

Einfluss spezifischer Inhibition von SRC Family Kinasen in HNSCC-Tumoren

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades einer
Doktorin der Zahnmedizin (Dr. med. dent.)

an der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Vu, Anh Thu

aus

Krefeld, Deutschland

2024

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am 16.06.2025
Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Betreuer:in / Gutachter:in der Dissertation: PD Dr. Malte Kriegs

Gutachter:in der Dissertation: Prof. Dr. Christian Betz

Vorsitz der Prüfungskommission: Prof. Dr. Christian Betz

Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Ibrahim Nergiz

Mitglied der Prüfungskommission: PD Dr. Hartwig Seedorf

Stellvertretendes Mitglied: PD Dr. Malte Kriegs

Datum der mündlichen Prüfung: 16.06.2025

Inhaltsverzeichnis

1. Darstellung der Publikation	4
1.1. Einleitung	4
1.2. Material und Methoden	5
1.2.1. Inhibitoren	5
1.2.2. Zelllinien	5
1.2.3. Proliferation	5
1.2.4. Kolonietests	5
1.2.5. Datenauswertung	5
1.2.6. Western Blot	6
1.2.7. Aktivitätsanalyse von Kinasen (Kinomics).....	6
1.3. Ergebnisse	6
1.4. Diskussion	10
2. Publikation	12
3. Zusammenfassung	22
4. Literaturverzeichnis	23
5. Abkürzungsverzeichnis	24
6. Abbildungsverzeichnis	25
7. Erklärung des Eigenanteils	25
8. Eidesstattliche Versicherung	25
9. Danksagung	26

1. Darstellung der Publikation

1.1. Einleitung

Kopf-Hals-Tumore zählen mit etwa 600.000 neuen Fällen pro Jahr zu den sechs häufigsten Krebsarten weltweit. In mehr als 90% der Fälle handelt es sich dabei um Plattenepithelkarzinome (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, HNSCC), die aus Epithelzellen der Mukosa hervorgehen. Diese Tumore manifestieren sich überwiegend in Kehlkopf, Nase, Rachen wie auch der Mundhöhle. Aufgrund der unterschiedlichen anatomischen Lokalisationen und der Vielzahl genetischer Mutationen, die zur Tumorentwicklung beitragen, weisen HNSCC eine erhebliche Heterogenität auf, sowohl innerhalb eines Tumors als auch zwischen verschiedenen Tumoren.¹

Eine klare Unterscheidung kann jedoch zwischen HPV-positiven und HPV-negativen Tumoren vorgenommen werden. HPV-positive HNSCC, die durch eine Infektion mit Hochrisikotypen des humanen Papillomvirus charakterisiert sind, stehen im Gegensatz zu den HPV-negativen Tumoren, die mit traditionellen Risikofaktoren wie Tabak- und Alkoholkonsum assoziiert sind. Diese Differenzierung ist klinisch bedeutsam, da HPV-positive HNSCC in der Regel besser auf Therapieansätze ansprechen und eine 5-Jahres Überlebensrate von über 80% aufweisen. Demgegenüber sind HPV-negative Tumore oft aggressiver und mit einer schlechteren Prognose assoziiert, wobei die 5-Jahres Überlebensrate häufig unter 50% liegt.^{2,3} Die typische, späte Diagnosestellung verschärft therapeutische Herausforderungen zusätzlich.

Die Standardbehandlung erfolgt in der Regel multimodal; chirurgische Eingriffe werden durch Strahlentherapie, Chemotherapie oder einer Kombination dieser Methoden ergänzt. Angesichts der Tatsache, dass die Sterblichkeitsrate in den letzten Jahrzehnten nur geringfügig gesunken ist, besteht ein dringender Bedarf an neuen Therapieansätzen, die gezielt spezifische Eigenschaften dieser Tumorentität stärker berücksichtigen.¹

Die Vorarbeiten von Bußmann *et al.* haben gezeigt, dass die Prognose bei HPV-negativen Tumoren stark mit der Aktivität von Kinasen der Src-Familie (SFK) korreliert. Eine erhöhte SFK-Aktivität, gemessen an der Phosphorylierung, geht mit einer schlechteren Prognose einher. Mittels der Erstellung von Kinomaktivitätsprofilen haben wir festgestellt, dass SFK in HPV-negativen HNSCC häufig hyperaktiviert sind, was SFK zu vielversprechenden Zielen für eine personalisierte Therapie macht.⁵ Wichtig dabei ist, dass es die Aktivität und nicht die Expression der Kinasen ist, die von Bedeutung zu sein scheint.⁶

Ziel meiner Arbeit war es, die Auswirkungen einer gezielten Inhibition der SFK auf HNSCC-Zelllinien mit unterschiedlichen Basalniveaus an SFK-Expression und -Aktivität zu untersuchen. Die Arbeitshypothese war dabei, dass insbesondere Zelllinien mit erhöhter SFK-Aktivität eine größere Sensitivität gegenüber einer SFK-Inhibition aufweisen würden.

1.2. Material und Methoden

1.2.1. Inhibitoren

Genutzt wurden der SFK-Inhibitor SU6656, der Abl/Src-Inhibitor Dasatinib (Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) wie auch der SFK-Inhibitor PP2 (Selleckchem, Houston, Texas, USA), welche in Dimethylsulfoxid (DMSO; Roche, Basel, Schweiz) gelöst wurden.

1.2.2. Zelllinien

Die HPV-negativen HNSCC-Zelllinien HSC4, SAS und UTSCC-8 wurden bei 37 °C und 100%-iger Befeuchtung in Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM; Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) kultiviert, welches 10% fötales Kälberserum (FCS; PANBiotech, Aidenbach, Deutschland) und 2 mM Glutamin (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) enthielt. Alle Experimente wurden mit Mykoplasmen-freien Zellen durchgeführt. Alle HNSCC-Zelllinien wurden mittels *Short Tandem Repeat* (STR)-Profiling durch Eurofins (Ebersberg, Deutschland) authentifiziert.

1.2.3. Proliferation

Für die Proliferationstests wurden je 100.000 Zellen ausgesät und 24 Stunden später mit dem jeweiligen Inhibitor oder DMSO als Kontrolle behandelt. Drei Tage nach Behandlung wurde die Zellzahl mittels eines *Coulter Counters* (Beckmann, Indianapolis, Indiana, USA) quantifiziert.

1.2.4. Kolonietests

Die Testung des Zellüberlebens wurde unter *pre-plating* Bedingungen durchgeführt. Hierbei wurden je 250 Zellen in T25-Flaschen ausgesät und 24 Stunden später mit dem jeweiligen Inhibitor behandelt. 24 Stunden nach Behandlung wurde das Medium wieder ausgetauscht, um es vom Inhibitor zu befreien. Sobald die Proben gleichgroße Kolonien gebildet hatten, wurden sie nach 10-20 Tagen fixiert und mit Kristallviolett angefärbt. Kolonien mit mehr als 50 Zellen wurden gezählt, alle anderen wurden ignoriert. Die Überlebensrate wurde auf die *plating efficiency* der DMSO-Proben der jeweiligen Behandlungsreihe normiert.

1.2.5. Datenauswertung

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Experimente mindestens dreimal wiederholt. Die Daten wurden als Mittelwerte (SEM) angegeben. Datenanalyse und Darstellung der Graphen wurde mit der Software Prism 5 durchgeführt (GraphPad Software, La Jolla, California, USA). Um die statistische Signifikanz der Ergebnisse zu überprüfen, wurden p-Werte mit Hilfe des ungepaarten Student's-t-Test berechnet (* $P < .05$; ** $P < .01$; *** $P < .001$).

1.2.6. Western Blot

Proteine aus Ganzzelextrakten wurden mittels Western Blot-Verfahren nach Standardprotokollen nachgewiesen. Genutzte Erstantikörper von Cell Signaling Technology (Danvers, Massachusetts, USA) waren: Anti-Phospho-Src-Familie D49G4 (Tyr416 (Huhn); pSFK,#6943), Anti-Src L4A1 (#2110), Anti-Stat3 (#4904), Antiphospho-Stat3 (#9138); von Sigma-Aldrich (Merck KGaA,Darmstadt, Deutschland): Anti- β -Actin (#A-2228).

Genutzte Zweitantikörper: Anti-Maus und Anti-Kaninchen (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA). Das Odyssey® CLx InfraredImaging System (LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA) wurde für die Signaldetektion und -quantifizierung verwendet.

1.2.7. Aktivitätsanalyse von Kinasen (Kinomics)

Verwendet wurde eine PamStation®12 (in der UCCH KinomicsCore Facility, Hamburg) mit PTK-PamChip®-Arrays, um Tyrosinkinase-Profile gemäß den Anweisungen des Herstellers zu erstellen (PamGene International, 's-Hertogenbosch, Niederlande). Ganzzelllysate wurden unter Verwendung von 100 μ l M-PER (Mammalian Extraction Buffer) mit Halt Phosphatase Inhibitor und EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)-freiem Halt Protease Inhibitor Cocktail (jeweils 1:100; Pierce, Waltham, Massachusetts, USA) pro 1×10^6 Zellen hergestellt. Die Proben wurden 30 Minuten lang auf Eis lysiert und anschließend 15 Minuten lang bei 16000g und 4°C in einer vorgekühlten Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand der lysierten Probe wurde in Aliquots in auf Trockeneis vorgekühlte Fläschchen aufgeteilt und sofort bei 80°C im Gefrierschrank gelagert.

Die Proteinquantifizierung wurde mit dem Bicinchoninsäure-Assay gemäß den Anweisungen des Herstellers (BCA; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Die *In-vitro*-Hemmung wurde direkt in der Assay-Mastermischung durchgeführt, die 5 μ g Protein und 100 μ M ATP pro Array enthielt. Technische Triplikate wurden analysiert und die sequenzspezifische Peptid-Tyrosin-Phosphorylierung wurde mit dem Fluorescein-markierten Antikörper PY20 (Exalpha, Maynard, Massachusetts, USA) und einer CCD-Kamera unter Verwendung der Evolve-Software (PamGene International, 's-Hertogenbosch, Niederlande) nachgewiesen. Die Daten wurden mit der BioNavigator-Software (PamGene International, 's-Hertogenbosch, Niederlande) ausgewertet. Sofern nicht anders angegeben, werden die Daten als durchschnittliche Signalintensität ($\pm$ SD) der 196 Peptidspots auf der Grundlage der Endwerte der Phosphorylierungskurve angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen zwei Bedingungen wurden mit dem zweiseitigen Student's t-Test ermittelt.

1.3. Ergebnisse

Das Ziel meiner Arbeit war es, die Wirkung einer Hemmung der SFK auf HNSCC-Zelllinien mit unterschiedlichem Basallevel an SFK-Expression und Aktivität zu untersuchen. Dabei konzentrierten sich meine Arbeiten auf die Analyse der Wirkung der SFK-Inhibitoren, sowohl auf Ebene der Proliferation, des Zellüberlebens wie auch der Signaltransduktion. Diese Daten werden im Folgenden gezeigt. Um diese Analysen durchzuführen wurden im Vorfeld aus einem Panel von 30 HNSCC-Zelllinien (s. Bussmann, Hoffer *et al.* 2021) exemplarisch drei Zelllinien ausgewählt; eine mit erhöhter SFK-Grundaktivität (HSC4), eine mit mittlerer (SAS) und einer mit geringer SFK-Grundaktivität (UT-SCC 8).

Ich bestimmte zunächst die Wirkung der drei SFK-Inhibitoren PP2, SU6656 und Dasatinib auf die Proliferation der ausgewählten HNSCC-Zellen, indem ich die Anzahl der Zellen nach dreitägiger Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen der Inhibitoren analysierte.

In allen Fällen konnte eine konzentrationsabhängige Verringerung der Proliferation beobachtet werden, allerdings mit unterschiedlichen Spezifika.

So blockierte PP2 die Proliferation nur bei hohen Konzentrationen von 5 (HSC4) bis 10 μM (SAS und UT-SCC 8) effizient, während SU6656 die Proliferation aller drei Zelllinien bereits bei Konzentrationen zwischen 1 und 2,5 μM vollständig hemmte. Dasatinib hemmte die Proliferation nur bei HSC4-Zellen vollständig (bei Konzentrationen von weniger als 0,1 μM), während die Proliferation von SAS- und UT-SCC 8-Zellen bei Konzentrationen von bis zu 1 μM nur auf 25% reduziert wurde. Interessanterweise erwies sich HSC4 als Zelllinie mit stärkster SFK-Aktivität für alle drei Inhibitoren als die empfindlichste Zelllinie, gefolgt von SAS- und UT-SCC 8-Zellen.

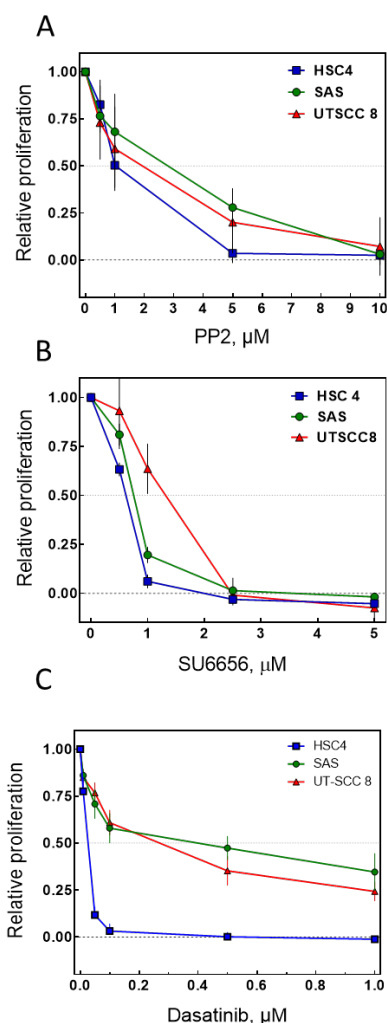


Abbildung 1:
Hemmung der Proliferation durch SFK-Inhibitoren
Wirkung von (A) PP2, (B) SU6656 und (C) Dasatinib auf die Proliferation von HNSCC-Zellen. Die Zellzahlen wurden nach dreitägiger Behandlung mit den angegebenen Konzentrationen bestimmt und die ursprüngliche Zellzahl wurde abgezogen. Die Diagramme zeigen die relative Zellproliferation, die aus mindestens drei unabhängigen Experimenten ermittelt wurde.

Als Nächstes analysierte ich die Wirkung der SFK-Inhibition auf das Überleben der Zellen mithilfe des Koloniebildungstests. Dabei wurden Zellen in geringer Dichte ausgelegt und 24 Stunden lang mit den Inhibitoren behandelt. Danach wurden diese entfernt, das Medium gewechselt und die Zellen wurden kultiviert, bis sie Kolonien vergleichbarer Größe bildeten (*Pre-Plating*-Protokoll; siehe auch Kriegs et al. 2015). PP2 zeigte nur geringe Auswirkungen auf das Zellüberleben, wobei UT-SCC 8 am empfindlichsten war, gefolgt von HSC4. SAS-Zellen schienen in Bezug auf das Zellüberleben resistent gegen PP2 zu sein und zeigten keinerlei

Beeinflussung der Koloniebildung. Bei SU6656 wurden vergleichbare Ergebnisse wie beim Proliferationsassay beobachtet: Das Zellüberleben wurde in allen Fällen gesenkt, wobei HSC4-Zellen am empfindlichsten waren, gefolgt von SAS-Zellen und UT-SCC 8-Zellen.

Dasatinib wirkte in allen Zelllinien zytotoxisch, sobald 1 μM verwendet wurde. Das ist eine Konzentration, die deutlich jenseits derjenigen lag, die eine maximale Wirkung auf die Proliferation zeigte. Bei 0,1 μM , einer Konzentration, die die Proliferation bereits sehr effizient blockierte, wurde das Zellüberleben bei UT-SCC 8 und HSC4 nur mäßig beeinträchtigt, während SAS wiederum keine Anzeichen einer Zellinaktivierung zeigte.

Zusammengefasst ergaben die Ergebnisse der Proliferations- und Zellüberlebensexperimente ein sehr heterogenes Bild. Nur für SU6656 war eine Korrelation zwischen dem basalen pSFK-Spiegel und der Sensitivität beobachtbar.

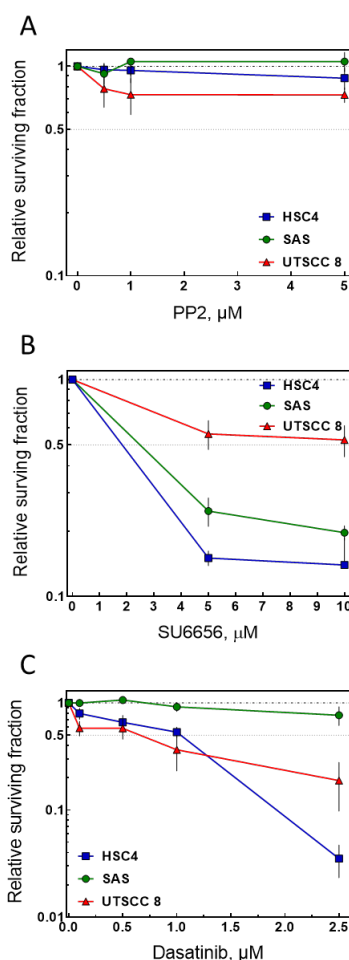


Abbildung 2:
Zellinaktivierung durch SFK-Inhibitoren

Wirkung von (A) SU6656, (B) PP2 und (C) Dasatinib auf das Zellüberleben von HNSCC-Zellen: Nach dem Ausplattieren wurden die Zellen 24 Stunden lang mit verschiedenen Konzentrationen der Inhibitoren behandelt, und die Anzahl der überlebenden Zellen wurde durch Koloniebildung bestimmt. Abgebildet wurden die relativen Koloniezahlen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Aufgrund dessen überprüfte ich als nächstes die Wirkung der Inhibitoren auf die SFK-Signalübertragung mittels Western Blot. Es wurden die HSC4-Zellen verwendet, da diese das höchste pSFK-Signal und in Bezug auf die Proliferation die ausgeprägteste Empfindlichkeit gegenüber einer SFK-Inhibition aufwiesen. Bei der Verwendung von bis zu 10 μM PP2, einer Konzentration, die sich in unseren vorhergehenden Tests sowohl auf die Proliferation als auch das Überleben der Zellen auswirkte, beobachtete ich weder eine Wirkung auf die SFK-Autophosphorylierung an Tyr419 unter Verwendung eines pan-SFK-spezifischen Antikörpers noch auf die Phosphorylierung des gut beschriebenen Src-Ziels STAT3 an Tyr705. Auch SU6656 hatte keinen Einfluss auf die SFK-Phosphorylierung an Tyr419, bewirkte aber eine

konzentrationsabhängige Verringerung der Phosphorylierung von STAT3. Eine deutliche Reduktion wurde bereits bei 5 μM erreicht. Im Gegensatz dazu beobachtete ich mit Dasatinib eine deutliche Verringerung der SFK-Phosphorylierung, jedoch keine Verringerung der STAT3-Phosphorylierung bei Konzentrationen bis zu 0,5 μM .

A

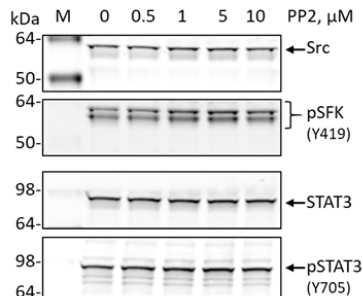
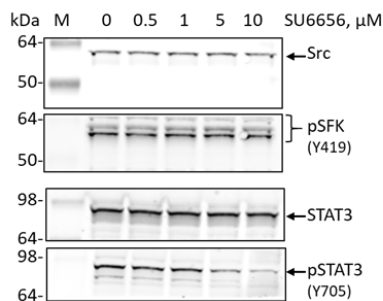


Abbildung 3:

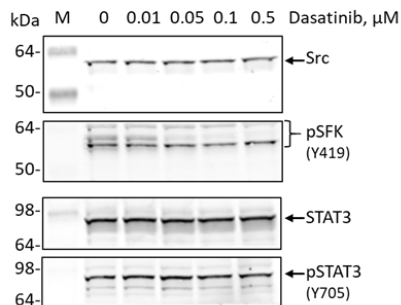
SFK-Signalübertragung in HSC4-Zellen

Wirkung verschiedener Konzentrationen von (A) PP2, (B) SU6656 und (C) Dasatinib auf die SFK-Signalübertragung, bestimmt durch Western Blot. Die Expression von Src und STAT3 sowie die Phosphorylierung von SFK (Y419) und STAT3 (Y705) wurden mit entsprechenden Antikörpern analysiert.

B



C



Da auch die Ergebnisse in Bezug auf die SFK-Signalübertragung damit inhomogen ausfielen, wurde zuletzt beschlossen, die Effizienz von PP2, SU6656 und Dasatinib durch eine Kinomanalyse (*functional kinomic profiling*) zu charakterisieren. Die entsprechenden Lysate wurden der UCCH Kinomics Core Facility zur Analyse übergeben. Dabei wurde die 5-fache IC50 jedes Inhibitors zu einem Proteinlysate von SAS-Zellen gegeben und die spezifische Peptidphosphorylierung mit dem Microarray-basierten System von PamGene Int. B.V. in Übereinstimmung mit Bussmann *et al.* (Bussmann, Hoffer *et al.* 2021) analysiert.

Mit PP2 behandelte Proben ergaben im Vergleich zur Kontrolle kaum Auswirkungen auf die Peptidphosphorylierung; im Gegensatz dazu hatten SU6656 und Dasatinib eindeutige, hemmende Wirkungen, wobei Dasatinib die deutlichsten Effekte zeigte.

Unter den am wahrscheinlichsten von SU6656 beeinflussten Kinasen befanden sich zwei SFK-Mitglieder unter den ersten fünf Kinasen, LCK und Yes; dieses Ergebnis deutete zumindest auf

eine *in-vitro*-Aktivität von SU6656 gegen SFK hin. Im Gegensatz dazu fand sich keine SFK unter den Top-5 der von Dasatinib beeinflussten Kinasen.

1.4. Diskussion

Diese Studie zeigt die zum Teil sehr heterogenen Auswirkungen von drei SFK-Inhibitoren auf die Proliferation, das Überleben und die zelluläre Signalübertragung von HNSCC-Zelllinien. Alle drei Substanzen blockierten effektiv die Proliferation, wobei die Zelllinie mit der höchsten basalen SFK-Aktivität (HSC4) zumindest in Bezug auf die Hemmung der Zellproliferation am empfindlichsten war. Allerdings blockierten nur SU6656 und Dasatinib die Proliferation bei Konzentrationen, die aufgrund ihrer IC50-Werte zu erwarten waren (das 5-10fache der IC50). Im Gegensatz dazu blockierte PP2 die Proliferation nur bei überhöhten Konzentrationen (ca. das 100-200fache der IC50), was auf *off-target*-Effekte hinweist. Solche *off-target*-Effekte wurden bereits in der Vergangenheit beschrieben, insbesondere für höhere PP2-Konzentrationen.⁶⁻⁸

Außerdem zeigte PP2 selbst bei hohen Konzentrationen nur mäßige bis leichte Auswirkungen auf das Zellüberleben, wohingegen HNSCC-Zellen durch SU6656 und Dasatinib effizient inaktiviert wurden. Für SU6656 ließ sich sogar eine klare Korrelation zwischen der basalen SFK-Aktivität und der Zellinaktivierung feststellen, wobei HSC4-Zellen wiederum am empfindlichsten waren, gefolgt von SAS- und UT-SCC 8-Zellen.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass SU6656 zumindest bei der Behandlung von Zellen mit hoher basaler SFK-Aktivität am wirksamsten ist, während die Wirkung bei Zellen mit niedriger basaler SFK-Aktivität abgeschwächt ist, was im Einklang mit unseren früheren Ergebnissen steht.⁴

Die Analyse der zellulären SFK-Signalübertragung nach der Behandlung mit dem Inhibitor demonstrierte große Unterschiede. Es konnte keine Wirkung von PP2 auf die SFK-Signalübertragung im Western Blot (WB) mit Konzentrationen von bis zu 10 µM oder im funktionellen *In-vitro*-Assay mit dem 5-fachen IC50-Konzentration nachgewiesen werden, was auf eine fehlende SFK-Hemmung durch PP2 in den ausgewählten HNSCC-Zellen hinweist. Dies stand jedoch in Übereinstimmung mit meinen Daten zur Proliferation und zum Zellüberleben. Im Gegensatz dazu gab es eine deutliche Hemmung der SFK-Phosphorylierung an Tyr419 durch Dasatinib bei niedrigen Konzentrationen, was auf eine Hemmung der SFK-Aktivität hinweist. Allerdings fehlte die Blockierung von STAT3, einer Kinase, die als *downstream target* von SFK beschrieben wurde.⁹

SU6656 hingegen reduzierte die STAT3-Phosphorylierung mit weniger als dem 10-fachen der IC50, konnte aber die Tyr419-Phosphorylierung von SFK nicht blockieren.

Wichtig ist, dass man mit Hilfe der Kinomanalyse eine klare Wirkung von SU6656 auf die SFK-Aktivität *in vitro* beobachten konnte, während Dasatinib bevorzugt Tyrosinkinasen der ErbB- und Abl-Unterfamilie blockierte. Diese Aktivität von Dasatinib ist nicht überraschend, da es sich um einen dualen Src/Abl-Inhibitor¹⁰ handelt und auch eine inhibitorische Aktivität von Dasatinib gegenüber Mitgliedern der Her-Familie von Rezeptortyrosinkinasen bereits vermutet wurde.¹¹ Dennoch war das Ausbleiben einer eindeutigen Hemmung von SFK nicht zu erwarten, zumal Dasatinib eine Verringerung der Tyr419-Phosphorylierung bewirkte. Es ist jedoch davon auszugehen, dass Tyr419 keine ausschließliche Autophosphorylierungsstelle ist,

sondern wahrscheinlich auch von vorgeschalteten Kinasen wie dem *platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR), dem PH-Rezeptor B2 (EPHB2) oder Axl phosphoryliert wird.¹²⁻¹⁴

Da Dasatinib die STAT-Phosphorylierung nicht blockieren konnte, lassen die Ergebnisse die Vermutung zu, dass die Verringerung der Tyr419-Phosphorylierung - zumindest teilweise - durch eine solche Blockierung vorgeschalteter Kinasen wie PDGFR verursacht wird.^{10,11} Dies würde wiederum bedeuten, dass die beobachteten biologischen Wirkungen auch eher durch eine Blockierung alternativer Zielmoleküle, nicht aber durch eine direkte SFK-Inhibition vermittelt werden wurde.

Wie für PP2 und Dasatinib wurden auch für SU6656 alternative Zielmoleküle beschrieben, zu denen Aurora-Kinasen gehören.¹⁶ Da diese Serin/Threonin-Kinasen an der Zellteilung beteiligt sind, kann nicht ausgeschlossen werden, dass einige der beobachteten biologischen Wirkungen von SU6656 auch durch diese *off-targets* vermittelt werden. Darüber hinaus deuten unsere eigenen Daten auch auf eine gewisse Aktivität gegen die Syk-Familie der Tyrosinkinasen hin, was die Ergebnisse ebenfalls beeinflussen könnte. Dennoch scheint SU6656 im Vergleich zu den beiden anderen Substanzen am spezifischsten für SFK zu sein, was auch durch die Blockierung der STAT3-Phosphorylierung belegt wird. Die Unempfindlichkeit der Tyr419-Phosphorylierung gegen SU6656 könnte auch hier durch ein eventuelles Vorhandensein möglicher anderer Kinasen erklärt werden, die *upstream* ebenfalls eine Tyr419-Phosphorylierung in den ausgewählten HNSCC-Zelllinien vermitteln.

Off-target-Effekte und multiples Kinase-Targeting sind nicht nur ein Phänomen, welches SFK-Inhibitoren betrifft, sondern ein Charakteristikum der meisten niedermolekularen Inhibitoren, auch derjenigen, die für den klinischen Einsatz zugelassen wurden.^{17,18} Ob das multi-Targeting eines Kinase-Inhibitors von Vor- oder Nachteil ist, ist umstritten und hängt natürlich von Faktoren wie dem Tumortypen oder den gewählten Zielen ab. In diesem Zusammenhang dürften jedoch noch weitere Faktoren von Bedeutung sein, wie z. B. individuelle Patientenmerkmale sowie die Mikroumgebung des Tumors, zu der u. a. das Tumorstroma, Zellen des Immunsystems und Blutgefäße gehören.^{19,20} Insbesondere die Angiogenese hat sich als vielversprechendes Ziel für den Einsatz von Multikinase-Inhibitoren wie Sorafenib erwiesen.²¹ Die potenziellen positiven therapeutischen Wirkungen müssen jedoch gegen das Risiko schwerwiegenderer Nebenwirkungen abgewogen werden, wenn mehrere Kinasen angegriffen werden. Eine breite Inhibition mehrerer Kinasen kann auch Wirkungen hervorrufen, die letztlich den therapeutischen Nutzen verringern, wie dies kürzlich für Dasatinib gezeigt wurde.²²

Zusammenfassend zeigen die Daten, wie wichtig eine gründliche molekulare Charakterisierung des Ziels, des Wirkstoffs sowie des Tumortyps ist. Ohne dieses Wissen wird die Entwicklung von präzisen und vor allem effizienten therapeutischen Ansätzen erheblich erschwert.

2. Publikation

Src family kinase targeting in head and neck tumor cells using SU6656, PP2 and dasatinib

Anh Thu Vu¹ | Lara Akingunsade BSc¹ | Konstantin Hoffer^{1,2} | Cordula Petersen MD¹ | Christian Stephan Betz MD³ | Kai Rothkamm PhD¹ | Thorsten Rieckmann PhD^{1,3} | Lara Bussmann MD^{2,3,4} | Malte Kriegs PhD^{1,2}

¹Department of Radiobiology & Radiation Oncology, Hubertus Wald Tumorzentrum – University Cancer Center Hamburg (UCCH), University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

²UCCH Kinomics Core Facility, Hubertus Wald Tumorzentrum – University Cancer Center Hamburg (UCCH), University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

³Department of Otorhinolaryngology, Hubertus Wald Tumorzentrum – University Cancer Center Hamburg (UCCH), University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

⁴Mildred Scheel Cancer Career Center HaTriCS4, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

Erschienen in:

Head & Neck. 2022; 10.1002/hed.27216

Src family kinase targeting in head and neck tumor cells using SU6656, PP2 and dasatinib

Anh Thu Vu¹ | Lara Akingunsade BSc¹ | Konstantin Hoffer^{1,2} |
Cordula Petersen MD¹ | Christian Stephan Betz MD³ |
Kai Rothkamm PhD¹ | Thorsten Rieckmann PhD^{1,3}  |
Lara Bussmann MD^{2,3,4} | Malte Kriegs PhD^{1,2} 

¹Department of Radiobiology & Radiation Oncology, Hubertus Wald Tumorzentrum – University Cancer Center Hamburg (UCCH), University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

²UCCH Kinomics Core Facility, Hubertus Wald Tumorzentrum – University Cancer Center Hamburg (UCCH), University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

³Department of Otorhinolaryngology, Hubertus Wald Tumorzentrum – University Cancer Center Hamburg (UCCH), University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

⁴Mildred Scheel Cancer Career Center HaTriCS4, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

Correspondence

Malte Kriegs, Laboratory of Radiobiology & Experimental Radiation Oncology, Hubertus Wald Tumorzentrum—University Cancer Center Hamburg, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistr. 52, D-20246 Hamburg, Germany.
Email: m.kriegs@uke.de

Funding information

Bundesministerium für Bildung und Forschung, Grant/Award Number: 02NUK032; Hamburger Krebsgesellschaft; Mildred Scheel Cancer Career Center; University Cancer Center Hamburg

Abstract

Background: We have recently shown a frequent upregulation of Src-family kinases (SFK) in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). Here we tested, if SFK targeting is effective especially in HNSCC cells with upregulated SFK signaling.

Methods: The impact of SFK inhibitors SU6656, PP2 and dasatinib on three HNSCC cell lines with different SFK activity levels was analyzed using proliferation and colony formation assays, Western blot and functional kinomics.

Results: Proliferation was blocked by all inhibitors in a micro-molar range. With respect to cell kill, dasatinib was most effective, while SU6656 showed moderate and PP2 minor effects. Cellular signaling was affected differently, with PP2 having no effect on SFK signaling while dasatinib probably has non-SFK specific effects. Only SU6656 showed clear SFK specific effects on signaling.

Conclusion: The results demonstrate potential benefit of SFK inhibition in HNSCC but they also highlight challenges due to non-specificities of the different drugs.

KEYWORDS

head and neck cancer, personalized therapy, signal transduction, Src family kinases, targeted therapy

Lara Bussmann and Malte Kriegs share last authorship.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2022 The Authors. *Head & Neck* published by Wiley Periodicals LLC.

1 | INTRODUCTION

With 600 000 new cases diagnosed annually worldwide, head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is the sixth most common cancer type. Although HNSCC therapy is a prime example of multimodal treatment including surgery, radiotherapy, chemotherapy and targeted therapy, HNSCC has still bad prognosis with a 5-year survival of 58%. Nevertheless, huge differences exist, with a favorable prognosis for early-stage tumors or HNSCC which are induced by the human papillomavirus (HPV). In contrast, locally advanced and metastasized tumors are associated with a bad prognosis.¹

We have recently shown, that for HPV-negative tumors patient survival is also associated with the activation status of Src family kinases (SFK): patients showing a higher SFK activity—detected by the phosphorylation of SFK—have a worse prognosis², compared to those with low SFK activity level. In this context we detected SFK to be frequently hyperactivated in HPV-negative HNSCC using functional kinome profiling, highlighting SFK as promising targets in personalized HNSCC therapy. Importantly, the SFK activity but not the expression of Src for example was of relevance, demonstrating potential discrepancies which can be observed between kinase expression and activity, as already reported by us previously.³

SFK is a group of 10 soluble tyrosine kinases including SrcA kinases (Yes, Src, Fyn, Fgr), SrcB kinases (Lyn, HCK, Lck, Blk) and the Src-like tyrosine kinases (FRK, SRMS). SFK activation involves the auto-phosphorylation of tyrosine 419 (human) and the dephosphorylation of tyrosine 530 (human). Activated SFK can phosphorylate multiple targets such as the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), the epidermal growth receptor (EGFR) or the extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 and with that regulate biological processes like cell growth, survival or migration as summarized before.^{4,5}

Src itself is one of the first described oncogenes but also other members of the SFK group have been implicated in cancer, leading to the approval of SFK inhibitors for cancer treatment.^{5,6} SFK inhibition has also shown anti-proliferative, anti-migratory and pro-apoptotic effects in preclinical studies for HNSCC.^{7–11} Since the biological effects seem to correlate with the basal SFK activity² one can assume, that SFK inhibition is effective especially for tumors with a high basal SFK activity and may therefore be a promising strategy for personalized HNSCC therapy approaches. Unfortunately, Src inhibitors such as dasatinib or saracatinib did not show any

clinical benefit so far, whether used alone^{12,13} or in combination with erlotinib.¹⁴ However, the results of these studies may be influenced by the fact that the number of patients was limited and there was no stratification based on biomarkers such as Src, SFK or HPV, with the latter being also of importance for the prognostic value of SFK activity.²

The aim of this study was to better understand the effect of SFK inhibition in HNSCC. Therefore, we chose two experimental small molecule inhibitors, PP2 and SU6656 as well as the clinically approved SFK inhibitor dasatinib. PP2 has been shown to be highly efficient in blocking Lck and Fyn as well as Hck in vitro using half the maximal inhibitory concentration (IC50) of 4 nM (Lck) and 5 nM (Fyn, Hck),¹⁵ but less potent towards Src (IC50 in vitro: 300 nM).¹⁶ SU6656 has been shown to be active against many SFK with IC50 in vitro of 280, 20, 130, and 170 nM for Src, Yes, Lyn, and Fyn, respectively.¹⁷ In contrast to PP2 and SU6656, dasatinib has been approved for the treatment of cancer (specific forms of leukemia). It has known activity against Src as well as Abl and c-Kit with in vitro IC50 of <1, 0.8, and 79 nM for Abl, Src and c-Kit, respectively.^{18,19}

On the assumption that a stronger basal activity of SFK might confer a higher sensitivity towards SFK inhibition, we tested the effect of these drugs by using three HPV-negative HNSCC cell lines with different levels of basal SFK activity.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Substances

Vehicle DMSO, Src-inhibitor SU6656 and Abl/Src-inhibitor dasatinib from Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), Src-inhibitor PP2 from Selleckchem (Houston, Texas, USA).

2.2 | Cells

The HPV-negative HNSCC cell lines HSC4, SAS and UT-SCC-8 were grown in D-MEM medium (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) containing 10% FCS (PAN Biotech, Aidenbach, Germany) and 2 mM glutamine (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) at 37°C and 100% humidification. All experiments were performed with mycoplasma-free cells. All HNSCC cell lines were authenticated using short tandem repeat (STR) profiling by Eurofins (Ebersberg, Germany).

2.3 | Cell proliferation

To measure proliferation, 100 000 cells were seeded, treated with inhibitors or DMSO as a control 24 h later and cell numbers were determined after 3 days of treatment using a Coulter Counter (Beckmann, Indianapolis, Indiana).

2.4 | Colony formation assay

Cell survival was measured by colony formation under pre-plating conditions. Therefore 250 cells were seeded in T25 flasks 24 h before inhibitor treatment. After 24 h the medium was changed, keeping the cells without inhibitor for the rest of the experiment. Since inhibitor treatment might affect proliferation, all samples were grown until colonies reached equal size. After 10–20 days colonies were fixed, stained with crystal violet and the colonies of more than 50 cells were scored as “survivors.” The surviving fraction was normalized to the plating efficiency of the DMSO sample.

2.5 | Data evaluation

Unless otherwise indicated, experiments were repeated at least three times. The data are presented as mean values (SEM). Prism 5 software (GraphPad Software, La Jolla, California) was used for analyzing and graphing the data. To test for statistical significance the unpaired Student's *t*-test was performed to calculate *p*-values (**p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001).

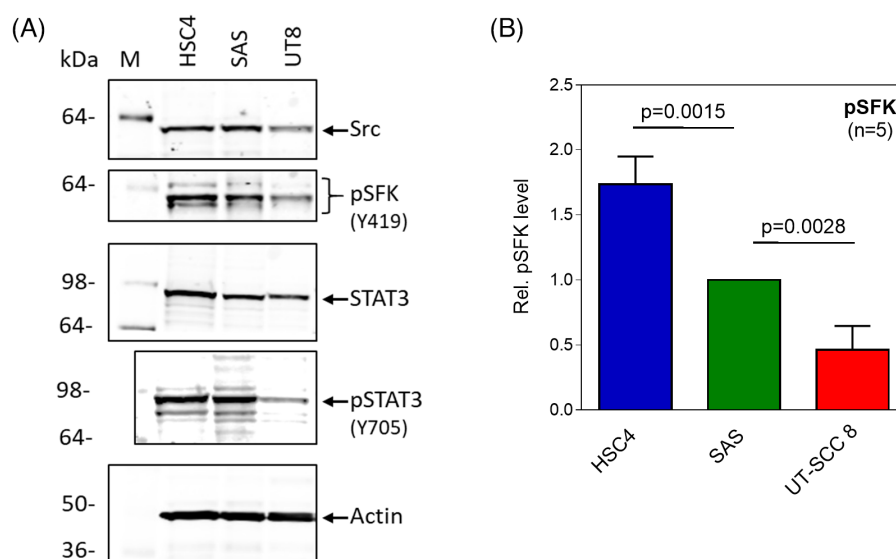
2.6 | Western blot (WB)

Proteins from whole cell extracts were detected by WB according to standard protocols. Primary antibodies from Cell Signaling Technology (Danvers, Massachusetts, USA): anti-phospho-Src family D49G4 (Tyr416 (chicken); pSFK, #6943), anti-Src L4A1 (#2110), anti-Stat3 (#4904), anti-phospho-Stat3 (#9138); from Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Germany): anti-β-Actin (#A-2228). Secondary antibodies: anti-mouse and anti-rabbit (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA). The Odyssey® CLx Infra-red Imaging System (LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA) was utilized for signal detection and quantification.

2.7 | Kinase activity profiling

Kinase activity profiling and in vitro inhibition of tyrosine kinases has been described previously.² Here we used a PamStation®12 (located at the UCCH Kinomics Core Facility, Hamburg) and PTK-PamChip® arrays to profile tyrosine kinase according to the manufacturer's instructions (PamGene International, 's-Hertogenbosch, The Netherlands). Whole cell lysates were made using 100 µl M-PER Mammalian Extraction Buffer containing Halt Phosphatase Inhibitor and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-free Halt Protease Inhibitor Cocktail (1:100 each; Pierce, Waltham, Massachusetts, USA) per 1×10^6 cells. The samples were lysed for 30 min on ice and centrifuged afterwards for 15 min at 16 000g at 4°C in a pre-cooled centrifuge. The supernatant of the lysed sample was divided in aliquots in vials pre-cooled on dry ice and stored immediately in a –80°C freezer. Protein

FIGURE 1 SFK activation in HNSCC cell lines. (A) Western blot experiment detecting SFK and STAT3 phosphorylation at Tyr419 and Tyr705 respectively. Expression of Src, STAT3 and Actin were detected as control. The lysate of 40 000 cells was loaded on each lane. (B) The mean relative pSFK values of three independent WB experiments are shown as a bar graph. The values for SAS were used for normalization. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]



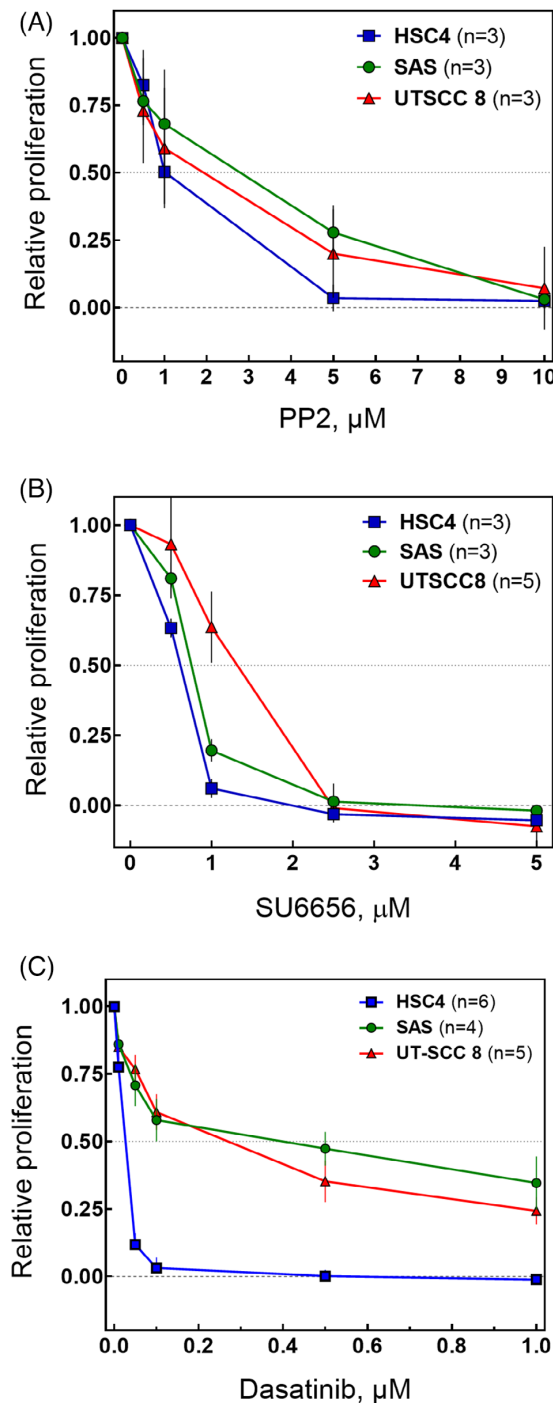


FIGURE 2 Inhibition of proliferation by SFK inhibitors. Effect of (A) PP2, (B) SU6656 and (C) dasatinib on the proliferation of HNSCC cells. The cell numbers were determined after 3 days of treatment with the indicated concentrations and the initial cell number was subtracted. The graphs show the relative cell proliferation determined from at least three independent experiments. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

quantification was performed with the bicinchoninic acid assay according to the manufacturer's instructions (BCA; Merck KGaA, Darmstadt, Germany). In vitro inhibition was performed directly in the assay master mix, containing 5 μg of protein and 100 μM ATP per array. Technical triplicates were analyzed and sequence-specific peptide tyrosine phosphorylation was detected by the fluorescein-labeled antibody PY20 (Exalpha, Maynard, Massachusetts, USA) and a CCD camera using the Evolve software (PamGene International, 's-Hertogenbosch, The Netherlands). Data were analyzed using the BioNavigator software (PamGene International, 's-Hertogenbosch, The Netherlands). Unless otherwise stated, data are expressed as the average signal intensity ($\pm\text{SD}$) of the 196 peptide spots based on end levels of the phosphorylation curve. Significant differences between two conditions were determined using two-sided Student's *t*-test.

3 | RESULTS

The aim of this study was to analyze the effect of SFK inhibition on HNSCC cells with different SFK activity levels. From a panel of 30 HNSCC cell lines (see Reference 2), we chose three HNSCC cell lines, one with increased SFK phosphorylation at Tyr416 (HSC4; rel. pSFK = 1.7), one with intermediate SFK activity (SAS; rel. pSFK = 1; values from SAS were used for normalization) and one with low Tyr419 (human) phosphorylation (UT-SCC 8; rel. pSFK = 0.5) as detected by Western blot (WB) analysis (Figure 1A, B). In contrast to the specific detection of Src, the use of a pan-phospho SFK results in the detection of multiple bands with molecular weights higher and lower compared to Src 59.8 kDa (isoform 1). The lower SFK activity in UT-SCC8 cells in comparison to HSC4 and SAS cells was confirmed by analyzing the phosphorylation of the well described Src target STAT3.

We next determined the effect of the three SFK inhibitors on HNSCC cell proliferation by analyzing the number of cells after 3 days of treatment with different concentrations of PP2, SU6656 or dasatinib as indicated in Figure 2. For all three inhibitors we observed a concentration-dependent reduction in proliferation, however with different characteristics. PP2 blocked proliferation efficiently only at high concentrations of 5 (HSC4) to 10 μM (SAS and UT-SCC 8) while SU6656 completely inhibited the proliferation of all three cell lines already at concentrations between 1 and 2.5 μM . Dasatinib inhibited proliferation completely only for HSC4 cells (at concentrations of less than 0.1 μM), while proliferation of SAS and UT-SCC 8 cells was only reduced to 25% at concentrations of up to 1 μM . Interestingly, for all

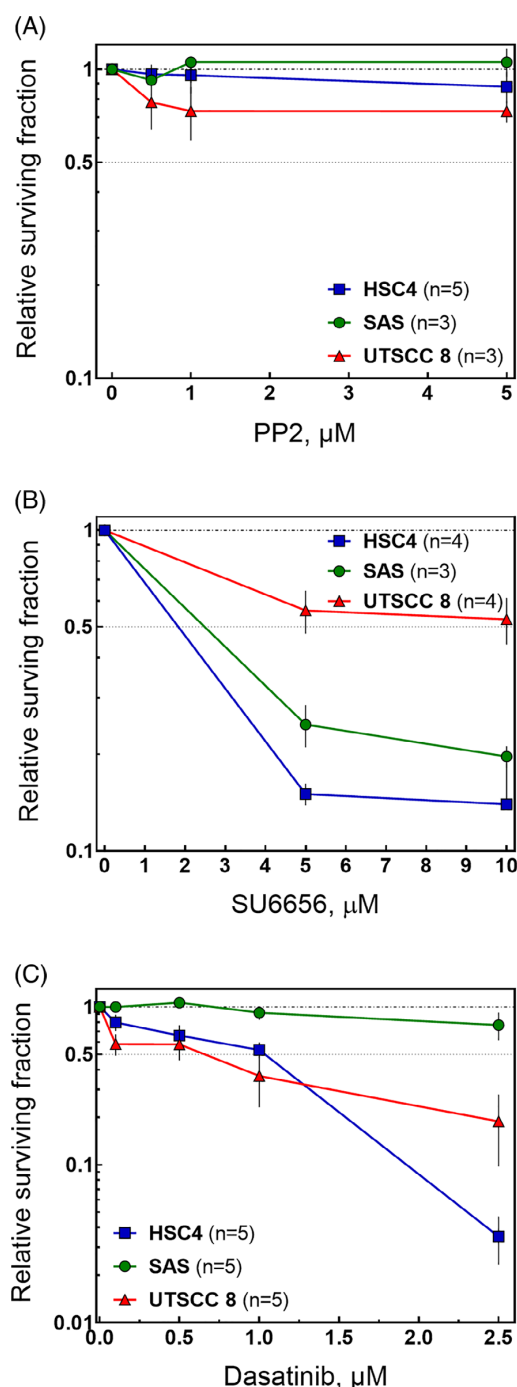


FIGURE 3 Cell inactivation by SFK inhibitors. Effect of (A) SU6656, (B) PP2 and (C) dasatinib on cell survival of HNSCC cells. After plating, the cells were treated with different concentrations of the inhibitors as indicated for 24 h and the number of surviving cells was determined by colony formation. The relative colony numbers from at least three independent experiments were depicted. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

three inhibitors we found HSC4 to be the most sensitive cell line, followed by SAS and UT-SCC 8 cells.

Next, we analyzed the effect of SFK inhibition on cell survival using the colony formation assay (Figure 3). Here, the cells were plated in low density and were treated with the inhibitor for 24 h. Thereafter, the inhibitors were removed, the medium was changed and the cells were allowed to form colonies of comparable size (pre-plating protocol; see also Reference 20). PP2 showed only minor effects on cell survival with UT-SCC 8 being the most sensitive (SF_{5 μM} = 0.73), followed by HSC4 (SF_{5 μM} = 0.77). SAS cells seemed to be resistant to PP2 in terms of cell survival, showing no reduction in colony formation at all (SF_{5 μM} = 1.05). For SU6656 we observed comparable results as for the proliferation assay: all drugs reduced the cell survival with HSC4 cells being the most sensitive (survival fraction at 5 μM SF_{5 μM} = 0.15), followed by SAS cells (SF_{5 μM} = 0.25) and UT-SCC 8 cells (SF_{5 μM} = 0.56). Dasatinib was cytotoxic for all cell lines using 1 μM , a concentration which was beyond those showing maximal effect in proliferation. At 0.1 μM , a concentration which already blocked proliferation very efficiently, cell survival was only moderately affected for UT-SCC 8 (SF_{0.1 μM} = 0.59) and HSC4 (SF_{0.1 μM} = 0.57) while SAS showed again no signs of cell inactivation (SF_{0.1 μM} = 1.01).

Taking together the results of the proliferation and survival experiments, we observed very heterogeneous results. Only for SU6656 a correlation of basal pSFK-level and sensitivity was detectable as summarized in Supplementary Table S1.

We also tested SFK inhibition in combination with cisplatin, assuming that individualized SFK inhibition would most likely be tested clinically with concomitant adjuvant chemotherapy. The effects of all three SFK inhibitors were even more heterogeneous compared to the single treatment when analyzing the cellular survival, which did not allow any meaningful interpretation (Supplementary Figure S1).

Due to these heterogeneous results, we next analyzed the effect of the inhibitors on SFK signaling by WB analysis. HSC4 cells were used, since this cell line displayed the highest pSFK signal and the pronounced sensitivity towards SFK inhibition, at least in terms of proliferation (see Figure 2). Using up to 10 μM PP2, a concentration which affected proliferation and cell survival, we observed neither an effect on SFK phosphorylation at Tyr419 using a pan-SFK specific antibody nor on the phosphorylation of STAT3 at Tyr705 (Figure 4A). Also SU6656 had no effect on SFK phosphorylation at Tyr419 but caused a reduction in phosphorylation of STAT3 in a concentration-dependent manner (Figure 4B). A clear reduction was already achieved with 5 μM . In contrast,

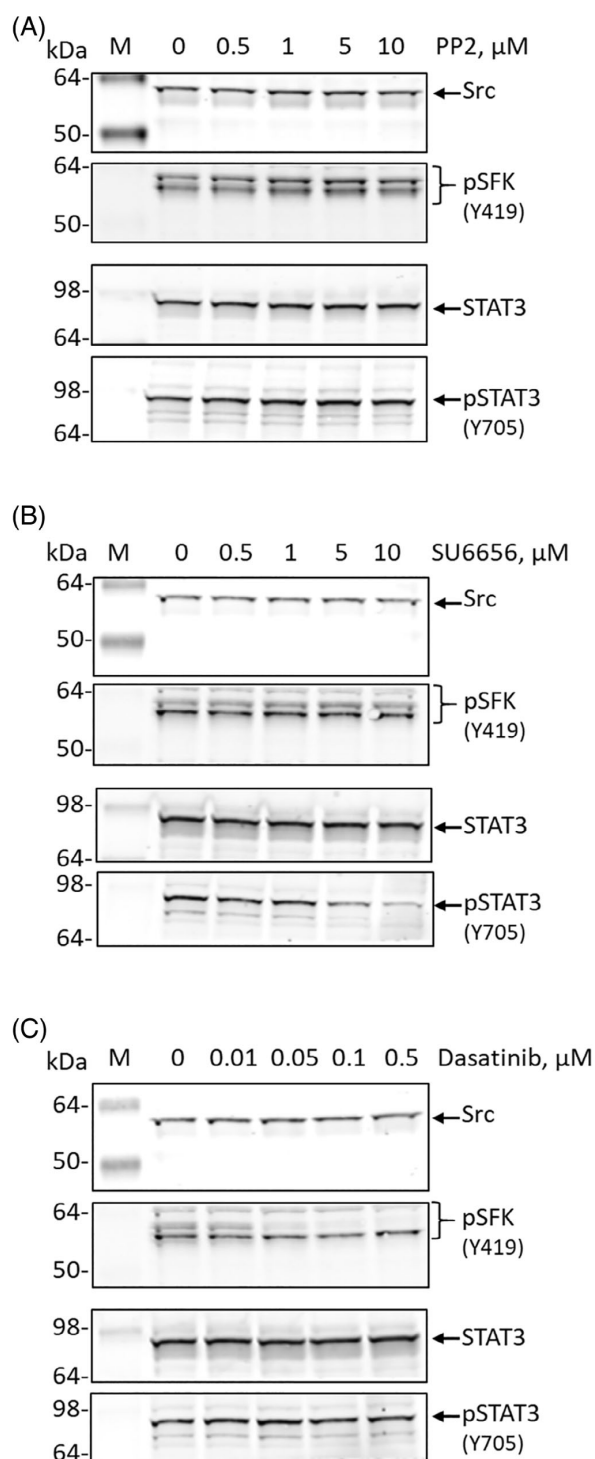


FIGURE 4 SFK signaling in HSC4 cells. Effect of different concentrations of (A) PP2, (B) SU6656 and (C) dasatinib on SFK signaling as determined by WB. Src and STAT3 expression as well as SFK (Y419) and STAT3 (Y705) phosphorylation were analyzed using appropriate antibodies.

with dasatininib we observed a clear reduction in SFK phosphorylation but no reduction in STAT3 phosphorylation with concentrations up to 0.5 μM (Figure 4C). Analyzing alternative SFK targets also did not yield any clear results as well. While ERK1/2 phosphorylation was reduced by all three substances (for PP2 inhibition was observed only at higher concentrations), inhibition of EGFR phosphorylation at Tyr845 could be again observed especially for Su6656 (Figure S2).

Due to these heterogeneous results in terms of SFK signaling, we decided to characterize the efficiency of PP2, SU6656 and dasatinib using functional kinome profiling. Here, the 5 fold IC_{50} of each inhibitor was added to a protein lysate of SAS cells and specific peptide phosphorylation was analyzed using the microarray-based system from PamGene Int. B.V. in accordance to Busmann et al.² As shown in the heat map of Figure 5A, there was hardly any effect on peptide phosphorylation when PP2-treated samples were compared to the control, resulting in only one significantly altered peptide as depicted in the volcano plot in Figure 5B. In contrast, SU6656 and dasatinib had clear inhibitory effects on peptide phosphorylation, with dasatinib showing the most prominent effects (Figure 5A, B). When predicting the most likely SU6656-effected kinases, two SFK members were among the top 5 kinases, namely LCK and Yes1, indicating at least in vitro activity of SU6656 against SFK. In contrast, dasatinib showed maximal efficiency against kinases of the ErbB, TAM and Abl-family with no SFK to be identified among the top 5 kinases (Figure 5C).

4 | DISCUSSION

In this study we report in part very heterogeneous effects of three SFK inhibitors on HNSCC proliferation, survival and cellular signaling. All three substances effectively blocked proliferation and the cell line with the highest basal SFK activity (HSC4) was most sensitive at least with respect to cell proliferation inhibition. However, only SU6656 and dasatinib blocked proliferation at concentrations, which were to be expected due to their IC_{50} values (5–10 fold the IC_{50}). In contrast, PP2 blocked proliferation only at excessive concentrations (approximately 100–200 fold the IC_{50}), indicating off-target effects. Such off-target effects have been described in the past, especially for higher concentrations of PP2.^{21–23} Furthermore, PP2 showed only moderate to mild effects on cell survival even at high concentrations. In contrast, SU6656 and dasatinib efficiently inactivated HNSCC cells. For SU6656 we even observed a clear correlation of SFK basal activity and cell inactivation, with HSC4 cells again being the most sensitive, followed by SAS and UT-SCC 8 cells.

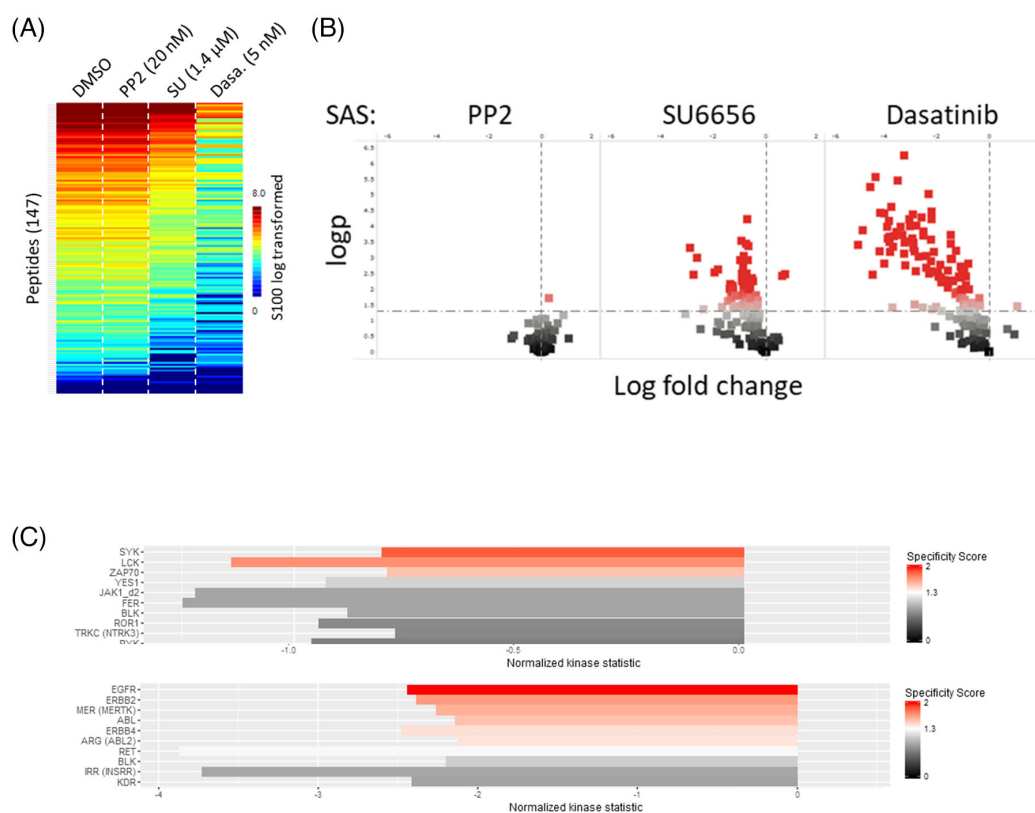


FIGURE 5 Characterization of SFK inhibitor efficiency by functional kinomics. Lysates of SAS cells were treated with 5-times the IC₅₀ of PP2, SU6656 (IC₅₀ for Src) or dasatinib (IC₅₀ for Src) as indicated. DMSO was used as control. The activity of tyrosine kinases was analyzed by functional kinome profiling using PTK-specific peptide-based PamChips. (A) The heatmap of 147 analyzed peptides (the S100_log transformed values are depicted). (B) Volcano plot highlighting those peptides, which were significantly altered between control and SFK inhibitor treated samples (x-axis: log fold change in peptide phosphorylation, dashed line = 0; y-axis: significance (log) for each peptide, >1.3 (dashed/dotted line) significant changes). (C) Upstream kinase analysis of control vs dasatinib or SU6656 treated samples (normalized kinase statistic (log₂) < 0: lower kinase activity in inhibitor treated sample; specificity score (log₂) > 1.3; white to red bars: statistically significant changes). [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

These results indicate, that at least SU6656 is most efficient when treating cells with high basal SFK activity, compared to attenuated effect in cells with low basal SFK activity, which is in line with our previous results.²

Analyzing the cellular SFK signaling after inhibitor treatment, we again observed large differences. We could not detect any effect of PP2 on SFK signaling by WB using concentrations up to 10 μM or functional in vitro assay using 5 times the IC₅₀, demonstrating a lack of SFK inhibition by PP2 in the chosen HNSCC cells, which is however in line with the proliferation and cell survival data. In contrast, we observed a clear inhibition of SFK phosphorylation at Tyr419 by dasatinib at low concentrations, indicating inhibition of SFK activity. However, we observed no block of STAT3, which has been described to be downstream of SFK also in HNSCC.¹⁰ In contrast, SU6656 reduced STAT3 phosphorylation using less than

10 times the IC₅₀ but failed to block Tyr419 phosphorylation of SFK. Importantly, we observed a clear effect of SU6656 on SFK activity in vitro using functional kinomics while dasatinib preferentially blocked tyrosine kinases of the ErbB and Abl sub-family. This activity of dasatinib is not surprising, since it is a dual Src/Abl inhibitor²⁴ and also inhibitory activity of dasatinib towards members of the Her-family of receptor tyrosine kinases has been assumed before.²⁵ Nevertheless, the absence of a clear inhibition of SFK was not expected, especially since dasatinib caused a reduction in Tyr419 phosphorylation. However, Tyr419 is assumed to be no exclusive autophosphorylation site but becomes probably also phosphorylated by upstream kinases such as the platelet-derived growth factor receptor (PDGFR), the PH receptor B2 (EPHB2) or Axl.^{26–28} Since dasatinib failed to block STAT phosphorylation, our results allow

the speculation that the reduction in Tyr419 phosphorylation is caused—at least in part—by such a block of upstream kinases such as PDGFR.^{24,29} This in turn would mean, that the biological effects, which have been observed, might also be mediated by a block of alternative targets, but not by direct SFK inhibition.

Like for PP2 and dasatinib, alternative targets have also been described for SU6656, which include Aurora kinases.³⁰ Since these serine/threonine kinases are involved in cell division, we cannot exclude, that some of the observed biological effects of SU6656 are mediated by this off-target effect. Additionally, our own data also indicate some activity against the Syk family of tyrosine kinases which also might influence the results (see Figure 5C). Nevertheless, SU6656 seems to be most SFK-specific, compared to both other drugs, also supported by the block of STAT3 phosphorylation. The resistance of Tyr419 phosphorylation against SU6656 might be again explained by the assumption of up-stream kinases mediating Tyr419 phosphorylation in the chosen HNSCC cell lines.

Off-target effects and multiple kinase targeting is not only a phenomenon of SFK inhibitors but is a characteristic of most small molecule inhibitors, also those which were approved for clinical use.^{31,32} Whether multi-targeting of a kinase inhibitor is of advantage or disadvantage, is a matter of debate and for sure depends on obvious factors, such as the tumor type or the chosen targets. However, additional factors are likely of relevance in this context, such as individual patient characteristics as well as the tumor microenvironment including among others the tumor stroma, cells of the immune system and blood vessels.^{33,34} Angiogenesis in particular has emerged as a promising target for the use of multikinase inhibitors such as sorafenib.³⁵ However, potential positive therapeutic effects must be weighed against the risk of more severe side effects if targeting several kinases. Moreover, multiple kinase targeting might also induce opposite effects, which in the end reduce the therapeutic benefit, as is the has been shown for dasatinib quite recently.³⁶

In summary, our data demonstrate the importance of profound molecular characterization of the target, the drug as well as the tumor type/model system. Without this knowledge, the development of precise and, above all, efficient therapeutic approaches will be significantly hampered.

5 | CONCLUSIONS

Here we demonstrate that only one (SU6656) of three SFK inhibitors showed SFK-specific effects. The effect of the other two inhibitors (PP2 and dasatinib) is probably

due to SFK-nonspecific activity. Additionally, the effect of SU6656 seems to correlate with the basal SFK-activity, with cells having a higher basal activity being more sensitive. Therefore, these results further underline the potential benefit of SFK inhibition in HNSCC, especially for those tumors with elevated SFK-signaling. However, this study also highlights the need for precise target and drug characterization, as a basis of successful individualized molecular targeting.

ACKNOWLEDGMENT

Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

CONFLICT OF INTEREST

All authors declare no conflict of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ORCID

Thorsten Rieckmann  <https://orcid.org/0000-0001-8426-107X>

Malte Kriegs  <https://orcid.org/0000-0002-6195-8920>

REFERENCES

1. Du E, Mazul AL, Farquhar D, et al. Long-term survival in head and neck cancer: impact of site, stage, smoking, and human papillomavirus status. *Laryngoscope*. 2019;129(11):2506-2513.
2. Bussmann L, Hoffer K, von Barga CM, et al. Analyzing tyrosine kinase activity in head and neck cancer by functional kinomics: identification of hyperactivated Src family kinases as prognostic markers and potential targets. *Int J Cancer*. 2021; 149(5):1166-1180.
3. Kriegs M, Clauditz TS, Hoffer K, et al. Analyzing expression and phosphorylation of the EGF receptor in HNSCC. *Sci Rep*. 2019;9(1):13564.
4. Parsons SJ, Parsons JT. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene*. 2004;23(48):7906-7909.
5. Wheeler DL, Iida M, Dunn EF. The role of Src in solid tumors. *Oncologist*. 2009;14(7):667-678.
6. Martin GS. The hunting of the Src. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001; 2(6):467-475.
7. Ammer AG, Kelley LC, Hayes KE, et al. Saracatinib impairs head and neck squamous cell carcinoma invasion by disrupting Invadopodia function. *J Cancer Sci Ther*. 2009;1(2):52-61.
8. Johnson FM, Saigal B, Talpaz M, Donato NJ. Dasatinib (BMS-354825) tyrosine kinase inhibitor suppresses invasion and induces cell cycle arrest and apoptosis of head and neck squamous cell carcinoma and non-small cell lung cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2005;11(19 Pt 1):6924-6932.
9. Mao L, Deng WW, Yu GT, et al. Inhibition of SRC family kinases reduces myeloid-derived suppressor cells in head and neck cancer. *Int J Cancer*. 2017;140(5):1173-1185.

10. Xi S, Zhang Q, Dyer KF, et al. Src kinases mediate STAT growth pathways in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Biol Chem*. 2003;278(34):31574-31583.
11. Zhang Q, Thomas SM, Xi S, et al. SRC family kinases mediate epidermal growth factor receptor ligand cleavage, proliferation, and invasion of head and neck cancer cells. *Cancer Res*. 2004;64(17):6166-6173.
12. Brooks HD, Glisson BS, Bekele BN, et al. Phase 2 study of dasatinib in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2011;117(10):2112-2119.
13. Fury MG, Baxi S, Shen R, et al. Phase II study of saracatinib (AZD0530) for patients with recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Anticancer Res*. 2011;31(1):249-253.
14. Bauman JE, Duvvuri U, Gooding WE, et al. Randomized, placebo-controlled window trial of EGFR, Src, or combined blockade in head and neck cancer. *JCI Insight*. 2017;2(6):e90449.
15. Hanke JH, Gardner JP, Dow RL, et al. Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J Biol Chem*. 1996;271(2):695-701.
16. Waltenberger J, Uecker A, Kroll J, et al. A dual inhibitor of platelet-derived growth factor beta-receptor and Src kinase activity potentially interferes with mitogenic and mitogenic responses to PDGF in vascular smooth muscle cells. A novel candidate for prevention of vascular remodeling. *Circ Res*. 1999;85(1):12-22.
17. Blake RA, Broome MA, Liu X, et al. SU6656, a selective src family kinase inhibitor, used to probe growth factor signaling. *Mol Cell Biol*. 2000;20(23):9018-9027.
18. Shah NP, Lee FY, Luo R, Jiang Y, Donker M, Akin C. Dasatinib (BMS-354825) inhibits KITD816V, an imatinib-resistant activating mutation that triggers neoplastic growth in most patients with systemic mastocytosis. *Blood*. 2006;108(1):286-291.
19. O'Hare T, Walters DK, Stoffregen EP, et al. In vitro activity of Bcr-Abl inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants. *Cancer Res*. 2005;65(11):4500-4505.
20. Kriegs M, Gurtner K, Can Y, et al. Radiosensitization of NSCLC cells by EGFR inhibition is the result of an enhanced p53-dependent G1 arrest. *Radiother Oncol*. 2015;115(1):120-127.
21. Bartscht T, Rosien B, Rades D, et al. Inhibition of TGF-beta signaling in tumor cells by small molecule Src family kinase inhibitors. *Anticancer Agents Med Chem*. 2017;17(10):1351-1356.
22. Blake RA, Garcia-Paramio P, Parker PJ, Courtneidge SA. Src promotes PKCdelta degradation. *Cell Growth Differ*. 1999;10(4):231-241.
23. Brandvold KR, Steffey ME, Fox CC, Soellner MB. Development of a highly selective c-Src kinase inhibitor. *ACS Chem Biol*. 2012;7(8):1393-1398.
24. Lombardo LJ, Lee FY, Chen P, et al. Discovery of N-(2-chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-ipera-zin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide(BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. *J Med Chem*. 2004;47(27):6658-6661.
25. Nautiyal J, Majumder P, Patel BB, Lee FY, Majumdar AP. Src inhibitor dasatinib inhibits growth of breast cancer cells by modulating EGFR signaling. *Cancer Lett*. 2009;283(2):143-151.
26. Leung HW, Leung CON, Lau EY, et al. EPHB2 activates beta-catenin to enhance cancer stem cell properties and drive Sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2021;81(12):3229-3240.
27. Kimani SG, Kumar S, Davra V, et al. Normalization of TAM post-receptor signaling reveals a cell invasive signature for Axl tyrosine kinase. *Cell Commun Signal*. 2016;14(1):19.
28. Wei L, Yang Y, Zhang X, Yu Q. Altered regulation of Src upon cell detachment protects human lung adenocarcinoma cells from anoikis. *Oncogene*. 2004;23(56):9052-9061.
29. Dickerson EB, Marley K, Edris W, et al. Imatinib and Dasatinib inhibit Hemangiosarcoma and implicate PDGFR-beta and Src in tumor growth. *Transl Oncol*. 2013;6(2):158-168.
30. Arai R, Tsuda M, Watanabe T, et al. Simultaneous inhibition of Src and Aurora kinases by SU6656 induces therapeutic synergy in human synovial sarcoma growth, invasion and angiogenesis in vivo. *Eur J Cancer*. 2012;48(15):2417-2430.
31. Bain J, McLauchlan H, Elliott M, Cohen P. The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem J*. 2003;371(Pt 1):199-204.
32. Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J*. 2000;351(Pt 1):95-105.
33. Broekman F, Giovannetti E, Peters GJ. Tyrosine kinase inhibitors: multi-targeted or single-targeted? *World J Clin Oncol*. 2011;2(2):80-93.
34. Morphy R. Selectively nonselective kinase inhibition: striking the right balance. *J Med Chem*. 2010;53(4):1413-1437.
35. Fallahi P, Ferrari SM, Santini F, et al. Sorafenib and thyroid cancer. *BioDrugs*. 2013;27(6):615-628.
36. Liu C, Zhu X, Jia Y, et al. Dasatinib inhibits proliferation of liver cancer cells, but activation of Akt/mTOR compromises dasatinib as a cancer drug. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2021;53(7):823-836.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Vu AT, Akingunsade L, Hoffer K, et al. Src family kinase targeting in head and neck tumor cells using SU6656, PP2 and dasatinib. *Head & Neck*. 2023;45(1):147-155. doi:10.1002/hed.27216

3. Zusammenfassung

In Vorarbeiten von Bußmann *et. al* konnte gezeigt werden, dass Plattenepithelkarzinome des Kopf-Halsbereiches (HNSCC) eine erhöhte Tyrosinkinaseaktivität im Vergleich zum entsprechenden Normalgewebe aufweisen. Speziell Kinasen der Src-Familie (SFK) waren in der Mehrzahl der Tumore verstärkt aktiv. In meinen Experimenten habe ich mich von daher der Fragestellung gewidmet, ob eine spezifische Inhibition von SFK insbesondere bei HNSCC-Zellen, die eine verstärkte SFK-Aktivität aufweisen, wirksam sein kann, indem ich die Auswirkungen einer solchen Hemmung auf das Zellüberleben, die Proliferation und die zelluläre Signalübertragung dreier HPV-negativer HNSCC-Zelllinien mit unterschiedlicher SFK-Expression und Phosphorylierung untersucht habe. Verwendet wurden dabei die als SFK-Inhibitoren beschriebenen Substanzen SU6656, PP2 und Dasatinib.

Die Zellproliferation wurde von allen Inhibitoren im mikromolaren Bereich blockiert. In Bezug auf die Zellabtötung war Dasatinib am wirksamsten, während SU6656 eine moderate und PP2 eine geringe Wirkung zeigte. Die zelluläre Signalübertragung wurde sehr unterschiedlich beeinflusst, wobei PP2 keine Auswirkungen auf die SFK-Signalübertragung hatte, während Dasatinib wahrscheinlich nicht SFK-spezifische Auswirkungen auf Tyrosinkinasen hat. Nur SU6656 zeigte klare SFK-spezifische Auswirkungen auf die zelluläre Signalübertragung.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen den potenziellen Nutzen einer SFK-Hemmung bei HNSCC, verdeutlichen aber auch klar die Notwendigkeit einer präzisen Charakterisierung von Inhibitor und Zielkinase.

The preliminary work by Bußmann *et. al* demonstrated that head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) exhibit increased tyrosine kinase activity compared to corresponding normal tissue. In particular, kinases of the Src family (SFK) were activated at elevated levels in the majority of tested tumors. In my experiments I addressed the question of whether a specific inhibition of SFK can be effective, especially in HNSCC cells that exhibit increased SFK activity, by investigating the effects of such inhibition on cell survival, proliferation and cellular signaling of three HPV-negative HNSCC cell lines with different SFK expression and phosphorylation. The substances used were SU6656, PP2 and dasatinib, which are described as SFK inhibitors.

Cell proliferation was blocked by all inhibitors in the micromolar range. In terms of cell killing, dasatinib was the most effective, while SU6656 showed a moderate effect and PP2 a minor effect. Cellular signaling was affected very differently, with PP2 having no effect on SFK signaling, while dasatinib likely has non-SFK-specific effects on tyrosine kinases. Only SU6656 showed clear SFK-specific effects on cellular signaling. The results of this work underscore the potential benefit of SFK inhibition in HNSCC, but also clearly highlight a need for more precise target and drug characterization.

4. Literaturverzeichnis

1. Du E, Mazul AL, Farquhar D, et al. Long-term survival in head and neck cancer: impact of site, stage, smoking, and human papillomavirus status. *Laryngoscope*. 2019;129:2506-2513.
2. R veyda Dok, Sandra Nuyts. HPV positive Head and Neck Cancers: Molecular Pathogenesis and Evolving Treatment Strategies. *Cancers (Basel)*. 2016 Mar 29;8(4):41. doi: 10.3390/cancers8040041. PMID: 27043631; PMCID: PMC4846850.
3. Suh Y, Amelio I, Guerrero Urbano T, Tavassoli M. Clinical update on cancer: molecular oncology of head and neck cancer. *Cell Death Dis*. 2014 Jan 23;5(1):e1018. doi: 10.1038/cddis.2013.548. PMID: 24457962; PMCID: PMC4040714.
4. Bussmann L, Hoffer K, von Bargen CM et al. Analyzing tyrosine kinase activity in head and neck cancer by functional kinomics: identification of hyperactivated Src family kinases as prognostic markers and potential targets. *Int J Cancer*. 2021; 149(5):1166-1180.
5. Kriegs M, Clauditz TS, Hoffer K, et al. Analyzing expression and phosphorylation of the EGF receptor in HNSCC. *Sci Rep*. 2019;9(1):13564.
6. Bartscht T, Rosien B, Rades D, et al. Inhibition of TGF-beta signaling in tumor cells by small molecule Src family kinase inhibitors. *Anticancer Agents Med Chem*. 2017;17(10):1351-1356.
7. Blake RA, Garcia-Paramio P, Parker PJ, Courtneidge SA. Src promotes PKCdelta degradation. *Cell Growth Differ*. 1999;10(4):231-241.
8. Brandvold KR, Steffey ME, Fox CC, Soellner MB. Development of a highly selective c-Src kinase inhibitor. *ACS Chem Biol*. 2012;7(8):1393-1398.
9. Xi S, Zhang Q, Dyer KF, et al. Src kinases mediate STAT growth pathways in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Biol Chem*. 2003;278(34):31574-31583.
10. Lombardo LJ, Lee FY, Chen P, et al. Discovery of N-(2-chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-iperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino) thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. *J Med Chem*. 2004;47(27):6658-6661.
11. Nautiyal J, Majumder P, Patel BB, Lee FY, Majumdar AP. Src inhibitor dasatinib inhibits growth of breast cancer cells by modulating EGFR signaling. *Cancer Lett*. 2009;283(2):143-151.
12. Leung HW, Leung CON, Lau EY, et al. EPHB2 activates betacatenin to enhance cancer stem cell properties and drive Sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2021; 81(12):3229-3240.
13. Kimani SG, Kumar S, Davra V, et al. Normalization of TAM post-receptor signaling reveals a cell invasive signature for Axl tyrosine kinase. *Cell Commun Signal*. 2016;14(1):19.
14. Wei L, Yang Y, Zhang X, Yu Q. Altered regulation of Src upon cell detachment protects human lung adenocarcinoma cells from anoikis. *Oncogene*. 2004;23(56):9052-9061.
15. Dickerson EB, Marley K, Edris W, et al. Imatinib and Dasatinib inhibit Hemangiosarcoma and implicate PDGFR-beta and Src in tumor growth. *Transl Oncol*. 2013;6(2):158-168.
16. Arai R, Tsuda M, Watanabe T, et al. Simultaneous inhibition of Src and Aurora kinases by SU6656 induces therapeutic synergy in human synovial sarcoma growth, invasion and angiogenesis in vivo. *Eur J Cancer*. 2012;48(15):2417-2430.
17. Bain J, McLauchlan H, Elliott M, Cohen P. The specificities of protein kinase inhibitors:

- an update. *Biochem J.* 2003;371(Pt 1):199-204.
18. Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J.* 2000;351(Pt 1):95-105.
 19. Broekman F, Giovannetti E, Peters GJ. Tyrosine kinase inhibitors: multi-targeted or single-targeted? *World J Clin Oncol.* 2011;2(2):80-93.
 20. Morphy R. Selectively nonselective kinase inhibition: striking the right balance. *J Med Chem.* 2010;53(4):1413-1437.
 21. Fallahi P, Ferrari SM, Santini F, et al. Sorafenib and thyroid cancer. *BioDrugs.* 2013;27(6):615-628.
 22. Liu C, Zhu X, Jia Y, et al. Dasatinib inhibits proliferation of liver cancer cells, but activation of Akt/mTOR compromises dasatinib as a cancer drug. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2021;53(7):823-836.

5. Abkürzungsverzeichnis

ATP	<i>Adenosintriphosphat</i>
CCD	<i>Charge Coupled Device</i>
DMEM	<i>Dubecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraessigsäure</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
FCS	<i>Fetales Kälberserum</i>
HNSCC	<i>Head and Neck Squamous Cell Carcinoma</i>
HPV	<i>Humane Papillomviren</i>
M-PER	<i>Mammalian Extraction Buffer</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
SFK	<i>Src Family Kinases</i>
STR	<i>Short Tandem Repeat</i>
WB	<i>Western Blot</i>

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Hemmung der Proliferation durch SFK-Inhibition	7
Abbildung 2: Zellinaktivierung durch SFK-Inhibitoren	8
Abbildung 3: SFK-Signalübertragung in HSC4-Zellen	9

7. Erklärung des Eigenanteils

Die Arbeit wurde im Labor für Strahlenbiologie & Experimentelle Radioonkologie (Ltg. Prof. Dr. Kai Rothkamm) als Teil der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie (Ltg. Prof. Dr. Cordula Petersen) am Hubertus Wald Tumorzentrum, University Cancer Center Hamburg (UCCH), Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf unter der Betreuung von PD Dr. Malte Kriegs durchgeführt. Die Studienkonzeption erfolgte durch PD Dr. Malte Kriegs.

Die folgenden Versuche wurden nach Einarbeitung durch BTA Konstantin Hoffer von mir eigenständig durchgeführt, ausgewertet und interpretiert: Proliferationstests (s. 1.2.3), Kolonietests (s. 1.2.4), Western Blot (s. 1.2.6).

Zudem habe ich die Ganzzelllysate für die Kinomanalysen (durchgeführt durch die UCCH Kinomics Core Facility) angefertigt und die Ergebnisse zusammen PD Dr. Malte Kriegs interpretiert.

Die statistische Auswertung erfolgte durch mich und Frau Lara Akingunsade.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig nach Anleitung durch PD Dr. Malte Kriegs verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

8. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe, insbesondere ohne entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten, verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Das gilt insbesondere auch für alle Informationen aus Internetquellen.

Soweit beim Verfassen der Dissertation KI-basierte Tools („Chatbots“) verwendet wurden, versichere ich ausdrücklich, den daraus generierten Anteil deutlich kenntlich gemacht zu haben. Die

„Stellungnahme des Präsidiums der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) zum Einfluss generativer Modelle für die Text- und Bilderstellung auf die Wissenschaften und das Förderhandeln der DFG“ aus September 2023 wurde dabei beachtet.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Datum 11.11.2024

Unterschrift



9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich während meiner Dissertation unterstützt haben. An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater PD Dr. Malte Kriegs für seine warmherzige Betreuung danken, wie auch Herrn Konstantin Hoffer, der mir mit Witz, Geduld und Erfahrung bei der praktischen Durchführung der Experimente zur Seite stand. Vielen Dank auch meinen Laborkompagnons – Agnes, Lara und Steffi – für all den Spaß und den Austausch den wir miteinander hatten, wie auch meiner wundervollen Familie, insbesondere meinem Mann Daniel!