die Benutzung des Tier- und Zellbestrahlungsgerätes bedanken. In diesem Zusammenhang danke ich auch dem Zentrum für präklinische Forschung (ZPF) mit seinen Mitarbeitern, die sich stets kooperativ gezeigt und die Räumlichkeiten für die experimentelle Bestrahlung zur Verfügung gestellt haben.